

機関番号：17401
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590104
 研究課題名 (和文) 癌の浸潤・転移に関する亜鉛蛋白質の機能を特異的に阻害する亜鉛キレーターの創製
 研究課題名 (英文) Development of zinc chelators to inhibit function of zinc protein participating in invasion and metastasis of cancer cell
 研究代表者
 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

研究成果の概要 (和文)：

近年、腫瘍細胞の浸潤・転移には、機能発現に亜鉛が必須である転写因子 Snail や、プロテアーゼ ADAM10 および ADAM17 が関与していることが見いだされてきた。

本研究では、亜鉛特異的な配位子に蛋白認識部位を連結させるという方法論で、これらの蛋白質を特異的に阻害する化合物を合成することを目的とした。我々が開発したピリジンと2つのシステアミンからなる亜鉛特異的な配位子に、蛋白認識部位として MMP 阻害剤として知られているマリマスタットの側鎖部位を連結した化合物を合成することができた。合成した化合物は 20 μ M で細胞毒性を示すことなく細胞のフォーカス形成を 80% 阻害した。

研究成果の概要 (英文)：

Recently, it has been reported that transcription factor Snail, protease ADAM10 and ADAM17 are participating in invasion and metastasis of cancer cell. The present study aimed at development of specific inhibitors of these proteins.

We are successful to synthesis a new pyridine/cysteamine based zinc chelator equipped with a marimastat side chain. This compound showed 80% inhibition against focus formation in 20 mM without any cell toxicity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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, 浸潤・転移, 亜鉛キレーター

1. 研究開始当初の背景

癌による死亡の約90%は、腫瘍細胞の局所浸潤（周辺組織への浸潤）と遠隔転移によるものであると考えられている。近年、腫瘍細胞の浸潤・転移

に、上皮間葉転移に関連する転写因子 Snail と、細胞の移動に関連してメタロプロテアーゼ ADAM10、および ADAM17 が関与していることが見いだされた。

Snail は、C末端側に4個の亜鉛フィンガードメインを持つ亜鉛フィンガー型転写

因子で、E-カドヘリンの発現を抑制する。最近の研究により、Snailの核内移行には亜鉛フィンガーが重要であることが報告された (*Gene to Cell*, **10**, 455, 2005; *Nature*, **429**, 298, 2004). すなわち, Snailの亜鉛フィンガー部分に作用する化合物を合成することで, Snailの核内移行を阻害し, EMTを抑制することが可能ではないかと考えた。

また, ADAM10やADAM17などのプロテアーゼは, 活性中心に亜鉛を持っており, 亜鉛に作用する化合物は, プロテアーゼの活性を阻害することができると考えられる。MMPは, 1990年代から癌治療の分子標的として認識され, その阻害剤 (MMPI) の開発は活発な研究が行われているものの, その成功に行き着いたものはなかった。

研究代表者らは, ピリジンと2つのシステアミンからなる化合物が, 亜鉛配位子として働き, 亜鉛フィンガー蛋白質であるHIV-EP1に対して良い阻害効果を示すことを見いだした。さらに, この配位子に芳香環を連結した化合物は, 活性中心に亜鉛が存在し, その近傍に疎水性ポケットを持つファルネシルトランスフェラーゼの活性を阻害する事を見いだした。

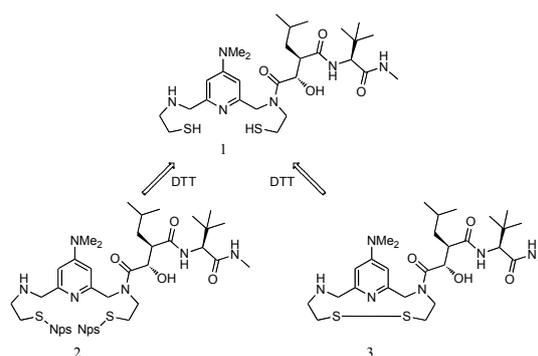
2. 研究の目的

転写因子Snail, プロテアーゼADAM10, およびADAM17は, その機能を発現するために亜鉛を必要とする亜鉛蛋白質である。

本研究では, 我々が開発した亜鉛特異的な配位子に, 蛋白質を特異的に認識する側鎖を結合し, これらの蛋白質の機能発現に必須である亜鉛と特異的に相互作用する亜鉛キレーターを設計・合成することを目的とした。合成した化合物は, 癌の浸潤・転移を阻害する事により, がん患者のQOLを改善する新しい抗癌剤の開発につながるものと考えた。

