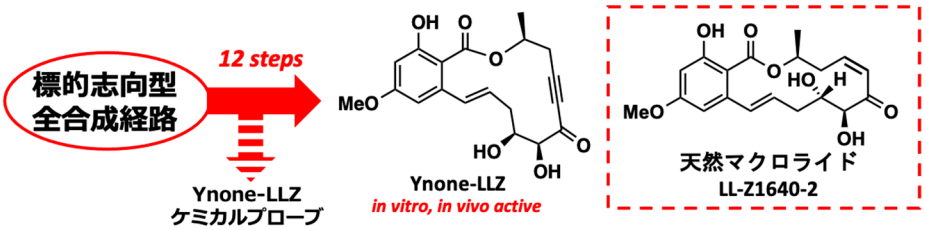
227　骨改善作用を有する大環状化合物の作用機序解明研究	中山　淳

【目的】超高齢社会を迎えた日本にとって、加齢により罹患リスクの高まる疾患の克服は急務の課題である。特に、骨に損傷を伴う疾患は、高齢罹患者の治癒実績が低く、患者の QOL を著しく低下させるだけでなく、周囲への影響も甚大である。このため骨喪失疾患治療薬の開発は今後ますます重要となる。骨喪失を伴い、かつ治癒実績の低い悪性腫瘍として多発性骨髄腫がある。本疾患は形質細胞ががん化することで免疫異常を含む様々な症状を呈するが、骨破壊性病変の形成が特徴的である。筆者らは多発性骨髄腫の克服を目指す中で、天然マクロライド LL-Z1640-2 が多発性骨髄腫に対して顕著な治癒効果を示すことを明らかとした。そこで、本化合物を鋳型として多重結合異性体ライブラリーを構築し、骨髄腫細胞を用いた細胞傷害活性を評価した結果、LL-Z1640-2 のファーマコフォアを *cis*-enone から ynone へと変換した新規化合物 Ynone-LLZ が有望な生物活性を有することを見出した。本化合物は *in vitro*、*in vivo* ともに有効ではあるものの、その作用メカニズムは親化合物である LL-Z1640-2 とは全く異なることが示唆された。そこで、Ynone-LLZ のケミカルプローブを作製し、pull-down アッセイにより生体内作用標的分子を明らかとすることを計画した。

【方法】ケミカルプローブには、タンパク精製等に必要なアルキンタグを導入する必要があった。そこで、Ynone-LLZ の供給に利用してきた「多様性志向型全合成経路」によるケミカルプローブ合成と、選択的に Ynone-LLZ を合成するための「標的志向型全合成経路」の開発を行った。

【結果】これまでに開発してきた「多様性志向型全合成経路」の利用を試みたが、鍵反応である閉環メタセシス反応では望まない立体化学を有する化合物しか得られず、Ynone-LLZ のケミカルプローブを合成することはできなかった。そこで、分子内に含まれる二重結合の幾何異性を完全に制御できる「標的志向型全合成経路」を新たに開発することとした。分子間 Heck 反応を鍵反応に用いて市販化合物から数工程で合成したユニット同士の連結を試みたところ、高収率で目的の幾何異性を有するカップリング生成物を得ることができた。さらに、分子内光延反応を活用することで 14 員環マクロライド骨格を構築し、Ynone-LLZ の初の選択的合成経路を確立することに成功した。

