Cortistatin A をモチーフとする抗腫瘍活性リード化合物の創製

古徳直之

Creation of Readily Accessible Analogue of Cortistatin A as an Antitumor Drug Lead

Naoyuki Kotoku

*Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University;
1-6 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, Japan.*

(Received May 13, 2013)

Angiogenesis, the formation of new blood capillaries from preexisting blood vessels, is a vital process in growth of solid tumors and development to malignant stage. This makes angiogenesis a desirable target for cancer treatment. In this work, design and syntheses of structurally simplified analogues of cortistatin A (**1**), a novel antiangiogenic steroidal alkaloid from Indonesian marine sponge, and their biological activities were investigated. One of the analogues, in which the isoquinoline moiety was appended to the planar tetracyclic core structure, showed potent antiproliferative activity against human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) together with high selectivity and also showed *in vivo* antiangiogenic activity and significant antitumor effect by oral administration.

Key words——cortistatin A; antiangiogenesis; marine sponge; analogue synthesis; structure-activity relationship

はじめに

既存の血管から新生血管を誘導する血管新生は、膨大な酸素や栄養源の獲得が必要な固形がんの増殖に必須の現象である。^{1,2)} がん血管新生は、腫瘍細胞から産生される vascular endothelial growth factor (VEGF) や basic fibroblast growth factor (bFGF) などの血管新生促進因子の刺激により、血管内皮細胞が活性化され、血管内皮細胞からの matrix metalloproteinase (MMP) 類の産生による血管基底膜の消化、内皮細胞の増殖と遊走、管腔形成といった過程を経て、新生血管を構築することが知られている。また構築された新生血管は、固形がんの酸素や栄養の獲得経路としてだけでなく、遠隔転移につながるがん細胞の循環系への侵入経路としての役割も担うことから、血管新生を阻害することができる化合物は、がん細胞特異的にその増殖を抑制し、がん転移にも抑制効果を示すことが期待される。近年、血管新生促進因子である VEGF に対するモノク

ローナル抗体 bevacizumab (Avastin[®]) が血管新生阻害剤として、また VEGF 受容体を含むマルチキナーゼ阻害剤である sorafenib (Nexavar[®]) や sunitinib (Sutent[®]) が、血管新生阻害作用を有する抗がん剤として臨床で使用されている。しかしながら、VEGF 経路を遮断することによる副作用なども報告されており、^{3,4)} 今なお新たな作用メカニズムを有する薬剤の開発が求められている。

新規血管新生阻害物質 cortistatin 類

こうした背景下、筆者らは VEGF のシグナル伝達を阻害する化合物だけではなく、いろいろな薬剤標的に作用する化合物を網羅的に探索することを目的に、血管新生のすべての過程に関与している血管内皮細胞に着目し、血管内皮細胞特異的にその増殖を阻害できる化合物の探索を行った。すなわち、ヒト正常臍帯静脈血管内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells; HUVECs) に対する増殖阻害活性とヒト咽頭上皮がん KB3-1 細胞に対する活性を比較し、HUVECs 選択的に増殖阻害活性を示す化合物を探索した。その結果、2001 年、インドネシアのフローレス島で採集した海綿 *Corticium simplex* のメタノール抽出エキスを、HUVECs 選択的な増殖阻害活性を見出した。そして活性試験の結果を

The author declares no conflict of interest.

大阪大学大学院薬学研究科 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 1-6)

e-mail: kotoku@phs.osaka-u.ac.jp

本総説は、平成 24 年度日本薬学会近畿支部奨励賞 (化学系薬学) の受賞を記念して記述したものである。

指標に単離精製を行った結果, cortistatin A (1), B (2), C (3) 及び D (4) と命名した, oxabicyclo[3.2.1]octene 構造と isoquinoline 構造を有する新規ステロイドアルカロイド類を見出した. また構造活性相関を解析するために類縁化合物を詳細に探索した結果, 側鎖の構造や A 環の官能基が異なる cortistatin E (5), F (6), G (7), H (8), J (9), K (10) 及び L (11) と命名した計 7 種の微量類縁化合物を見出した (Fig. 1).⁵⁻⁷⁾

主活性成分である cortistatin A (1) は, HUVECs に対して最も強い増殖阻害効果 ($IC_{50}=1.8$ nM) を示し, 正常ヒト繊維芽細胞 NHDF, 神経芽細胞腫 Neuro2A, 慢性骨髄性白血病細胞 K562, 及び KB3-1 などの細胞株と比較して, 3000 倍以上の細胞種選択性を有していた (Table 1). また筆者らは, 1 が実際に血管新生阻害作用を有するか否かを *in vitro* の評価系で検証した結果, 血管新生促進因子の刺激により誘導される HUVECs の遊走及び管腔形成のいずれに対しても濃度依存的かつ強力な阻害活性を示すことも明らかにしている.

