

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590109
 研究課題名（和文） フルオロメチレンホスホン酸の特性に基づく機能性分子の設計と新たな創薬手法の開発
 研究課題名（英文） Development of biologically active compounds based on features of fluoromethylene phosphonates
 研究代表者
 横松 力
 東京薬科大学・薬学部・教授
 研究者番号：70158369

研究成果の概要：

リン酸は生体内に普遍的に存在し、核酸の加リン酸分解やシグナルタンパク質のリン酸化など多くの生体機能に関与している。本研究課題では、ヌクレオシド加リン酸分解酵素およびリン脂質分解酵素を分子標的とした創薬研究を fragment-based drug design (FBDD) および Ligand-based drug design (LBDD) に基づいて展開させた。その結果、臨床で治療効果を発揮し得る高い阻害活性を有する PNP 阻害剤の創製に成功した。また、当教室で見いだされたスフィンゴミエリナーゼ阻害剤 SMA-7 の構造展開を企図して、SMA-7 関連化合物の第一世代改良合成法を確立した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：(1)ヌクレオチドアナログ (2)ジフルオロホスホン酸 (3)PNP 阻害剤 (4) TP 阻害剤 (5) fragment-based drug design (6)クリック反応 (7) スフィンゴミエリナーゼ (8) Huisgen 反応

1. 研究開始当初の背景

細胞には、細胞の増殖・分化、アポトーシスをつかさどる様々な情報伝達機構が存在する。蛋白質、糖質、脂質、核酸のリン酸化により生じる生体内リン酸エステル誘導体の多くは、細胞情報伝達機構においてメディエーターとなり細胞機能を制御している。本研究は、細胞情報伝達機構におけるリン酸エステル系メディエーターに着目し、その産生を制御している酵素を分子標的とした人工化合物の創製を目的とした。これらの人工化合物を分子プローブとして活用し、細胞情報

伝達機構の詳細を明らかとすることを目的とする Chemical Biology 研究へ展開すれば、細胞情報伝達機構の制御を基盤とする難治性疾患治療薬のシードを見いだすことも可能と考えられる。

2. 研究の目的

すでに、我々は生体内リン酸エステル「R-OP(O)(OH)₂」を生物学的等価構造に化学修飾する手法を用いて、1) プロテインチロシンホスファターゼ (PTP)、2) プリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP)、3) スフィ

ンゴミエリン分解酵素 (SMase) などを分子標的とする阻害剤創製研究を行ってきた。これらの研究において、リン酸エステル「ROPO(OH)₂」のミメティックスとして、物理化学的性質がリン酸エステルと近似し、加水分解に対する抵抗性を有するジフルオロメチレンホスホン酸「RCF₂PO(OH)₂」を活用した。本研究期間においては、新たな創薬手法を積極的に取り入れてこれまでの研究を展開させると共に、新たな分子標的に着目した新規生物活性化合物の創製を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 二基質複合型酵素阻害剤の創薬研究

近年、新しい創薬の手法として、FBDD (fragment-based drug design) が注目されている。これは、標的タンパク質に対して親和性を有する個々の低分子 (フラグメント) を適切なリンカーでつなぎ合わせ、比較的分子量が小さく、活性の高い化合物を効率的に見出すことができる方法である。リン酸及びリン酸エステル類は生体内に普遍的に存在する分子であり、これらを基質とする酵素が多数存在する。これらの酵素は、生体恒常性の維持に重要な役割を担っており、多くの場合リン酸結合部位および基質取り込み部位などから構成されている。リン酸結合部位を有する酵素阻害剤の創製において、フラグメント分子としてのリン酸と、リン酸結合部位の近傍に存在する他の基質結合部位に親和性を有するフラグメント分子とを適切なリンカーで連結することで、新規リガンドを見出すことが出来ると考えられる。このように設計された二基質複合型アナログは、リン酸結合部位でのアミノ酸残基とリン酸基の強い相互作用のために、標的酵素に高い親和性を示すことが期待できる。また、個々のフラグメント分子は様々なタンパク質に結合し得るが、フラグメント分子同士を連結することによって、高い選択性を示すことも期待される。

本研究では、T 細胞で亢進しており、白血病などに深く関与しているプリンヌクレオシドホスホリラーゼ (PNP) および癌組織で亢進しており、腫瘍血管新生、浸潤、転移に深く関与しているチミジンホスホリラーゼ (TP) の阻害剤創製を目的に、FBDD に立脚してそれぞれの二基質複合型アナログを設計した。また、それらの合成・機能解析を行った。

(2) SMase 阻害剤の創製研究

FBDD とは異なった手法による機能性分子の探索途上で、我々は *N*-パルミトイルスフィンゴシン-1-ホスフェートのジフルオロメチレン短鎖類縁体 SMA-7 が、脂質情報伝達の鍵

