

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590017

研究課題名(和文)新しい分子標的抗がん剤の開発を指向した生物活性天然物の合成研究

研究課題名(英文) Synthetic Studies on Biological Active Natural Products Directed Toward Developing Novel Molecular-Targeted Agents

研究代表者

加藤 正 (Kato, Tadashi)

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：50382669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：TAN-1813の全合成研究の過程において、新たなマレイミドの合成法およびフェニルチオ基を脱離基としたカップリング反応を開発した。本反応をデカリン環セグメントおよびマレイミドセグメントのカップリング反応に適用し、TAN-1813のすべての炭素骨格、不斉炭素および官能基を有する化合物の合成を達成した。FK228の類縁体合成においては、独自に開発した合成方法論を用いて、さまざまな類縁体の合成を行い、構造活性相関に関する有用な知見を得ることができた。その結果、開発候補化合物であるFK-A11の創製に成功した。現在、FK-A11は東北大学病院臨床研究推進センターにおいて、非臨床試験が実施されている。

研究成果の概要(英文)：In the course of our synthetic studies on a novel p21ras farnesyltransferase inhibitor, TAN-1813, a new method for construction of maleimide and a new coupling reaction of maleimide using phenylthio group as a leaving group were successfully developed. The reaction was applied to the coupling reaction of the maleimide segment with the decalin segment, which afforded the advanced key intermediate possessing whole carbon skeleton with all asymmetric carbon centers and functional groups present in the natural product.

A new synthetic route for the synthesis of FK228 analogues as novel HDAC inhibitors, was developed in a highly convergent and unified manner. Eight analogues were synthesized, and their biological evaluation disclosed novel aspects of structure-activity relationships. Further investigation of FK228 analogues identified FK-A11 as a promising candidates for novel anticancer agent. FK-A11 is currently conducting preclinical studies in Tohoku University Hospital.

研究分野：医歯薬

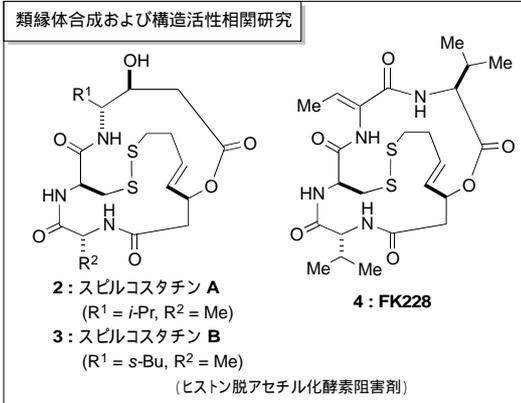
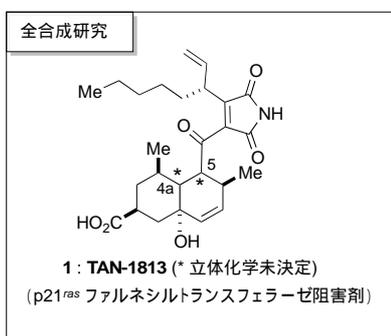
 キーワード：分子標的治療薬 生物活性天然物 抗腫瘍活性物質 全合成 TAN-1813 HDAC阻害剤 FK228 スピルコ
スタチン

1. 研究開始当初の背景

がんは日本人の死因の第1位であり、総死亡率の約3割を占める。がんの薬物療法は、分子標的の登場により目覚ましい進歩を遂げているが、未だ克服できない難治性がんは数多く存在し、より治療効果の高い、「新しい分子標的抗がん剤」の開発が切望されている。一方、近年、植物、微生物および海洋生物から新しい作用機序の抗腫瘍活性物質がいくつか見いだされており、新規抗がん剤のシード(種)として注目されている。一般にこれら天然物は複数の不斉炭素に加え、酸素や窒素などの官能基が組み込まれた特異な構造を有するものが多く、その化学合成は既存の合成反応をただ組み合わせるだけでは容易に達成することはできない。その目的を達成するためには、革新的な分子変換反応や斬新な合成ルートを開発が必要である。以上のことを念頭に置いて、申請者は「作用機序の新規性」+「構造の特異性」を指標とする独自の概念に基づいて、「標的化合物の選定」を行い、「独創的かつ革新的な合成法の開発」「類縁物質の創製」「構造活性相関の解明」「開発候補化合物の探索」を行い、我が国の抗がん剤開発に寄与することを目指す。

2. 研究の目的

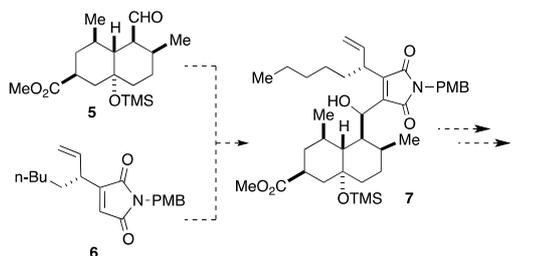
本研究課題の目的は、次世代抗がん剤の創製に寄与するために、新しい作用機序を有する活性物質の探索、およびその探索を可能にする革新的な合成手法や分子変換法の開発である。本研究課題の具体的な内容は、「新しい分子標的抗がん剤」として大きな期待が寄せられている化合物である、優れた p21^{ras} ファルネシルトランスフェラーゼ (PFTase) 阻害剤(抗がん活性) TAN-1813 (1) の合理的かつ効率的な全合成ルートを開発、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤であるスピルコスタチン A (2)、B (3) および FK228 (4) の「構造活性相関の解明」と「開発候補化合物の探索」を目的とした新規類縁物質の創製である。



3. 研究の方法

(1) TAN-1813 の合成計画

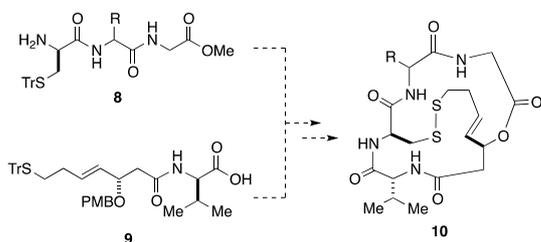
武田薬品の研究グループにより、真菌類の培養液から単離された TAN-1813 (1) は、優れた PFTase 阻害活性を示し (IC₅₀ = 2.3 μM)、新規抗がん剤のシードとして期待されている。天然物 1 の C-4a 位および C-5 位の立体化学は未決定であるが、熱力学的安定性を考えると、4aR および 5S 配置であると推定できる。我々はすでに、デカリン環およびマレイミドセグメント (5, 6) の合成を達成している。そこで、両セグメントのカップリング反応について検討を行い、TAN-1813 (1) の全合成を達成する。



(2) 「HDAC 阻害剤 FK228 の新規類縁物質の創製」に関する合成研究

スピルコスタチン類 (2, 3) および FK228 (4) は分子内にジスルフィド結合を含む特異な大環状デプシペチドであり、優れたヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害作用を示す。中でも、FK228 (4) はロミデプシンの名称で、2009 年、FDA によって皮膚 T 細胞性リンパ腫の治療薬として承認され、臨床応用に至った化合物である。しかしながら、副作用として心毒性が問題となっている。この副作用は HDACs のサブタイプである HDAC 6 の阻害に起因するものと考えられており、よりアイソフォーム選択的な薬剤の開発が望まれている。我々はすでに 2-4 の実践的な全合成ルートを開発に成功しており、予備的な生物活性評価から、マクロ環側鎖の置換基によりアイソフォーム選択性が大きく変化するという知見を得ている。そこで、4 のマクロ環を構成するアミノ酸を変化させた類縁体を設計・合成し、生物活性を評価することにより、「構造活性相関の解明」「優

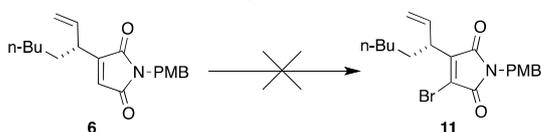
れたアイソフォーム選択的な HDAC 1 阻害剤の創製」へと展開させる。



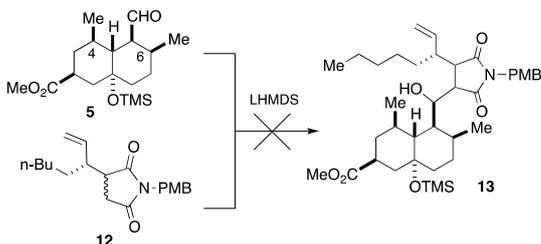
4. 研究成果

(1) TAN-1813 の合成に関する研究成果

合成計画に従い、デカリン環およびマレイミドセグメント (5, 6) のカップリング反応を行うことにした。マレイミドセグメント 6 にはカップリング反応の足掛かりとなる置換基がないことから、6 にハロゲンを導入することを考え、プロモマレイミド 11 の合成について検討を行った。しかしながら、種々条件検討を行ったものの、基質の分解あるいは複雑な混合物が得られるのみで、11 を得ることはできなかった。

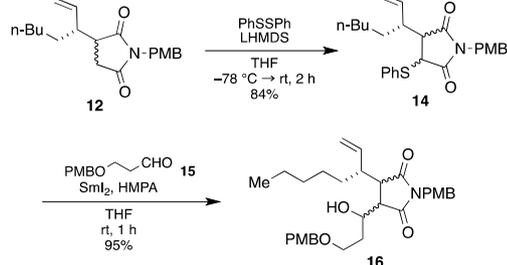


この結果を受けて、合成の序盤にマレイミド構造を構築し、その後カップリング反応を行うことは困難であると考えられたので、マレイミドに変えてスクシンイミドを用い、カップリング反応について検討を行うことにした。スクシンイミド 12 に対し、 $\text{LiN}(\text{SiMe}_3)_2$ を作用させ、生じたエノラートをデカリン環セグメント 5 に作用させた。しかしながら、反応はまったく進行せず、原料回収に終わった。このことは、デカリン環 4 位および 6 位メチル基の立体障害により反応点が接近できないためであると考えられた。そこで、遷移金属を用い、反応点を接近させることを考え、ヨウ化サマリウムを用いた Reformatsky 反応に着目した。

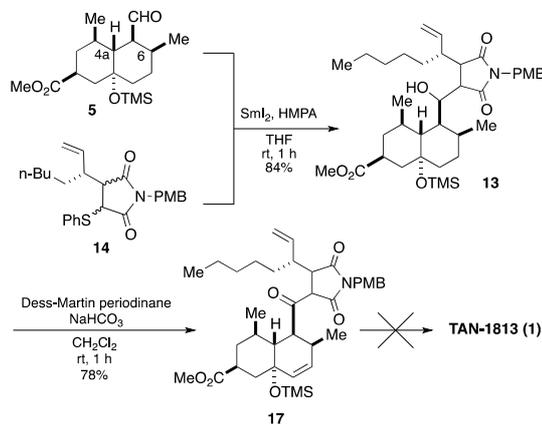


スクシンイミド 12 に対し、Reformatsky 反応の足掛かりとなるフェニルチオ基を導入し、フェニルチオスクシンイミド 14 を合成した。合成した 14 の反応性を検証すべく、モデル基質であるアルデヒド 15 とのヨウ

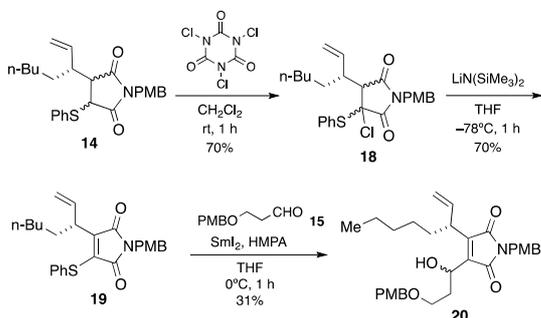
化サマリウムを用いた Reformatsky 反応を行ったところ、高収率で望むカップリング体 16 が得られることを見いだした。



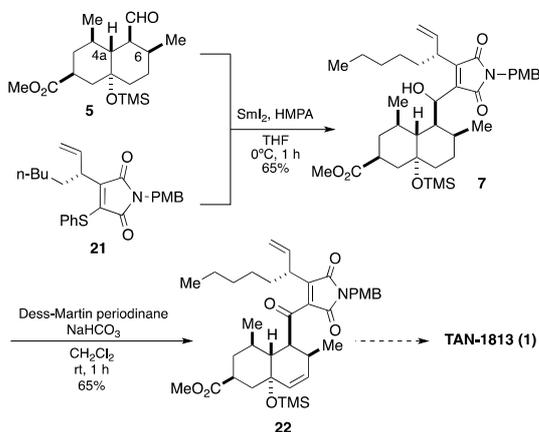
そこで、デカリン環セグメント 5 との Reformatsky 反応を行ったところ、良好な収率でカップリング体 13 を得ることに成功した。次いで、13 の水酸基を Dess-Martin 試薬を用いて酸化し、ケトン 17 へと変換した。次に、ケトン 17 のスクシンイミドをマレイミドへと誘導すべく種々条件検討を行ったが、マレイミドへと変換することは困難であった。



合成の終盤でスクシンイミドをマレイミドへと変換することは困難であることが判明したことから、再度、合成計画の見直しを行い、新たなマレイミドの合成法およびカップリング反応を開発することにした。種々検討を行った結果、先に合成したフェニルチオスクシンイミド 14 に対し、トリクロロイソシアヌル酸を作用させたところ、Pummerer 転位が進行し、クロル基が導入された化合物 18 が得られることを見いだした。得られた 18 のクロル基の脱離反応について検討したところ、 $\text{LiN}(\text{SiMe}_3)_2$ を作用させることにより、望む脱離反応が進行し、フェニルチオ基を有するマレイミド 19 の合成に成功した。さらに、フェニルチオ基を有するマレイミド 19 をヨウ化サマリウムで処理したところ、アルデヒド 15 とのカップリング反応が進行し、カップリング体 20 を得ることに成功した。本反応はフェニルチオ基を脱離基とした前例のないカップリング反応であり、新たなマレイミドの合成法として有用な新規反応になることが期待される。

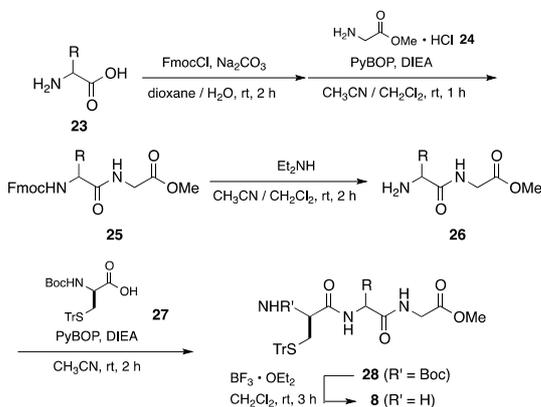


そこで、本反応をデカリン環セグメント 5 との反応に適用したところ、中程度の収率 (65%) ではあるものの、カップリング体 7 を得ることに成功した。さらに、7 の水酸基を酸化し、ケトン 22 に導いた。ケトン 22 は TAN-1813 (1) のすべての炭素骨格、不斉炭素、および官能基を有した化合物である。現在、22 の脱保護反応による TAN-1813 (1) の全合成達成について検討を行っている。

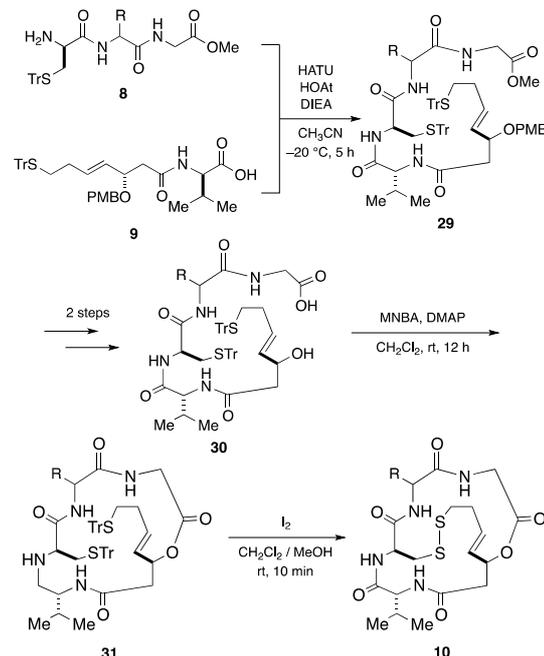


(2)「HDAC 阻害剤 FK228 の新規類縁物質の創製に関する合成研究」に関する研究成果

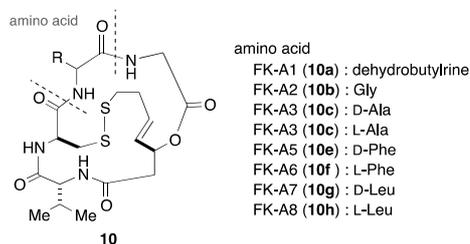
合成計画に従い、マクロ環を構成するアミノ酸を変化させた類縁体の合成を行った。対応するアミノ酸を出発物質として用い、アミノ基を Fmoc 基で保護したのち、グリシン 24 を縮合させ、ジペプチド 25 とした。25 の Fmoc 基を除去したのち、システイン 27 を縮合させ、Boc 基を除去することでアミンセグメント 8 を合成した。



次に、得られたアミンセグメント 8 と別途合成したカルボン酸セグメント 9 とのカップリング反応を行った。すなわち、HOAt 存在下、HATU を作用させることで、エピメリ化を伴うことなくカップリング反応が進行し、カップリング体 29 を単一の立体異性体として得ることができた。得られた 29 の PMB 基の除去およびエステル部の加水分解を行い、セコ酸 30 へと変換した。さらに、30 に対して椎名マクロラクトン環化反応を行うことで、16 員環環状デブシペプチド 31 を構築した。最後に、ジスルフィド結合形成反応を行うことで FK228 類縁体 10 の合成を達成した。



本合成法を用い、構成アミノ酸としてグリシン、デヒドロプロチリン、D-およびL-アラニン、D-およびL-フェニルアラニン、D-およびL-ロイシンを含む類縁体 8 種類 (FK-A1~A8 : 10a~10h) を合成した。それぞれの類縁体の HDAC 阻害活性を測定したところ、グリシン由来の FK-A2 (10b) ではその HDAC 阻害活性は FK228 (4) と比べて減弱した。また、D-アミノ酸から構成される類縁体の方が L-アミノ酸から構成される類縁体よりも優れた HDAC 阻害活性を示すことが明らかとなった。このことは、マクロ環を構成するアミノ酸の変化により、環全体の配座が変化し、結果として HDAC との親和性が低下したためであると考えられる。驚くべきことに D-ロイシン由来の FK-A7 (10g) は FK228 (4) の約 80 倍も高いアイソフォーム選択性 (HDAC6 IC₅₀/HDAC1 IC₅₀) を示した。このように高いアイソフォーム選択性を示す化合物は前例がない。今回得られた結果から、マクロ環を構成するアミノ酸の変化によりアイソフォーム選択性が変化するという新知見を得ることができた。このことは FK-228 (4) よりも低毒性な HDAC 阻害剤を開発する上できわめて重要な知見である。



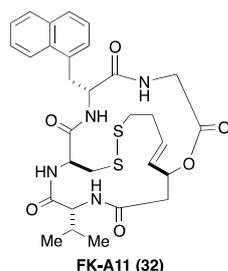
Compound	IC ₅₀ ^[a] [nM]		SI ^[c]
	HDAC 1 ^[b]	HDAC 6 ^[b]	
FK228 (4)	3.6	390	108
FK-A1 (10a)	7.8	3200	410
FK-A2 (10b)	45	4800	107
FK-A3 (10c)	4.2	3200	762
FK-A4 (10d)	340	2100	6
FK-A5 (10e)	0.54	55	102
FK-A6 (10f)	40.8	355	9
FK-A7 (10g)	0.96	8450	8800
FK-A8 (10h)	11.4	2250	197

[a] The concentration that induces 50% inhibition against HDACs

[b] The enzyme assay was performed in the presence of 100 mM dithiothreitol (DTT).

[c] Selectivity index (HDAC6 IC₅₀/HDAC1 IC₅₀) as the selectivity toward class I HDAC1 over class II HDAC6.

FK-A7 (10g) が高いアイソフォーム選択性を示す一方で、ヒトがん細胞パネルを用いた増殖抑制活性においては芳香環を有するFK-A5 (10e)が優れた活性を示すことが明らかとなった。そこで、芳香環上の置換基の影響について検討した結果、ナフチル基を有するFK-A11 (32) が特に優れた生物活性を示すことを見いだした。今後、FK-A11 (32) は新規分子標的抗がん剤の開発候補化合物となることが期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

Biochemical, biological and structural properties of romidepsin (FK228) and its analogs as novel HDAC/PI3K dual inhibitors

Ken Saijo, Jin Imamura, Koichi Narita, Akifumi Oda, Hideki Shimodaira, Tadashi Katoh, Chikashi Ishioka

Cancer Sci., **106**, 208–215 (2015)

DOI: 10.1111/cas.12585 (査読有)

Predicting the structures of complexes between phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and romidepsin-related compounds for the drug design of PI3K/histone deacetylase

dual inhibitors using computational docking and the ligand-based drug design approach

Akifumi Oda, Ken Saijo, Chikashi Ishioka, Koichi Narita, Tadashi Katoh, Yurie Watanabe, Shuichi Fukuyoshi, Ohgi Takahashi

J. Mol. Graph., **54**, 46–53 (2014)

DOI:10.1016/j.jmngm.2014.08.007 (査読有)

Total synthesis of burkholdacs A and B and 5,6,20-tri-*epi*-burkholdac A: HDAC inhibition and antiproliferative activity

Yurie Fukui, Koichi Narita, Singo Dan, Takao Yamori, Akihiro Ito, Minoru Yoshida, Tadashi Katoh

Eur. J. Med. Chem., **76**, 301-313 (2014)

DOI: 10.1002/ejoc.201402082 (査読有)

Total synthesis of bicyclic depsipeptides spiruchostatins C and D and investigation of their histone deacetylase inhibitory and antiproliferative activities

Koichi Narita, Yurie Fukui, Yui Sano, Takao Yamoria, Akihiro Ito, Minoru Yoshida, Tadashi Katoh

Eur. J. Med. Chem., **60**, 295-304 (2013)

DOI: 10.1002/ejoc.201300438 (査読有)

Romidepsin (FK228) and its analogs directly inhibit phosphatidylinositol 3-kinase activity and potently induce apoptosis as histone deacetylase/phosphatidylinositol 3-kinase dual inhibitors

Ken Saijo, Tadashi Katoh, Hideki Shimodaira, Akifumi Oda, Ohgi Takahashi, Chikashi Ishioka

Cancer Sci., **103**, 1994-2001 (2012)

DOI: 10.1111/cas.12002 (査読有)

Characterization of cells resistant to the potent histone deacetylase inhibitor spiruchostatin B (SP-B) and effect of overexpressed p21^{waf1/cip1} on the SP-B resistance or susceptibility of human leukemia cells

Syu-Ichi Kanno, Naoyuki Maeda, Ayako Tomizawa, Shin Yomogida, Tadashi Katoh, Masaaki Ishikawa

Int. J. Oncol., **41**, 862-868 (2012)

DOI: 10.3892/ijo.2012.1507 (査読有)

Involvement of p21^{waf1/cip1} expression in the cytotoxicity of the potent histone deacetylase inhibitor spiruchostatin B towards susceptible NALM-6 human B cell leukemia cells

Syu-Ichi Kanno, Naoyuki MAaeda, Ayako Tomizawa, Shin Yomogida, Tadashi Katoh, Masaaki Ishikawa

Int. J. Oncol., **40**, 1391-1396 (2012)

DOI: 10.3892/ijo.2011.1323 (査読有)

〔学会発表〕(計 35 件)

p21^{ras} ファルネシルトランスフェラーゼ阻害物質 TAN-1813 の合成研究

成田 紘一, 加藤 正

第 53 回日本薬学会東北支部大会, いわき明星大学(福島県いわき市), 2014 年 10 月 5 日

新規 HDAC/PI3K 二重阻害剤としてのデプシペプチド類縁体の抗腫瘍活性の検討
西條 憲, 李 仁, 成田 紘一, 加藤 正, 下平 秀樹, 石岡 千加史

第 73 回日本癌学会学術総会, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市), 2014 年 9 月 27 日

In vitro および *in vivo* における PI3K/HDAC 二重阻害剤としての FK228 類縁体の抗腫瘍効果の評価

李 仁, 西條 憲, 下平 秀樹, 成田 紘一, 加藤 正, 石岡 千加史

第 18 回日本がん分子標的治療学会, 仙台市情報・産業プラザ(宮城県仙台市), 2014 年 6 月 26 日

In Vitro and *In Vivo* Antitumor Effects of Romidepsin Analogs as Novel PI3K/HDAC dual Inhibitors

Jin Lee, Ken Saijo, Koichi Narita, Tadashi Katoh, Hideki Shimodaira, Chikashi Ishioka

The 9th International Symposium of the Institute Network, Osaka, Japan, June, 19 2014

p21^{ras} ファルネシルトランスフェラーゼ阻害物質 TAN-1813 の合成研究

成田 紘一, 加藤 正

日本薬学会第 134 年会, 熊本市総合体育館(熊本県熊本市), 2014 年 3 月 29 日

p21^{ras} ファルネシルトランスフェラーゼ阻害物質 TAN-1813 の合成研究

成田 紘一, 加藤 正

第 52 回日本薬学会東北支部大会, 東北大学(宮城県仙台市), 2013 年 10 月 20 日

Total Synthesis of the Bicyclic Depsipeptides -Spiruchostatins A, B, C and D- and Investigation of Their HDAC inhibitory and Antiproliferative Activities

Yurie Fukui, Koichi Narita, Tadashi Katoh

13th International Conference on the Chemistry of Antibiotics and other bioactive compounds (ICCA-13), Yamanashi, Japan, September, 25, 2013

HDAC/PI3K dual inhibitor としての Romidepsin (FK228) 新規類縁体の開発と最適化

李 仁, 西條 憲, 下平 秀樹, 成田 紘一, 加藤 正, 石岡 千加史

第 17 回日本がん分子標的治療学会, 国立京都国際会館(京都府京都市), 2013 年 6 月 13 日

分子内に S-S 結合を持つ大環状デプシペプチド類の合成と活性評価

加藤 正

文部科学省新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」化学療法基盤支援活動班・ミニ班会議, 東京国際フォーラム(東京都千代田区), 2013 年 5 月 14 日

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 ブルクホルダック A の全合成

福井 友理恵, 成田 紘一, 加藤 正

第 38 回反応と合成の進歩シンポジウム, タワーホール船堀(東京都江戸川区), 2012 年 11 月 5 日~11 月 6 日

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 ブルクホルダック A の全合成

福井 友理恵, 成田 紘一, 加藤 正

第 51 回日本薬学会東北支部大会, 青森大学(青森県青森市), 2012 年 10 月 7 日

新規 HDAC/PI3K 2 重阻害剤としてのロミデプシン (FK228) 類縁体の同定

西條 憲, 加藤 正, 石岡 千加史

第 16 回日本がん分子標的治療学会, 西日本総合展示場(福岡県北九州市), 2012 年 6 月 27 日~29 日

〔図書〕(計 1 件)

Studies in Natural Products Chemistry, Vol. 43, Tadashi Katoh, ed. by Atta-ur-Rahman, Elsevier, Amsterdam, 2014, p.1-39

〔産業財産権〕

取得状況(計 1 件)

名称: Novel Phosphatidylinositol-3-kinase Inhibitor and Pharmaceutical Composition
発明者: 西條 憲, 石岡 千加史, 加藤 正
権利者: 同上

種類: 特許

番号: WO 2 0 1 3 / 0 4 7 5 0 9

取得年月日: 平成 2 5 年 4 月 4 日

国内外の別: 国外

〔その他〕

東北薬科大学

医薬合成化学教室ホームページ

<http://www.tohoku-pharm.ac.jp/laboratory/iyakugo/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 正 (KATOH, TADASHI)

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 50382669

(2) 研究分担者

渡邊 一弘 (WATANABE, KAZUHIRO)

東北薬科大学・薬学部・講師

研究者番号: 10382673