

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670054

研究課題名(和文)天然物由来小分子化合物を用いた多剤耐性がん選択性のケミカルバイオロジー

研究課題名(英文)Chemical biology of MDR cancer selective cytotoxicity using natural product derivatives

研究代表者

後藤 享子(Goto, Kyoko)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：50180245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、多剤耐性(MDR)がんの克服を目指して独自に開発した天然物誘導体を用いた新たな創薬化学的アプローチである。パンレイシ科植物から単離された非定型フラボノイド誘導体であるTEDBは、MDRがん選択的に作用する非常に興味深い生理活性を示す。創薬化学的に合成したTEDB誘導体を用いた生理活性解析を通して、MDRがんにも有効なこれまでになかったがん細胞分裂特異的阻害化合物を見出した。得られた知見を元に、新規抗腫瘍活性フラボンをデザイン・合成し、有望な抗がん創薬シードの開発に成功した。TEDBの作用機序解析により、MDRがん細胞内に特徴的な標的タンパク質候補とその作用機序の一端を見出した。

研究成果の概要(英文)：TEDB, a derivative of natural flavonoid desmosdumotin B, selectively inhibits multidrug resistant (MDR) tumor cell growth without any cytotoxicity against normal cells as well as non-MDR cells. Despite its unique antiproliferative activity, the mechanism of action is totally unclear. Using medicinal chemistry as well as chemical biological approaches of TEDB derivatives, we have discovered that TEDB with an artificial benzothiophene ring-B system induced a unique antimitotic bioactivity. The resulting antimitotic agent showed a wide spectrum against multiple cancer cell lines including MDR cells. Based on this finding, a series of new antimitotic flavonoids was designed and synthesized. We have also identified a cellular protein overexpressed in MDR cells as a novel candidate for overcoming MDR tumor using TEDB derivatives.

研究分野：創薬化学

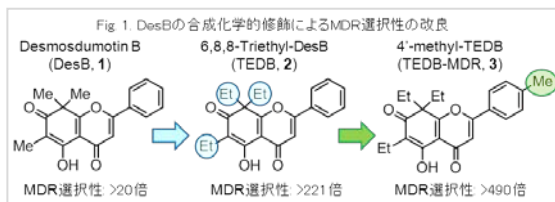
キーワード：フラボノイド TEDB 多剤耐性がん Collateral sensitivity

1. 研究開始当初の背景

がんによる致死は、がん転移およびがん多剤耐性化(MDR)等のがん進展により引き起こされる。本研究は、MDR がんの克服を目指して独自に開発した天然物由来生理活性化合物を用いた新たな創薬化学的アプローチである。

バンレイシ科の *Desmos dumosus* から単離された非定型フラボノイド、Desmosdumotin B (DesB, **1**, Fig.1)が、ヒト正常細胞 (HUVEC: ヒト臍帯静脈内皮細胞) や種々の薬剤感受性がん細胞には殆ど毒性を示さず、多剤耐性(MDR)がん細胞に選択的な細胞毒性を示すことを独自に見出した(細胞増殖を抑制する薬剤濃度が薬剤感受性がん細胞の1/20、すなわち Selective Index : SI = 20)。このような MDR 選択性を、Collateral sensitivity (CS) と言い、MDR 選択性を持つ化合物は CS 化合物と呼ばれる。

通常、MDR がん細胞には P 糖タンパク質 (P-gp) などの ABC 薬物輸送体(ATP-binding cassette transporter)が過剰発現しており、細胞内から薬物(抗がん剤)を ATP 依存的に効率よく排出してしまう。このため、異なった作用機序の多種多様な薬剤に対する感受性が劇的に低下する。ABC 輸送体の基質ではない抗がん剤の場合は、多剤耐性および薬剤感受性がんに対して同等の有効性が見られる。従って、DesB のように MDR がん細胞に高い選択的細胞毒性を示す化合物の発見と創薬化学的発展は、がんの多剤耐性化克服の新たな基礎科学的解明に大いに寄与することが期待される。



我々は、DesB の全合成ルートを確立後、その誘導体合成、構造活性相関研究により、6,8,8-triethyl-DesB (TEDEB, **2**)が、221以上