酵素であるスフィンゴミエリン分解酵素 (SMase) を阻害することを見出した。SMA-7 は、中性 SMase に対して菌代謝産物スキホスタチンと同等の高い阻害活性を示すことを明らかとしている。本研究では SMA-7 の構造活性相関研究を指向して、SMA-7 関連化合物の多様性合成法について検討した。

4. 研究成果

本研究では、当初の目標に沿って研究を展開させ、以下の成果を得た。

(1) 二基質複合型類縁型阻害剤の創製研究

PNP 阻害剤の創製においては、グアニンとリン酸ミミック (CF₂PO₃H₂) を4つのメチレンで連結したヌクレオチドアナログ (DFPP-G) と PNP の共結晶の X 線結晶解析に成功した。これらの情報を基にして、核酸塩基部を 9-デアザグアニンに置換した新規ヌクレオチドアナログ (DFPP-DG) をデザイン・合成したところ、予想通り活性向上が認められた。本阻害剤は、細胞内と等しいリン酸濃度 (1mM) でも高活性を示すことから、臨床で治療効果を発揮し得る高い阻害活性を有することが明らかとなった。このような阻害プロファイルは、これまで開発されている PNP 阻害剤には認められていない。従って、この結果は、優れたプロファイルを有する PNP 阻害剤の分子設計の基礎データとして貢献すると考えている。

TP 阻害剤の創製においては、TP と親和性を示すチミジン誘導体とリン酸ミミック (CF₂PO₃H₂) をクリック反応で連結する方法について検討したところ、リン酸ミミック (CF₂PO₃H₂) を有するアジド誘導体とエチニル基を有するピリミジン誘導体の Huisgen 反応を利用することにより、所望のクリック生成物が高収率で生成することを見出した。また、本研究は、クリック反応をリン酸ミミック型二基質複合型アナログのライブラリー構築に利用した最初の研究例と言える。

(2) SMase 阻害剤の創製研究

本研究においては、当教室で見いだされた SMase 阻害剤 SMA-7 をリードとして、構造最適化研究に活用できる新しい合成法について検討したところ、リン酸化セリンのフルオロメチレンホスホン酸アナログから合成するルートを見出すことが出来た。次年度以降の本研究の推進に貢献できる成果と評価でき、引き続き研究を展開させる予定である。また、SMA-7 が炎症性腸疾患におけるマクロファージ活性化に及ぼす ceramide の役割解明や脂肪細胞分化におけるスフィンゴミエリン水解経路の役割解明の有用なプローブとなることが判明した。今後、新規 SMase 阻害剤の創製研究と応用研究を展開する予

定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

1. S. Soeda, A. Sakata, T. Ochiai, K. Yasuda, Y. Kuramoto, H. Shimeno, A. Toda, R. Eyanagi, S. Hikishima, T. Yokomatsu, and S. Shibuya; Sphingomyelinase inhibition suggests a possible new strategy for the treatment of inflammatory bowel disease; *Curr. Drug Therapy*, 3, 218-225 (2008). 査読有
2. L. Glavas-Obrovac, M. Suver; S. Hikishima, T. Yokomatsu, and A. Bzowska; Inhibitory Properties of Nucleotides with Difluoromethylenephosphonic Acid as a Phosphate Mimic versus Calf Spleen Purine Nucleoside Phosphorylase and Effect of These Analogues on the Viability of Human Blood Lymphocytes; *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 26, 989-993 (2007). 査読有
3. S. Hikishima, M. Hashimoto, L. Magnowska, A. Bzowska, and T. Yokomatsu; Synthesis and Biological Evaluation of 9-Deazaguanine Derivatives connected by a Linker to Difluoromethylene phosphonic Acid as Multi-substrate Analogue Inhibitors of PNP; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 17, 4173-4177 (2007). 査読有
4. A. Sakata, T. Ochiai, H. Shimeno, S. Hikishima, T. Yokomatsu, S. Shibuya, A. Toda, R. Eyanagi, and S. Soeda; Acid Sphingomyelinase Inhibition Suppresses Lipopolysaccharide-mediated Release of Inflammatory Cytokines from Macrophages and Protects against Disease Pathology in Dextran Sulphate Sodium-induced Colitis in Mices; *Immunology*, 122, 54-64 (2007). 査読有
5. A. Sakata, K. Yasuda, T. Ochiai, H. Shimeno, S. Hikishima, T. Yokomatsu, S. Shibuya, and S. Soeda; Inhibition of lipopolysaccharide-induced Release of Interleukin-8 from Intestinal Epithelial Cells by SMA, a Novel Inhibitor of Sphingomyelinase and its Therapeutic Effect on Dextran Sulphate Sodium-induced Colitis in Mice; *Cell Immunology*, 245, 24-31 (2007). 査読有

[学会発表] (計 14 件)

