

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05718

研究課題名(和文)血管新生阻害新規化合物epoxycarolide類の抗がんリードへの展開

研究課題名(英文)Development of novel anti-angiogenetic epoxycarolide to antitumor lead

研究代表者

田村 理 (Tamura, Satoru)

和歌山県立医科大学・薬学部・教授

研究者番号：30362619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：固形がんは、新たな血管をがん組織へと導くことで酸素や栄養素を得て増大するため、この血管新生を抑えることでがんの増殖を抑制できる。々が見出したepoxycarolideは、血管新生の鍵となる血管内皮細胞への選択的な生育阻害物質であり、本化合物を抗がん剤開発へと繋がる検討を行った。本化合物の立体異性体を合成したところ、天然物に匹敵する活性を示す立体異性体を見出すことに成功した。さらに、分子内に存在するエポキシド構造が活性発現に必須であることを、構造活性相関から明らかにした。その過程で、合成ルートの改良を行い、汎用性の高いルートを確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

対象としているepoxycarolideは、分子量が非常に小さい上に多彩な官能基を備えているため、有機合成的な改変、開発に適している。今回、種々の立体異性体を合成可能なルートの開発を達成し、さらに改良できたことで、今後のepoxycarolideをシーズ分子とした血管新生阻害作用を作用メカニズムとした新規抗がん剤の開発に向けて大きな一歩となった。また、側鎖上のエポキシド構造が活性発現に必須であることを明らかにできたことから、今後はエポキシド部分を残した開発が必要であることを示唆できた。

研究成果の概要(英文)：Angiogenesis is an important target for anti-tumors because angiogenesis is essential for growth of solid tumors. We found a novel anti-angiogenetic compound named as epoxycarolide to show the selective anti-proliferation to vascular endothelial cells, which is a key of angiogenesis. We synthesized stereoisomers of epoxycarolide and assessed anti-proliferation of them to reveal an stereoisomer with comparative potent and vascular-endothelial-cell-selective anti-proliferation to epoxycarolide. On the basis of the structure of the promising stereoisomer, SAR analysis was performed to disclose that epoxide moiety in the side chain of epoxycarolide is important for potent and selective anti-proliferation. Through the SAR analysis, we improved the synthetic route to be more versatile one for the future study on epoxycarolide to develop anti-tumors.

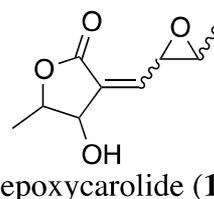
研究分野：天然物化学、ケミカルバイオロジー、創薬化学

キーワード：血管新生阻害 抗がん プテノリド 構造活性相関

## 1. 研究開始当初の背景

がん組織は、血管新生によって既存の血管から自らの組織へと新たな血管の伸長を誘発し、新生させた血管を通じて爆発的な増殖に必要な大量の栄養と酸素を得ている。また、がんの悪性化を高める浸潤や転移といった現象にも血管新生は深く関わっている。一方、ヒト成体において血管新生は、創傷治癒などの限られた場面では起こらないため、血管新生阻害物質は正常組織への影響が少ない、がん増殖・浸潤・転移を抑制する新規抗がん剤として期待される。しかしながら、血管新生阻害は抗がん剤開発上で副作用の出にくい恰好の標的メカニズムあるにもかかわらず、血管内皮増殖因子(VEGF)に対する3種の抗体医薬品が認可されているのみである。抗体医薬品は、体内での安定性や標的特異性など様々な長所を有するが、高価であるとともに投与経路が限られており、標的と少しでもメカニズムが異なると全く効果が出ないなどの短所も有する。すなわち、血管新生を引き起こす鍵となる因子は VEGF 以外にも複数報告されていることから、これらの因子による血管新生は認可された抗体医薬品では全く役に立たない。

