

氏 名 まつ もと ひろ のぶ  
 松 本 洋 亘  
 学位(専攻分野) 博 士 (薬 学)  
 学位記番号 薬 博 第 587 号  
 学位授与の日付 平成 18 年 3 月 23 日  
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当  
 研究科・専攻 薬学 研究科創薬科学専攻  
 学位論文題目 新規抗腫瘍活性分子の設計と合成

論文調査委員 (主査) 教授 富岡 清 教授 竹本佳司 教授 藤井信孝

論 文 内 容 の 要 旨

ヌクレオシドは生命を維持するプロセスにおける基本単位であり、その誘導体には抗腫瘍活性や抗ウイルス活性など広範な生物活性が期待できる。当研究室では、抗腫瘍活性化合物に関する研究の一環として、DNA トポイソメラーゼ阻害剤の探索ならびに設計・合成を行っている。DNA トポイソメラーゼは DNA のトポロジーを変換する酵素であり、複製・転写・組み換えといった DNA の代謝に不可欠な酵素である。したがって、DNA トポイソメラーゼを標的とする化合物は潜在的な抗がん剤と見なすことができる。

リグナン系化合物であるエトポシド 1 は、メギ科ポドフィラム属植物の抗腫瘍活性成分ポドフィロトキシン 2 から半合成により誘導された臨床医薬品として有効な抗がん剤である (Fig. 1)。1 の母骨ともなった 2 は共通の基本骨格をもつ抗腫瘍活性化合物であるが、その作用の様式は異なり、親化合物である 2 は細胞内標的としてチューブリン重合を阻害するのに対し、1 のチューブリン重合阻害活性は非常に弱く、II 型に属する DNA トポイソメラーゼ II の阻害が抗腫瘍活性の本体である。しかし、その作用機作の劇的な変化にもかかわらず、DNA トポイソメラーゼ阻害発現の必須部分構造を含め、確たる構造要因は未だ明らかにされていない。一方、当研究室において、2 の窒素置換体であるデオキシアザポドフィロトキシン

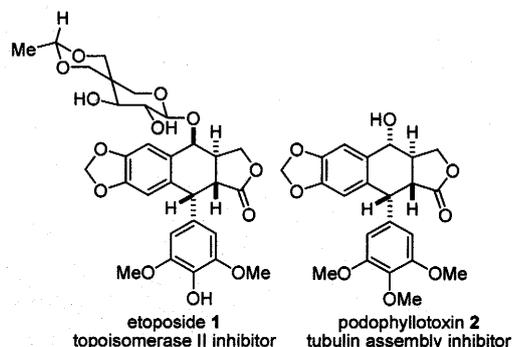


Figure 1. Etoposide 1 and podophyllotoxin 2.

3 を設計・合成し、DNA トポイソメラーゼ II 阻害活性を測定したところ、興味深い知見が得られた (Fig. 2)<sup>2</sup>。すなわち、E 環がトリメトキシフェニルやモノヒドロキシフェニルではチューブリン重合を阻害するのに対し、カテコールになるとはじめて DNA トポイソメラーゼ II 阻害活性が発現し、さらにオルトキノンへと酸化するとより強い活性を示した。この結果は、C 環 4 位の置換基の種類やその立体化学あるいは C 環と D 環の連結部の立体化学の重要性といったこれまでの常識を

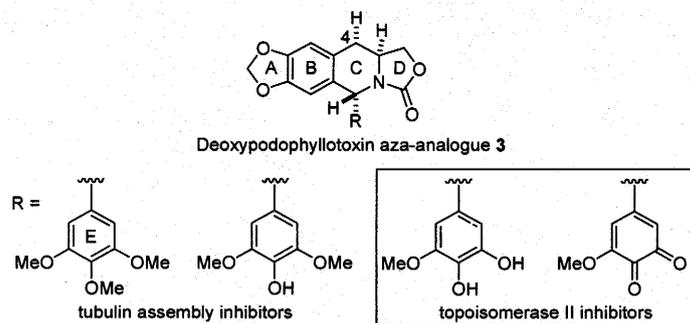


Figure 2. Structure-activity relationships of Deoxy-podophyllotoxin aza-analogues.

