

平成22年5月20日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590027

研究課題名（和文） 癌治療薬を指向した脂溶性シグナル分子の開発

研究課題名（英文） Development of a fat soluble signal molecule for cancer chemotherapy

研究代表者

和田 昭盛 (WADA AKIMORI)

神戸薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80158683

研究成果の概要（和文）：

ゲラニルゲラノイン酸が環式構造を持たないレチノイド化合物（非環式レチノイド）とみなすことができることに着目し、不飽和部分が二重結合となった化合物、メチル基のない化合物あるいは二重結合を飽和した化合物を種々合成し、HL-60細胞に対する細胞増殖抑制作用、分化誘導作用およびアポトーシス誘導作用を測定した。その結果、二重結合の位置およびメチル基の有無の位置により、生物活性が大きく影響されることが判明した。この作用は、核内受容体を介して発現していることが予想された。これらの構造活性相関の結果は、構造の最適化等により、今後の癌治療薬開発するための重要な情報を提供することになったと思われる。

研究成果の概要（英文）：

As geranylgeranoic acid (GGA) was considered as an retinoic acid analog, various GGA analogs were efficiently synthesized and their biological activities were evaluated. The combination of conjugate polyene system and the position of methyl substituent played an important role in regulation of gene transcription and apoptosis-inducing activity in HL-60 cells. These high activities would be caused by high binding affinity to the receptors. The results provide useful information on the structure-activity relationship of GGA derivatives as mimic of acyclic retinoic acid analogs for the development of new drugs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：癌、シグナル伝達、核内受容体、生理活性、イソプレノイド、脂溶性リガンド

1. 研究開始当初の背景

癌はイニシエーション、プロモーションおよびプログレッションからなる多段階発現機構よりなる難治性疾患である。ビタミンD、レチノイド(ビタミンA)、ビタミンKは抗癌作用を有する化合物として知られているが、その作用メカニズムは未だ明らかにされていない。しかし、それらの活性中心は主に環(ステロイド骨格、ヨノン環、キノン環)と側鎖(共通のイソプレノイド骨格)の2つの部分に起因し、癌細胞をアポトーシス(細胞死)に導く作用や良性細胞へ分化を誘導する作用によるものであることが予想されている。これらの化合物は、全てイソプレノイド骨格から誘導されるテルペノイド化合物であり、その構造特性により生理作用の調節がなされており、脂溶性リガンドの性格付けがなされている。

一方、ゲラニルゲラノイン酸(GGA)は、レチノイン酸の1-6結合を開裂し、7-8および11-12二重結合(ナンバリングはレチノイン酸のものを使用)を水素で飽和した化合物(テトラヒドロ体)であり、7-8二重結合のみを水素化した化合物(ジヒドロ体)は、非環式レチノイドとして知られ、肝癌特異的に有効で近年臨床応用にも試行されている化合物である。ゲラニルゲラノイン酸の還元体であるアルコール(GG-OH)は癌遺伝子由来タンパク質であるRasファミリーのゲラニルゲラニル化に用いられ、癌細胞の活性化に重要な役割をはたしていることが知られている。(図1)

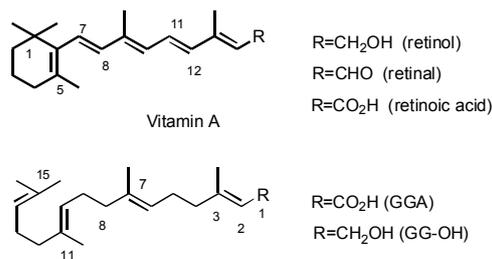


図1 ビタミンAとそのアナログの構造

そこで、癌発現機構における第二あるいは第三段階での分子生物学的メカニズム、特にRNR分子の機能を介した湿潤、増殖や転移などの癌関連因子を制御しうるような治療薬の開発を目的とするため、受容体の分子認識機構に基づいた脂溶性リガンド分子の開発研究を行うことにした。

2. 研究の目的

我々はこれまでに核内受容体であるRAR(レチノイン酸レセプター)およびRXR(レチノイドXレセプター)のシグナル分子であるall-trans-及び9-cis-レチノイン酸の様々な生理作用に着目し、その立体選択的合成法を確立すると共に、その合成方法を応用して種々のアナログ化合物を作るとともに生理活性の検討を行ってきた。

