

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：36102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2016

課題番号：24790123

研究課題名(和文) 低分子型血管新生促進剤・2クロル炭素環オキセタノシンAの医薬品を指向した基盤研究

研究課題名(英文) Synthesis and evaluation of novel carbocyclic oxetanocin A (COA-CI) derivatives as potential tube formation agents

研究代表者

榊原 紀和 (Sakakibara, Norikazu)

徳島文理大学・薬学部・講師

研究者番号：10441594

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)：申請者らは低分子化合物初の血管新生促進物質、COA-CI(コアクロル)を見いだした。そこで、本化合物の血管新生促進作用発現の最適化、生体内での作用機序および代謝経路等の未だ解明されていない基礎的な問題を解決し、さらに創傷治癒、育毛剤、認知症治療薬等の医薬品としての臨床応用へと展開するための研究基盤を目的と確立する。具体的には、構造活性相関の一環として、コアクロルのシクロブタン環に結合した2つのヒドロキシメチル基に着目し、対応する類縁体を合成・活性を精査した。

研究成果の概要(英文)：Six novel carbocyclic oxetanocin A analogs (2-chloro-C.OXT-A; COA-CI) with various hydroxymethylated or spiro-conjugated cyclobutane rings at the N9-position of the 2-chloropurine moiety were synthesized and evaluated using human umbilical vein endothelial cells. All prepared compounds showed good to moderate activity with angiogenic potency. Among these compounds, 100 μ M cis-trans-2',3'-bis(hydroxymethyl)cyclobutyl derivative, trans-3'-hydroxymethylcyclobutyl analog, and 3',3'-bis(hydroxymethyl)cyclobutyl derivative had greater angiogenic activity, with relative tube areas of 3.43 ± 0.44 , 3.32 ± 0.53 , and 3.59 ± 0.83 (mean \pm SD), respectively, which was comparable to COA-CI (3.91 ± 0.78). These data may be important for further development of this class of compounds as potential tube formation agents.

研究分野：創薬化学

キーワード：コアクロル 血管新生促進活性

1. 研究開始当初の背景

申請者らは低分子化合物初の血管新生促進物質、2-Cl-C.OXT-Aを見いだした。そこで、本化合物の血管新生促進作用の最適化、生体内での作用機序および代謝経路等の未だ解明されていない基礎的な問題を解決し、さらに創傷治癒、育毛剤、痴呆症治療薬等の医薬品としての臨床応用へと展開するための研究基盤を確立する。

2. 研究の目的

現在用いられている血管新生促進剤は、生体由来の血管内皮成長因子(VEGF)や繊維芽細胞成長因子(FGF)といった高分子糖タンパク質である。これらは糖尿病患者における慢性閉塞性動脈硬化症やパージャーカー病といった、血流不足のために生じる様々な症状の緩和・治癒に用いられるが、化学的あるいは生物学的に不安定であり、これらVEGFやFGFといった生体由来の増殖因子以外に促進剤がほとんど知られていないために、現在も臨床応用は極めて少ないままである。

ところが近年、申請者らは新規に合成した核酸類縁体：2-クロル炭素環オキセタノシン A (2Cl-C.OXT-A：通称 COA-CI (コアクロル) 右

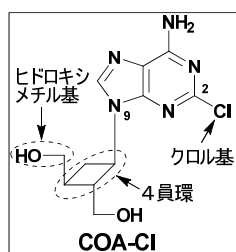


図)に強力な血管新生促進作用があることを明らかにした。COA-CI は、化学的に非常に安定で、そのプリン骨格の2位にクロル基、9位に2つのヒドロキシメチル基を持つ4員環が結合したユニークな構造をしており、低分子化合物(分子量 284)としては唯一、血管新生促進作用を示す物質である。さらにこの点が注目され COA-CI は、2010年に和光純薬工業(株)より新規血管新生促進剤として市販されている(コード No.032-21543, 5mg, 60,000円, 細胞生物用)。

このようにこれから COA-CI に関する研究が

更に活発となるが、依然、基礎研究の段階において未解明な問題が残されており、また臨床応用への展開に関しても検討することが多い。

本研究は COA-CI のまだ解明されていない基礎研究を完成させ、COA-CI およびその類縁体を利用した血管新生関連治療薬への臨床応用に展開するための基盤研究を行う。

