



Title	去勢抵抗性前立腺癌治療を志向したSpliceostatin A誘導体の設計と合成
Author(s)	吉川, 祐介
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76492
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (吉川祐介)	
論文題名	去勢抵抗性前立腺癌治療を志向したSpliceostatin A 誘導体の設計と合成
論文内容の要旨	
<p>[背景と目的]</p> <p>去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) の治療では、エンザルタミドやアピラテロンなどのアンドロゲンのシグナル経路を標的とした薬剤が主に用いられている。しかし、CRPCはほぼすべての症例で既存の薬剤に対して抵抗性を獲得することが知られている。その抵抗性の原因の1つとしては、アンドロゲン受容体スプライシングバリアント7 (AR-V7) の発現を挙げることができる。即ち、アンドロゲン受容体のリガンド結合領域が欠損したAR-V7は、リガンド非依存的に転写因子として恒常に活性化し癌増殖を促進する。近年、共同研究者の金田らはスプライシング機能制御タンパク複合体SF3bの構成因子の1つSF3B2がAR-V7の発現に関与すること、SF3b複合体機能制御天然有機化合物Pladienolide BがAR-V7の発現を濃度依存的に抑制すること ($IC_{50} = 12.7 \text{ nM}$) を見出した。しかしPladienolide Bは臨床研究でヒトに視神經炎などの毒性を示すことが知られていたことから、Pladienolide Bとは異なる母骨格を有するSF3b複合体機能制御天然有機化合物Spliceostatin A (1) に着目した。1を既知法に倣い合成し、活性を評価した結果 $IC_{50} = 0.5 \text{ nM}$ でAR-V7の発現を抑制した。しかし、1のwild typeのマウスを使用した <i>in vivo</i> 毒性試験では重篤な毒性発現 (マウスが24時間以内に死亡) が観測された。そこで簡便に合成可能で、活性を維持し、且つ <i>in vivo</i> 毒性を低下可能な誘導体 (2-6) の設計、合成、活性評価に取り組んだ (活性評価は大阪大学医学部が実施した) (Figure 1)。</p>	

Spliceostatin A (1) :
 $R^1 = OMe, R^2 = Me, R^3 = H, R^4 = H, R^5 = OAc$
2 : $R^1 = Ph, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H, R^5 = OAc$
3 : $R^1 = H, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H, R^5 = OAc$
4 : $R^1 = H, R^2 = H, R^3 = Me, R^4 = H, R^5 = OAc (3'R)$
5 : $R^1 = H, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = Me, R^5 = OAc (3'S)$
6 : $R^1 = H, R^2 = H, R^3 = H, R^4 = H, R^5 = OPIV$

Figure 1. Structure of spliceostatin A and its derivatives

[結果]

3つの戦略に基づき1の誘導体を設計・合成・活性評価・*in vivo* 毒性試験を行った (I-III)。

I. 生体内での安定向上を期待したC1位の置換-1 : フェニル-C-グリコシド誘導体 (2)

設計 : 1の毒性発現の原因は、酸性条件下不安定なC1位メチレンケタール構造が生体内の酸性条件下開裂した化合物が原因がはないかと仮説を立てた。そこで、1のO-グリコシド構造を酸性条件下に安定なC-グリコシド構造に変換したフェニル-C-グリコシド誘導体 (テトラヒドロピランの2-フェニル置換体) 2を設計した。また、数あるC-グリコシド構造の中でもフェニル-C-グリコシド構造への変換の利点は2点挙げられる。すなわち、(1) O-グリコシド構造と比較して合成が簡便である点、(2) 様々な置換基を導入可能であることから構造活性相関研究の足掛かりにできる点、(3) その嵩高さからC1位周辺とSF3b複合体間の空間の有無を検証できる点である。

合成、活性評価 : D-グルカールを原料に酸化的ヘック反応でフェニル-C-グリコシド構造を構築し、Juliaカップリング反応を鍵にジエン部位を構築することで2の合成を達成した。2の活性評価の結果、2のAR-V7発現抑制活性は $IC_{50} = 132 \text{ nM}$ であり4より200倍程度低下した。本結果より、グリコシド部位へのフェニル基の導入は活性発現に不利に働くことが示唆されたが、2はナノオーダーレベルでの活性は保持していることが分かった。

