

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18790084

研究課題名（和文）細胞分化の制御剤としてのサリドマイド

研究課題名（英文）Thalidomide as a cell differentiation regulator

研究代表者

野口 友美（NOGUCHI TOMOMI）

東京大学・分子細胞生物学研究所・技術職員

研究者番号：20401284

研究成果の概要：サリドマイドおよびその代謝物の示す細胞分化誘導促進活性の解析およびそれに関わる諸要因を現象的・分子作用レベル的に解析、ならびに同生物作用を指標としたサリドマイドの構造展開研究を遂行した。その結果、サリドマイドの有効性・有用性に対する細胞生物学的・分子作用機構的な理解を進歩させることが出来た。また各種構造展開研究の遂行によりサリドマイド派生化合物群という新たな医薬リードカテゴリーが発信できた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,200,000	0	1,200,000
2007 年度	900,000	0	900,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	270,000	3,270,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：生物活性物質、サリドマイド、構造展開、構造活性相関

1. 研究開始当初の背景

サリドマイドは催奇形性のために市場撤退した睡眠薬として有名であるが、1990年代以降、本薬の様々な難病に対する有効性が注目を浴びている。特に多発性骨髄腫に対する著効が明確となり、我が国においても2005年に希少疾病用医薬品として認められた。しかし、その分子作用機序の理解は欠如している。

サリドマイドの薬効の分子基盤を解明することが出来れば、催奇形性の心配がないニューサリドマイドへの誘導体化の道が拓けるなど、その意義は社会的要請の観点からも大き

いと考えた。

2000年代に入って、サリドマイドを免疫調節剤とする捉え方が主流になってきた。本研究者も、サリドマイドを免疫調節剤と捉えての基礎分子医薬化学研究を遂行し、(1) サリドマイドのシクロオキシゲナーゼ（COX）阻害作用の発見、(2) 同活性を指標にした構造展開による新規 COX 阻害剤の創製、(3) サリドマイドの一酸化窒素合成酵素（NOS）阻害作用の発見と同活性を指標とした構造展開による新規 NOS 阻害剤の創製、といった成果を上げてきた。

一方、本研究者は、サリドマイドの骨髄腫細胞に対する生物作用を解析する研究も遂行していた。その過程で、(4) サリドマイドならびにその主要な水酸化代謝物に細胞の分化を促進する活性があることを初めて見出した。この事実は、**サリドマイドがヒト体内では細胞分化誘導剤として機能**し、そのことによって有用な薬理作用を発揮している可能性を提示するものであり、これまでのサリドマイドの作用機序に関する理解の根拠からの見直しを促すものであった。同時に、これまで話題性が先行し十分な学術的根拠が欠如していたサリドマイドの薬理作用に対する理解を大きく進めるものであると考えた。

2. 研究の目的

本研究者の発見を受け、本研究課題では(1)サリドマイドならびにその代謝物の示す細胞分化制御作用について、それに関わる諸要因を現象的・分子作用レベルの両側面から明確にすること、(2)同生物作用を指標とした構造展開により、サリドマイドの欠点を克服した新たな活性化合物を創製すること、を目的とした。

例えば(1)については、サリドマイドの示す細胞分化促進作用におけるイニシエーターの解析 [研究開始時まで生理濃度の all-trans retinoic acid を明確にしてあった]、サリドマイドの各種代謝物の同作用の検定、同作用に関わりうる分子レベル作用の解析 [研究開始時までチューブリン重合阻害作用を明確にしてあった]を行った。(2)に関しては、すでに強力な細胞分化誘導剤、ならびに血管新生阻害剤が数種得られていた。そこで、その構造活性相関に関する理解を深め、真に医薬リードたり得る化合物の創製を狙った。

以上のように、(1)を通じて、これまで曖昧に免疫調節剤としてしか捉えられていなかったサリドマイドについて、これを細胞分化制御剤とする捉え方に学術的に明確な基盤を付与し、さらに、上記(2)を行うことによって、その捉え方ならびにその有用性を実験的に実証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)サリドマイドおよびその代謝物の細胞分化誘導(促進)活性の解析

サリドマイド代謝物を網羅的に合成した。合成した代謝物の内、ラセミ体については不斉充填剤カラムによる液体クロマトグラフィーで分離できる条件を確立してあるので、同条件により光学活性的に純粋な化合物を得た。

