

新規抗腫瘍性シトシンヌクレオシドの開発 Development of new antitumor cytosine nucleosides

佐々木琢磨*, 小幡徹, 田中基裕
Takuma Sasaki*, Tohru Obata, Motohiro Tanaka

愛知学院大学 薬学部 生体有機化学講座
Laboratory of Bio-Organic Chemistry, School of Pharmacy, Aichi-Gakuin University,
1-100 Kusumoto, Chikusa, Nagoya 464-8650, Japan

腫瘍細胞内で代謝的に活性化される抗腫瘍性ヌクレオシドは様々な腫瘍の治療に使われている。1-β-D-*arabino* furanosylcytosine(cytarabine,AraC)、6-mercaptapurine、9-β-D-*arabino*furanosyl-2-fluoroadenine 5'-monophosphate(fludarabine, FaraAMP)等の抗腫瘍性ヌクレオシドは白血病治療に重要な役割を担っており、2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine (gemcitabine, dFdC)や5-fluorouracil(5-FU)とその誘導体は多種類の固形腫瘍の治療に幅広く使用されている。これらの化合物はいずれも内在性のヌクレオシドやヌクレオチドと同様に代謝される。代謝活性化体はヌクレオシドやヌクレオチドの*de novo*合成阻害や、chain-terminatorとしてDNA鎖に取り込まれた後DNA鎖伸張を阻害する。DNA鎖に取り込まれた抗腫瘍性ヌクレオシドは鎖切断を引き起こし、最終的にはアポトーシスを誘導する。抗腫瘍性ヌクレオシドは1つもしくは複数の特異的な酵素を標的としている。同じような抗腫瘍性ヌクレオシドでも標的酵素の阻害様式は同じとは限らない。AraCやdFdCは同じ塩基を分子内に持ち、どちらもデオキシシチジンキナーゼ(dCK)によってリン酸化され、シチジンデアミナーゼ(CDA)によって不活性化されるが、その阻害様式は異なっている。しかも、dFdCは固形腫瘍に対して抗腫瘍活性を示すが、AraCは示さない。これらの抗腫瘍性ヌクレオシドの薬物動態学的特性の相異は標的酵素に対する阻害様式の違いを反映していることが示唆される。この総説では、抗がん剤の中で最も長い歴史を持ち、今なお進歩を遂げている代謝拮抗剤の中のヌクレオシド系核酸代謝拮抗剤、特に著者らが開発中の糖部を修飾した抗腫瘍性シトシンヌクレオシドについて概説する。

Keywords: antitumor activity; metabolism and mechanism of action; sugar-modified cytosine nucleoside

核酸代謝拮抗抗がん剤の概要

代謝拮抗抗がん剤は、主に核酸生合成前駆体の「似て非なる」誘導体で、核酸の生合成阻害に基づく細胞毒性を基本とした抗がん剤であり、「細胞障害性抗がん剤」に分類され、核酸代謝拮抗剤とも呼ばれる。本邦においては現在約20種の核酸代謝拮抗剤が臨床で用いられており、その主たる作用には、核酸代謝酵素等の標的分子に結合することによりその酵素活性を阻害するものと、DNAあるいはRNA合成酵素の基質となり一旦DNAやRNA鎖に取り込まれた後にさらなる合成(鎖伸長)を阻害するものがある。核酸代謝拮抗剤にはフッ化ピリミジン系と非フッ化ピリミジン系薬剤がある。非フッ化ピリミジ

ン系薬剤には、本稿の主題であるデオキシシチジン誘導体の他にプリン系、葉酸代謝拮抗剤がある。具体的には、AraC、2-chloro-2'-deoxyadenosine (cladribine, 2-CIA)、FaraAMP(図1)等があり、ほとんどは白血病や悪性リンパ腫等の血液腫瘍に対する治療薬である¹⁾。dFdC(図1)は抗白血病治療薬ではなく固形腫瘍に有効な抗がん剤として幅広く使用されている。抗ウイルス剤のような他の核酸代謝拮抗剤と同様に、これらの薬剤(ヌクレオシド)自身に抗腫瘍活性はなく、リン酸化によって代謝的に活性化される。従って、臨床応用の際は、ヌクレオシドキナーゼの基質特異性ががん組織におけるヌクレオシドキナーゼの発現量が薬剤の効果発現に重要な要因となる。

*Corresponding author.
Takuma Sasaki
Tel: +81 52 757 6768; fax: +81 52 757 6799.
E-mail address: takuma@dpc.aichi-gakuin.ac.jp

しかしながら、代謝活性化された薬剤（ヌクレオチド）の標的酵素（因子）は各薬剤間で幾分異なっている。AraCTP(AraCの代謝活性化体)は、DNAポリメラーゼ α のDNA鎖伸張反応においてdeoxycytidine 5'-triphosphate(dCTP)と拮抗的に阻害し、それに起因したアポトーシスの誘導が知られている。2-CIATP(2-CIAの代謝活性化体)はDNAポリメラーゼを阻害し、deoxyadenosine 5'-triphosphate(dATP)に拮抗的にリボヌクレオチドリダクターゼ(RNR)も阻害する²⁾。FaraATP(FaraAMPの代謝活性化体)はDNAポリメラーゼ、RNR、DNAプライマーゼ、DNAリガーゼ等を阻害し、さらにRNA合成も阻害する²⁾。dFdCTP(dFdCの代謝活性化体)はDNAポリメラーゼを阻害し、ジリン酸体であるdFdCDPがRNRを阻害する³⁾。このような標的酵素の違いは、抗腫瘍スペクトルの違いに関与していると考えられ、新規の抗腫瘍性ヌクレオチドの開発はがん治療において重要な戦略方法の一つである。我々は糖部を修飾したヌクレオチドとして、1-(2-deoxy-2-methylene- β -D-erythropentofuranosyl) cytosine(DMDC)、1-(2-C-cyano-2-deoxy-1- β -D-arabinopentofuranosyl) cytosine(CNDAC)、1-(3-C-ethynyl- β -D-ribo-pentofuranosyl) cytosine(ECyd)等を北海道大学薬学部松田彰教授グループと共同で開発してきた(図1)^{4,5)}。

