

平成 30 年 6 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14977

研究課題名(和文) Wntシグナル制御分子を構造基盤とする抗脳腫瘍薬開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic agents derived from Wnt signaling inhibitor for treating brain cancer

研究代表者

好光 健彦 (Yoshimitsu, Takehiko)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30301576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Agelastatin A (AA) は、Wnt/ $\beta$ -catenin経路を阻害し、がん細胞の増殖を顕著に抑制する。本研究では、脳腫瘍治療薬の開発に資するAA誘導体の創製を目指した検討を進め、以下の結果を得た。1)シリルエノールエーテルのラジカルアジド化を活用し、AA及びその誘導体に至る新規合成経路を確立した。本経路により1位窒素に様々な置換基を備えた誘導体を容易に調製することが可能となった。また、構造活性相関研究により優れた活性を示すAA誘導体を同定した。2)アルケンの触媒的オキシアジド化手法を開発した。3)上記合成経路により三種のプロープ分子を調製したが、いずれも活性を欠くことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Agelastatin A (AA) exhibits potent antiproliferative activity against cancer cell lines by inhibiting the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway responsible for cellular processes. The present study was undertaken to develop new therapeutic agents derived from AA for treating brain cancer and has culminated in the following achievements. 1) A new synthetic route to AA and AA derivatives was established by employing radical azidation of a silyl enol ether. The route enabled facile access to AA analogs with varying N1-substituents. Furthermore, AA analogs that exhibit potent inhibitory activity were identified by the structure-activity relationship (SAR) study. 2) A new method for the catalytic radical oxyazidation of alkenes was developed. 3) The divergent synthetic route successfully provided access to three chemical probes applicable for identifying the molecular target of AA. However, none of the probes were found to exert desirable activities.

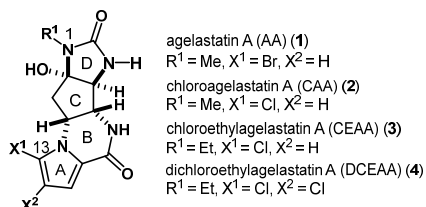
研究分野：有機合成化学、創薬化学

キーワード：アルカロイド 脳腫瘍 agelastatin A Wnt/ $\beta$ -cateninシグナル阻害 抗がん剤 創薬

## 1. 研究開始当初の背景

ニューカレドニア海産海綿 *Agelas dendromorpha* の抽出成分が含有するアルカロイド agelastatin A (AA) (1) は、細胞増殖に関わる Wnt/ -catenin シグナルを阻害すると共に細胞外マトリクスタンパク質 osteopontin (OPN) の発現を抑制する (Mason *et al. Mol. Cancer Ther.* 2008, 7, 548.)。米国 Mayo Clinic と我々は、悪性脳腫瘍組織において OPN が高発現していることに着目し、その発現を抑制する AA をモチーフとする抗脳腫瘍薬の創製に向けた研究をこれまで展開してきた。一方で、この顕著な生物活性ゆえに、AA を医薬シードとする同様の創薬研究が世界中で繰り広げられてきたにもかかわらず、本天然物の構造改変は悉く活性の消失をもたらし、天然型 AA に匹敵する活性を維持した新規誘導体の獲得は極めて困難であると見做されてきた。このような背景下、我々は、今から遡ること数年前、上記の難局を打開する新規 AA 誘導体 (CAA (2), CEAA (3), DCEAA (4)) の開発に成功し、世界をリードする成果を得た (*Med. Chem. Commun.* 2013, 4, 1093. 特許 US9464093B2, 米国, 2012 年 10 月 12 日 (出願) 2016 年 10 月 11 日 (取得)) (Figure 1)。

Figure 1 AA and novel potent AA analogues



しかしながら、我々の萌芽的成果を医薬品開発に繋げるためには、上記候補化合物の毒性プロファイルを始めとする各種生物活性データの獲得、構造活性相関に基づく、より優れた AA 誘導体の獲得 (構造最適化)、そして、AA 誘導体の未だ明確ではない分子標的の解明が不可欠である (立案当時は、不明であったが、ごく最近の研究によってリボソームが AA の標的分子である可能性が報告された。後述の内容を参照)。さらに、これら全ての研究の推進を支える化合物の供給をもたらす洗練された化学合成法の確立が必須となる。そこで、こうした課題を解決し、現在我々が手にしているリード化合物を超える高活性・低毒性候補化合物を創製し、Wnt/ -catenin シグナル制御に基づく新たな抗がん剤開発戦略を確立すべく、本研究に着手した。