そこで我々は、血管新生という現象を包括的に抑えられる可能性のある物質として、血管新生の各段階で鍵となる血管内皮細胞に対して選択的な生育阻害を示す物質を探索し、海洋真菌の培養上清より epoxy-carolide (1) と命名した新規化合物を既に見出している。本活性化化合物は、4つの不斉点と1つの3置換二重結合を有しており、スペクトルデータの解析では完全な立体配置の決定は困難であった。そこで、1をシーズ分子とした新規抗がん剤の創製という目的を達成する上で解決すべき課題として、1の全立体配置の決定、構造活性相関の検討と活性向上アナログの探索、標的分子解明を含めた作用機序解明、が考えられた。

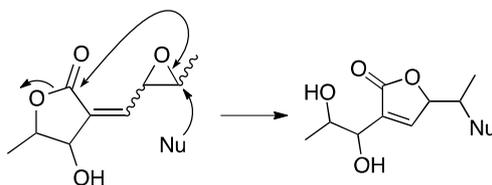


## 2. 研究の目的

本研究課題は、血管新生の中心的役割を果たす血管内皮細胞に対して選択的な生育阻害活性を示す epoxy-carolide (1) をシーズ分子として捉え、ここから血管新生阻害を作用メカニズムとする新規抗がん剤の創製を目的とする。そのためには、1の全立体配置の決定は重要事項であることから、考える立体異性体を全合成して天然物とスペクトルデータを比較することでこれを決定する。さらに、合成した立体異性体を用いて構造活性相関を検討し、活性発現に重要な立体配置を明らかにする。その立体配置情報を加味した類縁体の合成および活性評価を経て、標的探索用プローブ分子の設計および1よりも血管内皮細胞へ選択的で強力な生育阻害活性を示す類縁体の発見、創出を目指す。ここで見出した分子は、作用機序を明らかにする足がかりとなる標的分子の解明に必要となるプローブ分子の設計の礎とする。

血管新生を標的とした抗がん剤は既に抗体医薬品が認可されていることから、適切に血管新生を抑制できれば抗がん作用に繋がるということが証明されている。しかしながら、これら抗体医薬品は高価であると共に投与経路は限られ、VEGF 以外の経路だと抗がん効果は全く期待できない。一方、我々が見出した1は、血管内皮細胞の生育阻害を引き起こすことから、血管新生という現象そのものを包括的に抑制できるメカニズムといえる。さらに、1は、VEGF に応答して引き起こされる血管内皮細胞の遊走や管腔形成といった形態変化に対しても抑制効果を示すことから、単なる細胞毒性よりも抗がん剤開発への期待が高い。

シーズ分子とする1は、我々が発見した新規化合物であり他の研究者が真似できない独自性を有している。また、1は、分子量200を切る非常に小さい分子でありながら、5員環ラク톤、3置換オレフィン、エポキシド、ヒドロキシ基など多彩な官能基を分子内に備えており、有機化学的な合成が比較的容易で、且つ構造改変した類縁体のバリエーションも広く取ることが可能な特徴を有する。また、作用機序解明に際して、1は下記のような反応を経て、標的分子の求核性官能基と直接共有結合を形成しうると推察しており、この反応を標的探索用プローブ分子の設計に活かすことで独創的な作用機序解明を行う。さらに、血管内皮細胞への選択性から、常に血管内皮細胞以外の細胞をレファレンスに置いて比較することで、より効率的に標的分子の探索を行うことが可能である特徴を有する。



### 3. 研究の方法

まず、epoxycarolide (1) の各立体異性体の合成に着手した。ラクトン部分については類似構造を有する天然物が見出されており、合成研究も報告されている<Tetrahedron Lett. 42, 3967 (2001)>ことから、これを利用した。側鎖 *trans* エポキシド体について合成を完了した時点で、3つの方針に従って研究を進めた。1つ目は、*cis* エポキシド体の合成ルート確立と生育阻害活性の評価。2つ目は、天然物に匹敵する HUVEC 選択的生育阻害活性を示した立体異性体を基にした各官能基の活性への関与解明。3つ目は、当該海洋真菌を再度培養し、天然物の再取得を試みる。

