

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06939

研究課題名(和文) 多発性骨髄腫克服を目指した共有結合性官能基含有治療薬の開発研究

研究課題名(英文) Development of novel anti-tumor agent to overcome multiple myeloma

研究代表者

中山 淳(Nakayama, Atsushi)

大阪公立大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：60743408

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：申請者が独自に見出した14員環マクロライドYnone-LLZは、多発性骨髄腫に対して顕著な治癒効果を示す。しかし、この化合物が示すユニークな生物活性がどのような作用機序で引き起こされているかはこれまでのところ未知である。本研究では、Ynone-LLZの生体内作用標的を明らかとするために、Ynone-LLZにアルキンタグを導入した化学プローブの合成を検討した。その過程で、これまでの合成経路では所望の化学プローブの合成は困難であることが分かった。そこで、新たな合成経路の開発を行い、化学プローブ合成に応用できる新規経路を開拓した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者は、多発性骨髄腫に対して顕著な治癒効果を示す新規低分子化合物を見出しており、これが副作用リスクの低い骨髄腫治療薬になり得る可能性を示してきた。しかし、このような有望な生物活性がどのような生体内作用標的に作用することで引き起こされているかは未知であった。今回の研究では、その生体内作用標的に迫るために必須な化学プローブ合成に主眼を置いている。これが達成され、生体内作用標的が明らかとなれば、新たな多発性骨髄腫治療薬開発の加速が期待される。

研究成果の概要(英文)：Ynone-LLZ which was developed based on the natural 14-membered macrolide, LL-Z-1640-2, by the author displays the potent anti-tumor activity against multiple myeloma cells in vitro and in vivo. However, the biomolecular target of Ynone-LLZ and the mode of action are still unknown. In this research, the author tried to synthesize the chemical probe containing alkyne tag for pull-down assay of ynone-LLZ to identify the biomolecular target, and developed the new synthetic route of Ynone-LLZ and the chemical probe because the previous synthetic route could not be applied to the synthesis of the probe.

