

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05571

研究課題名(和文) コア2糖鎖を標的とした新たな癌悪性度診断法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel cancer malignancy diagnostic method that utilized core 2 oligosaccharide as a tumour marker

研究代表者

宮崎 達雄 (Miyazaki, Tatsuo)

新潟薬科大学・応用生命科学部・准教授

研究者番号：70410222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)： コア2糖鎖を利用した新規な癌悪性度診断法の確立を目指して、コア2糖鎖(分岐型三糖)の部分構造に相当する2種類のカルバ二糖をターゲットとして、必要なカルバ糖受容体および糖供与体の合成を検討した。

その結果、カルバ糖ブロックとしては、アノメリック位にヒドロキシ基を有する2種類のカルバ-β-D-ガラクトース受容体5, 14およびカルバ-N-アセチル-β-D-グルコース35の合成を達成した。一方、糖ブロックとしては、11工程で6位にトリフレート基を有するGalNAc供与体46の合成を達成した。3位にトリフレート基を有するGalNAc供与体の合成に関しては、GalNAc48の反転反応を検討中である。

研究成果の概要(英文)： For the establishment of a novel cancer malignancy diagnostic method that utilized core 2 oligosaccharide as a tumour marker, two kinds of carba-disaccharides 2 and 3 corresponding to the partial structure of core 2 oligosaccharide (branched trisaccharides) were targeted and the synthesis of the carbasugar acceptors and the sugar donors was examined.

As a result, as carba-sugar block, the synthesis of two kinds of carba-β-D-galactose acceptor 5 and 14 having a hydroxy group at anomeric position and carba-N-acetyl-β-D-glucose 35 were achieved.

On the other hand, as sugar block, the synthesis of GalNAc donor 46 having a triflate group at 6-position was achieved in 11 steps. About the synthesis of GalNAc donor having a triflate group at 3-position, the inversion reaction of GalNAc derivative 48 is examining.

研究分野：糖化学

キーワード：カルバ糖鎖 コア2糖鎖

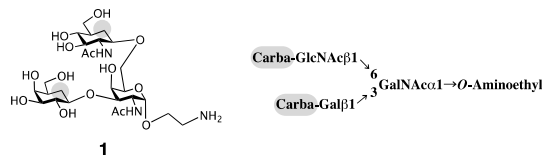
1. 研究開始当初の背景

糖転移酵素のひとつである C2GnT は O-結合型糖鎖の基本構造であるコア 1 糖鎖に N-アセチルグルコサミン残基を転移させル反応を触媒する。現在までに C2GnT-1, C2GnT-2 および IGnT の 3 種類が知られている。この酵素の発現は大腸癌(Shimodaira, Nakayama *et al. Cancer Res.* 1997)、肺癌 (Machida, Nakayama *et al. Cancer Res.* 2001)の悪性度および前立腺癌の再発率 (Hagisawa, Ohyama *et al. Glycobiology* 2005)と強い相関関係が認められている。また、膀胱癌においては C2GnT-1 の発現が体内の免疫機構から癌細胞を保護していることが明らかにされている (Tsuboi, Ohyama *et al. EMBO J.* 2011)。これらの実験データは C2GnT が癌の悪性度および再発に関連していることを強く示唆している。また、この C2GnT は尿中のムチン型タンパク質 MUC1 に分岐型コア 2 糖鎖を付加することが知られている。そのため、尿中の分岐型コア 2 糖鎖が定量できれば、簡単に癌の悪性度を診断できる手法となりえる。しかしながら、未だに分岐型コア 2 糖鎖を定量するよい方法が見出されていない。例えば、分岐型コア 2 糖鎖のモノクローナル抗体が作製できれば、本診断法の有効性を検証することが可能である。しかしながら、ヒト型糖鎖である分岐型コア 2 糖鎖は免疫原性が低い抗体を作製することが非常に困難である。そこで、これを解決するために、本申請課題では擬似糖鎖であるカルバ糖鎖を利用して抗コア 2 糖鎖モノクローナル抗体を作製することとしている。