上記第 1 項で得た化合物について、ヒト白血病細胞株 HL-60 を用いて、分化誘導ないし分化誘導促進活性を検定した。既に、数種の化合物において、生理濃度の all-trans-レチノイン酸で誘導される顆粒球系分化の促進作用を見出していたので、まずすべての化合物について同作用を検定した。次いで、分化誘導剤として、活性型ビタミンD₃、テトラデカノイルフォルボールアセテート、ジメチルスルホキシドなど、既知の代表的化合物について同様の検索を行った。分化の方向性に関しては、市販の蛍光標識抗体を用いたフローサイトメトリー-FACS解析を行った。このことによって、サリドマイドおよびその代謝物について網羅的に、その細胞分化制御に関わる分化誘導剤に関する情報を蓄積・整理した。

上記第 1 項と同様の実験を、他の血球細胞(K562細胞)拡張して行い、作用の一般性と特殊性を解析した。なお、K562細胞については分化誘導剤としてヘミンを追加した。

チューブリン重合阻害剤・脱重合阻害剤が一般的に細胞分化誘導促進活性を示すことがわかっていた。既にサリドマイド代謝物2種について、細胞分化誘導促進活性に関連してチューブリン重合阻害作用を証明してあった。上記第 1 項で得た化合物についてチューブリン重合に及ぼす効果を解析した。活性を認めた化合物について、チューブリン上の結合部位(コルヒチン部位、ビンブラスチン部位、またはリゾキシシン部位)を結合競合実験によって検討した。手法は既に確立してあった方法を用いた。

(2)サリドマイドの構造展開研究

研究開始の時点で、既に、細胞分化誘導促進活性、細胞分化誘導活性、チューブリン重合阻害活性、COX阻害活性、血管新生阻害活性、についてプレリミナリーな構造展開を行い、各々の活性について、新規のフタルイミド型活性化合物が得られていた。構造活性相関についても初歩的な解答を得ていたため、それを基に、既存のフタルイミ

ド化合物ライブラリーから代表的な化合物について活性評価を行い、構造活性相関の確認を行った。その上で、より優れた活性化合物を設計し、合成した。

COX阻害剤については、既にサリドマイドのベンゼン環へ置換基導入によって、COX-1選択性とCOX-2選択性を、導入する置換基の位置と電子効果の組み合わせで所望に制御できる可能性を示してある。この知見を基に、構造展開リードのフタルイミド骨格からの逸脱を図った。

特にファルマコフォア骨格のフタルイミド骨格からの逸脱に焦点を当て、ホモフタルイミド骨格やイソインドロン骨格を候補として、サリドマイドの構造展開研究を行った。創製した新規サリドマイド誘導体について、分化誘導活性、アミノペプチダーゼN (APN)及びピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ(PSA)阻害活性、腫瘍壊死因子 (TNF) - 産生阻害活性等の評価及びその解析を行った。

サリドマイド関連化合物 (サリドマイド由来 β -グルコシダーゼ阻害剤) の構造展開に基づく肝臓X受容体 (LXR)アンタゴニストの創製、構造展開研究および構造活性相関解析、

および創製した LXR アンタゴニストの β -グルコシダーゼ阻害活性の確認ならびに解析を行った。

以上の研究の遂行により、分化誘導剤としてのサリドマイドという概念に明確な学術基盤を付与することができ、サリドマイドの有効性・有用性に対する細胞生物学的・分子作用機構的な理解を格段に進歩させることができると考えた。同時に細胞の分化制御に関わる生理的・薬理的・病理学的諸要因が部分的であれ解明され、関わる基礎生物学に貢献すると考えた。また、各種構造展開研究の遂行により、サリドマイド派生化合物群という新たな医薬リードカテゴリーの発信ができると考えた。

4. 研究成果

サリドマイドおよびその代謝物の示す細胞分化誘導促進活性の解析およびそれに関わる諸要因を現象的・分子作用レベル的に解析、ならびに同生物作用を指標としたサリドマイドの構造展開研究を遂行した。その結果、(1) サリドマイド代謝物の網羅的合成および

