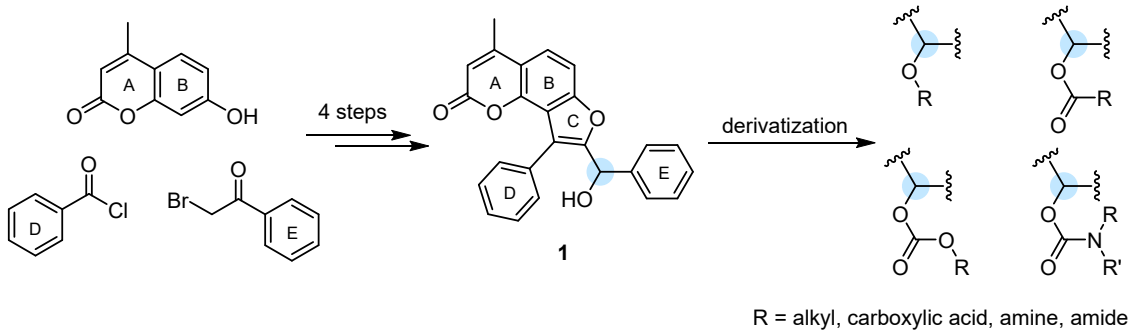
14　DHODHを標的とする新規抗ウイルス抗がん剤の開発	渡辺　賢二

【目的】ジヒドロオロト酸脱水素酵素（DHODH）は、*de novo* ピリミジン生合成に関わる酵素であり、抗がん剤や免疫抑制剤などの開発のターゲットとして近年注目を集めている。これまでに、約 20,000 種の天然物および非天然物を含む化合物ライブラリー（RIKEN NPDepo）を使った一連のスクリーニングを行うことで、強力な DHODH 阻害活性（IC_{50} 3.9 nM）を示す化合物 **1** を新たに見出すことに成功した。植物代謝産物に見られるようなフロクマリン構造を含む **1** は既知化合物であったが、DHODH 阻害活性に関する報告例は無く、我々は、**1** をシードとして新規な DHODH 阻害剤の開発が可能と期待した。しかしながら、細胞系やマウスを用いた *in vivo* での実験において化合物 **1** が溶解性や代謝安定性などに問題を抱えていることが明らかになった。そこで本研究では、化合物 1 の薬物動態の改善を目的として、類縁体合成と生物活性評価による構造最適化を検討することとした。

【方法】化合物 **1** とヒトの DHODH との共結晶構造を解析したところ、基質-酵素結合部位において、化合物 **1** の二級水酸基の水素結合形成が阻害活性に寄与していることが示唆された。そこで今回、**1** の二級水酸基を足掛かりとして側鎖を導入した類縁体をいくつか合成し、それぞれについて構造活性相関を調べることとした。

【結果】はじめに二級水酸基と側鎖との結合様式が異なる類縁体を合成し、それらの *in vitro* での DHODH 阻害活性試験を行ったところ、アルキルエーテル体やアルキルエステル体は全く阻害活性を示さなかった。一方で、炭酸エステル体やカルバミン酸エステル体は IC_{50} 数十～数百 nM で阻害活性を示すことがわかった。これらに対し、細胞毒性を指標とした活性評価では、いくつかの類縁体が *in vitro* よりも低濃度で活性を示すことが明らかとなった。以上のことは、化合物 **1** の薬物動態改善の方針の 1 つとして、二級水酸基を足掛かりとしたプロドラッグ化が有効であることを支持する結果である。現在、さらなる構造最適化を検討中である。

