

ENPP1 阻害剤の構造最適化および STING 経路活性化剤としての機能評価研究

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

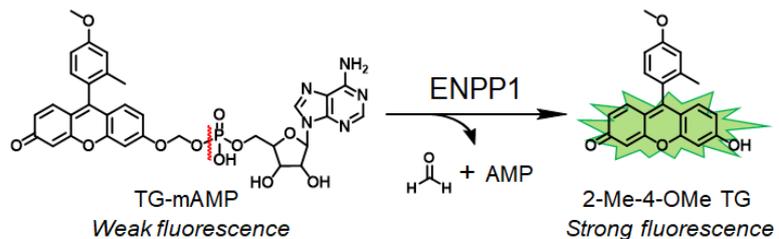
そこで、申請者は独自に開発した ENPP1 蛍光プローブを活用して東京大学創薬機構所有のライブラリーよりスクリーニングを実施し複数の ENPP1 阻害剤ヒットを得ることに成功した。³

本申請研究では、得られたヒット化合物を更に構造最適化することにより強力かつ特異的な有機小分子 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* においても抗がん活性を示す潜在性を持つ 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/アンタゴニスト活性を軽減させることができ特異性が高

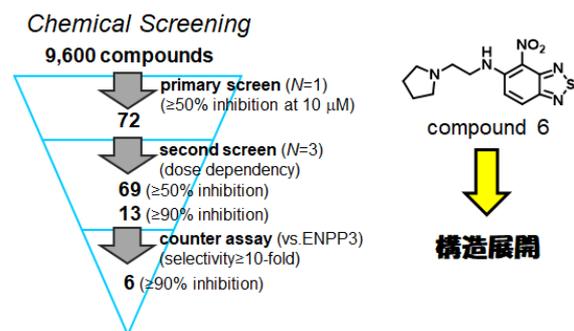
まることが期待される。

2. 研究の対象ならびに方法

申請者はこれまでに、ENPP1 活性を高感度に検出可能な蛍光プローブ TG-mAMP の開発に成功している。³ TG-mAMP を用いてケミカルスクリーニングを実施した結果、阻害活性、特異性の点で優れた特性を持つ **compound 6** を見出すことができた (右図)。しかしながら、**compound 6** の ENPP1 阻害活性 ($IC_{50} = 390 \text{ nM}$) は十分ではなく構造最適化の必要があった。



そこで、**3-1. compound 6** の構造を基に構造展開を行い、さらに ENPP1 阻害活性の強い阻害剤開発を目指した。また、**3-2.** 構造最適化された阻害剤について、細胞系において STING 経路活性化能を示すか調べるために、HEK-Blue™ ISG 細胞を用いて SEAP 発現を指標に STING 経路活性化能を評価した。



3. 研究結果

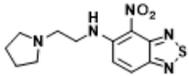
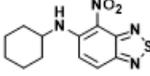
3-1. compound 6 の構造活性相関

compound 6 に着目し構造展開を行い、阻害活性、選択性に優れた ENPP1 阻害剤の創製を目指した。nM オーダーでの ENPP1 高発現細胞特異的な増殖阻害を達成することを目指すと同時に、STING 経路の活性化に基づいた自然免疫系の活性化により誘起される動物個体での抗腫瘍作用にも着目して研究を進めた。

ヒット化合物として benzothiadiazole が得られたが、その母核が最適とも限らない。そこで、ヒット化合物と類似する構造を持つ母核についても検討した (何れもニトロ基のオルト位にアミノ基を持つ化合物を合成することとした)。これは、他のヒット化合物の中にニトロ基のパラ位にアミノ基を持つ化合物は阻害活性がやや弱いことに加え、ENPP3 に対する選択性も乏しかったためである。

TG-mAMP を用いて合成した 62 化合物の ENPP1 阻害活性の評価を行った (Table 1)。その結果、ポジティブコントロール (スクリーニングヒット **Compound 6** の周辺化合物) として合成した **Compound 6-1, 4** ($IC_{50} = 0.87, 0.23 \mu\text{M}$) はおよそスクリーニング時と同程度の阻害活性を示すことが確認できた (Table 1)。様々な構造展開の結果、**Compound 6-18, 37** で阻害活性の向上が認められ、母骨格の変換を行うことにより **Compound 6-39, 47, 49, 53** のように更なる阻害活性の向上が認められた。化合物の構造は知財の関係で非開示とする。

Table 1. Inhibitory activity (IC_{50}) of **compound 6** derivatives toward ENPP1 and ENPP3.

