

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14344

研究課題名（和文）天然物誘導体により制御可能なトリプルネガティブ乳がん治療標的の解明

研究課題名（英文）Elucidation of therapeutic target for triple-negative breast cancer regulated by natural product derivatives

研究代表者

齋藤 洋平（SAITO, Yohei）

金沢大学・先進予防医学研究センター・助教

研究者番号：90723825

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：トリプルネガティブ乳がん（TNBC）とはその他の乳がんでは発現するホルモン受容体、成長因子受容体の3つすべてが欠損した乳がんである。他の乳がん治療で効果的な分子標的薬、ホルモン療法が効かないうえ、転移が起こりやすい特徴を有する。若年乳がんでその割合が高く、再発を繰り返すことから予後が非常に悪い。そのため、治療に有効な分子の発見から作用機序解明に至るまでの創薬基礎研究が極めて重要である。本研究ではTNBC細胞の増殖抑制に有効な分子を新たに見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではTNBC細胞に対して選択的に増殖抑制活性を有する分子の創出、およびその細胞内標的タンパク質を同定することを目的に研究を実施した。得られた分子は抗がん剤としての骨格新規性から、これまでに関与が明らかになっていないがん細胞内のタンパク質を標的としている可能性が高く、新規抗がん剤リード化合物として基礎科学的に興味深い。創薬基礎研究を担う本研究はTNBC治療法開発に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：Triple-negative breast cancer (TNBC) is deficient in two hormone receptors and a growth factor receptor expressed in other breast cancers. It has the characteristics that molecular targeted drugs and hormone therapies which are effective in the treatment of other breast cancer do not work, and metastases easily occur. The prognosis is also very poor due to the repeated recurrence. Therefore, basic research on drug discovery from the finding of therapeutically effective molecules to the elucidation of the mechanism of action is extremely important. In this study, we found a new molecule effectively showing antiproliferative activity against TNBC cells.

研究分野：生物分子化学

キーワード：がん細胞増殖抑制 化学プローブ 誘導体合成 構造活性相関

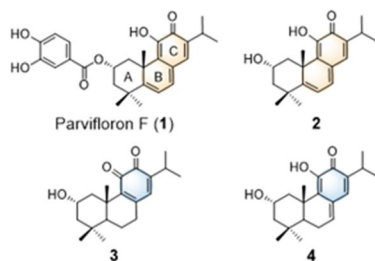
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

過去 30 年間で新たに開発された医薬品の 25% は天然物、あるいは天然物由来の合成化合物であり、ファーマコフォアなどを含めると約半数が天然物に関連したものである。特に、抗がん剤に限れば、その割合はさらに高く約 60% が天然物に由来する (*J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 629–661.)。これは天然物が多彩な構造・物理化学的性質を有し、ヒトに対して様々な生理活性を示すことに起因する。

申請者はこれまで植物由来の生理活性天然物に着目し、抗がん剤の開発を念頭に研究を展開してきた。その過程で、B 環、C 環部分が高度に酸化されたジテルペン Parvifloron F (1, 図 1) が、

我々独自の研究において多剤耐性がんを含む各種ヒト培養がん細胞に対して増殖抑制活性 (細胞毒性ではない) を有していることを見出した。抗がん剤としての骨格新規性から、これまでにないがん細胞内タンパク質を標的としている可能性が高く、新規抗がん剤シードとして基礎科学的にも興味深い。しかしこれまでに 1 を含め Parvifloron 類全合成の報告例はなく、系統的な構造活性相関研究も行われていなかった。申請者は本化合物の不斉全合成に成功し、合成体 1 が天然体と同等の増殖抑制活性を示すことを確認した (図 1)。また本合成過程で、A 環に結合したエステル構造の有無で活性に差異がないこと (図 1. 化合物 1, 2)、合成誘導体の一部に TNBC 細胞の増殖を選択的に抑制するもの (図 1. 化合物 3, 4) が存在することを明らかにした (*Org. Lett.*, **2018**, *20*, 628–631.)。TNBC は、乳がんに関与する 3 つの受容体、エストロゲン受容体 (ER)、プロゲステロン受容体 (PR)、ヒト上皮成長因子受容体 (HER2) すべてが欠損しており、全乳がんの 10–20% を占め、その割合が特に多いのが若年乳がんである。ホルモン療法や抗 HER2 分子標的療法が使えず、早期での外科手術以外では化学療法しか選択肢がない。転移・再発が起こりやすく予後が非常に悪いいため、有効な治療薬の開発が強く望まれている。そのため、TNBC 細胞の増殖抑制に関与する標的分子の探索・同定はがん生物学的にも非常に興味深く、治療法開発に大きく貢献することが期待される。



compound	Cell lines / IC <sub>50</sub> (μM)				
	A549	KB	KB-Vin	MDA-MB-231	MCF-7
1 (天然物)	4.92	4.74	4.70	4.91	4.94
1 (不斉合成体)	4.64	4.49	4.75	4.99	4.67
2	4.67	5.03	4.98	4.79	5.10
3	20.77	19.62	22.16	5.15	18.21
4	19.57	17.10	21.42	4.98	8.80
PXL (nM)	6.32	6.22	2172.3	7.94	10.66

PXL: バクリタキセル, A549: 肺がん, KB: 鼻咽頭がん, KB-VIN: P糖タンパク質が過剰発現した多剤耐性鼻咽頭がん, MDA-MB-231: トリプルネガティブ乳がん (TNBC), MCF-7: ER陽性/HER2陰性乳がん