化合物 **1** の化学構造と合成ルート



14. DHODH を標的とする新規抗ウイルス抗がん剤の開発

渡辺　賢二

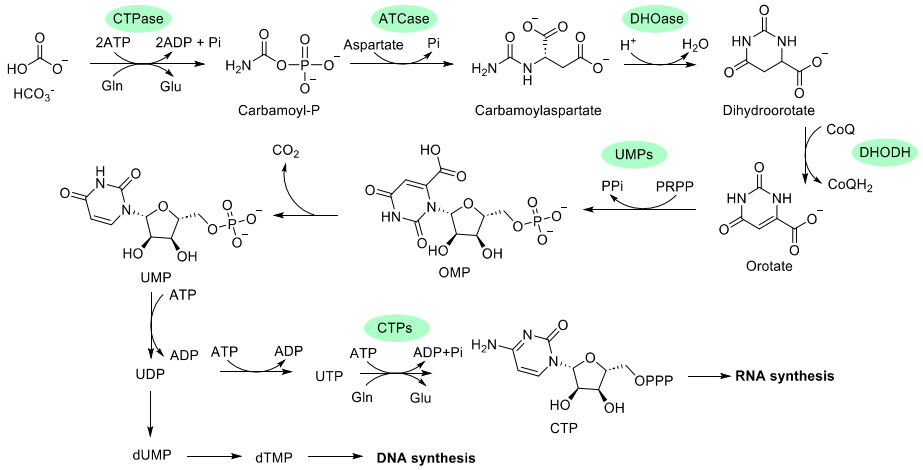
静岡県立大学 薬学部 生薬・天然物化学研究室

Key words：ピリミジン，ジヒドロオロト酸デヒドロゲナーゼ，阻害剤，抗ウイルス薬，フロクマビリン

緒　言

1. ピリミジンの生合成とジヒドロオロト酸デヒドロゲナーゼ（DHODH）

DNA や RNA を構成する 5 種類の窒素塩基のうち、シトシン、チミン、ウラシルの 3 種類はピリミジン塩基に分類される。これらを含むヌクレオチドはピリミジンヌクレオチドと呼ばれ、次に示す二つの供給経路が知られる。一つは、アミノ酸や炭酸水素イオン、リボースリン酸などの単純な物質を原料として、一連の酵素反応によりピリミジンヌクレオチドを生合成するもので、*de novo* pathway と呼ばれる。もう一つは、体内にある遊離のピリミジンまたはピリミジンヌクレオシドを再利用する形でピリミジンヌクレオチドを合成するもので、salvage pathway と呼ばれる。*De novo* pathway では、L-グルタミンと L-アスパラギン酸、炭酸水素イオンを基質として、まず、ウリジル酸（UMP）が生合成される（Scheme 1）。はじめに、カルバモイルリン酸合成酵素（CTPase）により合成されたカルバモイルリン酸が、アスパラギン酸トランスカルバミラーゼ（ATCase）によって L-アスパラギン酸と反応し、カルバモイルアスパラギン酸に変換される。次に、ジヒドロオロティックアシダーゼ（DHOase）によって分子内縮合し、4,5-ジヒドロオロト酸が生成する。4,5-ジヒドロオロト酸は、ミトコンドリア内膜上に存在する DHODH によってオロト酸に酸化された後、再び細胞質に入り、ウリジル酸合成酵素（UMPs）によって UMP に変換される。続いて、UMP を前駆体として種々のピリミジンヌクレオチド類が生合成される（Scheme 1）。RNA 合成に必要なリボヌクレオチド類は、UMP のリン酸化によってウリジン三リン酸（UTP）が、さらに、シチジン三リン酸合成酵素（CTPs）によって UTP からシチジン三リン酸（CTP）がそれぞれ生合成される。一方、DNA 合成に必要なデオキシリボヌクレオチド類は、ウリジン二リン酸（UDP）を起点として生合成される。まず、リボヌクレオチド還元酵素によってリボース部分がデオキシリボースに還元されることでデオキシウリジン二リン酸に変換され、さらに脱リン酸によってデオキシウリジン一リン酸（dUMP）に変換される。その後、dUMP がメチル化されてデオキシチミジン一リン酸（dTMP）が生合成される［1，2］。