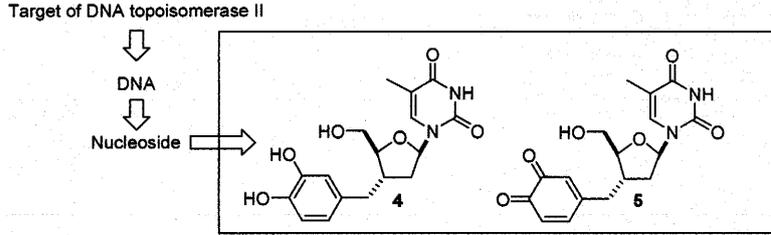
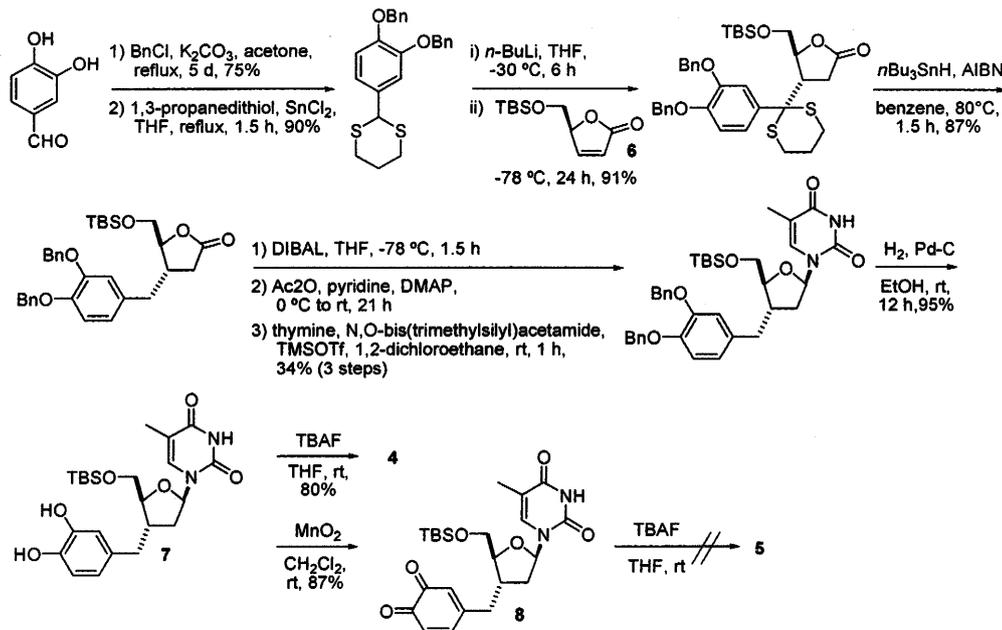


Figure 3. Design of nucleoside-based inhibitors targeting DNA topoisomerase II.

覆すとともに、カテコールやオルトキノンのような小構造単位こそが活性発現に必須の部分構造のひとつであることを強く示唆している。したがって、DNA トポイソメラーゼ II が DNA を基質とすることを考慮すると、DNA の基本単位であるヌクレオシドにオルトキノンあるいはカテコールを、たとえばデオキシリボースの3' 位に組み込んだ分子は有用な DNA トポイソメラーゼ II 阻害剤として作用すると期待した (Fig. 3)。

Schemel に鍵化合物となるキラルビルディングブロック 6 を利用したヌクレオシド 4 と 5 の合成ルートを示す<sup>2</sup>。



Scheme 1. Synthetic route to nucleoside 4 and 5.

今までにもヌクレオシドを基本骨格とする抗腫瘍活性化合物は数多く知られていたが、DNA トポイソメラーゼ II を標的とするものは皆無であった。幸運なことに、4 は弱いながらも DNA トポイソメラーゼ II を阻害し、ヌクレオシド骨格に基づく DNA トポイソメラーゼ II 阻害剤の最初の例となった (Fig. 4)。

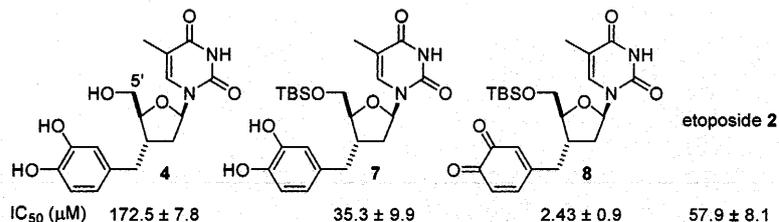


Figure 4. DNA topoisomerase II inhibitory activity.