		Inhibition (% at 10 μM) * at 1 μM	
		ENPP1 ($IC_{50} \mu\text{M}$)	ENPP3 ($IC_{50} \mu\text{M}$)
Compound 6		95 (390 nM)	- (14000 nM)
Compound 6-4		99	65
Compound 6-18		99% (0.042)	79% (1.1)
Compound 6-31		99% (0.018)	96% (0.46)
Compound 6-37		100% (0.014)	98% (0.26)
Compound 6-39		100% (0.043)	80% (2.5)
Compound 6-47		99%* (0.0093)	90%* (0.13)
Compound 6-49		99%* (0.010)	76%* (0.30)
Compound 6-53		99%* (0.0071)	67%* (0.48)

3-2. compound 6 誘導体の細胞系で機能評価

まず、細胞系 (MDA-MB-231 細胞) における **compound 6** 誘導体の ENPP1 阻害活性 (Figure 2) および細胞毒性 (増殖阻害活性) の評価を行った (Figure 3)。その結果、*in vitro* で行った酵素活性阻害評価の結果と概ね一致して、**compound 6-47, 49, 53** で細胞系においても強い ENPP1 阻害活性が確認できた (Figure 1)。また、MDA-MB-231 細胞における細

胞毒性に関しては **compound 6-4, 18, 31** で強く見られた一方で、**compound 6-39, 37, 47** では少なくとも 20 倍程度毒性が低減することが分かった (**Figure 2**)。加えて、細胞膜透過性が低い (或いはない) と考えられる **compound 6-49, 53** では細胞毒性は殆ど認められなかった。従って、**compound 6-4** などのよる細胞毒性は、細胞内 ENPP1 或いは細胞内の off-target 酵素を阻害することにより発現していると考えられる。

