

平成 21 年度 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 研究成果報告書

ドラッグラショナル研究開発センター（プロジェクト2）

研究プロジェクト名：退行期疾患治療における天然薬物素材の評価・開発と精密化学を基盤とした創薬研究

研究代表者及び分担者：

| 研究室名      | 職名  | 氏名    | 研究の役割分担                                      |
|-----------|-----|-------|--|
| 天然医薬品化学   | 教授  | 竹谷 孝一 | 研究統括、退行期疾患を指向した新規天然薬物素材の探索・アナログ合成            |
| 漢方資源応用学   | 教授  | 三巻 祥浩 | 退行期疾患を指向した漢方系生薬・伝承薬からの新規抗腫瘍及び抗酸化活性物質の探索と構造解析 |
| 有機合成化学    | 教授  | 田口 武夫 | 退行期疾患を指向したフッ素の特異性を基盤とする酵素阻害剤の分子設計と合成法の開発     |
| 薬品化学      | 教授  | 林 良雄  | 退行期疾患を指向した含窒素生物活性天然物およびアナログの合成               |
| 生物分子有機化学  | 准教授 | 宮岡 宏明 | 退行期疾患を指向した海洋生物由来の生物活性物質の探索と化学合成              |
| 分子機能解析学   | 教授  | 横松 力  | 退行期疾患を指向した特異的酵素阻害剤の分子設計と合成                   |
| 病態生理学     | 教授  | 市田 公美 | 退行期疾患関連物質 D-アミノ酸に対する生体の応答                    |
| 内分泌・神経薬理学 | 教授  | 立川 英一 | 退行期疾患に対する薬物作用の評価                             |

研究成果の概要：

本研究は高齢化医療での退行期疾患治療薬創製の種となる化合物の探索・合成・評価法開発を目的とする。

天然物化学領域グループでは抗腫瘍活性環状ペプチド RA-VII の 3 箇所のアラニン残基のすべての NH 基を *N*-メチル化した化合物、D-Ala-1, Ala-4 残基だけを *N*-メチル化した化合物を合成して配座構造解析と細胞毒活性の関係を考察した。また、*R. cordifolia* の根より新たに単離された新規構造のシクロジチロシン構造を有する環状ペプチドの絶対配置を決定するための全合成を行った。また、*Anemone hupehensis* var. *japonica*、*Furcraea foetida* の細胞毒性活性成分の探索を行い、6 種の新規化合物を含む合計 23 種の化合物を単離・構造決定し、それらの HL-60 白血病細胞に対する細胞毒性活性を評価した。また、昨年度 *Agave utahensis* より単離した 5β-spirostan 配糖体の細胞毒性活性はアポトーシスの誘導によることが示された。海綿由来のメロジテルペノイド stronglyloporine-16 は卵巣明細胞癌 (ES2 細胞株) に対して 5 nM から 500 nM の濃度間で用量依存的に増殖を阻害することを見出した。また、海綿 *Acanthella* sp. より単離されたジテルペノイドであり、抗マラリア活性を有する海産ジテルペノイド kalihinol A の初めての全合成を達成した。

分子設計・合成領域グループでは微小管を標的にした抗腫瘍薬化合物 Plinabulin (NPI-2358, Phase II) 及びその誘導体 KPU-244 の化学構造を基に、Plinabulin の約 30 倍強力な活性を示す化合物 KPU-133 および-146 の創製に成功した。また、カルボキシル基と水酸基の 2 つの極性官能基を有する水溶性補助基構造を付与した水溶性プロドラッグの合成に成功した。また、(1) フルオロ

アルケン類の合成では触媒と基質の精緻な設計に基づく脱フッ素アリル置換反応の開発で成果を挙げた。(2) TFAE を合成素子として用いた新規なジフルオロメチレン化合物合成法を確立した。