本稿では、これらの新規抗腫瘍性シトシンヌクレオチドを中心として最新の知見を交え概説する。

抗腫瘍性ヌクレオチドの活性化と不活性化

哺乳類の細胞や組織内にはdCK、チミジンキナーゼ-1(TK1)、アデノシンキナーゼ(AK)、ウリジン/シチジンキナーゼ(UCK)の4つのヌクレオチドキナーゼが存在し、

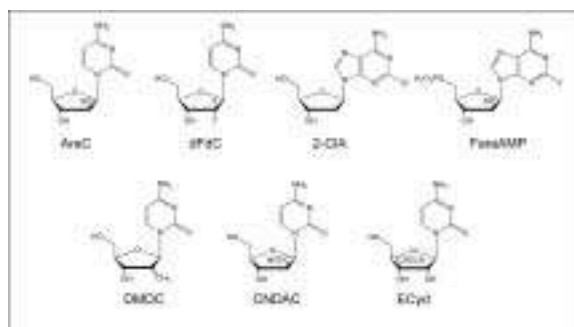


図1. 抗腫瘍性ヌクレオチドの化学構造

[(1- β -D-arabinofuranosyl)cytosine]; AraC], [(2'-deoxy-2',2'-difluorocytidine);dFdC], [(2-chloro-2'-deoxyadenosine);2-CIA],[(9- β -D-arabinofuranosyl-2-fluoro-adenine5'-monophosphate);FaraAMP],[(1-(2-deoxy-2-methylene- β -D-erythro-pentofuranosyl)cytosine);DMDC],[(1-(2-C-cyano-2-deoxy-1- β -D-arabinopentofuranosyl)cytosine);CNDAC],[(1-(3-C-ethynyl- β -D-ribo-pentofuranosyl)cytosine);ECyd]

ミトコンドリア内にはチミジンキナーゼ-2(TK2)とデオキシグアノシンキナーゼ(dGK)が存在する^{6,8)}。臨床で使用されているAraC、2-CIA、dFdC等の多くの抗腫瘍性ヌクレオチドはdCKによって5'-モノリン酸体へとリン酸化され、さらにヌクレオチドモノリン酸体キナーゼ(NMPK)、ヌクレオチドジリン酸体キナーゼ(NDPK)によってトリリン酸体へと変換される(図2)。これらのヌクレオチドキナーゼの中でもdCKは抗腫瘍性ヌクレオチドが抗腫瘍効果を発揮するためのリン酸化酵素として基質特異性が低い、誘導体作りに最適な酵素であると考えられている。即ち、1) dCKは細胞周期非依存的で、恒常的なmRNAとタンパク質発現がある。2) dCKは他のヌクレオチドキナーゼよりも基質特異性が低い。3) 固形腫瘍の多く(脳と肝臓以外)はdCK活性を有している。4) 多くの腫瘍のdCK発現量は正常組織やB細胞性慢性リンパ腫よりも3-5倍高く発現している。これらの理由から、dCK依存型化学療法剤の開発は世界的な規模でなされてきた。

dCKは生成物であるdCTPによって抑制されるフィードバック阻害を受けるので、抗腫瘍性ヌクレオチドがトリリン酸体へ代謝され、それがdCKのフィードバック阻害剤として働くか否かが、その抗腫瘍活性の発揮に重要な要因となる。AraCTPはdCTPの様にdCKをフィードバック阻害することが知られており、AraCの弱点の一つである。また、AraC、dFdC、DMDC、CNDAC等の抗腫瘍性デオキシシトシンヌクレオチドに対する耐性細胞では、dCK遺伝子の異常が高頻度に認められていることから、dCKは抗腫瘍性デオキシシトシンヌクレオチドの効果発現に必須の酵素であることは明白である^{9,10)}。しかし、耐性初期段階ではdCKの遺伝子異常や酵素活性の減弱は認められず、ヌクレオチドの細胞内取込み量の著減のみが観察された¹¹⁾。

抗腫瘍性ヌクレオチドは、細胞膜上に存在するヌクレオチドトランスポーターを介して細胞内に輸送されるので(図2)、腫瘍細胞に発現するヌクレオチドトランスポーターはこれらの薬剤の感受性に大きな影響を与える因子となる。ヒトのヌクレオチドトランスポーターにはNa⁺非依存型促進拡散系(ENT-1~4)とNa⁺依存型能動輸送系(CNT-1~3)が存在する。我々は、CNDACおよびECydの耐性細胞におけるヌクレオチドトランスポーターの機能的変化を解析し、耐性初期細胞ではNa⁺非依存型促進拡散系の機能的発現の減少が感受性の低下に関連することを明らかにした¹¹⁾。また、Na⁺非依存型促進拡散系を腫瘍細胞に過剰発現させて、感受性との関連性を検討した結果、ENT-1とENT-2が感受性に重要なトランスポーターであることを明らかにした。一方、ENT-3およびENT-4は細胞膜ではなく細胞内小器官上に発現し、薬剤の感受

性には関与していなかった¹²⁾。従って、ヌクレオシド誘導体に対する感受性および耐性化関連因子として、ヌクレオシドキナーゼや分解酵素と共に、ヌクレオシドトランスポーターも極めて重要であることが示唆された。

