

106. 極小蛍光分子を用いた実践的キナーゼ阻害薬の探索研究

中山 淳

*徳島大学 大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 有機合成薬学分野

Key words : マクロライド, キナーゼ阻害剤, LL-Z1640-2, 全合成, 蛍光分子

緒言

様々な治療法や薬剤が開発されている現代においても、がんは未だ克服困難な重要な疾病である。また、がんは加齢により罹患リスクが高まることから、超高齢社会を迎えた日本にとって、副作用が少なく「キレの良い」抗がん剤の開発、リード分子探索は急務である。このような背景のもと、近年、分子標的を指向した抗がん剤の開発が各国で行われており、シグナル伝達系に作用するキナーゼ阻害薬の開発は特に注目を集めている。中でも、慢性骨髄性白血病 (CML) 治療薬として上市されたグリベックは、チロシンキナーゼ阻害薬であり、CML 治療の特効薬として画期的な成果を上げている。同じ造血腫瘍の一種である多発性骨髄腫 (MM) は、罹患数自体は他のがんに比べて少ないものの、治療薬の幅が狭く、また、長期使用によって多くの抗がん剤に対して耐性を獲得することから新規薬剤の開発が望まれている。これらを背景に、MM 細胞を用いた化合物スクリーニングを行った結果、微生物由来天然マクロライド LL-Z1640-2 (1) が *in vitro*, *in vivo* 試験において強力な抗腫瘍効果を示すことを見出した (Fig.1)。1 は MAP3K ファミリーキナーゼ、特に TAK1 を非可逆的に阻害し、NF- κ B 経路に関与してアポトーシスを誘導することが示されており、抗炎症・抗腫瘍リード分子として注目を集めている。1 は resorcylic acid lactone 類 (RALs) に属する 14 員環マクロライドであり、*cis*-enone を持つことを構造的な特徴としている。本化合物と同様のキナーゼ阻害活性を有する化合物は多発性骨髄腫に対して有効である可能性が高いと考えられるが、現在までに報告されているキナーゼ阻害活性は精製酵素を用いた限定的なものであり、実際の MM 細胞中でのキナーゼ阻害活性を反映しているとは言えない。そこで、著者は以下の方法を提案した。すなわち、*in vitro*, *in vivo* 系ですでに良好な治療効果をあげた 1 に蛍光残基を導入した光標識プローブ 2 を設計し、この蛍光を目印としたアッセイ系を確立することができれば、候補化合物スクリーニングを高速化できると考えた。本研究課題では、光標識プローブ 2 の合成と応用のため、その親化合物となる LL-Z1640-2 (1) の不斉全合成経路の確立および蛍光残基導入に向けた構造活性相関を行う。続いて、蛍光残基導入による蛍光プローブ 2 の創出と、実際の系での有効性の確認を行い新たなアッセイ系を確立することを最終目的とし、研究を開始した。

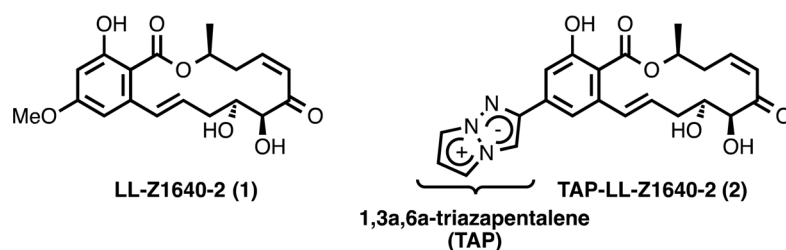


Fig. 1. Structures of LL-Z1640-2 (1) and TAP-LL-Z1640-2 (2)