(3) シリル求核種を用いた有機合成化学的に重要な炭素-炭素結合形成反応に極めて有用な新規な炭素酸触媒の開発に成功した。一方、プロテアーゼ阻害剤のリードジェネレーションを指向して Leu-Pro 型ホスフィニルジペプチドイソスター (Leu-Pro 型 PDIs) の不斉合成を中心に研究を展開させ、アミノ-H-ホスフィナート誘導体とトリフラートの Pd 触媒下のクロスカップリング反応を利用して Leu-Pro 型 PDIs の基本骨格を立体選択的に構築した。

代謝、薬効評価領域グループでは、退行期疾患や抗癌剤の副作用抑制効果が指摘されている D-アミノ酸の体内動態制御システムの解明を目的に研究を遂行している。本年度は腎毒性物質の可能性が指摘されている D-セリンの腎障害発症機序について検討した。D-セリン代謝物の 3-ヒドロキシピルビン酸が毒性本体との仮説を証明できなかったが、シスプラチンの腎毒性をセレノメチオン光学異性体が抑制する効果を明らかにした。一方、卵巣がんで発現が高進しているスタスミンが、VEGF 発現調節に関わる mTOR 経路とリンクし、がんの生存に有利に働いている可能性を示唆した。新規テルペノイド化合物の抗腫瘍活性が *in vivo* でも発揮されることを確認した。また、プロテアーゼ活性化受容体を介したサイトカイン生成が子宮内膜症の進行に寄与する可能性並びに子宮の妊娠準備機構に Epac が仲介する cAMP シグナル伝達経路が関与する可能性を示唆した。

# 天然薬物素材の探索と活性物質の構造解明：抗腫瘍活性環状ペプチド・関連化合物のアナログ合成

竹谷 孝一（天然医薬品化学教室・教授）

## 1. 当初の研究目標

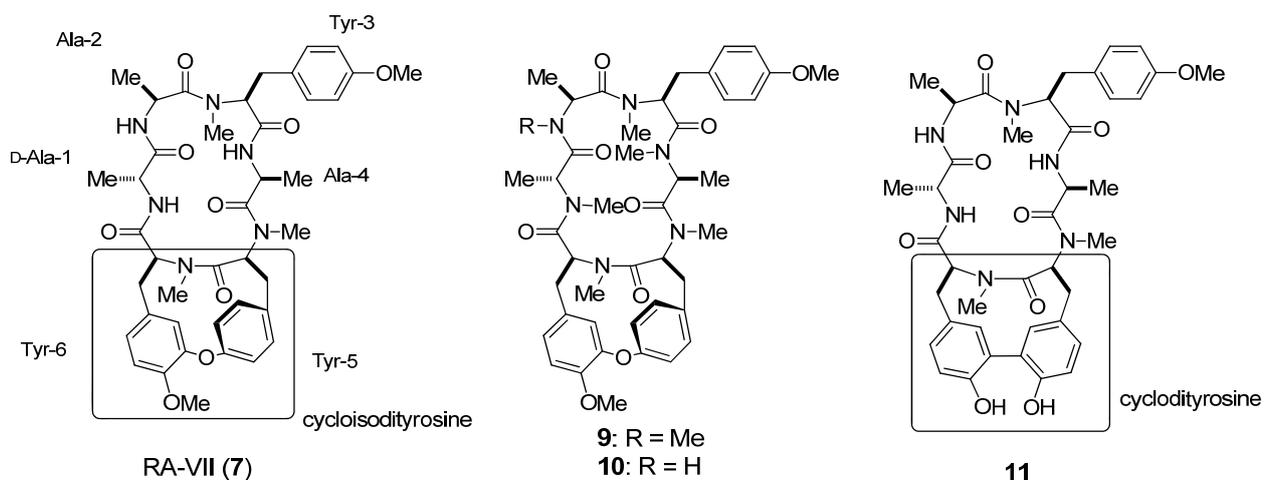
加齢とともに発病頻度が高くなる退行期疾患のうち、癌，リュウマチなどにターゲットを絞り、民間伝承天然薬物素材を中心に活性物質の探索，構造解明を行っていくとともに得られた活性化合物については各種アナログ合成を行い，構造活性相関的研究を構築してゆき，新規シズ分子を設計してゆく。研究対象化合物は、すでに当研究室でアカネ *Rubia cordifolia*、*R. akane* の根の抽出エキスより単離・構造決定した抗腫瘍性環状ヘキサペプチド **RA-VII** とその関連ペプチド類（**RA** 類）をベースとし、その強い抗腫瘍活性と特異な環状イソジチロシン構造、さらに 80S リボソームに結合する蛋白質合成阻害の新しいタイプの抗腫瘍活性物質でアクチンにも作用する特異な活性発現機構を有するものであることより、**RA** 類の特長を生かすアナログに焦点を絞り化合物の創製を目的に研究を進めている。本研究では、環状ヘキサペプチド **RA** 類をリード化合物として、臨床で通用する抗腫瘍性医薬品を創製することであり、各種の化学修飾体をデザイン合成して活性知見データの構築に努める。得られた各種 **RA** 誘導体と抗腫瘍活性の結果については、各種構造活性相関プログラムを用いるコンピューターシミュレーションにより、より精密なコンピューター薬物設計のためのデータを構築し、ドラッグデザインへと発展させていく。また、**RA-VII** の生合成を基盤とするゲノム創薬の基礎的研究の確立をはかる。