の SI を示すこと、さらにその誘導体である 4'-Me- TEDEB (**3**)がリード天然物 DesB の約 250 倍の選択性 (SI = >490) を持つことを独自に見出した (Nakagawa-Goto, *et al.*, *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 3297; *J. Med. Chem.*, **2010**, *53*, 6699)。この選択性は、これまで見出された CS 化合物の中で最も高い点で非常に注目されている (Hall, *et al.*, *Trends Pharmacol. Sci.*, **2009**, *30*, 546; Pluchino *et al.*, *Drug Resist. Updat.*, **2012**, *15*, 98)。

このように興味深い MDR がん細胞選択的細胞毒性、すなわち CS 現象の分子機構および CS 化合物の作用機序は、これまでに全く解明されていない。

我々は、4'-Me-TEDEB (**3**) のケミカルバイオロジー解析から、TEDEB 誘導体による MDR 選択的細胞毒性作用は P-gp の発現に依存していることを明らかにしている。その作用機序は P-gp の ATP 分解酵素(ATPase)活性誘導である可能性を報告している (Kuo *et al.*, *Biochem. Pharmacol.*, **2011**, *81*, 1136)。一般的に、P-gp の基質は P-gp の ATPase を活性化する。一方で、TEDEB 誘導体は P-gp の基質ではなく、しかも細胞膜上の P-gp の薬物排出能も阻害しない。このことから、その MDR 選択性の作用機序の分子機構は複雑であると予想された。

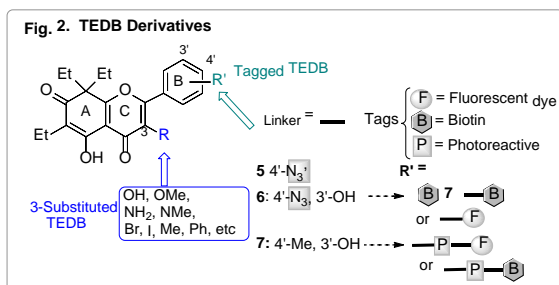
また、TEDEB 誘導体による MDR 選択性は、MDR がん細胞における P-gp 発現量に大きく影響される。

2. 研究の目的

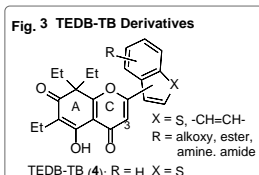
上記で述べたように、TEDEB の MDR がん細胞選択性が、細胞の不均一な多剤耐性度に影響を受けることから、更なる最適化が必要である。さらに、本化合物の MDR がん細胞選択性の作用機序は全く解明されていない。以上のことから、より安定的な MDR 選択性を持つ新たな誘導体合成と、TEDEB 誘導体のユニークな CS 現象の作用機序解明を当初の目的とした。

TEDEB の持つ生理活性の安定化を達成し、副作用なく MDR がん細胞選択的に作用する新たな TEDEB 誘導体を合成することにより、これ

までにない抗がん剤となり得る可能性を見出し、将来の動物実験への移行を模索することも念頭に入れている。たとえば、3位置換基効果に関しては、検証されていないため、各種3位置換体の合成を試みるとともに、活性の安定化を期待した (Fig. 2)。



研究遂行にともなって、がん細胞に選択性が高く (通常細胞には低毒性) しかも MDR ががん細胞にも有効な新たな TEDB 誘導体を見出すことをも目的に加えた。すなわち、B 環を 10  $\pi$  電子系に変換することで得られる TEDB-TB (4, Fig. 3) は、その生理活性が TEDB とは大きく変わり、MDR ががん細胞を含め、各種がん細胞に対して効果的に有糸分裂特異的阻害効果を示すことを既に報告している。B 環上に様々な置換基を導入することにより、P-gp の発現にも影響しない、これまでにない新しい有糸分裂特異的阻害剤の合成を目指した。



TEDB 誘導体は細胞膜上の P-gp の機能を阻害しないことから、併用する薬剤の細胞分布に対しても全く影響を与えない。また、がん幹細胞の同定および評価の過程で MDR ががん細胞との類似性、特に ABC 輸送体の発現亢進が報告され始めており (Fatima, *et al.*, *Stem Cells*, 2012, 30, 210)、過剰発現した ABC 輸送体によるがん細胞の進展さらに自己再生能への関与も予測されている。