1. T. Yatsu, M. Hashimoto, S. Hikishima, L. Magnowska, A. Bzowska, and T. Yokomatsu, 9-Deazaguanine derivatives: synthesis and inhibitory properties as multi-substrate analogue inhibitors of mammalian PNPs Joint Symposium of the 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids and the 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Sep., 2008, Kyoto.
2. K. Breer, B. Wielgus-Kutrowska, M. Hashimoto, S. Hikishima, T. Yokomatsu, R. H. Szczepanowski, M. Bochtler, A. Girstun, K. Staroń, and A. Bzowska, Thermodynamic studies of interactions of calf spleen PNP with acyclic phosphonate inhibitors, Joint Symposium of the 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids and the 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Sep., 2008, Kyoto.
3. 橋 真純, 橋本真梨子, 疋島貞雄, 横松 力
ホスホノジフルオロメチレン基を有するアジド誘導体と・-アルキニルピリミジン誘導体とのHuisgen反応
第38回複素環化学討論会, 2008年11月, 福山
4. 野田裕介, 疋島貞雄, 横松 力
SMase 阻害剤を指向した機能性分子の創製研究
日本薬学会第129年会、2009年3月、京都
5. 谷津智之, 疋島貞雄, 横松 力
ベンゼン環をスキャホールドとする二基質類縁型 PNP 阻害剤の創製研究
日本薬学会第129年会, 2009年3月, 京都
6. 疋島貞雄, 橋本真梨子, 添田秦司, 占野廣司, Magnowska Lucya, Agnieszka Bzowska, 渋谷 皓, 横松 力
日本ケミカルバイオロジー研究会第2回年会、2007年5月, 京都.
7. Sadao Hikishima, Arihiro Takatori, Atsushi Kojima, and Tsutomu Yokomatsu, Synthetic Studies for Difluoromethylenephosphonate Analogues of MRS2216, a Selective P2Y₁ Receptor Antagonist
6th AFMC International Medicinal

- Chemistry Symposium, 2007年7月, イスタンブール (トルコ)
8. Sadao Hikishima, Mariko Hashimoto, Lucyna Magnowska, Agnieszka Bzowska, Tsutomu Yokomatsu,
Synthesis and Biological Evaluation of 9-Deazaguanine Derivatives connected by a Linker to Difluoromethylene Phosphonic Acid
6th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, 2007年7月, イスタンブール (トルコ)
 9. Mariko Hashimoto, Sadao Hikishima, Lucyna Magnowska, Angieszka Bzowska, and Tsutomu Yokomatsu
Synthesis and evaluation of 9-deazaguanine derivatives as multi-substrate analogue inhibitors of PNP
Fifth International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2007年11月, 東京
 10. 鍋山卓志, 藏元佑嘉子, 落合敬史, 林田諭, 添田泰司, 疋島貞雄, 横松力, 渋谷皓, 占野廣司
脂肪細胞でのPPAR・2発現におけるセラミドシグナルの役割
第24回日本薬学会九州支部大会, 2007年12月, 福岡
 11. 東みお, 落合敬史, 藏元佑嘉子, 添田泰司, 坂田晃, 疋島貞雄, 横松力, 渋谷皓, 占野廣司
T細胞受容体を介した・・・産生におけるセラミドシグナルの役割
第24回日本薬学会九州支部大会, 2007年12月, 福岡
 12. 橋本真梨子, 疋島貞雄, 横松力
リン酸等価体を有する新規2基質複合類縁型PNP阻害剤の創製研究
日本薬学会第128年会, 2008年3月, 横浜
 13. 橋真純, 疋島貞雄, 横松力
Huisgen反応を用いた新規2基質複合類縁型TP阻害剤の創製研究
日本薬学会第128年会, 2008年3月, 横浜
 14. 室野井真, 山岸丈洋, 疋島貞雄, 横松力
SMase阻害剤SMA-7誘導体の新規合成法の開発
日本薬学会第128年会, 2008年3月, 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横松力 (YOKOMATSU TSUTOMU)
東京薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：70158369

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

添田 泰司 (SOEDA SHINJI)
福岡大学・薬学部・教授
研究者番号：20078695

ANGIESKA BZOWSKA

ワルシャワ大学・理学部・教授

(4) 研究協力者

疋島 貞雄 (HIKISHIMA SADAO)
東京薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：70398816

山岸 丈洋 (YAMAGISHI TAKEHIRO)

東京薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90297606

橋本 真梨子 (HASHIMOTO MARIKO)

東京薬科大学大学院・薬学研究科・大学院生
平成19年度

室野井 真 (MURONOI SHIN)

東京薬科大学大学院・薬学研究科・大学院生
平成19年度

橋 真純 (TACHIBANA MASUMI)

東京薬科大学大学院・薬学研究科・大学院生
平成19・20年度

谷津 智之 (YATSU TOMOYUKI)

東京薬科大学大学院・薬学研究科・大学院生
平成20年度

野田 裕介 (NODA YUSUKE)

東京薬科大学大学院・薬学研究科・大学院生
平成20年度