

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活性評価

赤井 昭二* 實吉 尚郎** 小野 晶***

Syntheses and biological evaluation of rare sugar and nucleotide analogues toward the next-generation medicines.

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

1. 緒言

悪性腫瘍（がん）は、今や日本人の2人に1人がかかり、約3人に1人が亡くなる病気である。かつて「がん」は不治の病と恐れられていたが、医学や薬学の進歩により治らない病気ではなくなってきた^[1]。がんの転移や浸潤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、より効果的な治療薬として分子標的薬の研究が精力的に進められている。その結果、これまでにない新規な構造の化合物には、新たな作用機構と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。

このような背景から、エピジェネティクスの異常に着目した研究^[2]や、アンチセンス核酸医薬を用いた研究が精力的に進められている。これらは、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^[3]。

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取り組んでいる。それら物質の合成過程における中間体は、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、予備的活性評価を外部に委託することなく行える必要がある。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した。昨年度は、糖誘導体と核酸誘導体の合成と主要細胞の培養と活性評価系の構築を行い、簡易的ではあるが生物活性評価が行えるようになったことを報告した^[4]。2年目の今年度は、高性能な光学蛍光位相差顕微鏡とリアルタイムデジタルカメラを含む機器を購入し、細胞内への化合物の移行や、作用機序の特定を試みたので報告する。

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。希少糖の存在の理由は、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。

天然物オルセリド A-E は、ケタマカビの2次代謝産物から見出された特異な希少糖誘導体であり、黄色ブドウ球菌を含む菌類に対し抗菌作用を持つという極めて稀な物質と報告された^[5]。われわれ研究グループでは、このオルセリド類の希少糖骨格と特異な生物活性に興味を持ち、誘導体を含むそれらの合成に成功し、生物活性を調べた（図1）^[4]。

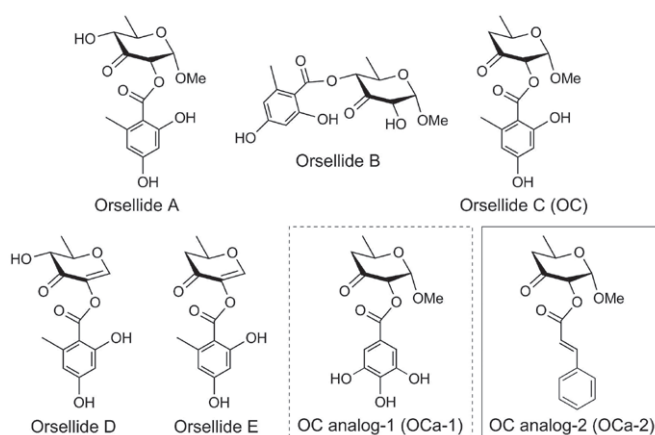


図1. 天然産オルセリド類と誘導体の構造^[4]

その結果、予期に反しオルセリド E に弱いながら抗菌活性が見られただけで、報告ほどの顕著な活性^[5]が確認できなかったが、新規に抗腫瘍活性と抗腫瘍剤（DOX）の効果を増強させる効果（増感作用）を有する可能性が示唆された。さらに、誘導体（OC analog-1: 没食子酸エステル型）には、同様に単独での抗腫瘍活性が見られた。我々は、特異なケトヘキソース（希少糖）と芳香族エステルが複合

*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

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し、今年度は、さらなる誘導体合成と活性試験により、構造-活性の相関を明らかにすることにした。まず、桂皮酸エステル型誘導体 (OC analog-2) を同様に合成し、HT-29 (ヒト大腸癌細胞) を用いた細胞増殖阻害作用を測定した。

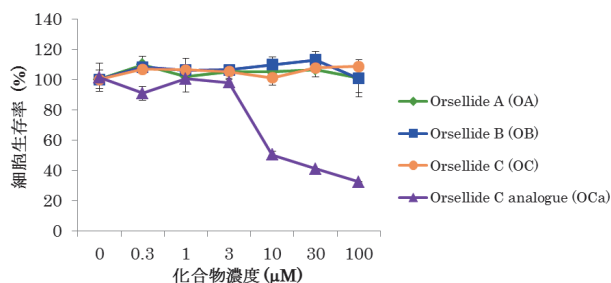


図 2. HT-29 癌細胞の生存率に対するオルセリド類の影響

※0.3 から 100μM の濃度範囲で化合物を培地に添加して培養し、24時間後の細胞生存率を MTT 法により測定した。誤差棒は標準偏差 (n=3)。化合物を添加しない細胞を対照群 (100%) とした。また図中の OCa は、桂皮酸エステル型誘導体 (OC analog-2) を示す。

