

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590098
 研究課題名（和文） マクロスフェライドを基盤とする新規抗癌剤の創製を目指した分子設計、合成、活性評価
 研究課題名（英文） Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Macrosphelide-based Compounds for Development of New Anticancer Agents
 研究代表者
 松谷 裕二（MATSUYA YUJI）
 富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・助教
 研究者番号：50255858

研究成果の概要:天然物マクロスフェライドを基盤とした新規抗癌性医薬品探索を目的として、マクロスフェライドの16員環基本骨格に、強力な抗腫瘍性天然物であるエポチロン類のチアゾール側鎖を組み込んだ人工ハイブリッド化合物を設計し、合成研究を行った。また、マクロライド骨格の一部を窒素原子で置換した、アザ-アナログの設計と合成も行った。その結果、天然のマクロスフェライドを大きく上回る抗癌活性を示す、新規人工設計マクロスフェライド誘導体を見出すことに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：有機化学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：アポトーシス、腫瘍細胞、薬物設計、構造活性相関

1. 研究開始当初の背景

糸状菌の産生する天然物、マクロスフェライド類は、ヒト白血病細胞と血管内皮細胞との接着を強力に阻害することから、新しい癌転移抑制剤としての有効性が示されている。加えて当研究室では、これらの天然物がある種の腫瘍細胞の増殖を抑制する効果、およびヒトリンパ腫細胞のアポトーシスを誘導する効果を併せ持つことを新たに見出した。これらの知見は、マクロスフェライド類が多面的な活性発現による新規な抗癌性医薬品開発にむすびつく有望なリード化合物になるこ

とを示している。

マクロスフェライド類の合成研究は、国内外含めていくつかの研究グループにより行われているが、それらの大部分は天然物のみをターゲットとした合成であり、医薬品開発を目指して化合物としての多様性を追求した研究はほとんど見られない。それゆえ、既存の合成法は、構造活性相関研究を進める上では実用性に乏しいものであった。ただ一つ、多様性と活性スクリーニングを目的とした合成研究が報告されているが、ここでは固相によるコンビナトリアル合成が応用されており、得られる化合物群は微量かつ純度保証

に欠けるという問題点を持っている。マクロスフェライド類の生物活性については、細胞接着阻害活性とそれに基づく *in vivo* での肺癌転移抑制効果について検討が行われている。これら *in vivo* 試験においては、抗癌剤シスプラチンとのコンビネーション治療の有効性について言及されているが、当研究室で見出しているマクロスフェライド類の抗腫瘍活性と照らし合わせると、細胞接着阻害活性と腫瘍細胞増殖抑制活性を併せ持つ誘導体が新たにデザイン、合成されれば、有効性が高い新規な抗癌性医薬品となる可能性が高い。更に、マクロスフェライド類のアポトーシス誘導能については、これまでに全く報告されていない新規な知見である。アポトーシスが異常をきたした癌細胞の自己防衛的なプログラム死としての側面があることを考えあわせると、アポトーシス誘導活性をもつマクロスフェライド類について更に構造最適化ができれば、従来にはない強力な抗癌剤としての実用化が達成されることが期待される。

2. 研究の目的

エポチロン類は、マクロスフェライド類と同様に 16 員環マクロライド骨格を有する天然物であり、極めて強力な抗腫瘍活性とアポトーシス誘導活性を示すことで知られている。本研究では、マクロスフェライドの持つ抗癌剤としての潜在的な可能性、およびエポチロン類との構造上そして活性プロファイルの類似性に着目して、これら天然物の新規ハイブリッド化合物の設計と合成を計画した。エポチロン類の特徴的化学構造の 1 つであるチアゾール側鎖は、その活性発現において重要な役割を担っていることが知られており、この構造をマクロスフェライドのコア骨格に組み込むことで、活性の増強と共に新規医薬品のシーズとなることが期待される。複数の天然物のハイブリッド化による人工化合物の設計は、医薬品探索において有効なアプローチの 1 つである。本研究では、2 年間の研究期間にて設計化合物の合成法の確立と活性評価、そして構造活性相関の考察に基づく医薬品候補化合物の探索を行う。これらの目的達成に向けて効率良く研究を行うため、次の 3 つの項目を柱として検討を進める。

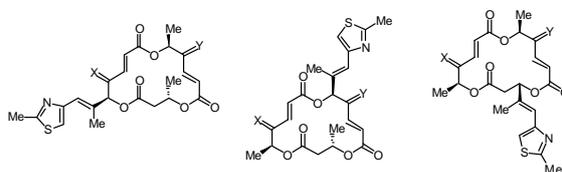
- (1) 閉環メタセシスを基盤とした一般性の高いマクロスフェライド骨格構築法の確立
- (2) マクロスフェライド骨格にチアゾール側鎖を導入したハイブリッドの設計と合成、活性評価
- (3) ハイブリッド化合物の抗腫瘍活性およびアポトーシス誘導活性における、チアゾール側鎖部の機能の解明

3. 研究の方法

(1) マクロスフェライドとエポチロン類のハイブリッド化合物の設計と合成

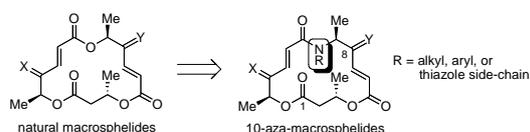
当研究室では最近、天然型マクロスフェライド化合物の閉環メタセシス (RCM) を利用した合成について検討を行い報告した。本法を応用することで、マクロスフェライドとエポチロンのハイブリッド化合物の合成について検討を行う。設計化合物の例を Figure 1 に示す。加えて、チアゾール部の有効性の比較確認のため、チアゾール環をピリジン環とした誘導体、立体化学を部分的に変化させた異性体などについても合成を進める予定である。

Figure 1



(2) アザマクロスフェライド類の設計と合成

マクロスフェライドのラクトン骨格の酸素原子を窒素原子に置換したラクタムアナログ、すなわちアザマクロスフェライドの設計を行う (Scheme 1)。天然マクロスフェライド骨格の 10 位をアミド結合とした 10-aza 体の合成を、RCM を鍵行程として達成する。ここで置換基 R は、単純なアルキル基やアリール基に加え、先のエポチロンハイブリッドと同じ、含チアゾール側鎖とした誘導体とする。また同じく、窒素置換位置を変えた 4-aza 体、16-aza 体についても検討を行い、それら誘導体の合成を達成する。



Scheme 1

(3) 合成誘導体の生物活性試験

合成を達成した種々の新規誘導体について、各種生物活性の評価を行う。内容は、アポトーシス誘導活性、腫瘍細胞に対する増殖抑制活性、正常細胞に対する毒性などである。これらは、新規抗癌性医薬品としての評価のマーカーとして重要である。アポトーシス誘導能の評価については、ヒトリンパ腫細胞 (U937) を用いることとし、初期スクリーニングとして、DNA フラグメンテーション誘発

を指標とする。また、フローサイトメトリーによるアポトーシス-ネクロシス定量も同時に行う。腫瘍細胞の増殖抑制評価には、各種固形癌細胞（大腸癌、胃癌等）を用いる。

(4) 活性発現メカニズムの解析

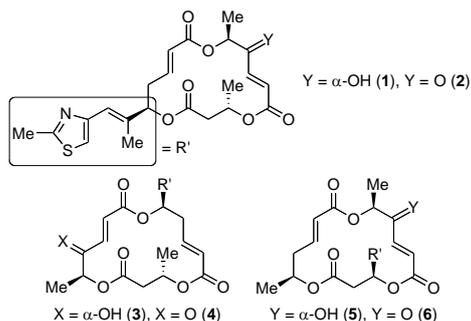
アポトーシス誘導のシグナル伝達経路を特定するための実験を行う。アポトーシスと関連の深い、ミトコンドリアやカスパーゼに及ぼす影響、細胞内活性酸素種への影響、カルシウムイオン濃度の変化、などがその内容である。

