

## フッ素置換基を含んだ核酸分子が及ぼす DNA特性と相互作用変化に対する理論的考察

<sup>1</sup>阪大院医, <sup>2</sup>阪大院薬, <sup>3</sup>大鵬薬品

○小関準<sup>1</sup>, 今野雅允<sup>1</sup>, 浅井歩<sup>1</sup>, 堀江直宏<sup>2</sup>, 常國健太<sup>3</sup>, 川本弘一<sup>1</sup>,  
佐藤太郎<sup>1</sup>, 小比賀聡<sup>2</sup>, 土岐祐一郎<sup>1</sup>, 森正樹<sup>1</sup>, 石井秀始<sup>1</sup>

### Theoretical analysis of DNA characteristics and interaction changes exerted by nucleic acids containing fluorine substituent

○Jun Koseki<sup>1</sup>, Masamitsu Konno<sup>1</sup>, Ayumu Asai<sup>1</sup>, Naohiro Horie<sup>2</sup>, Kenta Tsunekuni<sup>3</sup>, Koichi Kawamoto<sup>1</sup>, Taroh Satoh<sup>1</sup>, Satoshi Obika<sup>2</sup>, Yuichiro Doki<sup>1</sup>, Masaki Mori<sup>1</sup>, Hideshi Ishii<sup>1</sup>

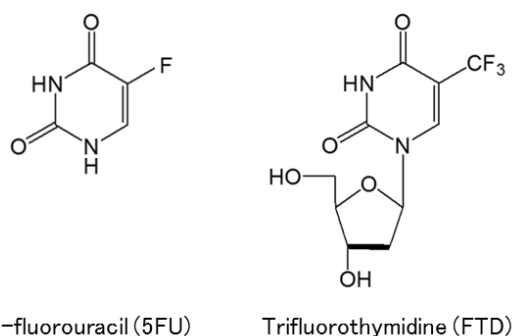
<sup>1</sup> Graduate School of Medicine, Osaka University, Japan

<sup>2</sup> Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Japan

<sup>3</sup> Translational Research Laboratory, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd., Tokushima, Japan

**【Abstract】** Fluorine-modified nucleic acid molecules, such as 5-fluorouracil (5FU) and trifluorothymidine (FTD), are widely used in medical science and clinical site. The pharmacological compounds of these anti-tumor drugs could be incorporated into DNA. Although it is unknown whether to occur a significant effect by the incorporation of 5FU, the incorporation of FTD produces highly anti-tumor effect. Then, the molecular dynamics simulations and molecular orbital calculations have been performed to understand the reason why there is large differences between 5FU and FTD. In addition, some verification experiments have been performed based on the results of computational analyses. From our results, we propose the hypothesis of unique pharmaceutical function retained by FTD. To justify our hypothesis, administration tests have been performed with subcutaneous implantation model of even the pancreatic cancer cell line.

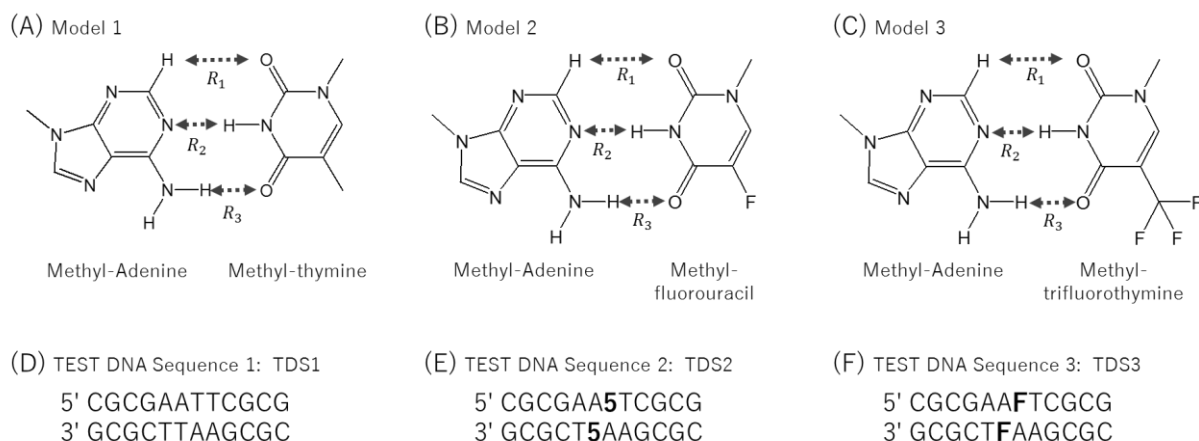
**【序】** 近年、5-fluorouracil (5FU) や Trifluorothymidine (FTD) のようなフッ素置換基を有した核酸分子 (Fig. 1) が、抗がん剤として臨床現場や医学研究で広く使用されている。5FU はウラシルと同じ経路を経て RNA に組み込まれてリボソーム RNA の形成を阻害する、もしくは 5-fluoro-deoxyurasil となりチミジル酸の合成を阻害することで抗腫瘍効果を発揮する。一方で FTD では、詳細こそ分かっていないが、リン酸化体を経由して DNA に取り込まれることで抗腫瘍効果を発揮すると推定されている。また最近になって、5FU も DNA に取り込まれることが分かった。しかしながら、DNA に取り込まれることでの抗腫瘍効果は観測できていない。5FU と FTD では塩基部分構造が非常に似ているにもかかわらず、抗腫瘍効果に対して大きな差が生じる理由は明らかになっていない。そこで本研究では、DNA に取り込まれた FTD と 5FU がもたらす物理的特性の違いを明らかにするために、分子動力学計算と量子化学計算を用いて解析す