また、4 の前駆体である 7 はより強力な阻害活性を示し、5' 位ヒドロキシメチル基の TBS 基が活性の強さを支配する役割を果たすことがわかった。この効果は、9 と 11 との比較からも明らかである (Fig. 5)。一方、オルトキノン誘導体については、5 が不安定であったため同様の効果を確認することはできなかったが、TBS 基をもった 8 は非常に強い阻害活性を示した。さらに、これらヌクレオシドは DNA トポイソメラーゼ I を全く阻害せず DNA トポイソメラーゼ II を選択的に

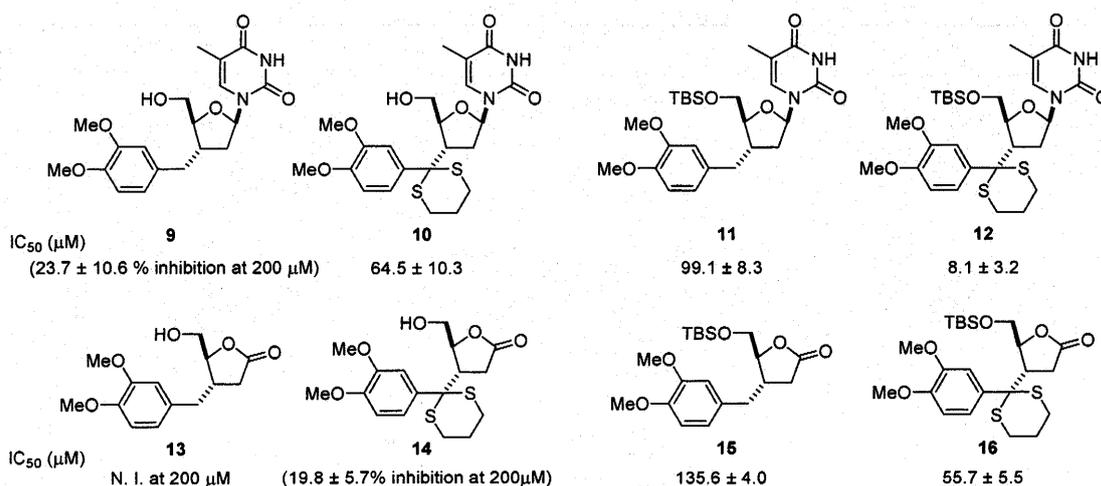


Figure 5. Structure-activity relationships.

阻害した。興味深いことに、11の合成中間体15は核酸塩基を持たなくても阻害活性を示した。さらに、15の前駆体である16はさらに強力な阻害活性を示した。この結果は、核酸塩基は活性発現に必須ではなく TBS 基あるいは1,3-ジチアンのいずれかが活性発現に重要な役割を果たしていることを示唆した (Fig. 5)。

この点を明確にするためにラクトン誘導体13, 14を、また核酸塩基の効果を調べるためヌクレオシド誘導体10, 12を合成した。その結果、阻害活性発現には TBS 基あるいは1,3-ジチアンのいずれかが必須であり、その寄与は TBS 基の方が大きいことが分かった。同時に、核酸塩基の役割として阻害活性の増強に大きく寄与していることが示された。これはヌクレオシド骨格を形成することで酵素に対する親和性が向上した結果を反映しているものと推定される。なお、16のベンゼン環上の置換基を除いた17は1と変わらない阻害活性を示すとともに、本研究で得られた最小の活性発現構造である。

次に、このラクトン誘導体17の構造と活性を最大限に利用した新規な機能性分子の創製を目指し、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤とのハイブリッド化を計画した。DNA トポイソメラーゼ II は、核のスcaffold領域に存在している。この領域には HDAC も多く存在することが知られている。HDAC はヒストンのアセチル化レベルの調節をしている酵素であり、抗がん剤の新たな標的として着目されている。また、最近、HDAC 阻害剤と DNA トポイソメラーゼ II 阻害剤の併用により、相乗的な抗腫瘍効果を示すことが報告された。この結果は、両阻害剤のハイブリッド化が多機能分子開発への有用な手段であることを期待させた。そこで、強力な HDAC 阻害活性を持つと同時にラクトン17と共通部分構造を持つ最適化合物として、トリコスタチン A を選んだ (Fig. 6)。ハイブリッド18の合成ルートを scheme2 に示す。

