

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18830

研究課題名(和文)天然マクロライドを基盤とした新規多発性骨髄腫治療剤の創製研究

研究課題名(英文)Development of novel anti-multiple myeloma agent based on natural macrolide

研究代表者

中山 淳(NAKAYAMA, Atsushi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学系)・助教

研究者番号：60743408

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)：多発性骨髄腫は、形質細胞が骨髄内で異常増殖し、免疫抑制とともに破骨細胞の活性化と骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化抑制が同時に起こることで広範な骨破壊性病変が形成される難治性疾患である。本研究課題では、多発性骨髄腫に対して顕著な治癒効果を示した天然マクロライドLL-Z1640-2を基盤として、不斉全合成によってLL-Z1640-2及びその誘導体を合成し、プローブ化による標的タンパク質同定を目指した。その結果、閉環メタセシス反応を鍵段階としてLL-Z1640-2とその全二重結合異性体の合成を達成した。また、本合成経路から多発性骨髄腫細胞に対して強力な細胞傷害活性を示す誘導体も獲得した。

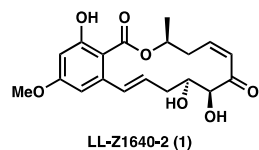
研究成果の概要(英文)：LL-Z1640-2 (1) is a member of 14-membered macrolide containing cis-enone moiety. This is known as a potent and selective TAK-1 (TGF- $\beta$  activated kinase 1) inhibitor. Recently, we revealed that 1 exhibited a marked tumor reduction effect for multiple myeloma(MM)-bearing mice. Moreover the osteolytic bone destruction which is caused in MM was also suppressed by the administration of LL-Z1640-2. Although LL-Z1640-2 can be considered as a promising seed molecule of antitumor drug, the supplement of it is not stable for the further animal experiments. To facilitate the development of anti-MM agent, the establishment of the novel synthetic route of LL-Z1640-2 was conducted. This synthesis involved a ring-closing metathesis under low temperature as a key reaction and last stage isomerization from cis-enone to trans-enone. As a result, four derivatives including LL-Z1640-2 were obtained throughout this total synthesis and we also discovered some derivatives which have potent anti-MM agents.

研究分野：有機合成化学

キーワード：天然マクロライド 多発性骨髄腫

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会を迎えた日本では、加齢により罹患リスクの高くなるがんの治療薬開発は急務の課題といえる。多発性骨髄腫は血液腫瘍の一種であり、これまでに幾つかの治療薬が上市されているが、耐性がん細胞の出現などから新規治療薬の開発が望まれている。このような状況の中、我々は多発性骨髄腫細胞で発現が亢進している TGF- $\beta$  activated kinase 1 (TAK-1)に着目して化合物スクリーニングを行った結果、14 員環天然マクロライド LL-Z1640-2 (1)が多発性骨髄腫細胞に対し、*in vitro* 及び *in vivo* においても強力な抗腫瘍活性を示すことを見出した。



本化合物は 1978 年に抗生物質として単離されたが、後に選択的 TAK-1 阻害剤であることが示されており、これまでに国内外において活発な全合成研究、医薬化学研究が行われている。しかし、1 のファーマコフォアである *cis*-enone 部分は血中で容易に *trans*-enone へと異性化してしまいキナーゼ阻害活性が激減することが知られている。このことから研究代表者は、1 だけでなく、多発性骨髄腫細胞で発現量が多い TAK-1 あるいは新たな分子標的に 1 の代謝誘導体が作用しているのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

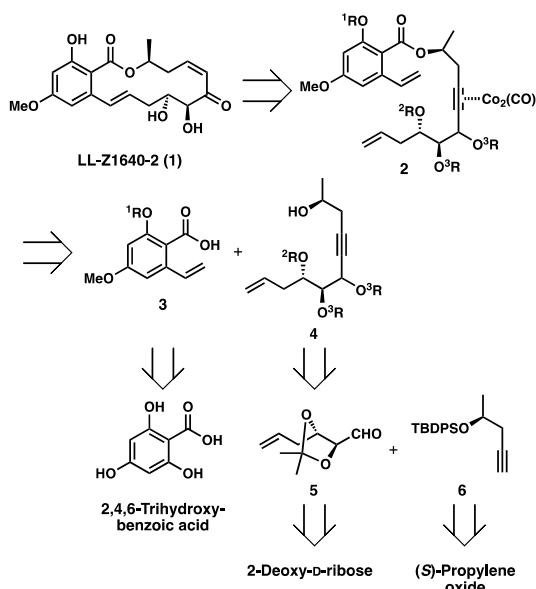
LL-Z1640-2 (1)は購入可能であるが非常に高価であり、また 1 からの誘導体合成は制御が困難であることから現実的ではない。そこで、各種誘導体へ展開可能かつ標的タンパク質探索のためのプローブ化を行うことができる全合成経路の確立を行うことを第一の目的とした。ここから得られた各種マクロライド及びプローブを利用することで多発性骨髄腫細胞に対して強力な生物活性を示す化合物を同定、その標的タンパク質の探索を行い、新規多発性骨髄腫治療剤開発を目指した基盤を確立することを最終目的とした。