3. 研究の方法

- 1) ラセミの(±)-COA-CI を光学分割し、それぞれの光学活性体の活性の違いを検討する。
- 2) [S1P₁受容体]-[COA-CI]複合体分子モデリングに基づいた COA-CI のさらなる構造最適化を行うことで、より強い血管新生促進活性を有し且つ低毒性な COA-CI 類縁体を創製する。
- 3) COA-CI をマウスに投与し、COA-CI の生体内での薬物動態学的検証を行う。

4. 研究成果

2-クロル炭素環オキセタノシン A (COA-CI) の新規誘導体の合成とその血管新生促進作用について

1. 緒言

当研究グループでは新規に合成した核酸類縁体である 2-クロル炭素環オキセタノシン A (2-Cl-C.OXT-A、通称 COA-CI) (1a, Figure 1)に強力な血管新生促進作用を有することを明らかにしている^{1a,b)}。COA-CI は化学的に安

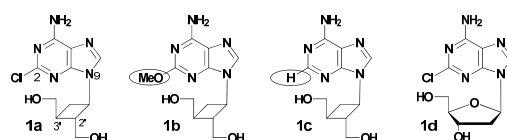


Figure 1. Structures of COA-CI (1a), COA-OMe (1b), C.OXT-A (1c), and cladribine (1d)

定で、そのプリン骨格の2位にクロル基、9位に炭素から成る4員環(シクロブタン環)が結合したユニークな構造をしており、低分子化合物(分子量 284)としては唯一、血管新生促進作用を示す物質であることから、創

傷治癒、認知症治療薬等の医薬品としての実用化が期待されている。血管新生促進能の機序に関しては、COA-Cl がスフィンゴシン-1-リン酸受容体(S1P₁)の部分的アゴニストとして作用していることを明らかにしている^{1c)}。

COA-Cl 類縁体の創製および構造活性相関研究についても研究が進んでおり^{1a,d,e,f)}、Figure 1 に示すように、COA-Cl のプリン骨格 2 位のクロル基をメトキシ基に変換した、いわゆる COA-OMe (1b) で血管新生促進活性が半減し^{1d)}、さらに 2 位のクロル基が水素に置き換わった類縁体 1c では活性が無くなることを見出ししている^{1a)}。一方、COA-Cl プリン骨格 9 位のシクロブタン環がペントース環へと置換されたクラドリピン 1c でも血管新生促進作用が失活している^{1a)}。すなわち、COA-Cl の血管新生促進作用の発現には、プリン骨格の 2 位に適切な官能基が置換され、且つ 9 位にシクロブタン環が結合していることが必須であることが明らかになった。その一方、シクロブタン環の 2' および 3' 位に結合している 2 つヒドロキシメチル基が活性にどう関与しているかについては不明のままであった。

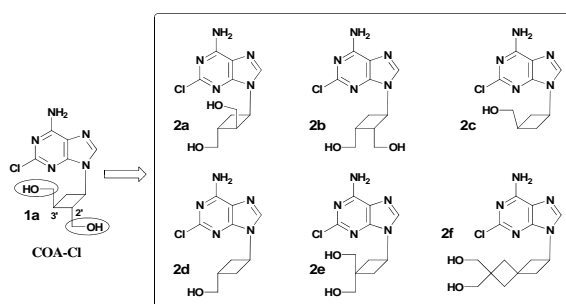


Figure 2. Structures of COA-Cl (1) and COA-Cl analogs (2a-f)

そこで今回、COA-Cl のシクロブタン部位の構造活性相関を解明し、より高活性で低毒性な血管新生促進剤を創製することを目的として、COA-Cl 類縁体(2a-f)を合成し、血管新生促進作用を評価した (Figure 2)。

2. 結果と考察

COA-Cl 類縁体(2a-d)の合成に関しては、Chart 1 に示すように適切なシクロブチルアルコール 3a-d を光延反応により 2,6-ジクロル

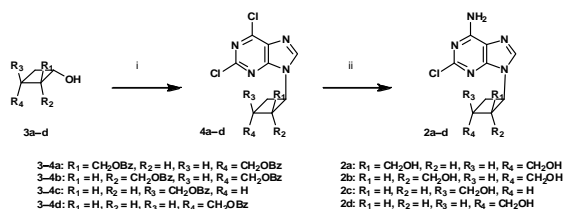


Chart 1. Synthesis of compound 2a-d. Reagents and conditions: i, 2,6-dichloropurine, PPh₃, DIAD, THF, 50 °C; ii, NH₃, MeOH, 100 °C

