3　天然PKCリガンドの医薬品シーズとしての構造最適化	入江　一浩

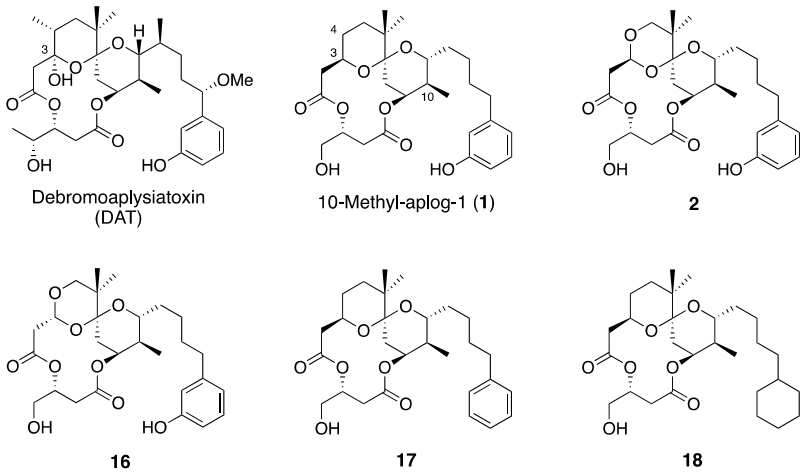
【目的】プロテインキナーゼ C（PKC）は、細胞の増殖、分化、アポトーシス等において、情報伝達の中枢を担っているリン酸化酵素である。天然の PKC 活性化剤は、特定のがん細胞株の増殖を抑制するが、同時に発がん促進性や炎症性といった副作用を示すことから医薬品として用いることは困難であった。一方、本研究グループが開発したデブロモアプリシアトキシン（DAT）の単純化アナログ・10-methyl-aplog-1（**1**）はこれらの副作用を示さない PKC 活性化剤であり、新しいタイプの抗がん剤シードとして期待されている。本研究では、**1** の合成段階数の短縮とがん細胞増殖抑制活性の更なる改善を目的として、新規誘導体の合成と各種生物活性評価を行った。

【方法】化合物 **1** の 3 位アセタール型アナログ（**2**）は、*m*-ヒドロキシ桂皮酸から収束的な経路で合成した。次に、**1** の *m*-ヒドロキシフェニル基を、フェニル基あるいはシクロヘキシル基に還元した。これらのアナログの PKC アイソザイムに対する結合能、各種がん細胞に対する増殖抑制活性、ならびに副作用である発がん促進活性と炎症作用を調べた。各種がん細胞増殖抑制活性の評価は、新学術領域研究・分子プロファイリング支援班に依頼した。

【結果】まず、合成段階数の短縮を目的として **1** の 4 位の炭素原子を酸素原子に置き換えた **2** を設計した。スピロ環およびマクロラクトン環の同時形成反応を適用することによって、**2** を最長直線工程数 18 段階で合成することに成功した。しかしながら、熱力学的により安定な 3 位のエピマー（**16**）が優先して生成したことから、収率の改善には至らなかった。また、**2** の PKC 結合能およびがん細胞増殖抑制活性は、**1** と比べて 1 オーダー程度低かったことから、4 位周辺の疎水性が活性発現に重要であることが判明した。一方で、**2** と **16** は異なる PKC アイソザイム選択性を示したことから、アイソザイム選択的な誘導体を開発するうえで 3 位周辺の構造修飾が有効であることが示唆された。

次に、**1** の *m*-ヒドロキシフェニル基をフェニル基またはシクロヘキシル基に変換した **17** および **18** を合成した。化合物 **17** は、**1** と同程度の強さで PKCδ C1B ドメイン（δ-C1B）に結合したが、**18** は 1 オーダー近く結合能が低下した。ドッキングシミュレーションによって各誘導体と δ-C1B の結合様式を解析したところ、**1** および **17** のフェノール性水酸基およびフェニル基は δ-C1B の Met-239、Pro-241 との間に水素結合または CH/π 相互作用を形成することが示唆された。化合物 **18** のシクロヘキシル基はこれらの相互作用を形成できないため結合能が低下したと予想される。また、**17** は **1** と同様にマウス背部皮膚において発がん促進性を示さなかったのに対し、**18** は炎症性と弱い発がん促進性を示した。以上より、**1** の *m*-ヒドロキシフェニル基は δ-C1B との結合を強めるとともに、副作用の抑制に関与していることが判明した。今後、側鎖の長さや芳香環の電子密度を調整し、C1 ドメインとの結合を強化すれば、優れた抗がん剤シードを提示できると考えられる。

