

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590005

研究課題名(和文) グルコサミノグリカン生合成阻害剤としての各種キシロース誘導体の調製

研究課題名(英文) Preparation of various xylose derivatives as glycosaminoglycan biosynthesis inhibitor

研究代表者

纈 守 (KOKETSU, Mamoru)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号：50178208

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、キシロースに疎水性部分を導入した各種GAG生合成阻害剤の開発を検討した。銅を用いたアジドとアルキンとの反応により1,4-二置換-1,2,3-トリアゾール誘導体を合成した。これらが、腫瘍関連血管内皮管形成において有効な阻害剤であることを確認した。

さらに、様々なキシロース誘導体を調製した。ルテニウム錯体を用い1,5-二置換-1,2,3-トリアゾール誘導体を合成した。チオ尿素と臭化プロピンとの反応により1,3-チアゾールをヒドラジンとの反応により1,2,4-トリアゾールをアジ化ナトリウムでは1,2,3,4-テトラゾールをそれぞれ調製した。現在、それらのGAG生合成阻害能の評価を進めている。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the development of various GAG biosynthesis inhibitors introducing hydrophobic moieties into xylose.

The current study demonstrates that fluoro-xylosides are effective inhibitors of endothelial tube formation in vitro using a matrigel based assay to simulate tumor-associated angiogenesis.

In addition, various xylose derivatives were prepared for development of GAG biosynthesis inhibitor. 1,5-D isubstituted-1,2,3-triazole derivatives were synthesized by click chemistry using a ruthenium complex. The reaction of xylose thiourea derivatives with bromide propyne gave 1,3-thiazole derivatives. The reaction with hydrazine gave 1,2,4-triazole derivatives. And the reaction with sodium azide yielded 1,2,3,4-tetrazole derivatives, respectively. Currently, GAG biosynthesis inhibitory ability of these obtained xylose derivatives are carrying out.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：グルコサミノグリカン 阻害剤 キシロース クリックケミストリー

1. 研究開始当初の背景

プロテオグリカンの生合成は、コアタンパク質のセリン残基にキシロースが結合後、グルコース 2 糖とグルクロン酸のコア 4 糖の形成がおこる (図 1)。

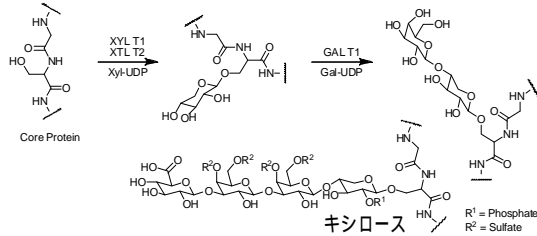


図 1. プロテオグリカンの 4 糖コア構造の生合成経路

キシロースが糖鎖伸長の起爆剤であるともいわれている。コア 4 糖形成後、直鎖の 2 糖繰り返し構造グリコサミノグリカン (GAG) 鎖が伸長し高分子多糖タンパク質のプロテオグリカンとなる。極めて多種類の構造が存在し、その構造の多様性が GAG 鎖の多様な生物学的機能に対応している。これら GAG 鎖は種々の機能性タンパク質と相互作用することにより、タンパク質の機能発現の調節に関わっている。GAG 鎖の生物学的役割を解明するためにそれらの生合成阻害剤の開発が求められている。これまで塩素酸塩やプレフェルディン A などが用いられたが高濃度でしか活性を示さないため毒性の発現や選択的な生合成阻害が不可能などの問題があった。

近年我々は、コア 4 糖の根元のキシロースに着目しいくつかのキシロース誘導体を調製し GAG 鎖生合成阻害能を確認したところ毒性なく低濃度で特異的に活性を示す化合物を得た (*J. Biol. Chem.*, 2008, **283**, 28881, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 7269)。これまでのところキシロース誘導体のみではなくガラクトースの結合すべきキシロースの 4 位をフッ素でキャップした誘導体も有効な候補化合物であることを確認した (図 2)。

