

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590102

研究課題名（和文）抗腫瘍活性フラビン類縁体の分子設計とコンピューター支援ソフト利用
酵素阻害様式研究課題名（英文）Molecular design and enzyme inhibition mode using software supported
by computer for antitumor active flavin derivatives

研究代表者

永松 朝文（NAGAMATSU TOMOHISA）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：40155966

研究成果の概要（和文）：

本研究は、細胞増殖機能調節に関わっている酵素のチロシンキナーゼを阻害して、腫瘍細胞増殖を阻害する新規抗腫瘍薬開発を目的に行った研究である。デアザフラビン類縁化合物に関して、抗腫瘍活性データとコンピューターを駆使した酵素へのドッキングデータよりバーチャルスクリーニング系を構築した。この系より得られた活性情報を基にデザインした新たな活性有効化合物を合成・評価する新しい高効率抗腫瘍活性化合物検索系を構築した。

研究成果の概要（英文）：

The present study is the research for the purpose of the development of new antineoplastic drugs, which obstruct the tyrosine kinase of the enzyme concerned with the cell proliferation function adjustment and inhibit the tumor cell multiplication. We built the virtual screening system depended on the antitumor activities and docking data into the enzyme of deazaflavin analogs. The high, new and efficient search system, which can synthesize and evaluate the significant compounds designed as antitumor active compounds based on the virtual screening system, was constructed in this study.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬科学

キーワード：フラビン、デアザフラビン、ステロイド、抗腫瘍、酵素阻害、オートドッキング、構造活性相関、インシリコ

1. 研究開始当初の背景

| 1970年に riboflavin の5位の窒素を炭素に

等価変換することによって、代謝拮抗を目的とする 5-deazariboflavin が合成され、それが極めて強力な抗コクシジウム活性を示した。更に、最近メタン生成菌から 5-deazaflavin 骨格をもつ補酵素 F₄₂₀ が見いだされ、この補酵素は炭酸ガスのメタンへの還元過程や抗生物質の生合成過程で重要な働きをしていることが判ってきた。このような背景のもと、私は 5-デアザフラビンの化学・生化学的機能性に興味を持ち、これまでに、NAD(P)⁺モデルとしてのこの 5-デアザフラビンを有機触媒とするアルコール類やアミン類を循環的に酸化する系及びギ酸を水素源とした 5-デアザフラビンによるカルボニル化合物からアルコール類への循環的還元系を構築した。本研究は、豊富な機能性を持っている 5-デアザフラビン骨格をシーズとするフラビン類縁化合物及びフラビンとステロイド等の天然物が融合した生物活性ハイブリッド化合物のデザイン・合成を企画した。さらに、これらの新化合物に対して抗原虫、抗ウイルス及び抗腫瘍活性などの生物・薬理活性を検索・評価を企画した。また、このような合成及び生物活性評価に加え、コンピューターによる生物活性支援ソフトを用いた活性検索の三方面より研究を進め、薬としてより有効な生物・薬理活性分子設計を行うことも企画した。

2. 研究の目的

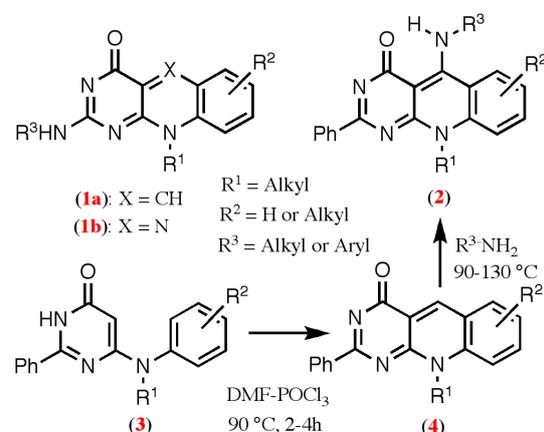
本研究は、細胞増殖機能調節に関わっている酵素のチロシンキナーゼ (PTK) を阻害して、腫瘍細胞増殖を阻害する新規抗腫瘍薬開発を目的に行う研究である。特に、フラビンやデアザフラビン類をシーズとする類縁化合物に関して、*in vitro* 酵素阻害 (又は抗腫瘍) 活性データとコンピューターを駆使した酵素へのドッキングデータよりバーチャルスクリーニング系の構築を行い、このバーチャルスクリーニング系より得られた活性情報を基にデザインした新たな活性有効化合物のみを合成し、その合成化合物の *in vitro* での癌細胞への阻害活性試験および *in vivo* での抗腫瘍活性動物試験を行うものであり、バーチャルスクリーニング系を抗腫瘍薬開発に取り入れた新規高効率抗腫瘍薬開発研究である。

