

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390028

研究課題名(和文) PI3K/Akt 経路、TGF- $\beta$ /Smad 経路を標的とした化合物の開発と創薬展開

研究課題名(英文) Development of medicinal molecules having biologically functions targeting the PI3K/Akt pathway and the TGF- $\beta$ /Smad pathway

研究代表者

大塚 雅巳(Otsuka, Masami)

熊本大学・大学院生命科学研究部(薬)・教授

研究者番号：40126008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000 円、(間接経費) 4,170,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究ではPI3K/Akt 経路を活性化する化合物、TGF- $\beta$ /Smad 経路を阻害する化合物を設計、合成し、両経路のクロストークを制御する薬物を得ることを目的とした。本研究ではPI3K/Akt 経路を標的としてイノシトールリン酸骨格を基盤としジアシルグリセロールを導入した化合物、TGF- $\beta$ /Smad 経路を標的としてピリジンと金属結合側鎖からなる化合物を設計、合成した。これにより、脳保護、糖尿病、癌、癌転移、強皮症などの医薬品開発のための基礎的成果が期待される。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed at the design and synthesis of activators of the PI3K/Akt pathway and inhibitors of the TGF- $\beta$ /Smad pathway to develop drugs to regulate the crosstalk of the two pathways. Targeting the PI3K/Akt pathway, compounds comprising inositol phosphate and diacyl glycerol moiety were synthesized. Targeting the TGF- $\beta$ /Smad pathway, compounds comprising the pyridine and metal-binding side chains were synthesized. These compounds could be useful as brain-protecting agents, drugs for diabetes, cancer, cancer metastasis, and scleroderma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

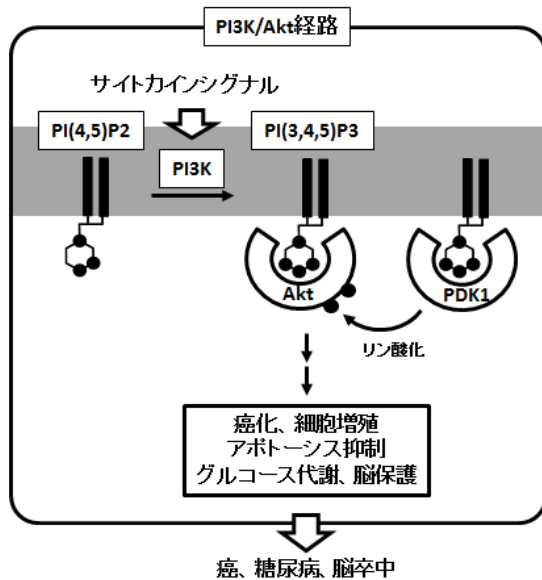
キーワード：PI3K/Akt 経路 TGF- $\beta$ /Smad 経路 脳保護 癌 強皮症

1. 研究開始当初の背景

種々の疾病の治療標的として重要な PI3K/Akt 経路と TGF-β/Smad 経路との間に負のクロストークが存在することが、最近、明らかになりつつある。本研究では両経路を活性化/阻害する人工化合物を設計・合成しクロストークの制御する薬物を開発することを目的とする。

