

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14793

研究課題名(和文)Oscillatoxin Fの細胞株選択性に着目した抗がん剤シーズ開発

研究課題名(英文)Development of a new anti-cancer seed based on the cell-line selective anti-proliferative activity of oscillatoxin F

研究代表者

花木 祐輔(Hanaki, Yusuke)

香川大学・農学部・助教

研究者番号：70897818

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：Oscillatoxin類のがん細胞増殖抑制試験により、A環部分の構造が細胞株選択性の発現に重要であること、分子疎水性度を下げることが活性の向上に繋がることが示唆された。そこで、A環部分に様々な官能基を導入したり、フェノール性水酸基にビオチンなどのタグを導入したりするための新たな合成ルートを考案し、様々なアナログへと変換し得る鍵中間体を効率的に合成した。これらの知見は、A環周辺の構造活性相関を調べて細胞株選択性に優れた誘導体を開発するとともに、標的分子を探索し作用機構を解析するうえで役に立つ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、国内外の複数の研究グループによってシアノバクテリアから数多くのoscillatoxin類縁体が単離され、多様な生物活性を有することが報告されている。本研究では、oscillatoxin類の構造活性相関の一端を明らかにするとともに作用機構を明らかにするための基盤となる結果が得られた。今後、oscillatoxin類のユニークな生物活性の解析に役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was found that oscillatoxin F showed a cell-line selective anti-proliferative activity dependent on the structure of A-ring moiety. In addition, reducing the molecular hydrophobicity was suggested to improve the anti-proliferative activity. We developed a new synthetic route to introduce various functional groups to the A-ring moiety and a biotin-tag to the side chain. These studies may contribute to developing superior anti-tumor analogs and identifying target molecules related to the cell line-selective anti-proliferative activity.

研究分野：生物有機化学

キーワード：Oscillatoxin 抗がん剤 天然物

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Oscillatoxin (OTX) 類は, *Lyngbya* 属, *Oscillatoria* 属などの海洋シアノバクテリアが生産するポリケチド系天然物であり, 現在までに 20 種類以上の類縁化合物が単離されている (図 1). マクロラクトン型の類縁体である OTX-A や aplysiatoxin は細胞内情報伝達の鍵酵素・プロテインキナーゼ C (PKC) を活性化することにより, 発がん促進性や炎症性, 細胞毒性などを示す. また, 副作用となる発がん促進性や炎症性を取り除き, がん細胞増殖抑制活性のみを選択的に残した誘導体が開発されて抗がん剤シーズとして注目されている. 一方, その他の OTX 類にも, 抗白血病作用や, カリウムイオンチャネル阻害活性が見いだされているが, その作用メカニズムや構造活性相関についてはほとんど明らかになっていなかった.

我々の研究グループでは 4 種の OTX 類 (OTX-D, 30-Methyl-OTX-D, OTX-E, OTX-F) の全合成を達成し, がん細胞株および白血病細胞株に対する増殖抑制活性を評価した. その結果, OTX-F が肺がん由来 DMS114 株に対して選択的な増殖抑制活性を示すことが明らかになった (Araki, Y. *et al.*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2021**, *85*, 1371) (図 1). また, 細胞株選択性のプロファイルは既存の抗がん剤のいずれとも異なりユニークな作用機構を有することが示唆された. 従って, OTX-F の活性発現に必要な構造因子や作用機構, 治療効果を予測するマーカーなどを明らかにすれば, 特定のがん患者に対して適用できる副作用が少ない新規抗がん剤シーズとして有望であると考えられた.