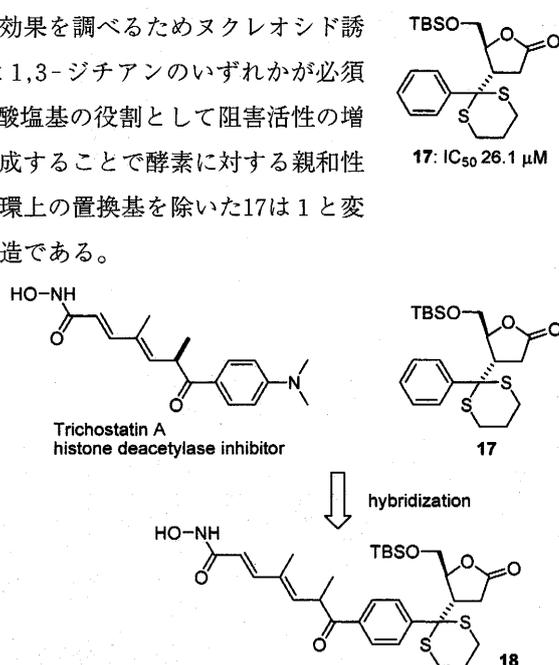
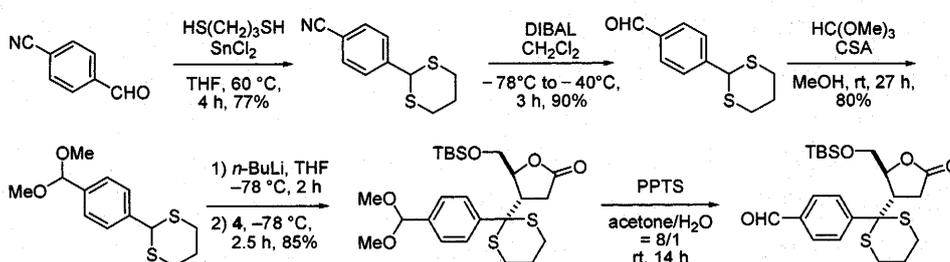
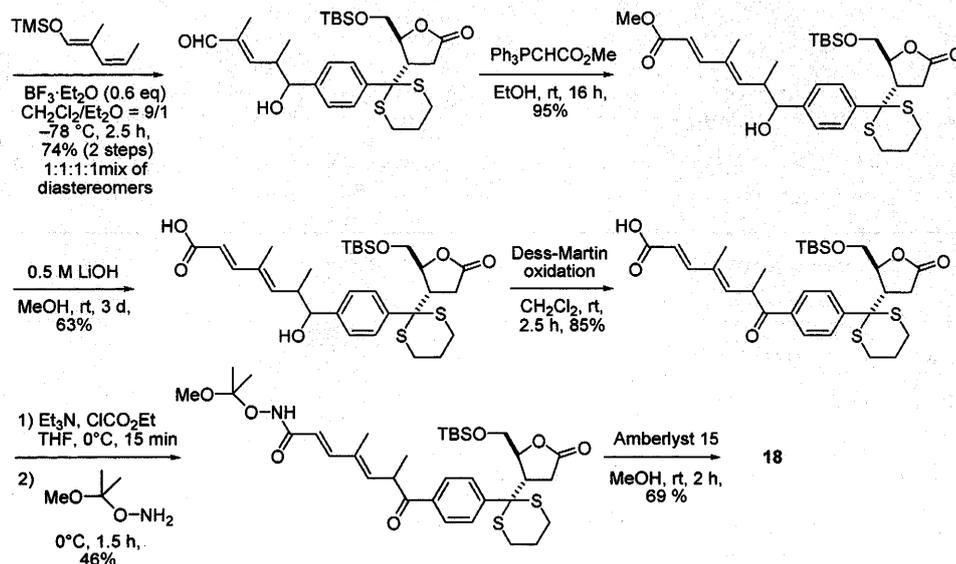


Figure 6. Hybrid of DNA topoisomerase II inhibitor 17 with histone deacetylase inhibitor trichostatin A.





Scheme 2. Synthetic scheme to the target hybrid 18.