抗腫瘍活性試験では、*in vitro*において十分な細胞毒性を示すと、次は担がんマウスやラットを用いた*in vivo*での抗腫瘍活性試験が行われる。しかし、ヌクレオチド合成に関する酵素活性はヒトと齧歯類ではかなり異なっている。抗腫瘍性シトシンヌクレオシドの分解酵素であるCDAはシトシンヌクレオシドを抗腫瘍性のないウラシル体へと分解する(図2)。齧歯類のCDA活性は一般に弱い、ヒトでは高いことが知られている。DNAポリメラーゼ等の標的酵素を強く阻害するためには抗腫瘍性ヌクレオシドが代謝され、ある一定以上の細胞内濃度にリン酸化されたヌクレオチドを保つ必要があり、腫瘍細胞内でのヌクレオチドの安定性が抗腫瘍性ヌクレオシドの効果発現のために重要であると考えられる。AraCTPは腫瘍細胞内で不安定であることが知られているが、後述するようにECTP(ECydのトリリン酸体)は細胞内に安定に存在することが明らかになっている。

代表的既存抗腫瘍性シトシンヌクレオシド、AraCとdFdCの比較

我々が糖部を修飾した抗腫瘍性シトシンヌクレオシドの開発を意図した時、シトシンヌクレオシドとしては、現在もヒト急性骨髄性白血病に対する第一選択薬剤であるAraCだけが治療薬として臨床で使用されていた¹³⁾。AraCは、1950年代にバハマのビミニ島に生息する海綿動物より見出されたspongothymidineとspongouridineを母

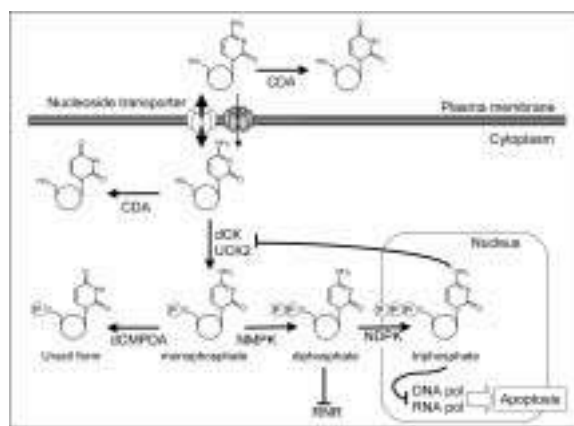


図2. 抗腫瘍性ヌクレオシドの代謝経路

CDA (シチジンデアミナーゼ)、dCK (デオキシシチジンキナーゼ)、UCK (ウリジン/シチジンキナーゼ)、dCMPDA (dCMPデアミナーゼ)、NMPK (ヌクレオシドモノリン酸キナーゼ)、NDPK (ヌクレオシドジリン酸キナーゼ)、RNR (リボヌクレオチドリダクターゼ)

化合物として分子設計・化学合成され、シトシンのリボース2'位の水酸基をエピメリ化したヌクレオシド誘導体である。AraCはdCKの基質認識性が高く($K_m=8.8 \mu\text{M}$, CHO細胞)、さらに代謝されたAraCTPがDNAポリメラーゼ α によってDNAに取り込まれた後、DNAの伸張を阻害する。また、DNAポリメラーゼ β によるDNA損傷修復を阻害することも報告されている。白血病細胞に対するAraCの傷害性は、DNA複製の阻害とそれに起因したアポトーシスの誘導効果として理解されている。しかし、そのような活性にもかかわらず、AraCは固形腫瘍に対して抗腫瘍活性をほとんど示さない。その原因の一つとして、体液中や細胞内に存在する、脱アミノ化酵素であるCDAやdCMPデアミナーゼ(dCMPDA)の基質となり、抗腫瘍活性を持たないAraUやAraUMPに代謝され、不活性化されることが知られている。ヒトでは、腫瘍細胞以外に肝臓、脾臓、腸管粘膜、肺などの正常組織にもCDA活性が認められる。CDAに対する抵抗性や血中濃度の持続性の向上を図るため、AraCの多くのプロドラッグが開発されてきた¹⁴⁾。それらの幾つかは日本で白血病の治療に使われてきたが、これらのプロドラッグは、生体内でAraCに戻り活性化される過程を経て抗腫瘍性を発揮する。そのため、固形腫瘍に対して抗腫瘍効果を示さない。

糖部を修飾したシトシンヌクレオシドであるdFdCは、デオキシシチジンのリボース2'位の2つの水素原子をフッ素原子に置換した誘導体で、当初抗ウイルス剤として開発されたが(1986年)^{15,16)}、その後固形腫瘍に対しても広範な抗腫瘍スペクトルを有していることが明らかになり、抗がん剤としての開発が進められた。dCKはdFdCに高い基質認識性を示し($K_m=3.6 \mu\text{M}$, CHO細胞)、さらにジリン酸体(dFdCDP)、トリリン酸体(dFdCTP)へとリン酸化される。dFdCDPはRNRの強力な阻害剤である。一方、dFdCTPはDNA合成を阻害するが、その効果はAraCTPよりも弱い。また、dFdCTPはdCMPDAやCTP合成酵素も阻害し、RNAに取り込まれる¹⁷⁾。dFdCは当初シスプラチン等の抗がん剤との併用によって、膵臓がん患者の生存期間の延長ではなくQOLを改善するための抗がん剤として米国のFood and Drug Administration(FDA)に承認されたが、現在では非小細胞肺癌および膵臓がん患者の生存期間延長にも有効であることが知られている。我が国でも、非小細胞肺癌および膵臓がんの治療薬として承認されている。