Scheme 1.　DNA 生合成経路

2. DHODH 阻害剤

活性化されたT細胞や、がん細胞のような急速に増殖する細胞において、DNAの複製に必要な核酸の要求量が急増するに従って、大量にピリミジン類を供給可能な *de novo* pathway が活性化されることが知られている［1，2］。したがって、このような細胞は、正常細胞よりもヌクレオチド合成阻害に高い感受性を示す可能性があり、ピリミジン供給の律速酵素であるDHODHを創薬ターゲットとすることは合理的な戦略と言える。

現在、DHODH阻害剤は、急性骨髄性白血病（AML）、乳がん、肺がん、皮膚がんなど、多くの悪性腫瘍の増殖を抑制することが示されている［1］。特にAMLは死亡率が高く、過去5年間の生存率が50%未満の悪性腫瘍である［3］。David B. Sykesらは、AML細胞がDHODH阻害剤に感受性が高いことを発見した［4］。DHODH阻害剤による細胞内ピリミジンの欠乏は、AML細胞の細胞形態の変化、遺伝子発現の停止、細胞死などの結果をもたらすことが分かった。また、肺がんは世界で2番目に罹患率が高いがんであり、T.Heらは、肺がん細胞がDHODH阻害剤に対する高い感受性を示し、DHODH阻害剤の一つであるbrequinarが微小細胞肺がん細胞SCLC tumorの増殖を抑制し、マウスの寿命を延ばすことを発見した［5］。一方、DHODH阻害剤による抗ウイルス活性にも、近年、多くの注目が集まっている。ウイルスは、宿主細胞の遺伝子複製機構を利用しながら盛んに増殖するので、先のがん細胞の例と同様に *de novo* pathway に依存しており［1，2］、すなわち、ウイルス感染症においてもDHODHをターゲットとした治療が可能であり、これまでに様々な研究が実施されてきた。例えば、2022年、Lacy M. Simonsらは、SARS-CoV-2ウイルスに感染した患者を観察した際に、すべての患者の *de novo* pathway が時間とともに著しく活性化されることを明らかとした。また、ウイルス増殖の際に、しばしばタンパク質に変異が生じることで多様なウイルス株が発生する。Simonsらは患者体内のウイルス多様性が増加していたことから、ウイルス増殖と *de novo* pathway との間に強い相関があると結論付けた［6］。

2016年にYijin WangらはDHODH阻害剤brequinarがHEVウイルスに対して強い阻害効果があることを証明した［7］。Wangらは、HEを感染させたヒト肝細胞株Huh7およびヒト胚性腎臓上皮細胞株293Tをbrequinarで処理した。処理された細胞と未処理の細胞において、BioLux Gaussia luciferase flex assay kitを使用してウイルスRNA量を測定したところ、前者ではRNA量が78±17%抑制されていたことを見出した。これは、DHODH阻害剤が *de novo* pathway を阻害することによって、ウイルスに遺伝子複製に必要なピリミジンの供給を抑制し、ウイルスの増殖を阻害したものと考察されている。また、2019年にMei-jiao Gongらは、DHODH阻害剤teriflunomideを使って、口蹄疫ウイルスに感染させたマウスの心臓組織細胞を用いて抗ウイルス効果を検証した。その結果、投与量と投与時間に正比例して、ウイルスの数が明らかに減少することが見られた。以上の結果は、DHODH阻害剤のウイルス増殖抑制効果を支持している。長年の創薬研究の結果、いくつかのDHODH阻害剤が発見されてきたが、DHODH阻害活性が弱い（IC_{50}>1 mM）ことや強い副作用などが原因で、ほとんどのDHODH阻害剤は医薬品としての使用には至らない。例えば、現在阻害活性が一番強いDHODH阻害剤として知られているbrequinar（IC_{50} 7 nM）は、頭頸部扁平上皮がん［8］、肺がん［9］、胃腸がん［10］などの悪性腫瘍患者を対象とした第Ⅰ相および第Ⅱ相臨床試験で評価された［8］。しかし、いずれの悪性腫瘍に対しても非常に弱い抗がん活性を示すに留まった。さらには、重篤な副作用として、白血球減少、血小板減少、体重減少、胸腺萎縮、骨髄や脾臓白髄の細胞壊死、および空腸の絨毛萎縮などが見られた。有効血中薬物濃度範囲が狭く、副作用が生じる範囲に非常に近いことがbrequinarの医薬品利用を妨げている。一方、第2相臨床試験に投入されたもうひとつのDHODH阻害剤leflunomide（IC_{50} 1.8 mM）もまた非常に強い副作用を引き起こすことが明らかになった。具体的には、下痢、肝機能異常、高血圧、骨髄抑制、吐き気、および脱毛などがあり、さらには、ヒトにおいて肝不全を引き起こす可能性も示唆された。