本研究の成果は、MDR ががん細胞選択的化合物によるこれまでにない作用機序を持つ抗がん剤開発と新たな抗がん剤の細胞内標的探索に繋がることを期待される。

さらに、MDR ががん細胞選択的細胞毒性の分

子機構の解明は、がん進展制御及びがん幹細胞研究の新しい分野の創成に寄与すると考えられる。

### 3. 研究の方法

がん細胞の多剤耐性度は細胞毎に均一な状態ではなく、4'-Me-TEDB (3) の MDR ががん細胞選択性は、多剤耐性度 (主として P-gp 発現量) の影響を受ける。この問題点を克服するべくさらなる化学的な最適化を行い、同時に作用機序の解明のために必要な標識誘導体の合成を達成する。最適化された化合物ならびに標識誘導体を用いて、MDR ががん細胞における P-gp による多剤耐性化のこれまで知られていない機能解析を目指した。

化合物の最適化では、これまでに確立した TEDB 合成法と構造活性相関研究をもとに化合物をデザインし、標的生体分子との結合能力の改善を目指した。この際、酸化酵素等による代謝も考慮にいれる必要があるが、TEDB が代謝に対し比較的安定であることを実証済みである。標的タンパク質の結合ポケットに上手く適合する官能基を適切な場所に導入するか、水素結合を介して親和性を高めれば結合の安定化が望めると考えた。現時点では標的タンパク質は未同定ではあるが、フラボノイド 3 位の OH 基が P-gp を構成する Nucleotide-binding domain との親和性を高めること (Barron, *et al.*, *Phytochem. Rev.*, 2002, 1, 325)、更に 3 位置換基効果が未だ不明であるため、各 3 位置換体の合成により最適化が期待できる。従って OH 体を含む 3 位置換体の合成を、文献既知の方法を応用することによって達成させる。

標的タンパク質同定のための標識化合物の合成では、光感受性置換基 (アジド等) を直接導入して、まず自家蛍光型の誘導体の合成を試みた。標識体の利用においては生理活性の維持と標的タンパク質との安定的な結合という大きな課題がある。そこでさらに、標識化可能な水酸基を持ち、かつ必要な活性を維持し、既に合成済みの TEDB-OH 体 5、6

(Fig. 2)を用いて、蛍光色素(Aminocumarin, Fluorescein 等)、光感受性置換基(アジド等)やビオチンなどのアフィニティー標識の中から2つ以上を組み合わせての挿入を試みる事が当初の計画であった (Li X, Hu Y. *Curr. Med. Chem.*, **2010**, *17*, 3030)。従ってその前試験として、B 環水酸基にリンカーと成り得る様々な置換基の導入を試みた。

上記で合成した全ての各種誘導体は細胞増殖阻害試験に附し、高いMDR がん細胞選択性を維持している化合物を選定する。また、MDR を含めて広域に抗腫瘍作用を示す誘導体に関しては、その作用機序の解明もすすめる。さらに、MDR がん細胞選択的細胞増殖阻害活性を示す標識 TEDB 誘導体を用いて、細胞生物学的に細胞内での挙動を蛍光顕微鏡下観察し、作用機序解析を試みる。

#### 4. 研究成果

(1) TEDB 誘導体の構造的最適化では、3 位置換誘導体の合成を試みた。3 位水酸基導入は、Algar-Flynn-Oyamada 反応を含め、既存の方法を種々検討したが、A 環の非芳香族性、立体的な嵩高さなどが、反応の進行を妨げ目的物を得ることが出来なかった。低収率ながらヨウ素、ブロムなどのハロゲンの 3 位導入に成功し、それを足がかりに 3-アミノ置換体 (R = NHMe, NHEt)を合成した。また、1-(2,4,6-Trihydroxy-phenyl)-1-propanone を出発原料として、3-Me 誘導体も合成した。得られた全ての 3 位置換誘導体は、いずれも CS 現象を示したが、残念ながら非常に弱いものであった。

(2) TEDB 誘導体の標識化では、B 環水酸基上への標識置換基導入に向け種々のリンカーを検討した。その結果、結合様式は、エーテルタイプよりもエステルタイプの方が本来の生理活性維持に最適だという知見を得ることができた。しかし、合成した化合物いずれの場合においても MDR がん細胞に対する選択性の低下が観察され、MDR 選択性の作用機序解析に向けては今後さらなる誘導体