方法

蛍光プローブ **2** を合成するにあたり、はじめに **1** のどの部分にどのような蛍光分子を入れるかが重要となる。これまでに報告されている TAK-1 と **1** の X 線結晶構造解析より、芳香環部分がキナーゼの外側に面しておりスペースが空いていることが明らかとなっている。そこで、**1** の芳香環のフェノール性水酸基部分に蛍光残基を導入することを計画した (Fig.2)。また、従来の蛍光分子は分子サイズが比較的大きなものが多く、これにより生物活性に影響を与えてしまうことが低分子化合物の蛍光プローブ化では大きな問題となる。これは当研究室が開発した極小蛍光分子である 1,3a,6a-triazapentalene (以下 TAP) を用いることで解決できると考えた¹⁻³⁾。TAP はコンパクトながらも優れた蛍光発色団であり、芳香環に直結することで安定性、蛍光強度が増大する特性を持つことから、導入箇所は適切と考えられる。これらを踏まえた上で、はじめに LL-Z1640-2 (**1**) の不斉全合成経路の確立を目指した。

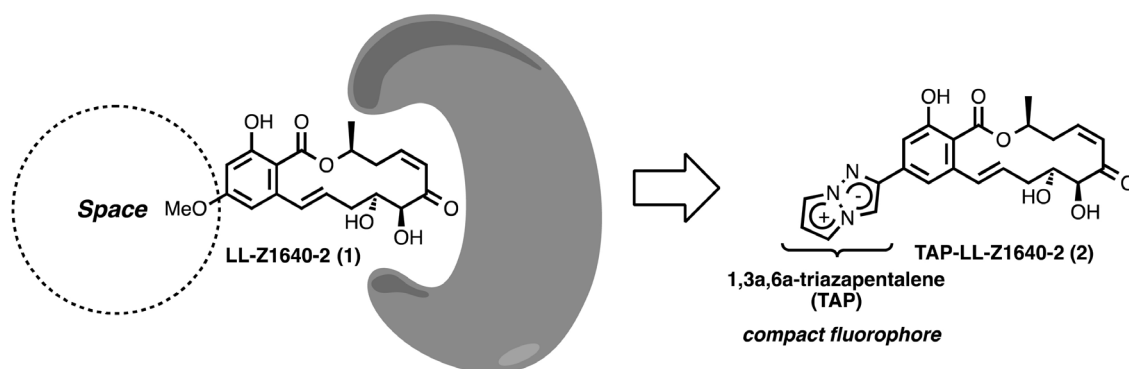


Fig. 2. Introduction of fluorescent molecule (TAP) to LL-Z1640-2 (**1**)

結果

実際の合成を以下に示す (Fig.3-5)。

はじめに、各ユニット (A、B、C) の合成を行った (Fig.3. 芳香環を有する A ユニットは、市販の 2,4,6-トリヒドロキシ安息香酸を出発原料に、三工程でトリフラート体 **9** に導いた。続いて、鈴木-宮浦カップリングにより収率良くスチレン誘導体に変換した後、エステル加水分解を経て A ユニットの合成を完了した。B ユニットは、2-deoxy-D-ribose から、ジオールのアセトナイド保護、Wittig 反応、Parikh-Doering 酸化を行い、アルデヒド **14** を得ることができた。また、C ユニットについては、市販の光学活性 (*S*)-propylene oxide からリチウムアセリドによる開環と、生じた水酸基を TBDPS 基で保護することで合成を行った。

