次世代型医薬品開発を目指した希少糖や核酸誘導体の合成と生物活性評価システムの構築

赤井　昭二*　實吉　尚郎**　小野　晶***

Synthesis of rare sugar and nucleos(t)ide analogues for the development of next-generation medicines and construction of the system for evaluating biological activity of their compounds.

Shoji AKAI*　Hisao SANEYOSHI**　Akira ONO***

1. 緒言

近年，癌細胞の増潤・転移などのメカニズムが分子レベルで解明されるにともない，分子標的薬の開発が進められている．これまでにない新規な構造を有する化合物は，新たな作用機構を示し，標的選択性を持つ医薬品開発の可能性が見出されてきた．つまり効果が高く副作用の少ない薬剤となる可能性である．

そのひとつは，エピジェネティクスの異常に着目した研究である．エピジェネティクスとは，DNA の塩基配列によらない遺伝子発現制御に関わる機構で，DNA の複製・組換えなど様々な生命現象に関与して，疾患の原因の一つであると推測されている[1]．もうひとつは，アンチセンス核酸などの核酸医薬を用いた手法である．例えば，核酸医薬の手法の一つであるアンチセンス法は，遺伝子の働きを阻害する．人工的に合成できるだけではなく原理的には配列を変えるだけで様々な標的（mRNA）に対応でき，より広範囲な疾患に対応することが可能と考えられる．それゆえ，抗体医薬や遺伝子治療薬とともに次世代型の医薬品として期待されている[2]．特に抗癌剤に注目すると核酸誘導体やペプチド誘導体が阻害剤として注目され，活発に研究されている．

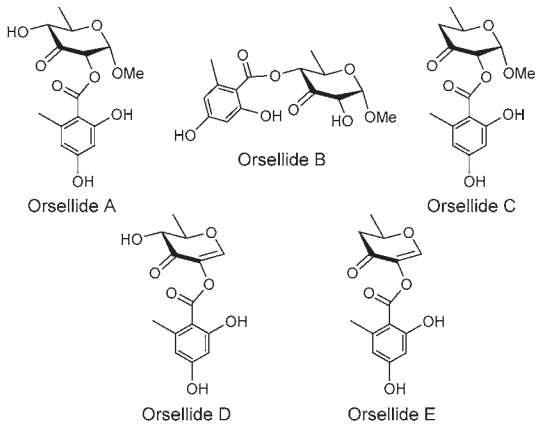
我々の研究グループでは，糖やアミノ酸，核酸を原料に，様々な生物活性物質や機能性物質の創製に日常的に取り組んでいる．それら物質の合成過程における中間物質には，様々な生物活性や機能性を秘めているが，それらを一つひとつ明らかにするためには，独自の生物活性評価システムを保有し，化合物をこまめにスクリーニングしていなければ，系統的な研究が難しいのが現状である．しかしながら，本学の中には，そのような研究を共同で進められる設備もプロジェクトも存在していなかった．そこで本共同研究では，我々研究者がこれまで合成してきた糖や核酸誘導体化合物ライブラリーの中で，阻害剤として次世代型の医薬リードになり得ると予想される物質を中心に，その誘導体をも含め再度合成し，生物活性評価システムを構築して評価するサイクルを確立して新規な医薬リード化合物の発見を目指すものである．特に本年度は，糖誘導体と，核酸誘導体に分けて，その合成や予備的に行った生物活性評価の結果について述べる．また，最後に現在構築中の生物活性評価システムについて簡単に報告する．

2.1. 希少糖を基盤とする抗腫瘍剤の開発研究

グルコース（ぶどう糖）に代表される単糖類は，生物のエネルギー源等として自然界に広く豊富に存在する．一方で，微量ながらも存在してきた単糖類も存在し，それらは希少糖と呼ばれる．それら希少糖の存在理由は，現在でも未だ明確には解明されていない．近年ではバクテリアや真菌類の二次代謝産物としても，希少糖が見出され，その生物活性と構造との相関が注目されている．

これに関連し，2006年に Zeeck らは，真菌類の一種である *Chaetomium sp.*（ケタマカビ）の二次代謝産物から，新たに5種の天然物オルセリド A-E を単離・構造決定した（図1）[3]．