Debromoaplysiatoxin（DAT）とその単純化アナログの構造



3. 天然 PKC リガンドの医薬品シーズとしての構造最適化

入江　一浩

京都大学 大学院農学研究科 食品生物科学専攻 生命有機化学分野

Key words：protein kinase C，tumor promoter，aplysiatoxin，anti-cancer agent

緒　言

プロテインキナーゼ C（PKC）は、細胞増殖、分化、アポトーシスなどに関与していることから、がん治療における標的酵素の一つとして注目されている。近年、がん細胞株における PKC の変異の多くが機能欠損型であることが明らかになり、PKC の活性化が有望ながん治療戦略になる可能性がある［1］。天然の PKC 活性化剤である 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate（TPA）や debromoaplysiatoxin（DAT）は、数種のがん細胞株に対して増殖抑制作用を示すが、その強力な発がん促進作用と炎症作用のため、抗がん剤としての使用は著しく制限される（Figure 1）。一方、本研究グループでは DAT の単純化アナログである 10-methyl-aplog-1（**1**）が発がん促進性や炎症性を示さず、特定のがん細胞株に対して DAT と同等以上の増殖抑制活性を示すことを見いだしている［2］。

化合物 **1** は有望な抗がん剤シーズであるが、その合成には最長直線工程数 23 段階を要し、総収率は 1.1%にすぎないため［3］、医薬品シーズとして臨床試験を行うためには更なる合成段階数の短縮による大量供給が必要である。同時に、本化合物に対して感受性の高いがん細胞株に対する 50%増殖阻害濃度は 10^{-7} ～10^{-6} M であったことから、増殖抑制活性を更に 1 オーダー程度高めることが望まれる。そこで本研究では、これまで未検討であった 3 位ヘミアセタール部分と側鎖芳香環の構造活性相関を調べ、**1** の構造最適化と合成段階数の短縮を試みた。

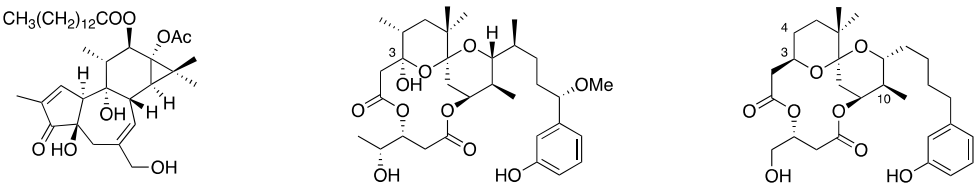


Figure 1. Structure of TPA，DAT，and 10-methyl-aplog-1（**1**）

方　法

化合物 **1** の 3 位アセタール型アナログ（**2**）は、*m*-ヒドロキシ桂皮酸から収束的な経路で合成した。次に、**1** の側鎖の *m*-ヒドロキシフェニル基を、フェニル基あるいはシクロヘキシル基に還元した。これらのアナログの PKC アイソザイムに対する結合能、各種がん細胞に対する増殖抑制活性、ならびに副作用である発がん促進活性と炎症作用を調べた。PKC アイソザイムに対する結合能は、本研究代表者らが開発した PKC アイソザイム C1 ペプチドと［^{3}H］phorbol 12，13-dibutyrate を用いて行なった［2］。また、各種がん細胞増殖抑制活性の評価は、新学術領域研究・先端モデル動物支援プラットフォーム・分子プロファイリング支援班に依頼した。

結果および考察

1. 10-Methyl-aplog-1（1）の3位アセタール型アナログの合成ならびに活性評価

岸らのDAT合成では3位ヘミアセタール、スピロ環ならびにマクロラクトン環を同時に構築することによって合成段階数を短縮している［4］。しかし、岸らの合成経路をそのまま**1**の合成に適用すると、脱水しやすい3位水酸基が導入されるため、化合物の安定性の観点から好ましくない。そこで本研究では、スピロ環とマクロラクトン環の同時形成による合成段階数の短縮を目的として、**1**の4位の炭素原子を酸素原子に置換した**2**を設計した。*m*-ヒドロキシ桂皮酸（**3**）を出発原料として、4つのユニット（**5**，**6**，**8**，**12**）を結合させる収束的な合成経路にて最長直線工程数18段階で**2**を合成することに成功した（Figure 2）。しかしながら、スピロ環とマクロラクトン環の同時形成反応において、二重アノマー効果によって熱力学的に安定な3位エピマーが優先的に生成したこと等から総収率の面を改善するには至らなかった（目的物**2**：0.30%、3位エピマー**16**：0.67%）。

