

培養細胞系における自然免疫系賦活剤としての ENPP1 阻害剤の STING 経路活性化能の評価

名古屋市立大学大学院
薬学研究科 講師 川口 充康

1. 研究の背景・目的

ENPP1 は細胞外で ATP などのヌクレオチドを代謝する加水分解酵素である。ENPP1 はピロリン酸を産生する酵素であるため骨代謝に重要であるだけでなく、インスリン受容体と相互作用しインスリン抵抗性を惹起するため 2 型糖尿病にも関与することが古くから知られていた。一方、近年 ENPP1 は乳がんや脳腫瘍で過剰発現することが示され、がん幹細胞性の形成・維持に関与することが報告されただけでなく、STING (Stimulator of interferon genes) のリガンド分子である 2',3'-cGAMP (cyclic GMP-AMP) の加水分解にも関与し自然免疫系を不活性化することが示された。¹ 自然免疫系を活性化することは感染症やがんの治療につながると考えられるため、STING 経路を直接活性化する STING アゴニストの開発研究が盛んに行われているが、過剰な STING 経路の活性化は炎症性サイトカインの過剰な分泌を惹起し炎症を誘起する怖れがある。そこで、間接的に cGAMP 量を亢進可能な ENPP1 阻害剤が近年注目を集めているが、報告されている多くの ENPP1 阻害剤がホスファターゼなどによる加水分解耐性を持つ ATP 誘導体であることに加え、阻害活性、特異性の観点からも十分満足できるものではない。²

申請者はこれまでに独自に開発した ENPP1 蛍光プローブを活用して東京大学創薬機構所有のライブラリーよりスクリーニングを実施し複数の ENPP1 阻害剤ヒットを得ることに成功してきた。³

本申請研究では、昨年度までに得られた ENPP1 阻害剤を更に構造最適化することにより強力かつ特異的な小分子 ENPP1 阻害剤を創製することを目的とする。加えて、最適化した ENPP1 阻害剤の STING 経路活性化能を細胞系において評価することにより、単に *in vitro* において強力かつ特異的であるだけでなく、細胞系においても、将来的には *in vivo* においても免疫系の活性化に伴い抗がん活性を示す潜在性を持つ強力かつ選択的な ENPP1 阻害剤を創製することを目的とする。ATP 誘導体を用いず、drug-like な有機小分子を用いることにより代謝安定性が高まるだけでなく、アデニン受容体などへのアゴニスト/アンタゴニ

殆ど見られなかったため、細胞応用、動物個体への応用も期待できる。

Table 1. Inhibitory activity (IC₅₀) of **compound 6** derivatives toward ENPP1 and ENPP3.

	<i>in vitro</i> IC ₅₀ (nM)		<i>In cellulo</i> IC ₅₀ (nM)	GI ₅₀ (μM)	
	TG-mAMP	ATP	MDA-MB-231	MDA-MB-231	HEK-Blue-ISG
6-4	230	N.D.	370	0.8	>20
6-18	42	N.D.	390	1.0	>20
6-31	18	N.D.	180	2.0	>20
6-37	14	670	120	~20	>20
6-39	43	N.D.	89	~20	>20
6-47	9.3	200	24	~20	>20
6-49	10	280	57	>20	>20
6-53	7.1	430	52	>20	>20
A	0.25	11	2.2	>5	N.D.
B	0.59	21	2.7	>5	N.D.
C	0.34	N.D.	3.7	>5	N.D.

N.D. = not determined.

3-2. HEK-Blue™ INF α/β細胞の機能評価

Invivogen 社から HEK-Blue™ INF α/β細胞を購入し、STING 経路活性化能を評価できるか検討した。(HEK-Blue™ INF α/β細胞は他の細胞から産生される INF-α/βを定量することができる) 2',3'-cGAMP 刺激に応答して INF-α/βを産生する細胞として文献調査の末 THP-1 細胞 (JCRB より購入) を選択することとした。⁴

そこで、まず i) THP-1 細胞が ENPP1 を発現しているか、ii) ENPP1 阻害剤 **6-49**, **6-53** が THP-1 細胞に細胞傷害性がないかを検討した。その結果、i) THP-1 細胞は内在性に ENPP1 を殆ど発現していないこと、ii) **6-49**, **6-53** は THP-1 細胞に対して細胞傷害性を示さないことが明らかとなった (**Figure 1**)。