これらは，希少糖である 6-デオキシ-3-ケト-ヘキソースを骨格にオルセリン酸がエステル結合した特異な構造を持つ化合物である．また，これらは大腸菌，枯草菌，黄色ブドウ球菌に対して感受性をもつ抗菌性物質であると報告された[3]（図1）．このオルセリド



単離されたオルセリド類の抗菌活性（ディスク法による）

化合物	*E. coli*（大腸菌）	*B. subtilis*（枯草菌）	*S. aureus*（黄色ブドウ球菌）
Orsellide A, B	11	18	9
Orsellide C	14	30	12
Orsellide D	12	21	8
Orsellide E	---	13	---

※細胞培養器にそれぞれの化合物を15μg滴下したときの菌の繁殖抑制領域の直径（mm）

図1．天然産オルセリド類の構造と生物活性[3]

*准教授　物質生命化学科
Associate Professor, Dept. of Material and Life Chemistry
**助教　物質生命化学科
Assistant Professor, Dept. of Material and Life Chemistry
***教授　物質生命化学科
Professor, Dept. of Material and Life Chemistry

の基本骨格であるデオキシヘキソース類は，抗生物質や抗腫瘍剤をはじめとする生物活性物質中に多く含まれ[4]，その活性発現にしばしば重要な役割を担っていることが良く知られているが，真菌類から，しかも抗菌物質として見つかった例としては極めて稀である．一般的に抗菌活性物質には，同時に他の生物活性を示すことが多く，抗腫瘍活性や抗マラリア活性などが期待できる．そこで我々研究グループでは，このオルセリドが持つ特異な糖誘導体（希少糖誘導体）の構造と生物活性に興味を持ち，天然型オルセリドとその誘導体を合成し，生物活性試験を行うことで，新規な生物活性を持つ医薬リードを見出せるものと期待した．