Ynone-LLZ ケミカルプローブ合成に向けた標的志向型全合成経路の開発



227. 骨改善作用を有する大環状化合物の作用機序解明研究

中山　淳

*徳島大学 大学院医歯薬学研究部 有機合成薬学分野

Key words：天然マクロライド，多発性骨髄腫，全合成，ケミカルバイオロジー，ケミカルプローブ

緒　言

超高齢社会を迎えた日本にとって、加齢により罹患リスクの高まる疾患の克服は急務の課題である。特に、骨に損傷を伴う疾患は、高齢罹患者の治癒実績が低く、患者の QOL を著しく低下させるだけでなく、周囲への影響も甚大である。このため骨喪失疾患治療薬の開発は今後ますます重要となる。骨喪失を伴い、かつ治癒実績の低い悪性腫瘍として多発性骨髄腫がある。本疾患は形質細胞ががん化することで免疫異常を含む様々な症状を呈するが、骨破壊性病変の形成が特徴的である。筆者らは多発性骨髄腫の克服を目指す中で、天然マクロライド LL-Z1640-2 が多発性骨髄腫に対して顕著な治癒効果や骨破壊性病変の改善効果を示すことを明らかとした［1］。そこで、本化合物を鋳型として、天然物 LL-Z1640-2 と類似の官能基を有しつつ三次元的ケミカルスペースを拡張する多重結合異性体ライブラリーの構築を計画した（図 1a）。

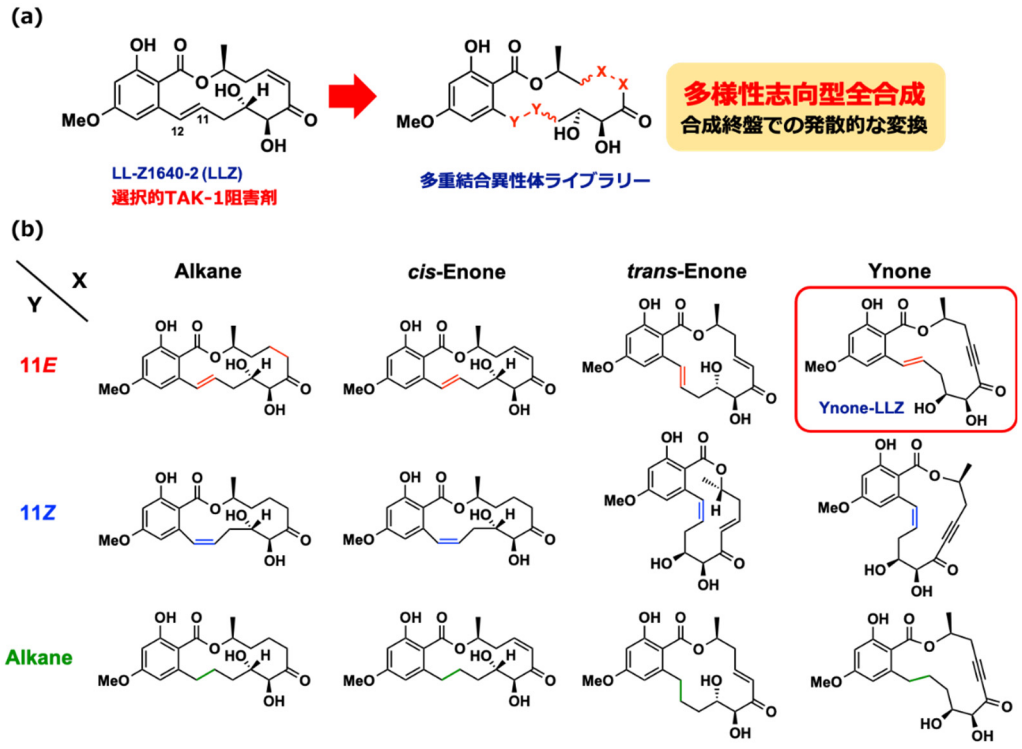


図 1. 多重結合異性体ライブラリーの構築計画（a）と多様性志向型全合成で合成した化合物群（b）

a）天然マクロライド LL-Z1640-2 の構造と、多重結合異性体ライブラリーの概念図。

b）14 員環マクロライドライブラリーの化合物。

*現在の所属：大阪公立大学 大学院理学研究科 物化学専攻 分子変換学研究室

効率的にライブラリーを構築するため、合成の終盤で立体化学や官能基変換を発散的に行う「多様性志向型の全合成経路」を開発することとした。その結果、アルキン - コバルト錯体を有する中間体から立体発散的閉環メタセシス反応を鍵工程として LL-Z1640-2 を含む天然マクロライド 5 種、擬天然マクロライド 7 種から成る小規模ライブラリーを構築することに成功した（図 1b）。この中から、親化合物である LL-Z1640-2 のファーマコフォアにあたる *cis*-enone を ynone へと変更した新規化合物 Ynone-LLZ が、多発性骨髄腫細胞に対して *in vitro*、*in vivo* においても強力な生物活性を示すことを独自に見出した［2］。さらに、本化合物は多発性骨髄腫によって形成された骨破壊性病変の改善作用を示し、低濃度で破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を抑制することも明らかとしている。