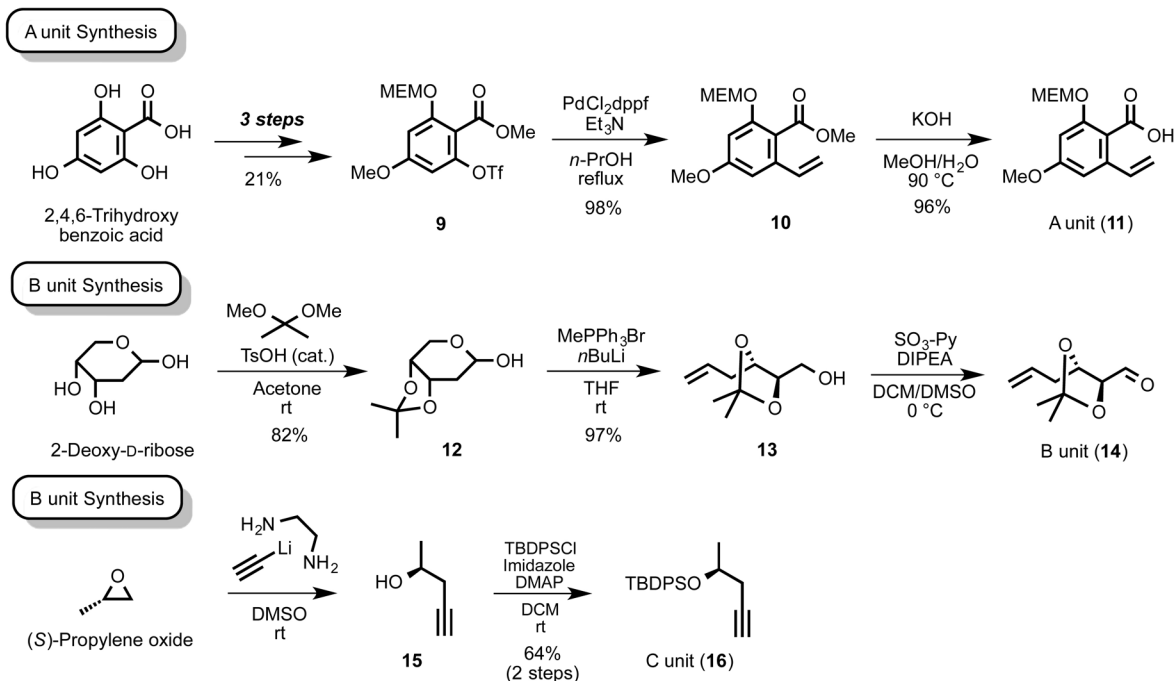


Fig. 3. Syntheses of A, B, C units

続いて、得られたB, Cユニットをアニオンカップリングにより連結することとした (Fig. 4)。すなわち、Bユニット **14** を *n*BuLi で処理してアセチリドとした後、Cユニット **16** を加えることで中程度の収率ではあるが、目的のエンイン化合物 **17** の合成に成功した。生じた水酸基をアセチル基で保護した後、ジアステレオマーを分離、TBDPS基を除去することで目的の分子間エステル化反応前駆体 **19** を得ることができた。種々のエステル化法を検討した結果、2-methyl-6-nitro benzoic anhydride (MNBA) を用いた椎名エステル化法に行った時のみ収率良く目的のカップリング体 **20** を得ることに成功した。エンインメタセシスを防ぐ目的で三重結合をアルキンコバルト錯体で保護することで鍵反応前駆体 **21** の合成を完了した。

