

学位論文題名

制癌性ヌクレオシド 3'-エチニルシチジンに関する 医薬化学研究：大量合成法の確立、構造活性相関、 及びプロドラッグ化

学位論文内容の要旨

1. はじめに

3'-エチニルシチジン (ECyd) は RNA ポリメラーゼ阻害を作用機序とし、*in vitro* 及び *in vivo* で強力な制癌活性を有するヌクレオシド系代謝拮抗剤である¹。ECyd の臨床開発を進めるため、その大量合成法を確立するとともに、優れた制癌活性を有する ECyd を母化合物とした有用性の高い制癌剤の創製を試みた。種々の糖部修飾ヌクレオシドを合成し構造活性相関を検討するとともに、癌組織への作用選択性の向上を志向した種々のプロドラッグ化を実施した。

2. ECyd の大量合成法²

当初の ECyd 合成経路で使用されているクロマトグラフィーによる精製及び毒性の高い試薬を回避した大量合成法の確立を行った。1,2-O-イソプロピリデン-D-キシロースを原料とし、結晶性の良好な 5-O-(4-クロロベンゾイル)糖を中間体として選択した。各種グリコシルドナーを合成し、シリル化核酸塩基との Vorbrüggen グリコシル化反応を検討した。イソブチリルオキシ基が有効な脱離基及び隣接関与基となることを見出し、ECyd の大量合成法に利用した。

3. 構造活性相関³

2'-又は 3'-修飾ヌクレオシドを種々設計・合成し、マウス白血病 L1210 細胞及びヒト咽頭癌 KB 細胞に対する細胞増殖抑制効果を評価した。3'-置換基の嵩高さはその制癌活性に大きく影響した。また、ECyd のエチニル基の位置異性及び立体異性、更に水酸基除去誘導体に増殖抑制効果が観察されなかったことより、制癌活性には 3' β -エチニルリボ型構造が必須であることを明らかにした。さらに、4' α -修飾ヌクレオシドの制癌活性を系統的に評価するため、種々の置換基を有するデオキシシチジン及びシチジン誘導体を合成した。この際、Wittig 反応条件下、中間体である 4'-ホルミル体の糖部が環拡大し、ジヒドロオキセピンヌクレオシドが生成する興味深い反応を見出した。4' α -修飾デオキシシチジン誘導体の抗白血病作用の強さは、4' α -置換基の嵩高さに逆相関しているものと考えられた。さらに、4' α -エチニルデオキシシチジンは強い抗 HIV 活性を有することが明らかとなり、臨床の AIDS 治療で問題となっている耐性 HIV 株に対しても抗ウイルス活性を示すことが明らかにされた⁴

4. ECyd のプロドラッグ化

4.1. 葉酸結合体⁵

癌細胞で過剰発現している葉酸レセプターの基質認識特異性は低く、葉酸のみならず種々の葉酸結合体も認識される。葉酸結合体には癌組織集積性が期待できるが、葉酸は難溶性であり、汎用性の高い結合体合成法は存在していなかった。そこで、葉酸の α -カルボン酸が2-トリメチルシリルエチル基で、2位が2-TMS-エトキシカルボニル基で保護された中間体を開発した。低沸点溶媒に溶解し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製可能なこの中間体を用いて、種々の葉酸-ECyd 誘導体及び葉酸結合アミダイト試薬を合成した。しかし、得られた葉酸-ECyd 結合体の培地中での安定性は低く、葉酸レセプターによる取り込みは観察されず、さらなるリンカーの検討が必要であると考えられた。

4.2. 生体内還元-加水分解機構を利用した癌組織への作用選択性向上⁶

癌組織において観察される還元反応の亢進と低 pH の両者を利用して、癌組織で選択的に活性化される ECyd プロドラッグの創製を試みた。生体内還元反応によりニトロ基が電子供与性のアミノ基に還元されることにより、アセタール部の加水分解が促進され、ECyd が生成することを期待して、種々のニトロベンズアルデヒドアセタール誘導体を設計・合成した。癌組織を想定した pH 6.5、及び正常組織を想定した pH 7.4 の緩衝液中のアセタール誘導体の安定性を検討した。ニトロ体は両緩衝液中で安定であった。非環状アミノアセタール体は pH7.4 よりも pH6.5 において効率的に加水分解反応が進行し ECyd が生成したことから、癌組織での選択的な活性化が期待できる。また、ラット肝由来 S-9 mix を用いた還元実験を行ったところ、ニトロ体は、対応するアミノ体又は 4-アミノベンズアルデヒドに変換された。この結果は、設計したプロドラッグが生体内還元を受け、癌組織において選択的に活性化される可能性を示唆する。