研究分野：医薬化学

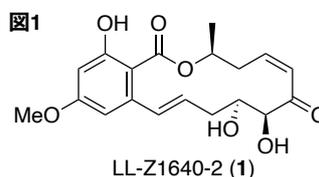
キーワード：マクロライド 多発性骨髄腫 医薬化学 天然物合成

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

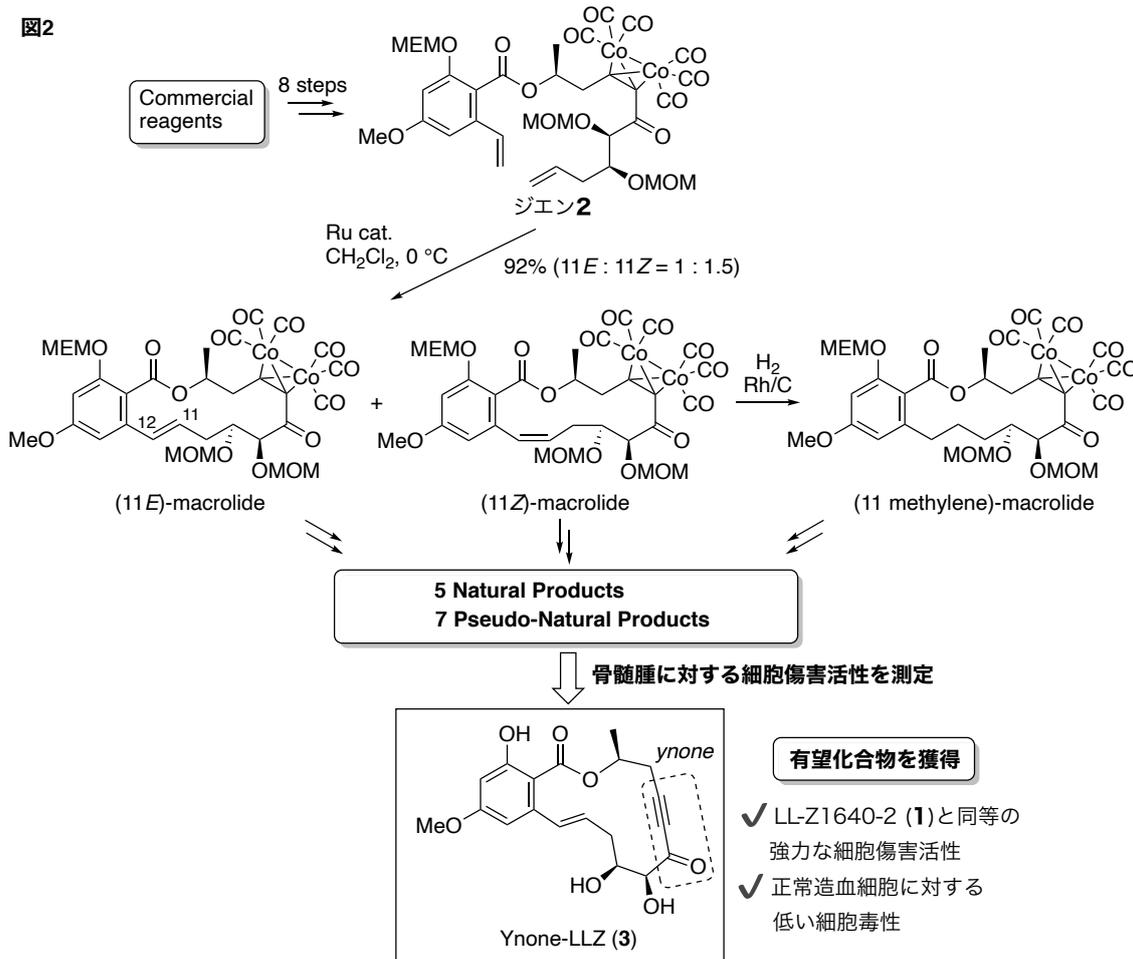
1. 研究開始当初の背景

がんは日本の死因一位であり、特に高齢者ほどその罹患リスクは高まることから、超高齢社会を迎えた日本にとっては克服すべき重要な疾患である。特に、高齢者に頻発し、広範な骨破壊性病変を呈する多発性骨髄腫は、進行性の骨損傷をもたらすことから患者の **Quality of Life** を著しく低下させてしまう。多発性骨髄腫の治療は、プロテオソーム阻害薬の登場により治療実績自体は向上している。その一方で、がん治療だけでは骨損傷自体の改善は難しく、さらに近年では耐性がん細胞の出現も報告されている。そのため、腫瘍細胞の増殖抑制に加えて進展性の骨病変を治療できる新たな多発性骨髄腫治療薬の開発が望まれている。

このような背景の下、申請者等は 14 員環天然マクロライドの一種である LL-Z1640-2 (**1**) が多発性骨髄腫細胞に対して *in vitro*, *in vivo* において強力な細胞傷害活性を示すことを見出した(図 1a)。さらに、**1** は骨吸収を促進する破骨細胞への分化抑制や、骨髄腫細胞による骨芽細胞分化抑制の解除など、骨破壊性病変で無秩序となる骨のリモデリングを正常化させる可能性も示したことから、有望な新規骨髄腫治療薬リード化合物と考えられた。そこで申請者は、**1** に存在する多重結合部分の酸化度を変化させた小規模な多重結合異性体ライブラリーを構築することで、さらに有望な化合物の取得を目指すこととした。その結果、コバルト錯体を有するジエン中間体 **2** に対して、ルテニウム触媒を用いた閉環メタセシス反応を適用させることで 14 員環マクロライド構造を構築し、そこから種々化学変換を行うことで、天然物 5 種、天然物の構造に近い”擬(似)天然物”7 種を獲得した(図 2)。得られた化合物 12 種類に関して多発性骨髄腫細胞に対する細胞傷害活性を評価した結果、親化合物である LL-Z1640-2 (**1**) の *cis*-enone 部分を *ynone* へと変換した新規マクロライド **Ynone-LLZ** (**3**) が *in vitro*, *in vivo* において **1** に匹敵する治療効果を示すことを初めて見出した。さらに、**3** は正常造血細胞に対して、**1** と異なり、治療域濃度で細胞毒性を示さなかったことから、多発性骨髄腫治療で頻発する副作用である血球減少を引き起こしにくい新たな治療剤となり得ることが示唆された。