その結果、OC analog-2 の 50%増殖阻害濃度 (IC₅₀) は ≤10mM となり、100μM では、30%の生存率となった。しかし天然産オルセリド A-C は、0.3-100μM の濃度域では阻害作用を示さなかった。

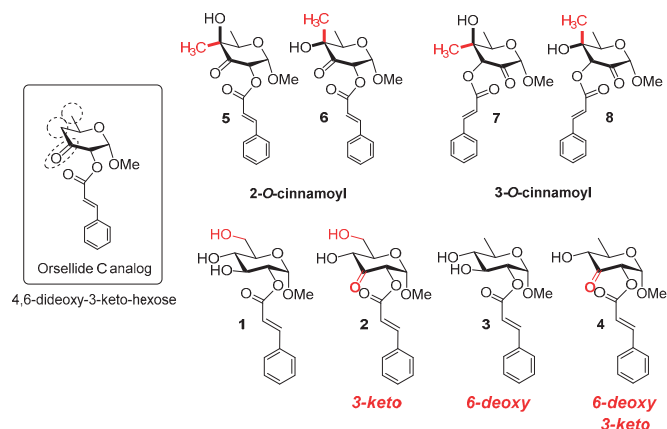


図 3. 活性発現に必要な構造を明らかにするために新たに合成したオルセリド C 誘導体

一方、活性発現に 4 位および 6 位のデオキシ構造と 3 位のカルボニル構造が、それぞれ必要か否かを確認するため、図 3 示す OC analog-2 誘導体 (1 - 8) をそれぞれ合成 (詳細は省略) し、増殖阻害作用を確認したところ、阻害作用は確認できなかった。これにより、抗腫瘍活性の発現には、4 位と 6 位のデオキシ構造と 3 位のカルボニル構造の 3 つが同時に必要であることが明らかとなった。

さらに、誘導体合成と並行して OC analog-2 の作用機序を明らかにするため、細胞の形態変化や、各酵素の発現量などを確認した。細胞の形態変化から、細胞の萎縮と細胞膜の不鮮明化が見られアポトーシスを誘導したものと推測された。様々な対象化合物と比較検討の結果、ヒストンの脱アセチル化酵素 (HDAC) を阻害するスルホラファン (SFN) と同様同等の細胞増殖阻害作用を示すことが明らかとなった (図 5)。

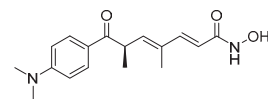
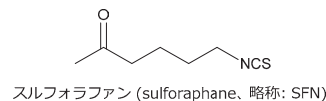


図 4. 既知のヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤として用いたスルホラファン (SFN) とトリコスタチン (TSA) の化学構造

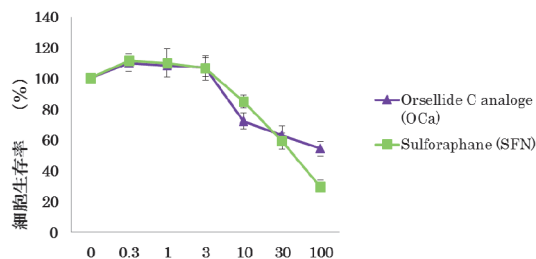


図 5. HT-29 癌細胞の生存率に対するオルセリド C 誘導体 (OC analog-2) の影響

※HDAC (ヒストン脱アセチル化酵素): HDAC とは、DNA の基本構造 (ヌクレオソーム) を構成するヒストン (タンパク質) の修飾酵素の 1 つであり、DNA の塩基配列以外の遺伝子発現の制御物質のこと。また図中の OCa は、桂皮酸エステル型誘導体 (OC analog-2) を示す。

より詳細な阻害作用を分子レベルで確認するため、SFN と同様に HDAC 阻害剤として良く知られるトリコスタチン A (TSA) を用いて比較対象実験を行った。図 6 に示したように、既知の HDAC 阻害剤 (SFA と TSA) と同様にヒストン H4 および H3 のアセチル化を顕著に阻害し、その結果、H2Ax のリン酸化と共に細胞周期が停止し、それに伴って p21 の発現と H2A のリン酸化が引き起こされたものと推察された。

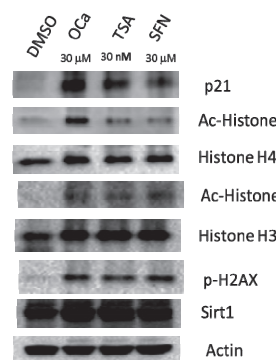


図 6. 細胞の HDAC 関連分子に対する OC analog-2、TSA および SFN の作用

いずれにおいても OC analog-2 は既知の HDAC 阻害剤と同等かそれ以上の強い作用を示すことが明らかとなった。さらに、HDAC の阻害活性を 2 種の方法で調べた結果、OC analog-2 は HDAC へ直接作用するのではなく間接作用することが明らかとなった (図 7)。