4. 研究成果

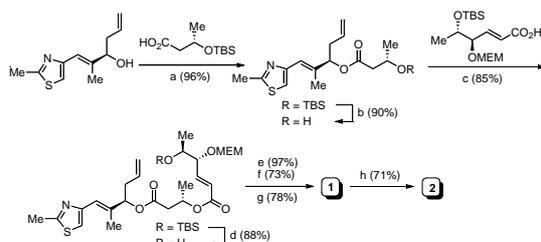
(1) マクロスフェライドとエポチロン類のハイブリッド化合物について

16 員環マクロスフェライド骨格にエポチロン側鎖を組み込んだハイブリッド化合物 (1~6, Figure 2) について、合成の検討を行った。

Figure 2



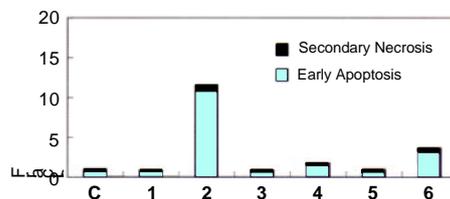
ハイブリッド 1 および 2 の合成について、Scheme 2 に例示する。まず、チアゾール部を含む光学活性アルコール体をキラルカルボン酸との脱水縮合反応に付してエステル体とし、その脱シリル化により得た化合物を更にキラルカルボン酸と縮合させてジエステル体を合成した。次いで、脱シリル化、アクリロイル化を経て RCM 前駆体とし、第二世代 Grubbs 触媒を作用させると、室温、24 時間という緩和な条件下にてマクロ環化が進行し、16 員環骨格を構築することができた。引き続き、MEM 基を TFA で除去することでハイブリッド化合物 (1) へと変換し、更にその水酸基を PDC 酸化に付して、ハイブリッド化合物 (2) を合成することに成功した。また、これと類似した合成経路により、Figure 2 に掲げる 6 種の化合物全てについて合成に成功した。更に、1, 2 のチアゾール部をピリジン環とした 2 種の類縁化合物の合成も達成した。



Scheme 2 Reagents: (a) EDC, DMAP, CH_2Cl_2 ; (b) TBAF, THF; (c) 2,4,6-trichlorobenzoyl chloride, DMAP, toluene; (d) TBAF, AcOH, THF; (e) acryloyl chloride, DIPEA, CH_2Cl_2 ; (f) second generation Grubbs' catalyst, CH_2Cl_2 ; (g) TFA, CH_2Cl_2 ; (h) PDC, CH_2Cl_2 .

今回合成した 6 種のハイブリッド化合物 (1~6) について、アポトーシス誘導能の評価を行った。細胞は、ヒトリンパ腫細胞 (U937) を用い、薬物濃度 $1 \mu\text{M}$ で 6 時間処理を行った時のアポトーシスおよびネクロシスの割合をフローサイトメトリーによりモニターした。Figure 3 に示す通り、ハイブリッド 2 および 6 において有意なアポトーシス誘導活性が観察され、特にハイブリッド 2 が最も強力な活性を示すという結果が得られた。またいずれの場合も、ネクロシス誘導は低かった。一方、天然物を含めたチアゾール側鎖を持たないマクロスフェライド類は、同濃度において全くアポトーシス誘導活性を示さなかったことから、ハイブリッド化合物に組み込まれたチアゾール側鎖部が、活性発現に重要な役割を果たしていることが推定される。

Figure 3



(2) アザマクロスフェライド類について

マクロスフェライド骨格のエステル部を、アミド構造とした新規設計化合物の合成を検討した。本研究で合成に成功した誘導体は、Figure 4 に示す通りである。いずれも、環化反応に RCM を利用して合成を行った。これらについて、ヒトリンパ腫細胞 (U937) を用いたアポトーシス誘導活性評価を行った。まず、10aza-MS1~10aza-MS4 について比較した結果を Figure 5 に示す。100 μM 濃度にて 10aza-MS3 および 10aza-MS4 が 80% を越えるアポトーシス誘導率を示し、より低濃度 (10 μM , 1 μM) においても効果が見られた。10aza-MS2 の場合は、10 μM 濃度にてネクロシスが優先した。これらの結果は、これま

で得られている知見と同様に、8位と14位のケトン構造（すなわち2つの共役エノン構造）がアポトーシス誘導活性に重要であることを示している。

Figure 4

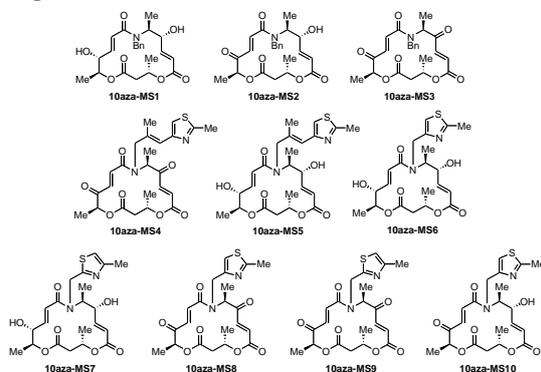


Figure 5

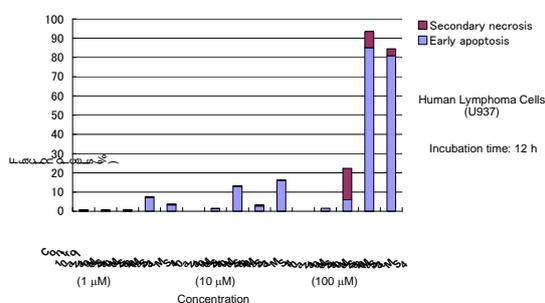
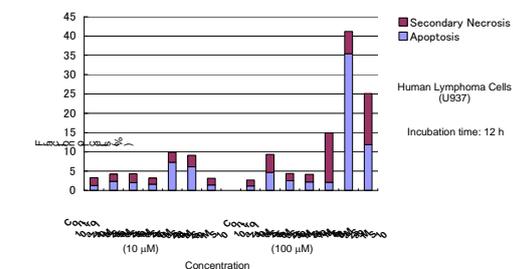


