

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26620019

研究課題名(和文)「加水分解産物からサリドマイドへの逆反応過程の検証と代謝経路の新規構築」

研究課題名(英文) Reverse reaction of thalidomide hydrolytic product to thalidomide for reconsidering metabolic pathway of thalidomide

研究代表者

朝日 透 (Asahi, Toru)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：80222595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：サリドマイド(TD)の第一段階の加水分解産物3種類(CBG, PIG, PG)の有機溶媒中における擬脱水反応を詳細に解析した。恒温静置したCBG, PIG, PGのアセトニトリル溶液をHPLC分析することで、CBGのみ擬脱水反応が起こることを明らかにした。反応速度の解析から通常の一次反応ではなく、TDとCBGが共に触媒的に作用する反応であることが示唆された。CBGのエナンチオマーの擬脱水反応ではキラリティの変化は確認されず、不斉炭素における水素の脱着は起こらないと考えられる。TDからCBGへの加水分解反応におけるエネルギー障壁を量子化学計算により求め、約42kcal/molと見積もられた。

研究成果の概要(英文)：Recently, Thalidomide(TD) has attracted attention again because of rediscovery of drug efficacy against some intractable diseases. Previously, we found that - (2-Carboxybenzamido) glutarimide (CBG), which is a primary hydrolysis product of TD in vivo, slowly changed to TD through dehydration in organic solvents such as acetonitrile. In this study, to comprehend its mechanisms, we investigated the dehydration of CBG under various conditions and examined whether the dehydration occur on phthaloylisoglutamine (PIG) and phthaloylglutamine (PG), which are other primary hydrolysis products of TD. We have concluded that the dehydration of CBG occurred in acetonitrile and ethanol within a range of 20-60 °C, whereas PIG and PG were not dehydrated in the condition described above. Moreover, the kinetics of CBG dehydration suggests that the reaction mechanism was not simple first-order reaction but catalytic reaction which involve both TD and CBG as a catalyst.

研究分野：キラル科学

キーワード：サリドマイド加水分解産物 脱水反応 X線結晶構造解析 HPLC分析 反応速度論 量子化学計算

**「加水分解産物からサリドマイドへの逆反応過程の検証と代謝経路の新規構築」**

**1. 研究開始当初の背景**

サリドマイド(以下 TD と略)の数奇な歴史は、薬効と副作用という薬品の二面性を顕在にし、医薬品のキラリ識別の重要性を世界に強く認識させた。そして TD は多くの難病の治療薬として再び脚光を浴び、日本では 2008 年に多発性骨髄腫の治療用途に限って再承認された。しかし TD の作用メカニズムの多くは未解明である。それは体内での様々な代謝反応(加水分解など)とキラリ転換の複雑さのためである。加水分解に至っては殆どがキラリな 12 種の加水分解産物が生成する。これら代謝産物とそのキラリティとの複雑な絡み合いが TD のいくつかの薬効を生み出していると考えられるため、実際に薬理活性を持つ物質とそのキラリティの同定は解決困難なこととして残されている。この状況を打破して、より安全かつ効果的な TD の使用や類似薬剤の開発のために、申請者らは TD の加水分解産物の生成過程とキラリティの変化を系統的に明らかにしてきた。その中でこれまでに知られていない興味深い現象を発見した。TD の加水分解産物の一つ  $\alpha$ -(2-Carboxybenzamido)glutarimide (CBG)が有機溶媒中で TD に戻るといふ「擬脱水」反応が見出された。これは TD の加水分解が、ある条件下では逆に進み、分解産物が逆に TD へと変化するという、TD の新しい挙動を示唆するものである。