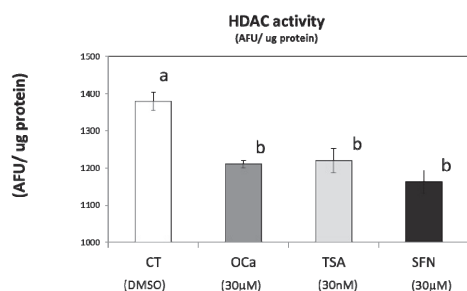


図 7. HDAC 活性に対する OC analog-2 の影響

以上の結果から、OC analog-2 は既存の HDAC 阻害剤 SFN 300μM や TSA 30nM とほぼ同等で、無添加の細胞系と比べて優位な阻害活性を示し、直接的に HDAC に作用するのではなく、細胞内に取り込まれた際に何らかの修飾を受けた場合のみ HDAC を阻害すると考えられる。したがって、腫瘍細胞のような代謝回転が極めて速い細胞における増殖抑制作用は顕著となることが示された。細胞核内に存在する HDAC には直接作用せず核内へ移行する過程で阻害活性を獲得する新規な化合物として化学的・分子生物学的に興味深い結果が得られた^[6]。

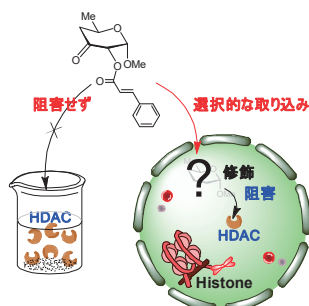


図 8. OC analog-2 の抗腫瘍活性発現の作用イメージ

今後は、どのような修飾をどの段階で受けるのかについてさらに詳しく調べていく予定である。

2. 2. 核酸誘導体を基盤とする抗腫瘍剤の開発研究

核酸医薬は、比較的短鎖の合成オリゴヌクレオチドを基盤構造とする有機分子である。核酸医薬は、低分子医薬と同様に化学合成で製造することができる。また、近年開発が盛んな抗体医薬と同等（あるいはそれ以上）の高い標的選択性をもつ。それゆえ核酸医薬は、低分子医薬と抗体医薬の双方の利点を兼ね備えた分子といえる。さらに、遺伝情報に基づいて塩基配列を変えるだけで新薬の設計が理論的には可能であり、そのため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、これまでに市場に出た例はわずか数えるほどしかない。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デリバリー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、次世代型の医薬品候補である核酸医薬の開

発を目指し、特に 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。

オリゴヌクレオチド 5'-末端への簡便な修飾を可能とする生分解性リンカーの開発

本年度は、オリゴヌクレオチドの 5'-末端へ簡便に機能性分子を結合でき、かつ癌細胞内部の還元的環境により開裂するリンカーの開発を行った。

核酸医薬は、そのままでは標的組織や細胞へのデリバリーは困難である。それゆえ、核酸医薬に対し、細胞内への取り込みを促進する機能性分子との結合が試みられている^[7,8]。たとえば、糖、ペプチド、ビタミン、脂肪酸などは細胞内への取り込みを促進することが知られている。しかしながら、結合した機能性分子が核酸医薬の活性をしばしば低下させる^[9]。そこで本研究では、先に述べた機能性分子を簡便に核酸医薬へと結合でき、癌細胞内の低酸素環境領域に到達後、リンカーが開裂し、活性の核酸医薬を放出可能なリンカーを設計した。

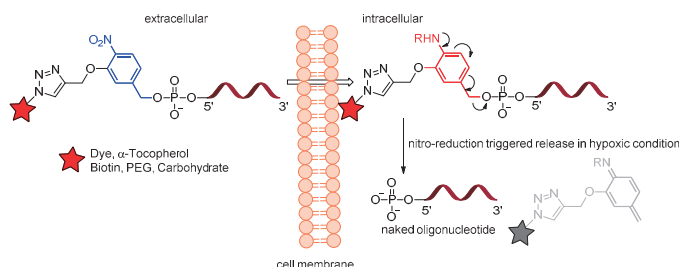


図 9. 還元応答性リンカーにより機能性分子が結合した核酸医薬の期待する動作機構

簡便に機能性分子を結合できるようにアルキン残基をリンカー構造に組み込むことで、多様な核酸医薬を系統的に合成可能となると期待した。また、ヌクレオチドに組み込まず、リンカー自体をアミダイト試薬とすることで核酸塩基や糖-リン酸バックボーンの種類を問わず、全ての核酸医薬に対応できると考えた。