一方で、親化合物である LL-Z1640-2 は選択的 TGF-beta-activated kinase 1（TAK1）阻害剤として知られているが、広範なキナーゼ阻害活性評価の結果、Ynone-LLZ は TAK1 に対してほとんど阻害活性を示さないことが明らかとなった。現在の段階で Ynone-LLZ の生体内標的分子は未知であるが、その標的分子を明らかにできれば新たな創薬標的を提示できる可能性は高い。Ynone-LLZ のファーマコフォアは強力なマイケルアクセプターである ynone 部分であり、骨髄腫細胞中で標的分子と共有結合を形成していると予想される。そこで、Ynone-LLZ にアルキンタグを導入したケミカルプローブを合成し、pull down 法による標的分子同定研究を計画した。

方法および結果

1. Ynone-LLZ ケミカルプローブの合成検討

Ynone-LLZ の標的分子 pull-down アッセイを行うために、Ynone-LLZ にアルキンタグを導入することとした。これまでの知見から、フェノール性ヒドロキシ基に置換基を導入すると大幅に活性が低下することが明らかとなっていた。そこで、芳香環メトキシ基部分をプロパルギル基に変更したケミカルプローブ **1** を合成標的に設定した（図 2）。

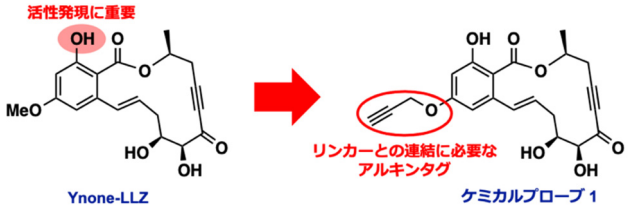


図 2. Pull-down アッセイに用いる Ynone-LLZ ケミカルプローブ **1** の構造

開発してきた多様性志向型合成経路を基盤とすると、あらかじめプロパルギル基を導入して合成を進めると鍵工程であるルテニウム触媒を用いた閉環メタセシス反応の際に望まぬ副反応が進行してしまうことが懸念された。そこで、閉環メタセシス反応で 14 員環を構築した後に除去できる保護基としパラメトキシベンジル（PMB）基を選択し、14 員環マクロライド化合物の合成を行った（図 3）。

市販の 2,4,6-トリヒドロキシ安息香酸を出発原料としてカルボン酸と隣接ヒドロキシ基をアセトナイドエステル化した後、パラ位のヒドロキシ基をトリイソプロピルシリル（TIPS）基で保護してシリル保護体 **2** とした。続いて、6 位のヒドロキシ基をトリフラート化した後に鈴木カップリングを用いてビニル基を導入したところ、TIPS 基が反応条件で脱落したスチレン体 **3** が得られてきた。そこで、4 位のヒドロキシ基に PMB 基を導入することで所望のスチレン PMB 保護体 **4** を合成できた。得られた **4** に対して別途（*S*）-プロピレンオキシドから一段階で調製した光学活性アルキン **5** を NaHMDS 存在下でカップリングさせるとともに、ワンポットでテトラブチルアンモニウムフルオリド（TBAF）を加えてテトラメチルシリル（TMS）基を除去してエステル **6** を得た。フェノール性ヒドロキシ基にメトキシエトキシメチル（MEM）基を導入して化合物 **7** とした後、2-デオキシ-D-リボースから 5 工程で調製した Weinreb アミド **8** とアニオンカップリングさせてイノン化合物 **9** へと変換した。最後に、アルキン部分をアルキン - コバルト錯体へと変換することで閉環メタセシス前駆体 **10** を合成した。**10** に対して、第二世代 Piers-Grubbs 触媒［3］を用いて低温下で

