

ヒストン脱アセチル化酵素1/2選択的阻害剤の創製 とその経口性抗がん剤への応用

著者	平田 佳之
発行年	2014-09-20
学位授与機関	関西大学
学位授与番号	34416甲第538号
URL	http://doi.org/10.32286/00000133

平成 26 年 9 月期学位授与
関西大学審査学位論文

2014 年
博士論文

ヒストン脱アセチル化酵素 1/2 選択的阻害剤の
創製とその経口性抗がん剤への応用

関西大学大学院 理工学研究科
総合理工学専攻

平田佳之

博士論文要旨

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は核内の遺伝子発現を後天的に制御することにより、がん化やその増殖に密接に関わっている酵素である。HDAC は 18 種類ものアイソザイムに分類され、その中でも亜鉛依存性である HDAC1-11 はがん抑制遺伝子 p53, p21^{WAF1/CIP1} や自発的細胞死であるアポトーシスなどの発現調節に深く関与していることが知られている。HDAC 阻害剤は HDAC を阻害し、がん抑制遺伝子の転写を促進することにより、がん細胞の細胞周期停止やアポトーシスを誘導し、抗がん作用を示す薬剤である。HDAC 阻害剤は、HDAC 活性部位底部に存在する 2 価の亜鉛イオンを捕捉する官能基の種類により、HDAC アイソザイムの選択性や阻害効果が異なる。例えば、皮膚 T 細胞リンパ腫に対する治療薬として上市されている SAHA (Zolinza[®]) は亜鉛と結合する官能基として hydroxamic acid 基を持つ。hydroxamic acid は HDAC を広範囲に (非選択的に) 阻害する。また、現在臨床試験中の 2-aminobenzamide 基を持つ MS-275 (Entinostat) は HDAC1-3 を選択的に阻害し、経口投与性やヒト血中安定性を持つ化合物である。しかしながら、前者では hydroxamic acid 構造が不安定であり、ヒト血中安定性が低く、後者は hydroxamic acid 基と比べて HDAC 阻害活性が低いことなどが欠点として挙げられる。当研究室においても、surface recognition domain に 5-ethylbenzo[d][1,3]dioxole 骨格をもち、且つ、linker domain に水溶性基として hydroxymethyl amino 基をもつ K-197 を合成しており、ヒト大腸がん細胞株 HCT116 に対し、MS-275 と同等の細胞増殖抑制活性を示している。そこで、HCT116 移植ヌードマウスを用いた K-197 の経口投与による抗腫瘍効果試験を実施した。K-197 は MS-275 と比べ、50 mg/kg 投与では同等の腫瘍縮小効果を示

したが 35 mg/kg 及び 45 mg/kg 投与では **MS-275** と比べ、腫瘍縮小効果が乏しかった。また、**K-197** 投与群ではマウスが死亡するなどの副作用も観察された。

本研究では、**K-197** をリード化合物とし、臨床応用可能な新規 2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤の創製を企図した。近年、HDAC1 及び HDAC2 活性部位底部の更に底部にチエニル基或いはフェニル基が入り込む疎水性のポケットが存在することが、X 線結晶解析により報告された。そこで、チエニル基置換ベンズアミド基を持つ新規 HDAC 阻害剤を合成し、そのアイソザイム選択性とヒトがん細胞に対する細胞増殖活性、等を評価した。

創製した化合物の内、4-ethyl-2, 3-dioxopiperazine 基を導入した化合物 **K-560** は、適度な水溶性を維持し、ヒト大腸がん細胞株 HCT116、SW480、SW620 及び乳がん細胞株 SKBR3 に対し、**MS-275** と同等の細胞増殖抑制活性を示し、且つ HDAC1 及び HDAC2 に対して **MS-275** より高い選択的阻害効果を示し、HDAC3 には事実上阻害効果を示さなかった (HDAC1 IC₅₀: 0.05 µM; HDAC2 IC₅₀: 0.67 µM; HDAC3 IC₅₀: >100 µM)。**K-560** は HCT116 移植ヌードマウスに対する経口投与実験で、**MS-275** と比べて遜色のない腫瘍縮小効果を示した (**K-560**, T/C: 60% at 45 mg/kg; **MS-275**, T/C: 51% at 45 mg/kg)。また、**K-560** は、**MS-275** 投与群でみられた体重減少は観察されなかった。

そこで、詳細な抗がん作用機序を解明するために、Flow cytometer 及び蛍光顕微鏡により細胞形態を観察した。すると、**K-560** を暴露した HCT116 細胞では、G1 期と G2/M 期で細胞周期停止を誘導し、アポトーシス細胞は観察されなかった。また、**K560** は cleaved PARP や cleaved caspase 3 などのアポトーシス関連タンパク質を誘導しなかった。一方、**K560** は細胞周期関連タンパク質である p-Rb や E2F1 の発現を抑制したことから、主として G1 期において細胞周期停止を誘導する、従来の HDAC 阻害剤と異なった抗がん作用機序を有すると示唆された。

そこで、アポトーシスとは異なる細胞処理の一つとして考えられているオートファジーに注目するとともに、生存関連経路 (PI3K、mTOR、AKT、ERK)について調査した。結果、**K-560** はオートファジーマーカータンパク質である LC3B を誘導した。その誘導効果は、既存のオートファジー誘起剤である rapamycin よりも高いものであった。特記すべきことに、rapamycin は mTOR 複合体である mTORC1 の活性を阻害するのに対し、**K-560** はこの活性を亢進した。以上を総合すると、**K-560** は、既存の HDAC 阻害剤とは異なり、がん細胞の細胞周期を制御するが、一方で、生存シグナルタンパク質 PI3K/Akt/mTOR を活性化し、オートファジーを誘起して細胞を生存させる新規作用機序をもつ化合物であることが分かった。また、オートファジー誘起剤として広く世の中に知られている rapamycin とは異なったオートファジー誘導作用を有することが明らかとなった。本化合物やその関連化合物は、細胞死に病因をもつ疾患の治療薬に応用される可能性を秘めており、今後のさらなる展開が期待される。

目次

総論の部

第1章	緒言	3
第2章	従来の研究の問題点及び研究戦略	9
第1節	従来の HDAC 阻害剤とその問題点	
第2節	HDAC アイソザイムを標的とした新規 HDAC 阻害剤の合成戦略	
第3章	経口性 HDAC 阻害剤 K-197 の薬理活性評価、並びに担がんヌードマウスを用いた抗腫瘍活性試験	11
第1節	ベンズアミド型 HDAC 阻害剤 K-197 の作用機序の検討	
第2節	HCT116 移植ヌードマウスを用いた K-197 の抗腫瘍活性試験	
第4章	2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤の創製	20
第1節	Cap 部位にアミド結合を持つ HDAC 阻害剤の合成	
第5章	HDAC1/2 アイソザイム選択的 HDAC 阻害剤の創製	26
第1節	チエニル基置換 2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤の創製と HDAC1/2 選択的阻害効果	
第2節	水溶性官能基 Diketopiperadine を導入したチエニル基置換 2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤の合成	
第6章	HDAC1/2 アイソザイム選択的 HDAC 阻害剤 K560 の薬理評価	37
第1節	HCT116 移植ヌードマウスを用いた抗腫瘍活性試験	
第2節	K-560 の抗がん作用機序の解明	
第7章	総括	47

実験の部

試薬及び実験方法	50
研究業績	75
引用文献	79
謝辞	84

第 1 章

緒言

がんは日本人の死亡原因の常に上位に並んでおり根治しにくい疾患の一つである。抗がん剤の種類には一般にアルキル化剤、抗腫瘍性植物成分（アルカロイド）製剤、代謝拮抗剤、抗腫瘍性抗生物質製剤、ホルモン製剤や非特異的腫瘍薬などの抗腫瘍薬があるが、これら既存薬は DNA の架橋構造を不可逆的に変化させ、塩基配列を変化させてしまい、結果、下痢、嘔吐、脱毛などの重度の副作用が突発的に表れる。発がんの原因の一つとしてエピジェネティックな遺伝子発現制御の異常と呼ばれる発がん遺伝子発現制御機構の機能の低下或は失活、発がん遺伝子発現機構の亢進などが深く関与している¹⁾。エピジェネティクスは、DNA メチル化とヒストンタンパク質の化学修飾を中心に特定遺伝子の発現変化が引き起こることを指し、その中でもヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）は、がん化やその増殖に密接に関わる生体分子として注目されている。本研究テーマであるヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害剤はエピジェネティクスによる遺伝子発現制御を介し、がん細胞に間接的に作用することから副作用を軽減できる分子標的抗がん剤として国内外にて盛んに研究が行われている。HDAC 阻害剤の作用機構は、ヒストンタンパク質を構成している特定アミノ酸のリシン残基の末端にあるアミノ酸 (-NH₃⁺) の正電荷と負電荷を帯びている DNA のモノメチル化、ジメチル化、トリメチル化などの修飾を介したクロマチン構造中にある DNA とヒストンタンパク質の複合体の静電気的な結合状態の変化によるものである。この折りたたまれた状態では、ヒストンアセチル化酵素（HAT）がヒストンタンパク質の特定リシン残基をアセチル化することにより、正電荷を帯びずに核酸から離れてクロマチン構造が弛緩される。また、特定リシン残基のメチル化、リン酸化、SUMO 化が引き起こされることにより遺伝子発現を緻密に制御していることが知られている。一方、HDAC はアセチル化されたリシン残基を元の非修飾リシン残基に戻す酵素であり、HDAC を阻害することにより高アセチル化したヒストンタンパク質が蓄積し、p53 や p21/WAF1 等のがん抑制遺伝子の転写が活性化される。そして、がん細胞の細胞周期停止やアポトーシス、オートファジーが誘起されてがん細胞の増殖が抑制されることが報告されている²⁻¹⁶⁾。以上より、HDAC 阻害剤が次世代の分子標的

抗がん剤として注目されている (Fig. 1)。

1976年に N. Tsuji らによって *Streptomyces hygroscopicus* から単離された Trichostatin A (TSA)¹⁷⁾ に HDAC 阻害活性があることを 1990年に M. Yoshida ら¹⁸⁾が発見した。これが、HDAC 阻害剤に関する最初の報告である。また、バクテリア由来 HDAC 様タンパク (HDLP) の活性部位と TSA とのドッキングモデルが X 線結晶解析により明らかにされている¹⁹⁻²⁰⁾。TSA 構造は、HDAC 活性部位の上部を Cap する芳香族炭化水素基、活性部位底部に存在する亜鉛イオンをキレートする hydroxamic acid 基、Cap と亜鉛結合部位とをつなぐ linker から成り立っている。TSA は非常に高いがん細胞増殖抑制活性を示すことが知られている。

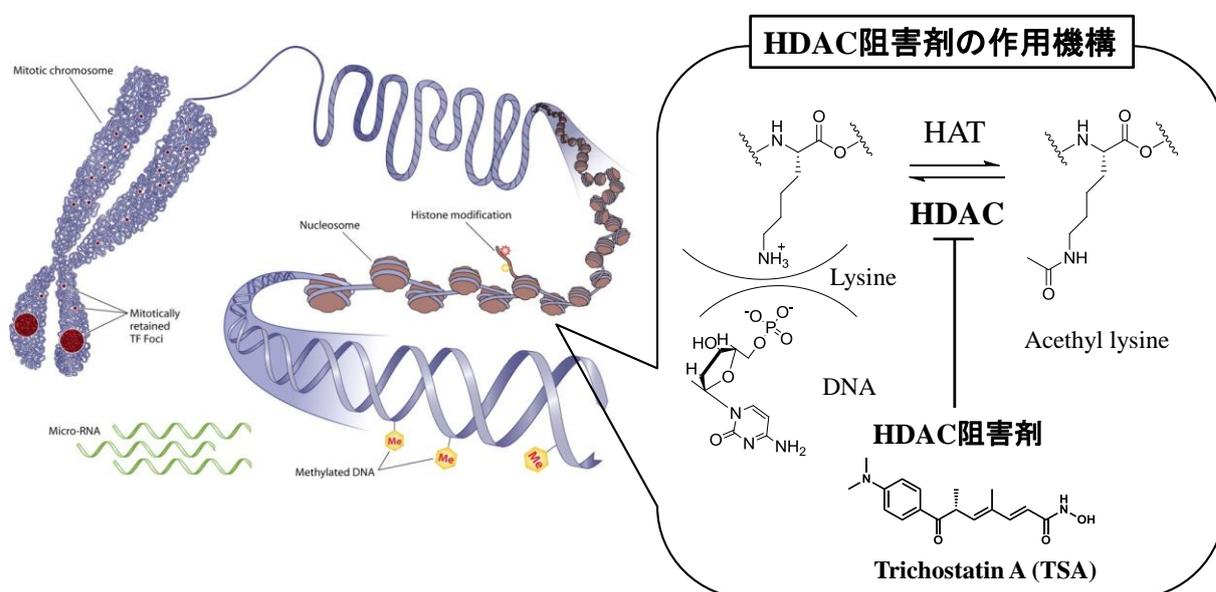


Fig. 1 クロマチン構造中ヒストンタンパク質の HAT 及び HDAC による化学修飾

Sayyed K. Zaidi et al., *Mol. Cell. Biol.*, **30** (2010) 4758-4766. より改変・引用

従来の研究では、より高い酵素活性阻害を示す化合物を得るために TSA の構造式を基に様々な合成展開がなされてきた。ヒドロキサム酸基を持つ SAHA (Suberoylanilide hydroxamic acid, Vorinostat[®])は、TSA のもつ正常細胞に対する強い毒性を緩和するよう設計・最適化され、皮膚 T 細胞性リンパ腫の治療薬として Merck 社から上市されている²¹⁻²⁵⁾。また、FK228 (Romidepsin, Istodax[®])は *Chromobacterium violaceum* から単離された環状構造の HDAC 阻害剤であり、皮膚性及び抹消性 T 細胞リンパ腫或は緑内障・高眼圧症治療剤として上市されている²⁶⁻³¹⁾。また、前三井製薬工

業(現 Syndax Pharmaceuticals)で開発された **MS-275** (Entinostat)は、経口投与可能な HDAC 阻害剤として Hodgkin's リンパ腫、乳がん、肺腺がんに対する治療薬として臨床試験が進められている(**Fig. 2**)³²⁻³⁷。この他、**Fig. 2** に示す HDAC 阻害剤が臨床試験へと進んでいる³⁸⁻⁴⁶。

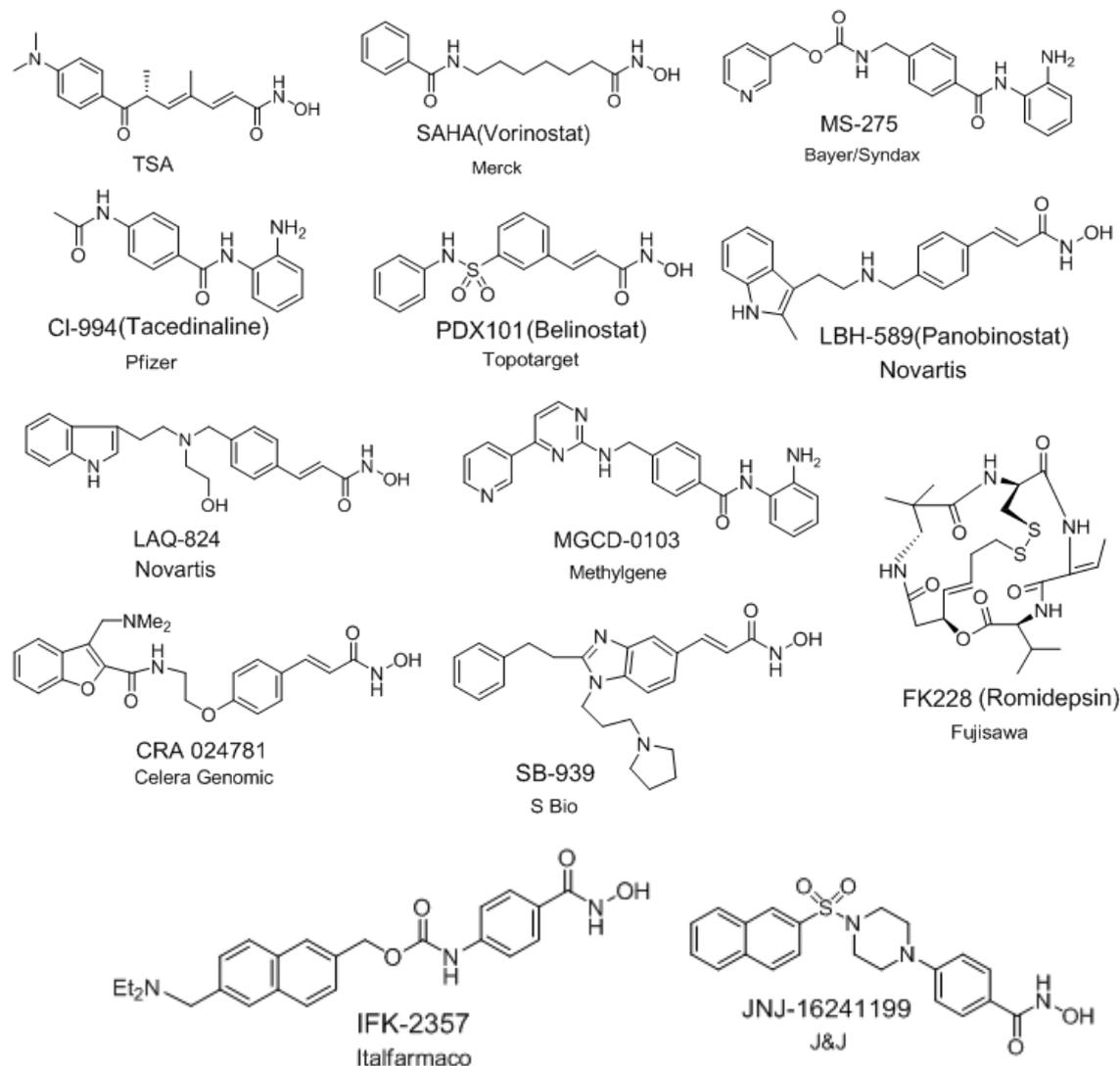


Fig. 2 既存の HDAC 阻害剤

ヒト HDACs として、4 つのクラス、18 種類ものアイソザイムが報告されており(**Fig. 3**)、細胞内の様々な器官に存在し、単量体や複数量体を形成している⁴⁷。さらに、これらのアイソザイムは、亜鉛依存性のもの (**Table 1**) と NAD⁺ (nicotinamide adenine dinucleotide) 依存性のもの (**Table 2**) があり、特に後者のものを sirtuin 或は SIRT と呼ぶ。sirtuin は別名、長寿遺伝子とも呼ばれ、アンチエイジングや育毛活性に関わる酵素群として知られている⁴⁸。近年、HDAC アイソザイムに対する siRNA を用いた

ノックダウン法により、アイソザイムの機能性、分子メカニズム、がん、神経変性疾患、代謝異常など、様々な観点から薬理評価が行われている。

Table 1 亜鉛依存性 HDAC の局在性及び機能

Zn²⁺-dependent HDAC enzymes			
	Localization	Function	
Class I (RPD3 homologue)			
HDAC1	Nucleus	Transcriptional repression	
HDAC2	Nucleus	Transcriptional repression	
HDAC3	Nucleus, cytoplasm	Transcriptional repression	
HDAC8	Nucleus, cytoplasm	Smooth muscle cell contractility	
Class II (HDA1 homologue)			
II a	HDAC4	Nucleus, cytoplasm	Transcriptional repression, muscle differentiation block, retinal Protection
	HDAC5	Nucleus, cytoplasm	Transcriptional repression, muscle differentiation block
	HDAC7	Nucleus, cytoplasm	Transcriptional repression, muscle differentiation block
	HDAC9	Nucleus, cytoplasm	Transcriptional repression, muscle differentiation block
II b	HDAC6	Cytoplasm	Regulation of microtubule stability and function, Regulation of molecular chaperone function
	HDAC10	Cytoplasm	Transcriptional repression, cell survival
Class IV			
	HDAC11	Nucleus	Transcriptional repression

T. Suzuki, *Chem. Pharm. Bull.* **57** (2009) 897-906. を一部改変・引用

Table 2 NAD⁺依存性 HDAC の局在性及び機能

NAD⁺-dependent HDAC enzymes			
	Localization	Function	
Class III (Sir 2 homologue)			
	SIRT1	Nucleus	Functional regulation of p53, transcriptional repression
	SIRT2	Nucleus, cytoplasm	Cell cycle regulation
	SIRT3	Mitochondria	Activation of mitochondrial functions, thermogenesis in brown adipose
	SIRT4	Mitochondria	Insulin secretion
	SIRT5	Mitochondria	Regulation of mitochondrial energy metabolism
	SIRT6	Nucleus	DNA repair and genomic stability, regulation of telomere metabolism
	SIRT7	Nucleus	Activation of RNA polymerase I transcription

T. Suzuki, *Chem. Pharm. Bull.* **57** (2009) 897-906. を一部改変・引用

当研究室では、hydroxamic acid 構造を有する化合物の合成展開が行われてきた。即ち、当初、HDAC の Cap 部位と亜鉛結合部位をつなぐ linker として、リシンのアナログであるトラネキサム酸を採用していたが、これを 1,4-phenylene 基に替えたところ、ヒト血漿安定性を向上させ、SAHA が持つ代謝不安定性を改善させることが分かった。合成化合物のなかで、**K-24**、**K-32**、**K120** は、cap 部位に naphthyl group 或は quinoline group などの 2 環性芳香環が HDAC ポケット上部と相互作用することにより、HDACs に対し、**SAHA** などと同等の HDAC 阻害作用を持つことが報告されている。更に、組織内移行性の向上を考慮して、含硫 2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤が創製され、動物実験で優れた抗腫瘍効果があることが明らかにされた(**Fig. 4**)⁴⁹⁾⁻⁵²⁾。

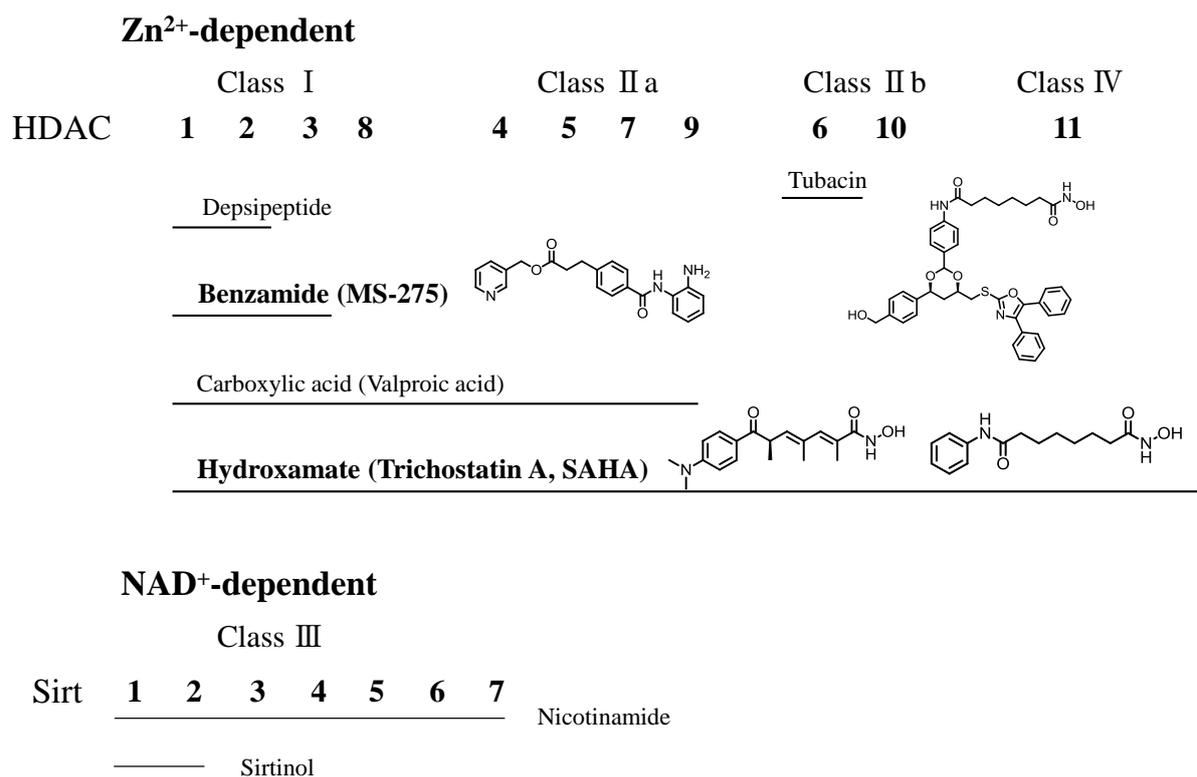
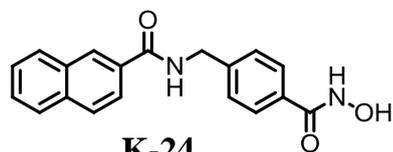
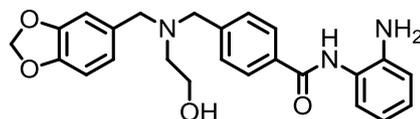


Fig. 3 HDAC アイソザイムとその阻害剤



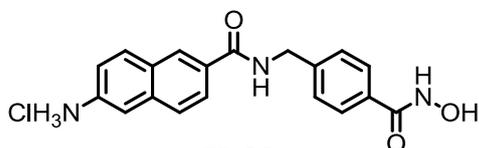
K-24

HCT116 IC₅₀: 0.7 μM
 HDACs IC₅₀: 0.044 μM
 Solubility
 10% HCO60/PBS ≤ 1 mg/ml



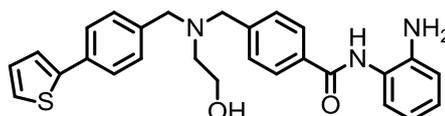
K-197

HCT116 IC₅₀: 1.2 μM
 HDAC1 IC₅₀: 1.17 μM
 HDAC2 IC₅₀: 3.36 μM
 HDAC3 IC₅₀: 6.00 μM
 Solubility
 10% DMSO/H₂O ≥ 0.2 mg/ml



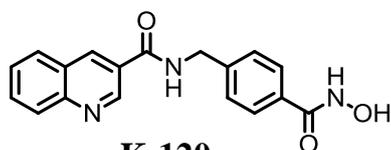
K-32

HCT116 IC₅₀: 0.5 μM
 HDACs IC₅₀: 0.039 μM
 Solubility
 10% HCO60/PBS ≥ 8 mg/ml



K-350

HCT116 IC₅₀: 0.7 μM
 HDAC1 IC₅₀: 0.94 μM
 HDAC2 IC₅₀: 7.64 μM
 HDAC3 IC₅₀: 6.30 μM
 Solubility
 10% DMSO/H₂O ≥ 0.5 mg/ml



K-120

HCT116 IC₅₀: 0.6 μM
 HDACs IC₅₀: 0.026 μM
 Solubility
 10% HCO60/PBS ≥ 4 mg/ml

Fig. 4 当研究室で合成された HDAC 阻害剤

第 2 章

従来の研究の問題点及び研究戦略

第 1 節

従来の HDAC 阻害剤とその問題点

TSA、**SAHA** に代表される hydroxamic acid 型 HDAC 阻害剤の Cap 或は linker 部位を中心に改変が行われてきた。しかしながら、hydroxamic acid 自体構造的に不安定であり、血中での安定性が乏しいことが問題点となっている。筆者の調査では、Balb/c マウスへの **SAHA** の静脈投与で得た血液の LC-MS/MS 血中安定性試験で、**SAHA** の hydroxamic acid 構造が carbonic acid に分解された構造が、約 0.5-1.0 時間に多く検出された(data not shown)。一方、経口投与可能であり、且つ代謝安定性が比較的高いと云われている 2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤に関して、その構造活性相関や、HDAC 活性部位底部の亜鉛とキレートする官能基自体の研究はあまりされていなかった。そこで、筆者は、これまで公開された 2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤の構造を基に、より活性の高い化合物をもとめて、合成戦略を計画した。

合成展開をするに先立ち、当研究室でこれまでに合成された化合物のなかから、ヒトがん細胞株増殖抑制活性及び HDAC 阻害活性の優れた化合物 **K-24**, **K-32**, **K-120**, **K-197** を選定し、構造活性相関について検討した。その中で、**K-197** は、現在臨床試験中の **MS-275** と比べてもヒト大腸がん細胞株 HCT116 において同等の細胞増殖抑制活性を示し、ヒト血漿による代謝安定性試験にて比較的高い代謝安定性をもつことが報告されていた⁵²⁾。更に、10%DMSO/H₂O 水溶性試験より、**K-197** は適度な水溶性を維持したことから、HCT116 移植ヌードマウスを用いた経口投与による腫瘍効果試験を計画した。

第2節

HDAC アイソザイム選択性を志向した新規 HDAC 阻害剤の合成戦略

HDACs は冒頭にも述べたように、18 種類アイソザイムに分類され、それぞれ機能性や生理活性が異なる。特に HDAC1-3 は、生命体の恒常性維持にとって重要な役割を担っており、且つ、がん化にも深く関わっている⁵³⁾。TSA や SAHA は HDAC を広範囲に阻害するため、がん作用に関わる HDAC アイソザイムに選択的阻害効果を示さず、この性質が副作用を生む原因となっていた。アイソザイム選択的な阻害剤を創製することは、HDAC アイソザイムの機能性や分子メカニズムの解明のみならず、副作用の少ない医薬品への創製につながる可能性がある。本研究では、HDAC1 から HDAC3 のアイソザイム選択的阻害活性の高い 2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤を創製し、その効果の分子レベルの研究と医薬品としての可能性を検討した。

第3章

経口性 HDAC 阻害剤 **K-197** の薬理活性評価並びに HCT116 移植ヌード マウスを用いた抗腫瘍活性試験

第1節

2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤 **K-197** の作用機序の検討

当研究室で合成された **K-197** は、亜鉛結合部位に 2-aminobenzamide 基を有する HDAC 阻害剤である。以前の研究より、ヒト大腸がん細胞株 HCT116 に対して高い細胞増殖抑制活性を示し (HCT116 IC₅₀ = 1.2 μM)、ヒト正常線維芽細胞 CCD-1059SK に対して低毒性 (CCD-1059SK IC₅₀ = 41.7 μM) であることが明らかとなっている⁵²⁾。抗がん剤製剤として重要な代謝安定性に関しても、*in vitro* ヒト血漿安定性試験において高い安定性を保持したことから、**K-197** の抗がん作用とその機序の検討、並びに、ヒト大腸がん細胞株 HCT116 移植ヌードマウスを用いた経口投与による抗腫瘍効果試験を実施した。

HDAC 阻害剤の作用機序は諸説報告されているが、その中で、**K-197** と同じく 2-aminobenzamide 基を持つ、臨床試験中の **MS-275** の抗がん作用とその機序を参考に、薬理試験を計画した。**MS-275** の作用機構の特徴としては、HDAC1 から HDAC3 を阻害することにより、ヒストンタンパク質のコアヒストンである Histone H3 と Histone H4 の特定リシン残基をアセチル化することが知られている。特に 2-aminobenzamide 基を持つ HDAC 阻害剤は Histone H3 に感受性が高いことから Histone H3 のアセチル化レベルを測定した。また、アセチル化した Histone H3 は様々な遺伝子のプロモーター部位に影響を与える。例えば、がん抑制遺伝子である p21/WAF1 や DNA の変異や欠失の修復遺伝子 GADD45 や RAD51 の遺伝子発現を活性化させることが知られている。そこで、がん抑制遺伝子産物の発現を確認した。

Histone H3 のアセチル化の変化とがん抑制遺伝子 p21/WAF1 の発現量の変化

ヒト大腸がん細胞 HCT116 (p53 wild-type) 及びヒト乳がん細胞株 SKBR-3 (p53-mutant) を用いて実験を行った。

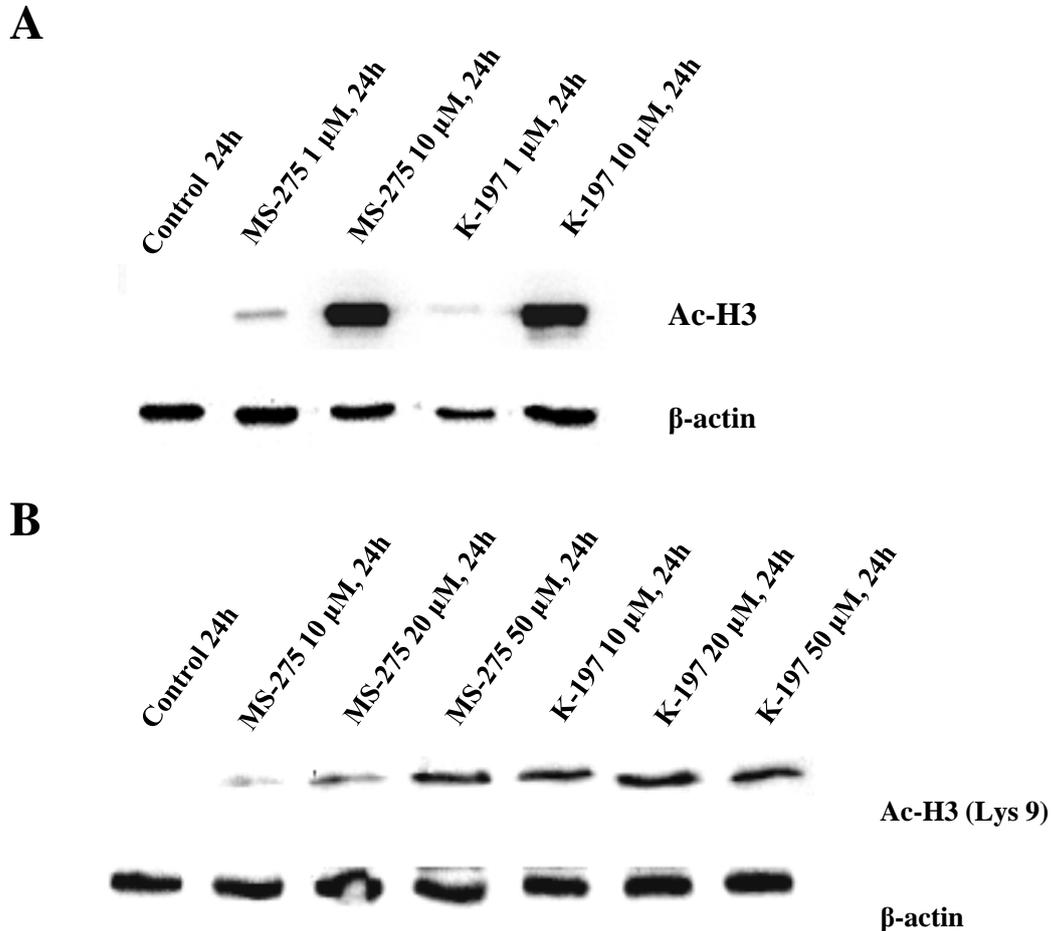


Fig. 5 ヒト大腸がん細胞株 HCT116 に対する K-197 薬剤添加 24 時間後の (A) Ac-H3 及び(B) Ac-H3 (Lys9)の検出量

Fig. 5A (total acetyl histone H3)及び **Fig. 5B** (acetyl histone H3 (Lys-9))は **K-197** 及び **MS-275** 添加 24h 後の Ac-H3 のレベルを Western blot 法にて調べたものである。**K-197** は、観察されたように、陽性対照化合物 **MS-275** と同様、濃度依存的に Ac-H3 を亢進させた。このことから、**K-197** は 2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤である **MS-275** とほぼ同様の作用機構により抗がん作用を示していることが示唆された。また、**Fig. 5B** から分かるように、**K-197** は、**MS-275** と比べ、がん抑制遺伝子などの転写に関わる Lys 9 残基のアセチル化を、10-20 μM において若干ながら **MS-275** よりも早く亢進

していることが確認された。**Fig. 5A** 及び **5B** の結果から、**K-197** は Ac-H3 を **MS-275** と同程度に亢進させ、且つ AcH3 の Lys9 を若干ながら **MS-275** よりも亢進させた。以上のことは、**K-197** は **MS-275** よりもがん抑制遺伝子群を活性化し、細胞周期停止やアポトーシスを誘導する能力が高いことを示唆する。

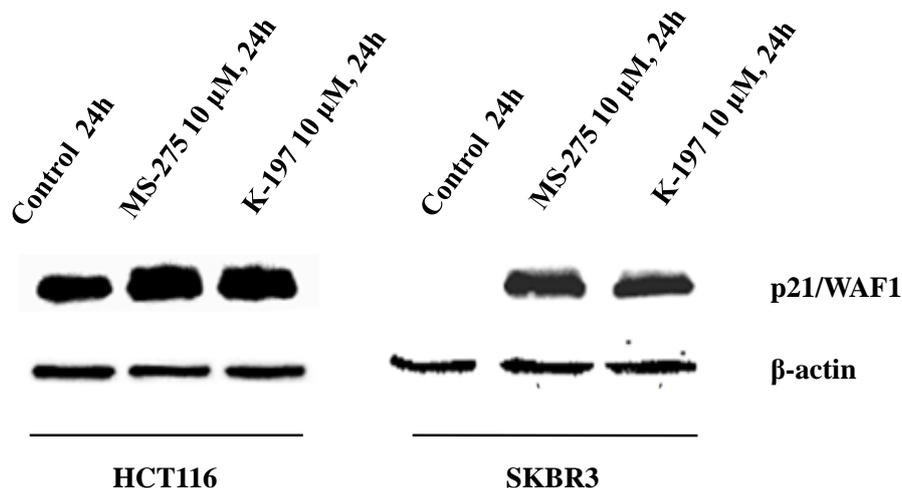


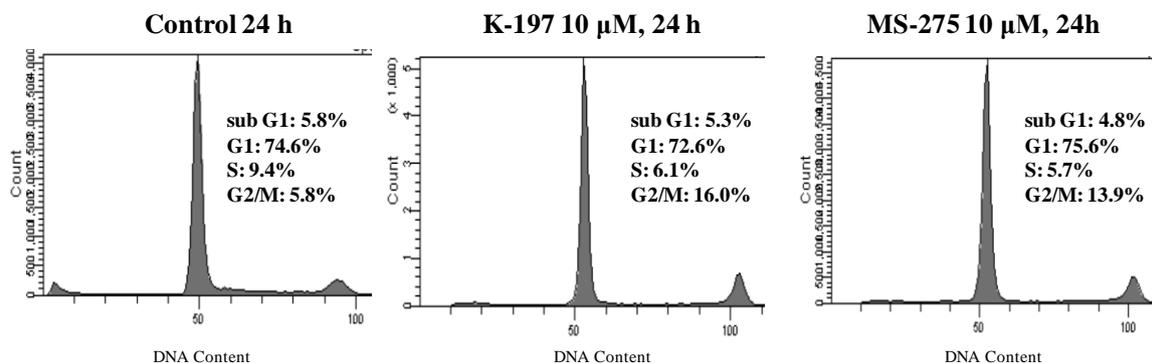
Fig. 6 HCT116 及び SKBR3 細胞株に対する p21/WAF1 タンパク質の発現レベル

HCT116 細胞株 (p53-wild type)において、**K-197** 及び **MS-275** 薬剤添加による p21/WAF1 遺伝子産物の発現レベルを調べたが、コントロールでも発現しているため、両者の遺伝子産物の発現レベルの比較は困難であった。そこで、p53-mutat type であるヒト乳がん細胞株 SKBR3 にて評価したところ、**K-197** 及び **MS-275** は、細胞周期停止やアポトーシスに関わる p21/WAF1 遺伝子産物を同程度亢進することが分かった。

ヒト大腸がん細胞株 HCT116、ヒト乳がん細胞株 SKBR3 に対する、**K-197** 及び **MS-275** 細胞周期解析

前述の実験結果から、**K-197** は Histone H3 のアセチル化を亢進し、細胞周期停止やアポトーシスに関わる遺伝子産物 p21/WAF1 を強く発現上昇させることが明らかとなった。そこで、Flow cytometer を用いて細胞周期の解析を行った。

HCT116 (wild-type)



SKBR3 (p53 mutation)

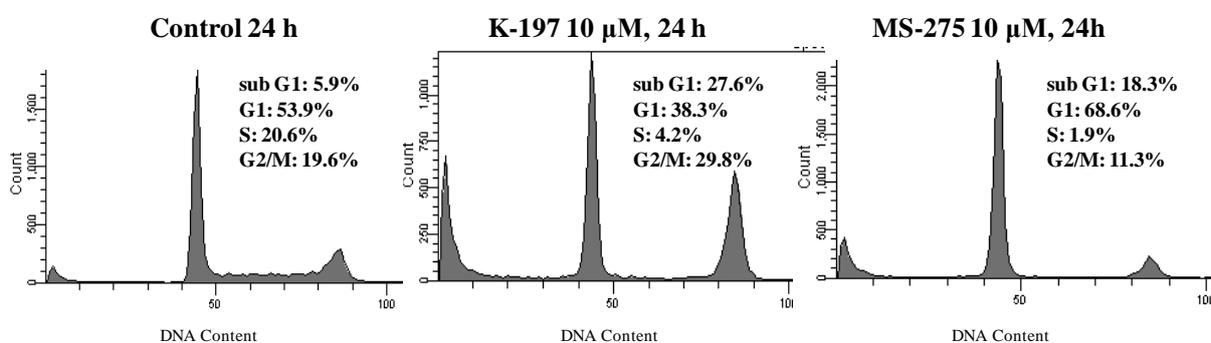


Fig. 7 HCT116 及び SKBR3 に対する K-197 及び MS-275 の細胞周期解析

Fig. 7 は、ヒト大腸がん細胞株 HCT116 及びヒト乳がん細胞株 SKBR3 に **K-197** 又は **MS-275** 添加 24 時間経時変化を観察して得た各周期の細胞の割合を表している。HCT116 細胞では、24 時間薬剤添加後、**K-197** 及び **MS-275** は、それぞれコントロールと比べて S 期の細胞割合を減少させ、G2/M 期を僅かながら増加させた。一方、ヒト乳がん細胞株 SKBR-3 では、**K-197** は、添加 24 時間後、G2/M 期細胞やアポトーシス細胞を含む sub-G1 細胞を大きく増加させた。これに対し、**MS-275** は、S 期細胞をコントロールと比べ減少させたが、G2/M 期細胞の増減は少なく、sub-G1 期細胞の増加も、**K-197** 程大きくはなかった。以上の実験結果より、**K-197** は HistoneH3 をアセチル化することにより細胞周期停止遺伝子産物 p21/WAF1 タンパク質を亢進させ、主に細胞周期を G1 で制御し、アポトーシスを誘導することが分かった。

K-197 と陽性対照化合物 MS-275 の HDAC1, 2, 3 アイソザイム阻害選択性について

Table 3 は、K-197 と MS-275 の HDAC1, 2, 3 アイソザイム阻害選択性を調べた結果である。この表からもわかるように、両者は、他の 2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤と同様、HDAC1、2、3 を阻害していた。したがって、K-197 は、細胞周期解析において MS-275 とわずかな違いが観察されたが、本質的には、MS-275 とほぼ同様の作用機構で抗がん活性を発揮することが示唆された。

Table 3 K-197 と MS-275 の HCT116 細胞増殖抑制活性及び HDAC1, 2, 3 の阻害活性

Compound	HCT116 IC ₅₀ (μ M)	HDAC1 IC ₅₀ (μ M)	HDAC2 IC ₅₀ (μ M)	HDAC3 IC ₅₀ (μ M)
K-197	1.2	1.17	3.36	6.00
MS-275	0.7	0.95	6.61	1.07

HCT116 移植ヌードマウスを用いた経口投与による抗腫瘍活性試験について

K-197 の抗がん作用、薬物代謝、薬物動態、副作用などを総合的に観察するために、MS-275 を陽性対照化合物として用い、ヒト大腸がん細胞株 HCT116 移植ヌードマウスを用いた抗腫瘍効果試験を実施した。

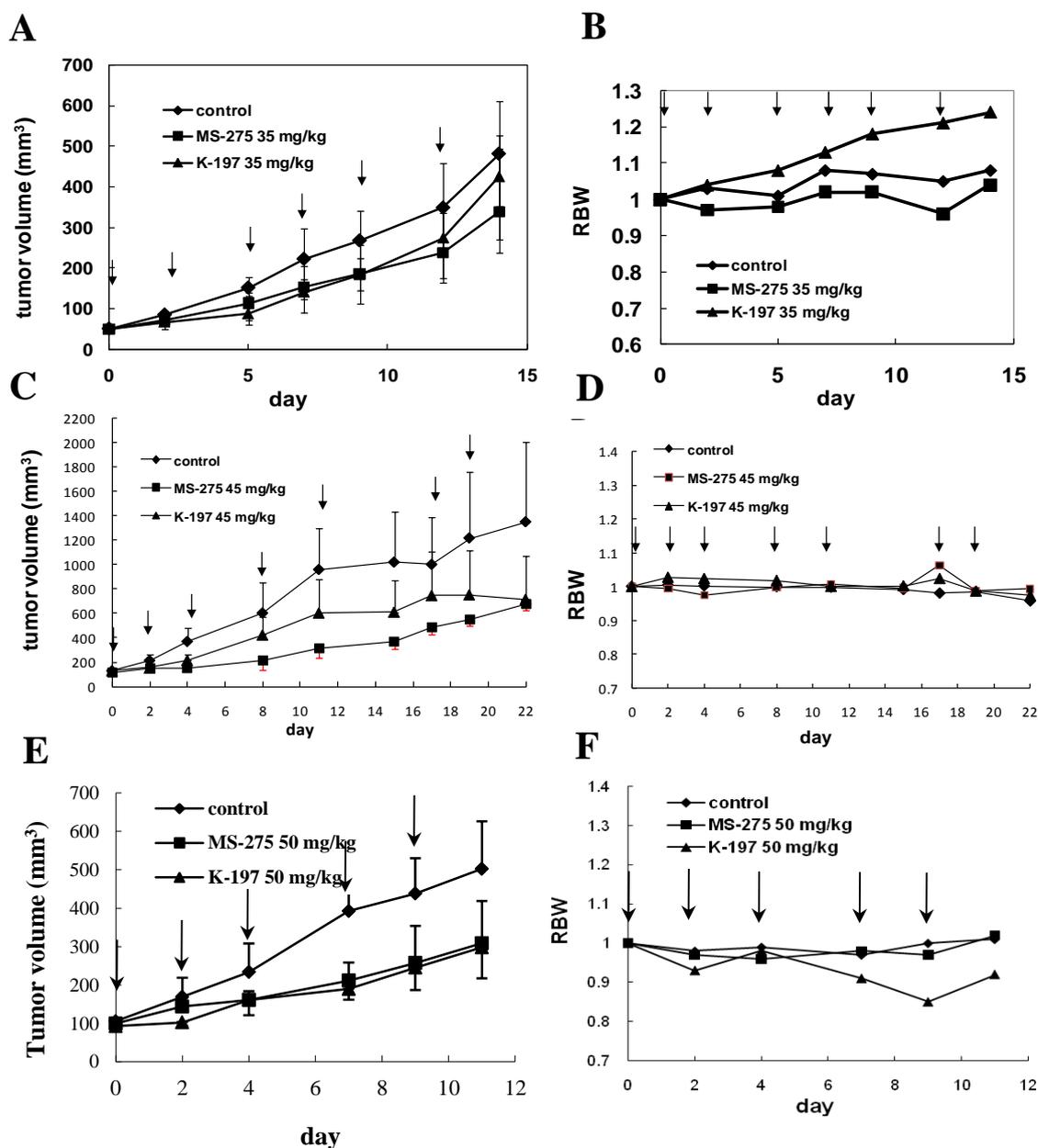


Fig. 8 ヒト大腸がん細胞株 HCT116 移植ヌードマウスを用いた抗腫瘍効果試験

Fig. 8 は、ヒト大腸がん細胞株移植ヌードマウスを用いた経口投与による抗腫瘍効果試験の実験結果である。**Fig. 8A** は、**K-197** または **MS-275** を 35 mg/kg 経口投与した時の腫瘍体積を測定した結果である。**Fig. 8B** は、**K-197** または **MS-275** を 35 mg/kg 経口投与した時の体重変化を測定した結果である。**Fig. 8C** は、**K-197** または **MS-275** を 45 mg/kg 経口投与による腫瘍体積を測定した結果であり、**Fig. 8D** は、**K-197** または **MS-275** を 45 mg/kg 経口投与した時の体重変化を測定した結果である。**Fig. 8E** は、**K-197** または **MS-275** を 50 mg/kg 経口投与した時の腫瘍体積であり、**Fig. 8F** は、**K-197** または **MS-275** を 50 mg/kg 経口投与した時の体重変化を測定した結果である。**Fig. 8A**

の結果から、**K-197** 及び **MS-275** 薬剤投与群ともに、コントロールと比べて、腫瘍体積の変化に有意な差は見られなかった。**Fig.8C** の結果では、**MS-275** はコントロールと比べ腫瘍体積の減少に有意差を示したが、**K-197** は、コントロールと比べて有意差を示さなかった。**Fig. 8E** の結果から、**K-197** は、コントロールと比べて腫瘍体積の減少に有意差を示した。したがって、**K-197** は 35 mg/kg、45 mg/kg 経口投与において、**MS-275** ほどの抗腫瘍効果は得られなかった。一方、50 mg/kg 経口投与においては、**K-197** は **MS-275** と同等の腫瘍縮小効果を示した。続いて、体重変化については、35 mg/kg 経口投与群(**Fig. 8B**)では、両薬剤投与群は体重変化をほぼ示さなかった。この結果は、45 mg/kg 経口投与群(**Fig. 8D**)においても同様であった。しかし、50 mg/kg 経口投与群(**Fig. 8F**)では、**MS-275** と比べて、**K-197** では有意に体重減少が起こった。

薬剤投与 (45 mg/kg)による心臓の湿重量及び腫瘍湿重量の変化について

上記の実験結果より **K-197** は経口投与で満足すべき腫瘍活性を示すものではなかった。そこで、投与終了後、心臓の重量（損傷：例えば心肥大など）や腫瘍の湿重量を測定した。

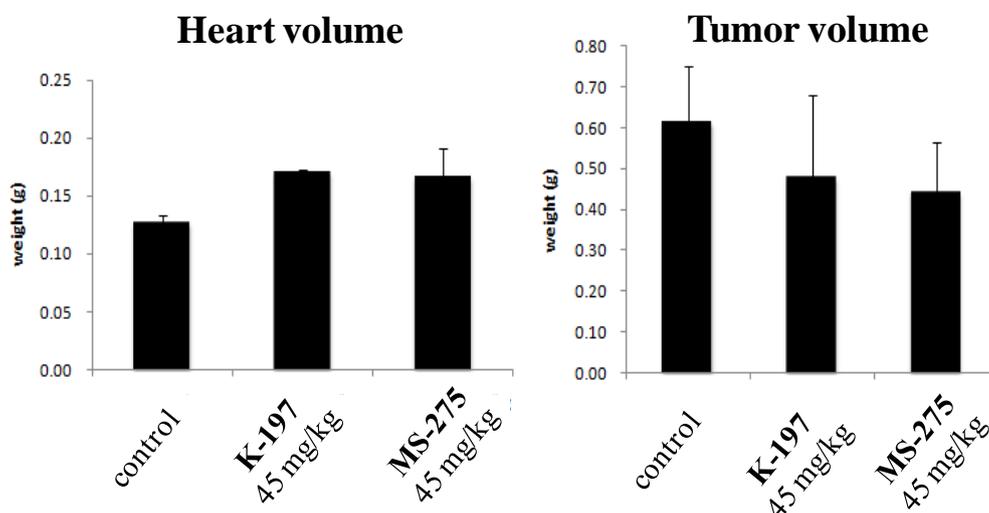


Fig. 9 心臓の湿重量及び腫瘍湿重量

Fig. 9 は、前述で行った **K-197** 及び **MS-275** を 45 mg/kg 経口投与したヌードマウスの心臓の湿重量、腫瘍の湿重量を測定したものである。左図の心臓湿重量を見ると、**K-197**、**MS-275** を投与したマウスの心臓湿重量が微増している。これは両薬剤とも心

肥大への影響が可能性も考えられたが、コントロールの重量と差が僅かであり、且つマウスの心臓重量も少ないことから、心肥大と断定するには至らなかった。続いて腫瘍の湿重量を見てみるとコントロールと比べて両薬剤とも優位な差は得られなかった。しかし、**K-197**、**MS-275**ともコントロールより湿重量が減少しており、且つ、**K-197**は**MS-275**とほぼ同等の湿重量であったことから、**K-197**の腫瘍縮小効果はあったと判定した。

K-197 及び **MS-275** の腫瘍内移行性

K-197 の抗腫瘍効果が乏しかった一つの原因として、薬剤のがん細胞内移行性の低さが考えられた。そこで、抗腫瘍効果試験で得たマウスの腫瘍を破碎してタンパク抽出を行い、腫瘍内での AcH3 レベルを Western blotting により確認した。

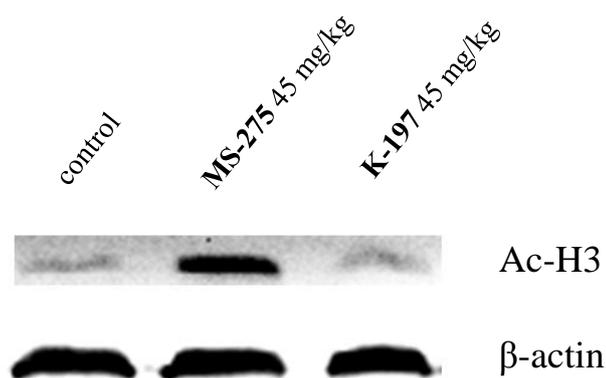


Fig. 10 薬剤投与 45mg/kg 群の腫瘍内タンパク質の HistoneH3 アセチル化レベル

Fig. 10 は **K-197** 及び **MS-275** を 45 mg/kg 経口投与したヌードマウス腫瘍内の HistoneH3 のアセチル化レベルを Western blotting により測定した結果である。**MS-275** を投与した腫瘍内タンパク質抽出物のアセチル化が亢進していることが確認できたが、**K-197** を投与した抽出物にはアセチル化の亢進は観察さえなかった。この結果から、**K-197** は in vivo の試験において腫瘍内移行性が低いこと確認された。今回の研究では **K-197** が、ヒト大腸がん細胞株 HCT116、ヒト乳がん細胞株 SKBR3 において Histone H3 のアセチル化を亢進させると共に、がん抑制遺伝子 p21/WAF1 産物を亢進させた。これら一連のシグナル伝達により G1 期及び G2/M 期での細胞周期停止及びアポトーシス誘導が引き起こされて細胞増殖を抑えている又は細胞死を誘導するこ

とが示唆された (Fig. 11)。しかしながら、**K-197** は、in vitro において、臨床試験移行化合物である **MS-275** と同等の細胞増殖抑制活性を示すにも関わらず、HCT116 移植ヌードマウスを用いた抗腫瘍効果試験においては **MS-275** ほどの抗腫瘍効果を得ることはできなかった。これは、**K-197** の生物学的利用率(Bioavailability)が低いため、抗腫瘍効果が乏しくなったと推定している。

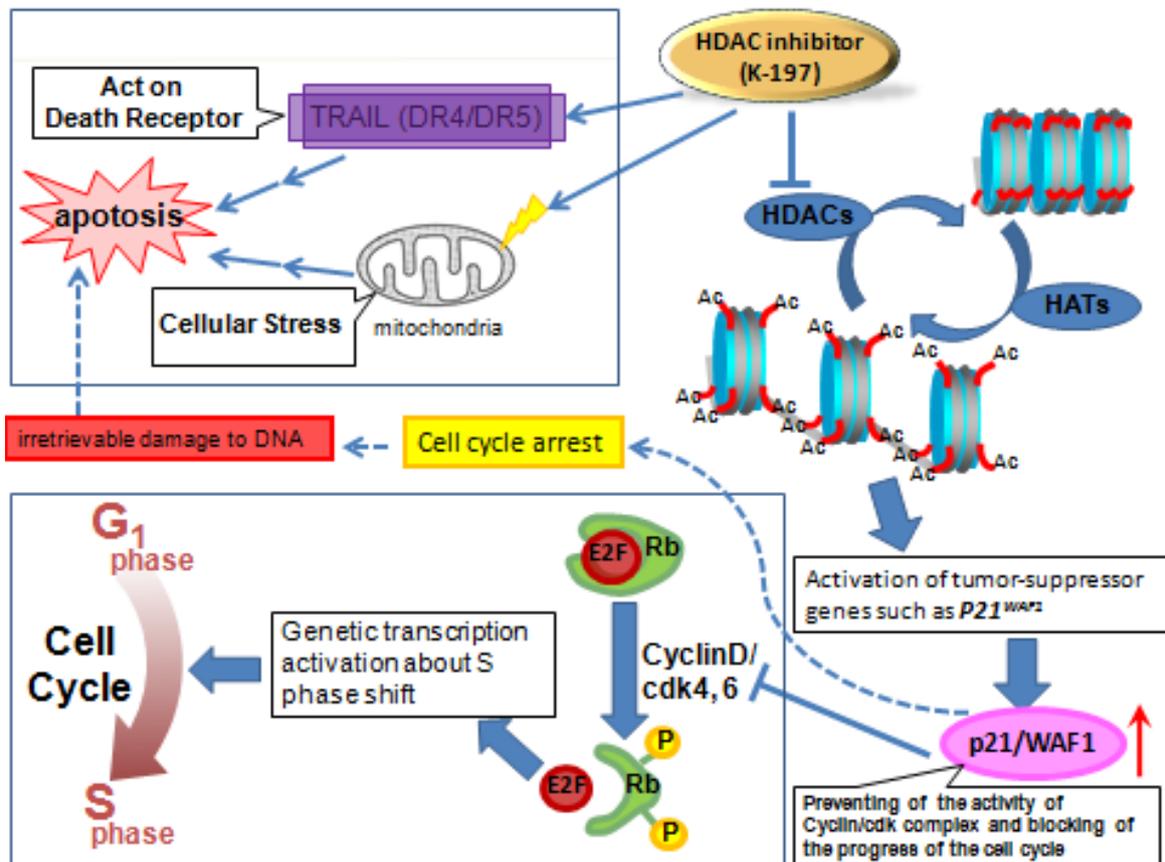


Fig. 11 K-197 の推定される抗がん作用機構

第 4 章

2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤の創製

第 1 節

Cap 部位にアミド結合を持つ HDAC 阻害剤の合成

K-197 は、生物学的利用率 (Bioavailability) が低いと推定され、ヌードマウスを用いた抗腫瘍効果試験において満足のいく成績を残すことが出来なかった。この結果から、*in vivo* において、抗腫瘍活性を示す化合物の探索を目標に新たな HDAC 阻害剤の設計を企図した。まず始めに、問題点である生物学的利用率をどう改善するか考察した。そこで、2002 年に GlaxoSmithKline 社が発表した、化合物の構造に存在する自由度 (自由回転結合数) を減少させると、Bioavailability が向上するという経験則に注目した。同社は、この経験則では sp^3 炭素 (結合) を増加させることにより、候補化合物が臨床試験を通過しやすくなることを述べ、構造の自由度を減少させることにより、物性や生物学的利用率の改善、代謝抵抗性、抗腫瘍効果の増大が観察されることを報告している⁵⁴⁾。そこで、**K-197** 構造中で自由度の高い三級アミンを、より自由度の低いアミド結合に替え、生物学的利用率の向上した化合物の創製を試みた。

