

Wnt/ β -catenin 経路を標的とした新規ジペプチド型阻害薬の開発
およびその抗腫瘍効果の検証

2020 年度
京都薬科大学大学院 課程博士学位論文
【薬学】病態生理学分野
若林 亮介

課程博士學位論文 内容の要旨

専攻・課程 : 薬学専攻・博士課程

氏名 (英字名) : 若林亮介 (Ryosuke Wakabayashi)

学位論文題目 : Wnt/ β -catenin 経路を標的とした新規ジペプチド型阻害薬の開発およびその抗腫瘍効果の検証

序章

がんは本邦における 2019 年 1 年間での死亡数は 37 万人以上であり、全死亡数の約 3 割を占める。がん治療は近年グリベック (イマチニブ) などの分子標的薬や、免疫チェックポイント阻害剤オプジーボ (ニボルマブ) などの登場により飛躍的な治療成績の向上を遂げている。しかし未だにがん種や臨床病期によっては予後が悪いものもある。また治療困難な再発性のがんや抗がん剤に対する耐性化など多くの問題が残されており、さらなる治療薬の開発が待ち望まれている。胚発生、幹細胞分化調節、骨形成、細胞増殖などに関与するシグナル伝達経路である Wnt/ β -catenin 経路の異常な活性化は、さまざまながん種の発がんやがん幹細胞の発生・維持に寄与することが報告されている。そのため本経路は、がんの再発や耐性化の問題を解決につながる魅力的ながん治療の標的として治療薬の開発が行われてきた。しかし、Wnt/ β -catenin 経路を特異的に標的とする、承認済みの治療薬は未だに存在しない。

本研究では、臨床における治療抵抗性や再発などの問題を解決可能とする、新たな Wnt/ β -catenin 経路阻害薬の開発を目指し、京都薬科大学薬品化学分野が創製した化合物を用いて新規阻害薬の探索研究を行い、がん細胞における抗腫瘍効果を検討した。

第 1 章 Wnt/ β -catenin 経路阻害薬候補化合物の探索

Wnt/ β -catenin 経路阻害薬を探索するため、ヒト胎児腎細胞 HEK293 細胞に Super TOP flash プラスミドを導入した TOP 細胞を作製し、T-cell factor (TCF) ルシフェラーゼレポーターアッセイでの TCF 活性を指標としたスクリーニングを可能とした。まず、京都薬科大学薬品化学分野が創製した化合物より Wnt/ β -catenin 経路阻害活性を有する化合物のスクリーニングを行った。既存の同阻害薬である ICG001 と構造類似性を有する SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤合成中間体 (23 化合物) を評価した。その結果、12 化合物が ICG001 を上回る活性を示したが、これらの中間体は合成に多くの工程を要し、化合物供給の面での課題がある。そのため、合成が簡便であり多様な原料を容易に利用可能なジペプチド型化合物を新たに設計し、合成と評価を行った (8 化合物)。結果、ICG001 よりも強い TCF 阻害活性を示す compound 31 (Comp. 31) を見出した。

第 2 章 がん細胞における抗腫瘍効果の評価

第 1 節 急性骨髄性白血病細胞に対する抗腫瘍効果

前章で開発した Comp. 31 を用いて、Wnt/ β -catenin 経路の異常が数多く報告されている急性骨髄性白血病 (AML: acute myelogenous leukemia) に対しての抗腫瘍効果を検討した。実験には、ヒト AML 細胞株 (U937, KG1a, HL-60) を用いた。Comp. 31 は、各細胞の増殖を用量依存的に抑制した。さらに、細胞周期を G₁ 期で停止し、アポトーシスを強く誘導した。次に細胞死メカニズムの解析にあ

たり、Wnt/ β -catenin 経路阻害による細胞死との関連が報告されている ROS (Reactive Oxygen Species) に着目した。フローサイトメトリー法により ROS 検出試薬 (CM-H2DCFDA) を用いて ROS 産生を評価したところ、control 群および Wnt/ β -catenin 経路阻害薬 ICG001 処置群と比して Comp. 31 処置群において ROS 産生が亢進していることを見出した。また抗酸化剤である N-acetyl cysteine (NAC) との併用により細胞増殖抑制および死細胞の増加が一部解除された。これらの結果より、Comp. 31 による AML 細胞株の細胞増殖抑制および細胞死誘導に、ROS が部分的に関与していることが示唆された。次に、Comp. 31 による Wnt/ β -catenin 経路関連遺伝子の発現変化を、qRT-PCR 法およびウエスタンブロッティング法によって確認したところ、*CTNNB1* (β -catenin)、*C-MYC*、*SURVIVIN* などのタンパク質および mRNA 発現が低下していた。さらに、AML の治療で広く用いられているアントラサイクリン系抗がん剤であるイダルビシンと Comp. 31 との併用効果を検討した。2 剤併用処置により相乗的に増殖を阻害した。以上の結果より Comp. 31 は *CTNNB1* mRNA の発現を抑制し、Wnt/ β -catenin 経路を阻害することで、細胞増殖抑制・細胞周期停止・アポトーシス誘導をもたらすことを明らかにした。

第 2 節 大腸がん細胞に対する抗腫瘍効果

大腸がん患者のうち約 8 割に APC (adenomatous polyposis coli) の変異が認められ、Wnt/ β -catenin 経路の異常な活性化の関与が多く報告されている。そこで Wnt/ β -catenin 経路への依存性が高い大腸がん細胞に対して Comp. 31 における抗腫瘍効果を検討した。まず、Super TOP flash プラスミドを導入したヒト大腸がん細胞株を用いて TCF ルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、Comp. 31 は濃度依存的な TCF 活性阻害効果を有していた。次に、細胞増殖抑制効果を検討した。Wnt/ β -catenin 経路依存性のヒト大腸がん細胞株 HT29 に対し、濃度依存的な増殖抑制を示した。一方、Wnt/ β -catenin 経路非依存性のヒト大腸がん細胞株 RKO に対しては、HT29 細胞に比して低い細胞増殖抑制効果を示した。以上の結果より、Comp. 31 は Wnt/ β -catenin 経路を特異的に抑制している可能性が示唆された。さらに、*CTNNB1* mRNA の発現を抑制し、Wnt/ β -catenin 経路関連遺伝子の発現を抑制していることを明らかとした。以上より、Comp. 31 は大腸がん細胞に対して Wnt/ β -catenin 経路を抑制し、抗腫瘍効果を発揮することを明らかとした。

総括

本研究では京都薬科大学薬品化学分野が創製した化合物から既存の ICG001 よりも強い TCF 阻害活性を示したジペプチド型 Wnt/ β -catenin 経路阻害薬 Comp. 31 を見出した。本化合物は AML 細胞株と大腸がん細胞株に対する細胞増殖抑制効果とアポトーシス誘導効果を示し、さらに Wnt/ β -catenin 関連遺伝子の発現を抑制した。本研究の研究成果はこれまで難治性腫瘍とされてきた Wnt/ β -catenin 経路活性化腫瘍に対して、治療効果を期待できる治療薬創出につながる知見である。

本論文は以下の報告の内容を総括したものである。なお、図の転載については出版社より許可を得ている。また本論文は、一部、未発表データも含んでいる。

- 1) Ryosuke Wakabayashi, Yasunao Hattori, Shigekuni Hosogi, Yuki Toda, Kazuyuki Takata, Eishi Ashihara. A novel dipeptide type inhibitor of the Wnt/ β -catenin pathway suppresses proliferation of acute myelogenous leukemia cells: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, 535, 73-79. [第1章、第2章]. Copyright Elsevier

目次

略語一覧

序論.....	1
第1章 Wnt/ β -catenin 経路阻害薬候補化合物の探索	
第1節 緒言	4
第2節 実験方法.....	6
第3節 実験結果.....	8
第4節 考察.....	15
第2章 がん細胞における抗腫瘍効果の評価	
第1節 急性骨髄性白血病に対する抗腫瘍効果	
第1項 緒言	17
第2項 実験方法.....	18
第3項 実験結果.....	22
第4項 考察.....	35
第2節 大腸がんに対する抗腫瘍効果	
第1項 緒言	38
第2項 実験方法	39
第3項 実験結果.....	41
第4項 考察.....	45
総括.....	47
謝辞.....	49
参考文献.....	50
Supplemental data.....	56

略語一覽表

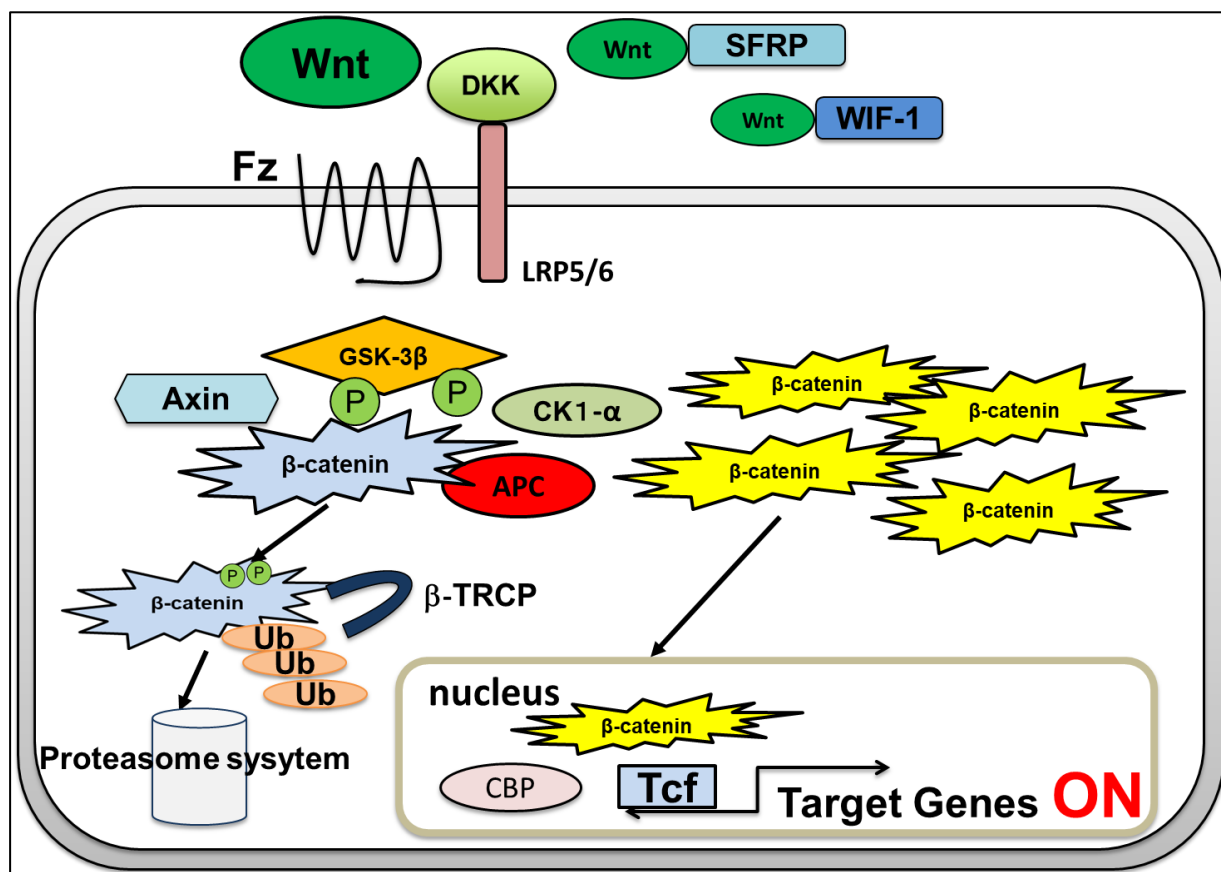
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
Ab	antibody
Ac	acetyl
AML	acute myelogenous leukemia
APC	adenomatous polyposis coli
ATCC	american type culture collection
Boc	<i>t</i> -butoxycarbonyl
BOP	(benzotriazol-1-yl-oxo)-tris(dimethylamino)phosphonium hexafluorophosphate
BSA	albumin, from bovine serum
β-TRCP	β-transducin repeat containing protein
CDK	Cyclin-dependent kinase
CK1α	casein kinase α
CM-H2DCF-DA	5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester
CML	chronic myelogenous leukemia
CI	combination index
CBP	c-AMP response element binding protein-binding protein
Comp.	compound (s)
COMU	(1-cyano-2-ethoxy-2-oxoethylideneaminoxy)dimethylamino-morpholino-carbenium hexafluorophosphate
DCF	2',7'-dichlorodihydrofluorescein
DIBAL-H	diisobutylaluminum hydride
DKK	dickkopf
DMAP	4-dimethylaminopyridine
Et	ethyl
Fa	fraction affected
FBS	fetal bovine serum
Fmoc	fluorenylmethoxycarbonyl
FOXO	Forkhead box O
Fz	Frizzled
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GSK-3β	glycogen synthase kinase 3β
h	hour(s)
His	histidine
HRMS	high resolution mass spectrometry
Hygr	hygromycin
IC ₅₀	inhibitory concentration of 50%
IDR	idarubicin
LRP5/6	low-density lipoprotein receptor-related protein

LSC	leukemia stem cell
Luc	luciferase
Me	methyl
min	minute(s)
NFDM	non-fat dry milk
NMM	<i>N</i> -methylnorpholine
NMR	nuclear magnetic resonance
P	phosphorylation
PBS	phosphate-buffered saline
PCP	planar cell polarity
PI	propidium iodide
PTLC	preparative thin layer chromatography
PVDF	poly vinylidene di fluoride
qRT-PCR	quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction
RIPA	radioimmuno precipitation assay
ROS	reactive oxygen species
Sam68	Src associated in mitosis, 68 kDa
SARS 3CL ^{pro}	severe acute respiratory syndrome chymotrypsin-like protease
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	standard error of the mean
SFRP	secreted frizzled-related protein
TBDPS	<i>t</i> -butyldiphenylsilyl
TCF/LEF	T cell factor/Lymphocyte enhancing factor
TLC	thin layer chromatography
Trt	trityl
Ub	ubiquitination
WIF-1	Wnt inhibitory factor

序論

がんは本邦で死因第1位の疾患であり2019年1年間における死亡数が37万人以上と増加している。そして生涯のうち2人に1人が罹患を経験し、3人に1人が、がんで死亡するという誰しもが罹患するリスクの高い疾患である¹。がん治療は近年グリベック（イマチニブ）²をはじめとした分子標的薬の登場や、免疫チェックポイント阻害剤オプジーボ（ニボルマブ）³の登場により飛躍的な治療成績の向上を遂げている。しかし未だにがん種や臨床病期によっては予後不良のものもあり、さらなる治療薬の開発が待ち望まれている。

Wntは約350~400のアミノ酸で構成される分泌性の糖タンパク質である⁴。1980年代に乳がんの原因遺伝子Int-1が単離され、ショウジョウバエの遺伝学的解析から分節極性遺伝子として同定されていたWinglessと高い相同性を示したことからWnt-1と名付けられた⁵。これがWntシグナルの研究の最初である。Wntシグナル伝達経路には3種類の経路が明らかになっている。古典的な β -catenin経路と β -cateninに依存しないPCP（planar cell polarity）経路⁶、 Ca^{2+} 経路⁷である。

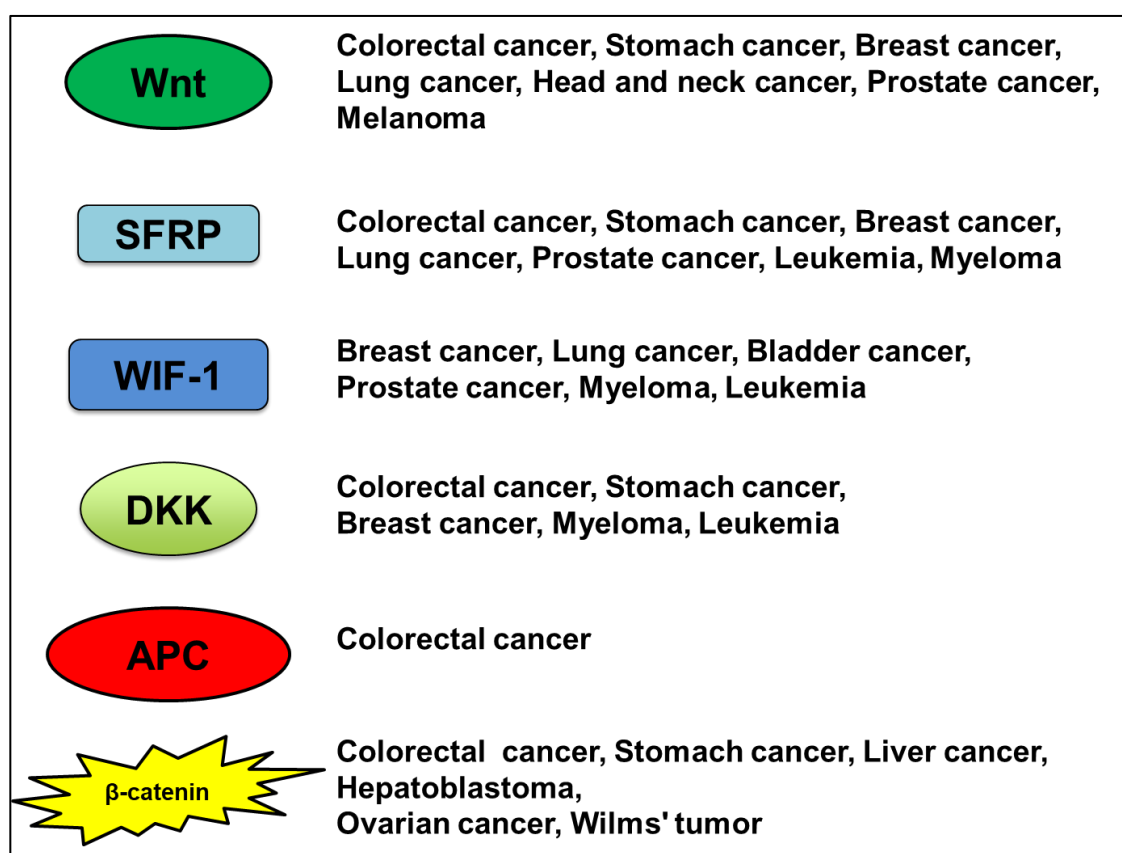


Schema 1. Wnt/ β -catenin signaling pathway

Ub: ubiquitination, P: phosphorylation

Wnt/ β -catenin経路は、胚発生、幹細胞分化調節、骨形成、細胞増殖などに関与するシグナル伝達経路である^{8,9}。リガンドであるWntタンパク質の非存在下では、APC（adenomatous polyposis coli）¹⁰、GSK-3 β （glycogen synthase kinase-3 β ）¹¹、CK1 α （casein kinase α ）¹²、Axin¹³などの β -cateninのリン酸化に関わる分子が複合体を形成して β -cateninをリン酸化し、ユビキチンリガーゼである β -TRCP（ β -

transducin repeat containing protein)¹⁴ がリン酸化β-catenin をポリユビキチン化し、プロテアソーム系での分解へ導く¹⁵。その結果、細胞周期調節や細胞発生に関わる下流遺伝子の転写は抑制される。一方、Wnt タンパク質存在下では、Wnt タンパク質が細胞膜に存在する 7 回膜貫通型受容体である Frizzled (Fz) 受容体¹⁶ および 1 回膜貫通型受容体の LRP5/6 (low-density lipoprotein receptor-related protein) 共受容体¹⁷ に結合し、Disheveled¹⁸ のリン酸化を誘導することで GSK-3βを介したβ-catenin のリン酸化を妨げ、β-catenin は分解されずに安定化し細胞質内で蓄積する。その後、核内に移行し、転写因子である TCF/LEF (T cell factor/Lymphocyte enhancing factor) と結合し、標的遺伝子である *CCND1*¹⁹ や *c-MYC*²⁰ 等の遺伝子の転写を促進する (Schema 1)。β-catenin は E-cadherin の裏打ちタンパク質としての細胞接着に関わる機能も有しているが²¹、細胞質内で蓄積することで核内へ移行し転写翻訳を活性化するエフェクター分子としての機能も持ち合わせている²²。



Schema 2. Relationship between Wnt/β-catenin signaling pathway and various cancer types

この 30 年間で Wnt シグナル伝達のメカニズムは解明されつつあり、この経路の異常な活性化は、さまざまな悪性腫瘍の病態生理に深く関与しており^{8,23}、がんに対して有用な治療標的になりうることが示唆されてきた (Schema 2)。またこの Wnt/β-catenin 経路はがん幹細胞の発生・維持に関わっていることがよく知られている。特に白血病幹細胞 (Leukemic stem cell: LSC) における Wnt/β-catenin 経路の役割に関する研究が盛んに行われてきた。白血病治療において既存の抗がん剤に対する耐性化や、再発率が依然高いということが臨床現場では重要な課題となっている。その原因の一つとしてあげられるのが LSC の存在である²⁴⁻²⁶。LSC は細胞周期の静止状態にあり、抗がん剤に対する感受性が低

い²⁶。LSCの本態を明らかにし、LSC維持の鍵となる分子を標的とした治療法を開発することが、白血病を根治に導く治療法の確立につながると期待されている²⁷。LSCの維持・自己複製に重要な役割を果たしているシグナルの一つとしてWnt/ β -cateninシグナル経路がある²⁸。これまでの研究で急性骨髄性白血病(acute myelogenous leukemia: AML)や慢性骨髄性白血病(chronic myelogenous leukemia: CML)におけるLSC発生・維持とWnt/ β -catenin経路の関りや、Wnt/ β -cateninを標的とすることが白血病幹細胞に対して有用であることが示唆されている^{29,30}。

また従来の化学療法や放射線療法に対する耐性にWnt/ β -catenin経路が関わっていることが報告されており³¹、本経路を阻害する薬剤の開発成功により臨床現場におけるさまざまな問題が解決されることが期待される。

本研究の目的は、より効果が高いWnt/ β -catenin経路阻害薬を開発し臨床現場に新たな治療の選択肢を提案することである。そのために京都薬科大学の薬品化学分野で合成された化合物を用いて新規阻害薬の探索研究を行っていくこととした。

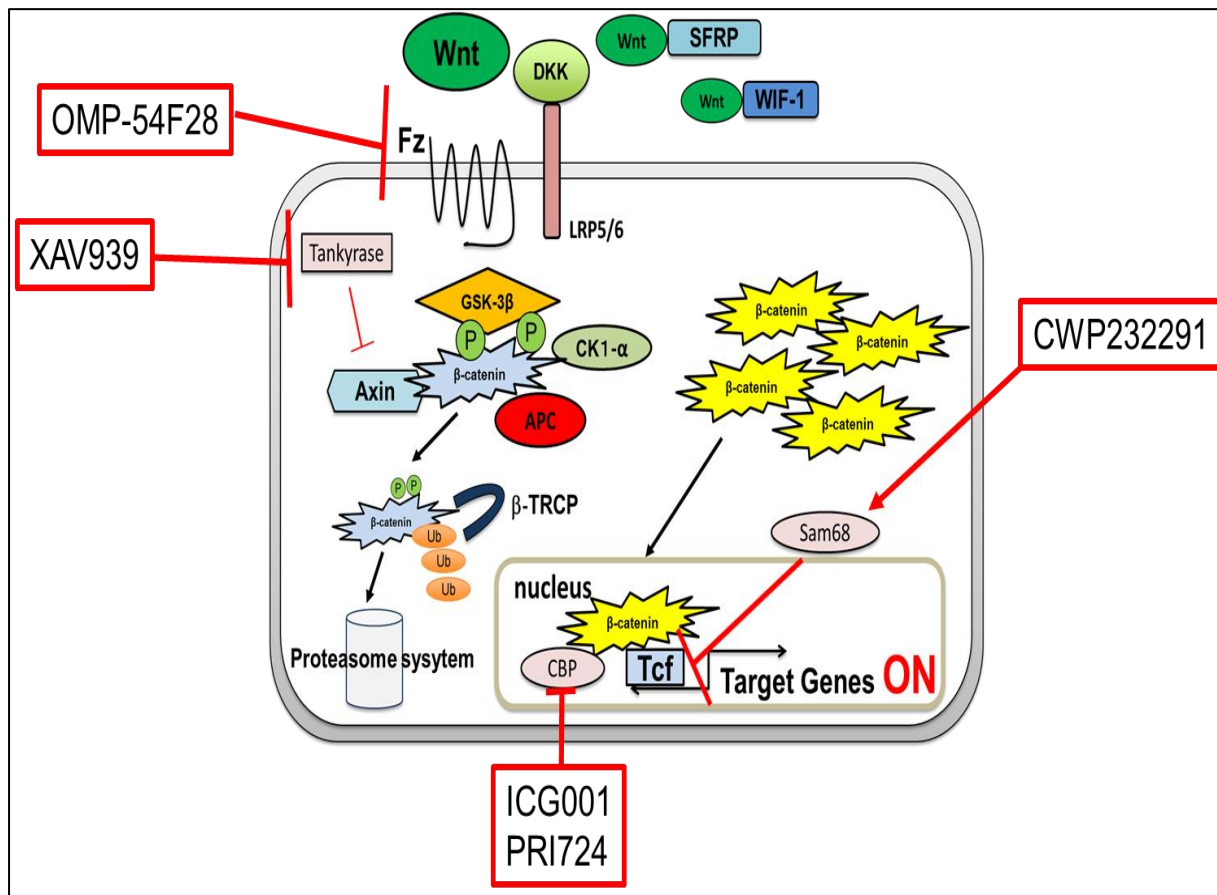
第1章では、Wnt/ β -catenin経路阻害薬を探索するため、ヒト胎児腎細胞HEK293細胞にSuper TOP flashプラスミドを導入したTOP細胞を作製し、TCF (T-cell factor) ルシフェラーゼレポーターアッセイでのTCF-Luciferase (Luc) 活性を指標としたスクリーニング系の確立と既知の阻害薬ICG001との構造類似性に基づき選択した合成化合物を用いたWnt/ β -catenin経路阻害活性を有する化合物の探索について論じた。

第2章では、前章で有効性を確認した化合物を用いて、Wnt/ β -catenin経路の異常が数多く報告されているAMLならびに約80%にAPCの変異が認められ、Wnt/ β -catenin経路の異常な活性化の関与が多く報告されている大腸がん細胞株に対する抗腫瘍効果の検討について論じた。

第1章 Wnt/ β -catenin 経路阻害薬候補化合物の探索

第1節 緒言

Wnt/ β -catenin 経路はさまざまながん種でその異常が報告され、新たな治療標的としてこれまで本経路を標的とする薬剤の開発が世界で行われてきた³² (Schema 3)。



Schema 3. Drugs that have been developed targeting Wnt/ β -catenin pathway

代表的な化合物として Emami K. H. らによって開発された ICG001 が挙げられる³³。ICG001 は転写コアクチベーターである CBP (c-AMP response element binding protein - binding protein) と結合することで CBP と β -catenin の結合を阻害し、 β -catenin/TCF シグナルを抑制する。現在 ICG001 第2世代の PRI724 が米国および日本で臨床試験が進行中である。また XAV939 は Axin のユビキチン化を促進するタンキラーゼを阻害することで Axin の活性化し、Wnt/ β -catenin シグナルを抑制する³⁴。CWP232291 は TCF-1 の選択的スプライシングを調節する RNA 結合タンパク質 Sam68 (Src associated in mitosis, 68 kDa)³⁵ に結合することで Wnt/ β -catenin シグナルを抑制する化合物である³⁶。去勢抵抗性の前立腺がんに対して抗腫瘍効果を示し³⁷、現在米国で白血病に対する臨床試験も行われている。また OMP-54F28 は Wnt タンパク質と Fz 受容体との結合を競合的に阻害する作用を持ち³⁸、現在米国で固形腫瘍に対する臨床試験が進められている³⁹。このように Wnt/ β -catenin 経路を標的とした様々な治療薬が今日まで開発されている。しかし現在までに臨床試験を通過し臨床で実用化されている薬剤は存在していない。そこで Wnt/ β -catenin 阻害薬としてより効果がある新たな薬剤の開発を目的に研究を着手した。

まずヒト胎児腎細胞 HEK293 細胞に Super TOP flash プラスミドを導入した細胞を作製した (以下 TOP 細胞)。この TOP 細胞を用いて TCF ルシフェラーゼレポーターアッセイでの TCF-Luc 活性を指標としたスクリーニングを可能とした。

京都薬科大学の薬品化学分野で合成された化合物の中から、Wnt/ β -catenin 経路阻害薬を探索した。既存の Wnt/ β -catenin 経路阻害薬として ICG001³³ と構造類似性がある SARS 3CL^{pro} 阻害剤合成中間体^{40,41} を用いてスクリーニングを行った。

第2節 実験方法

1. TOP/FOP 細胞作製

ルシフェラーゼの上流に TCF/LEF 結合部位を含む TOP flash レポーターを最初に確立した。M50 Super TOP Flash (Addgene, Cambridge, MA, U. S. A) と pGL4.32 [luc2P/NF- κ B-RE/Hygr (Hygromycin)] Vector (Promega, Madison, WI, U. S. A) から、制限酵素 (BamHI と SalI) (タカラバイオ、草津、日本) を用いて、p.M50 Super 8 x TOP Flash - Hygr - Resistance vector を挿入し、Super TOP flash plasmid を作製した。同様の方法で TCF binding site に変異がある M51 Super FOP Flash (Addgene) を用いて Super FOP flash plasmid を作製した。次に、Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U. S. A) と FuGENE[®] HD Transfection Reagent (Promega, Madison, WI, U. S. A) を用いて HEK293 細胞 (American Type Culture Collection; ATCC, Manassas, VA, U. S. A) に Super TOP flash plasmid および Super FOP flash plasmid をトランスフェクションした (TOP トランスフェクション細胞および FOP トランスフェクション細胞)。TOP および FOP のトランスフェクション細胞を Hygr (FUJIFILM 和光純薬、大阪、日本) 入り D-MEM Low-Glucose (L-グルタミン、フェノールレッド含有) (FUJIFILM 和光純薬) で培養し、セレクションを行った。これらのトランスフェクション細胞を 96 ウェルプレート (Corning, NY, U. S. A.) に 1 cell/ウェルになるように播種し、クローニング後、安定発現細胞を採取した。

2. Wnt3A 細胞作製

L-Wnt-3A 細胞 (ATCC) は、活性 Wnt-3A タンパク質を分泌する培地の調製に使用した。L-Wnt-3A 細胞は、10%非働化ウシ胎児血清 (fetal bovine serum: FBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U. S. A)、1% ペニシリン-ストレプトマイシン (100 units/mL ペニシリンおよび 100 μ g/mL ストレプトマイシン) (FUJIFILM 和光純薬)、および 0.4 mg/mL G418 (FUJIFILM 和光純薬) を含む D-MEM Low - Glucose で培養した。上清は以下の方法で調整した。L-Wnt-3A 細胞を 1.25×10^6 cells/dish で播種し、G418 を含まない培地で培養した。コンフルエントになる培養 3 日間後、培養上清を 0.22 μ m シリンジフィルター (Merck Millipore, Burlington, MA, U. S. A) で回収し、使用するまで -80°C で保存した。

3. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

TCF-Luc 転写活性は、ルシフェラーゼレポーターアッセイを使用して測定した。PBS (phosphate buffered saline) で剥離して TOP 細胞および FOP 細胞を回収し、遠心分離後、Wnt タンパク質の含有の培養上清を混和した。細胞を 96 ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific) に 5×10^4 cells/well で播種した。24 時間後各化合物を添加し、混合物を 24 時間インキュベートした。次に、細胞溶解試薬 (Table 1) をプレートの各ウェルに添加し、プレートを 30 分間穏やかに振とうし、細胞を溶解した。細胞溶解物 (100 μ L) をポリスチレン 96 ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific) に移した。発光試薬 (Table 2) をウェルに添加し、マイクロプレートリーダー (GloMax[®], Promega) を使用して発光を測定した。

Reagent name	Concentration
Tris-HCl (pH7.8) (Thermo Fisher Scientific)	25 mM
DTT (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries)	2 mM
CDTA (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries)	2 mM
Glycerin (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries)	10%
Triton X (NACALAI TESQUE, INC., Kyoto, Japan)	1%

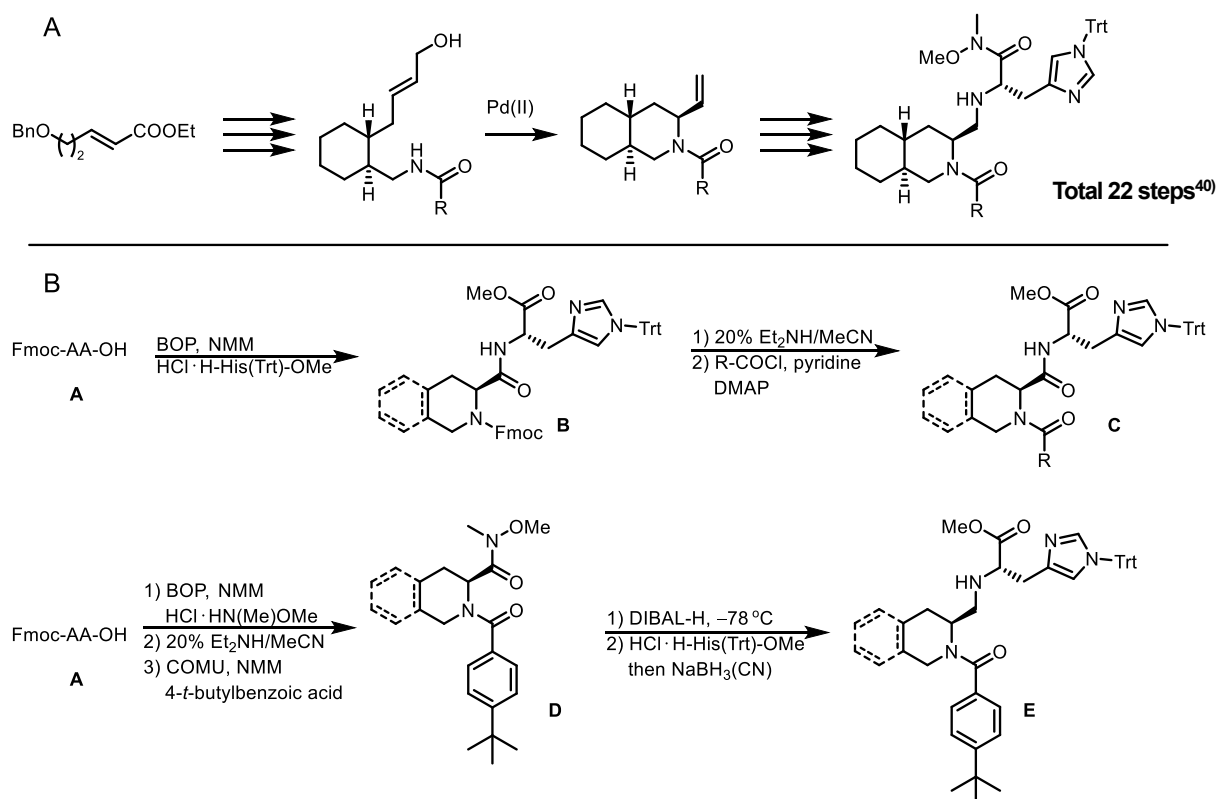
Table 1. Composition of cell lysing reagent used in this study

Reagent name	Concentration (mM)
Tricine-NaOH (pH 7.8) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries)	14.3
Magnesium carbonate hydroxide penta-hydrate (Sigma-Aldrich)	0.8
Magnesium sulfate (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries)	1.9
0.5M EDTA (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries)	0.1
DTT (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries)	23.8
Acetyl-CoA (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries)	0.2
D-luciferin K (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries)	0.3
ATP (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries)	0.4

Table 2. Composition of luminescence reagent used in this study

4. 候補化合物の合成

Comp. **1-23** は以前の報告に従って合成し、Comp. **25-31** は新たに合成した^{40,41}。Comp. **24** は渡辺化学工業株式会社（広島、日本）から購入した。合成方法の詳細は、サプリメントに記載している。



Schema 4. Synthetic routes for inhibitors. (A) Outline of synthetic route for intermediates of decahydroisoquinoline type SARS 3CL^{pro} inhibitors (Comp. **1-23**). (B) Synthetic routes for dipeptide type inhibitors (Comp. **25-31**).

第3節 実験結果

1. ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いた TCF 阻害化合物の探索

既知の Wnt/ β -catenin 経路阻害薬である ICG001 をポジティブコントロールとして使用し、Wnt/ β -catenin 経路を標的とする新薬候補を検索するためにスクリーニングを実施した。第1章において、合計 31 種の化合物を用いて TCF ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。アッセイの対象化合物は ICG001 との構造類似性に基づいて、デカヒドロイソキノリン型 SARS 3CL^{pro} 阻害剤合成中間体を京都薬科大学薬品化学分野の化合物ライブラリーから候補化合物として選択した。

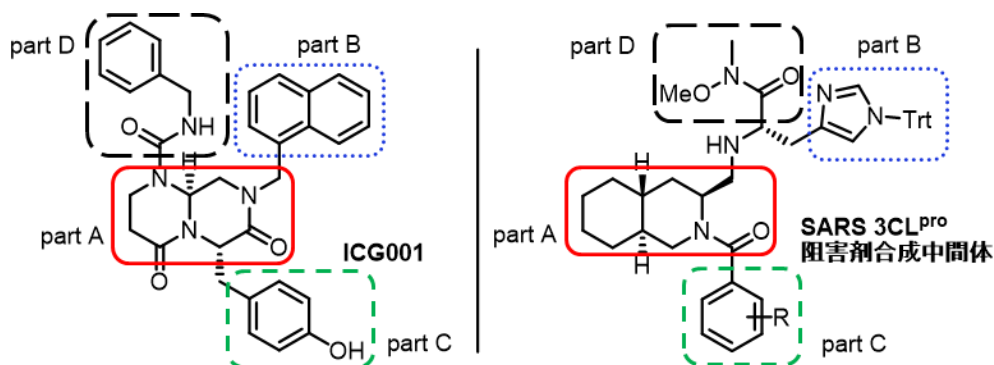
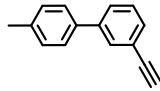


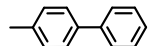
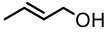
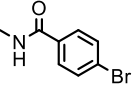
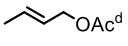

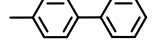
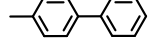
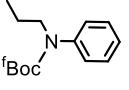
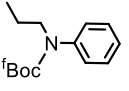
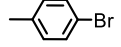
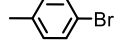
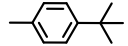


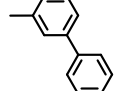
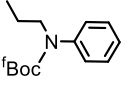


Figure 1. Structure of ICG001 and synthetic intermediates of SARS 3CL^{pro} inhibitors.

デカヒドロイソキノリン型 SARS 3CL^{pro} 阻害剤合成中間体の構造とスクリーニング結果を Table 3 と 4 に示した。23 化合物について TCF ルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、12 化合物が ICG001 を上回る良好な活性を示した。Table 3 および Table 4 における Inhibitory activity の数値はネガティブコントロールを 100 としたときのルシフェラーゼレポーターアッセイの発光強度比を示す。

Compound	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Inhibitory activity (%)	
					10 μ M	30 μ M
1-5, 12, 14, 16, 18, 19, 21						
6, 22, 23 ^a						
7-9						
10, 11 ^b						
13, 15, 17, 20						
1		Trt ^c			16.1	0.01
2		H			114	120

Table 3. Structure of test compounds (Comp. 1 and 2) and screening results of the luciferase assay using TOP cells. Inhibitory activity represents the luminescence intensity ratio of the luciferase reporter assay when the negative control is 100%.

Compound	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Inhibitory activity (%)	
					10 μM	30 μM
3		Trt ^c			137	176
4		H			101	111
5		H			103	115
6					94	104
7					129	99
8				-OH	87	90
9				-OTBDPS ^e	81	68
10					121	174
11 ^a					105	120
12		Trt ^c			32	6.0
13		Trt ^c			19	0.21
14		Trt ^c			44	0.2
15		Trt ^c			59	0.07
16		Trt ^c			60	0.5
17		Trt ^c			41	0.01
18		Trt ^c			36	0.02
19		Trt ^c			96	14
20		Trt ^c			60	0.7
21	-CH ₃	Trt ^c			85	0.03
22					146	109
23 ^b					68	35

^aComp. 11 is enantiomer of Comp. 10; ^bComp. 23 is racemate; ^ctriphenylmethyl (trityl); ^dacetyl; ^e*t*-butyldiphenylsilyl; ^f*t*-butoxycarbonyl

Table 4. Structure of test compounds (Comp. **3-23**) and screening results of the luciferase assay using TOP cells. TOP cells were treated with compounds (10 μ M, 30 μ M) for 24 h, and then TCF-Luc activity was measured. Inhibitory activity represents the luminescence intensity ratio of the luciferase reporter assay when the negative control is 100%.

しかしながら、これらのデカヒドロイソキノリン型 SARS 3CL^{pro} 阻害剤合成中間体は合成に最長 22 もの工程を要し⁴⁰、化合物供給の面での課題がある (Schema 4A)。そのため、合成が簡便であり多様な原料を容易に利用可能なジペプチド型阻害薬を SARS 3CL^{pro} 阻害剤合成中間体を基に新たに設計した (Figure 2)。今回、設計したジペプチド型阻害薬は最短 3 段階、最長でも 5 段階で合成可能であり合成工程の大幅な短縮を実現した (Schema 4B)。これらの合成経路を用いてジペプチド型阻害薬の合成を行い、合成した化合物の評価を行うこととした。

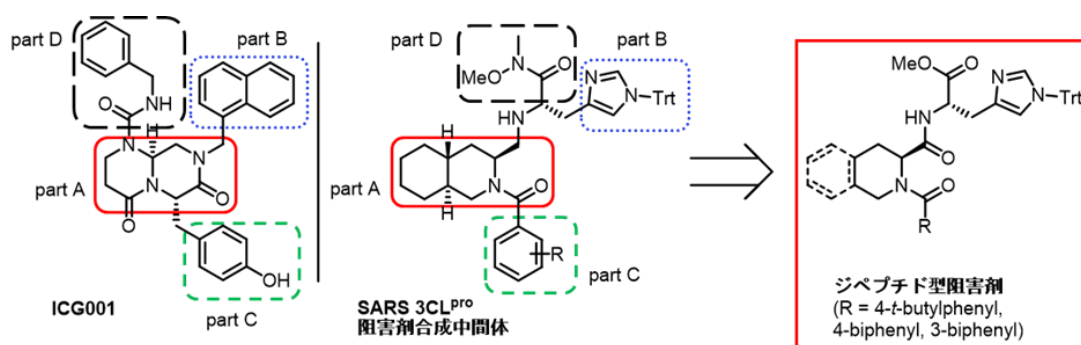
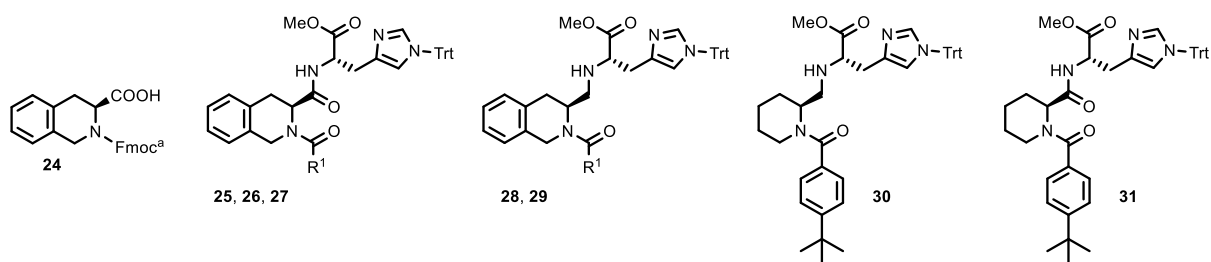


Figure 2. Design of the dipeptide type inhibitor via synthetic intermediates of SARS 3CL^{pro} inhibitors.

8 種類のジペプチド型阻害薬について TCF ルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、Comp. 31 が ICG001 を上回る良好な活性を示した (Table 5)。さらに Comp. 31 は濃度依存的に TCF-Luc の活性を阻害することも確認された (Figure 3)。また変異型の TCF binding site をもつ Super FOP plasmid を HEK293 細胞に導入して作製した FOP 細胞を用いて、ルシフェラーゼレポーターアッセイを実施したところ、TCF-Luc の活性阻害率は TOP 細胞に比して低い結果であった。



Compound	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Inhibitory activity (%)	
					10 μ M	30 μ M
24					154	156
25					58	61
26					56	64
27					50	52
28					69	68
29					103	108
30					80	68
31					59	14

^afluorenylmethoxycarbonyl

Table 5. Structure of test compounds (Comp. **24-31**) and screening results of the luciferase assay using TOP cells. TOP cells were treated with compounds (10 μ M, 30 μ M) for 24 h, and then TCF-Luc activity was measured. Inhibitory activity represents the luminescence intensity ratio of the luciferase reporter assay when the negative control is 100%.

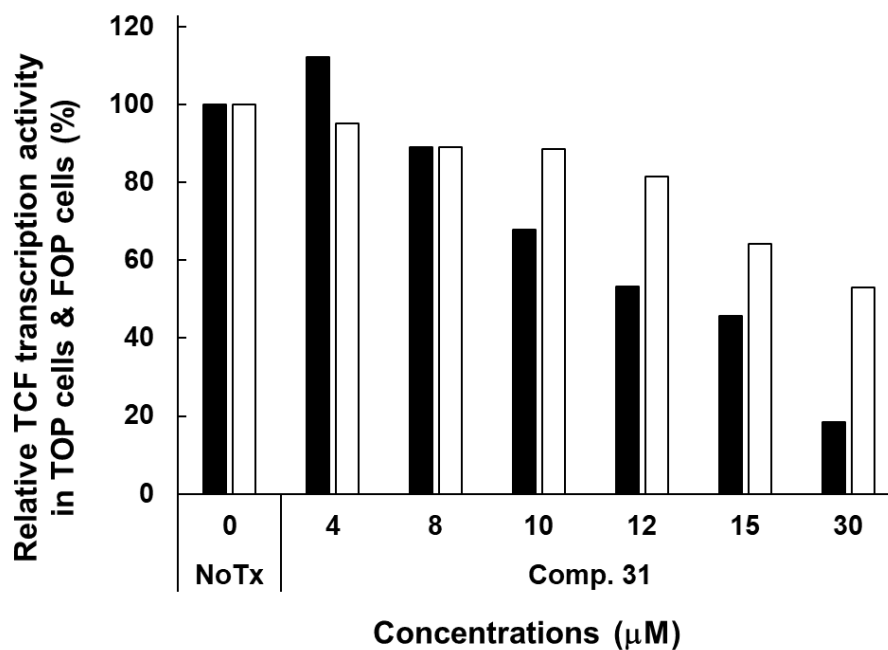


Figure 3. Comp. **31** diminished TCF-Luc activity in a dose-dependent manner. FOP cells have a mutant TCF binding region. No Tx indicates treatment with DMSO as a solvent control. Wakabayashi R. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, 535, 73-79, Fig. 1D. The figure was partially modified.

第4節 考察

Wnt/ β -catenin 経路は抗がん剤の魅力的な標的として認識されていたため、この経路を標的とするさまざまな阻害薬が開発されてきた^{33,34,42,43}。しかし、現在までに Wnt/ β -catenin 経路を標的とした治療薬で、承認されたものは存在しない。

既知の Wnt/ β -catenin 経路阻害薬である ICG001 との構造類似性に基づいて、京都薬科大学薬品化学分野で合成された化合物群の中からデカヒドロイソキノリン型 SARS 3CL^{pro} 阻害剤合成中間体^{40,41} を候補として選択した。Figure 1 に示すように、デカヒドロイソキノリン型 SARS 3CL^{pro} 阻害剤合成中間体は、ICG001 と同様に縮環型の中心骨格 (part A) を有する。また、ICG001 は中心骨格上に2つの疎水性芳香族置換基 (part B および part C) を持っているが、これらの部分構造はデカヒドロイソキノリン型 SARS 3CL^{pro} 阻害剤合成中間体のヒスチジン部分 (part B) とアミド置換基 (part C) で代替可能と考えた。ICG001 のウレア部分 (part D) はデカヒドロイソキノリン型 SARS 3CL^{pro} 阻害剤合成中間体の Weinreb アミド部分に相当するが、part D は Emami K. H.らの報告³³ から活性発現に重要ではないと判断した。

Table 3 および Table 4 に示した通り、デカヒドロイソキノリン型 SARS 3CL^{pro} 阻害剤合成中間体のスクリーニング結果から、構造活性相関についての情報が得られた。まず、part A と part C のみの場合や part A が単純な二置換シクロヘキサン環の Comp. 6-11 と 22、23 は不活性である。次に、中心骨格の part A における立体化学は活性に明確な影響を示さなかった (Comp. 12 と 14、16、19 vs Comp. 13 と 15、17、20)。その一方、part B の嵩高い Trt 基は、活性発現に不可欠であり (Comp. 1 vs Comp. 2)、part C のアミド置換基が変わっても同様である (Comp. 4 と 5)。また、part C のアミド置換基として、メチル基のような小さなものから二つのメチレン鎖を介した Boc 保護アニリンや *t*-ブチルフェニル基、ピフェニル基までは許容されるが、ピフェニル基がさらに置換されると阻害活性が失われることを明らかにした。(Comp. 3 vs Comp. 1 と 12-21)。

これらの中間体は ICG001 を上回る良好な活性を示したが、Schema 4A に示した通り合成に長い工程を要し、合成困難なため化合物供給において課題がある⁴⁰。現状において、中心骨格の part A に縮環構造が必要かどうかや part B のアミノ酸誘導体の最適構造は不明なままである。そのため、さらなる構造最適化が必要であるが、先述の通り有望なスクリーニング結果を示したデカヒドロイソキノリン型 SARS 3CL^{pro} 阻害剤合成中間体は合成困難であるため種々の誘導体合成に不向きである。従って、これらの課題を解決するために、合成が容易で多様なアミノ酸誘導体を利用可能なジペプチド型化合物を SARS 3CL^{pro} 阻害剤合成中間体を基に新たに設計し、合成と評価を行った (Figure 2 および Schema 4B)。

8種類のジペプチド型阻害薬を評価した結果、デカヒドロイソキノリン型 SARS 3CL^{pro} 阻害剤合成中間体にもっとも近い構造を有するテトラヒドロイソキノリン型では濃度依存性が見られなかった (Comp. 24-29)。また、ピペリジンアミノメチル型よりもピペリジンアミド型の方が良い活性を示した (Comp. 30 vs Comp. 31)。Comp. 31 は 30 μ M において ICG001 よりも強い TCF-Luc 阻害活性を示した。また変異型の TCF binding site をもつ Super FOP plasmid を HEK293 細胞に導入して作製した FOP 細胞を用いた解析も合わせて行った。偽陽性の化合物であった場合、FOP 細胞での TCF-Luc 活性を抑制し、非特異的な阻害効果を有すると判定される⁴⁴。TOP 細胞と FOP 細胞の TCF-Luc 活性の阻害率を比較解析した結果、FOP 細胞での TCF-Luc 活性の低下は小さいものであった。この結果から Comp.

31 が特異的に Wnt/ β -catenin の TCF-Luc 活性を抑制していることが示唆された。

これらの結果から、デカヒドロイソキノリン型 SARS3CL^{pro} 阻害剤合成中間体を用いて得られた構造活性相関に関する情報に加えて、中心骨格 (part A) に縮環構造は必須ではなく、より単純な単環系の骨格で置換可能であることを見出した。また、ピペリジンアミノメチル型よりもピペリジンアミド型の方が適した構造であることも明らかにした。

以上のことから、今後の構造展開が容易なジペプチド型阻害薬である **Comp. 31** を最適構造とし、さらに詳細な活性発現メカニズム解析を行うこととした。

第2章 がん細胞における抗腫瘍効果の評価

第1節 急性骨髄性白血病に対する抗腫瘍効果

第1項 緒言

Wnt/ β -catenin 経路の異常が白血病の病態に関わっており、白血病細胞における β -catenin の発現量は AML 患者の予後に関連していることが報告されている⁴⁵。また Wnt 阻害タンパク質とし Wnt/ β -catenin 経路の活性調節に関わる SFRP (secreted frizzled-related protein)⁴⁶ や DKK (dickkopf)⁴⁷ 等遺伝子のプロモーターの CpG アイランドのメチル化が、AML 患者ではアップレギュレートされていることが確認されており、予後不良との関連も報告されている⁴⁸。これら Wnt 阻害タンパク質における高頻度のメチル化によって SFRP と DKK の発現が抑制され、Wnt タンパク質に直接結合し、Wnt と Fz 受容体の結合を阻害する機能を失い Wnt/ β -catenin シグナルが活性化する。そのため AML においても有望な治療標的であると考えられている⁸。

近年、AML の治療成績は造血幹細胞移植術の向上、またシタラビンとアントラサイクリン系の抗がん剤を組み合わせた多剤併用化学療法により寛解率は改善されてきている⁴⁹。しかし、既存の抗がん剤に対する耐性化の出現や、再発率が現在でも高いという問題が残されている^{49,50}。白血病の治療効果を向上させるためには、現在の標準的な治療薬とは異なり、AML 発がんの重要な経路に関与する分子を標的とする新規薬剤を開発することが重要である。

本章では AML の新規治療薬の開発のためにスクリーニング系で見出した Comp. 31 の AML 細胞に対する *in vitro* の抗腫瘍効果の検討を行った。具体的には、WST-8 アッセイを用いた化合物の細胞増殖抑制効果、フローサイトメトリー法を用いた細胞周期抑制効果、アポトーシスの誘導、ウエスタンブロットティング法および定量的リアルタイム RT-PCR (quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction: qRT-PCR) 法による Wnt 関連遺伝子 *C-MYC*、*CCND1*、*SURVIVIN* の発現変化を検討した。*C-MYC* は古くから腫瘍化に関わる遺伝子と知られ、パートナー遺伝子である *MAX* と相互作用することで転写因子として機能する⁵¹。また幹細胞維持にも関わっており、iPS 細胞誘導の初期化因子としてしても知られる⁵²。*CCND1* は CDK4 (Cyclin-dependent kinase 4) または CDK6 (Cyclin-dependent kinase 6) の調節サブユニットとして複合体を形成し、これらを活性化することで細胞周期 G1 期から S 期への移行を促進する⁵³。*SURVIVIN* は caspase 3 や caspase 7 を阻害することで、アポトーシスを抑制し細胞分裂を促進する分子であることが知られる⁵⁴。さらに、AML 治療薬として臨床で使用されているイダルビシンと Comp. 31 の併用効果についても検討した。

第2項 実験方法

1. 細胞株と試薬

AML 細胞株 (U937、KG1a および HL-60) は ATCC から入手した。これらの AML 細胞は、10%FBS (Sigma-Aldrich) と抗菌剤 (100 units/mL ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシン) (FUJIFILM 和光純薬) を含む RPMI1640 (FUJIFILM 和光純薬) で 37 °C、5 % CO₂ の環境下で培養した。Wnt/β-catenin 経路阻害薬 ICG001³³ は、フナコシ株式会社 (東京、日本) から購入した。

2. AML 細胞に対する増殖阻害効果 (WST-8 アッセイ)

細胞増殖は、Cell Count Kit-8 (DOJINDO LABORATORIES、熊本、日本) を使用し評価した。AML 細胞株 (U937、KG1a および HL-60) を 96 ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific) に、各ウェルあたり 3.0 ~ 8.0 x 10³ cells/well の密度で細胞播種し、Comp. 31 または ICG001 の段階希釈液とともに 72 時間インキュベートした。Cell Count Kit-8 試薬を各 well に 10 µL ずつ処置し、マイクロプレートリーダー (GloMax[®]、Promega) を使用して吸光度 (極大吸収波長 450 nm) を測定した。各濃度での 4 つのサンプルの平均を評価した。50%の阻害濃度 (IC₅₀) の値は、非線形回帰プログラム CalcuSyn (Biosoft、Cambridge、UK) を使用して算出した。

3. 細胞周期解析

細胞周期解析はヨウ化プロピジウム (Propidium Iodide: PI) 染色によりフローサイトメトリー法を使用して評価した。AML 細胞株 U937、KG1a を 3.0 ~ 8.0 x 10⁴ cells/mL の濃度で 70 mL フラスコに播種して 3 時間インキュベートし、Comp. 31 および ICG001 を処置した。24 時間後細胞を回収し、遠心後 PBS で洗浄した。さらに遠心し上清を捨てた後、-20°C で冷却した 70%エタノールで細胞固定し、-20°C 冷凍庫で保存した。エタノールを取り除いた後 PI 20 µg/mL (フナコシ)、RNase 100 µg/mL (Sigma-Aldrich) を含む PBS にて染色後、BD FACS Diva TM ソフトウェア (Becton Dickinson、Franklin Lakes、NJ、U. S. A) を使用して FACS Fortessa を用いて解析した。結果は FlowJo ソフトウェア (Becton Dickinson) を用いてデータ分析した。

4. アポトーシス解析

化合物により誘導されるアポトーシスの解析は、Annexin-V-FITC アポトーシス検出キット (Thermo Fisher Scientific) を使用して解析を行った。AML 細胞株 U937、KG1a を 3.0 ~ 8.0 x 10⁴ cells/mL で播種後、Comp.31 または ICG001 を処置し 72 時間インキュベートした。細胞を回収し PBS で洗浄後、Annexin V Binding Buffer を加え、Annexin V、PI (20 µg/mL) にて染色し、15 分遮光下でインキュベートし、1 時間以内に FACS Fortessa を用いて解析を行った。細胞は、細胞周期解析同様 BD FACS Diva TM ソフトウェア (Becton Dickinson) を使用して FACS Fortessa で分析し、FlowJo ソフトウェア (Becton Dickinson) を用いてデータを分析した。

5. ROS 産生の測定

細胞内 ROS (reactive oxygen species) の産生を、CM-H2DCF-DA (5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester) (Thermo Fisher Scientific) を利用したフローサイトメトリー法により測定した。U937 細胞を 70 mL フラスコに 5.0×10^4 cells/mL で播種し、次に Comp. 31 または ICG001 を処置し 48 時間インキュベートした。その後細胞を回収し PBS で二回洗浄した後、 $10 \mu\text{M}$ CM-H2DCF-DA で 37°C 、45 分間暗所で染色した。7-AAD (7-Aminoactinomycin D) (FUJIFILM 和光純薬工業) で 10 分染色後細胞を収集し、DCF (2',7'-dichlorodihydrofluorescein) 蛍光を FACS Fortessa フローサイトメーター (BD Biosciences) で分析した。

6. NAC 併用による Comp. 31 における細胞死メカニズムの検討

6.1. 細胞増殖解析

抗酸化剤 NAC (N-acetyl cysteine) と Comp. 31 の併用処置による細胞増殖抑制効果の検討について WST-8 アッセイを用いて行った。AML 細胞株 U937 を 5.0×10^3 cells/well ずつ 96 ウェルプレートに播種し、①薬物未処置群 (2% DMSO 含有 RPMI1640)、②NAC 単独処置群、③Comp. 31 単独処置群、④NAC + Comp. 31 併用処置群を作製した。NAC は細胞播種直後に処置し、3 時間インキュベートした後 Comp. 31 または 2% DMSO 含有 RPMI1640 を処置した。24 時間インキュベート後 Cell Count Kit-8 試薬を処理し、マイクロプレートリーダー (GloMax[®], Promega) を使用して吸光度 (極大吸収波長 450 nm) を測定した。

6.2. 死細胞率解析

抗酸化剤 NAC と Comp. 31 の併用処置による死細胞率の解析をトリパンブルー染色によるセルカウントで算出した。AML 細胞株 U937 を 6 well プレート (Thermo Fisher Scientific) に 5.0×10^3 cells/well ずつ播種し、6.1 と同様に ①薬物未処置群 (2% DMSO 含有 RPMI1640)、②NAC 単独処置群、③Comp. 31 単独処置群、④NAC + Comp. 31 併用処置群を用意する。NAC は細胞を播種した直後処置し、3 時間インキュベートした後 Comp. 31 または 2% DMSO 含有 RPMI1640 を処置した。12 時間後細胞を回収し、遠心した後 PBS で懸濁してトリパンブルー染色した。トリパンブルーを排出し、トリパンブルー溶液で染色されない細胞を生細胞、トリパンブルー溶液で青く染色される細胞を死細胞とし、セルカウントを実施した。死細胞率の計算は (死細胞数) / (死細胞数 + 生細胞数) \times 100 で算出した。

7. qRT-PCR 解析

AML 細胞株 U937、KG1a を 70 mL フラスコに播種して 3 時間インキュベートし、Comp. 31 または ICG001 を処置した。4 時間後に全細胞を回収し RNA を抽出した。RNA は Nucleo Spin RNA Kit (タカラバイオ) で精製した。Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific) で精製 RNA の濃度を測定した。全 RNA ($200 \text{ ng}/\mu\text{L}$) を、PCR Thermal Cycler MP (タカラバイオ) で Rever Tra Ace qPCR RT キット (東洋紡、大阪、日本) を使用して逆転写し cDNA を合成したヒト *c-MYC*、*CCND1*、*SURVIVIN*、および *GAPDH* (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, U. S. A) の発現を qRT-PCR で測定した。各リアルタイム PCR 反応混合物には、 $20 \mu\text{L}$ の Taqman master mix (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)、cDNA、プライマー、および Taqman probe (Universal

Probe Library、Roche Diagnostics) が含まれている。cDNA は Thermal Cycler Dice system (タカラバイオ) で増幅した。mRNA 発現量は *GAPDH* 遺伝子を内部標準に用いて $\Delta\Delta Ct$ 法により各遺伝子の発現量を相対的に定量した。この研究で使用されたプライマーは、以下 Table 6 に示す。

primers	Length (bp)	Sequences	Probe Number	Accession Numbers	
<i>GAPDH</i>	Fw	20	5'-GAGTCCACTGGCGTCTTCAC-3'	45	NM_001256799.2
	Rv	20	5'-GTTTCACACCCATGACGAACA-3'		
<i>CTNNB1</i>	Fw	20	5'-GCTTTTCAGTTGAGCTGACCA-3'	21	NM_001098209.1
	Rv	22	5'-CAAGTCCAAGATCAGCAGTCTC-3'		
<i>SURVIVIN</i>	Fw	20	5'-AGAAGTGGCCCTTCTTGGA-3'	86	NM001168.2.
	Rv	20	5'-CAAGTCTGGCTCGTTCTCAGT-3'		
<i>C-MYC</i>	Fw	20	5'-GCTGCTTAGACGCTGGATTT-3'	66	NM_002467.4
	Rv	19	5'-TAACGTTGAGGGGCATCG-3'		

Table 6. Primer sequences and probe numbers for qRT-PCR used in this study

Fw: forward Rv: reverse bp: base pair

8. ウェスタンブロッティング解析

AML 細胞株 U937、KG1a を 70 mL フラスコに播種して 3 時間後に、Comp. 31 または ICG001 を処置した。48 時間または 72 時間後に、全タンパク質を回収した。回収した細胞を RIPA (radioimmuno precipitation assay) buffer (FUJIFILM 和光純薬) を用いて 1.0×10^6 cells/100 μ L 以上になるように溶解した。氷冷 (20 分) し、その間に 4 回ボルテックスを用いて攪拌し、十分に混和した。その後、遠心 (12000 rpm、20 分、4 °C) し、その上清をサンプルとして回収した。回収したサンプルは、Qubit Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific)、Quantus Fluorometer (Promega) を用いて定量を行い、4 μ g/ μ L になるように Sample Buffer Solution (FUJIFILM 和光純薬工業)、滅菌超純水と混合し、5 分間煮沸してサンプルを調製した。

調製したサンプルを用い、タンパク質の発現を SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) を行い解析した。電気泳動 (12.5% polyacrylamide gel、200 V) し、PVDF (poly vinylidene di fluoride) 膜 (Merck Millipore) に 100 V、90 分で転写した。非特異的結合を防止するため、PVDF 膜を 1%NFDM (non-fat dry milk) および 5%BSA (Albumin, from Bovine Serum) (FUJIFILM 和光純薬) 中で 1 時間反応させた。各ブロッキング剤は Tween 20 を含む tris-buffered saline (TBS; 20 mM tris、500 mM NaCl、pH 8.0) で溶解した。その後、一次抗体として、抗 CTNNB1 (Becton Dickinson)、抗 c-MYC、抗 CCND1、抗 SURVIVIN、および抗 GAPDH 抗体を使用した。HRP (Horseradish peroxidase) 標識抗ウサギ IgG 抗体および抗マウス IgG 抗体 (Cell Signaling Technology) を二次抗体として使用し、免疫反応性タンパク質に対応するバンドを ECL Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare、Chicago、IL、U. S. A) を用いて X 線フィルム (ケアストリーム株式会社、東京、日本) に感光させることにより検出した。使用した抗体とブロッキング剤は Table 7 に示す。

Primary Ab	Primary Ab concentrations	Secondary Ab	Secondary Ab concentrations	Blocking agents
GAPDH	1:1000	anti-mouse IgG	1:1000	1% NFDM
CTNNB1	1:500	anti-mouse IgG	1:1000	1% NFDM
C-MYC	1:1000	anti-rabbit IgG	1:1000	5% BSA
CCND1	1:1000	anti-rabbit IgG	1:1000	5% BSA
SURVIVIN	1:1000	anti-rabbit IgG	1:1000	1% NFDM

Table 7. Antibodies and blocking agents

Ab: antibody, NFDM: non-fat dry milk, BSA: albumin, from bovine serum

9. イダルビシンとの併用効果の検証

Comp. 31 とイダルビシン (Selleck Chemicals, Houston, Texas, U. S. A) の同時処置による併用効果は、WST-8 アッセイを行い、CI (combination index) を使用して評価した。CI は Chou. T. C により開発された酵素反応速度モデルから導出された質量作用の法則の原理に基づいて薬物の細胞毒性相乗作用を定量化する方法である^{55,56}。この手法は、抗腫瘍剤の相互作用を評価するために広く使用されている⁵⁷⁻⁵⁹。細胞を 72 時間、各化合物の 6 つの濃度 (IC₅₀ の 0.25、0.5、0.75、1.0、1.5、または 2.0 倍) または両方を組み合わせて、一定の比率の組み合わせで処置しインキュベートした。各希釈での CI と Fa (fraction affected) (例えば、0.25 の Fa は 75% の生細胞率に等しい) は、以前に報告されたように計算した⁵⁷⁻⁵⁹。この方法により、さまざまな用量および効果での相乗効果 (CI < 1)、相加効果 (CI = 1)、および拮抗作用 (CI > 1) の定量化が可能となる⁵⁶。CI の計算は、評価された薬剤の作用機序が相互に排他的ではないという仮定の下で行われた。組み合わせ効果の検証は、非線形回帰プログラム CalcuSyn (Biosoft) を使用して行った。

10. 統計分析

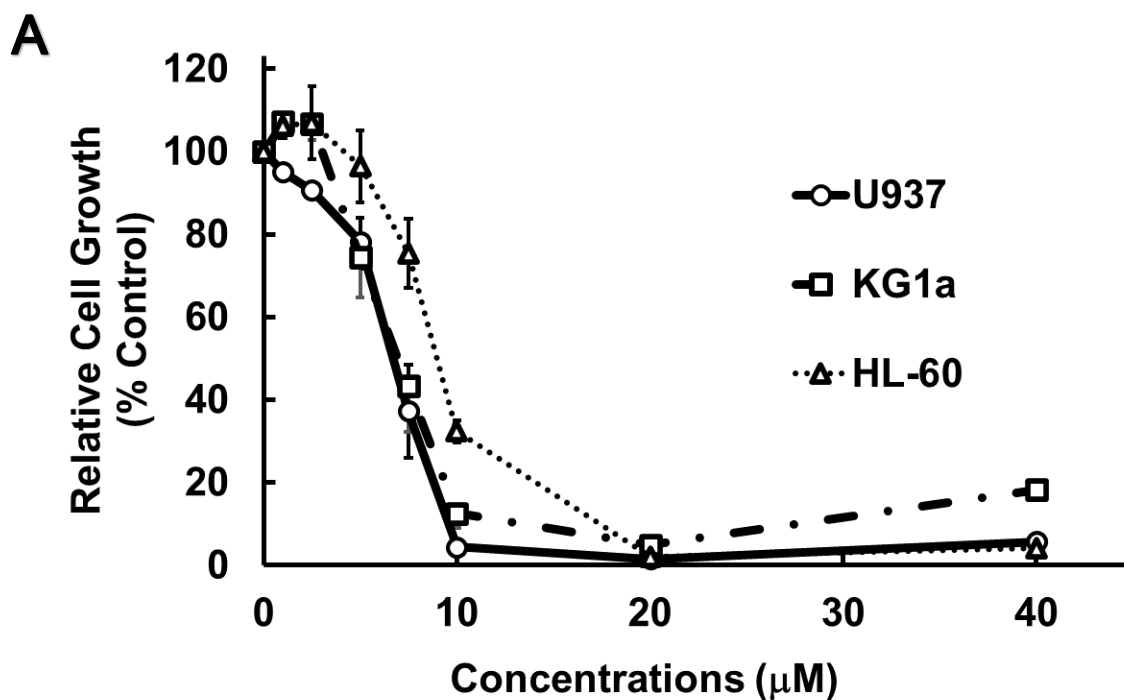
3 群以上の比較での統計学的解析は、一元配置分散分析を用いた Bonferroni 検定を使用して分析した。NAC と Comp. 31 併用による 2 群間の比較では Dunnet 検定を用いて解析した。統計解析ソフトは GraphPad Prism5 (GraphPad, USA) を使用した。得られた実験結果については、平均値±標準誤差 (standard error of the mean ; SEM) で表示した。危険率 5%以下両側を統計学的に有意差があると判定した。

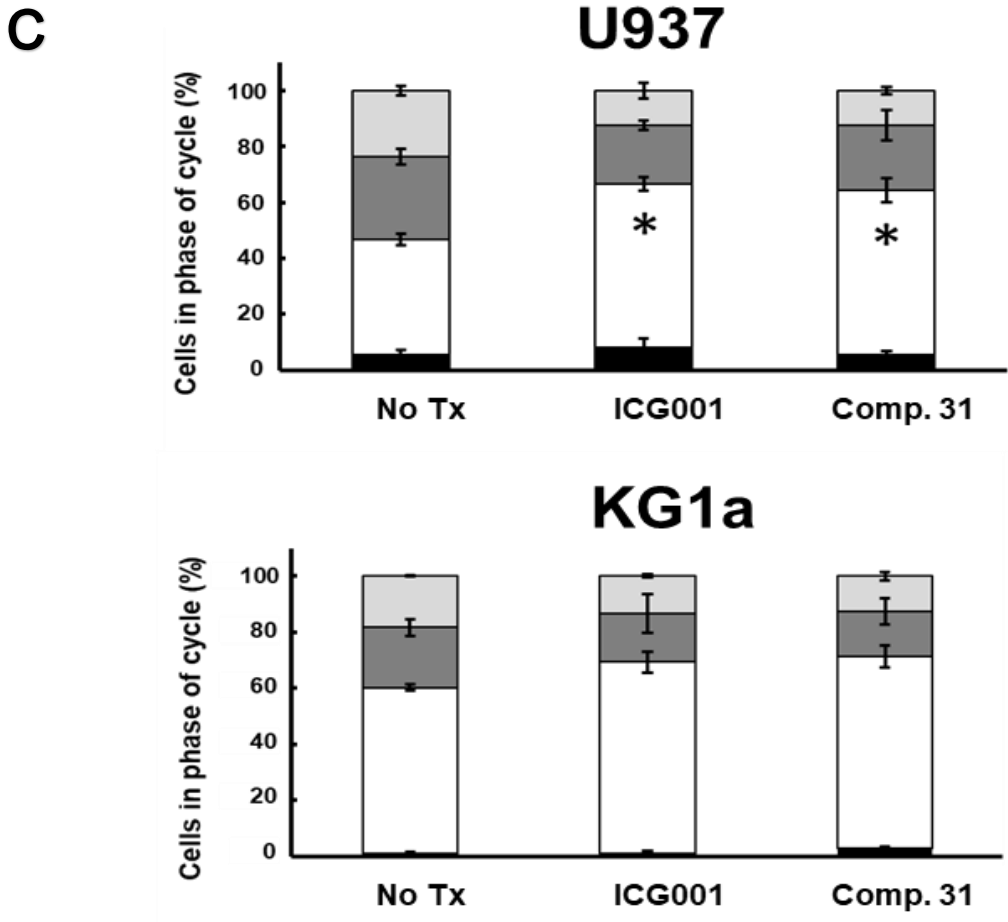
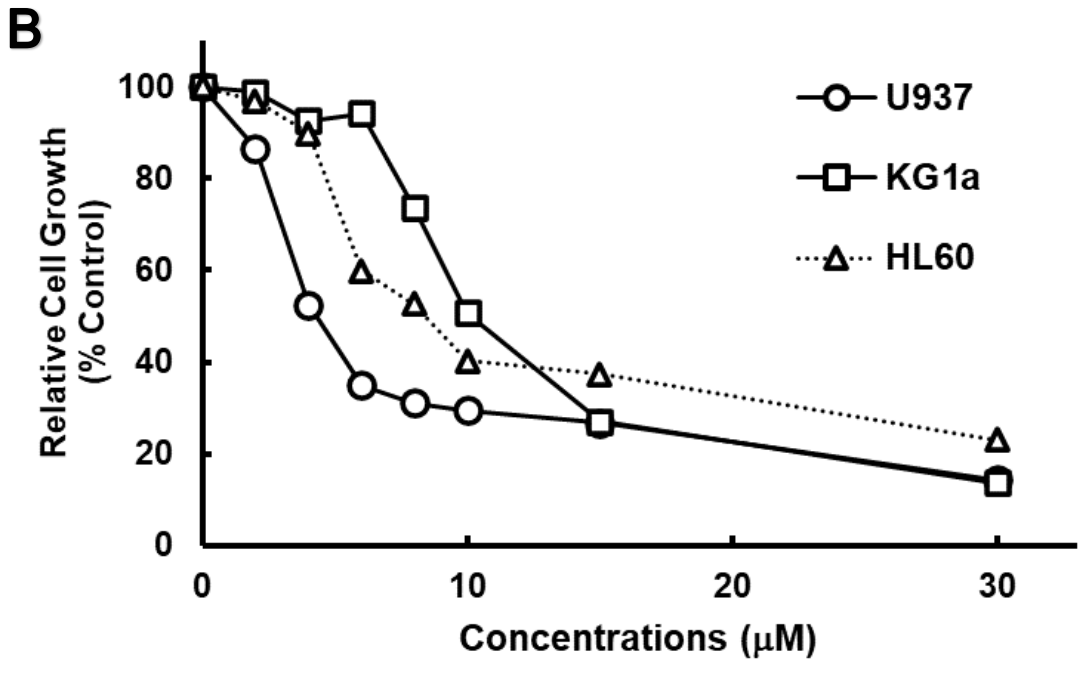
第3項 実験結果

1. Comp. 31 における AML 細胞に対する細胞増殖および細胞周期への影響

Figure 4A に示すように、Comp. 31 は、3つの AML 細胞株 (U937、KG1a、HL-60) の細胞増殖を用量依存的に阻害した (Figure 4A)。Comp. 31 における IC_{50} はそれぞれ U937 細胞および KG1a 細胞で $7\mu\text{M}$ 、HL-60 細胞で $9\mu\text{M}$ であった。ICG001 における IC_{50} は U937 細胞で $5\mu\text{M}$ 、KG1a 細胞で $10\mu\text{M}$ 、そして HL-60 細胞で $8\mu\text{M}$ であった。これ以降の実験は U937 細胞と KG1a 細胞を用いて $IC_{50} \times 1.5$ の薬物濃度で行った。

2つの細胞株、U937 細胞および KG1a 細胞に対する Comp. 31 および ICG001 の効果を、フローサイトメトリー法によって解析した (Figure 4B、C)。Comp. 31 および ICG001 で処理された U937 細胞の G_1 分画の割合は、それぞれ $58.5 \pm 5.36\%$ および $58.4 \pm 1.76\%$ であった。Comp. 31 および ICG001 で処理された KG1a 細胞の G_1 分画の割合は、それぞれ $68.4 \pm 4.71\%$ および $68.1 \pm 6.98\%$ であった。これらの結果は、Comp. 31 および ICG001 が同様に G_1 分画での割合の増加とともに AML 細胞の細胞周期を有意な差を持って停止させることを示唆した。





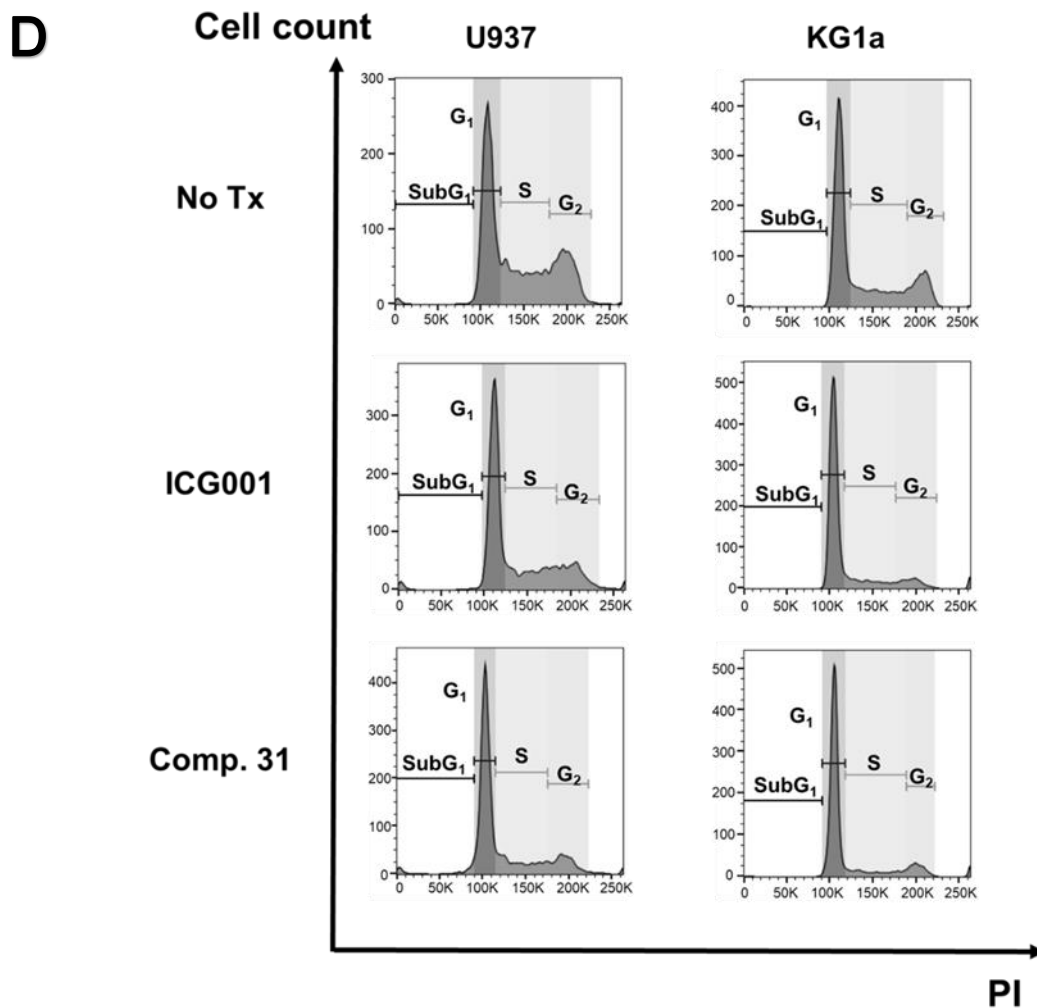
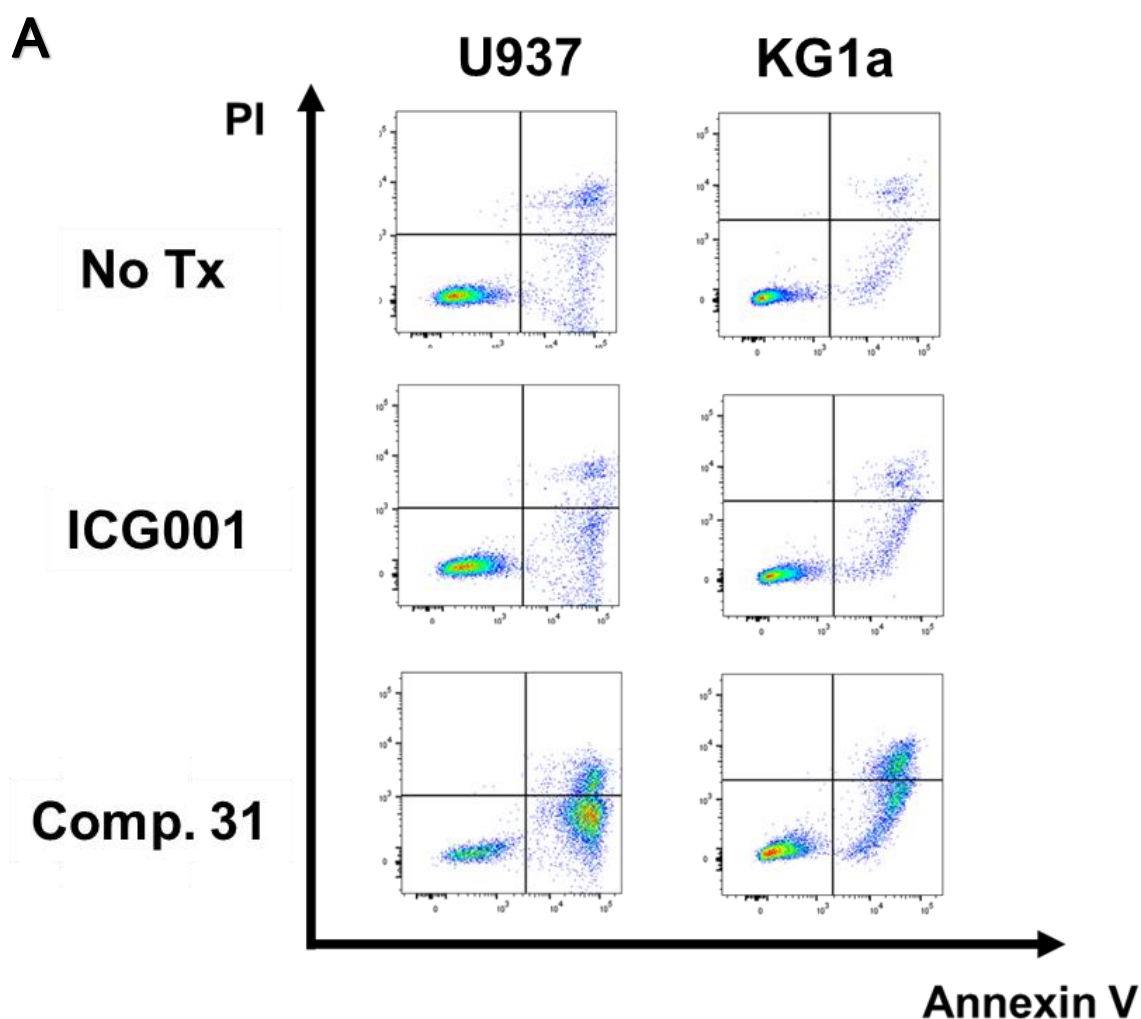


Figure 4. Inhibitory effects of Comp. **31** on AML cell lines. (A) WST-8 assay for detecting the effects of Comp. **31** on cell proliferation. Data represent the mean \pm standard error of the mean (SEM) of three independent experiments, each with test conditions replicated four times. (B) WST-8 assay for detecting the effects of ICG001 on cell proliferation. (C) Cell cycle status of U937 and KG1a AML cells after treatment with Comp. **31** or ICG001. Comp. **31** arrested the cell cycle of AML cells, with an increase in the proportion in G₁ phase. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments. Black, white, dark gray, and light gray bars indicate subG₁, G₀/G₁, S, and G₂/M phases of the cell cycle, respectively. Means \pm SEM were analyzed using a one-way ANOVA, and multiple comparisons of means were performed with Bonferroni's correction. $p < 0.05$ was considered significant. * $p < 0.05$ v. s. No Tx. (D) Cell cycle analysis by flow cytometry. U937 and KG1a cells were incubated with Comp. **31** or ICG001 at the indicated concentrations for 24 h. No Tx indicates treatment with DMSO as a solvent control. Wakabayashi R. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, 535, 73-79, Fig. 2A, 2B, 2C. The figure was partially modified.

2. Comp. 31 における AML 細胞に対するアポトーシスへの影響

Annexin-V / PI 染色を使用して、Comp. 31 で処理した U937 細胞および KG1a 細胞におけるアポトーシスの誘導を検討した (Figure 5A, B)。初期アポトーシス細胞 (Annexin-V+/PI-) の割合は、薬物未処理の細胞で $6.58 \pm 1.49\%$ (U937 細胞) および $3.20 \pm 0.80\%$ (KG1a 細胞) で、Comp. 31 で処理した細胞では $66.6 \pm 9.19\%$ (U937 細胞) および $21.2 \pm 3.52\%$ (KG1a 細胞) であった。後期アポトーシス細胞 (Annexin-V+/PI+) の割合は、未処理細胞で $6.40 \pm 1.03\%$ (U937 細胞) および $1.89 \pm 0.31\%$ (KG1a 細胞) であり、Comp. 31 処理細胞での割合は $13.9 \pm 6.48\%$ (U937 細胞) および $21.2 \pm 2.95\%$ (KG1a 細胞) であった。従って、Comp. 31 は、ICG001 と比較した場合、より有意に AML 細胞をアポトーシスに誘導した。



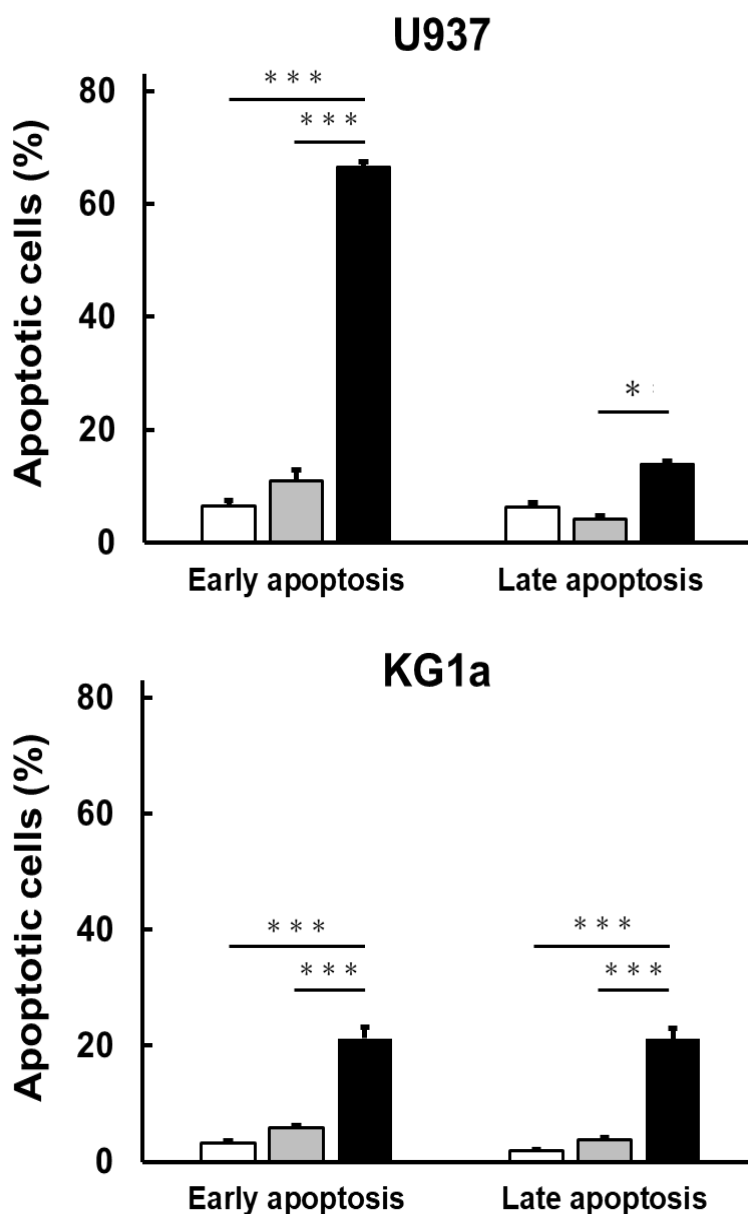
B

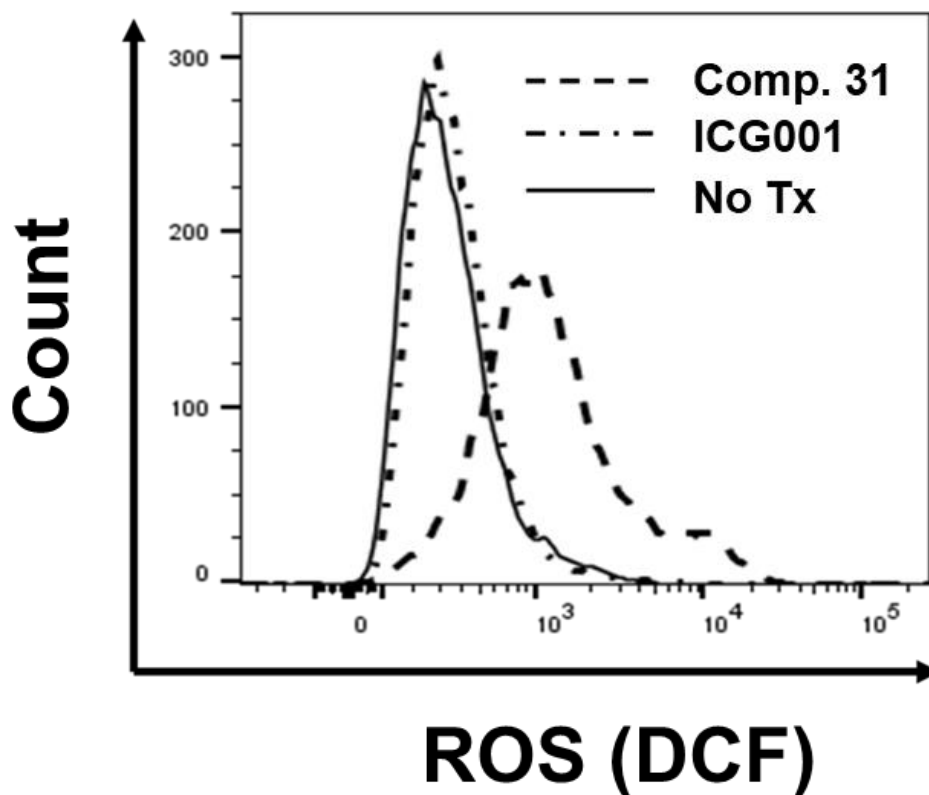
Figure 5. Induction of apoptosis in U937 and KG1a cells treated with Comp. **31** (10 μ M) or ICG001 (U937: 7.5 μ M; KG1a: 15 μ M) for 72 h. (A) Dot plots showing apoptosis detected by Annexin-V/PI using flow cytometry. Results shown are representative of three independent experiments. (B) Analysis of the proportion of cells in early and late apoptosis. Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments. White, gray, and black bars indicate the percentage of cells after treatment with solvent, ICG001, and Comp. **31**, respectively. Means \pm SEM were analyzed using a one-way ANOVA, and multiple comparisons of means were performed with Bonferroni's correction. $p < 0.05$ was considered significant. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ v. s. No Tx. No Tx indicates treatment with DMSO as a solvent control. Wakabayashi R. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, 535, 73-79, Fig. 2D, 2E. The figure was partially modified.

3. Comp. 31 におけるアポトーシスメカニズムの解析

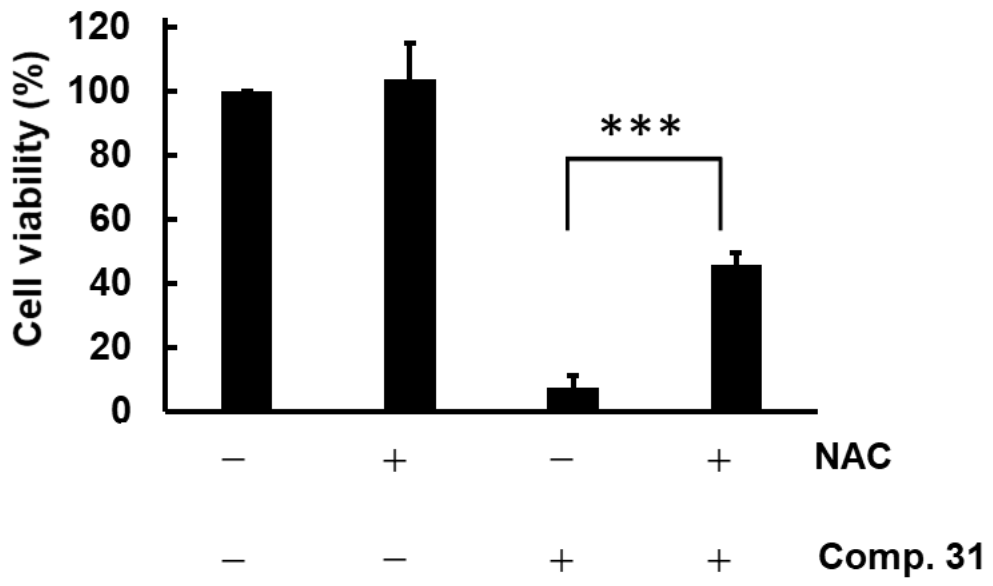
Comp. 31 によるアポトーシスのメカニズムを明らかにするため、アポトーシスとの関連が報告されている ROS について検討した。Comp. 31 を処置した時の AML 細胞株 U937 における ROS の産生をフローサイトメトリー法により測定した (Figure 6A)。ROS 検出試薬 CM-H2DCFDA は細胞に取り込まれた後、細胞内に蓄積した ROS と反応し蛍光物質である DCF となる。その DCF の蛍光を検出して ROS の値を測定する。DCF のヒストグラムを作成する際は、7-AAD で染色を行い生細胞の分画を抽出して行った。Comp. 31 処置群では薬物未処置群と ICG001 群よりもヒストグラムが右へシフトしており、ROS の産生量がその他の 2 群よりも増加していることが示された。

さらに Comp. 31 による細胞増殖抑制効果に ROS が関連しているかを検証するため、抗酸化剤である NAC と Comp. 31 を併用して WST-8 assay を行い細胞増殖の影響を検討した (Figure 6B)。その結果 NAC 処置により Comp. 31 による細胞増殖の抑制が有意な差を持って一部解除された。さらに細胞死誘導と ROS の関連を確認するため、NAC と Comp. 31 を併用してトリパンプルー染色により死細胞率を測定したところ、NAC 処置によって Comp. 31 による死細胞率の増加が有意な差を持って一部解除された (Figure 6C)。これらのことから、Comp. 31 によるアポトーシス誘導のメカニズムの一部に ROS の産生が関与していることを明らかとした。

A



B



C

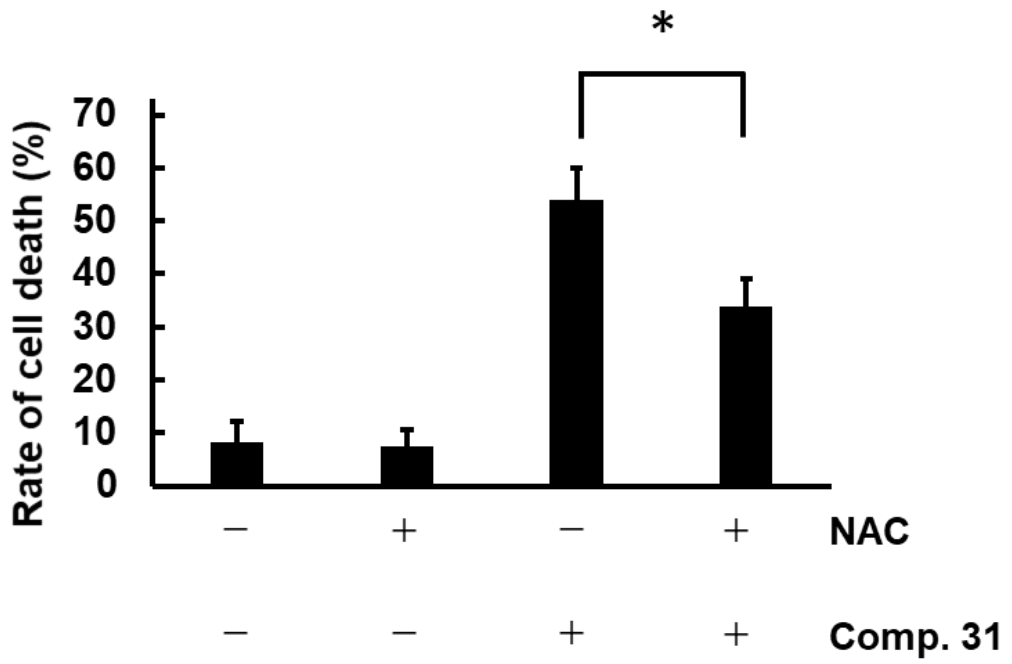
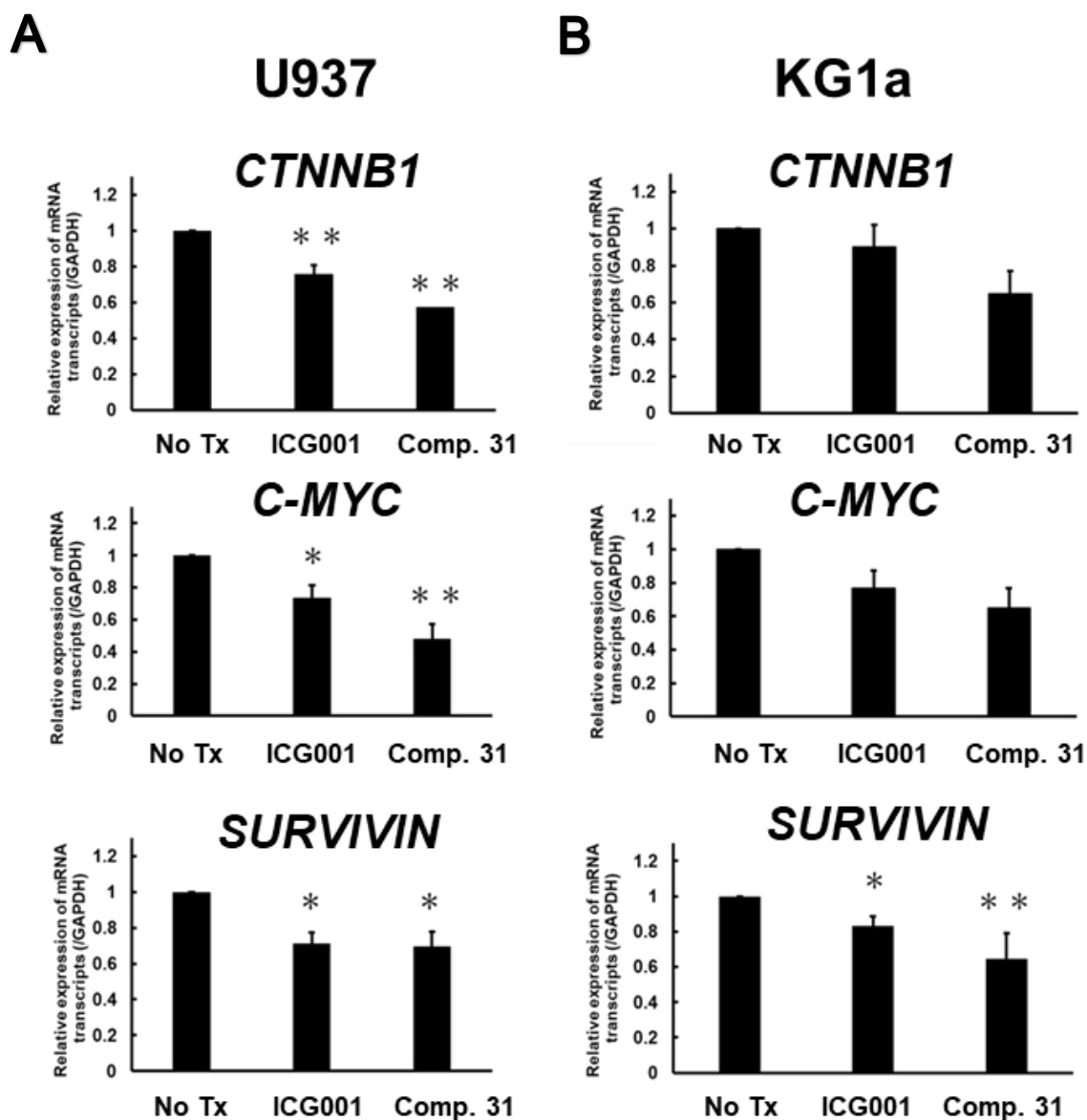


Figure 6. Evaluation of ROS production and verification of combined use of Comp. **31** and NAC. (A) U937 cells treated with Comp. **31** (10 μ M) or ICG001 (7.5 μ M) for 48 h. The production of ROS was measured by CM-H2DCFDA using flow cytometry. The DCF histogram is displayed as a 7-AAD negative live cell fraction. No Tx indicates treatment with DMSO as a solvent control. (B) WST8-assay. U937 cells were treated with Comp. **31** (10 μ M) and NAC (5mM) for 24 h. Results shown are the mean \pm SEM of three independent experiments. Means \pm SEM were analyzed using a one-way ANOVA, and multiple comparisons of means were performed with Dunnett's correction. $p < 0.05$ was considered significant. *** $p < 0.001$. (C) Measurement of dead cell rate by trypan blue staining. U937 cells were treated with Comp. **31** (14 μ M) and NAC (10 mM) for 12 h. Results shown are the mean \pm SEM of three independent experiments. Means \pm SEM were analyzed using a one-way ANOVA, and multiple comparisons of means were performed with Dunnett's correction. $p < 0.05$ was considered significant. * $p < 0.05$.

4. Comp. 31 における AML 細胞に対する Wnt シグナル関連分子発現への影響

AML 細胞における Wnt/ β -catenin シグナル関連分子の発現の変化を、qRT-PCR およびウエスタンブロットリング法を用いて評価し、Comp. 31 による細胞周期停止および細胞死誘導メカニズムを検証した。

qRT-PCR による解析は、Comp. 31 が *CTNNB1*、*c-MYC*、および *SURVIVIN* の mRNA 発現量を有意に減少させることを示した (Figure 7A, B)。また *CTNNB1* (β -catenin) のタンパク質発現量が、Comp. 31 処置によって減少した。(Figure 7C, D)。Comp. 31 は、*c-MYC*、*CCND1*、*SURVIVIN* タンパク質などの Wnt 関連タンパク質の発現量も抑制した (Figure 7C, D)。



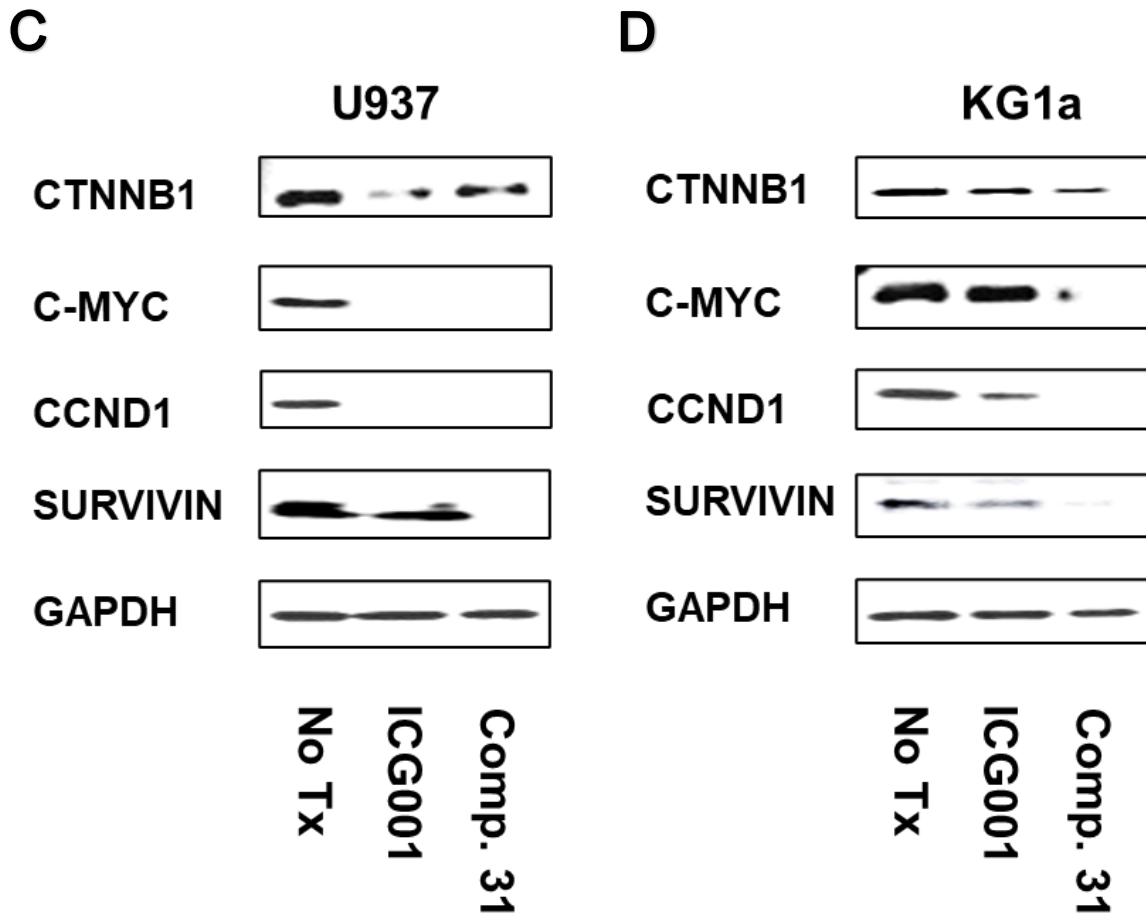
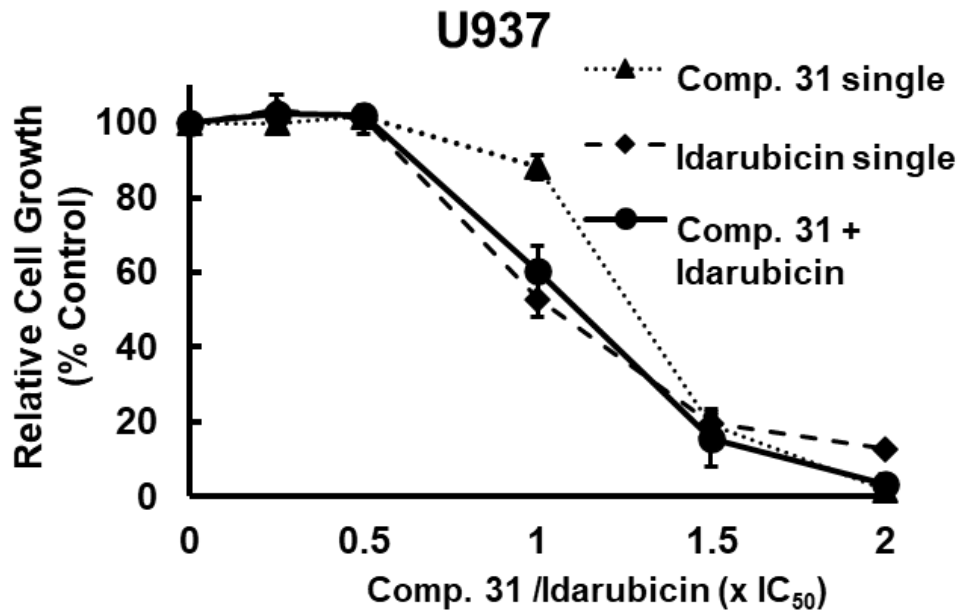
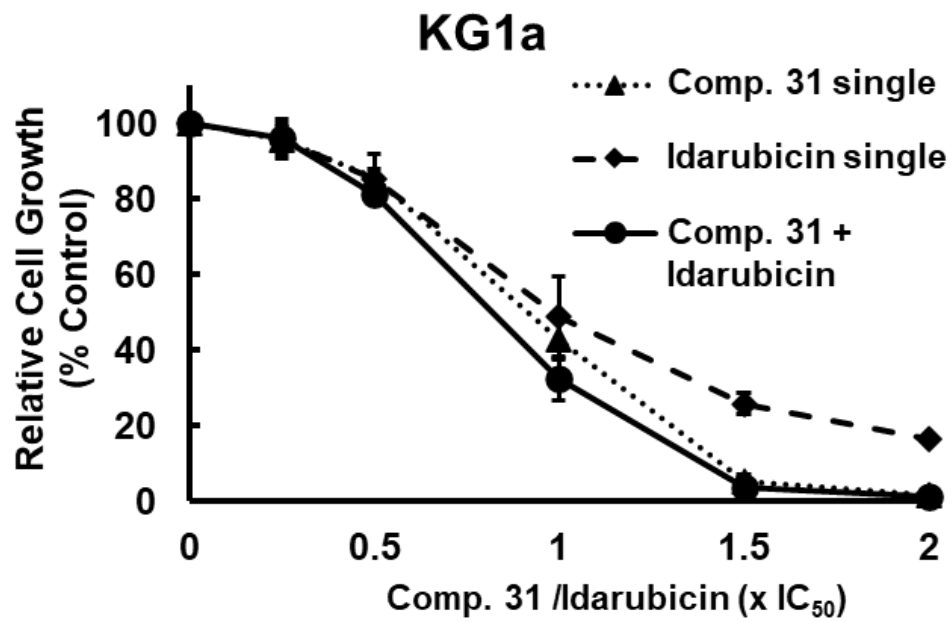


Figure 7. Effect of Comp. **31** on the expression of Wnt/ β -catenin signaling-related molecules. U937 (A) and KG1a (B) cells were incubated with Comp. **31** or ICG001 at the indicated concentrations for 4 h, and then mRNA levels of the indicated Wnt/ β -catenin signaling-related molecules were detected by qRT-PCR. Results shown are the mean \pm SEM of three independent experiments. Means \pm SEM were analyzed using a one-way ANOVA, and multiple comparisons of means were performed with Bonferroni's correction. $p < 0.05$ was considered significant. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ v. s. No Tx. U937 (C) and KG1a (D) cells were treated with Comp. **31** or ICG001 at the indicated concentrations for 72 h (U937) or 48 h (KG1a), and then protein levels of the indicated Wnt/ β -catenin signaling-related molecules were detected by western blotting. Results shown are representative of two or three independent experiments. No Tx indicates treatment with DMSO as a solvent control. Wakabayashi R. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, 535, 73-79, Fig. 3.

5. Comp. 31 の AML 細胞におけるイダルビシンと組み合わせた併用効果

KG1a 細胞および U937 細胞の AML 細胞に対するイダルビシンと Comp. 31 を組み合わせた併用効果を検討した。イダルビシンは、AML の導入療法で使用されている重要な薬剤である⁴⁹。各化合物またはその両方の 6 つの濃度 (IC₅₀ の 0.25、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0 倍) を一定の比率で使用し、WST-8 アッセイを実施した。各希釈での CI および Fa 値は、既報に従い CalcuSyn ソフトウェアを使用して計算した⁵⁷⁻⁵⁹。U937 細胞と KG1a 細胞に対するイダルビシンと Comp. 31 の用量効果プロットをそれぞれ Figure 8A と 8B に示し、U937 細胞と KG1a 細胞に対する Comp. 31 とイダルビシンの併用効果を示す CI-Fa プロットを Figure 8C および 8D にそれぞれ示した。イダルビシンと Comp. 31 の組み合わせた併用処置は、AML 細胞に対する各化合物単独の処理よりより強い増殖抑制効果を示した (Figure 8A、B)。CI 値は CI < 1 で相乗効果、CI = 1 で相加効果、および CI > 1 で拮抗作用と判定される。Comp. 31 とイダルビシン併用による CI 値は大方の濃度で 1 より低い値を推移しており、Comp. 31 とイダルビシンの併用が、U937 細胞と KG1a 細胞に対して相乗的に増殖抑制効果を有していることが示された。

A**B**

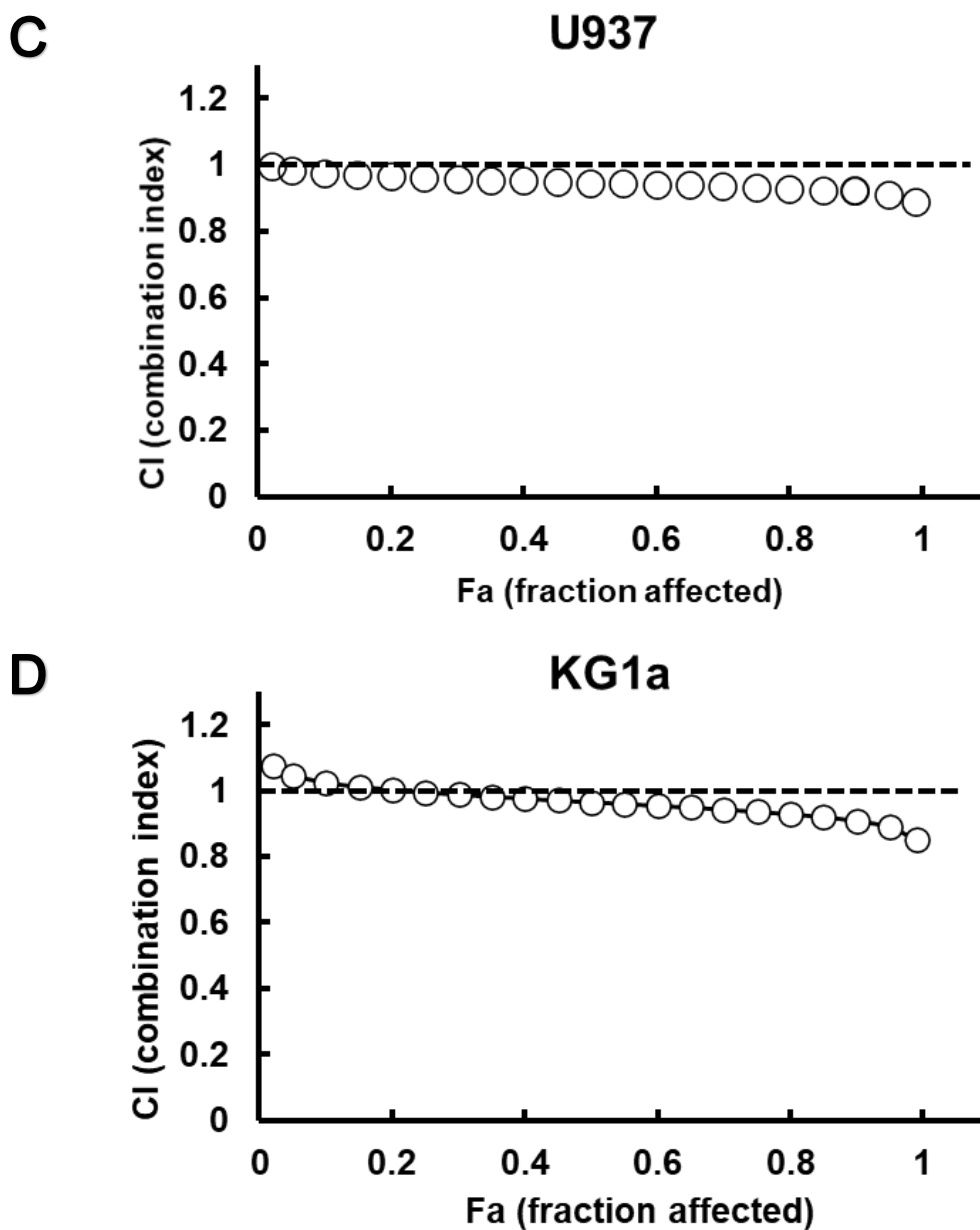


Figure. 8 Evaluation of the combined effects of Comp. **31** and idarubicin (idarubicin) treatment on AML cells. Cells were incubated for 72 h with six concentrations of each agent or both in combination. The IC_{50} values of Comp. **31** for U937 cells and KG1a cells were 7 μ M and 9 μ M, respectively, and those of IDR were 5 nM and 7 nM, respectively. (A, B) The cytotoxic effect of treatment with Comp. **31** or IDR, alone or in combination, on U937 cells (A) and KG1a cells (B). (C, D) Combination index (CI) -fraction affected (Fa) plots of U937 cells (C) and KG1a cells (D). CIs were determined with the nonlinear regression program CalcuSyn. Wakabayashi R. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2021**, 535, 73-79, Fig. 4.

第4項 考察

In vitro での AML 細胞に対する抗腫瘍効果を確認するために、AML 細胞株の細胞増殖、細胞周期、アポトーシスに対する Comp. 31 における影響を既存の Wnt/ β -catenin 経路阻害薬 ICG001 と比較して評価した。WST-8 アッセイの結果は、Comp. 31 が U937 細胞、KG1a 細胞、および HL-60 細胞の増殖に対する濃度依存性阻害を示した。ICG001 においても AML 細胞株に対して細胞増殖を抑制していたが、高濃度における阻害率は Comp. 31 よりも低い値であった。細胞増殖に影響を与える可能性のある要因を探索するため、Comp. 31 または ICG001 によって引き起こされる細胞周期の変化についてフローサイトメトリー法を用いて検討した結果、Comp. 31 と ICG001 は細胞周期における G₁ 期の割合が同程度に増加しており、両化合物における細胞周期への影響が等しいことが示された。さらに Comp. 31 は AML 細胞に対して、ICG001 よりも強くアポトーシスの誘導をもたらした。これらの結果から Comp. 31 と ICG001 は共に細胞周期の停止を誘導して細胞増殖を抑制する効果を有している。しかし AML 細胞を細胞死に至らせる効果は ICG001 に比して Comp. 31 の方が優れていると推察される。この違いは抗アポトーシスタンパク質である SURVIVIN の発現変化の差が影響していることが考えられる。Comp. 31 において SURVIVIN のタンパク発現は強く抑制されているのに対して、ICG001 では発現の変化が見られなかった。よってこれら 2 剤における SURVIVIN 発現の差が細胞死に対する影響に関わっていることが考えられる。

また Comp. 31 における細胞増殖の結果に細胞株ごとの大きな差はみられなかったが、ICG001 においては細胞株ごとに増殖阻害率の結果に差がみられた。またウエスタンブロッティング法によるタンパク質発現解析では、U937 細胞と KG1a 細胞で異なる結果が確認された。U937 細胞では C-MYC および CCND1 のタンパク質発現変化については、Comp. 31 および ICG001 で同程度発現を抑制しているのに対し、KG1a 細胞では ICG001 による発現抑制が確認されなかった。これはそれぞれの細胞における β -catenin の発現の差が影響している可能性が考えられる。Ysebaert L. らが行った AML 細胞株を用いたウエスタンブロッティング解析により KG1a 細胞が U937 細胞よりも顕著に β -catenin のタンパク質発現が上昇していることが認められた⁴⁵。ICG001 は β -catenin の発現量がより亢進している KG1a 細胞に対しては完全に Wnt/ β -catenin 経路を抑制することができないために、細胞ごとの差が認められた可能性がある。それに対して Comp. 31 は β -catenin の発現に影響を受けることなく本経路を阻害し、抗腫瘍効果を発揮することが示唆された。

Comp. 31 によるアポトーシス誘導のメカニズムの解析にあたり、ROS の関与に着目した。ROS がアポトーシス誘導に関連していることは、これまでも多く報告されている^{60,61}。また様々な薬物によるアポトーシス誘導に ROS が産生されることが報告されている^{62,63}。Yang X. らはヒト肝細胞株 Hep G2 細胞を用いた検討により中国で動物飼料添加物として使用されているキノセトンが ROS を介して Wnt/ β -catenin 経路を抑制し、最終的に caspase 9 の活性化を伴うアポトーシスを誘導したことを示している⁶²。Wu S. らは前立腺がんを用いた実験により、プロテインキナーゼ C 阻害作用を持つ薬物として同定された天然アルカロイド Chelerythrine が ROS の蓄積を介して小胞体ストレスを引き起こしアポトーシスを誘導することを報告している⁶³。さらには β -catenin 阻害により ROS が産生されることが報告されている^{62,64}。FOXO (Forkhead box O) は細胞周期を負に調節する転写因子であり¹⁹、Essers M. A. G. らは FOXO の細胞周期の調節に β -catenin が関わっていることを発見し、HEK293 細胞を用いた共免疫沈降解析において、H₂O₂ 処置により FOXO と β -catenin の結合が増強し細胞周期の

停止をさらに促進することを示した⁶⁴。このように Wnt/ β -catenin 経路が ROS の産生に関与している報告が散見されている。そこで Comp. 31 によるアポトーシスの誘導が ROS を介して起きるとする仮説を立て、フローサイトメトリー法により ROS 検出試薬 CM-H2DCFDA を用いて ROS の産生を解析した。その結果、Comp. 31 は薬物無処置群および ICG001 処置群に比較して ROS の産生が亢進していた。また抗酸化剤である NAC の併用により Comp. 31 による細胞増殖抑制と細胞死の誘導が一部解除された。NAC はグルタチオンの前駆物質であり、細胞内でグルタチオンに変換されることで ROS スカベンジャーとして抗酸化作用を発揮する⁶⁵。NAC を前処置することで、Comp. 31 による ROS 産生が抑制され、細胞増殖抑制および細胞死の誘導が抑制されたと考えられる。今回の検討では ROS の増加が Wnt/ β -catenin 経路を抑制したのかもしくは Wnt/ β -catenin 経路の抑制により ROS が増加したのかについてはさらなる検討が必要である。これらの結果より Comp. 31 による細胞死の誘導に、一部 ROS が関与していることが示唆された。その他の細胞死に関わる要因はまだ不明であり、今後さらなる検証が必要である。

ウェスタンブロッティング法では、Comp. 31 で処理した細胞の β -catenin のタンパク質発現が、対照群と比較して減少していることが明らかになった。さらに、Comp. 31 は CTNNB1 mRNA 発現量を減少させた。Comp. 31 が CTNNB1 mRNA の発現を抑制することで、ROS の産生を亢進させ細胞死を誘導しているのか、それとも Comp. 31 がまず ROS を産生し、CTNNB1 の発現を減少しているのかについては現時点では不明である。先述したように、Yang X. らの研究ではキノセトンが ROS を介して Wnt/ β -catenin 経路を抑制し、最終的に caspase 9 の活性化を伴うアポトーシスを誘導したことを示している⁶²。一方 Laphanuwat P. らの研究では MDA-MB-175 細胞などの乳がん細胞に対して shRNA を用いて Wnt/ β -catenin の標的遺伝子である CyclinD1 の発現を抑制したところ、強い ROS の蓄積が確認されたことを報告している¹⁹。このように、これまでの ROS の産生と β -catenin 発現の報告では、いずれの機序も報告されており^{19,62,66}、Comp. 31 の機序についてはさらなる検証が必要である。

Wnt/ β -catenin 経路は LSC の発生に関連しており、Wnt/ β -catenin 経路はがん幹細胞治療の重要な標的であることが報告されている^{29,67}。そして従来の抗がん剤と Wnt/ β -catenin 経路阻害薬の組み合わせは、がん治療において有用である可能性が考えられている³¹。そこで Comp. 31 と AML の強力な主要薬剤であるイダルビシンの併用効果を検討した。CalcuSyn を使用した併用療法の分析結果は、Comp. 31 とイダルビシンの併用が効果的かつ相乗的であることを示している。その要因としてイダルビシン処置により β -catenin の発現上昇が関与している可能性が考えられる。Zhou Y. らによる実験で、イダルビシンと同じアントラサイクリン系抗がん剤であるドキソルビシンをヒト肝がん細胞株 (HuH-7, HepG2, SNU-387) に処置したところ、 β -catenin の発現が上昇していることが示されていた⁶⁸。今回の検討ではイダルビシン処置による β -catenin の発現が上昇していることは確認できていない。しかしアントラサイクリン系のドキソルビシンで β -catenin の発現に変化が現れることが示されていることから、同アントラサイクリン系のイダルビシンの処置により β -catenin の発現が上昇し、Comp. 31 がより活性を示しやすい環境がもたらされている可能性が考えられる。また Zhou Y. らの研究では、イオノフォア抗生物質であるサリノマイシンが FOXO を介して β -catenin/TCF の複合体を阻害して肝がん細胞でのドキソルビシンの耐性を低下させたことを示している⁶⁸。この報告からも Wnt/ β -catenin 経路がアントラサイクリン系抗がん剤での耐性化に寄与する重要な治療ターゲットであることを示している。この結果は、Comp. 31 を使用することで LSC を駆逐できる可能性があることを示唆し

ており、AML 細胞の LSC に対する Comp. 31 の抗腫瘍効果に関する検証はさらに必要であると考え
る。

以上の結果より、ジペプチド型の Wnt/ β -catenin 阻害薬 Comp. 31 は、AML 細胞の増殖を阻害し、G₁
期での細胞周期の停止とアポトーシスを誘導した。その細胞死誘導に一部 ROS が関与することが示
唆された。Comp. 31 は AML 細胞において、CTNNB1 および関連遺伝子の mRNA の発現を減少させ
た。さらには、イダルビシンとの併用により AML 細胞の増殖を相乗的に阻害した。Comp. 31 は既存
の Wnt/ β -catenin 経路阻害薬 ICG001 に比してより細胞死を強く阻害作用する効果を有していた。
Wnt/ β -catenin 経路標的遺伝子である SURVIVIN において発現変化に差が見られたことから、本経路
を抑制する効果の違いが細胞死誘導の差を引き起こしている可能性がある。また Comp. 31 が Wnt/ β -
catenin 経路を阻害する作用に加えて、アポトーシスに関わる経路に作用するマルチなターゲットを有
する化合物である可能性も考えられ、今後さらに詳細な検証が必要である。これらの結果はこの Comp.
31 は AML に対する魅力的な Wnt/ β -catenin 阻害薬として有望なリード化合物になることを示唆して
いる。

第2章 第2節 大腸がんに対する抗腫瘍効果

第1項 緒言

大腸がんの死亡者数は近年増加しており、2018年の死亡数は男女合わせると約5万人であり、部位別で2位に位置するがん種である¹。血管新生阻害剤であるベバシズマブ⁶⁹などの分子標的薬の登場により生存期間は延長しているものの、ステージIVにおける5年生存率は2割に満たない¹。よってさらなる治療効果の高い大腸がん治療薬の開発は最重要課題あると考える。

CTNNB1の分解に重要な分子であるAPCの変異が大腸がん患者のうち約80%で見つかっており⁷⁰、Wnt/ β -catenin経路の異常な活性化が多く報告されている⁷¹。APCは家族性大腸腺腫症の原因遺伝子として同定されたものであり、がん抑制遺伝子としても知られる^{72,73}。変異したAPCは β -cateninとの結合能を有してはいるものの、Axinとの結合部位が欠損しているものが多くみられる。そのため β -cateninをリン酸化し、その後続くプロテアソーム系での分解が不可能となり、細胞質内で β -cateninが蓄積し核へ移行することとなる⁷⁴。大腸がん患者における核内での β -cateninの蓄積が80%以上で検出されている報告もあり⁷⁵、核内での β -cateninの高発現は予後不良と関連することが報告されている⁷⁶。よってWnt/ β -catenin経路は大腸がんにとって有望な治療ターゲットであり、大腸がんに対するWnt/ β -catenin経路阻害薬の開発が行われてきた⁷¹。しかし未だ臨床で使用されている本経路を標的とした薬剤はない。そこでWntシグナルの活性が高い大腸がん細胞においても新たな効果の高いWnt/ β -catenin経路阻害薬を開発するため、第1章、第2章第1節でWnt/ β -catenin経路を抑制し、AML細胞株に対して有効性を示したComp. 31の大腸がん細胞に対する抗腫瘍効果の検討を行った。

第2項 実験方法

1. 大腸がん細胞株培養方法

ヒト大腸がん細胞株 HT29、RKO、SW480 は、ATCC から入手した。これらの細胞は 10%FBS、抗菌薬 (100 units/mL ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシン) (FUJIFILM 和光純薬) を含む D-MEM High-Glucose (L-グルタミン、フェノールレッド含有) (ナカライテスク) で 37°C、5% CO₂ の環境下で培養した。

2. Luc-SW480 細胞の培養

Luc-SW480 は TOP 細胞と同様に SuperTOPflush plasmid を導入した細胞である。プラスミドの導入には Lipofectamine®2000 (Thermo Fisher Scientific) を使用した。Luc-SW480 は 10%FBS、抗菌薬 (100 unit/mL ペニシリンおよび 100 µg/mL ストレプトマイシン)、Hygr (150 mg/mL) (FUJIFILM 和光純薬) を含む D-MEM High-Glucose (L-グルタミン、フェノールレッド含有) (FUJIFILM 和光純薬) にて 37°C、5% CO₂ の環境下で培養した。

3. 大腸がん細胞に対する増殖阻害効果

大腸がん細胞に対する増殖抑制効果においても、第2章第1節と同様に Cell Count Kit-8 を用いて評価した。ヒト大腸がん細胞株を 96 ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific) に、ウェルあたり 3.0 x 10³ cells/well の密度で細胞播種し、Comp. 31 または ICG001 の段階希釈液とともに 72 時間インキュベートした。Cell Count Kit-8 試薬を各 well に 10 µL ずつ処置し、マイクロプレートリーダー (GloMax®、Promega) を使用して吸光度 (極大吸収波長 450 nm) を測定した。各濃度での 4 つのサンプルの平均を評価した。50%の阻害濃度 (IC₅₀) の値は、非線形回帰プログラム CalcuSyn (Biosoft、Cambridge、UK) を使用して取得した。

4. ルシフェラーゼレポーターアッセイ

ヒト大腸がん細胞株 Luc-SW480 を用いた TCF-Luc 転写活性を、ルシフェラーゼレポーターアッセイを使用して測定した。大腸がん細胞株では Wnt の活性が正常細胞 (HEK293 細胞) よりも亢進しているため、Wnt 上清を使用せずに細胞懸濁して播種した。Wnt 上清の有無で Luciferase の活性に差がないことは検証済みである。Luc-SW480 細胞を 96 ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific) に 5 x 10⁴ cells/well で播種した。培養 24 時間後に Comp. 31 を処置し、さらに 24 時間培養した。次に細胞溶解試薬 (Table 1) をプレートの各ウェルに添加し、プレートを 30 分間穏やかに振とうして細胞を溶解した。細胞溶解物をポリスチレン 96 ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific) に移した。発光試薬 (Table 2) を添加し、マイクロプレートリーダー (GloMax®、Promega) を使用して発光を測定した。

5. qRT-PCR 解析

第2章第1節と同様の方法で大腸がん細胞株 HT29 の mRNA を採取し、qRT-PCR 解析を実施した。HT29 細胞を 10 cm カルチャーディッシュ (Thermo Fisher Scientific) に細胞濃度 3.0 x 10⁴ cells/mL で播種し、24 時間後 Comp. 31 または ICG001 を処置した。24 時間後 NucleoSpinRNA Kit (タカラバイオ) を用いて mRNA を精製した。それ以降の cDNA への逆転写と qRT-PCR での解析は第2章第1節と同

様である。

6. ウェスタンブロッティング解析

第2章第1節と同様の方法で大腸がん細胞株 HT29 のタンパク質発現解析をウェスタンブロッティング法にて解析を行った。HT29 細胞を 10 cm カルチャーディッシュに細胞濃度 3.0×10^4 cells/mL で播種し、24 時間後 Comp. 31 または ICG001 を処置した。72 時間後に全タンパク質を回収した。回収した細胞を RIPA buffer (FUJIFILM 和光純薬) を用いて 1.0×10^6 cells/100 μ L 以上になるように溶解した。氷冷 (20 分) し、その間に 4 回ボルテックスを用いて攪拌し十分に混和した。その後、遠心 (12000 rpm、20 分、4°C) し、その上清をサンプルとして回収した。回収したサンプルは、Qubit Protein Assay kit (Thermo Fisher Scientific)、Quantus Fluorometer (Promega) を用いて定量を行い、 2μ g/ μ L になるように Sample Buffer Solution (FUJIFILM 和光純薬工業)、滅菌超純水と混合し、5 分間煮沸してサンプルを調製した。それ以降の SDS-PAGE を用いた解析は第2章第1節と同様に行った。使用した抗体とブロッキング剤は Table 8 に示す。

Primary Ab	Primary Ab concentrations	Secondary Ab	Secondary Ab concentrations	Blocking agents
β -actin	1:1000	anti-mouse IgG	1:1000	5% NFDm
CTNNB1	1:2000	anti-mouse IgG	1:1000	5% NFDm
MYC	1:1000	anti- mouse IgG	1:5000	5% BSA
SURVIVIN	1:1000	anti-rabbit IgG	1:1000	5% NFDm
cleaved caspase-3	1:1000	anti-rabbit IgG	1:1000	5% BSA
caspase-3	1:1000	anti-rabbit IgG	1:1000	5% NFDm

Table 8. Antibodies and blocking agents

Ab: antibody, NFDm: non-fat dry milk, BSA: albumin, from bovine serum

第3項 実験結果

1. Comp. 31 における大腸がん細胞株に対する TCF-Luc 活性および細胞増殖への影響

TOP 細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて TCF-Luc の活性を抑制していた Comp. 31 においてヒト大腸がん細胞株 SW480 細胞に Super-TOPflush plasmid を導入した Luc-SW480 細胞を用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。Luc-SW480 細胞においても濃度依存的に TCF-Luc の活性を抑制した (Figure 9A)。

また細胞増殖において Wnt/ β -catenin 経路依存的である HT29 細胞と非依存的である RKO 細胞において Comp. 31 処置における細胞増殖抑制効果を比較し検討を行った (Figure 9B)。Comp. 31 の処置は HT29 細胞では IC_{50} : 9 μ M に対し、RKO 細胞では IC_{50} : 18 μ M であり、HT29 細胞に対してより強力な細胞増殖抑制効果を示した。

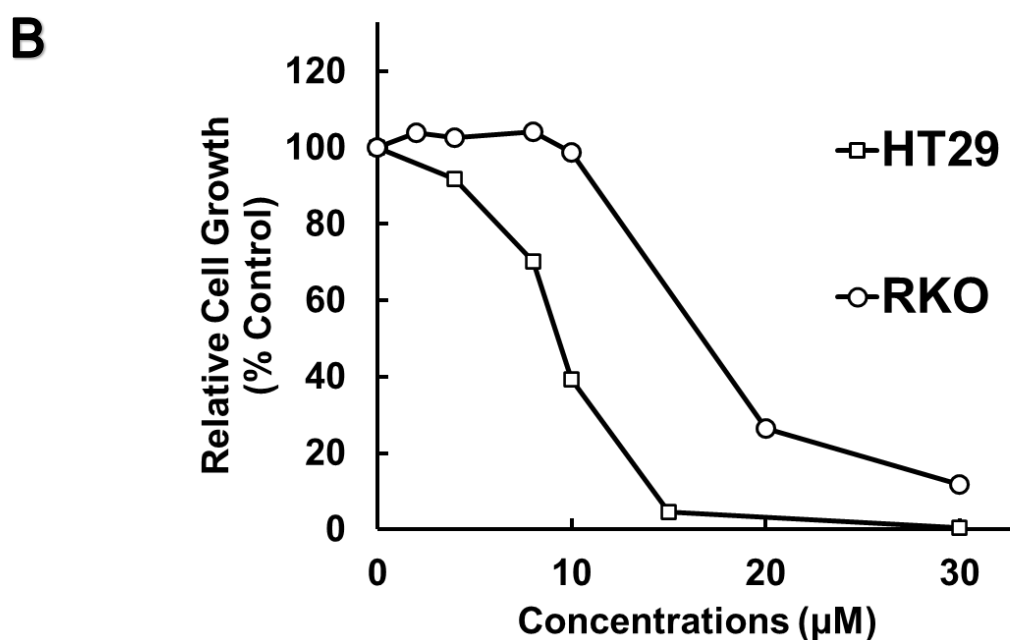
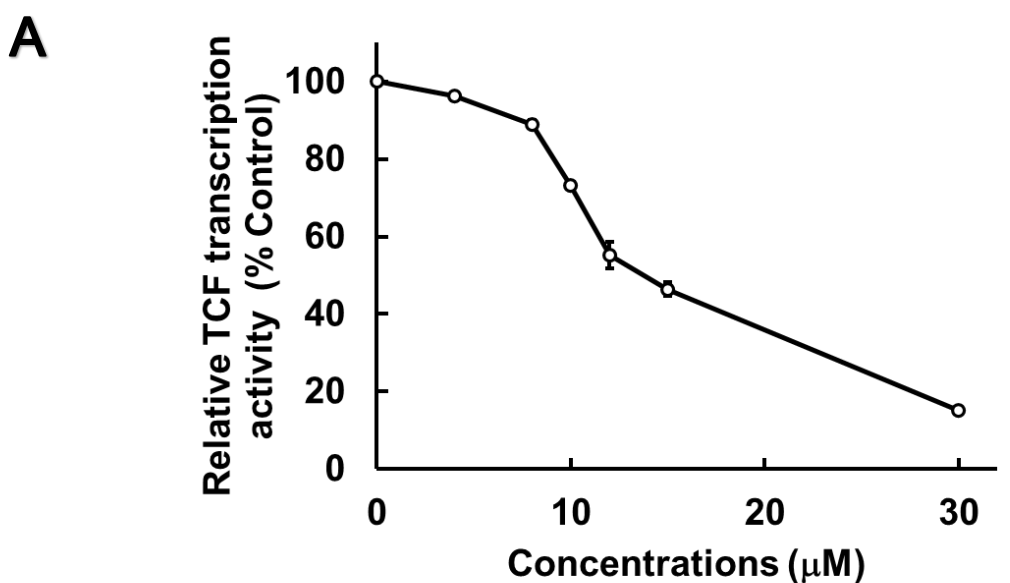
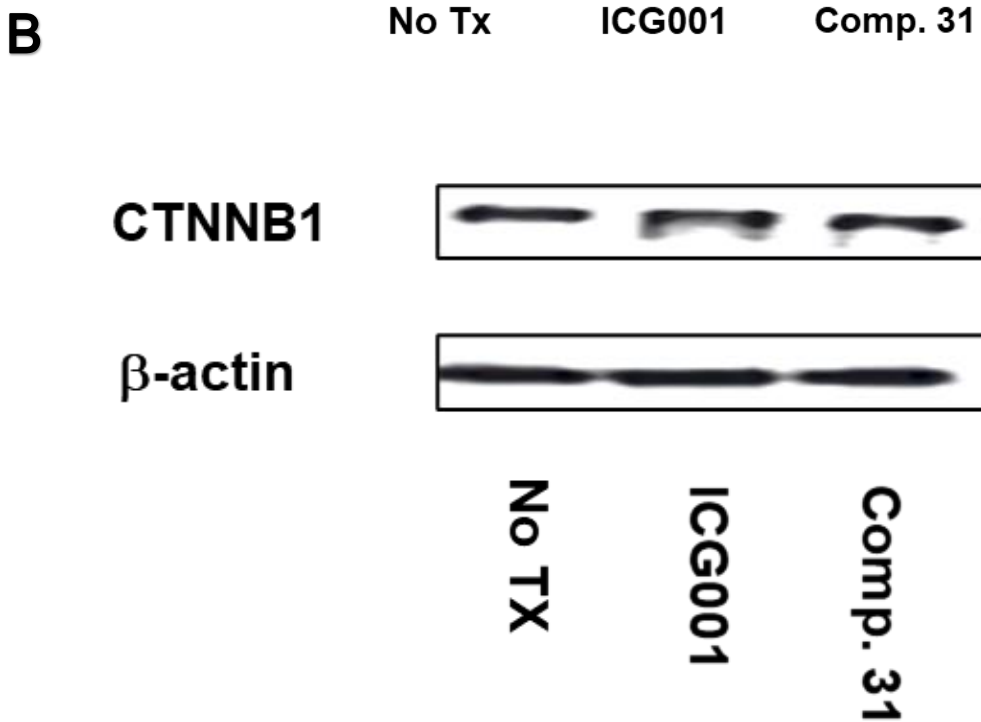
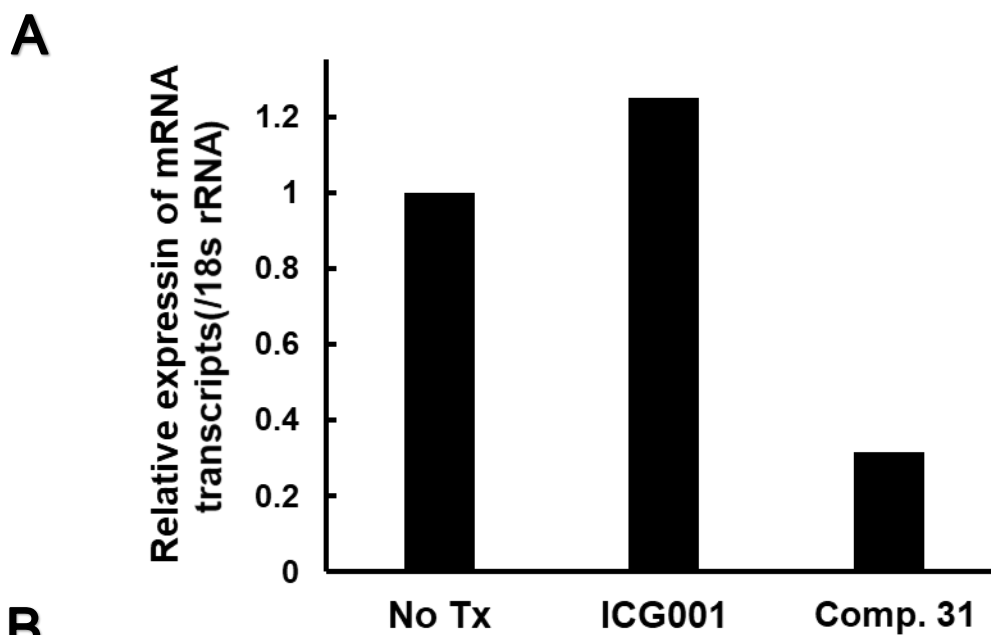


Figure 9. Inhibitory effects of TCF-Luc activity and cell viability on colorectal cancer (A) Luciferase reporter assay using Luc-SW480. Luc-SW480 cells were treated with Comp. **31** for 24 h. Results shown represent the means \pm SEM of three independent experiments. (B) WST-8 assay for detecting the effects of Comp. **31** on cell proliferation for 72 h (HT29 and RKO).

2. Comp. 31 におけるヒト大腸がん細胞株に対する Wnt 関連遺伝子の発現への影響

Comp. 31 処置後の CTNNB1 の発現変化を大腸がん細胞株 HT29 で解析したところ、24 時間で CTNNB1 mRNA の発現減少が認められた (Figure 10A)。しかし Comp. 31 による CTNNB1 のタンパク質の発現変化はウエスタンブロッティング法では認められなかった (Figure 10B)。さらに他の Wnt 関連遺伝子の SURVIVIN、C-MYC は AML 細胞での結果と同様にタンパク質発現の減少が見られた (Figure 10C)。また、アポトーシス関連タンパク質である cleaved caspase 3 の発現が上昇していることが確認された (Figure 10D)。



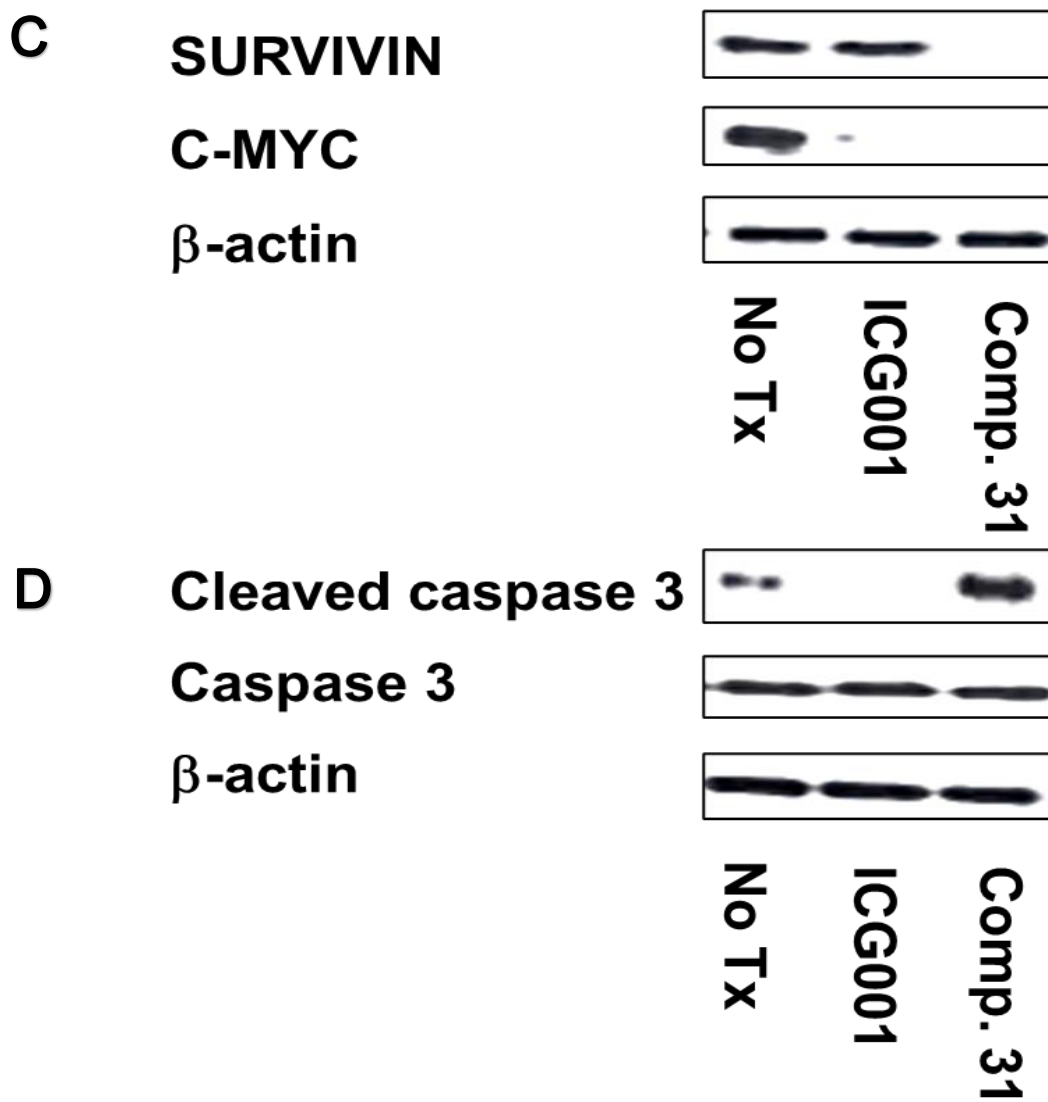


Figure 10. Effect of Comp. **31** against colorectal cancer (HT29) on the expression of Wnt/ β -catenin signaling-related molecules. (A) HT29 were incubated with Comp. **31** or ICG001 at the indicated concentrations for 24 h, and then mRNA levels of CTNNB1 (β -catenin) were detected by qRT-PCR. (B), (C) and (D) HT29 cells were treated with Comp. **31** or ICG001 at the indicated concentrations for 72 h, and then protein levels of the indicated Wnt/ β -catenin signaling-related molecules were detected by western blotting. No Tx indicates treatment with DMSO as a solvent control.

第4項 考察

これまでに大腸がん治療の有用な標的として Wnt/ β -catenin 経路は注目され、様々な阻害薬が開発されてきている⁷¹。Emami K. H. らによって ICG001 が大腸がん細胞に対して効果を発揮することが示されている³³。前節で AML 細胞で効果を示した Comp. 31 について、他のがん種での効果の可能性を検証するため、ヒト大腸がん細胞株に対する *in vitro* での抗腫瘍効果を検討した。

ヒト大腸がん細胞株 SW480 に Super TOP flash plasmid を導入した細胞 (Luc-SW480 細胞) を作製し、TCF-Luc 活性に及ぼす影響を検討した結果、Comp. 31 は大腸がん細胞株に対しても TCF-Luc 活性の減少を誘導した。この結果は、Comp. 31 が恒常的に Wnt/ β -catenin シグナルが活性化している大腸がん細胞に対し同シグナルの抑制効果を示し、本経路を阻害する化合物であることを示す上で重要な所見と考える。また SW480 細胞は APC に変異を有する細胞株であり⁷⁷、Wnt タンパク質の有無に関係なくシグナルが活性化していると考えられる。実際大腸がん細胞を用いたルシフェラーゼレポートアッセイでは、Wnt 上清を添加せずとも、TCF-Luc の活性を示している。よって APC に変異がある大腸がん細胞でも TCF-Luc の活性を抑制するということが、Comp. 31 が APC より下流で Wnt/ β -catenin 経路を抑制しているということが推察される。このことは、Comp. 31 の阻害作用メカニズム解析において重要な知見になると考える。

次にヒト大腸がん細胞株においても WST-8 アッセイを用いて細胞増殖抑制効果を確認した。細胞増殖において Wnt/ β -catenin 経路依存性の細胞株 (HT29 細胞) と細胞増殖においては Wnt/ β -catenin 非依存性の細胞株 (RKO 細胞) で比較検討を行った。HT29 細胞は変異型 APC を有して β -catenin が高発現しているのに対し、RKO 細胞は野生型 APC を有し細胞内 β -catenin 発現が低い⁷⁸。WST-8 アッセイの結果、HT29 細胞は RKO 細胞に対して、より低い濃度で細胞増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。これらの結果より Comp. 31 が Wnt/ β -catenin 経路を抑制することで増殖を抑制することが示唆された。

qRT-PCR による *CTNNB1* mRNA の発現量は AML 細胞における結果と同様に、Comp. 31 処置により減少した。しかしウエスタンブロッティング法によるタンパク質解析で *CTNNB1* のタンパク質発現は Comp. 31 処置によって変化が確認されず AML 細胞とは異なる結果が認められた。大腸がん細胞における *CTNNB1* の発現量が AML 細胞よりも高いことが要因であると推察される。大腸がん細胞と AML 細胞での Wnt/ β -catenin 経路のシグナル活性の違いおよび β -catenin の発現量の違いは現状検証ができていないが、 β -catenin は細胞接着因子の E-cadherin の裏打ちタンパク質として機能を有していることから²¹、細胞接着因子の E-cadherin の発現量と、 β -catenin の発現量が比例することが推察される。また大腸がん細胞は接着性の強い上皮細胞であることからしても E-cadherin は高発現し、それに伴って β -catenin の発現が高くなることが考えられる⁷⁹。一方白血病の E-cadherin に関しては、Rao Q. らは、AML 細胞株 (U937 および HL-60) を用いて E-cadherin に対する siRNA 処置を行い、細胞増殖の変化を解析した。その結果は E-cadherin の低発現が白血病発生に寄与していることを示している⁸⁰。よって血球系の細胞である白血病細胞では、E-cadherin の発現が大腸がんに比して低いことが予想され、それに伴い、 β -catenin の発現も大腸がん細胞より低発現であることが考えられる。これらの所見から大腸がん細胞では β -catenin の発現量が高く、今回のウエスタンブロット法では本化合物によるタンパク質発現量の変化が検出できなかったと考察する。しかし関連遺伝子の発現低下を認めたことから、 β -catenin 核内移行についての検討は行っていないが、 β -catenin/TCF 転写活性を変化させた

と推察する。Comp. 31 処置による Wnt/ β -catenin 経路の標的遺伝子のタンパク質発現変化の解析では、細胞増殖に関わる C-MYC および抗アポトーシスタンパク質である SURVIVIN の発現が抑制されることを確認した。それに対して ICG001 では第 2 章第 1 項の AML 細胞での解析と同様に SURVIVIN の発現変化は認められなかった。またアポトーシスの関連タンパク質である cleaved caspase 3⁶² の発現が上昇している結果からも、大腸がん細胞においても Comp. 31 はアポトーシスを誘導していることが示された。大腸がんにおいてもアポトーシス誘導に関わる分子の発現変化の差が Comp. 31 と ICG001 との間に認められ AML 細胞での結果を裏付ける所見となった。

以上より、Comp. 31 は AML 細胞に加えて大腸がん細胞に対しても Wnt/ β -catenin 経路を抑制し、抗腫瘍効果を発揮している可能性を明らかにした。

総括

第1章では、まず、ヒト胎児腎細胞 HEK293 細胞に Super TOP flash プラスミドを導入し、安定発現を確認した TOP 細胞を作製した。この TOP 細胞を用いて TCF ルシフェラーゼレポーターアッセイでの TCF-Luc 活性を指標としたスクリーニング系を確立した。次いで、評価対象化合物として既知の Wnt/ β -catenin 阻害薬である ICG001 との構造類似性から京都薬科大学薬品化学分野で合成された化合物から SARS 3CL^{pro} 阻害剤合成中間体を選択した。先に確立したスクリーニング系を用いて評価したところ、複数の有望な化合物を見出した。しかしながら、これらの SARS 3CL^{pro} 阻害剤合成中間体は合成が困難な為さらなる構造展開は容易ではない。そこで、合成が簡便であり、多様なアミノ酸誘導体を容易に利用可能なジペプチド型阻害薬を SARS 3CL^{pro} 阻害剤合成中間体を基に新たに設計し、合成と評価を行った。その結果、ICG001 よりも高活性な Comp. 31 を見出した。

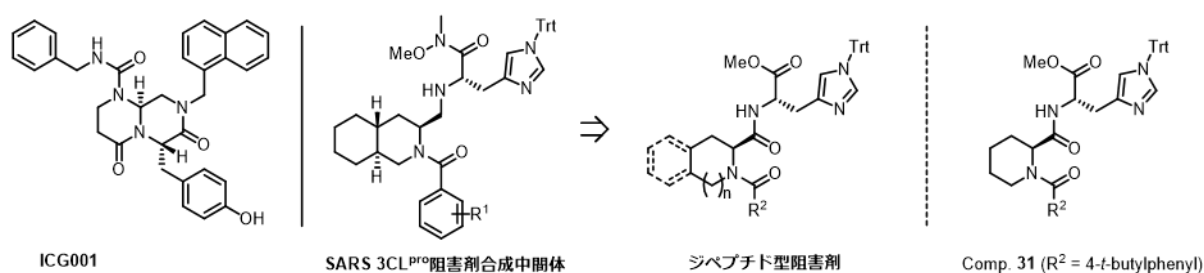


Figure 11. Structure of Comp. 31 and its outline of development history

第2章では、Comp. 31 における AML 細胞株と大腸がん細胞株における抗腫瘍効果を検討したところ、各々の細胞において細胞増殖抑制効果を示した。AML 細胞株においては細胞周期の停止およびアポトーシスの誘導、さらにはイダルビシンとの併用によって相乗効果を発揮することを確認した。また Comp. 31 の細胞増殖抑制および細胞死誘導のメカニズムに ROS が部分的に関連している可能性が示唆された。qRT-PCR による解析で *CTNNB1* mRNA の発現が抑制されることが、AML 細胞株と大腸がん細胞株ともに確認された。しかし、未だ本化合物の詳細な作用メカニズムは十分には明らかにはできていない。今後標的分子を同定し、構造最適化を実施し、より効果の高い薬剤を設計していくことが必要である。

Wnt/ β -catenin 経路は、その経路の異常が、がん幹細胞の発生維持、抗がん剤への耐性に関わることが明らかとなっている重要ながん治療標的である。そのため本経路を阻害する薬剤は既存の抗がん剤に対する耐性化や再発などの臨床における諸問題を解決する可能性を大いに秘めている。また本経路の異常はさまざまながん種で報告されていることから、本経路を標的とする薬剤を開発することが多様ながん種に対して有効性を示す可能性を有している。

本研究ではその標的に対する化合物の開発を行い、Wnt/ β -catenin 経路を阻害し、AML 細胞と大腸がんに対して効果を発揮する Comp. 31 を見出した。細胞死を強く誘導する点や ROS の産生が高いことなど、Comp. 31 と ICG001 は異なる点もあり、既存の Wnt/ β -catenin 経路阻害薬とは異なる新たな機序を有している可能性も考えられる。またジペプチド型阻害薬である Comp. 31 は短段階での合成が可能であり、多様なアミノ酸誘導体が容易に利用可能であるという利点をもつ。これは今後標的分子を同定しさらなる化合物の構造最適化を行い、*in vitro*、*in vivo* 研究を広げていく上で大変有益である

と考えられる。

本研究の成果は、最終的に薬剤の開発が成功するまでの大きな礎となり、これまで難治性腫瘍とされてきた Wnt/ β -catenin 経路活性化腫瘍に対して、治療効果を期待できる治療薬創出につながる知見である。

謝辞

本稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました京都薬科大学病態生理学分野 芦原英司 教授ならびに細木誠之 准教授、戸田侑紀 助教に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり、化合物の設計・合成や懇切丁寧な研究の助言や指導と激励を賜りました京都薬科大学共同利用機器センター服部恭尚 講師、京都薬科大学薬品化学分野小林数也 准教授、京都薬科大学 赤路健一 副学長にならびにスクリーニング系の立ち上げに尽力くださり、研究の助言を頂きました京都薬科大学 統合薬学系分野 高田和幸 教授 そして、研究を進める上で重要なご助言を頂きました京都薬科大学 臨床腫瘍学分野 中田晋 准教授には謹んで深く感謝の意を表します。

本論文の作成にあたり、ご助言とご高閲を賜りました京都薬科大学薬化学分野 古田巧 教授ならびに薬物治療学分野 加藤伸一 教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行に際して大いなる御教示と御協力をいただきました病態生理学分野、菅倫子 学士、大矢博己 学士、川幡尚平 学士、磯村拳一 学士、奥野亜弓 学士、三好美早紀 学士、田村優衣 学士、樫本美 学士、瀧本千穂 学士、柴谷諒 学士、平石沙織 学士、羽立祐貴氏、尾川菜々子氏、柏崎隼人氏、関謙成氏の諸氏ならびに同分野学生の皆様そして評価化合物の合成に御協力をいただきました薬品化学分野、嶋本康広 博士、石地真邑 学士、萩原瑠美 学士、細谷早希 学士には厚く御礼申し上げます。

4年間の研究生生活において、苦しい時も楽しい時も励まし支えて下さった、河西翔平 博士、黒田絵莉子 博士、角陽子 博士、宮下雅亜 先生、甘利圭悟 学士、友金眞光 学士、今吉菜月 学士、佐野友亮 学士、杉山雄輝 学士、清水大器 学士、松井透磨 学士、吉澤正人 学士の諸氏には心から感謝し、厚く御礼申し上げます。

最後にこの4年間の大学院生活を陰ながら支えてくれた父と、私にがんの研究を志すきっかけを作ってくれた亡き母に心から深く感謝いたします。

参考文献

1. 国立がん研究センター. 最新がん統計. 2019.
2. Claudiani S, Apperley J F. The Argument for Using Imatinib in CML. *Hematol. (United States)*. **2018**, 2018, 161–167.
3. Hamanishi J, Mandai M, Ikeda T, et al. Safety and Antitumor Activity of Anti-PD-1 Antibody, Nivolumab, in Patients with Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *J. Clin. Oncol.* **2015**, 33, 4015–4022.
4. MacDonald B T, Tamai K, He X. Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev. Cell.* **2009**, 17, 9–26.
5. Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell.* **2006**, 127, 469–480.
6. Humphries A C, Mlodzik M. From Instruction to Output: Wnt/PCP Signaling in Development and Cancer. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2018**, 51, 110–116.
7. Chen Y, Chen Z, Tang Y, Xiao Q. The Involvement of Noncanonical Wnt Signaling in Cancers. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, 133, 110946.
8. Ashihara E, Takada T, Maekawa T. Targeting the Canonical Wnt/ β -Catenin Pathway in Hematological Malignancies. *Cancer Sci.* **2015**, 106, 665–671.
9. Karner C M, Long F. Wnt Signaling and Cellular Metabolism in Osteoblasts. *Cell. Mol. Life Sci.* **2017**, 74, 1649–1657.
10. Ahmed Y, Nouri A, Wieschaus E. Drosophila Apc1 and Apc2 Regulate Wingless Transduction throughout Development. *Development.* **2002**, 129, 1751–1762.
11. Dajani R, Fraser E, Roe S M, Young N, Good V, Dale T C, Pearl L H. Crystal Structure of Glycogen Synthase Kinase 3 β : Structural Basis for Phosphate-Primed Substrate Specificity and Autoinhibition. *Cell.* **2001**, 105, 721–732.
12. Schneider R K, Ademà V, Heckl D, Järås M, Mallo M, Lord A M, Chu L P, McConkey M E, Kramann R, Mullally A, Bejar R, Solé F, Ebert B L. Role of Casein Kinase 1A1 in the Biology and Targeted Therapy of Del(5q) MDS. *Cancer Cell.* **2014**, 26, 509–520.
13. Salahshor S, Woodgett J R. The Links between Axin and Carcinogenesis. *J. Clin. Pathol.* **2005**, 58, 225–236.
14. Marikawa Y, Elinson R P. B-TrCP Is a Negative Regulator of the Wnt / β -Catenin Signaling Pathway and Dorsal Axis Formation in Xenopus Embryos. **1998**, 77, 75–80.
15. Stamos J L, Weis W I. The β -Catenin Destruction Complex. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, 5, 1–16.
16. Zeng C M, Chen Z, Fu L. Frizzled Receptors as Potential Therapeutic Targets in Human Cancers. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19.
17. Roslan Z, Muhamad M, Selvaratnam L, Ab-Rahim S. The Roles of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Proteins 5, 6, and 8 in Cancer: A Review. *J. Oncol.* **2019**, 2019, 1–6.
18. Sharma M, Castro-Piedras I, Simmons G E, Pruitt K. Dishevelled: A Masterful Conductor of Complex Wnt Signals. *Cell. Signal.* **2018**, 47, 52–64.
19. Laphanuwat P, Likasitwatanakul P, Sittithumcharee G, Thaphaengphan A, Chomanee N, Suppramote O,

- Ketaroonrut N, Charngkaew K, Lam E W-F, Okada S, Panich U, Sampattavanich S, Jirawatnotai S. Cyclin D1 Depletion Interferes with Oxidative Balance and Promotes Cancer Cell Senescence. *J. Cell Sci.* **2018**, 131.
20. He T C, Sparks A B, Rago C, Hermeking H, Zawel L, Da Costa L T, Morin P J, Vogelstein B, Kinzler K W. Identification of C-MYC as a Target of the APC Pathway. *Science.* **1998**, 281, 1509–1512.
 21. Ozawa M, Barbault H, Kemler R. The Cytoplasmic Domain of the Cell Adhesion Molecule Uvomorulin Associates with Three Independent Proteins Structurally Related in Different Species. *EMBO J.* **1989**, 8, 1711–1717.
 22. Van Der Wal T, Van Amerongen R. Walking the Tight Wire between Cell Adhesion and WNT Signalling: A Balancing Act for β -Catenin: A Balancing Act for CTNNB1. *Open Biol.* **2020**, 10.
 23. Gruszka A M, Valli D, Alcalay M. Wnt Signalling in Acute Myeloid Leukaemia. *Cells.* **2019**, 8, 1–18.
 24. Bonnet D, Dick J E. Human Acute Myeloid Leukemia Is Organized as a Hierarchy That Originates from a Primitive Hematopoietic Cell. *Nat. Med.* **1997**, 3, 730–737.
 25. Magee J A, Piskounova E, Morrison S J. Cancer Stem Cells: Impact, Heterogeneity, and Uncertainty. *Cancer Cell.* **2012**, 21, 283–296.
 26. Hata A N, Niederst M J, Archibald H L, et al. Tumor Cells Can Follow Distinct Evolutionary Paths to Become Resistant to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibition. *Nat. Med.* **2016**, 22, 262–269.
 27. Mashima T. Cancer Stem Cells (CSCs) as a Rational Therapeutic Cancer Target, and Screening for CSC-Targeting Drugs. *Yakugaku Zasshi.* **2017**, 137, 129–132.
 28. Katoh M. Canonical and Non-Canonical WNT Signaling in Cancer Stem Cells and Their Niches: Cellular Heterogeneity, Omics Reprogramming, Targeted Therapy and Tumor Plasticity (Review). *Int. J. Oncol.* **2017**, 51, 1357–1369.
 29. Wang Y, Krivtsov A V, Sinha A U, North T E, Goessling W, Feng Z, Zon L I, Armstrong S A. The Wnt/Beta-Catenin Pathway Is Required for the Development of Leukemia Stem Cells in AML. *Science.* **2010**, 327, 1650–3.
 30. Zhao Y, Masiello D, McMillian M, Nguyen C, Wu Y, Melendez E, Smbatyan G, Kida A, He Y, Teo J L, Kahn M. CBP/Catenin Antagonist Safely Eliminates Drug-Resistant Leukemia-Initiating Cells. *Oncogene.* **2016**.
 31. Zhong Z, Virshup D M. Wnt Signaling and Drug Resistance in Cancer. *Mol. Pharmacol.* **2020**, 97, 72–89.
 32. Krishnamurthy N, Kurzrock R. Targeting the Wnt/Beta-Catenin Pathway in Cancer: Update on Effectors and Inhibitors. *Cancer Treat. Rev.* **2018**, 62, 50–60.
 33. Emami K H, Nguyen C, Ma H, Kim D H, Jeong K W, Eguchi M, Moon R T, Teo J-L, Oh S W, Kim H Y, Moon S H, Ha J R, Kahn M. A Small Molecule Inhibitor of β -Catenin/CREB-Binding Protein Transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**, 101, 12682–12687.
 34. Huang S M A, Mishina Y M, Liu S, et al. Tankyrase Inhibition Stabilizes Axin and Antagonizes Wnt Signalling. *Nature.* **2009**, 461, 614–620.
 35. Li X, Zhou X, Hua F, Fan Y, Zu L, Wang Y, Shen W, Pan H, Zhou Q. The RNA-Binding Protein

- Sam68 Is Critical for Non-Small Cell Lung Cancer Cell Proliferation by Regulating Wnt/ β -Catenin Pathway. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2017**, 10, 8281–8291.
36. Shaw Holly V, Alexey K, Katanaev V. Targeting the Wnt Signalling Pathway in Cancer: Prospects and Perils. *Swiss Med. Wkly.* **2019**, 149, 1–8.
 37. Pak S, Park S, Kim Y, Park J H, Park C H, Lee K J, Kim C S, Ahn H. The Small Molecule WNT/ β -Catenin Inhibitor CWP232291 Blocks the Growth of Castration-Resistant Prostate Cancer by Activating the Endoplasmic Reticulum Stress Pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, 38, 1–13.
 38. Le P N, McDermott J D, Jimeno A. Targeting the Wnt Pathway in Human Cancers: Therapeutic Targeting with a Focus on OMP-54F28. *Pharmacol. Ther.* **2015**, 146, 1–11.
 39. Moore K N, Gunderson C C, Sabbatini P, McMeekin D S, Mantia-Smaldone G, Burger R A, Morgan M A, Kapoun A M, Brachmann R K, Stagg R, Farooki A, O’Cearbhaill R E. A Phase 1b Dose Escalation Study of Ipafricept (OMP—54F28) in Combination with Paclitaxel and Carboplatin in Patients with Recurrent Platinum-Sensitive Ovarian Cancer. *Gynecol. Oncol.* **2019**, 154, 294–301.
 40. Shimamoto Y, Hattori Y, Kobayashi K, Teruya K, Sanjoh A, Nakagawa A, Yamashita E, Akaji K. Fused-Ring Structure of Decahydroisoquinolin as a Novel Scaffold for SARS 3CL Protease Inhibitors. *Bioorganic Med. Chem.* **2015**, 23, 876–890.
 41. Teruya K, Hattori Y, Shimamoto Y, Kobayashi K, Sanjoh A, Nakagawa A, Yamashita E, Akaji K. Structural Basis for the Development of SARS 3CL Protease Inhibitors from a Peptide Mimic to an Aza-Decaline Scaffold. *Biopolymers.* **2016**, 106, 391–403.
 42. Yao H, Ashihara E, Strovel J W, Nakagawa Y, Kuroda J, Nagao R, Tanaka R, Yokota A, Takeuchi M, Hayashi Y, Shimazaki C, Taniwaki M, Strand K, Padia J, Hirai H, Kimura S, Maekawa T. AV-65, a Novel Wnt/ β -Catenin Signal Inhibitor, Successfully Suppresses Progression of Multiple Myeloma in a Mouse Model. *Blood Cancer J.* **2011**, 1.
 43. Matsuzaki S, Darcha C. In Vitro Effects of a Small-Molecule Antagonist of the Tcf/ β -Catenin Complex on Endometrial and Endometriotic Cells of Patients with Endometriosis. *PLoS One.* **2013**, 8.
 44. Ishibashi M. Screening for Natural Products That Affect Wnt Signaling Activity. *J. Nat. Med.* **2019**, 73, 697–705.
 45. Ysebaert L, Chicanne G, Demur C, De Toni F, Prade-Houdellier N, Ruidavets J B, Mansat-De Mas V, Rigal-Huguet F, Laurent G, Payrastré B, Manenti S, Racaud-Sultan C. Expression of β -Catenin by Acute Myeloid Leukemia Cells Predicts Enhanced Clonogenic Capacities and Poor Prognosis. *Leukemia.* **2006**, 20, 1211–1216.
 46. Surana R, Sikka S, Cai W, Myoung E, Warriar S R, Jie H, Tan G, Arfuso F, Fox S A, Dharmarajan A M, Prem A. Biochimica et Biophysica Acta Secreted Frizzled Related Proteins : Implications in Cancers. *BBA - Rev. Cancer.* **2014**, 1845, 53–65.
 47. Huang Y, Liu L, Liu A. Dickkopf-1: Current knowledge and related diseases. *Life Sci.* **2018**, 15, 249–254.
 48. Valencia A, Román-Gómez J, Cervera J, Such E, Barragán E, Bolufer P, Moscardó F, Sanz G F, Sanz M A. Wnt Signaling Pathway Is Epigenetically Regulated by Methylation of Wnt Antagonists in Acute

- Myeloid Leukemia. *Leukemia*. **2009**, 23, 1658–1666.
49. Ohtake S, Miyawaki S, Fujita H, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, Okumura H. Randomized Study of Induction Therapy Comparing Standard-Dose IDR with High-Dose DNR in AML JALSG AML201. *Blood*. **2011**, 117, 2358–2366.
 50. Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum F R, Thomas B, Ebert B L, Fenaux P, Larson R A, Levine R L, Lo-coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele G J, Sanz M, Sierra J, Tallman M S. Review Article Diagnosis and Management of AML in Adults : 2017 ELN Recommendations from an International Expert Panel. **2017**, 129, 424–447.
 51. Dang C V. MYC on the Path to Cancer. *Cell*. **2012**, 149, 22–35.
 52. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. **2006**, 126, 663–676.
 53. Stacey D W. Cyclin D1 Serves as a Cell Cycle Regulatory Switch in Actively Proliferating Cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, 15, 158–163.
 54. Kapisiris I, Nastos K, Karakatsanis A, Theodosopoulos T, Karandrea D, Kondi-Pafiti A, Contis J. Survivin Expression in Hepatocellular Carcinoma. Correlation with Clinicopathological Characteristics and Overall Survival. *J. B.U.ON.* **2019**, 24, 1934–1942.
 55. Chou T C. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacol. Rev.* **2006**, 58, 621–681.
 56. Chou T C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Res.* **2010**, 70, 440–446.
 57. Kawata E, Ashihara E, Nakagawa Y, Kiuchi T, Ogura M, Yao H, Sakai K, Tanaka R, Nagao R, Yokota A, Takeuchi M, Kimura S, Hirai H, Maekawa T. A Combination of a DNA-Chimera SiRNA against PLK-1 and Zoledronic Acid Suppresses the Growth of Malignant Mesothelioma Cells in Vitro. *Cancer Lett.* **2010**, 294, 245–253.
 58. Li X, Wei Y, Wei X. Napabucasin, a Novel Inhibitor of STAT3, Inhibits Growth and Synergises with Doxorubicin in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Cancer Lett.* **2020**, 491, 146–161.
 59. Liu Y, Zang R, Li F, Shi C, Zhao J, Zhong L, Wang X, Yang J, Li W. Combination of a Novel Microtubule Inhibitor MBRI-001 and Gemcitabine Synergistically Induces Cell Apoptosis by Increasing DNA Damage in Pancreatic Cancer Cell Lines. *Invest. New Drugs.* **2020**, 38, 1207–1217.
 60. Redza-Dutordoir M, Averill-Bates D A. Activation of Apoptosis Signalling Pathways by Reactive Oxygen Species. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2016**, 1863, 2977–2992.
 61. Circu M L, Aw T Y. Reactive Oxygen Species, Cellular Redox Systems, and Apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* **2010**, 48, 749–762.
 62. Yang X, Tang S, Dai C, Li D, Zhang S, Deng S, Zhou Y, Xiao X. Quinocetone Induces Mitochondrial Apoptosis in HepG2 Cells through ROS-Dependent Promotion of VDAC1 Oligomerization and Suppression of Wnt1/β-Catenin Signaling Pathway. *Food Chem. Toxicol.* **2017**, 105, 161–176.
 63. Wu S, Yang Y, Li F, Huang L, Han Z, Wang G, Yu H, Li H. Chelerythrine Induced Cell Death through ROS-Dependent ER Stress in Human Prostate Cancer Cells. *Onco. Targets. Ther.* **2018**, 11, 2593–2601.

64. Essers M A G, De Vries-Smits L M M, Barker N, Polderman P E, Burgering B M T, Korswagen H C. Functional Interaction between β -Catenin and FOXO in Oxidative Stress Signaling. *Science*. **2005**, 308, 1181–1184.
65. Sun S Y. N-Acetylcysteine, Reactive Oxygen Species and Beyond. *Cancer Biol. Ther.* **2010**, 9.
66. Cristofaro M, Contursi A, D'Amore S, Martelli N, Spaziante A F, Moschetta A, Villani G. Adenomatous Polyposis Coli (APC)-Induced Apoptosis of HT29 Colorectal Cancer Cells Depends on Mitochondrial Oxidative Metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2015**, 1852, 1719–1728.
67. Yeung J, Esposito M T, Gandillet A, Zeisig B B, Griessinger E, Bonnet D, So C W E. β -Catenin Mediates the Establishment and Drug Resistance of MLL Leukemic Stem Cells. *Cancer Cell*. **2010**, 18, 606–618.
68. Zhou Y, Liang C, Xue F, Chen W, Zhi X, Feng X. Salinomycin Decreases Doxorubicin Resistance in Hepatocellular Carcinoma Cells by Inhibiting the β -Catenin / TCF Complex Association via FOXO3a Activation. *Oncotarget*. **2015**. 30, 10350-10365.
69. Mody K, Baldeo C, Bekaii-Saab T. Antiangiogenic Therapy in Colorectal Cancer. *Cancer J. (United States)*. **2018**, 24, 165–170.
70. Kwong L N, Dove W F. APC and Its Modifiers in Colon Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2009**, 656, 85–106.
71. Sebio A, Kahn M, Lenz H J. The Potential of Targeting Wnt/ β -Catenin in Colon Cancer. *Expert Opin. Ther. Targets*. **2014**, 18, 611–615.
72. Hamada F. Wnt Signaling and Cancer. *Kaibogaku Zasshi*. **2009**, 84, 111–112.
73. Aoki K, Taketo M M. Adenomatous Polyposis Coli (APC): A Multi-Functional Tumor Suppressor Gene. *J. Cell Sci.* **2007**, 120, 3327–3335.
74. Kawahara K, Morishita T, Nakamura T, Hamada F, Toyoshima K, Akiyama T. Down-Regulation of β -Catenin by the Colorectal Tumor Suppressor APC Requires Association with Axin and β -Catenin. *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 8369–8374.
75. Wanitsuwan W, Kannngum S, Boonpipattanapong T, Sangthong R, Sangkhathat S. Overall Expression of Beta-Catenin Outperforms Its Nuclear Accumulation in Predicting Outcomes of Colorectal Cancers. *World J. Gastroenterol.* **2008**, 14, 6052–6059.
76. Baldus S E, Mönig S P, Huxel S, Landsberg S, Hanisch F G, Engelmann K, Schneider P M, Thiele J, Hölscher A H, Dienes H P. MUC1 and Nuclear β -Catenin Are Coexpressed at the Invasion Front of Colorectal Carcinomas and Are Both Correlated with Tumor Prognosis. *Clin. Cancer Res.* **2004**, 10, 2790–2796.
77. Schneikert J, Fodde R. Truncated APC Is Required for Cell Proliferation and DNA Replication. **2006**, 79, 74–79.
78. Ou C Y, LaBonte M J, Manegold P C, So A Y L, Ianculescu I, Gerke D S, Yamamoto K R, Ladner R D, Kahn M, Kim J H, Stallcup M R. A Coactivator Role of CARM1 in the Dysregulation of β -Catenin Activity in Colorectal Cancer Cell Growth and Gene Expression. *Mol. Cancer Res.* **2011**, 9, 660–670.
79. Van Roy F, Bex G. The Cell-Cell Adhesion Molecule E-Cadherin. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, 65, 3756–

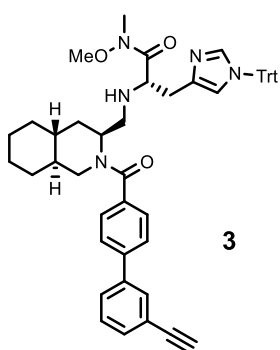
3788.

80. Rao Q, Wang J, Meng J, Tang K, Wang Y, Wang M, Xing H, Tian Z, Wang J. Low-Expression of E-Cadherin in Leukaemia Cells Causes Loss of Homophilic Adhesion and Promotes Cell Growth. *Cell Biol. Int.* **2011**, 35, 945–951.