ハイブリッド18は、DNA トポイソメラーゼⅡと HDAC のそれぞれに対して阻害活性を示すことがわかった (Table 1)。また、18は Raji 細胞、NCI-H552、DMS114 に対して細胞毒性を示した。

Table 1. Cytotoxic activity and enzyme inhibitory activity of hybrid 18.

cell lines	LD <sub>50</sub>		IC <sub>50</sub>
Raji cell	2.7 μM	DNA topoisomerase II	3.0 μM
NCI-H552	8.6 μM	hyistone deacetylase	1.2 μM
DMS114	7.7 μM		

以上、申請者は抗腫瘍活性分子の創製を目指し、ヌクレオシド構造を持つ新規 DNA トポイソメラーゼⅡ阻害分子の設計と合成を完了させた。また、構造活性相関より見いだした DNA トポイソメラーゼⅡ阻害活性ラ外ンと HDAC 阻害剤トリコスタチン A とのハイブリッド化を計画し、両親化合物の機能を併せ持った機能性分子の獲得に成功した。

#### 参考文献

- Iida, A.; Kano, M.; Kubota, Y.; Koga, K.; Tomioka, K. *Chem. Pharm. Bull.* 2000, **48**, 486-489.
- Tomioka, K.; Ishiguro, H.; Iitaka, Y.; Koga, K. *Tetrahedron* 1984, **40**, 1303-1312.

#### 論文審査の結果の要旨

本論文は、DNA トポイソメラーゼⅡを分子標的としたヌクレオシド構造を有する新規阻害剤の開発、さらに見出した DNA トポイソメラーゼⅡ阻害構造へ新たな機能を組み込むためにヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A とのハイブリッド分子の設計・合成を行い、ハイブリッド化による機能性分子を開発した経緯をまとめたものである。

##### 1. ヌクレオシド構造を基本骨格とする DNA トポイソメラーゼⅡ阻害剤の設計と合成

DNA トポイソメラーゼⅡの阻害剤には多種多様な化合物が報告されているが、ヌクレオシド構造を有する阻害剤はなかった。DNA トポイソメラーゼⅡの基質は DNA であり、その構成単位はヌクレオシドである。したがって、ヌクレオシドを基本構造とする阻害剤開発に成功すれば、既存の阻害剤以上に DNA トポイソメラーゼⅡを特異的かつ強力に阻害する分子の創製が期待できる。本研究では、デオキシポドフィロトキシニアザアナログの構造活性相関研究から見いだした阻害発現構造であるカテコール構造やオルトキノン構造をヌクレオシドに組み込んだ分子を設計・合成し、種々の酵素あるいは細胞に対するスクリーニングを行った。その結果、ヌクレオシドとして初めて DNA トポイソメラーゼⅡを選択的に阻害する分子の創出に成功した。さらに、阻害メカニズムはエトポシドとは異なり、DNA 鎖の切断を誘導しないキャタリティックな阻害剤として機能することを明らかにした。

## 2. DNA トポイソメラーゼ II 阻害活性ヌクレオシドの構造活性相関

DNA トポイソメラーゼ II に対して阻害活性を示さなかったヌクレオシドの合成中間体の阻害活性を評価したところ、上記1で合成したヌクレオシドよりも DNA トポイソメラーゼ II を強く阻害する誘導体を見いだした。そこで、種々の合成中間体や誘導体を合成し構造活性相関研究に発展させた。その結果、*t*-butyldimethylsilyl (TBS) 基あるいは 1,3-ジチアン基が活性発現に重要な役割を担っていることを示すことができた。また、核酸塩基は酵素との親和性の向上に寄与することを明らかにした。

## 3. 抗腫瘍活性ハイブリッド分子の設計と合成

これらの結果を基に合成した TBS 基および 1,3-ジチアン基を組み込んだ単純な構造を持つラクトン誘導体がエトポシドよりも強く DNA トポイソメラーゼ II を阻害したことから、これら二つの基がファーマコフォアとして機能していると仮定し、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A とのハイブリッド分子を設計した。合成したハイブリッド分子の生物活性を評価したところ、期待通りヒストン脱アセチル化酵素阻害活性の組み込みに成功し、新規機能性分子の開発の手法としてハイブリッド化が有効な方法論であることを実証した。

以上本研究では、DNA トポイソメラーゼ II を阻害するヌクレオシド分子の創製に初めて成功し、活性発現構造を明らかにした。また、機能性分子創製のためにハイブリッド化の手法が有効であることを示した。本研究の成果は、既存の抗がん剤とは異なる作用機作を持つ新規抗がん剤の開発上、有効な基礎的知見である。

よって、本研究は、医薬品化学、創薬科学に重要で新規な知見と方法論を提供するものであり、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

さらに、平成18年2月22日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。