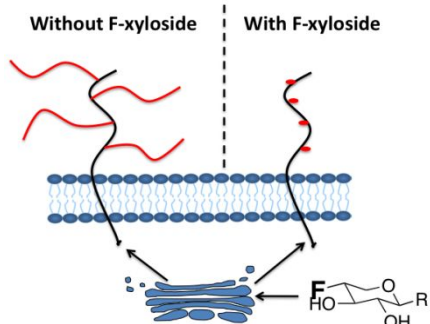


図 2 キシロース誘導体によるグリコサミノグリカン (GAG) 生合成阻害

これら阻害剤にはキシロースのアノマー位の疎水性部分が重要であることからクリックケミストリーすなわちアジドとアルキンによる環化反応で 1,2,3-トリアゾールを導入した。さらに詳細に各種キシロース誘導体を調製し GAG 生合成阻害活性物質の探索を進める必要があった。

2. 研究の目的

グリコサミノグリカン (GAG) 鎖の生物学的役割を解明するため、キシロースに疎水性部分を導入した各種 GAG 生合成阻害剤の開発を行う。キシロースのアノマー位に銅 () およびルテニウム錯体を用いたクリックケミストリーによるトリアゾール誘導体や含硫黄ヘテロ環を導入した新しいタイプの GAG 鎖生合成阻害剤を開発し GAG 鎖の生物学的役割を解明する。

3. 研究の方法

GAG 鎖生合成阻害能を示す阻害剤にはキシロースのアノマー位の疎水性部分が重要であることからクリックケミストリーすなわちアジドとアルキンによる環化反応でアノマー位に 1,2,3 - トリアゾール誘導体を導入した。銅 () を用いたクリックケミストリーによりアノマー位に 1,4-二置換 - 1,2,3 - トリアゾール誘導体を合成した。一方、ルテニウム錯体を用いたクリックケミストリーにより 1,5-二置換 - 1,2,3 - トリアゾール誘導体を合成した。さらに、キシロースのアノマー位にチオ尿素を導入しアジ化ナトリウムやギ酸ヒドラジンと反応させ 1,2,3,4 - テトラゾール及び 1,3,4 - トリアゾール誘導体を導入した。

4. 研究成果

グリコサミノグリカン (GAG) の一種であるヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPG) は、腫瘍関連血管新生のいくつかのステップで重要な役割を果たしている。例えば、VEGF や線維芽細胞増殖因子 (FGF) などのいくつかの血管新生促進因子のための補助受容体として、HSPG は、受容体 - リガンド相互作用を調節し、シグナル伝達に不可欠な役割を果たしている。

我々は、GAG 鎖生合成阻害能を示す阻害剤にはキシロースのアノマー位の疎水性部分が重要であることからクリックケミストリーを用いてフッ化キシロースのアノマー位に 1,2,3 - トリアゾール誘導体を導入した様々な誘導体 (図 3) を調製した。 (*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**, 7269-7273)

本研究では、選択的に内皮細胞におけるプロテオグリカン合成を阻害することができるいくつかのフッ化キシロース誘導体を明らかにした。これらのフッ化キシロース誘導

体が、腫瘍関連血管形成をシミュレートする評価系を用いたインビトロでの内皮管形成において有効な阻害剤であることを確認した。これらの成果は、腫瘍の増殖を効果的に調整することができるより強力な化合物であることを示唆した。(*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2011, **404**, 86-89)

