

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659051

研究課題名(和文) ビタミンKの新しい機能解明を志向した医薬化学研究

研究課題名(英文) Development of novel vitamin K derivatives and elucidation of their biological functions

研究代表者

影近 弘之 (Kagechika, Hiroyuki)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授

研究者番号：20177348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ビタミンK(VK)が核内受容体リガンドとして機能することや、腫瘍細胞の増殖抑制作用が明らかになる等、多彩な生理作用を持つことが示されてきた。本研究では、VKの新しい生理作用解明と医薬開発への応用基盤構築を目的として、新規VK誘導体の創製を行った。特に、VKの側鎖上の代謝的変換を想定して、側鎖の酸化誘導体の合成法を検討した。その結果、VKの代謝物とされるK acid I及びK acid IIの合成、側鎖長の異なる種々のVK側鎖酸化体の系統的合成に成功した。合成したVK酸化誘導体について生物活性評価を行った結果、癌細胞増殖に対する抑制効果、抗炎症効果を有する誘導体を見いだした。

研究成果の概要(英文)：Recently, novel biological properties of vitamin K, including function as some nuclear receptor ligand and inhibitory activity of cancer cell proliferation. In this study, we examined to develop novel vitamin K derivatives in order to clarify the detailed biological functions of vitamin K and to apply them to clinical utility. Based on our hypothesis that vitamin K (menaquinones) would be metabolized to yield an active substance for some vitamin K functions, we designed the derivatives bearing a polar functional group at the terminal of the side chain. As a result, we developed the efficient synthetic method for vitamin K metabolites, K acid I and II, and synthesized systematically the oxidative derivatives of vitamin K with various length of the side chain. Some of these novel derivatives inhibited the proliferation of some cancer cells in vitro, and showed anti-inflammatory effects in vivo.

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：ビタミンK メナキノン 酸化誘導体 癌細胞 増殖抑制 抗炎症効果

1. 研究開始当初の背景

ビタミン K (VK) は、従来骨組織や血管内皮細胞の石灰化などに関わるビタミンと捉えられてきた。一方、申請者らが研究してきたビタミン A やビタミン D の場合、生体内で代謝活性化を受け、核内受容体リガンドとして機能するホルモン作用が明らかにされ、それを基盤とした医薬化学展開がなされている。同じく脂溶性ビタミンに分類される VK も、既存の生理作用以外に、このような特異的作用を有する可能性を示唆する以下のような興味深い報告がされている。

(1) メナキノン-4 (MK-4) がオーフアン核内受容体 SXR (steroid and xenobiotic receptor) のリガンドとして作用することが示された。SXR リガンドとしての機能は未解明ではあるが、これまで補酵素として認識されていた VK が、ビタミン A やビタミン D と同様に、核内受容体を介して直接的に遺伝子発現制御に関与することが示された。

(2) MK-4 が肝癌細胞の増殖を抑制することが示されたが、詳細な作用機構は明らかにされていない。

(3) 生理的には存在しないと考えられてきたビタミン K₃ (VK₃) が天然型 VK から生体内で生成するという報告があり、VK の種々の生理作用を考察するうえで非常に興味深い知見である。

2. 研究の目的

以上のように VK の新しい機能に関する種々の報告がなされた一方で、その詳細は未解明である。本研究では、申請者のビタミン A、D 研究の手法を応用して VK の新しい医薬化学研究を展開し、従来理解されてきた VK の生理作用とは異なる生物作用の解明と医薬開発への応用基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

VK の新規誘導体創製と新規生物作用の解明に関して、具体的には以下の項目を行う。

(1) VK 類で高い生理活性を有する MK-4 の側鎖異性体や代謝物が活性本体であるとの仮説に基づき、側鎖の酸化誘導体の合成法を確立し、各種誘導体を合成する。

(2) 物性向上や多彩な構造展開を意図し、天然 VK の骨格とは異なる骨格を有する誘導体を創製する。

4. 研究成果

(1) VK の側鎖の酸化誘導体の合成
MK-4 の代謝経路としては、接種した MK-4 が K acid II として排泄されるまでに、酸化および段階的な酸化を受けると推測される。そこで Figure 1 に示す化合物群の合成を行った。