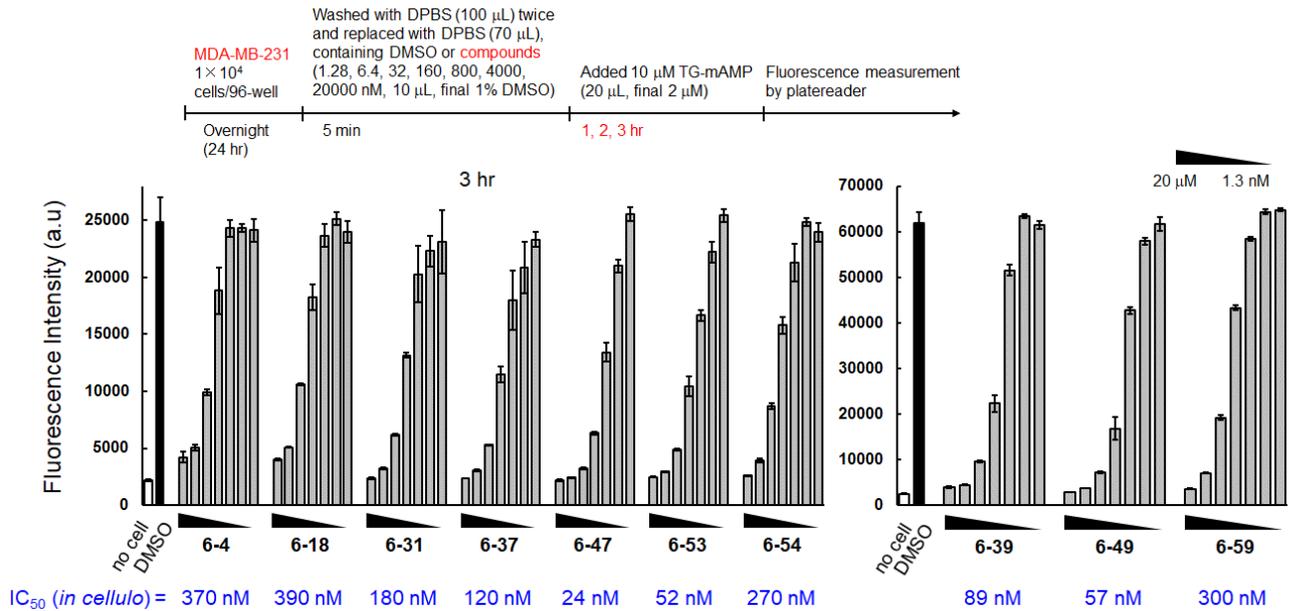


Figure 1. *In cellulo* detection of ENPP1 activity using TG-mAMP and inhibitory effect of synthesized inhibitors. Fluorescence enhancements of TG-mAMP upon incubation in MDA-MB-231 cells. Reactions were performed with 2 μ M TG-mAMP in the presence or absence of 0.00128, 0.0064, 0.032, 0.16, 0.80, 4.0 and 20 μ M **compound 6** derivatives in DPBS (1% DMSO) at 37 $^{\circ}$ C for 3 hr (left) or 2 hr (right) in 96-well microplates (IWAKI PLL-coated). The results are shown as mean \pm S.D. ($n = 3$).

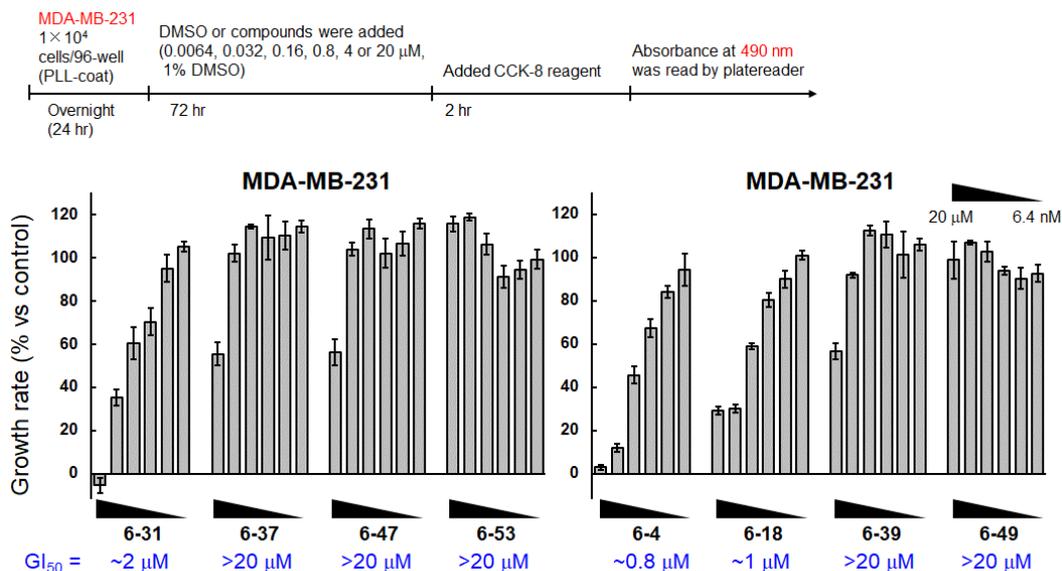


Figure 2. Cell viability of synthesized **compound 6** derivatives in MDA-MB-231 cells. MDA-MB-231 cells (1.0×10^4 cells/96-well plate) were treated with DMSO or 0.00128, 0.0064, 0.032, 0.16, 0.80, 4.0 and 20 μM **compound 6** derivatives (1% DMSO) at 37 °C for 72 hr. Cell viability was evaluated by using CCK-8 reagent. The results are shown as mean \pm S.D. ($n = 3$).

