

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05715

研究課題名（和文）C797S変異EGFRに有効なA環部及びF環部改変ラメラリン系阻害剤の開発

研究課題名（英文）Development of A- and F-ring-modified lamellarin type inhibitors effective for C797S mutated EGFR

研究代表者

福田 勉（Fukuda, Tsutomu）

長崎大学・環境保全センター・准教授

研究者番号：80295097

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：EGFRチロシンキナーゼ阻害剤の開発を目的として、A環部およびF環部を修飾したラメラリンNおよびアザラメラリンN誘導体の効率的な合成法を確立した。また、A環の20位および21位に3-(ジメチルアミノ)プロポキシ基を有するアザラメラリンN誘導体が、対応するラメラリンN誘導体に比べて高いEGFRキナーゼ阻害活性を示すことを見出した。さらに、アザラメラリンN誘導体は、EGFR T790M/L858R を持つがん細胞株の増殖を野生型EGFRを持つがん細胞株よりも選択的に阻害することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上皮成長因子受容体（EGFR）のキナーゼドメインの変異による、非小細胞肺がんの薬剤耐性化に関する問題が顕在化しつつある。研究代表者らは、海洋天然物ラメラリンNに着目してEGFRチロシンキナーゼ阻害剤に関する研究を進めてきた。その結果、ラメラリンN誘導体やアザラメラリンN誘導体に変異EGFRチロシンキナーゼに対して高い阻害活性を持つことを見出した。ラメラリンN誘導体やアザラメラリンN誘導体は従来のEGFRチロシンキナーゼ阻害剤とは大きく異なる構造を持つため、従来のEGFRチロシンキナーゼ阻害剤と交差耐性を持たない阻害剤のリードとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：To develop EGFR tyrosine kinase inhibitors, we have established an efficient method for synthesizing A-ring and F-ring modified lamellarin N and azalamellarin N derivatives. We also found that azalamellarin N derivatives possessing 3-(dimethylamino)propoxy groups at 20 and/or 21 positions of the A-ring exhibit higher EGFR kinase inhibitory activity than the corresponding lamellarin N derivatives. Moreover, azalamellarin derivatives selectively inhibit the proliferation of EGFR T790M/L858R mutant cells over EGFR WT cells.

研究分野：有機合成化学、創薬化学

キーワード：ラメラリン アザラメラリン A環部改変 F環部改変 EGFRキナーゼ阻害剤（EGFR-TKI）

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor, EGFR) は、細胞膜に貫通して存在するチロシンキナーゼ型受容体であり、細胞外のシグナルを細胞核まで伝達することで細胞の増殖や成長を制御する。正常な野生型 EGFR (EGFR WT) の細胞内領域に存在するキナーゼドメインが、exon 19 欠損変異 (exon 19 del) や L858R 変異などの活性化変異で常時活性化され、がんを発症する。特に非小細胞肺がんの約 50%にこの変異が見られるため、活性化変異 EGFR を標的としたチロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) が非小細胞肺がんの治療薬として開発されてきた。特にゲフィチニブ、エルロチニブ、アファチニブなどの第一世代や第二世代の EGFR-TKI が著効する。しかし治療から1年ほどで、EGFR に T790M 変異 (耐性化変異) が生じ、非小細胞肺がんはこれらの薬剤に対して耐性を獲得する。この耐性化した非小細胞肺がんに対して新たに第三世代 EGFR-TKI オシメルチニブが開発され、本邦でも 2016 年 5 月より臨床使用されている。しかしながらオシメルチニブの継続使用により、EGFR の新たな C797S 耐性化変異が生じオシメルチニブが無効となる。現在、C797S 耐性化変異 EGFR をもつ非小細胞肺がんに対する EGFR-TKI は存在せず、新たな作用機序に基づく EGFR-TKI の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、耐性変異 EGFR に有効な A 環部及び F 環部を改変したラメラリン誘導体の開発である。

3. 研究の方法

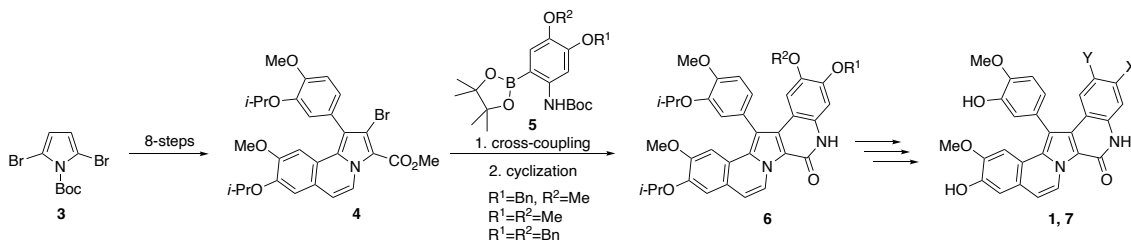
化学合成・ドッキングシミュレーションは研究代表者である福田が行った。また合成化合物のキナーゼ阻害活性評価ならびにがん細胞増殖阻害活性評価は共同研究者である岩手医科大学の西谷教授が行った。

