

令和元年6月14日現在

機関番号：35408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08335

研究課題名(和文) 医薬応用に向けたジヒドロピリミジン誘導体のレチノイドとしての機能開発

研究課題名(英文) Development of novel dihydropyrimidine retinoids for medicinal chemistry and drug discovery

研究代表者

西村 良夫 (Nishimura, Yoshio)

安田女子大学・薬学部・講師

研究者番号：60431516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：合成した新規ジヒドロピリミジン誘導体の中で、HL-60細胞に対して分化誘導、アポトーシス誘導作用を示すものを見出した。活性は、既存のレチノイドである all-trans レチノイン酸やタミバロテンに匹敵する。従来の医薬品と全く異なる構造を有するジヒドロピリミジンがレチノイドとして機能し、新しいリードになることを見出した。ジヒドロピリミジンの互変異性体について、その構造と安定性に2位の置換基が及ぼす影響について、NMR測定、van 't Hoff プロット、DFT計算により詳細に明らかにした。Weinrebアミド基を利用して、新しい 4,6-無置換 5-アシル-2-アミノ体の合成法を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

レチノイドとは、レチノイン酸と類似の活性を有する化合物の総称であり、急性白血病などの治療に用いられている。レチノイドとして機能する既存の低分子医薬品は、レチノイン酸を元にしており、その化学構造が類似している。今回、ジヒドロピリミジンというレチノイン酸と大きく異なる化学構造を有する化合物がレチノイドとして十分に機能することを見出した。ジヒドロピリミジンを基盤とする新たな創薬研究が進展すれば、強力な活性を持ちながら副作用を軽減した医薬品開発につながるだろう。

研究成果の概要(英文)：Novel dihydropyrimidines (DPs) exhibiting biological activity inducing differentiation and apoptosis of HL-60 cells were discovered. The activities of the DPs are comparable to those of available agents for acute promyelocytic leukemia, all-trans retinoic acid (ATRA) and tamibarotene. Because the structures of the DPs are quite different from those of ATRA and tamibarotene, and the DPs are novel retinoids and lead compounds for retinoid-based medicinal chemistry and drug discovery. Experimental and theoretical studies on the thermodynamics and properties of 2-substituted DPs were undertaken by NMR measurements and DFT calculations. A method of convergent synthesis of novel 4, 6-unsubstituted 5-acyl-2-amino DPs using Weinreb amides was also developed.

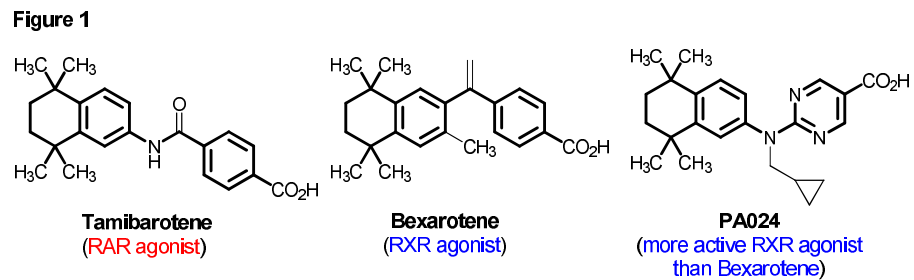
研究分野：有機合成化学、創薬化学

キーワード：ジヒドロピリミジン レチノイド タミバロテン レチノイン酸 ベキサロテン RAR RXR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