PKCアイソザイムのうちPKCαおよびδが、主として**1**のがん細胞増殖抑制活性に関与しているため［5］、これらのアイソザイムのC1ドメイン（α-C1A、δ-C1B）に対する結合能とがん細胞増殖抑制活性を評価した。その結果、**2**および**16**のこれらのC1ドメインへの結合能は、**1**と比べて5〜30倍程度低下するとともに、がん細胞増殖抑制活性も1オーダー低かった（Table 1，2）。NMR解析によって、**2**のマクロラクトン環のコンホメーションは**1**とほぼ同等であることが示唆されたため、活性低下の原因は4位付近の疎水性の低下と推定された。一方で、**2**と**16**を比較すると、δ-C1Bに対する結合能は2倍程度の差があったのに対し、α-C1Aに対する結合能はほぼ同等であった。したがって、δ-C1Bのみが3位付近のコンホメーションを認識していることが示唆された［6］。本知見は、今後PKCアイソザイム選択的な誘導体を設計するうえで有用である。

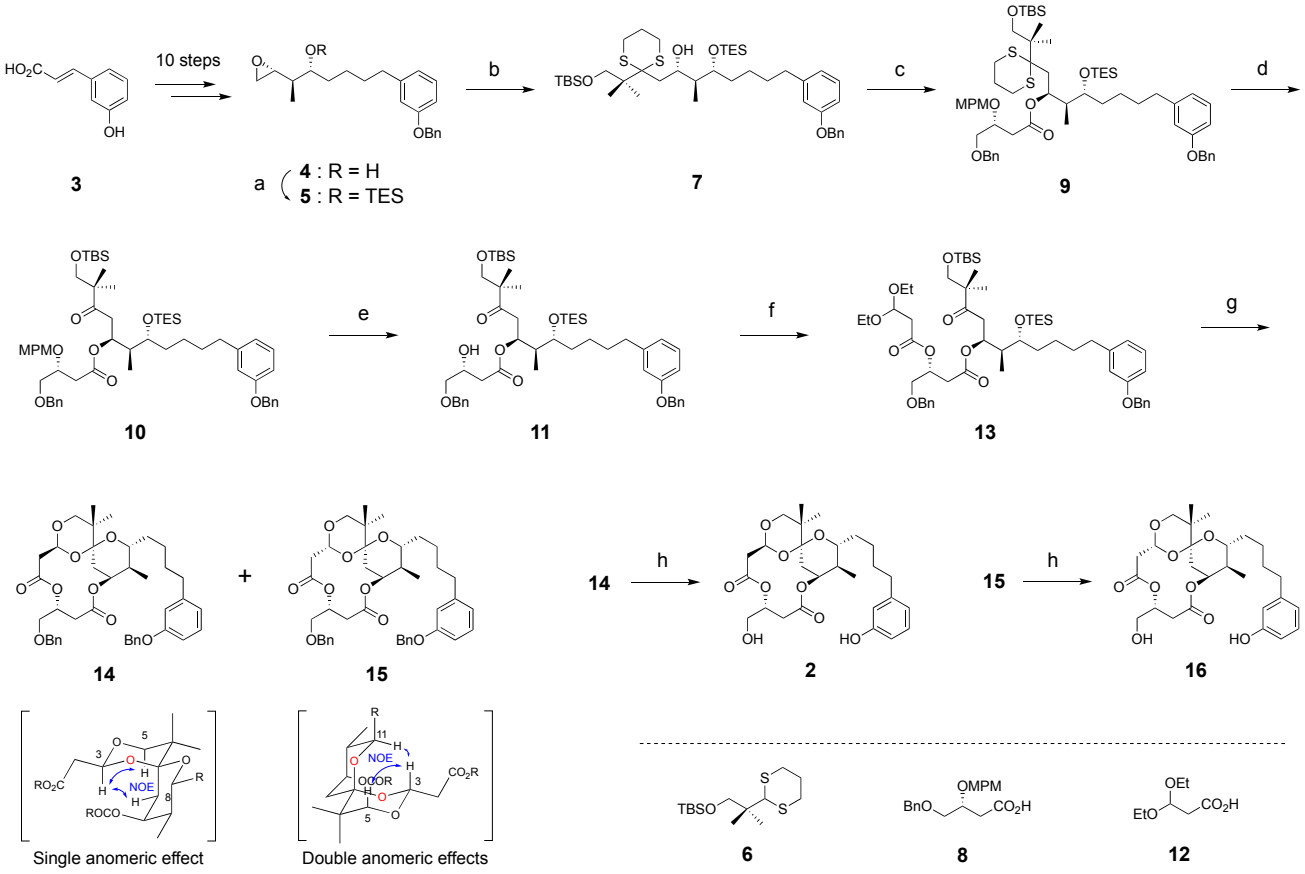


Figure 2. Synthesis of **2** and **16**

(a) TES-Cl, imidazole, THF, 89%. (b) **6**, *n*-BuLi, THF, 84%. (c) **8**, DCC, DMAP, CH_2Cl_2, 57%. (d) I_2, $NaHCO_3$, MeCN, 63%. (e) DDQ, CH_2Cl_2, H_2O, 83%. (f) **12**, TCB-Cl, Et_3N, DMAP, toluene, 90%. (g) TMSOTf, CH_2Cl_2, **14**：10%, **15**：14%. (h) H_2, 10% Pd/C, EtOH, **2**：78%, **16**：83%.

Table 1. K_i Values for the inhibition of [^{3}H]PDBu binding by **1**, **2**, and **16** [a]

	K_i (nM)		
PKC C1 peptides	**1**[a]	**2**	**16**
α-C1A	4.7	22 (4)[b]	22 (0.9)
δ-C1B	0.46	6.8 (1.3)	13 (0.9)

[a] Cited from Ref. [2]. [b] Values in parentheses represent the standard deviation from at least two separate experiments.

Table 2. Growth inhibition of **1**, **2**, and **16** against several human cancer cell lines