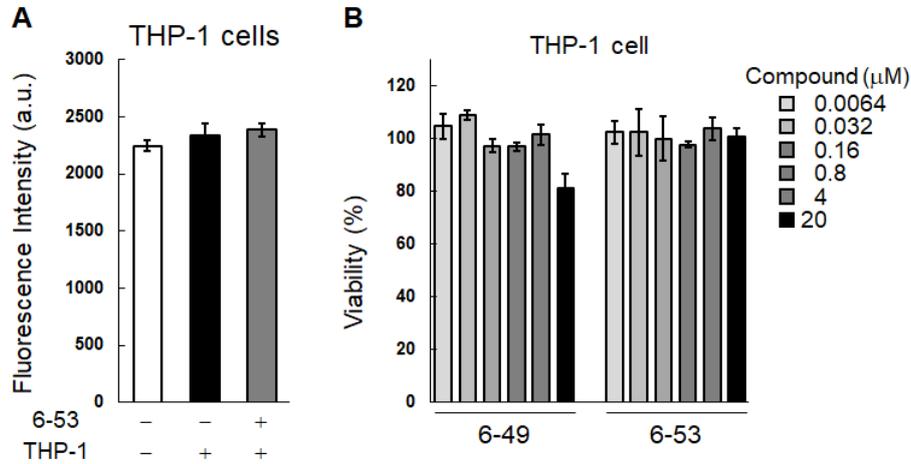


Figure 1. (A) ENPP1 activity in THP-1 cells. (B) Viability of THP-1 cells after the treatment of ENPP1 inhibitors.

次に、THP-1 細胞を 2',3'-cGAMP で 42 時間刺激後、産生される INF- α/β の検出を試みた。その結果、2',3'-cGAMP の刺激濃度依存的に SEAP 活性の増強が確認された。一方、単に HEK-BlueTM INF α/β 細胞に 2',3'-cGAMP を処理するのみでは SEAP 活性が見られなかったことから、THP-1 細胞からの IFN- α/β 産生が強く示唆された。

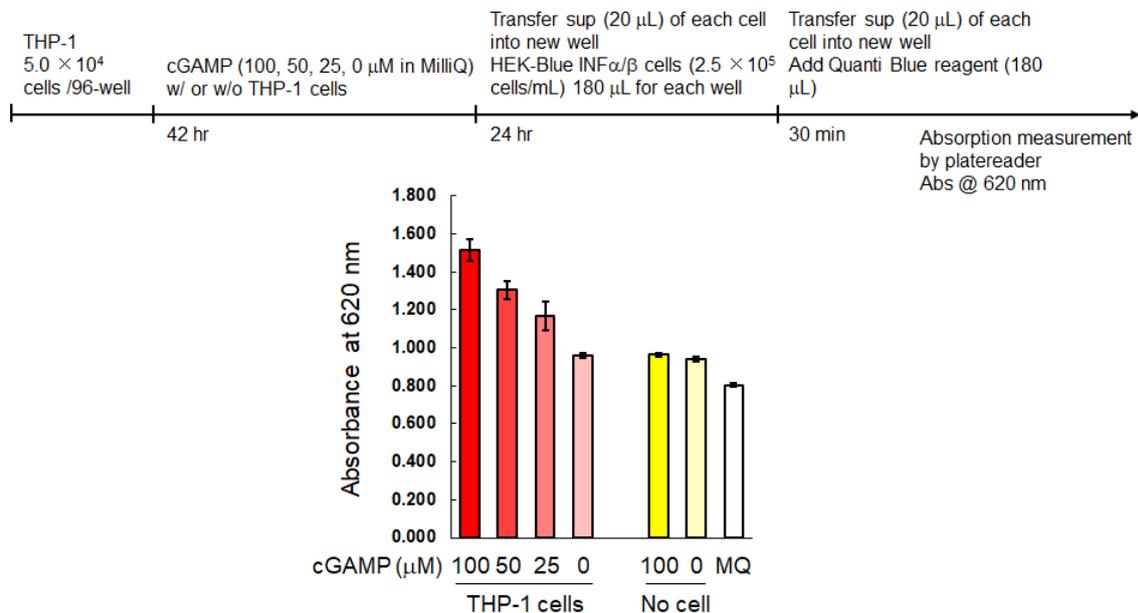


Figure 2. Quantification of INF- α/β produced from THP-1 cells which were stimulated with 2',3'-cGAMP (25, 50, 100 μM) for 42 hr.