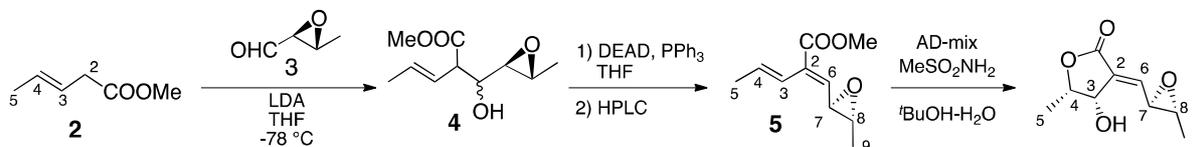
*cis* エポキシド体の合成：側鎖 *trans* エポキシド体に天然物とスペクトルデータが一致する立体異性体が存在しなかったため、天然物は *cis* エポキシド体であることが推測された。そこで、*cis* エポキシド体を立体選択的に合成して天然物の絶対立体配置決定を目指した。確立した *trans* エポキシド体の合成ルートを利用すると、2,3-epoxybutanal がシントンとして必要となるが、本化合物は極めて不安定であり室温では取り扱えないため、一度クロロヒドリンとしておき、合成ルートの終盤でエポキシドを再生する方法を試行した。

官能基の活性への関与解明：天然物の絶対立体配置は未決定ではあるものの、匹敵する活性を示す立体異性体を見出すことはできたため、そこから官能基を欠落させることによる活性の変化をもって各官能基の活性発現への寄与を推し量る。まずは、エポキシド欠損体について検討する。

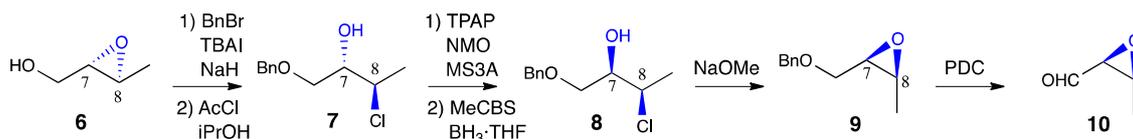
天然物の再取得：天然物が *trans* エポキシド体ではなかったことから、立体異性体の全合成から天然物の全立体配置を決定するにはもう少し時間が必要になると考えられたため、再度天然物を単離して、CD の測定や X 線結晶構造解析を利用して絶対立体配置の決定を試みることにした。

### 4. 研究成果

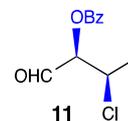
(1) Epoxycarolide (1) の各立体異性体の合成は、まず *trans* 配置の側鎖エポキシドを有する立体異性体から着手した。類似構造を有する天然物の合成報告に倣って合成を進めた。側鎖にエポキシド構造を持つ化合物への適用はこれまでになかったが、条件等を精査して問題なく合成できることが判明した。すなわち、調製したキラルなエポキシアルデヒド 3 を methyl (*E*)-pent-3-enoate (2) とアルドール反応により縮合したのち、脱水反応によりジエン体 5 へと誘導した。この時点では *E* 体と *Z* 体の混合物であったが、HPLC によってこれらを分離し、それぞれ不斉ジヒドロキシル化に付すことによってラクトン部が 3, 4 位 *syn* 配置(3*S*4*S* or 3*R*4*R*) で二重結合が *E* または *Z* である 4 種の立体異性体を合成した。残念ながら、これらの <sup>1</sup>H NMR データは天然物とは合致せず、生育阻害活性も減弱していた。次に、ラクトン部 3, 4 位 *anti* 配置の立体異性体の合成を行った。基本的には同様の合成ルートに則って行った。原料として methyl (*Z*)-pent-3-enoate を pent-3-yn-1-ol から AZADOL 酸化、Lindlar 還元につづく Fisher メチルエステル化による 3 ステップで調製しアルドール反応に用いたところ、問題なく縮合体が得られた。脱水反応後に HPLC で *E/Z* 体分離し、ジヒドロキシル化によって 3, 4 位 *anti* で二重結合 *E* or *Z* の 4 種の合成を達成した。最終段階で AD-mix による立体選択的なジヒドロキシル化が進行しなかったため、やむなく四酸化オスmiumで反応させた後、生成物を HPLC で分離精製し、改良 Mosher 法を適用して絶対立体配置を決定した。トータル収率が良好とはいえないものの、3, 4 位 *anti* 配置(3*S*4*R* or 3*R*4*S*) で二重結合が *E* または *Z* である 4 種の立体異性体を合成した。これらの <sup>1</sup>H NMR データも天然物とは一致しなかったが、生育阻害活性については天然物に匹敵する活性および HUVEC 選択性を示す異性体(2*E*3*R*4*S*7*S*8*S*)を見出すことに成功した。



