

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780117

研究課題名(和文) 希少糖をリードとした新規抗がん剤の開発および作用機構の解析

研究課題名(英文) Development and mechanism of action of rare sugar derivatives with antiproliferative effect

研究代表者

柳田 亮 (Yanagita, Ryo)

香川大学・農学部・助教

研究者番号：10598121

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、がん細胞増殖抑制活性を示す希少糖の一種であるD-alloseの構造修飾、活性異性体構造の解明による高活性誘導体の開発、分子プローブ化による作用機構の解析を目的とした。

まず、D-alloseのC-6位水酸基の構造修飾を検討し、C-6位水酸基を中鎖脂肪酸エステルとすることでヒト白血病細胞株に対する活性が最大約30倍向上することを明らかにした。次に、環構造を制限した誘導体の活性評価から、6員環構造が活性に主に寄与していることを明らかにした。また、分子プローブの基盤となる膜透過性単糖プロドラッグの合成に成功した。

研究成果の概要(英文)：The objectives of this project is to develop superior derivatives of D-allose, a rare sugar showing antiproliferative effect against human cancer cell lines, and molecular probes for an analysis of its mechanism of action.

First, we examined the modification for the C-6 OH group of D-allose and found that D-allose C-6 ester with medium chain fatty acids showed about 30 times higher effect compared to D-allose against human leukemia MOLT-4F cell line.

Then, we evaluated the activity of D-allose derivatives with 5-membered furanose form, and found that 6-membered pyranose form might be important for the activity of D-allose esters. Finally, we synthesized cell-permeable prodrugs for monosaccharide 6-phosphate, which could be a lead for molecular probes for an analysis of the mechanism of action.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、生物生産化学・生物有機化学

キーワード：がん 白血病 希少糖 D-allose

1. 研究開始当初の背景

先進国において、がんは死因別死亡率の第1位を占めている。従来のがん治療薬としては、微小管の重合を促進する paclitaxel (taxol) 等のように、細胞分裂を直接阻害するものが主流だったが、近年、慢性骨髄性白血病 (CML) 治療薬の imatinib (glivec) や、肺がんに対する抗体医薬 trastuzumab (herceptin) などの分子標的薬が成功を取っている。一方で、分子標的薬が適応可能ながんの種類は未だ少なく、新規作用機序を持つ抗がん剤の開発が強く望まれている。

天然に稀にしか存在しない希少糖は、D-glucose や D-fructose など一般的な単糖には見られない様々な生理活性を示すことから、近年注目されている。その中でも、D-glucose, D-fructose の3位エピマーである D-allose (図1), D-psicose に顕著な生物活性が見出されている。特に D-allose は前立腺がん、肝がん、卵巣がん、白血病細胞に対して増殖抑制活性を示す一方、正常細胞に対しては全く細胞毒性を示さないため、副作用の少ない抗がん剤シードとして期待されている。D-Allose はその他に、血管新生阻害、糖尿病抑制、植物成長調節作用、線虫成長抑制活性を示すことが明らかにされている。

新奇抗がん剤として有望な活性を示す一方、D-allose の作用機構に関してはほとんど明らかにされておらず、標的分子についての知見も得られていない。また、様々なアッセイ系における D-allose の有効濃度は 1~100 mM と比較的高く、更なる応用のためには絶対的な活性を向上させる必要がある。

2. 研究の目的

最近、香川大学の川浪らは、親水性の高い D-allose の6位ヒドロキシル基をアシル化して疎水性基を導入することで、D-allose の植物生長抑制活性が上昇することを報告しており、同様の修飾法がその他の生物活性の場合においても適用可能であると考えられる。また、D-allose は水溶液中で、4種類の異性体の平衡混合物として存在しているが、どの異性体が活性に寄与しているかも不明である。本研究は、D-allose の構造修飾、活性異性体構造の解明による高活性誘導体の開発、作用機構の解析のための分子プローブの開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) D-Allose の C-6 位水酸基の構造修飾と生物活性評価

固定化リパーゼを用いた位置選択的アシル化によって D-allose の C-6 位を選択的に中鎖脂肪酸エステル (図1) とした。合成した誘導体のがん細胞増殖抑制活性をヒト T 細胞性白血病細胞株 MOLT-4F に対する増殖抑制試験で評価した。生細胞数の定量には Cell counting kit 8 を用いた。

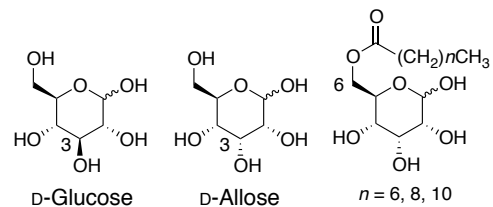


図1 D-Glucose, D-allose, および D-allose 中鎖脂肪酸エステルの構造。

(2) フラノース制限型 D-allose 中鎖脂肪酸エステル誘導体の合成と生物活性評価

D-Glucose は水溶液中で α -pyranose 型ならびに β -pyranose 型として存在するが、D-allose は、 α/β -pyranose/furanose の4種類の異性体の平衡混合物として存在する。そこで、D-allose 中鎖脂肪酸エステルのどの異性体構造が活性に寄与しているかを明らかにするため、C-5 位水酸基をデオキシ化あるいはメチル化した誘導体 (図2) を市販の D-allose 保護体を出発原料として合成した。フラノース型 D-allose は RNA を構成する D-ribose と同様の立体配置を有する。そこで、固定化リパーゼを用いて D-ribose のマイナー異性体の C-5 位水酸基を選択的にアシル化することで、D-ribose 中鎖脂肪酸エステルを得た。さらに、D-allose の C-1 位をメチルアセタール化することで環構造をフラノース型に固定した誘導体を合成した。合成した各種誘導体のがん細胞増殖抑制活性は (1) と同様に MOLT-4F 細胞増殖試験によって評価した。

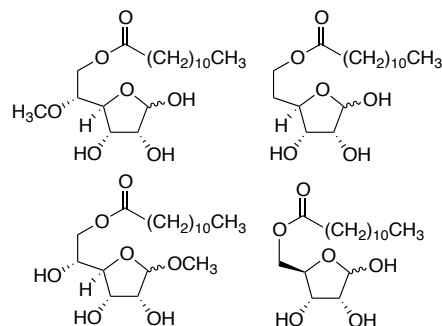


図2 フラノース制限型 D-allose 中鎖脂肪酸エステル誘導体および D-ribose 中鎖脂肪酸エステルの構造。

(3) 膜透過性 D-allose-6-phosphate 誘導体の設計と合成

D-Allose はグルコーストランスポーターによって細胞内へ取り込まれた後、ヘキソキナーゼによって C-6 位水酸基がリン酸化されるが、最近、転写因子 MondoA による D-allose-6-phosphate の感知、がん抑制遺伝子 TXNIP (Thioredoxin-interacting protein) の MondoA による発現上昇が D-allose のがん細胞増殖抑制活性に重要であることが明らかにされた。したがって、活性本体と考えられる D-allose-6-phosphate に膜透過性を付与しプロドラッグ化することで、D-allose の活性の大幅な向上が期待できる。

そこで、D-allose-6-phosphate のリン酸基を細胞内で酵素による切断を受ける疎水性基で保護したプロドラッグの設計と合成を行った。リン酸部位の疎水性保護基には phenyl, S-acyl thioethyl (mixed-SATE) 基 (図 3), diphenyl 基を選択した。また、目的化合物の分子疎水性度を調節するため、糖部位の水酸基は全てアセチル化した誘導体についても合成した。

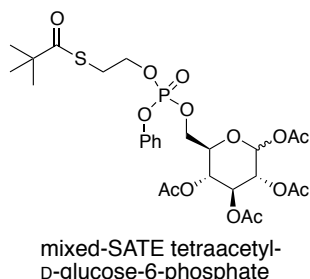


図3 膜透過性糖リン酸誘導体の構造。

4. 研究成果

(1) D-Allose の C-6 位水酸基の構造修飾と生物活性評価

D-Allose の C-6 位水酸基を炭素数 8, 10, 12 の中鎖脂肪酸エステルとした誘導体の活性を評価した結果、炭素数 12 の誘導体が D-allose の約 30 倍高い MOLT-4F 細胞株に対する増殖抑制効果を示すことを明らかにした。対照として D-glucose の C-6 位水酸基を同様に中鎖脂肪酸エステルとした誘導体の活性を評価したところ、D-allose よりも有意に低い活性を示したことから、D-allose 中鎖脂肪酸エステルのがん細胞増殖抑制活性には単純な界面活性によるものではなく、D-allose 部位が重要であることが示唆された。

(2) フラノース制限型 D-allose 中鎖脂肪酸エステル誘導体の合成と生物活性評価

環構造について 5 員環のフラノース型のみをとることができる D-allose 中鎖脂肪酸エステル誘導体は、D-allose 中鎖脂肪酸エステルと同等のがん細胞増殖抑制活性を示した。これらの結果は、D-allose 中鎖脂肪酸エステルのフラノース型ではなく、6 員環のピラノース型が活性に重要であることを示唆している。

(3) 膜透過性 D-allose-6-phosphate 誘導体の設計と合成

C1 位から C4 位の水酸基を接触水素添加で切断可能な官能基で保護した D-allose ユニットと市販の diphenyl chlorophosphate を反応させた後、脱保護を行い、目的とする diphenyl D-allose-6-phosphate を得た。また、C1 位から C4 位の水酸基をアセチル化した D-glucose ユニットと別途調製した mixed-SATE phosphate ユニットのカップリングにより、mixed-SATE D-glucose-6-phosphate 誘導体を得られた。今後同様の手法でアセチル化 D-allose 誘導体も合

成できると考えられる。これらの誘導体は、細胞膜を透過するために十分な分子疎水性度を有していると推定され、がん細胞増殖抑制活性を示すプロドラッグとして機能することや、D-allose-6-phosphate の細胞内標的と探るための分子プローブの基本構造としての利用も期待される。

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 1 件)

- (1) R. C. Yanagita, K. Kobashi, C. Ogawa, Y. Ashida, H. Yamaashi, Y. Kawanami, Anti-proliferative activity of 6-O-acyl-D-allose against the human leukemia MOLT-4F cell line. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2014**, 78, 190-194. (査読有)
DOI: 10.1080/09168451.2014.882747

[学会発表] (計 11 件)

- (1) 小橋克哉, 柳田 亮, 芦田能基, 山足陽和, 川浪康弘: フラノース型 D-アロース中鎖脂肪酸エステルのヒト白血病 MOLT-4F 細胞増殖抑制活性, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014 年 3 月 29 日, 川崎.
- (2) Md. Tazul Islam Chowdhury, Ryo C. Yanagita, Yasuhiro Kawanami: Synthesis of 6-O-decanoyl-1,2-didehydro-1,2-dideoxy-D-allose and Its Biological Activity on Plant Growth, 日本農芸化学会中四国支部第 38 回講演会, 2014 年 1 月 25 日, 高松.
- (3) Md. Tazul Islam Chowdhury, Ryo C. Yanagita, Yasuhiro Kawanami: Synthesis of 6-O-decanoyl-D-altrose and Its Biological Activity on Plant Growth, 日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部, 日本ビタミン学会近畿・中国四国・九州沖縄地区 2013 年度合同広島大会, 2013 年 9 月 5 日, 広島.
- (4) 柳田 亮, 小川知紗, 小橋克哉, 川浪康弘: D-アロース中鎖脂肪酸エステルのヒト白血病細胞増殖抑制活性, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 26 日, 仙台.
- (5) Ryo C. Yanagita, Norifumi Hashitani, Yasuhiro Kawanami: Synthesis and biological activity of 6-O-D-allose derivatives, 13th Tetrahedron Symposium – Asia edition, November 27, 2012, Taipei, Taiwan.
- (6) 橋谷矩史, 柳田 亮, 川浪康弘: 植物生長抑制活性を有する D-アロース誘導体の構造活性相関, 日本農芸化学会中四国支部第 34 回講演会, 2012 年 9 月 21 日, 山口.
- (7) 内藤まどか, 柳田 亮, 川浪康弘: D-グロース脂肪酸エステルの合成と植物生長抑制活性, 日本農芸化学会中四国支部第 34 回講演会, 2012 年 9 月 21 日, 山口.
- (8) 柳田 亮, 山足陽和, 橋谷矩史, 川浪康弘:

植物生長抑制作用を有する希少糖誘導体の親水性官能基が生物活性に与える影響, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012 年 3 月 23 日, 京都.

- (9) 橋谷矩史, 柳田 亮, 川浪康弘: 植物生長抑制作用を有する D-アロース誘導体の構造活性相関研究, 2011 年日本化学会西日本大会, 2011 年 11 月 13 日, 徳島.
- (10) 内藤まどか, 柳田 亮, 川浪康弘: D-グロース脂肪酸エステルの合成と生物活性, 2011 年日本化学会西日本大会, 2011 年 11 月 13 日, 徳島.
- (11) 柳田 亮, 橋谷矩史, 川浪康弘: 植物生長抑制作用を有する D-アロース誘導体の構造活性相関研究, 日本農芸化学会中四国支部第 30 回講演会, 2011 年 5 月 21 日, 岡山.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ag.kagawa-u.ac.jp/charlesy/chembiollab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳田 亮 (YANAGITA RYO)

香川大学・農学部・助教

研究者番号：10598121

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし