

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K01802

研究課題名(和文) 選択的キナーゼ阻害剤の創製を指向したラメラリン系軸不斉分子の開発

研究課題名(英文) Development of lamellarin type axially chiral molecules aiming at the creation of selective kinase inhibitors

研究代表者

福田 勉 (FUKUDA, Tsutomu)

長崎大学・工学研究科・助教

研究者番号：80295097

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)：選択的キナーゼ阻害剤の創製を指向し、軸不斉16-クロロおよび16-ブロモラメラリンNを開発した。7種類のキナーゼに対する阻害活性評価の結果、16-クロロおよび16-ブロモラメラリンNの(aR)-体についてはCK1 およびCLK3を除く5種のキナーゼを非選択的かつ強力に阻害した。一方(aR)-体についてはDYRK1A, GSK-3, PIM1 に対してのみ選択的な阻害活性を示した。

研究成果の概要(英文)：Axially chiral 16-chloro and 16-bromolamellarins N have been developed for the creation of selective kinase inhibitors. The kinase inhibitory activities of these enantiomers were evaluated on seven protein kinases. The (aR)-isomers of 16-chloro and 16-bromolamellarins N exhibited potent but non-selective inhibition on five protein kinases except for CK1 and CLK3. On the other hand, the (aS)-isomers showed selective inhibition against only DYRK1A, GSK-3, and PIM1.

研究分野：有機合成化学、創薬化学

キーワード：ラメラリン 軸不斉 アトロブ異性体 プロテインキナーゼ ハロゲン化

## 1. 研究開始当初の背景

キナーゼはタンパク質分子をリン酸化する酵素で、細胞の分化、増殖、接着や免疫反応などにかかわるシグナル伝達に関与しており、キナーゼの機能異常は様々な病気の原因となる。本研究課題にて着目した CMGC ファミリーのキナーゼには、CDK (cyclin dependent kinase), GSK-3 (glycogen synthase kinase 3), DYRK1A (dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 1A) などが属している。特に GSK-3 $\beta$  や DYRK1A は、微小管構成タンパク質タウの過剰リン酸化に関与し、脳細胞の神経原繊維変化をもたらすため、アルツハイマー病や神経変性疾患のターゲットとして注目されている [総説: *ACS Chem. Neurosci.* **2012**, *3*, 857; *Ageing Res. Rev.* **2014**, *15*, 116]。故に、GSK-3 $\beta$  や DYRK1A の選択的阻害剤の開発は、創薬化学上重要な課題のひとつである。

海洋天然物ラメラリン N は、がんやアルツハイマー病などの神経変性疾患の発症に関与する CMGC ファミリーキナーゼ類 (CDK1/cyclin B, CDK5/p25, GSK-3 $\alpha/\beta$ , PIM1, DYRK1A, CLK3 等) を非選択かつ強力に阻害することが知られている [*Marine Drugs* **2008**, *6*, 514-527] (図 1)。

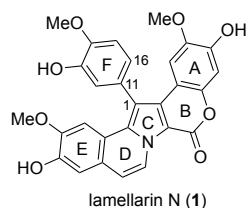


図 1. ラメラリン N (1)

研究代表者らは、ラメラリンの特異的な骨格に起因する軸不斉構造に着目し、ラメラリン N (1) の 16 位にメチル基を導入した 16-メチルラメラリン N (2) がアトロプ異性体 (aS)-2a および (aR)-2b に分割できること、またそれらのキナーゼ阻害選択性に違いがあることを見出した [*J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 7289-7301] (図 2)。