		log GI_{50} (M)		
Cancer cell line		**1**[a]	**2**	**16**
Breast	HBC-4	–7.48	–6.26	–5.88
	MDA-MB-231	–6.90	–5.10	–4.95
CNS	SNB-78	–6.05	> –5.00	–4.60
Colon	HCC2998	–6.47	–5.56	–5.17
Lung	NCI-H226	–6.15	–5.31	–4.80
	NCI-H460	–7.07	–6.12	–5.69
	A549	–6.01	–5.40	–5.20
Melanoma	LOX-IMVI	–6.21	> –5.00	–4.75
Stomach	St-4	–6.24	–5.96	–5.33
	MKN45	–4.97	–6.00	–5.62

[a] Cited from Ref. [2].

2. 10-Methyl-aplog-1 (1) の側鎖における構造活性相関

TPA などのホルボールエステル型の PKC 活性化剤においては, 側鎖の疎水性が PKC との結合に重要と考えられている［7］。しかしながら、DAT や **1** においては、側鎖の末端に親水性の *m*-ヒドロキシフェニル基を有する点でホルボールエステル類とは異なっている。この *m*-ヒドロキシフェニル基が各種生物活性に与える影響を調べるため、**1** のフェノール性水酸基を取り除いた **17**、さらにフェニル基を還元してシクロヘキシル基に変換した **18** を合成した（Figure 3）［8］。

これらの δ-C1B に対する結合能を評価したところ、**1** と比較して **17** は約 2 倍、**18** は約 8 倍結合能が低下した（K_i, **17** : 0.87 nM, **18** : 3.8 nM）。そこで、ドッキングシミュレーションによって各誘導体と δ-C1B の結合様式を解析した（Figure 4）。いずれの誘導体も、27 位の 1 級水酸基と 24 位のカルボニル基が Thr-242、Leu-251、および Gly-253 と水素結合を形成していることが示唆された。さらに、**1** のフェノール性水酸基および **17** のフェニル基は δ-C1B の Met-239 および Pro-241 と水素結合または CH/π 相互作用を形成することが予想された。一方で、**18** のシクロヘキシル基はこのような相互作用を形成しないため PKC との結合能が低下したと考えられる。さらに、**17** および **18** のがん細胞増殖抑制活性を評価したところ、いずれも **1** と同様に細胞株選択的な増殖抑制活性を示したが、PKC 結合能に劣る **18** の増殖抑制活性は若干低下した。

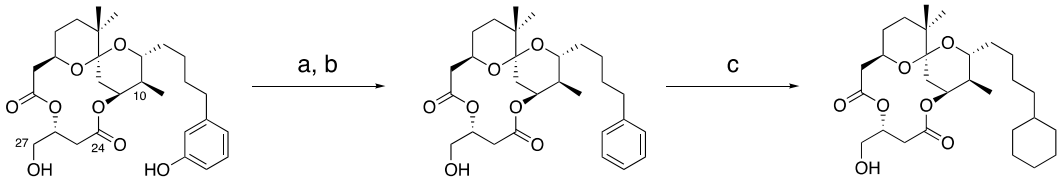


Figure 3. Synthesis of **17** and **18**

(a) *N*-phenyl-bis(trifluoromethanesulfonimide), triethylamine, CH_2Cl_2 ; (b) H_2, 10% Pd/C, *N,N*-diisopropylethylamine, EtOH (65% in two steps) ; (c) H_2, 5% Rh/C, *i*PrOH (98%).

最後に、マウス背部皮膚における二段階発がん試験により、**17** および **18** の発がん促進活性を評価した (Figure 5)。その結果、TPA が 0.85 nmol の塗布ですべてのマウスに腫瘍を発生させたのに対し、**17** はその 10 倍量である 8.5 nmol を塗布してもまったく腫瘍形成を惹起しなかった。一方、**18** は 8.5 nmol の塗布により、半数のマウスに腫瘍を形成させた。以上より、**1** の側鎖の *m*-ヒドロキシフェニル基は PKC アイソザイムとの結合を高めるとともに、発がん促進作用の抑制に関与していることが判明した［8］。したがって、**1** の側鎖の長さや芳香環の電子密度を調節し、側鎖末端と C1 ドメイン間の相互作用を強化するような誘導体を設計すれば、優れた抗がん剤シードを提示できると考えられる。

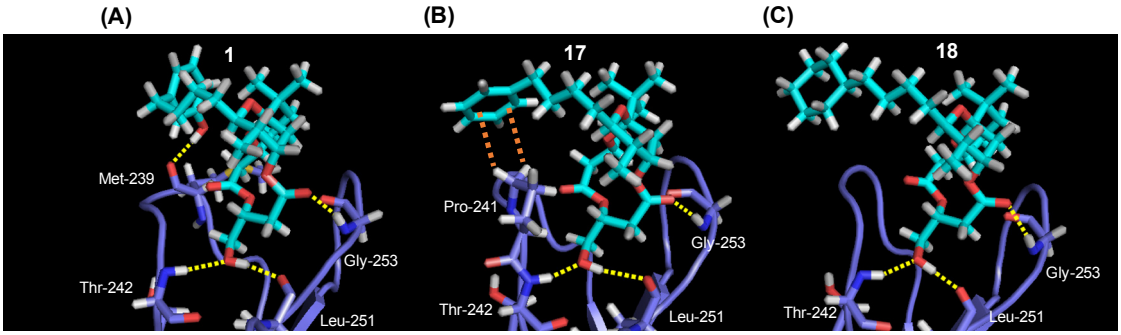


Figure 4. Structures of the PKCδ-C1B domain in complex with **1 (A)**, **17 (B)**, and **18 (C)**.

Each compound is drawn as a stick model. δ-C1B is depicted in cartoon form, and amino acid residues that could form hydrogen bonds or be involved in CH/π interactions with the aromatic ring of each compound are represented in stick model colored purple (carbon), red (oxygen), blue (nitrogen), yellow (surfer), and white (hydrogen). Yellow and orange dashed lines represent hydrogen bonds and CH/π interactions, respectively.