## 2. 研究の目的

Agelastatin A (AA) (1) は、抗がん剤の魅力的な創薬資源として世界中で獲得競争の対象となっている。その抗腫瘍活性の発現機構の詳細は未だ明確ではないが、Wnt/

-catenin シグナルの阻害によることが示唆されている。本研究では、AA をモチーフとする構造活性相関に関する知見を集積し、構造最適化を高度に推進することにより、Wnt/ -catenin シグナル制御に基づく悪性脳腫瘍の新規治療薬の開発に挑む。

## 3. 研究の方法

(1) Agelastatin A (AA) 並びに AA 誘導体の創製を加速する新規化学合成経路の確立

これまでの関連研究により、AA の化学修飾による誘導体化は悉く活性低下をもたらすことが知られていた。しかし、我々が最近の研究によって得た 'AA の 1 位窒素上置換基及び 13 位置換基の構造修飾が高活性誘導体の創製に繋がる' という新知見は、高い活性を備えた AA 誘導体の創製が困難とされてきたこれまでの常識を一変し、今後の構造最適化における強力な指針を与えている。そこで、まず、AA 骨格の 1 位窒素置換基及び 13 位置換基にバリエーションをもつ AA 誘導体の迅速な獲得をもたらす新規化学合成手法を確立する。

(2) Agelastatin A (AA) の分子標的の解明を目指した分子プローブの創製と生物活性評価

AA の活性発現に関わる分子標的を同定するうえで有用なケミカルプローブとして機能する AA 誘導体の獲得に挑む。上記研究計画 (1) において確立した合成経路に基づき、1 位窒素原子上の置換基に長鎖アルキル (アルキニル) 基を配した誘導体や、1 位窒素原子にリンカーを介してピオチンを連結させた誘導体を創製する。また、創薬標的の分子の解明には、得られた誘導体が AA に匹敵する活性を保持していることが必須であることから、それら AA 誘導体の生物活性を適宜評価する。

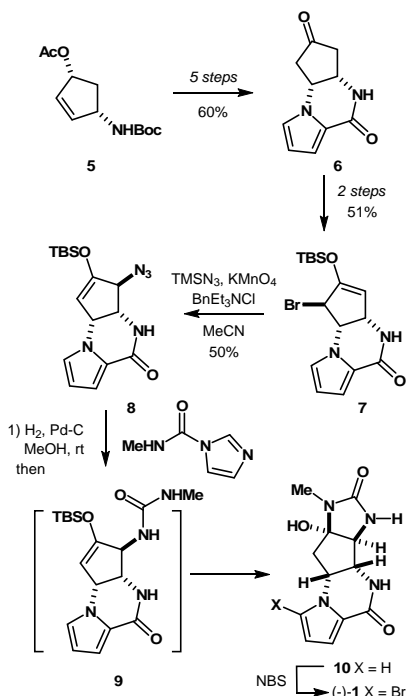
## 4. 研究成果

(1) Agelastatin A (AA) 並びに AA 誘導体の創製を加速する新規化学合成経路の確立

(1)- AA 並びに AA 誘導体の合成経路の確立 AA 骨格の 1 位窒素置換基及び 13 位置換基にバリエーションをもつ AA 誘導体の迅速合成をもたらす手法の確立を目的とする研究を進めた。その結果、シリルエノールエテル誘導体のラジカルアジド化を鍵として、入手容易な既知化合物から総 10 工程にて AA に至る全合成経路を開拓することに成功した (Scheme 1)。すなわち、既知のシクロペンテン誘導体 5 をピロールカルボン酸との縮合並びに環化を含む 5 工程の変換に付してケトン 6 とした。これより 2 工程を経て導いた化合物 7 を、過マンガン酸塩とトリメチルシリルアジドの組み合わせからなる反応剤によって処理し、アジド 8 とした。次いで、本中間体 8 を接触水素化に次ぐイミダゾリド反応剤とのカップリング、さらには、13 位の臭