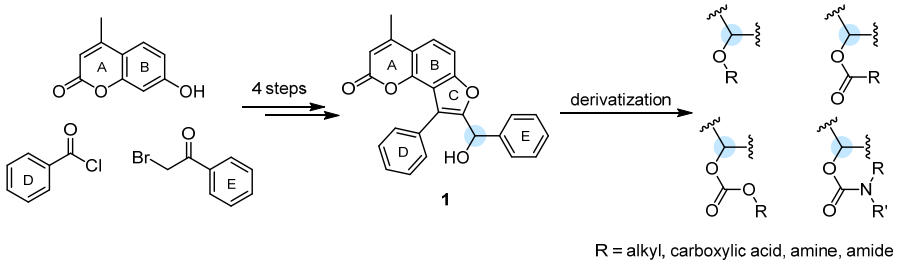
以上、DHODH阻害剤は、ピリミジンの生合成を阻害することで、ウイルス、がん細胞などの増殖を阻害することが期待され、現在、抗ウイルス剤や抗がん剤などの開発ターゲットとして多くの注目を集めている。しかしながら、臨床研究の段階で十分な効果が発揮できないことや、重篤な副作用の発現が大きな障壁となっており、臨床研究において副作用の出ない低濃度でも十分な薬理活性を発揮できる新規DHODH阻害剤の創生が強く望まれている。

3. シード化合物 1 の発見

理化学研究所の長田らは、約 20,000 種の天然物および非天然物を含む化合物ライブラリー（RIKEN NPDepo）を使った一連のスクリーニングを行うことで、既知化合物 NPD723 を見出した。当初、抗がん剤の開発を目指して、ヒト急性前骨髄球性白血病細胞 HL-60 に対する分化誘導活性を指標に探索を行い、本化合物の EC_{50}は 0.8 nM であった。その後、薬物代謝試験に際して、肝由来 S9 フラクションを作用させた場合に、NPD723 のケトンが還元された **1**（Scheme 2）が生じることを明らかとした。さらに、**1** が種々のがん細胞系に対して nM レベルと、NPD723 より強力な増殖阻害活性を示すことが明らかとなった。

4. 研究の目的

以上のことから、DHODH は抗がん剤や抗ウイルス剤開発のためのターゲットとして非常に有望であり、特に **1** は極微量で阻害活性を示すことから新規な DHODH 阻害剤開発のためのシード化合物として期待できる。しかしながら、同時に、**1** が溶解性や代謝不安定性といった問題を抱えていることが明らかとなっており、これらを含めた薬物動態を改善するための構造最適化が必要である。そこで本研究では、**1** を起点とした構造修飾が薬物動態の改善に有効であるかを検証することを目的とした。