3. 研究の方法

蛋白認識部位として, 広くMMPを阻害することが知られているマリマスタットの側鎖部位を用い, 亜鉛キレーターと結合させた化合物 (**1**) を目的化合物とした。チオール基の不安定性を考慮し, 末端のチオール基は, NPS保護 (**2**) あるいはジスルフィド体 (**3**) として合成することとした。これらの化合物 (**2** 又は **3**) は, 活性評価系に還元剤 (DTT) を加えることで, 末端をチオール基に変換することが可能であるので, 活性評価には影響がないと考えられる。

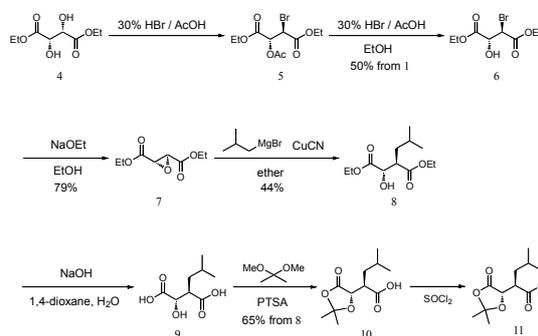


4. 研究成果

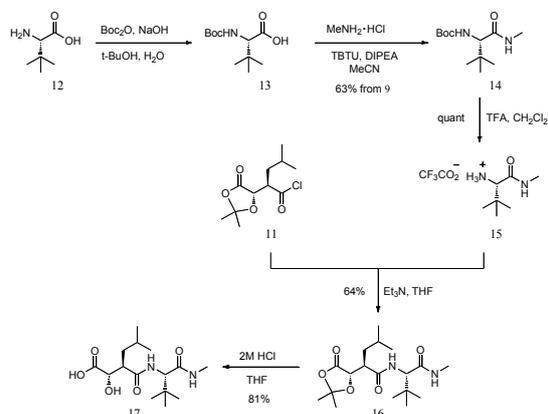
(1) マリマスタット側鎖の合成

D-(-)-酒石酸ジエチル (**4**) を出発原料としてマリマスタット側鎖 (**17**) の合成を行った。

4 を 30% HBr / AcOH で処理し, 化合物 (**6**) へ導き, その後, NaOEt で処理することでエポキシ化合物 (**7**) を得た。 **7** を CuCN 存在下で *i*-BuMgBr と反応させることで, 化合物 (**8**) を得た。 続いて, **8** のエステルを加水分解し, カルボン酸と水酸基をアセタール保護することで化合物 (**10**) を得た。 **10** を SOCl₂ 中で加熱還流することで, 酸クロリド体 (**11**) を得た。



次に, L-tert-ロイシン (**12**) のアミノ基を Boc で保護した後, TBTU, DIPEA 存在

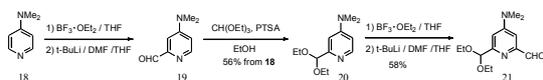


下、N-メチルアンモニウムクロリドと縮合させ、N-メチルアミド体(14)へと導いた。続いて14のBoc基をTFAを用いて脱保護し、化合物(15)を得た。さらに15を、先に合成した酸クロリド体(11)とTEA存在下で反応させ、化合物(16)へと導き、酸性条件下でアセタールの脱保護を行い、マリマスタット側鎖(17)を得ることに成功した。

(2) ピリジン部位の合成

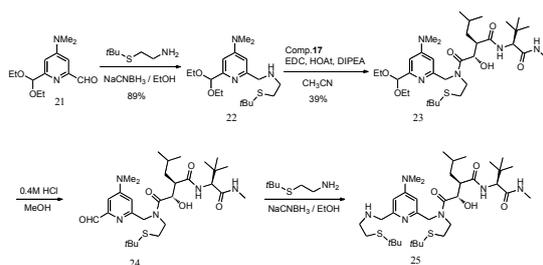
研究代表者らが開発したケリダム酸を出発原料とする従来の合成法は、9ステップを要し、通算収率は2%と低いものであった。そこで、新たな合成経路の検討を行った。4-ジメチルアミノピリジン(18)を出発原料として、2位、6位に順次ホルミル基を導入する改良合成法を開拓した。

18をTHF中BF₃・OEt₂で処理し、その後-78°Cでt-BuLi、DMFと反応させることで2位がホルミル化された化合物(19)を得た。19のホルミル基をアセタールで保護した後、先と同様の反応を行うことで、6位にホルミル基を導入した化合物(21)を得た。改良合成法は、3ステップで通算収率が24%と、工程数および収率ともに大幅な改善を達成することができた。

