

氏名（本籍）	佐藤秀哉（北海道）
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	甲第59号
学位授与の日付	2023年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	<b>Design, Synthesis and Biological Evaluation of 2-Pyrrolone Derivatives as Radioprotectors Regulating p53-Dependent Apoptosis and Their Mechanistic Study</b> (p53依存性アポトーシス制御型放射線防護剤としての2-ピロロン類の設計、合成、活性評価及びその作用機序解析)

論文審査委員	(主査) 教授 青木 伸
	教授 内海 文彰 教授 内呂 拓実
	准教授 早田 匡芳 教授 月本 光俊

## 論文内容の要旨

Radiation therapy (RT) is a common cancer treatment that is broadly applied to cancer patients for its advantages such as non-invasive anti-cancer activity and the coverage of radiation to tumor tissues with spatial control. However, ionizing radiation (IR)-induced DNA damages also take place in normal cells, resulting in toxicity and acute side effects. Radioprotectors that protect normal tissues from IR-induced injury are known as a tool for addressing this problem. To date, amifostine, a ROS scavenger, has been approved as a radioprotector by the Food and Drug Administration (FDA) in the

US, while its clinical use is limited due to its side effects such as severe nausea and vomiting. Therefore, the development of new radioprotectors with a high radioprotective activity and low side effects is a subject of considerable interest.

We previously reported that several compounds regulate p53 function and protect mice from IR-induced injury. The p53 protein is activated by IR-induced genomic stress and plays a central role in DNA damage response (DDR) including cell cycle arrest, DNA repair and apoptosis. Therefore, the regulation of p53 signaling pathway is a potential strategy to reduce the side effects caused by radiation. This background prompted us to search new p53-regulating radioprotectors and we conducted phenotypic screening of 9600 compounds included in a chemical library of the Drug Discovery Initiative at The University of Tokyo, using MOLT-4 cells that express wild-type p53 as a model of normal cells. As a result of the screening, a class of new radioprotective agents, 2-pyrrolone compound, STK160830, was discovered.

In Chapter 2, we report on the design, synthesis and biological evaluation of STK160830 and its derivatives. The 2-pyrrolone derivatives that were synthesized in this study have two stereoisomers for the *exo*-olefin part of the 2-pyrrolone core and we found that the *Z*-form compound was more biologically active than the corresponding *E*-form compound. Radioprotective activity was evaluated by dye exclusion assays using MOLT-4 cells, as a model of normal cells. The result of a structure-activity relationships (SAR) study revealed the several structural requirements for radioprotective activity. Regarding mechanistic studies, the expression level of p53 was confirmed

by Western blot analysis and the results indicated that the radioprotective activity is dependent on the suppression of p53.

In Chapter 3, we report on the biological analysis of the mechanism of radioprotection by STK160830. We initially found that STK160830 acts on the upstream of the mitochondria or on the mitochondria themselves by checking the percentage of cells losing the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ). Then, we verified the p53-specificity of radioprotection of STK160830 by checking anti-apoptotic activity using several cell lines having p53-mutation. As we expected, the anti-apoptotic activity of STK160830 was shown in the cell lines bearing wild-type p53. To examine the effect on p53, the expression level was confirmed by western blot analysis and the result suggested that STK160830 suppressed p53 accumulation upon the IR-irradiation. Further mechanistic study revealed that STK160830 inhibited nascent mRNA synthesis of TP53, an encoding gene of p53, without DNA-intercalation.

In conclusion, we report on the design, synthesis and the evaluation of radioprotective activity of synthesized derivatives. We also report on the biological analysis of the radioprotective activity of STK160830 and we found that STK160830 inhibited the p53 accumulation and the nascent TP53 synthesis without DNA intercalation. We believe that this information will be helpful for molecular design of 2-pyrrolone derivatives and other types of derivatives and the understanding of the function of p53 in cellular response to radiation.