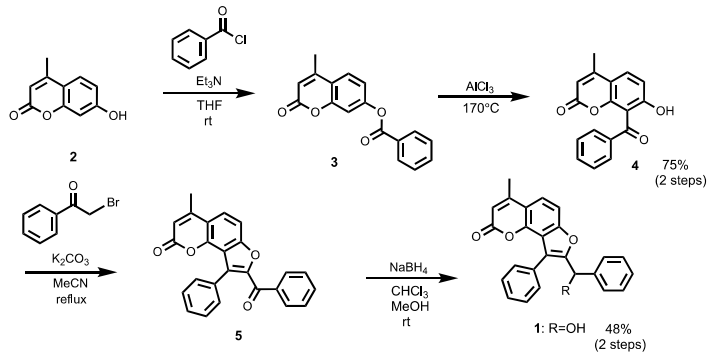


Scheme 2. 化合物 **1** の化学構造と合成ルート

方法および結果

1. 化合物 1 の合成

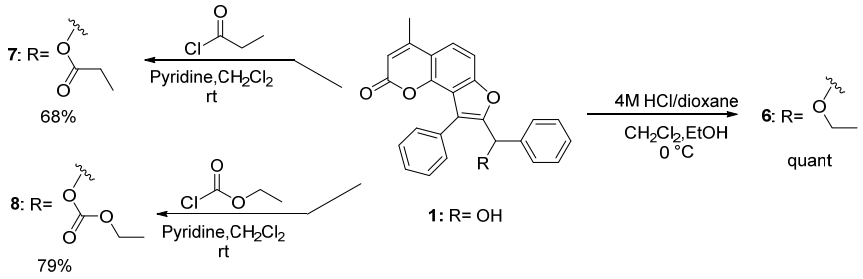
はじめに、類縁体合成の原料として、**1** をグラムスケールで合成した（Scheme 3）。出発原料として、7-ヒドロキシ-4-メチルクマリン **2** と BzCl を用いてエステル化することで、ベンゾエート **3** を粗生成物として得た。次に、化合物 **3** に対して、$AlCl_3$ を作用させて 170℃に加熱することでフリース転位が進行し、*C*-ベンゾイル化体 **4** を与えた。続いて、得られた **4** と phenacyl bromide を使って塩基性条件下、加熱還流を行うことで *O*-アルキル化とアルドール縮合が進行しケトン **5** を与えた。さらに、**5** に対して $NaBH_4$ を用いるヒドリド還元を行うことで目的の **1** を合計で 4.4 g 合成した。