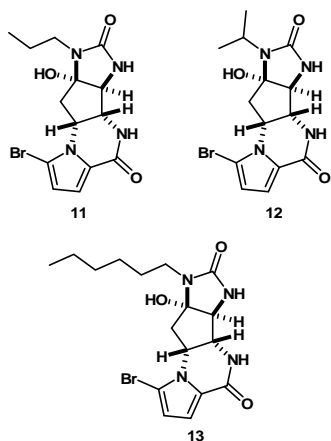
素化に付して、AA に至る新規全合成経路を開拓することに成功した。

Scheme 1 A new synthetic route to agelastatin A



今回新たに確立した合成経路は、アジド中間体 8 の簡便な処理により、1 位窒素原子上にさまざまな置換基を備えた AA 誘導体を容易に調製し得ることを特徴とする (Figure 2)。例えば、*n*-プロピル基、*i*-プロピル基、あるいは、*n*-ヘキシル基といった置換基を有する誘導体を、同手法により一挙に創製することも可能となった。

Figure 2 New AA analogues with modified D-ring system

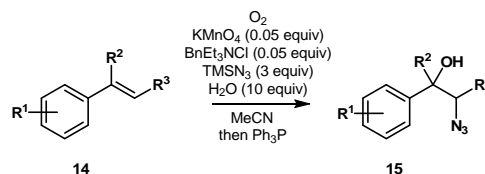


さらに、得られた誘導体の構造活性相関解析により、優れた *in vitro* 活性を示す 11 や 13 といった新規化合物を獲得することにも成功した。ここに得た知見は、我々が世界に先駆けて見出していた 'AA の 1 位窒素上置換基の構造修飾が高活性誘導体の創製に繋がる' という事実を明らかに裏付けるものである。また、枝分かれしたアルキル置換基を

有する誘導体 12 は活性を失う等、構造最適化に重要な指針となる知見を得ることができた。なお、ごく最近、米国マサチューセッツ工科大学 (MIT) の Movassaghi らのグループも、彼ら独自の合成戦略によって、AA の 1 位窒素上置換基にバリエーションを有する新規 AA 誘導体の創製を報告しており (Antropow *et al.* *J. Org. Chem.* 2017, 82, 7720.)、今後、AA をモチーフとする創薬研究がさらなる進展を遂げることが予想される。

(1)- 新規触媒的ラジカルオキシアジド化反応の開発 上記合成経路開拓の途上で、我々は独自のラジカルアジド化反応の開発に成功した。この知見をもとにさらなる検討を進めた結果、酸素存在下、過マンガン酸塩-トリメチルシリルアジド反応剤により、アルケンの触媒的オキシアジド化が進行することを見出した (Scheme 2)。本研究の対象である化合物のみならず、自然界にはさまざまな生物活性含窒素化合物が存在するため、本反応はこうした物質の化学合成に有用な新手法となり得る。

Scheme 2 A catalytic radical oxyazidation of styrenes



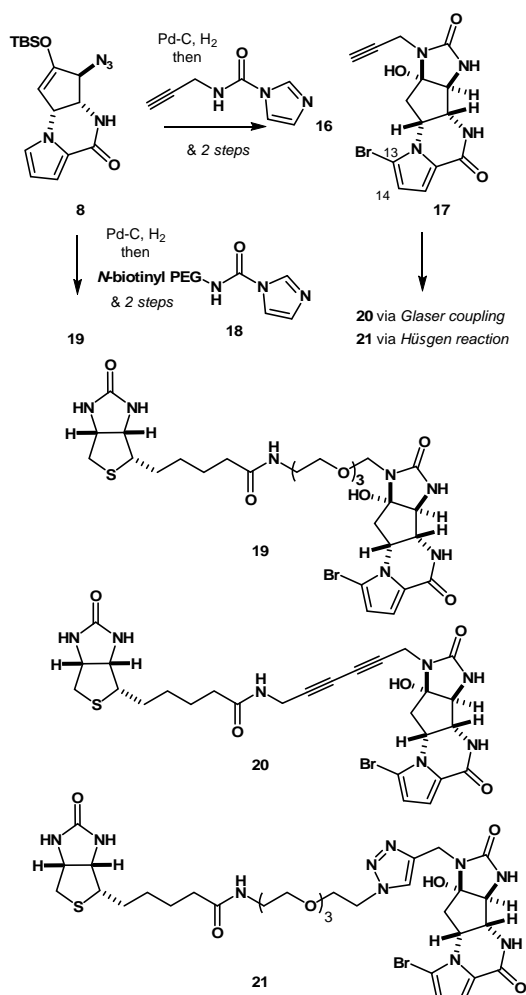
(2) Agelastatin A (AA) の分子標的解明を目指した分子プローブの創製と生物活性評価