さらに cortistatin A (1) は, 既存の血管新生阻害剤とは異なる作用メカニズムを有することが示唆されている. VEGF 受容体は, VEGF が結合することによりその立体構造を変化させ, 受容体自身を自己リン酸化する. そして最終的にその下流に位置する MAP kinase 経路の ERK1/2 及び p38, PI3kinase

経路の Akt をリン酸化することによりシグナル伝達を行う. 上述のように強力な血管新生阻害作用を有する 1 が既存の血管新生阻害剤と同様に VEGF のシグナル伝達を阻害するか否かを検討する目的で, VEGF 刺激による ERK1/2, p38 及び Akt のリン酸化に対する 1 の影響を, 各抗チロシンリン酸化抗体を用いて検討した結果, 1 は VEGF 刺激による各タンパク質のリン酸化に影響を与えなかった.⁸⁾

以上のように cortistatin A (1) は, 強力な血管新生阻害作用を示す新規作用メカニズムの抗がん剤シーズとして期待されることから, *in vivo* での抗腫瘍活性に興味を持たれる. しかしながら 1 は海綿からわずか 10 mg 程度得られただけの微量成分であり, 天然からの化合物供給はほぼ不可能である. 一方, 1 は特異な化学構造と顕著な生物活性を有することから合成化学者の興味を集め, 既に数例の全合成を含め, 多くの合成研究が報告されている.^{9,10)} われわれも以前より 1 の全合成研究に取り組んでおり, 最近, 独自の合成ルートによる 1 の主炭素骨格の構築に成功している (Fig. 2). すなわち, A 環フラグメント 12 と CD 環フラグメント 13 とを原料に用い, 両者を連結した後, 官能基変換によって得られた化合物 14 に対する分子内 Heck 反応を検討した結果, 環化反応が 7-endo 選択的に進行し, 化合物 15 をまずまずの収率で得ることができた. 続く変換によって不飽和ケトン 16 とした後, 分子内 oxy-Michael 反応によって酸素架橋を構築することに成功し, B 環部のビシクロ骨格を含む主炭素骨格の合成を達成した.¹¹⁾

しかしながら, われわれも含め多くの報告例において, 複雑な化学構造の構築には多工程を要しており, 有機合成による cortistatin A (1) の大量供給は今なお困難である. そこでわれわれは, 魅力的な生物活性を示す本化合物を実用的な医薬リードへと展開すべく, 1 をモチーフにした, より容易に合成可能な構造単純化アナログの創製を検討した.

Fig. 1. Chemical Structure of Cortistatins

古徳直之

大阪大学大学院薬学研究科・助教 博士 (薬学). 鳥取県出身. 1998 年大阪大学薬学部製薬化学科卒業. 2000 年大阪大学大学院薬学研究科博士前期課程修了. 2003 年同博士後期課程修了. 同年大阪大学薬学部助手. 2007 年より現職.

Table 1. Growth Inhibition of Cortistatins against HUVECs and Various Type of Cell Lines