**Fig. 1.** Structural formulas of main components of anti-tumor drugs with fluorine substituent

ることと、FTD が取り込まれた DNA が誘導する機能障害メカニズムを解明することを目的とした。

**【方法 (理論)】**フッ素置換基が含まれる事によって変化する相補塩基との相互作用を理解するために、塩基部分の単純化モデル (Fig. 2A-C) を作成し MP2/6-31++G\*\*レベルで最適化し乖離エネルギーを算出した。さらに相補塩基以外の相互作用を解明する為に参照 DNA のチミジンの一部に 5FU (5), FTD (F) に置換した二本鎖 (Fig. 2D-F) を作成した。エネルギー最小化の後、Amber Force Field を用いて 310 [K]の水相環境下で分子動力学計算を実施した。注目している塩基間相互作用を解析するため、サンプリングしたトラジェクトリを用いて MP2/6-31G\*レベルで NBO 解析を実施した。



**Fig. 2.** Simple base-pair models: methylated adenine and (A) methylated thymine, (B) methylated fluorouracil, and (C) methylated trifluorothymine pair model. TEST DNA Sequences 1, 2, and 3: containing (D) thymidine, (E) 5FU, and (F) FTD.

**【方法 (実験)】**フッ素置換基が含まれる事によって変化する物理学的特性を観測するため、それぞれの TEST DNA (Fig. 2D-F) の紫外分光光度計 (SHIMADZU UV-1800 spectrometer) を用いて吸光度を測ることで、 $T_m$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta H$  を測定した。さらに、理論計算からの仮説を実証する目的で、ヌードマウスに膵がん細胞株 (Panc1) を移植し、5FU, FTD それぞれに相当した抗がん剤を経口投与し、腫瘍体積変化を比較した。

### 【結果・考察】

当然ながら単純化モデルを用いた計算では、通常チミジンよりもフッ素原子が入った 5FU, FTD の方が乖離エネルギーは大きく二量体は安定化する。一方で二本鎖 DNA ではその傾向は逆転し、通常 DNA が一番安定化し FTD が入った DNA では FTD と相補アデニン間の水素結合が断裂し不安定化した。これは、フッ素原子が同一鎖の隣接した塩基と電子的なドナーアクセプター相互作用で強くひきつけあうことにより生じていると考えられた。この理論結果を支持するように、通常 DNA, 5FU 含有 DNA, FTD 含有 DNA の  $T_m$  値はそれぞれ 64.2, 58.9, 56.8 [°C] となり、FTD 含有 DNA は熱力学的にも不安定化が示された。このことから、DNA に取り込まれた FTD が抗腫瘍効果を発揮する理由が、FTD がもたらす二重らせん構造の不安定性から、DNA 認識タンパク質に認識されることが要因と考えられる。この仮説が正しければ、FTD はがん種を選ばずに効果を発揮することが考えられる為、難治性がんである膵がん細胞株を用いた動物実験で抗腫瘍効果を確認したところ、膵がんに対する抗がん剤である Gemcitabine と同等かそれ以上の抗腫瘍効果を確認できた。詳細は当日発表する。