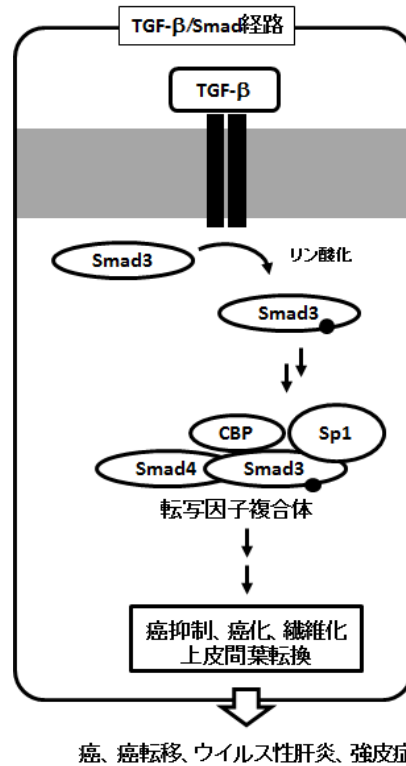
(1) PI3K/Akt 経路

細胞外からサイトカインシグナルがくると PI3 キナーゼ (PI3K) が活性化され、細胞膜中に存在するホスファチジルイノシトール二リン酸 PI(4,5)P<sub>2</sub> から対応する三リン酸 PI(3,4,5)P<sub>3</sub> が生成する。Akt は、ウイルス性癌遺伝子 v-Akt の相同遺伝子として見出されたセリン/スレオニンキナーゼで、N 末端の PH ドメインでイノシトールリン酸類と結合する。Akt は PI3K により生成した PI(3,4,5)P<sub>3</sub> と PH ドメインを介して結合することで細胞質から細胞膜へと移動し、やはり PH ドメインをもつ PDK1 によりリン酸化を受けて活性化される。活性化された Akt は癌化、細胞増殖、アポトーシス抑制、グルコース代謝、脳保護などを引き起こすことから、癌、糖尿病、脳卒中などの治療標的として重要である。



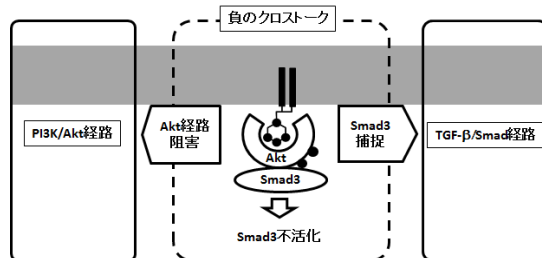
(2) TGF-β/Smad 経路

TGF-β が受容体に結合すると転写因子 Smad2/3 がリン酸化を受け、さらに Smad4、CBP、Sp1 などと会合して転写因子複合体を形成する。これが標的遺伝子の転写を活性化し、癌抑制、癌化、繊維化、上皮間葉転換を引き起こすことから、TGF-β/Smad 経路は癌、癌転移、ウイルス性肝炎、強皮症などの治療標的として重要である。



(3) シグナルのクロストークの制御

PI3K/Akt 経路と TGF-β/Smad 経路との間に負のクロストークが存在することが、近年、明らかになりつつある。Remy らは活性化された Akt が Smad3 を捕捉し、TGF-β/Smad 経路を抑制することを見出した (Nature Chem. Biol., 2004, 6, 358)。一方 Bian らは TGF-β/Smad 経路を欠損させたマウスを用いた実験から、TGF-β/Smad 経路が PI3K/Akt 経路を抑制していることを示した (Cancer Res., 2009, 69, 5918)。すなわち、PI3K/Akt 経路を活性化する化合物は TGF-β/Smad 経路を抑制する薬物としても作用する可能性があり、逆に TGF-β/Smad 経路を阻害する化合物は PI3K/Akt 経路を増強する薬物としても作用する可能性がある。よって、合成化合物によるシグナルのクロストークの複合的な制御を検討する。



2. 研究の目的

- (1) PI3K/Akt 経路を活性化する化合物の設計、合成、機能解析  
イノシトール部位と長鎖アルキル部位を

併せ持つ化合物を設計合成し、Akt の活性化を検討する。さらには脳保護作用、抗糖尿病作用を検討する。

(2) TGF-β/Smad 経路を阻害する化合物の設計、合成、機能解析

ピリジンと金属結合性側鎖からなる化合物を種々合成し、TGF-β/Smad 経路に対する作用を検討する。癌化、癌転移、強皮症に対する作用を検討する。

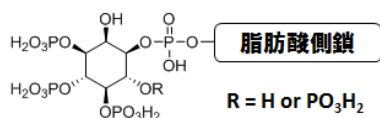
(3) PI3K/Akt 経路と TGF-β/Smad 経路との間の負のクロストークの制御の検討