II. 生体内での安定向上を期待したC1位の置換-2 : 1, 2-デオキシピラノース誘導体 (3)

設計 : Iで設計・合成した2が1よりも約200倍下がった理由は、O-グリコシド部位周辺は官能基許容スペースが小さいため、嵩高いフェニル基はそのスペースに適切に入り込めない為であると考えた。そこでSF3b複合体との不利な反発

を抑制するために、**1**のO-グリコシド部位を除去した1, 2-デオキシピラノース誘導体**3**を設計した。

合成、活性評価、in vivo毒性試験：D-グルカールを原料にオレフィンの還元反応で1, 2-デオキシピラノース構造を構築し、**I**と同様にJuliaカップリング反応を鍵にジエン部位を構築することで**3**の合成を達成した。**3**の活性評価の結果、**3**はAR-V7の発現をIC₅₀ = 20 nMと強力に抑制することができた。またin vivo毒性試験では**3**を投与したマウスは3匹とも死亡には至らず、DMSOのみを投与したマウスと比較して優位な体重減少は示さなかった。即ち、高AR-V7発現抑制活性を有しin vivo毒性の低い誘導体**3**の創製に成功した。

III. Off-target効果の解消を期待した末端エポキシドの置換：エポキシドメチル基置換誘導体（**4, 5**）

設計：**3**の更なるAR-V7発現抑制活性の向上には、**3**の末端エポキシドの安定性を高めることが必要ではないかと仮説を立てた。即ち、反応性の高い**3**の末端エポキシドがoff-target効果によりSF3b複合体以外の様々なタンパクのアミノ酸残基から求核攻撃を受けるため、SF3b複合体と相互作用可能な**3**の物質量が低下している可能性があると考えた。そこで**3**の末端エポキシドへメチル基の導入することでエポキシドの生体内での安定性を向上させることでAR-V7発現抑制活性を更に向上できると考え、誘導体**4**（3'R）と**5**（3'S）を設計した。

合成、活性評価：D-グルカールを原料に、メチルエポキシドの不斉炭素中心構築に必要なE体とZ体のオレフィンをWittig反応によって構築し、**I, II**と同様にJuliaカップリング反応を鍵に**4**と**5**の合成を達成した。**4**と**5**のAR-V7発現抑制活性評価の結果、**22**と比較してIC₅₀ = 150, 160 nMとそれぞれ10倍程度減弱した。また、メチルエポキシドの立体（R, S）の違いによる活性の差は見られなかった。本結果より、導入したメチル基がエポキシド周辺の水素結合ネットワークを遮蔽しSF3b複合体との相互作用を減弱したと考えられる。また、エポキシド周辺には相互作用可能な様々なアミノ酸残基があるため、エポキシメチルの立体（RとS）の違いは活性に影響がなかったと推測できる。

IV. エステラーゼ耐性の向上を期待したアセチル基の置換：ピバロイル誘導体（**6**）

設計：エステル基は一般的に生体内でエステラーゼなどの様々な酵素から加水分解を受ける。そこで、**II**で合成した**3**のアセチル基はエステラーゼにより加水分解を受けたために、AR-V7発現抑制活性が低下したではないかと仮説を立てた。そこでアセチル基を嵩高いピバロイル基に変換することで加水分解耐性を向上することができるのではないかと考え、**3**のアセチル基をピバロイル基に変換したピバロイル体**6**を設計した。

合成、活性評価、in vivo毒性試験：**3**の合成中間体より誘導することでピバロイル体を合成した。**6**の活性評価の結果、AR-V7発現抑制活性はIC₅₀ = 30 nMと**3**と同等の活性がみられ、in vivo毒性試験では**6**を投与したマウスは3匹とも死亡には至らないことが示された。即ち、**3**のアセチル基をピバロイル基に変換することで活性向上は見られなかったが、エステル部位を嵩高くしてもAR-V7発現抑制活性やin vivo毒性に影響がないことが示された。