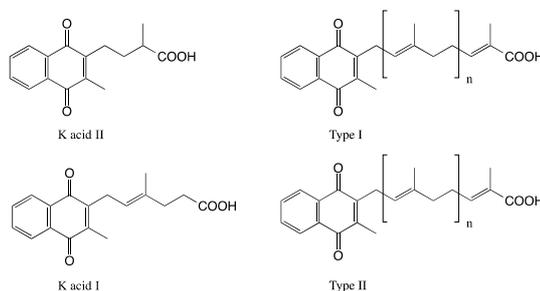
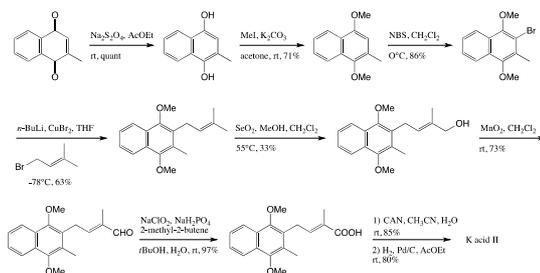


Figure 1. Target molecules

(a) K acid II の合成

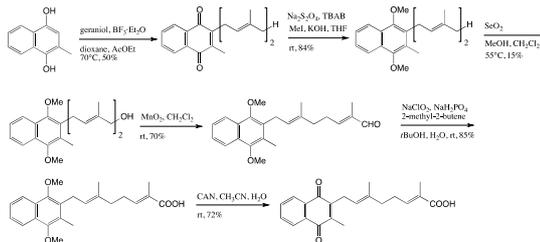
Scheme 1 に従って、市販の 2-メチル-1,4-ナフトキノンより 9 工程で K acid II を合成する方法を確立した。



Scheme 1. Synthetic scheme for K acid II

(b) Type I 化合物 (Figure 1) の合成

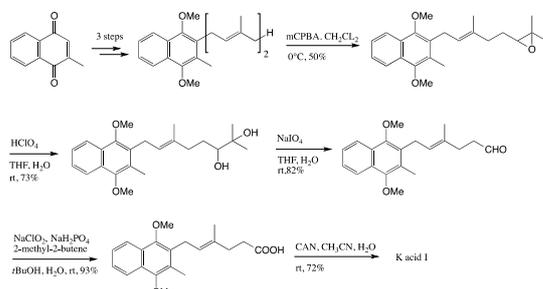
K acid II の合成法をもとに、Figure 1 の Type I 化合物の合成を行った。まずは n = 1 の合成を試みた。種々条件検討の結果、Scheme 2 に示す方法で合成することができた。本方法と同様の合成方法により、Type I 化合物 (n = 2 および n = 3) を合成した。



Scheme 2. Synthetic scheme for Type I molecule (n = 1)

(c) K acid I の合成

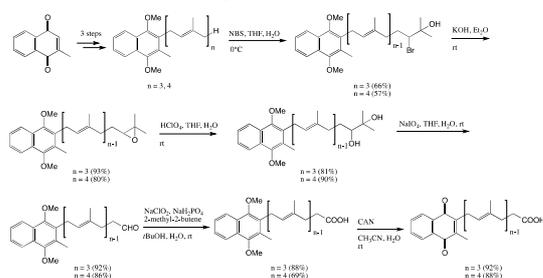
MK-4 の酸化的代謝経路において、K acid I は最終産物である K acid II の一段階前の代謝物であり、単離、同定の報告はあるものの、合成例はない。そこで、K acid I の合成方法を種々検討した結果、市販の 2-メチル-1,4-ナフトキノンより 8 工程で K acid I を合成する方法を確立した (Scheme 3)。



Scheme 3. Synthetic scheme for K acid I

(d) Type II 化合物 (Figure 1) の合成

K acid I の合成法をもとに、Figure 1 の Type II 化合物の合成を行った (Scheme 4) ーただし、長い側鎖を持つ化合物では、mCPBA による末端のエポキシ化がうまく進行しなかったため、オレフィンからプロモヒドリンを経由する方法を用いた。



Scheme 4. Synthetic scheme for Type II molecules

(3) 天然 VK とは異なる骨格を有する化合物の合成

多彩なビタミン K 作用の分離を目的に、ナフトキノンと側鎖構造からなる骨格の変換を試みた。具体的には、側鎖の二重結合をアミド結合に代替した化合物を合成した (Figure 2)。

