

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390033

研究課題名（和文） NFκB、HMGA 蛋白質を機軸とした DNA 切断・架橋剤の創製とがん治療への展開

研究課題名（英文） Design of DNA-cleaving and -crosslinking agents based on NFκB and HMGA proteins aiming at the application to cancer therapy

研究代表者

大塚 雅巳（OTSUKA MASAMI）

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：40126008

研究成果の概要（和文）：

近年、DNA 結合蛋白質 NFκB や HMGA と発がん、がんの浸潤との関連が指摘されている。本研究では DNA 結合蛋白質 NFκB と HMGA を機軸とし、酸素活性化剤や架橋剤の連結により DNA を酸化切断・架橋する人工分子の創製を行うことを目的とした。

はじめに、ジメチルアミノピリジンとヒスチジンからなる新規人工配位子を合成した。本配位子の2価鉄錯体は活性酸素ラジカルを産生し、DNA を切断した。

この人工配位子をもとに、SH 基をもつ任意の蛋白質と in situ で結合し特異的 DNA 切断能力を持つように誘導体化することを検討した。ジメチルアミノピリジンの2位および6位にホルミル基を導入し、ここにヒスチジンメチルエステルおよびリンカーをもつヒスチジンを順次連結することにより、目的とする化合物の合成を完了することができた。

本化合物が得られたことにより転写因子 NFκB や構造的クロマチン因子 HMGA などの蛋白質の認識する DNA を切断するための基礎を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

Recently, NFκB and HMGA proteins attract the interest because of their relation to carcinogenesis and tumor invasion. The present study aimed at design and synthesis of DNA-cleaving/crosslinking molecules based on the NFκB and HMGA proteins.

We first synthesized a novel artificial ligand comprising a dimethylaminopyridine and histidines. This ligand formed ferrous complex to generate oxygen radical, cleaving DNA. In the present study, we are successful to prepare a new dimethylaminopyridine/histidine based ligand equipped with a chloroalkyl linker that could bind a SH group of various proteins in situ. This would enable us to cleave DNA sequences that NFκB and HMGA proteins recognize.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

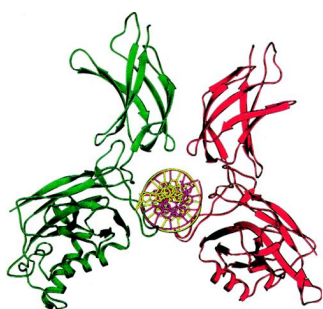
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：癌、NFκB、HMGA 蛋白質、DNA 切断

1. 研究開始当初の背景

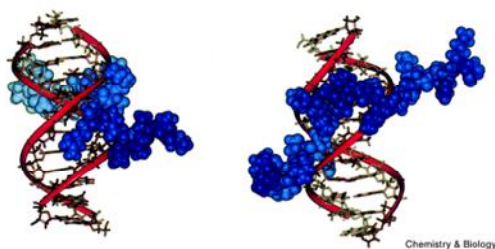
多くの DNA 結合タンパク質は、遺伝子発現の調節、クロマチンの高次構造形成など種々の重要な生体反応に関与している。転写因子 NFκB は、DNA のプロモーター領域に存在する κB 配列に結合し、免疫系に関連する種々の遺伝子の転写を調節し、がん、エイズなどの疾患にも関与していることが知られている。研究代表者らは NFκB と DNA の結合を阻害する人工化合物を開発してきた。



転写因子 NFκB と DNA の相互作用

F. E. Chen, D. B. Huang, Y. Q. Chen, G. Ghosh *Nature* **391**, 410-413 (22 January 1998)

また、非ヒストン性クロマチン構造因子である HMGA タンパク質 (HMGA1, HMGA2) は転写因子やコファクターとともに大きなタンパク質複合体を形成することが知られているが、中尾らは HMGA2 タンパク質が膀胱がん細胞の上皮間葉転換に関わることを見出した。HMGA タンパク質は、AT フック構造を持ち、DNA の狭い溝の AT に富んだ配列に結合する。