そのヒト白血病細胞に対する細胞分化誘導促進活性評価ならびに解析、

(2) サリドマイド代謝物の腫瘍壊死因子 (TNF) - 産生阻害活性評価による、同活性に関わる代謝活性体の同定と構造活性相関解析、

(3) サリドマイド代謝物のチューブリン重合に及ぼす効果の解析、

(4) サリドマイド代謝物をリード化合物とした新規且つ強力なチューブリン重合阻害剤、5HPP-33、のチューブリン上の結合部位の検討およびヒト骨髄腫細胞に対する増殖阻害ならびにアポトーシス誘導活性の確認およびその解析、

(5) サリドマイドの活性代謝物をリードとした構造展開研究による新規活性化合物群 (細胞分化誘導促進剤、チューブリン重合阻害剤、血管新生阻害剤など) の創製、

(6) サリドマイドをリードとした新規シクロオキシゲナーゼ (COX) 阻害剤の創製およびそれらのヒト臍帯静脈内皮細胞に対する血管新生阻害活性の確認ならびに解析、次いで活性化合物が血管新生誘導因子におよぼす影響の解析、

(7) サリドマイド関連化合物 (サリドマイド由来 β -グルコシダーゼ阻害剤) の構造展開に基づく LXR アンタゴニストの創製、構造展開研究および構造活性相関解析、

(8) 創製した LXR アンタゴニストの β -グルコシダーゼ阻害活性の確認ならびに解析、

(9) サリドマイドをリードとし創製した新規誘導体の分化誘導活性、アミノペプチダーゼN (APN)及びピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ(PSA)阻害活性、腫瘍壊死因子 (TNF) - 産生阻害活性の評価及びその解析、

などを遂行し、サリドマイドの有効性・有用性に対する細胞生物学的・分子作用機構的な理解を進歩させることが出来た。また、各種構造展開研究の遂行により、サリドマイド派生化合物群という新たな医薬リードカテゴリーが発信できた。

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11件)

Kousuke Dodo, Taro Minato, Tomomi

Noguchi Yachide, 他 2 名 : Antiproliferative and apoptosis-inducing activities of alkyl gallate and gallamide derivatives related to (-)-epigallocatechin gallate. *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, 16(17), 7975-7982 (査読有).

Kousuke Dodo, Atsushi Aoyama, Tomomi Noguchi Yachide, 他 3 名: Co-existence of a glucosidase-inhibitory and liver X receptor-regulatory activities and their separation by structural development. *Bioorg. Med. Chem.*, 2008, 16(8): 4272-4285 (査読有).

Haruka Fujimoto, Hiroshi Aoyama, Tomomi Noguchi Yachide, 他 2 名: Fusarielin A as an Anti-angiogenic and Anti-proliferative Agent: Its Basic Biological Characterization. *Chem. Pharm. Bull.*, 2008, 56(3): 298-304 (査読有).

Toyotaka Iguchi, Tomomi Noguchi Yachide, 他 5 名: Novel tubulin-polymerization inhibitor derived from thalidomide directly induces apoptosis in human multiple myeloma cells: possible anti-myeloma mechanism of thalidomide. *Int. J. Mol. Med.*, 2008, 21, 163-168 (査読有).

Tomomi Noguchi Yachide, 他 5 名: Structural Development of Liver X Receptor (LXR) Antagonists Derived from Thalidomide-related Glucosidase Inhibitors. *Chem. Pharm. Bull.*, 2007, 55(12), 1750-1754 (査読有).

Tomomi Noguchi Yachide, 他 4 名: Liver X Receptor Antagonists with a Phthalimide Skeleton Derived from Thalidomide-related Glucosidase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, 17(14), 3957-3961 (査読有).

Hiroshi Aoyama, Tomomi Noguchi, 他 5 名: Development of tubulin-polymerization inhibitors based on the thalidomide skeleton. *Chem. Pharm. Bull.*, 2007, 55(6), 944-949 (査読有).

Takanori Nakamura, Tomomi Noguchi, 他 3 名: Hydrolyzed Metabolites of Thalidomide: Synthesis and TNF- α Production-inhibitory Activity. *Chem. Pharm. Bull.*, 2007, 55(4), 651-654 (査読有).

Takanori Nakamura, Tomomi Noguchi, 他 3 名: Mono- and Dihydroxylated Metabolites of Thalidomide: Synthesis and TNF- α Production-inhibitory Activity. *Chem. Pharm. Bull.*, 2006, 54(12), 1709-1714 (査読有).

