

N-5

トリテルペノイド-レナリドミド結合分子の合成および細胞傷害活性評価

Synthesis of triterpenoids-lenalidomide conjugates and evaluation of their cytotoxicity

○小林優太¹, 大矢知明², 赤澤寛行³, 浮谷基彦⁴

Yuta Kobayashi, Tomoaki Oya, Hiroyuki Akazawa, Motohiko Ukiya

Abstract Lenalidomide-triterpenoids (oleanolic acid and betulinic acid) conjugates were synthesized based on the proteolysis-targeting chimera (PROTAC) strategy. The synthesized compounds were further evaluated for their cytotoxicity against human cancer cell lines (A549, MKN45, and SK-BR-3).

1. 緒言

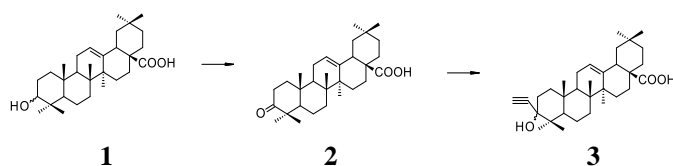
がん (悪性新生物) は, 日本人の主な死因の1つであり, 新規抗がん薬の開発が求められている. その開発において, 構造の多様性が高く, 豊富な生理活性を示す天然化合物は有用だとされている. 近年, 特定のタンパク質のみを分解するユビキチン-プロテアソーム系による生体内タンパク質除去機構を利用した手法 (タンパク質分解誘導キメラ, Proteolysis targeting chimeric molecule; PROTAC) が注目されている.¹⁾ これは, 標的タンパク質とユビキチンリガーゼに親和性を持つと期待される分子同士を結合することで, 標的タンパク質をユビキチン化しプロテアソームによる分解を誘導する方法である. 我々の研究グループでは, 令和3年度に, 抗アポトーシスタンパク質 Bcl-2 を分解誘導する分子を合成することを計画し, Bcl-2 に親和性がある可能性が報告²⁾されている天然物の Urusolic acid と, ユビキチンリガーゼ高親和性分子としてサリドマイド誘導体の1種である Lenalidomide (4) を用いて, PROTAC の合成および, 細胞傷害活性評価を行ったが, 期待される効果が見られなかった.³⁾ 原因として, ①2分子を結合する構造が適切でない可能性, ②ウルソール酸と標的タンパク質との結合性が期待されるほどではないことを考えた. そのため, 本研究では, 天然有機化合物を変更して新たな分子を合成し, がん細胞に対する傷害活性を評価する計画を立てた.

2. 方法

2.1. 3-Ethynyleoleanolic acid-C₆-Lenalidomide 結合体 (7) の合成 (Scheme 1-3)

2.1.1 3-Ethynyleoleanolic acid (3) の合成

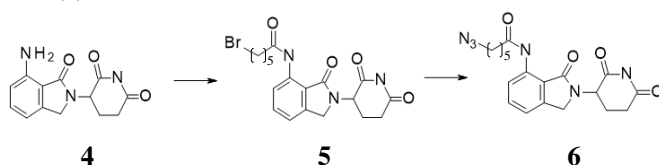
Oleanolic acid (1) をジョーンズ試薬で酸化し Oleanonic acid (2) とした. 化合物 (2) は, Tetrahydrofuran (THF) 中 Ethynylmagnesium bromide を加え, 3-Ethynyleoleanolic Acid (3) を得た.



Scheme 1

2.1.2 Lenalidomide のアジド (6) 合成

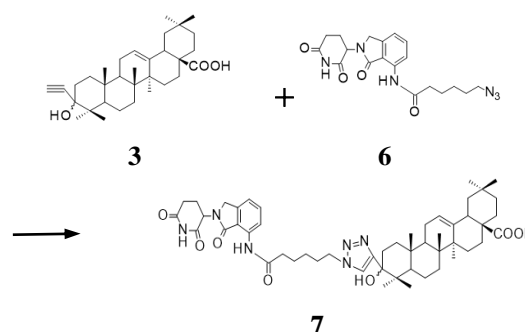
Lenalidomide (4) を 6-Bromohexanoyl chloride と反応し, 化合物 (5) を得た. 化合物 (5) は, NaN₃ と反応させ化合物 (6) を得た.



Scheme 2

2.1.3 3-Ethynyleoleanolic acid (3) と Lenalidomide アジド化合物 (6) の Huisgen 環化反応

3-Ethynyleoleanolic acid (3) と Lenalidomide アジド化合物 (6) を CHCl₃, CH₃OH 中, Sodium ascorbate および CuSO₄ · 5H₂O を加え, 化合物 (7) を合成した.



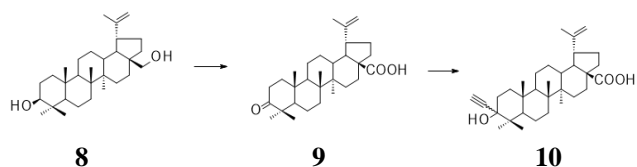
Scheme 3

2.2 3-Ethynylbetulinic acid-C₆-Lenalidomide 結合体 (11) の合成 (Scheme 4-5)

2.2.1 3-Ethynylbetulinic acid (10) の合成

Betulin (8) をジョーンズ試薬で酸化し Betulonic acid (9) とした. 化合物 (9) は, THF 中, Ethynylmagnesium bromide を加え, 3-Ethynylbetulinic acid (10) を得た.