次に、Invivogen 社より STING 経路活性化にตอบสนองして SEAP (分泌型の alkaline phosphatase) を発現するレポーター細胞 (HEK-Blue-ISG 細胞、**Figure 3**) を購入し、それを用いて **compound 6** 誘導体の機能を評価することとした。HEK 細胞は一般的に ENPP1 を発現していることが知られているので、2',3'-cGAMP 刺激にตอบสนองして発現する SEAP が ENPP1 阻害剤共存下で増大することを指標に、**compound 6** 誘導体の STING 経路活性化能を評価できると考えた (**Figure 4**)。

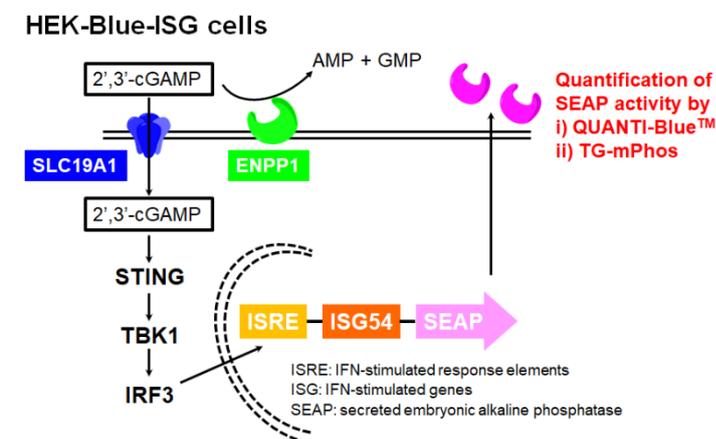


Figure 3. Schematic illustration of signaling pathway of HEK-Blue-ISG cells that can respond to STING pathway activation through SEAP expression.

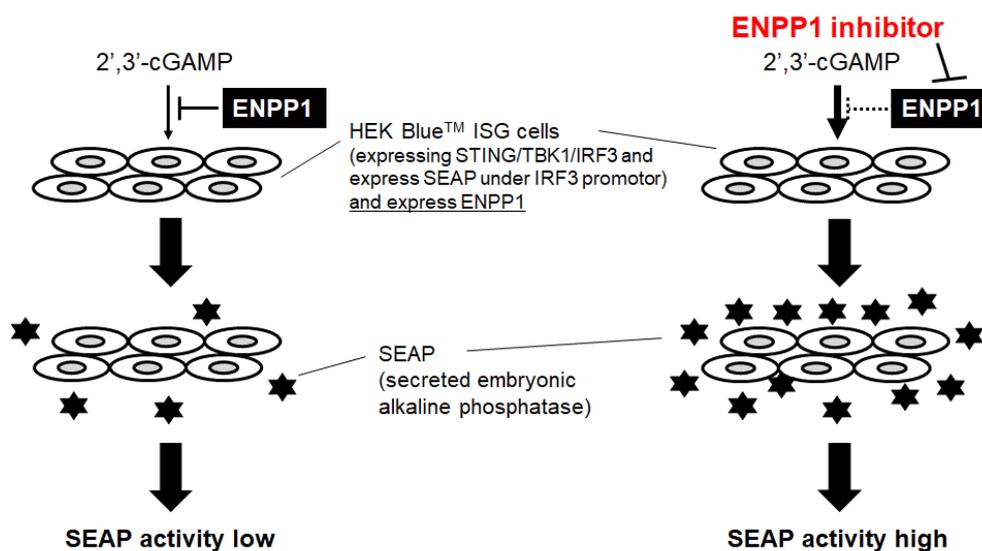


Figure 4. Schematic illustration of cell-based STING pathway upregulation effect of ENPPI inhibitors. We are planning to use HEK Blue™ ISG cells (from Invivogen), expressing STING/TBK1/IRF3 and probably expressing ENPPI. They express SEAP under the control of the IRF-inducible promoter, so we can measure/quantify STING pathway activity through SEAP activity.