4.3 リン脂質誘導体の合成とリポソーム製剤への応用

癌組織血管は透過性が亢進しており、高分子やリポソーム等の粒子が滞留しやすい。癌組織集積性の DDS として注目されているリポソーム封入に適切な脂溶性 ECyd 誘導体として、リン脂質型誘導体を合成した。リン脂質型誘導体は、ホスホリパーゼ D を用いたジアシルホスファチジル基転移反応⁷を利用して合成した。リン脂質誘導体 DPPECyd は安定なりポソームを効率的に形成した。DPPECyd リポソームは、マウス大腸癌 Colon 26 皮下移植マウス系において、ECyd 本体よりも強い固形癌増殖抑制効果を示し、ECyd リン脂質誘導体がりポソーム化に有効な誘導体であることを見出した。

参考文献

- (1) Hattori, H.; Tanaka, M.; Fukushima, M.; Sasaki, T.; Matsuda, A. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 5005–5011.
- (2) Nomura, M.; Sato, T.; Washinosu, M.; Tanaka, M.; Asao, T.; Shuto, S.; Matsuda, A. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 1279–1288.
- (3) (a) Hattori, H.; Nozawa, E.; Iino, T.; Yoshimura, Y.; Shuto, S.; Shimamoto, Y. Nomura, M.; Fukushima, M.; Tanaka, M.; Sasaki, T.; Matsuda, A. *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 2892–2902. (b) Nomura, M.; Shuto, S.; Tanaka, M.; Sasaki, T.; Mori, S.; Shigeta, S.; Matsuda, A. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 2901–2908. (c) Nomura, M.; Endo, K.; Shuto, S.; Matsuda, A. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 14847–14854.
- (4) Ohru, H.; Kohgo, S.; Kitano, K.; Sakata, S.; Kodama, E.; Yoshimura, K.; Matsuoka, M.; Shigeta, S.; Mitsuya, H. *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4516–4525.
- (5) Nomura, M.; Shuto, S.; Matsuda, A. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 5016–5021.
- (6) Nomura, M.; Shuto, S.; Matsuda, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 2453–2461.
- (7) Shuto, S.; Itoh, H.; Uda, S.; Imamura, S.; Fukukawa, K.; Tsujino, M.; Matsuda, A.; Ueda, T. *Chem. Pharm. Bull.* **1988**, *36*, 209–217.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 田 彰
副 査 教 授 小 林 淳 一
副 査 助 教 授 森 田 博 史
副 査 助 教 授 周 東 智

学 位 論 文 題 名

制癌性ヌクレオシド 3'-エチニルシチジンに関する 医薬化学研究：大量合成法の確立、構造活性相関、 及びプロドラッグ化

3'-エチニルシチジン (ECyd) は RNA ポリメラーゼ阻害を作用機序とし、*in vitro* 及び *in vivo* で強力な制癌活性を有するヌクレオシド系代謝拮抗剤である。本研究では、ECyd の臨床開発のために、その大量合成法を確立するとともに、優れた制癌活性を有する ECyd を母化合物としたさらに有用性の高い制癌剤の創製を試みた。種々の糖部修飾ヌクレオシドを合成し構造活性相関を検討するとともに、癌組織への作用選択性の向上を志向した種々のプロドラッグ化を実施した。

1. ECyd の大量合成法

当初の合成経路で使用されているクロマトグラフィーによる精製及び毒性の高い試薬を回避した大量合成法の確立を行った。1,2-O-イソプロピリデン-D-キシロースを原料とし、結晶性の良好な 5-O-(4-クロロベンゾイル)糖を中間体として選択した。各種グリコシルドナーを合成し、シリル化核酸塩基との Vorbrüggen グリコシル化反応を検討した。イソブチリルオキシ基が有効な脱離基及び隣接関与基となることを見出し、ECyd の大量合成法に利用した。