カルバ糖鎖とは、天然型の糖の環酸素原子が炭素原子(メチレン基)に置き換わったカルバ糖を有する擬似糖鎖である。カルバ糖鎖の立体構造は天然型の糖鎖と酷似しており、かつ化学的に不安定なピラノース骨格から強固なシクロヘキサン骨格に代わるため、生体内の糖代謝酵素による分解反応に対して耐性をもつ。つまり、立体構造は天然型に似ているがメチレン基をもつために非ヒト型糖鎖であり、かつ生体内安定性に優れるので抗原提示細胞内において糖鎖構造の維持が期待できる。このような特長を有するカルバ糖鎖を抗原とすれば、これが免疫を誘起し、ヒトの天然型タンパク質糖鎖を識別できる抗体が作製できる可能性がある。このような理由より、カルバ糖鎖は、抗ヒト型糖鎖抗体を作製するための抗原として、最適な糖鎖ミミック分子であると考えている。

本申請課題では、分岐型コア 2 糖鎖の還元末端に位置する N-アセチル-グルコサミン残基とガラクトース残基の 2 つを相当するカルバ糖に置き換えたカルバ糖鎖 1 をデザインした。還元末端側に組み込んだアミノエ

チル基は、抗体を作製する際に必要となる KLH などのキャリアタンパク質を繋げるために利用する予定である。

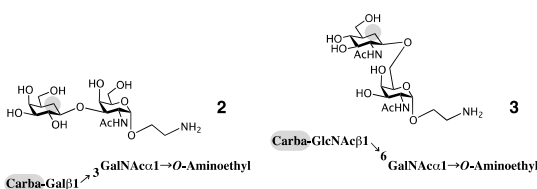


2. 研究の目的

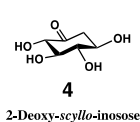
近年、糖タンパク質に分岐型コア 2 糖鎖構造を形成する糖転移酵素 C2GnT の発現量の増加が、いくつかの癌において悪性度と相関することが示唆されている。また、この酵素 C2GnT は尿中のムチン型タンパク質 MUC1 に分岐型コア 2 糖鎖を付加する機能をもつ。そのため、尿中の分岐型コア 2 糖鎖が定量できれば、簡単に癌の悪性度を診断する手法となりえる。そこで、生体内における安定性に優れた擬似糖鎖であるカルバ糖鎖を利用して抗コア 2 糖鎖モノクローナル抗体を作製し、患者尿検体中のコア 2 糖鎖の定量法を確立することを第一の研究目的とする。最終的には、コア 2 糖鎖量と癌悪性度の相関関係を調べ、コア 2 糖鎖の癌悪性度診断マーカーとしての可能性を検証することとなる。

3. 研究の方法

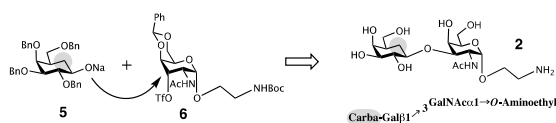
カルバ糖を含む擬似糖鎖がヒト型糖鎖の抗体作製の抗原として利用可能であるか否かを明らかとする。そのため、分岐型コア 2 糖鎖(三糖) 1 の部分構造に相当するカルバ二糖 2 および 3 を第一のターゲットとして合成する。合成完了後、還元末端のアミノエチル基を介してキャリアタンパク質を導入し、これらを抗原としてモノクローナル抗体の作製を検討する。その後、カルバ二糖の合成で得られた知見を利活用して、本申請課題のターゲットである分岐型コア 2 糖鎖のカルバ糖鎖 1 の合成に着手する。カルバ糖鎖 1 の合成が達成されれば、KLH を導入し、分岐型コア 2 糖鎖を認識するモノクローナル抗体の作製を検討する。さらに、得られた抗体を用いて、泌尿器癌患者のマッサージ尿検体中の MUC1 上のコア 2 糖鎖を定量し、その定量値と癌の悪性度の相関関係を調べ、コア 2 糖鎖の癌悪性度診断マーカーとしての可能性を明らかとする。