HEK-Blue-ISG 細胞における **compound 6** 誘導体の細胞毒性を評価した (**Figure 6**)。その結果、MDA-MB-231 細胞を用いた時と異なり (**Figure 3**)、殆ど全ての誘導体で細胞毒性は全く観察されなかった。全ての誘導体で GI₅₀ 値は >20 μM であった。ただし、**compound 6-18, 37** では 20 μM において若干の毒性が見られた。Figure 1, 2, 5 の結果を Table 2 に纏める。

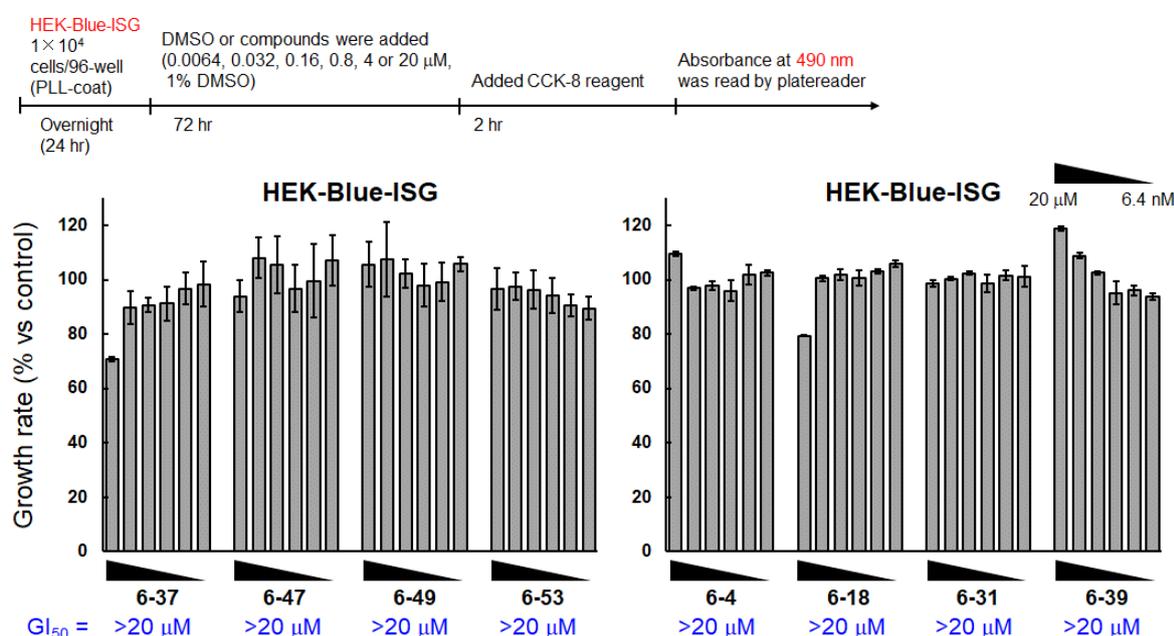


Figure 5. Cell viability of synthesized **compound 6** derivatives in HEK-Blue-ISG cells. HEK-Blue-ISG cells (1.0×10^4 cells/96-well plate) were treated with DMSO or 0.00128, 0.0064, 0.032, 0.16, 0.80, 4.0 and 20 μM **compound 6** derivatives (1% DMSO) and incubated at 37 °C for 72 hr. Cell viability was evaluated by using CCK-8 reagent. The results are shown as mean ± S.D. ($n = 3$).

Table 2. GI₅₀ in MDA-MB-231 and HEK-Blue-ISG cells and IC₅₀ values of **compound 6** derivatives.