2. 構造活性相関

2'-又は 3'-修飾ヌクレオシドを種々設計・合成し、マウス白血病 L1210 細胞及びヒト咽頭癌 KB 細胞に対する細胞増殖抑制効果を評価した。3'-置換基の嵩高さはその制癌活性に大きく影響した。また、ECyd のエチニル基の位置異性及び立体異性、更に水酸基除去誘導体に増殖抑制効果が観察されなかったことより、制癌活性発現には 3'β-エチニルリボ型構造が必須であることを明らかにした。さらに、4'α-修飾ヌクレオシドの制癌活性を系統的に評価するため、種々の置換基を有するデオキシシチジン及びシチジン誘導体を合成した。4'α-修飾デオキシシチジン誘導体の抗白血病作用の強さは、4'α-置換基の嵩高さに逆相関していると考えられた。さらに、4'α-エチニルデオキシシチジンは強い抗 HIV 活性を有することが明らかとなり、AIDS 治療で問題となっている耐性 HIV 株に対しても抗

ウイルス活性を示すことを明らかにした。

3. ECyd のプロドラッグ化

3. 1. 葉酸結合体：癌細胞で過剰発現している葉酸レセプターの基質認識特異性は低く、葉酸のみならず種々の葉酸結合体も認識される。葉酸結合体には癌組織集積性が期待できるが、葉酸は難溶性であり、汎用性の高い結合体合成法は存在していなかった。そこで、葉酸の α -カルボン酸が2-トリメチルシリルエチル基で、2位が2-TMS-エトキシカルボニル基で保護された中間体を開発した。低沸点溶媒に溶解し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製可能なこの中間体を用いて、種々の葉酸-ECyd 誘導体及び葉酸結合アミダイト試薬を合成した。しかし、得られた葉酸-ECyd 結合体の培地中での安定性は低く、葉酸レセプターによる取り込みは観察されず、さらなるリンカーの検討が必要であると考えられた。

3. 2. 生体内還元-加水分解機構を利用した癌組織への作用選択性向上：癌組織において観察される還元反応の亢進と低 pH の両者を利用して、癌組織で選択的に活性化される ECyd プロドラッグの創製を試みた。生体内還元反応によりニトロ基が電子供与性のアミノ基に還元されることにより、アセタール部の加水分解が促進され、ECyd が生成することを期待して、種々のニトロベンズアルデヒドアセタール誘導体を設計・合成した。癌組織を想定した pH 6.5、及び正常組織を想定した pH 7.4 の緩衝液中のアセタール誘導体の安定性を検討した。ニトロ体は両緩衝液中で安定であった。非環状アミノアセタール体は pH 7.4 よりも pH 6.5 において効率的に加水分解反応が進行し、ECyd が生成したことから、癌組織での選択的な活性化が期待できることが明らかになった。また、ラット肝由来 S-9 mix を用いた還元実験を行ったところ、ニトロ体は、対応するアミノ体又は4-アミノベンズアルデヒドに変換された。この結果は、設計したプロドラッグが生体内還元を受け、癌組織において選択的に活性化される可能性を示唆するものである。

3. 3 リン脂質誘導体の合成とリポソーム製剤への応用：癌組織血管は透過性が亢進しており、高分子やリポソーム等の粒子が滞留しやすい。癌組織集積性の DDS として注目されているリポソーム封入に適切な脂溶性 ECyd 誘導体として、リン脂質型誘導体を合成した。リン脂質型誘導体は、ホスホリパーゼDを用いたジアシルホスファチジル基転移反応を利用して合成した。リン脂質誘導体 DPPECyD は安定なリポソームを効率的に形成した。DPPECyD リポソームは、マウス大腸癌 Colon 26 皮下移植マウス系において、ECyd 本体よりも強い固形癌増殖抑制効果を示し、ECyd リン脂質誘導体がりポソーム化に有効な誘導体であることを見出した。

以上のように、本研究では ECyd (現在、米国で Phase I 試験が進行中) の大量合成法を確立したこと、ECyd を母核にしたプロドラッグ化の検討を行い、癌選択性の高い治療薬となることが期待される方法を見いだしたことから、博士(薬学)の学位を授与するに足る内容を持つものと認定した。