(2)- AA 分子プローブの創製 AA 並びに新規 AA 誘導体の迅速合成をもたらす新規合成経路に基づき (上述)、共通中間体 8 に対し、それぞれ別途調製したフラグメントを導入することによって 1 位窒素原子上にビオチンリンカーを配した各種誘導体を創製することに成功した (Scheme 3)。すなわち、まず、化合物 8 の還元によって得たアミンに対して、ビオチンタグを有するイミダゾリド反応剤 18 を作用させて 19 とした。また、プロパルギル化合物 16 を作用させて化合物 17 とした後、これにアルキンタグを有した化合物を Glaser カップリングによって連結して化合物 20 とし、一方、別途調製したアジドを 1,3-双極子付加によって連結して化合物 21 へ導いた。

(2)- AA 分子プローブの生物活性評価 上記の手法によって得たプローブ分子を、ヒト前立腺がん細胞 (DU145) に対する細胞増殖抑制を指標とする生物活性評価に付したところ、残念ながら、いずれの化合物も活性を示さないことが明らかとなった。1 位窒素上置換基に長鎖アルキル基を有する AA 誘導体 13 やプロパルギル基を有する 17 は、顕著な

活性低下を示さなかったことから、活性低下の原因が極性リンカーによるものか否か等、さらなる検討によってこれを解明し、活性を保持したプローブを創製する必要がある。

**Scheme 3** AA chemical probes derived from azide **8**



ごく最近、米国の Romo/Liu らのグループは、A 環 C14 位に塩素原子を導入した AA 誘導体が天然型 AA には劣るものの、或る程度のがん細胞増殖抑制活性 ( $IC_{50} = 2.82 \pm 1.07 \mu\text{L}$ ) を示すことを見出す一方、C14 位に光アフィニティー基が導入された AA プローブ分子の活性が著しく低下することを報告している (Jouanneau *et al.* *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 2092.). また、AA と 80S リボソームの共結晶の X 線結晶構造解析により、彼らは 80S リボソームの A サイトに AA が取り込まれていることを見出し、たんぱく質合成を司るリボソームが AA の分子標的である可能性を提案している (McClary *et al.* *Cell. Chem. Biology.* **2017**, *18*, 605.). 今回行った我々の研究においては、現在までのところ、活性を保持した分子プローブの獲得には成功してはいないが、こうした国内外における分子標的探索に関する最新の知見を検証する意味でも、今後の検討を早急に進めたい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Sawaki, D.; Czibik, G.; Pini, M.; Ternacle, J.; Suffee, N.; Mercedes, R.; Marcelin, G.; Surenaud, M.; Marcos, E.; Gual, P.; Clement, K.; Hue, S.; Adnot, S.; Hatem, S. N.; Tsuchimochi, I.; Yoshimitsu, T.; Henegar, C.; Derumeaux, G., Visceral Adipose Tissue Drives Cardiac Aging Through Modulation of Fibroblast Senescence by Osteopontin Production, *Circulation*, **2018**, <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.117.031358>. 査読有

Morihara, H.; Obana, M.; Tanaka, S.; Kawakatsu, I.; Tsuchiyama, D.; Suizu, H.; Ishida, A.; Kimura, R.; Tsuchimochi, I. Maeda, M.; Yoshimitsu, T.; Fujio, Y.; Nakayama, H., 2-Aminoethoxydiphenyl Borate Provides An Anti-oxidative Effect and Mediates Cardioprotection During Ischemia Reperfusion in Mice, *PLOS ONE*, **2017**, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189948>. 査読有

Takubo, K.; Mohamed, A. A.B.; Ide, T.; Saito, K.; Ikawa, T.; Yoshimitsu, T.; Akai, S., Regioselective Rearrangement of 4,4-Disubstituted 2-Hydroxycyclohexa-2,5-Dienones under Deoxyfluorination Conditions, *J. Org. Chem.*, **2017**, *82*, 13141-13151. 査読有