	50% growth inhibition (GI ₅₀) (μM)		IC ₅₀ (μM)	<i>in vitro</i> IC ₅₀ (μM)
	MDA-MB-231	HEK-Blue-ISG	MDA-MB-231	
6-4	0.8	>20	0.37	0.23
6-18	1.0	>20	0.39	0.042
6-31	2.0	>20	0.18	0.018
6-37	~20	>20	0.12	0.014
6-39	~20	>20	0.089	0.043
6-47	~20	>20	0.024	0.0093
6-49	>20	>20	0.057	0.010
6-53	>20	>20	0.052	0.0071

実際に HEK-Blue-ISG 細胞を用いて、2',3'-cGAMP 刺激により SEAP の発現が誘導され STING 活性が評価可能か検討することとした。SEAP 活性の検出には市販されている QUANTI Blue™ を用いた。評価の結果、2',3'-cGAMP の濃度依存的に吸光度の上昇 (= SEAP 活性の上昇、STING 経路の活性化) が観察された (**Figure 7**)。おそらく 5 μM の 2',3'-cGAMP でも STING 経路はまだ飽和していないと考えられる。

この実験のように ALP 活性を測定する際には、用いる FBS に注意が必要である。初めはいつも通り不活化された FBS を用いて実験を行ったが、cGAMP 刺激していないコントロールのウェルでも吸光度の時間依存的な上昇が観察された (**Figure 6 A**)。この結果は、培地中に ALP-like な酵素が含まれているためだと考えられたので、FBS を更に 56 °C、30 min 不活化して用いたところ吸光度の上昇は完全に抑制された (**Figure 6 B**)。これ以降の実験では、全て完全に不活化された FBS を用いた培地を使用している。

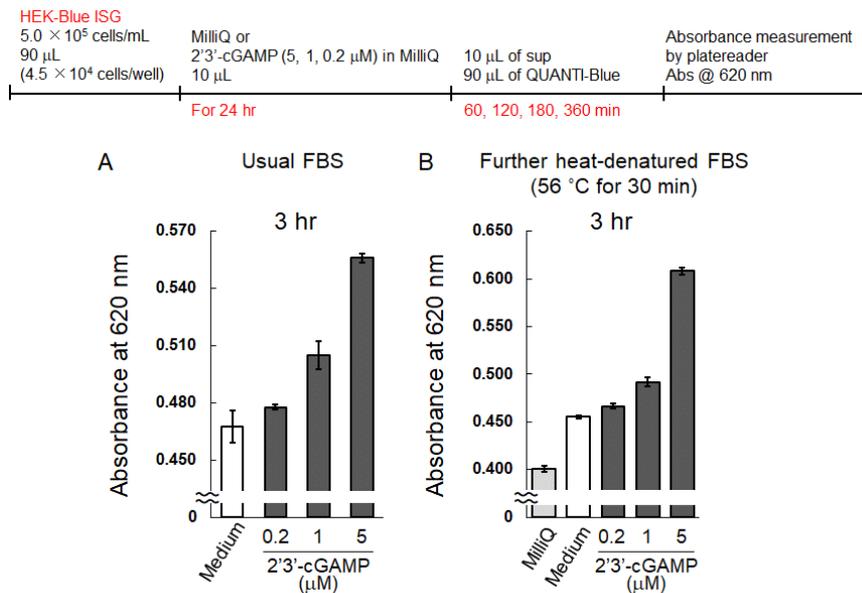


Figure 7. SEAP activity in HEK-Blue-ISG cells. HEK-Blue-ISG cells (4.5×10^4 cells/96-well plate) were treated with MilliQ or 2',3'-cGAMP (final 0.2, 1, 5 μ M) in medium containing (A) usual FBS or (B) further heat denatured FBS (56 °C for 30 min to inactivate ALP-like enzyme in the medium), and incubated at 37 °C for 24 hr. SEAP activity was evaluated by measuring Abs₆₂₀ after adding QUANTI Blue reagent. The results are shown as mean \pm S.D. ($n = 3$).