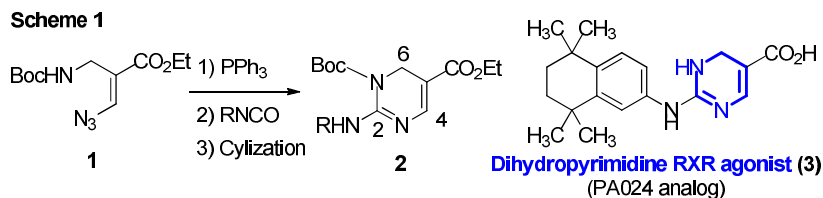
レチノイドは、レチノイン酸と類似の生理活性を示す化合物群であり、転写制御に基づく細胞の分化誘導、増殖の促進など重要な役割を果たし、抗ガン剤、免疫系疾患や皮膚病の治療薬として利用されている。レチノイドは、核内受容体(48種)のうちレチノイン酸受容体(RAR)とレチノイド X 受容体(RXR)に作用することで生理活性が発現する。RAR と RXR は通常ヘテロ二量体(RAR/RXR)を形成し、それぞれに  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  のサブタイプがある。RXR は、RAR のほかにビタミン D3 受容体(VDR)、甲状腺ホルモン受容体(TRs)や肝 X 受容体(LXR)ともヘテロ二量体を形成する。RXR アゴニストは、二量体を形成している RXR の相手の受容体への間接的アゴニストやアンタゴニスト作用(アロステリック効果)により、様々な生理活性が表れる。レチノイドの創薬研究は、歴史的に浅いため潜在的有用性を秘めており、既存の医薬品として、急性前骨髄球性白血病治療薬のタミバロテンが挙げられる(Figure 1)。タミバロテンは強い RAR  $\alpha$  アゴニストであり、増殖能を有するが未分化の白血病細胞を顆粒球へ分化誘導する。これにより、結果として白血病細胞の無制限な増殖を抑制し、治療効果をもたらす。一方、ベキサロテンは皮膚 T 細胞性リンパ腫(CTCL)の治療薬として海外で使用されており、RXR アゴニストとして腫瘍細胞の細胞死を誘導する(Figure 1)。国内でも、最近 CTCL 治療薬として製造販売承認が申請されている。これらの医薬品は、疎水性部(テトラメチルナフタレン部)と安息香酸部を持つ(Figure 1 の太線)が、一般に安息香酸部をヘテロ環にすると、RAR から RXR アゴニストへ変化する傾向があり、ピリミジン PA024 はベキサロテンよりも活性が高い、強力な RXR アゴニストである(Figure 1)。



2. 研究の目的

ピリミジンの部分還元体であるジヒドロピリミジン(以下、DP)誘導体は 1890 年代に一般的合成法として Biginelli 反応が見出された。以降あまり研究されず、最近になって合成法や生理活性に関する研究が進展し、有糸分裂の阻害作用による抗ガン剤への応用から注目された。Biginelli 反応は(1)尿素、(2)アルデヒド、(3)  $\beta$ -ジカルボニル化合物の三成分を縮合するが、一般に置換基の少ない DP 誘導体の合成は困難である。研究代表者は近年この問題に取り組み、置換基の少ない DP 誘導体の新しい合成法を開発してきた。この中で、アジド 1 の連続的反応を開発し、これまで知られていない 4,6-無置換 2-アミノ DP 誘導体 2 を合成した(Scheme 1)。そこで

PA024 との構造類似性に着目し、アナログ DP 3 を合成し、RXR アゴニスト活性を調べることとした。白血病細胞株 HL-60



に対して低用量のタミバロテンを作用させる条件で、3 およびベキサロテンを併用し、効果を比較した。RXR アゴニストは単独投与では白血病細胞の分化を誘導しないが、低用量のタミバロテン(RAR アゴニスト)と併用すると、タミバロテンの作用を促進する。RAR/RXR に対して RXR アゴニストがアロステリックな働きをするためである。タミバロテン(10 nM)と 3 を併用すると、3 日後の HL-60 成長抑制率は 16%(100 nM)および 19%(1000 nM)であった(Figure 2、黒色)。一方、ベキサロテンの場合の抑制率は 10%(100 nM)、27%(1000 nM)であった(Figure 2、灰色)。従って、DP 誘導体 3 の併用による白血病細胞の増殖抑制効果はベキサロテンのそれと同等とわかった。また、タミバロテンや 3 を単独投与しても増殖抑制効果がない(< 4%)ことから、3 は RXR アゴニスト作用を有している。以上から、RXR アゴニストのカルボン酸部は炭素環やピリミジン環でなく、DP であっても、ベキサロテンに匹敵するアゴニスト活性を示すことを見出した。本研究の目的は、これを発展させ、構造活性相関研究により DP 誘導体のレチノイドとしての機能開発を行うものである。