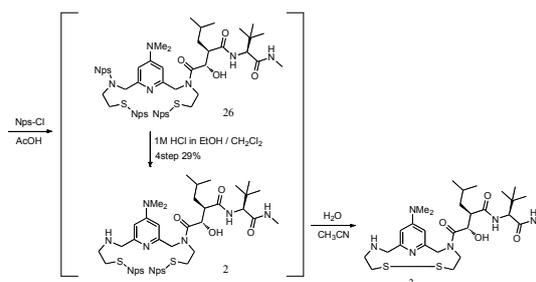


(3) 化合物(2)および化合物(3)の合成

ジメチルアミノピリジン誘導体(21)とS-tert-ブチルシステアミンを、還元的アミノ化反応により反応させることで、システアミン側鎖を導入した化合物(22)を得た。22に対するマリマスタット側鎖(17)の導入は、EDC, HOAt, DIEPAを用いることで達成した。続いて、23のアセタールの脱保護を酸性条件下で行い、アルデヒド体(24)を得た。24に先と同様の還元的アミノ化反応を行うことで、2位と6位にシステアミン側鎖を持ち、マリマスタット側鎖が結合した化合物(25)を得ることができた。

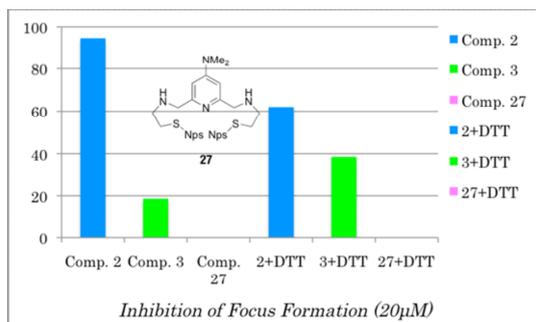


次に、25をNps-Clと反応させたところ、t-Bu基がNps基に置換した目的化合物(2)が、システアミン側鎖のアミノ基にもNps基が置換した化合物(26)との混合物として得られた。26は、酸性条件下で容易にアミノ基に置換したNpsのみをはずすことが可能である。そこで、2と26の混合物を1M HCl エタノール溶液で処理することで、目的化合物(2)を得ることができた。さらに、2をH₂O, CH₃CNで処理したところ、ジスルフィド体(3)を得ることができた。

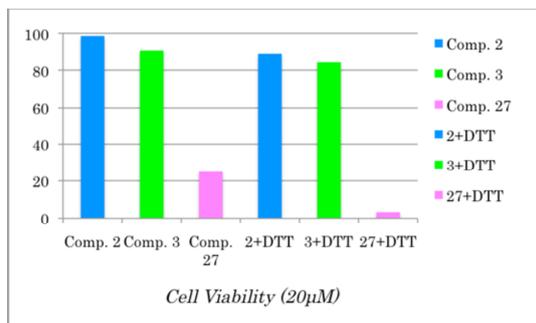


(4) 活性評価

合成が完了した化合物(2)及び化合物(3)のフォーカス形成阻害活性を検討した。その結果、化合物(3)は20μMでフォーカス形成を80%阻害した。



また、20μMでの細胞毒性に対する検討を行ったところ、マリマスタット側鎖を持たない化合物(27)では、細胞毒性が見られたものの、目的化合物(2)および(3)では、ほとんど細胞毒性を示さなかった。これは、導入したマリマスタット側鎖によって、阻害作用に選択性が発現したためと考えることができる。



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 9 件)

- ① Low direct cytotoxicity of loxoprofen on gastric mucosal cells, Naoki Yamakawa, Shintaro Suemasu, Ayumi Kimoto, Yasuhiro Arai, Tomoaki Ishihara, Kazumi Yokomizo, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka, Ken-ichiro Tanaka and Tohru Mizushima, *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, Vol. 33, 2010, pp.398-403
- ② Highly Sensitive Analysis of the Interaction between HIV-1 Gag and Phosphoinositide Derivatives Based on Surface Plasmon Resonance, Kensaku Anraku, Ryota Fukuda, Nobutoki Takamune, Shogo Misumi, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka, and Mikako Fujita, *Biochemistry*, 査読有, Vol. 49, 2010, pp.5109-5116
- ③ Properties and Synthesis of 2-(2-Fluoro (or Bromo)-4-[(2-oxocyclopentyl)methyl]phenyl)propanoic acid: Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs with Low Membrane Permeabilizing and Gastric Lesion-Producing Activities, Naoki Yamakawa, Shintaro Suemasu, Masaaki Matoyama, Ayumi Kimoto, Miho Takeda, Ken-ichiro Tanaka, Tomoaki Ishihara, Takashi Katsu, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka, and Tohru Mizushima, *J. Med. Chem.*, 査読有, Vol. 53, 2010, pp.7879-7882
- ④ Evaluation of allergenicity of constituents of myoga using the murine local lymph node assay (LLNA), Qingjun Wei, Koichi Harada, Keiko Minamoto, Chang-Nian Wei, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka and Atsushi Ueda, *J. Immunopathology and pharmacology*, 査読有, Vol. 23, 2010, pp.463-470
- ⑤ Accelerated blood clearance phenomenon upon repeated injection of PEG-modified PLA-nanoparticles, 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, Tatsuhiko Ishida, Hiroshi Kiwada, Yutaka Mizushima, and Tohru Mizushima, *Pharmaceut. Res.*, 査読有, Vol. 26, 2009, pp.2270-2279
- ⑥ Synthesis of prostaglandin E1 phosphate derivatives and their encapsulation in biodegradable nanoparticle, Miho Takeda, Taishi Maeda, Tsutomu Ishihara,