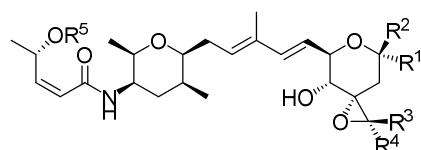
以上著者は、本研究において**1**の骨格を基盤に、in vivoで低毒性且つAR-V7発現抑制活性の高い誘導体**3**を創製することに成功した。また更なる誘導化によって、**3**のエポキシドとエステル基部位に関する今後の構造展開研究の重要な情報を得ることができた。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名 (吉川祐介)	
	(職) 氏名
論文審査担当者	主査 教授 有澤光弘 副査 教授 赤井周司 副査 教授 荒井雅吉

論文審査の結果の要旨

去勢抵抗性前立腺癌の治療では、エンザルタミドやアビラテロンなどのアンドロゲンのシグナル経路を標的とした薬剤が主に用いられている。しかし、去勢抵抗性前立腺癌はほぼすべての症例で既存の薬剤に対して抵抗性を獲得することが知られている。その抵抗性の原因の1つとしては、アンドロゲン受容体スプライシングバリエント7 (AR-V7) の発現を挙げることができる。即ち、アンドロゲン受容体のリガンド結合領域が欠損したAR-V7は、リガンド非依存的に転写因子として恒常的に活性化し癌増殖を促進する。近年、阪大院医・金田らはスプライシング機能制御タンパク複合体SF3bの構成因子の1つSF3B2がAR-V7の発現に関与すること、SF3b複合体機能制御天然有機化合物Pladienolide BがAR-V7の発現を濃度依存的に抑制すること ($IC_{50} = 12.7 \text{ nM}$) を見出した。しかしPladienolide Bは臨床研究でヒトに視神経炎などの毒性を示すことが知られていたことから、申請者はPladienolide Bとは異なる母骨格を有するSF3b複合体機能制御天然有機化合物Spliceostatin A (1) に着目し、1を既知法に倣い合成した結果、1がAR-V7の発現を抑制することがわかった ($IC_{50} = 0.6 \text{ nM}$)。しかし、1のwild typeのマウスを使用した *in vivo* 毒性試験では重篤な毒性発現 (マウスが24時間以内に死亡) が観測された。そこで、申請者は簡便に合成可能で、AR-V7発現抑制活性を維持し、且つ *in vivo* 毒性を有さない1の誘導体を創製したいと考え、誘導体 (2-6) の設計、合成に取り組んだ (活性評価は阪大院医・金田らに依頼)。



Spliceostatin A (1) :
 R¹ = OMe, R² = Me, R³ = H, R⁴ = H, R⁵ = OAc
 2 : R¹ = Ph, R² = H, R³ = H, R⁴ = H, R⁵ = OAc
 3 : R¹ = H, R² = H, R³ = H, R⁴ = H, R⁵ = OAc
 4 : R¹ = H, R² = H, R³ = Me, R⁴ = H, R⁵ = OAc
 5 : R¹ = H, R² = H, R³ = H, R⁴ = Me, R⁵ = OAc
 6 : R¹ = H, R² = H, R³ = H, R⁴ = H, R⁵ = OPiv

具体的には、下に示す4つの戦略 (I~IV) に基づき、1の誘導体 (2-6) を設計・合成した。

I. 生体内での安定向上を期待したC1位の置換-1 : フェニル-C-グリコシド誘導体 (2)

「1の毒性発現の原因は、酸性条件に不安定なC1位メチレンケタール構造が生体内の酸性条件で開裂した化合物が原因ではないか」との仮説を基に、1のO-グリコシド構造を酸性条件に安定なC-グリコシド構造に変換したフェニル-C-グリコシド誘導体 (テトラヒドロピランの2-フェニル置換体) 2を設計・合成した。即ち、D-グルカールを原料に酸化的溝呂木-Heck反応でフェニル-C-グリコシド構造を構築し、Juliaカップリング反応を鍵にジエン部位を構築することで2の合成を達成した。2の活性評価の結果、2のAR-V7発現抑制活性は $IC_{50} = 132 \text{ nM}$ であり4より200倍程度低下した。本結果より、グリコシド部位へのフェニル基の導入は活性発現に不利に働くことが示唆されたが、2はナノオーダーレベルでの活性は保持していることが分かった。