続いて、**Figure 4** に示した概念の実験を行った。即ち、ENPP1 を弱いながら発現する HEK-Blue-ISG 細胞では外から添加した 2',3'-cGAMP は少なからず ENPP1 により加水分解され STING 経路の活性化は部分的に抑制されるはずだが、ENPP1 阻害剤を添加すれば 2',3'-cGAMP は分解が抑えられ STING 活性は増強されると考えられる。

まず、毒性が殆ど見られず細胞での ENPP1 阻害活性が良好な **compound 6-37, 47, 49, 53** を用いて 2',3'-cGAMP 処理後の SEAP 活性測定を行った (**Figure 7**)。その結果、高濃度 (5 μ M 以上) の **compound 6-37, 47** で処理した場合に SEAP 活性の増強が認められた一方で、**compound 6-49, 6-53** では SEAP 活性の増強は認められなかった。この結果を単純に解釈すると、**compound 6-49, 6-53** は細胞内に入らない可能性が高いと考えられるので細胞内の ENPP1 を阻害することが STING 経路の活性化に重要である可能性を示唆している。

2',3'-cGAMP 刺激なしで 20 μ M 阻害剤を添加した場合には SEAP 活性はバックグラウンドレベルであった点から、化合物が STING アゴニストになっている可能性などを含めた直接的な STING 経路の活性化を **compound 6** 誘導体が誘起している可能性は排除できる。た

だし、**compound 6-37**は若干毒性が見られる化合物であるため (**Figure 5**)、この毒性がSEAP活性の上昇に寄与している可能性は排除できない (仮に毒性があったとして、それがSEAP活性を上げる理由は不明である。毒性があればタンパク質合成が止まりSEAPは寧ろ減りそうな気がする。**compound 6**が膜を緩くする様な作用を持ちタンパク質が漏れ出しやすくなることは考えられるだろうか。)。

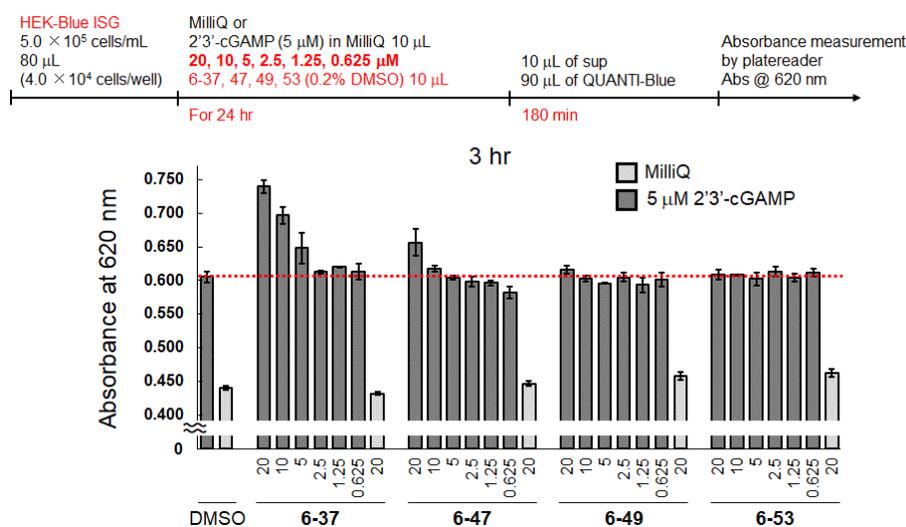


Figure 7. SEAP activity in HEK-Blue-ISG cells treated with ENPP1 inhibitors. HEK-Blue-ISG cells (4.0×10^4 cells/96-well plate) were treated with MilliQ or $5 \mu\text{M}$ 2'3'-cGAMP and incubated at 37°C for 24 hr in the presence or absence of ENPP1 inhibitor, **6-37**, **47**, **49** or **53** (indicated concentrations, 0.2% DMSO). SEAP activity was evaluated by measuring Abs_{620} after adding QUANTI Blue reagent. The results are shown as mean \pm S.D. ($n = 3$).

compound 6-37の結果の再現性確認と他の**compound 6**誘導体も評価することとした。その結果、**compound 6-4**, **31**ではSEAP活性の弱い増強が認められた一方で、**compound 6-18**では**compound 6-37**と同程度の強い増強が認められた (**Figure 8**)。やはり、**compound 6-18**も $20 \mu\text{M}$ で若干毒性が見られる化合物であるので、その毒性がSEAP活性上昇の原因である可能性は排除できない (また**compound 6-18**と**37**は母骨格が異なるものの構造は非常に似ている)。