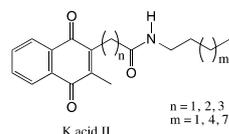


Figure 2. Structure of amide-containing VK analogs

(4) 生物活性

上記で合成した化合物を用いて、各種がん細胞に対する増殖抑制効果を検討した。その結果、幾つかの側鎖酸化誘導体に増殖抑制効果が認められた。また、炎症モデルマウスに対する効果を検討した結果、抗炎症効果を示す側鎖酸化誘導体を見いだした。

以上のように、ビタミン K の新規誘導体として、側鎖酸化体の系統的な合成と、アミド結合を有する化合物を合成し、その生物活性を明らかとした。本化合物はビタミン K の昨日解明の結うようなツール及び医薬応用へのリード化合物となると考えている。

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 12 件)

- 1) Fujii, S.; Kano, A.; Songkram, C.; Masuno, H.; Tao da, Y.; Kawachi, E.; Hirano, T.; Tanatani, A.; Kagechika, H. Synthesis and structure-activity relationship of *p*-carborane-based non-secosteroidal vitamin D analogs. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 1227-1235. DOI: 10.1016/j.bmc.2014.01.015, 査読あり
- 2) Yamada, A.; Fujii, S.; Mori, S.; Kagechika, H. Design and synthesis of 4-(4-benzoylaminophenoxy)phenol derivatives as androgen receptor antagonists. *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 937-941. DOI: 10.1021/ml4001744, 査読あり
- 3) Sagara, C.; Takahashi, K.; Kagechika, H.; Takahashi, N. Molecular mechanism of 9-*cis*-retinoic acid inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *433*, 102-107. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.02.057, 査読あり
- 4) Fujii, S.; Miyajima, Y.; Masuno, H.; Kagechika, H. Increased Hydrophobicity and Estrogenic Activity of Simple Phenols with Silicon and Germanium-Containing Substituents. *J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 160-166. DOI: 10.1021/jm3013757, 査読あり
- 5) Ohta, K.; Kawachi, E.; Shudo, K.; Kagechika, H. Structure-activity relationship study on benzoic acid part of diphenylamine-based retinoids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 81-84. DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.11.008, 査読あり
- 6) Fujii, S.; Ohta, K.; Goto, T.; Oda, A.; Masuno, H.; Endo, Y.; Kagechika, H. Development of androgen receptor ligands by application of ten-vertex para-carborane as a novel hydrophobic core structure. *Med. Chem. Commun.*, 2012, *3*, 680-684. DOI: 10.1039/c2md00294a, 査読あり
- 7) Ayaori, M.; Yakushiji, E.; Ogura, M.; Nakaya, K.; Hisada, T.; Uto-Kondo, H.; Takiguchi, S.; Terao, Y.; Sasaki, M.; Komatsu, T.; Iizuka, M.; Yogo, M.; Uehara, Y.; Kagechika, H.; Nakanishi, T.; Ikewaki, K. Retinoic acid receptor agonists regulate expression of ATP-binding cassette transporter G1 in macrophages. *Biochim. Biophys. Acta- Mol Cell Biol. Lipids* **2012**, *1821*, 561-572. DOI: 10.1016/j.bbalip.2012.02.004, 査読あり
- 8) Fujii, S.; Masuno, H.; Taoda, H.; Kano, A.; Wongmayura, A.; Nakabayashi, M.; Ito, N.; Shimizu, M.; Kawachi, E.; Hirano, T.; Endo, Y.; Tanatani, A.; Kagechika, H. Boron Cluster-based Development of Potent