合成した化合物のシグナルのクロストークへの作用を検討し、医薬としての新展開を探索する。

### 3. 研究の方法

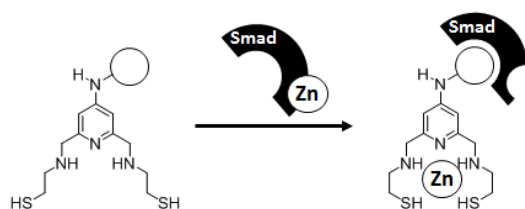
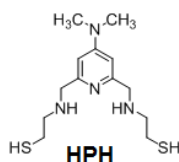
(1) PI3K/Akt 経路を活性化する化合物

Akt の PH ドメインに結合し膜移行させる化合物として、PI(3,4,5)P3 のジアシルグリセロール部分を各種の脂肪酸側鎖で置き換えた化合物、イノシトール部分のリン酸基の数を増やした化合物を合成する。合成化合物による PI3K/Akt 経路の活性化、糖代謝、脳保護を検討する。



(2) TGF-β/Smad 経路を阻害する化合物

Smad は亜鉛蛋白質であり、これから亜鉛を引き抜くことにより阻害することが可能と考える。研究代表者はさきに亜鉛に結合する人工配位子 HPH を開発した。本研究ではこれに Smad 蛋白質認識部位を連結し、標的蛋白質に特異的に結合して亜鉛を引き抜く機能をめざす。人工分子による TGF-β/Smad 経路の阻害、癌転移抑制、強皮症治療を検討する。

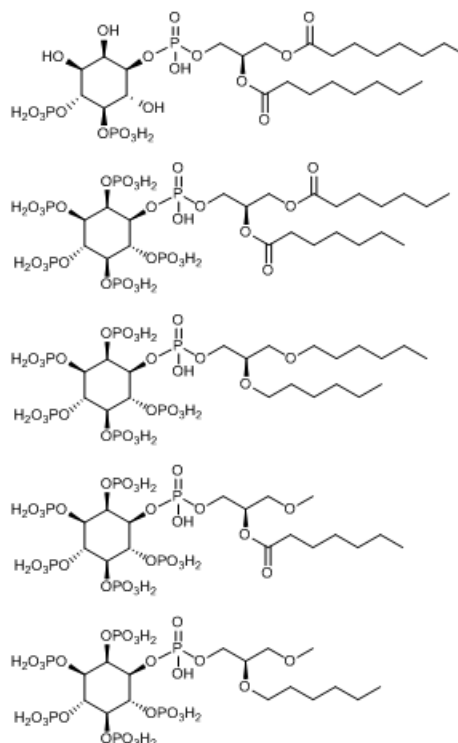


(3) PI3K/Akt 経路と TGF-β/Smad 経路との間の負のクロストーク

PI3K/Akt 経路と TGF-β/Smad 経路との間に存在する負のクロストークに対して、本研究で合成した人工分子がどのような影響を及ぼすかを検討する。

### 4. 研究成果

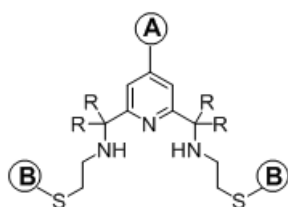
イノシトール誘導体については、細胞膜結合部位としてジアシルグリセロールを採用し、アシル基、アルキル基で置き換えることとし、また、イノシトール部分のリン酸基の数を変えることとした。下に示す各種誘導体の合成を行った。



合成戦略として、初めにイノシトールリン酸部位を構築し、次にアミダイトユニットリン酸化法を用いてジアシルグリセロール、あるいはジアルキルイノシトール部位を導入する方法を採用した。イノシトールリン酸部位は myo-イノシトールを出発原料とし、myo-イノシトールの6つのヒドロキシ基を選択的に保護・脱保護反応を繰り返すことにより合成した。ジアシルグリセロール、ジアルキルグリセロール部位はグリセロールの3つのヒドロキシ基に選択的に保護・脱保護をほどこして合成した。両者をホスホラアミダイトにより結合させて、ジアシルグリセロール部位またはジアルキルグリセロール部位をもつイノシトール五リン酸誘導体を合成した。合成した化合物のタンパク質結合性の評価を行った。

