

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 24日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659020

研究課題名（和文）ADCC 様活性を有する人工低分子核酸抗体の開発研究

研究課題名（英文）Development of nucleic acid antibody with ADCC activity

研究代表者

市川 聡（ICHIKAWA SATOSHI）

北海道大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：60333621

研究成果の概要（和文）：2本鎖DNAに搭載するキナルドペプチンの全合成研究を行った。ピペコリン酸、ジアミノブタン酸等を用いたペプチド固相合成法により鎖状デカペプチドを合成した。大環状ラクタム化反応を行い、最後に、クロモフォアを導入してキナルドペプチンの初の全合成を達成した。次に前立腺がん細胞表面に特異的に発現している抗原のリガンドを結合した2本鎖DNAにキナルドペプチンを結合させて、人工低分子核酸抗体を作成した。

研究成果の概要（英文）：First total synthesis of quinaldopeptin has been accomplished via solid-phase peptide synthesis. Namely, the linear decapeptide was sequentially cyclized and attached by chromophores to give quinaldopeptin. It was revealed that quinaldopeptin binds to double-stranded DNA with high affinity. Finally, quinaldopeptin was installed to the double-stranded DNA to afford a nucleic acid antibody with ADCC activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,300,000	0	1,300,000
23年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	420,000	3,120,000

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：創薬化学

キーワード：有機化学、抗がん、天然物、核酸抗体

1. 研究開始当初の背景

ハーセプチン（乳癌）を代表とする昨今の抗体医薬品の臨床成功はめざましい。これらの多くは、ADCC 活性（antibody-dependent cellular cytotoxicity、抗体が標的と結合した後に、免疫細胞が、抗体を介して標的細胞を殺傷する活性）を主な抗腫瘍メカニズムとする。しかし、これらの製剤は、高い製造コストや、低生産性という問題点を有する。

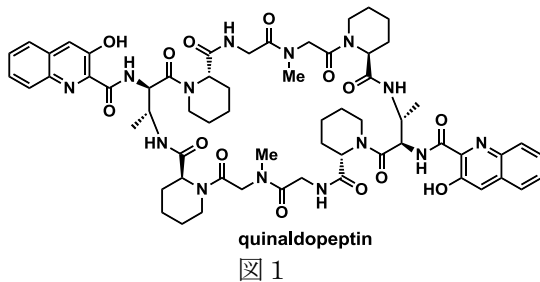
次世代創薬として注目を集めている核酸創薬において、抗体医薬品に相当するのがアプタマーである。アプタマーは標的に特異的に結合するDNAまたはRNAであり、抗体に比べて分子量が小さく、化学合成が容易である。抗体と同程度の結合能と特異性を有するが、ADCC 活性を持たない。アプタマーを「次世代の抗体医薬」とするためには、ADCC 様の機能付加が必要であった。

2. 研究の目的

上記の研究背景を踏まえて、殺細胞活性を有する「人工低分子核酸抗体」の作成を考案した。まず癌細胞表面に特異的に発現しているタンパクを標的としたアプタマーに、2本鎖 DNA を導入する。次に殺細胞活性を持つ化合物を DNA 部にインターカレートさせるものである。これまで申請者は、2本鎖 DNA のビスインターカレーターであり、強力な抗腫瘍活性 ($IC_{50} = 0.2 \text{ nM}$) を有する thiocoraline の全合成を達成している (*J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 2956, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 561.)。この人工低分子抗体は、1) アプタマー部位が標的タンパクの特異的な認識を、2) DNA-化合物複合体部位が活性分子の放出による殺細胞活性を担う。本分子が標的へ選択的に集積することで、癌細胞周辺の化合物濃度を高め、癌細胞選択的な活性が期待できる。これは抗体が有する ADCC 活性に相当し、抗体機能を有する人工核酸抗体になり得る。2本鎖 DNA のビスインターカレーターとしては、キナルドペプチンを選択した。