- Non-Secosteroidal Vitamin D Receptor Ligands: Direct Observation of Hydrophobic Interaction between Protein Surface and Carborane. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 20933-20941. DOI: 10.1021/ja208797n, 査読あり
- 9) Sakai, H.; Hirano, T.; Mori, S.; Fujii, S.; Masuno, H.; Kinoshita, M.; Kagechika, H.; Tanatani, A. 6-Arylcoumarins as novel nonsteroidal type progesterone antagonists: An example with receptor-binding-dependent fluorescence. *J. Med. Chem.*, **2011**, *54*, 7055-7065. DOI: 10.1021/jm2005404, 査読あり
 - 10) Fujii, S.; Yamada, A.; Tomita, K.; Nagano, M.; Goto, T.; Ohta, K.; Harayama, T.; Endo, Y.; Kagechika, H. p-Carborane-based androgen antagonists active in LNCaP cells with a mutated androgen receptor. *Med. Chem. Commun.*, **2011**, *2*, 877-890. DOI: 10.1039/c1md00001b, 査読あり
 - 11) Iwashita, M.; Fujii, S.; Ito, S.; Hirano, T.; Kagechika, H. Efficient and diversity-oriented total synthesis of Riccardin C and application to develop novel macrolactam derivatives. *Tetrahedron*, **2011**, *67*, 6073-6082. DOI: 10.1016/j.tet.2011.06.018, 査読あり
 - 12) Ohta, K.; Kawachi, E.; Fukasawa, H.; Shudo, K.; Kagechika, H. Diphenylamine-based Retinoid Antagonists: Regulation of RAR and RXR Function Depending on the N-Substituent. *Bioorg. Med. Chem.*, **2011**, *19*, 2501-2507. DOI: 10.1016/j.bmc.2011.03.026, 査読あり
- 〔学会発表〕(計 26 件)
- 1) 八田健司, 河内恵美子, 増野弘幸, 藤井晋也, 影近弘之. カルボランを基盤とした新規ビタミンD誘導体の創製. 日本薬学会第 134 年会, 熊本, 2014 年 3 月 27~30 日.
 - 2) 古賀瞳, 木下満里絵, 藤井晋也, 影近弘之, 棚谷綾. クマリン骨格を基盤とした新規アンドロゲン受容体アンタゴニストの創製. 日本薬学会第 134 年会, 熊本, 2014 年 3 月 27~30 日.
 - 3) 影近弘之, 藤井晋也, 増野弘幸. ホウ素クラスターを基盤としたビタミンDの構造展開. 第 341 回脂溶性ビタミン総合研究委員会, 奈良, 2013 年 12 月 6 日.
 - 4) 数井優子, 山田歩, 藤井晋也, 影近弘之, 棚谷綾. アンドロゲン受容体アンタゴニスト活性を有する新規フェノキシフェノール誘導体の構造活性相関. 第 31 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 広島, 2013 年 11 月 20~22 日.
 - 5) 森修一, 竹内由起, 中野英一, 藤井晋也, 棚谷綾, 影近弘之. 疎水性球状分子を骨格とする新規プロゲステロン受容体アンタゴニストの創製. 第 31 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 広島, 2013 年 11 月 20~22 日.
 - 6) Kagechika, H. D Development of novel synthetic retinoids and their biological functions. 1st International Retinoids Meeting 2013, Italy, 11-14 Sep. 2013.
 - 7) 藤井晋也, 山田歩, 森修一, 影近弘之. クルクミンの構造要素を基盤とした新規アンドロゲン受容体アンタゴニストの創製. 第 24 回日本レチノイド研究会学術集会, 東京, 2013 年 8 月 30, 31 日.
 - 8) Masuno, H., Miyajima, Y., Fujii, S., Kagechika, H. Development of Novel Estrogen Receptor Agonists Based on Silicon- and Germanium-Containing Hydrophobic Functionalities. The 2nd HD Physiology International Symposium on Multi-Level Systems Biology, Tokyo, 28-29 June 2013.
 - 9) Fujii, S., Miyajima, Y., Masuno, H., Kagechika, H. Increased hydrophobicity and estrogenic activity of silicon- and germanium-containing phenols. 14th Tetrahedron Symposium, Vienna, Austria, 25-28 June 2013.
 - 10) 藤井晋也, 山田歩, 森修一, 影近弘之. 新規ファーマコフォアの構築に基づくアンドロゲン受容体パンアンタゴニストの創製. ケミカルバイオロジー学会第 8 回年会, 東京, 2013 年 6 月 19~21 日.
 - 11) 藤井晋也, Angsuma Wongmayura, 増野弘幸, 伊藤茂, 加納敦, 河内恵美子, 棚谷綾, 影近弘之. 球状疎水性ファーマコフォアを有する非セコステロイド型VDRリガンドの構造活性相関. 日本ビタミン学会第 65 回大会, 東京, 2013 年 5 月 17, 28 日.
 - 12) 清水章貴, 藤井晋也, 影近弘之. ビタミンK酸化誘導体の系統的合成とその生理活性. 日本薬学会第 133 年会, 横浜, 2013 年 3 月 27~30 日.
 - 13) Hirano, T., Fujii, S., Mori, S., Tanatani, A., Kagechika, H. Development of Various Functional Molecules Based on Hydrophobic and Fluorescent Scaffolds. The 1st Official Conference of the International Chemical Biology Society (ICBS2012), Boston, USA, 4-5 Oct. 2012.
 - 14) Fujii, S., Miyajima, Y., Masuno, H., Kagechika, H. Hydrophobic parameters, substituent constants and estrogenic activities of silyl- and germyl-containing phenols. Int Symp Med Chem, Berlin, 2-6 Sep. 2012.
 - 15) Masuno, H., Fujii, S., Wongmayura, A., Ito, S., Kawachi, E., Tanatani, A., Kagechika, H. Design and Synthesis of Novel VDR Ligand having A Spherical Hydrophobic Structure. Vitamin D Workshop, Houston, USA, 19-22