まず，天然型オルセリドを図2に従って合成した．

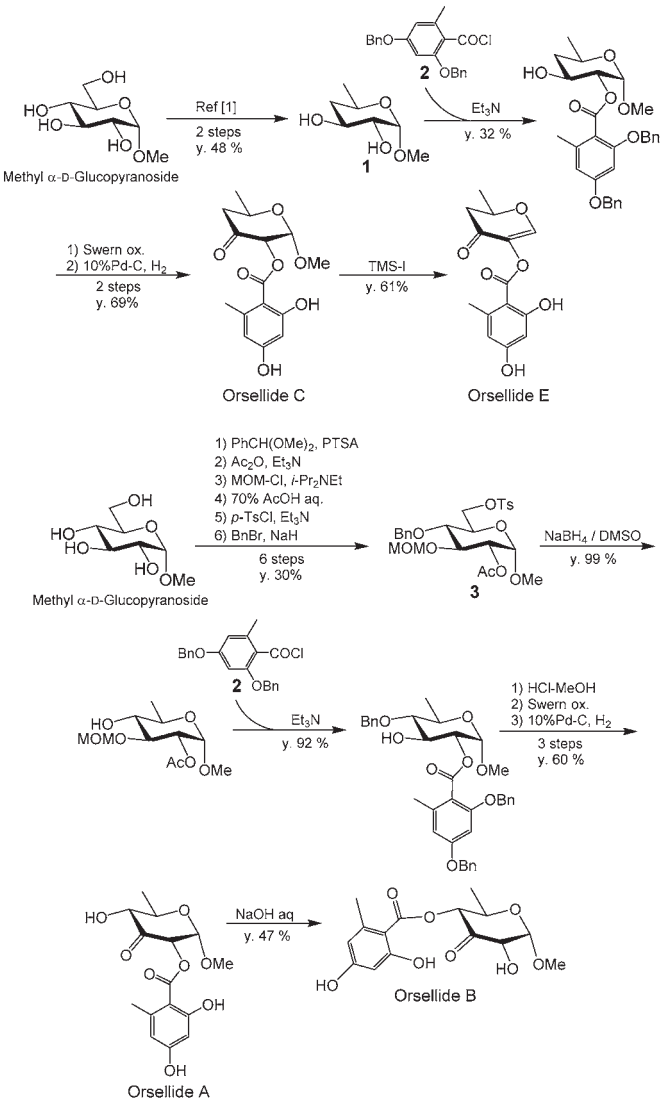


図2．天然型オルセリド A-C，E の合成

Methyl α-D-glucopyranoside を出発原料に，文献[5],[6]にしたがって 4, 6-dideoxy 体**1**を合成後，オルセリン酸誘導体**2**と縮合，次いで酸化することでオルセリド C を，さらにアノマーを脱離させてオルセリド E を合成した．同様に Methyl α-D-glucopyranoside から常法に従って6位を選択的にスルホン酸エステル化した**3**とした後，6位デオキシ化，先と同様にオルセリン酸誘導体**2**と縮合，次いで酸化することでオルセリド A を，その後アルカリ溶液によってアシル基を転位させて，オルセリド B を得た．

得られたオルセリド A－C，E の抗菌活性を MICs 法によって簡易的に評価した（表1）．

表1．細胞増殖最小阻害濃度（MICs μg/mL）．

Compound	*E. coli*（大腸菌）	*B. subtilis*（枯草菌）	*S. aureus*（黄色ブドウ球菌）	*S. typhimurium*（チフス菌）
Orsellide A	>1024	>1024	>1024	>1024
Orsellide B	>1024	>1024	>1024	>1024
Orsellide C	>1024	>1024	1024	>1024
Orsellide E	>1024	128	64	512

しかし，オルセリド E に弱いながら抗菌活性が見られただけで，Zeeck らが報告しているほど顕著な活性[3]は残念ながら見られなかった．菌株の違いにより活性に差異が生じる可能性も残されたが，そう大きく異なる実験結果は得られ無いと我々は判断し，他の側面へ研究を切り替えることとした．すなわち，前述したように天然産の抗菌物質には，同時に抗腫瘍活性や抗マラリアなどを示す事例が多いことから，合成したオルセリド A－C，E の抗腫瘍活性と抗腫瘍剤の効果を増強させる効果（増感作用）について予備的に試験した．抗腫瘍剤には広い癌種に効果があり一般的なアントラサイクリン系のドキソルビシン（DOX）を用い，腫瘍細胞には A549肺ガン細胞を用いた．その結果を図3に示す．

いずれのオルセリドにも抗腫瘍剤（DOX）の効果を強める増感作用を有する可能性が示唆された．またオルセリド E には単独でも抗腫瘍活性がみられた．そこで，さらにエステル部分の異なる誘導