一方、天然薬物素材である薬用植物治験知識をもとに、新規な構造で、新規な生理作用機序を有する化合物の探索を行い，医薬品創製研究のシード化合物発見にも平行して努めていく。生物検定を指標とした各種の分離・精製法により新規抗がん性医薬品を見出すため、抗腫瘍性高等植物からの新規活性成分を明らかにしていくとともに、各種の高等植物の生理活性スクリーニングを継続してゆき、薬用資源植物の発掘にも努める。

## 2. 研究成果の概要

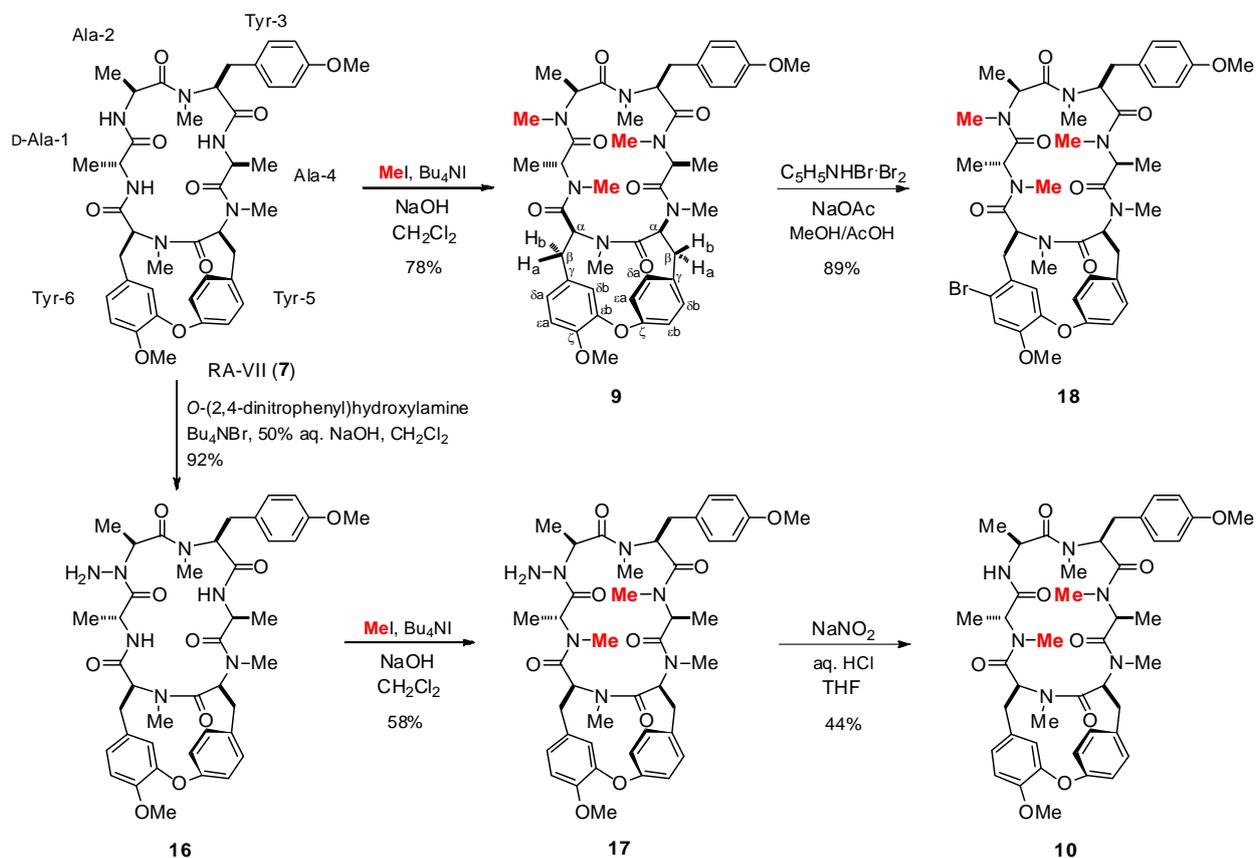
アカネ科 *Rubia* 属植物（アカネ *R. akane*、*R. cordifolia* 等）の根より、抗腫瘍活性を示す二十余种の **RA** 系化合物が単離されている。その中でも、**RA-VII (7)** は特に強い抗腫瘍活性を示す化合物で、その活性発現機構は 80S リボソームに結合することにより、蛋白質の合成を阻害することによると考えられている。また、最近ではアクチンにも作用することが明らかにされている。**RA-VII (7)** は以前制がん剤として臨床試験が行われていたが、毒性が強いこと、水溶性が低いために製剤化が困難である等の理由により、開発が中断されている。これらの問題を解決した **RA** アナログを合理的にデザインするためには、**RA** 類の詳細な構造－活性相関情報の収集が不可欠となっている。以前、当研究室において、**RA-VII (7)** の 3 箇所のアラニン残基のすべての **NH** 基を *N*-メチル化した化合物 **9** を合成しているが、今回、**D-Ala-1**、**Ala-4** 残基だけを *N*-メチル化した化合物 **10** を合成して配座構造解析を行った。また、当研究室で、*R. cordifolia* の根より新たに単離さ