4. 研究成果

(1) A 環部改変アザラメラリン N 誘導体の活性評価

アザラメラリン N (1) とは、海洋天然物ラメラリン N (2) の B 環部ラクトン環をラクタム環に置換した構造を持つ。また、アザラメラリン N (1) はキナーゼの一種である GSK-3β に対してラメラリン N (2) より高い阻害活性を持つこと、また阻害活性が ATP 濃度非依存的であることが報告されている。以前、我々はラメラリン N (2) の A 環部 20 位、21 位にアミノアルキル基を持つ誘導体が耐性変異 EGFR を酵素レベルで強力に阻害することを報告した [Bioorg. Med. Chem. 25, 6563 (2017)]。以上のことからアザラメラリン N (1) の A 環部 20 位、21 位にアミノアルキル基を持つ誘導体は、ATP 濃度非依存的に EGFR を阻害するものと期待した。

A 環部改変アザラメラリン N 誘導体の合成は、スキーム 1 に従って行った。市販のピロールから大量合成可能な化合物 3 を出発物質とし、化合物 4 を合成した。その後、4 とボロン酸ピナコールエステル 5 とを鈴木-宮浦カップリングさせ、次いで環化を行うことによりアザラメラリン誘導体 6 を得た。その後、6 の A 環部酸素上の保護基 (R¹, R²) を選択的に脱保護し、得られた誘導体をさらに官能化することによりアザラメラリン N (1) およびその A 環部改変誘導体 6 を合成した。



スキーム 1

EGFR WT および EGFR T790M/L858R 変異体のキナーゼドメインを用いたアザラメラリン誘導体のキナーゼ阻害活性を評価した。試験化合物の 50%阻害濃度 (IC₅₀) を表 1 に示す。20 位もしくは 21 位に 3-(ジメチルアミノ)プロピル基を導入したアザラメラリン誘導体は 7b-e は、アザラメラリン N (1) と比較して阻害活性が大幅に上昇し、また対応するラメラリン誘導体と比較しても高い阻害活性を示した。このことから、B 環部ラクタム NH 基はキナーゼ阻害活性を増強するために不可欠な構造単位であることが示唆された。さらに、すべてのアザラメラリン類縁体の T790M/L858R 変異 EGFR に対する阻害活性は、EGFR WT に対する阻害活性より高いものであった。

表 1. EGFR WT および T790M/L858R 変異 EGFR キナーゼドメインに対する A 環部改変アザラメラリン N 誘導体の阻害活性

Compound	X	Y	IC ₅₀ (nM) ^a	
			WT	T790M/L858R
1	OH	OMe	307.7	134.8
7a	OMe	OMe	259	65.3
7b	O(CH ₂) ₃ NMe ₂ ·TFA	OMe	15.5	5.7
7c	O(CH ₂) ₃ NMe ₂ ·TFA	OH	24.7	10.2
7d	OH	O(CH ₂) ₃ NMe ₂ ·TFA	23.6	16.6
7e	O(CH ₂) ₃ NMe ₂ ·TFA	O(CH ₂) ₃ NMe ₂ ·TFA	4.6	1.7

^a IC₅₀ values were determined at an ATP concentration of 10 μM.

アザラメラリン誘導体が ATP 競合的に作用するか非競合的に作用するかを検証するために、アザラメラリン誘導体濃度 1 μM で、3 種類の ATP 濃度 (10, 100, 1000 μM) を用いてキナーゼ阻害率を測定した。その結果を表 2 に示す。EGFR WT、T790M/L858R 変異 EGFR の阻害率はともに、ATP 濃度の増加にしたがって減少した。これらの結果から、アザラメラリン誘導体は、EGFR WT、T790M/L858R 変異 EGFR とともに ATP 競合的に阻害することが示唆された。