### 3. 研究の方法

はじめに、本研究計画の中心となる LL-Z1640-2 (1)の不斉全合成を目指し、逆合成解析を行った (Scheme 1)。1 の C11-C12 位二重結合は合成の最終盤でジエン体 2 に対して閉環メタセシス (RCM) 反応を行う構築することを計画した。この際、E 体と Z 体の制御が問題となるが、C11-C12 位が Z 体の化合物は新規誘導体として利用することができると考えた。*cis*-enone に対応する部分は、変換

の多様性を持たせるために三重結合とし、ジエン 2 はカルボン酸 3 とエンイン化合物 4 を椎名エステル化反応により合成することとした。カルボン酸ユニットは市販の 2,4,6-trihydroxybenzoic acid から合成することとした。こちらのエンイン化合物は、アルケンユニット 5 とアルキンユニット 6 に分割でき、これらはそれぞれ市販の 2-deoxy-D-ribose と (*S*)-propylene oxide から得られると考え合成研究を開始した。

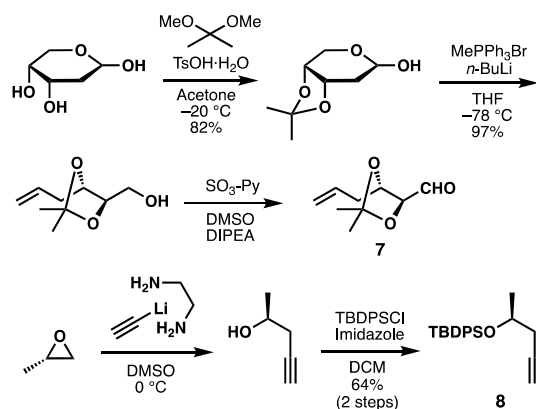
Scheme 1. Retrosynthetic analysis



### 4. 研究成果

アルケンユニット 7 は、2-deoxy-D-ribose の二つの二級水酸基をアセトナイド基で保護した後、Wittig 反応によりアルケンへと変換、一級水酸基を  $\text{SO}_3\text{-Py}$  で酸化することで合成した (Scheme 2)。アルキンユニット 8 は、(*S*)-propylene oxide をリチウムアセチド-エチレンジアミン錯体で開環させた後、生じた水酸基を TBDPS 基で保護することで得られた。

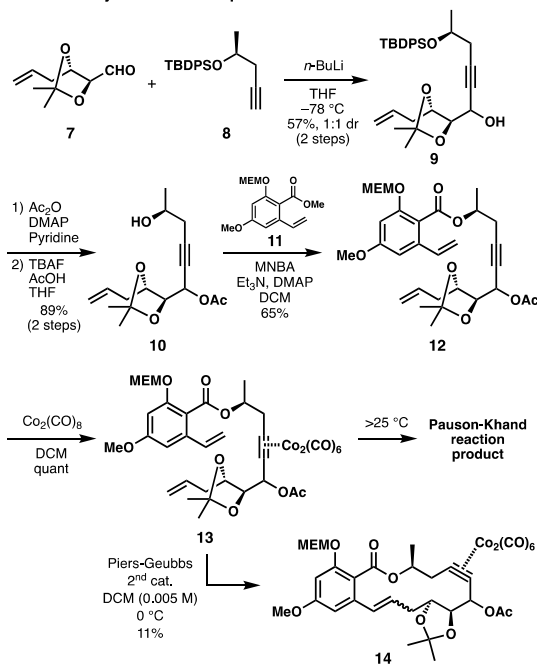
Scheme 2. Synthesis of alkene and alkyne units