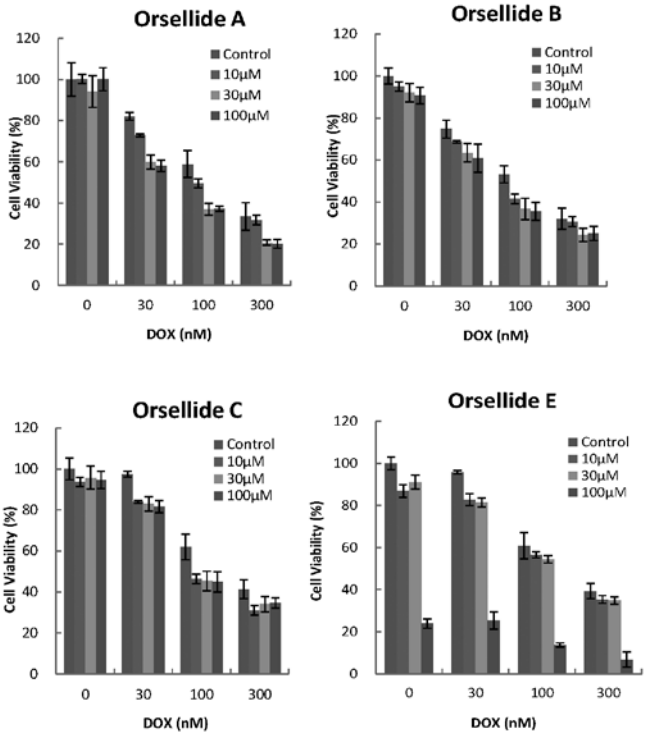


図3．MTT 法によるオルセリド類の A549腫瘍細胞に対する細胞毒性試験の結果

※A549肺腫瘍細胞；試験化合物：Orsellide A，B，C，and E）；抗腫瘍剤：ドキソルビシン（DOX）

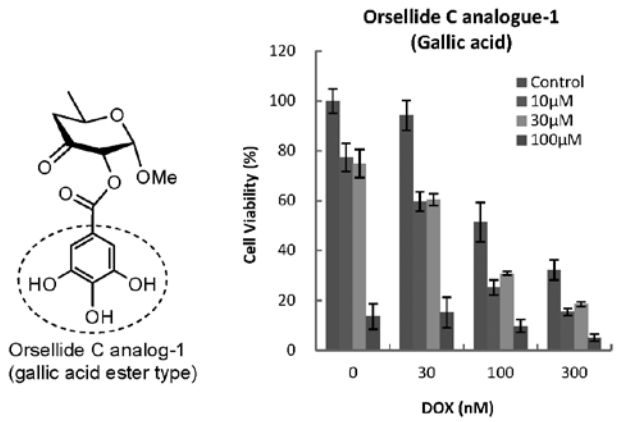


図4．オルセリドC誘導体-1の細胞毒性試験の結果

※A549肺腫瘍細胞；試験化合物：Orsellide A，B，C，and E）；抗腫瘍剤：ドキソルビシン（DOX）

※没食子酸は，日本茶カテキンに多く含まれるエピガロカテキンガレートのエステル成分である．このカテキンは，強い抗酸化作用もち抗腫瘍活性も示唆されているが，明確な根拠はない[7]．

体，オルセリドC誘導体（analog-1：没食子酸エステル型）を合成し，その細胞毒性試験を行ったところ，オルセリドEと同様に単独での抗腫瘍活性が見られた（図4）．

これらの結果からエステル部分の交換では，その活性には劇的な変化が見られないこと，対応する芳香族カルボン酸およびエステルのみでは，これまで抗腫瘍活性を明確に示すデータが見られないことから，オルセリン酸や没食子酸が特異なこのケトヘキソース（希少糖）との複合体になることで腫瘍細胞へ何らかの働きがあるものと推測される．

現段階での詳細は割愛させていただくが，現在，デオキシおよびケト-ヘキソース誘導体の合成をさらに行い，その細胞毒性試験を進めており，希少糖の構造－活性相関についてより詳しい知見が得られるものと考えている．今後，新規な次世代型抗腫瘍剤の開発につながる知見が得られるものと期待する．

2.2．核酸誘導体を基盤とする抗腫瘍剤の開発研究

合成オリゴヌクレオチドを基盤構造とする医薬品は総称して核酸医薬と呼ばれる．この核酸医薬は，化学合成で製造することができ，近年開発が盛んな抗体医薬と同様（あるいはそれ以上）の高い標的選択性を有している．そのため核酸医薬は，低分子医薬と抗体医薬の双方の利点を兼ね備えている．加えて，核酸医薬は，疾患対象が広く低分子や抗体医薬では，対応が困難であった細胞内部の標的（mRNAやmiRNA）にも設計が可能であり，次世代の分子標的薬として期待されている．以上のように，非常に潜在性の高い医薬品であるが，市場に出た例は少数に過ぎない．その主な原因は，核酸医薬特有の分子構造により，作用部位への薬剤の送達が困難であることが挙げられる．現在，世界中で核酸医薬のドラッグデリバリーシステム（Drug Delivery System＝DDS）の研究が盛んに行われている．本研究では，次世代型の医薬品開発を目指し，核酸医薬開発，とくにDDSに必要な新規生分解性ユニットの開発について以下検討した．

核酸医薬の主な作用部位は，細胞内であり細胞内部に到達する必要がある．しかしながら，核酸医薬は，その分子構造中に多数の負電荷を有するため，細胞膜を透過しにくい特徴を持つ．先にも述べたが，核酸医薬開発の中心は，デリバリーと同義であるといっても過言ではない．現在利用されているアプローチは，1）キャリア法（ナノ粒子など）2）プロドラッグ法である（図5）．上記アプローチに加えて，細胞膜透過性ペプチドや糖などの機能性分子をコンジュゲートする手法も利用される．そこで本年度の研究では，特に核酸医薬のプロドラッグ法に利用可能な細胞内で除去可能な保護基の開発について検討した結果を報告する．

