

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590110

研究課題名（和文）親水性基と疎水性基の組合せによる新規 Cdc25A 阻害剤リード骨格の探索
 研究課題名（英文）Development of novel class of Cdc25A inhibitor by combination of hydrophilic and hydrophobic group

研究代表者

嶋澤 るみ子 (SHIMAZAWA RUMIKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：00411083

研究成果の概要（和文）：含窒素複素環を母核とする新規 Cdc25A 阻害剤を設計、合成した。含窒素複素環誘導体は疎水性基として長鎖アルキル基を導入することで、高い阻害活性が得られた。さらに多様な複素環候補化合物の合成を目指して、新規 C-S 二座型配位子-パラジウム錯体触媒による 1,2-付加反応系を連続型骨格構築反応へと展開し、高効率なタンデム型複素環形成法の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：Novel *N*-heterocyclic derivatives were designed and synthesized as a Cdc25A inhibitor. The *N*-heterocyclic derivatives which have long alkyl chains exhibited strong inhibitory activity toward dual-specificity phosphatase Cdc25A. In addition, efficient synthesis of 3-arylphthalides via palladium-catalyzed 1,2-addition with the novel thioether-imidazolium carbene ligands was successfully achieved.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	900,000	270,000	1,150,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：脱リン酸化酵素、Cdc25A、複素環、付加反応

1. 研究開始当初の背景

(1) Cdc25 phosphatases (以下 Cdc25)は、protein tyrosine phosphatases (以下 PTP)の 1 種であり、ヒトでは A、B 及び C のホモログが存在する。いずれも細胞周期を制御する脱リン酸化酵素であり、特に Cdc25A 及び B は、様々な癌細胞でその遺伝子発現異常が検出され、抗癌剤開発における標的の 1 つとされている。つまり Cdc25 に対する阻害剤は、細胞周期研究における bioprobe として、あるいは抗癌剤として有望である。

(2) PTP は、触媒活性部位として共通構造を有し、Cdc25A 及び B は、それぞれ酵素活性部位単独の結晶構造が報告されているが、Cdc25A の立体構造は他の PTP と共通性が低く、阻害剤との相互作用は Cdc25B におけるドッキングスタディの結果が報告されているのみであった。

Cdc25 阻害剤に関する研究は、天然物や化合物ライブラリーからの発見をきっかけとしたものがほとんどであり、これまで酵素あるいは阻害剤の構造情報に基づく理論的な阻害剤設計や系統的な構造活性相関研究が

なかった。

2. 研究の目的

(1) 我々は、既存の Cdc25 阻害剤の構造から、「Cdc25 阻害剤はリン酸ミミックな親水性骨格と疎水性骨格を適切な距離と位置に配置することにより設計できる」との作業仮説を立てた。本研究においては、既存の Cdc25 阻害剤から親水性骨格と疎水性骨格双方の構造を変更し、新たに Cdc25 阻害剤のリード化合物となる骨格を見出すことを目標とした。

(2) さらに新規 Cdc25A 阻害剤の開発を目的として、C-S 二座型配位子-パラジウム触媒による 1,2-付加反応を基盤とするフタライド骨格構築を標的とした複素環構築反応の開発を行うこととした。本骨格構築法を足がかりとして多様な候補化合物の探索を可能とすることを目標とした。

3. 研究の方法

(1) 新規リード骨格の探索

芳香環・複素環は様々な置換基の導入により、将来的に様々な誘導体合成が可能であり、かつ親水性骨格との連結に必要な官能基を有する部分構造の入手あるいは合成も比較的容易である。まずは単純な芳香環、複素環を使い、親水性骨格としては、カルボン酸やリン酸エステルなど比較的導入しやすく、阻害活性が確認されているものを用いて、新規リード骨格の探索を行った。Cdc25A 阻害活性は *O*-methylfluorescein phosphate を基質として測定し、既知のビタミン D 誘導体である強力な Cdc25A 阻害剤 (IC₅₀ 12μM) を阻害活性の基準物質として IC₅₀ 値を求めた。

(2) 新規複素環合成法の開発

新規リード骨格の探索で、複素環は鍵骨格になるため、新規複素環骨格構築反応を開発することとした。1,2-付加反応に対して有効であった新規 C-S 二座型配位子-パラジウム触媒を用いて付加反応を基盤とするタンデム型複素環構築反応の開発を行った。

4. 研究成果

(1) 新規リード骨格の探索

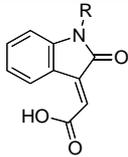
複素環化合物を中心に、親水性骨格としてカルボン酸など、疎水性骨格としてアルキル基などを導入し、種々の化合物を設計・合成した。

イサチン骨格誘導体により高い Cdc25A 阻害活性を示すものが見いだされたため、イサチン骨格誘導体の親水性骨格および疎水性骨格の構造変換を行った。親水性骨格はカルボン酸誘導体の阻害活性が高かったので、カ

ルボン酸誘導体で構造活性相関を探索した。

イサチン骨格とカルボン酸の相対配置(*E/Z*)により、阻害活性強度に変化がみられた (Table 1)。疎水性骨格はアルキル鎖を導入した場合が最も阻害活性が高く、その長さにより阻害活性が大きく異なることが明らかとなった。アルキル鎖は長くなるほど阻害活性が高くなったが、イサチン骨格から炭素数 14 以上長いアルキル鎖を導入しても阻害活性がほとんど変わらなくなった。一方、炭素数 12 よりアルキル鎖が短い場合はアルキル鎖が短くなるほど、阻害活性は低下し、炭素数 6 のアルキル鎖 (**a**) では阻害活性が認められなくなった。更にアルキル鎖と炭素数が同じ芳香環を導入した場合 (**g**)、ほぼ同じ長さのエーテル鎖を導入した場合 (**h**) にも阻害活性が認められなくなった。

Table 1

Compds	Cdc25A inhibition IC ₅₀ , μM ^a	
	<i>E</i>	<i>Z</i>
		
		
a : R=C ₆ H ₁₃	> 100	> 100
b : R=C ₈ H ₁₇	84	39
c : R=C ₁₀ H ₂₁	13	12
d : R=C ₁₂ H ₂₅	2.6	2.9
e : R=C ₁₄ H ₂₉	2.3	1.7
f : R=C ₁₆ H ₃₃	1.9	1.6
g : R=(CH ₂) ₃ Ph	> 100	-
h : R=C ₂ H ₄ (OC ₂ H ₅) ₂ H	> 100 ^b	-

^aValues are means of two-five experiments.

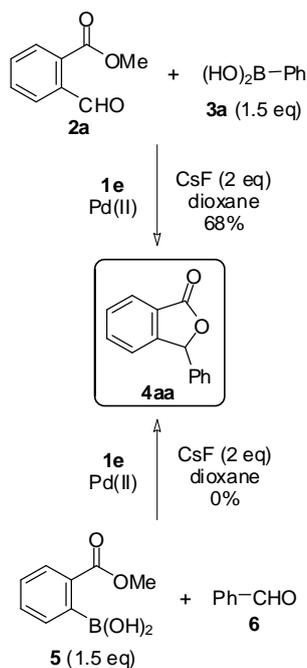
^bThe mixture of *E*- and *Z*-form (*E/Z*=4/1).

以上より、複素環骨格がリード骨格として有用であることが明らかになったため、新規複素環合成法を開発することとした。

(2) 新規複素環合成法の開発

① フタライド骨格構築を標的とするタンデム型複素環構築反応の開発：合成ルートの選択肢を増やし、柔軟な合成計画を可能とするためにパラジウムと C-S 二座型配位子 **1b** からなる触媒系 (0.01 当量) を用い、オルト位にアルデヒドもしくはボロン酸を有する基質を検討した (Scheme 1)。オルト位にアルデヒドを有するベンゾエートを用いた場合は 68% で目的とする付加環化体を得たが、オルト位にボロン酸を有するベンゾエートでは反応が全く進行しなかった。これは、基質 **5** がトランスメタル化後にパラダサイクルを経由して分解することが原因として考えられる。これらの結果を踏まえ、以後の検討は基質 **2a** を用いて行うこととした。

Scheme 1.



次に、反応条件の検討を種々行った。パラジウム源は、0 価の $\text{Pd}(\text{dba})_2$ 、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ を用いたときはいずれも 30% 台の低収率に留まった。2 価のパラジウムでは、 $[\text{Pd}(\text{allyl})\text{Cl}]_2$ が 68% 収率を示した他は $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ 、 $\text{Pd}(\text{acac})_2$ などでも 30% 台の低収率しか与えなかった。次に、toluene、dioxane、DMA、DMF、DMSO などの溶媒を種々検討したところ、DMA、DMF、DMSO などの高極性溶媒では全く反応は進行せず、toluene を用いたときに 78% まで収率が改善された。さらに、NaF、KF、CsF、 Cs_2CO_3 、 K_3PO_4 などの無機塩基を検討したが、CsF より優れた効果を与えるものを見出すことは出来なかった。フェニルホウ酸 **3a** を 2.5 当量まで増やすとほぼ定量的に反応が進行し、97% 収率で目的とする付加環化体 **4aa** を得た。

以上の検討から得た最適条件を用い、基質一般性に関して検討を行った。立体障害、電子的影響、配位性ヘテロ原子に左右されず、良好に反応が進行することが明らかとなった (Table 2, entries 1-6)。アルケニル基の導入や電子豊富なアルデヒドを用いる場合でも優れた収率を与えた (entries 7-8)。

Table 2.

entry	$(\text{HO})_2\text{BR}'$	product	yield (%) ^b
1	3b	4ab	87
2 ^a	3c	4ac	85
3	3d	4ad	99
4	3e	4ae	99
5 ^a	3f	4af	85
6 ^a	3g	4ag	75
7	3h	4ah	52
8	3a	4ba	85

^a Instead of toluene, dioxane was used as a solvent.

②反応溶媒の検討：触媒的複素環骨格構築反応を実用性に優れたものとするために、骨格構築反応の中核をなす触媒的付加反応に水を反応溶媒として適用することを試みた。種々反応条件を検討した結果、水のみを反応溶媒として用いたときにも C-S 二座型配位子-パラジウム錯体がアルデヒドのアリール化を高効率的に触媒することが明らか

となった。本反応は、優れた基質一般性を示したばかりでなく、グラムスケールの合成にも容易に対応することが可能であり、実用性に優れた手法の確立に成功した。また、反応効率の濃度依存がほとんどないために、高濃度での実施が可能であり、実践性における有用性の高さも示された。

さらに、含窒素環状化合物構築へと拡張すべく、イミンをオルト位に有するベンゾエートを基質として検討を行ったところ、期待に反して付加反応は全く進行しなかった為、アミドを有する基質への付加の後に、脱水型閉環を試みた。閉環の工程において種々ルイス酸を検討したところ、アルミニウム試薬が有効であることが明らかとなり、約 50% 収率で閉環体を得ることに成功した。さらなる収率の向上をはかるべく、ルイス酸や反応条件の詳細な検討を行っている。

以上より、新規骨格を有する Cdc25A 阻害剤の開発、及び更なる新規 Cdc25A 阻害剤の開発に必須である基礎および応用的反応の開発に成功した。今後は多様性に優れた誘導体合成と候補化合物探索に取り組む予定である。

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 4 件)

- ① “Palladium-Imidazolium Carbene-Catalyzed Arylation of Aldehydes with Arylboronic Acids in Water” Kuriyama, M.; Ishiyama, N.; Shimazawa, R.; Onomura, O. *Tetrahedron* **2010**, *66* (34), 6814-6819. (査読有)
- ② “Efficient Synthesis of 3-Arylphthalides using Palladium-Catalyzed Arylation of Aldehydes with Organoboronic Acids” Kuriyama, M.; Ishiyama, N.; Shimazawa, R.; Shirai, R.; Onomura, O. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (23), 9210-9213. (査読有)
- ③ Palladium-Catalyzed 1,2-Addition of Potassium Aryl- and Alkenyltrifluoroborates to Aldehydes using Thioether-Imidazolium Carbene Ligands” Kuriyama, M.; Shimazawa, R.; Enomoto, T.; Shirai, R. *J. Org. Chem.* **2008**, *73* (17), 6939-6942. (査読有)
- ④ “Design and synthesis of N-alkyl oxindolyidene acetic acids as a new class of potent Cdc25A inhibitors” Shimazawa, R.; Kuriyama, M.; Shirai, R. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (11), 3350-3353. (査

読有)

[学会発表] (計 8 件)

- ① “Palladium-Imidazolium Carbene-Catalyzed Arylation of Aldehydes with Arylboronic Acids in Water” Kuriyama, M.; Ishiyama, N.; Shimazawa, R.; Onomura, O. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Hawaii, USA, 2010/12/15-20
- ② 「C-S 二座型配位子-パラジウム錯体を用いたアルデヒドの触媒的アリール化反応」 栗山正巳, 第 3 回万有若手交流合宿セミナー, 唐津, 2009. 11. 21-22.
- ③ 「C-S 二座型配位子の開発と遷移金属触媒反応への適用」 栗山正巳, 有機合成化学協会九州山口支部 有機合成化学講演会, 長崎, 2009. 11. 20.
- ④ “Efficient Synthesis of Phthalides using Arylation of Aldehydes with Organoboronic Acids Catalyzed by Palladium/Thioether-Imidazolium Chloride System” Kuriyama, M.; Ishiyama, N.; Shimazawa, R.; Shirai, R.; Onomura, O. The 11th International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry, Kyoto, Japan, 2009. 11. 9-13.
- ⑤ 「含窒素複素環カルベンを基盤とする C-S 二座型配位子を用いたパラジウム触媒による有機ホウ素試薬の付加反応と応用」 栗山正巳, 石山夏希, 榎本光伯, 嶋澤るみ子, 白井隆一, 尾野村治, 第 7 回次世代を担う有機化学シンポジウム, 大阪, 2009. 7. 23-24.
- ⑥ 「C-S 二座配位子-パラジウム触媒を用いた有機三フッ化ホウ素塩のアルデヒドへの付加反応」 栗山正巳, 嶋澤るみ子, 榎本光伯, 白井隆一, 第 34 回反応と合成の進歩シンポジウム, 2008.11.4-5.
- ⑦ 「C-S 二座配位子-パラジウム触媒を用いた有機三フッ化ホウ素塩のアルデヒドへの付加反応」 栗山正巳, 嶋澤るみ子, 榎本光伯, 白井隆一, 第 58 回日本薬学会近畿支部大会, 神戸, 2008. 10. 25.
- ⑧ “Efficient 1,2-Addition of Organoboronic Acids to Aldehydes Catalyzed by the

Palladium/Thioether-Imidazolium
Chloride System” Kuriyama, M.;
Shimazawa, R.; Shirai, R. The Fifth
International Symposium on Integrated
Synthesis, Kobe, Japan, 2008. 9. 5-6.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋澤るみ子 (SHIMAZAWA RUMIKO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授
研究者番号：

(2) 研究分担者

栗山 正巳 (KURIYAMA MASAMI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授
研究者番号：40411087

(3) 連携研究者

なし