

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 12 日現在

機関番号：14301
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2015～2016
課題番号：15K21117
研究課題名(和文) -グルタミルトランスぺプチダーゼ特異的分子プローブの合成とがん免疫療法への応用

研究課題名(英文) Synthesis of gamma-glutamyl transpeptidase-specific chemical probes and their application to cancer immunotherapy

研究代表者
渡辺 文太 (WATANABE, Bunta)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：10544637
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： -グルタミルトランスぺプチダーゼ(GGT)特異的阻害剤GGsTopをリードとして設計した4種類の新規ホスホン酸ヘテロジエステル型分子プローブを合成した。その性能を酵素試験により評価した結果、高いGGT阻害活性を有する分子プローブを見出すことができた。このプローブの構造を拡張することで、がん細胞表面のGGTを標的とした、抗体依存性細胞傷害を引き起こすことのできる新規化合物の創製が期待される。

研究成果の概要(英文)： Four novel chemical probes based on the structure of GGsTop, a potent and selective γ -glutamyl transpeptidase (GGT) inhibitor, were designed and synthesized. One of these probes inhibited human GGT strongly. These results opened the gate to the development of novel ligands that could exert antibody-dependent cellular cytotoxicity against various cancer cells overexpressing GGT on their cell surfaces.

研究分野：有機合成化学、生物有機化学

キーワード： -グルタミルトランスぺプチダーゼ GGT 酵素阻害剤 GGsTop 分子プローブ 抗体依存性細胞傷害

1. 研究開始当初の背景

γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT) はグルタチオンの代謝を司る酵素であり、大小2つのサブユニットからなるヘテロ二量体を形成して細胞膜表面に存在する。多くのがん細胞では健常細胞と比較して多量の GGT が細胞表面全体に存在し、肺や卵巣といった通常 GGT が存在しない細胞もがん化により GGT を生産する。このことから GGT の酵素活性はがんの進行や転移、薬剤や放射線に対する耐性獲得に関係すると考えられ、がん治療薬としての GGT 阻害剤の有望性は従来から指摘されてきた。しかしながら、単純な GGT 阻害によるがん細胞の殺傷や増殖抑制は困難であり、これまで成功例はない。

本研究では、GGT 特異的阻害剤 GGsTop (図 1) を応用した汎用性の高いがん細胞制圧法の開発を最終目的とし、GGsTop の構造に基づいた分子プローブを利用した抗体依存性細胞傷害の誘導に着目した。GGsTop は、GGT の活性中心に存在するスレオニン残基と反応して共有結合を形成することにより、GGT を不可逆的に失活させる。

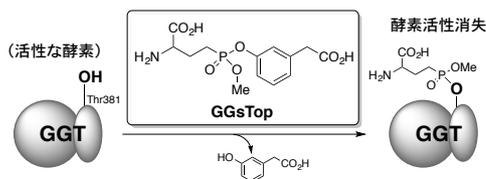


図 1. GGsTop の構造と GGT 阻害機構。

抗体依存性細胞傷害は近年、新しいがん免疫療法として注目を集めている。小分子プローブを用いた抗体依存性細胞傷害による、生体レベルでのがん細胞殺傷の概念を、GGT 阻害剤を例として以下に述べる (図 2)。

- (a) がん細胞に存在する標的タンパク質 (GGT) と特異的に相互作用する分子 (GGsTop) を、任意のハプテンとリンカーで結合した分子プローブを化学合成する。
- (b) 分子プローブががん細胞表面の標的タンパク質 (GGT) と結合すると、プローブのハプテンを血液中に既に存在する抗体が認識して結合し、がん細胞が抗体で標識される。
- (c) がん細胞上の抗体をナチュラルキラー細胞やマクロファージなどが認識し、がん細胞を攻撃して殺傷する。

このプロセスで主役を担うのは、GGT と抗体両方に結合することのできる分子プローブである。これまでの研究で、GGsTop のアナログが GGT の触媒残基 Thr381 の存在する小サブユニットと 1:1 の複合体を形成していることを質量分析により明らかにしている。さらに、GGsTop のホスホン酸部分のメチルエステルを 3-(カルボキシメチル)フェニルエ

