The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Cortistatin A由来抗腫瘍リード化合物の改良合成法の開発と標的同定への応用
Author(s)	伊藤, 葵
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61700
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（伊藤　葵）	
論文題名	Cortistatin A由来抗腫瘍リード化合物の改良合成法の開発と標的同定への応用

論文内容の要旨

腫瘍が増殖するには、栄養と酸素を獲得して老廃物・代謝産物を運び出すために血管新生が必要になる。がん血管新生は、虚血に陥った組織においてがん細胞が血管新生因子を放出することで誘導される。腫瘍内に侵入した新生血管は癌細胞の全身血流への入口の役割も果たし、転移の足掛かりとなる。血管新生阻害療法は全ての固形がんに共通する血管新生を標的としているため、 多くの癌腫で抗癌剤との併用で相乗効果が認められている。しかし、血管新生を標的とした治療薬はbevacizumab (Avastin®) に代表されるように正常血管にも必須の血管新生因子であるvascular endothelial growth factor (VEGF) の機能を遮断するため、副作用の問題も明らかになっている。このように、新薬開発が進んでいるものの、依然として新たな作用メカニズムを有するがん血管新生阻害剤の開発が望まれている。

こうした背景のもと、著者らの研究室ではヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) に対する選択的増殖抑制効果を指標とした海洋生物由来の血管新生阻害物質の探索研究を行い、インドネシア産海綿から強力な選択的増殖抑制効果を示すcortistatin 類を見出している。 Cortistatin類はいずれも変異ステロイド骨格を有するアルカロイドであり、そのB環部分に特徴的なoxabicyclo[3.2.1]octene構造を有している。主活性成分であるcortistatin A (**1**) はIC_{50}が1.8 nMというごく低濃度で血管内皮細胞の増殖を抑制し、他のがん細胞や正常細胞と比較して3000倍以上の選択性を示すことを明らかにしている。また、既存の血管新生阻害剤とは異なる経路で作用していることも明らかにしており、新規抗がん剤シーズとして非常に有望な化合物である。しかしながら、海綿から単離された量はごくわずかであり、*in vivo*での活性評価や詳細な作用メカニズムの解析などを行うためには、化学合成による供給が不可欠であった。**1**の特異な化学構造と顕著な生物活性は世界中の有機合成化学者の注目を集め、全合成研究が盛んに行われた結果、すでに数例の不斉全合成が達成されているが、そのいずれにおいても合成には多工程を要しており、天然物そのものの化学合成による大量供給は困難なため、より単純な化学構造を持つ**1**のアナログ化合物による創薬研究が必要不可欠である。

ここ数年、著者らの研究室でもアナログ化合物の合成研究に注力しており、**1**のABC環部分の平面性に着目したanalog O (**2**) の設計・合成に成功している。**2**はHUVECに対するIC_{50}値が0.035 μM、他の細胞との選択性が300倍という良好な増殖阻害活性を有した。また、本化合物は腫瘍移植モデルマウスに対して経口投与で顕著な*in vivo*抗腫瘍活性を示した。

さらに優れた抗がんリード化合物を創出するには、**2**の構造最適化を行う必要がある。しかし、先の合成法には、いくつかの問題点があった。まず、全14工程のうち、C環部分の変換に7工程を必要としており、総収率の低減の原因となっていることである。また、C環部分の変換の前に活性発現に重要なイソキノリン側鎖を導入しているため、様々な側鎖を導入したアナログ化合物の合成が困難になっている。そこで今回、著者は多様な類縁体を効率よく合成するために、**2**をより短工程かつ高収率で合成できる方法論の開発を目指して検討を行った。

その結果、Hajos-Parrish ketoneを出発物質として用い、立体選択的な1,4-還元の後、生じたエノラートを臭素で捕捉して文献既知のα-ブロモケトンを得、その後大平–Bestmann試薬を作用させることにより、二重結合を有するジメチルアセタールを収率よく得ることができた。続いてイソキノリン環の導入、アセタールの加水分解など5工程を経て、**2**を合成することに成功した。この改良合成法では、Hajos-Parrish ketoneから7工程、総収率26%と、短工程かつ高収率で**2**を得ることが可能であり、従来法と比較して工程数を大幅に改善することができた (第一章、第一節)。

次に本法を応用し、新規アナログ化合物の合成を行った。天然のcortistatin類縁体の構造活性相関から、A環部分の極性官能基も活性発現に影響を与えていることが示唆された。また、Coreyらによってイソキノリン環の置換位置の異なるアナログ化合物で良好な活性を持つものが存在することが報告されている。そこで、**2**を基盤として、A環部分に極性官能基としてヒドロキシメチル基、アセトアミド基を導入した化合物、およびイソキノリン側鎖の構造変換を行った化合物の合成を検討し、活性評価を行った。その結果、A環にアセトアミド基を導入したアナログ化合物が、**1**に匹敵するような非常に強力なHUVEC選択的な増殖阻害活性を示すことを見出した (第一章、第二節)。

一方で、**1**を超えるような強力な活性を示す医薬リード化合物の創製に向けた構造最適化を合理的に進めるには、**1**

の標的分子を明らかにし、その構造情報をもとに化合物を設計・合成することが最も効率的な方法である。著者らの研究室ではプローブ分子の合成研究およびその機能評価について研究を行っている。そこで、**2**由来のプローブ分子を合成し、標的分子のプルダウン実験を行うこととした。