Scheme 3. 合成ルート

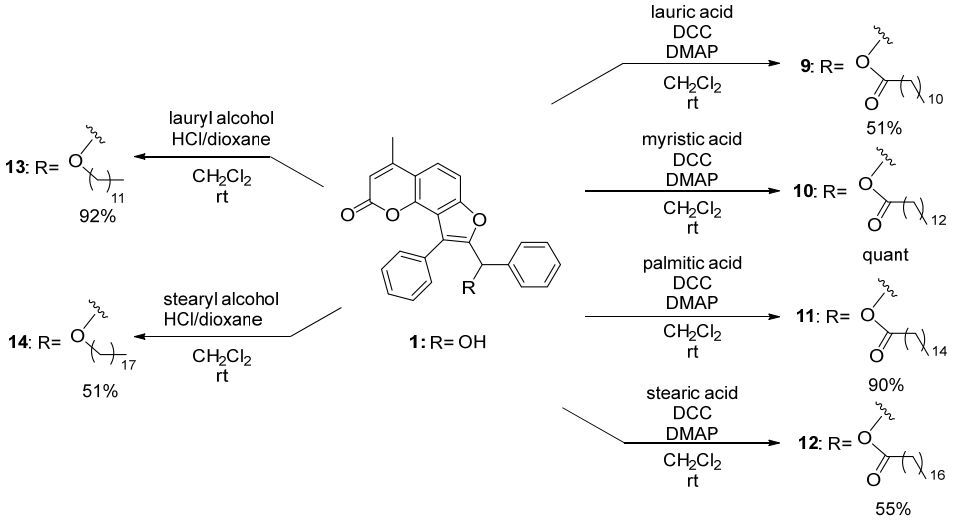
2. 1の類縁体合成

化合物 **1** の二級水酸基が活性に必須であるかを調べるために、嵩の小さなアルキル基を含む側鎖で保護することとした。また、二級水酸基と側鎖との結合様式が DHODH 阻害活性に対してどのような影響を与えるかを調べるために、各種エーテル類縁体とエステル類縁体の合成を計画した。**1** を基質として 4 M HCl/dioxane と EtOH を反応させ、対応するエチルエーテル **6** を定量的に得た（Scheme 4）。次に、ピリジン存在下、**1** と propionyl chloride を反応させて、プロピオン酸エステル **7** を 68%の収率で合成した。さらに同様の条件で、**1** に対して ethyl chloroformate を作用させることで炭酸エステル **8** を 79%の収率で合成できた。なお、**8** のみ、やや酸性であるシリカゲル TLC 上で加水分解される様子が観測された（40 分で約 80~90%が分解）。一方、中性シリカゲルを用いたカラムクロマトグラフィーや $CDCl_3$ 中での NMR 測定では顕著な分解は見られなかった。



Scheme 4. 合成ルート

次に、アルキル側鎖の長さと DHODH 阻害活性に相関があるかを調べるために長鎖（C12、C14、C16 および C18）の脂肪族類縁体を合成した（Scheme 5）。化合物 **1** と lauric acid を基質として、DCC と DMAP を用いて縮合することで、収率 51%で脂肪酸エステル 9 を得た。続いて、同様の条件にて、myristic acid を用いることで脂肪酸エステル **10** を、palmitic acid を用いることで脂肪酸エステル **11** を、さらに、stearic acid を用いることで脂肪酸エステル **12** をそれぞれ quant、90%、および、55%の収率で得ることができた。一方、**1** と lauryl alcohol を基質として HCl/dioxane を反応させることでアルキルエーテル **13** を、また、同様の条件下、stearyl alcohol を用いることでアルキルエーテル **13** をそれぞれ 92%と 51%の収率で得ることに成功した。



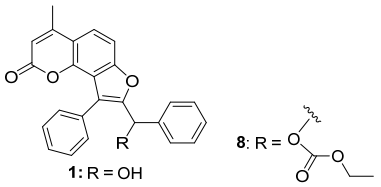
Scheme 5. 合成ルート

3. DHODH 阻害活性試験

次に、理化学研究所との共同研究で、ここまでに合成した類縁体を使った *in vitro* での DHODH 阻害活性試験を行った（Table 1）。その結果、側鎖の結合様式や長さと関係なく、**1** の二級水酸基が保護されると、DHODH 阻害活性が

大幅に弱くなることが示された。なお、化合物 8 が IC_{50} 49 nM で活性を示した原因は、緩衝液等を含む活性評価の条件で **8** が分解し、**1** が活性本体として生じたものと考えているが、アッセイ条件下での安定性については今後精査する予定である。以上の結果より、**1** の二級水酸基は DHODH 阻害活性においてとても重要な官能基であるということが明らかになった。

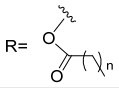
Table 1. DHODH 阻害活性試験



1: R = OH



	6: n = 1	**13**: n = 11	**14**: n = 17
humanDHODH/ΔTM IC_{50} (nM)	>1000	>1000	>1000



7: n = 1	**9**: n = 10	**10**:n = 12	**11**: n = 14	**12**: n = 16
humanDHODH/ΔTM IC_{50} (nM)	>1000	>1000	811	>1000	>1000

