

〈総 説〉

Gem-diamine 1-*N*-iminosugar, 新規多機能性グライコミメティクス： 合成，生物・薬理活性，創薬の可能性

西村吉雄

元微生物化学研究所

(2018年9月21日受付)

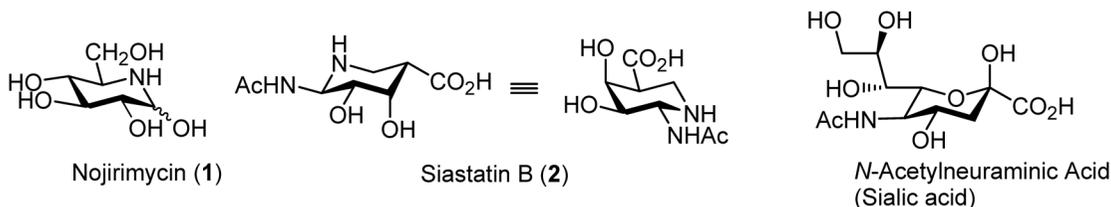
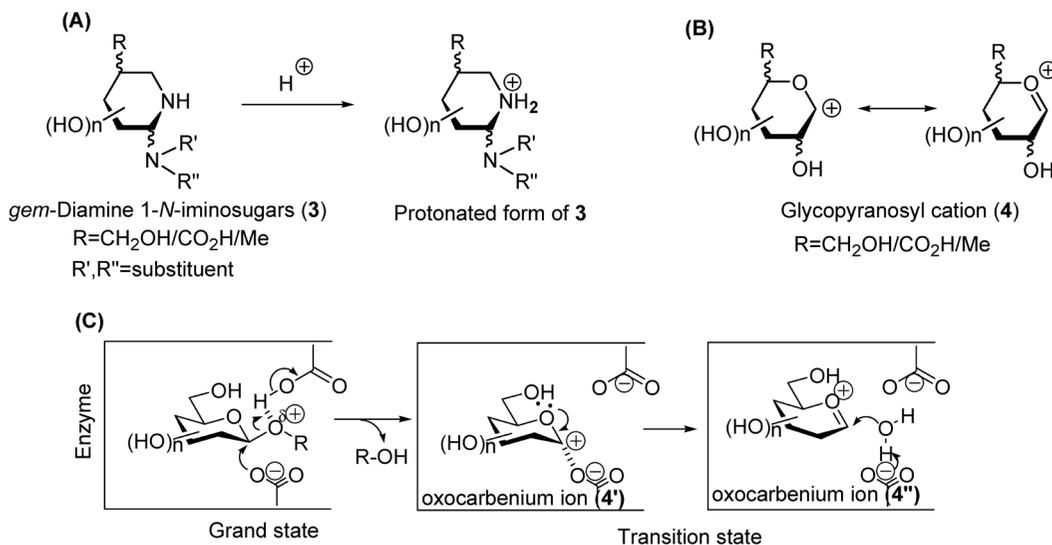
糖質の環内酸素が窒素原子に置換したイミノ糖質は、これまでグライコミメティクス（糖模倣体）として注目されてきている。著者らは、従来のイミノ糖質とは異なる糖質のアノメリック炭素を窒素原子に置換した *Gem*-diamine 1-*N*-iminosugar を新規グライコミメティクスとして提唱した。グライコノラクトンをキラル源とする汎用性に富む立体選択的全合成法および微生物代謝産物 Siastatin B からの半合成法を開拓し種々多様な 1-*N*-イミノ糖を創製した。1-*N*-イミノ糖のプロトン化されたカチオンが糖水解酵素反応遷移状態のオキソカルベニウムイオンのグリコピラノシルカチオンを mimic（模擬）し、強力で特異的な糖水解および糖転移酵素阻害活性を示した。近年、1-*N*-イミノ糖は癌転移、インフルエンザ感染、炎症性疾患など複合糖質の糖代謝が関与する様々な病態の解明のツールや治療薬のリード化合物の新しいソースとして認識されてきている。本稿では、*Gem*-diamine 1-*N*-iminosugar の合成、生物・薬理活性、創薬の可能性について近年の進展について概説する。

1. はじめに

微生物代謝産物を中心とする天然物の多くは糖質を分子中に含み、糖質がその生物・薬理活性の発現、増強や特異性等に深く関わっている。筆者は有用な化学療法剤の創製を目的として、糖質関連生理活性物質の合成研究を展開し、標的天然物の全合成を通して類似体や誘導体合成に応用できる汎用性に富む合成戦略を開拓し、抗菌剤や制癌剤など優れた生理活性物質の創製を行ってきた。他方、これまでの糖質化学を癌化、癌転移、免疫

機能、炎症反応やウイルス、細菌感染などの多分野領域として捉え細胞糖蛋白質、糖脂質糖鎖の代謝阻害剤の合成開拓に挑戦し、多くの新しい知見を得てきている。本稿では、筆者が1994年に住木・梅澤記念賞を受賞したタイトル「糖質関連生理活性物質の創製」の1研究分野「新規糖鎖代謝酵素阻害剤 *Gem*-diamine 1-*N*-iminosugar」の合成、生物・薬理活性、創薬の可能性について、近年の進展を中心にして述べる。

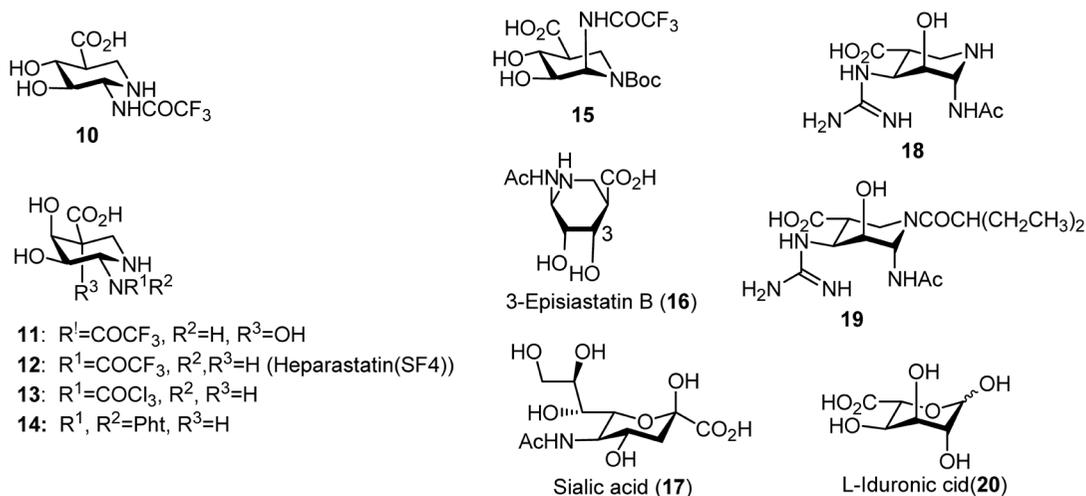
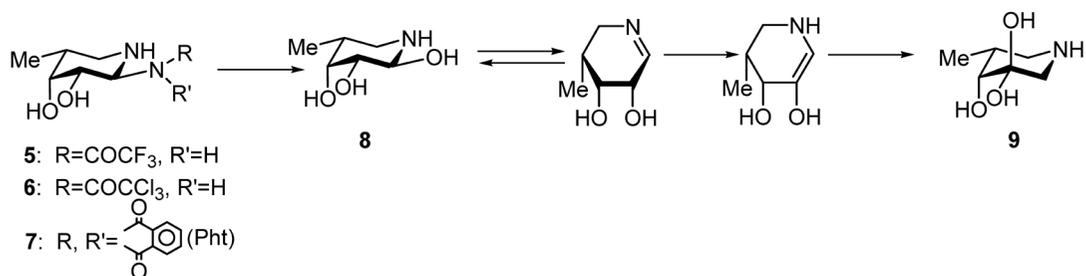
抗生物質 Nojirimycin (1) に代表される糖質の環内酸素が窒素原子に置き換わった糖類似体であるイミノ糖質は、複合糖質が関与している様々な

Figure 1. Structures of nojirimycin (1), siastatin B (2) and *N*-acetylneuraminic acid (sialic acid)**Figure 2. (A) General structures of gem-diamine 1-*N*-iminosugars (3) and its protonated form (B) Glycopyranosyl cation (4), the putative intermediate of enzymatic glycosidic hydrolysis (C) Proposed reaction mechanism of β -glycosidase**

生物機能の機構の解明に役立つばかりでなく、糖質代謝異常に起因する多くの疾病に対する治療薬として、注目されている^{1,2)}。

一方、1974年、それまで知られていたイミノ糖質と異なる特異な構造を有する SiastatinB (2) が、微生物および動物細胞由来の Neuraminidase (NA) の阻害剤として放線菌の培養液から単離された³⁾。2は、 β -Glucuronidase や *N*-Acetyl- β -D-glucosaminadase も拮抗的に阻害する。その生物活性より、構造が *N*-Acetylneuraminic acid (Sialic acid) と同様に、D-Glucuronic acid および *N*-Acetyl-D-glucosamine の構造とも類似していることを認識し (Fig. 1)、その構造—活性相関研究過程で新規な糖水解酵素阻害剤として、アノメリック炭素が窒素原子に置

き換わった特異な構造を有する *Gem*-diamine 1-*N*-iminosugar (3) を Glycomimetics として提唱した^{4,5)} (Fig. 2A)。我々は、3のプロトン化されたカチオンが糖水解酵素反応中に生成されると推定されるオキソカルベニウムイオンのグリコピラノシルカチオン(4)をmimicするとの仮説を立てた (Fig. 2B, 2C)。このことが、強力で特異的な糖水解および糖転移酵素阻害剤の新発見へ導き、さらに癌転移阻害、抗ウイルス、抗炎症などの新しい創薬研究へと発展した。これらの知見は、ゴーシュ病治療薬に用いられている *N*-n-butyl-1-deoxynojirimycin (Zavesca)⁶⁾ に代表される従来のイミノ糖質類とは異なった複合糖鎖代謝阻害に基づく創薬への可能性を示唆している。

Figure 3. Representative synthesized gem-diamine 1-*N*-minosugars, sialic acid and L-iduronic acid**Figure 4. Structural changes of L-fucose-type gem-diamine 1-*N*-minosugars in medium at pH 6.3**

2. 合成

キラル源としてD-Glyconolactoneを用いて広範な汎用性に富む全合成法 (Enantiodivergent synthesis⁷⁾) でD-型およびL-型の双方のイミノ糖質類の合成, および天然 Siastatin B (2) を出発原料として高効率で簡便な半合成法を開発し, 数十種類の Gem-diamine 1-*N*-minosugar (3) を合成し, 生物および薬理評価を行った^{4,5)} (Fig. 3, 4)。

3. 酵素阻害活性

一般にイミノ糖質類は, 様々な生物由来の糖水

解酵素や転移酵素に対して強力で特異的な阻害活性を示すが¹⁾, 3は糖水分解酵素や転移酵素に対して極めて強力で特異的な阻害活性を示すことが明らかとなった^{4,5)}。

3.1 糖水分解酵素, 硫酸基転位酵素阻害活性

3.1.1 フコシダーゼ阻害活性^{4,5)}

L-フコース型2-Trifluoroacetamido 5, 6, 7は, 牛の腎臓由来の α -L-Fucosidaseに対して, IC₅₀ 1.1×10⁻⁸ M (Ki 5.0×10⁻⁹ M) ~1.3×10⁻⁸ Mの特異的で強力な拮抗阻害を示す。化合物5, 6, 7は, 酵素評価系のpH 6.3において容易にAmadori転位を起こし, ヘミアミナル (8) とケトン水和体 (9) に変換され, それぞれは強い阻害活性を示し, ¹C₄-椅

子型立体配置を取ることが明らかとなった⁸⁾ (Fig. 4)。これらの事実は、Fig. 2に示した仮説を支持している。一方、2-Acetamido (2-NHAc) 体は、酵素評価系中安定でAmadori転位を起こさず、本酵素に阻害活性を示さない。

3.1.2 グルクロニダーゼ阻害活性^{4,5)}

D-グルクロン酸型1-N-イミノ糖 **10**, D-ガラクトン酸型1-N-イミノ糖 **11**, **12** (Heparastatin (SF4)), **13**, **14** は、牛の肝臓由来の β -D-Glucuronidase に対して、 IC_{50} $6.2\sim 6.5\times 10^{-8}$ Mの強力な阻害活性を示す。これらHeparastatin (SF4), **13**および**14**は、Fig. 4に示したL-フコース型と同様に酵素阻害評価系 (pH 5.0) において容易にAmadori転位を起こし、ヘミアミナル体に変換され、⁴C₁-椅子型立体配置を取ることが明らかにされた⁸⁾。これらの事実は、プロトン化されたヘミアミナルが β -D-Glucuronidase 水解反応における遷移状態のグリコシルカチオンの椅子型配座 (**4'**) をmimicすることを示唆している (Fig. 2C)。D-マンヌロン酸型 **15** も、同様に β -D-Glucuronidase に対して、 IC_{50} 6.5×10^{-8} Mの強力な阻害活性を示す。**15**の¹H NMR スペクトルは、舟形立体配座を取ること示している。このことから、酵素評価系において**15**から生成されるプロトン化されたヘミアミナルが遷移状態のグリコシルカチオンの舟型配座 (**4''**) の方をmimicすると推定される (Fig. 2C)。一方、予想通り酵素評価系でAmadori転位を起こさない安定なこれらの2-Acetamido (2-NHAc) 体は、 β -D-Glucuronidase の阻害活性を示さない。

3.1.3 グリコシダーゼおよびグリコサミニダーゼ阻害活性^{4,5)}

D-グルコース型 Trifluoroacetamido (-NHCOCF₃) 体は、 α -D-Glucosidase を強力に特異的に阻害 (IC_{50} 1.9×10^{-7} M) し、D-ガラクトース型 Trifluoroacetamido (-NHCOCF₃) 体は、 α -D-Galactosidase (IC_{50} 3.4×10^{-7} M), β -D-Galactosidase (IC_{50} 11.7×10^{-6} M) に強力に特異

的な阻害を示す。これらの結果は、酵素評価系でAmadori転移を経て生成されるヘミアミナルがグリコシダーゼ水解反応中における遷移状態のグリコシルカチオンをmimicしていることを示している (Fig. 2C)。一方、D-ガラクトサミン型およびD-グルコサミン型 Acetamido (-NHAc) 体は、それぞれ α -D-N-Acetylgalactosaminidase および β -D-N-Acetylglucosaminidase に対して強力かつ特異的な阻害 ($IC_{50}\sim 3.3\times 10^{-7}$ M) を示す。アセタミド体 (-NHAc) は、酵素評価系において安定でAmadori転移を起こさず、そのままの形でグリコサミニダーゼの水解反応における基底状態の基質のグリコピラノシドをmimicしていることを示唆している (Fig. 2C)。N-Acetylgalactosaminidase と N-Acetylglucosaminidase は、2位アセチル基を厳密に認識している。

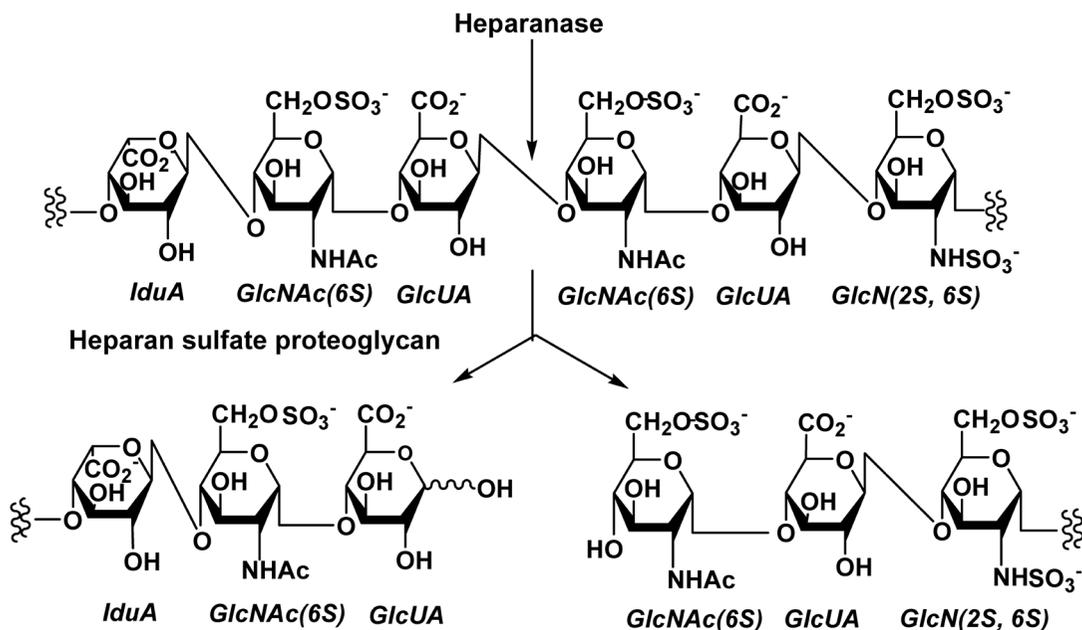
これまでに得られた糖水解酵素は阻害活性強度と特異性において、糖水解酵素が4位水酸基を除いてD-およびL-糖に相当する**3**の絶対配置を厳密に識別していることが明らかとなった。

3.1.4 ヘパラーゼ (Heparanase) 阻害活性^{4,5)}

Heparanase は、あらゆる組織の細胞表面の基底膜 (BM) と細胞外マトリクス (ECM), 更にはある種の細胞核に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカン (HSPGs) に特異的な哺乳動物 *Endo*- β -glucuronidase である^{9,10)}。本酵素は、HSPGs の N-Acetyl-D-glucosamine と D-Glucuronic acid の間の β -1,4結合を特異的に切断する¹¹⁾ (Fig. 5)。ヒトヘパラーゼの精製と遺伝子のクローニングが、発見から十数年を経て1999年に報告され、その構造が明らかにされている¹²⁻¹⁵⁾。

代表的なD-ウロン酸型Heparastatin (SF4) は、Heparanase cDNA を含んでいるpBK-CMV発現ベクターをトランスフェクションしたヒトメラノーマA375M細胞由来の組み換えヒトヘパラーゼ¹²⁾ を強く阻害する (IC_{50} $1.02\pm 0.29\ \mu\text{M}$)¹⁶⁾。

Figure 5. Heparanase cleavage site within the structure of heparan sulfate proteoglycan



3.1.5 シアリダーゼ (ノイラミニダーゼ) 阻害活性¹⁷⁾

Sialidase (Neuraminidase, NA) は、糖タンパク質、糖脂質のオリゴ糖残基に隣接する Sialic acid の α -ケト酸結合を切断する酵素である¹⁸⁾。一方、インフルエンザウイルス A, B 型は、宿主由来の脂質二重膜からなるエンベロープをもち、表面にはスパイク状の糖タンパク質の Hemagglutinin (HA) と NA を持っている¹⁹⁾。

3-Episiastatin B (**16**) は、インフルエンザウイルス A/FM/1/47 (H1N1) NA, B/Lee/40 NA に対して特異的に阻害活性 (IC_{50} (M); 7.4×10^{-5} , 4.2×10^{-5}) を示す¹⁷⁾。このことは、**16** が NA 水解反応における Sialic acid の mimic として働いていると考えられる。

3.1.6 ヘパラン硫酸 2-O-硫酸基転移酵素阻害活性²⁰⁾

ヘパラン硫酸 2-O-硫酸基転移酵素 (HS 2-O-ST) は、ヘパラン硫酸 (HS) の構成ウロン酸である L-イズロン酸の 2 位水酸基に 3'-Phosphate-5'-

phosphosulfate (PAPS) から硫酸基を転位する酵素である²¹⁾。L-イズロン酸型イミノ糖 **18** および **19** は、HS 2-O-ST を濃度依存的に有効に阻害 ($25 \mu\text{M}$, 84% 阻害) する²⁰⁾。PM3/MOPAC を用いる分子モデリングにおいても α -L-Iduronic acid (**20**) と **18** の構造類似性が示された²⁴⁾。

4. 生物・薬理活性

4.1 インフルエンザ感染阻害^{4,5,17,22)}

インフルエンザウイルス A, B 型の HA と NA は、インフルエンザウイルス感染に重要な役割を演じる¹⁹⁾。

3-Episiastatin B (**16**) は、*in vitro* の MDCK 細胞におけるインフルエンザウイルス A/FM/1/47 (H1N1) 感染を特異的に濃度依存的に抑制 (Plaque assay, $40 \mu\text{M}$ で 97.1% 阻害) することを 1993 年に報告している¹⁷⁾。

PM3/MOPAC を用いる分子モデリングより得られた **16** の最低エネルギーコンフォーマーが、

BIOCES/AMBERを用いるインフルエンザウイルスB/Beijing/1/87 NAとSialic acid (17)との共結晶構造の α -舟形コンフォーマー²³⁾とのBIOCES/AMBERを用いるドッキング実験においてよく一致することが明らかになった²²⁾。このことは、16がインフルエンザウイルスNAの水解反応において17をmimicすることを示唆している。

4.2 癌転移阻害活性^{4,5,22,24)}

癌細胞は、Heparanaseを産生し基底膜(BM)およびECMのHSPGPs糖鎖の分解を通して、増殖と組織への浸潤を促進している。癌細胞におけるHeparanaseの亢進が、その悪性と転移に関与していることが報告されている²⁵⁾。

ヒトヘパラーゼを阻害するHeparastatin (SF4)は、再構成BM (Matrigel)へのB16BL6の細胞浸潤を細胞毒性を示すことなく濃度依存的に阻害(1.1 mM処理で64.1%阻害)し、マウスの自然系癌細胞肺転移(マウスフットパッドに接種(足蹠内接種)した癌細胞の切除後の肺転移)も濃度依存的に有効に阻害(癌細胞切除9日後から、薬剤100 mg/kg/dayを5日間iv投与で57.1%阻害)する²⁶⁾。

また、HS 2-O-ST阻害剤(18)は、再構成BM (Matrigel)へのB16BL6細胞浸潤を細胞毒性を示すことなく濃度依存的に阻害(870 μ M処理で58.9%阻害)し、マウスの実験系癌細胞肺転移(薬剤で72h前処理した癌細胞のiv投与による肺転移)も濃度依存的に有効に阻害(150 μ M処理で97%阻害)する^{24,27)}。このことは、L-イズロン酸に相当する18が、癌転移に関与するECMおよびBMの代謝におけるL-イズロン酸のmimicとして働き、癌細胞の細胞表層複合糖質を修飾し、細胞認識および接着に関与する癌細胞の特性を変えていると考えられる^{24,27)}。

4.3 食道ケラチン生成細胞の分化阻害活性²⁸⁾

近年、Heparanaseが正常細胞や扁平上皮癌、神経膠腫(Glioma)、乳癌など癌細胞の核に存在することが明らかにされている²⁹⁾。また、HL-60細胞(Human promyelocytic leukemia)を用いる細胞分化実験において、Heparanaseの核内移行とその活性が細胞分化に関与していることが示され、このHeparanaseの機能が、前骨髄性白血病(Promyeloid Leukemia)および他の癌治療の新しい標的となることが示唆されている³⁰⁾。近年、HeparanaseがTリンパ球の核内に移行し、腫瘍増殖に大きく関係するヒストンH3のメチル化を調整して遺伝子転写を制御することが明らかにされている³¹⁾。

このことは、細胞核内Heparanaseの機能が、癌治療の新しい標的となる可能性を示唆している。

食道上皮および食道がん細胞においてもHeparanaseが核に存在し、その分化に関わっていることが明らかにされた³²⁾。然しながら、Heparanaseの核内での機能については知られていない。猶本らは、食道上皮細胞の分化におけるHeparanaseの役割を明らかにするため、ヒト上皮細胞を器官培養と単層培養をし、細胞分化を誘導し免疫染色とウェスタンブロッティングでHeparanase, HS, ケラチン生成細胞の分化マーカーのInvolucrinとp27の変動を観察した²⁸⁾。その結果、カルシウムで刺激された食道ケラチン生成細胞の分化において、Heparanaseは細胞質から核に移動する。移動に伴ってHeparanaseが核内HS糖鎖を切断すること、それに伴ってp27(2時間後)およびInvolucrin(24時間後)の発現の変化が観察された。Heparastatin(SF4)は、カルシウムで刺激された食道ケラチン生成細胞の核内に取り込まれ、核内でのHeparanaseによるHS糖鎖分解およびp27(2時間後)とInvolucrin(24時間後)の発現を1 mM処理でほぼ完全に阻害した。これらの結果から、Heparanaseが核内移行とHS糖鎖分解を通して食道上皮細胞の分化を制御し、

細胞の発生に重要な役割を担っていることが明らかにされた²⁸⁾。

4.4 炎症細胞の浸潤, 血管外遊出障害^{33~37)}

炎症細胞の白血球 (好中球, 単球, 樹状細胞) は, HeparanaseによるBMのHS分解活性を示す³⁸⁾。また, 炎症細胞の好中球, マクロファージ, 活性化Tリンパ球におけるHeparanaseによるHS分解活性が, 炎症細胞の血管外遊走と組織内の蓄積に関与している^{39,40)}。更に, HS分解とECMのリモデリングを伴う炎症反応において, 顕著なHeparanaseの発現と酵素活性が認められている⁴¹⁾。

4.4.1 ミクログリア (マクロファージ様細胞) の浸潤, 血管外遊走障害³³⁾

炎症反応は, 好中球などの炎症細胞の活性化と血管外遊走を引き起こし, 炎症組織へ浸潤し更に炎症を進行させる。脳虚血 (脳梗塞) では, 梗塞の進展に先立ってミクログリアが活性化されたM1表現型は, 炎症性サイトカイン, 活性酸素や一酸化窒素を産生し, 炎症反応を促進し神経細胞死を促進することが報告されている。他方, 代わりに活性化されたM2表現型は修復作用することが知られている。脳梗塞における免疫応答に重要な役割を演じると考えられることから, ミクログリアは脳梗塞治療研究の興味ある標的となっている^{42~44)}。

高橋らは, ラットミクログリアが, HeparanaseのmRNAを発現し, その蛋白を生産している事を明らかにし, LPS刺激により夫々を高発現, 高産生することを明らかにした³³⁾。また, LPS刺激で高産生したラットミクログリアのHeparanaseが, HSPGsを含むMatrigelのHSPGsのHS側鎖を分解し, Matrigel膜への浸潤活性に比例することも確認された³³⁾。Heparastatin (SF4) は, LPS刺激したラットミクログリアのHeparanase活性を濃度依存的に阻害し (Fig. 6C), そのMatrigelへの浸潤も濃度依存的に阻害した³³⁾ (Fig. 6D)。このことは, Heparanaseが, ミクログリアの脳血管

BMへの浸潤に重要な役割を担っている事を示している。

一方, ラット中大脳動脈閉塞・再還流モデルの急性期には, 好中球の浸潤に続いてミクログリアなどのマクロファージ様細胞 (BINCs) の侵入, 増殖に続くグリーオシスを経て組織欠損に至ることが示唆されている。

Heparastatin (SF4) の脳梗塞モデルラットを用いるiv投与による*in vivo*評価を実施したが, 顕著な効果は得られなかった。

脳虚血時には低酸素状態, 酸化ストレス, 炎症など様々な病態によって, 虚血後早期にまず内皮細胞の血管接着因子が減少しBlood Brain Barrier (BBB) が破綻する。続いてプロテアーゼ, マトリックスメタロプロテアーゼ, 炎症性サイトカインなどにより, 脳虚血急性期にはBBBの脆弱化をもたらすことが知られている⁴⁵⁾。

このことから, Heparastatin (SF4) がBBBを通過することにはあまり問題がないと考えられる。然しながら, これまでのマウスを用いた動態評価試験において, Heparastatin (SF4) が速やかに腎経路の尿中に排出されることが判っており, 本評価系のラットにおいても有効性発現に必要な血中濃度が得られていないことに起因していると考えられる。今後, 投与方法の改善などによりその有効性を確認する必要がある。

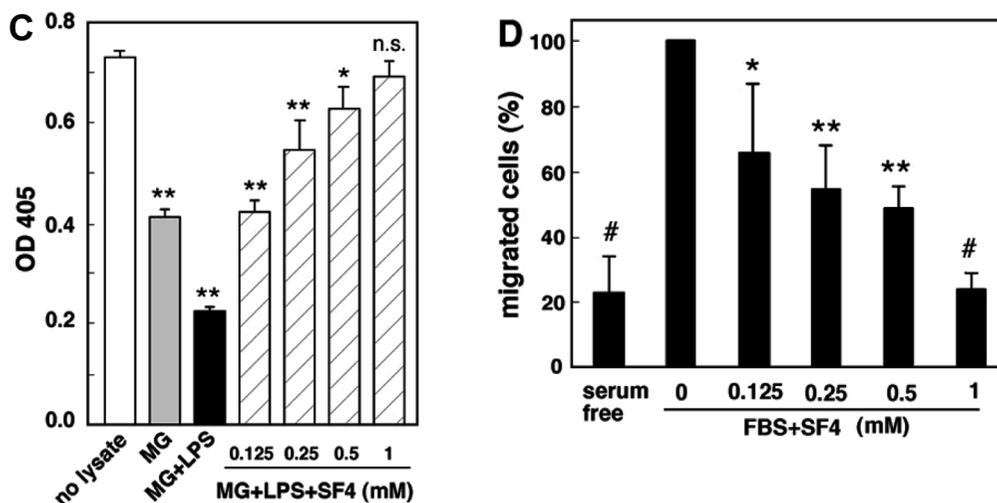
4.4.2 白血球細胞の浸潤, 血管外遊走障害^{34~37)}

近年, 東らは, Heparastatin (SF4) がマウスdorsal air pouch炎症モデルにおいて, 基底膜 (BM) のHSPGs分解によって局所炎症を有効に抑制する事を明らかにした^{36,37)}。

Heparastatin (SF4) は, N-Formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) およびCarrageenanで炎症を惹起したマウスdorsal air pouchモデルにおいて局所炎症を抑制する。

Heparastatin (SF4) とfMLP (1 μ M/PBS) およびCarrageenan (1%/PBS) の局所同時投与 (100 μ M)

Figure 6. Effect of heparastatin (SF4) on the heparan sulfate chain degradation by heparanase in the cell lysate of LPS-treated rat microglia (C) and the transmigration of rat microglial cells through Matrigel (D)



(C); Rat microglial cell lysates (MG: non-treated, MG-LPS: LPS-treated) with or without SF-4 were loaded to a Matrigel-coated ELISA plate and incubated. Enzyme activity of heparanase was evaluated by an ELISA method. The value of control indicates the total amount of HS of HSPGs in Matrigel. Data are shown as (average \pm SE). $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.001$, ns: no significance. (D); Rat microglial cells were plated onto Matrigel-coated inserts in the absence or presence of SF-4 and placed in outer chambers containing DMEM with or without 10% FBS. The mean value of transmigrated cells in 10% FBS condition is represented as 100%. Data are shown as (average \pm SE). $n=3$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, # $P<0.001$. Reprinted from ref. 33. Copyright (2018) with permission from Elsevier.

による *in vivo* 評価を行ったところ、Heparastatin (SF4) で処理した4時間後の総浸潤細胞数は、未処理と比較して fMLP で 64%、Carrageenan で 51% と大幅に少なかった (Fig. 7A)。Heparastatin (SF4) 処理マウスにおける好中球、単球の浸潤数は、未処理と比較して共に著しく少なく、その好中球/単球の比は、同じであった (Fig. 7B, 7C)。一方、マウスを用いる Zymosan 誘発腹膜炎モデルにおける Heparastatin (SF4) の効果を評価した結果、初期段階 (Zymozin 処理4時間後) では好中球が主な浸潤細胞で、単球はわずかであった (Fig. 7D)。また、Heparastatin (SF4) 処理マウスと未処理比較して好中球の総浸潤数に変化が見られなかったことから、Zymosan 誘発腹膜炎モデルにおける好中球の浸潤には、Heparanase が関与していないことが示唆された。

他方、Heparastatin (SF4) 炎症性滲出液における Chemokine 濃度に対する効果は、限定的なもの

であった。

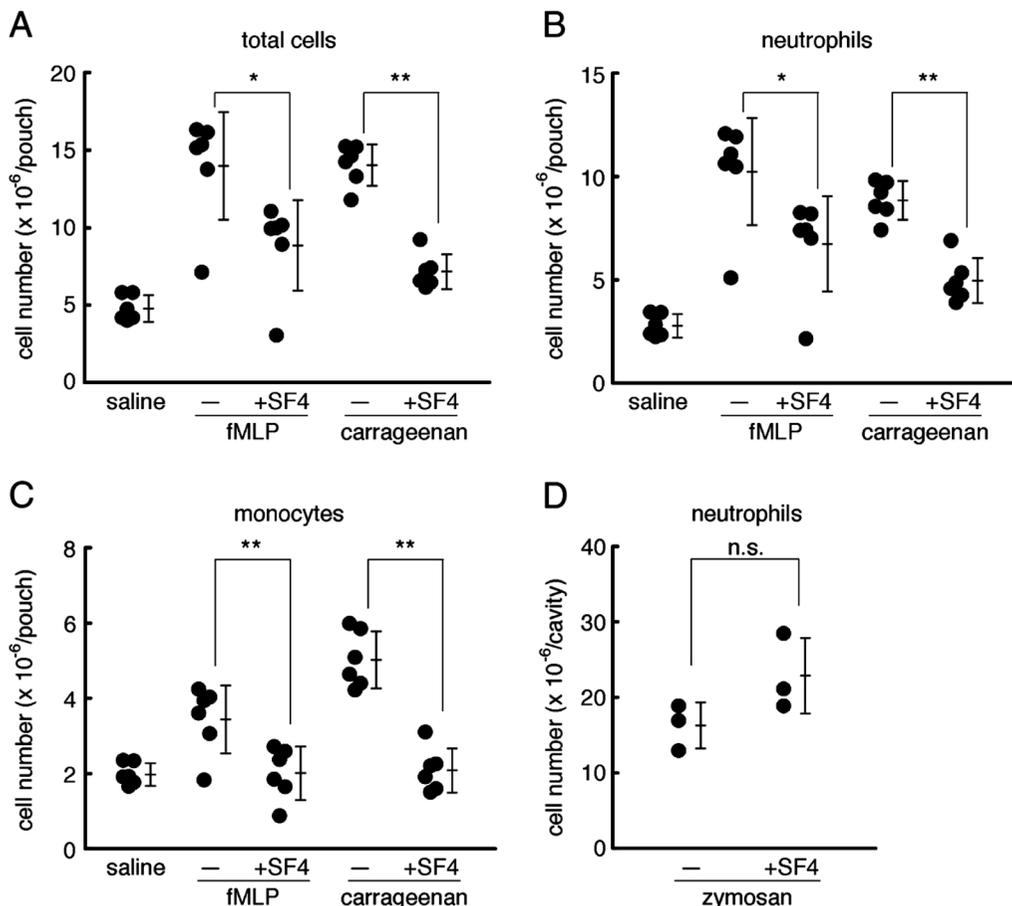
マウスを用いる Carrageenan 誘発炎症モデルにおいては、air pouch から回収した滲出液の炎症性 Chemokine (KC, MIP-2) の濃度が、Heparastatin (SF4) 処理と未処理と間に著しい相違は見られなかったが、MCP-1 の濃度は Heparastatin (SF4) 処理では著しく低かった (Fig. 8)。一方、fMLP 処理マウスの滲出液の炎症性 Chemokine の濃度は、わずかであった。

Heparastatin (SF4) は、*in vitro* (Matrigel) 評価において、細胞の可動性を変えずに、好中球の浸潤を抑制する (Fig. 9)。

これらの結果は、ヘパラーゼがマイクログリア、脳内在マクロファージや炎症細胞の血管外浸潤遊出に関与していることを示し、その抑制に Heparanase 阻害剤である Heparastatin (SF4) が有効であることを示している。

近年、Heparanase は癌疾患に加え、慢性炎症、糖

Figure 7. Heparastatin (SF4) suppresses infiltration of neutrophils and monocytes into inflamed air pouches *in vivo*



N-formyl-Met-Leu-Phe (fMLP, 1 μ M) or carrageenan (1%) in saline with or without heparastatin (SF4) (final concentration 0.1 mM) was injected into air pouches. After 4h, exudates were collected and numbers of total infiltrating cells (A), neutrophils (B), and monocytes (C) were counted and plotted ($n=6$ per group). (D) Peritoneal exudates derived from zymosan-injected mice were collected. The number of neutrophils in the peritoneal fluid was counted ($n=3$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Reprinted from ref. 36. Copyright (2018) with permission from Elsevier.

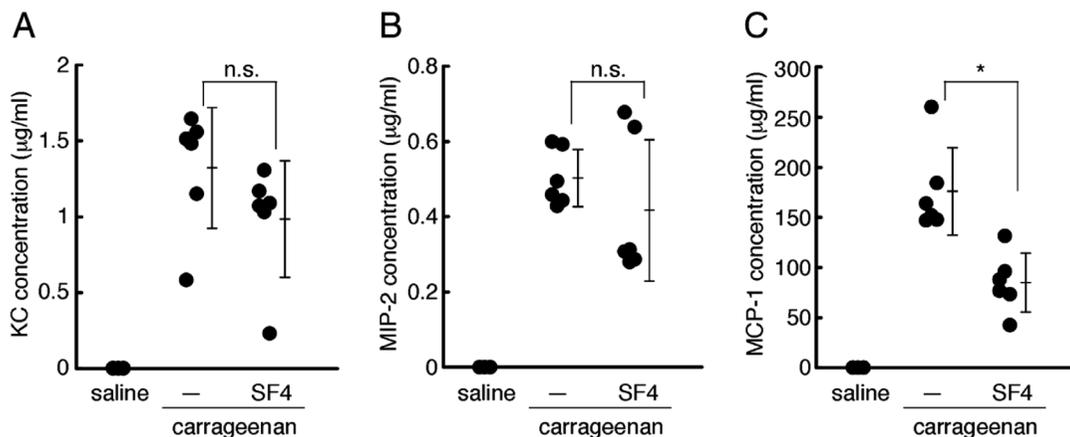
尿病性腎症, 骨粗鬆症, 血栓症, アテローム性動脈硬化症の他, 希少疾患など様々な多くの病態に関与している事が判ってきている⁴⁶⁾。Heparastatin (SF4) は, 細胞核内で活性を示すことも判明し, 今後, これらの病態の解明のツールとして, また治療薬のリード化合物として期待される。

5. おわりに

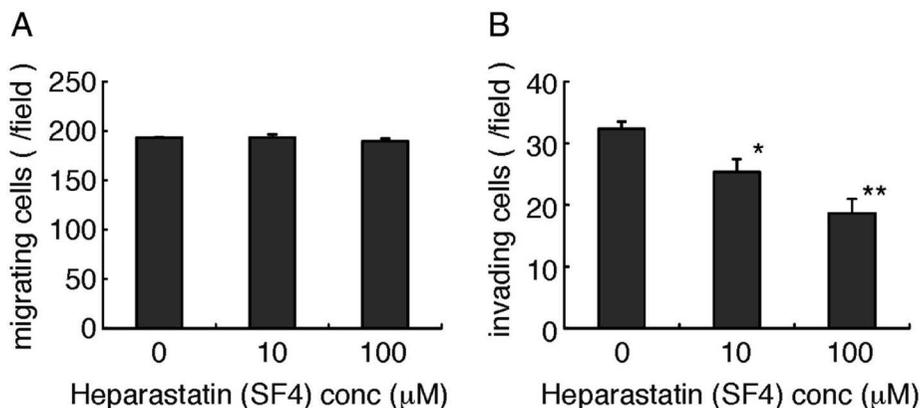
糖質のアノメリック炭素が窒素原子に置換した

Gem-diamine 1-*N*-iminosugar を新しいタイプのグライコミメティクスとして提唱し, その合成, 生物・薬理活性, 創薬の可能性について筆者らの研究の一端を紹介した。

イミノ糖質の中には, 小児の難病である遺伝性ライソゾーム病に対する substrate reduction therapy や chemical chaperon therapy への応用が考えられているものもあり, イミノ糖質は, ここ数年医薬候補化合物の豊富な資源として認識され, その研究も注目されてきている。1-*N*-イミノ糖は, 複合糖質

Figure 8. Chemokine concentration in dorsal air pouch exudates

The concentration of chemokines KC (A), MIP-2 (B) and MCP-1 (C) in exudates of air pouches injected with carrageenan were measured and plotted (n=6 per group). *P<0.05. Reprinted from ref. 36. Copyright (2018) with permission from Elsevier.

Figure 9. Effect of heparastatin (SF4) on migration and invasion of neutrophils through polycarbonate membrane

A, B: The indicated concentration of heparastatin (SF4) were added in both upper and lower chambers. The number of migrating cells (A) or invading cells (B) on the lower surface was counted 0.5 or 24 h of incubation. Data are shown as (average±SE). n=3, *: p<0.05, **: p<0.01. Reprinted from ref. 36. Copyright (2018) with permission from Elsevier.

の代謝に基づく幅広い疾病の医薬候補化合物の新しい資源として認識されてきている。Heparastatin (SF4) は、生化学試薬としてフナコシ株式会社 (東京) から発売されている。今後、複合糖質の代謝阻害剤を応用する癌化、癌転移、ウイルスおよび細菌感染、炎症性疾患、免疫機能調節などの病態の解明のツールや治療薬のリード化合物として創薬研究に資すると思われる。

謝辞

本研究は、筆者が微生物化学研究所において行ったものです。引用文献中に記載された研究所内外の共同研究者、研究協力者ならびに研究協力機関に心より感謝致します。また、本研究の一部は、日本学術振興科学研究費補助金基盤研究、住木・梅澤記念賞研究助成金および The National MPS Society, Inc. USA Research Grant の援助を受

け実施したもので、ここに記して感謝致します。

利益相反自己申告

申告すべきものなし。

〔この総説は、1994年度住木・梅澤記念賞受賞者 西村吉雄博士が受賞後の研究をまとめたものです。〕

引用文献

- 1) Compain P, Martin OR ed.: Iminosugars: From synthesis to therapeutic applications. John Wiley and Sons Ltd., West Sussex, England, 2007.
- 2) Borman S: Drug candidates march onward. Chem. & Eng. News. 2005; September 26: 39–41.
- 3) Umezawa H, Aoyagi T, Komiyama H, Morisima M, Hamada M, Takeuchi T: Purification and characterization of a sialidase inhibitor, siastatin produced by *Streptomyces*. J Antibiot. 1974; 27: 963–9.
- 4) Nishimura Y: *Gem*-diamine 1-*N*-iminoglycosides, a new family of glycosidase inhibitors: synthesis and biological activity. Heterocycles. 2006; 67: 461–88.
- 5) Nishimura Y: *Gem*-diamine 1-*N*-iminoglycosides as versatile glycomimetics: synthesis, biological activity and therapeutic potential. J. Antibiotics. 2009; 62:407–23.
- 6) Butter TD: “Iminosugar inhibitors for substrate reduction therapy for the lysosomal glycosphingolipidoses”. In: Compain P and Martin OR editor. Iminosugars: From synthesis to therapeutic applications, West Sussex, England: John Wiley and Sons, Ltd., 2007, p. 249–68.
- 7) Nishimura Y, Kondo S, Umezawa H: Synthetic studies on pyrrolizidine alkaloid agents. Enantioselective synthesis of retronecine and its enantiomer from D-glucose. J Org Chem. 1985; 50: 5210–4.
- 8) Kondo K, Adachi H, Shitara E, Kojima F, Nishimura Y: Glycosidase inhibitors of *gem*-diamine 1-*N*-iminoglycosides: structures in media of enzyme assays. Bioorg Med Chem. 2001; 9: 1091–5.
- 9) Chen LG, Sanderson RD: Heparanase regulates levels of syndecan-1 in the nucleus. PLoS ONE. 2009; 4 (3) : e4947.
- 10) Richardson TP, Trinkaus-Randall V, Nugent MA. Regulation of heparin sulfate proteoglycan nuclear localization by fibronectin. J Cell Sci. 2001; 114 (9) : 1613–23.
- 11) Vlodaysky I, Friedman Y.: Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. J Clin Invest. 2001; 108 (3) : 341–7.
- 12) Toyoshima M, Nakajima M: Human heparanase. Purification, Characterization, cloning, and expression. J Biol Chem. 1999; 274 (34) : 24153–60.
- 13) Hulett MD, Freeman C, Handroff BJ, Baker RT, Harris MJ, Parish CR: Cloning of mammalian heparanase, an important enzyme in tumor invasion and metastasis. Nat Med. 1999; 5: 803–9.
- 14) Vlodaysky I, Friedman Y, Elkin M, *et al.*: Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. Nat Med. 1999; 5: 793–802.
- 15) Fairbanks MB, Mildner AM, Leone JW, *et al.*: Processing of the human heparanase precursor and evidence that the active enzyme is a heterodimer. J Biol Chem. 1999; 274: 29587–90.
- 16) Nishimura Y, Shitara E, Adachi H, *et al.*: Flexible synthesis and biological activity of uronic acid-type 1-*N*-iminoglycosides: a new family of glycosidase inhibitors. J Org Chem. 2000; 65: 2–11.
- 17) Nishimura Y, Umezawa Y, Kondo S, *et al.*: Synthesis of 3-episiastatin B analogues having anti-influenza virus activity. J Antibiot. 1993; 46: 1883–9.
- 18) Gottschalk A: Neuraminidase: the specific enzyme of influenza virus and *vibrio cholera*. Biochem Biophys Acta. 1957; 23: 645–6.
- 19) Klenk HD, Rott R: The molecular biology of influenza virus pathogenesis. Adv Virus Res. 1988; 34: 247–81.
- 20) Brown JR, Nishimura Y, Esko JD: Synthesis and biological evaluation of *gem*-diamine 1-*N*-

- iminosugars related to L-iduronic acid as inhibitors of heparin sulfate 2-O-sulfotransferase. *Bioorg Med Chem Lett*. 2006; 16: 532–6.
- 21) Esko JD, Lindahl U: Molecular diversity of heparansulfate. *J Clin Invest*. 2001; 108: 169–73.
- 22) Nishimura Y: “Stereoselective synthesis and transformation of siastatin B, a novel glycosidase inhibitor, directed toward new drugs for viral infection and tumor metastasis”. In: Atta-ur-Rahman editor. *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol. 16. Amsterdam: Elsevier, 1995, p. 75–123.
- 23) Burmeister WP, Ruigrok RWH, Cusack S: The 2.2 Å resolution crystal structure of influenza B neuraminidase and its complex with sialic acid. *EMBO J*. 1992; 11: 49–56.
- 24) Nishimura Y, Satoh T, Adachi H, *et al.*: Synthesis and antimetastatic activity of L-iduronic acid-type 1-N-iminosugars. *J Med Chem*. 1997; 40: 2626–33.
- 25) Pisano C, Vlodavsky I, Ilan N, Zunino F: The potential of heparanase as a therapeutic target in cancer. *Biochem Pharmacol*. 2014; 89: 12–9.
- 26) Nishimura Y, Satoh T, Kondo S, *et al.*: Effect on spontaneous metastasis of mouse lung carcinoma by a trifluoroacetamide analogue of siastatin B. *J Antibiot*. 1994; 47: 840–2.
- 27) Nishimura Y, Satoh T, Adachi H, *et al.*: The first L-iduronic acid-type 1-N-iminosugars having inhibitory activity of experimental metastasis. *J Am Chem Soc*. 1996; 118: 3051–2.
- 28) Kobayashi M, Naomoto Y, Nobuhisa T, *et al.*: Heparanase regulates esophageal differentiation through nuclear translocation and heparan sulfate cleavage. *Differentiation*. 2006; 74:235–43.
- 29) Schubert SY, Ilan N, Shushy M, Ofer Ben-Izhak O, Vlodavsky I, Goldshmidt O: Human heparanase nuclear localization and enzymatic activity. *Labo Invest*. 2004; 84: 535–44.
- 30) Nobuhisa T, Naomoto Y, Okawa T, *et al.*: Translocation of heparanase into nucleus in cell differentiation. *Can Sci*. 2007; 98: 535–40.
- 31) He YQ, Suncliff EL, Bunting KL, *et al.*: The endoglycosidase heparanase enters the nucleus of T lymphocytes and moderates H3 methylation at actively transcribed genes via the interplay with key chromatin modifying enzymes. *Transcription*, 2012; 3: 130–45.
- 32) Ohkawara T, Naomoto Y, Takaoka M, Nobuhisa T, Noma K, Motoki T: Localization of heparanase in esophageal cancer cells: respective roles in prognosis and differentiation. *Labo Invest*. 2004; 84: 1289–304.
- 33) Takahashi H, Matsumoto H, Smirkin A, Itai T, Nishimura Y, Tanaka J: Involvement of heparanase in migration of microglial cells. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1780: 709–15.
- 34) Kogane Y, Higashi N, Nishimura Y, Nakajima M, Irimura T: Heparanase downmodulation in the process of epithelial-to-mesenchymal transition of mouse mammary epithelial cells. *J Glycomics Lipidomics*. 2013; 3: 107.
- 35) Tsunekawa N, Higashi N, Kogane Y, *et al.*: Heparanase augments inflammatory chemokine production from colorectal carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 469: 878–83.
- 36) Sue M, Higashi H, Shida H, *et al.*: An iminosugar-based heparanase inhibitor heparastatin (SF4) suppresses infiltration of neutrophils and monocytes into inflamed dorsal air pouches. *Int Immunopharm*. 2016; 35: 15–21.
- 37) Adachi H, Nakae K, Sakamoto S, *et al.*: Microbial metabolite and derivatives targeted at inflammation and bone diseases therapy: chemistry, biological activity and pharmacology. *J Antibiot*. 2018; 71: 60–71.
- 38) Naparstek Y, Cohen I, Fuks IR, Vlodavsky I: Activated T lymphocytes produce a matrix-degrading heparan sulphate endoglycosidase. *Nature*. 1984; 310: 241–4.
- 39) Maltzner Y, Bar-Ner M, Yahalom J, Isha-Michaeli R, Fucks Z, Vlodavsky I: Degradation of heparan sulfate in the subendothelial extracellular matrix by a readily released heparanase from human neutrophils. Possible role in invasion through basement membranes. *J Clin Invest*. 1985; 76: 1306–13.
- 40) Komatsu N, Waki M, Sue M *et al.*: Heparanase expression in B16 melanoma cells and peripheral blood neutrophils before and after extravasation detected by novel anti-mouse heparanase

- monoclonal antibodies. *J Immunol Methods*. 2008; 331: 82–93.
- 41) Li JP, Vlodavsky I: Heparin, heparan sulfate and heparanase in inflammatory reactions. *Throm Haemost*. 2009; 102: 823–8.
- 42) Patel AR, Ritzel R, McCullough LD, Liu F: Microglia and ischemic stroke: a double-edged sword. *Int J Physiol Pathophysiol*. 2013; 5: 73–90.
- 43) Taylor RA, Sansing LH: Microglial responses after ischemic stroke and intracerebral hemorrhage. *Clin Dev Immunol*. 2013; 2013: 178–88.
- 44) Benakis C, Garcia-Bonilla L, Iadecola C, Anrather J: The role of microglial and myeloid immune cells in acute cerebral ischemia. *Front Cell Neurosci*. 2014; 8: 461–76.
- 45) Rosenberg GA: Neurological diseases in relation to the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012; 32(7): 1139–51.
- 46) Rivara S, Milazzo FM, Giannini G: Heparanase: a rainbow pharmacological target associated to multiple pathologies including rare diseases. *Future Med Chem*. 2016; 8: 647–80.

Gem-diamine 1-*N*-iminosugars as new versatile glycomimetics: synthesis, biological and pharmacological activity, and therapeutic potential

Yoshio Nishimura

Institute of Microbial Chemistry

Iminosugars, carbohydrate analogues that have a nitrogen atom in place of the carbohydrate ring oxygen atom, have attracted increasing interest as new glycomimetics. *Gem*-diamine 1-*N*-iminosugars, proposed by us as a new class of iminosugars, have a nitrogen atom in place of the anomeric carbon. Various kinds of 1-*N*-iminosugars have been synthesized from glyconolactones as a chiral source by the versatile synthetic strategy in a stereospecific fashion and/or by the convergent strategy from siastatin B, a secondary metabolite of *Streptomyces*. The protonated form of the 1-*N*-iminosugar mimics the charge at the anomeric position in the transition state of enzymatic glycosidic hydrolysis, resulting in the strong and specific inhibition for glycosidases and glycosyltransferases. They have recently been recognized as a new source of therapeutic drug candidate in a wide range of diseases associated with the carbohydrate metabolism of glycoconjugates such as tumor metastasis, influenza virus infection, inflammatory disease and so forth. This review describes our research progress in synthesis, biological and pharmacological activity, and the therapeutic potentials of *gem*-diamine 1-*N*-iminosugar (*gem*-diamine 1-azasugar).