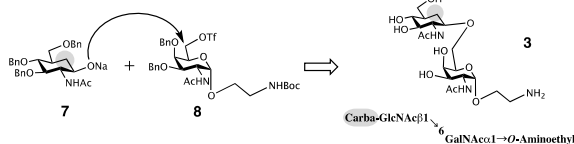
研究代表者（新潟薬科大学 宮崎達雄）の研究室では、バイオマスを原料に組換え大腸菌より生産した培養液から DOI 4 を簡便に生産する手法を確立している。これを鍵原料に必要となるカルバ糖部分を合成する。合成が完了したカルバ糖鎖 1~3 を利用した抗体作製および癌患者の尿検体中におけるコア 2 糖鎖の定量法の検討については、研究分担者（弘前大学 飛澤悠葵）が実施する予定である。具体的には、以下に記した 4 つの課題を検討する。



- (1) カルバ-β-D-ガラクトース受容体 5 と 3 位にトリフレート基を有する D-GulNAc 供与体 6 を合成し、求核的反転反応により、カルバ糖鎖 2 の合成を検討する。



- (2) カルバ-β-D-GlcNAc 受容体 7 と 6 位にトリフレート基を有する D-GalNAc 供与体 8 を合成し、求核的反転反応により、カルバ糖鎖 3 の合成を検討する。

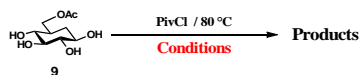


- (3) 上記(1), (2)より得られるカルバ糖鎖 2 と 3 にキャリアタンパク質である KLH を導入する手法を検討する。
- (4) 上記(3)より得られる 2 種類のカルバ糖鎖を含むネオグリコプロテインを免疫原として、モノクローナル抗体の作製を検討する。

4. 研究成果

- (1) 分子内アシル転移反応を鍵反応としたカルバ-β-D-ガラクトース受容体 14 の合成

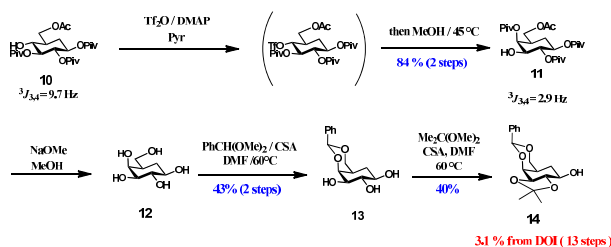
常法に従い DOI 4 から 7 工程（収率 47%）で 6-O-アセチル-カルバ-β-D-グルコース 9 を合成し、位置選択的ピバロイル化反応を試み



Entry	Conditions			Conversion Yield (%)					
	Solvents	Conc.	Time	di-O-Piv 1,3-	1,2,3-	1,3,4-	1,2,4-	per-O-Piv 1,2,3,4-	Total
1	Pyr	100 mM	3.75 h	n.d.	35%	22%	24%	13%	94%
2	Pyr	250 mM	3.75 h	n.d.	29%	23%	23%	22%	97%
3	Pyr	500 mM	3.75 h	n.d.	45%	10%	11%	34%	100%
4	Pyr / CH ₂ Cl ₂ = 1 / 1	100 mM	3.25 h	n.d.	38%	21%	22%	5%	86%
5	Pyr / CH ₂ Cl ₂ = 1 / 2	100 mM	4.25 h	6%	34%	18%	25%	10%	97%