Cell line	A (1)		B (2)		C (3)		D (4)		E (5)		F (6)		G (7)		H (8)		J (9)		K (10)		L (11)	
	IC ₅₀	S.I.	IC ₅₀	S.I.	IC ₅₀	S.I.	IC ₅₀	S.I.	IC ₅₀	S.I.	IC ₅₀	S.I.	IC ₅₀	S.I.	IC ₅₀	S.I.	IC ₅₀	S.I.	IC ₅₀	S.I.	IC ₅₀	S.I.
HUVEC	0.0018	1	1.1	1	0.019	1	0.15	1	0.45	1	1.9	1	0.80	1	0.35	1	0.008	1	0.04	1	0.023	1
KB3-1	7.0	3900	120	110	150	7900	55	460	2.5	6	10.8	6	8.9	11	2.3	7	9.1	1100	10.2	250	14	610
Neuro2A	6.0	3300	160	150	180	9500	>300	n.d.	1.9	4	4.0	2	4.0	5	2.2	6	3.3	410	3.0	80	2.8	120
K562	7.0	3900	200	180	>300	n.d.	>300	n.d.	2.8	6	4.0	2	3.8	5	2.7	8	3.3	410	3.9	100	4.3	190
NHDF	6.0	3300	>300	n.d.	>300	n.d.	>300	n.d.	1.9	4	4.1	2	2.9	4	2.7	8	2.4	300	2.5	60	2.4	100

IC₅₀= μ M; n.d.=not determined; S.I.=Selective index: IC₅₀ against testing cells/IC₅₀ against HUVECs.

Fig. 2. Stereoselective Synthesis of Core Structure of Cortistatin A (1)

アナログ化合物の設計

化合物のデザインにあたり、まず 11 種の天然類縁体の構造活性相関を解析した。すなわち、D 環に酸素官能基を有する cortistatin B (2), C (3) 及び D (4) については、細胞種選択性は保持される傾向にあるが、HUVECs 及び他の細胞株ともに増殖阻害活性の低下がみられた。さらにトリエン構造を有する cortistatin J (9), A 環部にジオールを持たない K (10), A 環部の 2 位に水酸基を 1 つ持つ L (11) においても、依然として強い HUVECs に対する増殖阻害効果と高い選択性を示すことから、活性発現には A 環部の水酸基の存在やジエン構造の位置も重要であるものの、その寄与は比較的小さいと考えられた。一方、側鎖に isoquinoline を持たない類縁体である cortistatin E (5), F (6), G (7) 及び H (8) は、HUVECs に対してほとんど増殖阻害効果を示さなかった。これらの結果から、cortistatin 類の HUVECs 選択的増殖阻害作用の発現には、isoquinoline 側鎖が大きく関与していることが明らかになった (Table 1)。⁸⁾

また、1 の X 線結晶解析の結果 (Fig. 3) から、

Fig. 3. 3-D Structure of Cortistatin A (1)

ABC 環部は通常のステロイド骨格とは異なり、anthracene 型の平面的な構造を有することが明らかになっている。これまで報告されている全合成研究においても、複雑な化学構造を有する AB 環部の構築に多工程を要していることも踏まえ、isoquinoline 側鎖周辺の構造を保持しつつ、AB 環部分を簡略化した化合物が有望であると考え、分子力場計算によるコンホメーション解析も活用して、三次元構造が 1 と類似し、かつ容易に合成可能なアナログ化合物を設計した。例えば B 環部を大幅に簡略化し、A 環部と CD 環部を sp² 炭素で連結した化合物 19 では、isoquinoline 側鎖と、すべての cortistatin 類縁体の共通構造であるジメチルアミノ基との位置関

係が **1** と比較的良好な一致を示している。また、化合物 **20** においては、平面的に連結した ABC 環部が **1** の三次元構造と非常によく重なることから、良好な活性を示すことが期待された (Fig. 4)。

アナログ化合物の合成と活性評価

上記のような指針に基づき設計した各種アナログ化合物について実際に合成し、それぞれについて、

Fig. 4. Design of Cortistatin Analogues **19** and **20**

The top & side views of the imposed 3D structures with cortistatin A (**1**) were also shown.

19			20			21			22		
	IC ₅₀ (μM)	S.I.		IC ₅₀ (μM)	S.I.		IC ₅₀ (μM)	S.I.		IC ₅₀ (μM)	S.I.
HUVEC	2.0		HUVEC	0.1		HUVEC	1.2		HUVEC	0.035	
KB3-1	18	9	KB3-1	10.5	105	KB3-1	8.0	6.7	KB3-1	10.5	300