プリンと反応させることにより縮合体 4a-d を得た。さらに封管中 100 °C でメタノリックアンモニア処理を行うことにより目的の COA-Cl 類縁体 4a-d とした。他方、COA-Cl 類縁体(2e-f) に関しては、Chart 2 に示すように共通の中間体 5 から数工程で合成した。すなわち、ジオール 5 をベンゾイル基で保護することで 6 とし、ベンジル基の脱保護、続く光延反応による 2,6-ジクロルプリンとの縮合により 8 とした。さらに封管中アンモニア処理を行うことにより目的物 2e を合成した。

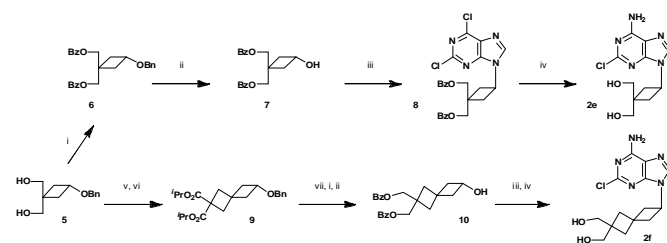


Chart 2. Synthesis of compound 2e-f. Reagents and conditions: i, BzCl, Pyridine, rt; ii, Pd/C, H₂, rt; iii, 2,6-dichloropurine, PPh₃, DIAD, THF, 50 °C; iv, NH₃, MeOH, 100 °C; v, TsCl, pyridine, rt; vi, NaH, Diisopropylmalonate, toluene, reflux; vii, LiAlH₄, THF, -20 °C

COA-Cl 類縁体 2f の合成に関しては、ジオール 5 をトシル基で保護した後、水素化ナトリウム存在下マロン酸ジイソプロピルと縮合させることによりスピロ体 9 とした。さらにジエステルを LAH 還元によりジオールとした後、ベンゾイル基でアルコールを保護、さらにベンジル基を脱保護することにより 2 級アルコール 10 とした。最後に光延反応続くアンモニア処理により目的物 2f を合成した。

合成した COA-Cl 類縁体(2a-f)の活性評価は、無添加コントロールにおいて形成された管腔の面積を 1 とした場合の相対値によって算出した。その結果、6 種類全ての類縁体に血管新生促進作用が認められた。特に 100 μM の濃度域において 2b, 2d および 2e は、相対値がそれぞれ 3.43 ± 0.44, 3.32 ± 0.53 および 3.59 ± 0.83 (mean ± SD) となり、COA-Cl (1a)

の値 3.91 ± 0.78 に匹敵する結果となった^{1e)}。現在これらの結果を踏まえ、S1P₁ 受容体とリガンドとのドッキングスタディを含めた、より詳細な構造活性相関について検討を行っている。

References

- 1) (a) I. Tsukamoto, N. Sakakibara, T. Maruyama, J. Igarashi, H. Kosaka, Y. Kubota, M. Tokuda, H. Ashino, K. Hattori, S. Tanaka, M. Kawata, and R. Konishi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2010**, 399, 699; (b) N. Okabe, E. Nakamura, N. Himi, K. Narita, I. Tsukamoto, T. Maruyama, N. Sakakibara, T. Nakamura, T. Itano, O. Miyamoto, *Brain Research*, **2013**, 1506, 115; (c) J. Igarashi, T. Hashimoto, Y. Kubota, K. Shoji, T. Maruyama, N. Sakakibara, Y. Takuwa, Y. Ujihara, Y. Katanosaka, S. Mohri, K. Naruse, T. Yamashita, R. Okamoto, K. Hirano, H. Kasaka, M. Takata, R. Konishi, I. Tsukamoto, *Pharmacology Research & Perspectives*, **2014**, 2, e00068; (d) N. Sakakibara, I. Tsukamoto, T. Tsurura, M. Takata, R. Konishi, T. Maruyama, *Heterocycles*, **2012**, 85, 1105; (e) N. Sakakibara, J. Igarashi, M. Takata, Y. Demizu, T. Misawa, M. Kurihara, R. Konishi, Y. Kato, T. Maruyama, I. Tsukamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **2015**, 63, 701; (f) N. Sakakibara, J. Igarashi, M. Takata, R. Konishi, N. Suzue, Y. Kato, T. Maruyama, I. Tsukamoto, *Heterocycles*, **2015**, 91(9), 1823-1832.

