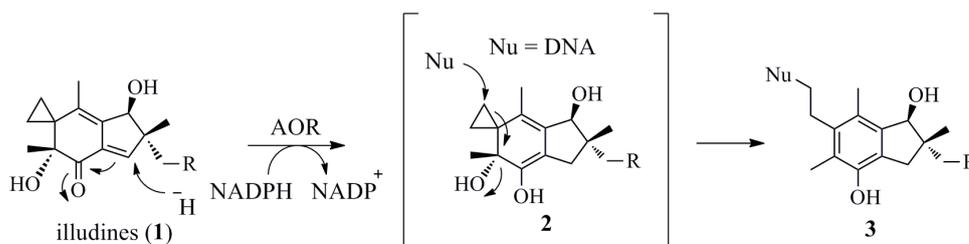


含水条件下での連続反応を利用した
pH 依存型新規 DNA アルキル化剤の設計

(京大院薬) ○永本祐樹、服部明、掛谷秀昭、竹本佳司、高須清誠

【序論】DNA アルキル化剤はがん治療に最も有効な治療薬の一つであるが、腫瘍細胞と正常細胞との選択性の低さによる重篤な副作用が

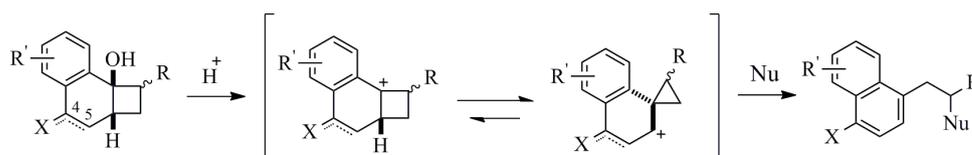
Scheme 1. Enzymatic DNA alkylation mechanism of illudines.



しばしば問題となる。細胞選択性を向上させる方策の一つとして、腫瘍細胞に特徴的な酵素や微小環境による代謝活性化が挙げられる。優れた抗腫瘍活性を示す天然物である illudine 類 (1) やその合成誘導体である irofulven は代謝活性化されるアルキル化剤の一つであり、母骨格にスピロ三員環構造を有している。特に irofulven は固形癌に対する第二相臨床試験まで進んでいる。その活性発現機構は、まず生体内の alkenal/one oxidoreductase (AOR) によって NADPH 依存的に α,β 不飽和ケトンが還元されて活性中間体 2 が生成する。続いて DNA の塩基によるスピロ三員環部の開環を伴う求核付加により付加体 3 が形成され、細胞のアポトーシスが誘導される (Scheme 1)。しかし特に illudine 類では α,β 不飽和ケトン部の求核剤に対する反応性が高いため、還元型グルタチオンなど生体内のチオール含有分子により、非酵素的な代謝活性化が進行して無差別なアルキル化が進行し、しばしば重篤な副作用につながった。

我々は最近 illudine Scheme 2. Concept of this work.

類の生合成に着目して、縮環シクロブタノールから四員環の三員環への環縮小を伴うカチオ



ン転位を經由して多置換スピロ三員環を得る反応を開発した¹⁾。また合成した多置換スピロ三員環の開環がハロゲン化水素により、室温、短時間で進行することも見出した²⁾。今回我々は腫瘍細胞が正常細胞に比べて低 pH である点に着目し、環縮小転位反応を經由して pH 依存的に代謝活性化されるアルキル化剤の開発を目指して、含水酸性条件下で転位および開環反応が連続的に進行する基質の設計を行った (Scheme 2)。

【結果・考察】今回我々は反応性の向上を目指して、基盤とする骨格をヘキサヒドロシクロブタ[a]ナフタレノール 4 に設定した。まず置換基 R^1, R^2, R^3 による反応性への影響を調べた (Table 1)。 R^1 の異なる基質 4a-d に対して含水酸性条件下で反応を行うと、 R^1 が Bz 基の基質では付加体 5 がほとんど得られなかったが (entry 1, 2)、メチル基の場合に反応性が向上し、特に β 体 4d では 5 が良好な収率で得られた (entry 3, 4)。続いて R^2, R^3 に電子供与基を導入した基質 4e-f で検討を行った。 R^2 にメトキシ基を導入した基質 4e では反応性が向上したが、 R^3 にもメトキシ基を導入した基質 4f では 4e に比べて反応性、収率ともに低下した (entry 5, 6)。

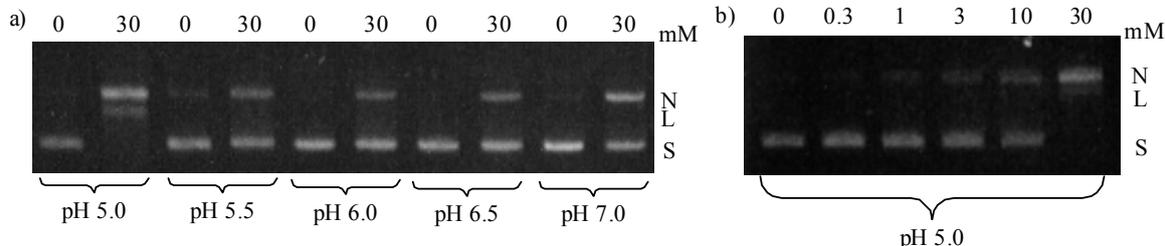
次に 4, 5 位の置換基の変換を試みた (Table 2)。4 位を水酸基に変換した基質 **4g**, **4h** では反応性が向上した (entry 1, 2)。さらに 4, 5 位を二重結合に変換すると、室温、1 時間で反応が完結した (entry 3)。**4i** は pH 6.0 まで pH を上げて反応が進行することが確認された。

最後に **4i** を用いて DNA 切断活性の評価を行った。種々の酸性 pH の緩衝液中、プラスミド DNA と 37 °C で 24 時間培養すると、pH の低下に伴い DNA の切断活性が向上した (Figure 1a)。また pH 5 の緩衝液中、種々の濃度の **4i** で 37 °C、24 時間培養すると、最小 1 mM で DNA の切断が見られ、**4i** の濃度依存的に DNA 切断活性が向上することも確認された (Figure 1b)。

【結論】環縮小転位反応を活性化機構に利用した pH 依存型新規アルキル化剤創製を目指して含水酸性条件下、

環縮小転位と開環反応が連続して進行する基質の設計を行い、良好な反応性を示す基質 **4i** を見出した。また **4i** は DNA 切断活性を示し、その活性が pH および濃度依存的に向上することを明らかにした。

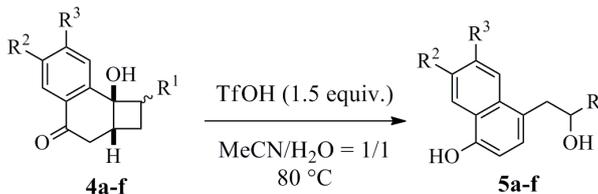
Figure 1. a) pH and b) concentration dependence of DNA cleavage by **4i**. (S: supercoiled, N: nicked, L: linear).



References

- 1) K. Takasu, Y. Nagamoto, Y. Takemoto, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 8427-8432.
- 2) K. Takasu, Y. Nagamoto, Y. Takemoto, in preparation.

Table 1. Effects of substituents on cyclobutane and aromatic rings



entry	substrate	R ¹	R ²	R ³	time (h)	5 (%) ^a	4 (%) ^a
1	4a	CH ₂ OBz (α)	H	H	5	no reaction	
2	4b	CH ₂ OBz (β)	H	H	5	trace	96
3	4c	Me (α)	H	H	5	38	62
4	4d	Me (β)	H	H	5	72	12
5	4e	Me (β)	OMe	H	1	74	0
6	4f	Me (β)	OMe	OMe	5	57	0

^a isolated yield

Table 2. Effects of substituents on 4 and 5 positions^a

entry	substrate	temp. (°C)	time (h)	product	yield (%) ^b
1		50	1		61
2					68
3		rt	1		88

^a condition: **4** (0.10 mmol), TfOH (0.15 mmol) in 500 μl of MeCN/H₂O (1/1) ^b isolated yield