3. 研究の方法

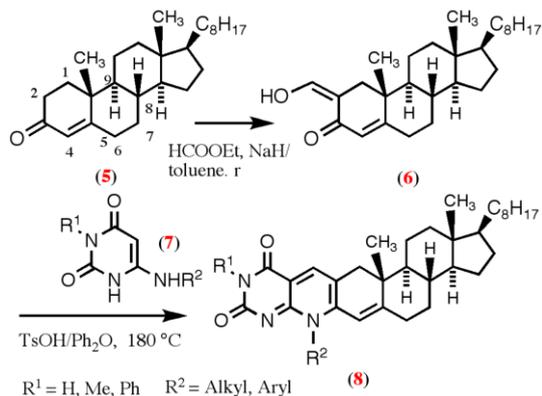
本研究は、フラビンやフラビン類縁化合物および新規フラビンハイブリッド化合物に、本来それぞれが持っている生理作用や薬理的作用の混成活性増強作用或いは全く新しい薬理活性や生物活性を期待して、これらの合成を計画した。更に、これら合成化合物の *in*

vitro 抗腫瘍活性試験を行った。また、抗腫瘍薬開発研究の一環として、フラビンやデアザフラビン類をシーズとする類縁化合物に関して、*in vitro* 酵素阻害 (又は抗腫瘍) 活性データとコンピューターを駆使したこれらの酵素 (チロシンキナーゼ) へのドッキングデータよりバーチャルスクリーニング系の構築を行い、このバーチャルスクリーニング系より得られた活性情報を基にコンピューターデザインした新たな活性有効化合物のみを更に合成し、その活性化合物について更に癌細胞阻害活性試験・評価を行った。

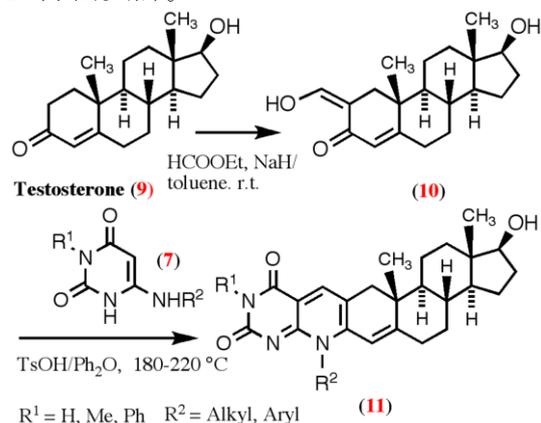
(1) 初年度は当研究室で開発した合成方法に従い、2-amino-2-deoxo-5-deazaflavin 類 (1a) および 2-amino-2-deoxyflavin 類 (1b) を合成する予定であったが、前年度でこれらの化合物の合成が終了 (*Bioorg. & Med. Chem.*, 2007, **15**, 6336-6352 に掲載済) したので、下図に示した新規な 5-amino-2-phenyl-2-deoxo-5-deazaflavin 類 (2) の合成計画を行った。合成した化合物 (2, 4) の NMR, UV, IR スペクトルを測定し、構造確認後これらの生物活性一次スクリーニングとして、抗腫瘍活性 (CCRF-HSB-2, KB 等のガン細胞) および抗ウイルス活性 (HSV-1, HSV-2) 試験を行った。



(2) 更に、cholesterol から誘導した cholesterolone (5) と 5-deazaflavin とのハイブリッド化合物 (8) の合成を行う。合成した化合物の NMR, UV スペクトル及び旋光度を測定した (下図参照)。また、構造確認後これらの生物活性一次スクリーニングとして、抗腫瘍活性 (CCRF-HSB-2, KB 等のガン細胞) および抗ウイルス活性 (HSV-1, HSV-2) 試験を行った。更に、コンピュータ計算による酵素へのドッキングデータと抗腫瘍活性試験データよりバーチャルスクリーニング系の構築を試みた。