今回は、脂溶性ビタミンやそれを母核とするアナログにおいてアルキル側鎖のイソプレノ単位の繰り返し構造における数や、二重結合と飽和結合部分のつながり様式の変化、更にはメチル基の有無により、活性が大きく変化することが予想されるので、その構造活性相関をシステムチックに検討してことにした。(図2)

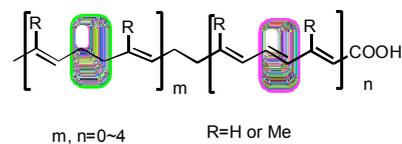


図2 イソプレノ側鎖の修飾によるアナログ化合物

合成したアナログ化合物は、発癌の各ステージにおいて癌細胞の細胞増殖抑制効果や癌細胞をアポトーシスへ誘導する作用についてスクリーニングをおこないより制癌作用の強い化合物を開発する。また、癌細胞の種類により活性が異なることが多いことから、肝臓癌、乳癌や前立腺癌などの異なる細胞での作用のスクリーニングを行い、癌特異性についても検討することにした。

3. 研究の方法

脂溶性ビタミン類のイソプレノイドの共

通構造に着目し、まず、不飽和および飽和結合を持つアルキル鎖誘導体を系統的に設計・合成する簡便かつ効率の良い合成法を確立し、多数のアナログ化合物を入手することにした。続いて、得られたアナログの生物活性スクリーニングにより、抗癌活性としてアポトーシス誘導能の高い化合物を見出し、更にその作用が受容体を介した作用であるかを確認するための作用解析を実施した。

(1) デメチル誘導体の合成法の確立

エノールトリフラートは、パラジウム触媒存在下、スズ試薬を使い分けることにより水素およびメチル基に交換することができる。一方、アセト酢酸エチルのジアニオンに求電子試薬を反応すると末端アニオンが反応することが知られている。そこでこれらの反応を組み合わせるにより、ゲラニルゲラノイン酸のメチル基を一個なくした各種モノデメチル体を合成した(図3)。

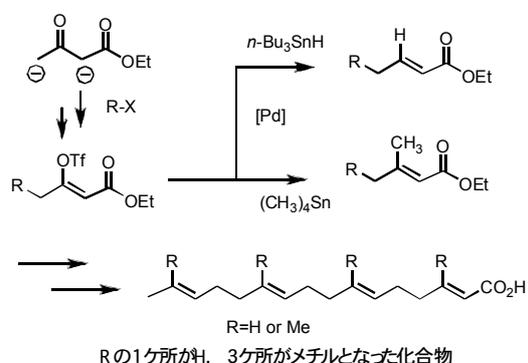


図3 エノールトリフラートからの置換基の変換とデメチル誘導体の合成

(2) デジヒドロ誘導体の合成

アルデヒドを原料として、Emmons-Horner反応により二重結合部分を構築し、官能基変換と、アセト酢酸エチルのジアニオンとの反応を組み合わせることにより、ゲラニルゲラノイン酸の不飽和結合部分を二重結合とした、デジヒドロ誘導体を合成した(図4)。

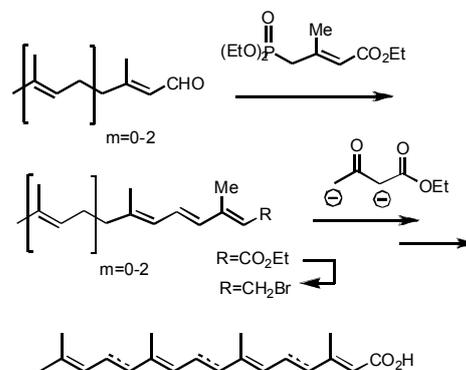


図4 ...の1ヶ所が二重結合となった化合物
デジヒドロ誘導体の合成

(3) ジヒドロ誘導体の合成

不飽和エステルを原料として、Red-Alで3置換二重結合部分を還元後、官能基変換と、アセト酢酸エチルのジアニオンとの反応およびメチル基の導入を組み合わせることにより、ゲラニルゲラノイン酸の不飽和結合部分を飽和結合としたジヒドロ誘導体を合成した(図5)。