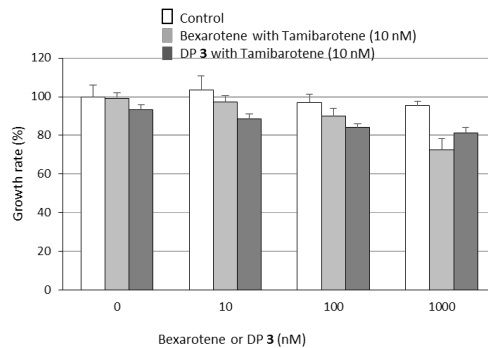


Figure 2

### 3. 研究の方法および研究成果

#### (1) 前骨髄球性白血病細胞 HL-60 に対する構造活性相関研究

100 種程度の DP 誘導体を合成し、HL-60 細胞に対して 4 日間処理後トリパンブルー色素排除法により細胞生存率を算出した。IC<sub>50</sub> 値が 10 μM 以下を示した化合物群については、フローサイトメーターと抗 CD11b 抗体を用いて CD11b ポジティブ細胞の計数を行い、分化誘導の有無を調べた。活性を示した研究成果について、以下を示す。独自に合成した新規 DP 1-7 の構造としては、4 位が二置換な点特徴的である (Figure 1)。Biginelli 反応では、アルデヒドを反応成分に用いるため、4 位が一置換の 8-10 のような誘導体のみが合成可能であった。アッセイの結果、4 が強い分化誘導作用を示すことを見出した (Fig. 2-1)。構造活性相関研究から、4 以外の 1-10 は分化誘導作用を示さず、4 位のわずかなアルキル構造の違いが重要であった。また、アポトーシスを誘導することも明らかにしており、既存の医薬品の ATRA (all-trans レチノイン酸) に匹敵する活性を有する (Fig. 3)。これまでのレチノイド医薬品の創薬研究は、タミバロテンやベキサロテンが構造的に ATRA と類似していることから見て

取れるが、ATRA をリードとする手法に特化してきた。この研究成果は、DP のような ATRA と全く異なる構造の化合物群がリードになることを示したものである。

Figure 1

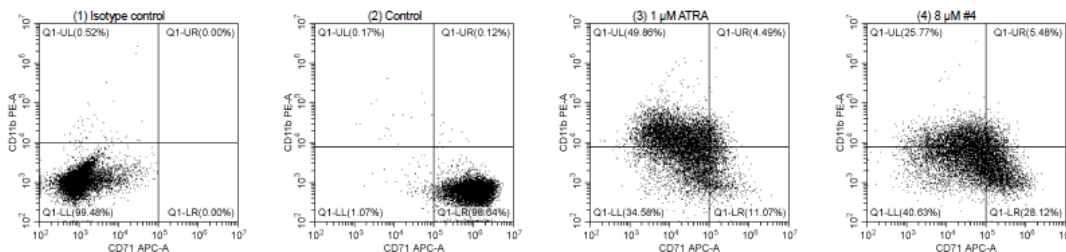
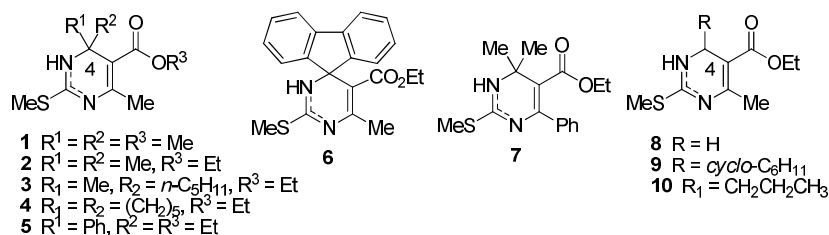


Fig2-1. Alteration of the representative expression of CD11b and CD71 in HL-60 cells treated with ATRA and #4, respectively.