合成の検討が必要である。

(3) 3 位置換誘導体合成と共に、創薬化学的に汎用されているリングシステムを B 環に変換し、その置換基効果も検討した。ベンゾチオフェンなど  $10\pi$  電子系 B 環による生理活性の劇的变化は既に発表しているが、さらにその B 環上に様々な置換基を導入することにより、これまでにない新しい有糸分裂特異的阻害効果を見出し、その成果を国際学会 (246<sup>th</sup> ACS National Meeting, Indianapolis, 2013 年) ならびに国内の学会 (日本薬学会第 136 年会、2016 年) で発表するとともに、論文にまとめた (*J. Med. Chem.*, **2015**, *58*, 2378)。さらに 1 報を投稿済みである。

(4) 上記で得られた知見を元にベンゾチオフェンフラボンを新たにデザイン・合成し、MDR がん細胞に対してもその作用を損なわずに有糸分裂特異的阻害効果を示す新規抗腫瘍活性フラボンを開発した。この成果は、特許として申請するとともに、国内外での学会 (250<sup>th</sup> ACS National Meeting, Boston, 2015 年; 日本薬学会 135 年会、2014 年; ならびに 136 年会、2015 年) で発表し、動物を用いた抗腫瘍活性の検証を引き続き行っているところである。

(5) TEDB 標識体合成では、自家蛍光性の 4 位アジド体を合成した。MDR がん細胞に選択的に細胞死を誘導する TEDB-MDR および新規に合成した 4 位アジド体を用いて、その作用機序解析を進めた。MDR ヒトがん細胞株を用いた細胞生物学的解析から、MDR がん細胞の細胞膜以外に発現する P-gp が TEDB-MDR の主な標的である可能性を示唆する結果を得た。しかしながら、4 位アジド体の自家蛍光は極めて微弱であったため標識体の更なる改良と、分子レベルでの詳細な解析を継続している。

## 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 1 件)

④ Nakagawa-Goto K., \* Oda A, Hamel E, Ohkoshi E, Lee KH, Goto M. \* Development of a novel class of tubulin inhibitor from desmosdumotin B with a hydroxylated bicyclic B-ring. *J. Med. Chem.*, **2015**, *58*, 2378-2389. DOI: 10.1021/jm501859j 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

- ① 谷口由花子、釣本浩行、齋藤洋平、後藤益生、後藤(中川)享子、ベンゾチオフェンフラボノイド誘導体の抗腫瘍活性と構造活性相関、日本薬学会第 136 年会、横浜、2016 年 3 月
- ② 小林佑希子、齋藤洋平、後藤益生、後藤(中川)享子、TEDB-TB 窒素置換誘導体の合成と抗腫瘍活性評価、日本薬学会第 136 年会、横浜、2016 年 3 月
- ③ Taniguchi Y, Tsurimoto H, Saito Y, Hamel E, Goto M, Nakagawa-Goto K. Benzothiophenyl flavones as new classes of mitotic inhibitors. 250th ACS National Meeting & Exposition, Boston, MA, United State, August 16-20, 2015, MEDI-185.
- ④ 谷口由花子、齋藤洋平、後藤益生、後藤(中川)享子 : 新規抗腫瘍活性ベンゾチオフェンフラボノイドの合成と構造活性相関研究、日本薬学会第 135 年会、神戸、2015 年 3 月
- ⑤ Nakagawa-Goto K., Oda A, Hamel E, Ohkoshi E, Bastow, KF, Lee KH, Goto M. TEDB-TB Analogs as New Classes of Tubulin Inhibitors. 246th ACS National Meeting & Exposition, Indianapolis, IN,

United States, September 8-12, 2013, MEDI-94.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : 抗がん作用を有するベンゾチオフェン誘導体

発明者 : 後藤享子、谷口由花子、齋藤洋平

権利者 : 金沢大学

種類 : 特許

番号 : 特願 2015-017635

出願年月日 : 2015 年 1 月 30 日

国内外の別 : 国内

[その他]

ホームページ

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~bunshishoyaku/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 享子 (GOTO, Kyoko)

金沢大学医薬保健研究域薬学系・准教授

研究者番号 : 50180245

(2) 連携研究者

玉井 郁巳 (TAMAI, Ikumi)

金沢大学医薬保健研究域薬学系・教授

研究者番号 : 20155237

(3) 研究協力者

後藤 益生 (GOTO, Masuo)

Eshelman School of Pharmacy, University of North Carolina at Chapel Hill · Research Professor