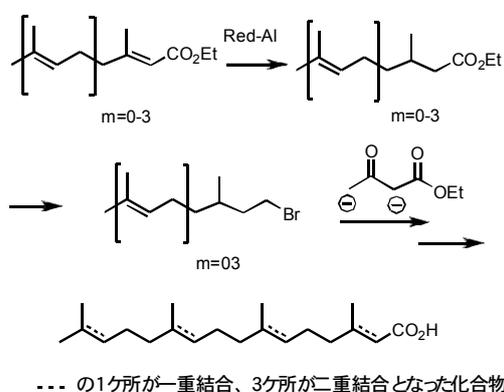


図5 ジヒドロ誘導体の合成

(4) 生理活性の測定

ここで合成した各種誘導体については、細胞増殖抑制作用、分化誘導作用、アポトーシス誘導作用および核内受容体RARやRXRに対する転写活性を測定した。

4. 研究成果

上記合成法により、ゲラニルゲラノイン酸をベースとしてデメチル体、デジヒドロ体およびジヒドロ体を各種合成することができた。

これらの誘導体の活性をHL-60細胞に対して検討した結果、8, 9-デジヒドロ体および3

位デメチル体が非環式レチノイドである 4, 5-デジヒドロ体よりも、強いアポトーシス誘導作用を示すことが判明した (図 6)。更に、これらの化合物は 9-*cis*-レチノイン酸よりも強い転写活性を示すことから、この生理活性は、核内受容体を介して発現しているものと考えられた。

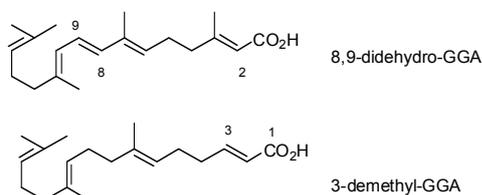


図 6 活性の強い誘導体

以上の結果より、ゲラニルゲラニオン酸アナログの生理活性は、メチル基ならびに二重結合の位置の組み合わせにより、大きく左右されることが判明した。今後、これらの構造活性相関を参考として、更に活性の強くなることが期待される誘導体の開発が可能になるものと思われる。

また、本研究過程において、トリフラートからの変換反応を応用して、重水素 5 個で標識したゲラニルゲラニオール合成を達成した。更に、重水素 1 2 個で標識したビタミン K₂ の合成にも成功した (図 7)。現在これらの化合物を用いて、蛋白質の同定やビタミン K の代謝など、生物化学的機能の解明を目指した研究を実施している。