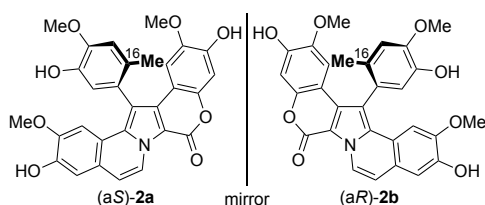


図 2. 16-メチルラメラリン N (2) のアトロプ異性体 (aS)-2a および (aR)-2b

## 2. 研究の目的

先に述べた知見から、ラメラリンの軸不斉構造と 16 位置換基が CMGC キナーゼ (特に

GSK-3 $\beta$  や DYRK1A) の阻害選択性に重要であることが示唆された。そこで本研究の目的は、選択的 CMGC キナーゼ阻害剤の創製を指向したラメラリン系軸不斉分子の開発に設定した。なお本研究の遂行にあたっては、ラメラリン 16 位に導入する置換基の選択が重要となる。そこで今回、ハロゲノ基に着目した。ここでハロゲノ基は、メチル基と同程度のファンデルワールス半径を持つ [*The nature of the chemical bond and the structure of molecules and crystals* (1960)]。一方でハロゲノ基は、ルイス塩基 (O, N, S 等) に対して指向性のあるハロゲン結合を形成することが報告されている [*J. Med. Chem.* **2013**, *56*, 1363]。従って 16-クロロラメラリン N (3) および 16-ブロモラメラリン N (4) は、16-メチルラメラリン N (2) と類似した立体的特性を持つため、アトロプ異性体に分割可能だと予想される。また、ハロゲン結合に由来するキナーゼに対する相互作用の違いから、16-クロロラメラリン N (3) および 16-ブロモラメラリン N (4) は、16-メチルラメラリン N (2) とは異なるキナーゼ阻害活性および選択性を示すものと期待される。以上を踏まえ、本研究では、16-クロロラメラリン N (3) のアトロプ異性体 (aS)-3a および (aR)-3b、16-ブロモラメラリン N (4) のアトロプ異性体 (aS)-4a および (aR)-4b を合成し、キナーゼ活性評価を行うこととした (図 3)。

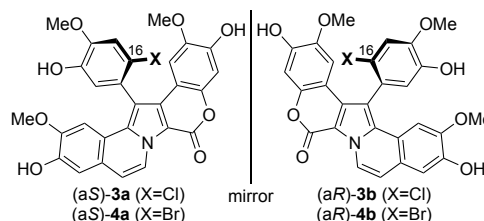


図 3. 16-クロロラメラリン N (3) および 16-ブロモラメラリン N (4) のアトロプ異性体

## 3. 研究の方法

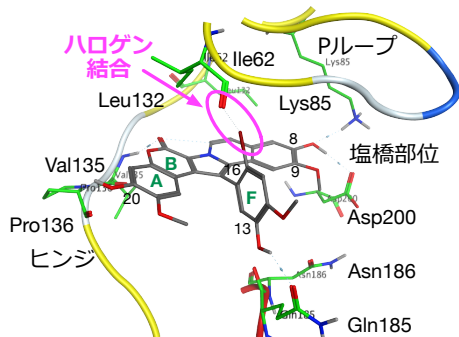
化学合成は福田 (研究代表者) が行った。またドッキングシミュレーションは重光 (連携研究者) の監修の下で実施した。

## 4. 研究成果

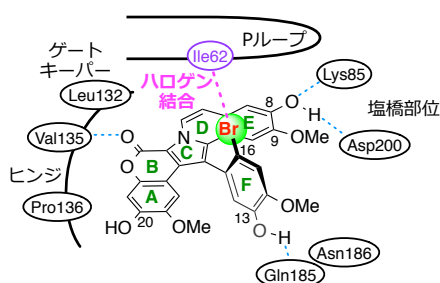
### (1) ドッキングシミュレーション

まず、*in silico* ドッキングシミュレーションによるキナーゼに対する阻害モード解析を行った。ここでは、GSK-3 $\beta$  とスタウロスポリンとの共結晶 X 線構造 [PDB ID: 1Q3D] のスタウロスポリンを (aS)-4a で置換し、MOE プログラムを用いて複合体の最適化を行った (図 4)。その結果、(aS)-4a は、平面 5 環性骨格の E 環部を ATP 結合ポケット奥の疎水性領域に、A 環部を親水性開口部に配向させ結合していることが明らかになった。また、ラクトン環 (B 環) カルボニル基はヒンジ領