れた新規構造のシクロジチロシン構造を有する化合物 **11** の絶対配置を決定するために、その全合成を試みた。



### (1) RA-VII (7) のペンタ-*N*-メチルアナログの合成と配座構造

RA-VII (7) は溶液中において、ペプチド結合の *cis* / *trans* 異性に由来する 2~3 種の配座異性体の混合物として存在する。そのうち Tyr-5 / Tyr-6 間が *cis* 配置、他の 5 箇所のペプチド結合が *trans* 配置をとる配座構造が最も安定であり、D-Ala-1 C=O / Ala-4 NH 間および Ala-4 C=O / D-Ala-1 NH 間の分子内水素結合により安定化されている。Ala-2 残基のアミド水素をそのまま残し、分子内水素結合に参与する D-Ala-1 および Ala-4 残



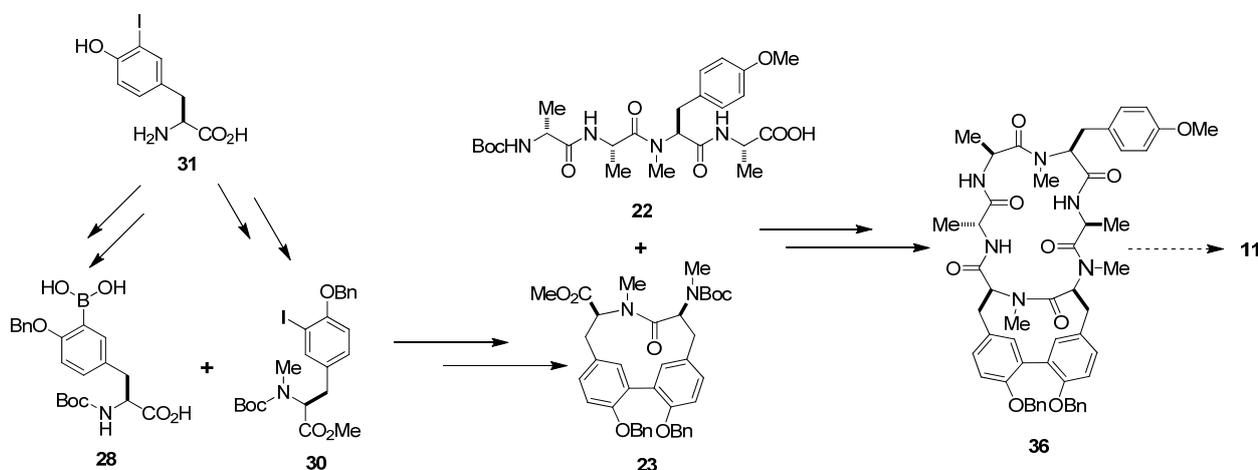
基の NH 基を *N*-メチル化した化合物 **10** を合成することにした。最も反応性の高い Ala-2 残基のアミド窒素原子をアミノ基で保護 (**16**) し、相間移動触媒存在下、水酸化ナトリウム粉末とヨウ化メチルにより *N*-メチル化 (**17**) を行い、脱保護して化合物 **10** を得た。重クロロホルム溶液中の NMR スペクトルにおいて、化合物 **10** は 2 種の安定な配座異性体の混合物として観測された。主配座異性体 (存在比 97%) の構造は、X 線結晶解析により得られた結晶中の構造に一致した。一方、化合物 **10** は化合物 **9** とペプチド骨格の構造は類似するが、Tyr-3 残基の側鎖の配向は大きく異なっていた。

アナログ **9**, **10**, **16**, **17** および臭化物 **18** について P-388 細胞に対する細胞毒性試験を行った。比較のため、RA-VII (**7**) についても同時に評価した。その結果を表 1 に示した。RA-VII と比較して、アナログ **16** は若干の活性の低下が認められたが、アナログ **9**, **10**, **17** および **18** の活性は著しく低下した。アナログ **9**, **10** および **18** の配座構造は RA-VII の活性配座構造 (A 配座) と大きく異なっている。アナログ **10** と臭化物 **18** の結晶構造を RA-II のものと比較すると Tyr-5 及び Tyr-6 の芳香環はほぼ一致するものの、Tyr-3 のそれはかなり空間的に異なる位置に配置することがわかる。そのためにアナログ **9**, **10** および **18** は低い活性を示したと考えられた。

表 1 アナログ RA-VII (**7**), **9**, **10**, **16**, **17**, **18** の P388 白血病細胞に対する細胞毒性

| 化合物                 | 細胞毒性 IC <sub>50</sub> (mg/mL) |
|---------------------|-------------------------------|
| RA-VII ( <b>7</b> ) | 0.0017                        |
| <b>9</b>            | 2.5                           |
| <b>10</b>           | 8                             |
| <b>16</b>           | 0.0045                        |
| <b>17</b>           | 40                            |
| <b>18</b>           | > 100                         |

## (2) *N,N'*-ジメチルシクロジチロシン構造を有する化合物 **11** の合成研究



市販の 3-iodo-L-tyrosine (**31**) より カルボン酸 **28** と *N*-メチルチロシン誘導体 **30** を合成した。これらを縮合させて得られる *N*-メチルジペプチドの分子内 Suzuki-Miyaura カップリング反応によりシクロジチロシン環を形成し、*N*-メチル化して化合物 **23** を得た。