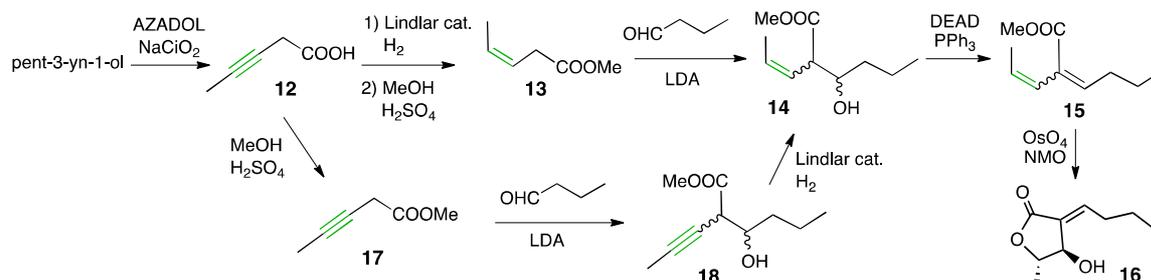
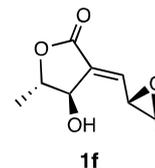
(2) 確立した合成ルートに則って側鎖 *cis* エポキシド体を合成するには、シントンとして 2,3-epoxybutanal (10)が必要となるが、これを直接立体選択的に調製するのはこんなと思われたため、*trans* エポキシドを開環し、生じた水酸基を立体反転させた後に再閉環することで合成を試みた。エポキシドの位置選択的開環には、 $\text{CeCl}_3$ ,  $(\text{CH}_3\text{OCH}_2)_2$  を用いたが収率が悪く、続く一級水酸基選択的保護基導入においても、塩基性条件は使えない制約もあって選択性は低かった。そこで、保護基導入後に  $\text{AcCl}$ -alcohol 条件でクロロヒドリン 7 へ導いた。メタノールでは  $\text{OMe}$  が副生したため、 $\text{iPrOH}$  を用いた。さらに、光延反転によって 8 の合成を検討したが収率が最大で 30% 程度であったため、ケトンへ酸化後に不斉還元によって立体反転体 8 を得た。続いて 40 加熱条件下で  $\text{NaOMe}$  を作用させることで *cis* エポキシドを構築し、 $\text{PDC}$  酸化で目的



のシントン **10** を合成した。しかしながら、**10** は室温で容易に分解するため、以降の反応への適用は困難であると考えた。そこで、閉環前駆体アルデヒド **11** で縮合に用いることとした。方法は、**8** からベンゾイル化、脱ベンジル化に続いてデスマーチン酸化によって調製した。なお、methyl pent-3-enoate (**2**)とのアルドール反応は問題なく進行したが、続く脱水反応あるいは *cis* エポキシド構築については検討中である。



(3) 合成した立体異性体のうち *2E3R4S7S8S* 体 **1f** に、天然物に匹敵する HUVEC 選択的で強力な生育阻害活性を見出した。そこで、同じ立体配置を有し、側鎖エポキシドのないアナログ **16** を合成し活性評価することで、エポキシドの活性への関与を調べた。既存のルートに従い、methyl (*Z*)-pent-3-enoate (**13**)と butanal を縮合し、脱水、ジヒドロキシ化によってデエポキシ体を合成した。しかしながら、**12** から **13** へのリンドラー還元がスケールアップにより著しく反応進行が遅くなる (1 グラムの基質で 1 ヶ月程度)、**13** から **14** への収率が 30% 程度と低いなどの問題点が顕在した。そこで、反応の順序を入れ替えてアルキンエステル **16** と butanal のアルドール反応後にリンドラー還元を行うことで、この問題を解決できた。