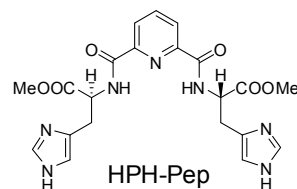
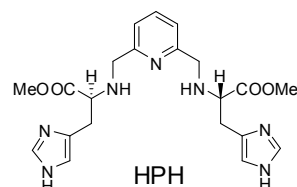
AT フックと DNA の相互作用

J. R. Huth, C. A. Bewley, M. S. Nissen, J. N. S. Evans, R. Reeves, A. M. Gronenborn, G. M. Clore, *Nat. Struct. Biol.* **1997** *4*, 657-665.

これらの DNA 結合タンパク質の機能を解明し、また機能を制御し、ひいてはこれらが関与する疾患の治療に結びつけるためには、これらが結合する DNA の塩基配列を特異的に破壊することが有効と考えられる。

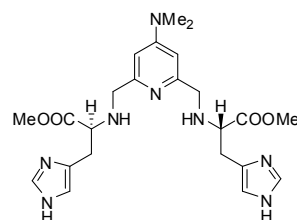
研究代表者らは、DNA を修復できないよう

に酸化切断することを目的としてブレオマイシンの鉄錯体形成部位の構造を再構成した人工化合物を設計合成した。すなわち、ピリジンと2つのヒスチジンを対称的に配置し、二級アミノ結合で連結した化合物 HPH 及びペプチド結合で連結した化合物 HPH-Pep を合成した。



ピリジン部位とヒスチジン部位が二級アミノ結合した HPH は、ブレオマシン同様に2価の鉄イオンと錯体を形成し、分子状酸素を還元的に活性化することが確認された。また、ピリジン部位とヒスチジン部位がペプチド結合した HPH-Pep は鉄錯体にしても酸素を活性化せず、この化合物を銅錯体にするると活性酸素の一種であるスーパーオキシドを消去する活性を示した。HPH-Pep- Cu(II) の X 線結晶構造解析を行ったところ、HPH-Pep はピリジン窒素、ペプチド窒素、イミダゾール窒素により銅に配位していることが明らかとなった。

HPH の酸素活性化能力は、ピリジン環上の4位にジメチルアミノ基を導入することにより大幅に増大することが明らかになった。鉄から酸素への電子移動をピリジン環上の電子供与基が促進したためと考えられる。



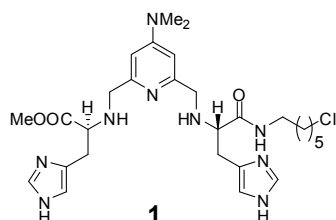
2. 研究の目的

HPH 化合物の Fe(II) 錯体は DNA 切断能を示したが、活性発現には 100 μM 程度の高濃度を必要とし、DNA 切断における塩基配列特異

性もみられなかった。

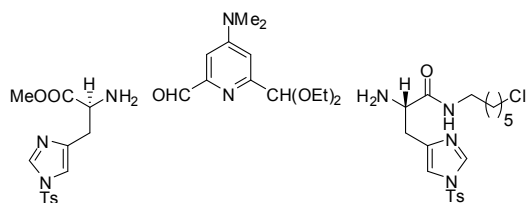
そこで本研究では、HPH 化合物に DNA 結合部位を導入するための機能性リンカーを持たせた化合物 **1** の合成を目的とした。

化合物 **1** はリンカー末端のクロロ基で SH 基を持つ (あるいは導入した) DNA 結合タンパク質と *in situ* にて連結し、DNA 切断能を持たせることが可能と考えられる。



3. 研究の方法

化合物 **1** は、3つのフラグメントに分割することができる。すなわち、ピリジン部位、ヒスチジン部位、および後に DNA 結合タンパク質を連結させるヒスチジン-リンカー部位である。本研究ではこれら3つのフラグメントをそれぞれ合成し、次いで順次連結することにより、化合物 **1** を合成することとした。

