

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08369

研究課題名(和文) G蛋白質共役型受容体の活性調節機能を有する多環縮環型フラン環化合物の創生

研究課題名(英文) Development of polycyclic heterocyclic compounds as GPCR analogues

研究代表者

波多江 典之 (HATAE, Noriyuki)

横浜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30449912

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Gタンパク質共役型受容体を標的とする医薬品は極めて多く、古くよりそのagonist/antagonistの創生は創薬の要とされている。これを標的として、多環縮環型複素環を合成し、新規5HT_{2C}アゴニストの創生に成功した。5HT_{2C}受容体は摂食に関与する受容体であり、その作動薬は満腹中枢を刺激するため、摂食抑制による抗肥満作用が期待されている。また、これらの創生に際して、種々合成した化合物ライブラリーのうち、一部の化合物群において、強い抗腫瘍活性が認められ、その活性発現構造の解明に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Gタンパク質共役型受容体のX線結晶構造解析の発展に伴って、そのアンタゴニストの開発では、SBDD (Structure based drug design) が適応され始めてきている。一方、GPCRアゴニストの開発では、アゴニストと受容体の複合体解析の結果が乏しく、未だ化合物ライブラリーに依存した創薬が主流である。本研究では、構造的に強固な5HT_{2C}アゴニストを創生したことで、アゴニストの立体構造を基に、ファーマコフォアの構築を模索することが可能と考えられる。また、多環縮環型複素環ライブラリーより、新規抗腫瘍活性物質の創生に成功しており、保健医療の分野においても多大な貢献が確信される。

研究成果の概要(英文)：G protein coupled receptors (GPCRs) are identified the 7th transmembrane receptor, and take essential roles in many physiological homeostasis. Serotonin 2C receptor (5-HT_{2C} receptor) classifies as seventh transmembrane domain receptors coupled to G proteins (GPCRs). It was expressed on the central nervous system; relatively higher expressed at amygdala, hippocampus, and hypothalamus. As the receptor was related to the emotion and food intake according to the analysis on 5-HT_{2C} receptor KO mice, and the lorcaserin was discovered against anti-obesity drug. In current study, we synthesized benzofuro[3,2-c]pyridine analogues by using MW-assisted thermal electrocyclic reaction, and assessed their efficacy against 5-HT_{2C} activation. Furthermore, some polycyclic heterocycles were indicated potent antiproliferative activity in tumor cells.

研究分野：創薬化学

キーワード：多環縮環型複素環 フラン環 ペリ環状反応 Gタンパク質共役型受容体 アゴニスト 抗腫瘍活性物質
生物活性物質

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役型受容体 (GPCR: G protein coupled receptor) に対する医薬品は、現在市販されている医薬品の多くを占めており¹⁾、古くよりそのアゴニストやアンタゴニストの創生は、創薬の要とされてきている。これら GPCR の創薬においても、他の酵素阻害剤と同様に、構造基盤型創薬 (SBDD: Structure based drug design) が行われ初めてきている。GPCR は、細胞膜中に存在し膜脂質にアシストされることでフォールディングされていること、また膜外ドメインが非常に短く、ほとんどが細胞膜ドメインとしてコンパクトに折りたたまれているため、結晶化がむづかしい分子であったが、GFP などのタンパク質との融合タンパク質の結晶化により、近年その結晶構造が解明されつつある²⁾。これらの解明されつつある GPCR の X 線結晶構造解析のデータを基にして、SBDD 法によるアンタゴニスト創薬が現在成功し始めてきている³⁾。一方、GPCR アゴニストの創薬においては、リガンドの結合に伴う GPCR の三量体 Gタンパク質の活性化に関する分子構造学的機序の解明が現在実施されており⁴⁾、その結果をもとにしたアゴニストの SBDD 法による開発は、今後の課題といえる。