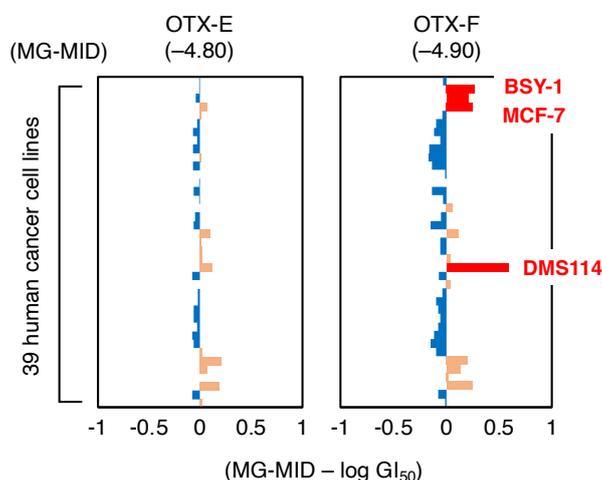
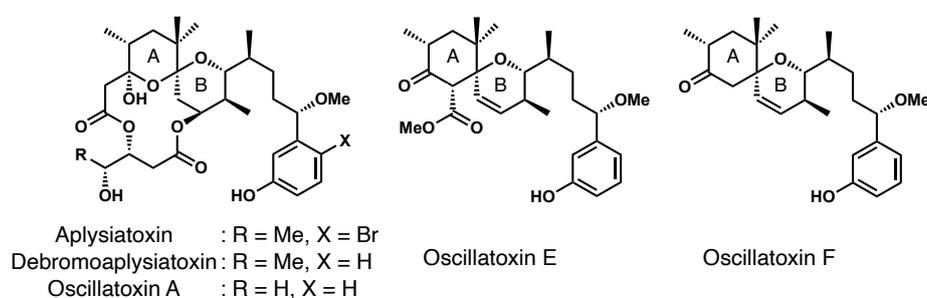


図 1. Oscillatoxin 類の構造および細胞株選択性プロファイル

### 2. 研究の目的

本研究の目的は, OTX-F の細胞株選択的な増殖抑制活性に関わる標的分子を同定することによって作用機構を解明し, 新規抗がん剤シーズを創出することである.

OTX-F の全合成には他段階を要することから, まず OTX 類の構造活性相関の情報をもとに不要な官能基を除去し, 細胞株選択的な増殖抑制活性を保持した単純化アナログを開発することにした. また, 単純化アナログや分子プローブを効率的に合成するために, OTX 類の新規合成経路の確立を目指した.

### 3. 研究の方法

- 1) OTX 類のがん細胞増殖抑制活性における構造活性相関を調べ、単純化アナログを設計するための指針を得る。
- 2) 分子プローブを導入するための新たな合成ルートを開発するとともに、複数の単純化アナログを合成して活性評価を行う。
- 3) 細胞株選択的な増殖抑制活性を示す単純化アナログについて、標的分子の探索と作用機構の解析を行う。

### 4. 研究成果

#### 1) OTX 類の分子プローブ化の検討ならびにがん細胞増殖抑制活性評価

まず、OTX-E ならびに OTX-F のカルボニル基やフェノール性水酸基に対して、エステル交換やウィリアムソンエーテル合成を用いてプロパルギル基を導入することを検討した。しかし、生成物の NMR スペクトルは複雑化しており、目的物に加えて複数の副生成物が含まれていることが示唆された。これらの反応では塩基を用いる必要があるため、不斉メチル基のエピ化などが起こっていると考えられた。以上の結果から、OTX 類へプロパルギル基などの標識タグを直接導入することは難しいと予想された。

そこで次に、不安定な官能基を取り除いた単純化アナログの開発、ならびに合成序盤で標識タグを導入したうえで OTX アナログを供給できる新たな合成ルートの開発を検討することにした。まず、構造単純化やタグの導入位置に関する知見を得るため、OTX 類やその合成中間体のがん細胞増殖抑制活性を調べた。スピロエーテル骨格を持たず側鎖構造のみを有する誘導体の増殖抑制活性は大幅に低下した。従って、少なくとも B 環は活性発現に必要であると予想された。その一方で、A 環構造が最も単純な OTX-F の増殖抑制活性が最も高いこと、スピロエーテル環上の官能基配置が細胞株選択性に大きく影響することが判明した (Hanaki, Y. *et al.*, *Heterocycles* **2021**, *102*, 2353)。

さらに、簡便に作用機構に関する知見を得ることを目的として、様々な培養条件における OTX 類のがん細胞増殖抑制活性を調べた。その結果、OTX-F は血清 (FBS) を含まない培地中では高い増殖抑制活性を示し、血清含有量が多い培地中ではその活性が低下することが分かった (図 2)。また、この傾向は他の OTX 類よりも OTX-F で特に顕著であり、OTX-F は分子疎水性度が高いために血清中に含まれるアルブミンなどに捕捉されやすいものと考えられた (Hanaki, Y. *et al.*, *Fundam. Toxicol. Sci.* **2021**, *8*, 69)。