閉環メタセシス反応を行った。しかしながら、目的の 11*E*-14 員環マクロライド化合物 **11** は全く得られず、得られたマクロライド化合物は全て 11*Z*配置の化合物 **12** のみであった。種々条件検討を行ったが目的の 11*E*体 **11** は一切得られなかった。

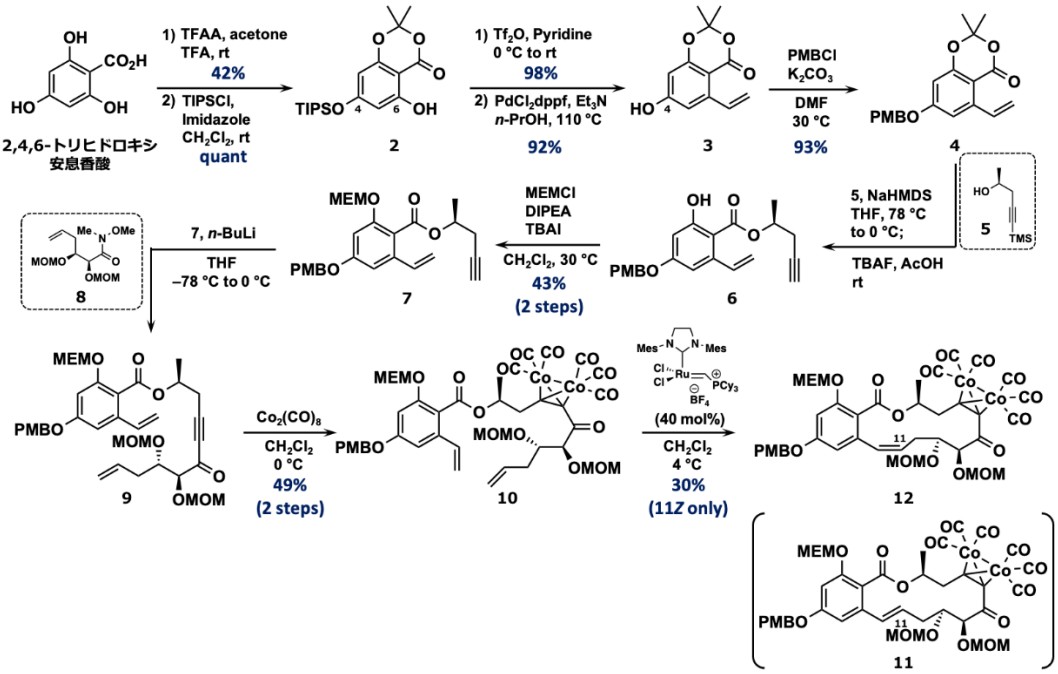


図 3. PMB 保護された 11*E*-マクロライド化合物 **11** の合成検討

閉環メタセシス反応を利用した **11** の合成検討。

以上のことから、芳香族部分のメトキシ基を変更した基質は閉環メタセシス反応を利用する「多様性志向型全合成経路」に不向きであることが示唆された。そこで、芳香環置換基が C11-C12 位の幾何異性に影響を与えない新たな「標的志向型全合成経路」を開発することとした。

合成計画の概略を示す（図 4）。C11-C12 位の幾何異性選択的アルケン構築には、トリフラート体 **13** とエンイン化合物 **14** による分子間 Heck 反応を利用すれば、熱力学的に安定な *E* 体化合物 **15** が得られると考察した。この段階でメチル基を PMB 基に変更したものを用いれば、合成後半で様々なリンカーを導入可能な中間体が得られると考えた。**15** から誘導したカルボン酸 **16** に対して分子内光延反応を行い、14 員環マクロライド骨格を構築する（化合物 **17**）。最後にフッ化水素で全ての保護基を除去することで所望の化合物（Ynone-LLZ or Ynone-LLZ ケミカルプローブ **1**）が合成できると考えた。まず、この合成経路の実現可能性を見るため、Ynone-LLZ を直接合成できる基質で合成を検討した（図 5）。