(3) 2年目と3年目は初年度に構築したバーチャルスクリーニング系および構造活性相関研究より予想される活性化化合物に対して、小動物試験用にグラム単位の活性化化合物の合成を試みた。更に、テストステロン(9)とのハイブリッド化合物(11)の合成も試みた(下図参照)。



4. 研究成果

本研究に於いて下記の研究成果を得た。

(1) フラビン及びデアザフラビンの2-アミノ及び2-フェニル誘導体の合成と抗腫瘍活性(発表論文①*Eur. J. Med. Chem.*, Vol. **43**, 2008, 1376 と②*Bioorg. & Med. Chem.*, Vol. **16**, 2008, 922)

① 2-amino-2-deoxy-5-deazaflavin類(1a)および2-amino-2-deoxyflavin類(1b)の簡便な合成法を開発でき、約40個の新規化合物を合成した。これらの各種スペクトル測定により構造を確定した。

②これらの抗腫瘍活性試験を行った結果、測定した総ての化合物が CCRF-HSB-2 癌細胞に1.5-30 $\mu\text{g/mL}$ 、KB 癌細胞に0.5-40 $\mu\text{g/mL}$ の IC_{50} 値の阻害活性を見出した。

③コンピューター支援ソフトを用い、合成したこれらの化合物の酵素(チロシンキナーゼ, PTK, PDB:1t46)阻害に関するAutoDock研究よ

り、化合物類の酵素の活性部位への結合自由エネルギー(ΔG_b)を求め、それと各種腫瘍細胞への*in vitro*活性試験結果(IC_{50})との相関関係より有用なバーチャルスクリーニング系を構築した(Fig. 1, 2参照)。その結果、酵素のチロシンキナーゼの活性部位へ強く結合(ΔG_b が小さい値)する化合物が、腫瘍細胞へ強い阻害作用を示すことを見出した。

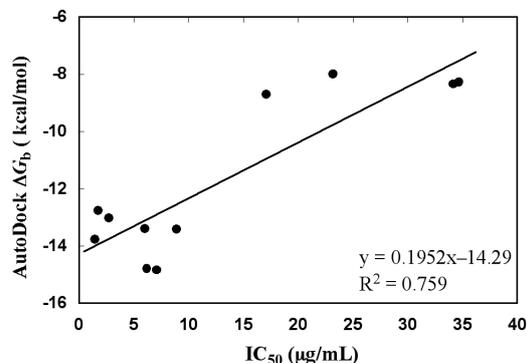


Fig. 1. Correlation between the binding free energy (ΔG_b) and IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) of **1a** and **1b** against CCRF-HSB-2 tumor cells.

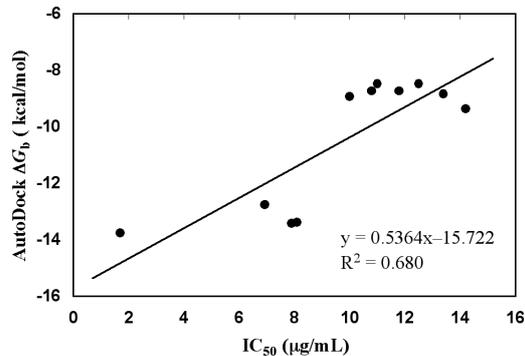


Fig. 2. Correlation between the binding free energy (ΔG_b) and IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$) of **1a** and **1b** against KB tumor cells.