域にある Val135 と、E 環部の 8 位ヒドロキシ基は Lys85-Asp200 塩橋部の Lys85 および Asp200 と、また F 環部 13 位ヒドロキシ基は Gln185 とそれぞれ水素結合していることも明らかになった。さらに F 環部 16 位プロモ基が N 末端ローブ側の P ループ上の Ile62 とハロゲン結合を形成することが示唆された。



(a) ATP 結合ポケットの拡大図



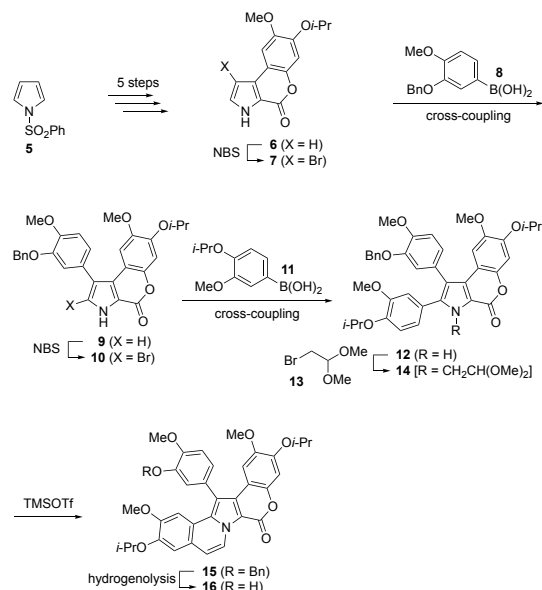
(b) ATP 結合ポケットの模式図

図 4. (aS)-**4a** と GSK-3 $\beta$  とのドッキングモデル

## (2) ラメラリン系軸不斉分子の合成

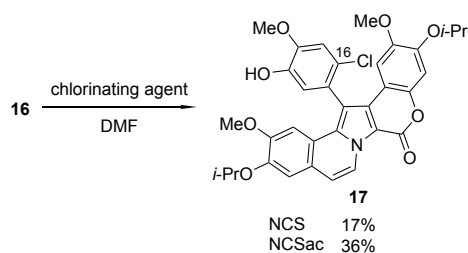
まず、ラメラリン F 環部 16 位へのハロゲン基導入の基質となる鍵中間体 **16** の合成を行った (式 1)。なおラメラリン A-C 環に相当する [1]ベンゾピラノ [3,4-*b*]ピロール-4(3*H*)-オン **6** については、研究代表者らが開発した手法 [J. Org. Chem. 2009, 74, 8143-8153] に従い、市販のピロールから大量合成可能な化合物 **5** を出発物質とし、五段階で合成した。その後、**6** をジクロロメタン-酢酸混合溶媒中にて *N*-ブロモスクシイミド (NBS) と反応させることで、1 位がブromo化された **7** を得た。次にブromo体 **7** とアリールボロン酸 **8** との鈴木-宮浦クロスカップリングを行い、**9** へと変換した。その後、**9** をピリジン存在下、ジメチルホルムアミド (DMF) 中にて NBS で処理したところ、2 位がブromo化された **10** が得られた。引き続きブromo体 **10** とアリールボロン酸 **11** との鈴木-宮浦クロスカップリングにより、1 位および 2 位に異種のアリール基を持つ **12** を得ることができた。次に **12** をブromoアセトアルデヒドジメチルアセタール **13** で処理することで、ピロール窒素に 2,2-ジメトキシエチル基

が導入された **14** へと変換した。さらに、化合物 **14** を TMSOTf で処理することにより、五環性化合物 **15** を得た。最後に **15** のベンジル基を除去することで **16** の合成を達成した。