新規抗腫瘍性シトシンヌクレオシドの開発

1. 1-(2-Deoxy-2-methylene- β -D-erythropentofuranosyl)cytosine (DMDC)

DMDC(図1)はリボース3'位に第二級アルコールをもつアリルアルコール系の化合物である。このDMDC分子中

のアリルアルコールはヌクレオシドレベルでは安定であるが、細胞内キナーゼによって5'-リン酸体にリン酸化され、以下のような化学反応性を持つことが予想された。すなわち、(1) 5'-ジリン酸体レベル(DMDCDP)で、酵素反応によって3'-ラジカルが形成されるとRNRの非可逆阻害剤になる。(2) DNAポリメラーゼの阻害剤である5'-トリリン酸体(DMDCTP)はDNAに取り込まれると求核剤によって開裂する反応性の高いアリルリン酸エステルになる。

マウス白血病L1210細胞や様々なヒト腫瘍細胞株に対するDMDCの*in vitro*細胞毒性効果はAraCより強い活性を示した^{18,19}。更に、DMDCの抗腫瘍スペクトルは5-FUに似ており、AraCとは異なる。DMDCはAraCと異なり、マウス腎臓由来のCDAの基質にはならなかった。また、化学的に合成されたDMDCTPは実際にdCTPと拮抗することでDNAポリメラーゼ α 、 β 、 γ を強く阻害した。さらに、合成誘導型-プライマー系を用いた実験系でDMDCTPがDNAポリメラーゼ α によってDNA分子のグアニンの相補的位置に取り込まれることが明らかになった。この実験でDMDCTPは明らかにchain-terminatorとして働いていることが明らかになったが、単なるchain-terminatorとして働いているのか、我々の期待通りにDNA鎖切断の結果なのかは未だ証明されていない。また、L1210細胞やヒト肺がんLX-1細胞のRNRを阻害しなかったが²⁰、DMDCDPが大腸菌のRNRを時間依存的に阻害するという報告がある²¹。

DMDCの*in vivo*抗腫瘍効果はL1210細胞を腹腔内に移植した担がんCD2F1マウスを用いて検討された。250mg/kgのDMDCを5日間静脈内に連投した結果、235%のT/C(処置群の生存日数の対照群のそれに対する比)が得られた²²。DMDCの抗腫瘍活性はスケジュール依存的で、より高い治療効果は単回投与よりも連日投与で得られた。また、DMDCはAraCに低感受性の腫瘍であるマウス大腸がんcolon26細胞、マウス卵巣肉腫M5076細胞、ヒトメラノーマ腫瘍SK-Mel-28細胞、ヒト肺がんLX-1細胞に対しても強い抗腫瘍効果を示した。ヒト腫瘍移植モデルのCDAの腫瘍内活性レベルとDMDCの抗腫瘍効果は良く相関していた^{23,24}。DMDCは高いCDA活性をもつ腫瘍でより高い抗腫瘍効果を示し、低レベルのCDAではわずかな抗腫瘍活性しか認められなかった。一方、dFdCはCDA活性が高い腫瘍では、弱い抗腫瘍活性しか認められなかった。dCKによるDMDCの活性化(リン酸化)は細胞内のデオキシシチジンによって拮抗的に阻害される。従って、CDAによって制御される腫瘍細胞内デオキシシチジン濃度はDMDCのリン酸化の重要な要因の一つであり、DMDCの薬剤感受性に深く関与していると考えられる。

固形腫瘍に対するDMDCの静脈内投与による臨床第I相試験はすでに日本で実施されている²⁵。主な用量制限毒性は血液毒性、特に白血球減少と好中球減少であり、5連投の最大耐量は40mg/m²である。また、経口投与による臨床第I相試験も行われている²⁶。用量制限毒性は食欲不振、白血球減少、血小板減少、貧血である。全身倦怠感が非血液学的毒性であり、最大耐量は18mg/m²/dayである。18mg/m²/dayの投与量では、半減期は1.7h、最大血中濃度(Cmax)が112.9ng/mL、1日の血漿中薬物濃度-時間曲線下面積(AUC)は399.8ng・h/mlである。投与量の40-50%が腎臓で再吸収され、高い生物学的利用率を示し、恒常的な経口投与が可能であることが示された。詳細な臨床薬物動態学的解析も報告されている²⁷⁻²⁹。更に効果が期待される、CDA活性の高い血液腫瘍に対する臨床試験の実施が望まれる。

2. 1-(2-C-Cyano-2-deoxy-1- β -D-arabinopentofuranosyl)cytosine (CNDAC)

ヌクレオシドのリボース2'位への電子吸引基の導入は2'位 α の水素の酸性度を増加させる。ヌクレオシドが酵素的にリン酸化された後にDNAに取り込まれると、電子吸引基がDNA中のリン酸ジエステルに対して β 位になる。この時、図3で示されるように β 脱離がDNA鎖の切断を引き起こす。放射線治療によるDNA鎖切断の誘導が腫瘍細胞を死滅させることが報告されているように、このような化学反応性を持つヌクレオシドも腫瘍細胞の増殖を抑制すると考えられた。そこで、デオキシシチジンのリボース2'位に電子吸引基を持つヌクレオシドとして、シチジンからCNDAC(図1)が分子設計・合成された³⁰⁻³⁴。