- ✓ 強力な TAK 1 阻害活性
- ✓ *in vitro*, *in vivo* において骨髄腫細胞に対する強力な細胞傷害活性



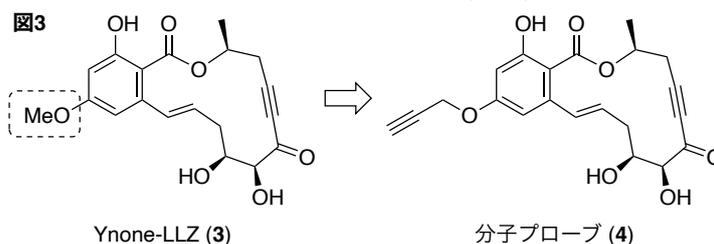
しかしながら、**1**が TGF- $\beta$  activated kinase 1 (TAK1)や MAPK に対する強力なキナーゼ阻害活性を示すのに対し、**3**はこれらキナーゼ阻害活性が低いことから細胞内分子標的が **1**とは異なることが示唆されていた。また、**3** (および **1**) のファーマコフォアである ynone (および cis-enone) は生体内グルタチオンや求核性アミノ酸を有するタンパクに対して潜在的に反応するから生体内での不安定性や望まぬ副作用発現リスクが高い。このため、**3** や **1** の有効性を高めつつ毒性を抑制することが新規骨髄腫治療薬開発では重要となる。

## 2. 研究の目的

本研究では、未知である新規マクロライド Ynone-LLZ (**3**)の生体内標的分子を同定し、**3**が示すユニークな生物活性発現メカニズムの解明を行う。また、**3**のもつ潜在的な不安定性、毒性を回避するプロドラッグ化を行う。以上のことから、より副作用を軽減させた新規多発性骨髄腫治療薬の創製を最終目的とした。

## 3. 研究の方法

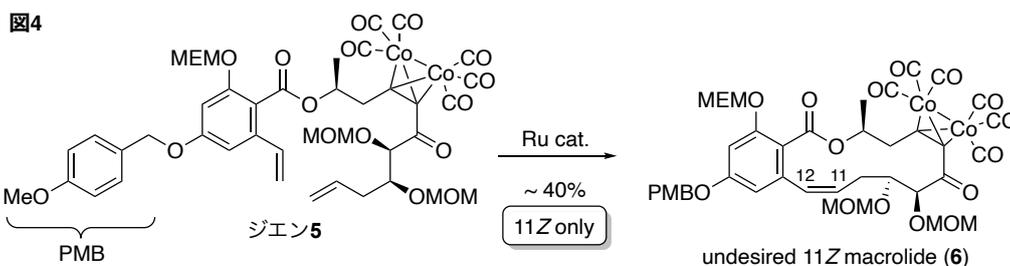
生体内標的分子探索を行うため、Ynone-LLZ (**3**)の生物活性を維持した分子プローブを合成する必要がある。そこで、**3**の構造中で最も生物活性への影響が小さいと考えられる芳香環メトキシ基をプロパルギル基へと変換したプローブ **4**の合成を行うこととした (図 3)。これまでに確立した閉環メタセシスを利用して全合成経路を利用し、構成ユニットを一部変更することで **4**の合成を目指した。また、潜在的な不安定性・毒性軽減に向けたプロドラッグ化では、骨髄腫の微小環境に応答するペプチドの合成も検討した。



## 4. 研究成果

### Ynone-LLZ 化学プローブ **4**の合成検討

分子プローブ合成に向けて、閉環メタセシス基質であるジエン **2**の芳香環メトキシ基部分を *p*-メトキシベンジル (PMB)基へと変更したジエン **5**を合成して閉環メタセシス反応を試みた (図 4)。しかしながら、閉環反応自体は中程度の収率で進行したものの、予想に反し、得られてきた 14員環マクロライド化合物は全て 11Z体 **6**であり、望みの 11E体を得ることはできなかった。PMB 基を他の保護基へと変更することも試みたが、閉環メタセシス自体の反応性が低下してしまったため、14員環マクロライド化合物自体を得ることができなかった。以上の理由から、この経路でのプローブ合成は断念した。

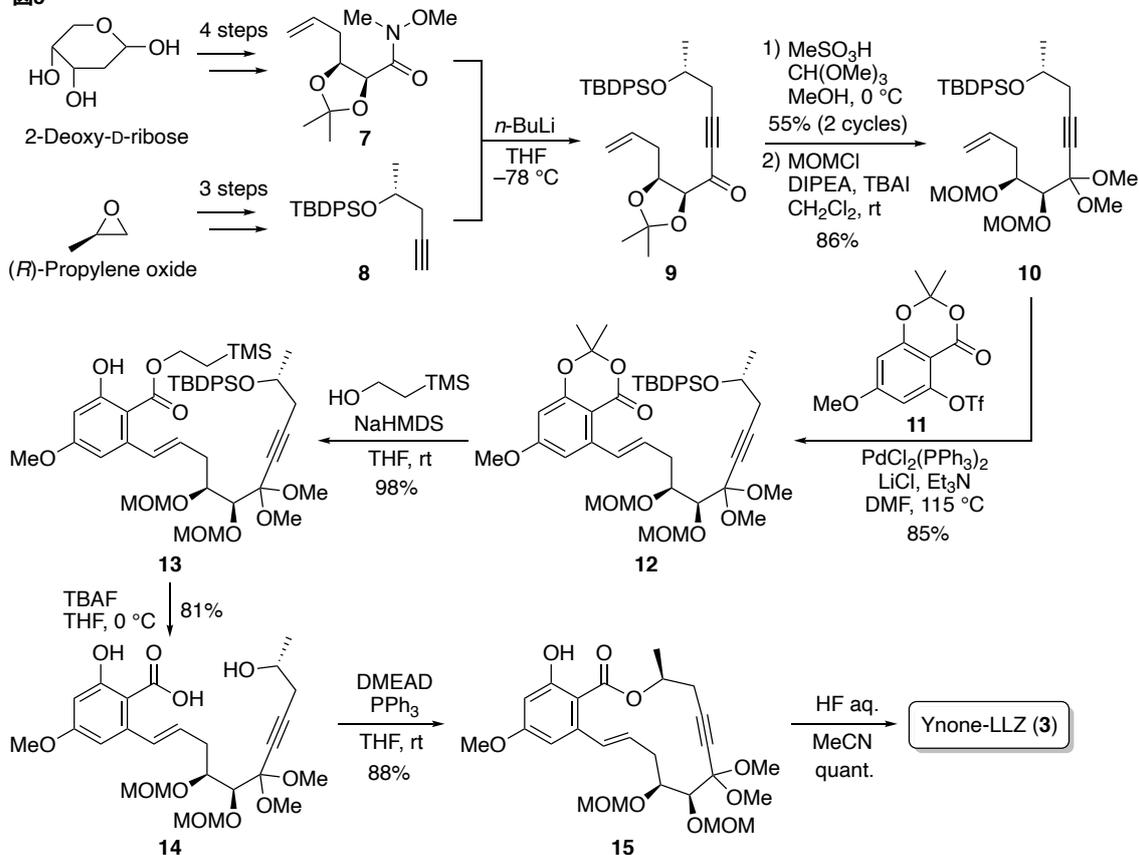


Ynone-LLZ (**3**)や LL-Z1640-2 (**1**)の特徴である 11E-14員環マクロライド構造を選択的に合成するため、閉環メタセシスに替わる別の閉環反応を用いた新たな合成経路の開発が必要となった。そこで、分子間 Heck 反応によりベンジル位二重結合の幾何異性を制御した後に、分子内光延反応による 14員環マクロライド構築を行う合成経路を立案し、この経路で **3**が合成できるか検討を行った (図 5)。

まず、2-デオキシ-D-リボースから 4工程で合成した Weinreb アミド **7**と (*R*)-プロピレンオキシドから 3工程で合成したアルキン **8**をリチオカップリングにより連結してイノン **9**を得た。酸性条件下、高反応性のイノン部のジメチルケタール保護とアセトナイドの除去を同時に行った後、連続ジオールを MOM 基で保護してエンイン **10**を調製した。**10**と、別途調製したアセトナイドエステル含有トリフラート体 **11**をパラジウム触媒的分子間 Heck 反応条件に付したところ、予想通り反応は円滑に進行して希望の 11Eの幾何異性を有するカップリング体 **12**を高収率で得ることに成功した。この際、11Zも若干量得られてきたが (<10%)、カラムクロマトグラフィーで容易に分離可能であった。続いて、トリメチルシリルエタノール存在下で NaHMDS を作用させると、発生したアルコキシドがラクトン部分に攻撃しエステル **13**が生じた。これを TBAF で処理することで、分子内光延反応前駆体 **14**を収率良く得ることができた。アゾ試薬として DEAD (アゾジカルボン酸ジエチル)を用いて分子内光延反応を行ったところ、所望の 14員環マクロライド骨格の形成が確認され、骨格構築に分子内光延反応が有効であることが分かった。しかし、