これに別途合成したテトラペプチド **22** を縮合させてヘキサペプチドとしたのち、マクロ環化反応により化合物 **36** を得た。**36** は、高分解能 ESI-MS において  $m/z$  937.4506 に疑似分子イオンピーク  $[M+H]^+$  ( $C_{54}H_{61}N_6O_9$ , 計算値 937.4500) を与えたことより、閉環構造を有していることを確認した。また、天然の化合物 **11** の NOESY スペクトルに於いて観測される Tyr-5  $H_\alpha$ /Tyr-6  $H_\alpha$  間に NOE 相関が観測されることから、閉環反応後に C 末側 Tyr-6 残基の  $\alpha$  位の立体配置が維持されていることを確認した。さらに、天然の化合物 **11** に於いて観測される Ala-2  $H_\alpha$ /Tyr-3 NMe 間、Tyr-3 NMe/Tyr-3  $H_\alpha$  間の相関、および D-Ala-1  $H_\alpha$ /Ala-4 Me 間にも相関が観測された。以上より、化合物 **36** の構造を確認した。

### 3. 研究評価及び今後の研究計画

平成 21 年度の本研究では、前年度に引続き抗腫瘍活性ヘキサ環状ペプチド RA-VII (**7**) のチロシン残基の芳香環部位の構造活性についての知見を得るべく、茜草根よりチロシン残基が修飾された新規アナログを探索するとともに、18 員環部位の配座を固定したアナログの合成、RA-VII (**7**) の 3 箇所のアラニン残基のすべての NH 基を *N*-メチル化した化合物 **9**、D-Ala-1, Ala-4 残基だけを *N*-メチル化した化合物 **10** を合成した。そして、NMR スペクトルおよび X 線結晶解析により配座構造を解析したところ、化合物 **10** のペプチド骨格の構造は、天然由来の RA 類がとり得るどの配座とも一致しない、ユニークなものであった。また、結晶構造を RA-II のものと比較すると、Tyr-3 の芳香環はかなり空間的に異なる位置に配置することがわかった。そのために、低い細胞毒活性しか示さないものと考えられる。

最近茜草根より単離されたシクロジチロシン構造を有する新規環状ヘキサペプチド **11** の絶対構造を証明することを目的に全合成研究を行った。市販の 3-iodo-L-tyrosine より Boc-3-iodo-*N*-methyl-L-Tyr(Bn)-OMe (**30**) とカルボン酸 **28** を合成した。これらをカップリングさせた後、分子内 Suzuki-Miyaura カップリング反応を行い、シクロジチロシン骨格を合成した。*N*-メチル化の後、数工程を経て環化体 **36** へ誘導することができた。化合物 **36** を脱 *O*-ベンジル化すれば、化合物 **11** の合成が完了する。

これまでの配座構造の研究から、RA-VII (**7**) は溶液中で 2~3 種の安定な配座異性体の混合物として存在し、そのうち活性を示す配座構造では、18 員環部位において Tyr-5/Tyr-6 間のペプチド結合が *cis* 配置、それ以外の 5 か所のペプチド結合が *trans* 配置を有していることが明らかとなっている。この構造は D-Ala-1 残基のカルボニル酸素原子と Ala-4 残基のアミド水素原子との間で水素結合を形成して部分的に安定化されているが、18 員環ペプチド骨格を種々修飾すると、いずれもその配座構造が大きく変化して活性が低下することが示されている。従って、活性配座を維持するためには 18 員環部位の配座構造の固定化が効果的と考えられる。そこで、RA-VII (**7**) と同様に、シクロイソジチロシン構造を有し、かつ残基 1、残基 4 の間でブリッジを形成して 18 員環の配座構造を固定した 3 環性アナログをデザインし、本アナログが強い活性を示せば、18 員環部位の活性配座構造を維持しつつ、各部位を多様に修飾したアナログのデザインが可能になると考え、研究を進めている。本研究において残基 1、残基 4 の間での閉環反応はオレフィンメタセシス反応で進行することを確認しているため、今後は、3 環性アナ

ログの合成を完了させ、配座構造の解析、細胞毒性試験を行い、詳細な構造活性相関情報を得たい。

本研究では、茜草根（アカネ科植物アカネ *Rubia akane*, *R. cordifolia* の根）より単離された、強力な抗腫瘍活性をもつペプチド化合物 RA-VII を制がん剤として開発するための構造活性情報の収集を目的とした活性配座構造の固定化、および水溶性の改善を指向したアナログのデザインと合成を試みた。