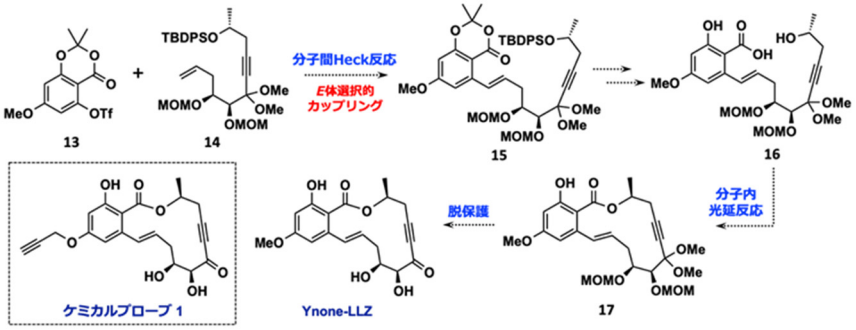


図 4. 新規合成計画

分子間 Heck 反応を鍵工程とした新規合成計画の概要。

市販の 2-デオキシ-D-リボースの二つのヒドロキシ基をアセトナイドで保護した後に Wittig 反応で増炭したアルコール **18** に対し、TEMPO 酸化、Weinreb アミドを導入することでアルケン **19** へと変換した。別途、市販の（*R*）-プロピレンオキシドから 3 工程で合成したアルキン **20** とアルケン **19** をアニオンカップリングしてイノン **21** とした後、MeOH 中でメシル酸を作用させるとケトン部分のジメチルアセタール化とアセトナイド基の除去が同時に進行してジオール体 **22** が得られた。**22** のジオール部分をメトキシメチル（MOM）基で保護してエンイン化合物 **14** へと導いた。Heck 反応のカップリングパートナーであるトリフラート体 **13** は、市販の 2,4,6-トリヒドロキシ安息香酸から既知の三工程によって 10 g スケールで合成した。**13** と **14** を $PdCl_2(PPh_3)_2$ 10 mol%と LiCl、Et_3N 存在下、115℃で 12 時間撹拌したところ所望の幾何異性を有する分子間 Heck 反応生成物 **15** を 83%で得ることができた。幾何異性については ^1H NMR のカップリング定数が望みの *E* アルケンに特徴的な値を示したことから決定した。ここからシリル保護基の除去とアセトナイドエステルの加水分解を経て、設定した環化前駆体 **16** を合成することができた。これに対して、THF 中 PPh_3 存在下で DIAD を作用させると、所望の分子内光延反応は円滑に進行し目的の 14 員環マクロライド構造の構築に成功した（化合物 **17**）。このマクロライド保護体 **17** に対してフッ化水素を作用させることで全てのアセタール系保護基を除去することができ、Ynone-LLZ の初の選択的合成経路を開発することに成功した。現在は、PMB 保護されたトリフラート体を用いて同様の反応が進行するか検討を行なっている。