- June, 2012.
- 16) 藤井晋也, 宮島友, 増野弘幸, 影近弘之 .
トリアルキルシリルおよびゲルミル基の
性質と生理活性物質の疎水性構造への応
用 . ケミカルバイオロジー学会第 7 回年
会, 京都, 2012 年 6 月 7~9 日 .
 - 17) 山田歩, 藤井晋也, 影近弘之 . クルクミ
ンの構造要素を基盤とした新規 AR アン
タゴニストの創製 . 日本薬学会第 132 年
会, 札幌, 2012 年 3 月 28~31 日 .
 - 18) Kagechika, H. Development of Nuclear
Receptor Ligands and Their CLinical
Application. The 5th International
Symposium for Future Technology Creating
Better Human Health and Society, Okayama,
15-16 Mar. 2012.
 - 19) Fujii, S., Yamada, A., Ohta, K., Endo, Y.,
Kagechika, H. Development of Nuclear
Receptor Ligands Based on Carborane as
Hydrophobic Core Structure. The 1st HD
Physiology International Symposium:
Integrative Multi-level Systems, Tokyo,
19-21 Jan. 2012.
 - 20) Masuno, H., Fujii, S., Kawach, E.,
Kagechika, H. Development of novel RXR
ligands bearing tralkylsilyl or trialkylgermyl
groups. The 1st HD Physiology International
Symposium: Integrative Multi-level Systems,
Tokyo, 19-21 Jan. 2012.
 - 21) Yamada, A., Fujii, S., Tomita, K., Nagano,
M., Harayama, T., Ohta, K., Endo, Y.,
Kagechika, H. Development of Novel AR
Antagonists Active in LNCaP Cells with
Mutated Androgen Receptor. AIMECS11,
Tokyo, 29 Nov.-2 Dec. 2011.
 - 22) Masuno, H., Fujii, S., Miyajima, Y., Kawachi,
E., Kagechika, H. Development of Silicon-
and Germanium-containing Ligands for
Nuclear Receptors. AIMECS11, Tokyo, 29
Nov.-2 Dec. 2011.
 - 23) Yamada, A., Fujii, S., Tomita, K., Nagano,
M., Harayama, T., Ohta, K., Endo, Y.,
Kagechika, H. Development of novel
carborane-based androgen receptor
antagonists effective for mutated receptor.
IME Boron XIV, Niagara Falls, Canada,
11-15 Sep. 2011.
 - 24) Fujii, S., Masuno, H., Nakabayashi, M.,
Hirano, T., Kawachi, E., Ito, N., Kagechika,
H. Development and structural basis of novel
non-secosteroidal VDR ligands based on
hydrophobic carborane cage. IME Boron
XIV, Niagara Falls, Canada, 11-15 Sep.
2011.
 - 25) 影近弘之 . レチノイド X 受容体の新規リ
ガンドの創製 . 第 331 回脂溶性ビタミン
総合研究委員会, 名古屋, 2011 年 7 月 8
日 .
 - 26) 増野弘幸, 藤井晋也, 前田満将, 前田貴
志, 平野智也, 河内恵美子, 影近弘之 .

ケイ素およびゲルマニウムを持つレチノ
イド X 受容体 (RXR) リガンドの開発 .
ビタミン学会第 63 回大会, 広島, 2011
年 6 月 4、5 日 .

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称: 新規アンドロゲン受容体アンタゴニス
ト

発明者: 影近弘之

権利者: 影近弘之

種類: 特許

番号: 特願 2012-043959

出願年月日: 2012 年 02 月 29 日

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/omc/index1.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

影近 弘之 (KAGECHIKA, Hiroyuki)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究
所・教授

研究者番号: 20177348

(2) 研究分担者: なし

(3) 連携研究者

藤井 晋也 (FUJII, Shinya)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究
所・助教

研究者番号: 60389179