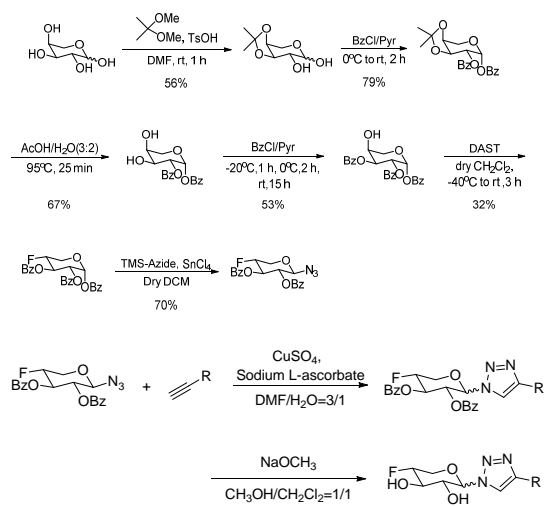
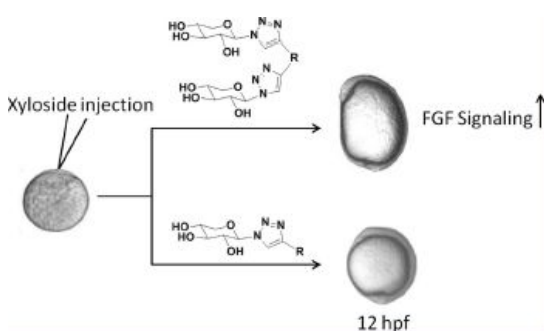


図3 クリックケミストリーを用いた
1,2,3 - トリアゾール誘導体の調製

プロテオグリカン (PG 類) は、線維芽細胞増殖因子 (FGF) を含む様々なシグナル伝達分子にグリコサミノグリカン (GAG) 側鎖を結合することにより伸長時に様々なシグナル伝達経路を調節する。PG の多くは二つ以上の GAG 側鎖を有し、その GAG の多価性は、*in vivo* での生物学的機能のために不可欠であり、その多価性の生物学的意義が報告されている。



本研究では、PG 類を模倣し、ビス - およびトリス - キシロシドのライブラリを調製しゼブラフィッシュを用い FGF / FGFR 相互作用の調節に関して検討した。いくつかのビス - およびトリス - キシロシドの胚への注入により、伸長を引き起こした。伸長した胚

は FGF 標的遺伝子 *mkp3* の発現が上昇しているが、他の経路のレポーターの発現を変化させなかった。FGF / FGFR シグナリングが特異的に過剰に活性化されたことを示していた。これらの現象から伸長は、チロシンキナーゼ阻害剤 SU5402、FGFR アンタゴニスト *sprouty4* もしくは FGF8 のモルホリノの mRNA により逆転させられることができることを確認した。内因性の GAG は、キシロース処理後に影響を受けず、これは機能獲得型の表現型であることを示唆し、さらに、シンデカン - 1 プロテオグリカンを含む一価の GAG ではなく多価の発現が、二価のキシロースで観察された伸長表現型を再現している。これらの *in vivo* での知見から、二量化した GAG 鎖が、FGF 媒介シグナル伝達経路を活性化することができる GAG / FGF / FGFR 相互作用のための新しいモデルであることを確認した。(*ACS Chemical Biology*, 2013, **8**, 939-948)

さらに、GAG 鎖生合成阻害能を期待して様々なキシロース誘導体を調製した。クリックケミストリーにおいて、銅 () を用いることにより 1,4-二置換体トリアゾール誘導体を合成し、一方、ルテニウム錯体を用いた反応により 1,5-二置換体トリアゾール誘導体を合成した。(図 4)

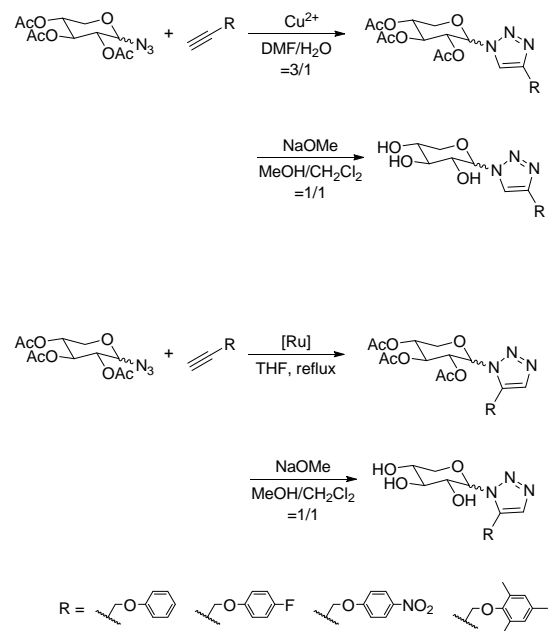


図4 銅とルテニウムを用いたクリックケミストリーで調製した 1,2,3 - トリアゾール誘導体

次に、キシロースのアノマー位にチオ尿素を導入した原料からヘテロ環を導入する方法を検討した。塩基性条件下イソチオシアナートとアミンとの反応により各種チオ尿素をキシロースのアノマー位に導入した。