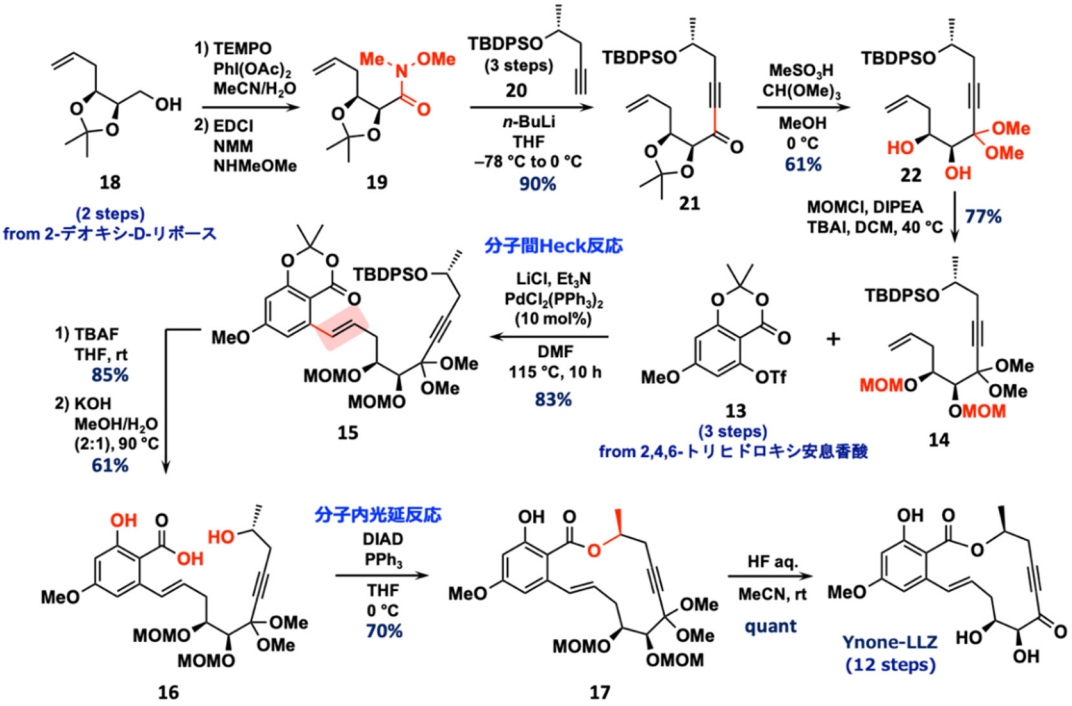


図 5. 標的志向型全合成経路

分子間 Heck 反応を鍵工程とした「標的志向型全合成経路」の合成スキーム。

考　察

分子間 Heck 反応を鍵工程に設定して Ynone-LLZ の選択的合成経路の開発を検討した。その結果、設定した分子間 Heck 反応は問題なく進行し、目的の幾何異性を有するカップリング生成物を高収率で得ることに成功した。この選択性は、生じるアルケンの熱力学的安定性に起因するため、メタ位に存在する芳香環置換基の影響は受けないと考えられる。今後は、メタ位酸素を PMB 基で保護したトリフラート体を用いて分子間 Heck 反応を行なった後、PMB 基の除去に続くプロパルギル基の導入を行う。その後の変換反応条件はアルキン部分に影響がないと考えている。

本合成経路を基盤としてケミカルプローブ **1** を合成後は、骨髄腫細胞に対して **1** を作用させ、その作用標的分子の pull-down アッセイを行う予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、徳島大学大学院医歯薬学研究部有機合成薬学分野の難波康祐教授、血液・内分泌代謝内科学の安倍正博教授、原田武志准教授および岡山大学大学院医歯薬学総合研究科の寺町順平准教授である。

文　献

1） Teramachi J, Tenshin H, Hiasa M, Oda A, Bat-Erdene A, Harada T, Nakamura S, Ashtar M, Shimizu S, Iwasa M, Sogabe K, Oura M, Fujii S, Kagawa K, Miki H, Endo I, Haneji T, Matsumoto T, Abe M. TAK1 is a pivotal therapeutic target for tumor progression and bone destruction in myeloma. Haematologica. 2021 May 1;106(5) 1401-1413. doi: 10.3324/haematol.2019.234476.

2） 特願-2020-553870, PCT/JP2019/42086 (WO2020/090700)「新規イノン化合物及びその用途」

3） Romero PE, Piers WE, McDonald R. Rapidly initiating ruthenium olefin-metathesis catalysts. Angew Chem Int Ed Engl. 2004 Nov 19;43(45):6161-5. doi: 10.1002/anie.200461374.