

非糖ミミックなゴルジ体マンノシダーゼ阻害剤による
N-結合型糖鎖の制御に関する研究

日本大学大学院生物資源科学研究科生物資源利用科学専攻
博士後期課程

小山亮祐

2019

非糖ミミックなゴルジ体マンノシダーゼ阻害剤による
N-結合型糖鎖の制御に関する研究

日本大学大学院生物資源科学研究科生物資源利用科学専攻
博士後期課程

小山亮祐

2019

目次

第1章 序論

1-1.	<i>N</i> -結合型糖鎖の生理作用	1
1-2.	細胞間コミュニケーション (CCC) における <i>N</i> -結合型糖鎖の役割	2
1-3.	<i>N</i> -結合型糖鎖の構造制御による CCC 不全を基盤としたがん腫瘍治療戦略	3
1-4.	<i>N</i> -結合型糖鎖プロセッシング経路	5
1-5.	ゴルジ体マンノシダーゼ (GM) 阻害による細胞接着不全	7
1-6.	研究目的	8

第2章 本論

2-1.	新規非糖ミミックな GM 阻害剤の開発	11
2-1-1.	GM 阻害剤探索系の構築	11
2-1-2.	化合物ライブラリからの探索	17
2-1-3.	ドラックリポジショニングの観点からのヒット化合物の選抜	20
2-2.	ジフェニルプロピルアミン骨格を有する GM 阻害剤 (AR501) の開発	21
2-2-1.	AR501 誘導体の分子設計	21
2-2-2.	AR501 誘導体の合成	25
2-2-3.	AR501 誘導体の構造活性相関解析に基づく GM 阻害剤の選抜	28
2-3.	AR524 の阻害作用点の解析	30
2-3-1.	GM 阻害による細胞内 HM 型糖鎖の分布変化	30
2-3-2.	GM 阻害による細胞表面糖鎖の分布変化	32

第3章 結論

3-1.	総括	36
------	----	----

第 4 章 実験の部

4-1.	ヒト培養細胞の調製	40
4-1-1.	DMEM の調製	40
4-1-2.	Trypsin 溶液の調製	41
4-1-3.	ヒト細胞の培養	41
4-1-4.	ヒト細胞の継代	41
4-2.	GM 阻害剤評価系の構築	42
4-2-1.	既知 GM 阻害剤の化学特性の計算	42
4-2-2.	既知 GM 阻害剤溶液および ConA-AF488 PBS 溶液の調製	42
4-2-3.	既知 GM 阻害剤を用いた濃度依存的添加による GM 阻害剤 探索系の評価	43
4-2-4.	評価系を用いた既知 GM 阻害剤の GM 阻害活性測定	44
4-3.	化合物ライブラリからの探索	45
4-3-1.	ヒット化合物の化学特性の計算	45
4-3-2.	ヒット化合物溶液の調製	46
4-3-3.	評価系を用いたヒット化合物の GM 阻害活性測定	47
4-3-4.	ヒット化合物の細胞毒性評価	48
4-4.	Morevlo Virchal Docker を用いたドッキングモデルの構築	49
4-5.	AR501 誘導体の合成	50
4-5-1.	化合物 1 の合成	50
4-5-2.	化合物 2a および 2b の合成	50
4-5-3.	化合物 3a および 3b の合成	51
4-5-4.	化合物 4a および 4b の合成	51
4-5-5.	化合物 5a および 5b の合成	52
4-5-6.	AR503 の合成	52
4-5-7.	AR506 の合成	53
4-5-8.	AR509 の合成	54
4-5-9.	AR523 の合成	55

4-5-10.	AR524 の合成	56
4-5-11.	AR525 の合成	57
4-5-12.	AR520 の合成	58
4-5-13.	AR521 の合成	59
4-5-14.	AR522 の合成	60
4-6.	AR501 誘導体の構造活性相関解析に基づく GM 阻害剤の 選抜	61
4-6-1.	AR501 誘導体の化学特性の計算	61
4-6-2.	AR501 誘導体溶液の調製	61
4-6-3.	評価系を用いた AR501 誘導体による GM 阻害活性測定	63
4-6-4.	AR501 誘導体の細胞毒性評価	64
4-7.	蛍光標識 Con-A を用いた細胞内 HM 型糖鎖の分布の観察	64
4-8.	蛍光標識レクチンを用いた細胞表面 HM 型糖鎖の分布の観察	65
4-8-1.	AR524 溶液および蛍光標識レクチン溶液の調製	66
4-8-2.	細胞表面糖鎖のフローサイトメトリー分析	66

参考文献

謝辞

第 1 章 序論

1-1. N-結合型糖鎖の生理作用

糖鎖は、核酸、タンパク質に次ぐ第 3 の生命鎖とよばれ、生体内でタンパク質や脂質に結合し、生体内で様々な生命現象・疾患における関与する重要な分子である [1-4]。タンパク質に結合する糖鎖には、タンパク質中のコンセンサス配列「Asn-X-Ser/Thr (X: 任意のアミノ酸残基)」を認識し、その中のアスパラギン残基に結合する N-結合型糖鎖、タンパク質中のセリンもしくはスレオニン残基に結合する O-結合型糖鎖、さらに、タンパク質中のコンセンサス配列「Trp-X-X-Trp (X: 任意のアミノ酸残基)」を認識し、その中のトリプトファンに結合する C-結合型糖鎖などが知られ、それぞれ特徴的な構造を有している。また、ヒアルロン酸やコンドロイチン硫酸を含むプロテオグリカンもタンパク質に糖鎖が結合した構造を持つが、結合した糖残基の数がおよそ 100~200 残基と長いことから、上記の糖鎖とは区別されて定義されている。

これらのタンパク質に結合する糖鎖のうち N-結合型糖鎖は、結合したタンパク質上および細胞表面において、様々な生理作用を示すことが知られている。タンパク質上においては、その品質・構造・機能の調整を担っており、小胞体における新生タンパク質の品質管理機構における正しいフォールディングの目印として機能すること、さらに、抗体分子においてはその抗原活性や動態等に影響することが知られている。細胞表面においては、酵素やレクチン、抗体など糖鎖を認識するタンパク質を介した細胞同士の情報伝達や免疫系への情報提示に不可欠となっている [5-7]。これらのことから、近年では N-結合型糖鎖および N-結合型糖鎖をターゲットとした酵素などを標的とした関連疾患治療への創薬研究が行われている [8-9]。

1-2. 細胞間コミュニケーション (CCC) における *N*-結合型糖鎖の役割

N-結合型糖鎖は、還元末端側のコア構造と呼ばれる 5 糖 ($\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$) の構造を共通構造とし、それ以外の非還元末端側の構造や構成する糖残基の種類によって、主にハイマンノース型糖鎖、コンプレックス型糖鎖、ハイブリッド型糖鎖の 3 種類に分類される。その構造を図 1 にまとめた。

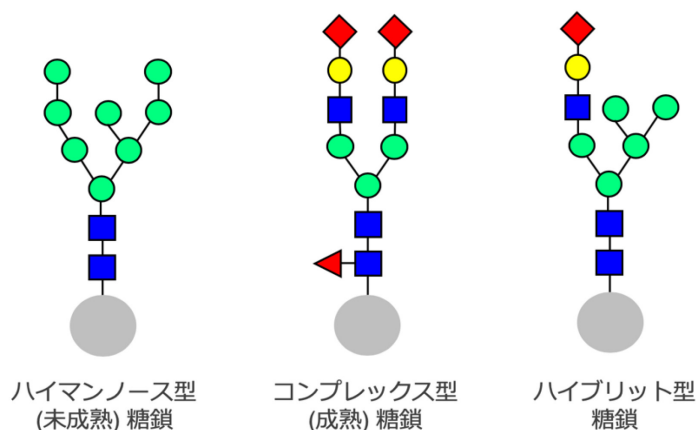


図 1.3 種類の *N*-結合型糖鎖の構造

ハイマンノース糖鎖は、構造中に多くのマンノース残基を含む糖鎖の総称であり、また、本糖鎖を出発原料として後述の *N*-結合型糖鎖プロセッシング経路にて修飾を受けることでコンプレックス型糖鎖およびハイブリッド型糖鎖が生合成されることから、未成熟糖鎖とも呼ばれている。コンプレックス型糖鎖は、主にシアル酸、ガラクトース、*N*-アセチルグルコサミン、マンノース、フコースなど複数の糖残基で構成される糖鎖の総称であり、また、*N*-結合型糖鎖プロセッシングの最終産物となることから成熟型糖鎖とも呼ばれている。ハイブリッド型糖鎖は、ハイマンノース型糖鎖とコンプレックス型糖鎖の中間の構造を

持つ糖鎖の総称である [1,3]。

また、これらの糖鎖の構造は、前述のタンパク質や細胞表面での生理作用にも密接に関与している。その中でも細胞間コミュニケーション (CCC) においては、その機能が *N*-結合型糖鎖の構造に依存していることが知られている。CCC は、細胞間の接着を伴う情報伝達であり、細胞表面糖鎖をリガンドとする受容体タンパク質 (レクチンや抗体など) と *N*-結合型糖鎖が結合することで、細胞間の認識を引き起こしている。また、糖鎖-タンパク質間だけでなく、糖鎖-糖鎖間、および糖鎖-低分子間での相互作用においても CCC が起こることも報告されている [4,10-13]。この現象は、真核生物の生体内において普遍的に起こっており、細胞の発生・分化におけるシグナル仲介や神経細胞におけるシナプス形成など、幅広い生命現象に関与している。また、老化による CCC の機能低下を発端とし、病原真菌やウイルスに感染した細胞やがん腫瘍細胞へ細胞認識と免疫機能が低下することで、疾患発症につながることも知られている [14,15]。このように生体内で重要な役割を持つ CCC は、3 種類の *N*-結合型糖鎖のうち、成熟糖鎖でのみ成立することが知られている [11,16,17]。それに対し、*N*-結合型糖鎖が未成熟となる場合、または糖鎖が細胞表面に存在しない場合、CCC が不全となり、細胞接着不全が生じることが知られている [11,18,19]。

1-3. *N*-結合型糖鎖の構造制御による CCC 不全を基盤としたがん腫瘍治療戦略

本研究では、*N*-結合型糖鎖の構造を制御し、未成熟型とすることによって、CCC を不全とすることができれば、依然として治療が困難ながん腫瘍の化学療法における問題点が解決できると考えた。

がん腫瘍は、自己複製能と分化能を示すがん幹細胞を通常がん細胞

が取り囲む構造を有している。そこへ上市されている抗がん剤を作用させても、その構造から腫瘍の深部まで作用しにくく、がん幹細胞が残存し、そこから腫瘍が再構成されるという問題がある (図 2 上部)。さらに、このがん幹細胞は、生体内での遠隔転移にも関与しているため、周囲のがん細胞ではなく、がん幹細胞の効率的な除去ががん治療における重要な課題となっている [20]。

そこで、がん腫瘍における CCC に着目すると、これらのがん細胞同士の細胞接着も成熟糖鎖を介した CCC によって成立していることが知られている。このことから、がん腫瘍の細胞表面 N-結合型糖鎖を未成熟型とし、がん細胞間の CCC 不全とすることができれば、がん腫瘍の構造を崩壊させ、露出したがん幹細胞に抗がん剤を投与することが可能となり、その結果、腫瘍細胞を効率的に治療できる (図 2 下部) と考えた。さらに、このような新規抗がん腫瘍戦略を達成できれば、がんの再発や遠隔転移のリスクも最小限に抑えることができると考えた。本研究では、このような抗がん腫瘍戦略を達成するために、N-結合型糖鎖の構造を制御する方法の開発が必要となると考えた。

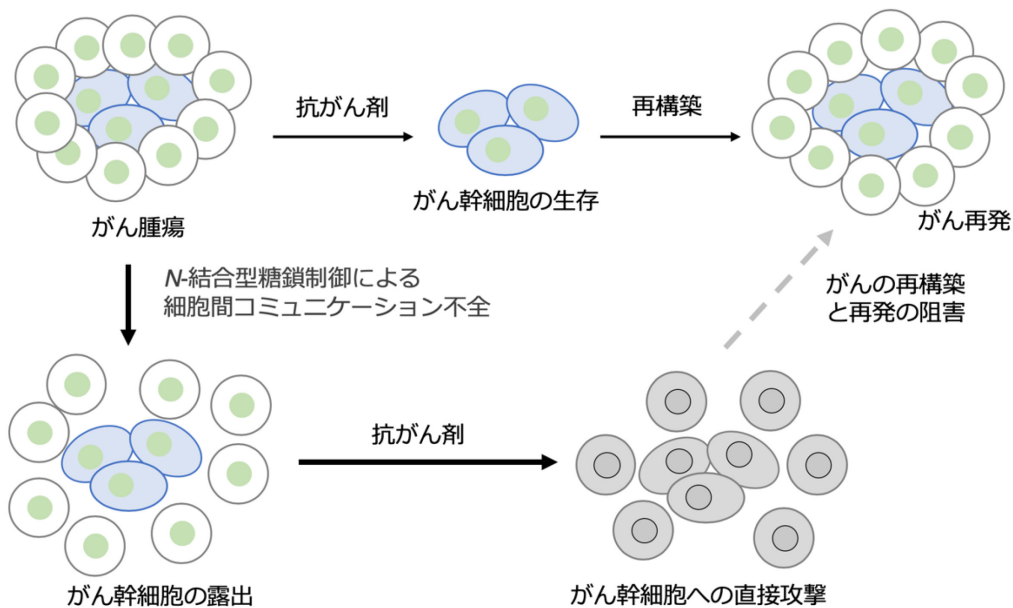


図 2. N-結合型糖鎖制御を基盤とした新規抗がん腫瘍戦略

1-4. N-結合型糖鎖プロセッシング経路

N-結合型糖鎖の構造制御法を開発するにあたり、N-結合型糖鎖プロセッシング経路の酵素群に着目した。N-結合型糖鎖は、細胞内の小胞体およびゴルジ体にて生合成されている。まず、小胞体表面にてドリコールリン酸上に GlcNAc が付加され、そこから 14 糖からなる未成熟糖鎖 (Glc₃Man₉GlcNAc₂ 型) まで合成される。次にその糖鎖が小胞体内腔に入り込み、リボソームにて合成された新生タンパク質のアスパラギン残基にオリゴ糖転移酵素によって付加される (図 3 上段左)。続いて、小胞体グルコシダーゼ I および II によってグルコース残基が除去され、GlcMan₉GlcNAc₂ 型糖鎖となったのち、分子シャペロンであるカルネキシン / カルネティキュリン (CRX/CRT) によってタンパク質のフォールディングが起こり、正しくフォールディングされたタンパク質の糖鎖は、小胞体グルコシダーゼ II によって Man₉GlcNAc₂ 型となったのち、小胞体マンノシダーゼ (ERGM, EC 2. 4. 1. 113, Glycosidase Family 47) によってマンノース 1 残基が除去され Man₈GlcNAc₂ 型となる (図 3 上段右) [21-23]。

ここでフォールディングに失敗したタンパク質は、UDP-グルコース糖タンパク質グルコース転移酵素によってグルコース残基の付加および CNX/CRT によるタンパク質の折り畳み促進を経て、適切な立体構造をとるまでグルコシダーゼ II によって再度グルコース残基除去のサイクルを繰り返す。また、このサイクルにおいて正しくフォールディングできなかつた、および糖鎖修飾がうまくいかなかつたタンパク質は、小胞体外に輸送され、小胞体関連分解 (ERAD) という機構を経て、糖鎖とともにプロテアソームに分解される。これらサイクルはタンパク質の品質管理の中心的な役割を担っている [21,22,24]。

小胞体にて Man₈GlcNAc₂ 型糖鎖となった糖タンパク質は、ゴルジ体のシスゴルジに輸送される。そこでゴルジ体マンノシダーゼ I (GMI,

EC 3. 2. 1. 113, Glycosidase Family 47) の 3 種類のアイソザイム (GMIA1, GMIA2, GMIC1) によって糖鎖から 3 つのマンノース残基を除去され、 $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ 型糖鎖となる (図 3 中段右) [21,22,25]。

GMI によってマンノースを刈り取られた糖鎖は、次にメディアアルゴルジに輸送され、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素により β -1, 2-GlcNAc 残基が付加されたのち、ゴルジ体マンノシダーゼ II (GMII, EC 3. 2. 1. 114, Glycosidase Family 38) によって 2 つのマンノース残基を除去される。その後、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素により β -1, 2-GlcNAc 残基が付加され、 $\text{GlcNAc}_2\text{Man}_3\text{GlcNAc}_2$ 型糖鎖となる (図 3 中段左) [21,22,26]。

次に、トランスゴルジに輸送され、*N*-アセチルグルコサミン転移酵素により β -1, 2-GlcNAc 残基、ガラクトース転移酵素より β -1,4-Gal 残基、フコース転移酵素より α -1,6-Fuc 残基、シアル酸転移酵素より α -2,6-NeuNAc 残基によって糖付加が行われ、成熟糖鎖を持ったタンパク質は機能発現の場へと輸送される (図 3 下段右) [21,22]。そこで、本経路を構成する酵素群のうち、ERAD のような糖鎖の品質管理機構によって分解されず、かつ本糖鎖のプロセッシングを未成熟な HM 型糖鎖で止められるゴルジ体の酵素を阻害や失活させることで、*N*-結合型糖鎖の構造制御法を開発できると考えた。

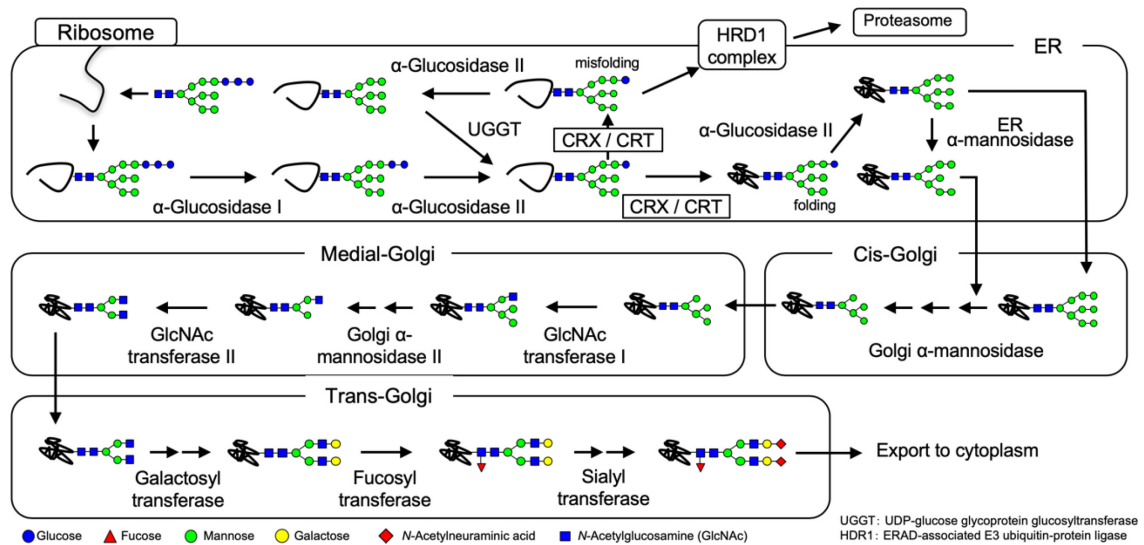


図 3. N-結合型糖鎖プロセッシング経路の概略

1-5. ゴルジ体マンノシダーゼ (GM) 阻害による細胞接着不全

本経路のグリコシダーゼの中でも、ゴルジ体マンノシダーゼ (GM, GMI および GMII) の阻害は、N-結合型糖鎖のプロセッシングを止め、かつ阻害により生じた未成熟糖鎖が ERAD のような分解機構を経ずに、未成熟のまま細胞内に蓄積し、その後、細胞表面にまで輸送されることが報告されている [27,28] (図 4)。さらに、近年には既知の GMI 阻害剤を用いた場合、および GMI のアイソザイムの 1 つである GMIA1 を司る遺伝子をノックアウトさせた場合、この療法の場合において細胞同士の接着を不全とすることも報告されている [27,29,30]。また、N-結合型糖鎖プロセッシング経路を構成するグリコシダーゼは近年、創薬のターゲットとしても注目されており、その阻害剤が抗がん活性や抗ウイルス活性 [31-33] などの生理活性を示すことが報告されている。しかし、GM のみならず、本プロセッシング経路に関与するグリコシダーゼの阻害剤は、基質である糖に似た糖ミミックな構造を持

つ阻害剤であることから、酵素レベル以上では阻害活性を示しにくいという問題点を持ち、医薬品となりにくいと考えられる[31-33]。

これらのことから、この GM を標的酵素とし、その阻害剤母核を探索などによって選定し、さらにその構造を展開することによって、細胞レベル以上で作用する阻害剤が開発することができれば、その阻害剤を用いた N-結合型糖鎖の構造の制御が可能となると考えた。さらに、N-結合型糖鎖構造が制御できれば、考案した抗がん戦略への応用も含めた創薬研究に発展することは可能であると考えた。

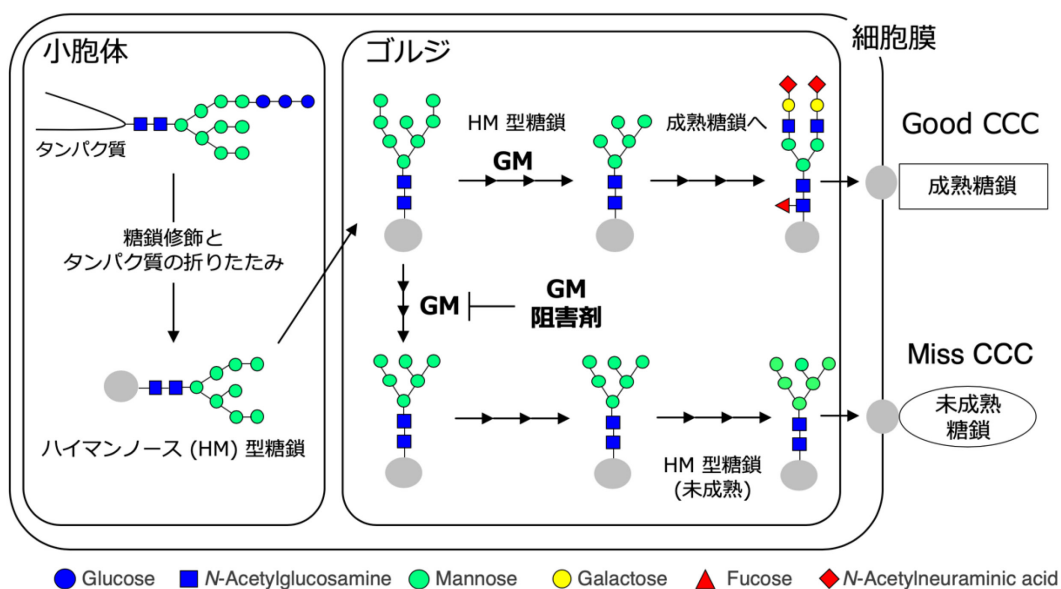


図 4. GM 阻害による未成熟糖鎖蓄積と CCC 不全

1-6. 研究目的

本研究では、細胞間コミュニケーション不全を基盤とした新たな抗がん腫瘍戦略の達成を目指し、N-結合型糖鎖の制御を可能とする GM 阻害剤の開発のために 2 つの研究目的を設定する。

まず、考案した戦略の基盤となる GM 阻害剤を開発することを第一

の研究目的とする。本戦略には、がん腫瘍の細胞内に浸透し、細胞レベルにおいて、低濃度で GM 特異的に作用する阻害剤が必要となる。そこで、目的の GM 阻害剤を開発するため、阻害剤の母核となる構造を選定、その構造を元にした構造展開、およびその構造活性相関解析を順に行う。はじめに、母核となる構造の選定では、基質であるマンノースを基盤に開発された糖ミミック構造の既知 GM 阻害剤が本研究に適応可能か検討する。適応が可能な場合は既知阻害剤を構造展開の基盤とした開発を行う。また、検討の結果適応が困難な場合は、阻害剤探索からの非糖ミミックな構造新規母核の選抜を検討する。また、探索に必要な阻害活性評価系が報告されていないことから、その構築も試みる。さらに、選抜の段階にて、低濃度で作用し、かつ GM に特異的な阻害剤母核の選抜も試みる。次に構造展開では、得られた母核構造を元に、構造活性相関解析が可能な数種類の誘導体を合成する。最後に構造活性相関解析では、合成した誘導体の GM 阻害活性を評価し、その構造活性相関を明らかとしたのち、その結果を元に最適な誘導体を選抜する。

第二の研究目的として、開発した GM 阻害剤が、*N*-結合型糖鎖プロセシング経路の酵素のうち GM を特異的に阻害するのか、さらに、その阻害によって細胞表面 *N*-結合型糖鎖構造を未成熟とし、考案した抗がん戦略に適応を可能とするのか明らかとする。*N*-結合型糖鎖プロセシング経路のマンノシダーゼは、GM 以外にも小胞体マンノシダーゼが存在する。そこで、開発した阻害剤の投与によって細胞内および細胞表面に蓄積する *N*-結合型糖鎖の構造を特定の糖鎖を認識するタンパク質レクチンを用いて分析し、その阻害標的を解析する。また、開発した阻害剤の活性によって、CCC 不全を引き起こす細胞表面 HM 型糖鎖が増加するのかについても解析する。

これら 2 つの研究を試みることで、細胞間コミュニケーション不全を *N*-結合型糖鎖構造の制御によって引き起こすこれまでにない GM

阻害剤が開発できる。さらに、阻害剤の探索にて GM 阻害活性評価系が開発できれば、本系が初となる。また、これらを開発することができれば、考案した抗がん戦略の達成に向けた GM 阻害剤の探索・評価・開発できるだけでなく、未だ解明されていない GMI とその 3 種類のアイソザイム、さらに GMII の諸性質や生物学的意義について解析する強力なツールとなることも期待できる。

第 2 章 本論

2-1. 新規非糖ミミックな GM 阻害剤の開発

2-1-1. GM 阻害剤探索系の構築

本研究が達成を目標とする抗がん腫瘍戦略には、がん腫瘍の各がん細胞の細胞膜およびゴルジ体膜を透過して GM に作用する膜透過性の高い阻害剤が必要となる。さらに医薬品への応用にあたり、副作用防止の観点から低濃度かつ特異的な GM 阻害活性を示すことが重要である。そこで、初めに既知 GM 阻害剤 4 化合物が本研究に適応可能か、その化学特性から検討した。

既知 GM 阻害剤は、1970 年ごろから報告がされており[34-36]、GM の基質であるマンノースの構造を模した糖ミミック構造を有している(図 5)。

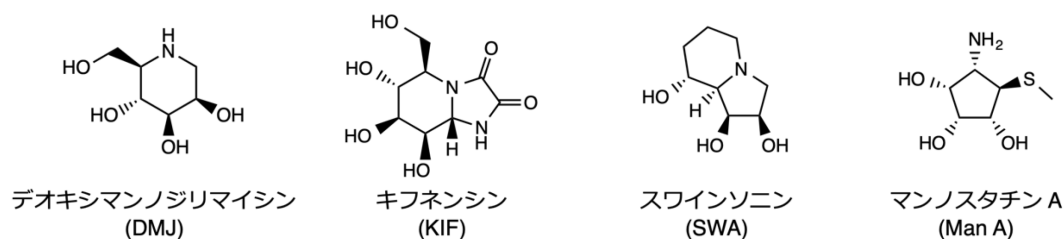


図 5. 既知 GM 阻害剤の構造

デオキシマンノジリマイシン (DMJ) およびキフネンシン (KIF) は、GMI 特異的阻害剤である。スワインソニン (SWA) およびマンノスタチン A (Man A) は、GMII 特異的阻害剤である。

これまでに、化合物の化学特性と膜透過性の関係の指標として、Waring より、 $1 < \log P < 3$ を示す化合物は、適切な脂溶性を示すこと

[37] が報告されている。また、Hughes らより、 $-1 < \log P < 5.9$ 、かつ $tPSA < 132 \text{ \AA}^2$ を示す化合物は、適切な膜透過性を示すこと [38] が報告されている。

これらの報告をもとに、既知阻害剤 4 化合物の化学特性として、分子量、分配係数の計算値 (Clog P)、pH 7.4 における分配係数の計算値 (Clog $D_{7.4}$)、極性表面積 (tPSA)、不斉中心数の 5 つを精査した (表 1)。

表 1. 既知 GM 阻害剤の化学特性

	既知 GM 阻害剤			
	DMJ	KIF	SWA	Man A
分子量	199.6	232.2	173.2	179.2
Clog P	-1.18±0.54	-1.31±0.58	0.076±0.55	-0.43±0.42
Clog $D_{7.4}$	-1.54	-1.31	-0.53	-1.56
tPSA (\AA^2)	92.95	130.3	63.93	112.01
不斉中心数	4	5	4	5

その結果、既知阻害剤 4 化合物 (DMJ、KIF、SWA、Man A) は全て、糖ミミック構造に由来する Clog $D_{7.4}$ の低さ (親水性の高さ) に起因し、膜透過性が低く、細胞レベルでの生理活性発現に高い阻害剤濃度が必要になると予想された。また、この膜透過性の問題を解決するため、既知阻害剤に対して様々な構造展開が行われ、膜透過性や活性の向上等の効果を上げている [35, 39] が、糖ミミックな構造を持つこれらは、不斉中心が多いことから構造展開にも限界があると考えた。

これらより、既知 GM 阻害剤は、非ドラックライクな構造であり、本研究の目的達成には不適であると判断した。そこで、意図しない作用標的が存在する懸念はあるが、既知阻害剤よりも容易に化学特性・生理活性・標的タンパク質を制御できると考え、開発する阻害剤母核

として非糖ミミック構造を選択した。

これまでに非糖ミミックな構造を有する GM 阻害剤の報告はないことから、目的とする GM 阻害剤を新たに探索しようと考えた。しかしながら、その探索に必要な GM 阻害活性の測定系の報告は、これまでになく、さらに、酵素ベースでの探索系に必要な GM の単離の報告もこれまでになかった。これらのことから、本研究では、ヒト培養細胞レベルで GM 阻害剤探索を可能とする GM 阻害活性評価系の構築を行った。

通常の *N*-結合型糖鎖プロセッシングでは、ゴルジ体内で HM 型 (未成熟) 糖鎖からコンプレックス型 (成熟) 糖鎖が生合成され、細胞表面などの機能発現の場に輸送される。しかし、阻害剤等によって GM が阻害されると、*N*-結合型糖鎖プロセッシングが止まり、糖鎖構造が未成熟なままゴルジ体内および細胞内に HM 型糖鎖が蓄積し、さらにその糖鎖が細胞表面まで輸送されることが知られている (図 6)。

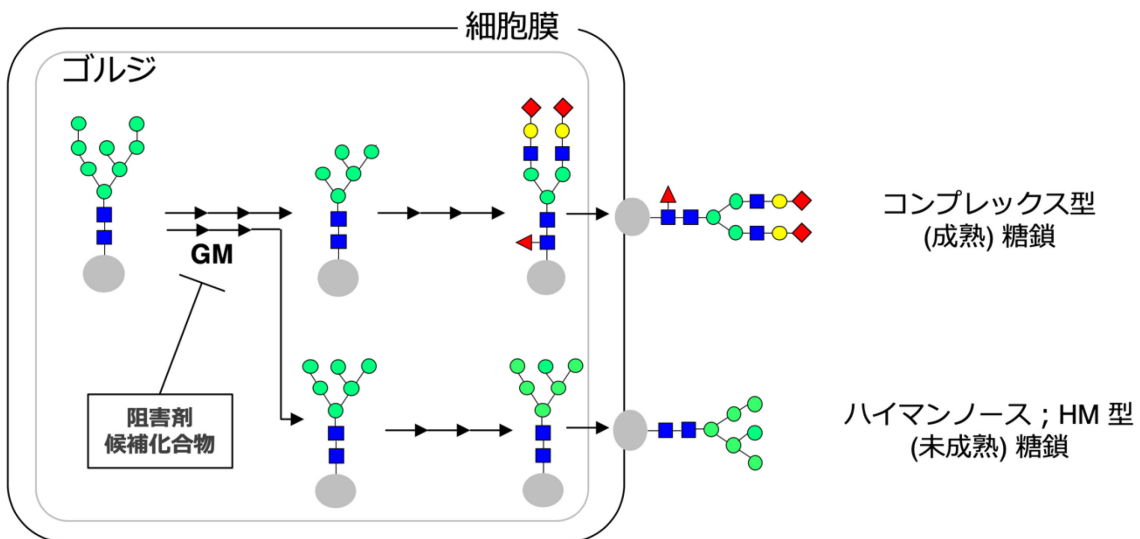
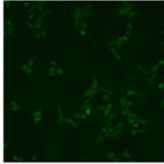
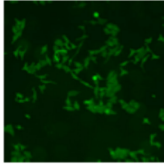
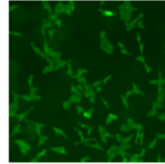
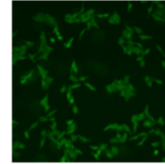


図 6. GM 阻害による細胞への HM 型糖鎖の蓄積

このことから、まず、GM 阻害によって蓄積する細胞内および細胞表面の HM 型糖鎖に着目した。そこで、HM 型糖鎖を特異的に認識する蛍光標識レクチン (コンカナバリン A; Con-A) を用いて蓄積した糖鎖を検出し、阻害剤を投与していないコントロール細胞と比較して、阻害剤を投与した細胞の蛍光強度および蛍光面積の増加を GM 阻害活性として評価する系「蛍光アッセイ系」を構築した。

次に、細胞表面への輸送によって蓄積した HM 型糖鎖が起こす細胞接着不全に着目した。細胞の単層培養において、細胞接着不全が起こると表面張力によって細胞形態が丸くなる。そこで、その細胞形態変化を観察し、阻害剤を投与していないコントロール細胞と比較して、阻害剤を投与した細胞の細胞長の縮小を GM 阻害活性として評価する系「細胞形態変化アッセイ系」を構築した。

次に、構築した蛍光アッセイ系と細胞形態変化アッセイ系が阻害剤の GM 阻害活性を定性的に評価できるのか確認を行った。はじめに、蛍光アッセイ系を用いて、3 種類の既知 GM 阻害剤 (DMJ, KIF, SWA) を終濃度 100 μM となるよう投与した細胞における HM 糖鎖を検出し、DMSO のみを加えたコントロール細胞と比べ、蛍光強度および面積の増加を観察できるのか評価した。次に、細胞形態変化アッセイ系を用いて、既知 GM 阻害剤を終濃度 100 μM となるよう投与した細胞における細胞長を測定し、DMSO のみを加えたコントロール細胞と比べ、その縮小を観察できるのか評価した。それらの結果を図 7 にまとめた。

	Control (DMSO)	DMJ (100 μ M)	KIF (100 μ M)	SWA (100 μ M)
蛍光				
蛍光強度増加率	100 %	350 %	258 %	320 %
蛍光面積増加率	100 %	260 %	199 %	240 %

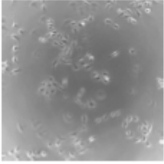
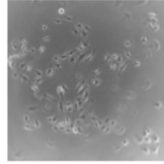
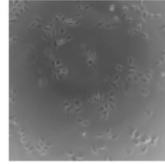
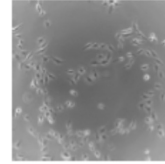
微分干渉				
細胞縮小率	0 %	28 %	29 %	32 %

図 7. 蛍光アッセイ系および細胞形態変化アッセイ系を用いた既知 GM 阻害剤 100 μ M における GM 阻害活性評価

その結果、蛍光アッセイ系にて既知阻害剤 3 種類の GM 阻害活性による蛍光強度の約 2.5~3.5 倍の増加、および蛍光面積の約 2~2.6 倍の増加を観察できた。さらに、細胞形態変化アッセイ系にて既知阻害剤の GM 阻害活性による約 30 % の細胞長の縮小が観察できた。この結果より、構築した 2 つの系は、GM 阻害活性による HM 型糖鎖の蓄積を評価できる系であることが示された。

次に、構築した蛍光アッセイ系が GM 阻害活性によって蓄積した HM 型糖鎖を観察しているのか、さらに、阻害活性の強さを定量的に評価できるのか確認するために、既知 GM 阻害剤をそれぞれ終濃度 0, 10, 30, 60, 100 μ M となるよう投与し、阻害剤の濃度依存的に細胞内の蛍光強度・蛍光面積が増加を観察できるのか評価した (図 8)。

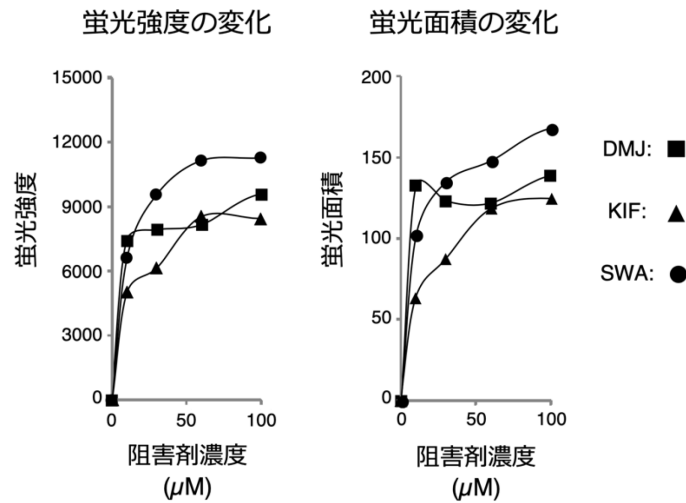


図 8. 既知 GM 阻害剤による濃度依存的な細胞内 HM 型糖鎖の増加

その結果、蛍光アッセイ系は、既知阻害剤 3 化合物をそれぞれ 0, 10, 30, 60, 100 μM 投与した細胞において、阻害剤の濃度依存的な蛍光強度・蛍光面積の増加を観察できた。この結果より、構築した蛍光アッセイ系は、GM 阻害による HM 型糖鎖の蓄積を評価できる系であることを確認した。さらに、阻害剤の GM 阻害活性の強さを評価できる系であることが示された。

以上の結果より、構築した蛍光アッセイ系は、既知 GM 阻害剤によつ細胞内の HM 型糖鎖の蓄積を定量的に評価できる系であることが示された。さらに、細胞形態変化アッセイ系は、阻害剤の GM 阻害活性を定性的に評価できる系であることが示された。そこで、構築した 2 つの系を用いて化合物の GM 阻害活性を同時に評価することで、細胞レベルで作用する新たな GM 阻害剤を確実に探索できると考え、蛍光アッセイ系と細胞形態変化アッセイ系を組み合わせ、GM 阻害剤探索系として採用した。

2-1-2. 化合物ライブラリからの探索

次に構築した GM 阻害剤探索系を用いて、医薬品や天然化合物など多様な母核構造を特徴とする理化学研究所 天然化合物ライブラリから阻害剤探索を行った。その結果、以下の 4 化合物が得られた (図 9)。

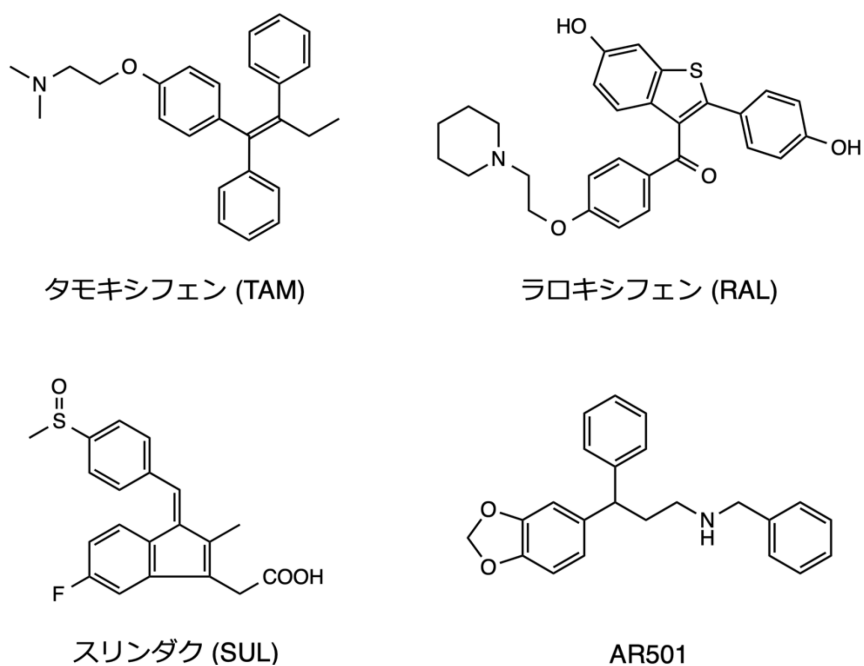


図 9. ヒット化合物 4 化合物の構造

得られた化合物のうち 3 化合物は医薬品であった。そのうち 2 化合物は、核内受容体であるエストロゲン受容体を作用標的とする抗がん剤、タモキシフェン (TAM) とラロキシフェン (RAL) であり、他 1 化合物はシクロオキシゲナーゼ 1 と 2 を作用標的とする抗炎症剤であるスリンダク (SUL) であった。残り 1 化合物は、生理活性等の報告のない化合物であり、AR501 と命名した。また、これらの化合物は、既知阻害剤とは異なり、非糖ミミックな構造を有していた。

そこで、探索で得られた化合物が既知阻害剤の問題点であった Clog D_{7.4} の低さと不斉中心の多さを解決する化学特性を有し、かつドラックライクな化合物であるか確認するため、その化学特性として、分子量、Clog D_{7.4}、tPSA、不斉中心数の 4 つについて KIF と比較した (表 2)。

表 2. KIF およびヒット化合物の化学特性

	KIF	TAM	RAL	SUL	AR501
分子量	232.2	371.5	473.6	356.4	345.4
Clog D _{7.4}	-1.31	3.83	3.40	-0.49	3.28
tPSA (Å ²)	130.3	12.47	98.24	73.58	30.49
不斉中心数	5	0	0	1	1

その結果、これら化合物は、KIF よりも Clog D_{7.4} の値が高く、不斉中心の数も少ないことから、既知阻害剤の問題点を解決した化合物であった。また、Waring らおよび Hughes らの報告 [37, 38] より、これらの化合物が適切な分子量・tPSA・Clog D_{7.4}・不斉中心の数を有し、適度な疎水性と膜透過性を示すと予想された。

このことから、これら 4 化合物を既知阻害剤の問題点を解決し、かつドラックライクな構造を持つ新規 GM 阻害剤であると判断し、ヒット化合物とした。

阻害剤探索によって、既知阻害剤の問題点を解決したヒット化合物が得られた。そこで次に、考案した抗がん腫瘍戦略への適応を目指し、既知阻害剤よりも低濃度で作用する化合物をヒット化合物の中から選抜した。そこで、構築した蛍光アッセイ系と細胞形態変化アッセイ系の 2 つの系を用いて、KIF とこれら化合物の GM 阻害活性を比較した (図 10)。蛍光アッセイ系では、GM 阻害による蛍光強度・蛍光面積

の増加を示す化合物濃度を検討した。細胞形態変化アッセイ系では、GM 阻害による細胞長の縮小を示す化合物濃度を検討した。

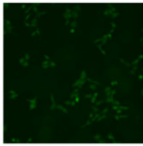
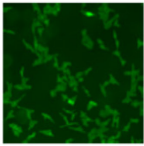
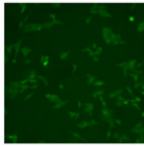
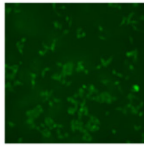
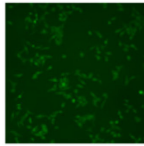
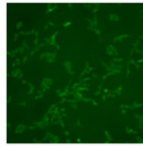
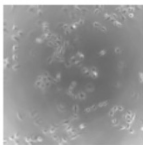
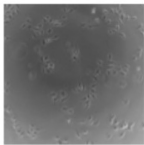
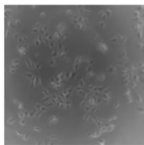
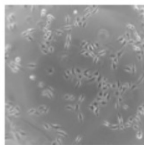
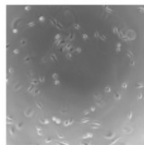
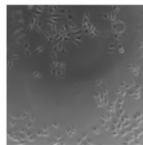
	Control (DMSO)	KIF (100 μ M)	TAM (10 μ M)	RAL (10 μ M)	AR501 (10 μ M)	SUL (100 μ M)
蛍光						
蛍光強度増加率	100 %	258 %	122 %	146 %	168 %	145 %
蛍光面積増加率	100 %	199 %	119 %	135 %	154 %	142 %
微分干渉						
細胞縮小率	0 %	29 %	33 %	26 %	21 %	29 %

図 10. KIF およびヒット化合物の GM 阻害活性評価

その結果、KIF は、終濃度 100 μ M にて蛍光強度および蛍光面積の増加および細胞長の縮小 (258 %, 199 %, 29 %) を示した。それに対し、ヒット化合物のうち、TAM・RAL・AR501 は、KIF のが GM 阻害作用を示さなかった終濃度 10 μ M にて、GM 阻害による蛍光強度および蛍光面積の増加および細胞長の縮小 (TAM: 122 %, 119 %, 33 %, RAL: 146 %, 135 %, 26 %, AR501: 168 %, 154 %, 21 %) を示した。このことから、これら 3 化合物は KIF よりも強い GM 阻害活性を持つことが示唆された。SUL は、KIF と同様に終濃度 10 μ M にて阻害活性を示さず、100 μ M でのみ GM 阻害による蛍光強度および蛍光面積の増加および細胞長の縮小 (145 %, 142 %, 29 %) を示した。

また、意図しない作用標的への結合による細胞毒性が発現しないか

確認するため、これらヒット化合物の細胞毒性を WST-8 法にて行った。その結果、TAM・RAL・AR501 は、GM 阻害活性を示した 10 μ M での細胞生存率が TAM: 90 %、RAL: 100 %、AR501: 98 % を示した。また、SUL は、GM 阻害活性を示した 10 μ M での細胞生存率が SUL: 100 % を示した。このことから、すべての化合物が阻害活性発現濃度において細胞毒性を示さなかったことから、意図しない作用標的はないと推測された。

これらの結果より、ヒット化合物より SUL を排除し、TAM・RAL・AR501 を選抜した。

2-1-3. ドラックリポジショニングの観点からのヒット化合物の選抜

次に、GM に特異的に作用する阻害剤を選抜するため、ヒット化合物の生体内標的を精査した。選抜したヒット化合物の 3 化合物のうち、TAM および RAL は、上市された抗がん剤であり、その主たる生体内標的はエストロゲン受容体である。さらに、これまでの実験結果より、GM がこれら 2 化合物の副たる生体内標的であることを明らかとした。そこで、本結果を医薬品活用の創薬アプローチの 1 つであるドラックリポジショニング [40,41] の観点へ当てはめると、これら 2 化合物の構造を基盤とした化合物展開を行うことで、迅速かつ低コスト、かつ薬物動態に対する知見の蓄積からある程度の安全性が担保された GM 阻害を基盤とする医薬品開発が可能となり、本研究で提案する新規抗がん戦略への応用も期待できる。しかしながら、これら 2 化合物は、GM に特異的に作用しない。さらに、本研究においては、主作用と GM 阻害の両方に基づく複雑な生理活性解析は上記のメリットを鑑みても避けるべきであると考えた。そこで、ヒット化合物から TAM および RAL を排除し、現時点で生理活性等の報告のない、つまり生

体内標的が現時点は報告されていない AR501 を GM 特異的阻害剤の開発基盤構造として選抜した。

2-2. ジフェニルプロピルアミン骨格を有する GM 阻害剤 (AR501) の開発

2-2-1. AR501 誘導体の分子設計

阻害剤探索よりジフェニルプロピルアミン骨格を有する AR501 が選抜できたことから、次に GM 阻害活性の向上を目的とし、本化合物を母核とした構造展開による誘導体合成と構造活性相関解析による誘導体選抜を行った。

はじめに、AR501 誘導体の分子設計のための *in silico* における GM の活性部位と AR501 のドッキングシミュレーションを行った。通常、このような解析にはヒト由来 GM を用いるのが適切である。しかし、その立体構造が報告されていないため、ヒト由来酵素と相同性の高いマウス由来 GM (mouse Golgi α -1,2-mannosidase IA, PDB ID: 5KKB) の X 線結晶構造を用いた。まず、本酵素の活性部位の構造および HM 型糖鎖の 1 つである Man₉GlcNAc₂ 型糖鎖との結合様式を解析した (図 11)。

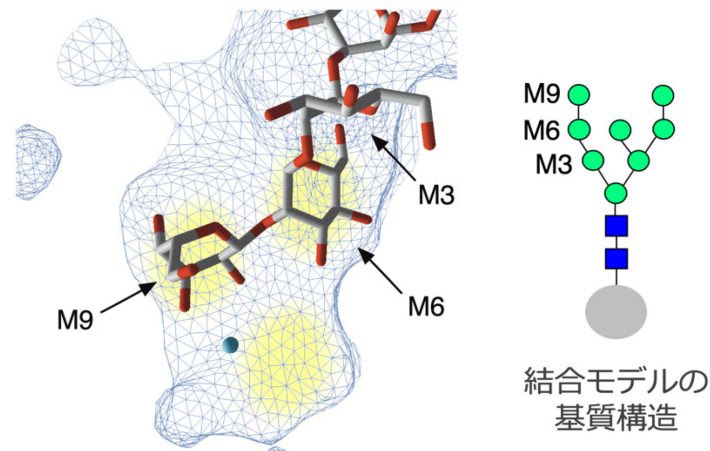


図 11. mouse Golgi α -1,2-mannosidase IA の活性部位と $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 型糖鎖の結合様式の X 線結晶構造解析結果

その結果、GM は、その活性部位内に糖残基が結合可能な 3 つの空間 (図 11、黄色ハイライト部分) を持っていた。さらに、そのうち 2 つの空間に HM 型糖鎖のマンノース残基が結合していた。

そこで次に、GM の活性部位との結合において AR501 のどの構造が重要であるか明らかとするため、同様の GM の X 線結晶構造を用いて AR501 とのドッキングモデルを構築し、その結合様式を解析した (図 12)。

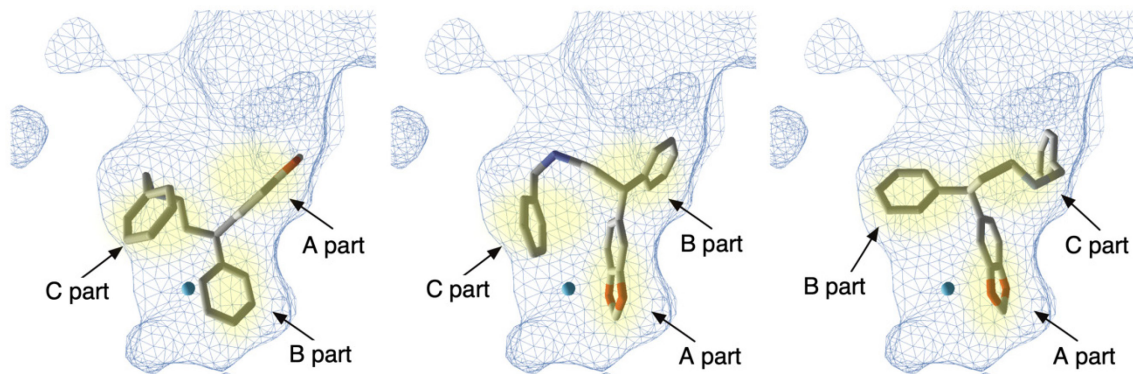


図 12. mouse Golgi α -1,2-mannosidase IA の活性部位と AR501 のドッキングモデル

その結果、酵素と化合物間の結合エネルギーの指標である MolDock Score が低い 3 つのドッキングモデルが得られた。さらに、その結合様式を解析した結果、GM 活性部位内の 3 つの空間に、AR501 が一定の結合様式を取らずに、フレキシブルに結合するモデルが得られた。このことから、AR501 構造中の 3 つの芳香環構造が GM の活性部位との結合に重要であると考えた。そこで、AR501 の構造中の各芳香族部位について、ピペロナル構造を持つ部位を A パート、A パートと近いフェニル基の部位を B パート、残る 1 つを C パートと命名した (図 13)。

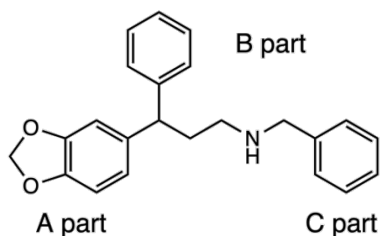


図 13. AR501 の A・B・C パートの構造

そこで、これら 3 つの部位に着目し、その構造と GM 阻害活性の相関を解析することが可能となるドラッカブルな 9 つの誘導体を設計した (図 14)。すべてのパートの構造設計は、GM の活性部位における水素結合の形成能の有無、および化合物の疎水性の違いによる阻害活性への影響を解析するために行った。A パートでは、AR501 が持つピペロニル基を持つ化合物に加え、フェニル基を持つ化合物を設計した。B パートでは、AR501 が持つフェニル基を持つ化合物に加え、4-メトキシフェニル基を持つ化合物を設計した。C パートでは、AR501 が持つフェニル基を修飾したピペロニル基を持つ化合物、*p*-ジメチルアミンフェニル基を持つ化合物、*p*-クロロフェニル基を持つ化合物を設計した。

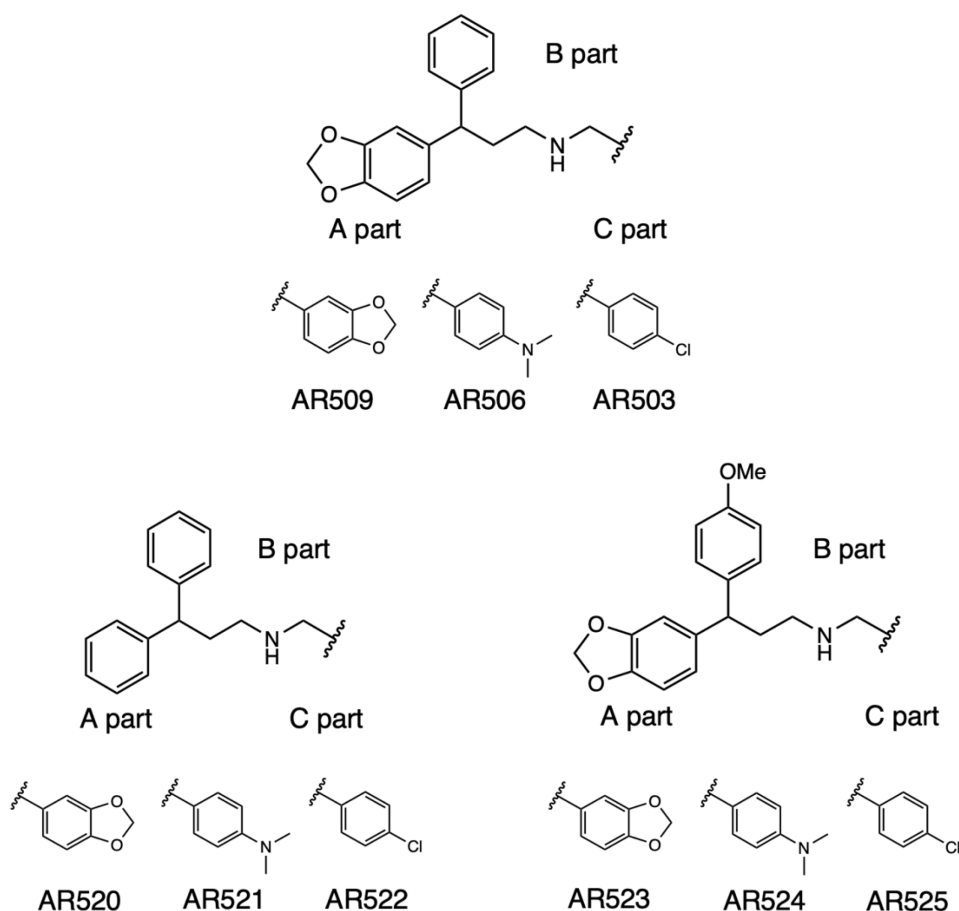


図 14. 設計した AR501 誘導体の構造

2-2-2. AR501 誘導体の合成

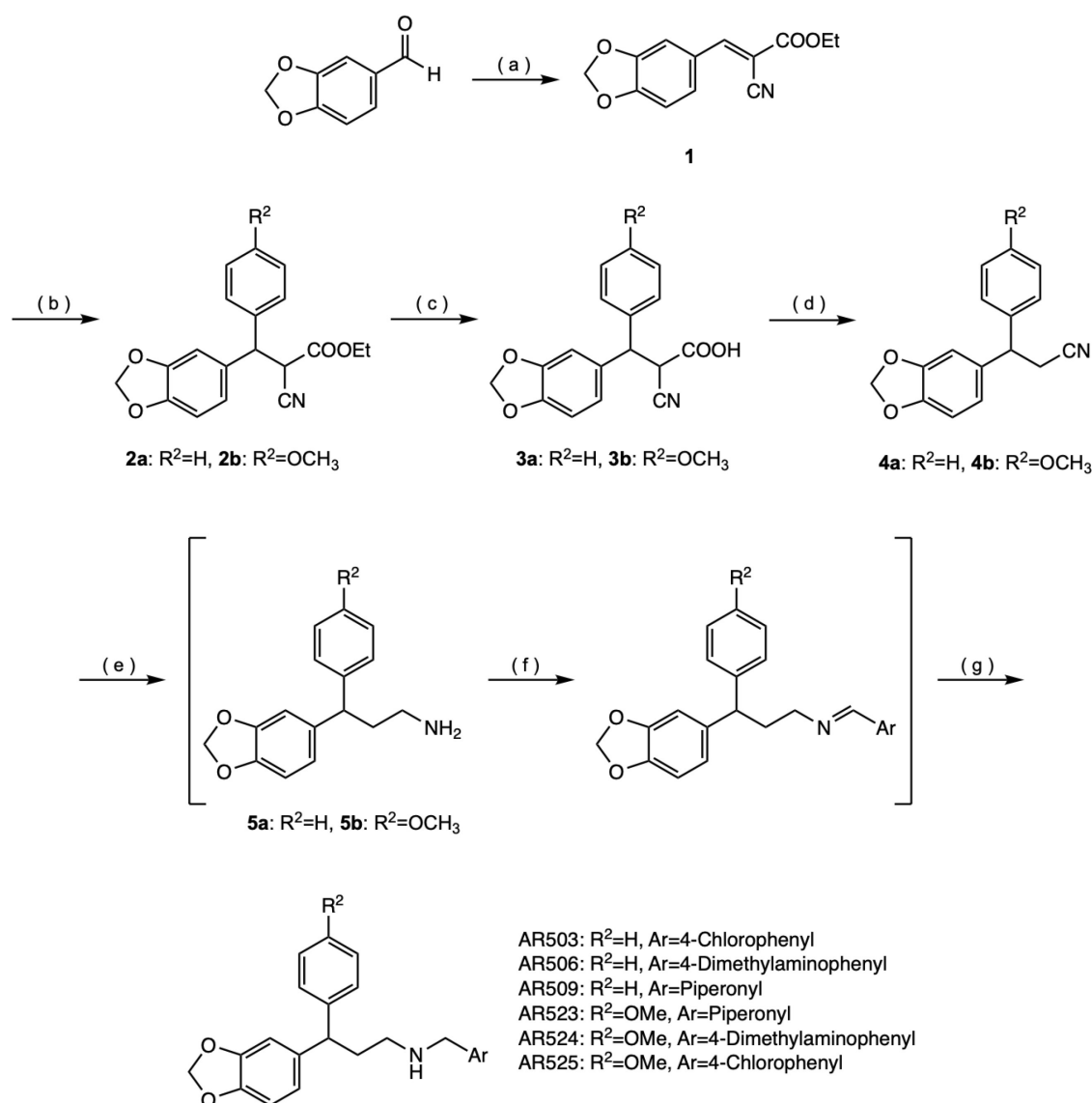
次に、設計した 9 つの AR501 誘導体の合成するため、その合成経路設計、および設計した経路を用いての合成を行った。設計した誘導体のうち、AR503、AR506、AR509、AR523、AR524、AR525 の 6 化合物の合成経路は、既報 [42-44] をもとに設計した (図 15)。また、AR520、AR521、AR522 の 3 化合物の合成経路については、A および B パートにフェニル基を持つジフェニルプロピルアミンが市販されていたことから、本化合物を出発原料とし、上記と同様に設計した (図 16)。

まず、AR503、AR506、AR509、AR523、AR524、AR525 の 6 化合物の合成では、A パートを含む芳香族アルデヒドを出発原料とし、シアノ酢酸エチルとの縮合反応によりシアノ基を導入するとともに 3 炭素増炭した化合物 **1** を合成した。

次に、得られた化合物 **1** の電子不足オレフィン構造にグリニャール試薬で B パートを含む芳香族置換基 (**2a**: フェニル基、**2b**: *p*-メトキシフェニル基) を導入し、化合物 **2a** および **2b** を合成した。次に、得られた化合物 **2a** および **2b** のそれぞれの構造中のエステルを加水分解し、化合物 **3a** および **3b** を合成した。次に、得られた化合物 **3a** および **3b** のそれぞれの構造中のカルボキシ基を脱炭酸反応にて除去し、化合物 **4a** および **4b** を合成した。

次に、得られた化合物 **4a** および **4b** のそれぞれの構造中のニトリル基を還元しアミノ基とし、化合物 **5a** および **5b** を合成した。得られた化合物 **5a** および **5b** はどちらも精製せず、合成・溶媒留去後にそれぞれ C パートを含む芳香族 (AR509 および AR523: ピペロニル基、AR506 および AR524: *p*-ジメチルアミンフェニル基、AR509 および AR523: *p*-クロロフェニル基) のアルデヒドとイミンを形成し、設計した AR503、AR506、AR509、AR523、AR524、AR525 の前駆体構造を持つ 6 化合物を合成した。

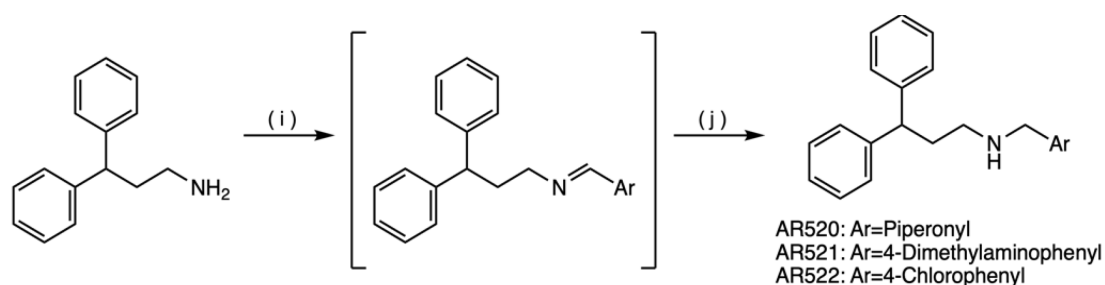
最後に、得られた前駆体構造を持つ 6 化合物のイミンをそれぞれ還元し 2 級アミンすることで、設計した AR503、AR506、AR509、AR523、AR524、AR525 を合成した。その結果、これらの 6 化合物をそれぞれ総収率が AR503: 35.3 %、AR506: 58.7 %、AR509: 58.7 %、AR523: 18.0 %、AR524: 31.5 %、AR525: 25.7 % で得ることに成功した。



(a) Ethyl cyanoacetate, 5mol %piperidine, PhMe, 140°C, 94.2%; (b) 2a) PhMgBr, PhMe, 45°C, 93.4%, 2b) 4-OMe PhMgBr, PhMe, r.t., 91.7%; (c) 28% NaOMe, MeOH, H₂O, r.t., 3a) 99.0%, 3b) 98.2%; (d) DMA, 140° C, 4a) 84.0%, 4b) 82.0%; (e) LiAlH₄, THF, 0° C, 5a) 95.9%, 5b) 71.6%; (f) PhH, reflux, (g) NaBH₄, MeOH, r.t., **AR503** 50.3%, **AR506** 83.7%, **AR509** 83.7%, **AR523** 36.1%, **AR524** 63.2%, **AR525** 51.6%, (i) PhH, reflux, (j) **AR520** NaBH₄, MeOH, r.t., 88.6%, **AR521** NaBH₄, MeOH, r.t., 63.9%, **AR522** NaBH₄, MeOH, r.t., 52.4%.

図 15. AR503、AR506、AR509、AR523、AR524、AR525 の合成

次に、AR520、AR521、AR522 の 3 化合物の合成では、A および B パートを含むジフェニルプロピルアミンを出発原料とし、C パートを含む芳香族 (AR520: ピペロニル基、AR521: *p*-ジメチルアミンフェニル基、AR522: *p*-クロロフェニル基) アルデヒドとイミンを形成し、設計した AR520、AR521、AR522 の前駆体構造を持つ 3 化合物を合成した。最後に、得られたイミンを還元し 2 級アミンすることで、設計した AR520、AR521、AR522 を合成した。その結果、これらの 3 化合物をそれぞれ総収率が AR520: 88.6%、AR521: 63.9%、AR522: 52.4% で得ることに成功した。



(i) PhH, reflux, (j) **AR520**) NaBH₄, MeOH, r.t., 88.6%, **AR521**) NaBH₄, MeOH, r.t., 63.9%, **AR522**) NaBH₄, MeOH, r.t., 52.4%.

図 16. AR520、AR521、AR522 の合成

設計した合成法を用いて設計した 9 種類の誘導体を合成した結果、AR503、AR506、AR509、AR523、AR524、AR525 を 7 工程、総収率 18.0% ~ 58.7% で合成することに成功した。また、AR520、AR521、AR522 は、2 工程、総収率 52.4% ~ 88.6% で合成することに成功した。合成した化合物の構造と純度は、核磁気共鳴分析・質量分析・元素分析により確認した。本方法は、酵素との結合に重要であるとされた A・B・C パートに任意の構造を導入可能な合成法であり、設計した誘導体のみならず、必要に応じてさらなる構造展開が可能となる。

2-2-3. AR501 誘導体の構造活性相関解析に基づく GM 阻害剤の選抜

次に、GM 阻害活性の向上を目指し、設計・合成した AR501 誘導体の構造活性相関を解析とその結果に基づいた最も有用な構造の選抜を行った。そこで、探索で得られた AR501、および合成した 9 種類の誘導体の GM 阻害活性の評価を構築した 2 つの評価系を用いて行った(表 3 および 4)。蛍光アッセイ系では、終濃度 10 μM となるように書く誘導体を投与し、その GM 阻害による蛍光強度・蛍光面積を観察し、その増加率を計算した。細胞形態変化アッセイ系においても、同様に終濃度 10 μM となるように各誘導体を投与し、GM 阻害による細胞形態変化を観察し、その細胞長の縮小率を計算した。

表 3. KIF および AR501、503、506、509 の GM 阻害活性評価

	Control	KIF	AR501	AR509	AR506	AR503
蛍光強度 増加率	100 %	315 %	168 %	108 %	114 %	111 %
蛍光面積 増加率	100 %	266 %	154 %	113 %	114 %	115 %
細胞長 縮小率	0 %	13 %	21 %	31 %	23 %	18 %

表 4. AR520、521、522、523、524、525 の GM 阻害活性評価

	AR520	AR521	AR522	AR523	AR524	AR525
蛍光強度 増加率	114 %	158 %	134 %	110 %	165 %	163 %
蛍光面積 増加率	113 %	152 %	127 %	101 %	148 %	150 %
細胞長 縮小率	28 %	32 %	29 %	26 %	28 %	27 %

まず、10 化合物を蛍光アッセイ系にて評価した結果、AR521、524、525 を終濃度 10 μM となるように投与した細胞において、AR501 と同程度の約 1.5 倍の HM 糖鎖の増加が観察された。そこで、その構造を図 17 に示した。AR522 を投与した細胞においては、AR501 よりも少ない約 1.3 倍の HM 糖鎖の増加が観察された。また、AR503、506、509、520、523 を投与した細胞においては、HM 糖鎖の増加がほとんど観察されなかった。

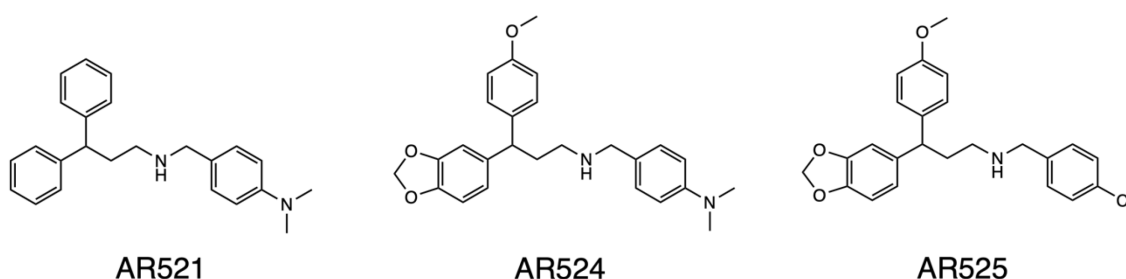


図 17. AR521、524、525 の構造

そこで次に、蛍光アッセイ系にて AR501 と同程度の GM 阻害活性を示したこれら 3 化合物の細胞形態変化アッセイ系で評価した結果、10 μM で AR501 以上の GM 阻害による細胞長の縮小を示した。さらに、これら 3 化合物の細胞毒性評価を WST-8 法にて行い、これらの化合物が GM 阻害活性を示した 10 μM での細胞生存率が AR521: 92%、AR524: 32%、AR525: 39% と細胞毒性を示さなかったため、これらの化合物が意図しない細胞内標的を持たない GM 阻害剤であると確認した。

次に、高い阻害活性を示した 3 化合物の構造と GM 阻害活性の相関を解析した。得られた 3 化合物の各パート構造に着目すると、A パートではピペロニル基もしくはフェニル基、B パートでは 4-メトキシ

フェニル基もしくはフェニル基、C パートでは緑色で示した *p*-ジメチルアミンフェニル基および *p*-クロロフェニル基であった。このことから、GM 阻害活性には、ヘテロ原子を含むことで化合物の極性を下げ、かつ酵素との水素結合が形成可能なこれらの官能基構造が重要であることが示された。

そこで、本解析の結果より、AR501 誘導体の代表構造として、これら 3 化合物より、全てのパートにヘテロ原子を含んだ官能基をもち、最も強く GM と結合すると期待できる AR524 (図 17 中央) を誘導体の代表構造として選抜した。

2-3. AR524 の阻害作用点の解析

2-3-1. GM 阻害による細胞内 HM 型糖鎖の分布変化

AR524 が選抜できたことから、次に本化合物が *N*-結合型糖鎖プロセッシングに関与するマンノシダーゼのうち、どの酵素に作用するのか解析を行った。ヒト細胞中において本糖鎖のプロセッシングに関与するマンノシダーゼは、GMI (Glycosidase Family 47, GMIA1, GMIA2, GMIC1 のアイソザイムの総称) および GMII (Glycosidase Family 38) に加え、小胞体マンノシダーゼ (Glycosidase Family 47) が存在する。そこで、AR524 がこれらのいずれの細胞内マンノシダーゼに作用するか、AR524 と GMI の 3 種のアイソザイムを区別せず阻害剤である KIF をポジティブコントロールとして用いて、GM 阻害によって細胞内部および細胞表面に蓄積した HM 型糖鎖の分布変化の観察とその構造の解析を行った。

まず、細胞内 HM 型糖鎖の分布変化の観察では、KIF と AR524 を用いて、それらをそれぞれ投与した際の細胞内の HM 型糖鎖の分布を

構築した「蛍光アッセイ系」に用いたレクチンと同様の蛍光標識レクチン Con-A を用いて検出し、比較した (図 18)。

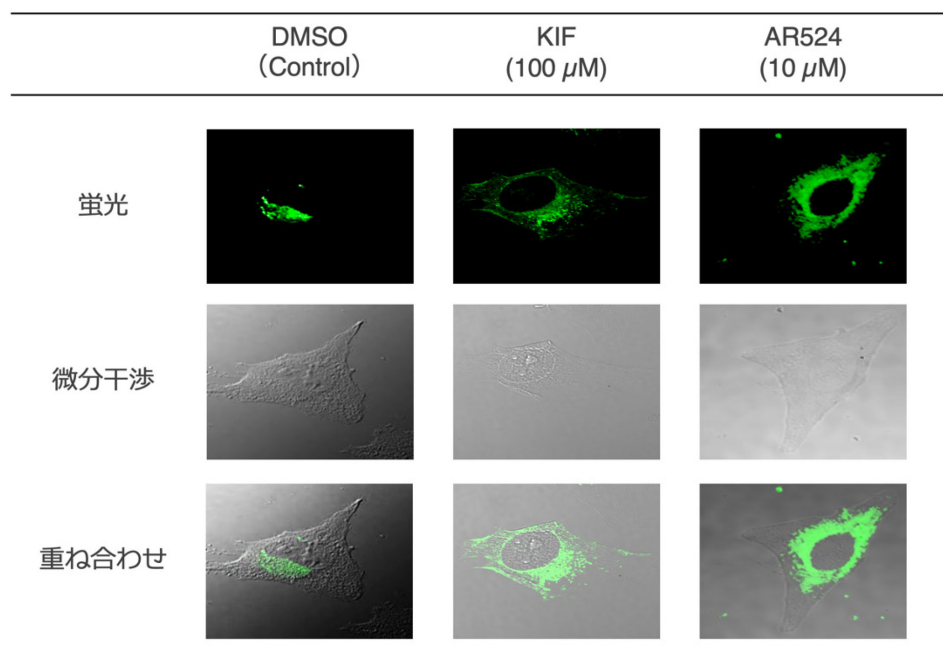


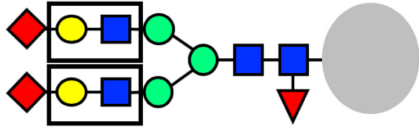
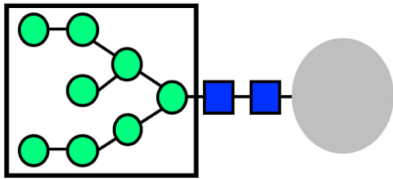
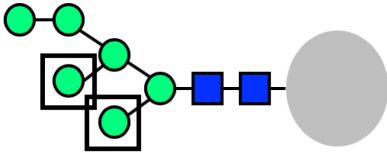
図 18. KIF および AR524 を用いた細胞内 HM 型糖鎖の分布変化

その結果、阻害剤未投与のコントロール細胞では、通常の *N*-結合型糖鎖のプロセッシング経路に見られる HM 型糖鎖が核周辺にある小胞体およびゴルジ体に分布していることが観察された。それに対し、終濃度 100 μ M となるように KIF を投与した細胞では、HM 型糖鎖が核周辺だけでなく細胞全体に分布していることが観察された。さらに、終濃度 10 μ M となるように AR524 を投与した細胞においても、KIF と同様に HM 型糖鎖の細胞全体への分布が観察された。以上の結果から、AR524 は *N*-結合型糖鎖プロセッシングに関与するマンノシダーゼのうち、3 種のアイソザイムは区別できないが少なくとも GMI に作用することが示唆された。

3-2. GM 阻害による細胞表面糖鎖の分布変化

次に、AR524 のより詳細な阻害作用点を明らかにするために、GM 阻害によって細胞表面へ輸送される糖鎖の種類と分布の変化について複数の蛍光標識レクチンを用いたフローサイトメトリー分析を行った。まず、細胞表面糖鎖の検出に用いた 3 種類の蛍光標識レクチンが認識する糖鎖の構造を表 5 にまとめた[45]。

表 5. 分析に用いた蛍光標識レクチンの認識構造

蛍光標識レクチン名	認識構造 (□: 認識する糖残基)
<i>Datura Stramonium</i> レクチン (DSL)	 <p>Galactose, β-1, 4 GlcNAc</p>
コンカナバリン A (Con-A)	 <p>α-mannose</p>
<i>Galanthus Nivalis</i> レクチン (GNL)	 <p>末端 α-1,3 mannose</p>

成熟糖鎖の認識には、成熟糖鎖中のガラクトースと β -1,4結合したN-アセチルグルコサミンを認識する *Datura Stramonium* レクチン (DSL) を用いた。HM 型糖鎖の認識には、 α -結合マンノース全般を認識する Con-A、および Con-A とは異なり HM 型糖鎖末端の α -1,3 結合マンノースを認識する *Galanthus Nivalis* レクチン (GNL) の 2 種類を用いた。

次に、阻害剤を投与した細胞とコントロールとして DMSO のみを投与した細胞における細胞表面糖鎖を上記レクチンにて検出し、その糖鎖の種類と分布変化を観察した (図 19)。また、すべての実験において、ポジティブコントロールである KIF は、終濃度 100 μ M、AR524 は、終濃度 30 μ M となるように細胞に投与した。

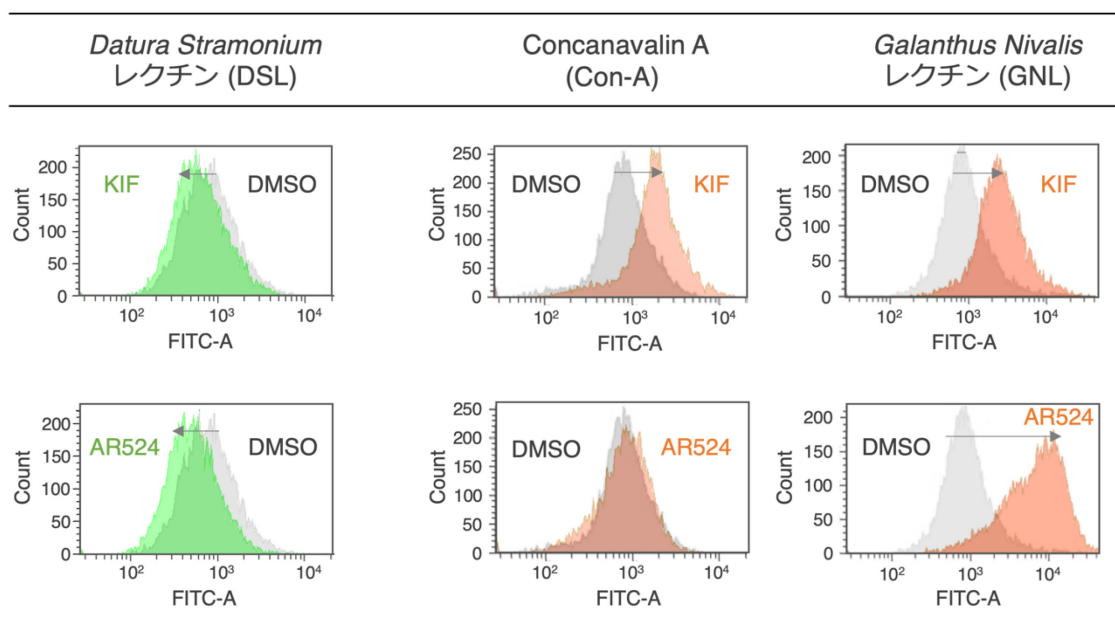


図 19. フローサイトメトリー分析による細胞表面糖鎖の分布変化 (灰色: DMSO のみ投与したコントロールの糖鎖分布、緑色: 阻害剤を投与した細胞の成熟糖鎖分布、橙色: 阻害剤を投与した細胞の未成熟糖鎖分布)

その結果、DSL を用いて観察した場合 (図 19 左)、コントロールと比較し、KIF を投与した細胞にて成熟糖鎖の減少が観察された。そして、AR524 を投与した細胞においても、同様の成熟糖鎖の減少が観察された。次に、Con-A を用いて観察した場合 (図 19 中央)、コントロールと比較し、KIF を投与した細胞にて、HM 型糖鎖の増加が観察された。しかし、AR524 を投与した細胞では、その糖鎖量に変化しなかった。さらに、GNL を用いて観察した場合 (図 19 右)、コントロールと比較し、KIF を投与した細胞にて HM 型糖鎖の増加が観察された。それに対し、AR524 は、KIF よりも多くの HM 型糖鎖を細胞表面に蓄積させた。これらの結果より、AR524 は、KIF とは異なる構造の HM 型糖鎖を細胞表面に増加させていることから、KIF とは作用点が異なることが明らかとなった。

そこで、これまでの阻害作用点解析の結果をレクチンの結合特性から解析した。糖鎖の検出に用いたレクチンのうち、GNL は、GMI、GMII、および ER マンノシダーゼの基質のうち、ER マンノシダーゼの基質 $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ 型の HM 型糖鎖を認識しない [46]。このことから、AR524 の阻害作用点は、GMI および GMII のどちらかであることが示唆された。

これまでの研究より、開発した AR524 は、細胞表面の N-結合型糖鎖構造の制御を可能とし、かつ既知阻害剤とは異なる阻害作用点を持つ有用な阻害剤である。そこで今後、より詳細な阻害作用点解析、および本阻害剤が GM 阻害に起因する細胞間コミュニケーション不全活性の解析、これら 2 点の解析を行っていく。阻害作用点解析では、細胞間コミュニケーションに関与し、GM 阻害によって構造中の糖鎖が未成熟となることが報告されている [47] 膜タンパク質インテグリンに着目し、AR524 投与時のインテグリン構造中の糖鎖構造を高分解能質量分析器にて推定することで阻害作用点を決定する。細胞間コミュニケーション不全活性の解析では、がん腫瘍に近い構造を持つ 3 次

元培養細胞 (スフェロイド) を用いて、AR524 の投与によってその構造を崩壊させるのか評価を行う [48, 49]。

これらを明らかとすることで、本研究で開発した AR524 が、考案した糖鎖構造制御による CCC 不全を基盤とした新たな抗がん戦略へ応用できると考えている。

第 3 章 結論

3-1. 総括

本研究では、細胞間コミュニケーション不全を基盤とした新たな抗がん腫瘍戦略の達成を目指し、*N*-結合型糖鎖の制御を可能とする GM 阻害剤の開発のため 2 つの研究目的を設定した。

まず、考案した戦略の基盤となる、細胞レベルにおいて低濃度で特異的に作用する GM 阻害剤を開発することを第一の研究目的とした。そこで、阻害剤開発の母核となる構造を選定、その構造を元にした構造展開、およびその構造活性相関解析による選抜を行った。はじめに、母核構造の選定として、既知 GM 阻害剤が本研究に適応可能か検討した結果、糖ミミックな構造に依存した問題点から適応は難しいと判断した。そこで、意図しない作用標的が存在する懸念はあるが、既知阻害剤の構造的な問題点を解決可能な、非糖ミミック構造を阻害剤の母核構造として選択した。そこで、これまでに報告のなかった非糖ミミックな構造の GM 阻害剤を新たに探索することで開発を試みるため、ヒト培養細胞レベルでの GM 阻害活性が評価可能な 2 つの系、「蛍光アッセイ系」と「細胞形態変化アッセイ系」を新たに構築した。本系の開発によって、新規 GM 阻害剤の探索を可能とした。

次に、構築した評価系を用いた阻害剤探索を試み、医薬品である 3 化合物と生理活性の報告のない 1 化合物を同定した。さらに、これら 4 化合物より、既知阻害剤よりも低濃度、かつ特異的に GM を阻害する可能性を持つ化合物 AR501 を選抜し、GM 特異的阻害剤開発の母核構造とした。本化合物は、既知阻害剤の問題点を解決した非糖ミミック構造を持つ有用な GM 阻害剤であり、細胞レベルにて既知阻害剤よりも低濃度での GM 阻害を可能とした。

次に、選抜した AR501 の GM 阻害活性を向上させるため、その構

造を元にした構造展開とおよびその構造活性相関解析を行った。まず、AR501 誘導体を設計するため、*in silico* における GM の活性部位と AR501 の結合様式解析を行った。その結果、AR501 構造中の 3 つの芳香環構造が重要であることが示された。そこで、3 つの芳香環構造に着目した 9 つの誘導体の設計し、その合成を行った。設計した誘導体のうち、AR503、AR506、AR509、AR523、AR524、AR525 は、7 工程、総収率 18.0%~58.7% で合成した。また、AR520、AR521、AR522 は、2 工程、総収率 52.4%~88.6% で合成した。次に、合成した誘導体の構築した 2 つの系を用いて GM 阻害活性を評価し、AR501 よりも高い阻害活性を示した 3 化合物を選抜した。そこで、この 3 化合物の構造から、その構造活性相関を解析した。その結果、化合物の極性を下げ、かつ酵素との水素結合が形成可能ヘテロ原子を含む官能基が重要であることが示された。このことから、AR501 誘導体の代表構造として、最も強く GM と結合すると期待できる AR524 を選抜した。

第二の研究目的として、開発した GM 阻害剤が、*N*-結合型糖鎖プロセッシング経路の 3 種のマンノシダーゼ (ER マンノシダーゼ、GMI、GMII) のうちいずれの酵素を阻害するのか、さらに、その阻害によって細胞表面 *N*-結合型糖鎖構造を未成熟とし、考案した抗がん戦略に適応を可能とするのか明らかとするため、AR524 によって細胞内および細胞表面に蓄積する *N*-結合型糖鎖の構造を特定の糖鎖を認識するタンパク質レクチンを用いて分析した。その結果、AR524 は、既知阻害剤と同様に細胞内に未成熟糖鎖を蓄積させ、さらに蓄積した未成熟糖鎖を既知阻害剤以上に細胞表面に増加させた。しかし、興味深いことに、その構造が既知阻害剤によって増加した糖鎖とは異なる構造を持つことが示された。そこでレクチンの認識構造より阻害作用点を解析すると、AR524 の阻害作用点は、GMI もしくは GMII であることが示唆されたが、決定には至らなかった。これらのことから、開発した AR524 は、阻害標的が既知阻害剤とは異なる有用な GM 阻害剤であることが

明らかとなった。

今後の課題として、本研究で既知阻害剤とは作用点の異なる有用な新規非糖ミミック GM 阻害剤 AR524 を開発することに成功したが、その阻害作用点が GMI もしくは GMII のどちらであるのか解明できていない。そこで、AR524 によって増加した HM 型糖鎖の構造について、質量分析器を用いて解析することで、その阻害作用点を決定する必要がある。また、AR524 が細胞表面に HM 型糖鎖を増加させることを明らかとしたが、本阻害剤が GM 阻害に基づく CCC 不全を引き起こすのか明らかとなっていない。そこで、がん腫瘍に近い構造を持つ 3 次元培養細胞を用いて、AR524 がその構造を CCC 不全によって崩壊させるのか解析する必要がある。さらに、3 次元培養よりも実際のがん腫瘍での作用解析も必要である。そこで、器官、個体レベルでの評価として、マウスを用いた固形がんにおける CCC 不全活性評価、および上市されている抗がん剤と併用してのがん腫瘍治療が可能であるか明らかとする必要がある。さらに、抗がん腫瘍戦略に用いる抗がん剤も検討することも必須である。そこで、上市されているものに加え、開発中の抗がん剤や臨床研究の途中で脱落してしまった化合物も対象とし、がん幹細胞への特異性や活性について、AR524 と併用して評価していく必要がある。

また、本研究で GM 阻害剤の有用性が明らかとできたことから、AR524 だけでなく、阻害剤探索で得られたヒット化合物 TAM や RAL を用いたドラックリポジショニングな阻害剤開発を行っていき、主たる活性と GM 阻害活性を併せ持ち、複数の標的に作用する複合的な効果を持つ強い薬剤を開発する必要がある。

本研究では、N-結合型糖鎖構造の制御を可能とした新規非糖ミミック GM 阻害剤 AR524 を開発した。そこで、AR524 の阻害作用点を決定することができれば、その標的の阻害による生理活性や酵素学的性質についての解析研究に発展することが可能となる。また、AR524 が

GM 阻害に基づく CCC 不全を引き起こすのか明らかとできれば、考案した抗がん腫瘍戦略構築の基盤とすることが可能となり、実際の器官やマウス個体におけるがん腫瘍を用いた *in vivo* レベルでの創薬研究に発展できる。特に AR524 との組み合わせでがん腫瘍に対する有用性が示せれば、現在のがん治療で使用されていない化合物に着目した新たな研究を行うことが可能である。また、AR524 の CCC 不全活性を基準としてさらなる構造展開と構造活性相関を行うこと CCC の強弱などを制御する化合物の開発や *N*-結合型糖鎖構造と CCC の詳細な相関解析につなげることが可能である。

最後に、本研究で標的酵素とした GM は、*N*-結合型糖鎖のプロセッシングの中核を担う酵素であることから、開発した AR524 および GM 阻害活性評価系を用いることで、考案した抗がん腫瘍戦略への応用だけでなく、未だ解明されていない GMI アイソザイムや GMII の諸性質や立体構造、および生物学的意義の解明にも大きく寄与することが可能である。

第 4 章 実験の部

(略語)

PhH, benzene; clog P, calculated of distribution coefficient; clog $D_{7.4}$, calculated of distribution coefficient on pH 7.4; ConA-AF488, Concanavalin A conjugated with Alexa Fluor 488; Et₂O, diethyl ether; DCM, dichloromethane; DMJ, deoxymannojirimycin hydrochloride; DMSO, dimethyl sulfoxide; DSL-FITC, *Datura stramonium* lectin conjugated with fluorescein isothiocyanate; EtOH, ethanol; AcOEt, ethyl acetate; FBS, fetal bovine serum; Hex: hexane; KIF, kifunensine; GNL-FITC, *Galanthus nivalis* lectin conjugated with fluorescein isothiocyanate; MS, mass spectrometry; MeOH, methanol; LAH, lithium aluminum hydride; NMR, nuclear magnetic resonance; PBS, phosphate-buffered saline (not including Ca²⁺ and Mg²⁺); SWA, swainsonine; TEA, triethylamine; TFA, trifluoroacetic acid; THF, tetrahydrofuran; tPSA, topological polar surface area; PhMe, toluene.

4-1. ヒト培養細胞の調製

4-1-1. DMEM の調製

DMEM は、DMEM (Sigma-Aldrich, D6046) 360 mL に FBS (MP Biomedicals, S1820) を 40 mL およびペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 168023191) を 5 mL を加えたのち、転倒混和することで作製した。

4-1-2. Trypsin 溶液の調製

Trypsin 溶液は、0.5 w/v% trypsin-5.3 mmol/L EDTA・4Na solution without phenol red (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 208-17251) 100 mL に、10 倍希釈し 121 °C, 2 気圧、20 分間オートクレーブにより滅菌処理した PBS (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 163-25265) 900 mL を加えることで作製した。

4-1-3. ヒト細胞の培養

ヒト細胞として、ヒト由来子宮頸癌細胞 (HeLa, RIKEN BRC through the National Bio-Resource Project of MEXT, RCB0007) を購入した。これら購入した細胞株を含むアンプルビン[®]を 37 °C の湯浴で融解したのち、10 mL の DMEM を含む 15 mL コーニングチューブに全量を移し、3,000 rpm, 室温、5 分間遠心分離を行った。その後、上清を取り除き新たに DMEM を 10 mL 加え、細胞を懸濁後、再度 3,000 rpm、室温、3 分間遠心分離を行った。上清を除き DMEM 3 mL を加え細胞懸濁液としたのち、DMEM 4 mL を含む 25 cm² 細胞培養用ディッシュ (TPP Techno Plastic Products AG, 90026) に 500 µL または 1,000 µL 加え、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で培養を行った。

4-1-4. ヒト細胞の継代

72-96 時間程度培養したヒト細胞を含む細胞培養用ディッシュについて、25 cm² 細胞培養用ディッシュから DMEM 除去し、PBS を用いて 3 回細胞を洗浄したのち、trypsin 溶液を 2 mL 加え、ディッシュから細胞を剥がした。その後、DMEM 2 mL を加え細胞懸濁液とした。これら細胞懸濁液について、DMEM 4 mL を含む 25 cm² 細胞培養用

ディッシュに 500 μL または 1000 μL 加え、37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 濃度 5 % の条件下で再度培養を行った。

4-2. GM 阻害剤評価系の構築

蛍光画像は、下記フィルターセットが備えられたオールインワン蛍光顕微鏡 (KEYENCE, BZ-9000) により記録した。AF488 の測定は、GFP-BP (EX, 470/40 nm; dichroic filter, 495 nm; and EM, 535/50 nm) で行った。また、細胞数は、countess TM automated cell counter (invitrogen, C10227) によりトリパンブルー染色法を用いて測定した。

4-2-1. 既知 GM 阻害剤の化学特性の計算

既知阻害剤 4 化合物 (DMJ, KIF, SWA, マンノスタチン A) の tPSA, clog P, clog $D_{7.4}$ は、Structure Design Suite version 12.01 (Advanced Chemistry Development Inc.) を用いて計算を行った。

4-2-2. 既知 GM 阻害剤溶液および ConA-AF488 PBS 溶液の調製

DMJ (Toronto Research Chemicals Inc. TRC-D240000, 1molecular weight: 199.63) 1.0 mg を DMSO 50 μL に溶解し、100 mM DMJ 溶液を作製した。この 100 mM 溶液 5 μL と DMSO 20 μL を混合し、20 mM DMJ 溶液を作製した。この 20 mM 溶液 12 μL と DMSO 8 μL を混合し、12 mM DMJ 溶液を作製した。また、20 mM 溶液 6 μL と DMSO 14 μL を混合し、6 mM DMJ 溶液を作製した。さらに、20 mM 溶液 2 μL と DMSO 18 μL を混合し、2 mM DMJ 溶液を作製した。

KIF (Toronto Research Chemicals Inc., 10009437, molecular weight:

232.20) 1.0 mg を DMSO 43 μ L に溶解し、100 mM KIF 溶液を作製した。この 100 mM 溶液 5 μ L と DMSO 20 μ L を混合し、20 mM DMJ 溶液を作製した。この 20 mM 溶液 12 μ L と DMSO 8 μ L を混合し、12 mM DMJ 溶液を作製した。また、20 mM 溶液 6 μ L と DMSO 14 μ L を混合し、6 mM DMJ 溶液を作製した。さらに、20 mM 溶液 2 μ L と DMSO 18 μ L を混合し、2 mM DMJ 溶液を作製した。

SWA (Toronto Research Chemicals Inc., MS10129, molecular weight: 173.21) 1.0 mg を DMSO 58 μ L に溶解し、100 mM SWA 溶液を作製した。この 100 mM 溶液 5 μ L と DMSO 20 μ L を混合し、20 mM DMJ 溶液を作製した。この 20 mM 溶液 12 μ L と DMSO 8 μ L を混合し、12 mM DMJ 溶液を作製した。また、20 mM 溶液 6 μ L と DMSO 14 μ L を混合し、6 mM DMJ 溶液を作製した。さらに、20 mM 溶液 2 μ L と DMSO 18 μ L を混合し、2 mM DMJ 溶液を作製した。

ConA-AF488 (Thermo Fisher Scientific, C11252) 1.0 mg を 0.1 M 重炭酸ナトリウム 溶液 200 μ L に溶解し、5 mg/mL ConA-AF488 PBS 溶液を作製した。また、5 mg/mL 溶液 30 μ L と PBS 12 mL を混合し、25 μ g/mL ConA-AF488 PBS 溶液を作製した。

4-2-3. 既知 GM 阻害剤を用いた濃度依存的添加による GM 阻害剤探索系の評価

DMEM を 1 mL を加えた 6-well plates (Sigma-Aldrich, SIAL0516) に HeLa 細胞を 9.0×10^4 cells/well となるように播種し、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。その後、DMEM を除去し、新しい DMEM を 1 mL 加え、終濃度 0, 10, 30, 60 および 100 μ M となるように、調製した 0, 2, 6, 12 および 20 mM DMJ, KIF, SWA の DMSO 溶液をそれぞれ加え、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。

培養後、PBS で 3 回洗浄したのち、10 % formalin solution (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 064-03843) で細胞を固定し、PBS で 1 回洗浄したのち、調製した 25 µg/mL ConA-AF488 PBS 溶液 1 mL を加え 15 分間室温で静置した。その後、PBS で 1 回洗浄したのち、PBS 1 mL 加え、オールインワン蛍光顕微鏡により観察を行った。1 well につき、蛍光画像を 5 地点で撮影を行った。

オールインワン蛍光顕微鏡にて撮影を行った細胞の蛍光画像から、細胞の蛍光強度および蛍光面積について、オールインワン蛍光顕微鏡解析ソフト(BZ-analyzer ver. 2.1)および画像解析ソフト Winroof 2013 ver. 1.2.0. (Mitani Co.) を用いて計測を行った。写真が保存されたファイルを開き、蛍光画像内の約 100-120 個の細胞を含む領域を選択した。細胞の蛍光強度および蛍光面積の平均値は、選択した領域の合計値を半手動で測定したそれぞれの細胞数で割ることで算出を行った。また、各ウェルの蛍光強度および蛍光面積は、標準偏差で棄却テストを実行した後の値を平均することによって計算を行った。

4-2-4. 評価系を用いた既知 GM 阻害剤の GM 阻害活性測定

DMEM を 1 mL を加えた 6-well plates に HeLa 細胞を 9.0×10^4 cells/well となるように播種し、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。その後、DMEM を除去し、新しい DMEM を 1 mL 加え、終濃度 100 µM となるように調製した 20 mM DMJ, KIF, SWA の DMSO 溶液をそれぞれ加え、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。

培養後、PBS で 3 回洗浄したのち、10 % formalin solution で細胞を固定し、PBS で 1 回洗浄したのち、調製した 25 µg/mL ConA-AF488 PBS 溶液 1 mL を加え 15 分間室温で静置した。その後、PBS で 1 回洗浄したのち、PBS 1 mL 加え、オールインワン蛍光顕微鏡により観察

を行った。1 wellにつき、蛍光画像および位相差画像を 5 地点で撮影を行った。

オールインワン蛍光顕微鏡にて撮影を行った細胞の蛍光画像から、細胞の蛍光強度および蛍光面積、また細胞の位相差画像から、細胞長径について、オールインワン蛍光顕微鏡解析ソフトおよび画像解析ソフト Winroof 2013 ver. 1.2.0. を用いて計測を行った。写真が保存されたファイルを開き、蛍光画像内の約 100-120 個の細胞を含む領域を選択した。細胞の蛍光強度、蛍光面積および細胞長径の平均値は、選択した領域の合計値を半手動で測定したそれぞれの細胞数で割ることで算出を行った。また、各ウェルの蛍光強度および蛍光面積は、標準偏差で棄却テストを実行した後の値を平均することによって計算を行った。

4-3. 化合物ライブラリからの探索

蛍光画像は、下記フィルターセットが備えられたオールインワン蛍光顕微鏡により記録した。AF488 の測定は、GFP-BP (EX, 470/40 nm; dichroic filter, 495 nm; and EM, 535/50 nm)で行った。また、細胞数は、countess TM automated cell counter によりトリパンブルー染色法を用いて測定した。吸光度は、波長 400–750 nm で測定が可能なマイクロプレートリーダー (iMark microplate reader, Bio-Rad) を用いて測定した。

4-3-1. ヒット化合物の化学特性の計算

ヒット化合物 4 化合物 (タモキシフェン、ラロキシフェン、スリンダク、AR501) の tPSA, clog P, clog D_{7.4} は、Structure Design Suite version 12.01 を用いて計算を行った。

4-3-2. ヒット化合物溶液の調製

タモキシフェン (Cayman Chemical, 13258, molecular weight: 371.53) 1.0 mg を DMSO 17.9 μL に溶解し、150 mM タモキシフェン溶液を作製した。この 150 mM 溶液 2 μL と DMSO 13 μL を混合し、20 mM タモキシフェン溶液を作製した。この 20 mM 溶液 10 μL と DMSO 10 μL を混合し、10 mM タモキシフェン溶液を作製した。また、20 mM 溶液 8 μL と DMSO 12 μL を混合し、8 mM タモキシフェン溶液を作製した。また、20 mM 溶液 6 μL と DMSO 14 μL を混合し、6 mM タモキシフェン溶液を作製した。また、20 mM 溶液 4 μL と DMSO 16 μL を混合し、4 mM タモキシフェン溶液を作製した。さらに、20 mM 溶液 2 μL と DMSO 18 μL を混合し、2 mM タモキシフェン溶液を作製した。

ラロキシフェン (Tokyo Chemical Industry, Ltd., R0109, molecular weight: 510.02) 1.0 mg を DMSO 13.1 μL に溶解し、150 mM ラロキシフェン溶液を作製した。この 150 mM 溶液 2 μL と DMSO 13 μL を混合し、20 mM ラロキシフェン溶液を作製した。この 20 mM 溶液 10 μL と DMSO 10 μL を混合し、10 mM ラロキシフェン溶液を作製した。また、20 mM 溶液 8 μL と DMSO 12 μL を混合し、8 mM ラロキシフェン溶液を作製した。また、20 mM 溶液 6 μL と DMSO 14 μL を混合し、6 mM ラロキシフェン溶液を作製した。また、20 mM 溶液 4 μL と DMSO 16 μL を混合し、4 mM ラロキシフェン溶液を作製した。さらに、20 mM 溶液 2 μL と DMSO 18 μL を混合し、2 mM タラロキシフェン溶液を作製した。

スリンダク (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 190-12701, molecular weight: 356.41) 1.0 mg を DMSO 18.7 μL に溶解し、150 mM スリンダク溶液を作製した。この 150 mM 溶液 3 μL と DMSO 12 μL を混合し、30 mM スリンダク溶液を作製した。また、150 mM 溶液 2

μL と DMSO 13 μL を混合し、20 mM スリンダク溶液を作製した。この 20 mM 溶液 2 μL と DMSO 18 μL を混合し、2 mM スリンダク溶液を作製した。

AR501 (NAMIKI SHOJI Co., Ltd., NS-000617656, molecular weight: 345.40) 1.0 mg を DMSO 19.3 μL に溶解し、150 mM AR501 溶液を作製した。また、150 mM 溶液 2 μL と DMSO 13 μL を混合し、20 mM AR501 溶液を作製した。この 20 mM 溶液 10 μL と DMSO 10 μL を混合し、10 mM AR501 溶液を作製した。また、20 mM 溶液 5 μL と DMSO 15 μL を混合し、5 mM AR501 溶液を作製した。また、20 mM 溶液 2 μL と DMSO 18 μL を混合し、2 mM AR501 溶液を作製した。この 2 mM 溶液 2 μL と DMSO 18 μL を混合し、0.2 mM AR501 溶液を作製した。

4-3-3. 評価系を用いたヒット化合物の GM 阻害活性測定

DMEM を 1 mL を加えた 6-well plate に HeLa 細胞を 9.0×10^4 cells/well となるように播種し、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。その後、DMEM を除去し、新しい DMEM を 1 mL 加え、終濃度 10 μM となるように、調製した 2 mM タモキシフェン、ラロキシフェンおよび AR501、および終濃度 100 μM となるように、調製した 20 mM スリンダクの DMSO 溶液をそれぞれ加え、37 °C , CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。

培養後、PBS で 3 回洗浄したのち、10 % formalin solution で細胞を固定し、PBS で 1 回洗浄したのち、調製した 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ConA-AF488 PBS 溶液 1 mL を加え 15 分間室温で静置した。その後、PBS で 1 回洗浄したのち、PBS 1 mL 加え、オールインワン蛍光顕微鏡により観察を行った。1 well につき、蛍光画像および位相差画像を 5 地点で撮影を行った。

オールインワン蛍光顕微鏡にて撮影を行った細胞の蛍光画像から、細胞の蛍光強度および蛍光面積、また細胞の位相差画像から細胞長径について、オールインワン蛍光顕微鏡解析ソフトおよび画像解析ソフト Winroof 2013 ver. 1.2.0. を用いて計測を行った。写真が保存されたファイルを開き、蛍光画像内の約 100-120 個の細胞を含む領域を選択した。細胞の蛍光強度、蛍光面積および細胞長径の平均値は、選択した領域の合計値を半手動で測定したそれぞれの細胞数で割ることで算出を行った。また、各ウェルの蛍光強度および蛍光面積は、標準偏差で棄却テストを実行した後の値を平均することによって計算を行った。

4-3-4. ヒット化合物の細胞毒性評価

DMEM を 100 μ L を加えた 96-well plates に HeLa 細胞を 3.0×10^3 cells/well となるように播種し、37 $^{\circ}$ C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。その後、DMEM を除去し、調製したヒット化合物の溶液(タモキシフェンおよびラロキシフェン: 2, 4, 6, 8, 10 mM, スリンダク: 30 mM, AR501: 0.2, 2, 5, 10, 20 mM) 3 μ L に新しい DMEM を 1 mL 加えて作成した、終濃度 (タモキシフェンおよびラロキシフェン: 10, 20, 30, 40, 50 μ M, スリンダク: 150 μ M, AR501: 1, 10, 25, 50, 100 μ M) ヒット化合物の DMSO 溶液を各 well に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C , CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。

培養後、Cell Counting Kit-8 溶液 (DOJINDO, 343-07623) を各 well に 10 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C , CO₂ 濃度 5 % の条件下で 2 時間培養した。その後、マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した。細胞生存率は、DMEM および Cell Counting Kit-8 溶液のみを加えた blank の吸光度を引いたヒット化合物を投与した well の吸光度を、同様に blank の吸光度を引いた DMSO のみを投与したコントロール well の吸光度で割ることで算出した。なお、本実験は 5 連で行なった。

4-4. Morevlo Virchal Docker を用いたドッキングモデルの構築

マウス由来ゴルジ体マンノシダーゼ IA (PDB ID: 5KKB) と AR501 のドッキングモデルは、Morevlo Virchal Docker ver. 7.0.0 (Molexus) を用いて行った。本実験では、a piecewise linear potential に基づく MolDock scoring function を使用し、highest ranked poses を再度ランク付けする方式を適用し、ドッキングの精度を高めた。Grid resolution は 0.3 Å に設定した。リガンドの評価は、結合の内部エネルギー、内部の水素結合形成、および Sp²-Sp² (trigonal planar electron domain geometry) のねじれ角に基づいて行なった。

マウス由来 Golgi α -1,2-マンノシダーゼ IA の X 線結晶構造は、The Protein Data Bank (PDB) よりダウンロードした。AR501 の立体構造は、Chem3D (Perkinelmer Inc.) を用いて作成し、MM2 より Minimize energy を選択し、エネルギー最小化を行った。続いて、Morevlo Virchal Docker を起動し、酵素およびリガンドの立体構造をインポートした。その後、Detect Cavities を起動し、10-10000 Å の結合ポケットを検索した。候補となる cavity のうち、マウス由来 Golgi α -1,2-マンノシダーゼ IA の X 線結晶構造で Man₉GlcNAc₂ とラベル付けされた天然リガンドであるピリジルアミンに結合した cavity を、ドッキングの活性部位として選択した。選択した cavity は、容積 (233.744 Å³), 表面積 (656.64 Å²), および半径 (15.0 Å) であった。続いて、Docking Wizard を起動し、ドッキングシミュレーションのセットアップを行なった。Binding Site に得られた cavity を選択、アルゴリズムを MolDock Optimizer とし、Number of runs を 20, Max iteration を 10000, population sizes を 50, scaling factor を 0.50, crossover rate を 0.90 に設定した。すべてのドッキングは、0.60 Å RMSD threshold で実行した。得られたドッキングモデルの中から、MolDock Score の値が小さいものを選択し、ドッキングモデルとして採用した。

4-5. AR501 誘導体の合成

シリカゲルカラムクロマトグラフィーはシリカゲル 60N (Kanto Chemical, 37560-85) を用いて行い、反応過程の追跡は TLC ガラスプレート シリカゲル 60 F254 (Merck, 105715) を用いて行った。また、合成した化合物については $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H-}^1\text{H COSY}$, HMQC , 質量分析 (イオン化法: ESI および DUIS) によって目的の構造であること、および元素分析によって高純度で精製されていることを確認した。

4-5-1. 化合物 1 の合成

窒素雰囲気下で、ピペロナール (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 165-02782, 1.50 g, 10.0 mmol) に脱水 PhMe 50 mL、シアノ酢酸エチル (Sigma-Aldrich, E18425-5G, 1.14 mL, 10.5 mmol)、ピペリジン (Tokyo Chemical Industry, Ltd., P0453, 50.0 μL , 0.50 mmol) の順に加え、140 °C の油浴で 1 時間加熱還流を行った。その後溶媒を留去し、真空乾燥を行った。得られた化合物に 99.5 % EtOH を 40 mL 加え、熱による再結晶を行い、桐山濾過により黄色の結晶である化合物 **1** (2.16 g, 94.2 %) を得た。

4-5-2. 化合物 2a および 2b の合成

窒素雰囲気下で化合物 **1** (**2a**: 2.00 g, 8.16 mmol, **2b**: 0.80 g, 3.23 mmol) を脱水 PhMe (**2a**: 50 mL, **2b**: 20 mL) に溶解し、(**2a**: 3 M フェニルマグネシウムブロミド Et₂O solution, Sigma-Aldrich, 171565, 3.30 mL, 0.02 mmol, **2b**: 3 M 4-フェニルマグネシウムブロミド Et₂O solution, Sigma-Aldrich, 470260, 9.80 mL, 4.90 mmol) を加え、室温で (**2a**: 45 °C で 1.5 時間、**2b**: 5 分間) 攪拌した。その後、10 % 塩酸を (**2a**: 16 mL, **2b**: 7.5

mL) 加え、反応を終了した。その溶液を Et₂O 40 mL が入った分液ロートに加え、生成物の抽出を行った。得られた有機層を飽和食塩水 40 mL で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去後、真空乾燥を行った。その後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒; **2a**: Hex / AcOEt = 5/2, **2b**: PhMe / AcOEt = 15/1) により精製し、化合物 **2a** (2.46 g, 93.4 %) または化合物 **2b** (1.19 g, 91.7 %)を得た。

4-5-3. 化合物 **3a** および **3b** の合成

化合物 (**2a**: 0.34 g, 1.12 mmol, **2b**: 1.02 g, 2.88 mmol) を MeOH (**a**: 17 mL, **b**: 50 mL) に溶解し、純水 (**a**: 3.4 mL, **b**: 10 mL)、28 % ナトリウムメトキシド MeOH 溶液 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 197-02463, **a**: 0.34 mL, **b**: 1 mL) の順に加え、室温で(**a**: 4.5, **b**: 2) 時間攪拌した。その後、DOWEX 50W-X8 (H+ form) 加えて 5 分間攪拌し、反応を終了した。その溶液を綿栓ろ過し、溶媒を留去後、真空乾燥を行った。得られた生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: DCM / MeOH / TFA = 8/1/0.1) により精製し、化合物 **3a** (0.33 g, 99.0 %) または化合物 **3b** (0.82 g, 98.2 %) を得た。

4-5-4. 化合物 **4a** および **4b** の合成

化合物 (**3a**: 1.11 g, 3.75 mmol, **3b**: 0.82 g, 2.51 mmol) を DMA (**a**: 11 mL, **b**: 9 mL) mL に溶解し、140 °C の油浴で (**a**: 1, **b**: 4) 時間加熱還流を行った。得られた反応溶液を 70 mL の水の入った分液ロートに注ぎ、70 mL の Et₂O で 2 回抽出した。得られた有機層を 70 mL の飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去後、真空乾燥を行った。その後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: Hex / AcOEt = 5/2) により精製し、化合物 **4a** (0.79 g, 84.0 %) また

は化合物 **4b** (0.58 g, 82.0 %)を得た。

化合物 **4b**: ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 2.96 (d, 2H, J=7.5 Hz, -CH₂CN), 3.79 (s, 3H, -OCH₃), 4.26 (t, 1H, J=7.8 Hz, -C (4-methoxyphenyl)HCH₂CN), 5.93 (s, 2H, -OCH₂O-), 6.65 (d, 1H, J=2.0 Hz, Aromatic H), 6.71 (dd, 1H, J=2.0 Hz and 8.0 Hz, Aromatic H), 6.77 (d, 1H, J=8.0 Hz, Aromatic H), 7.23 (d, 2H, J=9.0 Hz, Aromatic H), 7.97 (d, 2H, J=8.5 Hz, Aromatic H).

DUIS-MS (positive mode): m/z = 304 [M+Na]⁺.

4-5-5. 化合物 **5a** および **5b** の合成

窒素雰囲気下で化合物 (**4a**: 0.51 g, 0.20 mmol, **4b**: 0.19 g, 0.66 mmol) を脱水 THF (**a**: 3 mL, **b**: 10 mL) mL に溶解し、アイスバスで 0 °C とした。そこへ、LAH (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 120-01091, 純度 80 %, **a**: 19.7 mg, 0.40 mmol, **b**: 62.6 mg, 1.32 mmol) を加え、室温で (**a**: 1.5, **b**: 4) 時間攪拌した。その後、飽和硫酸ナトリウム水溶液をパスツールピペットで 3 滴加え、LAH を失活させた。その後、DCM を洗浄溶媒に用いてセライトろ過を行った。得られたろ液の溶媒を留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: DCM / MeOH / TEA = 8/1/0.1) により精製し、化合物 **5a** (0.5 g, 95.9 %) または化合物 **5b** (0.11 g, 71.6 %)を得た。

4-5-6. AR503 の合成

窒素雰囲気下で化合物 **5a** (0.17 g, 0.65 mmol) を脱水 PhH 40 mL に溶解し、4-クロロベンズアルデヒド (Tokyo Chemical Industry, Ltd., 165-02782, 0.14 g, 0.98 mmol) を加え、Dean-Stark トラップを用いた脱水加熱還流を 6 時間行った。その後、反応液の溶媒を留去し、真空乾燥を行うことで、イミンである化合物 (0.27 g) を得た。得られた化合物

(0.27 g) を MeOH 4 mL、DCM 1 mL に溶解し、NaBH₄ (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 192-01472, 純度 90 %, 32.8 mg, 0.72 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。その後、得られた反応液を 20 % 水酸化ナトリウム水溶液 60 mL と Et₂O 60 mL の入った分液ロートに加え、生成物の抽出を行った。得られた有機層を飽和食塩水 60 mL で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去後、真空乾燥を行った。その後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: DCM / MeOH = 10/1) により精製し、AR503 (0.12 g, 50.3 %) を得た。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 2.19 (m, 2H, -NHCH₂CH₂CH-), 2.57 (t, 2H, *J*=7.0 Hz, -NHCH₂CH₂CH-), 3.69 (s, 2H, -CH₂NHCH₂CH₂CH-), 3.95 (t, 1H, *J*=7.8 Hz, -NHCH₂CH₂CH-), 5.90 (dd, 2H, *J*=1.3 Hz, -OCH₂O-), 6.70-6.71 (m, 3H, Aromatic H), 7.16-7.22 (m, 5H, Aromatic H), 7.25-7.29 (m, 4H, Aromatic H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 35.86 (-NHCH₂CH₂CH-), 47.56 (-NHCH₂CH₂CH-), 48.56 (-NHCH₂CH₂CH-), 53.16 (-CH₂NHCH₂CH₂CH-), 100.85 (-OCH₂O-), 108.10, 108.16, 120.65, 126.22, 127.59 (C×2), 128.42 (C×2), 128.49 (C×2), 129.37 (C×2), 132.49, 138.72, 138.86, 144.80, 145.81, 147.66 (Aromatic C). DUIS-MS (positive mode): *m/z* = 380 [M + H]⁺.

4-5-7. AR506 の合成

窒素雰囲気下で化合物 **5a** (0.17 g, 0.70 mmol) を脱水 PhH 40 mL に溶解し、4-ジメチルアミノベンズアルデヒド (Tokyo Chemical Industry, Ltd., D1495, 0.16 g, 1.05 mmol) を加え、Dean-Stark トラップを用いた脱水加熱還流を 6 時間行った。その後、反応液の溶媒を留去し、真空乾燥を行うことで、イミンである化合物 (0.31 g) を得た。得られた化合物 (0.31 g) を MeOH 4 mL に溶解し、NaBH₄ (34.1 mg, 0.81 mmol)

を加え、室温で 1 時間攪拌した。その後、得られた反応液を 20% 水酸化ナトリウム水溶液 60 mL と Et₂O 60 mL の入った分液ロートに加え、生成物の抽出を行った。得られた有機層を飽和食塩水 60 mL で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去後、真空乾燥を行った。その後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: DCM / MeOH = 5/1) により精製し、AR506 (0.23 g, 83.7%) を得た。

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 2.18-2.23 (m, 2H, -NHCH₂CH₂CH-), 2.59 (t, 2H, *J*=7.3 Hz, -NHCH₂CH₂CH-), 2.93 (s, 6H, -N(CH₃)₂), 3.63 (s, 2H, -CH₂NHCH₂CH₂CH-), 3.94 (t, 1H, *J*=7.8 Hz, -NHCH₂CH₂CH-), 5.90 (t, 2H, *J*=2.0 Hz, -OCH₂O-), 6.68-6.71 (m, 5H, Aromatic H), 7.13-7.28 (m, 7H, Aromatic H). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 35.74 (-NHCH₂CH₂CH-), 40.78 (-N(CH₃)₂), 47.47 (-NHCH₂CH₂CH-), 48.64 (-NHCH₂CH₂CH-), 53.30 (-CH₂NHCH₂CH₂CH-), 100.81 (-OCH₂O-), 108.08, 108.21, 112.66, 120.69, 126.15, 127.62, 128.45, 129.08, 138.81, 144.89, 145.76, 147.63, 149.79 (Aromatic C). DUIS-MS (positive mode): *m/z* = 389 [M+H]⁺.

4-5-8. AR509 の合成

窒素雰囲気下で化合物 **5a** (0.21 g, 0.82 mmol) を脱水 PhH 60 mL に溶解し、ピペロナル (165-02782, 0.18 g, 1.23 mmol) を加え、Dean-Stark トラップを用いた脱水加熱還流を 3.5 時間行った。その後、反応液の溶媒を留去し、真空乾燥を行うことで、イミンである化合物 (0.38 g) を得た。得られた化合物 (0.38 g) を MeOH 4 mL、DCM 1 mL に溶解し、NaBH₄ (84.8 mg, 2.01 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。その後、得られた反応液を 20% 水酸化ナトリウム水溶液 60 mL と Et₂O 60 mL の入った分液ロートに加え、生成物の抽出を行った。得られた有機層を飽和食塩水 60 mL で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去後、真空乾燥を行った。その後、シリカゲルカ

ラムクロマトグラフィー (展開溶媒: DCM / MeOH = 15/1 で 1 回、DCM / MeOH = 10/1 で 2 回、DCM / MeOH = 7/1 で 2 回) により精製し、AR509 (0.23 g, 83.7 %) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 2.19 (m, 2H, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 2.57 (t, 2H, $J=7.3$ Hz, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 3.63 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 3.94 (t, 1H, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 5.90 (dd, 2H, $J=1.5$ Hz, $J=3.0$ Hz, $-\text{OCH}_2\text{O}-$ of $-\text{CH}(4\text{-methoxyphenyl})\text{-3,4-mthylyden-1-phenyl}$), 5.94 (s, 2H, $-\text{OCH}_2\text{O}-$ of $-\text{NHCH}_2\text{-3,4-mthylyden-1-phenyl}$), 6.68-6.80 (m, 6H, Aromatic H), 7.16-7.29 (m, 7H, Aromatic H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 35.84 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 48.02 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 53.70 ($-\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 100.83 ($-\text{OCH}_2\text{O}-$ of $-\text{CH}(4\text{-methoxyphenyl})\text{-3,4-mthylyden-1-phenyl}$), 100.85 ($-\text{OCH}_2\text{O}-$ of $-\text{NHCH}_2\text{-3,4-mthylyden-1-phenyl}$), 108.01, 108.08, 108.17, 108.61, 120.66, 121.12, 126.18, 127.59, 128.47, 134.55, 138.75, 144.85, 144.77, 146.38, 147.59, 147.63 (Aromatic C). DUIS-MS (positive mode): $m/z = 390$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Elemental analysis: Calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{NO}_4$: C, 74.02; H, 5.95; N, 3.60. Found: C, 74.04; H, 6.11; N, 3.64.

4-5-9. AR523 の合成

窒素雰囲気下で化合物 **5b** (0.11 g, 0.45 mmol) を脱水 PhH 60 mL に溶解し、ピペロナル (0.13 g, 0.90 mmol) を加え、Dean-Stark トラップを用いた脱水加熱還流を 4 時間行った。その後、反応液の溶媒を留去し、真空乾燥を行うことで、イミンである化合物 (0.84 g) を得た。得られた化合物 (0.84 g) を MeOH 4 mL に溶解し、 NaBH_4 (84.8 mg, 2.01 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。その後、得られた反応液を 20 % 水酸化ナトリウム水溶液 60 mL と Et_2O 60 mL の入った分液ロートに加え、生成物の抽出を行った。得られた有機層を飽和食塩水 60 mL で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去後、

真空乾燥を行った。その後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー（展開溶媒：DCM / MeOH = 5/1 で 1 回、DCM / MeOH = 10/1 で 5 回）により精製し、AR523 (0.067 g, 36.1 %) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 2.16 (dt, 2H, $J=4.6$ Hz, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 2.56 (t, 2H, $J=7.3$ Hz, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 3.63 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 3.77 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.89 (t, 2H, $J=7.8$ Hz, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 5.90 (dd, 2H, $J=1.3$ Hz, $J=2.8$ Hz, $-\text{OCH}_2\text{O}-$ of $-\text{CH}(4\text{-methoxyphenyl})\text{-3,4-mthylyden-1-phenyl}$), 5.93 (s, 2H, $-\text{OCH}_2\text{O}-$ of $-\text{NHCH}_2\text{-3,4-mthylyden-1-phenyl}$), 6.67-6.83 (m, 8H, Aromatic H), 7.11-7.14 (m, 2H, Aromatic H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 35.88 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 47.41 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 47.73 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 53.62 ($-\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 55.21 ($-\text{OCH}_3$), 100.82 ($-\text{OCH}_2\text{O}-$ of $-\text{CH}(4\text{-methoxyphenyl})\text{-3,4-mthylyden-1-phenyl}$), 100.88 ($-\text{OCH}_2\text{O}-$ of $-\text{NHCH}_2\text{-3,4-mthylyden-1-phenyl}$), 108.03, 108.07, 108.66, 113.80, 120.52, 121.22, 128.49, 136.92, 139.15, 145.72, 146.45, 147.61, 147.63, 157.88 (Aromatic C). DUIS-MS (positive mode): $m/z = 420$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Elemental analysis: Calculated for $\text{C}_{25}\text{H}_{25}\text{NO}_5$: C, 71.58; H, 6.01; N, 3.34. Found: C, 71.58; H, 6.27; N, 3.32.

4-5-10. AR524 の合成

窒素雰囲気下で化合物 **5b** (0.15 g, 0.61 mmol) を脱水 PhH 60 mL に溶解し、4-ジメチルアミノベンズアルデヒド (0.15 g, 0.61 mmol) を加え、Dean-Stark トラップを用いた脱水加熱還流を 4 時間行った。その後、反応液の溶媒を留去し、真空乾燥を行うことで、イミンである化合物 (0.28 g) を得た。得られた化合物 (0.28 g) を MeOH 3 mL に溶解し、 NaBH_4 (29.0 mg, 0.68 mmol) を加え、室温で 30 分間攪拌した。その後、得られた反応液を 20 % 水酸化ナトリウム水溶液 30 mL と Et_2O 30 mL の入った分液ロートに加え、生成物の抽出を行った。得ら

れた有機層を飽和食塩水 30 mL で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去後、真空乾燥を行った。その後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: DCM / MeOH = 7/1) により精製し、AR524 (0.18 g, 69.4 %) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 2.16 (dt, 2H, $J=4.6$ Hz, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2-$), 2.57 (t, 2H, $J=7.3$ Hz, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 2.92 (s, 6H, $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 3.63 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 3.77 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.88 (t, 1H, $J=7.8$ Hz, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 5.89 (d, 2H, $J=1.0$ Hz, $-\text{OCH}_2\text{O}-$), 6.68-6.71 (m, 5H, Aromatic H), 6.79-6.83 (m, 2H, Aromatic H), 7.12-7.14 (m, 4H, Aromatic H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 35.96 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 40.78 ($-\text{N}(\text{CH}_3)_2$), 47.55 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 47.80 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 53.37 ($-\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 55.20 ($-\text{OCH}_3$), 100.79 ($-\text{OCH}_2\text{O}-$), 108.05, 108.11, 112.65, 113.78, 120.54, 128.52, 129.07, 137.04, 139.27, 145.68, 147.61, 149.77, 157.84 (Aromatic C). DUIS-MS (positive mode): $m/z = 419$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Elemental analysis: Calculated for $\text{C}_{26}\text{H}_{30}\text{N}_2\text{O}_3$: C, 74.61; H, 7.23; N, 6.69. Found: C, 74.63; H, 7.54; N, 6.54.

4-5-11. AR525 の合成

窒素雰囲気下で化合物 **5b** (0.17 g, 0.69 mmol) を脱水 PhH 60 mL に溶解し、4-クロロベンズアルデヒド (0.15 g, 1.04 mmol) を加え、Dean-Stark トラップを用いた脱水加熱還流を 2 時間行った。その後、反応液の溶媒を留去し、真空乾燥を行うことで、イミンである化合物 (0.29 g) を得た。得られた化合物 (0.29 g) を MeOH 2 mL に溶解し、 NaBH_4 (29.0 mg, 0.68 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。その後、得られた反応液を 20 % 水酸化ナトリウム水溶液 30 mL と Et_2O 30 mL の入った分液ロートに加え、生成物の抽出を行った。得られた有機層を飽和食塩水 30 mL で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒

を留去後、真空乾燥を行った。その後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: DCM / MeOH = 15/1 で 3 回、AcOEt で 1 回、DCM / MeOH = 10/1 で 1 回) により精製し、AR525 (0.15 g, 51.6 %) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 2.15 (dt, 2H, $J=4.5$ Hz, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 2.56 (t, 2H, $J=7.3$ Hz, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 3.69 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 3.77 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.89 (t, 1H, $J=8.3$ Hz, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 5.90 (dd, 2H, $J=1.8$ Hz, $J=2.8$ Hz, $-\text{OCH}_2\text{O}-$), 6.67-6.72 (m, 3H, Aromatic H), 6.80-6.83 (m, 2H, Aromatic H), 7.11-7.14 (m, 2H, Aromatic H), 7.18-7.19 (m, 2H, Aromatic H), 7.25-7.27 (m, 2H, Aromatic H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 36.03 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 47.59 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 47.72 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 53.18 ($-\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 55.22 ($-\text{OCH}_3$), 100.83 ($-\text{OCH}_2\text{O}-$), 108.07, 113.81, 120.50, 128.42, 128.48, 129.39, 132.49, 136.91, 138.85, 139.16, 145.73, 147.64, 157.90 (Aromatic C). DUIS-MS (positive mode): $m/z = 410$ $[\text{M}+\text{H}]^+$. Elemental analysis: Calculated for $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{ClNO}_3$: C, 70.32; H, 5.90; N, 3.42. Found: C, 70.31; H, 5.86; N, 3.33.

4-5-12. AR520 の合成

窒素雰囲気下で 3,3-ジフェニルプロピルアミン (Tokyo Chemical Industry, Ltd., D1855, 0.31 g, 1.48 mmol) を脱水 PhH 30 mL に溶解し、ピペロナル (FUJIFILM Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 165-02782, 0.33 g, 2.22 mmol) を加え、Dean-Stark トラップを用いた脱水加熱還流を 4 時間行った。その後、反応液の溶媒を留去し、真空乾燥を行うことで、イミンである化合物 (0.52 g) を得た。得られた化合物 (0.52 g) を MeOH 2 mL に溶解し、 NaBH_4 (63.6 mg, 1.51 mmol) を加え、室温で 30 分攪拌した。その後、得られた反応液を 20 % 水酸化ナトリウム水溶液 30 mL と Et_2O 30 mL の入った分液ロートに加え、生成物の抽出

を行った。得られた有機層を飽和食塩水 30 mL で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去後、真空乾燥を行った。その後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: DCM / MeOH = 15/1) により精製し、AR520 (0.46 g, 88.6 %) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 2.24 (dt, 2H, $J=7.3$ Hz, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 2.57 (t, 2H, $J=7.3$ Hz, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 3.62 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 4.02 (t, 1H, $J=7.5$ Hz, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 5.93 (s, 2H, $-\text{OCH}_2\text{O}-$), 6.67-6.77 (m, 3H, Aromatic H), 7.14-7.18 (m, 2H, Aromatic H), 7.22-7.28 (m, 8H, Aromatic H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 35.79 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 47.55 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 48.96 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 53.70 ($-\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 100.84 ($-\text{OCH}_2\text{O}-$), 108.01, 108.61, 121.11, 126.15, 127.79, 128.44, 134.35, 144.74, 146.37, 147.58 (Aromatic C). DUIS-MS (positive mode): $m/z = 346$ $[\text{M}+\text{H}]^+$.

4-5-13. AR521 の合成

窒素雰囲気下で 3,3-ジフェニルプロピルアミン (0.30 g, 1.46 mmol) を脱水 PhH 30 mL に溶解し、4-ジメチルアミノベンズアルデヒド (0.33 g, 2.20 mmol) を加え、Dean-Stark トラップを用いた脱水加熱還流を 4 時間行った。その後、反応液の溶媒を留去し、真空乾燥を行うことで、イミンである化合物 (0.61 g) を得た。得られた化合物 (0.61 g) を MeOH 10 mL に溶解し、 NaBH_4 (75.9 mg, 1.79 mmol) を加え、室温で 30 分間攪拌した。その後、得られた反応液を 20 % 水酸化ナトリウム水溶液 30 mL と Et_2O 30 mL の入った分液ロートに加え、生成物の抽出を行った。得られた有機層を飽和食塩水 30 mL で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去後、真空乾燥を行った。その後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: DCM / MeOH = 15/1 で 1 回、DCM / MeOH = 10/1 で 1 回) により精製し、AR521

(0.39 g, 63.9 %) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 2.26 (dt, 2H, $J=7.5$ Hz, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 2.58 (t, 2H, $J=7.3$ Hz, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 3.68 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 4.02 (t, 1H, $J=7.8$ Hz, $-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 7.16-7.19 (m, 4H, Aromatic H), 7.23-7.29 (m, 10H, Aromatic H). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 35.78 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 47.63 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 48.93 ($-\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 53.14 ($-\text{CH}_2\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}-$), 126.19, 127.77, 128.41, 128.46, 129.36, 132.47, 138.85, 144.69 (Aromatic C). DUIS-MS (positive mode): $m/z = 336$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$.

4-5-14. AR522 の合成

窒素雰囲気下で 3,3-ジフェニルプロピルアミン (0.3 g, 1.42 mmol) を脱水 PhH 30 mL に溶解し、4-クロロベンズアルデヒド (0.3 g, 2.13 mmol) を加え、Dean-Stark トラップを用いた脱水加熱還流を 4 時間行った。その後、反応液の溶媒を留去し、真空乾燥を行うことで、イミンである化合物 (0.54 g) を得た。得られた化合物 (0.54 g) を MeOH 10 mL に溶解し、 NaBH_4 (68.9 mg, 1.61 mmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。その後、得られた反応液を 20 % 水酸化ナトリウム水溶液 30 mL と Et_2O 30 mL の入った分液ロートに加え、生成物の抽出を行った。得られた有機層を飽和食塩水 30 mL で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去後、真空乾燥を行った。その後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (展開溶媒: $\text{DCM} / \text{MeOH} = 15/1$ で 2 回、 $\text{Hex} / \text{AcOEt} = 1/5$ で 1 回) により精製し、AR522 (0.28 g, 52.4 %) を得た。

4-6. AR501 誘導体の構造活性相関解析に基づく GM 阻害剤の選抜

蛍光画像は、下記フィルターセットが備えられたオールインワン蛍光顕微鏡により記録した。AF488 の測定は、GFP-BP (EX, 470/40 nm; dichroic filter, 495 nm; and EM, 535/50 nm) で行った。また、細胞数は、countess TM automated cell counter によりトリパンブルー染色法を用いて測定した。吸光度は、波長 400–750 nm で測定が可能なマイクロプレートリーダー (iMark microplate reader, Bio-Rad) を用いて測定した。

4-6-1. AR501 誘導体の化学特性の計算

AR501 誘導体 9 化合物 (AR503, AR506, AR509, AR520, AR521, AR522, AR523, AR524, AR525) の tPSA, clog P, clog D_{7.4} は、Structure Design Suite version 12.01 を用いて計算を行った。

4-6-2. AR501 誘導体溶液の調製

AR503 (molecular weight: 379.88) 1.0 mg を DMSO 17.5 μ L に溶解し、150 mM AR503 溶液を作製した。この 150 mM 溶液 2 μ L と DMSO 13 μ L を混合し、20 mM AR503 溶液を作製した。20 mM 溶液 2 μ L と DMSO 18 μ L を混合し、2 mM AR503 溶液を作製した。

AR506 (molecular weight: 388.51) 1.0 mg を DMSO 17.2 μ L に溶解し、20 mM AR506 溶液を作製した。さらに、150 mM 溶液 2 μ L と DMSO 13 μ L を混合し、20 mM AR506 溶液を作製した。20 mM 溶液 2 μ L と DMSO 18 μ L を混合し、2 mM AR506 溶液を作製した。

AR509 (molecular weight: 389.45) 1.0 mg を DMSO 17.1 μ L に溶解し、20 mM AR509 溶液を作製した。さらに、150 mM 溶液 2 μ L と DMSO

13 μL を混合し、20 mM AR509 溶液を作製した。20 mM 溶液 2 μL と DMSO 18 μL を混合し、2 mM AR509 溶液を作製した。

AR520 (molecular weight: 345.44) 1.0 mg を DMSO 19.3 μL に溶解し、20 mM AR520 溶液を作製した。さらに、150 mM 溶液 2 μL と DMSO 13 μL を混合し、20 mM AR520 溶液を作製した。20 mM 溶液 2 μL と DMSO 18 μL を混合し、2 mM AR520 溶液を作製した。

AR521 (molecular weight: 344.50) 1.0 mg を DMSO 19.4 μL に溶解し、20 mM AR521 溶液を作製した。さらに、150 mM 溶液 2 μL と DMSO 13 μL を混合し、20 mM AR521 溶液を作製した。20 mM 溶液 2 μL と DMSO 18 μL を混合し、2 mM AR521 溶液を作製した。また、20 mM 溶液 10 μL と DMSO 10 μL を混合し、10 mM AR521 溶液を作製した。また、20 mM 溶液 5 μL と DMSO 15 μL を混合し、5 mM AR521 溶液を作製した。また、2 mM 溶液 2 μL と DMSO 18 μL を混合し、0.2 mM AR521 溶液を作製した。

AR522 (molecular weight: 335.88) 1.0 mg を DMSO 19.8 μL に溶解し、20 mM AR522 溶液を作製した。さらに、150 mM 溶液 2 μL と DMSO 13 μL を混合し、20 mM AR522 溶液を作製した。20 mM 溶液 2 μL と DMSO 18 μL を混合し、2 mM AR522 溶液を作製した。

AR523 (molecular weight: 419.48) 1.0 mg を DMSO 15.9 μL に溶解し、20 mM AR523 溶液を作製した。さらに、150 mM 溶液 2 μL と DMSO 13 μL を混合し、20 mM AR523 溶液を作製した。20 mM 溶液 2 μL と DMSO 18 μL を混合し、2 mM AR523 溶液を作製した。

AR524 (molecular weight: 418.54) 1.0 mg を DMSO 15.9 μL に溶解し、20 mM AR524 溶液を作製した。さらに、150 mM 溶液 2 μL と DMSO 13 μL を混合し、20 mM AR524 溶液を作製した。20 mM 溶液 2 μL と DMSO 18 μL を混合し、2 mM AR524 溶液を作製した。また、20 mM 溶液 10 μL と DMSO 10 μL を混合し、10 mM AR524 溶液を作製した。また、20 mM 溶液 5 μL と DMSO 15 μL を混合し、5 mM AR524 溶液

を作製した。また、2 mM 溶液 2 μ L と DMSO 18 μ L を混合し、0.2 mM AR524 溶液を作製した。

AR525 (molecular weight: 409.91) 1.0 mg を DMSO 16.3 μ L に溶解し、20 mM AR525 溶液を作製した。さらに、150 mM 溶液 2 μ L と DMSO 13 μ L を混合し、20 mM AR525 溶液を作製した。20 mM 溶液 2 μ L と DMSO 18 μ L を混合し、2 mM AR525 溶液を作製した。また、20 mM 溶液 10 μ L と DMSO 10 μ L を混合し、10 mM AR525 溶液を作製した。また、20 mM 溶液 5 μ L と DMSO 15 μ L を混合し、5 mM AR525 溶液を作製した。また、2 mM 溶液 2 μ L と DMSO 18 μ L を混合し、0.2 mM AR525 溶液を作製した。

4-6-3. 評価系を用いた AR501 誘導体による GM 阻害活性測定

DMEM を 1 mL を加えた 6-well plates に HeLa 細胞を 9.0×10^4 cells/well となるように播種し、37 $^{\circ}$ C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。その後、DMEM を除去し、新しい DMEM を 1 mL 加え、終濃度 10 μ M となるように 2 mM AR501 誘導体の DMSO 溶液をそれぞれ加え、37 $^{\circ}$ C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。

培養後、PBS で 3 回洗浄したのち、10 % formalin solution で細胞を固定し、PBS で 1 回洗浄したのち、調製した 25 μ g/mL ConA-AF488 PBS 溶液 1 mL を加え 15 分間室温で静置した。その後、PBS で 1 回洗浄したのち、PBS 1 mL 加え、オールインワン蛍光顕微鏡により観察を行った。1 well につき、蛍光画像および位相差画像を 5 地点で撮影を行った。

オールインワン蛍光顕微鏡にて撮影を行った細胞の蛍光画像から、細胞の蛍光強度および蛍光面積、また細胞の位相差画像から、細胞長径について、オールインワン蛍光顕微鏡解析ソフトおよび画像解析ソフト Winroof 2013 ver. 1.2.0. を用いて計測を行った。写真が保存され

たファイルを開き、蛍光画像内の約 100-120 個の細胞を含む領域を選択した。細胞の蛍光強度、蛍光面積および細胞長径の平均値は、選択した領域の合計値を半手動で測定したそれぞれの細胞数で割ることで算出を行った。また、各ウェルの蛍光強度および蛍光面積は、標準偏差で棄却テストを実行した後の値を平均することによって計算を行った。

4-6-4. AR501 誘導体の細胞毒性評価

DMEM を 100 μ L を加えた 96-well plates に HeLa 細胞を 3.0×10^3 cells/well となるように播種し、37 $^{\circ}$ C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。その後、DMEM を除去し、調製した AR501 誘導体溶液 (0.2, 2, 5, 10, 20 mM) 3 μ L に新しい DMEM を 600 μ L 加えて作成した、終濃度 (1, 10, 25, 50, 100 μ M) AR501 誘導体の DMSO 溶液を各 well に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。

培養後、Cell Counting Kit-8 溶液を各 well に 10 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 2 時間培養した。その後、マイクロプレートリーダーで 450 nm の吸光度を測定した。細胞生存率は、DMEM および Cell Counting Kit-8 溶液のみを加えた blank の吸光度を引いた AR501 誘導体を投与した well の吸光度を、同様に blank の吸光度を引いた DMSO のみを投与したコントロール well の吸光度で割ることで算出した。なお、本実験は 5 連で行なった。

4-7. 蛍光標識 Con-A を用いた細胞内 HM 型糖鎖の分布の観察

蛍光画像は、下記フィルターセットが備えられた共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus, FluoView FV1000-D) により記録した。AF488 の測定は、

GFP-BP (EX, 470/40 nm; dichroic filter, 495 nm; and EM, 535/50 nm) で行った。また、細胞数は、countess TM automated cell counter によりトリパンブルー染色法を用いて測定した。

DMEM を 1 mL を加えたカバーガラス (Matsunami Glass Ind., Ltd., C1210) を各 well に入れた 6-well plates に HeLa 細胞を 1.0×10^5 cells/well となるように播種し、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。その後、DMEM を除去し、新しい DMEM を 1 mL 加え、終濃度 10 および 100 μM となるように 2 mM AR524、および 20 mM KIF の DMSO 溶液 10 μL をそれぞれ加え、37 °C, CO₂ 濃度 5 % の条件下で 24 時間培養した。

培養後、PBS で 3 回洗浄したのち、カバーガラスを PBS 1 mL が入ったペトリディッシュ (φ75×20mm) に移した。PBS を除去し、MeOH を 1 mL 加え、10 分間 -20 °C で静置したのち、MeOH を除去し、アセトン を 1 mL 加え、1 分間 -20 °C で静置した。その後、PBS で洗浄したのち、調製した 25 μg/mL ConA-AF488 PBS 溶液 1 mL を加え 15 分間室温で静置した。その後、PBS で 1 回洗浄したのち、Mounting medium を 1 滴滴下したスライドガラス (Matsunami Glass Ind., Ltd., S1111) に細胞を播種した面を下にして置き、透明色の固定剤にて固定したのち、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行った。

4-8. 蛍光標識レクチンを用いた細胞表面 HM 型糖鎖の分布の観察

細胞表面の蛍光 population は、下記フィルターセットが備えられたセルソーター (FACSAria II, Becton, Dickinson and Company) により記録した。AF488 および FITC の測定は、FITC (BP filter, 530/30; and LP filter, 502 nm) で行った。得られたデータの解析は、FACSDiva software ver. 8.0.1 (Becton, Dickinson and Company) により行った。また、細胞

数は、countess TM automated cell counter によりトリパンブルー染色法を用いて測定した。

4-8-1. AR524 溶液および蛍光標識レクチン溶液の調製

調製した 20 mM 溶液 6 μ L と DMSO 14 μ L を混合し、6 mM AR524 溶液を作製した。

調製した 5 mg/mL ConA-AF488 溶液 10 μ L と PBS 12.5 mL を混合し、4 μ g/mL ConA-AF488 PBS 溶液を作製した。

2 mg/mL DSL-FITC (Vector Laboratories, Inc., FL-1181) 溶液 80 μ L と PBS 16 mL を混合し、10 μ g/mL DSL-FITC PBS 溶液を作製した。

2 mg/mL GNL-FITC (Vector Laboratories, Inc., FL-1241) 溶液 80 μ L と PBS 16 mL を混合し、10 μ g/mL GNL-FITC PBS 溶液を作製した。

4-8-2. 細胞表面糖鎖のフローサイトメトリー分析

DMEM を 4 mL を加えた 25 cm² 細胞培養用ディッシュに HeLa 細胞を 0.5-1.0 \times 10⁶ cells/well となるように播種し、37 °C, CO₂ 濃度 5% の条件下で 24 時間培養した。その後、DMEM を除去し、新しい DMEM を 2 mL 加え、終濃度 30 および 100 μ M となるように調製した 6 mM AR524、および 20 mM KIF の DMSO 溶液 10 μ L をそれぞれ加え、37 °C, CO₂ 濃度 5% の条件下で 24 時間培養した。

培養後、DMEM を 15 mL チューブに回収し、ディッシュを PBS で 3 回洗浄したのち、Accutase (Innovative Cell Technologies, Inc., 12679-54) を 2 mL 加え、37 °C, CO₂ 濃度 5% の条件下で 5 分間培養した。その後、細胞を剥がした懸濁液を 15 mL チューブに回収し、3,000 rpm, 室温、5 分間遠心分離を行った。上清を除き、調製したレクチン溶液を 2 mL 加え懸濁し 15 分間室温で静置した。その後、3,000 rpm, 室

温、5 分間遠心分離を行い、上清を除き、PBS 2 mL を加え懸濁し、再度遠心分離を行なった。上清を除き、PBS 2 mL を加え懸濁したのち、セルストレイナー (sysmex Corporation, BG472520) に通し、セルソーターにて分析を行った。

参考文献

1. 谷口直之, 伊藤幸成, 糖鎖化学の新展開 – 機能解明・次世代型材料・医薬品開発に向けて -, p. 4-48.
2. Varki, A., Biological roles of glycans, *Glycobiology*, **2017**, *27*, 1, 3–49.
3. Ghazarian, H.; Idoni, B.; Oppenheimer, S. B., A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics, *Acta Histochemica*, **2009**, *113*, 236-247.
4. Stowell, S. R.; Ju, T.; Cummings, R. D., Protein Glycosylation in Cancer, *Annu. Rev. Pathol.*, **2015**, *10*, 473–510.
5. Lannoo, N.; Van Damme, E. J. M., Review/N-glycans: The making of a varied toolbox, *Plant Science*, **2015**, *239*, 67–83.
6. Helenius, A.; Aebi, M., Intracellular Functions of N-Linked Glycans, *Carbohydrate and Glycobiology*, **2001**, *291*, 23, 2365-2369.
7. Hudak, J. E.; Canham, S. M.; Bertozzi, C. R., Glycocalyx engineering reveals a Siglec-based mechanism for NK cell immunoevasion, *Nature Chemical Biology*, **2014**, *10*, 65-77.
8. Dube, D. H.; Bertozzi, C. R., GLYCANS IN CANCER AND INFLAMMATION POTENTIAL FOR THERAPEUTICS AND DIAGNOSTIC, *Nature Reviews*, **2005**, *4*, 477-488.
9. Yagi, Y.; Suzuki, S., Characterization of Oligosaccharides in Therapeutic Antibodies, *CHROMATOGRAPHY*, **2013**, *34*, 2, 83-88.
10. Moremen, K. W.; Tiemeyer, M.; Nairn, A. V., Vertebrate protein glycosylation: diversity, synthesis and function, *Nature Reviews*, **2012**, *13*, 448-462.

11. Zhao, Y.; Takahashi, M.; Gu J.; Miyoshi, E.; Matsumoto, A.; Kitazume, S.; Taniguchi, N., Functional roles of N-glycans in cell signaling and cell adhesion in cancer, *Cancer Sci.*, **2008**, *99*, 7, 1304-1310.
12. Hayashida, O.; Mizuki, K.; Akagi, K.; Matsuo, A.; Kanamori, T.; Nakai, T.; Sando, S.; Aoyama, Y., Macrocyclic Glycoclusters. Self-Aggregation and Phosphate-Induced Agglutination Behaviors of Calix [4] resorcarene-Based Quadruple-Chain Amphiphiles with a Huge Oligosaccharide Pool, *J. AM. CHEM. SOC.*, **2003**, *125*, 594-601.
13. Mammen, M.; Choi, S. K.; Whitesides, G. M., Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1998**, *37*, 2754-2794.
14. 谷口直之, 伊藤幸成, 糖鎖化学の新展開 – 機能解明・次世代型材料・医薬品開発に向けて -, p. 208-246.
15. Miyoshi, E.; Fujii, H.; Shinzaki, S.; Tanemura, M.; Kamada, Y., Comprehensive analysis of disease-related glycosylation, leading to glyco-therapy, *生化学*, **2017**, *89*, 2, p. 264–268.
16. Peng, W.; Zhu, R.; Zhou, S.; Mirzaei, P.; Mechref, Y., Integrated transcriptomics, proteomics, and Glycomics Reveals the Association between Up-regulation of Sialylated n-glycans/ integrin and Breast cancer Brain Metastasis, *Scientific Reports*, **2019**, *9*, 17361, 1-13.
17. Varki, A., Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins, *NATURE*, **2007**, *446*, 26, 1023-1029.
18. Christiansen, M. N.; Chik, J.; Lee, L.; Anugraham, M.; Abrahams, J. L.; Packer, N. H., Cell surface protein glycosylation in cancer, *Proteomics*, **2014**, *14*, 525–546.

19. Zhang, Y.; Zhao, J.; Zhang, X.; Guo, H.; Liu, F.; Chen, H., Relations of the type and branch of surface N-glycans to cell adhesion, migration and integrin expressions, *Molecular and Cellular Biochemistry*, **2004**, *260*, 137–146.
20. Zhang, C.; Huang, T.; Wu, B.; He, W.; Liu, D.; Stem cells in cancer therapy: opportunities and challenge, *Oncotarget*, **2017**, *8*, 43, 75756-75766.
21. Varki, A.; Cummings, R. D.; Esko, J. D.; Stanley, P.; Hart, G. W.; Aebi, M.; Darvill, A. G.; Kinoshita, T.; Packer, N. H.; Prestegard, J. H.; Schnaar, R. L.; and Seeberger, P. H.; Essentials of Glycobiology, 3rd edition, *Cold Spring Harbor*, **2017**.
22. Arigoni-Affolter, I.; Scibona, E.; Lin, C.; Brühlmann, D.; Souquet, J.; Broly, H.; Aebi, M., Mechanistic reconstruction of glycoprotein secretion through monitoring of intracellular N-glycan processing, *Sci. Adv.*, **2019**, *5*, eaax8930, 1-12.
23. Aikawa, J.; Takeda, Y.; Matsuo, I.; Ito, Y., Trimming of glucosylated N-glycans by human ER α 1,2-mannosidase I, *J. Biochem.*, **2014**, *155*, 6, 375-384.
24. Kamiya, Y.; Satoh, T.; Kato, K., Molecular and structural basis for N-glycan-dependent determination of glycoprotein fates in cells, *Biochimica et Biophysica Acta*, **2012**, *1820*, 1327–1337.
25. 藤山和仁, 糖鎖プロセッシング酵素, マンノシダーゼ, *応用糖質科学*, **2013**, *3*, 1, 87-92.
26. Shah, N.; Kuntz, D. A.; Rose, D. R., Golgi α -mannosidase II cleaves two sugars sequentially in the same catalytic site, *PNAS*, **2008**, *105*, 28, 9570-9575.
27. Butters, T. D., Alonzi, D. S., Kukushkin, N. V.; Ren, Y.; Blériot, Y., Novel mannosidase inhibitors probe glycoprotein degradation pathways in cells, *Glycoconj. J.*, **2009**, *26*, 1109–1116.

28. Horne, G.; Wilson, F. X., Therapeutic Applications of Iminosugars: Current Perspectives and Future Opportunities, **2011**, *Progress in Medicinal Chemistry*, *50*, 135-176.
29. Jin, Z.; Kitajima, T.; Dong, W.; Huang, Y.; Ren, W.; Guan, F.; Chiba, Y.; Gao, X.; Fujita, M., Genetic disruption of multiple α -1,2-mannosidases generates mammalian cells producing recombinant proteins with high-mannose-type N-glycans, *J. Biol. Chem.*, **2018**, *293*, 15, 5572–5584.
30. Legler, K.; Rosprim, R.; Karius, T.; Eylmann, K.; Rossberg, M.; Wirtz, R. M.; Müller, V.; Witzel, I.; Schmalfeldt, B.; Milde-Langosch, K.; Oliveira-Ferrer, L., Reduced mannosidase MAN1A1 expression leads to aberrant N-glycosylation and impaired survival in breast cancer, *British Journal of Cancer*, **2018**, *118*, 847–856.
31. Tyrrell, B. E.; Sayce, A. C.; Warfield, K. L.; Miller, J. L.; Zitzmann N., Iminosugars: Promising therapeutics for influenza infection, *Critical Reviews in Microbiology*, **2017**, *43*, 5, 521–545.
32. Asano, N.; Nash, R. J.; Molyneux, R. J.; Fleet, G. W. J., Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application, *Tetrahedron: Asymmetry*, **2000**, *11*, 1645-1680.
33. Wadood, A.; Ghufraan, M.; Khan, A.; Azam, S. S.; Jelani, M.; Uddin, R., Selective glycosidase inhibitors: A patent review (2012–present), *International Journal of Biological Macromolecules*, **2018**, *111*, 82–91.
34. Iwami, M.; Nakayama, O.; Terano, H.; Kohsaka, M.; Aoki, H.; Imanaka, H., A NEW IMMUNOMODULATOR, FR-900494: TAXONOMY, FERMENTATION, ISOLATION, AND PHYSICO-CHEMICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERISTICS, *J. Antibiot.*, **1987**, *40*, 612–622.

35. Tropea, J. E.; Kaushal, G. P.; Pastuszak, I.; Mitchell, M.; Aoyagi, T.; Molyneux, R. J.; Elbein, A. D., Mannostatin A, A New Glycoprotein-Processing Inhibitor, *Biochemistry*, **1990**, *29*, 10062–10069.
36. Watson, A. A.; Fleet, G. W.; Asano, N.; Molyneux, R. J.; Nash, R. J., Polyhydroxylated alkaloids - natural occurrence and therapeutic applications, *Phytochemistry*, **2001**, *56*, 265–295.
37. Waring, M. J., Lipophilicity in drug discovery, *Expert Opinion on Drug Discovery*, **2010**, *5*, 3, 235-248.
38. Hughes, J. D.; Blagg, J.; Price D. A.; Bailey, S.; DeCrescenzo, G. A.; Devraj R. V.; Ellsworth, E.; Fobian Y. M.; Gibbs M. E.; Gilles R. W.; Greene, N.; Huang, E.; Krieger-Burke, T.; Loesel, J.; Wager, T.; Whiteley L.; Zhang, Y. Physiochemical drug properties associated with in vivo toxicological outcomes, *Bioorg. and Med. Chem. Let.*, **2008**, *18*, 4872–4875.
39. Cheng, T. R.; Chan, T.; Tsou, E.; Chang, S.; Yun, W.; Yang, P.; Wu, Y.; Cheng, W., From Natural Product-Inspired Pyrrolidine Scaffolds to the Development of New Human Golgi α -Mannosidase II Inhibitors, *Chem. Asian J.*, **2013**, *8*, 2600-2604.
40. Nosengo, N., New tricks for old drugs, *Nature*, **2016**, *534*, 314-316.
41. Novac, N., Challenges and opportunities of drug repositioning, *Trends in Pharmacological Sciences*, **2013**, *34*, 5, 267-272.
42. Harutyunyan, N.S.; Hakobyan, L. A.; Hakopyan, N. Z.; Amaspyan, A. A.; Gevorgyan, G. A.; Stepanyan, G. M.; Paronikyan, R.V.; Panosyan, G. A., SYNTHESIS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY 3-BENZO- [1,3] DIOXOL-5-IL-3-PENYLPROPYLAMINE, *Chemical Journal of Armenia*, **2010**, *63*, 2, 249-258.

43. Macdonald, D.I.; Durst, T., A Highly Stereoselective Synthesis of Podophyllotoxin and Analogues Based on an Intramolecular Diels-Alder Reaction. *J. Org. Chem*, **1988**, *53*, 3663-3669.
44. Jung, M. E.; Lowen, G. T., A DIRECT SYNTHESIS OF TRANS 2-ARYLBENZOCYCLOBUTENOL, A POTENTIAL INTERMEDIATE FOR PODOPHYLLOTOXIN SYNTHESIS: USE OF LDA FOR BENZYNE FORMATION AND TRAPPING. *Tetrahedron Letters*, **1986**, *27*, 5319-5322.
45. Kawasaki N., Remodeling Cell Surface Glycans Using Glycosylation Inhibitors, *Methods Mol. Biol.*, **2014**, *1200*, 371-378.
46. Toonstra, C.; Wu, L.; Li, C.; Wang, D.; Wang, L., Top-Down Chemoenzymatic Approach to Synthesizing Diverse High-Mannose N-Glycans and Related Neoglycoproteins for Carbohydrate Microarray Analysis, *Bioconjugate Chem.*, **2018**, *29*, 1911-1921.
47. Li, J.; Su, Y.; Xia, W.; Qin, Y.; Humphries, M. J.; Vestweber, D.; Cabañas, C.; Lu, C.; Springer, T. A., Conformational equilibria and intrinsic affinities define integrin activation, *The EMBO Journal*, **2017**, *36*, 5, 629-645.
48. Kusamori, K.; Nishikawa, M.; Takahashi, Y.; Takakura, Y., Development of multicellular spheroid for cell-based therapy, *Drug Delivery System*, **2013**, *281*, 45-53.
49. Hamester, F.; Legler, K.; Legler, K.; Wichert, B.; Kelle, N.; Eylmann, K.; Rossberg, M.; Ding, Y.; Kürti, S.; Schmalfeldt, B.; Milde-Langosch, K.; Oliveira-Ferrer, L. Prognostic relevance of the Golgi mannosidase MAN1A1 in ovarian cancer: impact of N-glycosylation on tumour cell aggregation, *British Journal of Cancer*, **2019**, *121*, 944-953.

謝辞

本研究の遂行と論文の作成は、本論文の主査をお願い致しました日本大学大学院 生物資源科学研究科 生物資源利用科学専攻 西尾 俊幸 教授ならびに本論文の副査をお願い致しました日本大学大学院 生物資源科学研究科 生物資源利用科学専攻 袴田 航 准教授の終始熱心なご指導とご鞭撻の下に行われたものであり、深甚なる謝意を表します。また、本研究を進めるにあたり、多くの有益なご助言を賜りました同研究室 平野 貴子 助教に心より御礼申し上げます。

本論文の副査ならびに校閲をお願い致し、ご指導とご鞭撻を賜りました日本大学大学院 生物資源科学研究科 生物資源利用科学専攻 細野 朗 教授ならびに松藤 寛 教授に心から感謝の意を表します。

本研究は、公益財団法人 日本科学協会 2019 年度笹川科学研究助成 (研究題目: がん幹細胞を標的とした抗がん戦略の開発: 糖鎖を介した細胞間コミュニケーション阻害剤の合成と評価) の助成をいただき研究を遂行いたしました。日本科学財団の方々には謹んで御礼申し上げます。

多くのご指導を賜りました日本大学 生物資源科学部 生命化学科および日本大学大学院 生物資源科学研究科の先生方に厚く御礼申し上げます。

また、6 年の長きにわたり生物化学研究室に在籍させて頂き、多くの皆様のご助力のもと研究を進めて参りました。心から御礼申し上げます。