市販のニトロベンズアルデヒドを出発とし、常法にしたがいアミダイトユニットへと導いた。

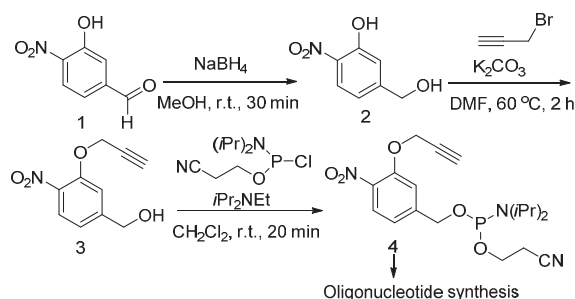


図 10. リンカー試薬の合成

DNA 自動合成機にて、所望のオリゴヌクレオチドの鎖伸長反応を行い、最後に 5'-末端にリンカーのアミダイトを取り付けた。固相担体の一部をアンモニア水によって切り出し HPLC にて純度を検定したところ、リンカーは、ほぼ定量的にオリゴヌクレオチドに導入さ

蛍光標識し、さらに保護基 Y を導入したオリゴヌクレオチドを HeLa 細胞培養液に添加した (図 15)。培養液を除去した後、細胞を固定化した。図 15-A, B で細胞の位置が分かる。蛍光顕微鏡では細胞の位置に蛍光が観測された (図 15-b)。無保護のオリゴヌクレオチドでは蛍光が観測されなかった (図 15-a)。今回の測定ではオリゴヌクレオチドが細胞膜に結合しているのか、細胞内に入ったのか決定できない。今後の課題である。

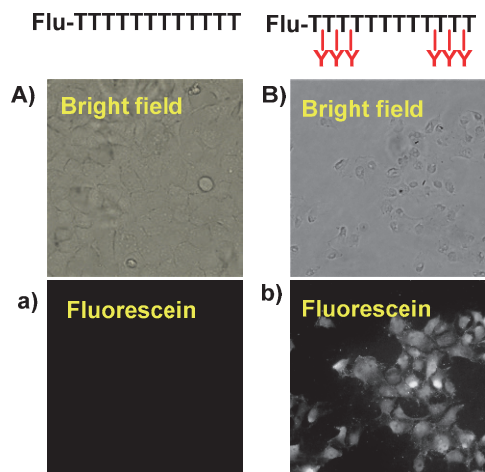


図 15. 蛍光標識オリゴヌクレオチドの細胞内取り込み実験

3. 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。

また本年度にセルカウンター(OLYMPUS Cell Counter model R1)や蛍光位相差型培養顕微鏡(OLYMPUS)を導入して継続的な細胞培養と蛍光観察が可能となり、化合物の 1 次活性試験が容易に可能となった。今後は、整備された機器を活用してここに得られた成果をさらに精査していくとともに、これまでに合成された化合物についても活性試験を行って、さらに高活性の化合物の合成に取り組んで行きたい。

最後に、共同研究者である新潟薬科大学応用生命科学部西田浩志准教授、永塚隆弘助教、岡山大学薬学部勝孝教授にこの場を借りて感謝申し上げる。

4. 参考文献

- [1] 国立がん研究センター最新がん登録・統計データ
https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html
- [2] 延山嘉真, 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.
- [3] 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.
- [4] 赤井昭二, 實吉尚郎, 小野晶, 「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」, *神奈川大学工学研究*, 2017, 1, 103-107.
- [5] O. Schlörke, A. Zeeck, “Orsellides A-E: An Example for 6-Deoxyhexose Derivatives Produced by Fungi.”, *Eur. J. Org. Chem.*, **2006**, 1043-1049.
- [6] 赤井昭二, 青島啓太, 西田浩志, 小島勝, 永塚貴弘, 佐藤眞治, 佐藤憲一, 抗癌剤. 特許第 6338276 号, 2018.
- [7] J. Winkler, “Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications.”, *Ther Deliv*. **2013**, 4, 791-809.
- [8] R. L. Juliano, “The delivery of therapeutic oligonucleotides.”, *Nucleic Acids Res*. **2016**, 44, 6518-6548.
- [9] Y. Ji, J. Yang, L. Wu, L. Yu, X. Tang, “Photochemical Regulation of

Gene Expression Using Caged siRNAs with Single Terminal Vitamin E Modification.”, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2016**, 55, 2152-2156.