3. 研究の方法

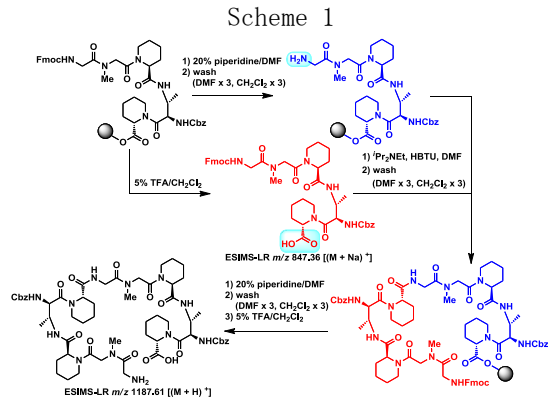
まず、2本鎖 DNA に搭載するビスインターカレーター天然物であるキナルドペプチン (図 1) の全合成を行った。キナルドペプチンが DNA にインターカレートした際に、クロモフォアの蛍光が消光することを利用して、2本鎖 DNA に対するキナルドペプチンの結合能を測定した。またスーパーコイル DNA の弛緩と、高濃度での再コイル化活性を評価した。最後に前立腺がん細胞表面に特異的に発現している抗原 (PSMA) のリガンドを結合した2本鎖 DNA にキナルドペプチンを結合させた。



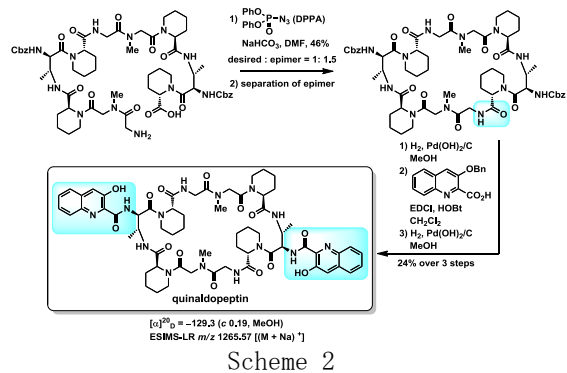
4. 研究成果

2本鎖 DNA に搭載するビスインターカレーター天然物であるキナルドペプチンの全合成を行った。構成非天然アミノ酸であるジアミノブタン酸は、クロトン酸ターシャリーブチルエステルを出発物質としてシャープレス不斉アミノヒドロキシル化反応、アミノ基の導入、保護基を適切に変換することで合成した。合成したジアミノブタン酸とピペ

コリン酸、グリシルサルコシンを用いたペプチド固相合成法により鎖状デカペプチドを合成した (Scheme 1)。



N, C-両末端の保護基を除去して得られるペプチドに対して、大環状ラクタム化反応を検討した。その結果、環化体を収率 45%で得ることができたが、環化の際に異性化が進行し、望みの立体を持つ環化体とそのエピマーが 1 : 1.5 の比で生成した。最後に、クロモフォアを導入してキナルドペプチンの初の全合成を達成した (Scheme 2)。また各種誘導体も同様の手法にて合成した。



キナルドペプチンが DNA にインターカレートした際に、クロモフォアの蛍光が消光することを利用して (図 2)、2本鎖 DNA に対するキナルドペプチンの結合能を測定した。その結果、配列選択性は見られないものの、高い DNA 結合能 ($K_d = 1.45\text{--}2.58 \times 10^{-7} \text{ M}$) を示す事がわかった (表 1)。

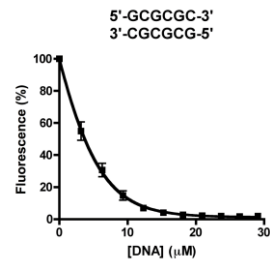


図 2

binding constant and ΔG of quinaldopeptin

sequence	K_b (M^{-1})	ΔG (kcal mol $^{-1}$)
5'-GCATGC-3' 3'-CGTACG-5'	1.48×10^7	-9.8
5'-GCGCGC-3' 3'-CGCGCG-5'	2.53×10^7	-10.1
5'-GCTAGC-3' 3'-CGATCG-5'	1.45×10^7	-9.7
5'-GCCGCGC-3' 3'-CGGCGCG-5'	1.52×10^7	-9.8