Yoshimitsu, T.; Tun, W. H., Compounds, compositions, and methods of agelastatin alkaloids: patent evaluation of WO2015042239 (A1), *Expert Opin. Ther. Pat.*, **2017**, *27*, 113-119. <https://doi.org/10.1080/13543776.2017.1273902>. 査読有

Takubo, K.; Furutsu, K.; Ide, T.; Nemoto, H.; Ueda, Y.; Tsujikawa, K.; Ikawa, T.; Yoshimitsu, T.; Akai, S., Diversity Oriented Synthesis of Alcolchicinoids with Fluoro and/or Oxygen Substituent(s) on the C Ring from a Single Common Intermediate, *Eur. J. Org. Chem.*, **2016**, (8), 1562-1576. <https://doi.org/10.1002/ejoc.201501624>. 査読有

好光健彦, 生物活性縮環天然物の全合成におけるラジカル環化戦略, 有機合成化学協会誌, **2016**, *74*, 350-359. 査読有

好光健彦, 解説「GroB 型環開裂」, 有機合成化学協会誌, **2016**, *74*, 379. 査読有

Suizu, H.; Shigeoka, D.; Aoyama, H.; Yoshimitsu, T., Total Synthesis of Clavilactone B: A Radical Cyclization-Fragmentation Strategy, *Org. Lett.*, **2015**, *17*, 126-129. 査読有

[学会発表](計 22 件)

向井 玖実, 名取智基, 好光健彦, Napyradiomycin A1 の全合成, 日本薬学会第 138 年会 (2018 年 3 月 25-28 日, 金沢)

鈴木伽奈, 朔優樹, 好光健彦, Hamigeran

Bの全合成研究,日本薬学会第138年会(2018年3月25-28日,金沢)

土持出,上野円香,赤井周司,好光健彦,過マンガン酸-TMSX-O<sub>2</sub>系触媒システムによるアルケン類の官能基化,日本薬学会第138年会(2018年3月25-28日,金沢)

豊田裕介,傘谷拓貴,衣斐勇人,Theingi Maung,向井玖実,好光健彦,Napyradiomycin類の不斉全合成研究,日本薬学会第138年会(2018年3月25-28日,金沢)

好光健彦,ラジカル化学を基盤とする生物活性天然物の全合成,第9回徳島文理大学薬部主催 学術講演会(2018年1月25日,徳島)

Takehiko Yoshimitsu, Radical-Based Synthetic Approaches to Bioactive Natural Products, Sungkyunkwan University (SKKU) (2017年9月22日,水原市(韓国))

Takehiko Yoshimitsu, New chemical approach to tackle inflammaging, INSERM-JSPS Collaboration Meeting (France)(2017年7月4-5日, Cernay (France))

土持出,北村優太,赤井周司,好光健彦,ラジカルアジド化を鍵とする agelastatin A および誘導体の合成,第111回有機合成シンポジウム(2017年6月8-9日,岡山)

土持出,北村優太,赤井周司,好光健彦,アルケン類の触媒的ラジカルアジド化反応の開発,日本薬学会第137年会(2017年3月24-27日,仙台)

朔優樹,向井玖実, Gamal Moustafa, 赤井周司,好光健彦,ラジカル脱炭酸を鍵とする縮環炭素骨格形成手法の開発,日本薬学会第137年会(2017年3月24-27日,仙台)

G. A. I. Moustafa, Yuki Saku, Hiroshi Aoyama, Takehiko Yoshimitsu, Total Synthesis of Platencin via Radical Decarboxylative Cyclization, The Twenty-Fifth French-Japanese Symposium on Medicinal and Fine Chemistry (FJS 2016) (2016年5月15-18日,東京)

名取智基,北村優太,水津拓,赤井周司,好光健彦,NCS-Ph<sub>3</sub>P(2:1)反応剤によるアルケンのジクロル化:H<sub>2</sub>Oの効果と反応機構,日本薬学会第136年会(2016年3月26-29日,横浜)