現在市販の低分子医薬品の化学構造に着目すると、プリビレッジド構造と称される⁵⁾、特有の化学構造が存在する。医薬品と生体分子との相互作用に際して、プリビレッジド構造が水素結合などの各種分子間相互作用を行うことで、薬理作用を発揮する。また分子間相互作用をする原子種が、標的タンパク質中に自由運動が拘束されずに存在すると、分子 (官能基) のエントロピーが増大するため、標的レジデンスタイムが増大することにより複合体の形成効率が低下する。適切に官能基化され、かつ強固な構造を有する複素環化合物は、この特性を有するため、プリビレッジド構造をなす傾向にある。複素環化合物の中でも、多環縮環型複素環化合物群は、環構造同士の縮合により、さらに構造的自由度が抑制されているため、立体構造的に有効性の高い基本母格として働くことができる。フラン環は、複素環としての作用とともに、ジエン性を有する複素環である。このフラン環を含む多環縮環型フラン環化合物群は、多環縮環構造による剛直な分子骨格とともに、フラン環部に立体電子的な歪が生じるため、生体分子などへ高反応性のユニットとなることが報告されてきている。ワートマニンなどの生物活性物質では、ナフト[1,8-bc]フラン骨格をコア構造とするため、三環縮環型フラン環構造の縮環による環歪みにより、フラン環上の LUMO が低下するため、生体内で容易に酸化され、得られた代謝体が PI3K を不可逆的に阻害する⁶⁾。

これらの背景をもとに、SBDD 法などでは補填することのむづかしい GPCR アゴニストの創生を、多環縮環型フラン環ライブラリーを用いて実施する。本研究を通して得られる結果は、市販薬において膨大なシェアを占める GPCR 創薬の実践であるため、保健医療の分野への極めて高い寄与が考えられている。

<引用文献>

- 1) Romanova, E. V., Sweedler, J. V., *Trends Pharmacol. Sci.*, **36**, 579-586 (2015).
- 2) Kobilka, B., Schertler, G. F. X., *Trends Pharmacol. Sci.*, **29**, 79-83 (2008).
- 3) Topiol, S., *Methods Mol. Biol.*, 1705-1721 (2018).
- 4) Weis, W. I., Kobilka, B. K., *Annu. Rev. Biochem.*, **87**, 897-919 (2018).
- 5) Evans, B. E., Rittle, K. E., Bock, M. G., DiPardo, R. M., Freidinger, R. M., Whitter, W. L., Lundell, G. F., Veber, D. F., Anderson, P. S., Chang, R. S. L., Lotti, V. J., Cerino, D. J., Chen, T. B., Kling, P. J., Kunkel, K. A., Springer, J. P., Hirshfield, J., *CJ. Med. Chem.*, **31**, 2235-2246 (1988).
- 6) Wipf, P., Halter, R. J., *Org. Biomol. Chem.*, **3**, 2053-2061 (2005).

2. 研究の目的

(1) GPCR アゴニストの創生

GPCR は、その遺伝子配列による分類により、4 種類に分類される。このうち class A の GPCR が、アドレナリン受容体などを含む GPCR である。この class A の GPCR の特徴としては、adrenaline や dopamine, serotonin など各種アミンをその内因性リガンドとするものが多く、それらはトレースアミン受容体と称される。これら GPCR リガンドのうちセロトニンは、インドール環を基本母格とする複素環含有生理活性物質であるため、セロトニン受容体である 5-HT (5-HT: 5-hydroxy tryptamine) 受容体は、低分子化合物が新たなリガンドとなる可能性が極めて高いと考えられている。

近年の高齢化およびストレス化社会において、生活習慣病が問題視されてきている。日本人の三大死因である、がん・脳血管疾患・心疾患、更に脳血管疾患や心疾患の危険因子となる動脈硬化症・糖尿病・高血圧症・脂質異常症などは、いずれも生活習慣病であるとされている。食事や運動、喫煙、飲酒、ストレスなどの生活習慣に關与し、肥満やメタボリックシンドロームなど、内臓脂肪の蓄積と密接に關与している。生活習慣病の予防を目的として、海外においては、5-HT_{2C} 受容体アゴニストによる抗肥満薬の開発が進められている¹⁾。世界の成人の 14 億人以上が過体重、うち約 5 億人が肥満であるといわれており、肥満症は世界において大きな健康問題の一つとなっている。地域別には、米国で約 1.7 億人、欧州では約 1.5 億人が過体重または肥満と考えられており、アジアでは、中国で約 1 億人、日本では約 2,500 万人の人が過

体重または肥満と推計されている。肥満に関与する 5-HT_{2C} 受容体は、摂食に関与する受容体であり、その作動薬は満腹中枢を刺激するため、摂食抑制による抗肥満作用が期待されている。本研究では、抗肥満薬の創薬として 5-HT_{2C} 受容体アゴニストの創生を図った。

5-HT_{2C} 受容体アゴニストの創生にあたり、基本とするライブラリーには、多環縮環型フラン環ライブラリーを用いることとした。多環縮環型フラン環化合物群は、フラン環部の芳香族性に加え、その高次縮環系による構造歪が、芳香化エネルギーの低いフラン環を活性化するため、生体分子と高反応性の構造として作用する。また、これまでの基礎的検討により、多環縮環型フラン環ライブラリーの簡便合成法に関する反応を開発してきており²⁾、これら反応を駆使して、一挙に基本母格の構築を図ることとした。

(2) 抗腫瘍活性物質の創生

現在の本国における死因別死亡者数において、上位に位置するものに悪性新生物がある。シスプラチンやシクロホスファミドなどの、細胞増殖の基本マシーナリーに作用する抗がん剤から、近年では分子標的薬や癌免疫療法薬など、多岐にわたる抗がん剤が市販されてきている。しかし未だに、がん化学療法においては、がんの種類、耐性化や、副作用など、様々な選択要件が必要なため、今後も、多種の抗がん剤の開発が必要であるとされる。

多環縮環型複素環ライブラリーに含まれるワートマニンやハレナキノン、ゼストキノンといった天然物は、いずれも発がん、およびがんの増殖に関与する各種キナーゼ類を阻害する天然物である。このことは、多環縮環型複素環ライブラリーの発展的な解析により、新機構主要活性物質の創生につながると期待される。また、GPCR アゴニストの探索において、各種細胞への細胞毒性を解析することは、創薬における必須のプロトコールである。これらを踏まえ、多環縮環型複素環ライブラリーによる新機抗腫瘍活性物質の創薬を図った。

< 引用文献 >

- 1) Wacker, D. A., Miller, K. J., *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.*, **11**, 438-445 (2008).
- 2) Hatae, N., Suzuki, I., Choshi, T., Hibino, S., Okada, C., Toyota, E., *Tetrahedron Lett.*, **55**, 4146-4148 (2014). Tagawa, S., Choshi, T., Okamoto, A., Nishiyama, T., Watanabe, S., Hatae, N., Ishikura, M., Hibino, S., *Eur J Org. Chem.*, 1805-1810 (2013).

3 . 研究の方法

(1) 化合物ライブラリーの構築

種々合成した化合物は、精製後、¹H-NMR, ¹³C-NMR, ESI-MS, および IR により、その化学構造を決定した。¹H-NMR は JEOL EX-400 (400 MHz) を、¹³C-NMR は JEOL EX-400 (100 MHz) により測定した。ESI-MS は、JEOL JMS-T100LP を用いて測定した。IR は JASCO FT/IR-460 PLUS を用いて測定した。

(2) 細胞内 Ca²⁺濃度の測定

細胞内 Ca²⁺濃度の測定は、カルシウム顕微鏡を用いる方法と、プレートリーダーを用いる方法により解析した。

カルシウム顕微鏡を用いる方法としては、浜松ホトニクス社の ARGUS を用い解析した。各種セロトニン受容体を遺伝子導入した CHO 細胞に Fura-2 AM (3 μM) を 1 時間ロードし、カルシウム顕微鏡にて、細胞内カルシウム濃度の変動を測定した。

プレートリーダーによるカルシウム濃度の測定では、TECAN 社の M200 を用いて解析した。各種セロトニン受容体を遺伝子導入した CHO 細胞に Fura-2 AM (3 μM) を 1 時間ロードし、M200 プレートリーダーにて、細胞内カルシウム濃度の変動を測定した。

(3) 細胞毒性の解析

がん細胞の細胞生存率は、ヒト大腸癌由来の HCT-116 細胞と、ヒト前骨髄性白血病細胞株の HL-60 細胞を用いて評価した。各種化合物にてがん細胞を処理後、HCT-116 細胞では MTT 法により、また HL-60 細胞では WST-1 法により細胞生存率を評価・算出した。

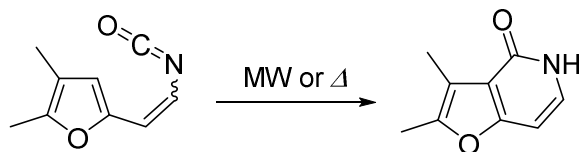
細胞生存率の低下の認められた化合物については、プロメガ社の CellTox™ Green Cytotoxicity Assay キットを用いて、細胞毒性を評価した。