表 2. EGFR WT および T790M/L858R 変異 EGFR に対するアザラメラリン類縁体の阻害能に及ぼす ATP 濃度の影響

Compound	EGFR WT (% inhibition)			EGFR T790M/L858R (% inhibition)		
	ATP (10 μM)	ATP (100 μM)	ATP (1,000 μM)	ATP (10 μM)	ATP (100 μM)	ATP (1,000 μM)
1	79.4	18.1	4.2	88.9	18.9	5.5
7a	71.5	14.1	0.6	92.7	37.8	16.9
7b	83.3	19.4	4.7	99.1	69.9	0
7c	83.2	26.9	7.4	99.0	77.5	0
7d	84.9	27.8	9.1	99.1	91.5	14.3
7e	87.7	33.2	12.8	97.8	84.9	13.3

また、アザラメラリン誘導体の EGFR キナーゼ阻害活性における阻害モードを推定するため、ドッキングシミュレーションを実施した。ここでは、EGFR (T790M/L858R/V948R)-ゲフィチニブ共結晶データ [PDB ID: 4I22] を用いた。図 1 には高い阻害活性を示した **7e** についてのドッキングモデルを示した。このドッキングモデルによると **7e** の平面五環性骨格 (ABCDE 環) は、A 環部が開口部に、E 環が特異性ポケットに配向するように ATP 結合ポケットを占有していた。B 環部のラクタムカルボニル (C=O) 基は、ヒンジ領域に存在する Met793 の NH 基と、ラクタム NH 基は Met793 のカルボニル (C=O) 基とそれぞれ水素結合を形成していた。また F 環部 13 位に存在する水酸基は Arg841 のカルボニル (C=O) 基と水素結合を形成していた。さらに 20 位および 21 位の 3-(ジメチルアミノ)プロピル基は Phe795 の主鎖カルボニル (C=O) 基と Asp800 と Glu804 の側鎖カルボキシル基に囲まれた負に帯電した小ポケットに配向し、アンモニウム基が Asp800 や Glu804 の側鎖カルボキシル基と水素結合を形成していた。

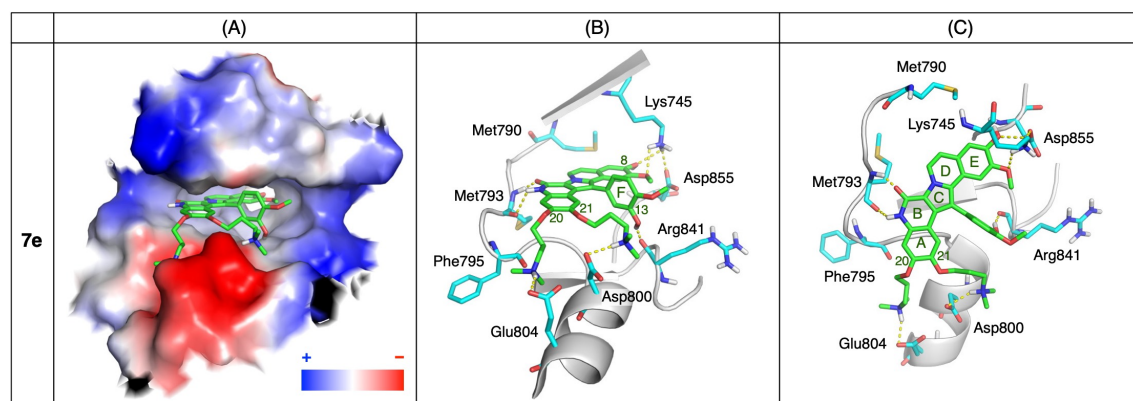


図 1. EGFR (T790M/L858R/V948R)-**7e** のドッキングモデル

さらに EGFR 変異を持たないがん細胞株 (A549) と T790M/L858R 変異を持つがん細胞株 (NCI-H1975) についてアザラメラリン N (**1**) および誘導体 **7b**, **7e** の増殖阻害活性評価を行った (表 3)。3 種類の誘導体はすべて、A549 よりも NCI-H1975 に対して高い阻害活性を示し、野生

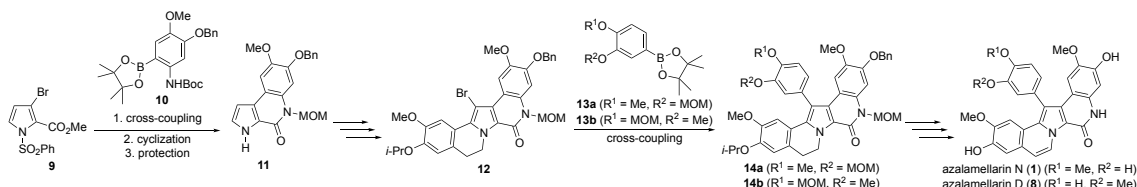
型 EGFR より EGFR T790M/L858R 変異体を選択的に阻害することが示された。なお、**1** は、**7b** および **7e** よりも顕著に強力な細胞毒性を示したが、これはそのマルチターゲット性によるものであると思われる。