ピリジンを持つ金属結合化合物については、4-ジメチルミノピリジンの2位と6位

にメチレンを介してシステアミンを連結させた構造を基本とし、これに種々の化学就職をほどこした化合物を合成した。下図の構造式の **A** は蛋白質認識部位、**B** は立体的、電子的因子である。



今後はこれら合成化合物の、脳保護、糖尿病、癌、癌転移、強皮症などへの展開を図る。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 10 件)

Hiroshi Tateishi, Kensaku Anraku, Ryoko Koga, Yoshinari Okamoto, Mikako Fujita, Masami Otsuka, Design and synthesis of lipid-coupled inositol 1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate derivatives exhibiting high-affinity binding for HIV-1 MA domain. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 査読有, First published online: 14 May 2014. DOI: 10.1039/C4OB00350K

Ariko Miyake, Mikako Fujita, Haruna Fujino, Ryoko Koga, Sogo Kawamura, Masami Otsuka, Hirotaka Ode, Yasumasa Iwatani, Yosuke Sakai, Naoya Doi, Masako Nomaguchi, Akio Adachi, Yasuyuki Miyazaki, Poly-proline motif in HIV-2 Vpx is critical for its efficient translation. *Journal of General Virology*, 査読有, 95: 179-189, 2014. DOI:10.1099/vir.0.057364-0

Tadashi Ashizawa, Haruo Miyata, Akira Iizuka, Masaru Komiyama, Chie Oshita, Akiko Kume, Masahiro Nogami, Mika Yagoto, Ichiro Ito, Takuma Oishi, Reiko Watanabe, Koichi Mitsuya, Kenji Matsuno, Toshio Furuya, Tadashi Okawara, Masami Otsuka, Naohisa Ogo, Akira Asai, Yoko Nakasu, Ken Yamaguchi Yasuto Akiyama, Effect of the STAT3 inhibitor STX-0119 on the proliferation of cancer stem-like cells derived from recurrent glioblastoma. *International Journal of Oncology*, 査読有, 219-227, 2013. DOI: 10.3892/ijo.2013.1916

Mikako Fujita, Masako Nomaguchi, Akio Adachi, Masami Otsuka, SAMHD1-dependent and-independent functions of HIV-2/SIV Vpx protein. *Frontiers in Microbiology*, 査読有, August 2012, Vol 3, Article 297, 1-7, 2012. DOI: 10.3389/fmicb.2012.00297

Shintaro Suemasu, Naoki Yamakawa,

Tomoaki Ishihara, Teita Asano, Kayoko Tahara, Ken-ichiro Tanaka, Hirofumi Matsui, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka, Koji Takeuchi, Hidekatsu Suzuki, Tohru Mizushima, Identification of a unique nsaid, fluoro-loxoprofen with gastroprotective activity. *Biochemical Pharmacology*, 査読有, 84 (11), 1470-1481, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.09.016>

Naoki Yamakawa, Shintaro Suemasu, Yoshinari Okamoto, Ken-ichiro Tanaka, Tomoaki Ishihara, Teita Asano, Keishi Miyata, Masami Otsuka, Tohru Mizushima, Synthesis and biological evaluation of derivatives of 2-{2-fluoro-4-[(2-oxocyclopentyl)methyl]phenyl}propanoic acid: Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs with Low Gastric Ulcerogenic Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 査読有, 55(11), 5143-5150, 2012. DOI: 10.1021/jm300049g