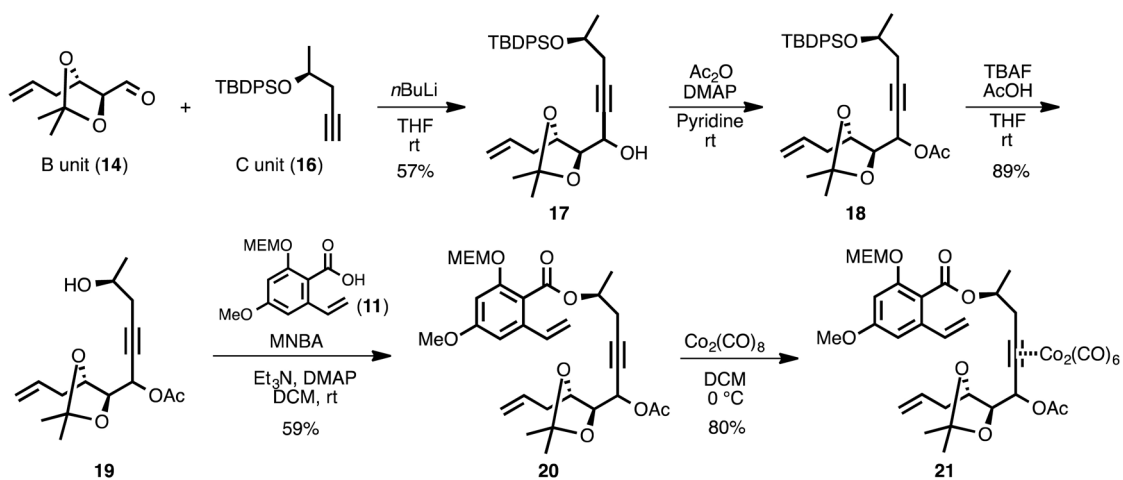


Fig. 4. Synthesis of RCM precursor **21**

鍵反応前駆体 **21** が得られたので、これを用いて閉環メタセシス反応の検討を行った。種々のルテニウム触媒を検討した結果、低温でも反応が進行する第二世代 Piers-Grubbs 触媒⁴⁾ を用いた時のみ、目的の閉環体 **22** を収率 11 % で得ることに成功した。しかしながら、本基質を用いてこれ以上の収率向上は困難と考え、水酸基部分の保護基をアセトナイド基から変更することとした。その結果、化合物 **23** の場合において、ルテニウム触媒を 40 mol% 使うものの、収率 76 %、*E/Z* = 1.2 : 1 で閉環体 **24** が得られることを見出した。閉環体 **24** のアルキンコバルト錯体をシス還元⁵⁾ した後、PMB 基の脱保護を行い、この時点でベンジル位 *E* 体と *Z* 体を分離した。プロパルギル位水酸基を Dess-Martin 試薬により酸化し、全ての保護基をフッ化水素で除去することで目的の LL-Z1640-2 (**1**) 及び (11*Z*)-LL-Z1640-2 (**28**) の不斉全合成を達成した。合成品の各種スペクトルデータは論文値と良い一致を示したことから構造を確認した。