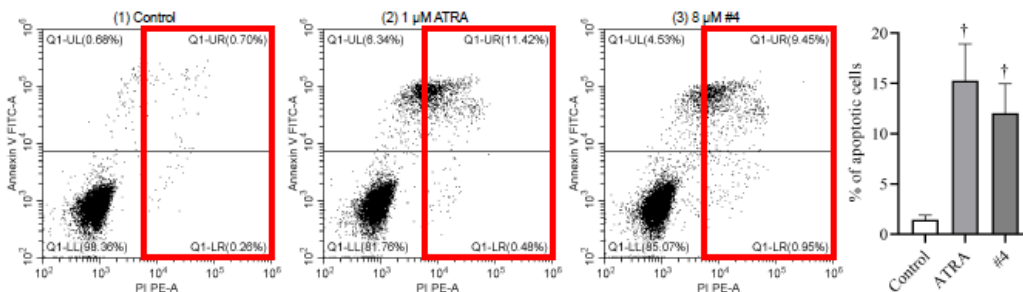
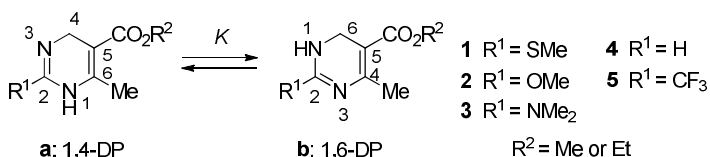


Fig. 3 Apoptosis induction in HL-60 cells treated with ATRA and #4, respectively. Apoptosis induction is indicated in red regions, respectively † *p* < 0.01 vs Control (0 μM)

#### (2) 1,4-および 1,6-DP 互変異性体の熱力学安定性に関する実験的・理論的研究

1,4-および 1,6-DP の互変異性について構造と安定性に及ぼす影響を詳細に調べた例はなかった。そこで、2-置換-1,4-および 1,6-DP 1-3 を合成し、温度、溶媒、濃度の効果を調べるため、互変異性体の比を種々の条件で NMR 測定により算出した (Figure 1)。その結果、DMSO-*d*<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub> および C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> 中の温度可変 NMR を異なる濃度で測定したところ、1 (R<sup>2</sup> = Et) および 2 (R<sup>2</sup> = Et) はいずれの条件でも 1,4-ジヒドロ体 **a** が主異性体として観測された。van 't Hoff プロットから算出した Δ*G*<sup>o</sup> 値はどの条件でも正 (*K* < 1) となり、**a** は 1,6-ジヒドロ体 **b** より熱力学的に安定であった。一見共役系が伸長している **b** のほうが安定に思えることと対照的である。298 K における異性体比 **a/b** は、溶媒の極性が下がるにつれて低下した (DMSO-*d*<sub>6</sub> > CDCl<sub>3</sub> > C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> の順)。一方、3 (R<sup>2</sup> = Et) の NMR 測定では、**b** のみが単一異性体として観測された。これらの特徴的な互変異性体の挙動について、1-5 (R<sup>2</sup> = Me) の DFT 計算を行い、得られた分子構造、双極子モーメント及び静電ポテンシャル図に基づいて NMR 測定の結果を裏付ける理論的根拠を得ることができた。

Figure 1



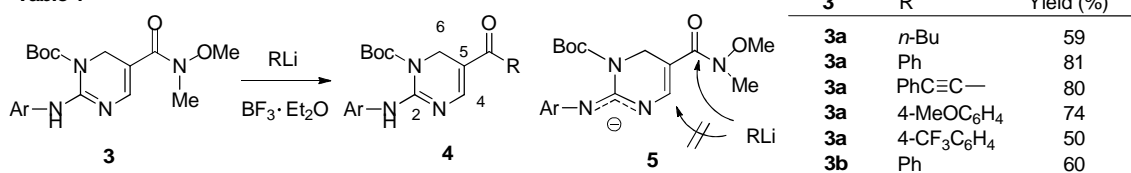
(3) Weinreb アミド基を利用する 4,6-無置換 5-アシル-2-アミノ DP の合成