図1. Parvifloron類の構造と各種ヒト培養がん細胞に対する増殖抑制活性

### 2. 研究の目的

本研究では TNBC 細胞に選択的に増殖抑制活性を示す化合物を基に設計した化学プローブを用いて標的タンパク質を同定し、作用機序を解明することを目的とする。Parvifloron 類のように B 環、C 環部分が高度に酸化されたジテルペン類の標的タンパク質同定の報告例はこれまでになく、新規作用機序の発見に繋がる可能性が非常に高い。

### 3. 研究の方法

構造活性相関研究の結果、A 環に結合したエステル構造の有無で活性に差異がないことが判明している (図 1. 化合物 1, 2)。この結果はエステル部分への化学修飾が可能であることを示唆し、プローブ化により生じる活性低下の問題を克服できる可能性がある。そこで、TNBC 細胞の増殖を選択的に抑制する化合物 3, 4 に関して、ビーズへの固定化法、ビオチン標識化法を利用して標的タンパク質の同定を試みることにした (図 2)。本プローブはヒト培養がん細胞への投与や細胞抽出物との反応に用いることから、有機溶媒中においてのみだけでなく、生理的条件下においても安定であることが求められる。従って、加水分解に安定なアミドや N-アルキル構造をプローブ内に取り入れることにした。所望のプローブを合成するためには 2 位ヒドロキシ基をアミノ基に変換する必要があるが、類似基質に対してアジド化を経由したアミノ基への変換反応が立体保持で進行することが報告されていたため、本方法を適用すれば合成可能であると考えた。

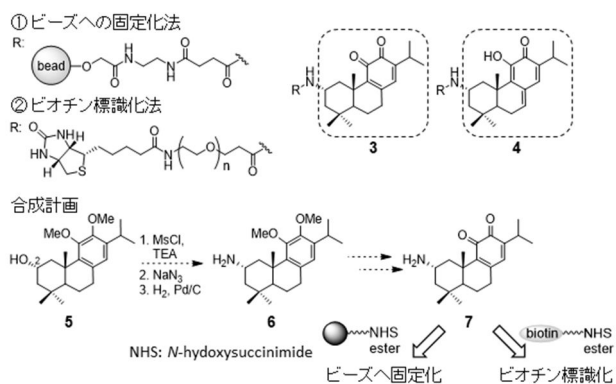


図2. 標的タンパク質検出のための化学プローブ

#### 4. 研究成果

初めにメシル化を経由したアジド基の導入を検討したところ、メシル体はアジド化反応条件においてメシラートの脱離に伴い、2,3 位にオレフィンが生じた化合物 (5 の合成前駆体) を与えることが判明した。メシル化を経由しないアジド基の導入も種々試みたものの、いずれの条件においてもアジド基の導入は困難であった。そこで 2 位ヒドロキシ基を酸化してケトンとしたのちに還元的アミノ化により、アミノ基を導入することとした。ケトンへの酸化反応は高収率で進行したものの、続く還元的アミノ化は様々な反応条件、反応基質においても進行しないことが明らかとなった。この他にもオキシム化やオレフィン体に対するヒドロホウ素化を経由する手法を試したが、いずれも導入が困難であったことからアミノ基の導入は断念することにした。続いて実施した 2 位ヒドロキシ基を利用した化合物 3,5 に対するエーテル化やエステル化による検討では、脱保護条件、及び基質の異性化を原因とする副反応により所望のプロープを得るに至らなかった。

本研究は TNBC 細胞の増殖抑制に関与する標的分子の同定を目指すことから、プローブ化が可能なより安定な化合物の創出が必須と考えられた。Parvifloron 類には F 以外にエステル位置が 4 位に置換された A, B, C, E がある。アビエタン部分の基本骨格は共通であることから本化合物群を利用することとした。アビエチン酸を出発原料に 15 段階で 4-*epi*-parvifloron A, C, E を合成し、構造活性相関を評価したところ 12 位に安息香酸エステルを有する化合物 8 (図 3) において高い選択性で TNBC 細胞の増殖を抑制することが判明した (*J. Org. Chem.*, 2019, 84, 3239–3248.)。さらに作用機序解明の一端として実施した細胞周期への効果において本化合物は影響を与えていないことから、TNBC 細胞特異的に発現する増殖に必須なタンパク質を標的としている可能性が高い。これらの結果はアビエタン型ジテルペン誘導体における新たな知見であり、今後は本化合物を基にした標的分子の同定が見込まれる。

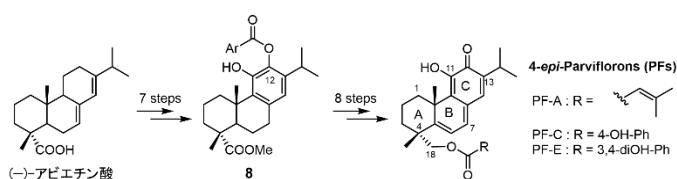


図3. TNBC細胞選択的増殖抑制活性を示す誘導体と4-*epi*-parvifloron類の構造

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yui Miyajima, Yohei Saito, Munehisa Takeya, Masuo Goto, Kyoko Nakagawa-Goto.	4. 巻 84
2. 論文標題 Synthesis of 4-epi-parviflorons A, C, and E: structure-activity relationship study of antiproliferative abietane derivatives.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 3239, 3248
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.joc.8b02832	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 坂田耕一、斎藤洋平、後藤（中川）享子
2. 発表標題 トリプルネガティブ乳がん選択的に増殖抑制活性を示す天然物誘導体プロープの設計と合成
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yui Miyajima, Yohei Saito, Munehisa Takeya, Masuo Goto, Kyoko Nakagawa-Goto.
2. 発表標題 Structure-activity relationship study of antiproliferative abietane diterpenes: Syntheses of 4-epi-parviflorons and its derivatives.
3. 学会等名 American Chemical Society National Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----