

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：72801
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K08384
研究課題名(和文) 中分子天然物ロイシノスタチンAの触媒的不斉合成を基盤とした抗がん剤リードの創製

研究課題名(英文) Development of anticancer lead based on catalytic asymmetric total synthesis of leucinostatin A

研究代表者
渡辺 匠 (Watanabe, Takumi)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・部長

研究者番号：80270544
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：従来のがん分子標的薬はがん細胞そのものの増殖シグナルに作用し選択性の高さがメリットとなる一方、当該細胞の遺伝子の不安定性に起因する容易な耐性惹起が避けられない。そこで、がん細胞の周囲に存在する正常細胞である間質細胞由来の増殖シグナルを標的とした抗がん剤の開発を目指している。本研究ではロイシノスタチンAに関する医薬化学研究により、間質細胞のミトコンドリア呼吸鎖関連酵素・complex Xを阻害し、動物モデルでも効果を示す化合物を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
がんとの闘いにおいて人類は様々な効果的治療法を開発してきたが、いずれも長所と短所を併せ持ち、新たな選択肢も常に待ち望まれている。低分子創薬の分野ではがん細胞に対する高選択性を特長とする分子標的薬に高頻度の耐性発現が知られる。本研究ではがん組織中のがん細胞の周囲に存在する、間質細胞とよばれる正常細胞がもつミトコンドリア呼吸鎖関連酵素・complex Vを新たな抗がん剤分子標的として提示するに至った。正常細胞の遺伝子の安定性に鑑み、耐性の発現し難い抗がん剤開発の基礎的知見としての意義をもつ。

研究成果の概要(英文)：Currently available targeted therapy of tumor acts on growth signal within tumor cells, which realizes potent and selective anti-tumor activity, and is clinically successful indeed. However, genetic instability of tumor cells frequently cause resistance toward this type of therapy. Based on this background, growth signals from normal cells (stromal cells) neighboring tumor cells are recognized as good candidate of molecular target of future anti-cancer medicine. Leucinostatin A acts on this cross-talk of tumor and stromal cells to inhibit proliferation of the tumor cells. In this study, leucinostatin and related compounds were found to inhibit complex V, a key enzyme in mitochondrial respiratory chain, to reduce expression of IGF-1. In fact, these compounds suppressed growth of tumor cells, showed anti-tumor activity in model mice.

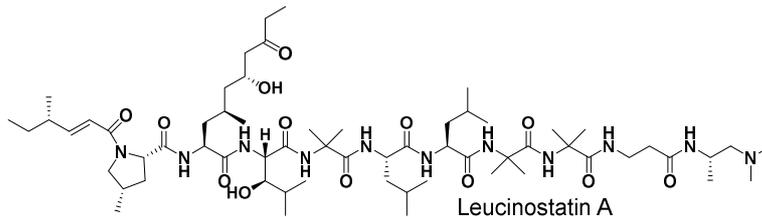
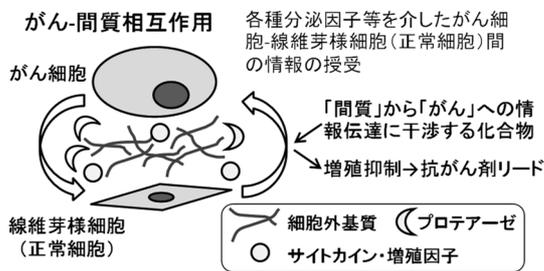
研究分野：医薬化学