また、RA アナログ合成における出発原料を市場生薬の茜草根より単離、精製して用いているが、その含有量がロット、ロットによってバラツキが大きいため、今後、簡便に RA 類の含量がチェックできる方法とその生合成経路等を解明する一手段として抗腫瘍活性環状ヘキサペプチド RA 類に対するモノクローナル抗体(MAb)作製を試み、詳細な抗体による ELISA 法での RA 類の定性・定量応用を検討するとともに精密な構造活性相関構築のためのアナログ合成を計画していく。

#### 4. 研究成果の公表

##### 原著論文

- (1) Sallam, A.A., Hitotsuyanagi, Y., Mansour, El-S.S., Ahmed, A.F., Gedara, S., Fukaya, H., Takeya, K.  
Phenylpropanoid triesters from *Daucus glaber*  
*Phytochemistry Letters*, **2**, 188-191 (2009)
- (2) Aoyagi, Y., Adachi, Y., Akagi, A., Ohno, N., Takeya, K.  
First asymmetric synthesis of CJ-14877 and its enantiomer and their interleukin-1beta inhibitory activities  
*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 1876-1878 (2009)
- (3) Mohamad, K., Hirasawa, Y., Litaudon, M., Awang, K., Hadi, A.H.A., Takeya, K., Ekasari, W., Widyawaruyanti, A., Zaini, N.C., Morita, H.  
Ceramicines B-D, new antiplasmodial limonoids from *Chisocheton ceramicus*  
*Bioorg. Med. Chem.*, **17**, 727-730 (2009)

##### 総説

- (1) 竹谷孝一  
生薬の抗腫瘍活性を持つ成分の解析  
*臨床検査*, **53**(8), 899-907 (2009)

##### 国際学会発表

- (1) Takeya k., Aoyagi Y., Yamazaki A., Nakatsugawa C., Fukaya H., Kawauchi S., Izumi H  
Absolute Structures of Salvileucalin A and B from *Salvia leucantha* Cav.  
57th International Congress & Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, 2009年8月, Geneva, Switzerland
- (2) Takeya, K.  
Antitumor Substances from Higher Plants ----Antitumor Cyclic Hexapeptides from *Rubia cordifolia*

国内学会発表

- (1) 中里 豊、山崎 朗、深谷 晴彦、青柳 裕、竹谷 孝一  
*Salvia leucantha* から得られる新規ネオクレロダン型ジテルペンの単離  
日本薬学会第129年会, 2009年3月, 京都
- (2) 佐藤公彦, 菅原慧人, 竹内浩乃, 稲葉靖典, 青柳 裕, 朴 炫宣, 竹谷孝一,  
秋山敏行, 小山鐵夫  
イヌマキから得られるノルジテルペン類の構造と活性に関する研究  
日本薬学会第129年会, 2009年3月, 京都
- (3) 久保泰裕, 蓮田知代, 代田 修, 関田節子, 竹谷孝一  
幻覚性ジテルペン *Salvinorin A* をハプテンとする抗原の合成及びモノクローナル  
抗体の作製  
日本薬学会第129年会, 2009年3月, 京都
- (4) 一柳幸生, 武田絵里加, 竹谷孝一  
タチビャクブより得られた新規アルカロイド *sessilifoliamine A* の構造  
日本薬学会第129年会, 2009年3月, 京都
- (5) 富士原浩次, 高橋良直, 相山律男, 松崎健, 橋本秀介, 青柳裕, 竹谷孝一  
抗トリパノソーマ活性を有する *komaroviquinone* の合成研究  
日本薬学会第129年会, 2009年3月, 京都
- (6) 中里 豊, 山崎 朗, 深谷晴彦, 青柳 裕, 竹谷孝一  
*Salvia leucantha* から得られる新規ネオクレロダン型ジテルペンの単離と構造決  
定  
日本生薬学会 第56回年会, 2009年10月, 京都
- (7) 植村 剛, 一柳幸生, 竹谷孝一  
タチビャクブより得られた新規ステモナアルカロイドの構造  
日本生薬学会 第56回年会, 2009年10月, 京都
- (8) 草野淳一, 伊藤聡大, 一柳幸生, 竹谷孝一  
茜草根より単離した新規 RA 系環状ヘキサペプチド化合物の構造  
日本生薬学会 第56回年会, 2009年10月, 京都
- (9) 加藤沙織, 小田切増美, 一柳幸生, 竹谷孝一  
抗腫瘍性ペプチド *RA-VII* のシクロイソジチロシン修飾アナログ  
日本薬学会第130年会, 2010年3月, 岡山
- (10) 草野淳一, 伊藤聡大, 一柳幸生, 竹谷孝一  
茜草根より単離した新規 RA 系ペプチド配糖体について  
日本薬学会第130年会, 2010年3月, 岡山
- (11) 中里 豊, 山崎 朗, 深谷晴彦, 青柳 裕, 竹谷孝一  
*Salvia leucantha* から単離された新規ネオクレロダン型ジテルペンの構造  
日本薬学会第130年会, 2010年3月, 岡山