## 論文審査の結果の要旨

放射線療法はがん病変部位に対して空間的に制御された電離放射線を照射し、がん細胞を殺傷する治療法である。その非侵襲的な特性と化学療法との併用が可能である点などから、現在ではがん治療に広く用いられている。一方課題として、がん病変部位周辺へのダメージや周辺のリスク臓器を考慮した処方線量の制限などが挙げられ、その解決が望まれてきた。この課題を克服する方法の一つとして、放射線防護剤が知られている。放射線防護剤は正常細胞に作用することで、放射線による副作用から正常細胞を防護する薬剤である。これまで薬学部生命創薬科学科生物有機化学（青木）研究室では、p53 依存性アポトーシス経路に作用するオルトバナジン酸ナトリウムや 8-キノリノール類である AS-2 及び 5CHQ が、優れた放射線防護活性を有していることを明らかにしてきた。またこれらの化合物が、致死線量の放射線を照射したマウスを防護することを見出している。一方で、骨格に由来する毒性の面で改善の余地が残されており、より低毒性な化合物の創製が望まれていた。そこで申請者らは、新たな骨格を有する放射線防護剤の開発を目的として、東大創薬機構の化合物ライブラリーからスクリーニングを行ったところ、新たに 2-Pyrrolone 骨格を母骨格とする STK160830 という化合物を見出した。放射線に応答して p53 依存性アポトーシスを示す MOLT-4 細胞を用い、STK160830 の放射線防護活性を評価したところ、STK160830 は 10 Gy という高線量の放射線を照射した MOLT-4 細胞で高い細胞死抑制効果を示すことを明らかにした。

第 2 章では、スクリーニングで見出された 2-pyrrolone 類 STK160830 とその誘導体について設計と合成及び活性評価を行った。本研究ではまず、アセチルコハク酸誘導体、アニリン誘導体、ベンズアルデヒド誘導体の 3 つのビルディングブロックを用いて STK160830 の合成法を確立した。本合成法では、2-pyrrolone 環のエキソオレフィン部位に由来する E 体と Z 体の二つの異性体が生成したが、これらを再結晶により精製し、活性の高い Z 体を単離することに成功した。また同様の合成により、他の誘導体を合成した。次に、ヒト白血病由来 T 細胞株である MOLT-4 細胞を正常細胞のモデルとして用い、得られた化合物の放射線防護活性を評価した。MOLT-4 細胞は野生型 p53 を有しており、正常細胞と同様、放射線に応答してアポトーシスが誘導される。この MOLT-4 細胞を用いて、放射線防護活性の評価を行ったところ、いくつかの優れた放射線防護活性を有する化合物を発見した。また、2-pyrrolone 類が放射線防護活性を有するために必要な構造活性相関を取得した。さらに、放射線防護活性を有する 2-pyrrolone 類がアポトーシスの誘導に重要な働きを担う p53 タンパク質を抑制していることを明らかにした。

第 3 章では、STK160830 の放射線防護活性について作用機序を解析した。MOLT-4 細胞を用いて、放射線誘発性 p53 依存性アポトーシス経路に対する STK160830 の作用を調べたところ、STK160830 は p53 の上流に作用していることが示唆された。また、STK160830 の p53 タンパク質発現量に対する影響をウエスタンブロッティングにより評価したところ、STK160830 は p53 及び下流のアポトーシス因子である PUMA やカス

パーゼの発現量を低下させていることが分かった。さらに qPCR により p53 及び下流遺伝子の発現量を定量したところ、STK160830 は p53 をコードする mRNA である *TP53* 及び下流遺伝子の mRNA 合成を阻害していることが示唆された。mRNA 合成阻害作用について、既存の mRNA 合成阻害剤であるアクチノマイシン D との比較を行ったところ、DNA インターカレート作用によるものでないことが示唆され、アクチノマイシン D が単独で p53 の蓄積を誘導したのに対し、STK160830 は p53 の蓄積を誘導しないことを明らかにした。

本論文は放射線防護活性を有する 2-Pyrrolone 類について設計と合成、活性評価及び作用機序解析に関する論文であり、2-Pyrrolone 骨格を有する化合物の基礎的な有機化学合成及び p53 を標的とする放射線防護剤の開発に有用な知見を与える内容である。従って本論文は、博士（薬科学）の学位論文として十分に価値あるものと判断した。