Tomonori Yanagawa, Tomomi Noguchi, 他 3 名: Tubulin polymerization inhibitors with a fluorinated phthalimide skeleton derived from thalidomide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, 16(18), 4748-4751 (査読有).

Hiroko Sano, Tomomi Noguchi, 他 3 名: Anti-angiogenic activity of basic-type, selective cyclooxygenase (COX)-1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, 16(11), 3068-3072 (査読有).

[学会発表](計 16 件)

谷内出友美, 他 3 名 (1 番目): 3,3'-Diindolylmethane (DIM)誘導体における HL-60 細胞分化誘導促進活性. 日本薬学会第 129 年会 (京都) 2009.3.26-28

本島和典, 谷内出友美, 他 4 名 (4 番目): サリドマイド誘導体における glucosidase と LXR 活性の作用分離. 日本薬学会第 129 年会 (京都) 2009.3.26-28

藤原朋也, 谷内出友美, 他 4 名 (5 番目): エピマー化しないサリドマイド代謝物等価体の設計, 合成, および生物活性. Symposium on molecular chirality 2008 (岡山大学創立五十周年記念館) 2008.5.22-23

湊太郎, 谷内出友美, 他 8 名 (3 番目): Galloyl 基誘導体の合成と活性評価. 日本薬学会第 128 年会 (横浜) 2008. 3. 26-28

藤本悠, 谷内出(野口)友美, 他 3 名 (3 番

目) : Fusarielin A の生物活性をその分子基盤. 日本薬学会第 128 年会 (横浜) 2008. 3. 26 -28

斉藤智之、谷内出友美、他 4 名 (5 番目) : サリドマイドヒドロキシル化代謝物のキラル部位フッ素置換体の合成と生物活性. 日本薬学会第 128 年会 (横浜) 2008. 3. 26 -28

斉藤智之、谷内出友美、他 4 名 (4 番目) : サリドマイド加水分解代謝物のフッ素置換体の合成と生物活性試験. 第 26 回メディシナルケミストリーシンポジウム (相模原) 2007. 11.28 -30

青山洋史、谷内出友美、他 4 名 (3 番目) : サリドマイド由来 グルコシダーゼ阻害剤をリードとした LXR アンタゴニストの創製. 第 26 回メディシナルケミストリーシンポジウム (相模原) 2007. 11.28 -30

藤本悠、谷内出友美、他 3 名 (2 番目) : Fusarielin A の生物活性とその分子基盤. 第 49 回天然有機化合物討論会 (札幌) 2007.9.19 -21

Tomomi Noguchi、他 3 名 (1 番目) : Bioresponse regulators derived from thalidomide. Pharmaceutical sciences world congress (Amsterdam) 2007.4.22 -25

野口友美、他 4 名 (1 番目) : サリドマイドの活性に及ぼす代謝の影響と構造展開. 日本薬学会第 127 年会 (富山) 2007. 3.28 -30

藤本悠、野口友美、他 3 名 (2 番目) : 新規血管新生阻害剤の作用解析. 日本薬学会第 127 年会 (富山) 2007. 3.28 -30

湊太郎、野口友美、他 8 名 (2 番目) : アルキルガレート誘導体の合成とその生物活性. 日本薬学会第 127 年会 (富山) 2007. 3.28 -30

青山洋史、野口友美、他 4 名 (3 番目) : サリドマイドの構造展開による微小管タンパク質重合阻害剤の開発. 日本薬学会第 127 年会 (富山) 2007. 3.28 -30

野口友美、他 1 名 (1 番目) : サリドマイ

ドのマルチ創薬テンプレートとしての活用. 東京大学臨床展開シンポジウム (東京) 2007. 3. 2

Tomomi Noguchi、他 5 名: Some bioresponse modifiers derived from thalidomide. The 7th Tetrahedron Symposium (京都) 2006.5.25 -26

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野口 友美 (NOGUCHI TOMOMI)
東京大学・分子細胞生物学研究所・技術職員
研究者番号 : 20401284

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

橋本 祐一 (HASHIMOTO YUICHI)
東京大学・分子細胞生物学研究所・教授
研究者番号 : 90164798