Haruka Sakamoto, Kanae Yuki, Naoko Takasaki, Fumihiko Nishimura, Takeshi Yamashita, Ken-ichiro Tanaka, Mitsuko Takenaga, Rie Igarashi, Megumu Higaki, Naoki Yamakawa, Yoshinari Okamoto, Hisao Ogawa, Masami Otsuka, Yutaka Mizushima, and Tohru Mizushima, *Pharmaceut. Res.*, 査読有, Vol. 26, 2009, pp.1792-1800

- ⑦ Design and synthesis of biotinylated inositol phosphate relevant to the biotin-avidin techniques, Kensaku Anraku, Teruhiko Inoue, Kenji Sugimoto, Takashi Morii, Yasuo Mori, Yoshinari Okamoto and Masami Otsuka, *Org. Biomol. Chem.*, 査読有, Vol. 6, 2008, pp.1822-1830
- ⑧ Synthesis of the indole core structures of conophylline, Shin Ando, Yoshinari Okamoto, Kazuo Umezawa, and Masami Otsuka, *J. Heterocycl. Chem.*, 査読有, Vol. 45, 2008, pp.1803-1808
- ⑨ Antiviral activities against herpes simplex virus type 1 by HPH derivatives and their structure-activity relationships, Tetsuji Hosono, Kazumi Yokomizo, Akiyuki Hamasaki, Yoshinari Okamoto, Tadashi Okawara, Masami Otsuka, Ryozauro Mukai and Keitaro Suzuki, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, Vol.18, 2008, pp.371-374

[学会発表] (計 13 件)

- ① 山川直樹, 末益慎太郎, 勝孝, 岡本良成, 大塚雅巳, 水島徹, 副作用を起こさない非ステロイド性抗炎症薬の創製, 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 31 日, ツインメッセ静岡
- ② Takashi Masuda, Kensaku Anraku, Kaori Sato, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka, Systematic synthesis of all regioisomers of inositol phosphate, Pacificchem2010, 2010 年 12 月 19 日, Kamehameha Halls (Honolulu) U. S. A.
- ③ 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 年 12 月 12 日, 長崎大学
- ④ 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 130 年会, 2010 年 3 月 29 日, 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年3月29日, 桃太郎アリーナ (岡山)
- ⑥ 大場誉徳, 井上奈月, 穴井美里, 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選択的阻害剤の合成研究, 第26回日本薬学会九州支部大会, 2009年12月13日, 九州大学
 - ⑦ 廣田真由子, 入江佳奈子, 小田一貴, 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年12月11日, パシフィコ横浜
 - ⑧ 大場誉徳, 井上奈月, 穴井美里, 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年3月28日, 京都国際会館
 - ⑨ 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129年会, 2009年3月26日, 京都国際会館
 - ⑩ 江島智彦, 岡本良成, 大塚雅巳, 藤田美歌子, HIV-1 Vif 阻害剤を指向した亜鉛キレーター合成と活性評価, 日本薬学会第129年会, 2009年3月26日, 京都国際会館
 - ⑪ 野田陽平, 岡本良成, 梅澤一夫, 大塚雅巳, DHMEQ類似体の合成研究, 第25回日本薬学会九州支部大会, 2008年12月7日, 九州保健福祉大学 (宮崎)
 - ⑫ 大場誉徳, 井上奈月, 穴井美里, 岡本良成, 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, 第25回有機合成化学セミナー, 2008年9月8日, 阿蘇プラザホテル (熊本)
 - ⑬ 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年6月26日, 学術総合センター (東京)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

()

研究者番号: