

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670051

研究課題名(和文) 可逆的マイケル付加-脱離制御を鍵反応とするプロドラッグ設計概念の確立

研究課題名(英文) Development of prodrugs based on a controlled reversible Michael reactions

研究代表者

岩淵 好治 (Iwabuchi, Yoshiharu)

東北大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20211766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：クルクミンは、低毒性で多様な生物活性を示す食用植物成分である。当研究室では、クルクミンよりも低濃度でがん細胞増殖阻害活性を示すbis(arylmethylidene)acetone型アナログ(C5-クルクミノイド)を見出し、創薬化学研究を展開している。今回、C5-クルクミノイドのファルマコフォアとなっている交差ジエノン部がチオール類と可逆的Michael反応を行うことを見出し、<sup>1</sup>H-NMRで観測・実証した。さらに本反応を活用してチオール付加型プロドラッグを合成して評価した結果、高い抗腫瘍活性を維持しつつ水溶性を有するプロドラッグを創製することに成功した。

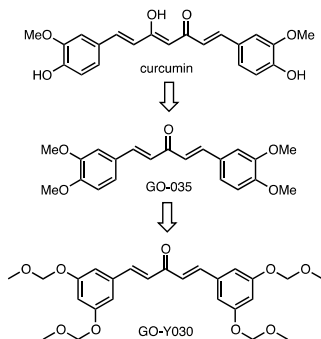
研究成果の概要(英文)：C5-curcuminoids are antitumor curcumin analogues bearing a reactive cross conjugated dienone structure. Dienone moiety is thought to be essential for antitumor activity and act as a Michael acceptor, which is traditionally avoided by medicinal chemists. Focusing on the dienone system, we monitored Michael reaction and retro Michael reaction between GO-Y030 and cysteamine by <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy method. In addition, we synthesized C5-curcuminoid thiol-adducts and evaluated their cell growth inhibitory activity against human colon cancer HCT116. The cytotoxicity of C5-curcuminoid thiol-adduct was almost comparable with that of GO-Y030, highlighting their potential as prodrugs. Our results indicated that C5-curcuminoids react with cysteine thiol in a reversible manner, which is considered as important intracellular behavior of C5-curcuminoid.

研究分野：創薬化学

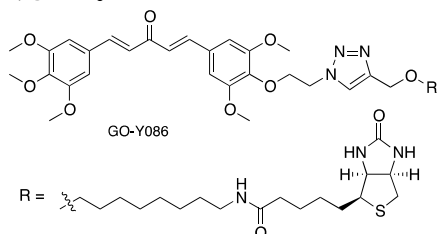
キーワード：プロドラッグ 抗腫瘍活性 薬剤反応性 マイケル付加

### 1. 研究開始当初の背景

「悪性新生物」が日本人の死亡原因の第一位となる状況が四半世紀以上続くなか、優れた薬物療法の開発が切望され続けている。このような背景のもと、低毒性で癌の化学防御に有効性を示す食用食物成分に高い関心が寄せられている。当研究室では2003年以来、がん化学療法の臨床に携わる研究者（現・秋田大学病院腫瘍内科・柴田浩行教授）と、共同して食用食物成分をリードとする創薬研究に携わってきた。当研究室が保有する化合物ライブラリーを用いて、大腸癌細胞に対する活性スクリーニングを行った結果、ウコン中の成分として知られる curcumin に類似した C<sub>5</sub>-curcuminoid 型化合物 GO-035 が curcumin を凌駕する活性を示すことを見出した。さらに探索合成を進めた結果、GI<sub>50</sub> = 0.3 μM で抗腫瘍活性を発現する誘導体 GO-Y030 を獲得した。



驚くべき事に、GO-Y030 は正常肝細胞に対しては 50 mM 以上の濃度でも全く毒性を示さなかった。この結果に力を得て、家族性大腸腺腫マウスに対する長期摂食実験を行った結果、GO-Y030 投与群は、非投与群に比べて顕著な延命効果を示すことが判明した。そこで GO-Y030 の標的分子の特定を企図して、ピオチン連結誘導体 GO-Y086 を合成し、このものの細胞内動態ならびに結合タンパク質を追究した。



その結果、GO-Y086 が経時的に核に集積していくこと、そしてその標的が RNA の発現制御に与る FUBP2/KSRP タンパクであり、GO-Y030 は FUBP2/KSRP の N 末端から 500 番目に位置する Cys 残基の SH 基と共有結合していることを明らかにした。GO-Y030 は FUBP2/KSRP を阻害して c-Myc の発現量を抑制することから、GO-Y030 は FUBP2/KSRP 阻害に基づく有望なリードと位置付けられる。

GO-Y030 は生理的な条件下、チオール化合物と速やかに反応して Michael 付加生成物を与えることを確認している。GO-Y030 は細胞内に高濃度 (~ 5 mM) で存在する glutathione と反応して付加体を形成するが、最終的には核まで到達して FUBP2/KSRP の C500 と結合している。「可逆的 Michael 平衡」を想定せざるを得ない。GO-Y030 は、可逆平衡を介して核タンパク FUBP2/KSRP に辿り着き、その活性を阻害することで優れた選択毒性を発揮していたと考察される。

### 2. 研究の目的

本研究は、著者らが取り組んで来た、食用植物ウコン由来の抗腫瘍活性化合物：curcumin を起点とする創薬研究の途上で見出した新奇現象を萌芽シードとして、創薬化学の発展に資する新概念の提唱を目指すものである。すなわち、エノン構造を特徴とする C<sub>5</sub>-curcuminoid 型抗腫瘍活性化合物 GO-Y030 において観測されたチオール化合物との可逆的 Michael 反応の理解と応用研究を通じて、「逆 Michael 反応の制御」を鍵とする新規プロドラッグ化法の開発を行う。本提唱概念の有効性が実証できれば、創薬の現場に定着する通念を変容させ、創薬科学の新境地が拓かれると期待される。

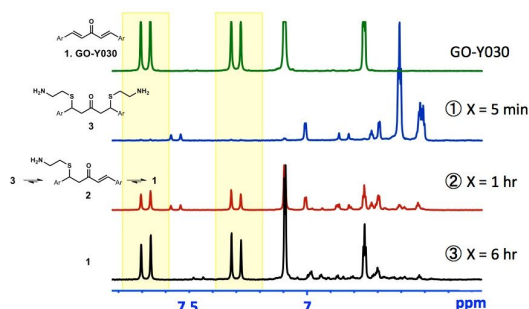
### 3. 研究の方法

本研究では、まず α,β-不飽和カルボニル化合物に対するチオール類の Michael 付加反応と、その逆反応を惹起する要因について精査し、生理的条件下（無細胞系）において、活性型薬剤を生成させる条件および手法（チオールシャトル：Thiol-Suttle 法）を開発する。具体的にはエノンおよびチオールの化学構造と Michael 反応平衡の相関を詳細に検討して、本現象の時間制御の可能性を追究する。次いで、細胞を用いた評価系にてプロドラッグ機能を精査するとともに、医薬として適切に機能発現させるための調節法を検討する。

### 4. 研究成果

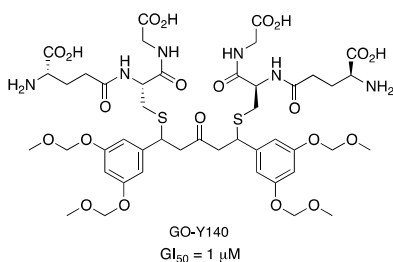
当研究室で開発した C<sub>5</sub>-curcuminoid 型 [bis(arylmethylidene)acetone 型] 抗腫瘍活性化合物 GO-Y030 の薬物動力学の有用性開発を期して、エノン部分に多様なチオール分子を Michael 付加してプロドラッグ候補分子を合成し、それらの溶解性と抗腫瘍活性を評価した。その結果、単純な脂肪鎖が置換したチオールでは溶解性も改善されず抗腫瘍活性が消失してしまったが、システアミンや N-アセチルシステイン、グルタチオン等、位にヘテロ原子を有するチオールでは水溶性が向上するとともに、GO-Y030 と同等の抗腫瘍活性が観られることを確認した。また、チオール付加型プロドラッグの NMR を追跡した結果、抗腫瘍活性が保持された誘導体においては速やかな逆 Michael 反応が進行することも明らか

となった。これらの結果から、C<sub>5</sub>-curcuminoid はグルタチオン抱合体となっても逆マイケル反応によって平衡下にファルマコフォア部位であるエノン部を再生し、細胞内でより高い親和性を有するタンパク質に付加して細胞増殖抑制活性を発揮していることが強く示唆された。さらに、今回合成したチオール付加型プロドラッグの中には、親化合物である GO-Y030 を凌駕する抗腫瘍活性を発現するものが見いだされたことから、チオール側鎖の機能修飾を鍵として逆マイケル反応性を制御して、細胞内での挙動と安定性を制御できる可能性が見いだされた。



The <sup>1</sup>H-NMR spectra of GO-Y030 and GO-Y030 after X hr addition of cysteamine (4 eq.) in DMSO-*d*<sub>6</sub>

<sup>1</sup>H-NMR 実験で明らかとなった C<sub>5</sub>-curcuminoid の可逆的 Michael 反応性を利用して、高活性誘導体 GO-Y030 にチオールを付加させたプロドラッグを 20 種類合成し抗腫瘍活性を評価した。合成した誘導体のほとんどは活性を保持しており、C<sub>5</sub>-curcuminoid はチオール付加に基づくプロドラッグ化が適用可能であることを確認できた。水溶性を向上させた、高活性水溶性誘導体 GO-Y140 を獲得できた。



GO-Y030 に対するチオール類の可逆的マイケル付加反応について、詳細に検証した結果、チオールに置換する基の立体電子効果が逆マイケル反応の速度に決定的な影響を与えることが判明し、1級アミンが逆マイケル反応の触媒として機能することが確認された。この結果は bis(arylmethylidene)acetone のケトンカルボニル基が 1級アミンと反応して形成するイミンあるいはイミニウム構造が逆マイケル反応を加速していることを示唆している。

1,4-Pentadien-3-one 構造への電子求引基の導入によるマイケル-逆マイケル反応の加速にもとづく抗腫瘍活性の上昇を期して新規誘導体を種々合成したが、置換基の立体障害のた

めか、活性は軒並み低下した。このことから、1,4-pentadien-3-one 構造は抗腫瘍活性発現にとって最適なファルマコフォアとなっていることが再確認された。

## 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0件)

[学会発表](計4件)

1. Aki Kohayama, Hiroyuki Yamakoshi, Shunsuke Sugiyama, Naoki Kanoh, Hiroyuki Shibata, Yoshiharu Iwabuchi  
Discovery and Bioorganic Insight into the Synthetic Curcumin Analogues  
The 27th International Conference on Polyphenols & The 8th Tannin Conference (口頭発表)  
2014年9月2日~2014年9月6日、名古屋大学

2. Yoshiharu Iwabuchi

Discovery and Medicinal Insight into the Cytotoxic C5-Curcuminoids  
The 8th International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia(招待講演)  
2013年11月25日~2013年11月28日、大阪国際会議場(大阪市)

3. Aki Kohayama, Shunsuke Sugiyama, Hiroyuki Yamakoshi, Naoki Kanoh, Hiroyuki Shibata, Yoshiharu Iwabuchi  
Synthesis and Cytotoxic Activity of C<sub>5</sub>-Curcuminoid-Thiol Adducts  
The 3rd Junior International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia Conference (ポスター発表)  
2013年11月22日~2013年11月25日、千葉大学

4. 岩淵好治

抗腫瘍活性 C5-クルクミノイドの発見と展開  
第29回創薬セミナー(招待講演)  
2013年7月24日 2013年7月26日、八ヶ岳ロイヤルホテル(山梨県北杜市)

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:

番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~gousei/synthetic/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩淵 好治 (Iwabuchi, Yoshiharu)  
東北大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：20211766

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：