4 . 研究成果

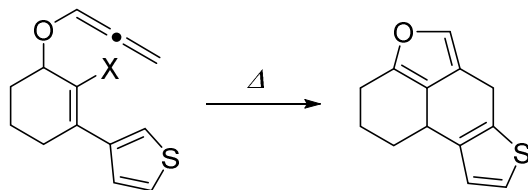
(1) 多環縮環型フラン環ライブラリーの構築

Benzofuro[3,2-c]pyridine 類の合成は、イソシアネート基を有する分子の Curtius 転位、引き続く 2-aza-6π-電子系の熱電子環状反応により実施した。本熱電子環状反応において、マイクロ波を照射することで、反応時間の著しい短縮に成功した。また反応温度の上昇により、熱電子環状反応が効率的に進行することが明らかとなった。マイクロ波照射を行わず、230 °C にて加熱したところ、反応は高収率にて進行したため、本反応の進行において、高い温度での加熱が必要であることが明らかとなった。また、6π-電子系の一部にフラン環を含む基質では、他のものと

比べて、熱電子環状反応の効率が非常に高いことが明らかとなった。(Nishiyama, T., Hatae, N., Hayashi, K., Obata, M., Taninaka, K., Yamane, M., Oda, S., Abe, T., Ishikura, M., Hibino, S., Choshi, T., *Heterocycles*, **95**, 261-267 (2017).) 本反応を活用して、各種 benzofuro[3,2-*c*]pyridine 類よりなる化合物ライブラリーの構築を行った。

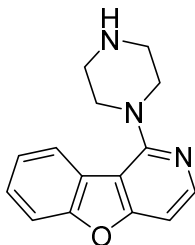


また、アレニルエーテルとハロゲン化ジエンとの分子内環状付加反応により naphtho[1,8-*bc*]furan 環類の合成に成功してきている。本反応では、ジエン部の置換基をハロゲンとすることで、通常は立体的にかさ高い置換基ではジエン部は *s*-*trans* 配座が優勢となるにも関わらず、*s*-*cis* 配座から反応が進行し、4+2 型の反応が進行することを明らかとしてきている。さらに本研究では、縮環構造を高次化した基質での反応を開発した(市川祐樹, 西山卓志, 鈴木真一, 町支臣成, 波多江典之, 第 45 回反応と合成の進歩シンポジウム, (2019).)。本反応では、ジエン部に芳香環を挿入することで、反応途中に脱芳香環化を経て反応が進行する。芳香化エネルギーの大きなベンゼン環をジエンの一部とする場合には、環状付加反応が進行しないものの、チオフェンを用いることで、目的の環化反応が進行した。



(2) 5-HT_{2C} アゴニストの創生

5-HT_{2C} アゴニストとして、2012 年に FDA より lorcaserin が抗肥満薬として承認されたが、受容体サブタイプへの交差反応などにより、種々の副作用も併発することが報告されてきている。その後の創薬展開により、vabicaserin 等も開発されてきているが、母格スイッチも含めた更なる新規母格の探索が必要とされている。本研究において、benzofuro[3,2-*c*]pyridine 類を種々合成し、そのアゴニスト活性について解析した。解析に先立ち、多検体を評価可能な評価系の構築を実施した。プレートリーダーを用いて、受容体発現細胞の細胞内 Ca²⁺の変動をリアルタイム解析したところ、受容体安定発現株でのみ、細胞内 Ca²⁺の変動解析に成功した。そこで、各種 5-HT₂ 受容体サブタイプを安定発現した細胞株を樹立し、各種化合物による Gq タンパク質の活性化について解析した。benzofuro[3,2-*c*]pyridine 類にピペラジンが結合した化合物において、サブマイクロモルでの強いアゴニスト活性を惹起する化合物の創生に成功した(市川裕樹, 西山卓志, 鈴木真一, 日比野俐, 町支臣成, 波多江典之, 第 37 回メディシナルケミストリーシンポジウム, (2019).)。この化合物の EC₅₀ 値は、先行品の lorcaserin とほぼ同等の値を示した。しかし lorcaserin と比べて、100 μM での処理においても、本化合物は他の 5-HT₂ 受容体サブタイプ(5-HT_{2A} および 5-HT_{2B} 受容体)を活性化しなかった。この結果より、今回得られた化合物は、lorcaserin に比して、5-HT_{2C} 受容体アゴニスト活性はほぼ等しいものの、その受容体サブタイプ特異性が非常に高い化合物の創生に成功した。