得られたアナログ **16** について、生育阻害活性を評価したところ、HUVEC に対して  $IC_{50}$ : 208  $\mu$ M とほとんど活性を失っていた。この他の *3,4-anti* デエポキシアナログについても検討したが、いずれも HUVEC に対する  $IC_{50}$  値が 100  $\mu$ M を超えていたことから、側鎖エポキシド構造は、HUVEC 選択的な生育阻害において必須の官能基であることが明らかになった。

(4) Epoxycarolide (**1**) を単離した海洋真菌について、再度培養して **1** の単離に着手した。単離した際の培養条件のみならず、栄養素や無機塩などの条件を複数設定して培養した。培養上清から調製したエキスから種々カラムクロマトグラフィーによって **1** の単離を試みたが、いずれのエキスからも **1** およびその類縁体は見出されなかった。

以上から、epoxycarolide (**1**) をシードとした血管新生阻害活性を作用メカニズムとする新規抗がんリードの探索として、有効な絶対立体配置の組み合わせを見出すとともに側鎖エポキシドが活性発現に必要な官能基であることを明らかにした。これらの情報をもとに、作用メカニズムの解明について取り組み、さらには、より有効な化合物を創出していきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2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 Mifundu Michel N., Murakami Nobutoshi, Kawano Tomikazu, Tamura Satoru	4. 巻 74
2. 論文標題 Toosendanin relatives, trypanocidal principles from Meliae Cortex	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 702 ~ 709
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-020-01422-9	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 Kawano Tomikazu, Sugawara Aoi, Ohashi Toshika, Ogawa Satoshi, Matsumoto Naomi, Nakanishi-Matsui Mayumi, Tamura Satoru	4. 巻 100
2. 論文標題 Synthesis and Biological Evaluation of New Curcumin Analogs Inhibiting Osteoclastogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 HETEROCYCLES	6. 最初と最後の頁 1233 ~ 1233
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/COM-20-14282	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 Tamura Satoru, Miyoshi Akihito, Kawano Tomikazu, Horii Toshihiro, Itagaki Sawako, Murakami Nobutoshi	4. 巻 68
2. 論文標題 Structure?Activity Relationship of Anti-malarial Allylpyrocatechol Isolated from <i>Piper betle</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 784 ~ 790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c20-00294	査読の有無 無
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 Tamura Satoru, Sugawara Aoi, Sato Erika, Sato Fuka, Sato Keigo, Kawano Tomikazu	4. 巻 61
2. 論文標題 New approach for induction of alkyl moiety to aliphatic amines by NaBH(OAc) <sub>3</sub> with carboxylic acid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 151919 ~ 151919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2020.151919	査読の有無 無
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5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田村 理
2. 発表標題 活性天然物の合成と作用メカニズムに基づいた類縁体設計および合成
3. 学会等名 有機合成化学協会東北支部 岩手地区講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田村 理、佐藤圭悟、藤原麗菜、廣田ゆい、山崎未稀、伏見麻衣花、荒井雅吉、中村友香、小林資正、河野富一
2. 発表標題 cis-エボキシドを有する血管新生阻害新規プテノリド類縁体の合成
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田村 理、吉田有毅、荒井雅吉、中村友香、小林資正、河野富一
2. 発表標題 血管新生阻害活性を示す海洋真菌由来新規プテノライド
3. 学会等名 日本生薬学会第66回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村 理、吉田有毅、廣田ゆい、藤原麗菜、荒井雅吉、中村友香、佐藤圭悟、小林資正、河野富一
2. 発表標題 血管新生阻害活性を示す海洋真菌由来新規プテノリドの合成研究
3. 学会等名 第58回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田村 理、佐藤圭悟、廣田ゆい、藤原麗菜、山崎未稀、菅井滉太、吉田有毅、荒井雅吉、中村友香、小林資正、河野富一
2. 発表標題 血管新生阻害活性新規ブテノリドのcis類縁体合成
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 グルココルチコイド受容体阻害剤	発明者 清水康晴、堀厚、上田実、田村 理	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-16494	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関