結果および考察

本研究では、新規な DHODH 阻害剤の創剤を目指し、**1** の構造を基盤として薬物動態の改善を目指した類縁体合成と生物活性評価を実施した。共結晶構造の解析より、**1** の二級水酸基の周辺に比較的大きな分子構造でも許容できそうな空間が存在することを確認し、**1** を起点とした二級水酸基への側鎖導入によって構造最適化が可能ではないかと仮説を立てた。同時に、この二級水酸基が Leu-330 と水素結合を形成していることが示唆され、これが阻害活性に重要であるかどうかの調査が必要であると考えた。そこで、類縁体合成の基盤となる **1** の大量合成法の確立を目指し、4 グラム以上のスケールで合成できるようになった。続いて、水酸基への側鎖導入と各種類縁体の酵素阻害活性評価を行い、水酸基への側鎖の導入によって酵素阻害活性が消失したことから、その水素結合形成が活性に重要であることを証明した。しかしながら、その一方で、水酸基に側鎖を導入した類縁体でも、細胞系での試験では活性を示すことを発見した。特にエステル結合を含む化合物は、プロドラッグとして利用するチャンスが見出された。そこで、二級水酸基へのアシル化を基盤としたプロドラッグの創製を次に目指すこととした。溶解性の向上を期待して、極性官能基を含む各種誘導体を合成し、同様に活性評価を行った。その結果、予想に反していずれの類縁体でも *in vitro* での阻害活性を nM レベルで維持することがわかり、側鎖構造の選択肢が広がった。さらに、細胞系での抗ウイルス活性評価においては、期待通りに *in vitro* よりも低濃度で活性を示すことも確認できた。極性基を導入した類縁体は、理想的な DHODH 阻害活性、抗ウイルス活性を持つだけでなく、今回合成した全ての類縁体において水溶性が改善されていることを確認できた。これらの類縁体は、アミン塩酸塩やカルボン酸のアルカリ塩とすることで、さらに水溶性が上がることが期待できる。

以上の結果により、**1** の DHODH 阻害メカニズムの一端を解明するとともに、**1** の二級水酸基を足掛かりとして、極性基を導入することで、薬物動態を改善し得るドラッグデザインが可能であることを示すことに成功した。

文　献

1) Zhou, Y. et al. DHODH and cancer: promising prospects to be explored. Cancer & Metabolism 9, 22 (2021). https://doi.org:10.1186/s40170-021-00250-z
2) Löffler, M., Fairbanks, L. D., Zameitat, E., Marinaki, A. M. & Simmonds, H. A. Pyrimidine pathways in health and disease. Trends Mol Med 11, 430-437 (2005). https://doi.org:10.1016/j.molmed.2005.07.003
3) Prada-Arismendy, J., Arroyave, J. C. & Röthlisberger, S. Molecular biomarkers in acute myeloid leukemia. Blood Rev 31, 63-76 (2017). https://doi.org:10.1016/j.blre.2016.08.005
4) Sykes, D. B. The emergence of dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) as a therapeutic target in acute myeloid leukemia. Expert Opin Ther Targets 22, 893-898 (2018). https://doi.org:10.1080/14728222.2018.1536748
5) He, T. et al. Inhibition of the mitochondrial pyrimidine biosynthesis enzyme dihydroorotate dehydrogenase by doxorubicin and brequinar sensitizes cancer cells to TRAIL-induced apoptosis. Oncogene 33, 3538-3549 (2014). https://doi.org:10.1038/onc.2013.313
6) Simons, L. M. et al. De novo emergence of SARS-CoV-2 spike mutations in immunosuppressed patients. Transpl Infect Dis 24, e13914 (2022). https://doi.org:10.1111/tid.13914
7) Wang, Y. et al. Cross Talk between Nucleotide Synthesis Pathways with Cellular Immunity in Constraining Hepatitis E Virus Replication. Antimicrob Agents Chemother 60, 2834-2848 (2016). https://doi.org:10.1128/aac.02700-15
8) Urba, S. et al. Multicenter phase II trial of brequinar sodium in patients with advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck. Cancer Chemother Pharmacol 31, 167-169 (1992). https://doi.org:10.1007/bf00685106
9) Maroun, J. et al. Multicenter phase II study of brequinar sodium in patients with advanced lung cancer. Cancer Chemother Pharmacol 32, 64-66 (1993). https://doi.org:10.1007/bf00685878
10) Moore, M. et al. Multicenter phase II study of brequinar sodium in patients with advanced gastrointestinal cancer. Invest New Drugs 11, 61-65 (1993). https://doi.org:10.1007/bf00873913