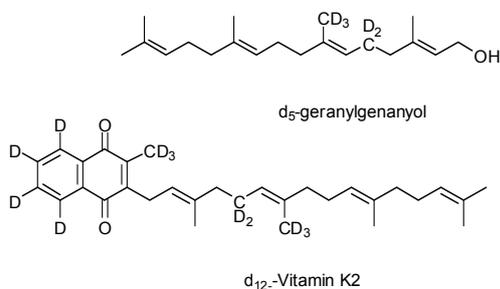


図 7 重水素標識した GG-OH と関連化合物

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 15 件) 全て査読有

- ① T. Okitsu, D. Nakazawa, A. Kobayashi, M. Mizohata, Y. In, T. and A. Wada, “*ipso*-Iodocyclization of Ethoxyethyl Ethers to Alkynes at the *ortho*-position: An Efficient Synthesis of Functionalized Spiro Compounds”, *Synlett*, **2010** (2), 203-206.
- ② T. Okitsu, D. Nakazawa, K. Nakagawa, T. Okano, and A. Wada, “Synthesis and Biological Evaluation of a 9Z-Retinoic Acid Analog Having 2-Substituted Benzo[*b*]furan”, *Chem. Pharm. Bull.*, **58**(3), 418-422 (2010).
- ③ Y. Suhara, A. Wada, and T. Okano, “Elucidation of the Mechanism Producing Menaquinone-4 in Osteoblastic Cells”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 1054-1057 (2009).
- ④ M. Ito, Y. Yamano, C. Tode, and A. Wada, “Carotenoid synthesis: Retrospect and recent progress”, *Arch. Biochem. Biophys.*, **483**, 224-228 (2009).
- ⑤ A. Wada, W. Fei, and M. Ito, “A Convenient Synthesis of 11Z-Didehydroretinal by Horner-Emmons Reaction Using Diphenyl Phosphonate” *Chem. Pharma, Bull.*, **56**(1), 112-114 (2008).
- ⑥ M. Ito, Y. Sudo, Y. Furutani, T. Okitsu, A. Wada, M. Homma, J. L. Spudich, and H. Kandori, “Steric Constraint in the Primary Photoproduct of Sensory Rhodopsin II Is a Prerequisite for Light-Signal Transfer to HtrII” *Biochemistry*, **47**(23), 6208-6215 (2008).
- ⑦ Y. Yamano, M. Ito, and A. Wada, “Total Synthesis of Cucurbitaxanthin A, Cycloviolaxanthin and Capsanthin 3,6-Epoxyde by Applying a Regioselective Ring Opening of Tetrasubstituted Epoxides” *Org. Biomol. Chem.*, (6), 3421-3427 (2008).
- ⑧ M. Katadae, K. Hagiwara, A. Wada, M. Ito, M. Umeda, P. J. Casey, and Y. Fukada, “Interacting Targets of the Farnesyl of Transducin γ -subunit” *Biochemistry*, **47**(32), 8424-8433 (2008).
- ⑨ A. Wada, N. Matsuura, Y. Mizuguchi, K. Nakagawa, M. Ito, and T. Okano, “Preparation and Biological Evaluation of 5-Substituted Retinoic Acids” *Bioorg. Med. Chem.*, **16** (18), 8471-8481 (2008).
- ⑩ T. Okitsu, D. Nakazawa, R. Taniguchi, and A. Wada, “Iodocyclization of Ethoxyethyl Ethers to Alkynes: A

Broadly Applicable Synthesis of 3-Iodobenzo[*b*]furans”, *Org. Lett.*, **10**(21), 4967-4970 (2008).

- ⑪ T. Okitsu, K. Iwatsuka, and A. Wada, “Cesium fluoride-promoted Stille coupling reaction: an efficient synthesis of 9*Z*-retinoic acid and its analogues using a practical building block”, *Chem. Commun.*, **2008**, 6330-6332.
- ⑫ A. Wada, Y. Mizuguchi, H. Miyake, M. Niihara, M. Ito, K. Nakagawa, and T. Okano, “Preparation and Biological Activity of Heteroarotins”, *Lett. Drug Design & Discov.*, **4** (6), 442-445 (2007).
- ⑬ Y. Yamano, Y. Fujita, Y. Mizuguchi, K. Nakagawa, T. Okano, M. Ito and A. Wada, “Synthesis of γ -Hydroxybuterolides Applying Crossed Aldole Condensation in the Presence of a Bulky Lewis Acid and Their Anti-tumor Activity”, *Chem. Pharm. Bull.*, **55** (9), 1365-1370 (2007).
- ⑭ M. Kamao, N. Tsugawa, Y. Suhara, A. Wada, T. Mori, K. Murata, R. Nishino, T. Ukita, K. Uenishi, K. Tanaka, and T. Okano, “Quantification of Fat-soluble Vitamins in Human Breast Milk by Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry”, *J. Chromatography B*, **859**, 192-200 (2007).
- ⑮ M. Torii, D. Kojima, T. Okano, A. Nakamura, A. Terakita, Y. Shichida, A. Wada, and Y. Fukada, “Two Isomers of a Chicken Melanopsins Show Blue Light Sensitivity”, *FEBS Lett.*, **581**, 5327-5331 (2007).