ステルに変換しても、依然として高い GGT 阻害活性を示すことを見出しており、ホスホン酸メチルエステル部分は多様な構造が許容されると考えられる。これらのことから、GGsTop はがん表面の GGT と抗体の結合を仲立ちする分子プローブのベースとして理想的である。

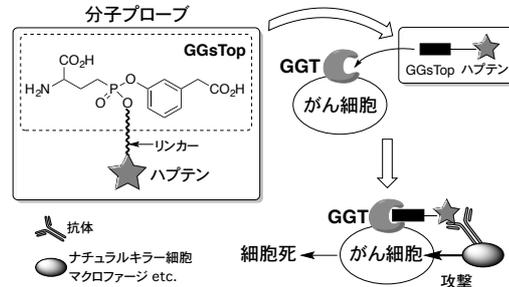


図 2. GGsTop をベースにした分子プローブの構造と抗体依存性細胞傷害メカニズム。

2. 研究の目的

本研究の目的は、抗体依存性細胞傷害を用いたがん免疫療法に応用可能な、GGsTop をベースとした小分子プローブの開発である。これまでの GGT 阻害剤の構造活性相関研究を踏まえて設計した分子プローブ 1a-d (図 3) を合成し、酵素試験を行って GGT 阻害活性を有するプローブを見出す。

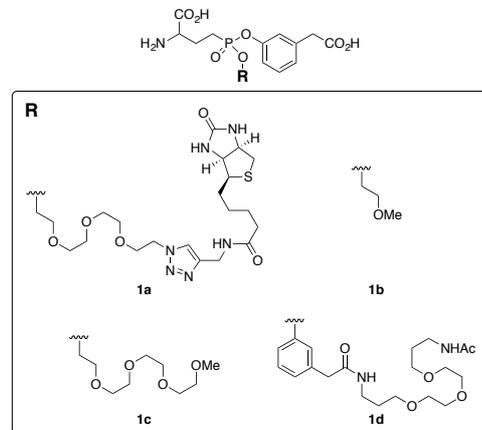


図 3. 本研究で合成する分子プローブ。

プローブ 1a は、GGsTop のメチルエステル部位にポリオキシエチレン型のリンカーを導入し、末端にハプテンとなりうるビオチンを付与したものである。また、リンカー鎖長およびビオチンの存在が GGT 阻害活性に与える影響を調べるために、ビオチン構造を除去してリンカー鎖長を変化させた 1b および 1c を分子設計した。さらに、リンカーを GGsTop のリン原子に直接結合するのではなく、アリアル基を介して結合した場合の影響を検討するために、GGsTop のホスホン酸メチルエステルを 3-(カルボキシメチル)フェニルエステルに変換し、さらに、アリアル基部分のカ

ルポキシ基にリンカーを結合したプローブ **1d** を分子設計した。

3. 研究の方法

(1) プローブ **1a** の合成

まず、合成に必要なリンカー部分を調製した (図4)。テトラエチレングリコールを 0.25 当量のトシルクロリドと反応させ、モノシル体 **2** を収率 20% で得た。次いで、得られた **2** とアジ化ナトリウムを 80 °C で反応させて、 ω -アジドアルコール **3** を収率 84% で得た。

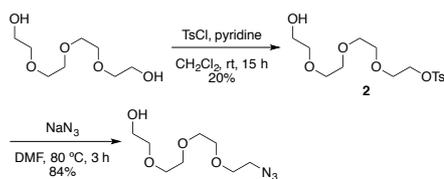


図4. リンカーの調製 (1)。

次に、鍵合成中間体となるホスホン酸ヘテロジエステルの合成を行った (図5)。Z-APBA-OBn (**4**) を触媒量の DMF の存在下、塩化オキサリルで処理してホスホン酸ジクロリド **A** へと変換した。この化合物は精製することなく、1 当量の 3-ヒドロキシフェニル酢酸ベンジル (**5**) とジクロロメタン溶媒中で混合し、-78 °C でトリエチルアミン (1 当量) を滴下してモノエステル化を行ってモノクロリド **B** を得た。反応を低温で行う理由は、ホスホン酸ジクロリド **A** の 2 つの塩素原子の両方が **5** と反応したホスホン酸ホモジアルールエステル **7** の副成を抑えるためである。トリエチルアミンの添加終了後、反応を十分に進行させるために反応温度を一度室温に戻した。なお、モノクロリド **B** は系内で発生させたものをそのまま用い、単離・精製は行わなかった。最後に、反応系を氷冷して図4で合成したアルコール **3** およびトリエチルアミンを順次加えることで、ヘテロジエステル **6** を収率 27% で得た。