種々のヒト腫瘍細胞に対するCNDACの*in vitro*細胞毒性効果をAraCやDMDCと比較した結果、CNDACの抗腫瘍スペクトルはAraCとは全く異なり、CNDACの*in vitro*での細胞毒性効果はDMDCよりも若干弱いことが明らかになった。一方、CNDACの*in vivo*抗腫瘍効果をマウス白血病P388細胞を腹腔内に移植したCDF1マウスでAraCと比較検討した。CNDACを20mg/kgで10日間の静脈内連投を行ったところ、T/Cが600%以上で、6匹中5匹のマウスが60日以上生存を示し、治癒が認められた。しかし、同じ投与スケジュールのAraC投与群ではT/Cは225%を示し、治癒は認められなかった。このように、CNDACは*in vitro*での細胞毒性効果は低い、*in vivo*での抗腫瘍効果は高いという特徴がある。CNDACはdCKによってCNDACMPにリン酸化されるが、このリン酸化効率はデオキシシチジンの約半分程度であり、Km値は5倍も大きかった^{35,36}。CNDACMPの5'-トリリン酸体(CNDACTP)へのリン酸化は抗腫瘍活性の発揮に必須である³⁷。AraCTPと異なり、dCKに対するフィードバック阻害作

用は非常に高濃度のCNDACTPでのみ認められるため、通常CNDACTPはdCKのフィードバック阻害剤としては働かないと考えられる³⁸⁾。また、CNDACはマウス腎臓由来のCDAの低活性基質であり、デオキシシチジンの4.2%の基質活性しか示さなかった。CNDACTPはDNAポリメラーゼ α を0.16 μ MのKi値で拮抗阻害し、AraCTPのKi値よりも7倍低かった。In vitroのDNAプライマー伸張実験ではCNDACMPが伸張するDNA鎖のC部位に取り込まれ、取り込まれた位置でDNAプライマーの伸張の停止を引き起こすことが明らかになった。CNDACTPのDNAポリメラーゼ α に対する基質認識性は高く、dCTPと同様の基質効率を示した。DNA鎖にCNDACMPが取り込まれた後、その立体的効果のため、更なる伸長反応は遅延された。しかし、一旦ヌクレオチドがCNDACMPの次に結合すると、我々の仮説(図3)通りに β 脱離が起こり2'-C-cyano-2',3'-didehydro-2'3'-dideoxycytidine(ddCNC)が生成する^{33,37,39)}。ddCNCの生成を証明することにより、この β 脱離反応は酵素レベルだけでなく、腫瘍細胞レベルでも確認することができた。DNA鎖に取り込まれた後、 β 脱離反応を介したDNA鎖切断を誘導する化学反応性はCNDAC独自の極めてユニークな作用機構である。AraCやdFdCで認められるS期阻害とは異なり、この特徴的なCNDACの鎖切断機構がG₂期での細胞周期停止を誘導する原因の一端となっていると考える。放射線照射やシスプラチン等のDNA傷害は細胞周期をG₂期で停止させることが知られているが、CNDACによって起こる β 脱離反応を介するDNA鎖切断がシスプラチン等で活性化されるシグナル伝達機構を活性化している可能性がある^{39,40)}。

CNDACは齧歯類のCDAに対して低い親和性を示すが、CDAはヒトに豊富に含まれしかも活性が高いため、CNDACの主な不活性化酵素であることは間違いない。そこでCDA抵抗性を示すようなCNDACの更なる誘導体を開発した。多くの誘導体の中でも、CNDACのN-4位

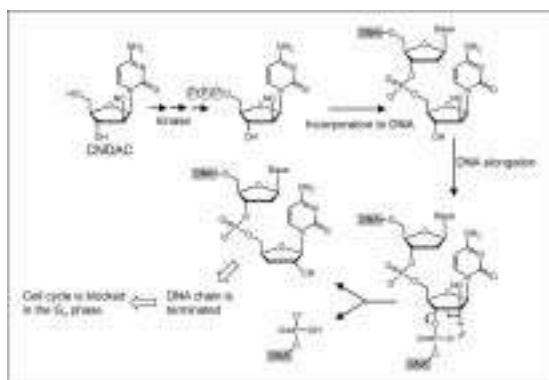


図3. CNDACの鎖切断機構

をパルミトイル化した、N⁴-palmitoyl CNDAC(PCNDAC, CS-682)の経口投与が皮下移植されたM5076細胞に対して最も強い抗腫瘍効果を示した。PCNDACはプロドラックであり、生体内でパルミトイル基が外れCNDACとなり、それがdCKによりリン酸化され抗腫瘍性を示す。PCNDACはin vitroで細胞毒性を示すが、これは遊離したパルミチン酸による細胞毒性であり、PCNDACはdCKの基質にならない(内田博之、私信)。PCNDACの経口投与はCNDACや5'-deoxy-5-fluorouridine、5-FU、dFdC等と比較しても、低い副作用でヒト腫瘍移植モデルに対してより強い効果を示した。さらに、PCNDACはマイトマイシンC、ビンクリスチン、5-FU、シスプラチンに対する耐性P388細胞に対してもin vivoで顕著な効果を示した³⁷⁾。これらの実験系における優れた抗腫瘍効果の結果を基に、経口投与による臨床試験が、現在、欧米において実施されている⁴¹⁾。

3. 1-(3-C-Ethynyl- β -D-ribofuranosyl)cytosine(ECyd)

腫瘍細胞は不均一性であることが知られており、腫瘍組織の細胞周期は同調されていない。固形腫瘍は大きくなるにつれ、増殖速度が鈍くなり、腫瘍の一部分のみしか増殖しなくなる。抗がん剤はがん細胞の分裂期に作用するため、増殖が鈍化あるいは停止している細胞には化学療法剤の感受性が低くなる。ヌクレオシド系代謝拮抗剤の殆どは、増殖期にある細胞のS期を標的にしている。固形腫瘍において増殖期の細胞は一部に過ぎず、そこではDNA修復とRNA合成のみが行なわれているので、固形腫瘍に対して十分な効果を発揮するためには、DNA合成阻害のみならずRNA合成の阻害も必須であると考え、DNAだけでなくRNA合成も阻害する抗腫瘍性ヌクレオシドの開発を企画した。すなわち、5'-ジリン酸体(ECDP)がRNRを阻害し、5'-トリリン酸体(ECTP)がRNAポリメラーゼを阻害する、DNAとRNA合成の両方を阻害するヌクレオシドとして、ECyd(図1)が分子設計・合成された⁴²⁻⁴⁸⁾。