* ΔG was calculated with the equation; $\Delta G = -RT \ln K_b$

表 1

またキナルドペプチンは、スーパーコイル DNA の弛緩と、高濃度での再コイル化活性を示した (図 3)。

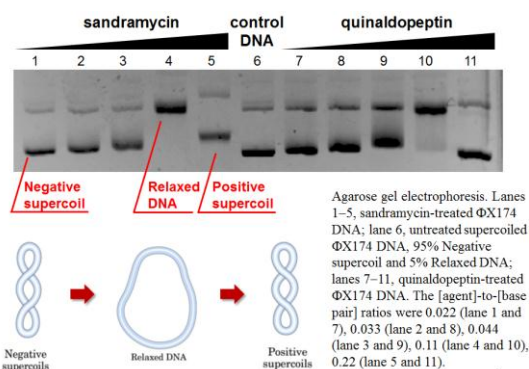


図 3

最後に前立腺がん細胞表面に特異的に発現している抗原 (PSMA) のリガンドを結合した 2 本鎖 DNA にキナルドペプチンを結合させて、人工低分子核酸抗体を作成することができた。現在各種生物活性評価を行っている。

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 12 件)

- ① Okamoto, Kazuya; Sakagami, Masahiro; Feng, Fei; Togame, Hiroko; Takemoto, Hiroshi; Ichikawa, Satoshi*; Matsuda Akira.* Total Synthesis and Biological Evaluation of Pacidamycin D and Its 3'-Hydroxy Analogue. *J. Org. Chem.*, 2012, 77, 1367-1377. 査読有、DOI: 10.1021/jo202159q
- ② Muranaka, Kazuhiro; Ichikawa, Satoshi* and Matsuda, Akira.* Development of the Carboxamide Protecting Group, 4-(*tert*-Butyldimethylsiloxy)-2-metho-

xybenzyl. *J. Org. Chem.*, 2011, 76, 9278-9293. 査読有、DOI: 10.1021/jo201495w

- ③ Okamoto, Kazuya; Sakagami, Masahiro; Feng, Fei; Togame, Hiroko; Takemoto, Hiroshi; Ichikawa, Satoshi*; Matsuda Akira*. Total Synthesis of Pacidamycin D by Cu^(I)-Catalyzed Oxy Enamide Formation. *Org. Lett.*, 2011, 13, 5240-5243. 査読有、DOI: 10.1021/o1202124b
- ④ Tanino, Tetsuya; Al-Dabbagh, Bayan; Mengin-Lecreulx, Dominique; Bouhss, Ahmed; Oyama, Hiroshi; Ichikawa, Satoshi* and Matsuda, Akira. Mechanistic Analysis of Muraymycin Analogues: a Guide to the Design of MraY Inhibitors. *J. Med. Chem.* 2011, 54, 8421-8439. 査読有、DOI: 10.1021/jm200906r
- ⑤ Tanino, Tetsuya; Ichikawa, Satoshi* Matsuda, Akira. Synthesis of L-*epi*-Capreomycin Derivatives via C-H amination. *Org. Lett.*, 2011, 13, 4028-4031. 査読有、DOI: 10.1021/o1201527k
- ⑥ Furuita, Kyoko; Murata, Shunpei; Jee, Jun Goo; Ichikawa, Satoshi; Matsuda, Akira; Kojima, Chojiro.* Structural Feature of DNA Recognized by HMGB1. *J. Am. Chem. Soc.* 2011, 133, 5788-5790. 査読有、DOI: 10.1021/ja2013399
- ⑦ Sako, Yuki; Osada, Akiko; Ichikawa, Satoshi*; Matsuda, Akira.* Synthesis and Evaluation of 5-Substituted 9-Hydroxypyrrrolo[3,4-*c*]carbazole-1,3-(2*H*,6*H*)-diones as Check Point 1 Kinase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18, 7878-7889. 査読有、DOI: 10.1016/j.bmc.2010.09.042
- ⑧ Sekiguchi, Hironori; Muranaka, Kazuhiro; Osada, Akiko; Ichikawa, Satoshi*; Matsuda, Akira.* Efficient Synthesis of Hsp90 Inhibitor Dimers as Potential Antitumor Agents. *Bioorg. Med. Chem.* 2010, 18, 7732-5737. 査読有、DOI: 10.1016/j.bmc.2010.05.075
- ⑨ Tanino, Tetsuya; Ichikawa, Satoshi*; Al-Dabbagh, Bayan; Bouhss, Ahmed; Matsuda, Akira.* Synthesis and Biological Evaluation of Muraymycin Analogues as Potential Anti-Drug-Resistant Bacterial. *ACS Med. Chem. Lett.* 2010, 1, 258-262. 査読有、DOI: 10.1021/ml100057z
- ⑩ Ii, Kensuke; Ichikawa, Satoshi*; Al-Dabbagh, Bayan; Bouhss, Ahmed;