II. 生体内での安定向上を期待したC1位の置換-2 : 1, 2-デオキシピラノース誘導体 (3)

「Iで設計・合成した2の活性が1よりも約200倍程度減弱した理由は、O-グリコシド部位周辺は官能基許容スペースが小さいため、嵩高いフェニル基はそのスペースに適切に入り込めない為である」との仮説を基に、SF3b複合体

との不利な反発を抑制するために、**1**のO-グリコシド部位を除去した1, 2-デオキシピラノース誘導体**3**を設計・合成した。即ち、D-グルカールを原料にオレフィンの還元反応で1, 2-デオキシピラノース構造を構築し、Iと同様にJuliaカップリング反応を鍵にジエン部位を構築することで**3**の合成を達成した。**3**の活性評価の結果、**3**はAR-V7の発現をIC₅₀=3.3 nMと強力に抑制することができた。またin vivo毒性試験では**3**を投与したマウスは3匹とも死亡には至らず、DMSOのみを投与したマウスと比較して優位な体重減少は示さなかった。即ち、高AR-V7発現抑制活性を有しin vivo毒性の低い誘導体**3**の創製に成功した。

III. Off-target効果の解消を期待した末端エポキシドの置換：エポキシドメチル基置換誘導体（**4**, **5**）

「**3**の更なるAR-V7発現抑制活性の向上には、**3**の末端エポキシドの安定性を高めることが必要ではないか」との考察から、「反応性の高い**3**の末端エポキシドがoff-target効果によりSF3b複合体以外の様々なタンパクのアミノ酸残基から求核攻撃を受けるため、SF3b複合体と相互作用可能な**3**の物質量が低下している可能性がある」との仮説を基に、**3**の末端エポキシドヘメチル基の導入することでエポキシドの生体内での安定性を向上させることでAR-V7発現抑制活性を更に向上できると考え、誘導体**4** (3'R) と**5** (3'S) を設計・合成した。即ち、D-グルカールを原料に、メチルエポキシドの不斉炭素中心構築に必要なE体とZ体のオレフィンをWittig反応によって構築し、I, IIと同様にJuliaカップリング反応を鍵に**4**と**5**の合成を達成した。**4**と**5**のAR-V7発現抑制活性評価の結果、**3**と比較してIC₅₀=202, 187 nMとそれぞれ60倍程度減弱した。また、メチルエポキシドの立体 (R, S) の違いによる活性の差は見られなかった。これらの結果より、導入したメチル基がエポキシド周辺の水素結合ネットワークを遮蔽し、SF3b複合体との相互作用を減弱したと考えられ、またエポキシド周辺には相互作用可能な様々なアミノ酸残基があるため、エポキシメチルの立体 (RとS) の違いは活性に影響がなかったと推測できる。

IV. エステラーゼ耐性の向上を期待したアセチル基の置換：ピバロイル誘導体（**6**）

エステル基は一般的に生体内でエステラーゼなどの様々な酵素から加水分解を受ける。そこで、IIで合成した**3**のアセチル基はエステラーゼにより加水分解を受けたために、AR-V7発現抑制活性が低下したではないかと仮説を立てた。そこでアセチル基を嵩高いピバロイル基に変換することで加水分解耐性を向上することができるのではないかと考え、**3**のアセチル基をピバロイル基に変換したピバロイル体**6**を設計・合成した。即ち、**3**の合成中間体からピバロイル体（**6**）を合成した。**6**の活性評価の結果、AR-V7発現抑制活性はIC₅₀=20 nMと**3**と同等の活性（10倍以内の減弱）がみられ、in vivo毒性試験では**6**を投与したマウスは3匹とも死亡には至らないことが示された。即ち、**3**のアセチル基をピバロイル基に変換することで活性向上は見られなかったが、エステル部位を嵩高くしてもAR-V7発現抑制活性やin vivo毒性に影響がないことが示された。

以上の研究は、申請者独自の分子設計論に基づき、簡便に合成可能で、AR-V7発現抑制活性を維持し、且つin vivo毒性を有さない天然有機化合物Spliceostatin A（**1**）の誘導体創製を達成するものであり、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。