SEAP活性が上がる原因が他にあるとすれば、細胞外へ2',3'-cGAMPを輸送するトランスポーター (同定はされていないが存在することが示唆されている)を**compound 6**誘導体が阻害すればこのような結果が得られることは妥当かも知れない。

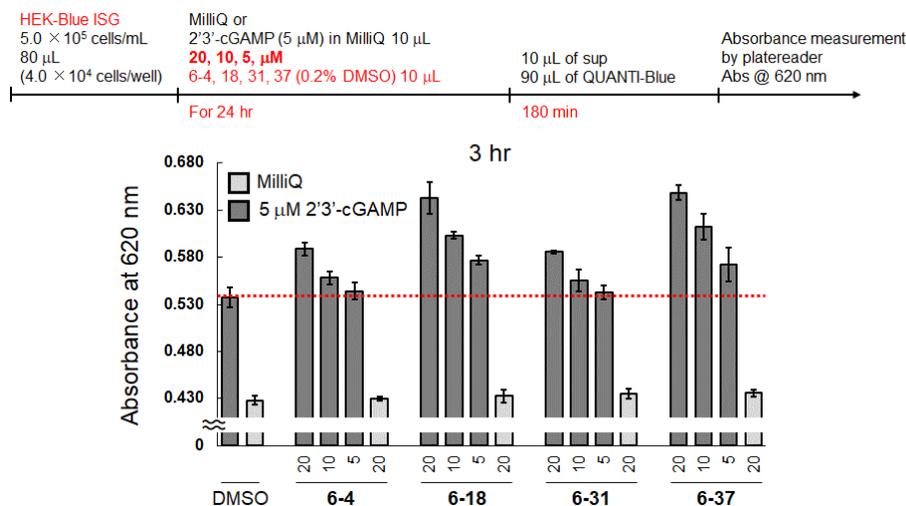


Figure 8. SEAP activity in HEK-Blue-ISG cells treated with ENPP1 inhibitors. HEK-Blue-ISG cells (4.0×10^4 cells/96-well plate) were treated with MilliQ or 5 μM 2'3'-cGAMP and incubated at 37 °C for 24 hr in the presence or absence of ENPP1 inhibitor, **6-4**, **18**, **31** or **37** (indicated concentrations, 0.2% DMSO). SEAP activity was evaluated by measuring Abs₆₂₀ after adding QUANTI Blue reagent. The results are shown as mean ± S.D. ($n = 3$).

4. 考察

最も強い阻害活性を示す **compound 6-53** は **compound 6** と比較して阻害活性は 55 倍強くなり、また ENPP3 に対する選択性も高くなった。ENPP1 は細胞外に存在する酵素であるため、阻害剤は細胞内へ入る必要がなく、寧ろ入らないことで余計な酵素を阻害する可能性も低くなると予想される。つまり、細胞膜透過性を低下させる方針は単に ENPP3 に対する選択性を高めるだけでなく他の細胞内の酵素に対する選択性向上にも繋がると期待される。しかしながら、何故極性官能基の導入により *in vitro* で ENPP3 への選択性が向上するかについては不明である。

細胞実験において、**compound 6-18**, **6-37** で SEAP 活性の向上が認められたが、この結果が真に STING 経路を活性化している結果とは言い切れない。従って、THP1 細胞などを刺激後、HEK-Blue INFα/β細胞を用いて interferon βの発現量を直接定量することにより確かめる必要があると考えられる。

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)

6. 論文発表

Kawaguchi M,[#] Han X, Hisada T, Nishikawa S, Kano K, Ieda N, Aoki J, Toyama T, Nakagawa H[#]
(**#Co-corresponding authors**)

“Development of an ENPP1 fluorescence probe for inhibitor screening, cellular imaging and prognostic assessment of malignant breast cancer”

J. Med. Chem. 62, 9254–9269, 2019. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b01213.