



Title	がん多剤耐性克服物質agosterol Aの全合成と標的分子の機能解析プローブの創製研究
Author(s)	杉本, 昌則
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43347">https://hdl.handle.net/11094/43347</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

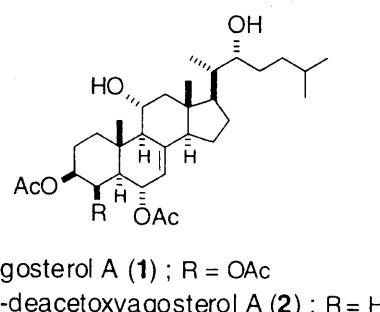
氏名	杉本昌則
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第16958号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	がん多剤耐性克服物質 agosterol A の全合成と標的分子の機能解析プローブの創製研究
論文審査委員	(主査) 教授 小林 資正
	(副査) 教授 田中 徹明 教授 北 泰行 教授 今西 武

## 論文内容の要旨

現在行われているがん治療において、抗がん剤を用いた化学療法の果たす役割は非常に大きい。ところが、がん化学療法においては、作用機序や化学構造の異なる数種の抗がん剤に対して同時に薬剤耐性を獲得して抗がん剤が効果を発揮できなくなる現象が起こり、大きな障害となっている。多剤耐性を獲得したがん細胞は、多剤耐性がん細胞と呼ばれている。がん細胞が多剤耐性を獲得する主なメカニズムの一つには、がん細胞が抗がん剤を細胞外に排出するタンパク質を細胞膜上に過剰発現し、細胞内抗がん剤濃度を低下させることによる機構が知られている。このような役割を果たす薬剤排出膜タンパク質の機能を阻害する物質は、多剤耐性がん細胞での細胞内抗がん剤濃度の低下を抑制し、抗がん剤の効果を回復させることができると期待されることから、臨床応用への可能性が高い。

このような背景のもと、当研究室では、がん多剤耐性を誘発する P-glycoprotein および MRP1 (multidrug resistance-associated protein 1) の 2 種類の抗がん剤排出膜タンパク質を過剰発現する培養腫瘍細胞株 KB C2 および KB CV60 を用いた、がん多剤耐性克服物質の探索アッセイ法を構築し、活性試験の結果を指標に底生海洋生物および各種生薬などの天然資源からがん多剤耐性克服物質の探索を進めてきた。その途上で、1998年に三重県英虞湾で採取した *Spongia* 属海綿から、強いがん多剤耐性克服作用を示す新規ステロイド agosterol A(1) を活性成分として単離構造決定した。1 は、KB3-1 細胞株 (KB C2 および KB CV60 の親株) に対して  $10 \mu M$  の濃度で全く細胞毒性活性を示さないにもかかわらず、KB C2 および KB CV60 の両細胞株に対し  $3 \mu M$  の濃度でがん多剤耐性克服作用を示した。これまでに、P-glycoprotein の機能阻害物質は多種報告されているが、それら薬物の本来の薬効が副作用として作用するため臨床的に用いるのは難しい。一方、MRP1 の機能阻害物質はまだ数例しか見出されていないことから、agosterol A(1) はがん多剤耐性克服剤のシーズとしても有望であり、MRP1 の作用機序を解析するための鍵化合物としても期待された。

しかしながら、agosterol A(1) は海綿からの抽出・精製による供給量が限られていることと、1 の化学変換では合成することが困難な誘導体も含めた詳細な活性発現部位の解析と構造活性相関研究、その解析結果に基づく合成医薬リード化合物の創製研究、*in vivo* での作用の詳細な検討や、MRP1 の作用機序を解明するための 1 を用いたプローブ分子の創製を検討するうえで、1 の化学合成が不可欠であると考えられた。



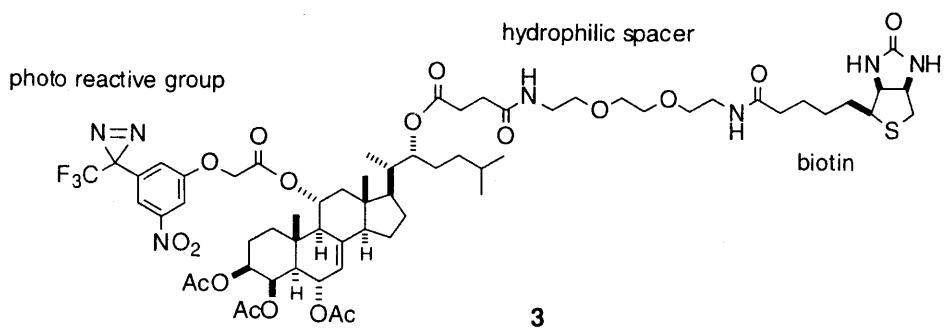
そこで、著者は安価に入手できる ergosterol を出発原料として、1の合成研究に着手した。その過程で、高選択的反 Markovnikov 型エポキシ開環反応による11位水酸基の構築と、高選択的3,4位二重結合導入反応につづく  $\beta$  面選択的ジオール化による4 $\beta$  水酸基導入法を詳細に検討することにより、agosterol A(1)の初めての全合成を達成した。