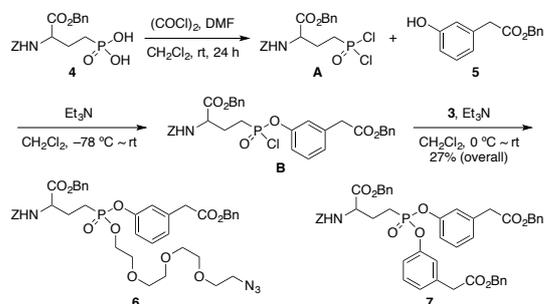


図5. ホスホン酸ヘテロジエステルの合成。

さらに、分子内にビオチン構造を導入した後、目的化合物へと導いた (図6)。ヘテロジエステル **6** のリンカー末端のアジド基とビオチン誘導体 **8** のエチニル基を銅触媒の存在下反応させて (ヒュスゲン反応)、トリアゾ

ール **9** を収率 57% で得た。最後にベンジル系保護基を接触水素化条件で除去して、目的とするプローブ **1a** を収率 66% で得た。

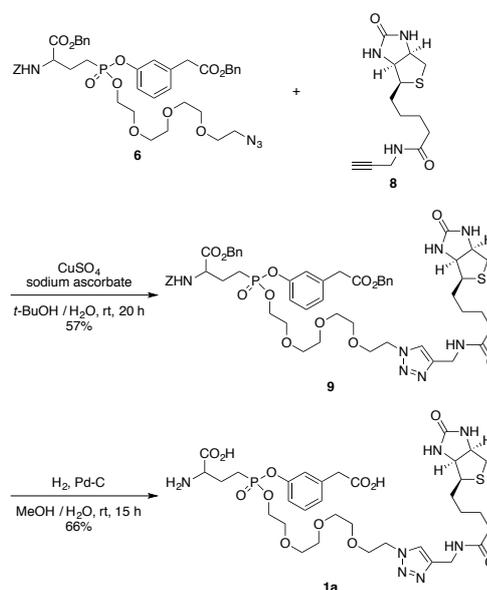


図6. プローブ **1a** の合成。

(2) プローブ **1b** の合成

プローブ **1b** の合成経路を図7に示す。プローブ **1a** の合成と同様の条件を用い、アルコール **3** に代えて 2-メトキシエタノールを用いることでホスホン酸ヘテロジエステル **10** を得た後、保護基を除去することでプローブ **1b** を合成した。

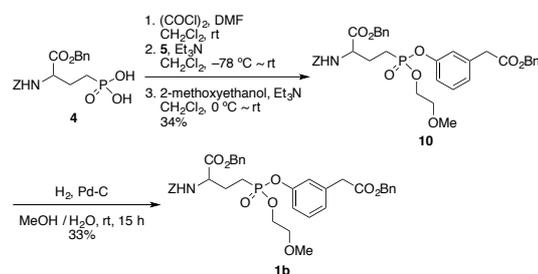


図7. プローブ **1b** の合成。

(3) プローブ **1c** の合成

プローブ **1c** の合成経路を図8に示す。プローブ **1a** の合成と同様の条件を用い、アルコール **3** に代えてメチルテトラグリコール (テトラエチレングリコールモノメチルエーテル) を用いることでホスホン酸ヘテロジエステル **11** を得た後、保護基を除去することでプローブ **1c** を合成した。

(4) プローブ **1d** の合成

プローブ **1a** の合成と同様に、まず、合成に必要なリンカーを調製した (図9)。4, 7, 10-トリオキサ-1, 13-トリデカンジアミンと 1 当量の酢酸エチルを 60 °C で反応させ、モノアセチル体 **12** を収率 60% で得た。

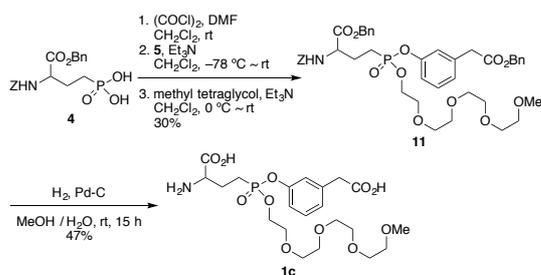


図 8. プローブ 1c の合成.