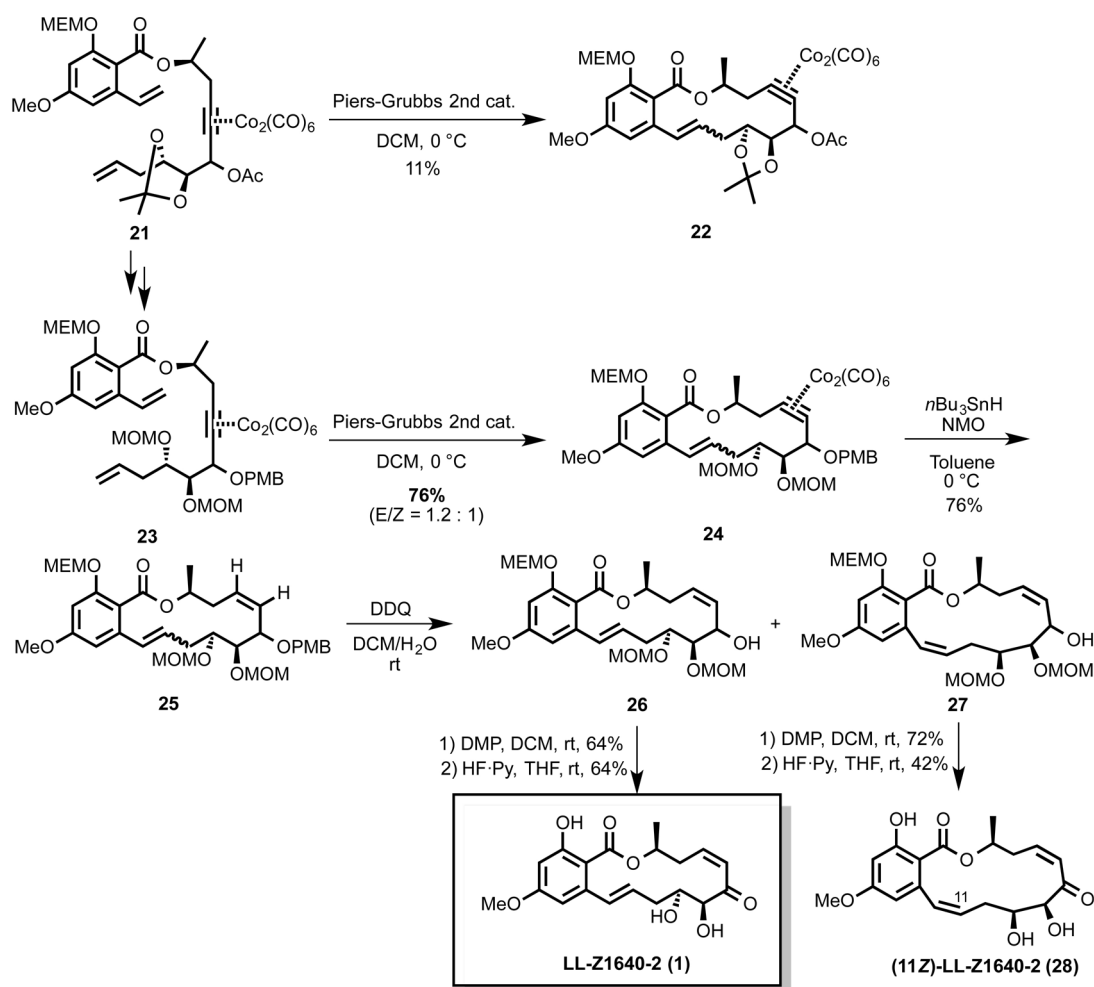


Fig. 5. Total syntheses of LL-Z1640-2 (**1**) and (11*Z*)-LL-Z1640-2 (**28**)

現在、**1** の全合成経路の改善を行うとともに、TAP 導入に向けて **1** の合成経路から誘導体化の検討を行っている。

共同研究者

本研究の共同研究者は、徳島大学大学院医歯薬学研究部（薬学系）有機合成薬学分野の難波康祐である。本稿を終えるにあたり、本研究を御支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文献

- 1) Namba K, Osawa A, Ishizaka S, Kitamura N, Tanino K. Direct synthesis of fluorescent 1,3a,6a-triazapentalene derivatives via click-cyclization-aromatization cascade reaction. *J Am Chem Soc.* 2011;133(30):11466-9. doi: 10.1021/ja203917r.

- 2) Namba K, Mera A, Osawa A, Sakuda E, Kitamura N, Tanino K. One-pot synthesis of highly fluorescent 2,5-disubstituted-1,3a,6a-triazapentalene. *Org Lett.* 2012;14(21):5554-7. doi: 10.1021/ol302668y.
- 3) Namba K, Osawa A, Nakayama A, Mera A, Tano F, Chuman Y, Sakuda E, Taketsugu T, Sakaguchi K, Kitamura N, Tanino K. Synthesis of yellow and red fluorescent 1,3a,6a-triazapentalene and theoretical investigation of optical properties. *Chem. Sci.* 2015;6:1083-1093. doi:10.1039/c4sc02780a.
- 4) Romero PE, Piers WE, McDonald R. Rapidly initiating ruthenium olefin-metathesis catalysts. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2004;43(45):6161-5. DOI: 10.1002/anie.200461374.
- 5) Goto T, Urabe D, Masuda K, Isobe Y, Arita M, Inoue M. Total Synthesis of Four Stereoisomers of (4Z,7Z,10Z,12E,16Z,18E)-14,20-Dihydroxy-4,7,10,12,16,18-docosahexaenoic Acid and Their Anti-inflammatory Activities. *J Org Chem.* 2015;80(15):7713-26. doi: 10.1021/acs.joc.5b01461.