アゾ試薬から生じるヒドラジンカルボキシラートと目的物の分離が困難であった。そこで、分液処理でヒドラジンカルボキシラートが除去できる DMEAD (アゾジカルボン酸ビス (2-メトキシエチル)) をアゾ試薬として用いたところ、環化反応は円滑に進行し、また副生するヒドラジンカルボキシラートも完全に除去することに成功した。最後に全てのアセタール系保護基をフッ化水素酸水溶液で除去することで Ynone-LLZ (**3**) の新たな合成経路を開発することに成功した。本合成経路では、14 員環マクロライド構築の前に C11-C12 位の幾何異性を Heck 反応によって制御しており、選択的に **3** や **1** に導くことができる。

図5



以上のように立体選択的な合成経路を確立できたので、Heck 反応における芳香環ユニットを変更することで化学プローブ **4** に必要なプロパルギル基導入前駆体を用いて **4** の合成を検討している。また、本経路はグラムスケールで **3** の供給も可能である。がん微小環境応答性ペプチド合成の検討も行っており、大量供給した **3** にペプチドを導入し、*in vitro* で **3** の放出速度や安定性、細胞傷害活性を測定することでプロドラッグ開発を目指す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12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 1件）

1. 著者名 Kimura Yuki, Ohashi Eisaku, Karanjit Sangita, Taniguchi Takashi, Nakayama Atsushi, Imagawa Hiroshi, Sato Ryota, Namba Kosuke	4. 巻 24
2. 論文標題 Total Syntheses of Proposed Structures of 4,10-Dihydroxy-8,12-guaianolides	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 3297 ~ 3301
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.2c01215	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 Kang Bubwoong, Shimizu Yuki, Tamura Yusaku, Fukuda Eigo, Hamamoto Ken-ichiro, Uchida Yuichiro, Yasuno Yoko, Nakayama Atsushi, Satoh Tetsuya, Kuse Masaki, Shinada Tetsuro	4. 巻 70
2. 論文標題 Formylation Reaction of Amines Using N-Formylcarbazole	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 492 ~ 497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c22-00161	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 Tsuji Daisuke, Nakayama Atsushi, Yamamoto Riko, Nagano Shuji, Taniguchi Takashi, Sato Ryota, Karanjit Sangita, Muguruma Naoki, Takayama Tetsuji, Itoh Kohji, Namba Kosuke	4. 巻 6
2. 論文標題 1,3a,6a-Triazapentalene derivatives as photo-induced cytotoxic small fluorescent dyes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42004-023-00838-0	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 Nakayama Atsushi, Nakamura Tenta, Ara Tabassum, Fukuta Tatsuya, Karanjit Sangita, Harada Takeshi, Oda Asuka, Sato Hideo, Abe Masahiro, Kogure Kentaro, Namba Kosuke	4. 巻 74
2. 論文標題 Development of a novel antioxidant based on a dimeric dihydroisocoumarin derivative	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 153176 ~ 153176
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2021.153176	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 Okamura Hironori, Yasuno Yoko, Nakayama Atsushi, Kumadaki Katsushi, Kitsuwa Kohei, Ozawa Keita, Tamura Yusaku, Yamamoto Yuki, Shinada Tetsuro	4. 巻 11
2. 論文標題 Selective oxidation of alcohol-d1 to aldehyde-d1 using MnO2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 28530 ~ 28534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1ra05405h	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 Yasuno Yoko, Nakayama Atsushi, Saito Kai, Kitsuwa Kohei, Okamura Hironori, Komeyama Mutsumi, Hemmi Hisashi, Shinada Tetsuro	4. 巻 84
2. 論文標題 Total Synthesis and Structure Confirmation of trans-Anhydromevalonate-5-phosphate, a Key Biosynthetic Intermediate of the Archaeal Mevalonate Pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 2749 ~ 2754
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.1c00615	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 Karanjit Sangita, Tanaka Emiko, Shrestha Lok Kumar, Nakayama Atsushi, Ariga Katsuhiko, Namba Kosuke	4. 巻 22
2. 論文標題 A heterogeneous bifunctional silica-supported Ag2O/Im+Cl catalyst for efficient CO2 conversion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Catalysis Science & Technology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d2cy00194b	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 Nakayama Atsushi, Yasuno Yoko, Yamamoto Yuki, Saito Kai, Kitsuwa Kohei, Okamura Hironori, Shinada Tetsuro	4. 巻 85
2. 論文標題 Stereoselective Syntheses of trans-Anhydromevalonic Acid and trans-Anhydromevalonyl Group-Containing Natural Products	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 1052 ~ 1058