キーワード：ロイシノスタチン がん-間質相互作用 医薬化学 構造活性相関 ペプチド 天然物 分子標的薬

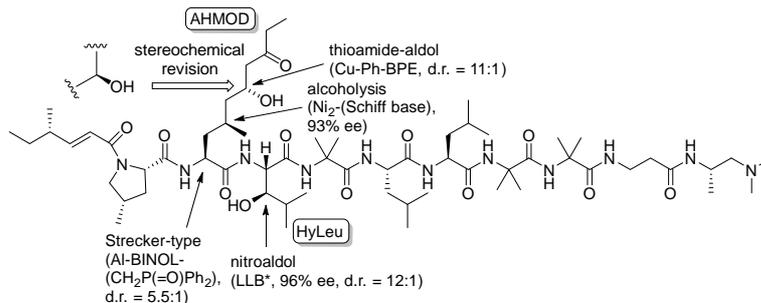
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分子標的薬開発の成功により化学療法の有効ながん種は飛躍的に増加しているが、その多くは標的をがん細胞自体に求めている。しかし、がん細胞の持つ遺伝子の不安定性はこれらの薬剤に対する容易な耐性発現の原因となり、しばしば治療効果が継続しない。ところでがん組織はがん細胞だけではなく、周囲を取り巻く正常細胞（線維芽様細胞）を含む成分で構成された間質と混在した形で成立し、その間に見られる情報の授受をがん-間質相互作用と称する（右図上）。実際、間質細胞由来の様々な分泌因子が（1）がん幹細胞の維持¹、（2）がん転移の成立²、（3）抗がん剤耐性獲得³等に深く関与することが報告されるようになった。また（2）に関してはいわゆる seed and soil 説、すなわちがん細胞（seed）には共存に適した固有の間質（soil）が存在し、これに導かれ転移が成立すると報告があり（*Clin. Exp. Med.* 2006, 6, 145）、がん-間質相互作用は臓器毎に異なる特徴を有する多様なものであることが示唆される。更に重要なことに、最近の研究から間質細胞由来の分泌因子によるがん細胞増殖の制御に関する知見も得られるようになった。これらのメディエータの例としては、がん細胞の増殖因子として作用する HGF, IGF-I, FGF-7, HB-EGF 等が知られる。以上の背景に基づき筆者らは、間質を標的とした新たながん治療法の開発を模索している。すなわち、がん細胞の増殖を制御する間質由来の蛋白因子の機能を抑制する化合物が、正常細胞の遺伝子の安定性に鑑み耐性発現頻度の低い優れたがん分子標的薬のリードとなるものと期待し、関連領域の創薬基礎研究を推進してきた。



共同研究者の川田はロイシノスタチン A が間質細胞と共培養された前立腺がん由来 DU-145 細胞の増殖を単独培養時よりも強力に阻害し、また DU-145 細胞を移植したマウスのがん組織を 0.05 mg/kg の低濃度で縮小することを見出した⁴。申請者は正常細胞に分子標的をもつ新しいタイプのがん化学療法剤のシーズとして本化合物に注目し、創薬化学研究にも応用可能な触媒的不斉全合成ルートを確立した。



AHMOD(上図)側鎖上のメチル基置換部位の立体制御には二核ニッケル-キラルシッフ塩基錯体を用いた 3-メチルグルタル酸無水物の触媒的不斉メタノリシス (93% ee)⁵、同側鎖水酸基には 1 価銅-Ph-BPE 錯体によるチオアミドアルドール反応⁶ (dr =>20:1)、主鎖には Al-BINOL 型錯体を触媒としたジアステレオ選択的 Strecker 反応⁷ (dr = 5.3:1)、メチルスレオニン (MeThr) の水酸基には LLB* による不斉 Henry 反応⁸ (dr = 12:1, 97% ee) を適用し、それぞれ良好な選択性にて立体制御に成功している。その他の残基を別途合成した後、固相法と液相法を併用したペプチド縮合を行った。途上、樹脂からの切り出し後に末端アミン部位を導入し、最終段階の脱保護を経て構造活性相関 (SAR) 研究に適用可能なロイシノスタチン A の触媒的不斉合成を達成した。この際、誤って報告されていた絶対立体配置の修正も行った⁹。

2. 研究の目的

本研究はがん組織と周囲の間質との情報伝達に作用する天然物ロイシノスタチン A の触媒的不斉全合成を基盤に、正常細胞をターゲットとした画期的抗がん剤のリードとなり得る新たな生物活性物質の創製を目指すものである。

前項で説明した背景とも重複するが、がんの増殖はがん細胞自身のみならず、周囲に存在する正常細胞を含む間質に由来する分泌因子によっても制御されることが知られ (がん-間質相互作用)、当該因子に働く化合物は正常細胞の遺伝子の安定性に鑑み耐性発現頻度の低い優れたがん分子標的薬のリードとなることが期待される。本研究は正常細胞由来の全く新しい分子標的をもつ画期的な抗がん剤リードの創製を目的とし、既に申請者により完成されたがん-間質相