ECydはnM以下のIC₅₀値で種々のヒト腫瘍細胞株に対してin vitroで強い細胞毒性効果を示した。ECydの抗腫瘍スペクトルは、DNA合成阻害剤AraC、DMDC、CNDACのいずれとも異なっていた。また、ECydはヌードマウスやヌードラットに移植した様々なヒト移植腫瘍に対しても静脈内投与で強い抗腫瘍効果を示した。この強い抗腫瘍効果はスケジュール依存的であり、下痢、骨髄抑制、体重減少といったDNA合成阻害剤で頻繁に認められる副作用も顕著でない^{49,50)}。前述のDMDCとCNDACは2'-デオキシシチジン誘導体であり、DNAポリメラーゼによるDNA鎖伸長反応をchain-termination活性により強力に阻害する。一方、リボースの3'- β 位にエチニル基を導入

したECydは従来の抗腫瘍性ヌクレオシドにはないRNAポリメラーゼによるRNA合成阻害を主作用とする核酸代謝拮抗剤として、種々のヒト固形腫瘍細胞に対して優れた抗腫瘍活性を示した。

ECydが示す顕著な抗腫瘍活性の発現のためには、ECydを5'-モノリン酸体(ECMP)にリン酸化するUCKが重要な酵素であり、その後ECMPはECDP、ECTPへと次々とリン酸化される(図2)。ECydの最終代謝物のECTPは細胞内に蓄積し、AraCTPの細胞内半減期はわずか10分以内であるのに対してECTPはマウス乳がんFM3A細胞で半減期が81時間と安定に存在し、細胞内ECTPはAraCTPよりも約500倍も安定であることが示された⁵⁰。FM3A細胞から抽出した核を用いた実験で、ECTPによってRNAポリメラーゼは拮抗的に阻害された。CTPのRNAポリメラーゼに対するKm値は8 μ Mであるが、ECTPのKi値は21nMであった⁵⁰。In vitroでのFM3A細胞の増殖に対するIC₅₀値は30 μ Mであるので、ECydが細胞毒性を示すときにECTPがRNAポリメラーゼを阻害していると考えられた⁵¹。真核生物には3種類のRNAポリメラーゼ(I、II、III)が存在するが、ECTPはこれらのポリメラーゼに対して非特異的に阻害することが明らかになった⁴⁷。また、このRNA合成阻害は腫瘍細胞にアポトーシスを誘導し、このアポトーシスの誘導にはRNaseLの活性化による28SリボソームRNAの部位選択的な切断が引き金となっていることが明らかとなった^{50,52}。ECydはマウス腎臓由来CDAの基質になりにくい、その脱アミノ化誘導体1-(3-C-ethynyl- β -D-ribofuranosyl)uracil(EUrd)は5'-トリリン酸体(EUTP)へと代謝され、84nMのKi値でRNAポリメラーゼを阻害し(UTPのKm値は13 μ M)、ECydと同様の細胞毒性を示した^{43,50,53}。なお、ECydはその5'-ジリン酸体(ECDP)が、前述のようにRNRも阻害することを期待して分子設計されたが、mMの濃度でも大腸菌由来のRNRを阻害しなかった。

ヒト腫瘍組織のUCK活性は正常組織に比べ相対的に高いことが知られており、ECydの腫瘍選択的細胞毒性は臨床でも期待できると考えている。近年、UCK1とUCK2といった2つからなるUCKファミリーがヒト細胞で報告された^{54,55}。ECydのリン酸化に関与するアイソザイムを決定することは更に有効な抗腫瘍性ヌクレオシドの開発に重要なことである。我々は10種類のヒト腫瘍細胞パネルでUCK1とUCK2の発現量をmRNAとタンパク質レベルで検討し、さらにECydに対するリン酸化能を比較検討した⁵⁶。ヒト腫瘍細胞のUCK活性はECydの感受性と良く相関していた。更に、UCK2のmRNAとタンパク質の発現量がこれらのヒト腫瘍細胞株でECydの感受性と非常に良く相関していたが、UCK1では全く関連性を示さなかった。UCK2のタンパク質発現レベルを数種のヒト

腫瘍組織と対応する正常組織と比較したところ、UCK2タンパク質の発現は、いずれのヒト正常組織でも検出されなかったが、ヒト腫瘍組織では5例中4例で検出され、特に膵臓がん組織で高発現の傾向が認められた。このように、ECydとEUrdのモノリン酸化にはUCK2が関与し、ECydとEUrdの耐性細胞ではUCK2のmRNAおよびタンパク質の発現が減少すると共にUCK2遺伝子に変異が存在することを明らかにした⁵⁷。UCK2の発現はECydに対する感受性と密接に相関し、ECydの腫瘍選択的細胞毒性に寄与すると考えられる。ECydは現在、米国において固形腫瘍に対して臨床第I相試験中である。