n.d. : not detected

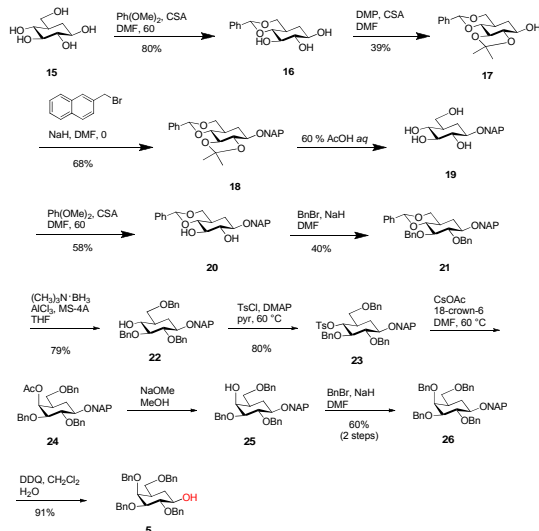
た。種々検討した結果として、基質濃度 500 mM、ピリジン溶媒中、反応温度 80 °C にて塩化ピバロイル（10 当量）を作用させると、目的の 1,2,3-tri-O-Piv 10 が収率 45% にて得られることがわかった。次いで、得られた 1,2,3-tri-O-Piv 体 10 を原料として分子内アシル転移反応によるガラクト型の 1,2,4-tri-O-Piv 体 11 の合成を試みた。この反応は、4 位のヒドロキシ基をトリフレート化した後、メタノール中で熱を加えることにより、4 位のトリフレート基の背後から 3 位のピバロイル基が分子内で求核攻撃することでオルソエステル体が生じ、その後、加水分解により、目的物が得られる反応である。1,2,3-tri-O-Piv 体 10 対し 10 当量の無水トリフレートを使用し、0 にて反応を行った。原料の消失を確認した後、メタノールを加え反応をクエンチし、次いで 45 に昇温した。その結果、収率 84% でガラクト型の 1,2,4-tri-O-Piv 体 11 を得ることに成功した。脱アシル化後、アセタール基で部分保護することで、アノメリック位にのみ遊離のヒドロキシ基を有するカルバ-β-D-ガラクトース受容体 14 の合成を達成した。



- (2) カルバ-β-D-ガラクトース受容体 5 の合成

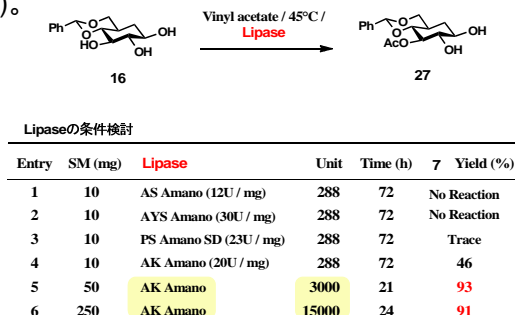
常法に従い DOI 4 から 8 工程（収率 47%）でカルバ-β-D-グルコース 15 を合成し、ベンジリデン化反応（収率 80%）、イソプロピリデン化反応を行った（収率 39%）。本反応は、位置選択性がほとんどなく同時に 1,2-O-イソプロピリデン体が生成するため低収率となる。しかしながら、副生成物は、2,3-O-イソプロピリデン体の原料として利用可能である。次いで、得られた 4,6-O-ベンジリデン-2,3-O-イソプロピロデン-5a-カルバ-β-D-グルコース 17 の遊離のヒドロキシ基ヘナフチルメチル基の導入後、両アセタール基を脱保護し、再度ベンジリデン化して（2 工程、収率 58%）、2,3-ジヒドロキシ体 20 を合成した。その後、得られた 2,3-ジヒドロキシ体 20 の 2 つのヒドロキシ基にベンジル基を導入し、ベンジリデン基の還元開裂反応を試み、2,3,6-O-ベンジル-1-O-(2-ナフチル)-5a-カルバ-β-D-グルコピラノース 22 へ変換した。収率は、それぞれ 40%、79% であった。次に得られた生成物の 4 位のヒドロキシ基をトシル化後、CsOAc による 4 位の立体反転反応を試みた。その結果、中程度の収率にて目的のカルバ-β-D-ガラクトース誘導体 24 を得ることがで

きた (収率 47%)。カルバ-β-ガラクトース **24** の化学構造は、 $J_{3,4}$ が 2.9 Hz、 $J_{4,5}$ が 1 Hz 以下であったことよりガラクト型であると決定した。続いて、合成したカルバ-β-ガラクトース **24** のアセチル基を脱保護し、4 位のヒドロキシ基にベンジル基を導入した (2 工程, 60%)。最後に、DDQ によりナフチルメチル基を脱保護し (収率 91%)、目的物であるカルバ-β-ガラクトース受容体 **5** を合成した。



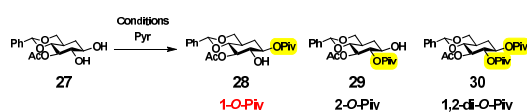
(3) カルバ-β-D-GlcNAc 受容体の合成検討

ベンジリデン体 **16** に対するリパーゼによる選択的アセチル化反応を検討した。リパーゼは、市販の AS アmano、AYS アmano、PS アmano SD、AK アmano を使用した。10 mg のベンジリデン体 **16** に対して 288 U のリパーゼを用い、酢酸ビニル存在下 45 °C で 3 日間反応を試みた。その結果、リパーゼ AS アmano と AYS アmano による反応では生成物が確認されなかったが、リパーゼ PS アmano SD の場合は、僅かに目的の 3-O-Ac 体 **27** が確認された (Entry 1~3)。一方、リパーゼ AK アmano による反応は、46% の収率で目的の 3-O-Ac 体 **27** を与えていた (Entry 4)。そこで、リパーゼ AK アmano の酵素量を約 2 倍にして反応を検討した結果、収率 93% にて 3-O-Ac 体 **27** を得ることに成功した (Entry 5)。また、同一条件下、250 mg スケールで反応した場合でも再現性が確認された (Entry 6)。



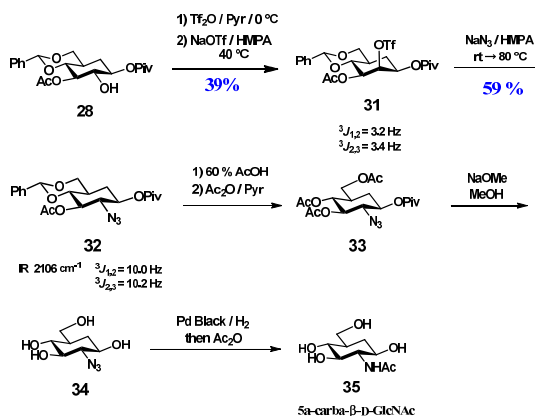
続いて、3-O-Ac 体 **27** に対する 1 位選択

的ピバロイル化反応を検討した。まず、塩化ピバロイル 1.1 当量を用いて、60 °C の条件下でピバロイル化反応を試みた (Entry 1)。その結果、収率は 37% と低いものであったが、目的の 1-O-Piv 体 **28** を得ることができた。併せて、2-O-Piv 体 **29** が 11% で得られた。次いで、塩化ピバロイル 3 当量を用いて、反応温度 20 °C、30 °C、40 °C で反応を試みた (Entry 2~4)。その結果、目的物の収率は大幅に向上し、60~70% 程度の収率を与えた。位置選択性は、30 °C のときが最も良好であった。また、反応温度が上がるに従って、1,2-di-O-Piv 体の生成割合が増加する傾向を示した。続いて、1,2-di-O-Piv 体の生成を抑制するため、反応温度を 20 °C とし、塩化ピバロイル 4 当量を用いて反応を試みた (Entry 5)。その結果は、反応温度 30 °C、塩化ピバロイル 3 当量の際と同程度であった。



Entry	Conditions		Yield (%)		
	PivCl (equiv.)	Temp. (°C)	1-O-Piv	2-O-Piv	1,2-di-O-Piv
1	1.1	60	37	11	—
2	3	20	67	18	12
3	3	30	71	15	12
4	3	40	63	19	16
5	4	20	71	13	14

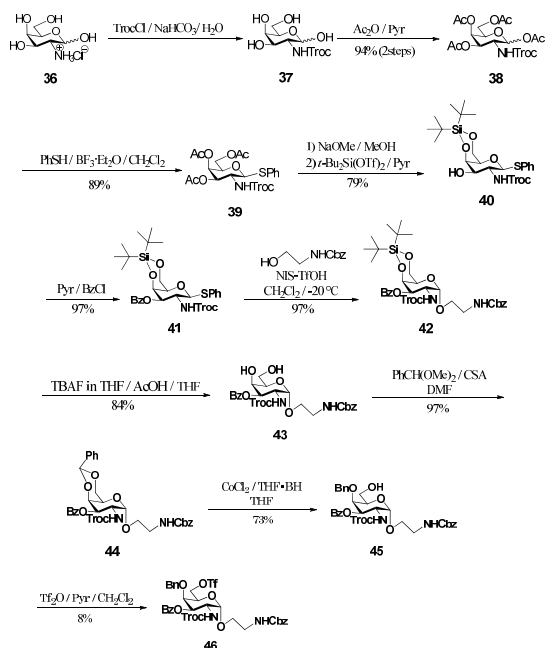
次いで、部分保護体 **27** をトリフレート化後、トリフルオロメタンスルホン酸ナトリウムを求核試薬として作用させる反転反応を試みた。その結果、目的物である 2-*epi*-OTf 体 **31** を収率 39% で得ることに成功した。なお、トリフレート体 **31** の ¹H NMR スペクトルから、³J_{1,2} と ³J_{2,3} がそれぞれ、3.2 Hz、3.4 Hz であったことにより、マンノ型であることを確認した。その後、得られたトリフレート体 **31** に求核試薬としてアジ化ナトリウムを作用させ、2-アジド体 **32** を収率 59% で得た。続いて、ベンジリデン基の脱保護、アセチル化、脱アシル化により 2-アジド体 **34** とした。最後に、得られた生成物のアジド基をアセトアミド基へと変換し、カルバ-N-アセチル-β-D-グルコサミン **35** の合成を達成した。



HRMS : *m/z* calcd for [C₂₇H₄₇O₉N₁Na]⁺: 242.0999
Found: 242.1002

(4) 6 位にトリフレート基を有する D-GalNAc 供与体 **46** の合成

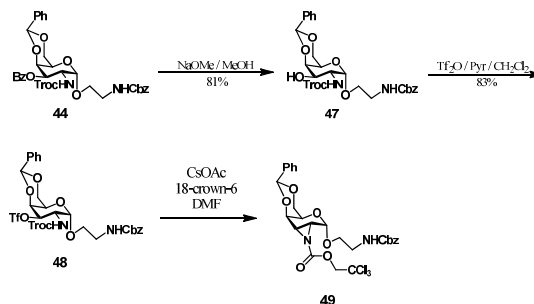
まず文献既知の手法により、*N*-ガラクトサミン塩酸塩 **36** を原料とし、7 工程にてガラクトサミン供与体 **41** を合成した。次いで得られたガラクトサミン供与体 **41** に対し、市販の 2-(カルボベンゾキシアミノ)-1-エタノールを糖受容体とした α 選択的なグリコシル化反応を試みた。その結果、ガラクトサミン供与体 **41** (1.0 当量) と 2-(カルボベンゾキシアミノ)-1-エタノール (2.5 当量) を用い、 -20°C で *N*-ヨードコハク酸イミド (2.0 当量) とトリフルオロメタンスルホン酸 (0.2 当量) を活性化剤としてグリコシル化反応することで、目的のガラクトサミン誘導体 **42** を収率 97% で得た。アノマー位と 2 位水素のカップリング定数が 3.5 Hz であったことから α 体であることを確認した。次いで、得られたガラクトサミン誘導体 **42** の DTBS 基を脱保護し (84%)、ベンジリデン化した (97%)。その後、ガラクトサミン誘導体 **42** のベンジリデンアセタール基を還元開裂し、ガラクトサミン誘導体 **45** を合成した (73%)。最後に得られたガラクトサミン誘導体 **45** の 6 位をトリフレート化することでガラクトサミン供与体 **46** を合成することができた。



(5) 3 位にトリフレート基を有する D-GulNAc 供与体の合成検討

ガラクトサミン誘導体 **44** の 3 位ベンゾイル基を脱保護し、ガラクトサミン誘導体 **47** を合成した (収率 81%)。次いで、得られたガラクトサミン誘導体 **47** をジクロロメタン : ピリジン = 1 : 1 の溶媒で溶解し、0 条件下にて無水トリフレートを作用させ、3 位にトリフレート基を有するガラクトサミン誘導体 **48** を収率 83% で得た。その後、得

られたガラクトサミン誘導体 **48** の 3 位反転反応を試みた。ガラクトサミン誘導体 **48** を *N,N*-ジメチルホルムアミドで溶解し、酢酸セシウムと 18-クラウン-6 エーテルを加えて 40 で 1.5 時間攪拌した。TLC 分析により出発原料の消失を確認後、生成物を単離した。生成物を構造解析した結果、得られた生成物は目的のグロサミン誘導体ではなく、Troc 基のアミンと 3 位のトリフレート基が分子内で反応したアジリジン骨格を有する化合物 **49** であった。



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 5 件)

館田尚家, 鱒坂勝美, 石黒正路, 宮崎達雄「環境保護基を有するカルバグルコシルトリフレートを有したジカルバグルコピオースの合成研究」第 34 回日本糖質学会年会 2015 年 7 月 31 日-8 月 2 日 (東京大学)

館田尚家, 石黒正路, 鱒坂勝美, 宮崎達雄「カルバ- β -D-グルコースを原料とした 5a,5a'-ジカルバ-D-グルコピオースの合成研究」第 9 回東北糖鎖研究会 2015 年 9 月 4 日-5 日 (東北薬科大学)

宮崎達雄, 館田尚家, 佐藤大輔, 木下裕市, 石黒正路「2-デオキシ-scyllo-イノソースを鍵原料とした α 系列カルバ糖の合成研究」第 35 回日本糖質学会年会 2016 年 8 月 1 日-8 月 3 日 (高知市文化プラザ かるぼーと)

宮崎達雄, 館田尚家, 石黒正路, 鱒坂勝美「2-デオキシ-scyllo-イノソースを原料とした 5a,5a'-ジカルバ-D-グルコピオースの合成および α -グルコシダーゼに対する活性評価」第 10 回東北糖鎖研究会 2016 年 8 月 6 日-7 日 (コラッセ福島)

館田尚家, 鱒坂勝美, 石黒正路, 宮崎達雄「立体配座を固定したカルバグルコシルトリフレートの反転反応によるジカルバグルコピオースの合成」第 72 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム (新潟シンポジウム) 2016 年 11 月 26 日-27 日 (新潟薬科大学 新津駅前キャンパス)

〔図書〕 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宮崎 達雄 (MIYAZAKI, Tatsuo)

新潟薬科大学・応用生命科学部・准教授

研究者番号：7 0 4 1 0 2 2 2

(2)研究分担者

飛澤 悠葵 (TOBISAWA, Yuki)

弘前大学・医学(系)研究科(研究院)・

助教

研究者番号：7 0 6 2 3 7 6 8