血管新生促進剤を指向した 2-クロル炭素環オキセタノシン A (COA-CI) の新規 2-置換型類縁体の創製研究

1. 緒言

当研究グループでは新規に合成した核酸類縁体である 2-クロル炭素環オキセタノシン A (2-Cl-C.OXT-A、通称 COA-CI: コアクロル) (1, Figure) に強力な血管新生促進作用を有することを明らかにしている。COA-CI は化学的に

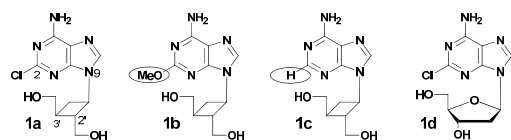


Figure 1. Structures of COA-CI (1a), COA-OMe (1b), C.OXT-A (1c), and cladribine (1d)

安定で、そのプリン骨格の 2 位にクロル基、9 位に炭素から成る 4 員環(シクロブタン環)が結合したユニークな構造をしており、低分

子化合物(分子量 284)としては唯一、血管新生促進作用を示す物質であることから、創傷治癒、認知症治療薬等の医薬品としての実用化が期待されている。今回、COA-CI のプリン骨格 2 位の構造活性相関を解明することを目的として、COA-CI 類縁体(2a-d, Figure)を合成し、血管新生促進作用を評価した¹⁾。

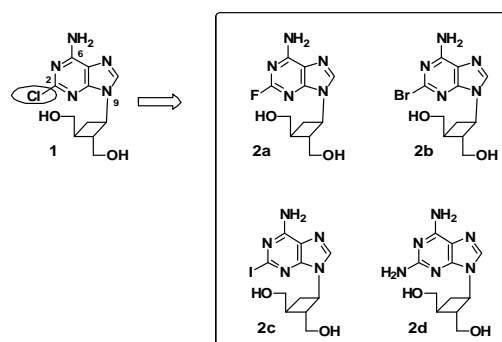


Figure. Structures of COA-CI (1) and COA-CI analogs (2a-d)

2. 結果と考察

COA-CI 類縁体(2a-d)は、何れも合成中間体としてシクロブチルアルコール誘導体を 2-置換型-6-クロルプリンと光延反応により縮合させ、続いてメタノリックアンモニアで処理することにより合成した。合成した COA-CI 類縁体(2a-d)の血管新生促進作用を評価したところ、特に 100 μ M の濃度域における類縁体 2b および 2c の活性は、COA-CI (1) に匹敵することが明らかになった¹⁾。

References

- 1) N. Sakakibara, J. Igarashi, M. Takata, R. Konishi, N. Suzue, Y. Kato, T. Maruyama, I. Tsukamoto, *Heterocycles*, **2015**, 91(9), 1823-1832.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 7 件)

1. Sakakibara, N.; Igarashi, J.; Takata, M.; Konishi, R.; Kato, Y.; Tsukamoto, I. Synthesis and evaluation of novel cyclopropane nucleoside as potential tube formation agents. *Chem. Pharm. Bull.*, **2017**, 65(5), 504-510.
2. Igarashi, J.; Okamoto, R.; Yamashita, T.; Hashimoto, T.; Karita, S.; Nakai, K.; Kubota, Y.; Takata, M.; Yamaguchi, F.; Tokuda, M.; Sakakibara, N.; Tsukamoto, I.; Konishi, R.; Hirano, K. A key role of