核酸医薬のプロドラッグ化は，1990年代に最初に報告された[8]．リン酸ジエステル部位に細胞内のエステラーゼにより除去可能な保護基を導入して，可逆的かつ電荷的に中性なリン酸トリエステルとするものであった．このオリゴヌクレオチドは，細胞膜を透過するだけではなく生体液中に豊富に存在する核酸分解酵素に対して抵抗性を示した．さらに，保護基はエステラーゼにより除去されることが示された．

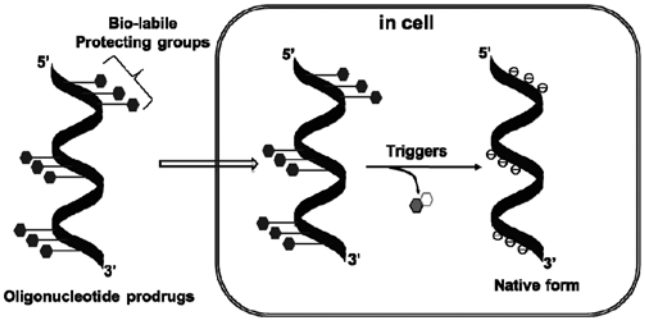


図5．核酸医薬プロドラッグの期待される活性化機構

近年になり，エステラーゼ応答性のRNA干渉能を持つRNAの合成と生物学的評価がなされ，保護基の除去反応が活性のスイッチを担うことが明らかとなった[9]．

我々の研究グループにおいても，核酸医薬のプロドラッグ化を志向して，ある種の癌細胞内にしばしば見受けられる低酸素環境での還元反応に注目した保護基の開発を行ってきた[10]．(図6)

3-(2-ニトロフェニル）プロピル基を新規に設計し，リン酸ジエステル部位に対して導入することにした．期待される除去機構は，細胞内でニトロ基が還元され，引き続く環化反応により除去されるものである．

紙面の都合上，合成スキームは省略するが，標準的なDNA固相合成プロトコールに従って保護基を有するオリゴヌクレオチドを合成できた．ニトロ基の還元によって保護基が除去されるかどうか，試験管内にて保護基の除去実験を行った．図7(a)は，還元によって除去可能な保護基を有するオリゴヌクレオチドの結果である．市販のニトロレダクターゼを用いて除去反応をおこなったところ，速やかに保護基が除去された．一方，ニトロ基が無い保護基は，酵素を添加しても除去されることはなかった．

ニトロ基の還元を引き金として脱保護可能な生分解性保護基の開発に成功した．次に，この保護基を足場にして，核酸医薬に対する生体適合性の付与や細胞内動態の改善を可能にする機能性分子をとりつける簡便な手法の開発を行った[11]．設計としては，先ほど