表 3. がん細胞株 A549 および NCI-H1975 に対するアザメラリン N 類縁体の増殖阻害活性

Compound	IC ₅₀ (μM)	
	A549	NCI-H1975
1	0.0155	0.0019
7b	1.04	0.35
7e	2.04	1.36

(2) F 環部を改変したアザメラリン N 誘導体の合成手法の確立

F 環部を改変したアザメラリン誘導体合成において、従来のアザメラリン合成法では、効率の面から問題があった。今回、アザメラリン N (**1**) および F 環部 13 位および 14 位置換基の位置異性体であるアザメラリン D (**8**) に着目し、F 環部導入を合成の終盤に行う合成法を確立することにした (スキーム 2)。ここでは、既知のピロール誘導体 **9** を出発物質として、ボロン酸ピナコールエステル **10** とのクロスカップリングを行い、次いで環化、メトキシメチル (MOM) 保護することで **11** へと誘導した。その後、DE 環形成、位置選択的ブロモ化を経て五環性鍵中間体 **12** を得た。五環性鍵中間体 **12** とボロン酸ピナコールエステル **13** とのクロスカップリング反応を行いアザメラリンの基本骨格を持つ **14** へと誘導した。カップリング体 **14** について DDQ 処理、脱保護を順次行うことで、アザメラリン N (**1**) および D (**8**) の合成を達成した。