おわりに

長い間、抗腫瘍性シトシンヌクレオシドは血液腫瘍の治療にしか適応できないと思われてきた。しかし、固形腫瘍の臨床治療においてもdFdCが顕著な抗腫瘍効果を示すことが明らかになり、抗腫瘍性シトシンヌクレオシドが再び大きな脚光を浴びている。我々が開発したDMDC、CNDACの作用機序は、同じデオキシチジン誘導体であるdFdCの作用機序と幾分異なっている。従って、これらの新しい抗腫瘍性シトシンヌクレオシドに関して、最適な投与方法やプロドラッグが開発されれば、様々な腫瘍に対してdFdCとは異なった臨床適応が期待できる。更に、RNAポリメラーゼを標的にしている新規抗腫瘍性リボヌクレオシドのECydはdFdCなどの従来のデオキシチジン誘導体と代謝経路も全く異なるため、これらの誘導体に耐性になった腫瘍に対する第二次選択薬剤や併用化学療法剤として極めて有用であると考えられる。本稿が新規抗がん剤の開発研究に関心を抱く若い研究者の参考になれば幸いである。

この研究に関しては、本文で触れなかった多くの仕事を含めて、大変多くの人に協力していただいております。松田彰教授(北海道大学薬学部)と遠藤良夫准教授(金沢大学がん研究所)の両先生の名を挙げるのにとどめることで、全部の皆さんへの謝辞に代えることをご容赦いただきたい。

文献

- 1 Montgomery JA, Ananthan S, Parker WB, Secrist JAL, Temple CG. Cancer Chemotherapeutic Agents. Washington DC: Amer Chemical Society, 1995; 47-110
- 2 Tsimberidou AM, Alvarado Y, Giles FJ, *Expert Rev Anticancer Ther*, **2**, 437-448 (2002).
- 3 Jacobs AD, *Cancer*, **95**, 923-927 (2002).
- 4 Matsuda A, Azuma A, Nakajima Y, Takenuki K, Dan A, Iino T, Yoshimura Y, Minakawa N, Tanaka M, Sasaki T. The synthesis and antitumor activity of 2'-

- deoxy-(2'-C-substituted) cytidines. New York: Plenum Press, 1993; 1-22
- 5 Masuda A, Sasaki T, *Cancer Sci*, **95**, 105-111 (2004).
 - 6 Arner ES, Eriksson S, *Pharmacol Ther*, **67**, 155-186 (1995).
 - 7 Johansson NG, Eriksson S, *Acta Biochim Pol*, **43**, 143-160 (1996).
 - 8 Eriksson S, Munch-Petersen B, Johansson K, Eklund H, *Cell Mol Life Sci*, **59**, 1327-1346 (2002).
 - 9 Obata T, Endo Y, Tanaka M, Matsuda A, Sasaki T, *Cancer Lett*, **123**, 53-61 (1998).
 - 10 Obata T, Endo Y, Tanaka M, Uchida H, Matsuda A, Sasaki T, *Jpn J Cancer Res*, **92**, 793-798 (2001).
 - 11 Obata T, Endo Y, Murata D, Sakamoto K, Sasaki T, *Curr Drug Targets*, **4**, 305-313 (2003).
 - 12 Endo Y, Obata T, Murata D, Ito M, Sakamoto K, Fukushima M, Yamasaki Y, Yamada Y, Natsume N, Sasaki T, *Cancer Sci*, **98**, 1633-1637 (2007).
 - 13 Gmeiner WH, *Biopolymers*, **65**, 180-189 (2002).
 - 14 Hadfield AF, Sartorelli AC, *Adv Pharmacol Chemother*, **20**, 21-67 (1984).
 - 15 Hertel LW, Boder GB, Kroin JS, Rinzel SM, Poore GA, Todd GC, Grindey GB, *Cancer Res*, **50**, 4417-4422 (1990).
 - 16 Lopez C, Watanabe KA, Fox JJ, *Antimicrob Agents Chemother*, **17**, 803-806 (1980).
 - 17 Plunkett W, Huang P, Searcy CE, Gandhi V, *Semin Oncol*, **23**, 3-15 (1996).
 - 18 Matsuda A, Takenuki K, Tanaka M, Sasaki T, Ueda T, *J Med Chem*, **34**, 812-819 (1991).
 - 19 Ono T, Fujii A, Yamagami K, Hosoya M, Okumoto T, Sakata S, Matsuda A, Sasaki T, *Biochem Pharmacol*, **52**, 1279-1285 (1996).
 - 20 Kanazawa J, Takahashi T, Akinaga S, Tamaoki T, Okabe M, *Anticancer Drugs*, **9**, 653-657 (1998).
 - 21 Baker CH, Banzon J, Bollinger JM, Stubbe J, Samano V, Robins MJ, Lippert B, Jarvi E, Resvick R, *J Med Chem*, **34**, 1879-1884 (1991).
 - 22 Yamagami K, Fujii A, Arita M, Okumoto T, Sakata S, Matsuda A, Ueda T, Sasaki T, *Cancer Res*, **51**, 2319-2323 (1991).
 - 23 Eda H, Ura M, F. OK, Tanaka Y, Miwa M, Ishitsuka H, *Cancer Res*, **58**, 1165-1169 (1998).
 - 24 Miwa M, Eda H, Ura M, Ouchi KF, Keith DD, Foley LH, Ishitsuka H, *Clin Cancer Res*, **4**, 493-497 (1998).
 - 25 弦間昭彦, 工藤翔二, 福岡正博, *癌と化学療法*, **23**, 1799-1811 (1996).
 - 26 Masuda N, Matsui K, Yamamoto N, Nogami T, Nakagawa K, Negoro S, Takeda K, Takifuji N, Yamada M, Kudoh S, Okuda T, Nemoto S, Ogawa K, Myobudani H, Nihira S, Fukuoka M, *Clin Cancer Res*, **6**, 2288-2294 (2000).
 - 27 Brindley CJ, Morrison R, Gordon RJ, Devlin AJ, van der Gaast A, Verweij L, Funaki T, *Clin Pharmacokinet*, **38**, 475-491 (2000).
 - 28 Friberg LE, Brindley CJ, Karlsson MO, Devlin AJ, *Eur J Clin Pharmacol*, **56**, 567-574 (2000).
 - 29 Friberg LE, Henningsson A, Maas H, Nguyen L, Karlsson MO, *J Clin Oncol*, **20**, 4713-4721 (2002).
 - 30 Azuma A, Nakajima Y, Nishizono N, Minakawa N, Suzuki M, Hanaoka K, Kobayashi T, Tanaka M, Sasaki T, Matsuda A, *J Med Chem*, **36**, 4183-4189 (1993).
 - 31 Azuma A, Hanaoka K, Kurihara A, Kobayashi T, Miyauchi S, Kamo N, Tanaka M, Sasaki T, Matsuda A, *J Med Chem*, **38**, 3391-3397 (1995).
 - 32 Matsuda A, Nakajima Y, Azuma A, Tanaka M, Sasaki T, *J Med Chem*, **34**, 2917-2919 (1991).
 - 33 Azuma A, Matsuda A, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **14**, 461-471 (1995).
 - 34 Tanaka M, Matsuda A, Terao T, Sasaki T, *Cancer Lett*, **64**, 67-74 (1992).
 - 35 Uchida H, Chen YX, Morinaga H, Hayashi Y, Matsuda A, Obata T, Endo Y, Sasaki T, *Biol Pharm Bull*, **22**, 83-86 (1999).
 - 36 Uchida H, Morinaga H, Misaki T, Miyazaki T, Uwajima T, Obata T, Endo Y, Matsuda A, Sasaki T, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **20**, 1647-1654 (2001).
 - 37 Hanaoka K, Suzuki M, Kobayashi T, Tanzawa F, Tanaka K, Shibayama T, Miura S, Ikeda T, Iwabuchi H, Nakagawa A, Mitsuhashi Y, Hisaoka M, Kaneko M, Tomida A, Wataya Y, Nomura T, Sasaki T, Matsuda A, Tsuruo T, Kurakata S, *Int J Cancer*, **82**, 226-236 (1999).
 - 38 松田彰, 佐々木琢磨, *蛋・核・酵*, **43**, 1981-1989 (1998).
 - 39 Azuma A, Huang P, Matsuda A, Plunkett W, *Mol Pharmacol*, **59**, 725-731 (2001).
 - 40 Azuma A, Huang P, Matsuda A, Plunkett W, *Biochem Pharmacol*, **61**, 1497-1507 (2001).
 - 41 Donehower RC, Dees EC, Bakek SD, Summerson L, Carducci MA, Izumi T, Kobayashi T, *Proc Am Soc Clin Oncol* **19**, 196a (2000).