Figure 6



次いで、種々の置換様式を有するチアゾール側鎖を組み込んだ誘導体（10aza-MS5～10aza-MS10）について検討を行った。Figure 6に示す通り、最も高いアポトーシス誘導能を示したのは10aza-MS9であるが、100 μM濃度でアポトーシス誘導率35%であり、10aza-MS3および10aza-MS4の活性には及ばなかった。10aza-MS5～10aza-MS7では全く活性が見られないことから、やはり8位と14位のケトン構造は必須であると考えられる。

(3) 活性発現メカニズムについて

本化合物群により誘導されるアポトーシスシグナル伝達経路を特定するための実験を行ったところ、Fas活性化、caspase-3およびcaspase-8の活性化、ミトコンドリア膜電位(MMP)の低下、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇等が観察された。またこれらに先行して、細胞内活性酸素種(ROS)の一過性の増大が認められ、本薬剤が細胞内酸化ストレス誘発に関与していることが示された。更にこれらの応答は、全て抗酸化剤NAC(N-acetyl-L-cysteine)によって阻害されるという結果が得られた。これらの結果から、今回合成した化合物が示すアポトーシス誘導活性は、一過性のROS増大が引き金となったFas/caspase-ミトコンドリア経路の活性化とカルシウムイオン依存経路が関与しているものと考えられる。またリンパ腫細胞に加えて、ヒト結腸癌細胞(HCT116)や胃癌細胞に対しても、アポトーシス誘導と増殖阻害を示すことが明らかとなった。

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5件)

(1) Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Artificial Macrophelides in Search for New Apoptosis-inducing Agents. Matsuya, Y.; Kobayashi, Y.; Kawaguchi, T.; Hori, A.; Watanabe, Y.; Ishihara, K.; Ahmed, K.; Wei, Z.-L.; Yu, D.-Y.; Zhao, Q.-L.; Kondo, T.; Nemoto, H. *Chem. Eur. J.*, in press. (査読有)

(2) Mechanism of Apoptosis Induced by a Newly Synthesized Derivative of Macrophelides with a Thiazole Side Chain. Ahmed, K.; Matsuya, Y.; Nemoto, H.; Zaidi, S. F. H.; Sugiyama, T.; Yoshihisa, Y.; Shimizu, T.; Kondo, T. *Chem. Biol. Interact.* **2009**, *177*, 218-226. (査読有)

(3) Total Synthesis of 2-Nor-macrophelide A and B. Matsuya, Y.; Matsushita, T.; Sakamoto, K.; Nemoto, H. *Heterocycles* **2009**, *77*, 483-492. (査読有)

(4) Rapid and Transient Intracellular Oxidative Stress Due to Novel Macrophelides Trigger Apoptosis via Fas/caspase-8-dependent Pathway in Human Lymphoma U937 Cells. Ahmed, K.; Zhao, Q.-L.; Matsuya, Y.; Yu, D.-Y.; Feril, L. B., Jr.; Nemoto, H.; Kondo, T. *Chem. Biol.*

Interact. **2007**, *170*, 86-99. (査読有)

(5) Enhancement of Macrophelide-induced Apoptosis by Mild Hyperthermia. Ahmed, K.; Zhao, Q.-L.; Matsuya, Y.; Yu, D.-Y.; Salunga, T. L.; Nemoto, H.; Kondo, T. *Int. J. Hyperthermia* **2007**, *23*, 353-361. (査読有)

[学会発表] (計 13 件)

(1) 堀 綾奈, 渡邊優香, 河村知美, 松谷裕二, Ahmed K., Zhao Q.-L., 近藤 隆, 根本英雄: Macrophelide-Epothiloneハイブリッド化を基盤とした分子設計と創薬. 創薬懇話会 2008, 2008, 12, 11-12, 徳島.

(2) 小林勇太, 堀 綾奈, 松谷裕二, Ahmed K., Zhao Q.-L., 近藤 隆, 根本英雄: アポトーシス誘導による新規抗癌剤開発を指向したアザマクロスフェライド類の合成. 創薬懇話会 2008, 2008, 12, 11-12, 徳島.