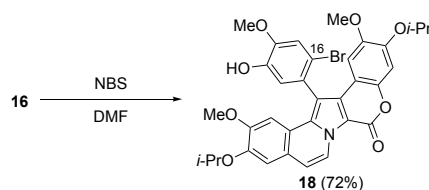
式 1. ラメラリン誘導体 **16** の合成

引き続き、**16** の 16 位選択的クロロ化について検討した (式 2)。当初、クロロ化剤として *N*-クロロスクシイミド (NCS)、溶媒として DMF を使用した。その結果、16 位がクロロ化された **17** が 17%と低収率であった。種々反応条件を検討した結果、*N*-クロロサッカリン (NCSac) をクロロ化剤として使用した場合に、収率に改善の余地はあるものの **17** が 36%の収率で得られた。



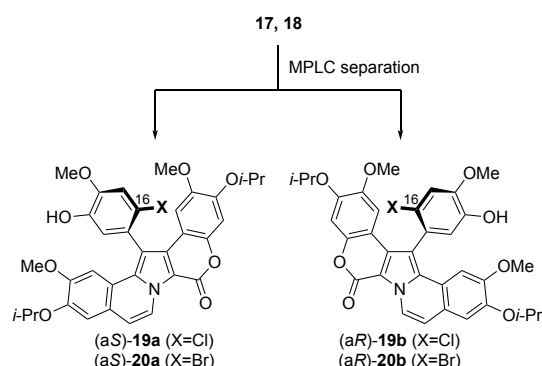
式 2. ラメラリン誘導体 **16** に対する 16 位選択的クロロ化

一方、16 位選択的ブromo化についても検討した (式 3)。その結果、ブromo化剤として *N*-ブロモスクシイミド (NBS)、溶媒として DMF を使用した場合、目的とする 16 位ブromo化体 **18** が 72%の収率で得られた。



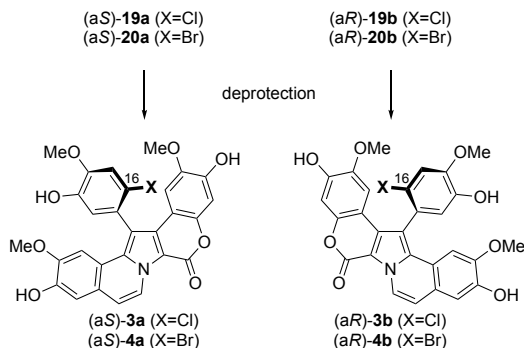
式 3. ラメラリン誘導体 **16** に対する 16 位選択的ブromo化

得られた16位ハロゲン体 **17** および **18** に対して光学活性カラムを使用した中圧液体クロマトグラフィー (MPLC) により分割を行った (式4)。その結果、アトロプ異性体 (a*S*)-**19a** および (a*R*)-**19b**、(a*S*)-**20a** および (a*R*)-**20b** へと分割できた。



式4. 16位ハロゲン体 **17** および **18** のMPLCによる分割

その後、得られた (a*S*)-**19a**、(a*R*)-**19b**、(a*S*)-**20a**、(a*R*)-**20b** それぞれについてイソプロピル基の脱保護を行うことで、目的とする16-クロロラメラリンN (**3**) のアトロプ異性体 (a*S*)-**3a** および (a*R*)-**3b**、16-ブロモラメラリンN (**4**) のアトロプ異性体 (a*S*)-**4a** および (a*R*)-**4b** を得ることができた。



式5. イソプロピル基の脱保護による目的化合物への変換

### (3) キナーゼ活性評価

次に、分割した16-クロロラメラリンN (**3**) のアトロプ異性体 (a*S*)-**3a** および (a*R*)-**3b**、16-ブロモラメラリンN (**4**) のアトロプ異性体 (a*S*)-**4a** および (a*R*)-**4b** について、CMGCファミリーキナーゼに属する7種類のプロテインキナーゼに対する阻害活性評価を実施した (表)。その結果、(a*R*)-**3b** および (a*R*)-**4b** は **1** と同様に、CK1ε および CLK3 を除くすべてのキナーゼを非選択的に強く阻害した。一方 (a*R*)-**3a** および (a*R*)-**4a** は、CDK2/cyclin A2, CDK5/p25, CK1ε, CLK3 に対して殆ど活性を示さず、DYRK1A, GSK-3β, PIM1 に対してのみ選択的な阻害活性を示した。