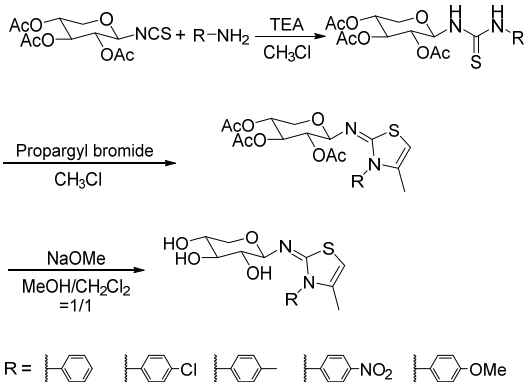


図5 チオ尿素と臭化プロピンの反応を用いた
1,3 - チアゾール誘導体の調製

その後、臭化プロピンとの反応により各種

1,3 - チアゾール誘導体を調製した。(図5)

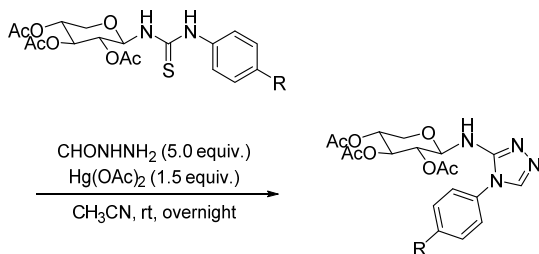


図6 チオ尿素とヒドラジンの反応による
1,2,4 - トリアゾール誘導体の調製

さらに、アノマー位にチオ尿素を導入した
キシロースとヒドラジンの反応により各
種 1,2,4 - テトラゾール誘導体を調製した。

(図6)

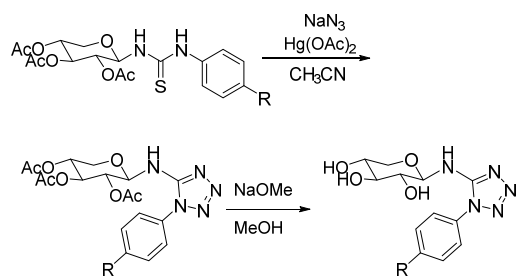


図7 チオ尿素とアジ化ナトリウムとの反応
による 1,2,3,4 - テトラゾール誘導体の調製

また、キシロースのチオ尿素誘導体とアジ
化ナトリウムとの反応により各種 1,2,3,4 -
テトラゾール誘導体を調製した。(図7)

このように調製した各種キシロース誘導
体は、現在、GAG 生合成阻害能の評価を進
めている。

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 2件)

Dimerized glycosaminoglycan chains
increase FGF signaling during zebrafish
development (T. K. N. Nguyen, Vy M. Tran,
V. Sorna, I. Eriksson, A. Kojima, M.
Koketsu, D. Loganathan, L. Kjellén, R. I.
Dorsky, C.-B. Chien, and B. Kuberan) *ACS
Chemical Biology*, 8, 939-948 (2013). 査読
有

DOI: 10.1021/cb400132r

Novel glycosaminoglycan biosynthetic
inhibitors affect tumor-associated
angiogenesis (K. Raman, M. Ninomiya, T.
K. N. Nguyen, Y. Tsuzuki, M. Koketsu, and
B. Kuberan) *Biochem. Biophys. Res.
Commun.*, 404, 86-89 (2011). 査読有

DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.11.069

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www1.gifu-u.ac.jp/~ms2/flame_j.htm

6. 研究組織

(1)研究代表者

纈纈 守 (KOKETSU MAMORU)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号： 50178208