スキーム 2

(3) A 環部及び F 環部を改変したラメラリンおよびアザメラリン誘導体の合成手法の確立

上述した合成手法を駆使することで A 環部及び F 環部を改変したラメラリンおよびアザメラリン誘導体の合成手法を確立した。現在、得られた誘導体について生理活性評価を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Ishibashi Fumito, Fukuda Tsutomu, Zha Shijiao, Hashirano Aya, Hirao Shotaro, Iwao Masatomo	4. 巻 85
2. 論文標題 Concise synthesis and in vitro anticancer activity of benzo[g][1]benzopyrano[4,3-b]indol-6(13H)-ones (BBPIs), topoisomerase I inhibitors based on the marine alkaloid lamellarin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 181 ~ 191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbaa028	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 -
1. 著者名 Fukuda Tsutomu, Anzai Mizuho, Nakahara Akane, Yamashita Kentaro, Matsukura Kazuaki, Ishibashi Fumito, Oku Yusuke, Nishiya Naoyuki, Uehara Yoshimasa, Iwao Masatomo	4. 巻 34
2. 論文標題 Synthesis and evaluation of azalamellarin N and its A-ring-modified analogues as non-covalent inhibitors of the EGFR T790M/L858R mutant	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 116039 ~ 116039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2021.116039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fukuda Tsutomu, Okutani Seiya, Sumi Mayu, Miyagi Kazuhito, Onodera Gen, Kimura Masanari	4. 巻 103
2. 論文標題 Divergent Total Synthesis of Azalamellarins D and N	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 HETEROCYCLES	6. 最初と最後の頁 862 ~ 862
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/COM-20-S(K)53	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nishiya Naoyuki, Oku Yusuke, Ishikawa Chie, Fukuda Tsutomu, Dan Shingo, Mashima Tetsuo, Ushijima Masaru, Furukawa Yoko, Sasaki Yuka, Otsu Keishi, Sakyo Tomoko, Abe Masanori, Yonezawa Honami, Ishibashi Fumito, Matsuura Masaaki, Tomida Akihiro, Seimiya Hiroyuki, Yamori Takao, Iwao Masatomo, Uehara Yoshimasa	4. 巻 112
2. 論文標題 Lamellarin 14, a derivative of marine alkaloids, inhibits the T790M/C797S mutant epidermal growth factor receptor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1963 ~ 1974
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14839	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukuda Tsutomu, Matsuoka Fuyuki, Matsuo Yuri, Yoshioka Naoki, Onodera Gen, Kimura Masanari, Ishibashi Fumito, Iwao Masatomo	4. 巻 99
2. 論文標題 Synthesis and Evaluation of Topoisomerase I Inhibitors Possessing the 5,13-Dihydro-6H-benzo[6,7]indolo[3,2-c]quinolin-6-one Scaffold	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 HETEROCYCLES	6. 最初と最後の頁 1032 ~ 1032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/COM-18-S(F)70	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukuda Tsutomu, Ishibashi Fumito, Iwao Masatomo	4. 巻 83
2. 論文標題 Lamellarin alkaloids: Isolation, synthesis, and biological activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Alkaloids: Chemistry and Biology	6. 最初と最後の頁 1 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/bs.alkal.2019.10.001	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26件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大橋愛美, 福田勉, 岡村睦美, 西谷直之, 岩尾正倫, 旦慎吾
2. 発表標題 高い抗がん選択性を持つ新規合成ラメラリン類縁体 Azalam 4 の抗がん作用様式の解析
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村萌香, 神崎香穂, 是枝杏佳, 杉山拓朗, 福田勉, 石橋郁人, 川崎則彦, 石原淳, 武田弘資
2. 発表標題 パイロトローシス抑制剤の探索
3. 学会等名 令和3年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大橋愛美, 福田勉, 岡村睦美, 西谷直之, 岩尾正倫, 旦慎吾
2. 発表標題 pan-CDK阻害活性を示す新規合成ラメラリン類縁体Azalam 4の細胞特異的なアポトーシス誘導作用
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田勉
2. 発表標題 多環性海洋天然物ラメラリンの構造変化による新規抗腫瘍活性物質の開発
3. 学会等名 先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会2021 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大橋愛美, 福田勉, 岡村睦美, 西谷直之, 岩尾正倫, 旦慎吾
2. 発表標題 強い抗がん選択性を持つ新規合成ラメラリン類縁体 Azalam4の抗がんメカニズム解析
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大橋愛美, 福田勉, 岡村睦美, 西谷直之, 岩尾正倫, 旦慎吾
2. 発表標題 強い抗がん特異性を示しCDKを阻害する新規ラメラリン類縁体Azalam4の同定
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大田原有香, 小田亮平, 福田勉, 小野寺玄, 木村正成
2. 発表標題 A環およびF環を改変したラメラリンN誘導体の合成研究
3. 学会等名 2020年日本化学会九州支部秋期研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角真由, 奥谷浄也, 福田勉, 小野寺玄, 木村正成
2. 発表標題 アザメラリンNの合成法の開発
3. 学会等名 2020年日本化学会九州支部秋期研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角真由, 奥谷浄也, 宮城一仁, 福田勉, 小野寺玄, 木村正成
2. 発表標題 アザメラリンDおよびNの全合成
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会 (2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西谷直之, 佐京智子, 奥裕介, 福田勉, 旦慎吾, 矢守隆夫, 石橋郁人, 上原至雅, 岩尾正倫
2. 発表標題 薬剤耐性 EGFR T790M/C797S に対する lamellarin と cetuximab の併用効果
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小田亮平, 辻圭弥, 福田勉, 小野寺玄, 木村正成
2. 発表標題 F環部改変ラメラリンN誘導体合成法の開発
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮城一仁, 中野悠香, 福田勉, 小野寺玄, 木村正成
2. 発表標題 20位を改変したアザラメラリンN誘導体の合成
3. 学会等名 第56回化学関連支部合同九州大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大橋愛美, 福田勉, 岡村睦美, 西谷直之, 宇野佑子, 澤匡明, 岩尾正倫, 旦慎吾
2. 発表標題 強い抗がん選択性を持つCDK4/6を標的とした新規ラメラリン類縁体の同定
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部壮矩, 渡辺菜美, 佐京智子, 奥裕介, 福田勉, 旦慎吾, 矢守隆夫, 石橋郁人, 上原至雅, 岩尾正倫, 西谷直之
2. 発表標題 第3世代EGFRチロシンキナーゼ阻害薬耐性非小細胞肺癌に対するLamellarin14とCetuximab併用効果の検討
3. 学会等名 第58回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮城一仁, 中野悠香, 福田勉, 小野寺玄, 木村正成
2. 発表標題 20位酸素官能基上の置換基を改変したアザラメラリンN類縁体の合成
3. 学会等名 日本化学会第100春季年会 (2020)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap https://researchmap.jp/t-fukuda ORCID https://orcid.org/0000-0002-5400-2808 Google Scholar https://scholar.google.co.jp/citations?user=i6AKg0gAAAAJ&hl=ja 長崎大学工学部工学科 化学・物質工学コース 有機生命化学研究室 http://www.cms.nagasaki-u.ac.jp/lab/yuuki/

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
研究分担者	西谷 直之 (Nishiya Naoyuki) (10286867)	岩手医科大学・薬学部・教授 (31201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------