(3) 渡邊優香, 河村知美, 堀 綾奈, 松谷裕二, Ahmed K., Zhao Q.-L., 近藤 隆, 根本英雄: 複素環側鎖を導入した人工型 macrophelide類の設計と合成. 第 38 回複素環化学討論会, 2008, 11, 21-23, 福山.

(4) 小林勇太, 堀 綾奈, 松谷裕二, Ahmed K., Zhao Q.-L., 近藤 隆, 根本英雄: Aza-macrophelide類の合成とアポトーシス誘導活性. 第 38 回複素環化学討論会, 2008, 11, 21-23, 福山.

(5) Matsuya Y., Kobayash Y., Ishihara K., Kawaguchi T., Ahmed K., Zhao Q.-L., Kondo T., and Nemoto H.: Synthesis of Novel Artificial Macrophelides as a New Apoptosis Inducing Agent. The 20th French-Japanese Symposium on Medicinal and Fine Chemistry, 2008, 9, 7-9, Bordeaux, France.

(6) Matsuya Y., Kobayash Y., Ishihara K., Kawaguchi T., Ahmed K., Zhao Q.-L., Kondo T., and Nemoto H.: Search for a New Anti-Cancer Agent by Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Macrophelide-Based Non-Natural Compounds. XXth International Symposium on Medicinal Chemistry, 2008, 8, 31 - 9, 4, Vienna, Austria.

(7) 近藤 隆, エヘメドカンワル, 松谷裕二, 趙 慶利, 根本英雄: 新規マクロスフェライド誘導体によるアポトーシス誘導とその

分子機構. 第 17 回日本アポトーシス研究会 学術集会, 2008, 8, 1-2, 京都.

(8) Kobayashi Y., Matsuya Y., and Nemoto H.: Design and Synthesis of Macrophelide Aza-analogues. The First International Symposium on Process Chemistry, 2008, 7, 28-30, Kyoto.

(9) Matsuya Y., Kawaguchi T., Ahmed K., Zhao Q.-L., Kondo T., and Nemoto H.: Synthesis and Bioactivity of Macrophelide-based Artificial Compounds. The First International Symposium on Process Chemistry, 2008, 7, 28-30, Kyoto.

(10) 堀 綾奈, 松谷裕二, Ahmed K., Zhao Q.-L., 近藤 隆, 根本英雄: 複素環含有マクロスフェライドの合成とアポトーシス誘導活性. 日本薬学会北陸支部第 118 回例会, 2008, 7, 5, 富山.

(11) Kondo T., Yu D.Y., Matsuya Y., Zhao Q.L., Ahmed K., Wei Z.L., Hori T., and Nemoto H.: Hyperthermia-induced apoptosis and its enhancement by novel chemical compounds. 10th International Congress on Hyperthermic Oncology. 2008, 4, 9-12, 2008, Munich, Germany.

(12) 堀 綾奈, 松谷裕二, 根本英雄: マクロスフェライド類を基盤としたドラッグデザインと合成. 日本薬学会第 128 年会, 2008, 3, 26-28, 横浜.

(13) 小林勇太, 松谷裕二, 根本英雄: アザマクロスフェライド類の合成研究. 日本薬学会第 128 年会, 2008, 3, 26-28, 横浜.

[その他]

(1) 近藤 隆, 松谷裕二, Yu D.-Y., Ahmed K., Zhao Q.-L., Wei Z.-L., 根本英雄: 分子設計によるアポトーシスを標的とした増感剤の開発. 第 38 回放射線による制癌シンポジウム-基礎と臨床の対話-. 第 47 回日本医学放射線学会生物部会学術大会 2008, 6, 20-21, 高知. (招待講演)

(2) 近藤 隆, 松谷裕二, Yu D.-Y., Ahmed K., Zhao Q.-L., Wei Z.-L., 根本英雄: 協会賞受賞講演、アポトーシスを標的とした新規合成増感剤の開発とその分子機構の解明. 第 14 回がん治療増感研究会 2008, 6, 7-8, 鈴鹿 (受賞講演).

(3) 松谷裕二: 「有機合成化学を基盤とする

創薬研究」-新規合成薬によるアポトーシス誘導と酸化ストレス. フォーラム富山「創薬」, 2008, 5, 27, 富山. (招待講演)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松谷 裕二 (MATSUYA YUJI)
富山大学・大学院医学薬学研究部・助教
研究者番号：50255858

(2) 連携研究者

根本 英雄 (NEMOTO HIDEO)
富山大学・大学院医学薬学研究部・教授
研究者番号：60006351

(3) 連携研究者

近藤 隆 (KONDO TAKASHI)
富山大学・大学院医学薬学研究部・教授
研究者番号：40143937