さらに、ENPP1 を強く発現する MDA-MB-231 細胞の培地中で 2',3'-cGAMP を一定時間処理した後、その培地を THP-1 細胞に添加し INF- α/β の産生を定量した。その際、ENPP1 阻害剤として **6-49**, **6-53** を処理することで THP-1 細胞からの INF- α/β の産生が増強されることを期待した。このような共培養系は実際のがん、正常細胞、免疫細胞が混在する *in vivo* の系に近いと考えられるため、本実験にて阻害効果が確認できればマウスがんモデルなどにおいても腫瘍縮小効果が期待できるものと考えている。

評価の結果、ENPP1 阻害剤の有無にかかわらず SEAP 活性の増強は殆ど認められなかった。即ち、MDA-MB-231 細胞の培地中での 2',3'-cGAMP の分解を添加した阻害剤は抑制できていないと考えられる。ただし、培地中での阻害剤の安定性については問題ないことを確認済みである (Data not shown)。

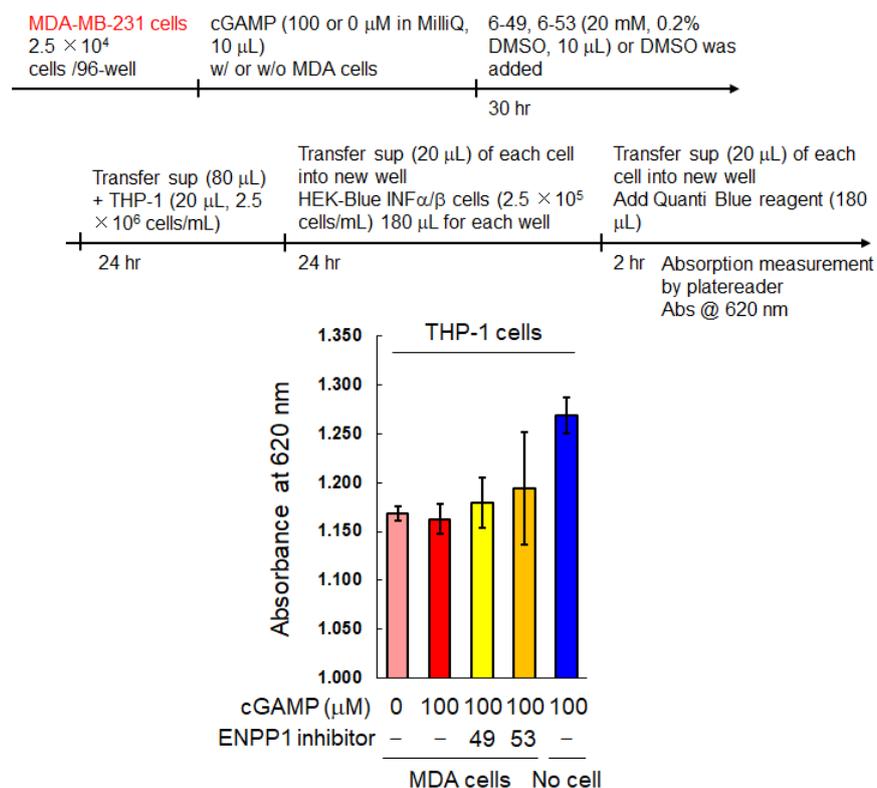


Figure 3. Quantification of INF- α/β produced from THP-1 cells which were co-cultured with MDA-MB-231 cells in the presence or absence of ENPP1 inhibitors.

4. 考察

ENPP1 阻害剤の更なる構造最適化に関して、新たなデザインを取り入れることによりこれまでの阻害剤より 20~30 倍阻害活性の向上が見られた。これまで 10 化合物ほどしか検

討できていないため、構造情報などを活用しさらに構造展開を行っていけば更に高活性な阻害剤を得ることができると期待される。構造展開の際、化合物の物性 (特に溶解性) に着目する必要もある。即ち、**A~C** は **DMSO** への溶解性が非常に悪く今後の応用を妨げる恐れがあるため、物性の改善も重要な課題として挙げられる。

一方、細胞を用いた検討に関して、十分な実験時間が確保できなかったため、今後実験系を最適化することが必要である。特に、**MDA-MB-231** 細胞への **2',3'-cGAMP** の処理時間が重要と考えられる。処理時間が長すぎると阻害剤存在下でさえ分解が進んでしまい **THP-1** 細胞を活性化できないことが予想される。また、培地中に存在する酵素などを適切に不活化することも重要だと考え、今後検討を進める予定である。

5. 文献

1. *Nat. Chem. Biol.*, 10, 1043–1048 (2014)
2. *Int. J. Cell Sci. & Mol. Biol.*, 5, 555655 (2018)
3. *J. Med. Chem.* 62, 9254–9269 (2019)
4. *Nat. Commun.* 9, 4424 (2018)