表. キナーゼ阻害活性評価

Kinase	Inhibition (%)				
	<b>1</b>	<b>3b</b>	<b>4b</b>	<b>3a</b>	<b>4a</b>
CDK2/CycA2	62.3	72.8	78.5	-2.6	-4.4
CDK5/p25	75.3	77.3	82.1	15.8	15.6
CK1ε	45.9	21.1	33.1	8.7	15.9
CLK3	59.3	31.2	33.9	7.8	9.1
DYRK1A	98.6	87.3	95.4	63.2	49.5
GSK-3β	96.2	97.4	98.3	61.3	62.2
PIM1	95.7	84.1	89.1	65.7	76.5

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

- ① [Tutomu Fukuda](#), Minoru Komure, Gen Onodera, Masanari Kimura, Masatomo Iwao, Synthesis of 4,5-disubstituted pyrano[3,4-*b*]pyrrol-7(1*H*)-ones via Sonogashira-Hagihara cross-coupling of *N*-benzenesulfonyl-3-bromo-1*H*-pyrrole-2-carboxylate and subsequent iodine-mediated cyclization, *Heterocycles*, 査読有, Vol.97, 2018, 印刷中, DOI: 10.3987/COM-18-S(T)68
- ② [Tutomu Fukuda](#), Teppei Umeki, Keiji Tokushima, Gao Xiang, Yuki Yoshida, Fumito Ishibashi, Yusuke Oku, Naoyuki Nishiya, Yoshimasa Uehara, Masatomo Iwao, Design, synthesis, and evaluation of A-ring-modified lamellarin N analogues as noncovalent inhibitors of the EGFR T790M/L858R mutant, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 査読有, Vol.25, 2017, pp. 6563-6580, DOI:10.1016/j.bmc.2017.10.030
- ③ [Tutomu Fukuda](#), Takatoshi Katae, Issei Harada, Masatomo Iwao, Synthesis of Lamellarins via Regioselective Assembly of 1,2-Diarylated [1]Benzo-pyrano[3,4-*b*]pyrrol-4(3*H*)-one Core, *Heterocycles*, 査読有, Vol.95, 2017, pp. 950-971, DOI:10.3987/COM-16-S(S)63 <http://hdl.handle.net/10069/37532>
- ④ [Tutomu Fukuda](#), Mizuho Anzai, Masatomo Iwao, Regioselective Synthesis of 2,4-Differentially Arylated Pyrroles and Its Application to the Synthesis of Lamellarins, *Heterocycles*, 査読有, Vol.93, 2016, pp. 593-612, DOI:10.3987/COM-15-S(T)49 <http://hdl.handle.net/10069/37531>

[学会発表] (計17件)