Fig. 5. Growth Inhibitory Activity of Cortistatin Analogues **19–22**

HUVECs 及び KB3-1 細胞に対する増殖抑制活性を評価した。代表的なものを Fig. 5 に示すが、ステロイド骨格を有する **21** や三環性の化合物 **19** など、ほとんどの化合物は HUVECs 選択的な増殖阻害活性を示さなかったが、**1** と三次元構造の類似した四環性骨格を有する化合物 **20** は 105 倍の高い選択性を示した。さらに、**20** の C 環部二重結合を還元した化合物 **22** については HUVECs に対する増殖阻害活性が増強し、300 倍の細胞種選択性を示す有望な化合物であることを見出した。

Scheme 1 には最も良好な活性を有する化合物 **22** の合成ルートを示した。市販の (+)-Hajos-Parrish ketone (**23**) を出発物質とし、文献既知の立体選択的な 1,4-還元により化合物 **24** を得た後、2 工程を経てエノールトリフラート **25** へと導いた。鈴木-宮浦カップリングと続くジアステロ選択的な接触還元によって isoquinoline 側鎖を導入することができた。ジイミドを用いた位置選択的な還元などの C 環部の官能基変換を経て不飽和アルデヒド **30** へと導いた後、エチレンジアミン存在下、1,3-シクロヘキサジオンと反応させると、Knoevenagel 縮合に続く 6π 電子環状反応が一挙に進行し、**22** を総収率 10% で得ることに成功した。本合成ルートにより数百ミリグラム単位であれば容易に供給が可能な方法として確立できているが、構造最適化に向けて多様な誘導体を効率よく合成する、あるいは化合物供給のためにさらにスケールアップするという観点から、より優れた合成法の開発についても現在検討を進めている。

アナログ化合物の *in vivo* 活性評価

最も良好な活性を示した **22** を用い、*in vivo* での血管新生阻害活性及び抗腫瘍活性を評価した。まず

Scheme 1. Reagents and Conditions

(a) DIBAL-H, CuI, *t*-BuMgCl, HMPA, THF, -78°C , 77%; (b) ethylene glycol, $(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CH_3CN ; (c) PhNTf₂, KHMDS, THF, -78°C , 78% (2 steps); (d) isoquinolin-7-yl boronate, Pd(PPh₃)₄, K₂CO₃, DMF, 50°C ; (e) *p*-TsOH, acetone/H₂O, 52% (2 steps); (f) H₂, Pd-C, AcOEt, 92%; (g) TMSCl, NaI, HMDS, CH₃CN; (h) IBX, DMSO, 71% (2 steps); (i) PhNTf₂, KHMDS, THF, -78°C , 94%; (j) CO (gas), Pd(PPh₃)₄, MeOH, Et₃N, DMF, 98%; (k) potassium azodicarboxylate, AcOH, 99%; (l) L-Selectride, THF, 80%; (m) Dess-Martin periodinane, NaHCO₃, CH₂Cl₂; (n) 1,3-cyclohexanedione, ethylenediamine, AcOEt, 64% (2 steps).

Fig. 6. *In Vivo* Evaluation of Analogue 22, Orally Administered on Every Other Day for Indicated Period

a) Antiangiogenic effect of 22. Mean $\pm$ S.D. hemoglobin content in the matrigel of each group after 10 days was shown. * $p < 0.05$. b) Antitumor effect of 22. Mean $\pm$ S.D. tumor weight of each group after 14 days was shown. * $p < 0.05$.

matrigel plug assay を用い、bFGF の刺激により誘導される血管新生に対する阻害活性を検討した。その結果、22 は 10 mg/kg 以上の経口投与により、新生血管の誘導を非投与群と比較して有意に阻害した [Fig. 6(a)]。さらにマウス肉腫 S180 細胞移植モデルマウスを用いて、22 の抗腫瘍活性を評価した。その結果、22 は 25 mg/kg 以上の経口投与で、腫瘍重量をコントロール群の 10% 未満に減少させた [Fig. 6(b)]。¹²⁾ 本試験期間中において、薬物投与群マウスに体重減少や下痢などの目立った急性症状は全くみられなかったことから、毒性を示さない濃度範囲で顕著な抗腫瘍活性を示す、有望な化合物であ

ると言える。

まとめ

Figure 6 に示すように、今回合成したアナログ化合物 22 は *in vivo* での血管新生を阻害し、良好な抗腫瘍活性を示した。経口投与でも有効であり、10 工程余りの単純な反応を用いて大量合成が可能であることから、新規抗がんリード化合物として期待できる。現在、さらに優れたリード化合物の創製に向けて検討中である。