相互作用に作用する天然物ロイシノスタチン A の触媒的不斉合成を基盤に、(1) ファーマコフォアの確定、(2) 分子プローブによる標的分子の同定、(3) より優れたがん細胞増殖阻害活性および抗がん活性を有する誘導体の探索、からのアプローチを試みる。

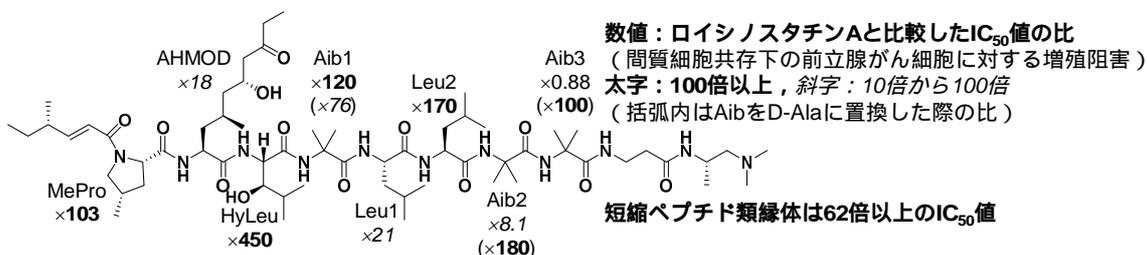
3. 研究の方法

最初にロイシノスタチン A のファーマコフォアの確定（間質細胞共存下のがん細胞に対する選択的増殖抑制が指標）を目指した。初めに鎖長を変更することにより、本化合物の活性発現に必須となる全体構造の解明を図った。その際、導入するアミノ酸残基自体はロイシノスタチン A のそれを踏襲することとし、既に確立した異常アミノ酸の触媒的不斉合成等も活用し、主に固相合成法を用いサンプルを調製した。但し、AHMOD や HyLeu は合成工程数が多く貴重であったので、当該残基のカップリングには液相法を利用した。

続いて、求められる最短鎖長を確定したのちに各アミノ酸残基の活性発現に対する相対的寄与を評価することとした。これには常法であるアラニンスキャン、すなわち各アミノ酸残基を一つずつアラニンに置換し活性を測定することで、それぞれの側鎖の重要性を評価するものとした。但し、ロイシノスタチン A には側鎖として 2 つのメチル基をもつ Aib が含まれており、これに関しそれぞれのメチル基と活性との関連を示すべく、D-アラニンを導入したものも合成の上評価を行った。

また、従来からロイシノスタチン類にはミトコンドリア呼吸鎖関連酵素・complex V に対する阻害活性が知られている。当該活性と間質細胞共存下のがん細胞の増殖阻害活性との関連を、IGF-I 発現量の変化を中心に調べることにした。

4. 研究成果

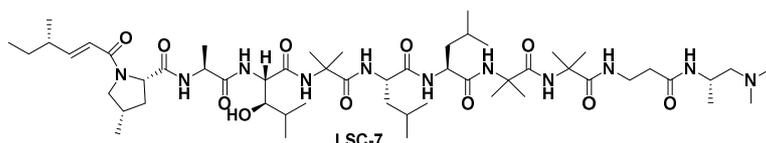


ロイシノスタチン A については複雑な構造を有する異常アミノ酸側鎖の構造にも興味をもち、所属研究室で開発されてきた触媒的不斉反応四種を鍵工程として用いた全合成を達成していたが、本課題開始直後に論文発表を行った。続いてこの合成ルートを利用し SAR 研究を実施した¹⁰。

まず初めに N 末端、および C 末端のアミノ酸残基を順次短縮させたいわゆる "truncated peptide" を合成した。いずれの末端のアミノ酸残基を除いた化合物も弱い増殖阻害活性にとどまり、その強度は最大でも親化合物の 62 分の 1 であった。すなわち、ロイシノスタチン A によるがん-間質相互作用への干渉にはノナペプチド構造全体が重要な役割を果たしていることが明らかになった。