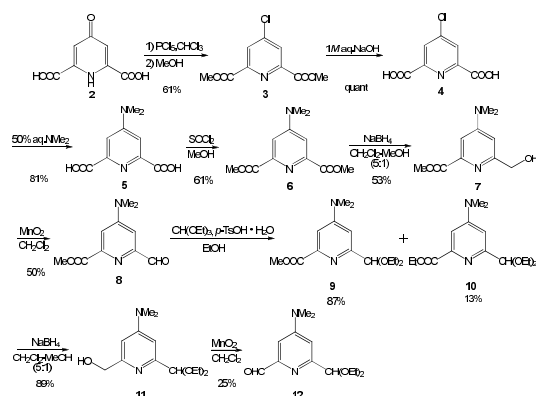


4. 研究成果

(1) ピリジン部位の合成

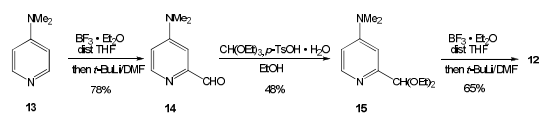
研究代表者らがさきに関連したケリダム酸 **2** を出発原料とする合成法を用いて化合物 **12** の合成を行った。化合物 **2** を順次クロロ化、メチルエステル化することにより化合物 **3** を得た。化合物 **3** を加水分解してジカルボン酸 **4** とし、封管中 120°C でジメチルアミンと反応させ化合物 **5** を得た。化合物 **5** を再びエステル化を行いジメチルエステル **6** とし、これを NaBH₄ 存在下で還元することにより、モノアルコール体 **7** を得た。化合物 **7** のアルコールをアルデヒドに酸化して化合物 **8** とし、引き続きジエチルアセタール化を行ったところ、メチルエステル **9** とともに、エステル交換により生成するエチルエステル体 **10** が得られた。化合物 **9**、**10** を混合物のまま NaBH₄ にて還元してアルコール **11** とし、これを MnO₂

にて酸化してアルデヒド **12** を得た。



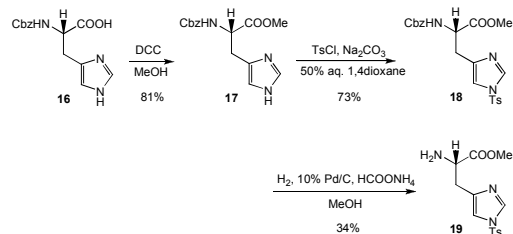
この合成法によるアルデヒド **12** の通算収率は 2% と高いものではなかったため、合成経路の再検討を行った。4-ジメチルアミノピリジン **13** にホルミル基を導入する改良合成経路を開拓した。

化合物 **13** に THF 中、BF₃・OEt₂ を加えて 1 時間攪拌後、-78°C で *t*-BuLi、DMF を加えて攪拌することでアルデヒド **14** を得た。化合物 **14** をアセタール **15** に導いた後、化合物 **14** を得た同様の方法でアルデヒド **12** を得た。この合成法の通算収率は 24% であった。工程数の短縮と収率の向上を実現された。



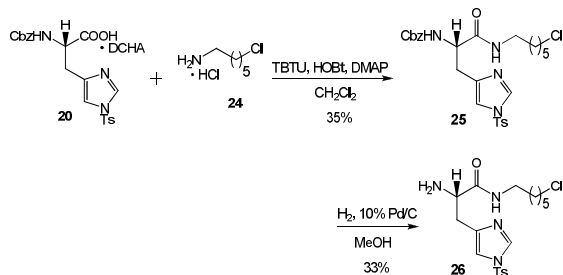
(2) ヒスチジン部位の合成

N^α-Benzyloxycarbonyl-L-histidine (**16**) をメチルエステル **17** へと変換し、更にイミダゾールを Ts にて保護した化合物 **18** を得た。化合物 **18** の α-アミノ基に導入された Cbz 基の脱保護を行い、化合物 **19** を得た。