次に著者は、達成した agosterol A(1)の全合成法は多段階の工程を要することから、1の化学構造単位が簡略化されたより容易に合成できる活性リード化合物を創製するために、1からの化学変換では誘導することが困難な各官能基の欠損アナログを設計し、1の全合成中間体から合成した。そして、これまで報告している1の天然類縁体や化学誘導体とあわせて、合成アナログについて詳細な構造活性相関の解析を行った。その結果、agosterol A(1)の11位と22位の水酸基はともに活性発現に重要な働きをしており、また、3位、4位、6位に疎水性を有する酸素官能基が存在することが活性の発現に重要であることを明らかにした。中でも、4-deacetoxyagosterol A(2)は1とほぼ同程度の活性を有し、1よりかなり短工程で合成できることから、構造単位が簡略化された活性アナログとして優れていることが判明した。

また次に著者は、結晶化が困難な膜タンパク質である MRP1の agosterol A 認識ドメインを明らかにすることを目的に、機能解析研究に着手した。

これまでに、リガンドと標的分子の相互作用の解析を基盤とする創薬アプローチは、種々の疾患に対する新しいアッセイ法の確立やコンビナトリアル合成によるライプラリーの構築とそれらのオートメーション化により、飛躍的な進歩をとげている。しかし、標的分子が膜タンパク質である場合には、全ヒトゲノム解析が完了した今日においても、成功例は少ないのが現状である。この研究の律速段階は基質および阻害剤を認識する部位の解析および決定であることは言うまでもない。そして、難結晶性でかつNMR解析が困難な膜タンパク質については、その基質および阻害剤認識部位を解析する1つの方法論として、光アフィニティーラベル化法が用いられてきた。この方法では、ラベル化標的分子の高精製と量的確保が克服課題となってきたが、近年、マススペクトルの進歩に伴い、混合物状態の微量サンプルにおいても LCMS-MS 法によるシーケンス解析が可能となりつつあり、標的タンパク質の機能部位解析への応用が期待されている。

このような背景のもと、アミノ酸残基決定をマススペクトルシーケンス解析法で行うことのできる戦略をたて、MRP1に結合能を有する天然物由来の低分子プローブとして、agosterol(1)に非放射性光反応性官能基を組みこんだプローブ分子を設計した。そして、1の各水酸基に親水性スペーサーを介したビオチンと光反応基を結合させたプローブを種々合成し、がん多耐性克服活性を解析するとともに、MRP1を含有する膜画分粗タンパク質を用いた MRP1との結合実験を検討した。その結果、MRP1と考えられる約190kDa のバンドが観測できる光反応性プローブ3を見出した。



### 論文審査の結果の要旨

抗がん剤を用いた化学療法において、「がんの多耐性」という現象が臨床的にしばしば認められ、がん治療の大きな障害となっている。がん細胞が多耐性を獲得するメカニズムの中で、P-gp や MRP1と呼ばれる薬剤排出膜タンパク質が関わる耐性獲得機構があり、これらの薬剤排出膜タンパク質の機能を阻害できる化合物は、抗がん剤と併用することにより、多耐性がんに対して化学療法の効果を回復できる可能性を秘めている。

著者は、共同研究者により三重県英虞湾で採取した*Spongia*属海綿から見いだされた新規スチロール agosterol A が、P-gp や MRP1の両方の膜蛋白質の機能を低濃度で阻害する非常に有望ながん多剤耐性克服物質であることから、合成化学的な手法を用いて agosterol A の多剤耐性克服作用について詳細に検討した。Agosterol A は海綿からの抽出・精製による供給量が限られていることと、agosterol A の化学変換では合成することが困難な誘導体も含めた詳細な活性発現部位の解析と構造活性相関研究のために、agosterol A の全合成研究に着手した。そして著者は、安価に入手できる ergosterol を出発原料として、高選択的反 Markovnikov 型エポキシ開環反応による11位水酸基の構築と、高選択的3,4位二重結合導入反応につづく  $\beta$  面選択的ジオール化による $4\beta$  水酸基導入法を考案することにより、agosterol A の初めての全合成を達成した。

次に著者は、達成した agosterol A の全合成法は多段階の工程を要することから、化学構造単位が簡略化されたより容易に合成できる活性リード化合物を創製するために、まず、agosterol A からの化学変換では誘導することが困難な各官能基の欠損アナログを種々設計し、全合成中間体から合成し、詳細な構造活性相関の解析を行った。中でも、4-deacetoxyagosterol A は agosterol A とほぼ同程度の活性を有し、かなり短工程で合成できることから、構造単位が簡略化された活性アナログとして優れていることが判明した。

また次に著者は、薬物排出膜タンパク質 MRP1の agosterol A 認識ドメインを明らかにすることを目的に、機能解析研究に着手した。MRP1に結合能を有する天然物由来の低分子プローブとして、agosterol A の各水酸基に親水性スペーサーを介したピオチンと光反応基を結合させたプローブを種々合成し、がん多剤耐性克服活性を解析するとともに、MRP1との結合実験を検討した。

以上の成果は博士（薬学）の学位論文として充分価値あるものと認められる。