Supplemental data

分析薄層クロマトグラフィー (TLC) は Silica gel 70 F₂₅₄, 0.25 mm TLC Plate-Wako (FUJIFILM 和光純薬) を用いた。分取薄層クロマトグラフィー (PTLC) は Silica gel 70 F₂₅₄, 0.75 mm TLC Plate-Wako (FUJIFILM 和光純薬) を使用した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーには Wakogel[®] 60N (particle size, 63-212 μm, FUJIFILM 和光純薬) を用いて行った。高分解能質量分析 (HRMS) 測定は LCMS-IT-TOF (ESI、島津製作所) または GCmate II (EI、日本電子) のいずれかを使用した。¹H NMR (核磁気共鳴) スペクトルは重クロロホルム中で Avance III 300 MHz spectrometer (300 MHz、Bruker) で測定した。ケミカルシフトはテトラメチルシランの 0.00 ppm を内部標準物質の基準値とした。¹³C NMR スペクトルは重クロロホルム中で同装置 (75 MHz、Bruker) を用いて測定し、重クロロホルムの 77.0 ppm を内部標準物質の基準値とした。また、カップリング定数には Hz を使用した。

Compound (Comp.) **1-23** は以前の報告に従って合成した (Schema 4A) ^{40,41}。新たに合成した化合物の NMR および HRMS のデータは以下の通り。

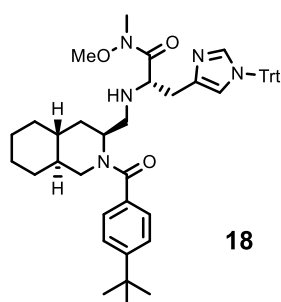


Comp. 3

(S)-2-(((3*S*,4*aR*,8*aS*)-2-(3'-ethynyl-[1,1'-biphenyl]-4-carbonyl)decahydroisoquinolin-3-yl)methyl)amino)-*N*-methoxy-*N*-methyl-3-(1-trityl-1*H*-imidazol-4-yl)propanamide

¹H NMR (60:40 mixture of two amide rotamers): δ = 7.70 (br d, *J* = 6.9 Hz, 1.2H), 7.61-7.30 (m, 17.8H), 7.13-7.08 (m, 6H), 6.62 (s, 0.6H), 6.56 (s, 0.4H), 4.93 (br s, 0.6H), 4.43-4.40 (m, 0.4H), 4.16-4.11 (m, 0.6H), 3.91 (m, 1H), 3.77-3.76 (m, 0.4H), 3.68 (s, 1.8H), 3.50 (s, 1.2H), 3.39-3.35 (m, 0.6H), 3.14 (s, 1.8H), 3.08 (s, 1.2H), 2.83-2.81 (m, 2.4H), 2.71-2.69 (m, 1.6H), 2.49-2.42 (m, 0.4H), 2.31-2.29 (m, 0.4H), 2.05-2.01 (m, 1.6H), 1.79-1.54 (m, 3H), 1.39-1.26 (m, 6H), 1.07-0.83 (m, 2H); ¹³C NMR: δ = 171.2, 170.5, 142.44, 142.41, 140.9, 140.8, 140.7, 140.6, 138.2, 136.4, 136.2, 131.2, 130.8, 129.8, 129.7, 128.8, 128.0, 127.6, 127.5, 127.4, 127.1, 127.0, 122.63, 122.60, 119.3, 83.4, 75.1, 61.7, 57.6, 55.6, 49.5, 48.3, 47.2, 46.7, 43.1, 42.6, 42.1, 36.5, 36.3, 34.5, 33.0, 32.9, 32.8, 32.0, 31.9, 30.0, 29.7, 29.3, 26.2, 26.1, 25.9, 25.7; HRMS (ESI) Calcd. For C₅₂H₅₄N₅O₃ [M+H]⁺: 796.4221. Found:

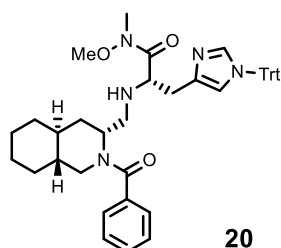
796.4231.



Comp. 18

(*S*)-2-(((3*S*,4*aR*,8*aS*)-2-(4-*tert*-butyl)benzoyl)decahydroisoquinolin-3-yl)methyl)amino)-*N*-methoxy-*N*-methyl-3-(1-trityl-1*H*-imidazol-4-yl)propanamide

^1H NMR (60:40 mixture of two amide rotamers): δ = 7.36-7.24 (m, 15H), 7.14-7.11 (m, 6H), 6.61 (s, 0.6H), 6.56 (s, 0.4H), 4.86 (m, 0.6H), 4.39 (dd, J = 12.9, 3.9 Hz, 0.4H), 4.11 (m, 0.6H), 3.94-3.91 (m, 0.8H), 3.71 (s, 1.8H), 3.50 (s, 1.2H), 3.50-3.37 (m, 0.6H), 3.13 (s, 1.8H), 3.08 (s, 1.2H), 2.88-2.81 (m, 3.4H), 2.75-2.68 (m, 1.6H), 1.79-1.52 (m, 4H), 1.31 (s, 5.4H), 1.29 (s, 4.6H), 1.40-1.25 (m, 6H), 1.09-0.80 (m, 2H); ^{13}C NMR: δ = 171.6, 152.2, 152.1, 142.5, 138.2, 134.2, 129.8, 129.7, 128.0, 127.9, 126.6, 125.3, 125.2, 119.3, 75.1, 61.5, 57.5, 55.4, 52.9, 49.5, 48.1, 47.1, 46.6, 45.7, 43.0, 42.6, 42.1, 36.5, 36.2, 34.7, 34.6, 33.1, 33.0, 32.1, 31.2, 30.0, 29.7, 26.2, 26.1, 25.9, 25.7; HRMS (ESI) Calcd. For $\text{C}_{47}\text{H}_{58}\text{N}_5\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 752.4534. Found: 752.4542.

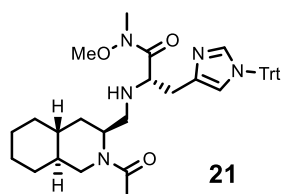


Comp. 20

(*S*)-2-(((3*R*,4*aS*,8*aR*)-2-benzoyldecahydroisoquinolin-3-yl)methyl)amino)-*N*-methoxy-*N*-methyl-3-(1-trityl-1*H*-imidazol-4-yl)propanamide

^1H NMR (50:50 mixture of two amide rotamers): δ = 7.41-7.30 (m, 15H), 7.11 (br s, 7H), 6.57 (br s, 0.5H), 6.54 (s, 0.5H), 4.99 (m, 0.5H), 4.44 (dd, J = 13.8, 2.7 Hz, 0.5H), 4.15 (br s, 0.5H), 3.85-3.69 (m, 0.5H), 3.65 (s, 1.5H), 3.52 (s, 1.5H), 3.39-3.34 (m, 1H), 3.13 (s, 1.5H), 3.10 (s, 1.5H), 3.06-2.88 (m, 1.5H), 2.80-2.63 (m, 1.5H), 2.51-2.32 (m, 2H), 1.6-1.58 (m, 4H), 1.45-1.26 (m, 6H), 1.01-0.81 (m, 2H); ^{13}C NMR: δ = 171.3, 171.1, 142.4, 138.1,

137.2, 136.9, 136.8, 129.73, 129.70, 129.1, 129.0, 128.5, 128.29, 128.25, 127.9, 126.9, 126.8, 119.5, 119.3, 75.1, 61.5, 57.6, 55.4, 50.5, 49.2, 48.3, 47.4, 47.2, 42.9, 42.7, 42.0, 36.6, 36.5, 34.5, 33.5, 33.0, 32.9, 32.2, 29.9, 29.6, 26.2, 26.0, 25.8, 25.7; HRMS (ESI) Calcd. For C₄₄H₅₀N₅O₃ [M+H]⁺: 696.3908. Found: 696.3902.



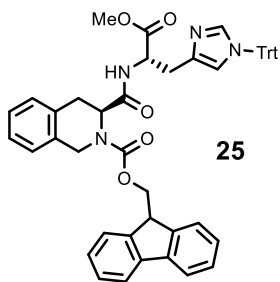
Comp. 21

(*S*)-2-(((3*S*,4*aR*,8*aS*)-2-acetyldecahydroisoquinolin-3-yl)methyl)amino)-*N*-methoxy-*N*-methyl-3-(1-trityl-1*H*-imidazol-4-yl)propanamide

¹H NMR (50:50 mixture of two amide rotamers): δ = 7.34-7.31 (m, 10H), 7.14-7.11 (m, 6H), 6.59 (s, 0.5H), 6.58 (s, 0.5H), 4.76-4.75 (m, 0.5H), 4.37 (dd, *J* = 13.4, 3.5 Hz, 0.5H), 4.00 (br s, 0.5H), 3.89 (m, 0.5H), 3.66 (s, 1.5H), 3.61 (d, *J* = 3.0 Hz, 0.5H), 3.58 (s, 1.5H), 3.35 (dd, *J* = 12.6, 2.7 Hz, 0.5H), 3.12 (s, 3H), 2.84-2.49 (m, 3H), 2.21-2.13 (m, 1H), 2.08 (s, 1.5H), 2.00 (s, 1.5H), 1.95 (br s, 1H), 1.72-1.53 (m, 4H), 1.25-1.09 (m, 6H), 1.00-0.82 (m, 2H); ¹³C NMR: δ = 169.6, 169.3, 142.54, 142.48, 138.3, 138.1, 137.3, 129.80, 128.75, 128.0, 119.4, 119.3, 61.6, 57.6, 54.7, 48.3, 47.7, 47.2, 42.5, 42.4, 41.7, 36.1, 36.0, 34.2, 33.0, 32.5, 32.2, 30.0, 29.9, 29.7, 26.2, 26.1, 25.8, 22.0, 21.8; HRMS (ESI) Calcd. For C₃₉H₄₈N₅O₃ [M+H]⁺: 634.3752. Found: 634.3757.

Comp. 24 は市販品（渡辺化学工業）を用いた。Comp. 25-28 と 31 は以下の方法で新たに合成した（Schema 4B）。

氷冷攪拌下、HCl·H-His(Trt)-OMe（1.1 等量）と *N*-メチルモリホリン（NMM、5.0 等量）、ベンゾトリアズリル-*N*-ヒドロキシトリスジメチルアミノホスホニウムヘキサフルオロリン化物塩（BOP、1.2 等量）のジクロロメタン溶液に保護アミノ酸 **A** を加え、室温で 16 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過してろ液を減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し粗生成して粗生成物 **B** を得た。粗生成物 **B** を 20% Et₂NH の MeCN 溶液に溶解し 20 分間攪拌した後、減圧下濃縮した。残渣をピリジンに溶解し、4-ジメチルアミノピリジン（DMAP、1.0 等量）と酸クロリド（2.0 等量）を加えて 16 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過してろ液を減圧下濃縮した。残渣を PTLC（CHCl₃/MeOH = 20:1）に付し、化合物 **C** を得た。

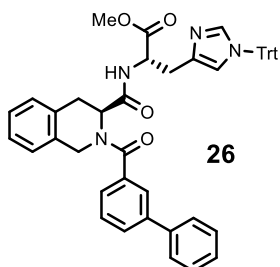


25

Comp. 25

(9*H*-fluoren-9-yl)methyl (*S*)-3-(((*S*)-1-methoxy-1-oxo-3-(1-trityl-1*H*-imidazol-4-yl)propan-2-yl)carbamoyl)-3,4-dihydroisoquinoline-2(1*H*)-carboxylate

Yield, 97%: ¹H NMR (55:45 mixture of two amide rotamers): δ = 8.50 (br d, *J* = 7.2 Hz, 0.55H), 8.11 (br d, *J* = 7.2 Hz, 0.45H), 7.72 (br d, *J* = 6.0 Hz, 2H), 7.59-7.51 (m, 2H), 7.35-7.14 (m, 17H), 7.07-7.01 (m, 7H), 6.50 (br s, 0.45H), 6.44 (br s, 0.55H), 5.06-5.00 (m, 1H), 4.86 (br t, *J* = 16.1 Hz, 1H), 4.74-4.62 (m, 2H), 4.51-4.41 (m, 1H), 4.32-4.21 (m, 2H), 3.49 (br s, 1.35H), 3.43 (s, 1.65H), 3.43-3.35 (m, 1H), 3.17-3.07 (m, 1H), 2.95-2.90 (m, 1H), 2.78-2.62 (m, 1H); ¹³C NMR: δ = 171.2, 171.0, 170.5, 170.3, 156.0, 155.5, 144.2, 143.8, 143.5, 142.0, 141.1, 140.9, 138.5, 136.3, 133.1, 132.8, 132.6, 129.5, 128.5, 128.1, 127.89, 127.87, 127.5, 127.1, 126.9, 126.5, 126.4, 126.1, 125.8, 125.4, 125.2, 125.0, 119.7, 119.3, 75.1, 68.3, 67.8, 55.4, 54.4, 52.5, 52.3, 51.8, 47.0, 44.6, 31.3, 30.4, 29.3; HRMS (ESI) Calcd. For C₅₁H₄₅N₄O₅ [M+H]⁺: 793.3384. Found: 793.3391.



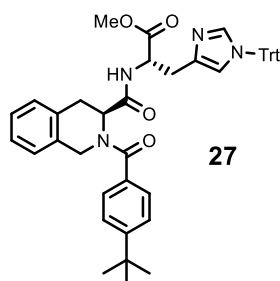
26

Comp. 26

Methyl *N*^{tr}-((*S*)-2-([1,1'-biphenyl]-3-carbonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carbonyl)-*N*^{tr}-trityl-L-histidinate

Yield, 78% (3 steps): ¹H NMR (55:45 mixture of two amide rotamers): δ = 8.48 (br d, *J* = 7.5 Hz, 0.55H), 8.09 (br d, *J* = 7.5 Hz, 0.45H), 7.76-7.72 (m, 2H), 7.60-7.51 (m, 2H), 7.41-7.30 (m, 3H), 7.28-7.23 (m, 12H), 7.21-7.11 (m, 3H), 7.07-7.01 (m, 7H), 6.50 (br s, 0.45H), 6.43 (br s, 0.55H), 5.05-4.97 (m, 1H), 4.86 (br t, *J* = 15.6 Hz, 1H), 4.73-4.60 (m, 1H), 4.46-4.41 (m, 1H), 4.31-4.18 (m, 1H), 3.50 (s, 1.35H), 3.43 (s, 1.65H), 3.11 (dt, *J* = 15.2, 5.9 Hz, 1H), 2.95 (dt, *J* = 13.9, 4.5 Hz, 1H), 2.76 (dd, *J* = 13.5, 4.2 Hz, 0.4H), 2.65 (dd, *J* = 14.7, 4.2 Hz, 0.6H); ¹³C NMR: δ = 171.3, 171.1, 170.6, 170.4, 156.1, 155.6, 144.25, 143.9, 143.7, 143.6, 142.1, 141.2, 141.0, 138.5, 136.4, 133.2,

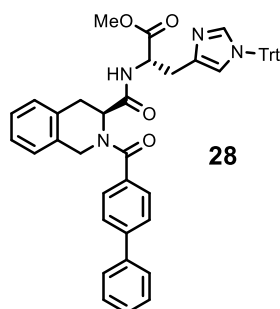
132.9, 132.7, 129.6, 128.6, 128.2, 127.98, 127.95, 127.6, 127.2, 127.0, 126.6, 126.2, 125.9, 125.5, 125.2, 125.1, 119.8, 119.4, 75.2, 68.4, 67.9, 55.5, 54.5, 52.6, 52.4, 51.9, 47.1, 44.7, 31.4, 30.5, 29.4; HRMS (ESI) Calcd. For $C_{49}H_{43}N_4O_4$ $[M+H]^+$: 751.3279. Found: 751.3270.



Comp. 27

Methyl N^α -((*S*)-2-(4(*tert*-butyl)benzoyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carbonyl)- N^ϵ -trityl-L-histidinate

Yield, 58% (3 steps): 1H NMR (60:40 mixture of two amide rotamers): δ = 8.96 (br d, J = 7.2 Hz, 0.6H), 8.21 (br d, J = 7.2 Hz, 0.4H), 7.62 (br d, J = 7.5 Hz, 0.8H), 7.52 (br d, J = 8.1 Hz, 1.2H), 7.43-7.37 (m, 2H), 7.31 (br s, 9H), 7.19-7.06 (m, 10.6H), 6.87-6.84 (m, 0.4H), 6.57 (br s, 0.4H), 6.50 (br s, 0.6H), 5.55 (br s, 0.4H), 5.30-5.24 (m, 0.6H), 4.88-4.78 (m, 2H), 4.71-4.41 (m, 0.4H), 4.54-4.18 (m, 0.6H), 3.56 (s, 1.8H), 3.54 (s, 1.2H), 3.43-3.38 (m, 1H), 3.20-3.04 (m, 1H), 2.97-2.92 (m, 1.4H), 2.61-2.56 (m, 0.6H), 1.29 (s, 9H); ^{13}C NMR: δ = 172.2, 171.2, 170.0, 153.0, 144.2, 138.9, 136.2, 133.3, 132.4, 132.2, 129.7, 128.7, 128.1, 127.7, 126.9, 126.7, 126.3, 125.5, 125.2, 119.8, 119.3, 75.3, 58.3, 52.7, 52.1, 43.9, 34.8, 31.9, 31.6, 31.2, 29.7, 29.5, 29.3, 28.9, 24.8, 22.7; HRMS (ESI) Calcd. For $C_{47}H_{47}N_4O_4$ $[M+H]^+$: 731.3592. Found: 731.3589.

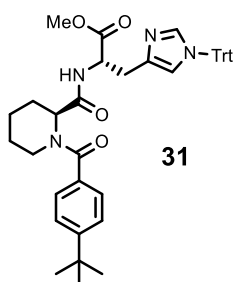


Comp. 28

Methyl N^α -((*S*)-2-([1,1'-biphenyl]-4-carbonyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carbonyl)- N^ϵ -trityl-L-histidinate

Yield, 75% (3 steps): 1H NMR (55:45 mixture of two amide rotamers): δ = 9.04 (br d, J = 7.2 Hz, 0.55H), 8.35 (br d, J = 7.5 Hz, 0.45H), 7.80 (br d, J = 7.5 Hz, 0.9H), 7.68 (br d, J = 7.8 Hz, 1.1H), 7.61-7.35 (m, 8.55H), 7.34-7.28

(m, 8.45H), 7.23-7.07 (m, 9.45H), 6.87 (br d, $J = 6.9$ Hz, 0.55H), 6.57 (br s, 0.45H), 6.51 (br s, 0.55H), 5.62 (br s, 0.45H), 5.29 (br d, $J = 17.4$ Hz, 0.55H), 4.95-4.70 (m, 2.45H), 4.56-4.54 (m, 0.55H), 3.57-3.41 (m, 1H), 3.55 (s, 3H), 3.11-2.88 (m, 2.45H), 2.61-2.54 (m, 0.55H); ^{13}C NMR: $\delta = 166.6, 164.8, 146.0, 141.8, 140.0, 138.4, 135.0, 132.4, 131.3, 130.6, 129.7, 129.6, 128.9, 128.7, 128.2, 128.1, 127.3, 127.0, 126.3, 120.2, 75.8, 55.4, 55.2, 53.4, 44.4, 34.0, 31.4, 29.7$; HRMS (ESI) Calcd. For $\text{C}_{49}\text{H}_{43}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 751.3274. Found: 751.3279.



Comp. 31

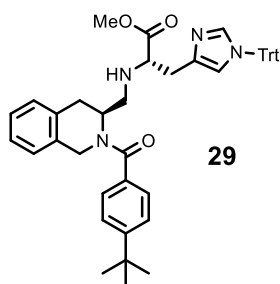
Methyl N^{α} -((S)-1-(4-*tert*-butyl)benzoyl)piperidine-2-carbonyl)- N^{ϵ} -trityl-L-histidinate

Yield, 54% (3 steps): ^1H NMR (60:40 mixture of two amide rotamers): $\delta = 8.76$ (br d, $J = 6.6$ Hz, 0.4H), 8.05 (br d, $J = 7.5$ Hz, 0.6H), 7.51 (br d, $J = 8.1$ Hz, 1.2H), 7.43 (br d, $J = 7.5$ Hz, 0.8H), 7.32-7.30 (m, 12H), 7.08 (br s, 6H), 6.572 (br s, 0.4H), 6.570 (br s, 0.6H), 5.47 (br s, 0.6H), 4.85 (m, 1H), 4.76 (br s, 0.4H), 4.53 (br s, 0.4H), 3.77 (br s, 0.4H), 3.73-3.67 (m, 0.4H), 3.63 (s, 1.2H), 3.58 (s, 1.8H), 3.46 (d, $J = 4.2$ Hz, 0.4H), 3.25-3.22 (m, 1.2H), 3.13 (dd, $J = 14.6, 4.7$ Hz, 1H), 3.03-2.98 (m, 1H), 2.43 (br d, $J = 7.5$ Hz, 0.6H), 2.35 (br d, $J = 9.0$ Hz, 0.6H), 1.97 (br s, 1H), 1.68-1.49 (m, 5H), 1.29 (s, 6H), 1.27 (s, 3H); ^{13}C NMR: $\delta = 172.0, 171.4, 171.0, 152.8, 142.1, 138.9, 138.6, 136.5, 136.1, 132.6, 129.6, 128.0, 127.2, 126.6, 125.3, 125.0, 119.5, 75.2, 59.7, 53.4, 52.8, 52.0, 46.2, 40.2, 34.6, 31.1, 29.7, 29.1, 26.7, 25.8, 25.6, 24.8, 20.8$; HRMS (EI) Calcd. For $\text{C}_{43}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_4$ $[\text{M}]^+$: 682.3519. Found: 682.3523.

Comp. 29 と 30 は以下の方法で新たに合成した (Schema 4B)。

氷冷攪拌下、 $\text{HCl}\cdot\text{HN}(\text{Me})\text{OMe}$ (1.1 等量) と NMM (5.0 等量)、BOP (1.2 等量) のジクロロメタン溶液に保護アミノ酸 **A** を加え、室温で 16 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過してろ液を減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し粗生成して粗生成物を得た。粗生成物を 20% Et_2NH の MeCN 溶液に溶解し 20 分間攪拌した後、減圧下濃縮した。残渣をジクロロメタンに溶解し、NMM (3.0 等量) と 4-*t*-ブチル安息香酸 (1.1 等量)、(1-シアノ-2-エトキシ

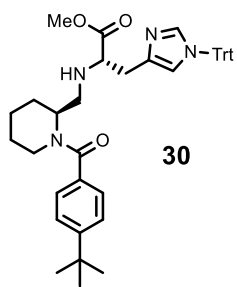
-2-オキソエチリデンアミノオキシ) ジメチルアミノ-モルホリノ-カルベニウムヘキサフルオロリン酸塩 (COMU、1.2 等量) を加えて 16 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過してろ液を減圧下濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し粗生成して粗生成物 **D** を得た。アルゴン雰囲気下、粗生成物 **D** のジクロロメタン溶液を $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ に冷却し、水素化ジブチルアルミニウムヒドライド (DIBAL-H、1.0 M ヘキサン溶液、1.2 等量) を滴下した。15 分間攪拌後、メタノールを加えて反応を停止した。この混合物を室温まで昇温後、セライト®とシリカゲルパッドでろ過した。ろ液を硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過してろ液を減圧下濃縮した。残渣は精製することなく次の反応に使用した。残渣のジクロロメタン溶液に HCl-H-His(Trt)-OMe (1.1 等量) を加えて 16 時間攪拌後、 NaBH_3CN (2.0 等量) を加えてさらに 1 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液を加えて反応を停止し、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した後、ろ過してろ液を減圧下濃縮した。残渣を PTLC ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH} = 10:1$) に付し、化合物 **E** を得た。



Comp. 29

Methyl *N*^α-(((*S*)-2-(4-*tert*-butyl)benzoyl)-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolin-3-yl)methyl)-*N*^ε-trityl-L-histidinate

Yield, 6.4% (5 steps): $^1\text{H NMR}$: $\delta = 7.77$ (br d, $J = 1.8$ Hz, 1H), 7.43-7.33 (m, 10H), 7.25-7.22 (m, 6H), 7.11-7.04 (m, 8H), 6.84 (br d, $J = 1.5$ Hz, 1H), 3.74 (d, $J = 5.4$ Hz, 1H), 3.67 (s, 3H), 3.64 (dd, $J = 17.7, 5.7$ Hz, 2H), 3.55 (d, $J = 12.6$ Hz, 1H), 3.15 (dd, $J = 15.6, 5.1$ Hz, 1H), 3.01 (dd, $J = 15.6, 8.1$ Hz, 1H), 2.37-2.28 (m, 1H), 1.29 (s, 9H); $^{13}\text{C NMR}$: $\delta = 174.2, 150.0, 140.3, 138.0, 136.4, 134.8, 129.6, 128.9, 128.6, 127.8, 125.2, 121.9, 59.1, 52.1, 51.6, 34.4, 31.9, 31.3, 29.7, 29.3, 29.1, 28.5, 27.2, 22.7$.



Comp. 30

Methyl *N*^{tr}-(((*S*)-1-(4-(*tert*-butyl)benzoyl)piperidin-2-yl)methyl)-*N*^{tr}-trityl-L-histidinate

Yield, 2.2% (5 steps): ¹H NMR: δ = 7.79 (br d, *J* = 1.5 Hz, 0.5H), 7.43-7.28 (m, 13H), 7.14-7.08 (m, 7H), 6.79 (br d, *J* = 1.8 Hz, 0.5H), 6.55 (br s, 1H), 3.85 (dd, *J* = 7.7, 5.9 Hz, 1H), 3.67-3.48 (m, 2H), 3.48 (s, 3H), 3.22 (dd, *J* = 15.8, 5.6 Hz, 0.5H), 2.95 (dd, *J* = 16.2, 4.7 Hz, 0.5H), 2.89 (br d, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.80 (br d, *J* = 6.9 Hz, 2H), 1.78 (br s, 2H), 1.60 (m, 4H), 1.30 (s, 9H); ¹³C NMR: δ = 174.8, 152.2, 153.9, 142.4, 140.3, 138.4, 138.3, 137.1, 134.7, 134.0, 129.8, 129.6, 129.0, 128.6, 127.99, 127.97, 126.5, 125.3, 122.0, 119.2, 77.6, 75.1, 61.6, 53.1, 52.3, 51.5, 46.6, 34.7, 32.0, 31.9, 31.2, 30.3, 21.0, 19.4; HRMS (EI) Calcd. For C₄₃H₄₈N₄O₃ [M]⁺: 668.3726. Found: 668.3728.