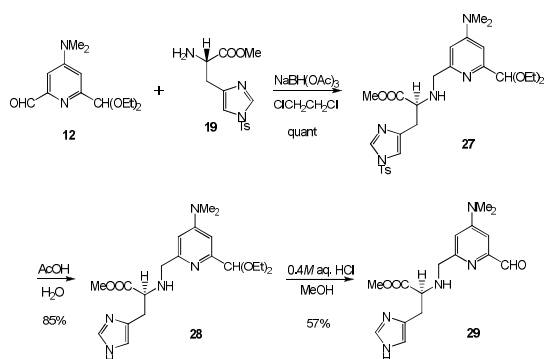
(3) ヒスチジン-リンカー部位の合成

ヒスチジン部位 **20** とリンカー部位 **24** を縮合させ、化合物 **25** を得た。化合物 **25** の α-アミノ基に導入された Cbz 基の脱保護を行い、ヒスチジン-リンカー部位の化合物 **26** を得た。

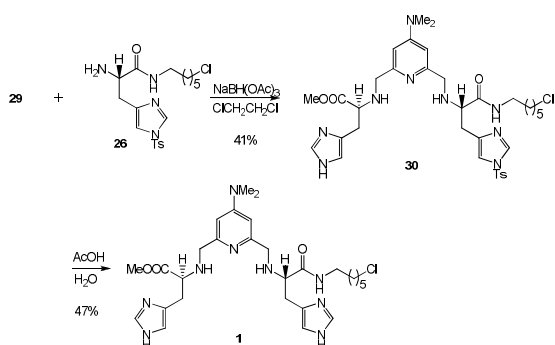


(4) 化合物 1 の合成

ピリジン部位 **12** とヒスチジン部位 **19** を還元的アミノ化反応により結合させ、二級アミノ化合物 **27** を得た。化合物 **27** のイミダゾールの Ts 基を脱保護して化合物 **28** とし、次いで、ジエチルアセタールを脱保護しアルデヒド **29** を得た。



続いて、ヒスチジン-リンカー部位を結合させるため、NaBH(OAc)₃ を用いた還元的アミノ化反応を行った。**29** を **26** と NaBH(OAc)₃ 存在下、ClCH₂CH₂Cl 中、室温で 24 時間攪拌することで **30** を得た。最後に、イミダゾールの Ts 基を AcOH と水 (1:1) の混合溶媒中、50℃で 4 時間攪拌することで化合物 **1** を得た。



本化合物が得られたことにより転写因子 NFκB や構造的クロマチン因子 HMGa などの蛋白質の認識する DNA を切断するための基礎を得ることができた。

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 13 件)

- ① Naoki Yamakawa, Shintaro Suemasu, Masaaki Matoyama, Ayumi Kimoto, Miho Takeda, Ken-ichiro Tanaka, Tomoaki Ishihara, Takashi Katsu, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka, Tohru Mizushima. Properties and synthesis of 2-{2-Fluoro (or Bromo)-4-[(2-oxocyclopentyl) methyl]phenyl}propanoic acid: Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs with Low Membrane Permeabilizing and Gastric Lesion-producing Activities. *J. Med. Chem.*, 53(21), 7879-7882, 2010. 査読有
- ② Kenji Matsuno, Yoshiaki Masuda, Yutaka Uehara, Hiroshi Sato, Ayumu Muroya, Osamu Takahashi, Takane Yokotagawa, Toshio Furuya, Tadashi Okawara, Masami Otsuka, Naohisa Ogo, Tadashi Ashizawa, Chie Oshita, Sachiko Tai, Hidee Ishii, Yasuto Akiyama, Akira Asai. Identification of a New Series of STAT3 Inhibitors by Virtual Screening. *ACS Med. Chem. Lett.*, 1(8), 371-375, 2010. 査読有
- ③ Kensaku Anraku, Ryota Fukuda, Nobutoki Takamune, Shogo Misumi, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka, Mikako Fujita. Highly Sensitive Analysis of the Interaction between HIV-1 Gag and Phosphoinositide Derivatives Based on Surface Plasmon Resonance. *Biochemistry*, 49 (25), 5109-5116, 2010. 査読有
- ④ Naoki Yamakawa, Shintaro Suemasu, Ayumi Kimoto, Yasuhiro Arai, Tomoaki Ishihara, Kazumi Yokomizo, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka, Ken-ichiro Tanaka, Tohru Mizushima. Low Direct Cytotoxicity of Loxoprofen on Gastric Mucosal Cells. *Biol. Pharm. Bull.*, 33(3), 398-403, 2010. 査読有
- ⑤ Qingjun Wei, Koichi Harada, Keiko Minamoto, Chang-Nian Wei, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka, Atsushi Ueda. Evaluation of allergenicity of constituents of myoga using the murine local lymph node assay (LLNA). *Int. J. Immunopathology and Pharmacology*, 23 (2), 463-470, 2010. 査読有
- ⑥ Mikako Fujita, Masami Otsuka, Masako Nomaguchi, Akio Adachi. Multifaceted activity of HIV Vpr/Vpx proteins: the