(2) デアザフラビンの5-アミノ-2-フェニル誘導体の合成と抗腫瘍活性(発表論文③*Bioorg. & Med. Chem.*, Vol. **16**, 2008, 9161)

①前図に記したように、化合物(3)にVilsmeier試薬を反応させ2-phenyl-2-deoxy-5-deazaflavin類(4)を合成し、次に各種アミンを反応させて目的の5-アミノ誘導体(2)を合成できた。約20個の新規化合物を合成し、これらの各種スペクトル測定により構造を確定した。

②これらの抗腫瘍活性試験の結果、測定した殆どの化合物が CCRF-HSB-2 癌細胞に0.7-60 $\mu\text{g/mL}$ 、KB 癌細胞に1.8-50 $\mu\text{g/mL}$ の IC_{50} 値の阻害活性を示した。

③これらの化合物の酵素(PTK, PDB:1t46)阻害に関するAutoDock研究より、化合物類の酵素の活性部位への結合自由エネルギー(ΔG_b)を求め、バーチャルスクリーニング系を構築した(Fig. 3, 4参照)。

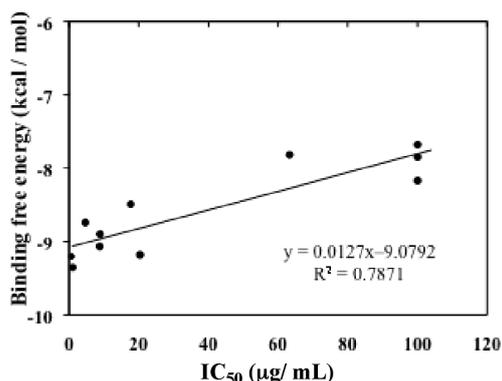


Fig. 3. Correlation between the binding free energy (ΔG_b) and antitumor activity (IC_{50}) of **2** against CCRF-HSB-2 tumor cells

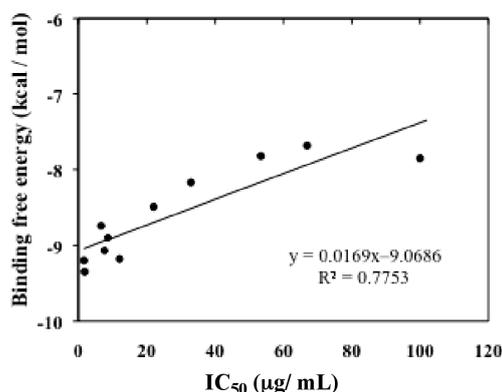


Fig. 4. Correlation between the binding free energy (ΔG_b) and antitumor activity (IC_{50}) of **2** against KB tumor cells

(3) デアザフラビンとコレスタンとのハイブリッド化合物の合成と抗腫瘍活性 (発表論文④ *Bioorg. & Med. Chem.*, Vol. **16**, 2008, 8685)

①前図に記したように、コレステロールから誘導した化合物 (**5**) をホルミル化して化合物 (**6**) へ誘導し、次に各種 6-アミノウラシル (**7**) を反応させて目的のハイブリッド化合物 (**8**) を合成できた。約 25 個の新規ハイブリッド化合物を合成し、これらの各種スペクトル測定により構造を確定した。

②抗腫瘍活性試験の結果、殆どの化合物が CCRF-HSB-2 癌細胞に 2-35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、KB 癌細胞に 1.7-40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の IC_{50} 値の阻害活性を示した。

③化合物の酵素 (PTK, 1t46) 阻害に関する AutoDock 研究より、前述と同様にバーチャルスクリーニング系を構築した (Fig. 5, 6 参照)。

④抗ウイルス活性試験として HSV-1 と HSV-2 に、0.8-4 mg/mL の活性をもつ化合物を見出せたが、有効と看做せる化合物は見出せなかった。

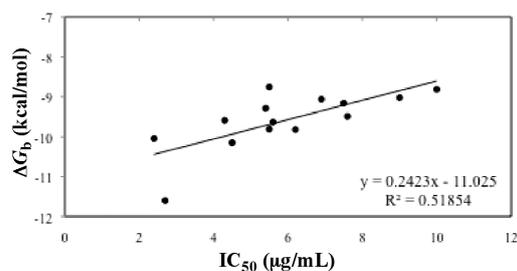


Fig. 5. Correlation between the binding free energy (ΔG_b) and IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of **8** against CCRF-HSB-2 tumor cells.

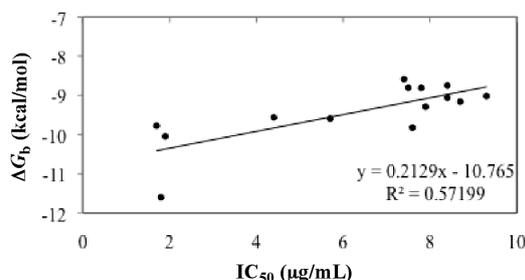


Fig. 6. Correlation between the binding free energy (ΔG_b) and IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of **8** against KB tumor cells.