**2. 研究の目的**

TD は近年、難病の治療薬として再承認されたが、いまだその薬効のメカニズムは明らかではない。これは TD が体内で様々な経路で加水分解などの代謝を進行させ、かつそのキラリティが変化するためであり、申請者は各反応過程の物理化学的解明を系統的に進めている。その中で、ある加水分解産物から TD への逆反応が起きていることが偶然的に発見された。このような反応は今まで全く報告がない。そこで本研究では、この逆反応過程を分析化学、分光学、計算科学の手法を駆使して、他の加水産物を含めて詳細に検討する。これにより TD の代謝経路を明らかにするだけでなく、生体条件で本反応が起きるか否かを探索することで、生体がキラリ薬物に働きかける新たな機構の解明につながる。

**3. 研究の方法**

**3.1 有機溶媒中の脱水反応の速度解析**

TD の加水分解物は加水分解を受ける部位のにより上述の CBG、Phtaloylglutamine (PG)、Phtaloylisoglutamine (PIG)の三種類が知られている(図 1)。この三種類の分子について、有機溶媒中での脱水反応特性を調べた。各物質を有機溶媒中(アセトニトリルとメタノール)で種々の濃度(0.25~5 mM)で溶解し、

種々の温度(28~60 )で、0~25 日ほど恒温静置した。数日おきに上記溶液を少量採取して HPLC 分析し、脱水反応により生成した TD を定量した。分析には、ODS 修飾シリカゲル逆相カラムを使用した。

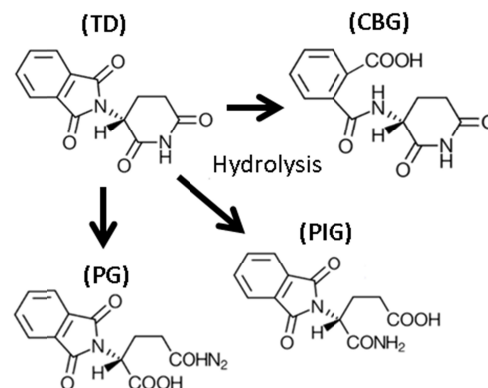


図 1: TD と TD の第一段階加水分解産物の分子構造

**3.2 固相における加熱による脱水反応・ラセミ化の検討**

CBG の脱水反応が発生する条件を広範に探るために、固相での脱水反応についても検討した。粉末状態の(R)-及び(S)-CBG をアルミバン内で 220 に加熱し、カバーガラスに蒸着させた。加熱後にカバーガラスに付着した物質を MeCN に溶解し、キラリカラムを用いて HPLC 分析し、TD の生成量を測定した。また、同様に(R)-TD、(S)-TD を 300 前後まで加熱し、熱による TD のラセミ化についても検討した。

**3.3 量子化学計算による加水分解反応のエネルギー障壁の推定**

TD における加水分解反応は、TD 一分子と H<sub>2</sub>O 一分子が関与する S<sub>N</sub>2 反応であると推定される。そこで、TD の第一段階の加水分解反応である、TD→PG、TD→PIG、TD→CBG のそれぞれについて、その反応に要するエネルギー障壁を、Gaussian09 を用いて計算した。入力する TD と三種類の加水分解産物の構造は、既に得られている結晶構造を用いた。TD と H<sub>2</sub>O 分子による遷移状態の構造を求め、基質系とのエネルギー差を求めた。計算には B3LYP/6-311+g(d,p)を用いた。

**4. 研究成果**

**4.1 有機溶媒中の脱水反応の速度解析**

まず加水分解物種と TD の溶出ピーク時間が良好に分離できる条件を検討した。その結果、アセトニトリル/H<sub>2</sub>O = 80/20 (v/v)にギ酸 0.1%を含む溶出液、流速 0.5 ml/min、カラム温度 15 の条件で良好な分離が得られた。また TD、CBG、PIG、PG の量は各溶出ピークの面積から定量するため、実験ごとに生じる注入量のばらつきの影響を抑えるために基準物質も同時に溶解し、基準物質の溶出ピーク

面積で規格化することとした。基準物質には、測定対象と溶出ピーク時間が重ならないエチルパラベンを用いた。また、溶解する有機溶媒についても、アセトニトリルとメタノールを試行した。どちらも同様の脱水反応特性を示したが、メタノールはTDや加水分解物種と吸収波長が近接しておりHPLC分析での定量に影響するため、溶解する有機溶媒にはアセトニトリルを使用することとした。分取後にも反応が進行していることが考えられるため、HPLC測定は少量分取の1時間以内に行うこととした。

CBGをアセトニトリルで5 mMで溶解して60 で恒温静置後1日目と10日目のそれぞれのHPLCクロマトグラムを図2Aに示す。1日目にはほぼ見られなかったTDのピーク強度が10日目では著しく増加していることが分かった。PGとPIGについても同様の測定を行ったところ、静置後1日目も10日目もTDは検出されなかった(図2B)。これらの結果は、CBGは有機溶媒中で脱水反応が進行するが、同じTDの加水分解産物であるPIGとPGでは、少なくとも今回試行したアセトニトリル中、60、10日間静置という条件では、脱水反応が起こらないことを示している。

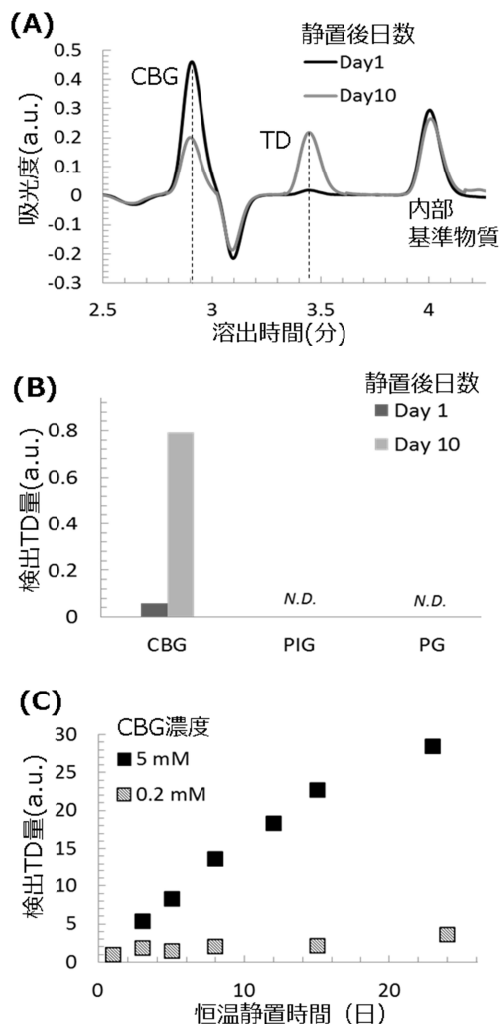


図2：加水分解物の脱水反応特性

本研究に関連して行ったCBG、PIG、PGの単結晶X線構造解析から、CBGはPIG及びPGよりも加水分解により生成したカルボキシル基の水酸基とアミン基(アミド基)の水素が対合しており、より近接していることが解っている。もちろん結晶中と溶液中の分子構造が同一ではないことは十分に考えられるため、慎重な考察が求められるものの、CBGでのみ脱水反応が起こる理由として、水酸基と水素の距離が重要であることを示唆する結果と言える。

次に、CBGの脱水反応機構を調べるため、TD生成量の時間依存性を測定した(図2C)。TDの生成量の時間変化は、①CBG初期濃度が高濃度(5 mM)で著しく速い、つまり反応速度に初期濃度依存性がある、②静置後日数が経過してもTD生成速度は変化しない、つまりCBG濃度の変化には影響を受けない、ことが分かった。これらの結果は、CBGの脱水反応が、 $CBG + CBG \rightarrow CBG + TD + H_2O$ の反応経路と $CBG + TD \rightarrow CBG + CBG + H_2O$ の反応経路が存在し、さらに二つの反応効率がほぼ同等であると考えたと説明できる。例えば、CBGとTDに共通する分子構造であるグルタルイミドが脱水反応を触媒していれば、このような反応機構が考えられる。反応機構を確定するためには、種々の条件で反応速度を解析して、上記のような仮説を検証する必要がある。

#### 4.2 固相での熱による脱水反応・ラセミ化の解析

((S)-CBGを220 に加熱し、カバーガラスに蒸着させたものをHPLC分析したところ、およそ等量の(R)-及び(S)-TDのみが検出された(図3)。この結果から、固相での220の加熱でも脱水反応が発生しており、有機溶媒

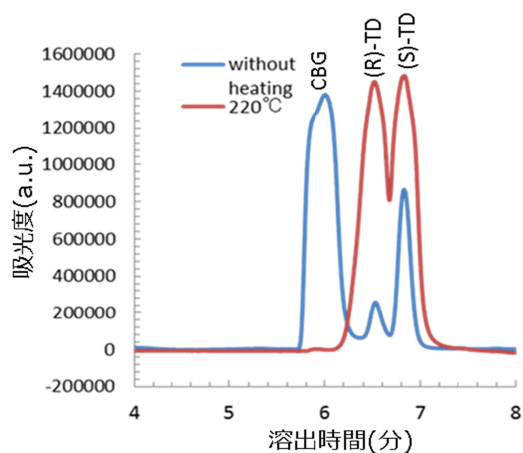


図3：固相における加熱によるCBGの脱水反応とラセミ化

の存在に限らず、熱力学的な条件さえ整えば起こる反応であると示唆された。また、溶液中での脱水反応ではラセミ化は見られなかったが(後述)、固相での加熱による脱水反応ではラセミ化も起きていた。しかし、

TD のエナンチオマーで同様の加熱実験を行ってもラセミ化が見られることから、CBG に見られた脱水反応とラセミ化は独立な反応である可能性が高い。

#### 4.3 量子化学計算による加水分解反応のエネルギー障壁の推定

まず TD の加水分解産物の中で最も生成量が多いと考えられる CBG が生成する反応について、その反応に要するエネルギー障壁を計算した結果を以下の図 3 に示す。CBG へと変化する反応の遷移状態( $i867.95\text{ cm}^{-1}$ )は、TD が開裂する部位の上部に水分子が位置する構造となった。この反応におけるエネルギー障壁は  $42.8\text{ kJ/mol}$  と予測された。比較的低いエネルギー障壁であること、生成物系のエネルギー準位が低いことを考えると、この加水分解反応は比較的起こりやすいと考えられる。しかしそれは同時に、CBG から TD へと変化する逆反応には大きなエネルギー障壁を越える必要があることを意味している。実験的には、数十日を掛けてゆっくりと TD が生成しているため、この予測は実験結果に即している。TD が開裂した側鎖の可動範囲によって、逆反応中にこのように大きなエネルギー障壁を越えるための推進力が働いていると考えられる。

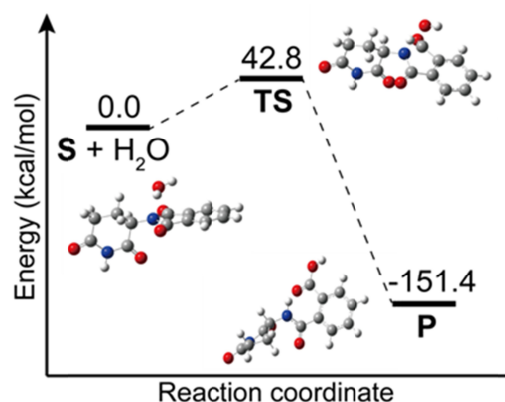


図 4 TD-CBG 間の反応におけるエネルギー準位の変化

#### 【参考文献】

- Lu, J.; Helsby, N.; Palmer, B. D.; Tingle, M.; Baguley, B. C.; Kestell, P.; Ching, L. -M. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2004**, *310*, 571-577.
- Schumacher, H.; Smith, R. L.; Williams R. T. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* **1965**, *23*, 324-337.
- Ogino, Y.; Asahi T. *J. Theor. Biol.* **2015**, *373*, 117-131.

#### 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)

- Kohei Otogawa, Kazuhiko Ishikawa, Motoo

Shiro and Toru Asahi, “Crystal structure of (S)-4-carbamoyl-4-(1,3-dioxo-isoindolin-2-yl)butanoic acidActa.” *Cryst. E*, *71* (1), 107-109, 査読有 (2015). doi:10.1107/S2056989014027121

[学会発表](計 10 件)

- Miri Nakamura, Kohei Otogawa, Yoshiyuki Ogino, Togo Shimozaawa, Toru Asahi, “Spontaneous Dehydration Mechanism of Thalidomide Hydrolysis Products in Organic Solvent”, Molecular Chirality Asia 2016, 2016/4/21, 日本・大阪.
- 田中 真人, 中川 和道, “Conformational analysis of chiral molecules by vacuum ultraviolet circular dichroism”, TSRP2016 & APSRC2016, 2016/01/06, インド・ムンバイ
- Kohei Otogawa, Yoshiyuki Ogino, Kazuhiko Ishikawa, Togo Shimozaawa, Masahito Tanaka, Hideko Koshima, Motoo Shiro, Toru Asahi, “Verifying dehydration of hydrolysis compound of thalidomide”, Pacificchem2015, 2015/12/17, アメリカ合衆国・ハワイ.
- Hiroki Toriyama, Yoshiyuki Ogino, Masahito Tanaka, Norio Shibata, Toru Asahi, Togo Shimozaawa, “Dynamic formation of enantiomeric thalidomide dimeric structure: Solid and solution state chiroptical spectroscopy and computational analysis”, Pacificchem2015, 2015/12/17, アメリカ合衆国・ハワイ.
- Miri Nakamura, Kohei Otogawa, Togo Shimozaawa, Toru Asahi, “Solvent free chiral inversion of thalidomide and hydrolysis product of thalidomide”, Pacificchem2015, 2015/12/17, アメリカ合衆国・ハワイ.
- 田中 真人, 中川 和道, “Vacuum ultraviolet circular dichroism measurement system development with reduction optics and its application to molecular structure analysis”, 15th International conference on Chiroptical Spectroscopy (CD2015), 2015/09/01, 日本・札幌.
- 荻野禎之, 田中真人, 柴田哲男, 朝日透, “サリドマイド骨格分子が示す複雑代謝挙動の実験・理論的解析”, Symposium on Molecular Chirality 2015, 2015/06/13, 日本・東京.
- 鳥山廣樹, 荻野禎之, 下澤東吾, 柴田哲男, 田中真人, 朝日透, “固体・溶液円二色性分光法と理論計算を用いたサリドマイドの二量体構造形成の解析” Symposium on Molecular Chirality 2015, 2015/06/13, 日本・東京.
- 乙川光平, 荻野禎之, 石川和彦, 下澤東吾, 田中真人, 小島秀子, 城始勇, 朝日透, “サリドマイド加水分解産物の有機溶媒中における脱水反応の検証”, Symposium

on Molecular Chirality 2015, 2015/06/13,  
日本・東京.

10. 田中 真人, 泉 雄大, 藤井 健太郎, 中川  
和道, “Present status of vacuum ultraviolet  
circular dichroism system and application to  
conformation analysis of bio-related chiral  
molecules”, 15th International Congress of  
Radiation Research, 2015/05/28, 京都.

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## **6. 研究組織**

(1)研究代表者

朝日 透 (Toru Asahi)  
早稲田大学 理工学術院 教授  
研究者番号：80222595

(2)研究分担者

田中 真人 (Masahito Tanaka)  
国立研究開発法人産業技術総合研究所  
研究員  
研究者番号：30386643

(3)連携研究者

( )

研究者番号：