以上の結果を踏まえ、OTX-F の A 環の官能基を除去または単純化しつつ、水素結合受容性の官能基を適切に配置した新規 OTX アナログを開発することが望ましいと考えた。また、分子プローブを合成する際のタグの導入位置は、細胞株選択性に影響を与えられとされるスピロエーテル環から遠いフェノール性水酸基とすることにした。

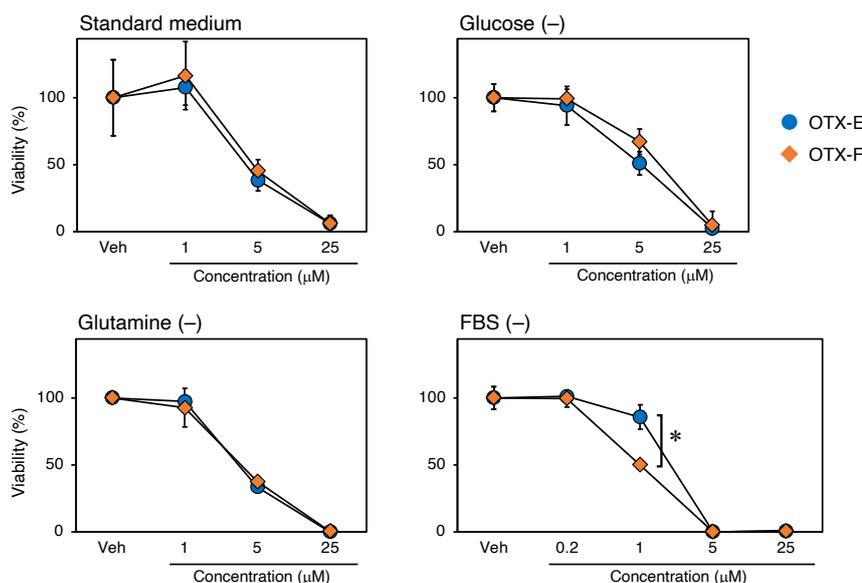


図 2. 培養条件による OTX-E および F の増殖抑制活性の変化

## 2) OTX 単純化アナログの新規合成法の開発

既存の OTX 類の合成経路では、フェノール性水酸基の保護基として脱保護し難いメチル基が採用されていたため標識タグなどの導入が困難であった。本研究では、既知の方法で合成できるユニット **A** および **B** をカップリングさせることで側鎖部分の基本構造を構築した。ユニット **B** は、原料である *m*-ヒドロキシアセトフェノンのフェノール性水酸基の保護基を変更することで任意の標識タグが入った側鎖を合成することも可能と考えられる。さらに、野依不斉水素化反応、Brown 不斉アリルホウ素化反応などを用いて立体選択的に官能基を構築し、既知の鍵中間体を合成することに成功した (図 3)。

同時に、鍵中間体のモデル化合物を用いて AB 環部分の構築法の検討に着手した (図 3 下段)。まず、2 級水酸基をアクリル酸クロライドと反応させエステルを合成した。続いて、第 2 世代 Hoveyda-Grubbs 触媒を用いた閉環メタセシス反応によって **B** 環を構築した。現在、ラク톤のカルボニル基を足がかりとして **A** 環に相当する位置に様々な官能基を導入する方法を検討している。今後はフェノール性水酸基に対してプロパルギル基などのタグを導入した鍵中間体に対して閉環メタセシスと官能基導入を行うことで様々な誘導体やその分子プローブを合成できるものと期待される。