著者らの研究室では近年、チオールとマレイミドの官能基選択的な反応を利用したプローブ分子の合成法を確立している。そこで、第一章での新規アナログ化合物の合成研究で得られた構造活性相関の知見をもとに、活性に影響の少ないA環部に側鎖を導入することで、そこを足掛かりとし、プローブ分子に必要なリンカーやビオチンタグを導入できると考え、合成に着手した。出発物質としてBoc-*L*-cystine を用いて、順次リンカーや補足補助基であるフェニルジアジリン、ビオチンタグを導入し、最後にマレイミドを導入したリガンドと反応させることでプローブ分子を合成した。また、活性のないアナログ化合物から同様の方法でプローブ分子を合成し、ネガティブコントロール化合物とした。これらのプローブ分子を用いてHUVECの破砕液からのプルダウン実験を行い、標的分子の同定を検討した。その結果、HUVEC選択的な増殖阻害活性を有するアナログ化合物由来のプローブ分子のみ特異的に結合していると思われるタンパク質を見出した(第二章)。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　伊藤　葵　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	小林資正
	副 査	教授	赤井周司
	副 査	教授	小比賀聡

論文審査の結果の要旨

がん血管新生阻害療法は全ての固形がんに共通する血管新生を標的とし、多くのがん腫で抗癌剤との併用で相乗効果が認められているが、正常血管にも必須の血管新生因子VEGFの機能を阻害するため、副作用の問題も明らかになっており、依然として新たな作用メカニズムを有するがん血管新生阻害剤の開発が望まれている。

共同研究者によりヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）に対する選択的増殖抑制効果を指標とした海洋生物由来の血管新生阻害物質の探索が行われ、インドネシア産海綿から強力な選択的増殖抑制効果を示すcortistatin類が見出されている。Cortistatin類は変異ステロイド骨格を有するアルカロイドであり、そのB環部分に特徴的なoxabicyclo[3.2.1]octene構造を有している。主活性成分であるcortistatin A（1）はごく低濃度で血管内皮細胞の増殖を抑制し、他のがん細胞や正常細胞と比較して3000倍以上の選択性を示すことを明らかにしている。また、既存の血管新生阻害剤とは異なる経路で作用していることも明らかにしており、新規抗がん剤シーズとして非常に有望な化合物である。しかしながら、海綿から単離された量はごくわずかであり、in vivoでの活性評価や詳細な作用メカニズムの解析などを行うためには、化学合成による供給が不可欠であった。共同研究者により、アナログ化合物の合成研究が進められており、1のABC環部分の平面性に着目したanalog 0（2）の設計・合成に成功している。2はHUVECに対する選択性が300倍という良好な増殖阻害活性を有し、腫瘍移植モデルマウスに対して経口投与で顕著なin vivo抗腫瘍活性を示した。

さらに優れた抗がんリード化合物を創出するには、2の構造最適化を行う必要があったが、全14工程を要する先の合成法には、いくつかの問題点があった。伊藤君は、多様な類縁体を効率よく合成するために、2をより短工程かつ高収率で合成できる方法論の開発を目指して検討を行った。その結果、Hajos-Parrish ketoneを出発物質として用い、立体選択的な1,4-還元の後、生じたエノラートを臭素で捕捉してα-ブロモケトンを得、その後大平- Bestmann試薬を作用させることにより、二重結合を有するジメチルアセタールを収率よく得ることができた。続いてイソキノリン環の導入、アセタールの加水分解など5工程を経て、2を合成することに成功した。この改良合成法では、Hajos-Parrish ketoneから7工程、総収率26%と、短工程かつ高収率で2を得ることが可能であり、従来法と比較して工程数を大幅に改善することができた。

次に本法を応用し、新規アナログ化合物の合成を行った。天然のcortistatin類縁体の構造活性相関から、A環部分の極性官能基も活性発現に影響を与えていることが示唆された。そこで、2を基盤として、A環部分に極性官能基としてヒドロキシメチル基、アセトアミド基を導入した化合物、およびイソキノリン側鎖の構造変換を行った化合物の合成を検討し、活性評価を行った。その結果、A環にアセトアミド基を導入したアナログ化合物が、1に匹敵するような非常に強力なHUVEC選択的な増殖阻害活性を示すことを見出した 。

一方で、1を超えるような強力な活性を示す医薬リード化合物の創製に向けた構造最適化を合理的に進めるには、1の標的分子を明らかにし、その構造情報をもとに化合物を設計・合成することが最も効率的な方法である。そこで、2由来のプローブ分子を合成し、標的分子のプルダウン実験を行うこととした。新規アナログ化合物の合成研究で得られた構造活性相関の知見をもとに、活性に影響の少ないA環部に側鎖を導入することで、そこを足掛かりとし、プローブ分子に必要なリンカーやビオチンタグを導入できると考え、合成に着手した。出発物質としてBoc-L-cystine を用いて、順次リンカーや補足補助基であるフェニルジアジリン、ビオチンタグを導入し、最後にマレイミドを導入したリガンドと反応させることでプローブ分子を合成した。プローブ分子を用いてHUVECの破砕液からのプルダウン実験を行い、標的分子の同定を検討した。

以上の成果は、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。