- PGC-1 α transcriptional coactivator in production of VEGF by a novel angiogenic agent COA-CI in cultured human fibroblasts. *Physiological reports*, **2016**, 4(6), e12742.
3. Sakakibara, N.; Igarashi, J.; Takata, M.; Konishi, R.; Suzue, N.; Kato, Y.; Maruyama, T.; Tsukamoto, I. Design, synthesis, and evaluation of novel 2-halogenated or aminated carbocyclic oxetanocin A analogs as potential angiogenic agents. *Heterocycles*, **2015**, 91(9), 1823-1832.
 4. Sakakibara, N.; Igarashi, J.; Takata, M.; Demizu, Y.; Misawa, T.; Kurihara, M.; Konishi, R.; Kato, Y.; Maruyama, T.; Tsukamoto, I. Synthesis and evaluation of novel carbocyclic oxetanocin A (COA-CI) derivatives as potential tube formation agents. *Chem. Pharm. Bull.*, **2015**, 63(9), 701-709.
 5. Igarashi, J.; Hashimoto, T.; Kubota, Y.; Shoji, K.; Maruyama, T.; Sakakibara, N.; Takuwa, Y.; Ujihara, Y.; Katanosaka, Y.; Mohri, S.; Naruse, K.; Yamashita, T.; Okamoto, R.; Hirano, K.; Kasaka, H.; Takata, M.; Konishi, R.; Tsukamoto, I. Involvement of S1P₁ receptor pathway in angiogenic effects of a novel adenosine-like nucleic acid analog COA-CI in cultured human vascular endothelial cells. *Pharmacology Research & Perspectives*, **2014**, 2(5), e00068.
 6. Okabe, N.; Nakamura, E.; Himi, N.; Narita, K.; Tsukamoto, I.; Maruyama, T.; Sakakibara, N.; Nakamura, T.; Itano, T.; Miyamoto, O. Delayed administration of the nucleic acid analog 2Cl-C.OXT-A attenuates brain damage and enhances functional recovery after ischemic stroke. *Brain Research*, **2013**, 1506, 115-131.
 7. Sakakibara, N.; Tsukamoto, I.; Tsurura, T.; Takata, M.; Konishi, R.; Maruyama, T. Novel Synthesis of Carbocyclic Oxetanocin Analogs (2-Alkoxy-C.OXT-A) and Their Tube Formation Activities of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). *Heterocycles*, **2012**, 85(5), 1105-1116.

〔学会発表〕(計 17 件)

1. 榑原紀和, 五十嵐 淳介, 高田麻紀, 小西良士, 鈴江奈月, 加藤善久, 丸山徳見, 塚本郁子 (2016). 「血管新生促進剤を指向した 2-クロル炭素環オキセタノシン A (COA-CI)の新規 2-置換型類縁体の創製研究」日本ケミカルバイオロジー学会第 11 回年会, 抄録集, p162, 6月 15~17 日, 京都
2. 塚本郁子, 榑原紀和, 五十嵐 淳介, 徳田雅明, 窪田泰夫, 高田麻紀, 小西良士 (2016). アデノシンアナログ COA-CI の神経栄養 / 保護作用-(2), 第 89 回日本生化学会, 9月 25~27 日, 仙台
3. 榑原紀和, 五十嵐 淳介, 高田麻紀, 出水庸介, 三澤隆史, 栗原正明, 小西良士, 加藤善久, 丸山徳見, 塚本郁子 (2015). 「血管新生促進剤を指向した 2-クロル炭素環オキセタノシン A(COA-CI)の新規誘導体の創製研究」第 54 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, 講演要旨集, p195, 10月 31~11月 1 日, 高知 .
4. Okamoto, R., Igarashi, J., Yamashita, T., Hashimoto, T., Karita, S., Shoji, K., Kubota, Y., Takata, M., Yamaguchi, F., Tokuda, M., Sakakibara, N., Tsukamoto, I., Konishi, R., Hirano, K. (2015). A Key Role of PGC-1 α Co-transcription Factor, but not HIF1 α Transcription Factor, in Production of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) by a Novel Angiogenic Agent COA-CI in Cultured Human Fibroblasts. The American Heart Association's Scientific Sessions 2015, Session No. APS.07.01, 7-11 November, Florida, America.
5. 榑原紀和, 五十嵐 淳介, 高田麻紀, 出水庸介, 三澤隆史, 栗原正明, 小西良士, 加藤善久, 丸山徳見, 塚本郁子 (2015). 「2-クロル炭素環オキセタノシン A (COA-CI)の新規誘導体の合成とその血管新生促進作用」第 45 回複素環化学討論会, 講演要旨集, p243-244, 11月 19~21 日, 東京 .
6. 榑原紀和, 五十嵐 淳介, 高田麻紀, 出水庸介, 三澤隆史, 栗原正明, 小西良士, 加藤善久, 丸山徳見, 塚本郁子 (2015). 「血管新生促進作用を有する新規 2-クロル炭素環オキセタノシン A (COA-CI)誘導体の創製」第 33 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 講演要旨集, p69, 11月 25~27 日, 千葉 .
7. 榑原紀和 (2016). 「血管新生促進剤を指向した新規 COA-CI 類縁体の創製研究」第 93 回日本生理学会大会, 講演要旨集, p89, 3月 22~24 日, 札幌 .
8. 榑原紀和, 五十嵐 淳介, 高田麻紀, 小西良士, 鈴江奈月, 加藤善久, 丸山徳見, 塚本郁子 (2016). 「2-クロル炭素環オキセタノシン A (COA-CI)の新規 2-置換型類縁体の合成とその血管新生促進作用」日本薬学会第 136 年会, 28AB-am188, 3月 26-29 日, 横浜
9. 塚本郁子, 高田麻紀, 窪田泰夫, 徳田雅明, 榑原紀和, 五十嵐 淳介, 小西良士 (2016). 「新規核酸アナログ COA-CI の神経保護栄養作用」日本薬学会第 136 年会, 28AB-am224, 3月 26-29 日, 横浜