先に開発した、Staudinger 反応 / Aza-Wittig 反応 / 分子内閉環の連続反応を用いれば、4,6-無置換 2-アミノ DP が合成できる。得られる DP にあらかじめ Weinreb アミド基を導入しておけば、5 位の官能基変換が可能になる。すなわち、プロモピルビン酸エチル **1** から出発して 7 工程でアジド **2** に導き、連続反応により DP **3** を合成する (Scheme 1)。その後、有機リチウム試薬でアシル基に変換することで、合成例のない 4,6-無置換 5-アシル-2-アミノ DP **4** を収束的に合成した (Table 1)。この反応で 1,4-付加反応が見られないのは、窒素アニオン **5** への 1,4-付加が起こらないためであろう。

Scheme 1



Table 1



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Antitumor effect of palmitic acid-conjugated DsiRNA for colon cancer in a mouse subcutaneous tumor model. Kubo, T., Nishimura, Y., Hatori, Y., Akagi, R., Mihara, K., Yanagihara, K., Seyama, T. *Chem. Biol. Drug. Des.*, **2019**, *57*, 570-581. (査読あり)
2. Experimental and theoretical studies on thermodynamics and properties of tautomers of 2-substituted 6(4)-methyl-1,4(1,6)-dihydropyrimidine-5-carboxylates. Cho, H., Nishimura, Y., Ikeda, H., Asakura, M., Toyota, S. *Tetrahedron*, **2018**, *74*, 2405-2413. (査読あり)
3. Convergent synthesis of 4,6-Unsubstituted 5-acyl-2-aminodihydropyrimidines using Weinreb amide. Nishimura, Y., Kubo, T., Okamoto, Y., Cho, H. *Tetrahedron Lett.*, **2017**, *58*, 4236-4239. (査読あり)
4. Convergent synthesis of 4,6-Unsubstituted 5-acyl-2-phenyldihydropyrimidines by substitution reactions of Weinreb amide group of tetrahydropyrimidine. Nishimura, Y., Kubo, T., Okamoto, Y., Cho, H. *Tetrahedron Lett.*, **2016**, *57*, 4492-4495. (査読あり)

〔学会発表〕(計 21 件)

研究代表者、研究分担者および研究協力者に下線

1. 西村 良夫、朝倉 光博、池田 宏、豊田 真司、長 秀連、「1,4-および1,6-ジヒドロピリミジン互変異性体の熱力学安定性に関する実験的・理論的研究」、日本薬学会第139年会(2019)、千葉、3/20-23 (2019)
2. 久保貴紀、西村良夫、柳原五吉、瀬山敏雄、「強力な RNAi 効果を有するパルミチン酸コンジュゲート Dicer-substrate siRNA の開発」、日本薬学会第 139 年会(2019)、千葉、3/20-23 (2019)
3. 菊地 秀与、西村 良夫、久保 貴紀、袁 博、須永 克佳、日比野 康英、長 秀連、「HL-60 細胞に対する新規 dihydropyrimidine 誘導体の細胞毒性誘導」、日本薬学会 第 139 年会 (2019)、千葉、3/20-23 (2019)
4. 池田 宏、朝倉 光博、西村 良夫、長 秀連、豊田 真司、「ジヒドロピリミジン誘導体の互変異性体の構造と熱力学的安定性に関する研究」、日本化学会第 99 春季年会 (2019)、兵庫、3/16-19 (2019)
5. 西村良夫、極樂寺侑希、久保貴紀、長秀連、「酸触媒を用いた閉環反応による 6-無置換ジヒドロピリミジンの合成」、第57回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、鳥取、11/10-11 (2018)
6. 久保貴紀、西村良夫、羽鳥勇太、赤木玲子、柳原五吉、瀬山敏雄、「脂肪酸コンジュゲート Dicer-substrate siRNAの大腸がん肝転移マウスモデルに対する抗腫瘍効果」、第91回日本生化学会大会、京都、9/24-26 (2018)
7. 久保貴紀、西村良夫、柳原五吉、瀬山敏雄、「In vitroおよびin vivoで高いRNAi効果を示す脂肪酸siRNAコンジュゲートの開発」、日本核酸医薬学会第4回年会、福岡、7/9-11 (2018)
8. 久保貴紀、西村良夫、柳原五吉、瀬山敏雄、「RNAi効果が高い脂肪酸結合型siRNAの開発」、日本薬学会第138年会(2018)、金沢、3/25-28 (2018)
9. 西村良夫、久保貴紀、長秀連、「Weinrebアミド基を利用する2-アミノ-5-アシルジヒドロピ