[学会発表] (計 33 件)

- 1 山野由美子, Venu Chary, M., 和田昭盛「位置および立体選択的なエポキシドの転位反応を利用した 3'-deoxycapsanthin および 3,4-didehydroxy-3'-deoxycapsanthin の全合成」(2010. 3. 29 岡山).
- 2 沖津貴志, 佐藤可奈, 和田昭盛「ヒドロジドを求核種とするヨード環化反応の開発」日本薬学会第 130 年会 (2010. 3. 28 岡山).
- 3 沖津貴志, Potewar, T. M., 佐藤可奈, 和田昭盛「アルコキシアミン類を求核種とするヨード環化反応の開発」日本薬学会第 130 年会 (2010. 3. 28 岡山).
- 4 沖津貴志, 岩塚欣也, 澤田夏美, 中川公恵, 岡野登志夫, 和田昭盛「9*Z*-レチノイン酸及び誘導体の高効率の合成と転写活性」第 28 回メディシナルケミストリーシンポジウム (2009. 11. 25 東京).
- 5 沖津貴志, 佐藤可奈, 澤田夏美, 中川公恵, 岡野登志夫, 和田昭盛「テルペノイド由来

疎水性ユニットを組み込んだ 9*Z*-レチノイン酸の合成と転写活」性第 28 回メディシナルケミストリーシンポジウム (2009. 11. 25 東京).

- 6 沖津貴志, 佐藤可奈, 和田昭盛「ヨード環化反応を利用したジヒドロピラゾール及びピラゾールの選択的合成」第 29 回有機合成若手セミナー (2009. 11. 24 神戸).
- 7 沖津貴志, 岩塚欣也, 和田昭盛, 中川公恵, 岡野登志夫「9*Z*-レチノイン酸の効率の合成とその応用」第 20 回日本レチノイド研究会 (2009. 11. 21 東京).
- 8 沖津貴志, 中澤大祐, 小林亮広, 溝畑雅裕, 和田昭盛「ヨウ素環化反応を機軸とするスピロ環の合成」第 35 回反応と合成の進歩シンポジウム (2009. 11. 16 金沢).
- 9 Okitsu, T.; Nakazawa, D.; Wada, A. “Concise Construction of 3-Iodobenzo-*[b]*furans by Iodocyclization”, *The Eleventh International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry* (2009. 11. 10 Kyoto).
- 10 和田昭盛, 須原義智, 山野由美子, 沖津貴志「重水素標識したグラニルゲラニオールおよびビタミン K の合成」第 53 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会 (2009. 11. 07 生駒).
- 11 沖津貴志, 中澤大祐, 和田昭盛「ヨウ素環化反応を用いるベンゾフラン類の網羅的合成」第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (2009. 10. 24 東大阪).
- 12 沖津貴志, 佐藤可奈, 和田昭盛「ヒドラジン誘導体を求核種とするヨウ素環化反応の開発」第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (2009. 10. 24 東大阪).
- 13 沖津貴志, 中澤大祐, 小林亮広, 溝畑雅裕, 尹康子, 石田寿昌, 和田昭盛「ヨウ素環化反応を活用する多官能性スピロ複素環の合成」第 59 回日本薬学会近畿支部総会・大会 (2009. 10. 24 東大阪).
- 14 Okitsu, T.; Nakazawa, D.; Wada, A. “Domino process of iodocyclization and Diels-Alder reaction for the construction of bridgehead-spiro heterocycles” *22nd International Congress on Heterocyclic Chemistry* (2009. 08. 04 St. John's).
- 15 沖津貴志, 中澤大祐, 小林亮広, 溝畑雅裕, 和田昭盛「ヨウ素環化反応を利用する複素環合成」第 7 回次世代を担う有機化学シンポジウム (2009. 07. 23 吹田).
- 16 沖津貴志, 岩塚欣也, 中澤大祐, 和田昭盛, 中川公恵, 岡野登志夫「環修飾レチノイン酸アナログの生物活性における置換基効果」第 324 回脂溶性ビタミン総合研究委員会 (2009. 07. 10 神戸).
- 17 沖津貴志, 岩塚欣也, 中川公恵, 岡野登