(3) 新規抗腫瘍活性物質の創生

先の検討にて得られた化合物ライブラリーの細胞毒性の解析をもとにして、その細胞毒性をがん細胞に関して発展的に解析することで、各種の新規抗腫瘍活性物質の創生に成功してきている。多環縮環型複素環ライブラリーは、その剛直かつ高反応性の化学構造により、各種キナーゼと強固に結合を形成し、抗腫瘍活性を発揮することが示唆されてきている。本研究において KALASINAMIDE, MARCANINE A, and GEOVANINE 類の抗腫瘍活性について解析し、その活性発現構造について解明した(Nishiyama, T., Hatae, N., Chikaraishi, K., Uchida, K., Yokoyama, C., Hibino, S., Choshi, T., *Heterocycles*, **99**, 415-424 (2019).)。

また、その強力な抗腫瘍活性については報告があるものの、作用機序がアポトーシスはじめ多岐に渡るとされる ellipticine 類およびその天然物誘導体について、抗腫瘍活性発現構造の解明に成功した (Itoh, T., Hatae, N., Nishiyama, T., Choshi, T., Hibino, S., Yoshimura, T., Ishikura, M., *Med. Chem. Res.*, **27**, 412-419 (2018).)。この解析の結果、ellipticine 類の抗腫瘍活性の発現においては、アポトーシスを介する経路の重要性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takashi Nishiyama, Noriyuki Hatae, Kyohko Chikaraishi, Keisuke Uchida, Chika Yokoyama, Satoshi Hibino, Tominari Choshi	4. 巻 99
2. 論文標題 Concise synthesis of kalasinamide, marcanine A, and geovanine, and antiproliferative activity evaluation of their azaanthracenones	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 HETEROCYCLES	6. 最初と最後の頁 inpress
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/COM-18-S(F)36	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomoki Itoh, Noriyuki Hatae, Takashi Nishiyama, Tominari Choshi, Satoshi Hibino, Teruki Yoshimura, Minoru Ishikura	4. 巻 27
2. 論文標題 Synthesis and cytotoxicity of pyrido[4,3-b]carbazole alkaloids against HCT-116 and HL-60 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medicinal Chemistry Research	6. 最初と最後の頁 412-419
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00044-017-2068-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Noriyuki Hatae, Eiko Kujime, Keigo Yano, Mami Kizuka, Rina Ashida, Tominari Choshi, Takashi Nishiyama, Chiaki Okada, Tatsunori Iwamura, Teruki Yoshimura	4. 巻 97
2. 論文標題 Synthesis of N-w-phenylalkyl-4-(p-chlororphenyl)-piperidin-4-ol analogues with potent antiproliferative activity against HCT-116 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 HETEROCYCLES	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/COM-18-S(T)25	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 飯岡稜也, Febria Elvy Sasanti, 波多江典之, 吉松三博
2. 発表標題 2-シアノ-1-プロパルギルインドールの[6+1]付加環化反応を用いたAzepino[1,2-e]indole合成
3. 学会等名 第48回複素環化学討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西山卓志、藤脇孝哉、波多江典之、日比野俐、町支臣成
2. 発表標題 Azafluorenone 骨格を有する Onychine の全合成とindeno [1,2-c]isoquinoline 類への応用
3. 学会等名 第44回 反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 波多江典之、岡田知晃、吉村昭毅
2. 発表標題 ビニルチオフェンとアレニルエーテルとの分子内環状付加反応の開発
3. 学会等名 第44回 反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤智貴、西山卓志、波多江典之、阿部睦、吉村昭毅、日比野俐、町支臣成、石倉稔
2. 発表標題 Carbazole-1,4-quinone類の簡便合成法の開発と抗腫瘍活性の解析
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第144回例会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 波多江典之、伊藤智貴、西山卓志、町支臣成、日比野俐、石倉稔
2. 発表標題 Pyrido[4,3-b]carbazole 類の合成と抗腫瘍活性の解析
3. 学会等名 第35回 メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 波多江典之、岡田知晃、吉村昭毅
2. 発表標題 アリールオレフィンとアレンとの分子内環状付加反応の開発
3. 学会等名 第43回 反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小橋川花、波多江典之、西山卓志、豊田栄子、吉村昭毅、町支臣成
2. 発表標題 Benzofuro[3,2-c]pyridine類の合成と新規5HT _{2C} アゴニストの探索研究
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	町支 臣成 (Choshi Tominari) (10248297)	福山大学・薬学部・教授 (35409)	