アミド含有 HDAC 阻害剤の合成

K-197 の中央に位置する 3 級アミンの隣にある炭素 (-CH₂-) をアミドに変換することにより、自由度を減少させた化合物を設計した。また、化合物の構造活性相関を得るために cap 部位構造変換したアミド類縁体の合成を試みた (**Fig. 12**)。

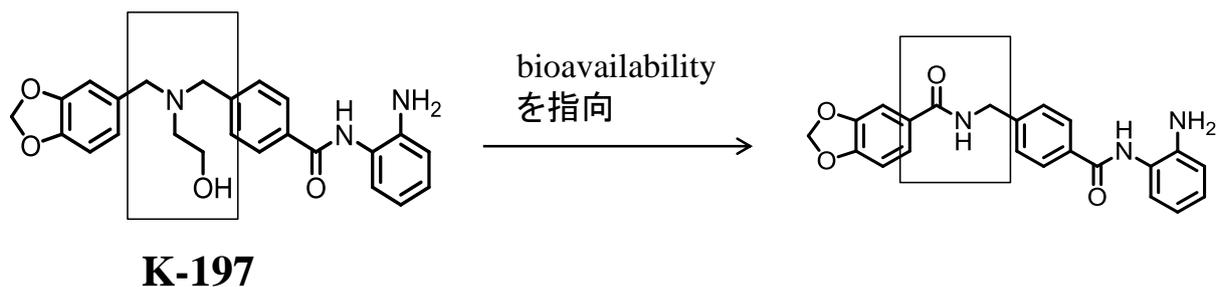
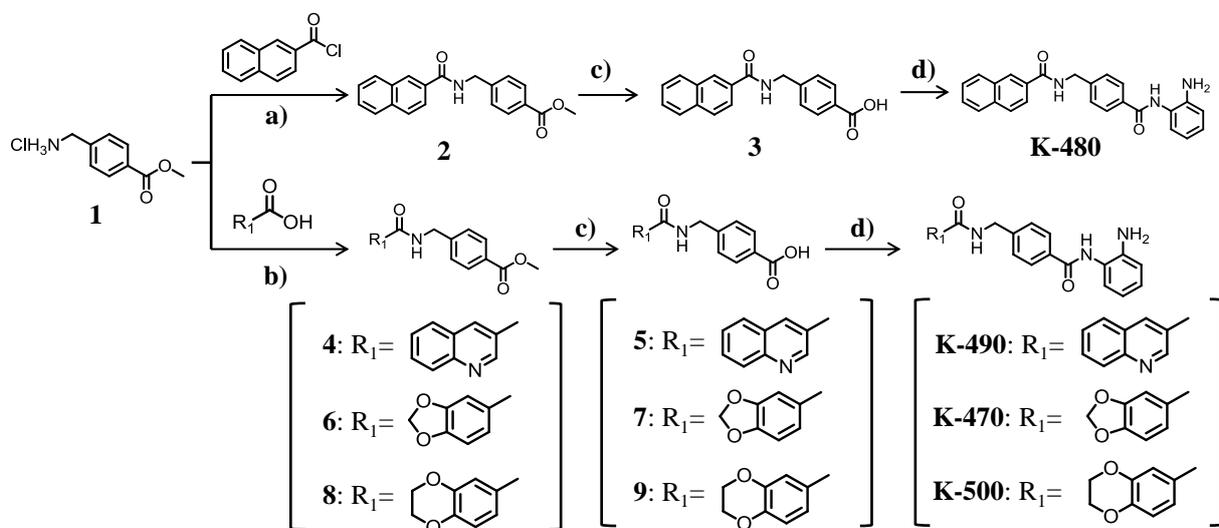


Fig. 12 アミド基を含む 2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤の設計

合成経路

化合物 **1** を出発原料として、以下の **Scheme 1** により合成を行った。

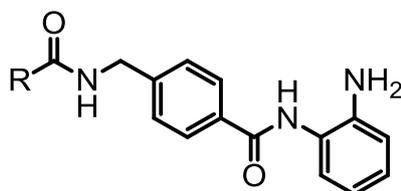
Scheme 1 アミド誘導体 K-470, K-480, K-490 及び K-500 の合成



Reagent and conditions: (a) Et_3N , CH_2Cl_2 , rt, overnight, 98%; (b) DMF, HOBT, WSCI/HCl, rt, overnight, 37% for **4**, 98% for **6**, 90% for **8**; (c) 1 M LiOH, THF/ H_2O , rt, overnight, 97% for **3**, 85% for **5**, 90% for **7**, 91% for **9**; (d) *o*-phenylenediamine, HOBT, WSCI (free salt), DMF, rt, overnight, 31% for **K-480**, 35% for **K-490**, 61% for **K-470**, 43% for **K-500**.

アミド誘導体の細胞増殖抑制活性試験及び HDAC 阻害活性試験、水溶性試験

Table 4 アミド誘導体の HCT116 細胞増殖抑制活性、HDAC1 阻害活性及び水溶性試験



Compound	R	HCT116 IC ₅₀ (μ M)	HDAC1 IC ₅₀ (μ M)	Solubility in 10%DMSO/H ₂ O (mg/ml)
K-480		0.8	1.0	< 0.1
K-470		0.7	1.6	0.5
K-490		0.7	1.2	< 0.1
K-500		0.7	1.7	0.2
K-197		1.2	1.2	0.2
MS-275		0.8	0.5	0.8

上記 Table 4 に示すように、アミド類縁体は、K-197 と比べ、HCT116 に対する細胞増殖抑制活性を向上させた。化合物 K-470 は水溶性も良好なことから、本化合物を基盤に更なる構造最適化を試みた。まず、K-197 及び K-470 の共通な官能基である cap 部位に注目し、水溶性向上を指向した新規化合物のデザインを考えた。そこで、現在非小胞肺がんの治療薬である Gefitinib (Iressa[®]) 構造中の水溶性官能基を導入することを検討した(Fig. 13)。

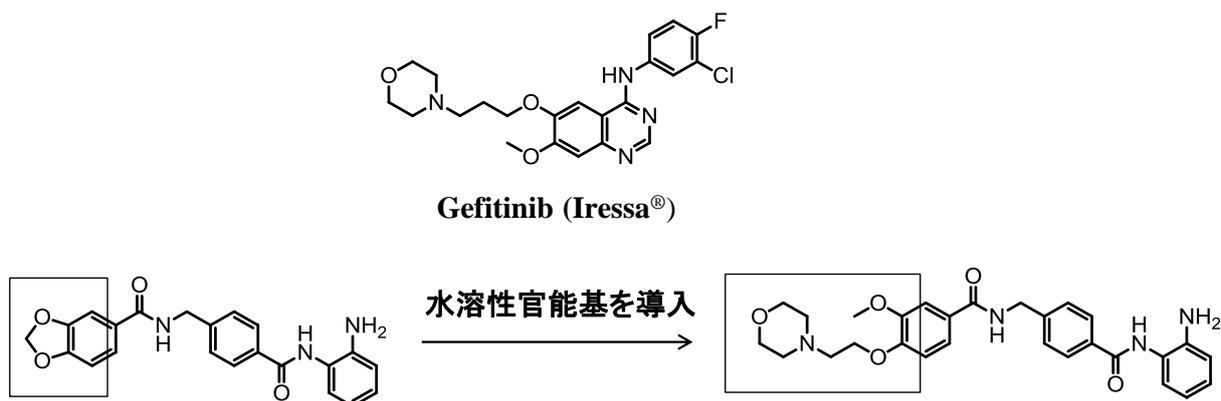
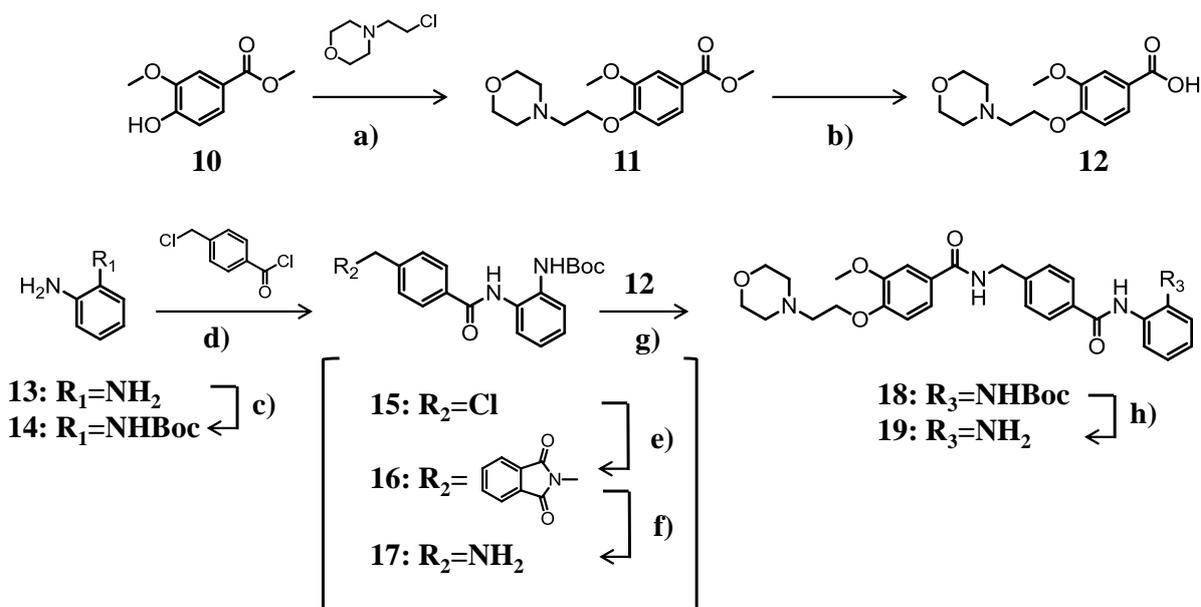


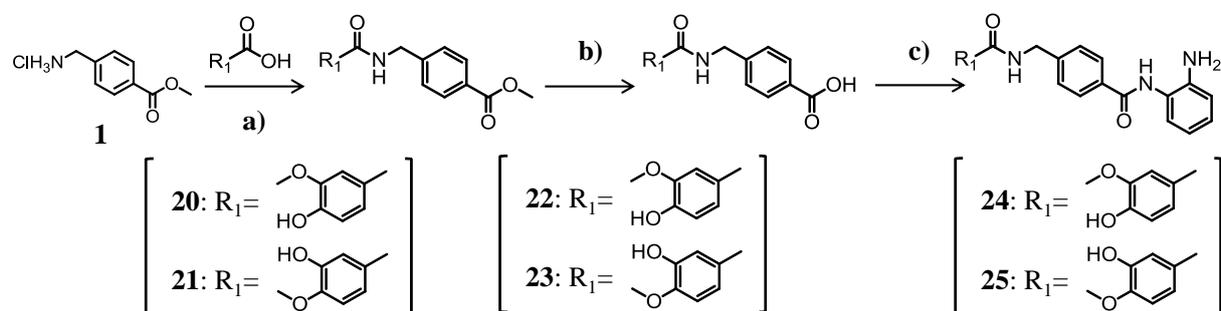
Fig. 13 水溶性官能基を導入した新規 HDAC 阻害剤のデザイン

Scheme 2 Gefitinib (Iressa[®]) の水溶性官能基を導入した化合物の合成経路



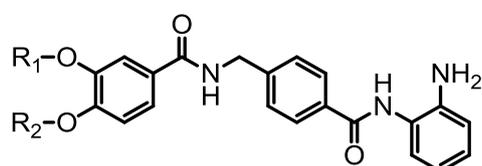
Reagent and conditions: (a) K₂CO₃, DMF, 100 °C, overnight, 90% ; (b) 1 M LiOH, THF/H₂O, rt, overnight, 90%; (c) (Boc)₂O, THF, Et₃N, rt, overnight, 97%; (d) CH₂Cl₂, Et₃N, rt, overnight, 62%; (e) Potassium phthalimide, KI, DMF, 50 °C, overnight, 75%; (f) NH=NH/H₂O, EtOH, 90 °C, 3 h, 52%; (g) CDI, DMAP, 60 °C→rt, overnight, 5%, (h) 4 M HCl, MeOH, rt, 3h, 36%.

Scheme 2 バニリン誘導体 24, 25 の合成経路



Reagent and conditions: (a) HOBt, WSCI (free salt), Et_3N , THF, rt, overnight, 91% for 20, 75% for 21; (b) 1 M LiOH, THF/ H_2O , rt, overnight, 99% for 22, 92% for 23; (c) *o*-phenylenediamine, HOBt, WSCI (free salt), THF, rt, overnight, 18% for 24, 40% for 25.

Table 5 Gefitinib (Iressa[®])水溶性官能基を導入した化合物 19 及びバニリン誘導体 24, 25 の HCT116 細胞増殖抑制活性、HDAC1 阻害活性及び水溶性試験



Compound	R_1	R_2	HCT116 IC_{50} (μM)	HDAC1 IC_{50} (μM)	Solubility in 10% DMSO/ H_2O (mg/ml)
19	CH_3-		0.1	1.4	0.6
24	CH_3-	H	4.2	1.6	0.4
25	H	CH_3-	1.8	1.2	0.5
K-197			1.2	1.2	0.2
K-470			0.7	1.6	0.5
MS-275			0.8	0.5	0.8

上記 **Table 5** は Gefitinib (Iressa[®])水溶性官能基を導入した化合物 **19** 及びバニリン誘導体 **24, 25** の HCT116 細胞増殖抑制活性、HDAC1 阻害活性及び水溶性試験の結果である。**Gefitinib (Iressa[®])**の水溶性官能基を導入した化合物 **19** は **K-470**、バニリン骨格の **24, 25** と比べ、水溶性を維持したまま、HCT116 細胞増殖抑制活性を示した。

Table 6 **K-470, K-480, K-490, K-500, 19, 24, 25** の各種ヒトがん細胞株増殖抑制試験

Cell line	IC ₅₀ value (μM)								
	K-197	MS-275	K-470	K-480	K-490	K-500	19	24	25
- colon -									
HCT116	1.2	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.1	4.2	1.8
SW480	4.8	4.2	4.0	4.0	3.9	4.2	0.7	> 10	> 10
SW620	N. D	3.1	2.8	3.3	3.3	2.3	1.0	> 10	> 10
- breast -									
SKBR3	3.1	2.8	1.3	2.5	4.2	2.3	0.2	N. D	N. D
MCF-7	3.3	2.3	2.1	6.7	3.4	2.5	2.0	N. D	N. D
MDA-MB-231	1.8	0.6	0.7	1.0	0.8	0.9	1.9	N. D	N. D
- lung -									
A549	3.3	3.4	2.7	3.4	3.3	3.4	1.8	N. D	N. D

Table 6 はアミド含有 2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤である **K-470, K-480, K-490, K-500, 19, 24** 及び **25** の各種ヒトがん細胞株細胞増殖抑制活性試験の結果である。methylenedioxy 基或いは OH 基にモルフォリン基をもつ **K-470, 19** は陽性対照化合物である **MS-275** と比べ、各種がん細胞株に対し、優れた細胞増殖抑制効果を示した。また、**K-470, 19** は **K-197, K-470, 19, 24, 25** と比べ、比較的高い水溶性を維持しつつ、高い細胞増殖抑制活性を示した。

第 5 章

HDAC1/2 アイソザイム選択的 HDAC 阻害剤の創製

第 1 節

チエニル基置換 2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤と

HDAC1/2 選択的阻害効果

既存の HDAC 阻害剤は、基本的に 2 種類の亜鉛結合部位を持っている。1 つ目は TSA や SAHA に代表され、水溶性が高く、広範囲な HDAC 阻害活性を有す hydroxamic acid 基、2 つ目は MS-275 に代表される経口性、代謝安定性、HDAC1-3 選択的阻害をする 2-aminobenzamide 基である。HDAC 阻害剤のドラッグデザインを行う際に、Cap 構造を最適化している化合物は多数論文発表されているが、亜鉛結合部位自体を構造変換している化合物は少ない。そこで、著者は、2-aminobenzamide 基のアミノ基 (-NH₂) から見て *p* 位に 2-thienyl 基を導入することにより、HDAC1 と HDAC2 選択的阻害活性を生み、且つ、HDAC1 阻害活性が MS-275 と比べて約 10 倍高くなったという報告⁵⁵⁾⁻⁶¹⁾を受け、亜鉛結合部位に 2-thienyl を導入した化合物を合成した(Fig. 13)。

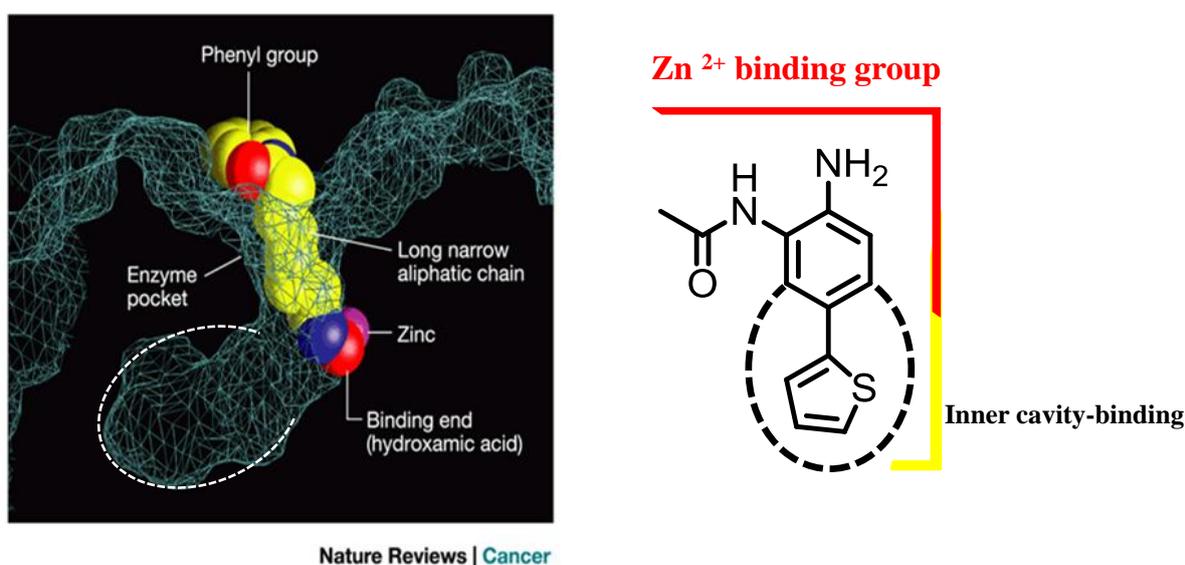
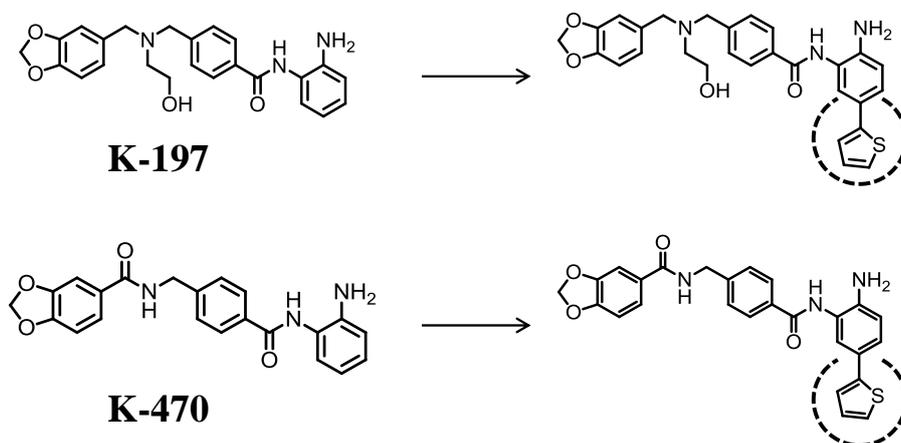


Fig. 13 SAHA と HDAC1 とのドッキングモデル-HDAC1 の inner cavity-

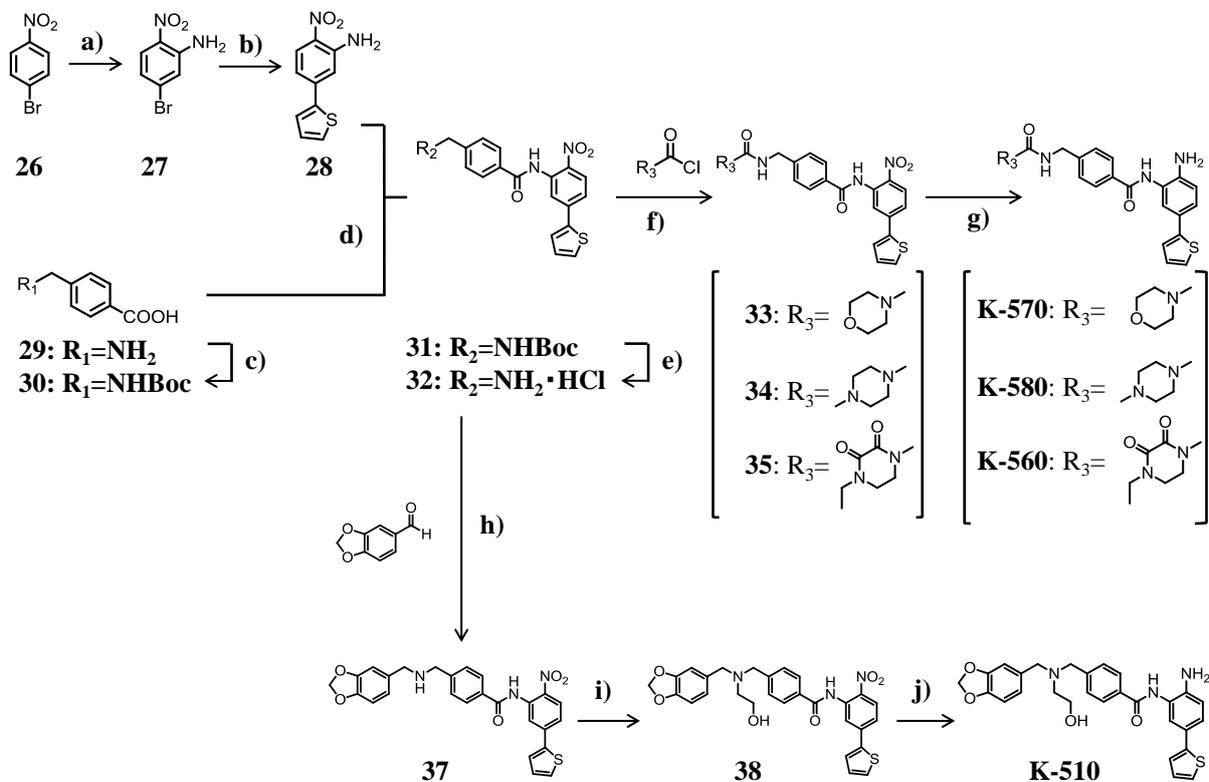
Paul A. Marks et al., *Nat. Rev. Cancer*, **1** (2001) 194-202.より引用

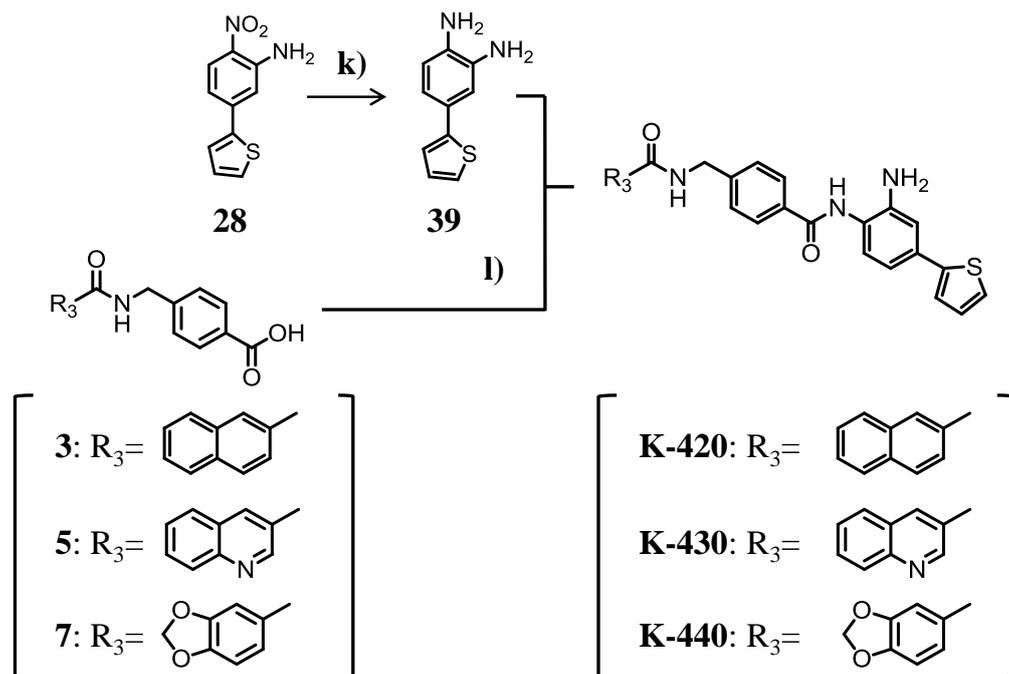
チエニル基を有する 2-アミノベンズアミド体の合成戦略

K-197 及び **K-470** をリード化合物として 2-aminobenzamide 基にチエニル基を導入した化合物 **K-510** の合成を行った。



Scheme 3 K-420, K-430, K-440, K-450 及び K-510 の合成経路





Reagent and conditions: (a) CuCl, NH₂OMe, KO^tBu, DME, -78 °C, 3 h, 67%; (b) Pd (PPh₃)₄, 2-Thiophene bonic acid, K₂CO₃, (*o*-MeC₆H₄)₃P, DME/H₂O, 80 °C, 18 h, 86%; (c) (Boc)₂O, NaHCO₃, 1,4-dioxane/H₂O, 94%; (d) SOCl₂, Pyridine, DMF, rt, overnight, 44%; (e) 15% HCl, THF/MeOH, rt, overnight, 99%; (f) Piperoyloyl chloride, Et₃N, CH₂Cl₂, rt, overnight, 31%; (g) SnCl₂ · 2H₂O, HN₄OAc, THF/MeOH, rt, overnight 11%; (h) Piperonal, NaBH(OAc)₃, CH₂Cl₂, CH₃COOH, rt, 3 h, 26%; (i) 2-Bromoethanol, K₂CO₃, THF/MeOH, 60 °C, 18 h, 56%; (j) SnCl₂ · 2H₂O, HN₄OAc, THF/MeOH, overnight 10%; (k) 10% Pd/C, H₂, MeOH, rt, 3 h, 62%; (l) HOBt, WSCI (free salt), Et₃N, DMF, rt, overnight, 26% for K-420, 16% for K-430, 8% for K-440.

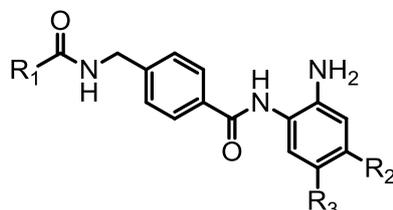
Table 6 は **K-197** をリード化合物とし、2-aminobenzamide の *p* 位に thienyl 基を導入した化合物の評価結果である。**K-510** は **K-197** よりも高い HCT116 細胞増殖抑制活性を示したが、水溶性に乏しかった。**Table 7** は、**K-470** をリード化合物として得たチエニル基置換 2-aminobenzamide 体の HCT116 細胞増殖抑制活性、HDAC1 阻害活性試験、並びに水溶性試験の結果を示したものである。**K-420**, **K-430**, **K-440** 及び **K-450** は比較的高い HCT116 細胞増殖抑制活性を示したが、水溶性が乏しかった。これまでの研究で、亜鉛イオン結合官能基である 2-aminobenzamide に 2-thienyl 基を導入した化合物 **K-420**, **K-430**, **K-440**、並びに **K-450** は、**K-197** が持っている、HCT116 細胞増殖抑制効果や HDAC 阻害活性を維持又は向上させたが、水溶性は乏しかった。そこで、

今後の方針として、Cap 構造に水溶性官能基を導入することにした。水溶性官能基として、一般的に水溶性向上のために使われるモルフォリン基、抗菌剤の水溶性官能基であるジケトピペラジン基、メチルアルコールモルフォリン基を使用した。

Table 6 チエニル基置換 2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤 K-510 の HCT116 細胞増殖抑制活性、HDAC1, 2, 3 阻害活性及び水溶性試験

Compound	HCT116 IC ₅₀ (μM)	HDAC1 IC ₅₀ (μM)	HDAC2 IC ₅₀ (μM)	HDAC3 IC ₅₀ (μM)	Solubility in 10%DMSO/H ₂ O (mg/ml)
K-510	0.5	0.06	0.74	> 100	> 0.1
K-197	1.2	1.17	3.36	6.00	0.2
MS-275	0.7	0.95	6.61	1.07	0.8

Table 7 チエニル基置換 2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤 K-420, K-430, K-440 及び K-450 の HCT116 細胞増殖抑制活性、HDAC1 阻害活性及び水溶性試験



Compound	R ₁	R ₂	R ₃	HCT116 IC ₅₀ (μM)	HDAC1 IC ₅₀ (μM)	Solubility in 10%DMSO/H ₂ O (mg/ml)
K-420			H	3.9	1.0	< 0.1
K-430			H	6.4	1.2	< 0.1
K-440			H	0.8	0.4	< 0.1
K-450		H		0.7	0.4	< 0.1
K-197				1.2	1.2	0.2
MS-275				0.8	0.5	0.8

Table 8 K-420、K-430、K-440、K-450、K-510 の各種ヒトがん細胞株増殖抑制試験

Cell line	IC ₅₀ value (μM)						
	K-197	MS-275	K-420	K-430	K-440	K-450	K-510
- colon -							
HCT116	1.2	0.8	3.0	4.7	0.8	0.9	0.5
SW480	4.8	4.2	8.0	> 10	> 10	> 10	N. D
SW620	N. D	3.1	5.6	> 10	> 10	N. D	N. D
- breast -							
SKBR3	3.1	2.8	> 10	9.2	7.9	7.6	5.8
MCF-7	3.3	2.3	> 10	>10	> 10	N. D	> 10
MDA-MB-231	1.8	0.6	> 10	3.4	2.2	N. D	N. D
- lung -							
A549	3.3	3.4	6.6	> 10	8.9	N. D	N. D

Table 8 は、チエニル置換 2-amonobenzamide 体 **K-420**, **K-430**, **K-440**, **K-450** の各種ヒトがん細胞株パネル試験の結果である。*m*-位にチエニル基を持つ **K-440** と、*p*-位にチエニル基を持つ **K-450** との間には抗がん活性の違いは見られなかった。

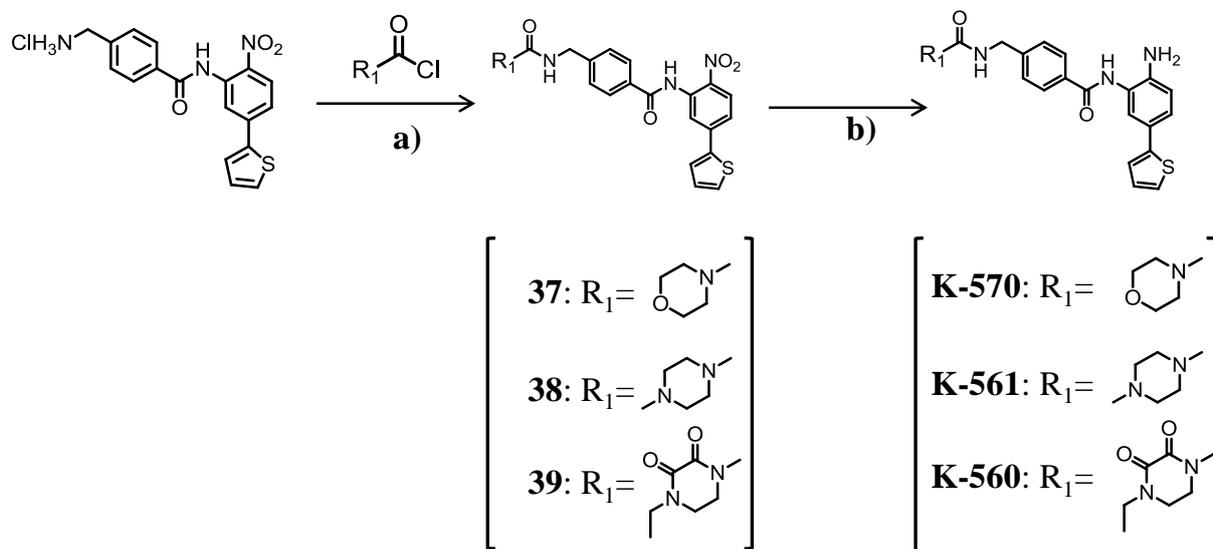
第 2 節

水溶性官能基 Diketopiperadine を導入したチエニル基置換

2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤の合成

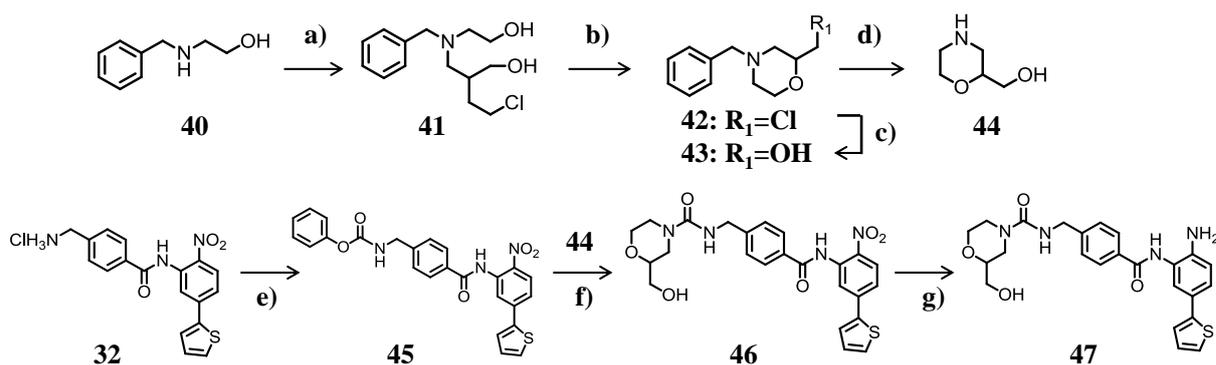
現在、2-アミノ-5- (2-チエニル) ベンズアミド型の新規 HDAC 阻害剤の研究は Merck 社、武田薬品工業、MethylGene 社を中心に精力的に行われている。Merck 社では surface domain region にリン酸エステル誘導体や水溶性アミノ酸基などの水溶性官能基を導入した構造最適化を行っているが、in vivo において、経口投与により抗腫瘍効果を示す同社の化合物は数少ない。この原因として、チエニル基やフェニル基などを導入したことで脂溶性が増大し、経口投与による生物学的利用率が低下したものだと考えられる。当研究室では経口性 2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤の探索研究に取り組んでいるが、その中で、上述のように、HDAC ポケットの surface recognition domain として 5-methylbenzo[d][1,3]dioxole に改変した **K-197** を開発した。しかし、物性や生物学的利用率に問題があったため、**K-197** の 2-aminobenzamide 基にチエニル基を導入した化合物を合成した。このチエニル基誘導体は N-(2-amino-5-(thiophen-2-yl)phenyl)-4-(propionamidomethyl)benzamide と比べて、HDAC 阻害活性を向上させたが、水溶性などの物性に問題があった。そこで、5-methylbenzo[d][1,3]dioxole 基の代わりに水溶性官能基としては汎用されている Morpholine-4-carboxamide 基、2-(hydroxymethyl)-N-methylmorpholine-4-carboxamide 基、または、 β -lactam 系抗菌剤 Piperacillin 構造に含まれている 4-Ethyl-2,3-dioxopiperazine-1-carboxamide 基を導入することにより、高活性化合物の合成を行った (**Scheme 4, 5, 6**)。

Scheme 4 K-560 及び K-570 の合成経路



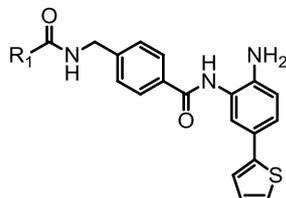
Reagent and conditions: (a) Et_3N , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$, rt, overnight, 36 % for 37, 64% for 38, 22% for 39; (b) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NH_4OAc , THF/MeOH , rt, 3 h, 44% for K-570, 36% for K-561, 53% for K-560.

Scheme 5 Compound 3 の合成経路



Reagent and conditions: (a) Epichlorohydrin, 40 °C, 0.5 h, 90%; (b) conc. H_2SO_4 , 100 °C, 0.5 h, 22%; (c) 1 M LiOH , 1, 4-dioxane, rt, overnight, 46%; (d) 10% Pd/C , H_2 , MeOH , rt, 4 h, 72%; (e) Phenyl Chloroformate, CH_2Cl_2 , Et_3N , rt, overnight, 64%; (f) 44, BuOH , reflux, 15 h, 18%; (g) $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NH_4OAc , THF/MeOH , rt, 3 h, 14%.

Table 8 チエニル基置換ベンズアミド型 HDAC 阻害剤の HCT116 細胞増殖抑制活性試験、HDAC1 阻害活性試験及び水溶性試験

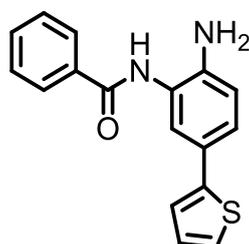


Compound	R ₁	HCT116 IC ₅₀ (μM)	HDAC1 IC ₅₀ (μM)	HDAC2 IC ₅₀ (μM)	HDAC3 IC ₅₀ (μM)	Solubility in 10%DMSO/H ₂ O (mg/ml)
K-570		0.44	0.10	0.88	> 100	Oil
K-580		0.53	0.08	0.8	> 100	1.0
K-560		0.51	0.05	0.67	> 100	0.6
47		3.6	0.12	N. D	> 100	Oil
K-197		1.2	1.2	1.2	1.2	0.2
K-510		0.49	0.06	0.74	> 100	< 0.1
MS-275		0.8	0.5	0.5	0.5	0.8

Table 8 から、水溶性官能基を導入した **K-560** 及び **K-570** は高い細胞増殖抑制活性と HDAC1 阻害活性を示した。更に化合物 **K-560** の水溶性は **MS-275** とほぼ同等であった。一方、**K-570** は **K-560** とほぼ同等の抗腫瘍活性を示したが、油状物であった。そこで、**K-560** を in vivo 試験移行化合物と考え、その HDAC アイソザイム選択性について調べた。**Table 9** は、**K-560** の他、陽性対照化合物として、**MS-275**、Merck 化合物、**TSA** の HDAC1、2、3 阻害活性をそれぞれ調べた (**Table 9**)。

Table 9 HDAC1、2、3 阻害活性

Compound	IC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)		
	HCT116	HDAC1	HDAC2	HDAC3
MS-275	0.52	0.95	6.61	1.07
K-560	0.51	0.05	0.67	>100
Merck comp	0.84	0.04	0.64	13.7
TSA		0.006	0.018	0.0063

**Merck compound**

その結果、代表的チエニル非置換 2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤 **MS-275** は HDAC1、2、3 をすべて阻害した。また、典型的チエニル置換 2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤 Merck 化合物は HDAC1、2 の他、HDAC3 も弱い阻害作用が見られた。これに対し、**K-560** は、HDAC1、2 を選択的に阻害し、HDAC3 は事実上阻害しないことが分かった。**K-560** のチエニル基は **Fig. 14** に示すように、HDAC1 または HDAC2 の inner cavity に挿入され、HDAC1/2 選択性を示したと推察される。

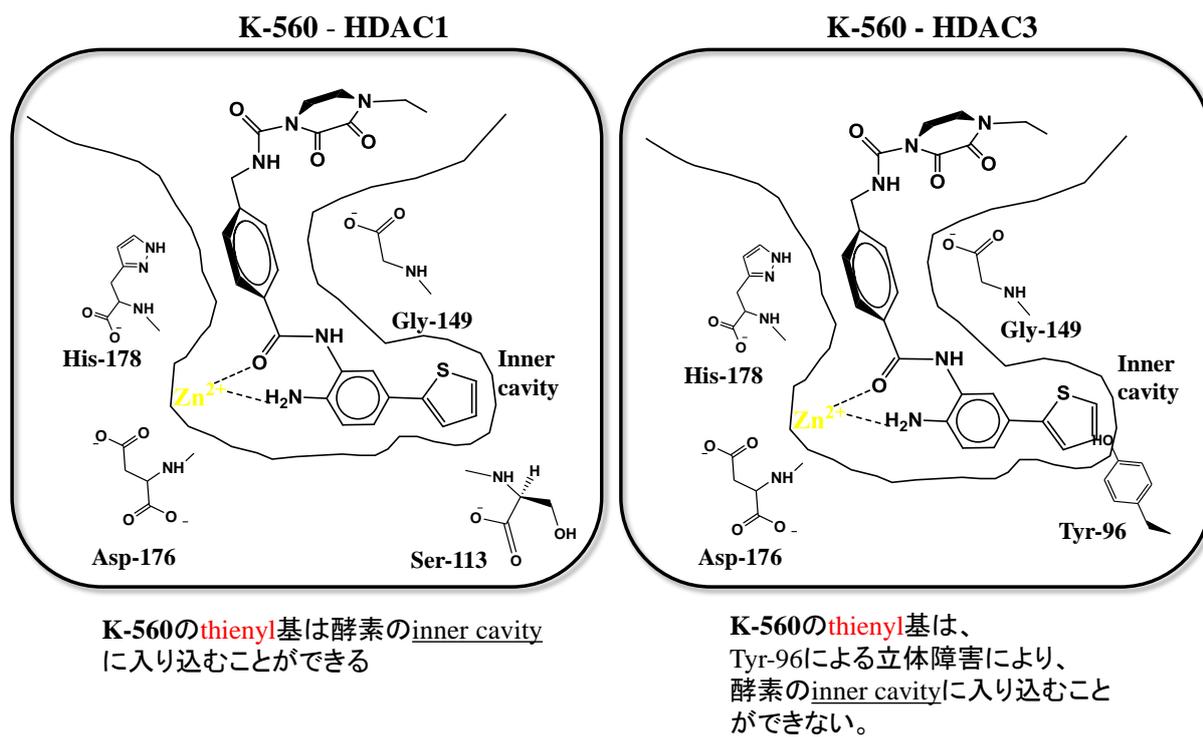


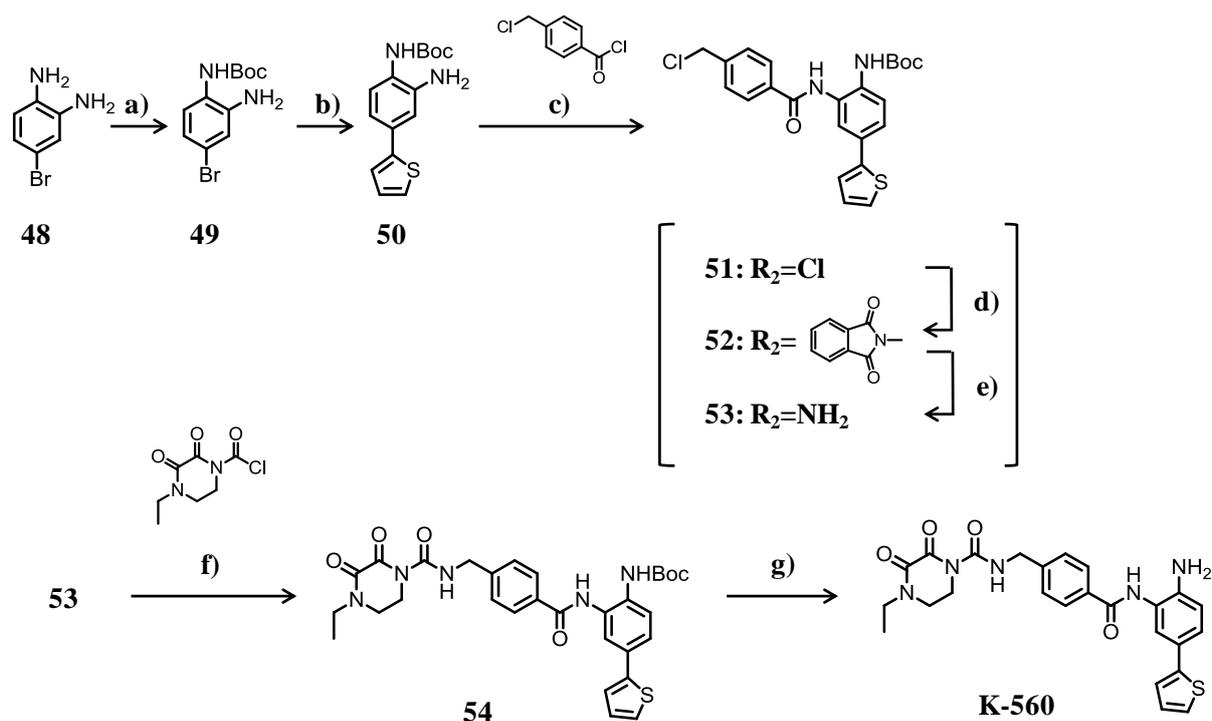
Fig. 14 K-560 と HDAC1 及び HDAC3 との結合モデル

Joey. L. Methot et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18** (2008), 973-978.を一部改変して引用

K-560 の新合成法の検討

K-560 が高い *in vitro* 活性と高い HDAC1/2 選択性を示したことから、本化合物の医薬品候補化合物としての詳細な性質を調べるために、大量合成法を検討した。

Scheme 6 K-560 の新合成法



Reagent and conditions: (a) (Boc)₂O, Et₃N, THF, rt, overnight, 68%; (b) Pd (PPh₃)₄, 2-Thiophene boric acid, K₂CO₃, (*o*-MeC₆H₄)₃P, DME/H₂O, 80 °C, 18 h, 96%; (c) Et₃N, THF, rt, 1 h, 76%; (d) Potassium phthalimide, KI, DMF, 50 °C, 1 h, 75%; (e) NH=NH/H₂O, EtOH, reflux, 3 h, 84%; (f) Et₃N, CH₂Cl₂, rt, 3 h, 90%; (g) TFA/CH₂Cl₂, rt, 1 h, 96%.

48 を出発物質とし、*p*-位選択的に-NH₂基を Boc 保護し、化合物 49 を高収率 (68%) で得た。また、鈴木-宮浦クロスカップリング反応により thienyl 基を導入した化合物 50 を合成した。続いて、以前より低収率が問題であった 1,4-phenylene 骨格と thienyl 基 50 との縮合反応を 4-Chlorobenzoyl chloride により縮合し、次いで、Gabriel Amine 反応により行い、53 (32 の無塩化合物) を高収率で得た (50 から 53 までの収率 29%)。この後、1,4-dioxopiperadinyll chloride を反応させ、TFA による脱保護処理により、K-560 をグラム単位で合成できることに成功した。

第 6 章

HDAC1/2 アイソザイム選択的 HDAC 阻害剤 K560 の薬理評価

第 1 節

HCT116 移植ヌードマウスを用いた抗腫瘍活性試験

K-560 は HCT116 細胞に対し、MS-275 よりも高い細胞増殖抑制活性を示した。更に、K-560 は K-197 及び K-510 のもつ物性上の問題も改善したことから、Balb/c マウスによる薬物動態試験、HCT116 移植ヌードマウスを用いた抗腫瘍効果試験を実施した。ヌードマウスを用いた抗腫瘍活性試験を実施するに先立ち、Balb/c マウスを用いた薬物動態試験を実施した。

BALB-c マウスを用いた血中濃度試験

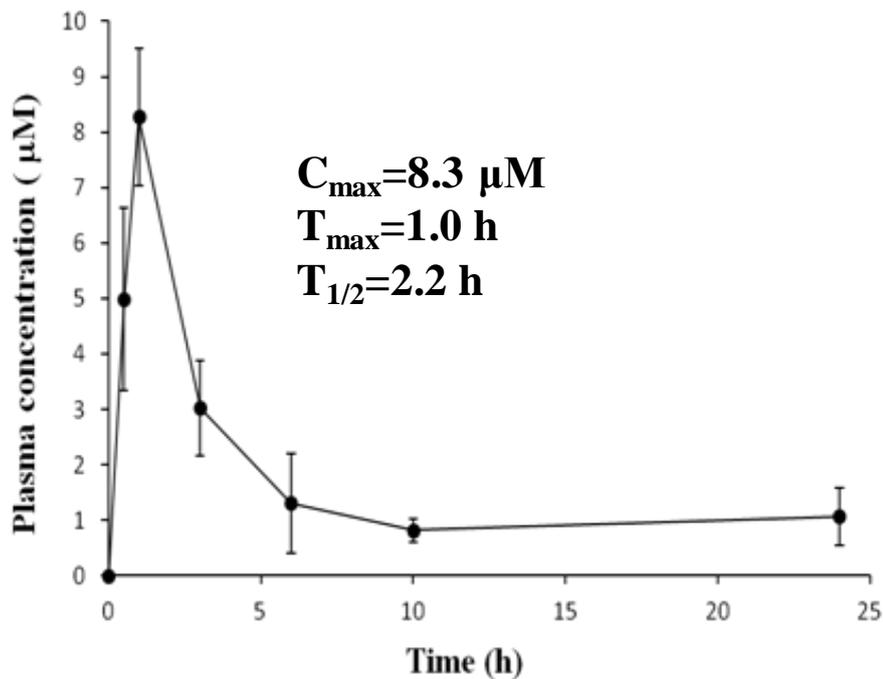


Fig. 16 Balb/c マウスを用いた K-560 の血中濃度

K-560 は、45mg/kg を経口投与したところ(**Fig. 16**)、Tmax 1 時間、T1/2 2.2 時間、Cmax 8.3 μ M を示した。

HCT116 移植ヌードマウスを用いた抗腫瘍活性試験

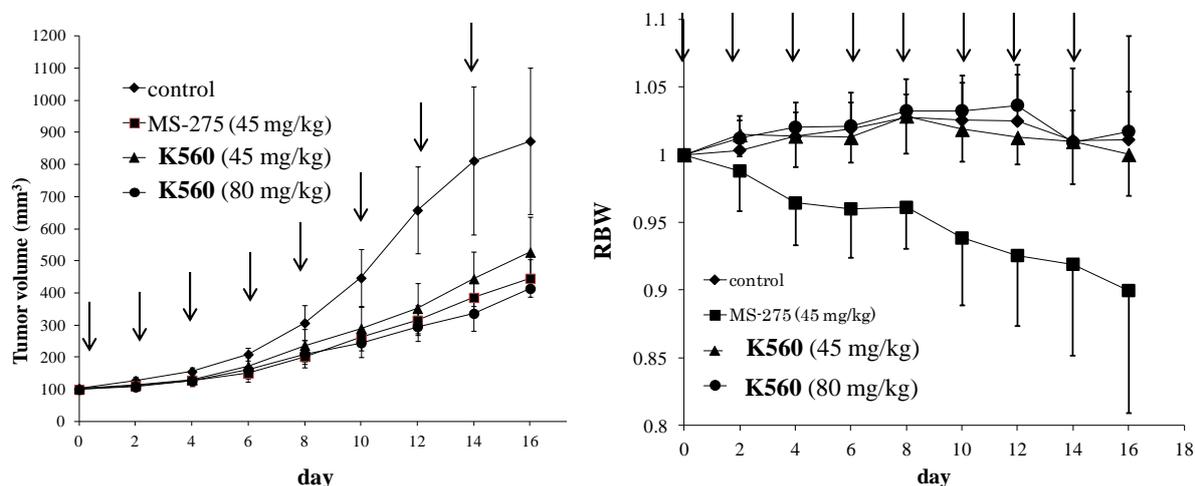


Fig. 17 HCT116 移植ヌードマウスを用いた、**K-560** の経口投与による抗腫瘍活性試験

K-560 を 16 日間にわたり、2 日毎に 0.1% Tween 80 に懸濁させ、HCT116 細胞移植ヌードマウス(Balb/c/nu-nu)に経口投与した。HCT116 移植ヌードマウスを用いた抗腫瘍活性試験において、45 mg/kg 投与群では、コントロール群と比べて、腫瘍サイズが 40%減少し、80 mg/kg 投与時では、53%減少した。また、陽性対照化合物群である **MS-275** 投与群 (45 mg/kg)では、腫瘍サイズが 49%減少したことから、**K-560** 及び **MS-275** はほぼ同等の腫瘍縮小効果を示したことになった。また、**MS-275** 投与群では、体重減少の副作用が現れたが、**K-560** 投与群はで観察されなかった。また、**MS-275** では顕著な疾走性発作が観察されたが、**K-560** では軽微であった。

第2節

K-560 の抗がん作用機序の解明

K-560 は in vivo において優れた抗腫瘍効果を示し、且つ、体重変化もほとんど観察されなかったことから、MS-275 とは異なる分子機構で抗がん活性を発揮している可能性があるかと推定した。そこで、K-560 の抗がん活性の作用機序について検討を行った。

K-560 及び MS-275 の細胞周期解析

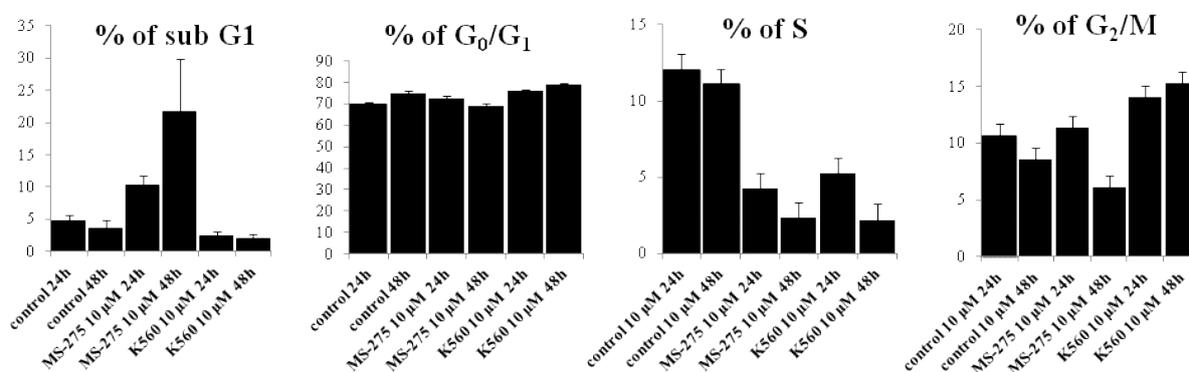
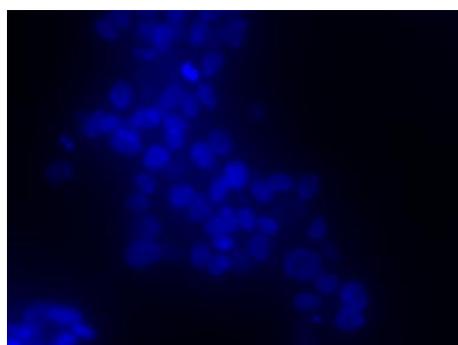


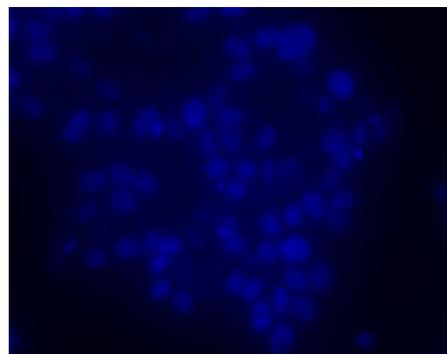
Fig. 18 K-560 の細胞周期解析

HCT116 細胞に 48 時間 K-560 或は MS-275 を曝露し、細胞周期の解析を行った。Fig. 18 は histogram より得た各周期の細胞の割合を示したものである。K-560、MS-275 共に S 期を減少させ、G1 期及び G2/M 期で細胞周期を停止した。特に、K-560 においては、アポトーシス細胞を含む subG1 が MS-275 の場合と比べてほとんど観察されなかった。これに対して、MS-275 は 20%以上の subG1 期細胞を与えた。以上の結果から、K-560 は、MS-275 とは異なりアポトーシスを誘導することなく、細胞周期を停止させたと推定した。

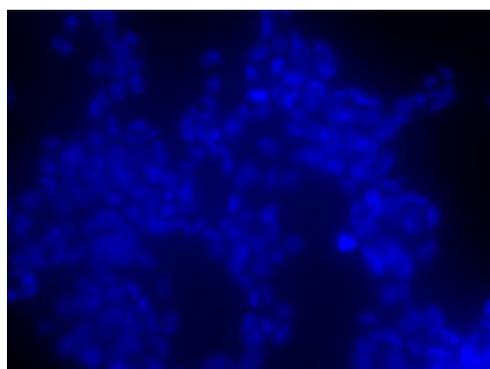
DAPI によるアポトーシス群の形態観察



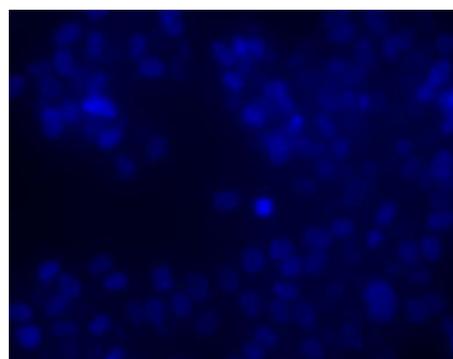
control 10 μ M, 48h



K-560 10 μ M, 48h



MS-275 10 μ M, 48h



Merck 10 μ M, 48h

Fig. 19 K560 のアポトーシス群形態観察

K-560 の細胞周期解析より、**K-560** は事実上アポトーシスを誘導しないことが示唆された。そこで、アポトーシス細胞を観察するために、DAPI 染色によるアポトーシス群の形態観察を行った(**Fig. 19**)。MS-275 は、48 時間曝露した後、多核化及び核の断片化したアポトーシス細胞が数多く観察されたが、**K-560** ではアポトーシス細胞は全く観察されなかった。

HCT116 細胞内における細胞周期関連タンパク質の Western blot 法による解析

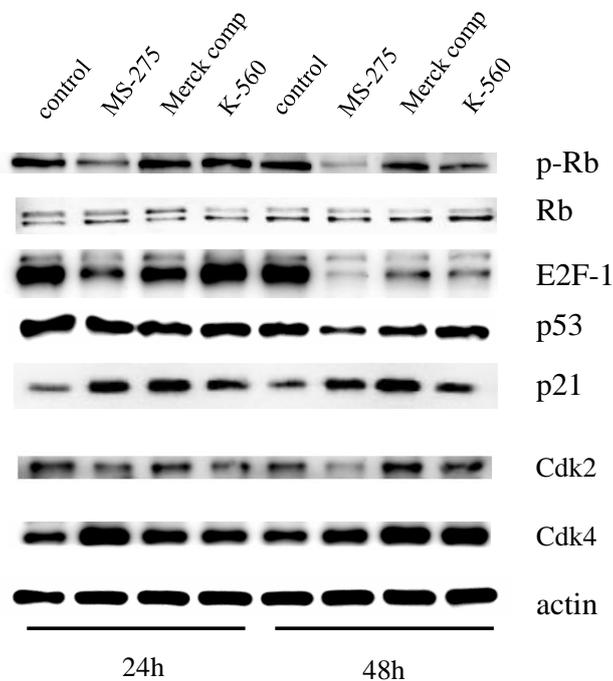


Fig. 21 HCT116 細胞周期関連タンパク質の解析

Fig. 20 は、HCT116 細胞に K-560, Merck compound 及び MS-275 を曝露した場合の細胞周期関連タンパク質 (p-Rb, E2F1, p53, p21, cdk2, cdk4)の発現を解析したものである。3 化合物ともがん抑制遺伝子産物 p21WAF1 の発現量を増加させた。また、3 化合物とも、強弱の差はあるが G1 期から S 期移行に関わる E2F1 及び Rb のリン酸化を抑制し、G1 期での細胞周期停止を示した。以上の結果から、3 化合物は HCT116 細胞の細胞周期を停止して、HCT116 細胞の増殖を抑制したと推定された。

HCT116 細胞内におけるアポトーシス及びオートファジー関連タンパク質の Western blot 法による解析

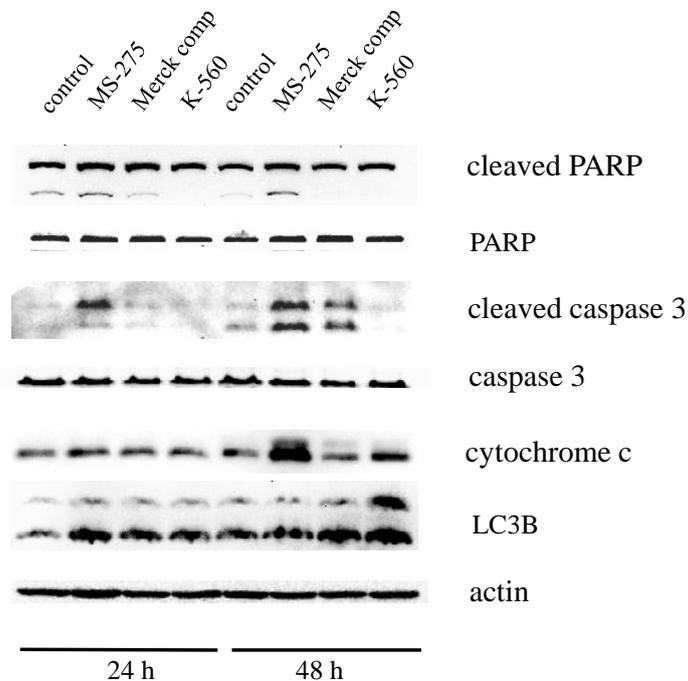


Fig. 21 アポトーシス及びオートファジー関連タンパク質の解析

Fig. 18 - Fig. 20 の結果から、**K-560** はアポトーシスを誘導せず、HCT116 細胞周期を停止させた。そこで、この事実を確認するために、HCT116 細胞を用いてアポトーシス関連タンパク質である PARP、caspase 3 及び cytochrome c の発現レベルを調べた(**Fig. 21**)。すると、**K-560** はアポトーシスの実行に関わる cleaved caspase 3 や cleaved PARP を誘導しなかった。このことから、**K-560** はアポトーシスを誘導しないことが分子レベルでもわかった。一方、**MS-275** や **Merck compound** においては、多少の差はあれ、アポトーシス関連タンパク質を活性化させた。また、**K-560** 曝露細胞において、オートファジー誘導時のマーカータンパク質である LC3B が薬剤添加後 48 時間で有意に上昇していた。

HCT116 細胞内における生存シグナル関連タンパク質 (PI3K, mTOR, AKT, ERK) の Western blot 法による解析

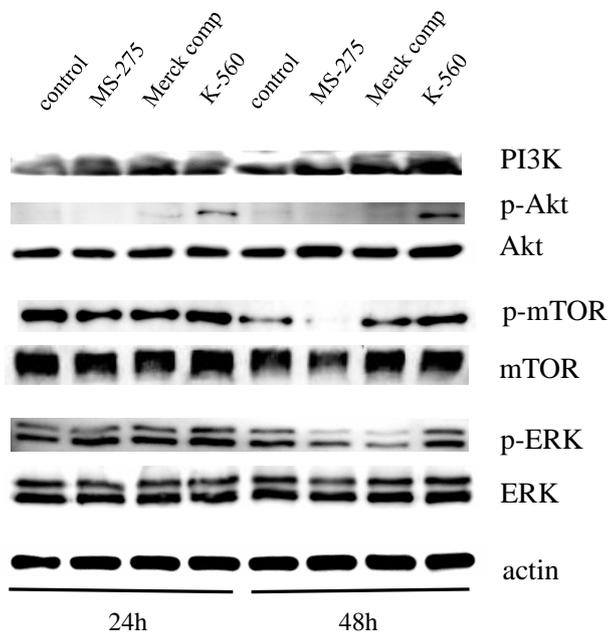


Fig. 22 生存シグナル (PI3K, mTOR, AKT, ERK)の解析

これまでの結果から、**K-560** はアポトーシスを誘導せず、オートファジーを誘導することにより結果的に細胞周期停止を停止したことが示唆された。そこで、オートファジーに関連する生存シグナル関連タンパク質 (PI3K, mTOR, AKT, ERK)の発現レベルやリン酸化について調べた。**Fig. 22** より、**K-560** は生存シグナルタンパク質 p-mTOR, p-AKT のレベルを上昇させた。一方、ERK は上昇しなかった。

以上の結果から、**K560** は、HCT116 の細胞周期を制御するが、一方で、生存シグナル関連タンパク質である mTOR 及び AKT のリン酸化を誘導し、オートファジーを誘起して細胞の生存を維持していると推定した。

SKBR3 細胞内における生存シグナル関連タンパク質 (PI3K, mTOR, AKT, ERK) の Western blot 法による解析

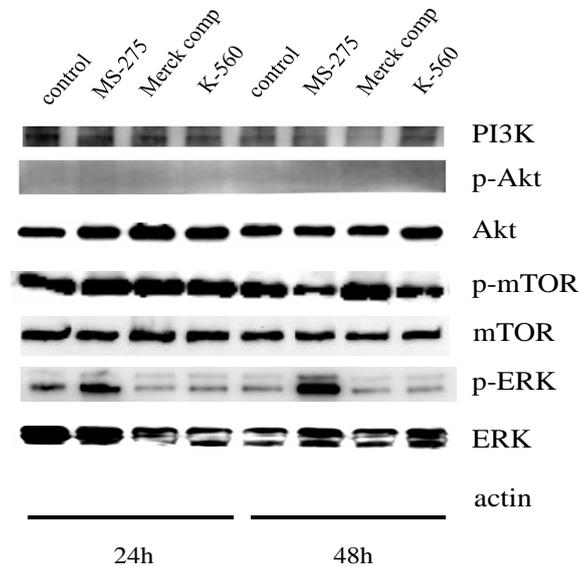


Fig. 23 生存シグナル (PI3K, mTOR, AKT, ERK)の解析

次に、p53-mutant型のヒト乳がん細胞株SKBR3を用いて、HCT116細胞と同様に **K-560**, **Merck compound**, **MS-275** を曝露した場合の生存シグナル関連タンパク質の発現レベルとリン酸化レベルを調査した(**Fig. 23**)。SKBR3細胞においても、HCT116細胞と同様、**K-560** は AKT, mTOR のリン酸化のレベルを上昇させた。しかし、**MS-275** 曝露細胞において、ERKのリン酸化が亢進した点については、HCT116細胞の場合と異なる。詳細な機構の違いについては今後の検討課題である。

K-560 の抗がん活性の推定分子機構

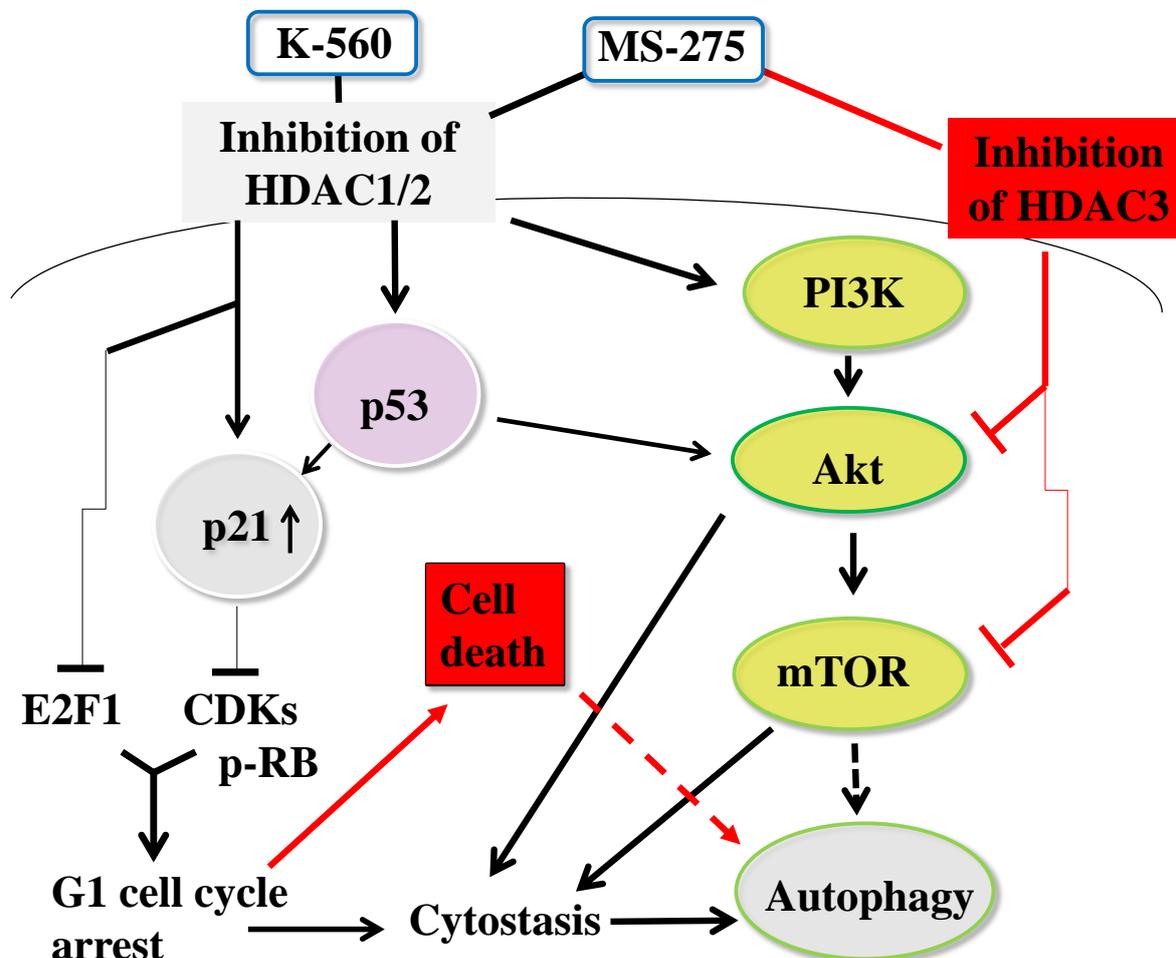


Fig. 24 K-560 の推定抗がん作用機構

細胞周期解析、アポトーシス関連タンパク質の解析、生存シグナル関連タンパク質の結果を総括すると、**K-560** は Fig. 24 で示す機構で抗がん活性を発揮していると推察される。HDAC1/2 選択的阻害活性を有する **K-560** はがん抑制遺伝子 p21WAF1 を活性化し、また、細胞周期関連タンパク質の発現を制御することにより、細胞周期を停止させる。一方、**K-560** は、生存シグナル関連タンパク質 PI3K、AKT、mTOR を活性化し、オートファジーを誘起して、周期停止細胞をアポトーシス死経路への移行を防止する。一方、**MS-275** は、HDAC1/2 の他、HDAC3 をも阻害するため、これら生存シグナル関連タンパク質の活性を抑制し、周期停止細胞の一部をアポトーシス細胞死へ導いたと考えている。

HCT116 細胞における mTORC1 及び mTORC2 関連タンパク質の Western blot 法による解析

これまでの研究で、**K-560** は生存シグナル mTOR を活性化し、オートファジーを誘起することが推定された。オートファジーは、一般に rapamycin のように、mTORC1 の活性を抑制して、オートファジーを誘起すると信じられている。そこで、両化合物の mTORC1 及び mTORC2 関連タンパク質に対する影響を Western blot 法により調べた。**Fig. 25** に示すように rapamycin は mTORC1 下流タンパク質 p-70S6K のリン酸化を抑制したのに対し、**K-560** はこのタンパク質のリン酸化を促進した。したがって、**K-560** と rapamycin は、互いに異なった機構でオートファジーを誘起したと推定している。

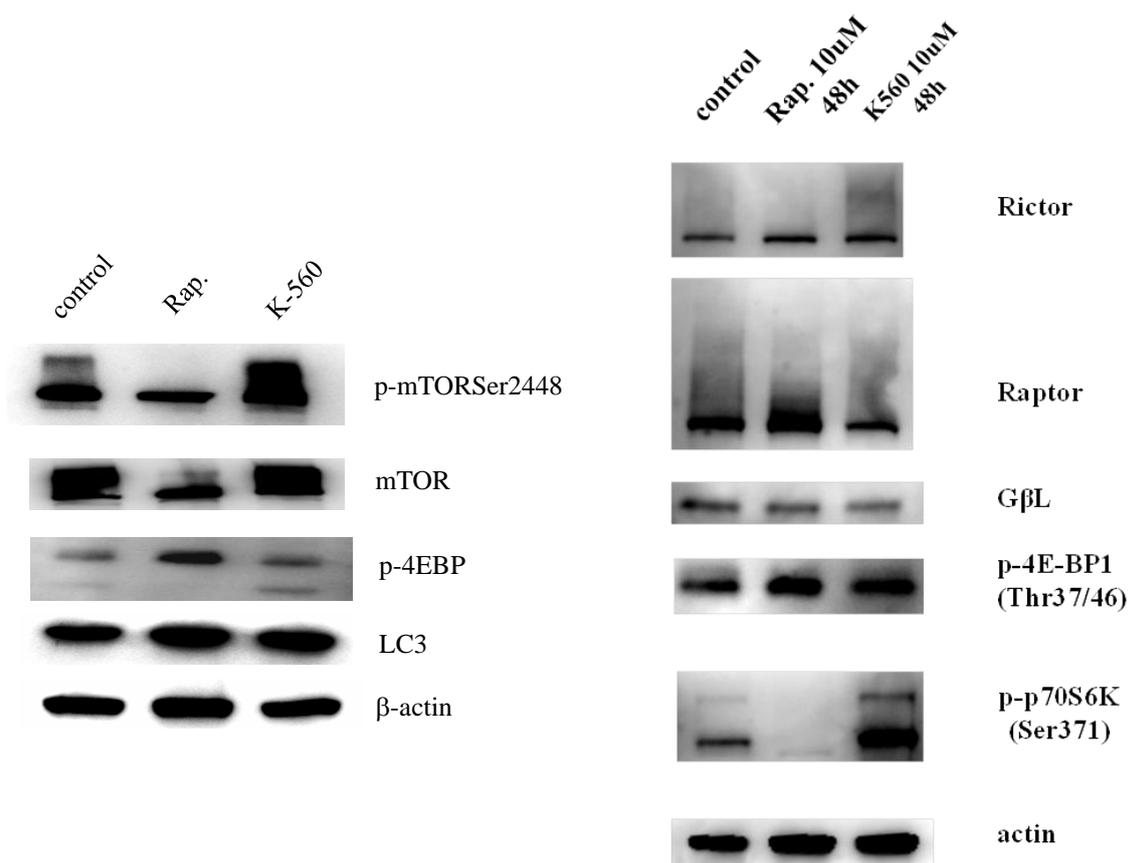


Fig. 25 K-560 及び rapamycin による mTORC1、mTORC2 関連タンパク質の影響

第7章

総括

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は後天的に遺伝子の発現を制御するタンパク質であり、その欠失や過剰発現は、がん、中枢神経疾患、生活習慣病、等の発症に密接に関わっている。HDAC は 18 種類ものアイソザイムに分類され、生体内の様々な生理作用に関与している。その中でも亜鉛依存性である HDAC1-11 はがん抑制遺伝子 p53, p21^{WAF1/CIP1} の発現や自発的細胞死であるアポトーシスなどに深く関与している。これらの酵素を阻害すると、がん抑制遺伝子の発現が活発化し、がん細胞の細胞周期停止やアポトーシスが誘導され、抗がん効果を発揮することが知られている。本研究では、HDAC1/2 アイソザイム選択的阻害活性をもつ HDAC 阻害剤 **K-560** を創製することに成功した。本薬剤は、これまで知られている経路とは異なった機構でがん細胞内のオートファジーを誘起し、生存シグナルを活性化しつつ抗腫瘍効果を発揮することが分かった。後天的な遺伝子制御を担う HDACs の阻害剤と、その抗がん作用機構について概説した。また、代表的な HDAC 阻害剤であり、皮膚 T 細胞リンパ腫に対する治療薬として上市されている **SAHA (Volinostat, Zolinza[®])** や、目下臨床開発中の **MS-275 (Entinostat)** を例に挙げ、化合物の構造上の特徴と活性との関連性について解説した。**SAHA** に代表される hydroxamic acid 型 HDAC 阻害剤と **MS-275** に代表される 2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤の特徴とその問題点について議論し、HDAC アイソザイム選択的阻害剤の合成戦略について提案した。当研究室で合成された 2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤 **K-197** と、陽性対照化合物としての **MS-275** を用いて行った、ヒト大腸がん細胞株 HCT116 移植ヌードマウス抗腫瘍活性試験の結果を述べるとともに、**K-197** の抗がん作用機序の検討を行った。**K-197** は、**MS-275** と比べ、50 mg/kg では同等の腫瘍縮小効果を示したが、35 mg/kg 及び 45 mg/kg では **MS-275** と比べ、腫瘍縮小効果が乏しかった。生物学的利用率に問題があると思われた。また、**K-197** 投与群ではマウスが死亡するなどの副作用も観察された。**K-197** は、水溶性が低いなどの物性の他、生物学的利用率の低さが問題点であり、これらの改善が課題としてあげられた。**K-197** をリード化合物とし、課題であった生物学的利用率をどう改善していくかについて考察した。報告によれば、分子内回転の自由度を減少させるこ

とにより、物性や生物学的利用率の改善、並びに、代謝抵抗性、抗腫瘍効果の増大が期待されることがある。そこで、**K-197** の構造中、回転自由度の高い三級アミンを、より自由度の低いアミド結合に改変した化合物を種々合成した。そして、合成化合物の抗腫瘍活性を評価した。X 線結晶解析により、HDAC1 及び HDAC2 のポケット状活性部位底部の更なる奥にチエニル基或いはフェニル基が入り込む疎水性ポケットが存在することが報告されたことから、チエニル基置換 2-aminobenzamide 基を持つ新規 HDAC 阻害剤を種々合成し、そのアイソザイム選択性、ヒトがん細胞に対する細胞増殖活性、等々を評価した。創製した化合物から、HDAC1 及び HDAC2 に対して、**MS-275** より高い選択的阻害効果を示す、4-ethyl-2, 3-dioxopiperazine 基含有化合物 **K-560** を見出した。本化合物は、適度な水溶性を保持し、ヒト大腸がん細胞株 HCT116、SW480、SW620 及び乳がん細胞株 SKBR3 に対し、**MS-275** と同等の細胞増殖抑制活性を示すことを認めた。**K-560** に特化して、その細胞レベル、動物レベルでの抗腫瘍活性、並びに、その活性の作用機序について評価した。**K-560** は、HCT116 移植マウスを用いた経口投与抗腫瘍活性試験において、**MS-275** と比べて遜色のない腫瘍縮小効果を示した。また、**K-560** には、**MS-275** 投与群でみられた体重減少は観察されなかった。Flow cytometer 及び蛍光顕微鏡により細胞形態を観察したところ、**K-560** を暴露した HCT116 細胞では、G1 期と G2/M 期で細胞周期が停止し、アポトーシス細胞は観察されなかった。また、**K-560** は cleaved PARP や cleaved caspase 3 などのアポトーシス関連タンパク質を誘導しなかった。一方、**K-560** は、細胞周期関連タンパク質である p-Rb や E2F1 の発現を抑制したことから、主として G1 期において細胞周期停止を誘導することが分かった。そこで、アポトーシスとは異なる細胞処理の一つであるオートファジーに注目するとともに、生存関連タンパク質 (PI3K、Akt、mTOR、ERK) について調査した。結果、**K-560** は、PI3K/Akt/mTOR シグナリングを活性化し、且つ、オートファジーマーカータンパク質である LC3B を誘導した。この LC3B 誘導効果は、既存のオートファジー誘起剤である rapamycin よりも高いものであった。特記すべきことに、rapamycin は mTOR 複合体である mTORC1 の活性を阻害するのに対し、**K-560** はこの活性を亢進した。

当研究室で合成された細胞レベルのみならず、動物レベルでも有効な抗腫瘍効果を示す化合物も存在したが、HDAC アイソザイムを広範に阻害するため、薬剤の作用に

対する安全域に問題があった。今回、生物学的利用率の向上と HDAC アイソザイム 選択性を目指して、合成展開を行ってきた。構造活性相関を検討しつつ合成を行った結果、HDAC1/2 選択性の高い **K-560** を開発することが出来た。本化合物は、がん細胞の細胞周期を制御して細胞の増殖を抑制するが、一方で、生存シグナルタンパク質 PI3K/Akt/mTOR を活性化し、オートファジーを誘起して細胞を生存させるという、既存の抗がん剤とは異なった作用機序をもつ化合物であることが分かった。更に、オートファジー誘起剤として広く世の中に知られている rapamycin とは異なったオートファジー誘導作用を有することも明らかとなった。従って、本化合物やその関連化合物は、細胞死中枢神経疾患などの細胞死に病因をもつ疾患の新しいタイプの治療薬に応用される可能性を秘めており、今後のさらなる展開が期待される。

実験の部

1. 化学

1-1. 試薬

購入した試薬は *Purification of Laboratory Chemicals, Sixth edition* (Elsevier Inc, 2009) に準拠し、精製した後に使用した。無水溶媒は市販の無水グレードの溶媒を購入、又は蒸留後、モレキュラーシーブにより調整した。NMR 用溶媒 CDCl_3 、 D_2O 、 $\text{d}_6\text{-DMSO}$ 、 $\text{d}_4\text{-methanol}$ は Acros organics (cat. NO. #2206-27-2)、Merck Co. (cat. NO. 1.13366.0009)、Cambridge Isotope Laboratories, Inc. (cat. NO. #2206-27-1、#811-98-3) で購入した。

1-2. 精製方法及び器具

クロマトグラフィー精製は Silica gel 60 (particle size 60-200 μm , Kanto Kagaku Co.)、PLC Silica gel 60 F₂₅₄ プレート (1 mm, 20×20 cm, Merck) 又は中圧カラムクロマトグラフィー (W-Prep 2XY, Yamazen Co、Biotage Zip カラムカートリッジ (Biotage Co.)) で行った。薄層クロマトグラフィー (TLC) は TLC silica gel 60 F₂₅₄ プレート (Merck Co.) を使用した。呈色は UV (254 nm) 及びヨウ素を使用した。再結晶はブフナーロート及び桐山ロートを用い、吸引瓶にて操作を行った。常圧蒸留はリービッヒ冷却器を用いた蒸留装置で行った。減圧蒸留はショートパス減圧装置又はガラスチューブオープン蒸留装置 (Kugelrohr, GTO-350RD, Shibata Co.) を使用した。

1-3. 分析装置

融点は Yanaco MP-500D 微量融点測定器 (Yanaco Co.) を用いて測定した。IR スペクトルは FTIR-8400 (Shimadzu Co.) により測定した。¹H NMR は JNM-EX400 (399.65 MHz, JEOL Co.) を使用した。Mass スペクトルは APCI 3000 (AB sciex Co.) を使用した。高分解 Mass スペクトルは LC-IT-TOF MS (Shimadzu Co.) 又は Q Exactive MS (Thermo Scientific Co.) で測定した。

Methyl 4-[(2-naphthoylamino)methyl]benzoate (2)

Methyl 4-(aminomethyl)benzoate hydrochloride (5.1 g, 24.9 mmol) を CH_2Cl_2 (500 ml) に懸濁させ、 Et_3N (15 ml) と 2-naphthoyl chloride (4.8 g, 24.9 mmol) を加えて室温で一晩攪拌

した。反応液を濃縮後、 CHCl_3 に溶解し、satd. NaHCO_3 、brine で洗浄後、 Na_2SO_4 で乾燥した。ろ過後、ろ液を減圧濃縮し、得られた残渣を CHCl_3 -hexane で再結晶し、無色結晶の **2** (7.5 g, 収率 94%) を得た。

mp. 133-134. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 3.91 (3H, s, -OMe), 4.76 (2H, d, $J = 5.9$ Hz, CH_2), 6.69 (1H, brs, NH), 7.43-8.32 (11H, m, arom. H_{11}). ESI-MS m/z : 319.3 (M)⁺; HR-ESI-MS m/z : (M)⁺ calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{NO}_3$, 319.1208; found, 319.1192.

4-[(2-Naphthoylamino)methyl]benzoic acid (**3**)

2 (9.9g, 31.0 mmol)を THF/ H_2O (100 ml)に溶解し、1M LiOH (30 ml)を加えて一晩攪拌した。反応液を濃縮し THF を除いた後、1 M HCl で pH=3 に調整した。得られた沈殿物を吸引濾取し、無色結晶の **3** (9.2 g, 収率 97 %)を得た。

mp. 215-216. $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 4.76 (2H, d, $J = 5.9$ Hz), 6.69 (1H, brs, NH), 7.43-8.32 (11H, m, arom. H_{11}). ESI-MS m/z 305.1 (M)⁺; HR-ESI-MS m/z : (M)⁺ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{16}\text{NO}_3$, 305.1052, found: 305.1055.

Methyl 4-[(3-quinolinylcarbonyl)amino]methyl]benzoate (**4**)

Methyl 4-(aminomethyl)benzoate hydrochloride (1.7 g, 8.4 mmol)と 3-Quinoline carboxylic acid (1.5g, 8.7 mmol)に無水 DMF (3 ml)を加え、HOBt (1.7g, 11.1 mmol) と WSCI/HCl (2.3 g, 12.0 mmol) を加え、一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮後 CHCl_3 に溶解し、satd. NaHCO_3 、brine で洗浄後、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶液を EtOAc-hexane で再結晶し、**4** (1.03 g, 収率 37%) を得た。

mp. 154-157. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 3.91 (3H, s, -OMe), 4.77 (2H, d, $J = 6.0$ Hz, CH_2), 7.43-8.15 (8H, m, arom. H_8), 8.63 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, arom. H_1), 9.30 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, arom. H_1). ESI-MS m/z : 321.5 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, HR-ESI-MS m/z : ($\text{M}+\text{H}$)⁺ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$, 321.1239; found, 321.1240.

4-[(3-Quinolinylcarbonyl)amino]methyl] benzoic acid (**5**)

4 (1.07 g, 2.9 mmol) を THF/ H_2O (18 ml) に溶解し、1 M LiOH (11 ml) を加えて室温で一晩攪拌した。反応液を濃縮し THF を除いた後、1 M HCl で pH=3 に調整した。得られた沈殿物を吸引濾取し、**5** (0.75 g, 収率 85%) を得た。

mp. 274-276. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 4.64 (2H, d, $J = 6.0$ Hz, CH_2), 7.49 - 8.11 (8H, m, arom.H₈), 8.89 (1H, s, arom.H₁), 9.33 (1H, s, arom.H₁). ESI-MS m/z : 307.6 (M+H)⁺; HR-ESI-MS m/z : 307 (M+H)⁺ calcd for C₁₈H₁₆N₂O₃, 307.1083; found, 307.1095.

Methyl 4-((benzo[d][1,3]dioxole-5-carboxamido)methyl)benzoate (6)

Methyl4-(aminomethyl)benzoate hydrochloride (1.5 g 7.4 mmol)と Piperonylic acid (1.24 g 7.4 mmol)と WSCI/HCl(2.13 g 11.1 mmol)と HOBt (1.5 g, 11.1 mmol)を加え、DMF(10 ml)、Et₃N(10 ml)の順に加え、室温で一晩中攪拌した。反応液を減圧濃縮後、CHCl₃に溶解し、satd. NaHCO₃、brine で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。この溶液を減圧濃縮後、得られた残渣を CHCl₃-hexane で再結晶し、白色結晶の **6** (2.3 g, 収率 98%)を得た。
mp.116-119. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 3.84 (3H, s), 4.52 (2H, d, $J = 5.6$ Hz), 6.10 (2H, s), 7.00-7.94 (7H, m) 8.97 (1H, t, $J = 6.0$ Hz). ESI-MS m/z : 314.3 (M+H)⁺, 336.2(M+Na)⁺. HR-ESI-MS m/z : (M+H)⁺, calcd for C₁₇H₁₇NO₅, 314.1028; found, 314.1026.

4-((benzo[d][1,3]dioxole-5-carboxamido)methyl)benzoic acid (7)

6 (2.12 g, 7.4 mmol)を THF/H₂O (30 ml)に溶解し、1M LiOH (15 ml) を加えて室温で一晩攪拌した。反応液を濃縮し THF を除いた後、1 M HCl で pH=3 に調整した。得られた沈殿物を吸引濾取し、無色の結晶 **7** (2.00 g, 収率 90%) を得た。
mp.216-223. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 4.51 (2H, d, $J = 6.0$ Hz), 6.06 (2H, m), 6.99-7.91 (7H, m), 8.95 (1H, t, $J = 6.0$ Hz), 12.85 (1H, brs). ESI-MS m/z : 300.3 (M+H)⁺. HR-ESI-MS m/z : (M+H)⁺, calcd for C₁₆H₁₅NO₅, 300.0872; found, 300.0868.

methyl 4-((2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxine-6-carboxamido)methyl)benzoate (8)

Methyl4-(aminomethyl)benzoate hydrochloride (1.08 g, 6.0 mmol)と 1,4-Benzodioxane-6-carboxylic acid (1.00 g 5.0 mmol)と WSCI/HCl (1.44 g, 6.0 mmol)と HOBt (1.0 g, 7.4 mmol)を加え、CH₂Cl₂ (50 ml)、DMF(10 ml)、Et₃N(10 ml)の順に加え、室温で一晩中攪拌した。減圧濃縮後、CHCl₃に溶解し、satd. NaHCO₃、brine で洗浄後、Na₂SO₄ で乾燥した。溶液を減圧濃縮後、得られた残渣を CHCl₃-hexane で再結晶し、白色結晶の (1.8 g, 収率 90%)を得た。
mp.160-161. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 3.84 (3H, s), 4.28 (4H, m), 4.51 (2H, d, $J = 4.8$ Hz),

6.93-7.93 (7H, m), 8.96 (1H, t, m). ESI-MS m/z : 328.2 (M+H)⁺, HR-ESI-MS m/z : (M+H)⁺ calcd for C₁₈H₁₉NO₅, 328.1185; found, 328.1178.

4-((2,3-dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxine-6-carboxamido)methyl)benzoic acid (9)

8 (1.5 g, 7.4 mmol)を THF/H₂O (20 ml)に溶解し、1 M LiOH (100 ml) を加えて室温で一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮し、THFを除いた後、1 M HCl で pH=3 に調整した。得られた沈殿物を吸引濾取し、無色結晶の **8** (1.31 g, 収率 91%) を得た。

mp. 243-244. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 4.23 (4H, m), 4.49 (2H, d, $J = 4.80$ Hz), 6.91-7.90 (7H, m), 9.09 (1H, t, m). ESI-MS m/z : 314.1 (M+H)⁺, HR-ESI-MS m/z : (M+H)⁺ calcd for C₁₇H₁₇NO₅, 314.1028; found, 314.1029.

N-(4-(2-aminophenylcarbamoyl)benzyl)-2-naphthamide (K-480)

3 (0.5 g, 1.64 mmol)と *o*-phenylenediamine(0.355 g, 3.3 mmol)と HOBt (0.332 g, 2.5 mmol)を 100ml 容ナスコルに入れ、デシケーターで一晩乾燥させる。次に Ar 雰囲気下後、無水 DMF(5 ml)を加え、攪拌しながら WSCI (3 ml)を加え、室温で一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮後、CHCl₃に溶解させ、satd. NaHCO₃、brine で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。この溶液を減圧濃縮後、得られた残渣を CHCl₃-hexane で再結晶し、無色結晶の **K-480** (0.21g, 収率 31%)を得た。

mp.124-125. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 4.63 (2H, d, $J = 6.0$ Hz), 4.90 (2H, brs, -NH₂), 6.58 -9.65 (15H, m). ESI-MS m/z : 396.0 (M+H)⁺. HR-ESI-MS m/z : (M+H)⁺ calcd for C₂₅H₂₃N₃O₂; 396.1712; found, 396.1711.

N-(4-(2-aminophenylcarbamoyl)benzyl)quinoline-3-carboxamide (K-490)

5 (0.20 g, 0.65 mmol)、*o*-phenylenediamine (0.14 g, 1.3 mmol)、HOBt (0.13 g 0.98 mmol) を Ar 雰囲気下後、無水 DMF (5 ml)を加え、攪拌しながら、WSCI (3 ml)を加え、室温で一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮後、CHCl₃に溶解し、satd. NaHCO₃、brine で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。溶液を減圧濃縮後、得られた残渣を CHCl₃ で再結晶し、白色結晶の **K-490** (0.092 g, 36%)を得た。

mp. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 4.61 (2H, d, $J = 6.00$ Hz), 4.90 (2H, brs, -NH₂), 6.58 -10.07 (14H, m). ESI-MS m/z : 397.2 (M+H)⁺, HR-ESI-MS m/z : (M+H)⁺ calcd for C₂₄H₂₂N₄O₂,

397.1664; found, 397.1657.

N-(4-(2-aminophenylcarbamoyl)benzyl)benzo[*d*][1,3]dioxole-5-carboxamide (K-470)

7 (0.20g, 0.67 mmol)と *o*-phenylenediamine(0.15 g, 1.3 mmol)と HOBt (0.14 g, 1.0 mmol)を 100ml 容ナスコルに入れ、デシケーターで一晩乾燥させる。次に Ar 雰囲気下後、無水 DMF (10 ml)を加え、攪拌しながら、WSCl (2 ml)を加え室温で一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮後、CHCl₃に溶解し、satd. NaHCO₃、brine で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。溶液を減圧濃縮後、得られた残渣を CHCl₃-hexane で再結晶し、無色結晶の **K-470** (0.16 g, 61%)を得た。

mp.211-213. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 4.50 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 4.88 (2H, s), 6.10 (2H, s), 6.58-7.52 (9H, m), 7.93 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 8.97 (1H, t, *J* = 6.0 Hz), 9.62 (1H, s). ESI-MS *m/z*:390.3 (M+H)⁺. HR-ESI -MS *m/z*: (M+H)⁺ calcd for C₂₂H₂₁N₃O₄,390.1454; found, 390.1461.

N-(4-(2-aminophenylcarbamoyl)benzyl)-2,3-dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxine-6-carboxamide (K-500)

9 (0.20 g, 0.64 mmol)と *o*-phenylenediamine(0.14 g, 1.3 mmol)と HOBt (0.13 g, 1.0 mmol)を 100ml 容ナスコルに入れ、デシケーターで一晩乾燥させる。次に Ar 雰囲気下後、無水 DMF(10 ml)を加え、攪拌しながら、WSCl (2 ml)を加え、室温で一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮後、CHCl₃に溶解し、satd. NaHCO₃、brine で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。溶液を減圧濃縮後、得られた残渣を CHCl₃-hexane で再結晶し、無色結晶の **K-500** (0.11 g, 43%)を得た。

mp.150-151. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 4.28 (2H, m), 4.51 (2H, d, *J* = 6.0 Hz), 4.87 (2H, brs) 6.58-9.61 (11H, m). ESI-MS *m/z*:404.1 (M+H)⁺, HR-ESI -MS *m/z*: (M+H)⁺ calcd for C₂₃H₂₃N₃O₄,404.1610; found, 404.1613.

Methyl 3-methoxy-4-(2-morpholinoethoxy)benzoate (11)

Methyl Vanillate (1.08 g, 5.9 mmol)、4-(2-Chloroethyl)morpholine Hydrochloride (2.00 g, 10.7 mmol)及び K₂CO₃ (3.06 g, 22.1 mmol)を加え DMF (10 ml)に溶解させ、8 時間加熱環流を行った。反応後、減圧濃縮を行い、EtOAc に溶解した後、brine で洗浄し、Na₂SO₄

で有機層を乾燥した。溶液をろ過し、減圧濃縮後、得られた生成物を再結晶により精製し、無色の結晶 **11** (1.5 g, 収率 90%)を得た。

mp. 124-130. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.67-7.54 (3H, m), 3.95-3.72 (10H, m), 2.75-1.25 (8H, m), ESI-MS m/z : 296.4 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, HR-ESI-MS m/z : ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{NO}$, 296.1498; found, 296.1492.

3-methoxy-4-(2-morpholinoethoxy)benzoic acid (12)

11 (1.5 g, 5.0 mmol)を THF (30 ml)と H_2O (10 ml)に溶解させ、1 M LiOH (20 ml)を加えて、室温で一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮し、THF のみ取り除いた後、反応液を pH=3 に調整した。その後、EtOAc と H_2O で分配後、BuOH により抽出し、無色結晶の **12** (1.27 g, 収率 90%)を得た。

mp. 153-156. $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 12.8 (1H, brs), 7.67-7.54 (3H, m), 3.95-3.72 (7H, m), 2.75-1.25 (8H, m). ESI-MS m/z : 209.3 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, HR-ESI-MS m/z : ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{NO}_5$, 282.1341; found, 282.1337.

Tert-butyl 2-aminophenylcarbamate (14)

o-phenylenediamine (25.0 g, 231.0 mmol)を THF (400 ml)及び Et_3N (100 ml)に溶解し、 $(\text{Boc})_2\text{O}$ (30.0 g, 137.0 mmol)を加え、室温で一晩攪拌した。反応後、減圧濃縮を行い、反応液を EtOAc に溶解させた。次に brine で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶液をろ過し、減圧濃縮後、得られた生成物を再結晶により精製し、**14** (46.7 g, 97%)を得た。(収率 97%)

mp. 116-118. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 12.7 (1H, brs), 7.52 -6.76 (4H, m), 6.24 (1H, brs), 3.74 (2H, s), 1.45 (9H, s), ESI-MS m/z : 209.2 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, HR-ESI-MS m/z : ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_2$, 209.1290; found, 209.1291.

Tert-butyl 2-(4-(chloromethyl)benzamido)phenylcarbamate (15)

p-(Chloromethyl)benzoyl Chloride (20.0 g, 106.0 mmol)を CH_2Cl_2 (300 ml)及び Et_3N (100 ml)に溶解させ、氷浴下で攪拌しながら **15** (20.0g, 96 mmol)をゆっくり加えた。投入後に室温に戻し、一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮し、 CHCl_3 で溶解した後、satd NaHCO_3 及び brine で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶液をろ過し、減圧濃縮後、得られた生成

物をシリカゲルクロマトグラフィー (EtOAc: toluene=1:10) にて精製し、無色の結晶 **15** を(23.7 g, 62%)を得た。

mp. 130-140. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.28-7.16 (10H, m), 4.64 (2H, s), 1.49 (9H, s), ESI-MS m/z : 361.2 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, HR-ESI-MS m/z : ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{ClN}_2\text{O}_3$, 361.1319; found, 361.1321.

tert-butyl 2-(4-((1,3-dioxisoindolin-2-yl)methyl)benzamido)phenylcarbamate (16)

15 (20.0 g, 55 mmol)を DMF (30 ml)に溶解させ、Potassium phthalimide (10.0 g, 53.0 mmol), KI (1.2 g, 7.2 mmol)を加え、50 °Cで一晩攪拌した。反応後、反応液を減圧濃縮した後、EtOAc に溶解させ、satd NaHCO_3 及び brine で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶液をろ過後、減圧濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィー (EtOAc: MeOH=8:2) にて精製し黄橙色の油状化合物 **16** (19.5 g, 収率 75%)を得た。

mp. 158-159. $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.28-7.16 (10H, m), 4.64 (2H, s), 3.65 (2H, brs), 1.49 (9H, s), ESI-MS m/z : 472.4 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, HR-ESI-MS m/z : ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_5$, 472.1872.; found, 472.1881.

Tert-butyl 2-(4-(aminomethyl)benzamido)phenylcarbamate (17)

16 (20.0 g, 42 mmol)を EtOH (200 ml)に懸濁させ、Hydrazine monohydrate (10 ml)を加え、90 °Cで5時間加熱環流を行った。反応後、反応液を減圧濃縮し、 CHCl_3 で溶解し、satd NaHCO_3 及び brine で洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶液をろ過し、減圧濃縮後、得られた生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (EtOAc: MeOH = 8:2)にて精製し、無色の結晶 **17** (9.76 g, 52%)を得た。

mp. 104-106. $^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 8.28-7.16 (10H, m), 4.64 (2H, s), 3.65 (2H, brs), 1.49 (9H, s), ESI-MS m/z : 342.0 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$, HR-ESI-MS m/z : ($\text{M}+\text{H}$) $^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_3$, 341.1817; found, 341.1819.

Tert-butyl 2-(4-((3-methoxy-4-(2-morpholinoethoxy)benzamido)methyl)benzamido)-phenylcarbamate (18)

12 (0.5 g, 1.8 mmol)及び **17** (0.3 g, 0.9 mmol)を THF (2 ml)に溶解させ、DMAP (0.2 g, 1.6 mmol)、CDI (0.3 g, 1.9 mmol)を加えた後、50 °Cで3時間加熱環流を行った。加熱環流

後に室温に戻し、一晩攪拌した。反応後、減圧濃縮し、 CHCl_3 で溶解し、satd NaHCO_3 及びbrineで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶液をろ過し、減圧濃縮後、得られた生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (CHCl_3 : CH_3OH =9:1)にて精製を行い、黄白色の結晶 **18** (0.03 g, 5%)を得た。

mp. 146-148. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.28-7.22 (13H, m), 5.92 (2H, brs), 4.64-2.60 (9H, m), 1.49-1.20 (17H, m). ESI-MS m/z : 605.9 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, HR-ESI-MS m/z : ($\text{M}+\text{H}$)⁺ calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_7$, 605.2975; found, 605.2978.

N-(4-(2-aminophenylcarbamoyl)benzyl)-3-methoxy-4-(2-morpholinoethoxy)benzamide (19)

18 (0.03 g, 0.05 mmol)を MeOH (1 ml)に溶解し、4 M HCl (1 ml)をゆっくり滴下して、3時間室温で攪拌した。反応後、反応液に satd NaHCO_3 を加え、反応停止し、次いで、EtOAcにて抽出した。有機層を satd NaHCO_3 及びbrineで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶液を減圧濃縮後、得られた生成物を EtOAc-hexaneによる再結晶し、白色の結晶 **19** (0.01 g, 36%)を0.01g得た。

mp. 129-130. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 8.28-7.22 (13H, m), 5.92 (2H, brs), 4.64-2.60 (9H, m), 1.49-1.20 (8H, m), ESI-MS m/z : 505.2 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, HR-ESI-MS m/z : ($\text{M}+\text{H}$)⁺ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_4\text{O}_5$, 505.2451; found, 505.2458.

methyl 4-((4-hydroxy-3-methoxybenzamido)methyl)benzoate (20)

Methyl 4-(aminomethyl)benzoate hydrochloride (3.0 g, 18.2 mmol)を THF (30 ml)及び Et_3N (20 ml)に溶解させ、HOBt (1.5 g, 11.1 mmol)、WSCl (5 ml)の順に加え、室温で一晩攪拌した。反応後、反応液を減圧濃縮し、 CHCl_3 で溶解した後、satd NaHCO_3 及びbrineで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶液をろ過し、減圧濃縮後、得られた生成物を CHCl_3 -hexaneにより再結晶し、**20** (5.2 g, 91%)を得た。

mp. 162-164. $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 7.90-6.93 (7H, m), 4.53 (3H, m), 3.85 (3H, m), 3.67 (2H, s). ESI-MS m/z : 315.2 (M)⁺, HR-ESI-MS m/z : ($\text{M}+\text{H}$)⁺ calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{NO}_5$, 316.1185; found, 316.1189.

methyl 4-((3-hydroxy-4-methoxybenzamido)methyl)benzoate (21)

Methyl 4-(aminomethyl)benzoate hydrochloride (3.0 g, 18.2 mmol)を THF (30 ml)及び Et₃N (20 ml)に溶解させ、HOBt (1.5 g, 11.1 mmol)、WSCl (5 ml)の順に加え、室温で一晩攪拌した。反応後、反応液を減圧濃縮し、CHCl₃で溶解した後、satd NaHCO₃及び brine で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥した。溶液をろ過し、減圧濃縮後、得られた生成物を CHCl₃-hexaneにより再結晶し、**21** (4.3 g, 75%)を得た。

mp. 168-169. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 7.90-6.93 (7H, m), 4.53 (3H, m), 3.85 (3H, m), 3.67 (2H, s). ESI-MS *m/z*: 316.0 (M+H)⁺, HR-ESI-MS *m/z*: (M+H)⁺ calcd for C₁₇H₁₈NO₅, 316.1185; found, 316.1190.

4-((4-hydroxy-3-methoxybenzamido)methyl)benzoic acid (22)

20 (5.2 g, 16.5 mmol)を THF (30 ml)と H₂O (10 ml)に溶解させ、1 M LiOH(20 ml)を加えて、室温で一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮し、THFのみ取り除いた後、pH=3に調整した。その後、EtOAcにより抽出した。溶液を減圧濃縮後、CHCl₃で洗浄し淡黄色の結晶 **22** (4.9 g, 99%)を得た。

mp. 151-152. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 9.64 (1H, brs), 7.90-6.93 (7H, m), 4.53 (3H, s), 3.67 (2H, s) ESI-MS *m/z*: 302.4 (M+H)⁺, HR-ESI-MS *m/z*: (M+H)⁺ calcd for C₁₇H₁₈NO₅, 302.1028; found, 302.1039.

methyl 4-((3-hydroxy-4-methoxybenzamido)methyl) benzoic acid (23)

21 (2.6 g, 10.0 mmol)を THF (15 ml)と H₂O (5 ml)に溶解させ、1 M LiOH(10 ml)を加えて、室温で一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮し、THFのみ取り除いた後、pH=3に調整した。その後、EtOAcにより抽出した。溶液を減圧濃縮後、CHCl₃で洗浄し淡黄色の結晶 **23** (2.8 g, 92%)を得た。

mp. 154-158. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 12.6 (1H, brs), 9.85 (1H, brs), 7.95-6.82 (7H, m), 4.31 (2H, s), 3.84 (3H, s), ESI-MS *m/z*: 302.5 (M+H)⁺, HR-ESI-MS *m/z*: (M+H)⁺ calcd for C₁₇H₁₈NO₅, 302.1028; found, 302.1024.

N-(4-(2-aminophenylcarbamoyl)benzyl)-4-hydroxy-3-methoxybenzamide (24)

22 (0.1 g, 0.3 mmol)を THF (4 ml)及び Et₃N (3 ml)に溶解させ、HOBt (0.15 g, 1.1 mmol)、*o*-phenylenediamine (0.1 g, 0.9 mmol)、WSCl (1 ml)の順に加え、室温で一晩攪拌した。

反応後、反応液を減圧濃縮し、CHCl₃で溶解させ、satd NaHCO₃及びbrineで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥した。溶液をろ過し、減圧濃縮後、得られた生成物をCHCl₃での再結晶により精製し、**24** (0.02 g, 18%)を得た。

mp. 114-116. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 8.24-6.93 (12H, m), 4.53 (3H, s), 3.89 (2H, brs), 3.67 (2H, s). ESI-MS *m/z*: 392.2 (M+H)⁺, HR-ESI-MS *m/z*: (M+H)⁺ calcd for C₂₂H₂₂N₃O₄, 392.1610; found, 392.1651.

N-(4-(2-aminophenylcarbamoyl)benzyl)-3-hydroxy-4-methoxybenzamide (Compound 4)

23 (0.1 g, 0.3 mmol)をTHF (4 ml)及びEt₃N (3 ml)に溶解させ、HOBt (0.15 g, 1.1 mmol)、*o*-phenylenediamine (0.1 g, 0.9 mmol)、WSCl (1 ml)の順に加え、室温で一晩攪拌した。反応後、反応液を減圧濃縮し、CHCl₃で溶解させ、satd NaHCO₃及びbrineで洗浄し、Na₂SO₄で乾燥した。溶液をろ過し、減圧濃縮後、得られた生成物をCHCl₃での再結晶により精製し、**25** (0.05 g, 40%)を得た。

mp. 119-123. ¹H NMR (CDCl₃) δ : 8.24-6.93 (12H, m), 4.53 (3H, s), 3.85 (2H, brs), 3.67 (2H, s) ESI-MS *m/z*: 392.8 (M+H)⁺, HR-ESI-MS *m/z*: (M+H)⁺ calcd for C₂₂H₂₂N₃O₄, 392.1610; found, 392.1621.

5-bromo-2-nitro-phenylamine (27)

26 (7.5 g, 37.3 mmol)、copper (I) chloride (0.38 g, 3.8 mmol)、potassium *tert*-butoxide (17.7 g, 157.7 mmol)、DME (ethyleneglycol dimethyl ether, 300 ml)を3径フラスコに加え、冷媒(dry ice/acetone)にて-78 °Cに冷却した。DMF (100 ml)に溶かし *o*-methyl-hydroxy-lamine hydrochloride (40.0 g, 478.9 mmol)を滴下ロートにて温度が上がらないようにゆっくり滴下した。滴下後、常温で3時間攪拌した。反応物にEtOAc溶解し、satd NH₄Cl水溶液で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥させる。溶液をろ過し、減圧濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(toluene:hexane = 1:1+0.1% Et₃N)で精製し、黄色の結晶 **15** (5.4 g, 収率 67%)を得た。

mp. 154-155. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 6.09 (2H, br), 6.81 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 7.01 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 7.97 (1H, d, *J* = 9.2 Hz). ESI-MS *m/z*: 217.4 (M-H)⁻, HR-ESI-MS *m/z*: (M+H)⁺ calcd for C₆H₆BrN₂O₂, 216.9612; found, 216.9610.

2-nitro-5-thiophen-2-yl-phenylamine (28)

27 (1.46 g, 6.7 mmol)と 2-thiophene bronic acid(1.14 g, 8.9 mmol)と *tri-o*-tolylphosphine (0.670 g, 2.2 mmol)を DME (17.5 ml)と H₂O (10 ml)に溶解させる。次いで、K₂CO₃ (2.76 g, 20.0 mmol)、tetrakis(triphenyl phosphine) palladium (0.51 g 0.4 mmol)を加え超音波破碎し、懸濁した溶液を 90 °Cで 18 h 加熱還流を行った。反応後、懸濁液に CHCl₃ を加え、H₂O で分配し、Na₂SO₄ で乾燥させた。溶液をろ過し、減圧濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (toluene:hexane = 1:1+0.1% Et₃N)で精製し、黄色結晶 **28** (1.27 g, 収率 86%)を得た。

mp. 145-147. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 6.15 (2H, br), 6.96 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 6.98 (1H, d, *J* = 2.0 Hz) 7.01 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 7.11-7.14 (1H, m), 7.40 (1H, m), 8.13 (1H, d, *J* = 8.8 Hz).

ESI-MS *m/z*: 219.2(M-H)⁻, HR-ESI-MS *m/z*: (M+H)⁺ calcd for C₁₀H₉N₂O₂S, 221.0384; found, 221.0386.

4-((tert-butoxycarbonylamino)methyl)benzoic acid (30)

29 (19.0 g, 125.7 mmol)を 1,4-dioxane(200 ml)に懸濁させ、H₂O(250 ml)に溶かした NaHCO₃ (21.1 g, 251.4 mmol)を加えた。次いで、(Boc)₂O (27.4 g, 125.7 mmol)を溶液に加え、室温で一晩中攪拌した。反応液を氷水で冷却しながら、10% HCl で pH=3 に調整し、析出物を EtOAc で抽出した。析出物を CHCl₃ で洗浄し、白色結晶 **30** (29.7 g 収率 94%)を得た。

mp.163-166. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 3.53 (9H, s), 7.55 (1H, s), 7.78 (1H, s), 8.29 (1H, s) 9.14 (1H, s), 11.30 (1H, brs). ESI-MS *m/z*:250.2(M-H)⁻, HR-ESI-MS *m/z*: (M+H)⁺ calcd for C₁₃H₁₈NO₄, 252.1236; found, 252.1233.

tert-Butyl 4-(chlorocarbonyl)benzylcarbamate (31)

30 (1.8 g, 7.2 mmol)に CH₂Cl₂ (10 ml), Et₃N (15 ml)を加え、冷媒 (ice) で冷却した。溶液に oxalyl chloride (1 ml)をゆっくり滴下し、室温に戻した後、3 時間攪拌した。続いて反応液に **28** (1.5 g, 6.8 mmol)を加え、室温で一晩攪拌した。反応終了後、懸濁液を Celite®にて不溶物を分離し、ろ液を減圧濃縮した。生成物を CHCl₃ に溶解させ、satd. NaHCO₃、brine の順に洗浄後、Na₂SO₄ で乾燥した。溶液を減圧濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc:toluene=1:30+0.1% Et₃N)で精製し、黄色結晶 **31** (1.3

g, 44%)を得た。

mp.156-166. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 1.40 (9H, m), 7.23-8.20 (11H, m)

ESI-MS m/z : 454.1 (M+H) $^+$, 476.3(M+Na) $^+$. HR-ESI-MS m/z : (M+H) $^+$ calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$, 454.1436; found, 454.1437.

4-((chloroamino)methyl)-N-(2-nitro-5-(thiophen-2-yl)phenyl)benzamide (32)

31 (1.00 g, 2.3 mmol)に THF (100 ml)、 MeOH (50 ml)を加え、溶解させた。溶液に 15% HCl (20 ml)を加え、室温で一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮し、黄色の結晶 **22** (0.88 g, 収率 99%)を得た。

mp.254-262. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 1.33 (2H, t, $J=7.2$ Hz), 4.12 (2H, d, $J = 7.5$ Hz), 4.32 (2H, q, $J = 7.2$ Hz), 7.24 (1H, d, $J = 4.0$ Hz), 7.62 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.68 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.73 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 7.73-7.77 (3H, m), 7.78 (1H, d, $J = 6.8$ Hz), 7.97(1H, d, $J = 8.8$ Hz), 8.03 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 8.09 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 8.18 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 8.47 (2H, brs).

ESI-MS m/z : 354.3(M+H) $^+$. HR-ESI-MS m/z : (M+H) $^+$ calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$, 354.0912; found, 354.0911.

N-(4-(2-nitro-5-(thiophen-2-yl)phenylcarbamoyl)benzyl)benzo[d][1,3]dioxole-5-carboxamide (33)

32 (0.50 g, 1.28 mmol)に CH_2Cl_2 (10 ml)、 Et_3N (10 ml)を加え、攪拌した。次に Piperoyloyl chloride (0.47 g, 2.56 mmol)を加え、室温で 3 時間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、 CHCl_3 に溶解させた後、Celite®にて不溶物を分離し、ろ液を減圧濃縮した。生成物を再度 CHCl_3 に溶解させた後、satd. NaHCO_3 、brine で洗浄、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶液を、減圧濃縮後、 CHCl_3 -hexane で再結晶し、黄色結晶 **33** (0.2 g 31%)を得た。

mp.220-235. $^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ :4.52 (2H, d, $J = 11.6$ Hz), 6.11 (2H, s), 7.00-8.32 (13H, m), 8.99 (1H, t, $J = 6.0$ Hz), 10.84 (1H, s). ESI-MS m/z : 502.6 (M+H) $^+$. HR-ESI-MS m/z : (M+H) $^+$ calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$, 502.1073; found, 502.1076.

N-(4-(2-amino-5-(thiophen-2-yl)phenylcarbamoyl)benzyl)benzo[d][1,3]dioxole-5-carboxamide (K-450)

33 (0.05 g, 0.10 mmol)に THF (1 ml)、MeOH(1 ml)を加えて溶解させる。溶液に NH_4OAc

(0.08 g, 1.07 mmol)、 $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.02 g, 0.1 mmol)を加え、 60°C で3時間加熱還流した。反応終了後、Celite®にて不溶物を分離し、減圧濃縮後した。生成物を CHCl_3 で溶解し、brineで洗浄後、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶液を減圧濃縮後、 CHCl_3 -hexaneで再結晶し、淡黄の結晶 **K-450** (0.005 g, 10.6%)を得た。

mp.170-183. ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$) δ : 4.52 (2H, d, $J=5.6$ Hz), 5.14 (2H, s), 6.10 (2H, s), 6.80-7.52 (12H, m), 7.95 (1H, d, $J=8.4$ Hz), 8.98 (1H, t, $J=5.6$ Hz), 9.69 (1H, s). ESI-MS m/z : 472.2($\text{M}+\text{H}$)⁺. HR-ESI-MS m/z : ($\text{M}+\text{H}$)⁺ calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$, 472.1331; found, 472.1324.

4-((benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethylamino)methyl)-N-(2-nitro-5-(thiophen-2-yl)phenyl)benzamide (34)

32 (0.20 g, 0.51 mmol)を CH_2Cl_2 (5 ml)、 CH_3COOH (2 ml)、 $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (0.11 g, 0.51 mmol)を加え、室温で3時間攪拌した。反応液を減圧濃縮後、 CHCl_3 に溶解し、satd. NaHCO_3 、brine洗浄後、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶液をろ過し、減圧濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl_3 : $\text{MeOH}=9:1$)で精製を行い、黄色の油状化合物 **34** (0.064 g, 26%)を得た。

^1H NMR (CDCl_3) δ : 2.62-2.74 (4H, m), 6.70-6.92 (2H, d, $J=3.6$ Hz), 7.14-8.29 (13H, m), 9.38 (1H, d, $J=2.0$ Hz), 11.53 (1H, s). ESI-MS m/z : 487.5 (M)⁺, HR-ESI-MS m/z : ($\text{M}+\text{H}$)⁺ calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$, 488.1280; found, 488.1285.

4-(((benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)(2-hydroxyethyl)amino)methyl)-N-(2-nitro-5-(thiophen-2-yl)phenyl)benzamide (35)

34 (0.05 g, 0.1 mmol), THF (1 ml)、 MeOH (1 ml)を加えた後、 K_2CO_3 (0.1 g, 0.7 mmol)、2-bromoethanol (0.5 ml)を加え、 60°C で6時間加熱還流を行った。反応液を減圧濃縮後、 CHCl_3 に溶解し、brineで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl_3 : $\text{MeOH}=9:1$)で精製し、黄色の油状化合物 **35** (0.03 g, 56%)を得た。

^1H NMR (CDCl_3) δ : 2.45 (1H, brs), 2.71-2.77 (4H, m), 3.62-3.68 (4H, m), 3.82 (2H, s), 7.14-8.29 (13H, m), 9.35 (1H, d, $J=2.0$ Hz), 11.53 (1H, s). ESI-MS m/z : 532.1($\text{M}+\text{H}$)⁺, HR-ESI-MS m/z : ($\text{M}+\text{H}$)⁺ calcd for $\text{C}_{28}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$, 532.1542; found, 532.1544.

N-(2-amino-5-(thiophen-2-yl)phenyl)-4-(((benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)(2-hydroxyethyl)amino)methyl)benzamide (K-510)

35 (0.02 g, 0.04 mmol)に THF (1 ml)、MeOH (1 ml)を溶解させ、NH₄OAc (0.03g, 0.38 mmol)、 SnCl₂ · H₂O (0.01g, 0.44 mmol)の順に加えた後、60°Cで3時間加熱還流した。反応終了後、Celite®にて不溶物を分離し、ろ液を減圧濃縮後、CHCl₃で溶解し、brineで洗浄後、Na₂SO₄で乾燥した。溶液を減圧濃縮後、CHCl₃-hexaneで再結晶し、淡黄色の結晶 **K-510** (0.005 g, 10%)を得た。

mp. ¹H NMR (CDCl₃) δ: 2.45 (1H, brs), 2.71-2.77 (4H, m), 3.62-3.68 (4H, m), 3.82 (2H, s), 5.12 (2H, brs), 7.14-8.29 (13H, m), 9.35 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 11.53 (1H, s).

ESI-MS *m/z*: 501.6 (M+H)⁺, HR-ESI-MS *m/z*: (M+H)⁺ calcd for C₂₈H₂₈N₃O₄S, 502.1800; found, 502.1772.

4-(thiophen-2-yl)benzene-1,2-diamine (36)

28 (1.90 g, 8.6 mmol)に MeOH (20 ml)を加え、Ar置換後に10% Pd/C (1.2g)を加えた。フラスコ内をH₂に置換し、常圧、室温で3時間攪拌した。反応後、反応液にCHCl₃を加え、ひだ付きろ紙 (5C)でろ過し、ろ液を減圧濃縮し。粗生成物をCHCl₃-hexaneで再結晶し、白色の結晶 **36** (1.02 g, 収率 62%)を得た。

mp. 76-81. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 4.71 (4H, brs), 6.51 (1H, d, *J* = 4.0 Hz), 6.70 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 6.72 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 6.09 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 7.00 (1H, m), 7.10 (1H, dd, *J* = 1.2 Hz), 7.27 (1H, dd, *J* = 1.2 Hz). ESI-MS *m/z*: 191.1. (M+H)⁺. HR-ESI-MS *m/z*: (M+H)⁺ calcd for C₁₀H₁₁N₂S, 191.0643; found, 191.0642.

N-(4-(2-amino-4-(thiophen-2-yl)phenyl)carbamoyl)benzyl)-2-naphthamide (K-420)

3 (0.623 g, 3.28 mmol)、**36** (0.5 g, 1.64 mmol)、HOBt (0.332 g 2.46 mmol)を DMF (4 ml)、Et₃N (1 ml)に溶解させた後、WSCl (2 ml)を加え、室温で一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮後、CHCl₃に溶解し、satd. NaHCO₃、brineで洗浄後、Na₂SO₄で乾燥した。溶液をろ過し、減圧濃縮後、CHCl₃で再結晶し、白色の結晶 **K-420** (0.407 g, 収率 26%)を得た。

mp. 217-221. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 4.62 (2H, d, *J* = 5.6 Hz), 5.08 (1H, s), 5.14 (2H, d, *J* =

2.6 Hz), 6.81-7.63 (11H, m), 7.96 -8.04 (7H, m), 8.53 (1H, s), 9.30 (1H, t, $J = 5.6$ Hz).

ESI-MS m/z : 478.2(M+H)⁺. HR-ESI-MS m/z : (M+H)⁺ calcd for C₂₉H₂₄N₃O₂S, 478.1589; found, 478.1580.

N-(4-(2-amino-4-(thiophen-2-yl)phenylcarbamoyl)benzyl)quinoline-3-carboxamide (K-430)

5 (0.120 g, 0.66 mmol)、**36** (0.1 g, 0.33 mmol)と HOBt (0.066 g, 0.50 mmol)を DMF (5 ml)及び Et₃N (1 ml)を加え溶解した後、WSCl (2 ml) 加え、室温で一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮後、CHCl₃ に溶解し、satd. NaHCO₃、brine 洗浄後、Na₂SO₄ で乾燥した。溶液をろ過し、減圧濃縮後、CHCl₃ で再結晶し、紺色の結晶 **K-430** (0.05 g, 収率 16%)を得た。

mp. 128-134. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 4.64 (2H, d, $J = 2.0$ Hz), 5.08 (2H, d, $J = 24.8$ Hz), 6.81-8.13 (17H, m), 8.90 (1H, d, $J = 1.6$ Hz), 9.35 (1H, d, $J = 2.0$ Hz). ESI-MS m/z : 478.2 (M)⁺. HR-ESI-MS m/z : (M+H)⁺ calcd for C₂₈H₂₃N₄O₂S, 479.1541; found, 479.1545

N-(4-(2-amino-4-(thiophen-2-yl)phenylcarbamoyl)benzyl)benzo[d][1,3]dioxole-5-carboxamide (K-440)

7 (0.127 g, 0.66 mmol)、**36** (0.10 g, 0.33 mmol)と HOBt (0.067 g, 0.50 mmol)を DMF (10 ml)に溶解し、WSCl (2 ml) を加え、室温で一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮後、CHCl₃ に溶解し、satd. NaHCO₃、brine 洗浄後、Na₂SO₄ で乾燥した。溶液をろ過し、減圧濃縮後、CHCl₃ で再結晶し、淡黄色の結晶 **K-440** (0.025 g, 収率 8%)を得た。

mp.179.9-182.7. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 4.52 (2H, s), 5.07 (2H, d, $J = 26.4$ Hz), 6.10 (2H, s) 6.70-7.52 (13H, m), 7.95 (2H, s), 8.97 (1H, s), 9.64 (1H, d, $J = 24.4$ Hz). ESI-MS m/z : 472.3 (M+H)⁺. HR-ESI-MS m/z : (M+H)⁺ calcd for C₂₆H₂₂N₃O₄S, 472.1331; found, 472.1333.

N-(4-(2-nitro-5-(thiophen-2-yl)phenylcarbamoyl)benzyl)morpholine-4-carboxamide (37)

32 (0.05 g, 0.12 mmol)を CH₂Cl₂ (2 ml)、Et₃N (1 ml)、DMF (0.1ml)に懸濁させ、氷浴中で Morpholil chloride (3 ml)を加え、室温で一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮後 CHCl₃ に溶解し brine 洗浄後、Na₂SO₄ で乾燥した。溶液を減圧濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc:toluene = 20:1)で精製を行い、黄色の油状化合物 **37** (0.016 g,

36%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.01-1.25 (8H, m), 3.37 -3.42 (4H, m), 3.69-3.73 (4H, m), 7.16-7.49 (6H, m), 7.97 -8.31 (4H, m). ESI-MS m/z : 467.4 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, HR-ESI-MS m/z : ($\text{M}+\text{H}$)⁺ calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_5\text{S}$, 467.1389; found, 467.1392.

N-(4-(2-amino-5-(thiophen-2-yl)phenylcarbamoyl)benzyl)morpholine-4-carboxamide (K-570)

37 (0.05 g, 0.11 mmol)に THF (1 ml)、MeOH (1 ml)加えた後、 NH_4OAc (0.01 g, 0.13 mmol)、 $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.01g, 0.044 mmol)を加え、室温で一晩攪拌した。反応液を satd. NaHCO_3 により反応を停止させ、 CHCl_3 にて抽出した。抽出後、 CHCl_3 溶液を Celite®にて不溶物を分離し、ろ液を satd. NaHCO_3 で洗浄、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶液を減圧濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl_3 : MeOH = 9:1)で精製し、黄色の油状化合物 **K-570** (0.022 g, 44%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.01-1.25 (8H, m), 3.38 -3.40 (2H, m), 4.52 (2H, brs), 7.14-8.29 (13H, m), 6.85-7.91 (10H, m). ESI-MS m/z : 437.6 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, HR-ESI-MS m/z : ($\text{M}+\text{H}$)⁺ calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$, 437.1647; found, 437.1649.

4-methyl-N-(4-(2-nitro-5-(thiophen-2-yl)phenylcarbamoyl)benzyl)piperazine-1-carboxamide (38)

32 (0.05 g, 1.41 mmol)を CH_2Cl_2 (10 ml)、 Et_3N (1 ml)、DMF (0.1 ml)に懸濁させ、氷浴で Piperoil chloride (3 ml)を加え、室温で一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮後 CHCl_3 に溶解し brine 洗浄後、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶液を減圧濃縮後、 CHCl_3 -hexane で再結晶し、白色の結晶 **38** (0.438 g, 収率 64%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 2.17-2.18 (3H, m), 3.33-3.35 (8H, m), 4.27-4.34 (2H, m), 7.18-8.31 (10H, m). ESI-MS m/z : 480.6 ($\text{M}+\text{H}$)⁺, HR-ESI-MS m/z : ($\text{M}+\text{H}$)⁺ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_4\text{S}$, 480.1705; found, 480.1706.

N-(4-(2-amino-5-(thiophen-2-yl)phenylcarbamoyl)benzyl)-4-methylpiperazine-1-carboxamide (K-561)

38 (0.10 g, 0.20 mmol)に THF (1 ml)、MeOH (1 ml)加えた後、 NH_4OAc (0.01 g, 0.13 mmol)、

SnCl₂ · H₂O (0.01g, 0.044 mmol)を加え、室温で一晩攪拌した。反応液を satd. NaHCO₃ により反応を停止させ、CHCl₃ にて抽出した。抽出後、CHCl₃ 溶液を Celite®にて不溶物を分離し、ろ液を satd. NaHCO₃ で洗浄、Na₂SO₄ で乾燥した。溶液を減圧濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃: MeOH = 9:1)で精製し、黄色の油状化合物 **K-561** (0.032 g, 収率 36%)を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.18 (3H, t, *J* = 8.0 Hz), 2.26 (4H, s), 2.50-2.52 (4H, m), 4.30 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 5.16 (2H, brs), 6.81-7.96 (10H, m), 9.71 (1H, s). ESI-MS *m/z*: 450.1 (M+H)⁺,

HR-ESI-MS *m/z*: (M+H)⁺ calcd for C₂₄H₂₈N₅O₂S, 450.1963; found, 450.1960.

4-ethyl-N-(4-(2-nitro-5-(thiophen-2-yl)phenylcarbamoyl)benzyl)-2,3-dioxopiperazine-1-carboxamide (39)

32 (0.10g, 0.28 mmol)を CH₂Cl₂ (5 ml) に懸濁させ、Et₃N (2 ml) と DMF(1 ml)を加えて、氷浴で 1,4-dioxopiperadiny chloride (0.10 g, 0.49 mmol)加えた後、室温で一晩攪拌した。反応液を濃縮後 CHCl₃ に溶解し、satd. NaHCO₃、brine で洗浄後、Na₂SO₄ で乾燥した。この溶液を減圧濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃: MeOH = 9:1)で精製し、淡黄色の油状化合物 **39** (0.030g, 収率 22%)を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ:1.32 (3H, t, *J* = 8.0 Hz), 3.49-4.40 (8H, m), 7.15-8.31 (10H, m), 9.40 (1H, s), 11.55 (1H, s). ESI-MS *m/z*: 520.0(M+H)⁺ HR-ESI-MS *m/z*: (M+H)⁺ calcd for

C₂₅H₂₄N₅O₆S, 522.1447; found, 522.1459.

N-(4-(2-amino-5-(thiophen-2-yl)phenylcarbamoyl)benzyl)-4-ethyl-2,3-dioxopiperazine-1-carboxamide (K-560)

39 (0.1 g, 0.19 mmol)に THF (3 ml)、MeOH (2 ml)加えて溶解させ、NH₄OAc (0.05 g, 0.93 mmol)、SnCl₂ · H₂O (0.10 g, 0.44 mmol)の順に加え、室温で一晩攪拌した。反応終了後、反応液を減圧濃縮し、CHCl₃ で溶解し、Celite®にて不溶物を分離した。ろ液を、brine で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。この溶液をろ過し、減圧濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃: MeOH = 9:1)で精製した。精製した無色油状の生成物を CHCl₃-hexane で再結晶し、白色の結晶 **K-560** (0.05 g, 収率 53%)を得た。

mp.107-109. ¹H NMR (CDCl₃) δ:1.23 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 3.54-3.60 (4H, m), 4.08-4.12 (2H, brs) 4.58 (2H, brs), 6.83-8.00 (10H, m), 9.42 (1H, s). ESI-MS *m/z*: 490.2 (M-H)⁻. HR-ESI-MS

m/z : (M+H)⁺ calcd for C₂₅H₂₆N₅O₄S, 492.1705; found, 492.1692.

2-((benzyl(2-hydroxyethyl)amino)methyl)-4-chlorobutan-1-ol (41)

40 (1.0 g, 6.94 mmol)に Epichlorohydrin (1.9 g 20.8 mmol)を加え 40 °Cで 30 分反応させた。反応後、反応液を減圧濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc: hexane = 1:4)で精製し、淡黄色の油状化合物 (1.5 g, 収率 90%)を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ: 2.44-3.06 (6H, m), 3.46 -3.85 (5H, m), 7.23-7.31 (5H, m). ESI-MS m/z : 244.0 (M+H)⁺. HR-ESI-MS m/z : (M+H)⁺ calcd for C₁₂H₁₉ClNO₂, 244.1104; found, 242.1110.

4-benzyl-2-(chloromethyl)morpholine (42)

41 (1.0 g, 4.10 mmol)に conc. H₂SO₄ (5 ml)をゆっくり滴下し、100 °Cで 30 分加熱還流する。反応液が黄色から橙色に変化したのを確認した後、H₂O で反応を停止した。溶液を toluene により抽出し、brine で洗浄後、Na₂SO₄ で乾燥した。溶液を減圧濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc: toluene = 1:1)で精製し、淡黄色の油状化合物 (0.2 g, 収率 22%)を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.98 (1H, t, J = 10.0 Hz), 2.15-2.22 (1H, m), 2.61-2.65 (1H, m), 2.81-2.83 (1H, m), 3.43-3.52 (4H, m), 3.65-3.74 (2H, m), 3.86-3.89 (1H, m), 7.31-7.33 (5H, m). ESI-MS m/z : 226.8 (M+H)⁺. HR-ESI-MS m/z : (M+H)⁺ calcd for C₁₂H₁₇ClNO, 226.0998; found, 226. 1001.

(4-benzylmorpholin-2-yl)methanol (43)

42 (0.1 g, 0.44 mmol)に 1, 4-dioxane (1 ml), 1M LiOH (1 ml)を加え、室温で一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮し、toluene で抽出した後、brine で洗浄し、Na₂SO₄ で乾燥した。溶液を減圧濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc: toluene = 1:1)で精製し、無色の油状化合物 **43** (0.042 g, 収率 46%)を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ: 2.46-3.08 (1H, t, J = 10.0 Hz), 2.15-2.22 (1H, m), 2.61-2.65 (1H, m), 2.81-2.83 (1H, m), 3.43-3.52 (6H, m), 3.60-3.83 (5H, m), 7.31-7.33 (5H, m). ESI-MS m/z : 208.2 (M+H)⁺. HR-ESI-MS m/z : (M+H)⁺ calcd for C₁₂H₁₈NO₂, 208.1337; found, 208.1332.

morpholin-2-ylmethanol (44)

43 (1.0 g, 4.8 mmol)に MeOH (20 ml)を加え、Ar 置換後に 10% Pd/C (0.5 g)を加えた。H₂に置換し、常圧、室温で4時間攪拌した。反応液に CHCl₃を加えた後、減圧濃縮し、得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH:H₂O=1:1:0.1)で精製し、無色の結晶 **44** (0.042 g, 収率 72%)を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ: 2.46-3.59 (6H, m), 3.73-4.28 (4H, m). ESI-MS *m/z*: 118.9 (M+H)⁺.

HR-ESI-MS *m/z*: (M+H)⁺ calcd for C₅H₁₁NO₂, 118.0868; found, 118.0878.

phenyl 4-(2-nitro-5-(thiophen-2-yl)phenylcarbamoyl)benzylcarbamate (45)

44 (0.5 g, 1.28 mmol)を CH₂Cl₂ (10 ml), Et₃N (2 ml)に溶解させ、攪拌した。溶液に Phenyl Chloroformate (0.5 ml)を加え、室温で一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮し、CHCl₃懸濁させ、satd. NaHCO₃, brine で洗浄後、Na₂SO₄ で乾燥した。溶液を減圧濃縮し、CHCl₃で再結晶し、黄色の化合物 (0.388 g, 収率 64%)を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ: 4.22-4.59 (2H, m), 6.85-9.46 (15H, m). ESI-MS *m/z*: 472.9 (M-H)⁺.

HR-ESI-MS *m/z*: (M+H)⁺ calcd for C₂₅H₂₀N₃O₅S, 474.1123; found, 474.1126.

2-(hydroxymethyl)-N-(4-(2-nitro-5-(thiophen-2-yl)phenylcarbamoyl)benzyl)morpholine-4-carboxamide (46)

45 (0.2 g, 0.42 mmol)を BuOH (5 ml)に懸濁させ、次いで、**44** (0.1 g, 0.85 mmol)を加え、18時間加熱還流を行った。反応液を減圧濃縮した後、CHCl₃/MeOHの混液で溶解し、brine で洗浄した後、Na₂SO₄ で乾燥した。溶液を減圧濃縮し、フラッシュカラムクロマトグラフィー (CHCl₃:MeOH:H₂O=9:1)で精製し、黄色の油状化合物 **46** (0.037 g, 収率 18%)を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ: 3.15-4.46 (11H, m), 7.14-7.94 (10H, m), 8.27 (1H, d, *J* = 9.0 Hz), 9.36

(1H, s), 11.52 (1H, brs). ESI-MS *m/z*: 497.9 (M-H)⁺. HR-ESI-MS *m/z*: (M+H)⁺ calcd for

C₂₄H₂₅N₄O₆S, 497.1495; found, 497.1496.

N-(4-(2-amino-5-(thiophen-2-yl)phenylcarbamoyl)benzyl)-2-(hydroxymethyl)morpholine-4-carboxamide (47)

46 (0.02 g, 0.04 mmol)に THF (1 ml)、MeOH (1 ml)を溶解させ、NH₄OAc (0.03 g, 0.38

mmol)、 $\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.01 g, 0.44 mmol)の順に加えた後、 60°C で3時間加熱還流した。反応終了後、Celite®にて不溶物を分離し、ろ液を減圧濃縮後、 $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ で溶解し、brineで洗浄後、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶液を減圧濃縮後、 CHCl_3 -hexaneで再結晶し、淡黄色の結晶 **K-510** (0.003 g, 収率 14%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 3.03-4.46 (11H, m), 5.04-5.20 (2H, brs), 6.74-7.76 (10H, m), 8.11 (1H, brs). ESI-MS m/z : 467.7 (M-H)⁺. HR-ESI-MS m/z : (M+H)⁺ calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_6\text{S}$, 467.1753; found, 497.1749.

tert-butyl 2-amino-4-bromophenylcarbamate (49)

48 (5 g, 26.7 mmol)を THF (40 ml)、 Et_3N (40 ml)に溶解させ、 $(\text{Boc})_2\text{O}$ (6.0 g, 27.5 mmol)を加え、室温で一晩攪拌した。反応後、反応液を減圧濃縮し、EtOAcに溶解させ、brineで洗浄し、 Na_2SO_4 で乾燥した。溶液を減圧濃縮後、得られた生成物を EtOAc-hexaneで再結晶し、無色の結晶 **49** (5.2 g, 68%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.49 (9H, m), 3.80 (2H, brs), 6.11 (1H, brs), 6.88-6.94 (2H, m), 7.25 (1H, m). ESI-MS m/z : 288.2 (M-H)⁺. HR-ESI-MS m/z : (M+H)⁺ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{BrN}_2\text{O}_2$, 287.0395; found, 287.0394.

tert-butyl 2-amino-4-(thiophen-2-yl)phenylcarbamate (50)

46 (3.0 g, 10.4 mmol)と 2-thiophene bronic acid(2.25 g, 17.6 mmol)と *tri-o*-tolylphosphine (1.35 g, 4.4 mmol)を DME (30 ml)と H_2O (18 ml)に溶解させる。次いで、 K_2CO_3 (5.55 g, 40.2 mmol)、tetrakis(triphenyl phosphine) palladium (0.90 g 0.78 mmol)を加え超音波破碎し、懸濁した溶液を 90°C で 18 h 加熱還流を行った。反応後、懸濁液に CHCl_3 を加え、 H_2O で分配し、 Na_2SO_4 で乾燥させた。溶液をろ過し、減圧濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc:hexane = 2:3)で精製し、黄色結晶 **50** (2.9 g, 収率 96%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ : 1.52 (9H, s), 3.80 (2H, brs), 6.21 (1H, brs), 7.06-7.07 (4H, m), 7.22-7.31 (3H, m). ESI-MS m/z : 291.4 (M-H)⁺. HR-ESI-MS m/z : (M+H)⁺ calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$, 291.1167; found, 291.1169.

tert-butyl 2-(4-(chloromethyl)benzamido)-4-(thiophen-2-yl)phenylcarbamate (51)

p-(Chloromethyl)benzoyl Chloride (2.4 g, 12.7 mmol)を THF (40 ml)及び Et₃N (5 ml)に溶解させ、氷浴下で攪拌しながら **50** (3.7 g, 12.7 mmol)をゆっくり加えた。投入後、室温に戻し、一晩攪拌した。反応液を減圧濃縮し、CHCl₃で溶解した後、satd NaHCO₃及び brine で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥した。溶液をろ過し、減圧濃縮後、得られた生成物をフラッシュカラムクロマトグラフィー (EtOAc: hexane = 2:3)にて精製し、無色の結晶 **51** を(4.27 g, 76%)を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ: 1.52 (9H, s), 4.64 (2H, s), 6.79 (1H, s), 6.82 (1H, s), 7.06-7.7.99 (10H, m), 8.38 (1H, brs). ESI-MS *m/z*: 443.4 (M+H)⁺. HR-ESI-MS *m/z*: (M+H)⁺ calcd for C₂₃H₂₄ClN₂O₃S, 443.1196; found, 443.1201.

tert-butyl 2-(4-((1,3-dioxoisindolin-2-yl)methyl)benzamido)-4-(thiophen-2-yl)phenylcarbamate (52)

51 (2.0 g, 4.58 mmol)を DMF (10 ml)に溶解させ、Potassium phthalimide (0.93 g, 5.04 mmol), KI (0.15 g, 0.92 mmol)を加え、50 °Cで一晩攪拌した。反応後、反応液に H₂O を加え、反応を停止させた。反応液を EtOAc で抽出し、有機層を brine で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥した。有機層をろ過後、減圧濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィー (CHCl₃: MeOH = 9:1) にて精製し、黄橙色の油状化合物 **52** (1.2 g, 収率 47%)を得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.44 (9H, s), 4.88 (2H, s), 6.96-8.05 (14H, m). ESI-MS *m/z*: 554.7(M+H)⁺. HR-ESI-MS *m/z*: (M+H)⁺ calcd for C₃₁H₂₈N₃O₅S, 554.1749; found, 554.1750.

tert-butyl 2-(4-(aminomethyl)benzamido)-4-(thiophen-2-yl)phenylcarbamate (53)

52 (1.7 g, 3.1 mmol)を EtOH (15 ml)に懸濁させ、Hydrazine monohydrate (0.3 ml)を加え、5 時間加熱環流を行った。反応後、反応液を減圧濃縮し、CHCl₃で溶解し、satd. NaHCO₃及び brine で洗浄し、Na₂SO₄で乾燥した。溶液をろ過し、減圧濃縮後、得られた生成物をシリカゲルクロマトグラフィー (CHCl₃: MeOH = 9:1)にて精製し、無色の結晶 **53** (1.1 g, 84%)を得た。

mp. 102-104. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.44 (9H, s), 3.82 (2H, s), 7.13-7.94 (10H, m), 8.77 (1H, brs), 9.84 (1H, brs). ESI-MS *m/z*: 424.7(M+H)⁺. HR-ESI-MS *m/z*: (M+H)⁺ calcd for C₂₃H₂₅N₃O₃S, 424.1695; found, 424.1670.

tert-butyl 2-(4-((4-ethyl-2,3-dioxopiperazine-1-carboxamido)methyl)benzamido)-4-(thiophen-2-yl)phenylcarbamate (54)

53 (1.2 g, 2.83 mmol)を CH₂Cl₂ (10 ml)、Et₃N (3 ml)に溶解させ、1,4-dioxopiperadinyll chloride (0.69 g, 3.40 mmol)を加え、室温で3時間攪拌した。反応液を濃縮後 CHCl₃ に溶解し、satd. NaHCO₃、brine で洗浄後、Na₂SO₄ で乾燥した。この溶液を減圧濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl₃: MeOH = 9:1)で精製し、淡黄色の結晶 **54** (1.5 g, 収率 90%)を得た。

mp. 162-169. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.10 (3H, t), 1.44 (9H, s), 2.50 (4H, s), 3.38 (2H, m), 3.57 (2H, m), 3.95 (2H, m), 4.53 (2H, m), 7.12-8.74 (10H, m), 9.36 (1H, brs), 9.39 (1H, brs), 9.91 (1H, brs). ESI-MS *m/z*: 592.22(M+H)⁺. HR-ESI-MS *m/z*: (M+H)⁺ calcd for C₃₀H₃₄N₅O₆S, 592.2230; found, 592.2231.

N-(4-(2-amino-5-(thiophen-2-yl)phenylcarbamoyl)benzyl)-4-ethyl-2,3-dioxopiperazine-1-carboxamide (K-560)

54 (1.5 g, 2.54 mmol)を TFA/CH₂Cl₂ (1:4)の混液 (15 ml)に加え、室温で1時間攪拌した。反応液を濃縮後、satd. NaHCO₃ で反応を停止させた。この溶液を CHCl₃ で抽出し、brine で洗浄後、Na₂SO₄ で乾燥した。溶液を減圧濃縮後、EtOH にて再結晶し、淡黄色の針状結晶 **K-560** (1.2 g, 96%)を得た。

mp.182-183. ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ:1.11 (3H, t, *J* = 7.2 Hz), 3.54-3.60 (4H, m), 4.08-4.12 (2H, brs) 4.58 (2H, brs), 6.83-8.00 (10H, m), 9.37 (1H, t), 9.72 (1H, brs). ESI-MS *m/z*: 490.2 (M-H)⁻. HR-ESI-MS *m/z*: (M+H)⁺ calcd for C₂₅H₂₆N₅O₄S, 492.1705; found, 492.1700.

2. 生物

2-1. 細胞株

HCT116、SW480、SW620、SKBR3、MDA-MB-231、MCF-7 並びに A549 は American Type Culture Collection (ATCC)から購入した。HCT116 及び SW620 は 10% ウシ胎児血清 (FBS、Biowest Co.)、0.1% penicillin/ streptomycin (Life technology Co.)含 McCoy's 5A 培地 (Life technology Co.)で培養した。SW480、SKBR3、MDA-MB-231 及び MCF-7 は 10% ウシ胎児血清 (FBS、Biowest Co.)、0.1% penicillin/ streptomycin (Life technology Co.)含 RPMI 1640 培地 (Sigma-Aldrich Co.)で培養した。A549 は 10% ウシ胎児血清 (FBS、Biowest Co.)、0.1% penicillin/ streptomycin (Life technology Co.)含 Dulbecco's Modified Eagle medium (Sigma-Aldrich Co.)で培養した。

2-2. 試薬

Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), MS-275, Merck compound は当研究室にて合成し、TLC 又は HPLC による純度測定をした後、実験に使用した。Trichostatin A と Rapamycin は Sigma-Aldrich Co.から購入した。

2-3. 遺伝子およびタンパク質実験

2-3-1. 一般で使った抗体

CDK4, CDK2, RB, PARP, caspase 3, cytochrome c は Biolegend から購入した。AcH3 (Lys 9), cleaved PARP, cleaved caspase 3, p-RB, p-Akt, p-mTOR (total), p-mTORSer2448, mTOR, E2F-1, PI3K, LC3B, Rictor, Raptor, GβL, p-p70PS6K, p-4E-BP1 は Cell Signaling Technology, Inc.より購入した。p21, p-ERK, ERK は Sigma-Aldrich Co.から購入した。Acetyl-histone H3 (total)は Merck-Millipore Co.から購入した。

WST-1 及び WST-8 を用いた細胞増殖抑制活性試験

ヒト大腸がん細胞株 HCT116 を 10%ウシ胎児血清 (FBS)、50 µg/ml Penicillin G-Streptomycin を含む McCoy's 5A 培地 (GIBCO)で 5%CO₂、37°Cで培養した。培養容器 70-80%まで細胞集団が成長したら、0.25%trypsin (1 ml)で処理し、剥離した細胞集団を回収後、1000 rpm で 5 min 遠心を行った。遠心終了後、上清を取り除き、上記培地で再懸濁後、10000 cells/ml になるように 96-well plate に播種した。24 h 後に各濃度

に調整した薬剤を添加し、5%CO₂濃度、37°Cで72h培養した。培養後、WST-8 (Dojindo) を添加し、37°Cで2h培養した。培養後、オートプレートリーダーを用いて吸光度 (主波 450 nm、副波 630nm)を測定し、各薬剤の細胞増殖抑制活性 (IC₅₀)を算出した。

Western blot 法

細胞を6 cm dish に1.0×10⁶ cell/cm² となるように播種した。細胞の培養液を無血清培地(5 ml)に置き換え、更に24時間培養した。無血清培地 (5 mL) に置き換え、薬剤を添加し、24時間又は48時間培養した。1×PBS (1 mL)で洗浄後、細胞が接着した dish に200 µL の Lysis buffer [1% Nonidet P-40, 0.1% SDS, 1% Triton-X 100, 10 mM Tris (pH=7.4), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM NaF, 2 mM Na₃VO₄, 20 mM Na₄P₂O₇, 1 mM PMSF, protease inhibitor and phosphatase inhibitor cocktails)を加え、細胞を回収した。Lysates を4°C、15000 rpm で15分間遠心処理し、不溶物を除去した。Lysates のタンパク濃度は BCA Protein Assay Kit.を用いて定量した。Lysate (タンパク量: 10 µg) を SDS-PAGE により、タンパク質を分離した。泳動後、Immobilon-P PVDF membrane (Millipore)にタンパク質を転写した。転写後、ブロッキング液として5% nonfat milk を用いた。また、リン酸化タンパク質検出用ブロッキング液には、1%nonfat milk、1% BSA、200 mM NaF 溶液を使用した。操作後、1次抗体を反応させ、冷蔵庫にて一晩静置させた。1×TBST (1×TBS, 0.1% Tween 20) で洗浄後、2次抗体を室温で1h反応させた。反応後、メンブレンを1×TBSTにて洗浄し、発色剤である ECL Prime Western Blotting Detection system Reagent (GE Healthcare Life Sciences)または、Super Signal West[®] Femto Maximum Sensitivity substrate (Thermo Scientific Co.)で発光させ、Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences) で検出、画像解析を行った。

細胞周期解析

ヒト大腸がん細胞株 HCT116 を10%ウシ胎児血清 (FBS)、50 µg/ml Penicillin G-Streptomycin を含む McCoy's 5A 培地 (GIBCO)で5%CO₂、37°Cで培養した。培養容器70-80%まで細胞集団が成長したら、0.25%trypsin (1 ml)で処理し、剥離した細胞集団を回収後、1000 rpm で5 min 遠心を行った。遠心終了後、上清を取り除き、上記培

地で再懸濁後、1000000 cells/ml になるように 6cm dish に播種した。24 h 培養後、上記無血清培地に交換し 24h 培養した。培地を取り除いた後、上記無血清培地 1 ml で 3 回洗浄し、薬剤含無血清培地を加え、24 h 培養した。

動物実験

6週齢メスBALB/c-nu/nu マウス(日本SLC)の背部にヒト大腸がん細胞株HCT116(1.0×10^6 cells/100 μ l)を2箇所皮下移植する。腫瘍体積が90-110 mm³に到達したら、各マウスを4群(コントロール群、陽性対照化合物MS-275群、被試験化合物群に群分けを行い、経口投与を行った。実験終了後、マウス背部にある腫瘍を取り出して湿重量を測定した。本研究では、申請者所属大学と協定校関係にある大阪薬科大学で動物実験を行なうため、倫理面において以下のように配慮する。

当該法律並びに関係省庁からの通達*などに従って、大阪薬科大学が定める「大阪薬科大学動物実験規程」に準じて行なう。すなわち、適正な飼育環境・管理のもとに苦痛や恐怖を伴わない取り扱いをし、安全管理には十分な配慮を払う。

*動物の保護及び管理に関する法律(昭和48年10月1日 法律 第105号) ; 実験動物の飼養及び保管に関する基準(昭和55年3月27日 総理府告示 第6号) ; 大学等における動物実験について(昭和62年5月25日 文部省 文学情第141号) ; 動物の処分法に関する指針(平成7年7月4日 総理府告示 第40号)

動物実験は、大阪薬科大学動物実験委員会に実験申請し、承認を受けた上で実施した。

研究業績

1. 論文発表 (査読あり)

- 1) Shingo Kiyokawa, Yoshiyuki Hirata, Yasuo Nagaoka, Makio Shibano, Masahiko Taniguchi, Masahide Yasuda, Kimiye Baba and Shinichi Uesato
New orally bioavailable 2-aminobenzamide-type histone deacetylase inhibitor possessing a (2-hydroxyethyl)(4-(thiophen-2-yl)benzyl)amino group
Bioorganic & Medicinal Chemistry (2010) **18**, 3925-3933

- 2) Yasuyuki Kawaratani, Tomohiko Harada, Yoshiyuki Hirata, Yasuo Nagaoka, Susumu Tanimura, Makio Shibano, Masahiko Taniguchi, Masahide Yasuda, Kimiye Baba and Shinichi Uesato
New microtubule polymerization inhibitors comprising a nitrooxymethylphenyl group
Bioorganic & Medicinal Chemistry (2011) **19**, 3995-4003

- 3) Ayako Kumagai, Nanao Horike, Yudai Satoh, Tatsuya Uebi, Tsutomu Sasaki, Yumi Itoh, Yoshiyuki Hirata, Kozue Uchio-Yamada, Kazuo Kitagawa, Shinichi Uesato, Hidehisa Kawahara, Hiroshi Takemori and Yasuo Nagaoka
A Potent Inhibitor of SIK2, 3, 39, 7-Trihydroxy-49-Methoxyflavon (49-O-Methylfisetin), Promotes Melanogenesis in B16F10 Melanoma Cells
PLoS One (2011), **6**, 10, e26148

- 4) Yoshiyuki Hirata, Masahiko Hirata, Yasuyuki Kawaratani, Makio Shibano, Masahiko Taniguchi, Masahide Yasuda, Yoshiro Ohmomo, Yasuo Nagaoka, Kimiye Baba and Shinichi Uesato
Anti-tumor activity of new orally bioavailable
2-amino-5-(thiophen-2-yl)benzamide-series histone deacetylase inhibitors, possessing an aqueous soluble functional group as a surface recognition domain
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2012) **22**, 1926-1930

5) Hiroki Maruoka, Ryo Hosokawa, Yoshiyuki Hirata, Hiromichi Kawa, Kouta Okamoto, Taiki Waki, Shinichi Uesato, Koji Shimoke and Toshihiko Ikeuchi.

New Orally Bioavailable 2-aminobenzamide-type Histone Deacetylase Inhibitor Promotes Neurite Outgrowth via histone H3 Modification in PC12 cells: a Possible Therapeutic Candidate for Neuronal Diseases

Bioengineering & Biomedical Science (2012), **S5**, 1-5.

6) Shinichi Uesato, Hirofumi Yamashita, Ryu Maeda, Yoshiyuki Hirata, Maho Yamamoto, Saki Matsue, Yasuo Nagaoka, Makio Shibano, Masahiko Taniguchi, Kimiye Baba and Motoharu Ju-ichi.

Synergistic Antitumor Effect of a Combination of Paclitaxel and Carboplatin with Nobiletin from *Citrus depressa* on Non-Small-Cell Lung Cancer Cell Lines.

Planta Medica (2014) **80**, 452-457.

2. 国内学会発表

7) 清川真吾、前田泰司、平田佳之、長岡康夫、芝野真喜雄、谷口雅彦、安田正秀、馬場きみ江、上里新一

経口性ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 K-197 の開発

第27回 メディシナルケミストリーシンポジウム (2008年11月26日-28日, 大阪)

8) 上里新一、清川真吾、平田佳之、長岡康夫、芝野真喜雄、谷口雅彦、安田正秀、馬場きみ江

新規経口性ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 K-197 の抗腫瘍効果について

日本薬学会第129年会 (2009年3月26日-28日, 京都)

9) 瓦谷泰之、寺田侑司、拝師佳奈、金子博、平田佳之、長岡康夫、上里新一
硝酸エステル基を有する細胞周期 G2/M 制御化合物について

日本薬学会第129年会 (2009年3月26日-28日, 京都)

10) 瓦谷泰之、平田佳之、長岡康夫、原田知彦、上里新一、芝野真喜雄、谷口雅彦、

安田正秀、馬場きみ江

新規細胞周期 M 期制御化合物の抗がん活性と関連化合物の構造活性相関について

第 28 回 メディシナルケミストリーシンポジウム (2009 年 11 月 25 日-27 日, 東京)

- 11) 清川真吾、平田佳之、長岡康夫、芝野真喜雄、谷口雅彦、安田正秀、馬場きみ江、上里新一

新規含硫ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤のデザインとそのヌードマウスを用いた抗腫瘍活性試験について

日本薬学会第 130 年会 (2010 年 3 月 28 日-30 日, 岡山)

- 12) 平田佳之、北久保正浩、長岡康夫、上里新一

亜鉛結合部位にチエニル基を持つ新規ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の創製

第 29 回 メディシナルケミストリーシンポジウム (2011 年 11 月 17 日-19 日, 京都)

3. 国際学会発表

- 13) Yoshiyuki Hirata, Shingo Kiyokawa, Yasuo Nagaoka, Makio Shibano, Masahiko

Taniguchi, Masahide Yasuda, Kimiye Baba, Shinichi Uesato

New orally bioavailable 2-aminobenzamide-type histone deacetylase inhibitors possessing 1,4-phenylene and bicyclic arylmethyl groups

2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (Dec. 15-20, 2010, USA)

- 14) Yoshiyuki Hirata, Makio Shibano, Masahiko Taniguchi, Masahide Yasuda, Kimiye Baba, Yasuo Nagaoka, Masahiko Hirata, Yoshiro Ohmomo and Shinichi Uesato

Antitumor activity of histone deacetylase inhibitors possessing a 2-thienyl-substituted 2-aminobenzamide moiety

8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (Nov. 29-Dec. 2, 2011, Japan)

15) Yoshiyuki Hirata, Yasuyuki Kawaratani, Yasuo Nagaoka and Shinichi Uesato

In vivo activity and mechanism of action of a new 5-(thiophen-2-yl)-substituted
2-aminobenzamide-series histone deacetylase inhibitor K-560

EFMC-ISMC 22nd International Symposium on Medicinal Chemistry (Sep. 2-6, 2012,
Germany)

引用文献

- 1) Andrew P. Feinberg, Benjamin Tycko., *Nature Reviews Cancer* (2004), **4**, 143-153.
- 2) Kouzarides T., *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **9**, 40-48 (1999).
- 3) Strahl B. D., Allis C. D., *Nature*, **403**, 41-45 (2000)
- 4) Kirch HC., Ruschen S., Brockmann D., Esche H., Horikawa I., Barrett JC, Opalka B, Hengge UR., *Oncogene*, **21**, 7991-8000 (2002).
- 5) Cao D., Wang Z., Zhang CL., Oh J., Xing W., Li S., Richardson JA., Wang DZ., Olson EN., *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 364-376 (2005).
- 6) Sowa Y., Orita T., Minamikawa S., Nakano K., Mizuno T., Nomura H., Sakai T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **241**, 142-150 (1997).
- 7) Sowa Y., Orita T., Hiranabe-Minamikawa S., Nakano K., Mizuno T., No,mura H., Sakai T., *Ann. NY. Acad. Sci.*, **886**, 195-199 (1999).
- 8) Sowa Y., Sakai T., *Biofactors.*, **12**, 283-287 (2000).
- 9) Kutko MC., Glick RD., *Ckin Cancer Res.*, **9**, 5749-5755 (2003).
- 10) Ishiguro K., Satorelli AC., *Eur. J. Biochem.*, **271**, 2379-2390 (2004).
- 11) Sowa Y., Sakai T., *Biofactors.*, **12**, 283-287 (2000)
- 12) Chen Z., Clark S., Birkeland M., Sung CM., Lago A., Liu R., Kirkpartick R., Johanson K., Winkler JD., Hu E., *Cancer Lett.*, **188**, 127-140 (2002).
- 13) Hirose T., Sowa Y., Takahashi S., Saito S., Yasuda C., Shindo N., Furuichi K., Sakai T., *Oncogene*, **22**, 7762-7773 (2003).
- 14) Brunet A., Sweeney LB., Sturgill JF., Chua KF., Greer PL., Lin Y., Tran H., Ross SE., Mostoslavsky R.,Cohen HY., Hu LS., Cheng HL., Jedrychowski MP., Cygi SP., Sinclair DA., Alt FW., Greenberg ME., *Science*, **303**, 20011-20015 (2004).
- 15) Kobayashi Y., Furukawa-Hibi Y., Chen C., Horio Y., Isobe K., Ikeda K., Motoyama N., *Int. J. Mol. Med.*, **16**, 237-243 (2005).
- 16) Oh M, Choi I_K., Kwon H_J., *Biochem Res Com.* **369**, 1179-1183 (2008).
- 17) Tsuji N., Kobayashi M., Nagashima K., Wakisaka Y., Koizumi K., *J. Antibiot.* **29** (1), 1-6 (1976).
- 18) Yoshida M., Kijima M., Akita M. and Beppu T., *J. Biol. Chem.*, **265**, 17174-17179

- (1990).
- 19) Fuito L., Bali P., Wittman S., Donapaty S., Guo F., Yamaguchi H., Wang H. G., Atadja P., Bhalla K., *Mol. Cancer. Ther.*, **2**, 971-984 (2003).
 - 20) Vanommeslaeghe K., Van Alesenoy C., De P. F., Martins J. C., Tourwe D., Gerrlings P., Pavletich N. P., *Nature*, **401**, 188-193 (1999).
 - 21) Richon VM, Emilliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**, 3003-3007 (1998).
 - 22) Butler LM, Agus DB, Scher HI, Higgins B, Rose A, Cordon-Cardo C, Thaler HT, Rifkind RA, Marks PA, Richon VM., *Cancer Res.*, **60**, 5165-5170 (2000).
 - 23) Cohen LA., Marks PA., Amins S., Desai D., Pittman B., Richon VM., *Anticancer Res.*, **22**, 1497-1504 (2002).
 - 24) Remiszewski SW., Sambucetti LC., Atadja P., Bair KW., Cornell WD., Green MA., Howell KL., *J. Med. Chem.*, **45**, 753-757 (2002).
 - 25) Castro-Galache MD., Ferragut JA., Barbera VM., Martin-Orozco E., Gonzalez-Ros JM., Garcia-Morales P., Saceda M., *Int. J. Cancer*, **104**, 579-586 (2003).
 - 26) Murata M., Towatari M., Kosugi H., Tanimoto M., Ueda R., Saito H., Naoe T., *Jpn. J. Cancer Res.*, **91**, 1154-1160 (2000).
 - 27) Yamano T., Ura K., Morishita R., Nakajima H., Monden M., Kaneda Y., *Mor. Ther.*, **1**, 574-580 (2000).
 - 28) Kitazono M., Goldsmith ME., Aikou T., Bates S., Fojo T., *Cancer Res.*, **61**, 6328-6330 (2001).
 - 29) Kitazono M., Chuman Y., Aikou T., Fojo T., *J. Clin. Endocrinol Metab.*, **86**, 834-840 (2001).
 - 30) Marshall JL., Rivi N., Kauh J., Dahut W., Figuera M., Kang MH., Figg WD., Wainer I., Chaissang C., Li MZ., Hawkings MJ., *J. Exp. Ther. Oncol.*, **2**, 325-332 (2002).
 - 31) Tabe Y., Konopleva M., Contractor R., Munsell M., Schober WD., Jin L., Tsutsumi-Ishii Y., Nagaoka I., Igari J., Andreef M, *Blood*, **107**, 1546-1554 (2006).
 - 32) Suzuki T., Ando T., Tsuchiya K., Fukazawa N., Saito A., Mariko Y., Yamashita T., Nakanishi O., *J. Med. Chem.*, **42**, 3001-3003 (1999).
 - 33) Rossig L., Li H, Fisslthaler B., Urbich C., Fleming I., Forstermann U., Zeiher AM.,

- Dimmeler S., *Cric. Res.*, **91**, 837-844 (2002).
- 34) Wittv O., Monkemeyer S., Ronndahl G., Erdlenbruch B., Reinhardt D., Kanbach K., Pelrun A., *Blood*, **101**, 2001-2007 (2003).
- 35) Camphausen K., Scott T., Sproull M., Tofilon PJ., *Clin. Cancer Res.*, **10**, 6066-6071 (2004).
- 36) Park JH., Jung Y., Kim TY., Kim SG., Jong HS., Lee JW., Kim DK., Lee JS., Kim NK., Kim TY., Bang YG., *Clin. Cancer Res.*, **10**, 5271-5281 (2004).
- 37) Marks PA., Richon VM., Kelly WK., Chiao JH., Miller T., *Novartis Found Symp.*, **259**, 269-281 (2004).
- 38) Krakaer AJ., Mizzen CA., Hartl BG., Minn J., Allis CD., Merriman RL., *Mol. Cancer Ther.*, **2**, 401-408 (2003).
- 39) Piekarz R., Bates S., *Curr. Pharm. Des.*, **10**, 2289-2298 (2004).
- 40) Undevia SD., Kindler HL., Janisch L., Olson SC., Schilsky RL., Vongelzang NJ., Kimmel KA., Macek TA., Ratein MJ., *Ann. Oncol.*, **15**, 1705-1711(2004).
- 41) Monneret C., *Eur. J. Med. Chem.*, **40**, 1-13 (2005).
- 42) Kouraklis G., Theocharis S., *Oncol. Rep.* **15**, 489-494 (2006).
- 43) Remiszewski SW., Sambucetti LC., Bair KW., Bontempo J., Cesarz D., Chandramouli N., Chen R., Cheung M., Cornell-Kennon S., Dean K., Diamantidis G., France D., Green MA., Howell KL., Kashi R, Kwon P., Lassota P., Martin MS., Mou Y., Perez LB., Sharma S., Smith T., Sorensen E., Taplin F., Trogani N., Versace R., Walker H., Weltchek-Engler S., Wood A., Wu A., Atadja P., *J. Med. Chem.*, **46**, 4609-4624 (2003).
- 44) Fuino L., Bali P., Wittmann S., Donapaty S., Guo F., Yamaguchi H., Wang HG., Atadja P., Bhalla K., *Mol. Cancer Ther.*, **2**, 971-984 (2003).
- 45) Monneret C., *Eur. J. Med. Chem.*, **40**, 1-13 (2005).
- 46) Paris M., Porcelloni M., Binaschi M/, Fattori D., *J. Med. Chem.* **51**, 1505-1529 (2008).
- 47) Suzuki T., *Chem. Pharm. Bull.*, **57**, 897-906, (2009).
- 48) Imai S. I., Guarente L., *Trends Cell Biol.*, S0962-8924 (2014).
- 49) Uesato S, Kitagawa M, Nagaoka Y, Maeda T, Kuwajima H, Yamori T., *Bioorg. Med. Chem Lett.*, **12**, 1347-1349 (2002).
- 50) Maeda T., Nagaoka Y., Kuwajima H., Seno C., Maruyama S., Kurotaki M., Uesato S.,

- Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 4351-4360 (2004)
- 51) Maeda T., Nagaoka Y., Kawai Y., Takagaki N., Yasuda C., Yogosawa S., Sowa Y., Sakai T., Uesato S., *Biol. Pharm. Bull.*, **28**, 849-853 (2005).
- 52) Nagaoka Y., Maeda T., Kawai Y., Takagaki N., Yasuda C., Yogosawa S., Sowa Y., Sakai T., Uesato S., *Eur. J. Med. Chem.*, **41**, 697-708 (2006).
- 53) Delcuve G_P., Khan D_H., Davie J_R., *Expert Opin Ther Targets*. **17**, 29-41 (2013).
- 54) Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD., *J Med Chem*. 2002 Jun 6;45(12):2615-23.
- 55) Oscar M. Moradei, Tammy C. Mallais, Sylvie Frechette, Isabelle Paquin, Pierre E. Tessier, Silvana M. Leit, Marielle Fournel, Claire Bonfils, Marie-Claude Trachy-Bourget, Jianhong Liu, Theresa P. Yan, Ai-Hua Lu, Jubrail Rahil, James Wang, Sylvain Lefebvre, Zuomei Li, Arkadii F. Vaisburg, and Jeffrey M. Besterman, *J. Med. Chem. Lett.*, **50**, 5543-5546 (2007).
- 56) Richard W. Heidebrecht Jr., Melissa Chenard , Joshua Close , William K. Dahlberg , Judith Fleming , Jonathan B. Grimm , Julie E. Hamill , Andreas Harsch , Brian B. Haines , Bethany Hughes , Astrid M. Kral , Richard E. Middleton, Chandrasekhar Mushti, Nicole Ozerova, Alexander A. Szewczak, Hongmei Wang, Kevin Wilson, David J. Witter, J. Paul Secrist, Thomas A. Miller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 2053-2058 (2009).
- 57) Solomon D. Kattar, Laura M. Surdi, Anna Zabierek, Joey L. Methota, Richard E. Middleton, Bethany Hughes, Alexander A. Szewczak, William K. Dahlberg, Astrid M. Kral, Nicole Ozerova, Judith C. Fleming, Hongmei Wang, Paul Secrist, Andreas Harsch, Julie E. Hamill, Jonathan C. Cruz, Candia M. Kenific, Melissa Chenard, Thomas A. Miller, Scott C. Berk, Paul Tempest, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 1168-1172 (2009).
- 58) Joey L. Methot, Christopher L. Hamblett, Dawn M. Mampreian, Joon Jung, Andreas Harsch, Alexander A. Szewczak, William K. Dahlberg, Richard E. Middleton, Bethany Hughes, Judith C. Fleming, Hongmei Wang, Astrid M. Kral, Nicole Ozerova, Jonathan C. Cruz, Brian Haines, Melissa Chenard, Candia M. Kenific, J. Paul Secrist, Thomas A. Miller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 6104-6109 (2008).
- 59) Kevin J. Wilson, David J. Witter, Jonathan B. Grimm, Phieng Siliphaivanh, Karin M. Otte, Astrid M. Kral, Judith C. Fleming, Andreas Harsch, a Julie E. Hamill, Jonathan C. Cruz, c

Melissa Chenard, Alexander A. Szewczak, Richard E. Middleton, Bethany L. Hughes, William K. Dahlberg, J. Paul Secrist and Thomas A. Miller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 1859-1863 (2008).

60) Joey L. Methot, Prasun K. Chakravarty, Melissa Chenard, Joshua Close, Jonathan C. Cruz, William K. Dahlberg, Judith Fleming, Christopher L. Hamblett, Julie E. Hamill, Paul Harrington, Andreas Harsch, Richard Heidebrecht, Bethany Hughes, Joon Jung, Candia M. Kenific, Astrid M. Kral, Peter T. Meinke, Richard E. Middleton, Nicole Ozerova, David L. Sloman, Matthew G. Stanton, Alexander A. Szewczak, Sriram Tyagarajan, David J. Witter, J. Paul Secrist and Thomas A. Miller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 973-978 (2008).

61) David J. Witter, Paul Harrington, Kevin J. Wilson, Melissa Chenard, Judith C. Fleming, Brian Haines, Astrid M. Kral, J. Paul Secrist and Thomas A. Miller, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **18**, 726-731 (2008).

謝辞

終わりに臨み、終始御指導御鞭撻賜りました、関西大学化学生命工学部医薬品工学研究室の上里新一教授に心より感謝致します。また、教育、研究においてご高配を賜りました長岡康夫教授に深謝致します。実験機器等にご協力賜りました下家浩二准教授、動物実験についてご協力頂いた大阪薬科大学の諸先生方、即ち、生薬科学研究室の馬場きみ江名誉教授、谷口雅彦教授、芝野真喜雄准教授、前動物関連施設責任者の安田正秀准教授、生体機能診断学研究室の大桃善郎准教授、平田雅彦講師に厚く感謝いたします。また、実験の一部に御助言賜りました医薬基盤研究所の竹森洋教授、熊谷彩子博士、大阪大学医学部神経内科佐々木勉助教に深謝致します。また、本研究において実験の御助力賜りました田辺三菱製薬株式会社の瓦谷泰之学兄、日本精化株式会社深田尚文学兄、清川真吾学兄、小城製薬株式会社桑島樹学兄、多木化学株式会社前田竜学兄、クラブコスメティクス株式会社武本佳樹学兄に感謝します。また、原田知彦氏、北久保正浩氏、山下裕史氏、小山竜平氏、山本真歩氏をはじめ、医薬品研究室の方々に深く御礼申し上げます。