- 志夫, 和田昭盛「9Z-レチノイン酸及び誘導体の高効率の合成と生物活性日本ビタミン学会第61回大会(2009.05.31 亀岡).
- 18 和田昭盛, 沖津貴志, 岩塚欣也, 中川公恵, 岡野登志夫「4-置換-2H-クロメン環を有するレチノイン酸類の合成と生物活性」日本ビタミン学会第61回大会(2009.03.28 亀岡).
- 19 中澤大祐, 沖津貴志, 松岡るみ, 和田昭盛「ヨウ素環化反応を用いた3-Iodobenzo[b]furanの簡便構築法における置換基効果」日本薬学会第129年会(2009.03.28 京都).
- 20 和田昭盛, 沖津貴志, 岩塚欣也, 中川公恵, 岡野登志夫「4-置換-2H-クロメン環を有するレチノイン酸類の合成と生物活性について」日本レチノイド研究会第19回学術集会(2008.11.22 東京).
- 21 沖津貴志, 中澤大祐, 谷口理恵, 和田昭盛「ヨウ素環化反応を利用するベンゾフラン環の簡便構築法」第34回反応と合成の進歩シンポジウム(2008.11.4 京都).
- 22 沖津貴志, 中澤大祐, 谷口理恵, 和田昭盛「3-ヨードベンゾフランの新規合成法」第58回日本薬学会近畿支部総会・大会(2008.10.25 神戸).
- 23 岩塚欣也, 沖津貴志, 和田昭盛「9Z-レチノイン酸の効率的合成とアナログ合成への応用」第50回天然有機化合物討論会(2008.10.1 博多).
- 24 Takashi Okitsu, Kinya Iwatsuka, Akimori Wada「AN EFFICIENT SYNTHESIS OF 9Z-RETINOIC ACID AND ITS ANALOGUES USING A PRACTICAL BUILDING BLOCK」THE 15th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CAROTENOIDS(2008.6.25 Okinawa).
- 25 岩塚欣也, 沖津貴志, 和田昭盛「9Z-レチノイン酸とその誘導体の効率的合成法」第22回カロテノイド研究談話会(2008.6.28 沖縄).
- 26 和田昭盛, 王飛, 後藤友香里, 筆岡真実子, 伊藤允好, 中川公恵, 岡野登志夫「インデン環に置換基を有するレチノイン酸類の合成と生物活性」日本ビタミン学会第60回大会(2008.6.14 仙台).
- 27 沖津貴志, 中澤大祐, 谷口理恵, 和田昭盛「2位置換3-ヨードベンゾフランの新規合成法の開発」日本薬学会第128年会(2008.3.26 横浜).
- 28 岩塚欣也, 沖津貴志, 和田昭盛「9Z-レチノイン酸及びその誘導体の新規合成法の開発」日本薬学会第128年会(2008.3.27 横浜).
- 29 和田昭盛, 王飛, 水口ゆかり, 中川公恵, 岡野登志夫, 伊藤允好. 「デヒドログラニルゲラノイン酸類の合成と生物活性」第26回メディシナルケミストリーシンポジウム(2007.11.29, 相模大野)
- 30 和田昭盛, 後藤友香里, 筆岡真実子, 伊藤允好, 水口ゆかり, 中川公恵, 岡野登志夫「3位置換インデン環を有するレチノイン酸類の生物活性について」日本レチノイド研究会第18回学術集会(2007.11.24, 東京).
- 31 沖津貴志, 岩塚欣也, 和田昭盛「9Z-レチノイン酸の効率的な合成法の開発」第27回有機合成若手セミナー(2007.11.15, 京都).
- 32 岩塚欣也, 沖津貴志, 和田昭盛「9Z-レチノイン酸及びその誘導体の効率的短工程合成」第58回日本薬学会近畿支部総会・大会(2007.10.27, 高槻)
- 33 和田昭盛, 伊藤允好「重水素6個で標識したレチニルアセテートおよびβ-カロテンの合成」日本ビタミン学会第59回大会(2007.5.25, 佐世保).
- [図書](計1件)
- ① 山野由美子, 都出千里, 和田昭盛, シーエムシー出版, 『カロテノイドの科学と最新応用技術』第4章 カロテノイドの有機合成(2009), 38-48.
- [産業財産権]
該当なし
- [その他]
ホームページ等
<http://www.kobepharma-u.ac.jp/~ocls/>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
和田 昭盛 (WADA AKIMORI)
神戸薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 80158683
- (2) 研究分担者
沖津 貴志 (OKITSU TAKASHI)
神戸薬科大学・薬学部・助教
研究者番号: 50441209
- (3) 連携研究者
岡野 登志夫 (OKANO TOSHIO)
神戸薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 20131542