

N-2

がん治療薬開発を目指したタンパク質分解分子の合成

Synthesis of proteolytic molecules as cancer therapeutic agents

○喜佐見智也¹, 仁科淳良², 浮谷基彦²,
*Tomoya Kizami¹, Atsuyoshi Nishina², Motohiko Ukiya²

Abstract: In this study, we synthesized 2-types of triterpeoid derivatives to degrade anti-apoptotic protein, Bcl-2. Thus, phenylquinoline conjugate and lenalidomide (thalidomide analogue) conjugate. These compounds were evaluated for their cytotoxicities against human cancer cell lines.

1. 目的

Bcl-2 ファミリータンパク質は、細胞死制御の中心的役割を担っている。中でもアポトーシスを阻害するタンパク質である Bcl-XL や Bcl-2 は、多くのがんで過剰発現しており、がんの発生や進行に寄与している¹⁾。

このような観点から、アポトーシス抑制タンパク質である Bcl-2 阻害薬(Venetoclax など)を用いた臨床試験は精力的に行われている²⁾。

一方、近年、特定のタンパク質のみを分解する研究が盛んに行われており、我々の研究グループでは、そのうち2つの手法に注目している。一つは、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)³⁾である。これは、標的タンパク質に親和性が高い分子と「ユビキチンリガーゼ高親和性分子」を結合した分子により、標的タンパク質をユビキチン化する点が特徴である。もう一つは光増感剤を結合した分子を合成し、光照射により活性酸素を局所的に生産してタンパク質を分解する方法⁴⁾であり、標的タンパク質を物理的に分解する点が特徴である。

本研究では、抗がん剤開発の観点から、標的タンパク質を Bcl-2 に設定し、Bcl-2 に親和性がある可能性が報告⁵⁾されている天然物の Ursolic acid (1)を Bcl-2 結合部位として用いることにした。また、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 (7)を、光増感性剤として 2-Phenylquinoline 4-amine (10)を用いて、2種類のタンパク質分解分子を合成し、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. Ursolic acid (1)誘導体の合成

まず、Lenalidomide (7), 2-Phenylquinoline 4-amine (10)を最終的に付加環化反応 (クリックケミストリー) で

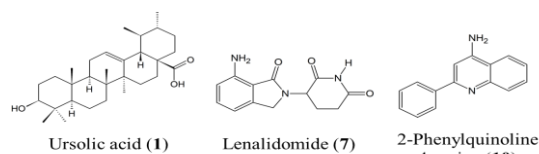
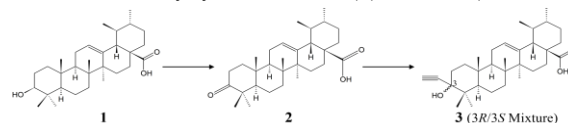


Fig.1 Chemical structures of compounds 1, 7, and 10

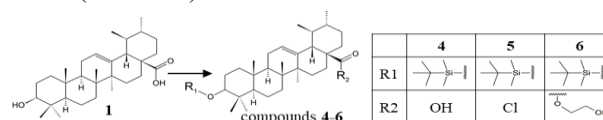
Ursolic acid (1)と結合する反応スキーム (Scheme 5, 6)を描き、反応に必要な 3-Ethynylursolic acid (3)を合成することとした。Ursolic acid (1)をアセトン中、ジョーンズ試薬で酸化し、Uronic acid (2)とした。化合物 2 は テトラヒドロフラン (THF)中、Ethynylmagnesium bromide を加え、3-Ethynylursolic acid (3)を得た (Scheme 1)。



Scheme 1 Synthetic scheme of 2-3

また、28 位カルボキシ基へのエステル結合による光増感剤導入を目的として、下記の間体も合成した。

Ursolic acid (1)をジクロロメタン中、2,6-Lutidine, *tert*-Butyldimethylsilyl trifluoromethane sulfonate (TBSOTf)を加え攪拌し、化合物 4 とした。化合物 4 は Oxalyl chloride により酸塩化物 (5)とし、続けて Ethylene glycol と反応することで中間体エステル(6)を得た (Scheme 2)。



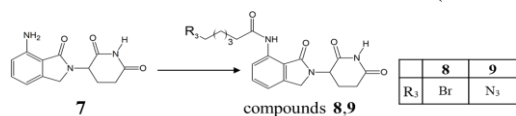
Scheme 2 Synthetic scheme of 4-6

2-2. Lenalidomide および 2-Phenylquinoline 4-amine のアジド合成

クリックケミストリーにて Ethynylursolic acid (3)と結合させる Lenalidomide (7)および 2-Phenylquinoline 4-amine (10)のアジドを下記の方法で合成した。