10. Tsukamoto, I., Takata, M., Kubota, Y., Kawanami, Y., Sakakibara, N., Maruyama, T., Tokuda, M., and Konishi, R. (2014). Physiological activities of the rare sugar derivatives, Rare Sugar Symposium 2014 in Kagawa, Abst. No. S12, 29-30 April, Kagawa, Japan.
11. 塚本郁子,五十嵐淳介,橋本剛,山下哲生,榊原紀和,丸山徳見,高田麻紀,窪田泰夫,平野勝也,小西良士 (2014). 「HUVECにおけるCOA-Clの血管新生作用に対するS₁Pレセプターの関与」第87回日本生化学会大会,演題番号,3P-391,10月15~18日,京都.
12. 塚本郁子,高田麻紀,榊原紀和,丸山徳見,五十嵐淳介,小坂博昭,徳田雅明,窪田泰夫,小西良士 (2013). 「新規核酸化合物COA-Cl(2Cl-C.OXT-A)の神経栄養作用」第90回日本生理学会大会,演題番号,1PK-165,3月27~29日,東京.
13. 岡部直彦,中村恵美,氷見直之,成田和彦,塚本郁子,榊原紀和,丸山徳見,中村文洋,板野俊文 (2013). 「核酸アナログ2Cl-C.OXT-Aの虚血性神経障害および機能回復に対する効果」第90回日本生理学会大会,演題番号,2PK-182,3月27~29日,東京.
14. 五十嵐淳介,窪田泰夫,小路和代,榊原紀和,丸山徳見,高田麻紀,小坂博昭,小西良士,塚本郁子 (2013). 「新規核酸類似物質COA.Clはプリン受容体とSrcチロシンキナーゼを介して血管新生を促進する」第90回日本生理学会大会,演題番号,1PK-005,3月27~29日,東京.
15. Tsukamoto, I., Takata, M., Sakakibara, N., Maruyama, T., Igarashi, J., Kosaka, H., Kubota, Y., Tokuda, M., Ashino, H., Hattori, K., Tanaka, S., Kawata, M., and Konishi, R. (2013). A newly synthesized adenosine analogue, COA-Cl has angiogenic potency, International Pharmaceutical Federation, Abst. No. 004, 31 August-5 September, Dublin, Ireland.
16. 塚本郁子,榊原紀和,丸山徳見,五十嵐淳介,小坂博昭,徳田雅明,窪田泰夫,高田麻紀,小西良士 (2013). 「アデノシンアナログCOA-Clの神経栄養/保護作用」第86回日本生化学会大会,演題番号,2P-354,9月11~13日,横浜.
17. 榊原紀和 (2013). 「血管新生促進作用および抗がん作用を有する新規核酸類縁体その創製」第52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,講演要旨集,p95,10月26~27日,松山(受賞講演).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://kp.bunri-u.ac.jp/kph17/index.htm>
|

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榊原 紀和 (SAKAKIBARA, Norikazu)
徳島文理大学 香川薬学部 薬物動態学
講座・講師
研究者番号: 10441594

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

塚本 郁子 (TSUKAMOTO, Ikuko)
香川大学 医学部 薬物生体情報学講
座・客員教授
研究者番号: 10183477

五十嵐 淳介 (IGARASHI, Junsuke)

香川大学 医学部 自律機能生理学講
座・准教授
研究者番号: 20346638

(4) 研究協力者

()