一方で今後の喫緊の課題は、cortistatin A (1) の作用メカニズムの解明である。Nicolaou *et al.* は、cortistatin A が Rho-associated, coiled-coil contain-

ing protein kinase (ROCK), cyclin-dependent kinase 8 (CDK8) 及び cyclin-dependent kinase 11 (CDK11) と親和性を有することを報告している¹³⁾が, CDK8 及び 11 については標的分子ではないことを示唆する報告例も出てきている.^{14,15)} 筆者らも化合物 **22** をリガンドとするプローブ分子を合成して, **1** の標的分子を見い出すべく検討を重ねている. 将来的には標的分子の構造を基にした合理的な設計によって, 真に有用な医薬リードの創出へと展開していきたい.

謝辞 本研究を行うにあたり, 終始ご指導, ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院薬学研究科天然物化学分野 小林資正教授に厚く御礼申し上げます. また, 研究の遂行にあたりご協力, ご助言を頂きました大阪大学大学院薬学研究科天然物化学分野 荒井雅吉准教授に心より感謝致します. さらに, 本研究にご協力頂きました大阪大学大学院薬学研究科天然物化学分野の研究員及び学生諸氏に感謝致します. 本研究は科学研究費補助金, A-STEP (科学技術振興機構), 及び上原記念生命科学財団の助成により行われたものであり, ここに深謝致します.

REFERENCES

- 1) Folkman J., *New Engl. J. Med.*, **285**, 1182–1186 (1971).
- 2) Folkman J., *Nat. Rev. Drug Discov.*, **6**, 273–286 (2007).
- 3) Paez-Ribes M., Allen E., Hudock J., Takeda T., Okuyama H., Viñals F., Inoue M., Bergers G., Hanahan D., Casanovas O., *Cancer Cell*, **15**, 220–231 (2009).
- 4) Facemire C. S., Nixon A. B., Griffiths R., Hurwitz H., Coffman T. M., *Hypertension*, **54**, 652–658 (2013).
- 5) Aoki S., Watanabe Y., Sanagawa M., Setiawan A., Kotoku N., Kobayashi M., *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 3148–3149 (2006).
- 6) Watanabe Y., Aoki S., Tanabe D., Setiawan A., Kobayashi M., *Tetrahedron*, **63**, 4074–4079 (2007).
- 7) Aoki S., Watanabe Y., Tanabe D., Setiawan A., Arai M., Kobayashi M., *Tetrahedron Lett.*, **48**, 4485–4488 (2007).
- 8) Aoki S., Watanabe Y., Tanabe D., Arai M., Suna H., Miyamoto K., Tsujibo H., Tsujikawa K., Yamamoto H., Kobayashi M., *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 6758–6762 (2007).
- 9) Chen D. Y.-K., Tseng C.-C., *Org. Biomol. Chem.*, **8**, 2900–2911 (2010).
- 10) Hardin Narayan A. R., Simmons E. M., Sarpong R., *Eur. J. Org. Chem.*, 3553–3567 (2010).
- 11) Kotoku N., Sumii Y., Kobayashi M., *Org. Lett.*, **13**, 3514–3517 (2011).
- 12) Kotoku N., Sumii Y., Hayashi T., Tamura S., Kawachi T., Shiomura S., Arai M., Kobayashi M., *ACS Med. Chem. Lett.*, **3**, 673–677 (2012).
- 13) Cee V. J., Chen D. Y.-K., Lee M. R., Nicolaou K. C., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 8952–8957 (2009).
- 14) Mousseau G., Clementz M. A., Bakeman W. N., Nagarsheth N., Cameron M., Shi J., Baran P., Fromentin R., Chomont N., Valente S. T., *Cell Host Microbe*, **12**, 97–108 (2012).
- 15) Porter D. C., Farmaki E., Altília S., Schools G. P., West D. K., Chen M., Chang B.-D., Puzyrev A. T., Lim C., Rokow-Kittell R., Friedhoff L. T., Papavassiliou A. G., Kalurupalle S., Hurteau G., Shi J., Baran P. S., Gyorffy B., Wentland M. P., Broude E. V., Kiaris H., Roninson I. B., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 13799–13804 (2012).