続いて、アラニンスキャンでは 1 箇所を除き活性低下がみられたが、中でも HyLeu, Aib1, Leu2 の側鎖（上図）の寄与が特に大きいことも判明し、それぞれ 450 分の 1, 120 分の 1, 170 分の 1 の活性強度となった。一方で、Aib3 の側鎖メチル基のもう一方を除き D-アラニンとしたものも 100 分の 1 まで活性を減じたものの、L-アラニンとした場合はほぼ活性を維持した。ロイシノスタチン A の結晶構造から¹¹、本化合物は α -ヘリックス構造をとることが知られている。Aib のほか、L-アラニンも当該二次構造形成を促進する因子とされ、らせん配座と生物活性の相関も示唆される。今後の重要な研究課題となった。

また、ロイシノスタチン A を構成するアミノ酸残基の中で、AHMOD と HyLeu は複雑で特徴的な構造を有し、生物活性発現に対する寄与には興味を持たれる。全合成への取り組みの途上、AHMOD の水酸基に関しエピマーに相当する化合物も合成されており、その共培養下での増殖阻害活性は親化合物の約 3 分の 1 に低下することが見いだされた。今回は HyLeu 側鎖についても SAR 研究を行った。その結果、水酸基を除きイソロイシンとしたものには、ほぼ活性に変化が見られないことが判明した。一方で末端のメチル基 2 つを除きスレオニンとした場合は活性が 4 分の 1 まで減弱する。以上の結果は、AHMOD と HyLeu の水酸基は、水素結合などを通じ標的分子との相互作用を決定づけるほどの役割は果たしていないことを示唆している。特に HyLeu の水酸基は相互作用と直接関連がない可能性が高い。他方、HyLeu の側鎖の高さは一定程度活性発現に関係するといえる。



上記の SAR を進めていく中で、前立腺がん由来の DU-145 細胞を移植したマウスを用いた動物実験においてロイシノスタチン A が in vivo 抗腫瘍活性を示すことがわかった。また類縁体・LCS-7 (上図)にも in vivo 抗腫瘍活性が確認された。ここで、ロイシノスタチン関連化合物によるがん-間質相互作用への干渉のメカニズムに関し検討を進めた。ロイシノスタチン A が電子伝達系 complex V の阻害剤であることはよく知られているが、今回、LCS-7 にも complex V の阻害活性が確認された。前立腺がん由来の DU-145 細胞と対応する線維芽細胞(間質細胞)・PrSC を共存させ培養したものに LCS-7 を作用させると、PrSC の IGF-I の発現が低下し、がん細胞の増殖が抑制されることを明らかにした¹¹。現時点では LCS-7 が PrSC の電子伝達系 complex V を阻害することで増殖阻害に至る一連の減少を惹起していると考えており、間質に由来する抗がん剤の創薬標的候補(complex V)を提示することとなった。なお、これをサポートする研究として結晶構造に基づく計算化学的手法を用い、LCS-7 を含むロイシノスタチン A 誘導体と complex V との相互作用モデルを提唱した。

以上、ロイシノスタチン A 関連化合物の研究を通じ、ミトコンドリア呼吸鎖関連酵素が正常細胞由来の創薬標的となりうることを明らかにしてきたが、一方で強力な毒性発現の回避には成功していない。今後は complex V 阻害剤から創薬リードを提示すべく、ロイシノスタチン類の多彩な生物活性から毒性の原因となるものを除く方針で SAR 研究を継続する予定である。