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.1c01176	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 Tsutsumi Tomohiro, Saitoh Arisa, Kasai Tomoyo, Chu MengYue, Karanjit Sangita, Nakayama Atsushi, Namba Kosuke	4. 巻 61
2. 論文標題 Synthesis and evaluation of 1,1,7,7-tetramethyl-9-azajulolidine (TMAJ) as a highly active derivative of N,N-dimethylaminopyridine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 152047 ~ 152047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2020.152047	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 Nakayama Atsushi, Nakamura Tenta, Zaima Toshihiro, Fujimoto Saho, Karanjit Sangita, Namba Kosuke	4. 巻 60
2. 論文標題 Concise Total Synthesis of Tronocarpine	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Angewandte Chemie International Edition	6. 最初と最後の頁 635 ~ 639
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/anie.202009966	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 Okamura Hironori, Yasuno Yoko, Nakayama Atsushi, Takikawa Hiroshiro, Shinada Tetsuro	4. 巻 2021
2. 論文標題 Stereoselective Synthesis of (2S,6R) Diamino (5R,7) dihydroxy heptanoic Acid (DADH): An Unusual Amino Acid from Streptomyces sp. SANK 60404	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 1396 ~ 1401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ejoc.202001646	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 Suzuki Motofumi, Nakayama Atsushi, Namba Kosuke et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of a mugineic acid family phytosiderophore analog as an iron fertilizer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-21837-6	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山崎理佳, 中山淳, 品田哲郎
2. 発表標題 抗腫瘍マクロライド天然物LL-Z1640-2の全合成
3. 学会等名 第42回有機合成若手セミナー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山淳, 福田瑛吾, 濱本健一郎, 藤原維吹, 遠藤聖也, 山中日出光, 品田哲郎
2. 発表標題 イソクマリン-3-カルボン酸類の新規合成法の開発と天然物合成への展開
3. 学会等名 第48回反応と合成の進歩シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎理佳, 山中日出光, 中山淳, 品田哲郎
2. 発表標題 LL-Z1640-2類の合成研究
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会 (2023)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山淳
2. 発表標題 Synthetic studies of trans-anhydromevalonate 5-phosphate and its derivatives
3. 学会等名 JSPS日中韓フォーサイト事業 アジア化学プローブ研究拠点 A3取りまとめシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山淳
2. 発表標題 ジヒドロイソクマリン系天然物の網羅的合成を基盤とした天然物化学研究
3. 学会等名 第23回天然薬物の開発と応用シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山淳
2. 発表標題 Development of a compact fluorescent probe based on 1,3a,6a-triazapentalene
3. 学会等名 JSPS日中韓フォーサイト事業 アジア化学プローブ研究拠点 第4回A3Young Scientist Meeting (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山淳, 浜田麻衣, 田村優作, 小澤圭太, 難波康祐, 品田哲郎
2. 発表標題 Resorcylic Acid Lactonesの全合成
3. 学会等名 第65回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 保野 陽子, 中山 淳, 斎藤 甲斐, 橘和 航平, 岡村 仁則, 米山 睦, 邊見 久, 品田 哲郎
2. 発表標題 好熱菌由来のメバロン酸経路中間体トランスアンヒドロメバロン酸 - 5 - リン酸の立体化学
3. 学会等名 第65回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村天太, 中山淳, 財間俊宏, Karanjit Sangita, 難波康祐
2. 発表標題 Tronocarpineの短工程全合成
3. 学会等名 第50回複素環化学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村 天太, 財間 俊宏, Karanjit Sangita, 中山 淳, 難波 康祐
2. 発表標題 Chippiine型アルカロイドTronocarpineの短工程全合成
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橘和 航平, 齋藤 甲斐, 中山 淳, 岡村 仁則, 保野 陽子, 品田 哲郎
2. 発表標題 アンヒドロメバロン酸類の立体選択的合成
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 品田 哲郎, 保野 陽子, 岡村 仁則, 中山 淳, 熊懷 克志, 橘和 航平, 小澤 圭太, 田村 優作, 山本 悠生
2. 発表標題 アルデヒドの簡便な重水素化法の開発と重水素化鎖状テルペン合成への応用
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsushi Nakayama
2. 発表標題 Development of a compact fluorescent probe based on 1,3a,6a-triazapentalene
3. 学会等名 A3 foresight program: Asian Chemical Probe Research Hub 4th A3 Young Scientists (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山 淳
2. 発表標題 創薬展開を志向した天然 擬天然物の網羅的全合成と医薬化学研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山 淳
2. 発表標題 創薬を目指した天然物-擬天然物の全合成と医薬化学研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------