Takashi Masuda, Kensaku Anraku, Mitsuhiro Kimura, Kaori Sato, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka, A Versatile Intermediate for the Systematic Synthesis of All Regioisomers of *myo*-Inositol Phosphates. *Synthesis*, 査読有, 44 (6), 909-919, 2012. DOI: 10.1055/s-0031-1289730

Yosuke Kanemaru, Yumi Momiki, Saori Matsuura, Tatsufumi Horikawa, Jin Gohda, Jun-ichiro Inoue, Yoshinari Okamoto, Mikako Fujita, Masami Otsuka, An Artificial Copper Complex Incorporating a Cell-penetrating Peptide Inhibits NF-κB Activation. *Chem. Pharm. Bull.*, 査読有, 59 (12), 1555-1558, 2011. <http://dx.doi.org/10.1248/cpb.59.1555>

Kensaku Anraku, Teruhiko Inoue, Kenji Sugimoto, Kota Kudo, Yoshinari Okamoto, Takashi Morii, Yasuo Mori, Masami Otsuka, Design and synthesis of biotinylated inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate targeting Grp1 Pleckstrin Homology domain. *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有, 19 (22), 6833-6841, 2011. doi:10.1016/j.bmc.2011.09.035

Tomohiko Ejima, Mayuko Hirota, Tamio Mizukami, Masami Otsuka, Mikako Fujita, An anti-HIV-1 compound that increase steady-state expression of apolipoprotein B mRNA-editing Enzyme-catalytic polypeptide-like 3G. *Int. J. Mol. Med.*, 査読有, 28 (4), 613-616, 2011. October 2011. DOI: 10.3892/ijmm.2011.737

### 〔学会発表〕(計 18 件)

井田智弓、岡本良成、藤田美歌子、黒崎博雅、大塚雅巳 ペプチド性新規 DNA

切断分子の設計と合成 第 30 回日本薬学会九州支部大会(長崎国際大学、長崎) 2013.12.8.

加茂真宏、岡本良成、大塚雅巳、藤田美歌子 ウイルスコアの脱殻過程における作用を目指した新規抗 HIV 薬の創製 第 30 回日本薬学会九州支部大会(長崎国際大学、長崎) 2013.12.7.

古賀涼子、江島智彦、金丸陽亮、田口祐、柴田佑里、井上純一郎、大塚雅巳、藤田美歌子 NF- $\kappa$ B 活性化シグナル伝達分子に対する亜鉛フィンガー蛋白質阻害剤の作用 第 30 回日本薬学会九州支部大会(長崎国際大学、長崎) 2013.12.7.

加茂真宏、岡本良成、大塚雅巳、藤田美歌子 ウイルスコアの脱殻過程における作用を目指した新規抗 HIV 薬の創製 第 31 回メディスナルケミストリーシンポジウム(広島アステールプラザ、広島) 2013.11.21.

古賀涼子、江島智彦、金丸陽亮、田口祐、柴田佑里、井上純一郎、大塚雅巳、藤田美歌子 NF- $\kappa$ B 活性化シグナル伝達分子に対する亜鉛フィンガー蛋白質阻害剤の作用 第 31 回メディスナルケミストリーシンポジウム(広島アステールプラザ、広島) 2013.11.21.

立石大、安楽健作、古賀涼子、岡本良成、藤田美歌子、大塚雅巳 HIV-1 放出抑制剤を目指したイノシトールリン脂質誘導体の合成と評価 第 31 回メディスナルケミストリーシンポジウム(広島アステールプラザ、広島) 2013.11.20.

Masami Otsuka Inositol phosphates in calcium signaling and HIV replication DPhG (Deutsche Pharmazeutische Gesellschaft) Annual Meeting 2013 (University of Freiburg、ドイツ) 2013.10.11.

安楽健作、立石大、古賀涼子、東大志、本山敬一、有馬英俊、大塚雅巳、藤田美歌子 HIV-1 MA 蛋白質と強く結合するイノシトールリン脂質誘導体の合成と評価 日本薬学会第 133 年会(パシフィコ横浜、横浜) 2013.03.29.