朔優樹, Gamal Moustafa, 青山浩, 赤井周司,好光健彦,ラジカル脱炭酸を経る炭素-炭素結合形成手法開発と platencin の全合成,日本薬学会第136年会(2016年3月26-29日,横浜)

好光健彦,高度縮環生物活性天然物の全合成,平成27年度 明治薬科大学アジア・アフリカ創薬研究センター(AACDD第2回セミナー)(2015年12月,東京)

朔優樹, Gamal Moustafa, 青山浩, 赤井周司,好光健彦,ラジカル脱炭酸環化戦略によるプラテンシンの第二世代全合成,第41回反応と合成の進歩シンポジウム(2015年10月26-27日,大阪)

Takehiko Yoshimitsu, Strategic Free Radical Transformations in Natural Product Synthesis,

The 10th International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia under Asian Core Program (ICCEOA-10) (2015年11月2-5日,高雄市(台湾))

北村優太,土持出,赤井周司,好光健彦,アゲラスタチンAの全合成:ラジカルアジド化戦略,第45回複素環化学討論会(2015年11月19日-21日,早稲田大学国際会議場,東京)

向井玖実,朔優樹, Gamal Moustafa, 赤井周司,好光健彦,ラジカル脱炭酸を経由する炭素-炭素結合形成反応の開発,第65回日本薬学会近畿支部総会・大会(2015年10月17日,大阪)

好光健彦,生物活性天然物と創薬を繋ぐ精密合成化学,新適塾「未来創薬への誘い」第32回会合(2015年10月5日,大阪)

好光健彦,天然物合成におけるラジカル化学戦略,中外製薬御殿場研究所(創薬化学研究部)(2015年9月11日,御殿場)

<sup>21</sup> Takehiko Yoshimitsu, Lead(IV)-Mediated Decarboxylative Carbon-Carbon Bond Formations, 7th Pacific Symposium on Radical Chemistry (PSRC-7) (2015年7月15-18日, Nanyang Technological University (NTU), Singapore)

<sup>22</sup> 信國好俊,升本順子,沼本通孝,好光健彦,抗腫瘍活性物質感受性関連遺伝子群のゲノム機能学的包括的探索法の開発,第42回日本毒性学会学術年会(2015年6月29日-7月1日,金沢)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

取得状況(計1件)

名称: Substituted imidazo[4',5':4,5]cyclopenta[1,2-e]pyrrolo[1,2-a]pyrazines and oxazolo[4',5':4,5]cyclopenta[1,2-e]pyrrolo[1,2-a]pyrazines for treating brain cancer

発明者: H. W. Tun, T. Yoshimitsu, D. Shigeoka, T. Kamon, Z. Li, Y. Qiu, T. R. Caulfield

権利者: Osaka University, Mayo Foundation for Medical Education and Research (Mayo Clinic)

種類: 特許権

番号: US9464093B2

出願年月日: 2012年10月12日

取得年月日: 2016年10月11日

国内外の別: 国外

○出願状況(計1件)

名称: Methods and pharmaceutical compositions for the treatment of age-related cardiometabolic diseases

発明者: G. Derumeaux, D. Sawaki, G. Czibik, T. Yoshimitsu

権利者: INSERM (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale), Université Paris-Est Créteil Val De Marne Assistance

Publique-Hôpitaux De Paris (Aphp), Osaka  
University

種類：特許権

番号：W02017174681A1 PCT/EP2017/058159

出願年月日：2017年4月5日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等：岡山大学研究者総覧

[http://soran.cc.okayama-u.ac.jp/view?l=](http://soran.cc.okayama-u.ac.jp/view?l=ja&u=d48eadf819ec805574506e4da22f6611&sm=affiliation&sl=en&sp=150)

[ja&u=d48eadf819ec805574506e4da22f6611&s](http://soran.cc.okayama-u.ac.jp/view?l=ja&u=d48eadf819ec805574506e4da22f6611&sm=affiliation&sl=en&sp=150)

[m=affiliation&sl=en&sp=150](http://soran.cc.okayama-u.ac.jp/view?l=ja&u=d48eadf819ec805574506e4da22f6611&sm=affiliation&sl=en&sp=150)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

好光 健彦 (YOSHIMITSU TAKEHIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科(薬  
学系)・教授

研究者番号：30301576

### (2) 研究分担者

該当無し

### (3) 連携研究者

該当無し