(4) デアザフラビン及びハイブリッド化合物の酵素阻害様式 (発表論文①-④)

本研究で合成した種々の 5-deazaflavin 類縁化合物に人腫瘍細胞 CCRF-HSB-2 と KB 細胞に対する抗腫瘍活性を *in vitro* 実験で精査した結果、殆どの化合物が有効な抗腫瘍活性を示した。更に有望な酵素 (PTK) 阻害活性探索研究として、これらの活性構造最適化のために PTK (PDB コード: 1t46) への分子ドッキング (AutoDock) 研究を行った。合成した 5-(monosubstituted amino)-2-deoxy-2-phenyl-5-deazaflavin 類 (**2**) の数種の化合物は C5-NH 部位で水素結合を有し、PTK の中へ理想的な結合親和性を示した。ヒト急性リンパ芽球性白血病・T リンパ芽球細胞

(CCRF-HSB-2) とヒト口腔がん細胞 (KB 細胞) に対する抗腫瘍作用を精査した結果、5-deazaflavin 類の 5 位への alkylamino 置換基導入は抗腫瘍活性を減弱したが、5 位での arylamino 置換基導入は抗腫瘍活性を増強した。化合物の中には IC_{50} 値が 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の強い抗腫瘍活性を示した。また、一般に 7 位へのメチル基置換導入化合物は抗腫瘍活性を増強させる傾向がみられた。更に、これらの化合物に対して AutoDock 研究として、蛋白質チロシンキナーゼ (PDB code: 1t46) の c-kit 部位へのドッキングを行った。この部位へは慢性骨髄性白血病 (CML) 治療薬として知られているグリベック (Gleevec, Glivec, STI571) が PTK (1t46) のリガンドとして知られており、本研究で得られた活性化合物も、STI571 と同じ PTK の活性部位へ結合することが明らかとなった (Fig. 7 参照)。

尚, CCRF-HSB-2 と KB cell に対する増殖抑制活性と AutoDoc により予測した結合親和性との関係は, 相関係数 (R^2) がそれぞれ 0.7871 と 0.7753 であり, 非常に良い関係であった (Fig. 3 と 4 参照)。Fig. 7 には **2a** (元素によって彩色された, ボールとスティック) と **2b** (青色スティック) の PTK への異なった結合親和性を示した。結合した化合物のそれぞれが緑の線で描かれているように水素結合を示した。そして STI (グリベック) 配位子は黄色の線で示されている。同様に, デアザフラビンスステロイドハイブリッド化合物も Fig. 8 に示したように PTK への結合様式を明らかにした。

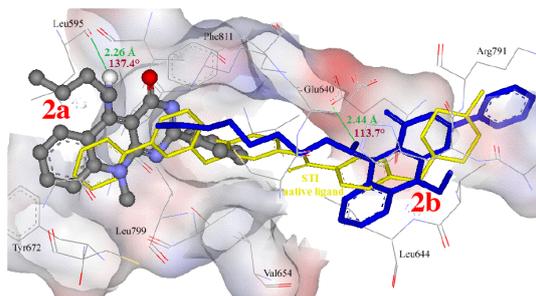


Fig. 7. 5-(*n*-butylamino)-2-deoxo-10-methyl-2-phenyl-5-deazaflavin **2a** (colored by element, ball and stick) is bound into PTK receptor site via hydrophobic interactions with Leu 595, Tyr 672, Leu 799, and Phe 811 in addition to hydrophilic binding by hydrogen bond between its C₅-NH and C = O of Leu 595. While 2-deoxo-10-ethyl-5-(*n*-octylamino)-2-phenyl-5-deazaflavin **2b** (blue, stick) is extended through the whole groove of the pocket forming one hydrogen bond with Glu 640. The binding pocket is shown in the solid surface with labeled amino acids and the STI ligand is shown as yellow stick.