田中亜友美、岸田明日美、小畑恵美子、岡本良成、梅澤一夫、大塚雅巳 ファルネシルトランスフェラーゼの特異的阻害剤を目的とした亜鉛キレーターの設計及び合成 日本薬学会第 133 年会(パシフィコ横浜、横浜) 2013.03.28.

立石大、安楽健作、古賀涼子、藤田美歌子、大塚雅巳 HIV-1 放出抑制剤を目指したイノシトールリン脂質誘導体 日本薬学会第 133 年会(パシフィコ横浜、横浜) 2013.03.28.

田中亜友美、岸田明日美、小畑恵美子、岡本良成、梅澤一夫、大塚雅巳 ファルネシルトランスフェラーゼの特異的阻害を目的とした亜鉛キレーターの設計

および合成 第 29 回日本薬学会九州支部大会(熊本大学薬学部、熊本) 2012.12.8/9.

川田代康介、岡本良成、佐谷秀行、大塚雅巳 人工亜鉛キレーターを持つ ADAM ファミリーメタロプロテアーゼ阻害剤の合成 第 29 回日本薬学会九州支部大会(熊本大学薬学部、熊本) 2012.12.8/9.

園田祥子、安楽健作、古賀涼子、田口祐、井上純一郎、岡本良成、藤田美歌子、大塚雅巳 亜鉛フィンガー蛋白質阻害剤 SN-1 の作用機序解明を目指した研究 第 29 回日本薬学会九州支部大会(熊本大学薬学部、熊本) 2012.12.8/9.

筑葉晃一、工藤康太、舩田岳史、安楽健作、大塚雅巳 PH ドメインタンパク質に結合し膜に移動させる myo-イノシトール誘導体の合成 第 29 回日本薬学会九州支部大会(熊本大学薬学部、熊本) 2012.12.8/9.

立石大、安楽健作、大塚雅巳、藤田美歌子 HIV-1 放出抑制剤を目指したイノシトールリン脂質誘導体 第 26 回日本エイズ学会学術集会(慶應義塾大学日吉キャンパス、横浜) 2012.11.24.

安楽健作、舩田岳史、立石大、岡本良成、藤田美歌子、大塚雅巳 イノシトールリン酸を基盤とした生物機能性分子の設計と合成 第 38 回反応と合成の進歩シンポジウム(タワーホール船堀、東京) 2012.11.5/6.

Kensaku Anraku, Mikako Fujita, Masami Otsuka Design and Synthesis of Anti-HIV-1 Agent that Targets Pr55Gag Protein 8<sup>th</sup> AFMC International Medicinal Chemistry Symposium(京王プラザホテル、東京) 2011.11.30.

Takeshi Masuda, Kensaku Anraku, Kaori Sato, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka Systematic Synthesis of all Regioisomers of Inositol Phosphates 8<sup>th</sup> AFMC International Medicinal Chemistry Symposium(京王プラザホテル、東京) 2011.12.1.

#### [図書](計 1 件)

Kensaku Anraku, Mikako Fujita, Takashi Morii, Yasuo Mori, Yoshinari Okamoto, Masami Otsuka, Design and Synthesis of Biotinylated Inositol Phosphates: Application to the Inositol Phosphate-Protein Binding Analysis. "Inositol" Ed. By Rochha H, Cardoso M, Nova Science Publishers, Inc., 2013, pp193-213.

#### [その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kumamoto-u.ac.jp/Labs/bunsi>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

大塚 雅巳 (OTSUKA MASAMI)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授  
研究者番号：40126008

### (2) 連携研究者

藤田美歌子 (FUJITA MIKAKO)  
熊本大学・薬学部・准教授  
研究者番号：00322256

岡本良成 (OKAMOTO YOSHINARI)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教  
研究者番号：20194409

安楽健作 (ANRAKU KENSAKU)  
熊本保健科学大学・保健科学部・講師  
研究者番号：80389543