current view of their virological functions. *Reviews in Medical Virology*, 20, 68-76, 2010. 査読有

- ⑦ Tsutomu Ishihara, Miho Takeda, Haruka Sakamoto, Ayumi Kimoto, Chisa Kobayashi, Naoko Takasaki, Kanae Yuki, Ken-ichiro Tanaka, Mitsuko Takenaga, Rie Igarashi, Taishi Maeda, Naoki Yamakawa, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka, Tatsuhiro Ishida, Hiroshi Kiwada, Yutaka Mizushima, Tohru Mizushima. Accelerated blood clearance phenomenon upon repeated injection of PEG-modified PLA-nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 26 (10) 2270-2279, 2009. 査読有
- ⑧ Miho Takeda, Taishi Maeda, Tsutomu Ishihara, Haruka Sakamoto, Kanae Yuki, Naoko Takasaki, Fumihiro Nishimura, Takeshi Yamashita, Ken-ichiro Tanaka, Mitsuko Takenaga, Rie Igarashi, Megumu Higaki, Naoki Yamakawa, Yoshinari Okamoto, Hisao Ogawa, Masami Otsuka, Yutaka Mizushima, Tohru Mizushima. Synthesis of Prostaglandin E1 Phosphate Derivatives and Their Encapsulation in Biodegradable Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*, 26 (7), 1792-1800, 2009. 査読有
- ⑨ Shin Ando, Yoshinari Okamoto, Kazuo Umezawa, Masami Otsuka. Synthesis of the indole core structure of conophylline. *J. Heterocyclic Chem.*, 45, 1803-1808, 2008. 査読有
- ⑩ Mikako Fujita, Masami Otsuka, Masako Nomaguchi, Akio Adachi. Functional region mapping of HIV-2 Vpx protein. *Microbes and Infection*, 10 (12-13), 1387-1392, 2008. 査読有
- ⑪ Mikako Fujita, Masami Otsuka, Masami Miyoshi, Boonruang Khamsri, Masako Nomaguchi, Akio Adachi. Vpx is critical for the reversetranscription of human immunodeficiency virus type 2 genome in macrophages. *J. Virology*, 82 (15), 7752-6, 2008. 査読有
- ⑫ Kensaku Anraku, Teruhiko Inoue, Kenji Sugimoto, Takashi Morii, Yasuo Mori, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka. Design and synthesis of biotinylated inositol phosphates relevant to the biotin-avidin techniques. *Org. Biomol. Chem.*, 6, 1822-1830, 2008. 査読有
- ⑬ Tetsuji Hosono, Kazumi Yokomizo, Akiyuki Hamasaki, Yoshinari Okamoto, Tadashi Okawara, Masami Otsuka, Ryozauro Mukai, Keitarou Suzuki.

Antiviral activities against herpes simplex virus type 1 by HPH derivatives and their structure-activity relationships. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18 (1), 371-374, 2008. 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- ① Takashi Masuda, Kensaku Anraku, Kaori Sato, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka 「Systematic synthesis of all regioisomers of inositol phosphates.」 PACIFICHEM 2010 (2010. 12. 19. Convention Center, Honolulu)
- ② 坂本慎弥、松本正裕、岡本良成、大塚雅巳 「新規 DNA 切断分子の合成研究」第 27 回日本薬学会九州支部大会 (2010. 12. 12. 長崎大学薬学部、長崎)
- ③ 安楽健作、福田亮太、藤田美歌子、大塚雅巳 「Pr55Gag を標的とした抗 HIV-1 薬開発のための基礎的研究」第 29 回メディスナルケミストリーシンポジウム (2010. 11. 18. 京都テルサ、京都)
- ④ 舩田岳史、安楽健作、佐藤かおり、岡本良成、大塚雅巳 「イノシトールリン酸類における全位置異性体の系統的合成法の開拓」日本薬学会第 130 年会 (2010. 3. 29. 桃太郎アリーナ、岡山)
- ⑤ 工藤康太、安楽健作、岡本良成、藤田美歌子、河野隆幸、森岡基浩、倉津純一、大塚雅巳 「脳虚血後の脳保護に関与する PI3K-Akt 経路を標的としたミオイノシトール誘導体の合成」日本薬学会第 130 年会 (2010. 3. 29. 桃太郎アリーナ、岡山)
- ⑥ 廣田真友子、入江佳奈子、尾田一貴、岡本良成、合田仁、井上純一郎、藤田美歌子、大塚雅巳 「RANK を三量体化させる人工低分子化合物の開発とそれによるシグナル伝達制御システム構築の試み」第 32 回日本分子生物学会年会 (2009. 12. 11. パシフィコ横浜、横浜)
- ⑦ 藤田美歌子、安楽健作、大塚雅巳 「HIV-1 複製に関与するイノシトールリン脂質類と Gag 関連蛋白質との結合の定量的解析」第 57 回日本ウイルス学会学術集会 (2009. 10. 25. 都市センターホテル、東京)
- ⑧ 安楽健作、藤田美歌子、大塚雅巳 「Highly sensitive analysis for interaction between human immunodeficiency virus type 1 Gag and phosphoinositide derivatives based on surface plasmon resonance」第 10 回熊本エイズセミナー (2009. 09. 28. ホテル日航熊本、熊本)
- ⑨ 大場誉徳、井上奈月、穴井里美、岡本良成、佐谷秀行、大塚雅巳 「ADAM ファミリーメタロプロテアーゼ特異的阻害剤の合成研究」日本薬学会第 129 年会 (2009. 3. 26.

国立京都国際会館、京都)

- ⑩ 舛田岳史、安楽健作、佐藤かおり、岡本良成、大塚雅巳「イノシトールリン酸類における全位置異性体の系統的合成法の開拓」日本薬学会第129年会(2009.3.26.国立京都国際会館、京都)
- ⑪ 藤田美歌子、安楽健作、福田亮太、大塚雅巳「HIV-1蛋白質とイノシトールリン酸との結合解析」第22回日本エイズ学会学術集会(2008.11.26.大阪国際交流センター、大阪)
- ⑫ 岡本良成、松本正裕、藤田美歌子、大塚雅巳「がんに関わる生体反応を標的としたDNA切断分子の合成研究」第12回がん分子標的治療研究会総会(2008.06.26.学術総合センター、東京)

[産業財産権]

○出願状況(計2件)

- ①名称：APOBEC3発現向上剤及び抗HIV剤
発明者：藤田美歌子、大塚雅巳、江島智彦
権利者：国立大学法人熊本大学
種類：特許
番号：2010-103182
出願年月日：平成22年4月28日
国内外の別：国内
- ②名称：ロキソプロフェン誘導体及びそれを含有する医薬
発明者：水島徹、大塚雅巳、岡本良成、山川直樹
権利者：国立大学法人熊本大学、株式会社LTTバイオファーマ
種類：特許
番号：特願2009-43801
出願年月日：平成21年2月26日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/bunsigouseiHP/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 雅巳 (OTSUKA MASAMI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：40126008

(2) 研究分担者

岡本 良成 (OKAMOTO YOSHINARI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：20194409