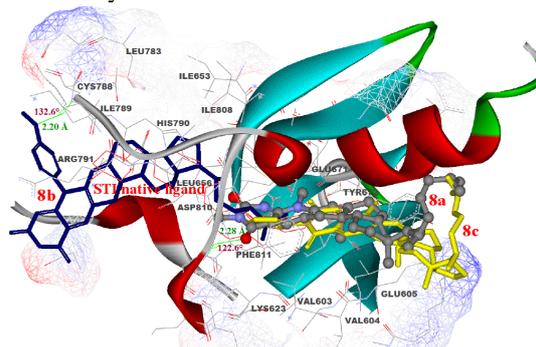


Fig. 8. Stereo view for comparative binding affinities of 3',8'-dimethyl-5'-deazacholest-2,4-dieno[2,3-*g*]pteridine-2',4'(3'*H*,8'*H*)-diones (**8a**, ball and stick), 8'-(-4-methoxyphenyl)-5'-deazacholest-2,4-dieno[2,3-*g*]pteridine-2',4'(3'*H*,8'*H*)-diones (**8b**, blue stick), and 8'-methyl-3-phenyl-5'-deazacholest-2,4-dieno[2,3-*g*]pteridine-2',4'(3'*H*,8'*H*)-diones (**8c**, yellow stick). Compound **8a** and **8b** exhibited one hydrogen bond shown as a green line, respectively, and

compound **8c** exhibited no hydrogen bond. The binding pocket of PTK is shown in the wire mesh surface with labeled amino acids, the PTK protein structure is shown in solid ribbon view, and the STI ligand is shown as a red line.

このように, 合成, 生物学的調査及びコンピュータ上 (in silico) の研究によるデアザフラビン類縁化合物の抗腫瘍薬探索研究に於いて, これらが理想的な低い結合自由エネルギー及び潜在性の抗腫瘍活性をもつことを明らかにした。それ故, これらの化合物は更なる小動物実験を視野に入れた抗腫瘍薬開発研究に有望な候補化合物として考慮できる。

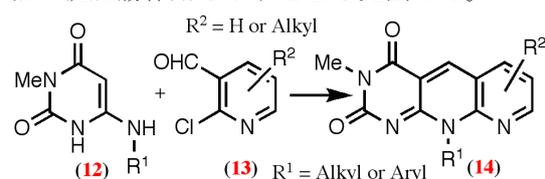
(5) デアザフラビンとテストステロンとのハイブリッド化合物の合成と抗腫瘍活性 (未発表, 特許・学会誌投稿準備中)

①前図に記したように, テストステロンから誘導した化合物 (**10**) に各種 6-アミノウラシル (**7**) を反応させて目的のハイブリッド化合物 (**11**) を合成できた。約 35 個の新規ハイブリッド化合物を合成し, これらの各種スペクトル測定により構造を確定した。

②抗腫瘍活性試験の結果, 測定した殆どの化合物が CCRF-HSB-2 癌細胞に 2-35 $\mu\text{g}/\text{mL}$, KB 癌細胞に 2-40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の IC₅₀ 値の阻害活性を示した。

(6) 5-デアザフラビンの 9-アザ体の合成と抗腫瘍活性 (未発表, 特許申請予定)

新規な 5-デアザフラビンの 9-アザ体である 3,7,10-trimethylpyrimido[4,5-*b*][1,8]-naphthyridine-2,4(3*H*,10*H*)-dione 類 (**14**) の合成に成功し, これら多くの誘導体が非常に強い抗腫瘍作用を示すことを見出した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

① Hamed I. Ali, Keiichiro Tomota, Eiichi Akaho, Munetaka Kunishima, Y. Kawashima, Takehiro Yamagishi, Hisao Ikeya, Tomohisa Nagamatsu, Antitumor studies. Part 2: Structure-activity relationship study for flavin analogs including investigations on their in vitro antitumor assay and docking simulation into protein tyrosine kinase, *Eur. J. Med. Chem.*, Vol. **43**, 2008, 1376-1389. 査読有

② Hamed I. Ali, Noriyuki Ashida, Tomohisa

Nagamatsu, Antitumor studies. Part 4: Design, synthesis, antitumor activity, and molecular docking study of novel 2-substituted 2-deoxoflavin-5-oxides, 2-deoxoalloxazine-5-oxides, and their 5-deaza analogs, *Bioorg. & Med. Chem.*, Vol. **16**, 2008, 922-940. 査読有