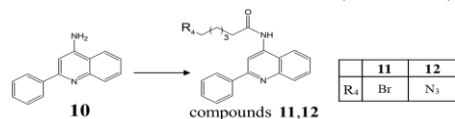
2-2-1. Lenalidomide アジドの合成

Lenalidomide (**7**)を THF 中、6-Bromohexanoyl chloride と反応し、臭化アルキルアミド (**8**)を得た。化合物 **8** は、NaN₃ と反応し、アジド化合物 **9** を得た (Scheme 3)。

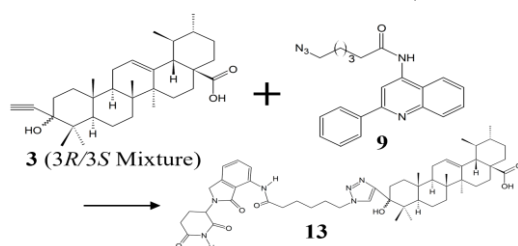
Scheme 3 Synthetic scheme of **8, 9**

2-2-2. Phenylquinoline アジドの合成

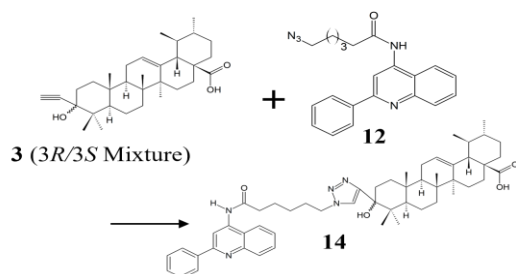
2-Phenylquinoline 4-amine (**10**)を用いて、2-2-1 と同様に反応し、アジド化合物 **12** を得た (Scheme 4)。

Scheme 4 Synthetic scheme of **11, 12**2-3. Ethynylursolic acid (**3**)とアジド化合物 (**9, 12**) の付加環化反応 (クリックケミストリー)

Ethynylursolic acid (**3**)および Lenalidomide アジド (**9**) を水-*tert*-BuOH 中、Sodium ascorbate および CuSO₄ · 5H₂O を加え攪拌し、化合物 **13** を得た (Scheme 5)。

Scheme 5 Synthetic scheme of **13**

化合物 **13** の合成と同様の方法を用い、Ethynylursolic acid (**3**)および 2-Phenylquinoline 4-amine アジド (**12**) から、化合物 **14** を合成した (Scheme 6)。

Scheme 6 Synthetic scheme of **14**

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[HL60 細

胞 (前骨髄球性白血病細胞), 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 (IC₅₀; μM) を算出した。なお、2-Phenylquinoline 4-amine を結合した分子については、化合物を作用させる際に、UV 照射⁶⁾ (照射時間 60 分、強度 340 μW/cm²) を行った。

3. 結果・考察

Ursolic acid (**1**)の 3 位に、Lenalidomide (**7**)および 2-Phenylquinoline 4-amine (**10**)を、リンカー (トリアゾール環および直鎖メチレン鎖) を介して結合した分子 (**13, 14**)を合成した。これらの化合物は、Ursolic acid (**1**)の構造を保持したまま、目的の部分構造 (Lenalidomide および 2-Phenylquinoline 4-amine) を導入した点特徴である。化合物 **13, 14** はいずれも立体異性体 (3*R*, 3*S*) の混合物と予想され、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて、これらを分離することが出来たが、各化合物の立体化学決定は今後の検討課題である。また、合成分子のがん細胞に対する傷害活性試験結果の一部を Table 1 に示した。立体化学の違いで活性に差が生じており、今後は再現性の確認および作用機構の解明を実施していく必要があると考えている。

Table 1 Cytotoxic activities of compound **13–14**'

Compounds**	IC ₅₀ ± SD* (μM)		
	MKN45	A549	
		UV(-)	UV(+)
13	2.26 (±2.55)	>100	-
13'	1.11 (±0.32)	5.88 (±1.45)	-
14	-	>100	>100
14'	-	>100	51.14 (±13.56)
Reference compound			
Cisplatin	8.11	37.51 (± 3.01)	-

* Standard deviation

** **13'**, **14'**; Stereoisomer of **13** and **14**

参考文献

- [1] T. Oltersdorf, *et al.*, *Nature*, **435**, 677 (2015).
- [2] 清井 仁, 日本内科学会雑誌, **107**, 1294 (2018).
- [3] 大岡伸通ら, *ファルマシア*, **56**, 41 (2020).
- [4] A. Suzuki, *et al.*, *Chem. Commun.* **10**, 4260 (2007).
- [5] K. E. Adewole, *et al.*, *J. Recept. Signal Transduction* **39**, 87 (2019).
- [6] 関根智之, 日本大学大学院理工学研究科修士論文 (2021).