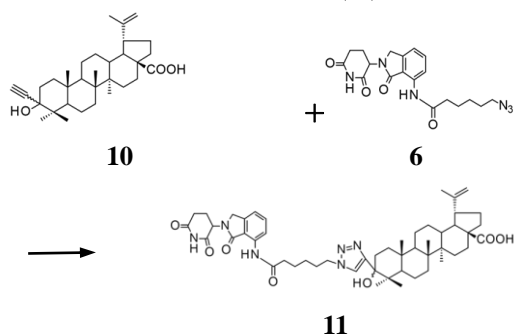
1: 日大理工・院 (前)・応化 2: 日大理工・学部・応化 3: 日大短大・教員 4: 日大理工・教員・応化



Scheme 4

2.2.2 3-Ethynylbetulinic acid (10) と Lenalidomide アジド化合物 (6) の Huisgen 環化反応

3-Ethynylbetulinic acid (10) と Lenalidomide アジド化合物 (6) を CHCl_3 , CH_3OH 中, Sodium ascorbate および $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を加え, 化合物 (11) を合成した.

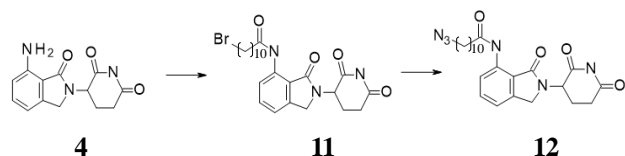


Scheme 5

2.3 3-Ethynylbetulinic acid-C₁₁-Lenalidomide 結合体 (13) の合成 (Scheme 6-7)

2.3.1 Lenalidomide のアジド (12) 合成

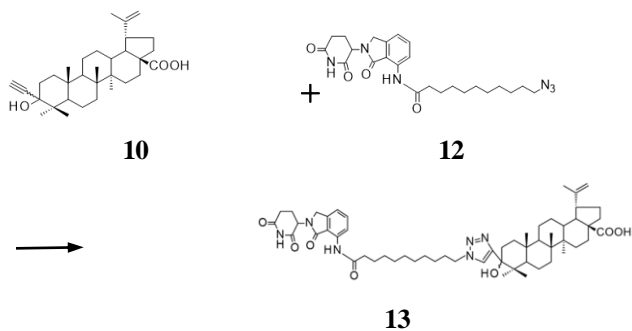
Lenalidomide (4) を 11-Bromoundecanoyl chloride と反応し, 化合物 (11) を得た. 化合物 (11) は, NaN_3 と反応させ化合物 (12) を得た.



Scheme 6

2.3.2 3-Ethynylbetulinic acid (10) と Lenalidomide アジド化合物 (12) の Huisgen 環化反応

3-Ethynylbetulinic acid (10) と Lenalidomide アジド化合物 (12) を CHCl_3 , CH_3OH 中, Sodium ascorbate および $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を加え, 化合物 (13) を合成した.



Scheme 7

2.4 細胞傷害活性試験

96 well plate に3種のヒト由来腫瘍細胞株 SK-BR-3 細胞 (乳がん細胞), A549 細胞 (肺がん細胞), MKN45 細胞 (胃がん細胞) をそれぞれ 3×10^3 cell/well で播種し, 24 時間培養した. 被験物質を添加し 48 時間作用させた後, 0.5 % MTT 溶液を加え, 3 時間インキュベート後に 570 nm 及び 630 nm における吸光度を測定し, 50% 生存阻害濃度 ($\text{IC}_{50}; \mu\text{M}$) を算出した.

3. 結果

Oleanolic acid (1), Betulin (8) を用い, 3 位に Lenalidomide (4) を炭素数 6 または 11 のリンカーを介して結合した分子を合成した (7, 11, 13). Fig.1 に示すように, 化合物 (11) の薄層クロマトグラフィー (TLC) の結果では, UV 検出, 硫酸発色どちらも陽性の化合物である. 合成分子 (7, 11, 13) のがん細胞に対する傷害活性試験結果を Table 1 に示した. 今回試験した化合物は, SK-BR-3, A549, MKN45 いずれも活性を示さなかった.



Fig.1 化合物 11 の Si-gel TLC (展開液 CHCl_3 -MeOH 9:1) データ (左:UV254nm 検出, 右:硫酸発色).

Table 1 Cytotoxic activities of compounds 7, 11, and 13 and reference compound ($\text{IC}_{50} \pm \text{SD}^*$ (μM))

Compounds	SKBR-3	MKN45	A549
7	100 <	100 <	100 <
11	100 <	100 <	100 <
13	100 <	100 <	100 <
Cisplatin*	$3.83 \pm (1.92)$	$10.87 \pm (0.65)$	$22.6 \pm (0.29)$

* reference compound

参考文献

- 1) 大岡伸通, 内藤幹彦, *ファルマシア*, **56**, 41, (2020).
- 2) K. E. Adewole, *et al.*, *J. Recept. Signal Transduct*, **39**, 87 (2019).
- 3) 喜佐見智也, 日本大学理工学研究科物質応用化学専攻・修士論文 (2022).