アルケンユニット 7 とアルキンユニット 8 をリチオカップリングしたところ、1:1 のジアステレオマー混合物として所望のエンイ

ン化合物 **9** を合成することができた (Scheme 3)。この水酸基をアセチル基で保護した後、TBDPS 基を TBAF で脱保護することで、所望のエステル化前駆体 **10** の合成を完了した。得られた **10** と、2,4,6-trihydroxybenzoic acid から5段階で合成したカルボン酸ユニット **11** を 2-メチル-6-ニトロ安息香酸無水物(MNBA) 存在下、カップリングしたところ中程度の収率ながらエステル **12** を得ることができた。エンインメタセシスの進行を抑えるため、三重結合をジコバルトオクタカルボニルで保護した後、鍵反応である RCM 反応を試みた。しかしながら、アルキン-コバルト錯体 **13** は室温付近でも Pauson-Khand 反応が優先して起こってしまうことが分かり、通常は加温が必要な第一世代 Grubbs 触媒や第二世代 Grubbs 触媒を用いた場合、RCM 反応が進行する前に全ての基質が Pauson-Khand 反応成績体を与えることが明らかとなった。そこで、低温でもメタセシス反応が進行することが知られる第二世代 Piers-Grubbs 触媒を用いて 0 °C で反応を行ったところ、11%と低収率ではあるものの所望の **14** 員環マクロライド構造を構築することに成功した。また、本検討の中で、プロパルギル位水酸基の立体が RCM 反応の反応性に大きく影響することが明らかとなった。そこで、更なる収率の改善を目指して水酸基部分の保護基を変更することとした。

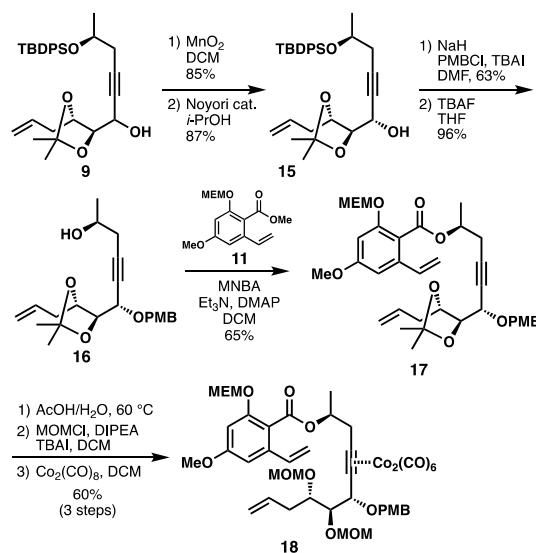
Scheme 3. Synthesis of RCM precursor and trials of RCM



先ほど得られたリチオカップリング体 **9** を二酸化マンガンで酸化した後、野依不斉水素移動化により単一ジアステレオマーとしてプロパルギルアルコール **15** を得た (Scheme 4)。後の選択的変換のため、生じた水酸基を PMB 基で保護した後、TBDPS 基の脱保護を行い、エステルカップリング基質 **16** を合成した。これを先と同様に椎名エステル化反応

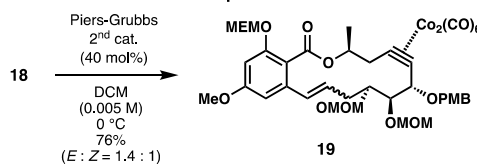
に付してエステル **17** とした後、酢酸-水混合溶媒でアセトナイド基を除去、二つの水酸基を MOM 基で保護した後、アルキン-コバルト錯体とすることで新たな RCM 前駆体 **18** を得ることができた。

Scheme 4. Synthesis of new RCM precursor



合成した **18** を用いて第二世代 Piers-Grubbs 触媒存在下 0 °C で RCM 反応を行なったところ、14 員環化合物 **19** を収率 76%、E:Z = 1.4 : 1 の混合物で得ることに成功した (Scheme 5)。