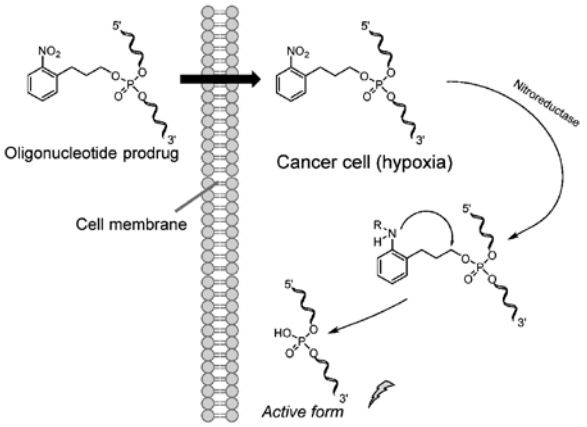


図6. 癌細胞内で活性化される核酸医薬の設計と期待される保護基の脱保護機構

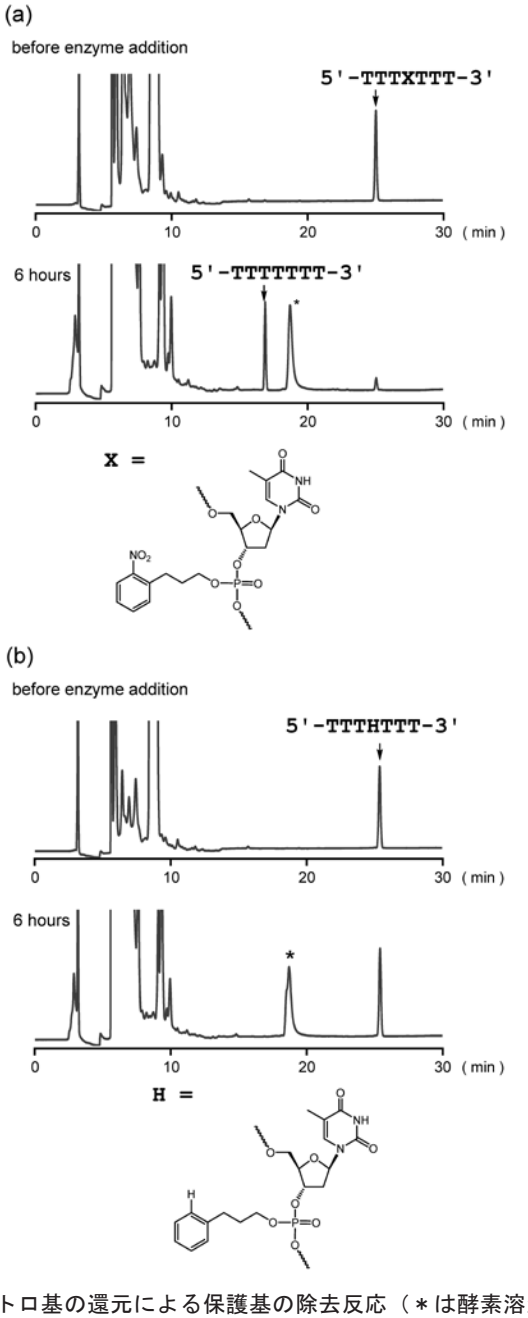


図7. ニトロ基の還元による保護基の除去反応（＊は酵素溶液由来のピーク）

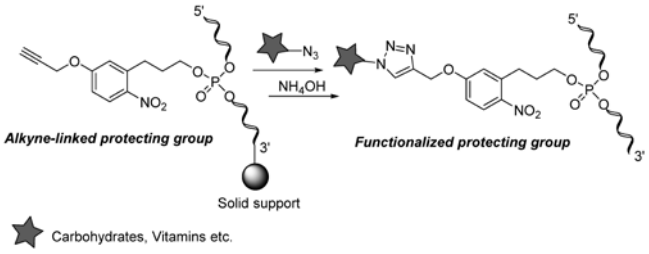


図8. 機能性分子で修飾された保護基を有する核酸医薬の合成

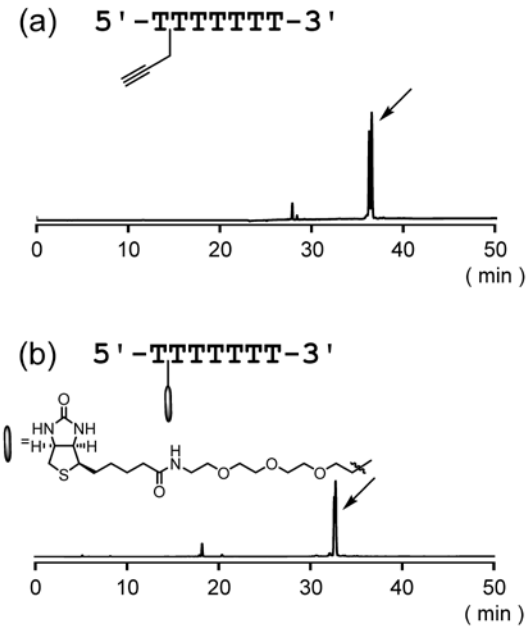


図9. 機能性分子で修飾された保護基を有する核酸医薬の HPLC チャート(a)CuAAC 反応なし(b)CuAAC 反応後

の保護基上にアルキン残基を導入し，copper-catalyzed azide alkyne cycloaddition（CuAAC）reaction を用いて機能性分子を簡便に導入できる構造とした（図8）.