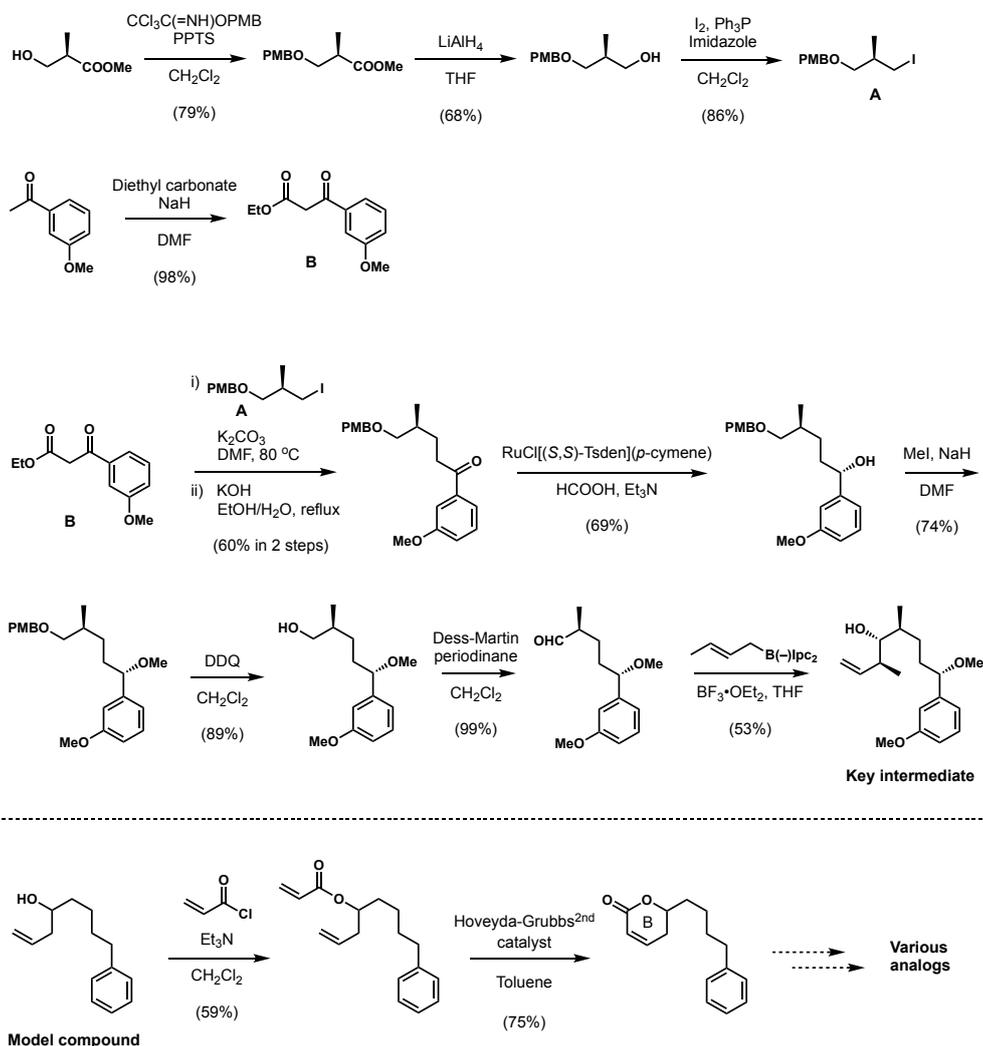


図 3. Oscillatoxin アナログの新規合成経路

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0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 Hanaki Yusuke, Araki Yusuke, Nishikawa Toshio, Yanagita Ryo C.	4. 巻 8
2. 論文標題 Evaluation of the <i>in vitro</i> cytotoxicity of oscillatoxins E and F under nutrient-starvation culture conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 69 ~ 73
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/fts.8.69	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 Hanaki Yusuke, Araki Yusuke, Nishikawa Toshio, C. Yanagita Ryo	4. 巻 102
2. 論文標題 Oscillatoxin E and Its C7 Epimer Show Distinct Growth Inhibition Profiles against Several Cancer Cell Lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 HETEROCYCLES	6. 最初と最後の頁 2353 ~ 2353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3987/com-21-14538	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3件（うち招待講演 1件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yusuke Hanaki
2. 発表標題 Synthesis and Biological Evaluation of Oscillatoxins and Aplysiatoxins
3. 学会等名 1st Trilateral Symposium on SDGs (Chiang Mai University, National Chiayi University, Kagawa University) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 花木 祐輔
2. 発表標題 海洋天然物・oscillatoxin類の合成および構造展開
3. 学会等名 香川大学農学部応用生命化学研究センター 第13回公開シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 波田航平, 新木悠介, 野倉吉彦, 花木祐輔, 中崎敦夫, 西川俊夫
2. 発表標題 アブリシアトキシン・オシラトキシン類縁体の網羅的合成法の開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------