③ Ajaya R. Shrestha, Hamed I. Ali, Noriyuki Ashida, Tomohisa Nagamatsu, Antitumor studies. Part 5: Synthesis, antitumor activity, and molecular docking study of 5-(monosubstituted amino)-2-deoxy-2-phenyl-5-deazaflavins, *Bioorg. & Med. Chem.*, Vol. **16**, 2008, 9161-9170. 査読有

④ Ajaya R. Shrestha, Takashi Shindo, Noriyuki Ashida, Tomohisa Nagamatsu, Synthesis, biological active molecular design, and molecular docking study of novel deazaflavin-cholestane hybrid compounds, *Bioorg. & Med. Chem.*, Vol. **16**, 2008, 8685-8696. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

① 森木昌子、加藤裕典、永松朝文(代表), 9-Aza-5-deazaflavin 類の合成とそれらの oxazolo[4,5-*b*][1,8]naphthyridine 類への環変換反応, 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 31 日, ツインメッセ静岡、静岡県立大学

② Tomohisa Nagamatsu, Structure-activity Relationships and Docking Simulation into Protein Tyrosine Kinase for Flavin and Their Analogs as a New Class of Antitumor Agents, BIT Life Sciences' 3rd Annual Protein and Peptide Conference (PepCon-2010), 21-23 March 2010, Beijing International Convention Center

③ 永松朝文, 抗腫瘍治療薬開発指向フラビン類縁化合物の合成と高効率酵素阻害活性試験, 第 3 回医薬品原料国際展 研究成果発表フォーラム, 平成 21 年 7 月 1 日, 東京ビッグサイト,

④ Tomohisa Nagamatsu (代表), Ajaya R. Shrestha, Takashi Shindo, Synthesis, Biological Active Molecular Design, and Molecular Docking Study of Deazaflavin-Cholestane Hybrid Compounds, Tenth Teterahydron Symposium, Challenges in Organic and Bioorganic Chemistry, 23-26 June 2009, Paris, France

⑤ Ajaya R. Shrestha, Hamed I. Ali, Ashida Noriyuki, Tomohisa Nagamatsu (代表), Synthesis, activity and molecular docking

study of 2-deoxy-2-phenyl-5-substituted-5-deazaflavins as potent antitumor agents, 第 38 回複素環化学討論会, 2008 年 11 月 23 日, 広島県民文化センターふくやま

⑥ Ajaya R. Shrestha, Tomohisa Nagamatsu (代表), Synthesis, biological active molecular design, and molecular docking study of deazaflavin-cholestane hybrid compounds, 第 47 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2008 年 11 月 8 日, 岡山コンベンションセンター

⑦ 永松朝文 (代表), Hamed I. Ali, 芦田則之, 抗癌研究第 4 報 新規 2-デオキソフラビン-5-オキシド類とその 5-デアザ類縁化合物の合成, 抗腫瘍活性, 及び PTK への分子ドッキング研究, 第 38 回複素環化学討論会, 2008 年 11 月 22 日, 広島県民文化センターふくやま

⑧ 永松朝文 (代表), Hamed I. Ali, 芦田則之, 抗癌研究第 3 報 新規 2-N-置換アミノ-10-アルキル-2-デオキソ-5-デアザフラビン類の合成, 抗腫瘍活性, 及び PTK への分子ドッキング研究, 第 34 回反応と合成の進歩シンポジウム, 2008 年 11 月 5 日, 京都テルサ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永松 朝文 (NAGAMATSU TOMOHISA)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 40155966

(2) 研究分担者

大塚 正人 (OTSUKA MASATO)
岡山大学。自然生命科学研究支援センター・准教授
研究者番号: 30243489

(3) 研究協力者

Ajaya R. Shrestha (SHRETHA R. AJAYA)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・博士後期課程学生
真銅 隆至 (SHINDO TAKASHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・博士後期課程学生
池内 百江 (IKEUCHI MOMOE)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・博士後期課程学生
芦田 則之 (ASHIDA NORIYUKI)
ヤマサ醤油・薬品化学研究室・室長