- 42 Azuma A, Matsuda A, Sasaki T, Fukushima M, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **20**, 609-619 (2001).
- 43 Hattori H, Tanaka M, Fukushima M, Sasaki T, Matsuda A, *J Med Chem*, **39**, 5005-5011 (1996).
- 44 Hattori H, Nozawa E, Iino T, Yoshimura Y, Shuto S, Shimamoto Y, Nomura M, Fukushima M, Tanaka M, Sasaki T, Matsuda A, *J Med Chem*, **41**, 2892-2902 (1998).
- 45 Matsuda A, Fukushima M, Wataya Y, Sasaki T, *Nucleosides Nucleotides*, **18**, 811-814 (1999).
- 46 田中基裕, 田畑敏, 松田彰, 福島正和, 江島清, 佐々木琢磨, *癌と化学療法*, **24**, 476-482 (1997).
- 47 Tabata S, Tanaka M, Endo Y, Obata T, Matsuda A, Sasaki T, *Cancer Lett*, **116**, 225-231 (1997).
- 48 Tabata S, Tanaka M, Matsuda A, Fukushima M, Sasaki T, *Oncol Rep*, **3**, 1029-1034 (1996).
- 49 Shimamoto Y, Fujioka A, Kazuno H, Murakami Y, Ohshimo H, Kato T, Matsuda A, Sasaki T, Fukushima M, *Jpn J Cancer Res*, **92**, 343-351 (2001).
- 50 Takatori S, Kanda H, Takenaka K, Wataya Y, Matsuda A, Fukushima M, Shimamoto Y, Tanaka M, Sasaki T, *Cancer Chemother Pharmacol*, **44**, 97-104 (1999).
- 51 Shimamoto Y, Kazuno H, Murakami Y, Azuma A, Koizumi K, Matsuda A, Sasaki T, Fukushima M, *Jpn J Cancer Res*, **93**, 445-452 (2002).
- 52 Naito T, Yokogawa T, Takatori S, Goda K, Hiramoto A, Sato A, Kitade Y, Sasaki T, Matsuda A, Fukushima M, Wataya Y, Kim HS, *Cancer Chemother Pharmacol*, in press (2008).
- 53 Matsuda A, Hattori H, Tanaka M, Sasaki T, *Bioorg Med Chem Lett*, **6**, 1887-1892 (1996).
- 54 Koizumi K, Shimamoto Y, Azuma A, Wataya Y, Matsuda A, Sasaki T, Fukushima M, *Int J Mol Med*, **8**, 273-278 (2001).
- 55 Van Rompay AR, Norda A, Linden K, Johansson M, Karlsson A, *Mol Pharmacol*, **59**, 1181-1186 (2001).
- 56 Shimamoto Y, Koizumi K, Okabe H, Kazuno H, Murakami Y, Nakagawa F, Matsuda A, Sasaki T, Fukushima M, *Jpn J Cancer Res*, **93**, 825-833 (2002).
- 57 Murata D, Endo Y, Obata T, Sakamoto K, Syouji Y, Kadohira M, Matsuda A, Sasaki T, *Drug Metab Dispos*, **32**, 1178-1182 (2004).