Scheme 5. RCM with a new precursor

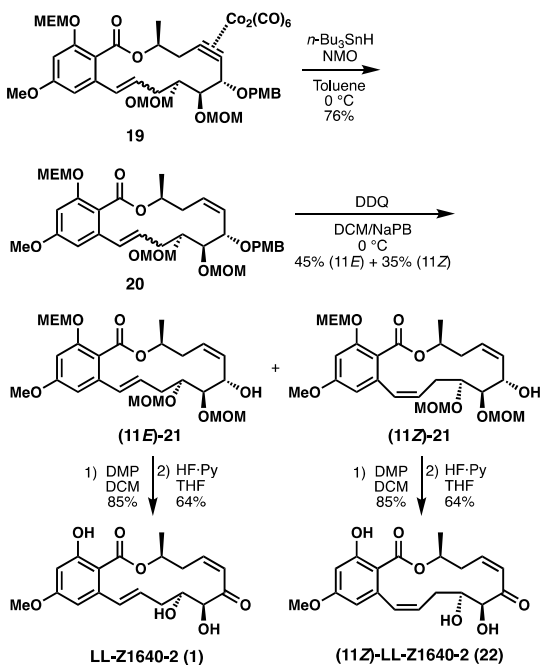


EZ 選択性は十分ではないものの、アセトナイド基を MOM 基へと変更することで大幅な収率の改善に成功したので、**1** 及びその誘導体の合成に向けて各種官能基変換を行なった (Scheme 6)。アルキン-コバルト錯体を *n*-Bu<sub>3</sub>SnH と NMO を用いてシス還元体 **20** した後、DDQ による PMB 基の除去を行い (11E)-**21**、(11Z)-**21** をそれぞれ得た。Dess-Martin 酸化により *cis*-enone を構築した後、HF·Py を用いて全ての保護基を除去することで LL-Z1640-2 (**1**) と 11Z-LL-Z1640-2 (**22**) の全合成を達成した。**1** と **22** は、それぞれ BCl<sub>3</sub> で処理することで定量的に *cis*-enone から *trans*-enone へと異性化できることを見出し、二重結合異性体四種を獲得することができた。

また、今回開発した全合成経路から導いたいくつかの化合物は多発性骨髄腫細胞に対して強力な細胞障害活性を示すだけでなく、破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化を抑制することが示唆された。これの標的タンパク質は TAK-1 とは異なることが示唆されており、現在最も簡略化された構造の化合物に Tag 用のアルキンを導入し、多発性骨髄腫

胞を用いた標的タンパク質のつり出し実験を行なっている。

Scheme 6. Total synthesis of LL-Z1640-2 and its derivatives



5. 主な発表論文等  
(研究代表者は下線)

[学会発表] (計9件)

Atsushi Nakayama, Shinichiro Nakayama, Kosuke Namba "Total Synthesis and Medicinal Study of Resorcylic Acid lactone, LL-Z1640-2" The 10<sup>th</sup> International Symposium on Integrated Synthesis (ISONIS-10), November 18-19<sup>th</sup>, 2016, 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市)、Poster presentation

中山 淳、中山 慎一郎、難波 康祐 「Ring-Closing-Metathesis 反応を利用した天然マクロライド LL-Z1640-2 の不斉全合成」第 55 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会、2016 年 11 月 5 日、就実大学(岡山県岡山市)、口頭発表

中山 淳、中山 慎一郎、難波 康祐 「天然マクロライド LL-Z1640-2 の不斉全合成と医薬化学研究」第 21 回天然薬物の開発と応用シンポジウム、2016 年 10 月 27-28 日、千葉大学薬学部 120 周年記念講堂(千葉県千葉市)、口頭発表

中山 淳、「天然マクロライドを基盤とした新規多発性骨髄腫治療薬の創製研究」第 32 回若手化学者のための化学道場、2016 年 8 月 25-26 日、にぎたつ会館(愛媛県松山市)、招待講演

中山 慎一郎、中山 淳、難波 康祐 「TAK1 阻害剤 LL-Z-1640-2 の不斉全合成」第 32 回若手化学者のための

化学道場、2016 年 8 月 25-26 日、にぎたつ会館(愛媛県松山市)、ポスター発表

中山 慎一郎、中山 淳、難波 康祐 「TAK1 阻害剤 LL-Z-1640-2 の不斉全合成」創薬懇話会 2016 in 蓼科、2016 年 6 月 30 日 - 7 月 1 日、エクシブ蓼科(長野県茅野市)、ポスター発表

中山 慎一郎、中山 淳、難波 康祐 「TAK1 阻害剤 LL-Z-1640-2 の不斉全合成」日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 27-29 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、口頭発表

Atsushi Nakayama "Total Synthesis and SAR Studies of Anti-tumor Agent, LL-Z1640-2" Natural Product Society of Philippines 20<sup>th</sup> annual convention, December 1<sup>st</sup>-2<sup>nd</sup>, 2015, University of Santo Tomas (Manila, Philippines), 招待講演

中山 慎一郎、中山 淳、難波 康祐 「LL-Z-1640-2 の不斉全合成研究」第 54 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会、2015 年 10 月 31 日 - 11 月 1 日、高知市文化プラザかるぽーと(高知県高知市)、口頭発表

[その他]

ホームページ:

<http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labobot/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 淳 (NAKAYAMA, Atsushi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号: 60743408