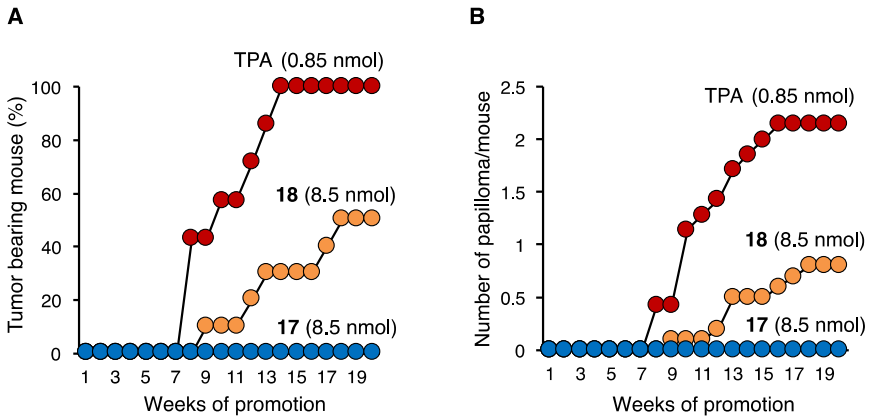


Figure 5. Tumor-promoting activity of TPA (0.85 nmol), **17** (8.5 nmol), and **18** (8.5 nmol).
The back of each female six-week-old ICR mice was shaved with surgical clippers. From a week after the initiation by a single application of 780 nmol of DMBA in 0.1 mL acetone, each compound (0.85 or 8.5 nmol) in 0.1 mL acetone was applied twice a week from week 1 to week 20. TPA group consisted of seven mice, and other groups consisted of ten mice. (A) Tumor-bearing mice (%) ; (B) Number of papilloma per mouse.

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都大学大学院農学研究科の花木祐輔 博士（現名古屋大学生命農学研究科）、早川皓太郎氏、菊森将之 博士、中川 優 博士（現名古屋大学生命農学研究科准教授）、徳田春邦 氏、香川大学農学部の柳田 亮准教授、がん研究所の旦 慎吾 博士、岡村睦美 氏です。また、アプログ類のヒトがん細胞に対する増殖抑制活性の評価は、新学術領域研究・先端モデル動物支援プラットフォーム・分子プロファイリング支援班によるものです。これらの共同研究者の方々と本支援班、ならびに本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に心より感謝申し上げます。

文　献

1) Antal C E, Hudson A M, Kang E, Zanca C, Wirth C, Stephenson N L, Trotter E W, Gallegos L L, Miller C J, Furnari F B, Hunter T, Brognard J, Newton A C. Cancer-associated protein kinase C mutations reveal kinase's role as tumor suppressor. Cell. 2015;160(3):489-502. PMID: 25619690 DOI: 10.1016/j.cell.2015.01.001

2) Kikumori K, Yanagita R C, Tokuda H, Suzuki N, Nagai H, Suenaga K, Irie K. Structure-activity studies on the spiroketal moiety of a simplified analogue of debromoaplysiatoxin with antiproliferative activity. J Med Chem. 2012;55(11): 5614-5626. PMID: 22625994 DOI: 10.1021/jm300566h

3) Kikumori M, Yanagita R C, Irie K. Improved and large-scale synthesis of 10-methyl-aplog-1, a potential lead for an anticancer drug. Tetrahedron. 2014;70(52):9776-9782. DOI: 10.1016/j.tet.2014.11.026

4) Park P U, Broka C A, Johnson B F, Kishi, Y. Total synthesis of debromoaplysiatoxin and aplysiatoxin. J Am Chem Soc. 1987;109(20): 6205-6207. DOI: 10.1021/ja00254a062

5) Hanaki Y, Shikata Y, Kikumori M, Hotta N, Imoto M, Irie K. Identification of protein kinase C isozymes involved in the anti-proliferative and pro-apoptotic activities of 10-Methyl-aplog-1, a simplified analog of debromoaplysiatoxin, in several cancer cell lines. Biochem Biophys Res Commun. 2018;495(1): 438-445. PMID: 29129688 DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.11.052

6) Hayakawa K, Hanaki Y, Tokuda H, Yanagita R C, Nakagawa Y, Okamura M, Dan S, Irie K. Synthesis and biological activities of acetal analogs at position 3 of 10-methyl-aplog-1, a potential anti-cancer lead derived from debromoaplysiatoxin. Heterocycles 2018;97(1):478-492. DOI: 10.3987/COM-18-S(T)37

7) Sharkey N A, Blumberg P M. Highly lipophilic phorbol esters as inhibitors of specific [^{3}H] phorbol 12, 13-dibutyrate binding. Cancer Res. 1985;45(1):19-24. PMID: 3855281

8) Hanaki Y, Kikumori M, Tokuda H, Okamura M, Dan S, Adachi N, Saito N, Irie, K. Loss of the Phenolic Hydroxyl Group and Aromaticity from the Side Chain of Anti-Proliferative 10-Methyl-aplog-1, a Simplified Analog of Aplysiatoxin, Enhances Its Tumor-Promoting and Proinflammatory Activities. Molecules. 2017;22(4), 631. PMID: 28406454 DOI: 10.3390/molecules22040631