次に、得られた **12** と 3-ヒドロキシフェニル酢酸を、縮合剤に 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩 (EDC1) を用いて縮合し、目的とするリンカー**13** を収率 29% で得た。

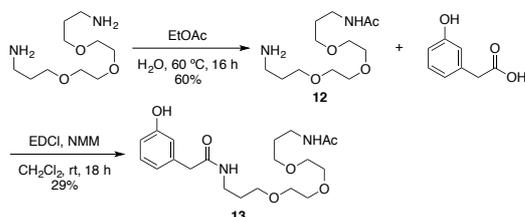


図 9. リンカーの調製 (2).

次に、これまでと同様の条件を用い、ホスホン酸 **4** から誘導されるジクロリド **A** にフェノール **5** および **13** を順次反応させて、ヘテロジエステル **14** を収率 36% で得た (図 10)。最後に、ベンジル系保護基を除去して、目的とするプローブ **1d** を収率 48% で得た。

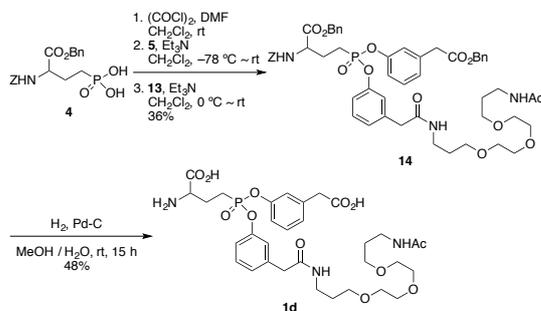


図 10. プローブ 1d の合成.

(5) プローブの GGT 阻害活性

合成したプローブのヒト GGT 阻害活性を表に示す。プローブ **1a-c** は 120 μM の濃度で GGT 阻害活性を示さなかったことから、リンカー鎖長やビオチンの有無にかかわらず、GGsTop のメチルエステル部分はエチレンジグリコール型リンカーの直接的な導入に不適切であることが明らかとなった。

一方、プローブ **1d** は明確な GGT 阻害活性を示した。プローブ **1d** の k_{on} 値は 19 ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) であり、その GGT 阻害強度は GGsTop (k_{on} : 51 $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) の 40% 程度であった。しかし、古典的な GGT 阻害剤として広く用いられてきたアシピシンのヒト GGT に対する k_{on} 値が 0.40

($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) であることを考慮すると、依然として **1d** は十分な阻害活性を保持していることが理解できる。

表. プローブの GGT 阻害活性.

compound	R	k_{on} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
GGsTop	OMe	51
1a		NI^*
1b		NI^*
1c		NI^*
1d		19

*阻害無し (120 μM).

4. 研究成果

本研究では、GGT 特異的阻害剤 GGsTop をリードとして分子設計した新規分子プローブ **1a-d** を合成し、酵素阻害活性を評価した (表)。その結果、ホスホン酸ヘテロジエステル部分への直接のエチレンジグリコール型リンカーの導入は、GGT 阻害活性を消失させることを明らかとした (**1a-c**)。一方、3-ヒドロキシフェニル酢酸構造を介してリンカーを導入したプローブ **1d** は十分な GGT 阻害活性を保持しており、ハプテン導入に適切な部位および構造を見いだすことができた。分子プローブ **1d** のリンカー末端にハプテンを結合することで、GGT をターゲットとした、抗体依存性細胞傷害を引き起こすことのできる新規化合物の創出が期待される。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

黒田 航、斎藤 慎吾、苗代 和樹、渡辺 文太、平竹 潤、ヒト γ -グルタミルトランスププチダーゼ阻害剤を応用した分子プローブの開発、日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 28 日、札幌

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 文太 (WATANABE, Bunta)
京都大学・化学研究所・助教
研究者番号: 10544637