アルキン残基を有する保護基が導入されたオリゴヌクレオチドを固相担体上で合成した．図9(b)は，固相担体からの切り出しを行うことなく，機能性分子（ビオチン）を取り付けた HPLC チャートである．図9(a)は，CuAAC 反応を行わずに，固相担体から切り出したのみの結果である．この結果から，定量的に機能性分子のコンジュゲーションが行えたことを示している．以上より，簡便に機能性残基を核酸医薬のバックボーン上に取り付けることが可能な手法を開発できた.

詳細は割愛させて頂くが，機能性分子が導入された保護基は，ニトロ基の還元によって同様に除去されることを確認している.

今後は，低酸素培養した癌細胞内部で実際に除去されるか，現在構築中の生物活性評価システムを用いて検討を進める.

2.3. 生物活性評価システムの整備・構築

有望な化合物をもれなく見つけるためには，外部への活性試験の依頼ではなく，自前で活性試験を適宜行えることが鍵となる.

平塚キャンパス理学部を含め，動物細胞の培養とそれを用いた生物活性試験を共同研究できる教員および設備は残念ながら無かっ

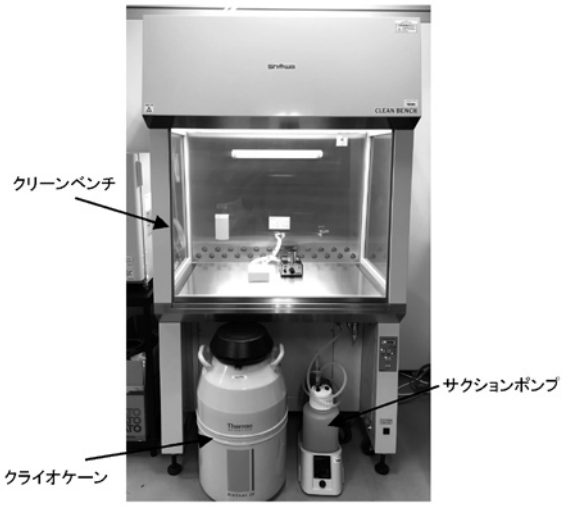


図10．クリーンベンチー式と細胞の凍結保用クライオケーン

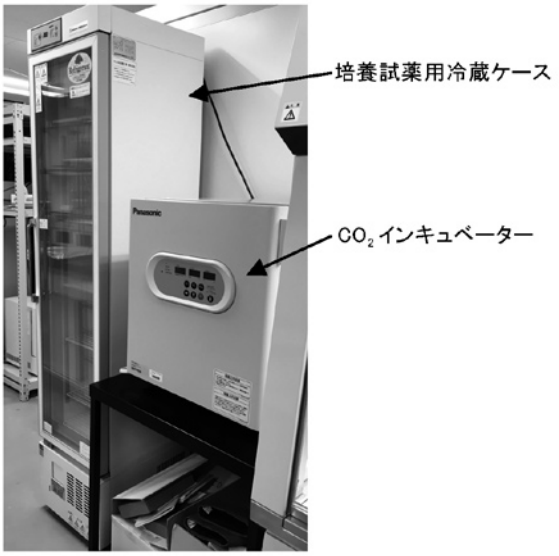


図11．CO_2インキュベーターと細胞培養試薬用冷蔵ケース

たため，一からすべてを揃え実験技術も確立することにした．

図10，図11のように，細胞培養と活性評価に不可欠なクリーンベンチ，CO_2インキュベーター，試薬保管用冷蔵ケース，細胞凍結保存用クライオケーンを揃えることができた．実験技術に関しては，細胞の培養（継代）について専門機関で講習を受け習得した．

今後，細胞観察用の位相差・蛍光顕微鏡が加われば，培養および簡易的な活性試験を開始できるようになる．また，合成実験と並行して，詳細な活性試験の実施方法について，これまでの共同研究者から教示いただけるように準備を進めている．

4．結言

希少糖や核酸誘導体には，我々が目的とした以外の生物活性を持つものが，今後，生物物活性試験を行うことで数多く見出せるものと考えられる．本共同研究によって整備された生物活性評価システムを用いて，来年度以降，これまでに合成してきた数多くの新規化合物についても，もう一度精査して，活性試験を行うとともに，今年度得られた結果を基に，さらに高活性の化合物の合成に取り組む予定である．

最後に，現在，生物活性評価システムは構築・整備中であり，ここに記された生物活性については，これまで共同研究を行ってきた新潟薬科大学応用生命科学部の西田浩志准教授と永塚隆弘助教，岡山大学薬学部の勝孝教授にお願いし，測定いただいた結果である．この場をかりて感謝申し上げる．

5．参考文献

［1］延山嘉眞，牛島俊和，エピジェネティクスと発がん，臨床化学，**2007**，*36*(4)，288-295.

［2］横田隆徳，仁科一隆，桑原宏哉，核酸医薬を用いた遺伝子治療の展望，神経治療，2016，*33*(3)，303-306.

［3］O. Schlörke, A. Zeeck, Orsellides A－E: An Example for 6-Deoxyhexose Derivatives Produced by Fungi, *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 1043-1049.

［4］Deoxysugar find in macrolide antibiotics consist of a core aglycone, of polyketide origin: Erythromycin, Tylosin, and Spinosyn A *etc.*

［5］V. Velvadapu, R. B. Andrade, Concise syntheses of D-desosamine, 2-thiopyrimidinyl desosamine donors, and methyl desosaminide analogues from D-glucose, *Carbohydr. Res.*, **2008**, *343*, 145-150.

［6］S. Hanessian, T. Focken, X. Mi, R. Oza, b. Chen, D. Ritson, R. Beaudegnies, Total Synthesis of (＋)-Ambruticin S: Probing the Pahrmacophoric Subunit, *J. Org. Chem.*, **2010**, *75* (16), 5601-5618.

［7］a) C. Hu , D. D. Kitts, Evaluation of antioxidant activity of epigallocatechin gallate in biphasic model systems in vitro, *Mol. Cell Biochem.*, **2001**, *218* (1-2), 147-155; b) M. Leone, D. Zhai, S. Sareth, S. Kitada, J. C. Reed, M. Pellecchia, Cancer prevention by tea polyphenols is linked to their direct inhibition of antiapoptotic Bcl-2-family proteins, *Cancer Res.*, 2003, *63* (23), 8118-8121.

［8］G. Tosquellas, K. Alvarez, C. Dell'Aquila, F. Morvan, J.-J. Vasseur, J.-L. Imbach and B. Rayner, The pro-oligonucleotide approach: Solid phase synthesis and preliminary evaluation of model pro-dodecathymidylates, *Nucleic Acids Res*., **1998**, *26*, 2069-2074.

［9］B. R. Meade, K. Gogoi, A. S. Hamil, C. Palm-Apergi, A. v. d. Berg, J. C. Hagopian, A. D. Springer, A. Eguchi, A. D. Kacsinta, C. F. Dowdy, A. Presente, P. Lonn, M. Kaulich, N. Yoshioka, E. Gros, X.-S. Cui and S. F. Dowdy, Efficient delivery of RNAi prodrugs containing reversible charge-neutralizing phosphotriester backbone modifications, *Nat. Biotechnol.* , **2014**, *32*, 1256-1261.

［10］H. Saneyoshi, K. Iketani, K. Kondo, T. Saneyoshi, I. Okamoto and A. Ono, Synthesis and Characterization of Cell-Permeable Oligonucleotides Bearing Reduction-Activated Protecting Groups on the Internucleotide Linkages, *Bioconjug. Chem,* **2016**, *27*, 2149-2156.

［11］H. Saneyoshi, K. Kondo, K. Iketani and A. Ono, Alkyne-linked reduction-activated protecting groups for diverse functionalization on the backbone of oligonucleotides, *Bioorg. Med. Chem,* **2017**, *25*, 3350-3356.