Matsuda, Akira.* Function-oriented Synthesis of Simplified Caprazamycins: Discovery of Oxazolidine-containing Uridine Derivatives as Antibacterial Agents against Drug-resistant Bacteria. *J. Med. Chem.* 2010, *53*, 3793-3813. 査読有、DOI: [10.1021/jm100243n](https://doi.org/10.1021/jm100243n)

- ⑪ Kaysser, Leonard; Eitel, Kornelia; Tanino, Tetsuya; Siebenberg, Stefanie; Matsuda, Akira; Ichikawa, Satoshi; Gust, Bertolt.* A new ASST-type sulfotransferase involved in liponucleoside antibiotic biosynthesis in Streptomyces. *J. Biol. Chem.* 2010, *285*, 12684-12694. 査読有、DOI: [10.1074/jbc.M109.094490](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.094490)
- ⑫ Tanino, Tetsuya; Ichikawa, Satoshi*; Shiro, Motoo; Matsuda, Akira.* Total Synthesis of (·)-Muraymycin D2 and Its Epimer. *J. Org. Chem.* 2010, *75*, 1366-1377. 査読有、DOI: [10.1021/jo9027193](https://doi.org/10.1021/jo9027193)

[学会発表] (計 16 件)

- ① 岡村 拓也、市川 聡、松田 彰、抗腫瘍活性天然物キナルドペプチンの構造活性相関研究、日本薬学会第 132 年会、2012/3/31、北海道大学 (札幌)
- ② 市川 聡、松田 彰、Development of Antibacterial Agents Active against Drug Resistant Bacteria Based on Natural Products、AIMECS11 8th AFMC International Medicinal Chemistry、2011/12/1、Keio Plaza Hotel (Tokyo)
- ③ 片山 勝史、市川 聡、松田 彰、抗腫瘍活性環状ペプチドサンドラマイシンの合成研究、第 53 回天然有機化合物討論会、2011/9/29、大阪国際交流センター (大阪)
- ④ 片山 勝史、市川 聡、松田 彰、サンドラマイシン誘導体の合成研究、第 23 回万有札幌シンポジウム、2011/7/2、北海道大学 (札幌)
- ⑤ 村中 一大、市川 聡、松田 彰、新規カルボキサミド保護基 4-(tert-butyl)dimethylsiloxy)-2-methoxybenzyl (SiMB) 基の開発と環化促進補助基としての応用、第 9 回次世代を担う有機化学シンポジウム、2011/5/1、日本薬学会会長井記念館 (東京都)

[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

http://www.pharm.hokudai.ac.jp/yakka/Matsuda_Lab/Matsuda_Lab_Home.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者
市川 聡 (ICHIKAW SATOSHI)
北海道大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号 : 60333621

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし