

博士論文

インデノピラゾール化合物の合成とがん細胞の
低酸素応答および増殖に対する阻害機構の解明

**Synthesis of Indenopyrazoles and Their
Inhibition Mechanisms in Hypoxic Response and
Proliferation of Cancer Cells**

学習院大学大学院 自然科学研究科

生命科学専攻 博士後期課程

12-244-002

峯岸 秀充

指導教員 花岡 文雄 教授

平成 26 年度

目 次

発表論文

第 1 章 がんの低酸素環境における低酸誘導因子の働き

- 1-1 がんと低酸素
- 1-2 低酸素誘導因子の働き
- 1-3 HIF-1 阻害剤
- 1-4 研究目的
- 1-5 参考文献

第 2 章 インデノピラゾール骨格を有する HIF-1 α 阻害剤の開発と生物活性評価

- 2-1 インデノピラゾール骨格を有する HIF-1 α 阻害剤の分子設計と合成
 - 2-1-1 分子設計
 - 2-1-2 インデノピラゾール化合物の合成
- 2-2 HIF-1 α 転写抑制と 細胞増殖抑制作用の解析
- 2-3 インデノピラゾール化合物 **41** の作用機序解明
 - 2-3-1 化合物 **41** による HIF-1 α タンパク質の安定化への影響
 - 2-3-2 化合物 **41** による HIF-1 α タンパク質の核内移行への影響
 - 2-3-3 化合物 **41** による HIF-1 α と HIF-1 β の二量体形成への影響
- 2-4 結論と考察
- 2-5 実験の部
- 2-6 参考文献

第3章 インデノピラゾール化合物による細胞増殖抑制作用に関する 構造活性相関研究および作用機序の解析

3-1 序論

3-2 インデノピラゾール誘導体の合成

3-3 インデノピラゾール化合物による細胞増殖抑制作用の解析

3-4 インデノピラゾール化合物 **18m** の作用機序解明

3-4-1 化合物 **18m** の標的タンパク質の推定

3-4-2 化合物 **18m** による tubulin 重合と細胞周期への影響

3-4-3 化合物 **18m** による Ac-tubulin 蓄積と微小管形成への影響

3-5 結論と考察

3-6 実験の部

3-7 参考文献

発表論文

Boron-containing phenoxyacetanilide derivatives as hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α inhibitors

Kazuki Shimizu, Minako Maruyama, Yuka Yasui, Hidemitsu Minegishi, Hyun Seung Ban, and

Hiroyuki Nakamura*

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **2010**, 20, 1453-1456

Discovery of Carboranes as Inducers of 20S Proteasome Activity.

Hyun Seung Ban, Hidemitsu Minegishi, Kazuki Shimizu, Minako Maruyama, Yuka Yasui, and

Hiroyuki Nakamura*.

ChemMedChem, **2010**, 5, 1236-1241

Identification of HSP60 as a Primary Target of *o*-Carboranylphenoxyacetanilide, an HIF-1 α Inhibitor

Hyun Seung Ban, Kazuki Shimizu, Hidemitsu Minegishi, and Hiroyuki Nakamura*

Journal of the American Chemical Society, **2010**, 132, 11870-11871

Synthesis and biological evaluation of boronic acid-containing phenstatin analogues

Hiroyuki Nakamura*, Hirokazu Kuroda, and Hidemitsu Minegishi

ARKIVOC, **2012**, vii, 79-87

Identification of heat shock protein 60 as the regulator of the hypoxia-inducible factor subunit HIF-1

Hyun Seung Ban, Kazuki Shimizu, Hidemitsu Minegishi, and Hiroyuki Nakamura*

Pure and Applied Chemistry, **2012**, 84, 2325-2337.

HSP60 as a drug target.

Hiroyuki Nakamura* and Hidemitsu Minegishi,

Current Pharmaceutical Design, **2013**, 19, 441-451.

Development of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α inhibitors: Effect of *ortho*-carborane substituents on HIF transcriptional activity under hypoxia

Hiroyuki Nakamura*, Yuka Yasui, Minako Maruyama, Hidemitsu Minegishi, Hyun Seung Ban, and Shinichi Sato

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, **2013**, 23, 806-810.

Synthesis and Biological Evaluation of Diaryl-Substituted Carboranes as Inhibitors of Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 Transcriptional Activity

Hidemitsu Minegishi, Takuya Matsukawa, and Hiroyuki Nakamura*

ChemMedChem, **2013**, 8, 265-271.

Discovery of Indenopyrazoles as a New Class of Hypoxia Inducible Factor (HIF) -1 Inhibitors

Hidemitsu Minegishi, Shinji Fukashiro, Hyun Seung Ban, and Hiroyuki Nakamura*

ACS Medicinal Chemistry Letters, **2013**, 4, 297-301.

第1章 がんの低酸素環境における低酸素誘導因子の働き

1-1 がんと低酸素

世界のがんによる死亡数は年間 820 万人と推定され、その数は毎年増え続けていくと予想されている。日本でも死因の第 1 位はがんであり、がんによる死亡数は 2013 年で 36.5 万人と推計され年々増加傾向にある。今後もこの増加は続く予測されるため、がん治療の研究は重要になってくるといえる。

がん組織と正常組織を比較すると、正常組織では血管網が発達しているため栄養や酸素が十分に供給されているが、がん組織ではがん細胞の増殖が血管網の発達よりも速いために血管の発達が未熟となる。また、がん組織で誘導される新生血管網は無秩序で、脆弱なものとなる。その結果としてがん組織内に形成された血管は通常組織における血管と比べ、働きが不十分になっている¹。したがって血流によって送られる栄養や酸素ががん組織に十分に送達されず、その結果としてがん組織においては低酸素環境が存在している。

細胞の低酸素ストレス反応として、解糖系の活性化や血管新生の誘導が起こることが知られており、これらの反応はがん細胞においても同様に起こっている。しかし、がん細胞は解糖系やオートファージの亢進によって低酸素・低栄養状態においても生存を可能にしている²。

1-2 低酸素誘導因子の働き

低酸素環境特異的に抗腫瘍効果を発揮する薬剤の開発において、注目されている標的タンパク質の1つが HIF (hypoxia-inducible factor) -1 である。HIF-1 は酸素依存的分解領域を有する α サブユニットと、細胞内で恒常的に安定して発現している β サブユニットが複合体を形成することで転写因子として働くタンパク質である^{3,4}。

HIF- α には現在、HIF-1 α ⁵、HIF-2 α ⁶、HIF-3 α ⁷ の3つのアイソフォームが知られており HIF-1 α はがん細胞を含めほぼ全身に発現している。HIF-1 α のタンパク質は、2つの転写活性化ドメインである NAD (N-terminal transactivation domain) と CAD (C-terminal transactivation domain)、酸素依存性分解ドメインである ODDD (oxygen-dependent degradation domain)、HIF-1 β との複合体形成時に必要な bHLH (basic helix-loop-helix) と PAS (Per-Arnt-Sim homology) ドメインを有している。ODDD が HIF-1 α 特異的なプロリン水酸化酵素である PHDs (prolyl hydroxylases) によって水酸化されることで分解へと導かれ、CAD のアスパラギン残基が FIH (factor inhibiting HIF) によって水酸化されることで転写のコアクチベータである p300 との複合体形成が抑制される。これによって HIF-1 α の転写は制御されている⁸。

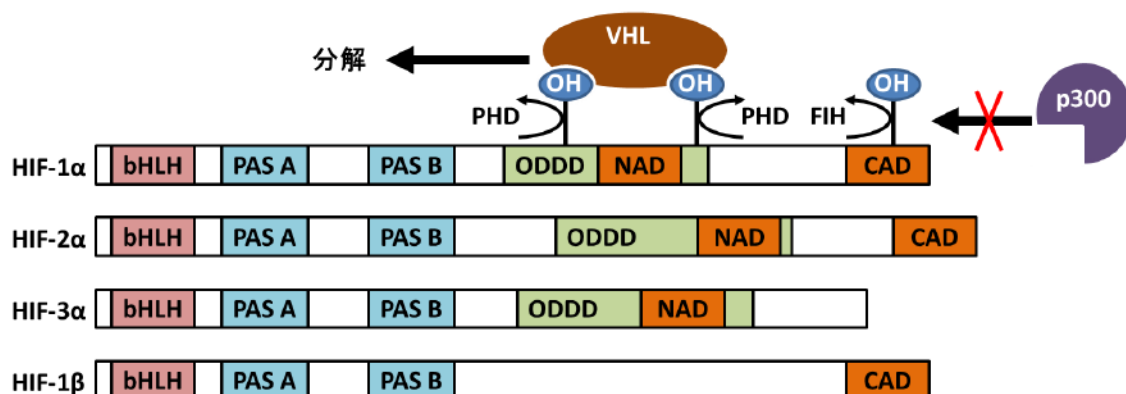


Figure 1-1. HIF タンパク質の構造と制御機構

HIF-1 α は細胞内で恒常的に発現しているタンパク質であるが、有酸素環境下では HIF-1 α の ODDD の P402 と P564 が PHDs によって水酸化される。これによって HIF-1 α が VHL (von Hippel-Lindau) E3 ユビキチンリガーゼ複合体を形成し、その結果ポリユビキチン化を経て 26S プロテアソームによって分解される^{9,10}。この HIF-1 α タンパク質の分解は非常に速いため、有酸素環境下においては安定して発現できず、転写因子として働くことはできない。

しかし、PHD の活性は酸素依存的であるため、低酸素環境では PHD 活性が低下することによって HIF-1 α の分解が止まり、細胞質に安定に存在するようになる。安定化された HIF-1 α は核内に移行し、HIF-1 β と複合体を形成することで転写コアクチベータ P300 とともに遺伝子上の低酸素応答領域である HREs (hypoxia response elements) に結合し、遺伝子の発現を誘導する転写因子として働く。

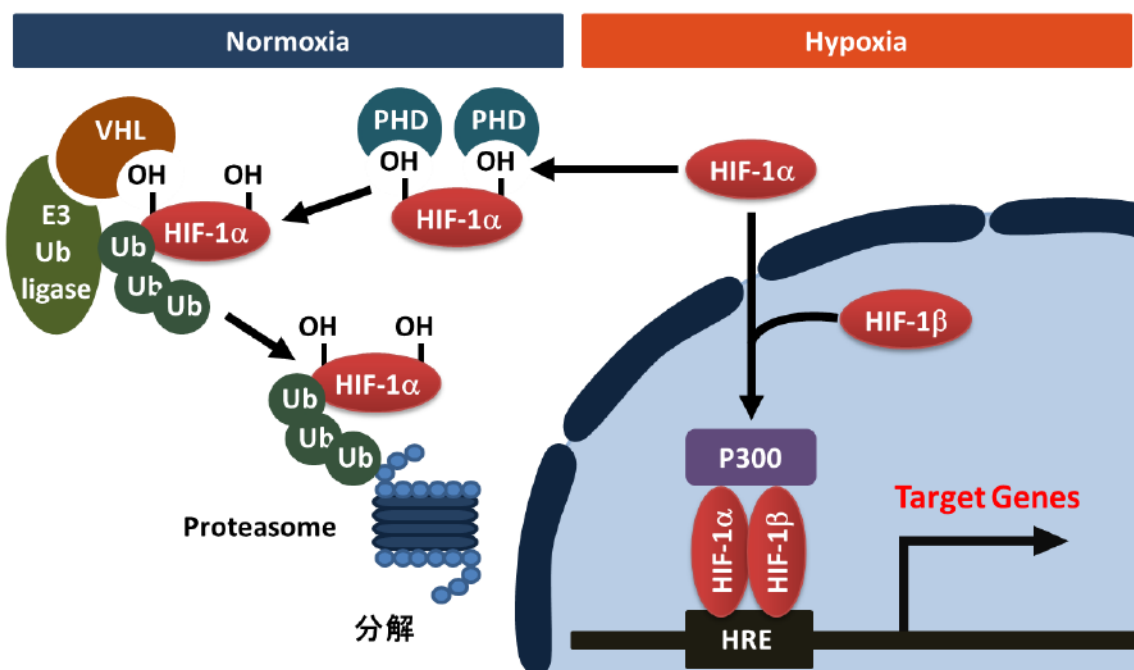


Figure 1-2. HIF-1 α タンパク質の分解および安定化経路

HIF-1 α によって推定 60 を超える遺伝子の発現が誘導される。HIF-1 α によって発現する主な遺伝子を Figure 1-3 に示した。Cyclin G2、IGF (Insulin-like growth factor)、TGF (transforming growth factor) などの増殖因子や、ADM (adrenomedullin) や NOS (nitric oxide synthase) による血管拡張作用が誘導されることで細胞増殖や生存につながる。GLUT (glucose transporter)、HK (hexokinase)、ENO (enolase)、PGK (phosphoglycerate kinase)、LDHA (lactate dehydrogenase A)、PKM (pyruvate kinase M)、PKFL (phosphofructokinase L) などの発現の亢進によって細胞内での糖代謝によるエネルギー産生が促進される。VEGF (vascular endothelial growth factor)、ENG (endoglin)、LEP (leptin) などの発現が亢進されることで血管新生が誘導される。LOX (lysyl oxidase)¹¹、CXCR4 (C-X-C chemokine receptor type 4)、MMP2 (matrix metalloproteinase 2) などの発現によって浸潤や転移が促進される。これら以外にも EPO (erythropoietin) による赤血球新生、MDR1 (multidrug resistance 1) による薬物排出の亢進なども誘導される¹²⁻¹⁷。がん組織内の低酸素環境下で HIF-1 α が働き、これらの遺伝子が発現することでがん細胞の更なる増殖だけでなく、がんの浸潤や転移、解糖系によるエネルギー産生の亢進、薬剤耐性などが誘導されるため、がんの悪性化に HIF-1 α が深く関与していると考えられる。実際に多くの種類の腫瘍内で HIF-1 α の過剰発現が確認されている¹⁸⁻²³。

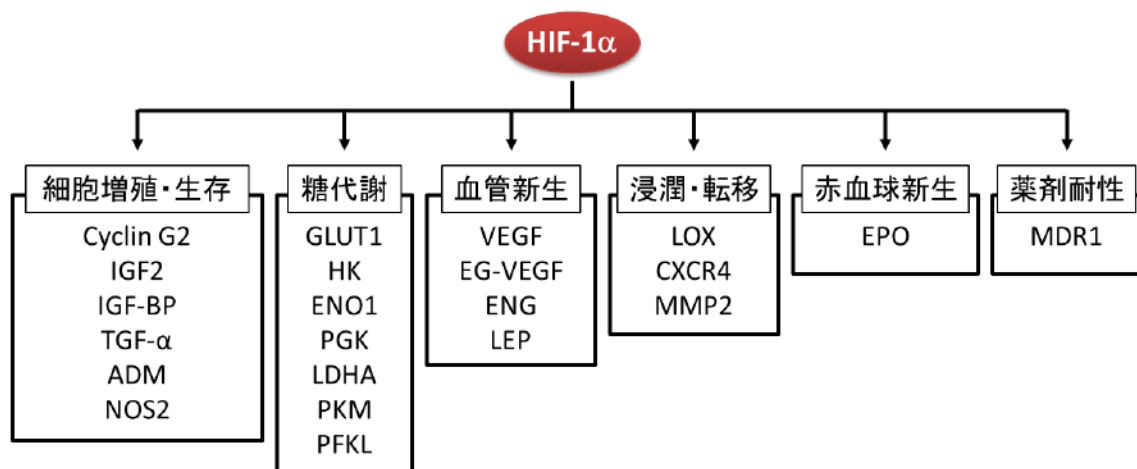


Figure 1-3. HIF-1 α により発現される遺伝子とその働き

1-3 HIF-1 阻害剤

現在報告されている HIF-1 α の阻害剤としては、HIF-1 α の mRNA からの翻訳を阻害することで HIF-1 α タンパク質の発現量を減少させ、その結果 HIF-1 の転写活性を阻害する Topotecan²⁴、リンゴ酸脱水素酵素の阻害によって局所的な酸素分圧を上げることで HIF-1 α タンパク質の分解を促進する LW6²⁵⁻²⁷、HIF-1 α タンパク質の安定化に関与している HSP (Heat Shock Protein) 90 を阻害することで HIF-1 α タンパク質を不安定化させ分解に導く 17AAG²⁸、当研究室で開発された HSP60 を阻害する GN26361^{29, 30}、HIF-1 と転写コアクチベータ P300 との相互作用を阻害することによって HIF-1 転写活性を抑制する YC-1^{31, 32}、HIF-1 α と HIF-1 β の二量体形成を阻害する Acriflavine³³ などがある。(Figure 1-3)。

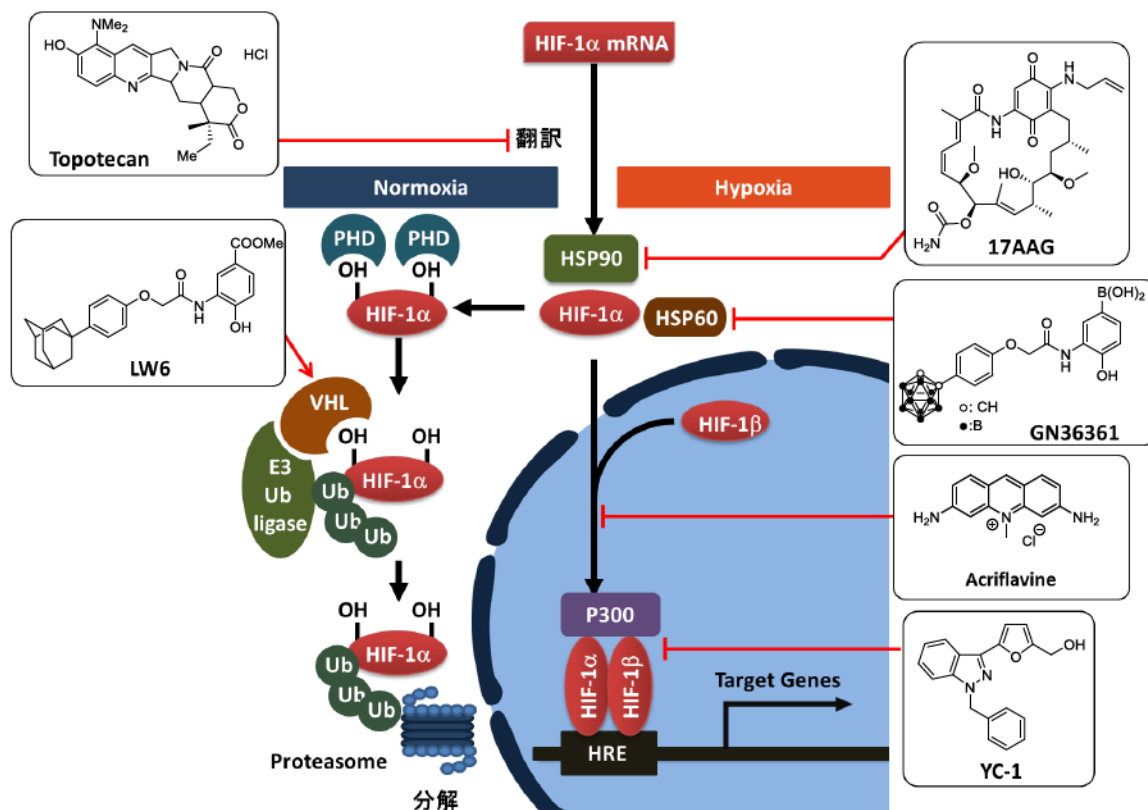


Figure 1-3. HIF-1 阻害剤の作用機序

その他にも HIF-1 α タンパク質の合成を阻害する Digoxin³⁴ や HIF-1 α タンパク質の安定化を阻害する PX-478³⁵ などが報告されている。また、ドクダミ科の *Saururus cernuus* L から単離された天然物である manassantin A が強力な HIF-1 阻害剤として報告されている³⁶。近年この manassantin A を基にした構造活性相関研究によって manassantin A よりも HIF-1 阻害活性の強い LXY6006 が報告された³⁷。また、経口投与可能な HIF-1 阻害剤であるアダマンタンを有する化合物なども報告されている³⁸。しかしながらこれらの化合物はいずれも詳細な作用機序は解明されていない。

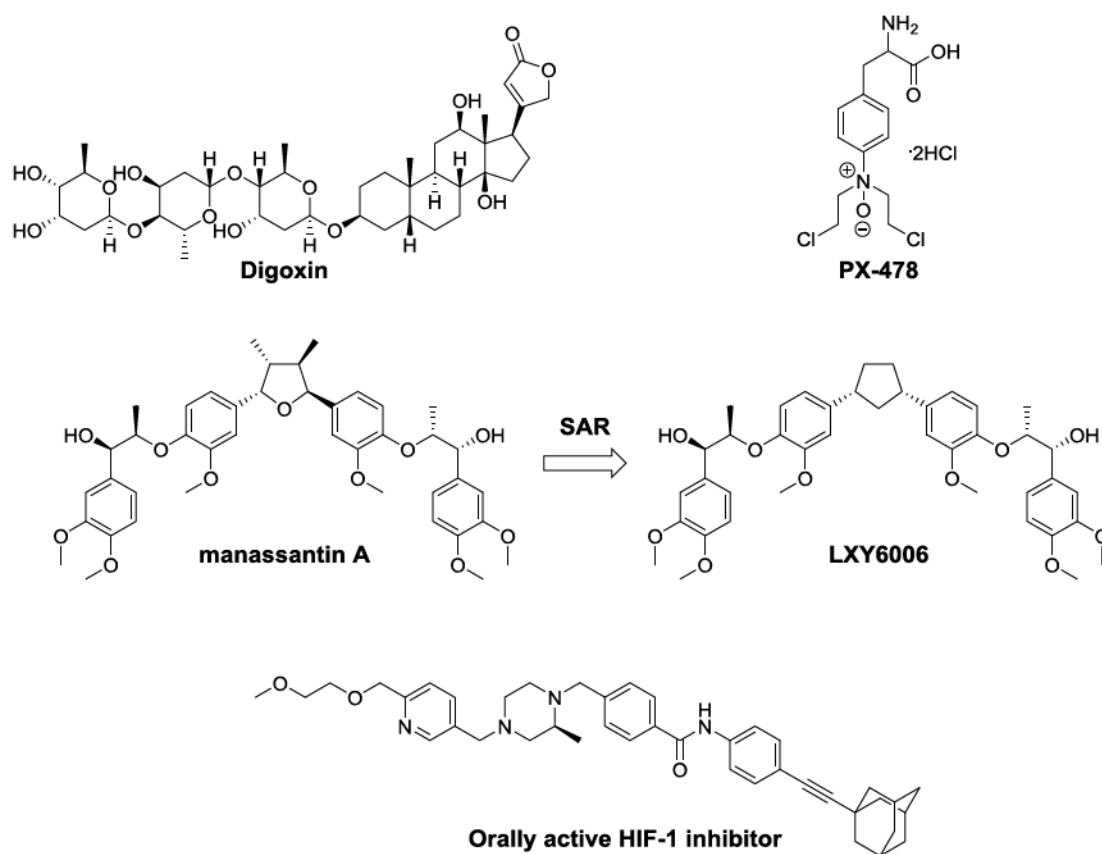


Figure 1-4. HIF-1 阻害剤の構造

1-4 研究目的

このように、がんの悪性化に関わっている HIF-1 α は、がん治療の分子標的として注目されており、その転写活性を阻害する薬剤の開発が行われている³⁹⁻⁴¹。しかしながら、報告されている HIF-1 の阻害剤は作用機序が明らかになっていないものもあり、HIF-1 の転写の制御機構には未解明の部分があると考えられる。

以上の事から本研究では HIF-1 を標的とした阻害剤の開発だけでなく、その詳細な作用機序の解明も行うこととした。

1-5 参考文献

- (1) Dewhirst, M.W.; Cao, Y.; Moleller, B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nat. Rev. Cance.*, **2008**, 8, 425-437.
- (2) Brown, J.M. ; Wilson, W.R. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat. Rev. Cancer*. **2004**, 4, 437-447
- (3) Wang, G. L.; Jiang, B. H.; Rue, E. A.; Semenza, G. L. Hypoxiainducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, 92, 5510-5514.
- (4) Wang, G. L.; Semenza, G. L. Purification and characterization of hypoxia-inducible Factor 1. *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 1230-1237.
- (5) Semenza, G. L. Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **1999**, 15, 551-578.
- (6) Wenger, R. H.; Gassman, M. Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biol. Chem.* **1997**, 378, 609-619.
- (7) Gu, Y.-Z.; Moran, S. M.; Hogenesch, J. B.; Wartmen, L.; Bardfield, C. A. Molecular characterization and chromosomal localization of a third α -class hypoxia inducible factor subunit, HIF3 α . *Gene Expression*, **1998**, 7, 205-213
- (8) Lisy, K.; Peet, D. J. Turn me on: regulating HIF transcriptional activity. *Cell. Death. Differ*, **2008**, 15, 642-649
- (9) Huang, L. E.; Gu, J.; Schau, M.; Bunn, H. F. Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, 95, 7987-7992.
- (10) Ivan, M.; Kondo, K.; Yang, H.; Kim, W.; Valiando, J.; Ohh, M.; Salic, A.; Asara, J. M.; Lane, W.

- S.; Kaelin, W. G., Jr. HIF α Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O₂ Sensing. *Science* **2001**, 292, 464–468.
- (11) Ji, F.; Wang, Y.; Qiu, L.; Li, S.; Zhu, J.; Liang, Z.; Wan, Y.; Di, W. Hypoxia inducible factor 1 α -mediated LOX expression correlates with migration and invasion in epithelial ovarian cancer. *Int. J. Oncol.* **2013**, 42, 1578-1588.
- (12) Semenza, G. L. Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene*. **2010**, 29, 625-634.
- (13) Jiang, B.-H.; Rue, E.; Wang, G. L.; Roe, R.; Semenza, G. L. Dimerization, DNA Binding, and Transactivation Properties of Hypoxia-inducible Factor 1. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 17771–17778.
- (14) Zhong, H.; De Marzo, A. M.; Laughner, E.; Lim, M.; Hilton, D. A.; Zagzag, D.; Buechler, P.; Isaacs, W. B.; Semenza, G. L.; Simons, J. W. Overexpression of Hypoxia-inducible Factor 1 α in Common Human Cancers and Their Metastases. *Cancer Res.* **1999**, 59, 5830– 5835.
- (15) Wenger, R. H. Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *FASEB J.* **2002**, 16, 1151–1162.
- (16) Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer.* **2003**, 3, 721-732.
- (17) Chowdhury, R.; Hardy, A.; Schofield, C. J. The human oxygen sensing machinery and its manipulation. *Chem. Soc. Rev.* **2008**, 37, 1308-1319
- (18) Talks, K. L.; Turley, H.; Gatter, K. C.; Maxwell, P. H.; Pugh, C. W.; Ratcliffe, P. J.; Harris, A. L. The Expression and Distribution of the Hypoxia-Inducible Factors HIF-1 α and HIF-2 α in Normal Human Tissues, Cancers, and Tumor-Associated Macrophages. *Am. J. Pathol.* **2000**, 157, 411–421.
- (19) Birner, P.; Schindl, M.; Obermair, A.; Breitenecker, G.; Oberhuber, G. Expression of Hypoxia-inducible Factor 1 α in Epithelial Ovarian Tumors: Its Impact on Prognosis and on Response to Chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* **2001**, 7, 1661–1668.

- (20) Birner, P.; Gatterbauer, B.; Oberhuber, G.; Schindl, M.; Rösler, K.; Proding, A.; Budka, H.; Hainfellner, J. A. Expression of hypoxia-inducible factor-1 α in oligodendrogliomas: Its impact on prognosis and neoangiogenesis. *Cancer*. **2001**, 92, 165–171.
- (21) Giatromanolaki, A.; Koukourakis, M. I.; Sivridis, E.; Turley, H.; Talks, K.; Pezzella, F.; Gatter, K. C.; Harris, A. L. Relation of hypoxia inducible factor 1 α and 2 α in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *Br. J. Cancer*. **2001**, 85, 881–890.
- (22) Zagzag, D.; Zhong, H.; Scalzitti, J. M.; Laughner, E.; Simons, J. W.; Semenza, G. L. Expression of hypoxia-inducible factor 1 α in brain tumors: Association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer*. **2000**, 88, 2606–2618.
- (23) Birner, P.; Schindl, M.; Obermair, A.; Plank, C.; Breitenecker, G.; Oberhuber, G. Overexpression of Hypoxia-inducible Factor 1 α is a Marker for an Unfavorable Prognosis in Early-Stage Invasive Cervical Cancer. *Cancer Res*. **2000**, 60, 4693–4696.
- (24) Rapisarda, A.; Uranchimeg, B.; Scudiero, D. A.; Selby, M.; Sausville, E. A.; Shoemaker, R. H.; Melillo, G. Identification of small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activation pathway. *Cancer Res*. **2002**, 62, 4316–4324.
- (25) Lee, K.; Lee, J. H.; Boovanahalli, S. K.; Jin, Y.; Lee, M.; Jin, X.; Kim, J. H.; Hong, Y. S.; Lee, J. J. (Aryloxyacetyl amino)benzoic acid analogues: A new class of hypoxia-inducible factor-1 inhibitors. *J. Med. Chem*, **2007**, 50, 1675–1684.
- (26) Lee, K.; Kang, J. E.; Park, S. K.; Jin, Y.; Chung, K. S.; Kim, H. M.; Lee, K.; Kang, M. R.; Lee, M. K.; Song, K. B.; Yang, E. G.; Lee, J. J.; Won, M. LW6, a novel HIF-1 inhibitor, promotes proteasomal degradation of HIF-1 α via upregulation of VHL in a colon cancer cell line. *Biochem Pharmacol*, **2010**, 80, 982–989.
- (27) Lee, K.; Ban, H. S.; Naik, R.; Hong, Y. S.; Son, S.; Kim, B. K.; Xia, Y.; Song, K. B.; Lee, H. S.; Won, M. Identification of malate dehydrogenase 2 as a target protein of the HIF-1 inhibitor LW6

using chemical probes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, 52, 10286-10289.

(28) Liu, Y. V.; Baek, J. H.; Zhang, H.; Diez, R.; Cole, R. N.; Semenza, G. L. RACK1 Competes with HSP90 for Binding to HIF-1 α and Is Required for O₂-Independent and HSP90 Inhibitor-Induced Degradation of HIF-1 α . *Mol. Cell*, **2007**, 25, 207-217

(29) Shimizu, K.; Maruyama, M.; Yasui, Y.; Minegishi, H.; Ban, H. S.; Nakamura, H. Boron-containing phenoxyacetanilide derivatives as hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 1453–1456.

(30) Ban, H. S.; Shimizu, K.; Minegishi, H.; Nakamura, H. Identification of HSP60 as a Primary Target of o-Carboranylphenoxyacetanilide, an HIF-1 α Inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 11870–11871.

(31) Yeo, E. J.; Chun, Y. S.; Cho, Y. S.; Kim, J.; Lee, J. C.; Kim, M. S.; Park, J. W. YC-1: a potential anticancer drug targeting hypoxia-inducible factor 1. *J. Natl. Cancer. Inst.* **2003**, 95, 516-525.

(32) Li, S. H.; Shin, D. H.; Chun, Y. S.; Lee, M. K.; Kim, M. S.; Park, J. W. A novel mode of action of YC-1 in HIF inhibition: stimulation of FIH-dependent p300 dissociation from HIF-1 α . *Mol. Cancer. Ther.* **2008**, 7, 3729-3738

(33) Lee, K.; Zhang, H.; Qian, D. Z.; Rey, S.; Liu, J. O.; Semenza, G. L. Acriflavine inhibits HIF-1 dimerization, tumor growth, and vascularization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, 106, 17910-17915.

(34) Zhang, H.; Qian, D. Z.; Tan, Y. S.; Lee, K.; Gao, P.; Ren, Y. R.; Rey, S.; Hammers, H.; Chang, D.; Pili, R.; Dang, C. V.; Liu, J. O.; Semenza, G. L. Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1 α synthesis and block tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2008**, 105, 19579-19586.

(35) Koh, M. Y.; Spivak-Kroizman, T.; Venturini, S.; Welsh, S.; Williams, R. R.; Kirkpatrick, D. L.; Powis, G. Molecular mechanisms for the activity of PX-478, an antitumor inhibitor of the hypoxia-inducible factor-1 α . *Mol. Cancer. Ther.* **2008**, 7, 90-100.

- (36) Hossain, C. F.; Kim, Y. P.; Baerson, S. R.; Zhang, L.; Bruick, R. K.; Mohammed, K. A.; Agarwal, A. K.; Nagle, D. G.; Zhou, Y. D. Saururus cernuus lignans--potent small molecule inhibitors of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, 333, 1026-1033.
- (37) Lang, L.; Liu, X.; Li, Y.; Zhou, Q.; Xie, P.; Yan, C.; Chen, X. A synthetic manassantin a derivative inhibits hypoxia-inducible factor 1 and tumor growth. *PLoS One*. **2014**, 9, e99584.
- (38) Nagao, S.; Yamane, Y.; Funasaka, S.; Tanaka, K.; Miyazaki, K.; Kotake, Y.; Kamata, J.; Watanabe-Miyano, S.; Toyama, O.; Ozawa, Y.; Mizui, Y.; Okamoto, K.; Ito, D. Synthesis and structure-activity relationships of novel, potent, orally active hypoxia-inducible factor-1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 5513-5529
- (39) Folkman, J. Angiogenesis: An organizing principle for drug discovery? *Nat. Rev. Drug Discovery*. **2007**, 6, 273–286.
- (40) Bertout, J. A.; Patel, S. A.; Simon, M. C. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer*. **2008**, 8, 967–975.
- (41) Ban, H. S.; Uto, Y.; Nakamura, H. Hypoxia-inducible factor inhibitors: A survey of recent patented compounds (2004–2010). *Expert Opin. Ther. Pat.* **2011**, 21, 131–146.

第2章 インデノピラゾール骨格を有する HIF-1 阻害剤の開発と生物活性評価

2-1 インデノピラゾール骨格を有する HIF-1 α 阻害剤の分子設計と合成

2-1-1 分子設計

当研究室では VEGFR (VEGF receptor) チロシンキナーゼ阻害剤である AAL993、SU5416、KRN663 が Akt や ERK のリン酸化シグナルを阻害することで HIF-1 の転写を阻害することを既に報告している¹。

また VEGFR チロシンキナーゼ阻害剤としてインデノピラゾール化合物を報告している²。これら2つの報告から、インデノピラゾール化合物も AAL993 など他の VEGFR チロシンキナーゼ阻害剤と同様に HIF-1 転写阻害活性を示すのではないかとの仮説を立て、研究室のインデノピラゾール化合物ライブラリーを用いた HIF-1 阻害剤のスクリーニングを行った。その結果、新たな HIF-1 阻害剤として GN02707 を見出した。

しかしながら、インデノピラゾール化合物 GN02707 は Figure 2-1 に示すように、化合物 **1** からのアセトフェノンとの反応によるトリケトン体 **2** への合成において収率が 10%程度と低く、さらに、トリケトン体 **2** からインデノピラゾール骨格を形成する際、位置異性体が生じるため単離・精製の点で問題があった³。

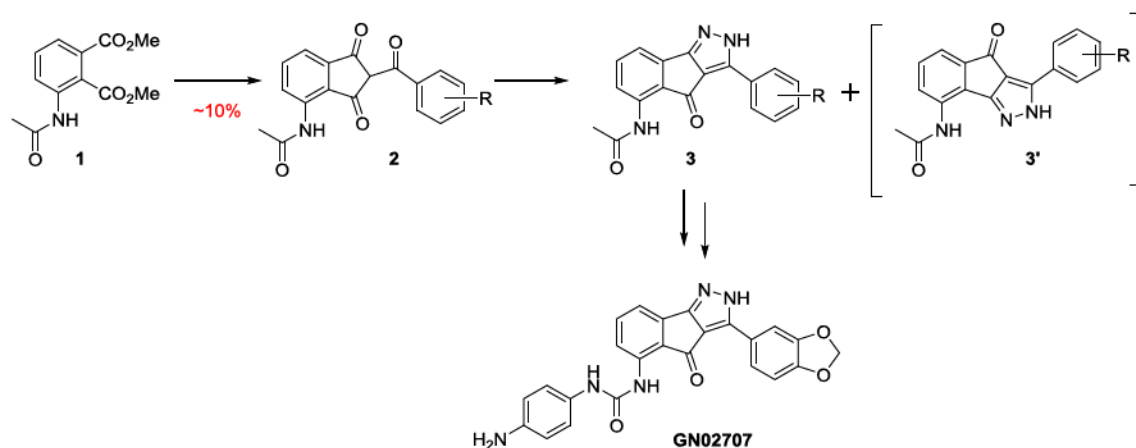


Figure 2-1. GN02707 の合成方法

そこで類似の骨格を持ち、構造展開の容易なインデノピラゾール化合物 **4** に着目した。化合物 **4** は PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) チロシンキナーゼ阻害剤として報告された骨格であり、この構造は化合物 **5** と **6** からワンポットで合成することができる⁴。そのため、2つのユニットをそれぞれチューニングすることで構造の多様化を効率的に行うことができる (Figure 2-2)。

以上のことから、化合物 **4** を基本骨格とした誘導体を合成し、HIF-1 阻害活性に対する構造活性相関研究を行うこととした。

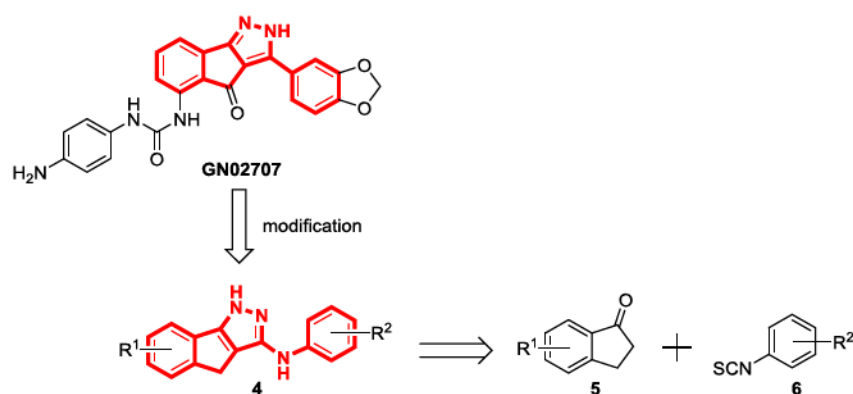


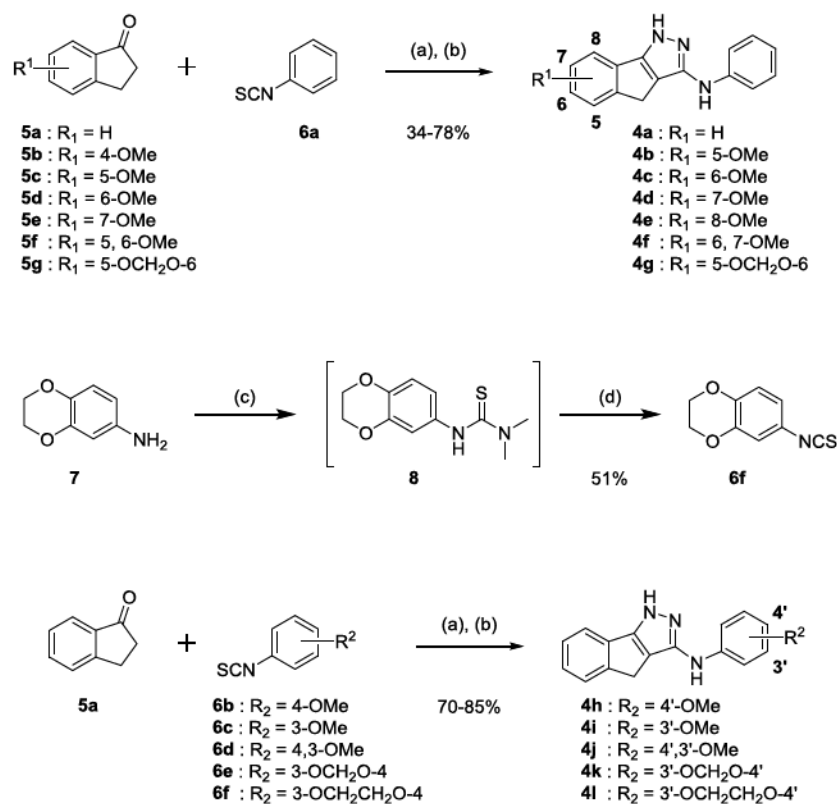
Figure 2-2. GN02707 から化合物 **4** への骨格変換と逆合成解析

2-1-2 インデノピラゾール化合物の合成

Scheme 2-1 に示すように、 R^1 部位に様々な置換基を有するインダノン誘導体 **5a-g** とフェニルイソチオシアナート **6a** にリチウムヘキサメチルジシラザン (LiHMDS) とヒドラジンを作用させることで、 R^1 部位に置換基を有するインデノピラゾール化合物 **4a-g** を合成した⁴。フェニルイソチオシアナート誘導体はアニリン化合物 **7** に対して Tetramethylthiuram Disulfide を作用させることで中間体 **8** とし、続く塩酸処理でフェニルイソチオシアナート **6f** を合成した⁵。

合成したフェニルイソチオシアナート誘導体 **6b-f** と 1-インダノン **5a** とを反応させることで R^2 部位に様々な置換基を導入したインデノピラゾール化合物 **4h-l** を合成した⁴。

Scheme 2-1 インデノピラゾール誘導体の合成



Reagents and conditions: (a) LiHMDS, THF, R.T. (b) $\text{H}_2\text{NNH}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$, AcOH, reflux. (c) Tetramethylthiuram Disulfide, EtOH, reflux. (d) conc HCl(aq), reflux.

2-2 HIF-1 α 転写抑制と 細胞増殖抑制作用の解析

HIF-1 の結合領域である HRE を繋いだプロモーターの下流にホタルルシフェラーゼを繋いだレポータープラスミドと、内部標準として CMV (Cytomegalovirus) プロモーターの下流にウミシイタケルシフェラーゼをつないだレポータープラスミドの 2 つを安定に保持したヒト子宮頸がん細胞 (HeLa) を作成した。この HeLa 細胞を用いて合成したインデノピラゾール化合物の HIF-1 α 転写阻害活性評価を行った。

また、細胞増殖抑制作用は MTT (3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) を用いて評価を行った。MTT は水溶液の状態では黄色の溶液だが細胞内に取り込まれるとミトコンドリア内での還元作用によって非水溶性のホルマザン色素として析出する (Figure 2-3)。

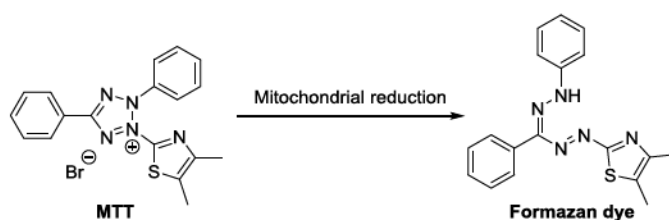
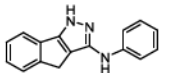
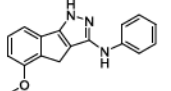
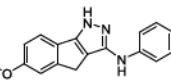
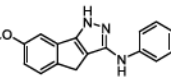
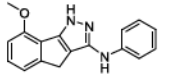
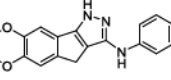
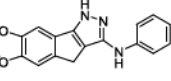
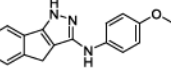
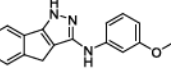
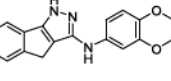
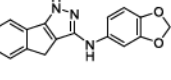
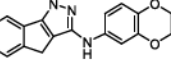


Figure 2-3. MTT と還元体であるホルマザン色素の構造

この還元反応はミトコンドリアが働いている細胞、つまり生細胞の中で起きるため、このホルマザン色素を DMSO (Dimethyl sulfoxide) に溶かし、595 nm における吸光度を測定することで生細胞の数を測定し、その値から細胞増殖抑制作用の IC₅₀ を算出した。

比較対象としては HIF-1 阻害剤として広く使用されている YC-1 と CAY10585 を用いた。低酸素環境下 (酸素濃度 1%) において HRE ルシフェラーゼ安定発現 HeLa 細胞を用いたレポータージンアッセイと、HCT116 (ヒト大腸がん由来細胞)、HepG2 (ヒト肝がん由来細胞)、PC3 (ヒト前立腺がん由来細胞)、HeLa (ヒト子宮頸がん由来細胞) を用いた MTT アッセイによって合成したインデノピラゾール化合物の生物活性評価を行った。(Table 2-1)。

Table 2-1. インデノピラゾール誘導体による HIF-1 α 転写抑制^(a)と細胞増殖抑制作用^(b)

Compound	IC ₅₀ viability (μ M)			HRE-Luc IC ₅₀ (μ M)	
	HCT116	HepG2	PC3	HeLa	HeLa
 4a	17.5 \pm 2.3	24.2 \pm 6.5	>30	17.6 \pm 1.8	>30
 4b	2.34 \pm 0.01	5.2 \pm 1.7	21.7 \pm 4.9	1.62 \pm 0.06	>30
 4c	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	>30
 4d	1.54 \pm 1.9	15.4 \pm 1.3	>30	13.4 \pm 1.3	>30
 4e	0.57 \pm 0.04	0.75 \pm 0.05	3.2 \pm 0.5	0.57 \pm 0.02	>30
 4f	<0.1	0.24 \pm 0.01	0.72 \pm 0.09	<0.1	>30
 4g	5.2 \pm 0.7	11.2 \pm 0.2	22.3 \pm 2.3	8.5 \pm 0.4	>30
 4h	3.1 \pm 0.2	9.1 \pm 1.2	28.8 \pm 2.2	2.62 \pm 0.02	1.4 \pm 0.6
 4i	2.2 \pm 0.2	6.8 \pm 1.3	>30	2.9 \pm 0.1	6.1 \pm 0.4
 4j	0.73 \pm 0.03	3.8 \pm 0.7	>30	1.81 \pm 0.08	3.2 \pm 0.6
 4k	6.9 \pm 0.4	12.7 \pm 0.9	23.7 \pm 2.8	5.8 \pm 0.4	0.27 \pm 0.07
 4l	2.1 \pm 0.1	3.7 \pm 0.3	25.4 \pm 2.1	1.84 \pm 0.02	0.014 \pm 0.006
YC-1	-	-	-	-	1.5 \pm 0.7
CAY10585	-	-	-	-	21 \pm 0.9

(a)HER を安定発現させた Hela 細胞に低酸素環境下（酸素濃度 1 %）においてインデノピラゾール誘導体で 12 時間処理した後に、luciferase assay を用いて測定した。

(b)4 種の細胞に対して様々な濃度のインデノピラゾール誘導体で 3 日間処理した後に MTT assay を用いて細胞増殖抑制作用を測定した。

活性評価の結果を Table 2-1 に示した。この結果から無置換のインデノピラゾール化合物 **4a** やインデノピラゾール骨格の R¹ 部位に置換基を導入した化合物 **4b-g** では HIF-1 α 転写阻害活性を示さないことが明らかとなった。しかし、興味深いことにこれらの化合物の中で 6 位にメトキシ基を導入した化合物 **4c** と **4f** が非常に強い細胞増殖抑制作用を示した。また、この細胞増殖抑制作用は化合物 **4g** のような環化させた場合には活性が著しく低下した。この活性の低下は環化によって立体が固定化されたことが原因と考えられる。

一方で R² 部位に置換基を導入した化合物では HIF-1 阻害活性を示すことが明らかとなった。1 置換や 2 置換体である化合物 **4h-j** が数 μ M の濃度範囲で HIF-1 阻害活性を示した。これは既存の HIF-1 阻害剤である YC-1 と CAY10585 の HIF-1 阻害活性と比較すると CAY10585 よりも約 10 倍活性が高く、YC-1 とほぼ同等の活性を示した。さらにジメトキシ基を環化させた化合物 **4k** では **4h-j** よりも活性が向上し、特にエチレンジオキシ基によって環化させた化合物 **4l** が IC₅₀ = 14 nM と YC-1、CAY10585 と比較して約 100-1000 倍強い HIF-1 阻害活性を示すことが明らかとなった。

2-3 インデノピラゾール化合物 **4I** の作用機序解明

2-3-1 化合物 **4I** による HIF-1 α タンパク質の安定化への影響

構想活性相関研究より化合物 **4I** が最も強力な HIF-1 阻害活性を示すことが明らかとなった。そのため、化合物 **4I** による HIF-1 転写阻害の作用機序解明を行うこととした。まず、化合物 **4I** による HIF-1 α タンパク質の安定化への影響をウェスタンブロットによって解析した。コントロール薬剤として用いている CAY10585 は報告されている通り HIF-1 α タンパク質を分解へと導くことが確認できたが、化合物 **4I** ではそのような作用は全く観察されなかった。しかし、HIF-1 α によって発現が亢進される VEGF の mRNA 量を RT-PCR 法によって解析したところ、化合物 **4I** による濃度依存的な阻害が見られた。このことから化合物 **4I** は HIF-1 α タンパク質が安定化された以降の段階で作用していることが明らかとなった。

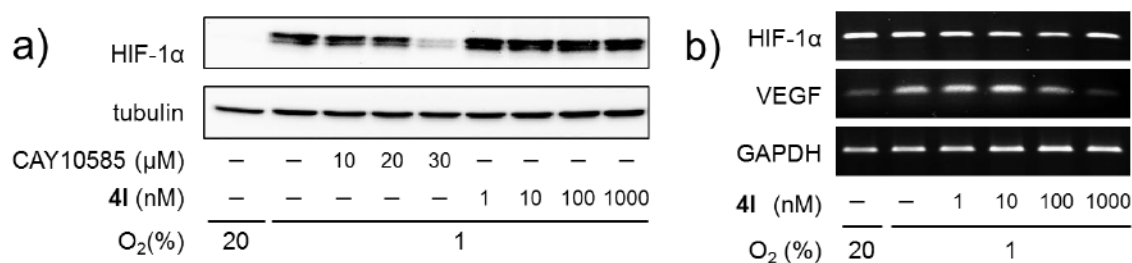


Figure 2-4. インデノピラゾール化合物 **4I** による HIF-1 α タンパク質と mRNA への影響

CAY10585 もしくは化合物 **4I** を図示した濃度で HeLa 細胞に暴露し、低酸素環境下において 4 時間培養した。(a) HIF-1 α タンパク質の発現量は抗 HIF-1 α 抗体を用いたウェスタンブロットによって解析した。CAY10585 は HIF-1 α タンパク質発現を抑えるコントロール薬剤として使用し、tubulin を内部標準として使用した。(b) HIF-1 α 、VEGF の mRNA レベルを RT-PCR によって解析した。内部標準としては GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) を用いた。

2-3-2 化合物 **4I** による HIF-1 α タンパク質の核内移行への影響

化合物 **4I** は HIF-1 α タンパク質が安定化された以降の段階で作用していることが明らかとなったため、化合物 **4I** による HIF-1 α タンパク質の核内移行への影響を免疫染色法によって解析した。Normoxia では HIF-1 α タンパク質は分解されるため局在は観測されないが、Hypoxai では HIF-1 α タンパク質は安定化され核内へ移行するため核内に局在が観測された。

CAY10585 で処理した場合は HIF-1 α タンパク質は分解されているため局在は観測できなくなった。しかしながら化合物 **4I** で処理した場合、HIF-1 α タンパク質は核内に移行していることが観察された。このことから、化合物 **4I** で処理しても HIF-1 α タンパク質の核内移行は阻害されないことが明らかとなった。

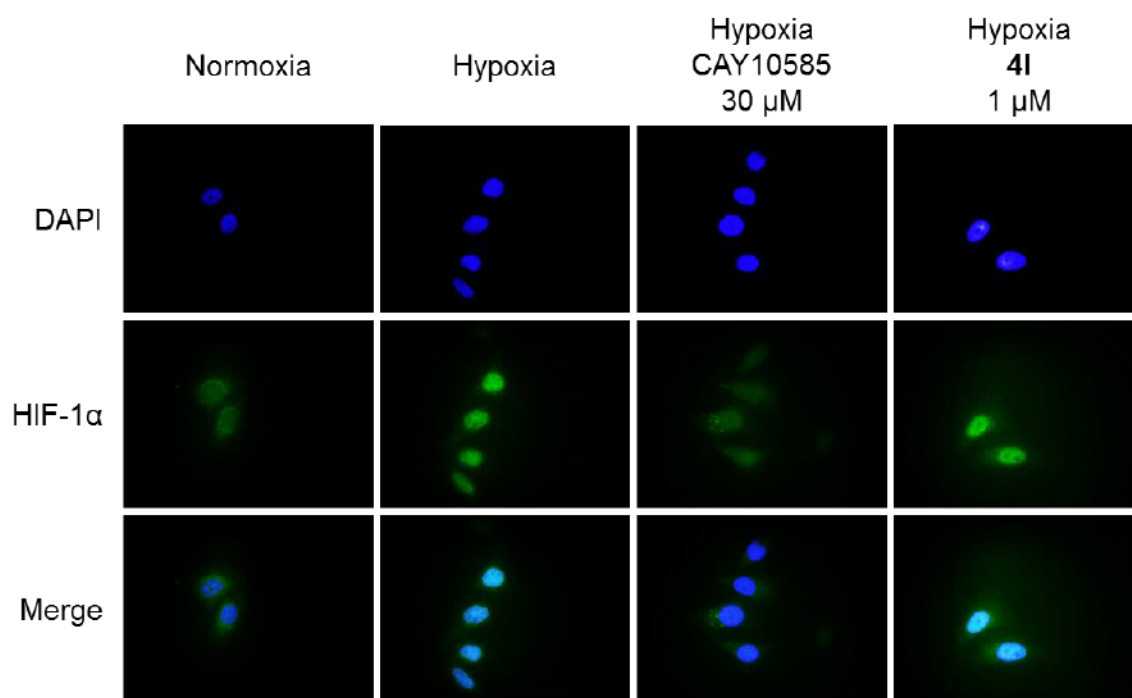


Figure 2-5. インデノピラゾール化合物 **4I** による HIF-1 α タンパク質の核内移行への影響

HIF-1 α タンパク質の局在を抗 HIF-1 α 抗体を用いた免疫染色によって解析した。細胞核は DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) によって染色した。染色後、蛍光顕微鏡を用いてそれぞれの蛍光の局在を観測した。

2-3-3 化合物 **4l** による HIF-1 α と HIF-1 β の二量体形成への影響

化合物 **4l** で処理しても HIF-1 α タンパク質の核内移行は阻害されないことが明らかとなったため、最後に HIF-1 α と HIF-1 β の二量体形成への影響について免疫沈降法を用いて解析した。化合物 **4l** で処理した場合に HIF-1 α と HIF-1 β のタンパク質の発現量に影響は見られないことが確認できたため、この条件下で抗 HIF-1 α 抗体を用いた免疫沈降実験を行い HIF-1 α タンパク質複合体の精製を行った。HIF-1 α と HIF-1 β は低酸素環境下では二量体を形成するため、HIF-1 α 抗体を用いた免疫沈降実験により HIF-1 β タンパク質も検出された。しかし、薬剤を処理してもこれら 2 つのタンパク質の検出量に変化は見られなかった。このことから化合物 **4l** で処理しても HIF-1 α と HIF-1 β の二量体形成には影響しないことが明らかとなった。

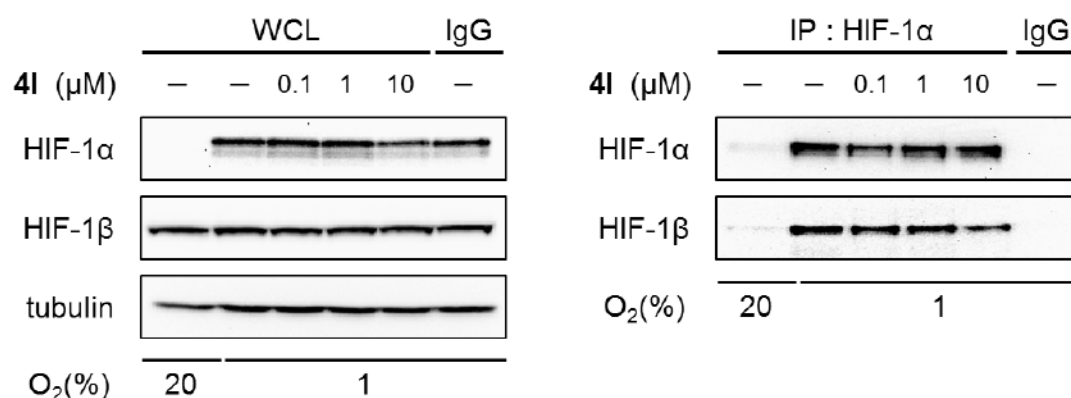


Figure 2-6. インデノピラゾール化合物 **4l** による HIF-1 α と HIF-1 β の二量体形成への影響

HIF-1 α と HIF-1 β の二量体の形成を抗 HIF-1 α 抗体を用いた免疫沈降法を用いて解析した。全細胞溶解液 (WCL : whole cell lysate) と免疫沈降後に得られた HIF-1 α 、HIF-1 β 、tubulin の量はそれぞれのタンパク質特異的な抗体を用いたウェスタンブロットによって解析した。

2-4 結論と考察

本研究においてはがんの低酸素環境下において病的血管新生を誘導する転写因子 HIF-1 α を標的とした阻害剤の開発を行った。

VEGFR チロシンキナーゼ阻害剤である AAL99 などが HIF-1 の転写を阻害することから、VEGFR チロシンキナーゼ阻害剤として報告したインデノピラゾール化合物も同様に HIF-1 転写阻害活性を示すのではないかと仮説を立て、スクリーニングを行った。その結果、新たな HIF-1 阻害剤として GN02707 を見出したが、合成が難しく化合物展開を行うことが困難であるという問題点があった。そこで類似骨格を持ち、なおかつ合成が容易であるインデノピラゾール骨格を持った HIF-1 阻害剤の分子設計と合成を行い、これに成功した。

合成したインデノピラゾール化合物による HIF-1 α 転写阻害活性について HRE ルシフェラーゼ安定発現 HeLa 細胞を用いたレポータージンアッセイによって解析した。その結果、インデノピラゾール骨格の R¹ に置換基を導入しても HIF-1 α 転写阻害活性は見られなかった。しかし、R² 部位にエチレンジオキシ基を導入した、インデノピラゾール化合物 **4I** (GN44028) が IC₅₀ = 14 nM と非常に高い HIF-1 阻害活性を示した。

化合物 **4I** による HIF-1 転写阻害の作用機序解明を行うため、まず、化合物 **4I** による HIF-1 α タンパク質の安定化への影響をウェスタンブロットによって解析した。また VEGF の mRNA 量を RT-PCR 法によって解析した。その結果、化合物 **4I** は HIF-1 α タンパク質の安定化には影響せず HIF-1 の転写を抑制していることが観察された。このことから化合物 **4I** は HIF-1 α タンパク質が安定化された以降の段階を阻害することで HIF-1 転写阻害活性を示していることが明らかとなった。

次に化合物 **4I** による HIF-1 α タンパク質の核内移行への影響を免疫染色法によって解析を行った。その結果、化合物 **4I** で処理した場合、HIF-1 α タンパク質は核内に移行していることが観察された。このことから、化合物 **4I** は HIF-1 α タンパク質が核内移行した後の段階を阻

害することで HIF-1 転写阻害活性を示すと考えられる。

最後に HIF-1 α と HIF-1 β の二量体形成への影響について免疫沈降法を用いて解析した。その結果、化合物 **4I** で処理してもこれら 2 つのタンパク質の二量体形成には影響しないことが明らかとなった。

以上の事から化合物 **4I** の作用機序は HIF-1 α と HIF-1 β が二量体を形成した後の段階で作用することで HIF-1 転写阻害活性を示していることが明らかとなった。このような作用を持つ HIF-1 阻害剤は報告例が無く、これまで報告されてきた HIF-1 阻害剤とは異なる作用機序を有していることが考えられる。つまり、化合物 **4I** を基にした更なる作用機序の解明を進めるとこは、未だ明らかにされていない HIF-1 の転写開始までの経路を解明することにつながるといえる。そのため、本研究で開発した化合物 **4I** はこれまで報告されている小分子 HIF-1 阻害剤と比較して非常に強力な HIF-1 阻害剤であるだけでなく、HIF-1 における研究を進めるうえでのケミカルツールとしても有用なものであるといえる。

また、合成したインドノピラゾール化合物の生物活性評価を行った結果、目的である HIF-1 α 阻害活性は示さなかった化合物 **4c** が非常に強い細胞増殖抑制作用を示すことがわかった。このことから、インドノピラゾール骨格は置換基を導入する位置を変えることで全く異なる活性を発現させられることができるため、生理活性物質の基本骨格として有用なものであると考えられる。

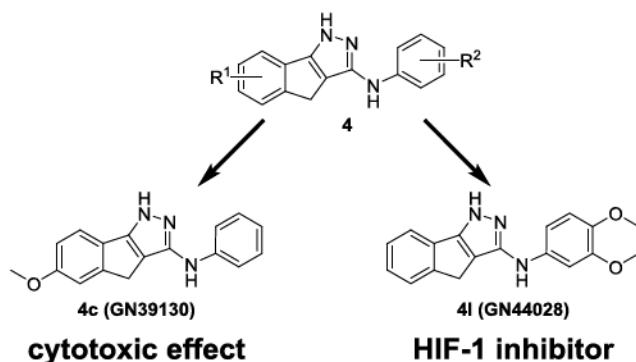


Figure 2-7. インドノピラゾール化合物の基本骨格と **4c**, **4I** の構造

2-5 実験の部

溶媒 脱水溶媒は下記の溶媒以外は当研究室にて蒸留したものを用いた。

THF 和光純薬株式会社 DMF 和光純薬株式会社

試薬 特に記載のない限り、市販のものを用いた。

実験器具 すべての反応器具は 120℃で2時間加熱し完全に乾燥したものを用いた。

各種測定には次の機器を用いた。

¹H NMR, ¹³C NMR Bruker biospin AVANCE II (400 MHz)

VARIAN UNITY-INOVA 400 (400 MHz)

¹H NMR、¹³C NMR 測定には溶媒として重クロロホルム、重メタノール、重 DMSO を用いた。重クロロホルムの内部標準はテトラメチルシラン(0 ppm)を用いた。

IR JASCO FT/IR-4100

MASS Shimadzu LCMS-2010EV

Bruker Daltonics micro TOF-15 focus

HPLC 島津高速液体クロマトグラフ(RID-10A, SPD-10A VP, SCL-10A VP,
LC-10AT VP, FCV-10AL VP, DGU-20A3)

使用カラム Hiber LiChrosorb Si60 5 μm (Cica-MERCK)

元素分析 CE instrument EA1110 CHNS-O automatic elemental analyzer.

6-Isothiocyanato-2,3-dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxine (6f)

3,4-ethylenedioxyaniline (1.50 ml, 8.0 mmol)と tetramethylthiuram disulfide(2.16 g, 9.0 mmol)を EtOH (40 ml)に溶かし、一晚加熱還流した。冷却後 conc. HCl (2.0 ml)を加えて、6 時間加熱還流した。反応溶液に四塩化炭素を加えて抽出し、炭酸カリウムを加えた後に有機溶媒を除去した。得られた残渣をカラムクロマトグラフィー（ヘキサン）で精製し、6-isothiocyanato-2,3-dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxine (4f) を白色固体で得た(0.728 g, 4.05 mmol, 51%)。

mp: 62-63 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 6.81 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.76-6.72 (2H, m), 4.27-4.24 (4H, m); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 143.7, 143.1, 134.0, 123.9, 119.1, 117.9, 114.7, 64.3, 64.3; IR (KBr) 3061, 2979, 2937, 2879, 2166, 2139, 1847, 1583, 1501, 1315, 1291, 1065, 891, 866, 800 cm^{-1} ; Anal. Calcd for $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$: C: 55.94, H: 3.65, N: 7.25, O: 16.56, S16.59, found, C: 55.94, H: 3.53, N: 7.20.

N-Phenyl-1,4-dihydroindeno[1,2-*c*]pyrazol-3-amine(4a)⁴

文献既知の化合物である。窒素雰囲気下、1-indanone (3a) (0.1 g, 0.76 mmol) と phenyl isothiocyanate (4a) (0.093 ml, 0.78 mmol) を THF (5 ml) に溶かした。1.6 M *n*-BuLi ヘキサン溶液 (0.475 ml, 0.76 mmol) と HMDS (0.16 ml, 0.76 mmol) を 0 °C で 30 分攪拌して調製した LiHMDS を反応溶液に室温で滴下した。室温で 12 時間攪拌した後、反応溶液に hydrazine (0.037 ml, 0.76 mmol) と酢酸 を加え、24 時間加熱した。反応溶液に水を加え、酢酸エチルで抽出を行い、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、有機溶媒を除去した。得られた残留物をカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル = 3:1）で精製し、*N*-phenyl-1,4-dihydroindeno[1,2-*c*]pyrazol-3-amine(4a) (0.152 g, 0.61 mmol, 80%)を白色固体で得

た。得られた化合物の ^1H NMR スペクトルは、文献値と一致した。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.57 (1H, d, $J = 7.2$ Hz), 7.44 (1H, d, $J = 6.8$ Hz), 7.31-7.23 (4H, m), 6.99 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.91 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 3.46 (2H, s); MS (ESI, positive) m/z : 248 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HPLC purity: 99.7% (206 nm), retention time: 15.4 min, The eluents were mixture of EtOAc and Hexane (1:1).

5-Methoxy- *N*-phenyl-1,4-dihydroindeno[1,2-*c*]pyrazol-3-amine(4b)⁴

文献既知の化合物である。4-methoxy-1-indanone (**3b**) (0.2 g, 1.23 mmol) と phenyl isothiocyanate (**4a**) (0.15 ml, 1.27 mmol) から **4a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー (塩化メチレン) で精製し **4b** を白色固体として得た (0.268 g, 0.96 mmol, 78%)。得られた化合物の ^1H NMR スペクトルは、文献値と一致した。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.33-7.23 (4H, m), 7.01 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.91 (1H, t, $J = 7.6$ Hz), 6.83 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 3.89 (3H, s), 3.42 (2H, s); MS (ESI, positive) m/z : 278 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HPLC purity: 96.3% (206 nm), retention time: 18.9 min, The eluents were mixture of EtOAc and Hexane (1:1).

6-Methoxy- *N*-phenyl-1,4-dihydroindeno[1,2-*c*]pyrazol-3-amine(4c)⁴

文献既知の化合物である。5-methoxy-1-indanone (**3c**) (0.123 g, 0.76 mmol) と phenyl isothiocyanate (**4a**) (0.093 ml, 0.78 mmol) から **4a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー (ヘキサン: 酢酸エチル = 3:1) で精製し **4c** を白色固体として得た (0.123 g, 0.44 mmol, 58%)。得られた化合物の ^1H NMR スペクトルは、文献値と一致した。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.50 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.30-7.26 (2H, m), 7.03 (1H, s), 7.02 (2H, d,

$J = 8.4$ Hz), 6.92 (1H, t, $J = 7.2$ Hz), 6.89 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 5.89 (1H, bs), 3.85 (3H, s), 3.47 (2H, s); MS (ESI, positive) m/z : 278 $[M+H]^+$; HPLC purity: 96.8% (206 nm), retention time: 26.2 min, The eluents were mixture of EtOAc and Hexane (1:1).

7-Methoxy- *N*-phenyl-1,4-dihydroindeno[1,2-*c*]pyrazol-3-amine(4d) ⁴

文献既知の化合物である。6-methoxy-1-indanone (3d) (0.123 g, 0.76 mmol) と phenyl isothiocyanate (4a) (0.093 ml, 0.78 mmol) から 4a と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 3:1) で精製し 4d を白色固体として得た(0.161 g, 0.58 mmol, 76%)。得られた化合物の ¹H NMR スペクトルは、文献値と一致した。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.32-7.24 (3H, m), 7.14 (1H, s), 6.98 (2H, d, $J = 7.2$ Hz), 6.90 (1H, dd, $J = 7.2, 7.6$ Hz), 6.81 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 3.80 (3H, s), 3.39 (2H, s); MS (ESI, positive) m/z : 278 $[M+H]^+$; HPLC purity: 91.2% (206 nm), retention time: 29.0 min, The eluents were mixture of EtOAc and Hexane (1:1).

8-Methoxy- *N*-phenyl-1,4-dihydroindeno[1,2-*c*]pyrazol-3-amine(4e)

7-methoxy-1-indanone (3e) (0.15 g, 0.92 mmol) と phenyl isothiocyanate (4a) (0.12 ml, 0.95 mmol) から 4a と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー (塩化メチレン) で精製し 2b を白色固体として得た(0.109 g, 0.39 mmol, 43%)。

mp: 200-201 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.29-7.22 (3H, m), 7.09 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.06 (2H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.90 (1H, dd, $J = 7.6, 7.6$ Hz), 6.86 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.09 (1H, bs), 3.97 (3H, s), 3.50 (2H, s); ¹³C NMR (100MHz, CD₃OD) δ 153.2, 150.4, 143.9, 128.6, 127.7, 118.9, 118.0, 115.3, 108.5, 54.4, 29.3; IR (KBr) 3343, 1597, 1563, 1523, 1498, 1486, 1268, 1070, 770, 744, 691

cm⁻¹; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for C₁₇H₁₅N₃O [M+Na]⁺: 300.1113, found: 300.1110; HPLC purity: 93.6% (206 nm), retention time: 17.6 min, The eluents were mixture of EtOAc and Hexane (1:1).

6,7-Dimethoxy- *N*-phenyl-1,4-dihydroindeno[1,2-*c*]pyrazol-3-amine(4f)⁴

文献既知の化合物である。5,6-dimethoxy-1-indanone (**3f**) (0.2 g, 1 mmol) と phenyl isothiocyanate (**4a**) (0.12 ml, 1.03 mmol) から **4a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー (メタノール : 塩化メチレン = 100:1) で精製し **2b** を白色固体として得た(0.2133 g, 0.69 mmol, 69%)。得られた化合物の ¹H NMR スペクトルは、文献値と一致した。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.28 (2H, t, J = 8.0 Hz), 7.20 (1H, s), 7.02 (1H, s), 7.00 (2H, d, J = 8.0 Hz), 6.93 (1H, dd, J = 7.2, 7.6 Hz), 5.86 (1H, bs), 3.93 (3H, s), 3.92 (3H, s), 3.42 (2H, s); MS (ESI, positive) m/z : 308 [M+H]⁺; HPLC purity: 91.8% (206 nm), retention time: 26.7 min, The eluents were mixture of EtOAc and Hexane (7:3).

6,7-Methylenedioxy- *N*-phenyl-1,4-dihydroindeno[1,2-*c*]pyrazol-3-amine (4g)

5,6-(Methylenedioxy)-1-indano (**3g**) (0.16 g, 0.91 mmol) と phenyl isothiocyanate (**4a**) (0.11 ml, 0.94 mmol) から **4a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー(塩化メチレン)で精製し **2b** を白色固体として得た(0.129 g, 0.44 mmol, 48%)。

mp: 181-182 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.28 (2H, t, J = 7.2 Hz), 7.08 (1H, s), 6.99 (2H, d, J = 8.4 Hz), 6.94-6.90 (2H, m), 6.00 (2H, s), 5.90 (1H, bs), 3.38 (2H, s); ¹³C NMR (100MHz, CD₃OD) δ 147.1, 147.0, 143.7, 142.8, 128.6, 119.2, 115.3, 106.4, 101.2, 99.6, 29.2; IR (KBr) 3382, 2896, 1596, 1528, 1498, 1478, 1269, 1142, 1037, 937, 852, 749, 695, 545 cm⁻¹; HRMS (ESI, positive) m/z

calcd. for $C_{17}H_{13}N_3O_2$ $[M+H]^+$: 292.1086, found: 292.1083; HPLC purity: 95.6% (206 nm), retention time: 18.5 min, The eluents were mixture of EtOAc and Hexane (1:1).

***N*-(4-Methoxyphenyl)-1,4-dihydroindeno[1,2-*c*]pyrazol-3-amine (4h)**

1-indanone (**3a**) (0.1 g, 0.76 mmol) と 4-methoxyphenyl isothiocyanate (**4b**) (0.11 ml, 0.76 mmol) から **4a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル = 5:1）で精製し **2b** を白色固体として得た (0.153 g, 0.55 mmol, 73%)。

mp: 145-147 °C; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.57 (1H, d, $J = 7.2$ Hz), 7.43 (1H, d, $J = 7.2$ Hz), 7.29 (1H, t, $J = 6.4$ Hz), 7.26-7.22 (1H, m), 6.81 (1H, dd, $J = 8.6, 3.6$ Hz), 3.79 (3H, s), 3.39 (2H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 154.3, 148.7, 143.8, 136.3, 133.1, 126.7, 126.4, 125.7, 119.4, 118.9, 118.5, 114.5, 111.1, 55.6, 29.9; IR (KBr) 3394, 3254, 3042, 2360, 1510, 1238, 1033, 818 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $C_{17}H_{15}N_3O$ $[M+H]^+$: 278.1293, found: 278.1292; HPLC purity: 99.1% (206 nm), retention time: 9.6 min, The eluents were mixture of EtOAc and Hexane (1:1).

***N*-(3-Methoxyphenyl)-1,4-dihydroindeno[1,2-*c*]pyrazol-3-amine (4i)**

1-indanone (**3a**) (0.1 g, 0.76 mmol) と 3-methoxyphenyl isothiocyanate (**4c**) (0.11 ml, 0.76 mmol) から **4a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー（メタノール：塩化メチレン = 1:5）で精製し **2b** を白色固体として得た(0.164 g, 0.59 mmol, 80%)。

mp: 67-69 °C; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.45 (1H, d, $J = 7.2$ Hz), 7.32 (1H, d, $J = 7.2$ Hz), 7.16-7.04 (3H, m), 6.45-6.39 (3H, m), 3.65 (3H, s), 3.31 (2H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$): δ 160.7, 155.3, 148.6, 144.4, 141.8, 133.0, 130.0, 126.7, 126.5, 125.7, 119.5, 112.4, 108.6, 105.7, 101.7, 55.1, 30.2; IR (KBr) 3383, 2360, 1602, 1525, 1495, 1203, 1159, 1045, 846, 765, 691 cm^{-1} ;

HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $C_{17}H_{15}N_3O$ $[M+H]^+$: 278.1293, found: 278.1290; HPLC purity: 99.0% (206 nm), retention time: 7.9 min, The eluents were mixture of EtOAc and Hexane (1:1).

***N*-(3,4-Dimethoxyphenyl)-1,4-dihydroindeno[1,2-*c*]pyrazol-3-amine (4j)**

1-indanone (**3a**) (0.1 g, 0.76 mmol) と 3,4-Dimethoxyphenyl isothiocyanate (**4d**) (0.15 g, 0.76 mmol) から **4a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 3:1) で精製し **2b** を白色固体として得た(0.175 g, 0.57 mmol, 75%)。

mp: 188-190 °C; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.58 (1H, d, $J = 5.2$ Hz), 7.45 (1H, d, $J = 5.2$ Hz), 7.31-7.26 (2H, m), 6.81 (1H, dd, $J = 8.6, 3.6$ Hz), 6.68 (1H, s), 6.59 (1H, d, $J = 8.4$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ 149.8, 148.9, 142.1, 138.6, 127.1, 126.5, 126.2, 119.0, 114.0, 107.1, 101.6, 56.7, 55.7, 29.7; IR (KBr) 3307, 2907, 2362, 1598, 1513, 1298, 1230, 1133, 1021, 840, 764, 729 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $C_{18}H_{17}N_3O_2$ $[M+H]^+$: 308.1399, found: 308.1400; HPLC purity: 98.9% (206 nm), retention time: 15.1 min, The eluents were mixture of EtOAc and Hexane (1:1).

***N*-(Benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-1,4-dihydroindeno[1,2-*c*]pyrazol-3-amine (4k)**

1-indanone (**3a**) (0.1 g, 0.76 mmol) と 3,4-methylenedioxyphenyl isothiocyanate (**4e**) (0.135 g, 0.76 mmol) から **4a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 5:1) で精製し **2b** を白色固体として得た(0.166 g, 0.57 mmol, 76%)。

mp: 184-186 °C; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$): δ 7.58 (1H, d, $J = 7.2$ Hz), 7.46 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.33 (1H, t, $J = 7.2$ Hz), 7.29-7.25 (1H, m), 6.74 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.68 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 6.50 (1H, dd, $J = 8.2, 2.4$ Hz), 5.93 (2H, s), 3.44 (2H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$): δ 148.9, 147.9,

140.0, 139.4, 127.1, 126.5, 126.3, 119.1, 108.8, 107.6, 100.8, 98.3, 39.3, 29.6; IR (KBr) 3292, 2898, 2360, 1635, 1616, 1538, 1500, 1486, 1201, 1040, 926, 814, 771, 730 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 292.1086, found: 292.1083; HPLC purity: 99.4% (206 nm), retention time: 7.8 min, The eluents were mixture of EtOAc and Hexane (1:1).

***N*-(2,3-Dihydrobenzo[*b*][1,4]dioxin-6-yl)-1,4-dihydroindeno[1,2-*c*]pyrazol-3-amine (4l)**

1-indanone (**3a**) (0.1 g, 0.76 mmol) と **4f** (0.15 g, 0.76 mmol) から **4a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル = 5:1）で精製し **2b** を白色固体として得た(0.133 g, 0.44 mmol, 60%)。

mp: 98-100 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.57 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.44 (1H, d, $J = 6.8$ Hz), 7.31 (1H, t, $J = 7.2$ Hz), 7.27-7.23 (1H, m), 6.78 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.61 (1H, d, $J = 2.8$ Hz), 6.52 (1H, dd, $J = 8.8, 2.8$ Hz), 4.26-4.21 (4H, m), 3.44 (2H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 155.2, 148.7, 143.8, 142.9, 137.8, 137.2, 133.1, 126.6, 126.3, 125.7, 119.5, 117.4, 111.3, 110.5, 106.0, 64.6, 64.2, 30.1; IR (KBr) 3384, 2361, 1618, 1508, 1304, 1241, 1206, 1068, 887, 846 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 306.1243, found: 306.1244; Anal. Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$: C: 70.81, H: 4.95, N: 13.76, O: 10.48, found, C: 70.52, H: 5.16, N: 13.51; HPLC purity: 99.3% (206 nm), retention time: 9.1 min, The eluents were mixture of EtOAc and Hexane (1:1).

細胞の継代

In vivo 実験にはヒト子宮頸癌細胞(HeLa 細胞)を使用した。この細胞は Biomedical Research の Cell Resource Center から手に入れた。HeLa 細胞は 10% FBS (HyClone) 、100 Units/ml のペニシリンと 100 µg/ml のストレプトマイシン (Invitrogen, Carlsbad, CA) を含んだ RPMI - 1640 メディウム (Wako) の中で、5% CO₂ 濃度条件下、37°C で培養した。

ルシフェラーゼアッセイ

96 穴マルチウェルプレートを用いて、HRE-ルシフェラーゼを安定発現させた HeLa 細胞を化合物存在下で 16 時間培養 (1% O₂, 94% N₂, 5% CO₂) した後、培養上清を取り除いた。その後、Luciferase Assay System™ (Promega) を用いて付属のプロトコールに従いルシフェラーゼアッセイを行った。

MTT アッセイ

96 穴マルチウェルプレートにて HeLa 細胞を 5×10^3 cells/100 µl の密度で 6 時間培養した後、RPMI-1640 メディウムで化合物を 60-0.2 µM の濃度に希釈し、100 µl を細胞に加え、72 時間、37 °C で培養した。その後、PBS に溶かした MTT (sigma) 試薬溶液 (5 mg/ml) を加え、2 時間培養した。2 時間後上清を取り除き DMSO を 100 µl 加えて、プレートリーダーによって 595 nm の吸光度を測定した。

ウエスタンブロット

12 穴マルチプレートに 2.5×10^5 cells/1 ml の濃度で HeLa 細胞を播種し、化合物を加えたのちに Normoxia で 1 時間培養後し、Hypoxia で 4 時間培養した。メディウムを取り除き、lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 5 mM sodium fluoride, 2.5 mM *p*-nitrophenylene phosphate, 10 µg/ml phenylmethylsulfonylfluoride, 1 mM

sodium vanadate, and 10 µg/ml leupeptin)を 80 µl 加えて細胞を溶解し、sample buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 20% SDS, 50% glycerol, 20% 2-thioethanol, 50 µg/ml bromophenol blue)を 20µl 加えて、超音波、熱変性処理を行った。細胞ライセートを 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってタンパク質を分離し、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレンに転写した。メンブレンを抗 HIF-1α 抗体 (BD Transduction Laboratories, Lexington, KY)、抗チューブリン抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) で処理し、さらに HRP 結合 2 次抗体で処理した。メンブレンを ECL kit (GE healthcare Buckinghamshire, UK) で処理し、タンパク質を Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Bio-Rad, Hercules, CA) で可視化した。

逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR : Reverse transcription polymerase chain reaction)

12 穴マルチプレートに 2.5×10^5 cells/1 ml の濃度で HeLa 細胞を播種し、化合物を加えたのちに Normoxia で 1 時間培養後し、Hypoxia で 4 時間培養した。メディウムを取り除き、ISOGEN II (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan)を用いて付属のプロトールに従い全 RNA を抽出した。抽出した RNA (1 µg)、5 µM random hexamer oligonucleotides (Promega, Madison, WI)、2.5 mM dNTP (Bioline, London, UK)を加えて 40 °C で 50 分間逆転写反応させた。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に用いたプライマー は HIF-1α が 5'-CTC AAA GTC GGA CAG CCT CA-3' (sense) と 5'-CCC TGC AGT AGG TTT CTG CT-3' (antisense)、VEGF が 5'-GCT CTA CCT CCA CCA TGC CAA-3' (sense) と 5'-TGG AAG ATG TCC ACC AGG GTC-3' (antisense)、GAPDH が 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3' (sense) と 5'-TCC CCA CCC TGT TGC TGT A -3' (antisense)を使用した。10 µl の template DNA、40 µl の PCR buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, and 1.5 mM MgCl₂)、それぞれのプライマー (0.2 µM)、dNTP (0.2 mM)、BIOTAQ™ DNA ポリメラーゼ (1.25 units) (Bioline)を用いて PCR を行った。PCR の条件は最初に 94 °C で 5 min 変性させた。その後に変性を 94 °C で 0.5 分、アニーリングを 58 °C で 0.5 分、増幅反応を 72 °C で 1 分のサイクルを繰り返し、最後に増幅反応を 72 °C で 7 分間反応させた。

反応には PCR thermal cycler (Astec, Fukuoka, Japan)を使用した。PCR ごとに 10 μ l の反応混合物を 2%アガロースゲルを用いた電気泳動で分離し、ethidium bromide による染色を行い、HIF-1 α 、VEGF、GAPDH の mRNA の発現量を Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Bio-Rad, Hercules, CA)で可視化した

免疫染色

カバーガラス上に 1x10⁴ cells/100 μ l の濃度で HeLa 細胞を撒き、35 mm ディッシュに入れ 2 時間培養した後、メディウムを 1 ml 加えて 12 時間培養した。化合物を加えて 8 時間処理し、メディウムを取り除き 4%パラホルムアルデヒド溶液で 15 分間処理して細胞を固定化した。その後 0.4% Triton X で 5 分間、イムノブロック (DS ファーマバイオメディカル株式会社) で 5 分間処理した。抗チューブリン抗体を加えて 12 時間、FITC 結合 2 次抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) で 4 時間、DAPI (和光純薬) で 5 分間処理した。ProLong[®]Gold antifade reagent (Invitrogen) で封入し、蛍光顕微鏡で観察した。

免疫沈降

Hypoxia で 4 時間化合物処理した細胞を lysis buffer (10 mM HEPES-KOH, pH = 7.4, 142.5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.5% NP-40, 5 mM sodium fluoride, 2.5 mM *p*-nitrophenylene phosphate, 10 μ g/ml phenylmethylsulfonylfluoride, 1 mM sodium, and 10 μ g/ml leupeptin)を用いて溶解させた。得られた細胞溶解液を 4 $^{\circ}$ C、13200 rpm の条件で 20 分遠心した。遠心後に上清を回収し、Protein A/G plus-Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)を加えて 4 $^{\circ}$ C、1 時間反応させ、4 $^{\circ}$ C、13200 rpm の条件で 20 分遠心した。上清を回収後、抗 HIF-1 α 抗体(2 μ g)と Protein A/G plus-Agarose (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)を加えて 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。4 $^{\circ}$ C、13200 rpm の条件で 10 分遠心し、得られたペレットを PBS で 5 回洗浄し、HIF-1 α 、HIF-1 β 、tubulin の量をウェスタンブロットによって解析した。

2-6 参考文献

- (1) Ban, H. S.; Uno, M.; Nakamura, H. Suppression of hypoxia-induced HIF-1 α accumulation by VEGFR inhibitors: Different profiles of AAL993 versus SU5416 and KRN633. *Cancer Lett.* **2010**, 296, 17–26.
- (2) Usui, T.; Ban, H. S.; Kawada, J.; Hirokawa, T.; Nakamura, H. Discovery of indenopyrazoles as EGFR and VEGFR-2 tyrosine kinase inhibitors by in silico high-throughput screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 285–288
- (3) Nugiel, D. A.; Vidwans, A.; Etzkorn, A.-M.; Rossi, K. A.; Benfield, P. A.; Burton, C. R.; Cox, S.; Doleniak, D.; Seitz, S. P. Synthesis and Evaluation of Indenopyrazoles as Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors. 2. Probing the Indeno Ring Substituent Pattern. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 5224–5232
- (4) Ho, C. Y.; Ludovici, D. W.; Maharroof, U. S. M.; Mei, J.; Sechler, J. L.; Tuman, R. W.; Strobel, E. D.; Andraka, L.; Yen, H.-K.; Leo, G.; Li, J.; Almond, H.; Lu, H.; DeVine, A.; Tominovich, R. M.; Baker, J.; Emanuel, S.; Gruninger, R. H.; Middleton, S. A.; Johnson, D. L.; Glemmo, R. A. (6,7-Dimethoxy-2,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-yl)phenylamines: Platelet-Derived Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors with Broad Antiproliferative Activity against Tumor Cells. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 8163–8173.
- (5) Demchenko, A. M.; Yanchenko, V. A.; Kisly, V. V.; Lozinskii, M. S. Use of Tetramethylthiuram Disulfide in Synthesis of Nitrogen-containing Heterocyclic Compounds. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2005**, 41, 668–672

第3章 インデノピラゾール化合物による細胞増殖抑制作用に関する構造活性相関研究および作用機序の解析

3-1 序論

第2章においてインデノピラゾール骨格を有する HIF-1 α 阻害剤の開発を行うために様々な誘導体を合成し、HIF-1 α 転写阻害活性に対する構造活性相関研究をおこなった。その結果、既存の HIF-1 α 阻害剤である YC-1 よりも約 100 倍活性の強い GN44028 の開発に成功した。この研究の中で、インデノピラゾール誘導体による細胞増殖抑制作用を解析した結果、GN39130 が非常に強い細胞増殖抑制作用を示すことが明らかとなった。生物活性を示すインデノピラゾール化合物としては Chk (checkpoint kinase) 1 阻害剤^{1,2}、CDK (cyclin-dependent kinase) 阻害剤^{3,4}、PDGFR (platelet-derived growth factor receptor) チロシンキナーゼ阻害剤⁵、EGFR (epidermal growth factor receptor) と VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor)-2 チロシンキナーゼの阻害剤⁶ などが報告されているのみである。

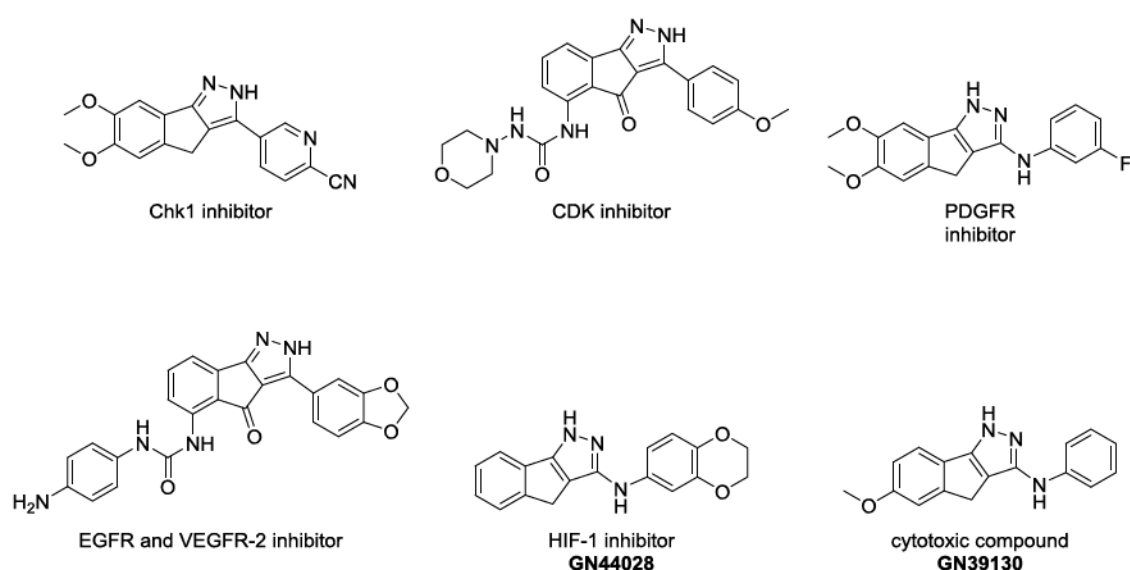


Figure 3-1. インデノピラゾール骨格を有する生物活性物質

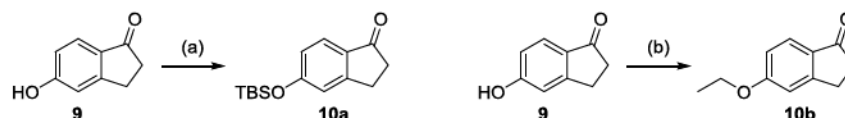
GN39130 は HIF-1 α 阻害活性を示さなかったことから、この細胞増殖抑制作用は HIF-1 α に関連した作用とは関係の無いものであるといえる。GN44028 や GN39130 のように同一の基本骨格に対して置換基の種類や導入する位置を変えることで全く異なる生物活性を発現できることから、インデノピラゾール骨格は生物活性物質を開発する際の主骨格として有用であると考えられる。これまでの研究からインデノピラゾール化合物 GN39130 は 4 種類のがん細胞に対して細胞増殖抑制作用を示し、どの種類の細胞においても同等の活性を有していることが明らかとなった。

以上の事から、インデノピラゾール化合物が生物活性に及ぼす作用についての新たな知見を得ることに加え、GN39130 をリード化合物として更なる細胞増殖抑制活性の向上と活性を示す構造を特定するための構造活性相関研究を行い、その作用機序の詳細を解析することを目的として研究を行うこととした。

3-2 インデノピラゾール誘導体の合成

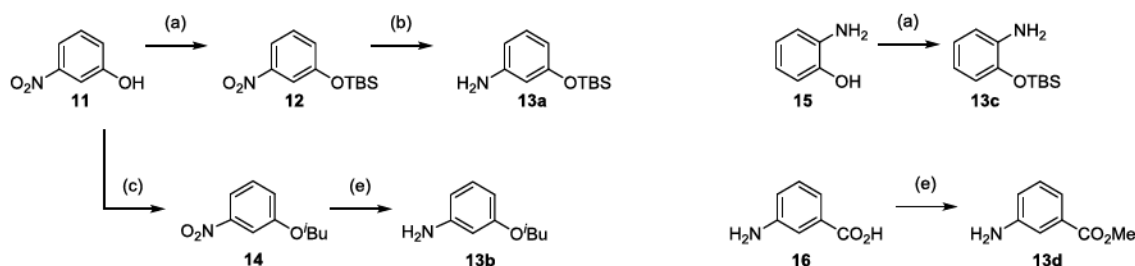
Scheme 3-1 に示すように、化合物 **9** を出発物質として、そのヒドロキシ基を TBS 保護し化合物 **10a** とし、エトキシ化することで化合物 **10b** とした。アニリン誘導体の合成を Scheme 3-2 に示した。メタニトロフェノールのヒドロキシ基を TBS 保護した後にニトロ基を還元しアニリン誘導体 **13a** とした。また、ヒドロキシ基をイソブトキシ化した後に還元してアニリン誘導体 **13b** とした。化合物 **15** のヒドロキシ基を TBS 保護して化合物 **13c** とした。化合物 **16** に対して Fischer エステル化を用いてメチルエステル化合物 **13d** とした。Scheme 3-3 にフェニルイソチオシアナート誘導体の合成を示した。合成したアニリン誘導体に対してクロロチオノギ酸フェニルと反応させ、チオカルバマートとした後、ETA とトリクロロシランを作用させることでフェニルイソチオシアナート化合物 **17a-e** を合成した。

Scheme 3-1. インダノン誘導体の合成



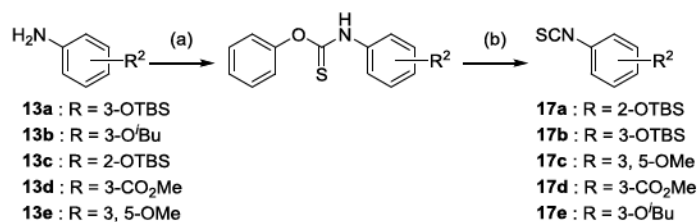
Reagents and conditions: (a) TBSCl, Imidazol, DMF, 95%. (b) EtI, K₂CO₃, DMF, 97%

Scheme 3-2. アニリン誘導体の合成



Reagents and conditions: (a) TBSCl, Imidazole, DMF, 93-99%. (b) H₂NNH₂·H₂O, FeCl₃, charcoal, EtOH, 84%. (c) *i*-BuBr, K₂CO₃, DMF, 80 °C, 99%. (d) H₂, Pd/C, MeOH, 77%. (e) Conc H₂SO₄, MeOH, quant.

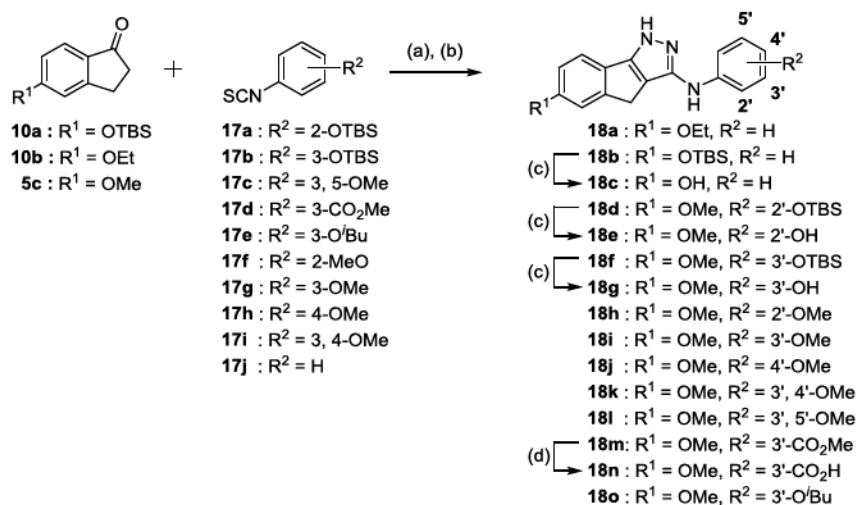
Scheme 3-3. フェニルイソチオシアナート誘導体の合成



Reagents and conditions: (a) Phenyl Chlorothionoformate, THF. (b) TEA, Cl₃SiH, toluene

Scheme 3-4 に化合物 **18a-o** の合成を示す。Scheme 3-1 で合成したインダノン誘導体 **10a**、**10b** に対し、フェニルイソチオシアナート **17j** を反応させることでインデノピラゾール化合物 **18a** と **18b** を合成した。インダノン誘導体 **5c** とフェニルイソチオシアナート誘導体 **17a-i** とを反応させることで R² に置換基を導入したインデノピラゾール化合物 **18d**, **18f**, **18h-m**, **18o** を合成した。合成したインデノピラゾール化合物 **18b**, **18d**, **18f** の TBS 保護を TBAF によって脱保護し、ヒドロキシ基を有するインデノピラゾール化合物 **18c**, **18e**, **18g** を合成した。メチルエステル基を有する **18m** は水酸化リチウムを用いた加水分解を行い、カルボン酸化合物 **18n** とした。

Scheme 3-4. インデノピラゾール誘導体の合成



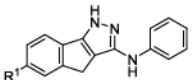
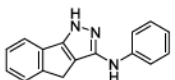
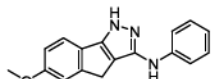
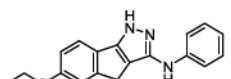
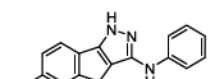
Reagents and conditions: (a) LiHMDS, THF, 12 h. (b) H₂NNH₂·H₂O, AcOH, reflux, 24 h, 37-60%. (c) TBAF, THF, 47%-quant. (d) LiOH·H₂O, THF, H₂O, 76%

3-3 インデノピラゾール化合物による細胞増殖抑制作用の解析

合成したインデノピラゾール化合物による細胞増殖抑制作用は HeLa、PC3、HCT116 細胞を用いた MTT assay によって測定した。

Table 3-1 にインダノンから誘導される R¹ への置換基を導入した場合の化合物による MTT assay の結果を示した。置換基を導入していない化合物 **4a** では全く活性を示さなかったが、メトキシ基を導入した化合物では IC₅₀ が数十 nM の濃度範囲で活性を示すことがわかった。しかし、メトキシ基をエトキシ基に変換した場合、どの細胞においても活性の低下が見られ、ヒドロキシ基に変換した場合は活性を全く示さなくなった。この結果から、インデノピラゾール化合物が細胞増殖抑制作用を示すにはインダノンから誘導される 6 位にメトキシ基が導入されていることが必須であることが明らかとなった。

Table 3-1 インデノピラゾール誘導体の R¹ への置換基導入による細胞増殖への影響

<div style="text-align: center;">  R¹ </div>	compd	IC ₅₀ (nM) 72h		
		HeLa	PC3	HCT116
	4a	>100	>100	>100
	4c	8.9 ± 0.37	35.6 ± 4.8	26.6 ± 1.4
	18a	20.4 ± 1.19	60.2 ± 12.7	56.8 ± 5.2
	18c	>100	>100	>100

3 種類の細胞株に対して様々な濃度のインデノピラゾール誘導体を 72 時間暴露した後に MTT assay を用いて細胞増殖抑制作用を測定した。

6 位にメトキシ基が導入されていることが必須であることが明らかになったため、6 位にメトキシ基を有しているインデノピラゾール化合物に対してアニリン部位である R² へ置換基導入を行った際の活性への影響を解析した (Table 3-2)。

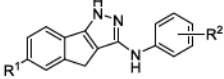
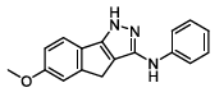
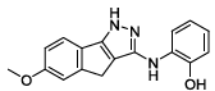
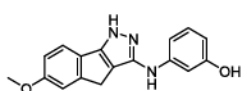
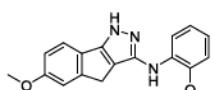
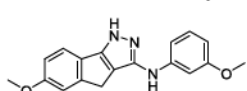
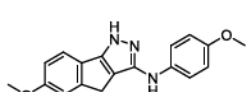
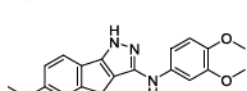
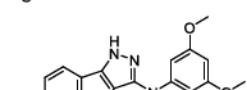
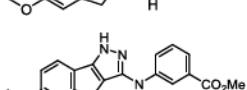
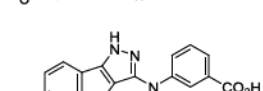
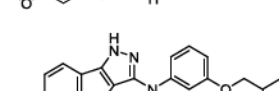
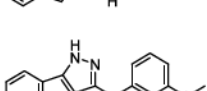
一置換体である化合物 **18e**, **18g**, **18h-j** を比較すると 2' 位や 4' 位に置換基を導入するとヒドロキシ基やメトキシ基の種類に関わらず活性の著しい低下が確認された。しかし 3' 位に置換基を導入すると活性の向上が確認された。

3' 位の置換基を有する二置換化合物 **18k** と **18l** の結果を比較すると、4' 位に置換基を導入した **18k** では活性の著しい低下が確認された。一方で 5' 位に置換基を導入した **18l** は一置換体と同等の活性を示した。

一置換化合物のデータからも、3' 位以外に置換基を導入することは活性の低下に関わるということがわかった。このことから、インデノピラゾール化合物が細胞増殖抑制作用を示すには 6 位のメトキシ基だけでなく、アニリン部の 3' 位に置換基を有することも重要であることが明らかとなった。

3' 位が重要であることが明らかになったため、3' 位にメトキシ基以外の置換基を導入した場合の構造活性相関を行った。化合物 **18m-o** を比較すると、メチルエステル基を導入した場合に最も強い活性を示すことが明らかとなった。しかし、カルボン酸誘導体では全く活性を示さなかった。また、メトキシ基よりも嵩高いイソブトキシ基を導入すると活性の低下が見られた。このことから 3' 位の置換基はメチルエステル基が最適であり、極性の高い置換基やイソブトキシ基以上の嵩高い置換基の導入は活性の低下につながるということが明らかになった。

Table 3-2 インデノピラゾール誘導体の R² への置換基導入による細胞増殖への影響

compd		IC ₅₀ (nM) 72h		
		HeLa	PC3	HCT116
	4c	8.9 ± 0.37	35.6 ± 4.8	26.6 ± 1.4
	18e	>100	>100	>100
	18g	7.1 ± 0.15	8.6 ± 1.2	10.9 ± 0.9
	18h	32.0 ± 1.21	>100	86.2 ± 10.4
	18i	2.8 ± 0.16	4.7 ± 0.5	6.53 ± 0.96
	18j	>100	>100	>100
	18k	>100	90.9 ± 3.8	86.3 ± 5.4
	18l	3.20 ± 0.05	7.0 ± 1.1	7.4 ± 0.6
	18m (GN39482)	2.47 ± 0.07	2.64 ± 0.07	2.7 ± 0.2
	18n	>100	>100	>100
	18o	19.95 ± 1.01	50.5 ± 7.4	56.6 ± 1.6
	4i	>100	>100	>100

3 種類の細胞株に対して様々な濃度のインデノピラゾール誘導体を 72 時間暴露した後に MTT assay を用いて細胞増殖抑制作用を測定した。

3-4 インデノピラゾール化合物 **18m** の作用機序解明

3-4-1 化合物 **18m** の標的タンパク質の推定

これまでの構造活性相関研究の結果からメチルエステル基を有する **18m** が最も強い活性を示すことが明らかとなった。そのため、**18m** による細胞増殖抑制作用の作用機序解明を目的として Morphobase profiling⁷ と ChemProteoBase profiling^{8,9} を行った。

Morphobase profiling を行った結果、**Figure 3-2** に示すように **18m** は微小管作用薬の近傍に分布した。化合物の類似性検索を行ったところ、各種微小管作用薬が最近接化合物の上位に多数ランキングされた。このことから **18m** は微小管に作用することが示唆された。

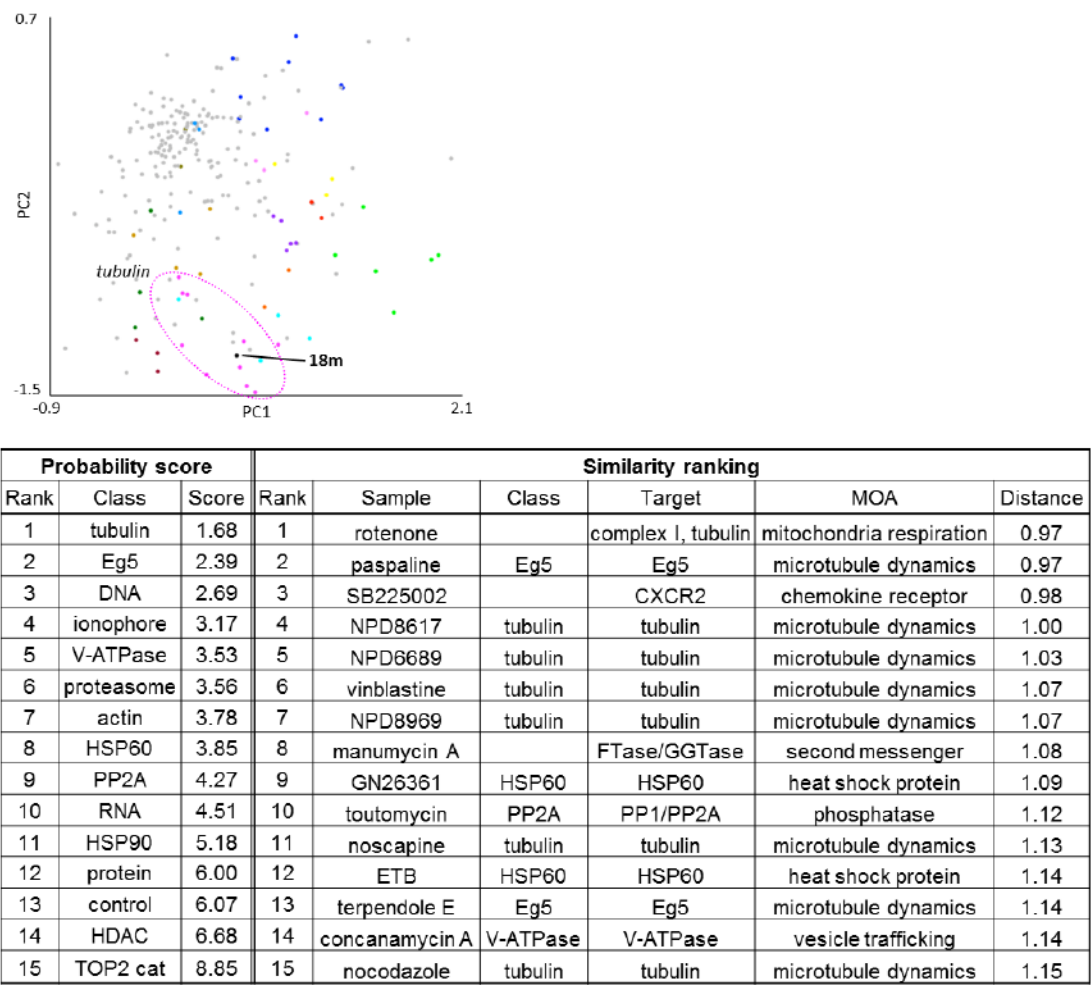


Figure 3-2. Morphobase profiling の結果

ChemProteoBase profiling を行った結果、データベースに含まれる 134 化合物との類似度解析によって **18m** は微小管作用薬と高い類似性を示した。また、41 標準化合物とクラスター解析を行ったところ、微小管作用薬を含むクラスターに分類された (**Figure 3-3**)。

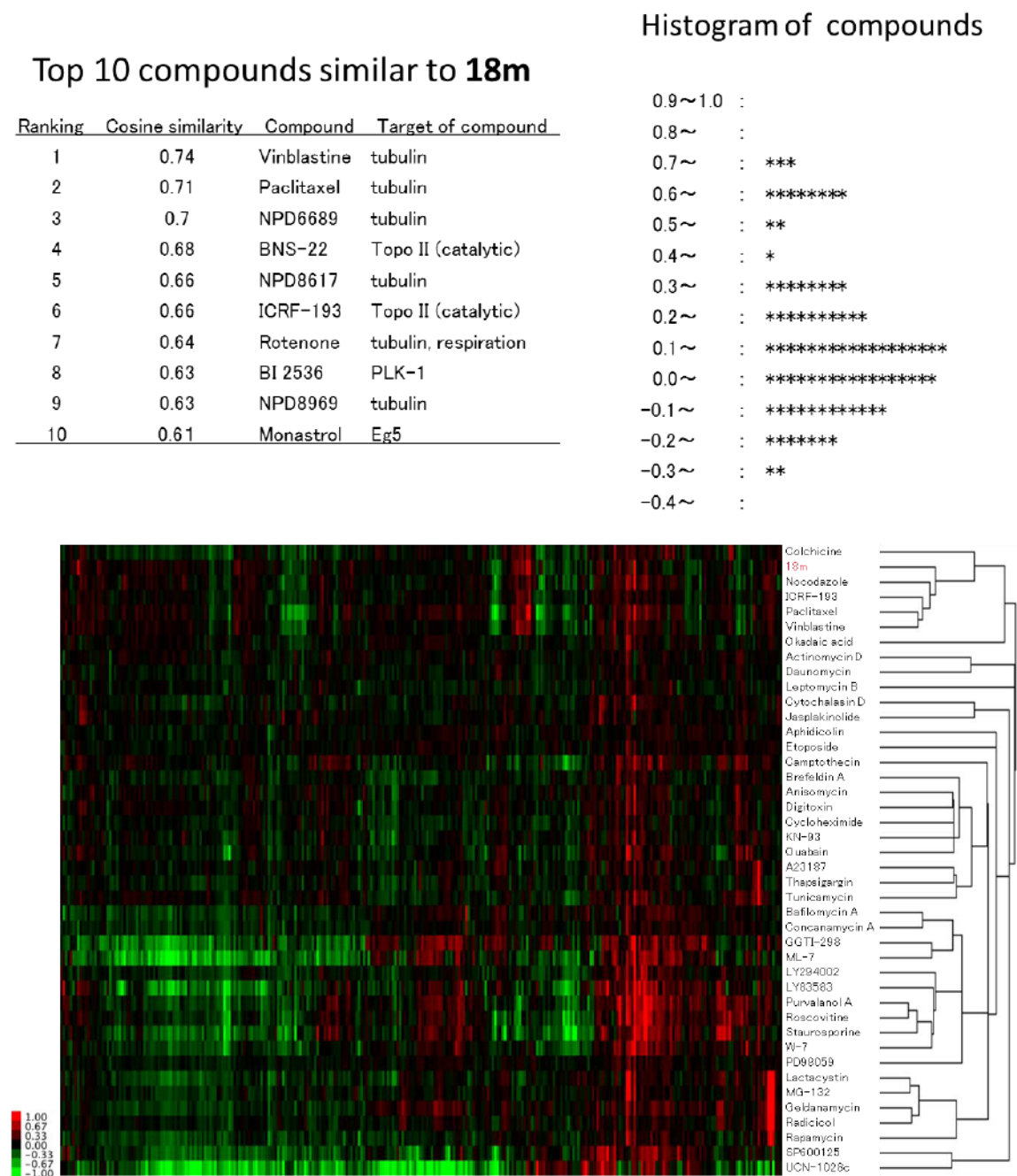


Figure 3-3. ChemProteoBase profiling の結果

3-4-2 化合物 **18m** による tubulin 重合と細胞周期への影響

Morphobase profiling と ChemProteoBase profiling によって化合物 **18m** の標的分子が tubulin と予測されたため、tubulin 重合への影響を解析した。

その結果、**18m** は *in vitro* において既知の tubulin 重合阻害剤である VBL (vinblastine) や PTX (paclitaxel) と同様に tubulin 重合を濃度依存的に阻害した。また、微小管作用薬は細胞周期を G2/M 期で停止させることが良く知られているため、**18m** による細胞周期への影響を解析した。その結果、**18m** は薬剤添加後 24 時間で顕著な G2/M 期停止を誘導した (Figure 3-4)。

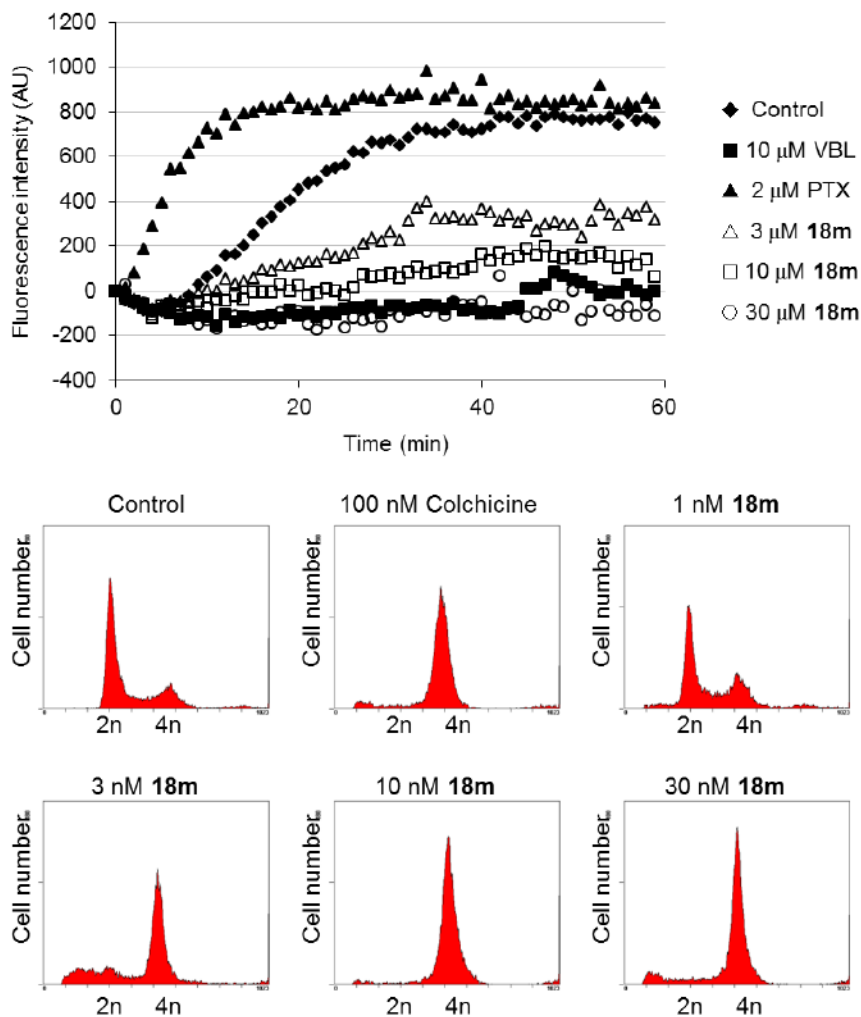


Figure 3-4. 化合物 **18m** による tubulin 重合および細胞周期への影響

3-4-3 化合物 **18m** による Ac-tubulin 蓄積と微小管形成への影響

in vitro での実験において化合物 **18m** による tubulin 重合阻害が確認されたため、生細胞の tubulin 重合および微小管の形態への影響を解析した。アセチル化された tubulin (Ac-tubulin) は重合して安定化された微小管に見出されることが知られている^{10,11}。そのため、Ac-tubulin の蓄積をウェスタンブロットによって解析した。既知の tubulin 重合阻害剤である colchicine で細胞を処理すると濃度依存的に Ac-tubulin の蓄積が阻害され 30 nM の濃度から阻害が観察された。**18m** で処理した際も同様に Ac-tubulin の蓄積が 30 nM から濃度依存的に阻害された。**18m** よりも活性の低かった **18o** の Ac-tubulin 蓄積への影響を解析すると 300 nM で蓄積を阻害した。一方で **18m** と同等の細胞増殖抑制活性を示した **4c** による Ac-tubulin の蓄積への影響を解析すると 1000 nM の濃度で弱い阻害が見られた。また、活性を示さない **4i** は Ac-tubulin の蓄積には影響しなかった (Figure 3-5)。

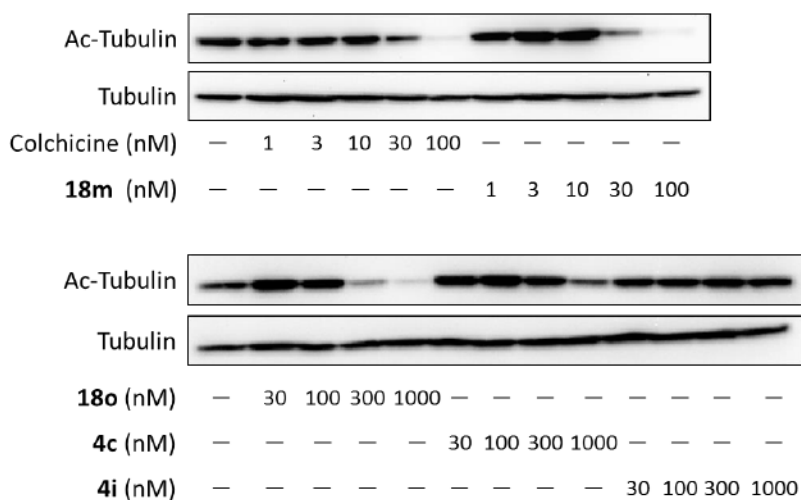


Figure 3-5. インデノピラゾール化合物による Ac-tubulin の蓄積に対する影響

インデノピラゾール化合物を図示した濃度で HeLa 細胞に暴露し、6 時間培養した。Ac-tubulin の蓄積量は抗 Ac-tubulin 抗体を用いたウェスタンブロットによって解析した。colchicine は tubulin 重合を阻害するコントロール薬剤として用いた。

次に細胞中の微小管形成への影響を免疫染色法によって解析した。colchicine は 100 nM の濃度で微小管形成を阻害することが観察され、tubulin 脱重合阻害剤である Taxol で処理すると、重合した tubulin が安定化されるため微小管の形成が確認された。

そこで、**Figure 3-5** の結果から、化合物 **18m** は 30 nM、化合物 **18o** は 300 nM、化合物 **4c** は 1000 nM の濃度で Ac-tubulin の蓄積に対して阻害を示したことから、これらの濃度で処理した際の微小管形成への影響を解析した。化合物 **18m** で処理した場合、colchicine と同様に微小管の形成を阻害した。**18m** よりも活性の低かった **18o** も 300 nM の濃度で微小管の形成を阻害することが明らかとなった。一方で細胞増殖抑制活性の高い **4c** による微小管形成への影響を解析すると 1000 nM の濃度でも微小管の形成が確認された。この結果から化合物 **18m** と **18o** は微小管形成を阻害するため Ac-tubulin の蓄積が阻害され、化合物 **4c** は微小管形成に対してはあまり影響しないため Ac-tubulin の蓄積が阻害されなかったと考えられる。

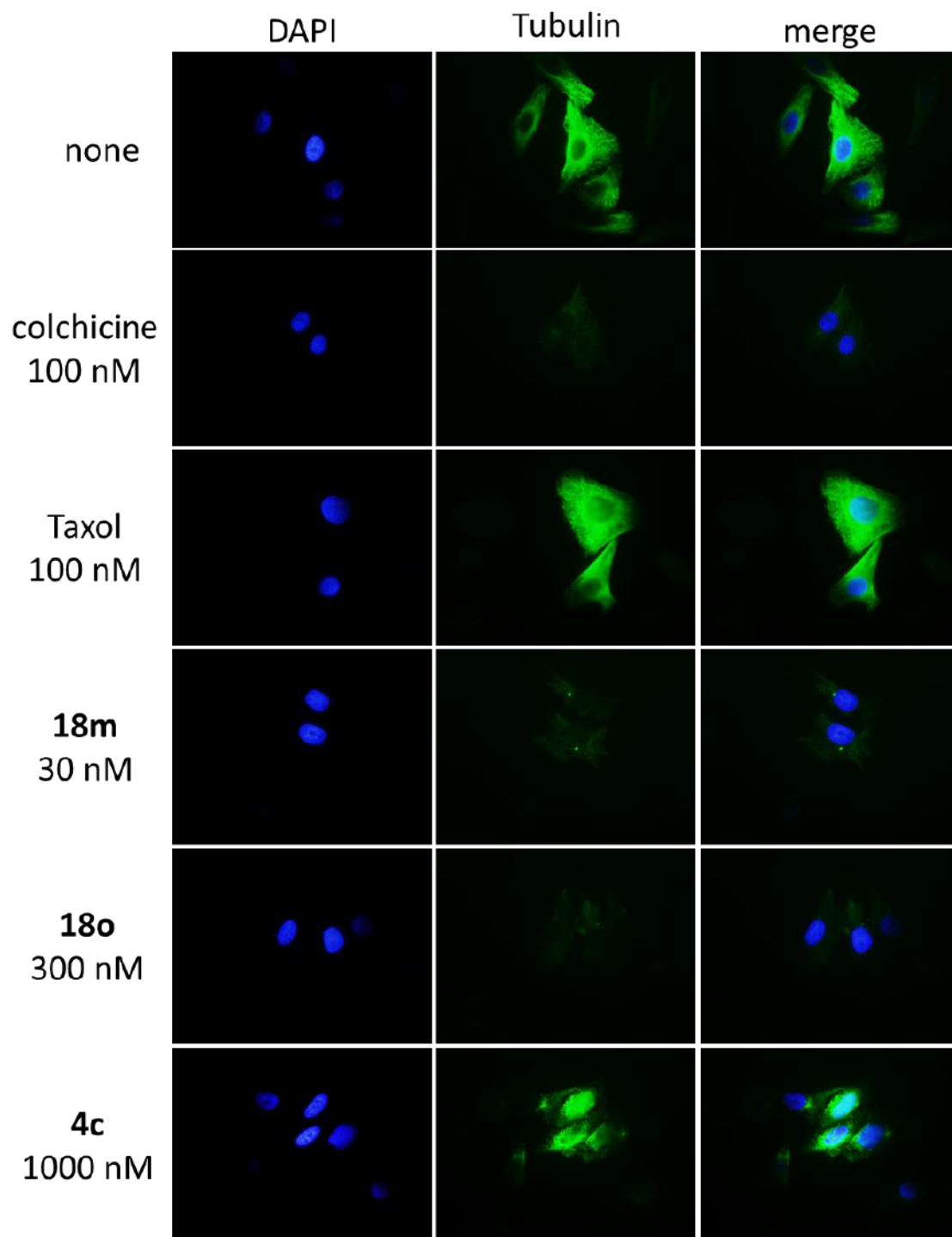


Figure 3-6. インデノピラゾール化合物による Ac-tubulin の蓄積に対する影響

微小管の形成を抗 tubulin 抗体を用いた免疫染色によって解析した。細胞核は DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) によって染色した。染色後、蛍光顕微鏡を用いてそれぞれの蛍光の局在を観測した。

3-5 結論と考察

第2章で述べたように、インデノピラゾール骨格を有する HIF-1 α 阻害剤の開発のために構造活性相関研究をおこなった際に、細胞増殖抑制作用を解析したところ GN39130 が非常に強い細胞増殖抑制作用を示すことが明らかとなった。また、インデノピラゾールを基本骨格とした生物活性物質の報告は多くない。そのためインデノピラゾール化合物が生物活性に及ぼす作用についての新たな知見を得ることに加え、GN39130 の作用機序の詳細を解析することを目的とした研究を行った。

細胞増殖抑制活性の向上とその活性を示す構造の特定を目的とした構造活性相関研究の結果より、インデノピラゾール化合物が細胞増殖抑制作用を示すにはインダノンから誘導される6位のメトキシ基が必須であり、アニリンから誘導される3'位に置換基を有することも重要であることが明らかとなった。特に3'位にメチルエステル基を有する化合物 **18m** が最も強い活性を示した。

そこで、化合物 **18m** の作用機序解明のため Morphobase profiling と ChemProteoBase profiling による解析を行った結果、微小管に作用することが示唆された。そのため、tubulin 重合への影響を解析すると化合物 **18m** は tubulin 重合阻害活性を示した。さらに colchicine と同様に細胞周期を G2/M 期で停止させた。

このように、tubulin が標的タンパク質であることが示唆されたため細胞中の Ac-tubulin の蓄積をウェスタンブロットによって測定した。その結果、化合物 **18m** は 30 nM の濃度で濃度依存的に Ac-tubulin の蓄積を阻害した。また、**18m** よりも細胞増殖抑制活性の低下した **18o** による Ac-tubulin の蓄積への影響を解析すると 300 nM の濃度でその蓄積を阻害した。

一方で、**18m** と同等の細胞増殖抑制活性を示した **4c** による Ac-tubulin の蓄積への影響を解析すると 1000 nM の濃度で若干の阻害が確認できる程度であった。

また、細胞増殖抑制作用を示さなかった化合物 **4i** は Ac-tubulin の蓄積に対して影響を及ぼ

さなかった。

最後に微小管形成への影響について免疫染色法を用いて解析した。colchicine は 100 nM の濃度で微小管の形成を阻害し、化合物 **18m** は 30 nM の濃度で微小管の形成を阻害した。また、化合物 **18o** は 300 nM の濃度で微小管の形成を阻害した。しかし、化合物 **4c** は 1000 nM の濃度でも微小管の形成が確認された。既知の tubulin 重合阻害剤である colchicine による Ac-tubulin の蓄積と微小管形成への影響を解析した結果から、これらの 2 つの結果の間には良い一致が見られた。このことから Ac-tubulin の蓄積に対する阻害は微小管形成の阻害、つまり tubulin 重合の阻害を反映しているといえる。

このことを踏まえてインデノピラゾール化合物による Ac-tubulin の蓄積と微小管形成への影響を解析した結果を考察する。化合物 **18m** よりも化合物 **18o** の細胞増殖抑制活性は約 10 倍活性が低く、Ac-tubulin の蓄積も 10 倍程度高濃度で阻害している。さらに Ac-tubulin の蓄積を阻害した濃度で微小管形成を阻害することも確認された。これら結果から、2 つの化合物の活性の間には相関があり、化合物 **18o** の細胞増殖抑制作用の低下は tubulin 重合阻害活性が低下したことによるものであると考えられる。

化合物 **4c** に関しては、その細胞増殖抑制活性は化合物 **18m** と比較して約 4 倍低いがアセチルチューブリンの蓄積の阻害に対しては 30 倍以上の活性の低下がみられ、微小管形成への影響に関しても同様の結果が得られた。また、化合物 **4c** と **18o** を比較すると細胞増殖抑制活性は化合物 **4c** の方が高いが Ac-tubulin の蓄積阻害は化合物 **18o** の方が高い。このことから化合物 **18o** の場合とは異なり化合物 **4c** の細胞増殖抑制作用と tubulin 重合阻害活性との間の関連は低いと考えられる。つまり、化合物 **4c** による細胞増殖抑制作用は化合物 **18m** とは異なる作用機序である可能性が示唆された。

6 位にメトキシ基を有している化合物 **4c** と 3' 位に置換基を有している化合物 **4i** はともに Ac-tubulin の蓄積に対してあまり影響がなかった。しかし、6 位と 3' 位の両方に置換基を有している化合物は Ac-tubulin の蓄積を阻害することが明らかとなった。この結果より、イン

デノピラゾール骨格の6位にメトキシ基を有しており、さらに3'位に置換基を導入している化合物のみ tubulin 重合阻害活性を示すことが明らかとなった。また、3'位にイソブトキシ基を導入した場合に活性が約 10 倍低下したため、tubulin 重合阻害活性を示すには置換基の立体的な大きさにも制限がある。

これらの結果から、化合物 **18m** (GN39482) は tubulin の重合を阻害することで強力な細胞増殖抑制作用を示していることが明らかとなった。また、化合物 **4c** (GN39130) は化合物 **18m** とは異なる作用機序で細胞増殖抑制作用を示していることが示唆された。

以上の事からインデノピラゾール骨格は置換基の種類と導入する位置を変換することで様々な生物活性を誘導することのできる非常に有用な骨格であり、更なる構造活性相関研究によって、本研究で示した結果以外に新たな生物活性を示す可能性が十分にあると考えられる (Figure 3-7)。

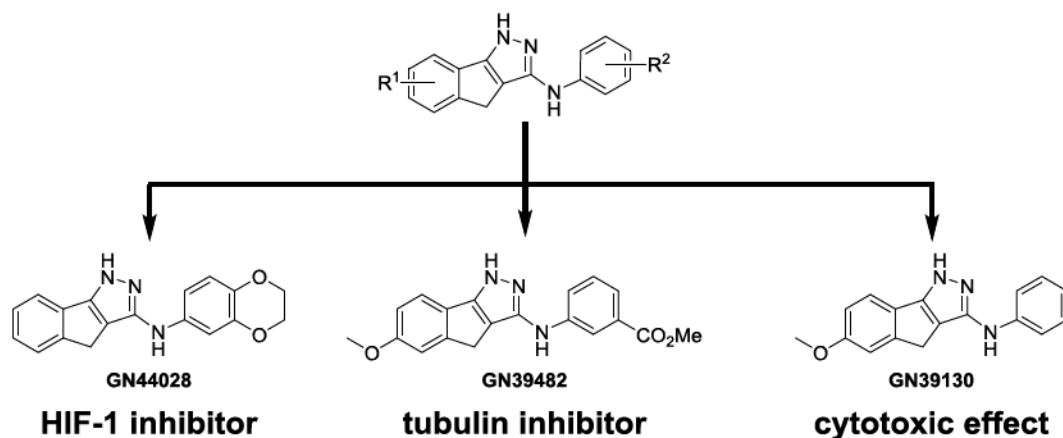


Figure 3-7. インデノピラゾール化合物により誘導される生物活性の違い

3-6 実験の部

溶媒 脱水溶媒は下記の溶媒以外は当研究室にて蒸留したものを用いた。

THF 和光純薬株式会社 DMF 和光純薬株式会社

試薬 特に記載のない限り、市販のものを用いた。

実験器具 すべての反応器具は 120 °C で 2 時間加熱し完全に乾燥したものを用いた。

各種測定には次の機器を用いた。

¹H NMR, ¹³C NMR Bruker biospin AVANCE II (400 MHz)

VARIAN UNITY-INOVA 400 (400 MHz)

¹H NMR、¹³C NMR 測定には溶媒として重クロロホルム、重メタノール、重 DMSO を用いた。重クロロホルムの内部標準はテトラメチルシラン(0 ppm)を用いた。

IR JASCO FT/IR-4100

MASS Shimadzu LCMS-2010EV

Bruker Daltonics micro TOF-15 focus

HPLC 島津高速液体クロマトグラフ(RID-10A, SPD-10A VP, SCL-10A VP,
LC-10AT VP, FCV-10AL VP, DGU-20A3)

使用カラム Hiber LiChrosorb Si60 5 μm (Cica-MERCK)

元素分析 CE instrument EA1110 CHNS-O automatic elemental analyzer.

5-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one (10a)

5-hydroxy-2,3-dihydro-1H-inden-1-one (0.148 g, 1 mmol) と imidazole (0.272 g, 4 mmol) と TBSCl (0.301 g, 2 mmol) を DMF (5 ml) に溶かし、室温で一晩撹拌した。反応溶液に水を加え、酢酸エチルで抽出を行い、有機層を水と飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、有機溶媒を除去した。得られた残留物をカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル = 20:1）で精製し、5-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one (10a) を白色固体で得た (0.249 g, 0.95 mmol, 95%)。

mp: 66-67 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.65 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.85 (1H, s), 6.82 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 3.06 (2H, t, $J = 5.6$ Hz), 2.66 (2H, t, $J = 5.6$ Hz), 0.99 (9H, s), 0.24 (6H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 205.2, 161.8, 157.8, 130.9, 125.2, 120.2, 116.9, 36.4, 25.6, 25.5, 18.2, -4.4; IR (NaCl) 2955, 2930, 2886, 2859, 2360, 1711, 1603, 1485, 1472, 1442, 1301, 1267, 1140, 1091, 1031, 951, 842, 809, 782, 693 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 263.1462, found: 263.1465.

5-Ethoxy-2,3-dihydro-1H-inden-1-one (10b)

窒素ガス雰囲気化、5-hydroxy-2,3-dihydro-1H-inden-1-one (0.09 g, 0.6 mmol) と EtI (0.074 ml, 0.72 mmol) を DMF (5 ml) に溶かし、 K_2CO_3 (0.124 g, 0.9 mmol) を加えて室温で4時間反応させた。反応溶液に水を加え、酢酸エチルで抽出を行い、有機層を水と飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、有機溶媒を除去した。得られた残留物をカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル = 10:1）で精製し5-ethoxy-2,3-dihydro-1H-inden-1-one (10b) を白色固体で得た (0.103 g, 0.58 mmol, 97%)。

mp: 83-84 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.68 (1H, d, $J = 9.2$ Hz), 6.90-6.88 (2H, m), 4.11 (2H,

q, $J = 7.2$ Hz), 3.08 (2H, t, $J = 5.6$ Hz), 2.67 (2H, t, $J = 5.6$ Hz), 1.45 (3H, t, $J = 7.2$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 205.1, 164.6, 158.1, 130.1, 125.1, 115.6, 110.1, 63.9, 36.3, 25.8, 14.6; IR (NaCl) 2983, 2940, 2359, 1700, 1605, 1488, 1473, 1435, 1401, 1308, 1272, 1255, 1146, 1111, 1092, 1025, 947, 870, 847, 824, 815, 754, 645 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 177.0910, found: 177.0912.

tert-Butyldimethyl(3-nitrophenoxy)silane (12)

3-nitrophenol (0.835 g, 6 mmol) と imidazole (1.63 g, 24 mmol) と TBSCl (1.8 g, 12 mmol) を DMF (15 ml) に溶かし、室温で一晩攪拌した。反応溶液に水を加え、酢酸エチルで抽出を行い、有機層を水と飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、有機溶媒を除去した。得られた残留物をカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル = 100:1）で精製し tert-butyldimethyl(3-nitrophenoxy)silane (**12**) を無色の油状物として得た (1.45 g, 5.7 mmol, 95%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.83 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.66 (1H, s), 7.83 (1H, dd, $J = 8.4, 8.0$ Hz), 7.16 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 1.00 (9H, s), 0.25 (6H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 156.4, 149.1, 129.9, 126.4, 116.3, 114.9, 25.5, 18.1, -4.6; IR (NaCl) 3735, 2956, 2931, 2859, 2360, 1615, 1578, 1531, 1481, 1350, 1306, 1282, 1253, 1083, 1002, 963, 884, 849, 782, 741, 675 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{Si}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 276.1026, found: 276.1030.

3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)aniline (13a)

tert-butyldimethyl(3-nitrophenoxy)silane (**12**) (1.45 g, 5.7 mmol)、hydrazine monohydrate (1.11 g, 22.8 mmol)、charcoal (0.72 g)、 FeCl_3 (0.092 g, 0.57 mmol) を EtOH (5 ml) に懸濁させ、80 $^\circ\text{C}$ で

3 時間反応させた。反応溶液をセライトろ過し、有機溶媒を除去した。得られた残留物をカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル = 10:1）で精製し 3-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)aniline (**13a**)を明褐色の油状物として得た(0.929 g, 4.2 mmol, 74%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 6.99 (1H, dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz), 6.30 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.26 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.19 (1H, s), 3.59 (2H, bs), 0.96 (6H, s), 0.19 (6H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 156.7, 147.7, 129.9, 110.4, 108.5, 107.1, 25.7, 18.2, -4.4; IR (NaCl) 3735, 3376, 2956, 2930, 2858, 2360, 1599, 1493, 1472, 1313, 1285, 1256, 1194, 1155, 981, 847, 781, 688 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NOSi}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 224.1465, found: 224.1470.

1-Isobutoxy-3-nitrobenzene (**14**)

3-nitrophenol (0.139 g, 1 mmol)、*i*BuBr (0.16 ml, 1.5 mmol)、 K_2CO_3 (0.276 g, 2 mmol)を DMF (5 ml)に懸濁させ、80 $^\circ\text{C}$ で 5 時間反応させた。反応溶液に水を加え、酢酸エチルで抽出を行い、有機層を水と飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、有機溶媒を除去した。得られた残留物をカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル = 50:1）で精製し 1-isobutoxy-3-nitrobenzene (**14**)を無色の油状物として得た(0.193 g, 0.99 mmol, 99%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.80 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.72 (1H, s), 7.41 (1H, dd, $J = 8.4, 8.0$ Hz), 7.22 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 3.80 (2H, d, $J = 6.4$ Hz), 2.17-2.07 (1H, m), 1.05 (6H, d, $J = 6.8$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 159.8, 149.1, 129.8, 121.4, 115.3, 108.7, 75.0, 28.1, 19.1; IR (NaCl) 3734, 2961, 2874, 2360, 1617, 1578, 1528, 1470, 1350, 1219, 1286, 1245, 1031, 810, 738, 671 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 218.0788, found: 218.0784.

3-Isobutoxyaniline (**13b**)

水素ガス雰囲気化 1-butoxy-3-nitrobenzene (**14**) (0.193 g, 0.99 mmol)と Pd/C (0.07 g)を MeOH (5 ml)に懸濁させ、室温で一晩攪拌した。反応溶液をセライトろ過し、有機溶媒を除去した。得られた残留物をカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル = 30:1）で精製し 3-isobutoxyaniline (**13b**)を褐色固体として得た(0.126 g, 0.76 mmol, 77%)。

mp: 39-40 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.04 (1H, dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz), 6.33-6.25 (3H, m), 3.68 (2H, d, $J = 6.4$ Hz), 3.63 (2H, bs), 2.10-2.01 (1H, m), 1.01 (6H, d, $J = 6.4$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 160.5, 147.9, 130.1, 107.8, 104.7, 101.8, 74.3, 28.3, 19.3; IR (NaCl) 3457, 3373, 3220, 2958, 2872, 1624, 1600, 1459, 1468, 1394, 1329, 1288, 1193, 1156, 1036, 838, 763, 686 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 166.1226, found: 166.1228.

2-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)aniline (**13c**)

2-aminophenol (0.109 g, 1 mmol)、imidazole (0.272 g, 4 mmol)、TBSCl (0.301 g, 2 mmol)を DMF (5 ml)に溶かし、室温で一晩攪拌した。反応溶液に水を加え、酢酸エチルで抽出を行い、有機層を水と飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、有機溶媒を除去した。得られた残留物をカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル = 40:1）で精製し 2-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)aniline (**13c**)を褐色の油状物として得た(0.208 g, 0.93 mmol, 93%)。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 6.81-6.71 (3H, m), 6.64-6.60 (1H, m), 3.69 (2H, bs), 1.02 (9H, s), 0.24 (6H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 1423.0, 138.3, 122.0, 118.6, 118.4, 115.7, 25.9, 18.3, -4.2; IR (NaCl) 3734, 3480, 3376, 2955, 2930, 2884, 2857, 2360, 1614, 1505, 1472, 1457, 1276, 1257, 1227, 923, 832, 781, 742 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NOSi}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 224.1465, found: 224.1466.

Methyl 3-aminobenzoate (**13d**)¹²

文献既知の化合物である。3-aminobenzoic acid (0.137 g, 1 mmol)と H₂SO₄ (0.4 ml)を MeOH (10 ml)に溶かし一晩加熱還流した。反応溶液に水を加え、酢酸エチルで抽出を行い、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水、飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、有機溶媒を除去した。得られた残留物をカラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル = 3:1）で精製し methyl 3-aminobenzoate (**13d**)を黄色の油状物として定量的に得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.42 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.25 (1H, s), 7.21 (1H, dd, *J* = 8.0, 7.6 Hz), 6.86 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 3.89 (3H, s), 3.77 (2H, bs); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 167.4, 146.8, 130.9, 119.4, 119.4, 115.7, 52.0; IR (NaCl) 3734, 3370, 2951, 2360, 1715, 1624, 1603, 1491, 1459, 1434, 1318, 1294, 1240, 1101, 996, 881, 754 cm⁻¹; HRMS (ESI, positive) *m/z* calcd. for C₈H₉NO₂ [M+H]⁺: 152.0706, found: 152.0708.

tert-Butyl(2-isothiocyanatophenoxy)dimethylsilane (**17a**)

2-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)aniline (**13c**) (0.208 g, 0.93 mmol)と phenyl chlorothionoformate (0.065 ml, 0.47 mmol)を THF (5 mL)に溶かし、室温で2時間反応させた。反応溶液に水を加え、酢酸エチルで抽出を行い、有機層を水と飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、有機溶媒を除去した。窒素雰囲気下、得られた残留物 toluene (5 ml)に溶かし、TEA (0.13 ml, 0.9 mmol)と Cl₃SiH (0.09 ml, 0.9 mmol)を加え、室温で2時間反応させた。反応溶液に水を加え、酢酸エチルで抽出を行い、有機層を水と飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、有機溶媒を除去した。得られた残留物をカラムクロマトグラフィー（ヘキサン）で精製し tert-butyl(2-isothiocyanatophenoxy)dimethylsilane (**17a**)を無色の油状物として定量的に得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.16-7.11 (2H, m), 6.92-6.87 (2H, m), 1.03 (9H, s), 0.29 (6H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 152.1, 136.6, 128.1, 126.3, 123.0, 121.5, 120.0, 25.7, 18.4, -4.2; IR (NaCl) 3734, 2930, 2858, 2360, 2076, 1507, 1490, 1472, 1456, 1289, 1255, 1225, 1109, 943, 891, 839, 782, 751 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NOSSi}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: 288.0849, found: 288.0848.

tert-Butyl(3-isothiocyanatophenoxy)dimethylsilane (17b)

3-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)aniline (**13a**) (0.929 g, 4.2 mmol)、phenyl chlorothionoformate (0.29 ml, 2.1 mmol)、TEA (0.47 ml, 3.4 mmol)、 Cl_3SiH (0.34 ml, 3.4 mmol) から **17a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー(ヘキサン : 酢酸エチル = 100:1)で精製し tert-butyl(3-isothiocyanatophenoxy)dimethylsilane (**17b**)を無色の油状物として定量的に得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.18 (1H, dd, $J = 8.0, 8.4$ Hz), 6.84 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.76 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.69 (1H, s), 0.98 (9H, s), 0.21 (6H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 156.5, 135.1, 131.9, 130.1, 119.5, 118.9, 117.4, 25.6, 18.1, -4.2; IR (NaCl) 3734, 2955, 2930, 2858, 2360, 2112, 1592, 1486, 1472, 1294, 1254, 1184, 1153, 1006, 888, 839, 780, 680 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NOSSi}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 266.1029, found: 266.1036.

1-Isothiocyanato-3,5-dimethoxybenzene (17c)

3,5-dimethoxyaniline (0.153 g, 1 mmol)、phenyl chlorothionoformate (0.07 ml, 0.5 mmol)、TEA (0.11 ml, 0.77 mmol)、 Cl_3SiH (0.08 ml, 0.77 mmol) から **17a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 80:1) で精製し 1-isothiocyanato-3,5-dimethoxybenzene (**17c**) を白色固体として得た(0.0896 g, 0.49 mmol, 96%)。

mp: 48-49 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 6.37 (3H, s), 3.77 (3H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 161.1, 135.4, 132.5, 104.0, 100.3, 55.5; IR (NaCl) 3099, 3006, 2967, 2941, 2840, 2360, 2147, 1598, 1458, 1422, 1353, 1304, 1208, 1192, 1156, 1062, 1006, 927, 853, 826, 813, 769, 672 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_9\text{H}_9\text{NO}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 196.0427, found: 196.0432.

Methyl 3-isothiocyanatobenzoate (17d)

methyl 3-aminobenzoate (**13d**) (0.151 g, 1 mmol)、phenyl chlorothionoformate (0.07 ml, 0.5 mmol)、TEA (0.17 ml, 1.2 mmol)、 Cl_3SiH (0.12 ml, 1.2 mmol) から **17a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクトマトグラフィー(ヘキサン : 酢酸エチル = 50:1)で精製し methyl 3-isothiocyanatobenzoate (**17d**)を無色の油状物として定量的に得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.91 (1H, d, $J = 7.2$ Hz), 7.89 (1H, s), 7.46-7.38 (2H, m), 3.94 (3H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 165.3, 137.1, 131.7, 129.6, 128.1, 126.6, 52.4; IR (NaCl) 3734, 2955, 2360, 2090, 1727, 1582, 1443, 1292, 1224, 1104, 1077, 1000, 949, 752, 721, 675 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_9\text{H}_7\text{NO}_2\text{S}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 194.0270, found: 194.0266.

1-Isobutoxy-3-isothiocyanatobenzene (17e)

3-isobutoxyaniline (**13b**) (0.151 g, 1 mmol)、chlorothionoformate (0.05 ml, 0.38 mmol)、TEA (0.15 ml, 1.1 mmol)、 Cl_3SiH (0.11 ml, 1.1 mmol) から **17a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクトマトグラフィー(ヘキサン : 酢酸エチル = 100:1)で精製し 1-isobutoxy-3-isothiocyanatobenzene (**17e**)を黄色の油状物として定量的に得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.22 (1H, dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz), 6.83-6.79 (2H, m), 6.74 (1H, s), 3.70 (2H, d, $J = 6.4$ Hz), 2.13-2.03 (1H, m), 1.02 (6H, d, $J = 6.4$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ

160.0, 135.3, 132.0, 130.1, 117.8, 114.2, 111.7, 74.6, 28.2, 19.2; IR (NaCl) 2959, 2872, 2100, 1600, 1488, 1470, 1394, 1313, 1287, 1267, 1185, 1155, 1038, 977, 842, 819, 769, 679 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NOS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 208.0791, found: 208.0796.

6-Ethoxy-N-phenyl-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine (18a)

窒素雰囲気下、5-ethoxy-2,3-dihydro-1H-inden-1-one (10b) (0.103 g, 0.58 mmol) と phenyl isothiocyanate (0.07 ml, 0.58 mmol) を THF (5 ml) に溶かした。1.6 M *n*-BuLi ヘキサン溶液 (0.36 ml, 0.58 mmol) と (0.12 ml, 0.58 mmol) を 0 °C で 30 分攪拌して調製した LiHMDS を反応溶液に室温で滴下した。室温で 12 時間攪拌した後、反応溶液に hydrazine monohydrate (0.03 ml, 0.58 mmol) と酢酸を加え、24 時間加熱した。反応溶液に水を加え、酢酸エチルで抽出を行い、有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、有機溶媒を除去した。得られた残留物をカラムクロマトグラフィー (塩化メチレン) で精製し、6-ethoxy-N-phenyl-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine (18a) を黄色固体で得た (0.0825 g, 0.28 mmol, 48%)。

mp: 74-75 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.38 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.21 (2H, dd, $J = 7.6, 8.4$ Hz), 6.94 (1H, s), 6.90-6.85 (3H, m), 6.72 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 4.00 (2H, q, $J = 7.2$ Hz), 3.33 (2H, s), 1.41 (3H, t, $J = 7.2$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 158.2, 155.3, 150.7, 143.1, 141.8, 129.2, 126.2, 120.1, 120.0, 116.1, 112.8, 112.4, 110.9, 63.6, 30.4, 14.9; IR (NaCl) 3734, 3053, 2979, 2900, 2360, 1600, 1540, 1508, 1497, 1464, 1394, 1309, 1241, 1111, 1043, 981, 952, 824, 748, 693 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 292.1444, found: 292.1445; HPLC purity: 99.7% (254 nm), retention time: 7.0 min, The eluents were mixture of MeOH and CH_2Cl_2 (1:4).

6-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)-N-phenyl-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine (18b)

5-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-2,3-dihydro-1H-inden-1-one (**10a**) (0.249 g, 0.95 mmol)、phenyl isothiocyanate (0.11 ml, 0.95 mmol)から **18a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル = 2:1）で精製し 6-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-N-phenyl-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine (**18b**)を明褐色固体として得た(0.197 g, 0.52 mmol, 55%)。

mp: 93-94 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.42 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.28-7.25 (3H, m), 6.99 (2H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.94 (1H, s), 6.91 (1H, dd, *J* = 7.6, 7.2 Hz), 6.78 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.01 (1H, bs), 3.41 (2H, s), 0.99 (9H, s), 0.21 (6H, s); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 155.3, 154.9, 150.7, 143.1, 141.9, 129.2, 126.8, 120.08, 120.05, 118.5, 117.9, 116.1, 111.4, 30.2, 25.7, 18.2, -4.4; IR (NaCl) 3181, 3051, 2955, 2929, 2896, 2858, 2360, 1600, 1530, 1497, 1463, 1444, 1418, 1396, 1281, 1250, 1086, 957, 841, 780, 745, 692 cm⁻¹; HRMS (ESI, positive) *m/z* calcd. for C₂₂H₂₇N₃OSi [M+H]⁺: 378.1996, found: 378.1994.

N-(2-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)-6-methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine (18d)

5-methoxy-1-indanone (0.078 g, 0.48 mmol)、tert-butyl(2-isothiocyanatophenoxy)dimethylsilane (**17a**) (0.127 g, 0.48 mmol)から **18a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル = 5:1）で精製し N-(2-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)-6-methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine (**18b**)を黄色固体として得た(0.0565 g, 0.14 mmol, 29%)。

mp: 72-73 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.51 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.36 (1H, d, *J* = 6.8 Hz), 7.04 (1H, s), 6.95-6.83 (3H, m), 6.76 (1H, dd, *J* = 8.0, 7.2 Hz), 6.26 (1H, bs), 3.85 (3H, s), 3.48 (2H, s),

1.06 (9H, s), 0.28 (6H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 158.9, 153.9, 150.7, 143.2, 142.7, 134.9, 126.2, 121.9, 120.0, 119.5, 118.1, 115.2, 112.2, 112.1, 111.9, 55.5, 29.8, 25.9, 18.3, -4.3; IR (NaCl) 3423, 3063, 2929, 2857, 2360, 1598, 1537, 1495, 1460, 1283, 1250, 1106, 1082, 1035, 922, 839, 807, 782, 752 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_2\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 408.2102, found: 408.2105;

N-(3-((tert-Butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)-6-methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine (18f)

5-methoxy-1-indanone (0.224 g, 1.38 mmol)、tert-butyl(3-isothiocyanatophenoxy)dimethylsilane (17b) (0.366 g, 1.38 mmol)から **18a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 2:1) で精製し N-(3-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)-6-methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine (**18f**)を黄色固体として得た(0.386 g, 0.946 mmol, 68%)。

mp: 136-137 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.50 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.10 (1H, dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz), 7.03 (1H, s), 6.87 (1H, d, $J = 6.8$ Hz), 6.61 (1H, d, $J = 6.8$ Hz), 6.52 (1H, s), 6.40 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 5.94 (1H, bs), 3.85 (3H, s), 3.47 (2H, s), 0.97 (9H, s), 0.19 (6H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 158.9, 156.7, 155.1, 150.7, 144.4, 141.8, 129.8, 126.3, 120.1, 112.1, 111.9, 111.8, 109.4, 108.0, 55.4, 30.4, 25.7, 18.1, -4.4; IR (NaCl) 3063, 2954, 2929, 2858, 2360, 1600, 1524, 1490, 1471, 1310, 1283, 1250, 1181, 1155, 1083, 1035, 992, 871, 838, 781 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_2\text{Si}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 408.2102, found: 408.2104;

6-Methoxy-N-(2-methoxyphenyl)-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine (18h)

5-methoxy-1-indanone (0.08 g, 0.5 mmol)、1-isothiocyanato-2-methoxybenzene (0.082 mg, 0.5 mmol)から **18a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 2:1) で精製し 6-methoxy-N-(2-methoxyphenyl)-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine (**29**)を明黄色固体として得た(0.0615 g, 0.2 mmol, 40%)。

mp: 182-183 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.55 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.06 (1H, s), 6.97-6.86 (5H, m), 6.39 (1H, bs), 3.94 (3H, s), 3.87 (3H, s), 3.53 (2H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 159.0, 155.0, 150.7, 147.3, 141.6, 133.0, 126.5, 121.1, 120.0, 119.5, 114.3, 112.4, 112.0, 112.0, 110.2, 55.6, 55.5, 30.1; IR (NaCl) 3064, 2933, 2834, 2360, 1600, 1532, 1461, 1310, 1283, 1245, 1112, 1030, 979, 817, 746 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 308.1394, found: 308.1399; HPLC purity: 99.9% (254 nm), retention time: 6.9 min, The eluents were mixture of MeOH and CH_2Cl_2 (1:9).

6-Methoxy-N-(3-methoxyphenyl)-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine (18i)

5-methoxy-1-indanone (0.1 g, 0.62 mmol)、3-methoxyphenyl isothiocyanate (0.087 ml, 0.62 mmol)から **18a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー (塩化メチレン : メタノール = 30:1) で精製し 6-methoxy-N-(3-methoxyphenyl)-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine (**18i**)を白色固体として得た(0.113 g, 0.37 mmol, 60%)。

mp: 153-154 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.50 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.19 (1H, dd, $J = 8.4, 8.4$ Hz), 7.04 (1H, s), 6.88 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.60-6.59 (2H, m), 6.49 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 6.07 (1H, bs), 3.86 (3H, s), 3.79 (3H, s), 3.49 (2H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 160.7, 158.9, 155.0, 150.7, 144.5, 141.7, 130.0, 126.2, 120.0, 112.3, 111.9, 111.7, 108.6, 105.6, 101.7, 55.5, 55.2, 30.3; IR (NaCl) 3004, 2904, 2834, 2360, 1601, 1524, 1494, 1310, 1284, 1248, 1202, 1158, 1082, 1034, 980,

840, 756, 688 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 308.1394, found: 308.1389; HPLC purity: 97.7% (254 nm), retention time: 7.7 min, The eluents were mixture of MeOH and CH_2Cl_2 (1:9).

6-Methoxy-N-(4-methoxyphenyl)-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine (18j)

5-methoxy-1-indanone (0.2 g, 0.1.23 mmol)、4-methoxyphenyl isothiocyanate (0.17 ml, 1.23 mmol) から **18a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル = 1:1）で精製し 6-methoxy-N-(4-methoxyphenyl)-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine (**18j**)を白色固体として得た(0.141 g, 0.46 mmol, 37%)。

mp: 137-138 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.50 (1H, d, J = 8.4 Hz), 7.05-7.03 (3H, m), 6.89-6.87 (3H, m), 5.81 (1H, bs), 3.86 (3H, s), 3.82 (3H, s), 3.40 (2H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 158.8, 155.5, 154.2, 150.8, 143.3, 136.5, 126.5, 120.1, 118.8, 114.5, 112.1, 111.8, 109.6, 55.6, 55.4, 30.3; IR (NaCl) 3182, 2903, 2832, 2360, 1615, 1509, 1466, 1310, 1282, 1240, 1179, 1082, 1034, 979, 819, 757 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 308.1394, found: 308.1393; HPLC purity: 97.9% (254 nm), retention time: 11.0 min, The eluents were mixture of MeOH and CH_2Cl_2 (3:97).

N-(3,4-Dimethoxyphenyl)-6-methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine (18k)

5-methoxy-1-indanone (0.2 g, 0.1.23 mmol)、3,4-dimethoxyphenyl isothiocyanate (0.24 g, 1.23 mmol)から **18a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー（塩化メチレン：メタノール = 100:1）で精製し 6- N-(3,4-dimethoxyphenyl)-6-methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine (**18k**)を明褐色固体として得た (0.202 g, 0.6 mmol,

49%)。

mp: 102-103 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.51 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.04 (1H, s), 6.89 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.83 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.71 (1H, s), 6.61 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 5.85 (1H, bs), 3.88 (3H, s), 3.86 (6H, s), 3.42 (2H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 158.9, 155.5, 150.7, 149.7, 143.6, 143.0, 137.0, 126.3, 120.0, 112.4, 112.2, 111.9, 109.9, 108.7, 102.6, 56.4, 55.7, 55.4, 30.3; IR (NaCl) 3337, 3014, 2934, 2833, 1612, 1511, 1466, 1310, 1282, 1232, 1165, 1134, 1082, 1027, 980, 752 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 338.1499, found: 338.1503; HPLC purity: 96.0% (254 nm), retention time: 8.3 min, The eluents were mixture of MeOH and CH_2Cl_2 (1:9).

N-(3,5-Dimethoxyphenyl)-6-methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine (18l)

5-methoxy-1-indanone (0.08 g, 0.49 mmol)、1-isothiocyanato-3,5-dimethoxybenzene (**17c**) (0.0896 g, 0.49 mmol)から **18a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー（ヘキサン：酢酸エチル = 1:1）で精製し N-(3,4-dimethoxyphenyl)-6-methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine (**18l**)を明褐色固体として得た(0.0827 g, 0.245 mmol, 50%)。

mp: 88-89 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): 7.52 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.06 (1H, s), 6.90 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.20 (2H, s), 6.09 (1H, s), 6.00 (1H, bs), 3.87 (3H, s), 3.78 (6H, s), 3.52 (2H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 161.6, 158.9, 155.3, 150.7, 145.1, 141.4, 126.2, 120.0, 112.3, 111.8, 111.6, 94.3, 92.6, 55.4, 55.2, 30.4; IR (NaCl) 3003, 2935, 2837, 2360, 1600, 1525, 1488, 1310, 1283, 1254, 1202, 1152, 1066, 1033, 817, 754, 686 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 338.1499, found: 338.1495; HPLC purity: 97.0% (254 nm), retention time: 7.7 min, The eluents were mixture of MeOH and CH_2Cl_2 (1:9).