- リミジンの収束的合成」、日本化学会 第98春季年会 (2018)、千葉、3/20-23 (2018)
10. 久保貴紀、西村良夫、柳原五吉、瀬山敏雄、「パルミチン酸結合型Dicer-substrate siRNAの*in vivo*での遺伝子発現抑制効果」、第90回日本生化学大会、神戸、12/6-9 (2017)
  11. 君羅好史、菊地秀与、西村良夫、袁博、須永克佳、真野博、「*Vitex agnus-castus* 果実由来 Casticinの破骨細胞分化抑制作用」、第22回日本フードファクター学会薬学会、神奈川、12/2-3 (2017)
  12. Takanori Kubo, Yoshio Nishimura, Makoto Hirano, Kazuyoshi Yanagihara, Toshio Seyama, 「Development of lipid-siRNA conjugates having efficient cellular uptake and a potent RNAi effect」、The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2017 / The 1st Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry, Tokyo, 11/14-11/16 (2017)
  13. 西村良夫、長秀連、「Weinrebアミド基を利用する2-アミノ-5-アシルジヒドロピリミジンの合成」、第47回複素環化学討論会、高知、10/26-28 (2017)
  14. 岩尾采未、久保貴紀、橋本優里、上藤明日香、田中一絵、西村良夫、平野真、柳原五吉、瀬山敏雄、「標的遺伝子の発現を効果的にノックダウンできる脂肪酸コンジュゲートsiRNAの開発」、第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、徳島、10/21-22 (2017)
  15. 上藤明日香、久保貴紀、岩尾采未、田中一絵、橋本優里、西村良夫、平野真、柳原五吉、瀬山敏雄、「優れた細胞導入性と強力なRNAi効果を有する飽和脂肪酸結合型siRNAの開発」、第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、徳島、10/21-22 (2017)
  16. 橋本優里、久保貴紀、岩尾采未、西村良夫、平野真、柳原五吉、瀬山敏雄、「RNA干渉効果が高いパルミチン酸結合型Dicer-substrate siRNAの開発」、第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、徳島、10/21-22 (2017)
  17. 久保貴紀、橋本優里、西村良夫、平野真、柳原五吉、瀬山敏雄、「パルミチン酸結合型DsiRNAの肝転移マウスモデルに対する抗腫瘍効果」、第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、徳島、10/21-22 (2017)
  18. 西村良夫、久保貴紀、長秀連、「Weinrebアミド基を有する4,6-無置換ジヒドロピリミジン誘導体の合成と5-アシル体への変換反応」、第56回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、徳島、10/21-22 (2017)
  19. 西村良夫、佐々木千尋、西博行、生中雅也、「ラニレスタット鍵中間体(光学活性環状イミド)の立体選択的合成」、日本プロセス化学会 2017サマーシンポジウム、大阪、8/3-8/4 (2017)
  20. 西村良夫、長秀連、「アルケニルアジドの連続的反応とWeinrebアミド基への求核置換反応を利用した2-アミノ-5-アシルジヒドロピリミジンの合成」、日本薬学会第137年会、仙台、3/24-27 (2017)
  21. 西村良夫、佐々木千尋、西博行、生中雅也、「ラニレスタット鍵中間体(光学活性環状イミド)の立体選択的合成」、第34回メディスナルケミストリーシンポジウム、つくば、11/30-12/2 (2016)

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：久保 貴紀  
 ローマ字氏名：Kubo Takanori  
 所属研究機関名：安田女子大学  
 部局名：薬学部  
 職名：講師  
 研究者番号(8桁)：90435751

研究分担者氏名：菊地 秀与  
 ローマ字氏名：Kikuchi Hidetomo  
 所属研究機関名：城西大学  
 部局名：薬学部  
 職名：助教  
 研究者番号(8桁)：60614055

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：長 秀連  
 ローマ字氏名：Cho Hidetsura

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。