- ① 西上真由, 小野寺玄, 福田勉, 作田絵里, 馬越啓介, 木村正成, 新規ビスピリジン配位子を有するルテニウム錯体の合

- 成と構造、日本化学会第 98 春季年会 (2018)、2018 年
- ② 神路祇里歩、二ノ方亮、小野寺玄、福田勉、木村正成、パラジウム触媒による 3-ヒドロキシ-4-ペンテン酸を共役ジエン等価体として用いたアルデヒドとのカップリング反応の開発、日本化学会第 98 春季年会 (2018)、2018 年
- ③ 山下健太朗、福田勉、小野寺玄、木村正成、岩尾正倫、プロモアザラメラリン N 誘導体の合成と光学分割、日本化学会第 98 春季年会 (2018)、2018 年
- ④ 福田勉、光学活性ヨードラメラリン N 誘導体の合成、第 20 回ヨウ素学会シンポジウム、2017 年
- ⑤ 福田勉、石橋郁人、岩尾正倫、奥裕介、西谷直之、上原至雅、且慎吾、矢守隆夫、L858R/T790M/C797S 変異に有効な EGFR チロシンキナーゼ阻害剤、第 1 回 SN ワークショップ、2017 年
- ⑥ 山下健太朗、中原茜、石橋郁人、岩尾正倫、福田勉、水溶性アザラメラリン N 誘導体の合成、第 54 回化学関連支部合同九州大会、2017 年
- ⑦ 福田勉、石橋郁人、岩尾正倫、奥裕介、西谷直之、上原至雅、且慎吾、矢守隆夫、L858R/T790M/C797S 変異に有効な EGFR チロシンキナーゼ阻害剤、第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2017 年
- ⑧ 吉岡直樹、松尾祐理、松岡冬樹、福田勉、岩尾正倫、BIQ 骨格を持つ新規トポイソメラーゼ I 阻害剤の設計・合成・活性評価、第 34 回メディスナルケミストリーシンポジウム、2016 年
- ⑨ 吉岡美妃子、白川千尋、福田勉、岩尾正倫、軸不斉構造を持つ 12-および 16-クロロラメラリン N 誘導体の合成と分割、第 46 回複素環化学討論会、2016 年
- ⑩ 高翔、吉田祐樹、福田勉、岩尾正倫、海洋天然物ラメラリン N の 20 位および 21 位改変アナログの合成研究、第 53 回化学関連支部合同九州大会、2016 年
- ⑪ 吉岡美妃子、白川千尋、福田勉、岩尾正倫、12-および 16-クロロラメラリン N 誘導体の合成研究、第 53 回化学関連支部合同九州大会、2016 年
- ⑫ 吉岡直樹、松岡冬樹、福田勉、岩尾正倫、BIQ 骨格を持つ新規トポイソメラーゼ I 阻害剤の設計と合成、第 53 回化学関連支部合同九州大会、2016 年
- ⑬ 中原茜、吉田昇太、安在瑞穂、福田勉、石橋郁人、岩尾正倫、アザラメラリン N 誘導体の効率的合成、第 53 回化学関連支部合同九州大会、2016 年
- ⑭ 白川千尋、吉岡美妃子、福田勉、岩尾正倫、光学活性ハロゲノラメラリン N の合成と分割、日本化学会第 96 春季年会 (2016)、2016 年
- ⑮ 福田勉、白川千尋、岩尾正倫、軸不斉を持つプロモラメラリン N 誘導体の合成と

光学分割、第 45 回複素環化学討論会、2015 年

- ⑯ 安在瑞穂、福田勉、岩尾正倫、ポリアリールピロール誘導体の位置選択的合法の開発、第 52 回化学関連支部合同九州大会、2015 年
- ⑰ 白川千尋、福田勉、岩尾正倫、ラメラリン F 環部へのプロモ基の位置選択的導入と光学分割、第 52 回化学関連支部合同九州大会、2015 年

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：第四世代 EGFR チロシンキナーゼ阻害剤  
 発明者：岩尾正倫、福田勉、石橋郁人、上原至雅、西谷直之、奥裕介、且慎吾、矢守隆夫  
 権利者：国立大学法人 長崎大学、学校法人 岩手医科大学、公益財団法人 がん研究会  
 種類：特許  
 番号：特願 PCT/JP2018/013370  
 出願年月日：平成 30 年 3 月 29 日  
 国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：抗癌活性物質  
 発明者：岩尾正倫、石橋郁人、福田勉、長谷川寛夫  
 権利者：国立大学法人 長崎大学  
 種類：特許  
 番号：特許第 5888702 号  
 取得年月日：平成 28 年 2 月 26 日  
 国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等  
<http://www.cms.nagasaki-u.ac.jp/lab/yuuki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福田 勉 (FUKUDA, Tsutomu)  
 長崎大学・工学研究科・助教  
 研究者番号：80295097

(2) 連携研究者

重光 保博 (SHIGEMITSU, Yasuhiro)  
 長崎大学・工学研究科・准教授  
 研究者番号：50432969