Methyl 3-((6-methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-yl)amino)benzoate (18m)

5-methoxy-1-indanone (0.1 g, 0.62 mmol)、methyl 3-isothiocyanatobenzoate (**17d**) (0.119 g, 0.62 mmol)から **18a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 2:1) で精製し methyl 3-((6-methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-yl)amino)benzoate (**18m**)を白色固体として得た(0.0839 g, 0.25 mmol, 40%)。

mp: 147-148 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.64 (1H, s), 7.54 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.44 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.29 (1H, m), 7.16 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.00 (1H, s), 6.82 (1H, s, *J* = 8.0 Hz), 6.39 (1H, bs), 3.88 (3H, s), 3.28 (3H, s), 3.42 (2H, s); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 167.3, 158.9, 154.8, 150.7, 143.3, 141.8, 130.9, 129.1, 125.9, 120.9, 120.1, 120.0, 116.4, 112.2, 111.8, 111.2, 55.4, 52.1, 30.3; IR (NaCl) 3734, 2950, 2360, 1716, 1592, 1540, 1508, 1489, 1472, 1284, 1249, 1107, 1034, 999, 752, 687 cm⁻¹; HRMS (ESI, positive) *m/z* calcd. for C₁₉H₁₇N₃O₃ [M+H]⁺: 336.1343, found: 336.1340; HPLC purity: 98.3% (254 nm), retention time: 7.7 min, The eluents were mixture of MeOH and CH₂Cl₂ (1:9); Anal. Calcd for C₁₉H₁₇N₃O₃: C: 68.05, H: 5.11, N: 12.53, O: 14.31, found, C: 67.81, H: 5.15, N: 12.47.

N-(3-Isobutoxyphenyl)-6-methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine (18o)

5-methoxy-1-indanone (0.094 g, 0.58 mmol)、1-isobutoxy-3-isothiocyanatobenzene (**17e**) (0.12 g, 0.58 mmol)から **18a** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー (ヘキサン : 酢酸エチル = 2:1) で精製し N-(3-isobutoxyphenyl)-6-methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine (**18o**)を明黄色固体として得た(0.113 g, 0.32 mmol, 55%)。

mp: 76-77 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.50 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 7.17 (1H, dd, *J* = 8.0, 8.4 Hz), 7.04 (1H, s), 6.87 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.58-6.56 (2H, m), 6.48 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 6.07 (1H, bs), 3.86 (3H, s), 3.70 (2H, d, *J* = 6.4 Hz), 3.48 (2H, s), 2.21-2.02 (1H, m), 1.03 (3H, s), 1.00 (3H, s); ¹³C

NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 160.4, 158.9, 155.3, 150.7, 144.4, 141.6, 129.9, 126.3, 120.1, 112.2, 111.9, 111.4, 108.5, 106.3, 102.4, 74.3, 55.4, 30.4, 28.3, 19.3; IR (NaCl) 3162, 2957, 2360, 1598, 1524, 1494, 1469, 1394, 1310, 1283, 1247, 1192, 1156, 1082, 1034, 980, 839, 757, 688 cm⁻¹; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for C₂₁H₂₃N₃O₂ [M+H]⁺: 350.1863, found: 350.1865; HPLC purity: 95.7% (254 nm), retention time: 9.5 min, The eluents were mixture of MeOH and CH₂Cl₂ (3:97).

3-(Phenylamino)-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-6-ol (**18c**)

6-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)-N-phenyl-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine (**18b**) (0.17 g, 0.45 mmol)を MeOH (10 ml)に溶かし、1 M TBAF THF 溶液 (0.81 ml, 0.81 mmol)を加えて室温で 2 時間反応させた。反応溶液に酢酸エチルを加えて薄め、飽和塩化アンモニウム水溶液と飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、有機溶媒を除去した。得られた残留物をカラムクロマトグラフィー (塩化メチレン : メタノール = 50:1) で精製し、3-(phenylamino)-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-6-ol (**18c**)を明黄色固体で得た(0.114 g, 0.43 mmol, 96%)。

mp: 150-151 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.41 (1H, d, J = 8.4 Hz), 7.21 (2H, dd, J = 7.6, 7.6 Hz), 7.00 (2H, d, J = 7.6 Hz), 6.91 (1H, s), 6.80 (1H, dd, J = 7.2, 7.6 Hz), 6.75 (1H, d, J = 8.4 Hz), 3.38 (2H, s), 3.34 (1H, s); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 156.6, 155.6, 151.0, 143.7, 141.6, 128.7, 125.3, 119.6, 119.3, 115.4, 113.4, 113.0, 110.3, 29.3; IR (KBr) 3376, 3052, 2896, 2810, 2362, 1620, 1600, 1528, 1497, 1449, 1243, 1104, 1082, 982, 927, 853, 820, 747, 718, 691 cm⁻¹; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for C₁₆H₁₃N₃O [M+H]⁺: 264.1131, found: 264.1132; HPLC purity: 98.3% (254 nm), retention time: 7.7 min, The eluents were mixture of MeOH and CH₂Cl₂ (1:4).

2-((6-Methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-yl)amino)phenol (**18e**)

N-(2-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)-6-methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine

(**18d**) (0.057 g, 0.14 mmol)、1 M TBAF THF 溶液 (0.25 ml, 0.25 mmol)から **18c** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー (塩化メチレン : メタノール = 50:1) で精製し 2-((6-methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-yl)amino)phenol (**39**)を暗緑色固体として得た(0.0195 g, 0.066 mmol, 47%)。

mp: 196-197 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.50 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.10 (1H, d, *J* = 7.6 Hz), 7.05 (1H, s), 6.88 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.84-6.72 (3H, m), 3.81 (3H, s), 3.44 (2H, s); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 159.3, 155.5, 150.8, 145.6, 142.0, 131.7, 126.3, 120.1, 119.6, 119.4, 115.6, 114.4, 112.1, 111.6, 109.8, 54.5, 29.5; IR (KBr) 3368, 3241, 2830, 2682, 2499, 1589, 1510, 1471, 1400, 1310, 1286, 1246, 1112, 1090, 1038, 862, 808, 738 cm⁻¹; HRMS (ESI, positive) *m/z* calcd. for C₁₇H₁₅N₃O₂ [M+H]⁺: 294.1237, found: 294.1241; HPLC purity: 98.8% (254 nm), retention time: 10.7 min, The eluents were mixture of MeOH and CH₂Cl₂ (1:1).

3-((6-Methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-yl)amino)phenol (**18g**)

N-(3-((tert-butyldimethylsilyl)oxy)phenyl)-6-methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-amine

(**18f**) (0.386 g, 0.94 mmol)、1 M TBAF THF 溶液 (1.69 ml, 1.69 mmol)から **18c** と同様の実験手順で反応させた。カラムクロマトグラフィー (塩化メチレン : メタノール = 50:1) で精製し 3-((6-methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-yl)amino)phenol (**18g**)を白色固体として定量的に得た。

mp: 201-202 °C; ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD): δ 7.52 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.09 (1H, s), 7.05 (1H, dd, *J* = 8.0, 8.0 Hz), 6.90 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.52-6.49 (2H, m), 6.31 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 3.83 (3H, s), 3.47 (2H, s); ¹³C NMR (100 MHz, CD₃OD): δ 159.3, 157.9, 155.5, 150.9, 145.1, 141.2, 129.5, 126.4,

119.4, 112.1, 111.6, 110.7, 107.2, 106.4, 102.3, 54.6, 29.5; IR (KBr) 3402, 3347, 3058, 2944, 2900, 2826, 2703, 1615, 1600, 1543, 1463, 1267, 1250, 1157, 1108, 1075, 1039, 981, 849, 832, 774 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 294.1237, found: 294.1245; HPLC purity: 99.9% (254 nm), retention time: 10.7 min, The eluents were mixture of MeOH and CH_2Cl_2 (1:1).

3-((6-Methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-yl)amino)benzoic acid (**18n**)

methyl 3-((6-methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-yl)amino)benzoate (**18m**) (0.084 g, 0.25 mmol) を THF (5 ml) に溶かし、 $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (0.021 ml, 0.5 mmol) の水溶液 (1 ml) を加えて室温で一晩攪拌した。反応溶液に 1 N 塩酸を加えて酸性にし、酢酸エチルで抽出を行い、有機層を水と飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、有機溶媒を除去した。得られた残留物塩化メチレンに懸濁させ、固体をろ別し 3-((6-methoxy-1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-yl)amino)benzoic acid (**18n**) を白色固体として得た (0.062 g, 0.19 mmol, 76%)。

mp: 239-240 $^{\circ}\text{C}$; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD): 7.65 (1H, s), 7.53 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.47 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 7.27 (1H, dd, $J = 7.6, 8.0$ Hz), 7.14 (1H, dd, $J = 1.2, 8.0$ Hz), 7.10 (1H, s), 6.91 (1H, dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz), 3.84 (3H, s), 3.50 (2H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD): δ 173.3, 159.2, 155.6, 150.9, 143.5, 141.2, 137.0, 128.2, 126.4, 120.3, 119.4, 117.9, 116.2, 112.1, 111.5, 110.3, 54.5, 29.5; IR (KBr) 3274, 2896, 2833, 1551, 1471, 1391, 1310, 1283, 1245, 1083, 1032, 976, 815, 763, 686 cm^{-1} ; HRMS (ESI, positive) m/z calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 322.1186, found: 322.1182; HPLC purity: 100% (254 nm), retention time: 8.2 min, The eluents was MeOH.

細胞の継代

細胞は 10% FBS (HyClone) 、100 Units/ml のペニシリンと 100 µg/ml のストレプトマイシン (Invitrogen, Carlsbad, CA) を含んだ RPMI - 1640 メディウム (Wako) の中で、5% CO₂ 濃度条件下、37°C で培養した。

MTT assay

96 穴マルチウェルプレートにて細胞を 5×10^3 cells/100 µl の密度で 6 時間培養した後、RPMI-1640 メディウムで化合物を 60-0.2 µM の濃度に希釈し、100 µl を細胞に加え、72 時間、37 °C で培養した。その後、PBS に溶かした MTT (sigma) 試薬溶液 (5 mg/ml) を加え、2 時間培養した。2 時間後上清を取り除き DMSO を 100 µl 加えて、プレートリーダーによって 595 nm の吸光度を測定した。

MorphoBase profiling

MorphoBase profiling は報告されている手法に従った^{7, 8}。src^{ts}-NRK と HeLa 細胞を poly-D-lysine-coated, black, 96-well clear-bottom plates (Bio-one µclear, Greiner) に播種した。化合物を曝露後、3.7%ホルマリンで細胞を固定し、Hoechst33342 (Sigma-Aldrich) で染色した。明視野画像と細胞核の画像を IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare) によって取得した。得られた画像から約 1000 細胞を custom-designed image analysis algorithms を用いて個々の細胞の区域を解析し、細胞核や細胞の面積など 12 の規定した項目について測定した。各ウェルでの表現型の応答を特徴づけるため、平均、中央値、標準偏差をそれぞれのパラメトリックな測定値に対して算出した。全 71 パラメーターを DMSO 処理した細胞の値をコントロールとして規格化した。共通対数出力に対して統計解析を適応した。主成分分析のため共分散行

列の固有値-固有ベクトルを算出し、主成分スコアを二次元散布図にプロットした。試験した化合物の確率成績と最短距離のランキングを化合物からのユークリッド距離により算出し、この二つの統計学的な算出を用いて試験した化合物の作用機序や標的タンパク質の予想を行った。

ChemProteoBase Profiling

ChemProteoBase profiling は報告されている手法に従った^{9,13}。HeLa 細胞を化合物 **18m** で 18 時間処理した。細胞溶解液のプロテオーム解析は 2D-DIGE system (GE Healthcare)を用いて行い、ゲルの画像は Progenesis SameSpots (Nonlinear Dynamics)によって解析した。2DE ゲルから 1000 以上のスポットを検出し、作用機序の明らかになっている化合物で処理した細胞のゲル間で共通する 296 の変化のあるスポットを選択した。次に DMSO 処理した HeLa 細胞から得られた 296 スポットの平均値を標準として、薬剤処理によって変化したスポットの値を規格化した。規格化した 296 スポットの値を用いて、化合物間の類似度を算出し、階層的クラスタリング解析を Gene Cluster 3.0 (clustering method; centroid linkage with the means of uncentered correlation)をもちいて行った¹⁴。予想される樹状図は Java Treeview 1.1.3.を用いて可視化した¹⁵。

In vitro tubulin polymerization assay

In vitro tubulin polymerization assay は Tubulin Polymerization Assay Kit (Cytoskeleton)を用いて、製品の説明書に従って行った。凍結乾燥した豚の tubulin を reaction buffer (80 mM PIPES pH 6.9, 2 mM MgCl₂, 0.5 mM EGTA, 1 mM GTP, 10 μ M fluorescent reporter, 20% glycerol)に最終濃度 2 mg/ml になるよう溶かした。化合物(100 \times DMSO stock solutions)を予熱した 96 穴マルチ

ウェルブラックプレートに加え、冷却した tubulin 溶液を各ウェルに加えた。プレートを振とうさせ、340 nm における吸光度を 1 分ごとに 1 時間測定した。

Flow Cytometry

ChemProteoBase profiling は報告されている手法に従った^{8,13}。HeLa 細胞を化合物で 24 時間処理し、エタノールで細胞を固定化し PBS で洗浄後、PI buffer (PBS containing 50 µg/ml propidium iodide and 2 µg/mL RNase A (Nacalai Tesque)で 30 分染色した。DNA の含有量を Cytomics FC500 (Beckman Coulter)によって測定した。

ウェスタンブロット

12 穴マルチプレートに 2.5×10^5 cells / ml の濃度で HeLa 細胞を撒き、化合物処理を行った後に、メディウムを取り除き、lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.4, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 5 mM sodium fluoride, 2.5 mM *p*-nitrophenylene phosphate, 10 µg/ml phenylmethylsulfonylfluoride, 1 mM sodium vanadate, and 10 µg/ml leupeptin)を 80 µl 加えて細胞を溶解し、sample buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 20% SDS, 50% glycerol, 20% 2-thioethanol, 50 µg/ml bromophenol blue)を 20µl 加えて、超音波、熱変性処理を行った。細胞ライセートを 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってタンパク質を分離し、ポリフッ化ビニリデン (PVDF) メンブレンに転写した。メンブレンを抗チューブリン抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、抗アセチルチューブリン抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)、で処理し、さらに HRP 結合 2 次抗体で処理した。メンブレンを ECL kit (GE healthcare Buckinghamshire, UK)) で処理し、タンパク質をメジャー (Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Bio-Rad, Hercules, CA)) で可視化した。

免疫染色

カバーガラス上に 1×10^4 cells/100 μ l の濃度で HeLa 細胞を撒き、35 mm ディッシュに入れ 2 時間培養した後、メディウムを 1 ml 加えて 12 時間培養した。化合物を加えて 8 時間処理し、メディウムを取り除き 4% パラホルムアルデヒド溶液で 15 分間処理して細胞を固定化した。その後 0.4% Triton X で 5 分間、イムノブロック (DS ファーマバイオメディカル株式会社) で 5 分間処理した。抗チューブリン抗体を加えて 12 時間、FITC 結合 2 次抗体 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) で 4 時間、DAPI (和光純薬) で 5 分間処理した。ProLong[®] Gold antifade reagent (Invitrogen) で封入し、蛍光顕微鏡で観察した。

3-7 参考文献

- (1) Tao, Z-F.; Li, G.; Tong, Y.; Chen, Z.; Merta, P.; Kovar, P.; Zhang, H.; Rosenberg, S-H.; Sham, H. L.; Sowin, T. J.; Lin, N-H. Synthesis and biological evaluation of 40-(6,7-disubstituted-2,4-dihydro-indeno[1,2-c]pyrazol-3-yl)-biphenyl-4-ol as potent Chk1 inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 4308
- (2) Tao, Z-F.; Li, G.; Tong, Y.; Stewart, K. D.; Chen, Z.; Bui, M-H.; Merta, P.; Park, C.; Kovar, P.; Zhang, H.; Sham, H. L.; Rosenberg, S. H.; Sowin, T. J.; Lin, N-H. Discovery of 40-(1,4-dihydro-indeno[1,2-c]pyrazol-3-yl)-benzonitriles and 40-(1,4-dihydro-indeno[1,2-c]pyrazol-3-yl)-pyridine-20-carbonitriles as potent checkpointkinase 1 (Chk1) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 5944
- (3) Nugiel, D. A.; Vidwans. A.; Etzkorn, A-M.; Rossi, K. A.; Benfield, P. A.; Burton, C. R.; Cox, S.; Doleniak, D.; Seitz, S. P. Synthesis and Evaluation of Indenopyrazoles as Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors. 2. Probing the Indeno Ring Substituent Pattern. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 5224
- (4) Yue, E. W.; Higley, C. A.; DiMeo, S. V.; Carini, D. J.; Nugiel, D. A.; Benware, C.; Benfield, P. A.; Burton, C. R.; Cox, S.; Grafstrom, R. H.; Sharp, D. M.; Sisk, L. M.; Boylan, J. F.; Muckelbauer, J. K.; Smallwood, A. M.; Chen, H.; Chang, C-H.; Seitz, S. P.; Trainor, G. L. Synthesis and Evaluation of Indenopyrazoles as Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors. 3. Structure Activity Relationships at C3. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 5233
- (5) Ho, C. Y.; Ludovici, D. W.; Maharroof, U. S. M.; Mei, J.; Sechler, J. L.; Tuman, R. W.; Strobel, E. D.; Andraka, L.; Yen, H.-K.; Leo, G.; Li, J.; Almond, H.; Lu, H.; DeVine, A.; Tominovich, R. M.; Baker, J.; Emanuel, S.; Gruninger, R. H.; Middleton, S. A.; Johnson, D. L.; Galemno, R. A. (6,7-Dimethoxy-2,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazol-3-yl)phenylamines: Platelet-Derived Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors with Broad Antiproliferative Activity against Tumor

Cells. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 8163–8173.

(6) Usui, T.; Ban, H. S.; Kawada, J.; Hirokawa, T.; Nakamura, H. Discovery of indenopyrazoles as EGFR and VEGFR-2 tyrosine kinase inhibitors by in silico high-throughput screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 285

(7) Futemura, Y.; Kawatani, M.; Kazami, S.; Tanaka, K.; Muroi, M.; Shimizu, T.; Tomita, K.; Watanabe, N.; Osada, H. Morphobase, an encyclopedic cell morphology database, and its use for drug target identification. *Chem. Biol.* **2012**, 19, 1620-1630

(8) Muroi, M.; Kazami, S.; Noda, K.; Kondo, H.; Takayama, H.; Kawatani, M.; Usui, T.; Osada, H. Application of proteomic profiling based on 2D-DIGE for classification of compounds according to the mechanism of action. *Chem. Biol.* 2010, 17, 460-470

(9) Kawatani, M.; Takayama, M.; Muroi, M.; Kimura, S.; Maekawa, T.; Osada, H. Identification of a small-molecule inhibitor of DNA topoisomerase II by proteomic profiling. *Chem. Biol.* **2011**, 18, 743-751

(10) Piperno, G.; LeDizet, M.; Chang, X. J. Microtubules containing acetylated alpha-tubulin in mammalian cells in culture. *J. Cell. Biol.* **1987**, 104, 289-302

(11) Matsuyama, A.; Shimazu, T.; Sumida, Y.; Saito, A.; Yoshimatsu, Y.; Seigneurin-Berny, D.; Osada, H.; Komatsu, Y.; Nishino, N.; Khochbin, S.; Horinouchi, S.; Yoshida, M. *In vivo* destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO. J.* **2002**, 21, 6820-6831

(12) Kasagami, T.; Kim, I. H.; Tsai, H. J.; Nishi, K.; Hammock, B. D.; Morisseau, C. Salicylate-urea-based soluble epoxide hydrolase inhibitors with high metabolic and chemical stabilities. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 15, 1784-1789.

(13) Futamura, Y.; Kawatani, M.; Muroi, M.; Aono, H.; Nogawa, T.; Osada, H. Identification of a molecular target of a novel fungal metabolite, pyrrolizilactone, by phenotypic profiling systems.

ChembioChem. **2013**, 14, 2456-2463.

(14) de Hoon, MJ.; Imoto, S.; Nolan, J.; Miyano, S. Open source clustering software. *Bioinformatics.* **2004**, 20, 1453-1454

(15) Saldanha, AJ. Java Treeview--extensible visualization of microarray data. *Bioinformatics.* **2004**, 20, 3246-3248

謝辞

本研究は学習院大学と東京工業大学において行われたものです。

本研究の遂行にあたり、暖かいご指導をしていただきました学習院大学 花岡文雄 教授に心より深く感謝申し上げます。

また、研究へのご指導と研究環境を設けて下さいました、東京工業大学 資源化学研究所 中村浩之 教授に感謝申し上げます。

研究室に配属されてから生物学の知識と実験技術をご教授下さいました佐藤伸一 助教、潘鉉承 博士、横井雅幸 助教、孤嶋慎一郎 博士、鍋山航 研究員に深く感謝申し上げます。

化合物の標的同定にご協力して頂いた、理化学研究所 長田裕之 主任研究員、室井誠 専任研究員、川谷誠 専任研究員、二村友史 特別研究員に深く感謝いたします。

HIF-1 阻害剤の研究においてご助言とご協力をしていただきました東京工業大学 近藤科江 教授と中川賢治 氏に深く感謝いたします。

本研究の一部は日本学術振興会特別研究員として行ったものであり、財政的な支援を頂きました日本学術振興会に深く感謝いたします。

研究室の先輩方には基本的な研究の進め方などを教えて頂きました。深く感謝いたします。

研究室の同期である、立川将士 氏とは常に刺激し合い、励まし合いながら研究生活を送れたことに深く感謝いたします。

研究室の後輩である深代真司 氏と松川卓也 氏とは同じテーマで研究を行い、互いに高めあう関係で充実した研究を行うことが出来たことに感謝いたします。

最後に、大学入学以来今日までの9年間、私の生活を精神的、経済的に常に支えて頂いた、家族に心より深く感謝申し上げます。

平成 27 年 3 月