5. 参考文献

1. C.-P. Liao, H. Adisetiyo, M. Liang, P. Roy-Burman, *Cancer Res.* **2010**, *70*, 7294.
2. I. Malanchi, A. Santamaria-Martinez, E. Susanto, H. Peng, H. A. Lehr, J. F. Delaloye, J. Huelsken, *Nature* **2012**, *481*, 85.
3. R. Straussman, T. Morikawa, K. Shee, M. Barzily-Rokni, Z. R. Qian, J. Du, A. Davis, M. M. Mongare, J. Gould, D. T. Frederick, Z. A. Cooper, P. B. Chapman, D. B. Solit, A. Ribas, R. S. Lo, K. T. Flaherty, S. Ogino, J. A. Wargo, T. R. Golub, *Nature*, **2012**, *487*, 500.
4. M. Kawada, H. Inoue, S.-i. Ohba, T. Masuda, I. Momose, D. Ikeda, *Int. J. Cancer*, **2010**, *126*, 810.
5. P. Gopinath, T. Watanabe, M. Shibasaki, *Org. Lett.* **2012**, *22*, 231.
6. M. Iwata, R. Yazaki, Y. Suzuki, N. Kumagai, M. Shibasaki, *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 18244.
7. M. Takamura, Y. Hamashima, H. Usuda, M. Kanai, M. Shibasaki, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2000**, *39*, 1650.
8. H. Sasai, T. Tokunaga, S. Watanabe, T. Suzuki, N. Itoh, M. Shibasaki, *J. Org. Chem.*, **1995**, *60*, 7388.
9. H. Abe, H. Ouchi, C. Sakashita, M. Kawada, T. Watanabe, M. Shibasaki, *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 11792.
10. T. Ohishi, H. Abe, C. Sakashita, U. Saqib, M. S. Baig, S.-i. Ohba, H. Inoue, T. Watanabe, M. Shibasaki, M. Kawada, *Int. J. Cancer*, **2020**, *146*, 3474.
11. S. Cerrini, D. Lamba, A. Scatturin, G. Ughetto, *Biopolymers* **1989**, *28*, 409.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Abe, H.; Ouchi, H.; Sakashita, C.; Kawada, M.; Watanabe, T.; Shibasaki, M.	4. 巻 23
2. 論文標題 Catalytic Asymmetric Total Synthesis and Stereochemical Revision of Leucinostatin A, a Modulator of Tumor-Stroma Interaction	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Chem. Eur. J.	6. 最初と最後の頁 11792-11796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/chem.201703239	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Abe, H.; Kawada M.; Sakashita, C.; Watanabe, T.; Shibasaki M.	4. 巻 74
2. 論文標題 Structure-activity relationship study of leucinostatin A, a modulator of tumor -stroma interaction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Tetrahedron	6. 最初と最後の頁 5129-5137
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tet.2018.05.064	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 渡辺 匠, 柴崎 正勝	4. 巻 76
2. 論文標題 抗結核薬および抗がん剤のリード創製を志向した天然物の触媒的不斉合成	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 有機合成化学協会誌	6. 最初と最後の頁 781-791
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5059/yukigoseikyokaisi.76.781	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ohishi, T.; Abe, H.; Sakashita, C.; Saqib, U.; Baig, M. S.; Ohba, S.-i.; Inoue, H.; Watanabe, T.; Shibasaki, M.; Kawada, M.	4. 巻 146
2. 論文標題 Inhibition of mitochondria ATP synthase suppresses prostate cancer growth through reduced insulin like growth factor 1 secretion by prostate stromal cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int. J. Cancer	6. 最初と最後の頁 3474-3484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.32959	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takumi Watanabe
2. 発表標題 Catalytic asymmetric total synthesis of leucinostatin A
3. 学会等名 ワルシャワ大学講演会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 阿部光, 大内仁志, 坂下千春, 川田学, 渡辺匠, 柴崎正勝
2. 発表標題 がん-間質相互作用を制御する天然物ロイシノスタチンAの触媒的不斉全合成
3. 学会等名 第59回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 阿部光, 大内仁志, 坂下千春, 川田学, 渡辺匠, 柴崎正勝
2. 発表標題 がん-間質相互作用に干渉する天然物ロイシノスタチンAの全合成, および類縁体の構造活性相関
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡辺匠
2. 発表標題 抗感染症薬および抗がん剤のリード創製を指向した生物活性天然物の化学的研究
3. 学会等名 日本薬学会第138年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡辺匠
2. 発表標題 天然物創薬を志向した有機合成 抗感染症薬および抗がん剤のリード創製を目指して
3. 学会等名 早稲田大学理工学術院講演（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 阿部光，川田学，坂下千春，大石智一，大庭俊一，井上裕幸，渡辺匠，柴崎正勝
2. 発表標題 がん-間質相互作用に干渉する天然物ロイシノスタチンA類縁体の構造活性相関研究
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takumi Watanabe
2. 発表標題 Leucinostatin A, a Modulator of Tumor-Stroma Interaction: Catalytic Asymmetric Synthesis, Stereochemical Revision, and Structure-Activity Relationship Study
3. 学会等名 International Congress on Pure & Applied Chemistry (ICPAC) Yangon 2019 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>IMC 微生物化学研究所 http://www.bikaken.or.jp/</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	川田 学 (Kawada Manabu) (20300808)	公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・部長 (72801)	
連携研究者	阿部 光 (Abe Hikaru) (10462269)	公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員 (72801)	