- (12) 植村 剛, 塩田千紘, 角田大地, 一柳幸生, 竹谷孝一  
タチビャクブより得られた新規ステモナルカロイドの構造  
日本薬学会第130年会, 2010年3月, 岡山
- (13) 蓮田知代, 一柳幸生, 竹谷孝一  
抗腫瘍性ヘキサペプチド RA-V をハプテンとするモノクローナル抗体の作成  
日本薬学会第130年会, 2010年3月, 岡山
- (14) 久保泰裕, 蓮田知代, 山崎 朗, 青柳 裕, 代田 修, 関田節子, 竹谷孝一  
幻覚性ジテルペン salvinorin A に対するモノクローナル抗体の差1区政及びその  
応用  
日本薬学会第130年会, 2010年3月, 岡山
- (15) 富士原浩次, 高橋良直, 山崎 朗, 相山律男, 松崎 健, 橋本秀介, 青柳  
裕, 竹谷孝一  
シソ科植物由来ジテルペンを用いた抗原虫薬の開発研究  
日本薬学会第130年会, 2010年3月, 岡山
- (16) 安藤智教, 船川絵美子, 吉田圭司郎, 志村 進, 栗山裕佑, 川合溪剛, 奈邊  
健, 河野茂勝  
ユソウボク抽出物 (*Guaiacum officinale* L.) のロイコトリエン産生ならびにアレルギー性鼻炎に及ぼす影響  
日本薬学会第130年会, 2010年3月, 岡山

# 漢方系生薬・伝承薬に着目した新規抗腫瘍及び抗酸化活性物質の探索と構造活性相関

三巻 祥浩（漢方資源応用学教室・教授）

## 1. 当初の研究目標

少子高齢化社会を迎え、退行期疾患の予防・治療薬の開発は重要かつ急務な問題である。骨粗鬆症やアルツハイマー病等に加え、がんは退行期疾患の代表的な疾病である。運動、禁煙、バランスのとれた食生活等の生活習慣の改善によりがんの罹患のリスクを減らすことはできても、完全に予防することは現在のところ不可能であり、早期発見と早期治療が重要である。抗がん剤による化学療法は手術療法、放射線療法とならんで、がんの治療の重要な手段の一つである。現在、日本で肺がんの罹患者が急増しており、特に男性の全がん死亡者における肺がん死亡者が胃がんを抜き1位となっている。がんの化学療法において、非小細胞肺がんを始めとする難治性のがんに対して効果が期待できる薬剤は少なく、新規構造、新規作用機序をもつ抗がん剤の開発が現在でもなお急務な課題である。近年開発されたイリノテカン塩酸塩、タキソテール、タキソールは、現在までに、胃がん、肺がん、乳がん、子宮がん、卵巣がん、大腸がんなど、従来の抗がん剤では有効性が期待できなかった悪性腫瘍に対しても効果をあげている。これらの抗がん剤がいずれも植物成分を起源としていることを考慮すると、植物より新しい作用機序を有し、より有効で副作用の少ない抗がん剤が開発されることが期待される。

本研究では、退行期疾患の代表であるがん治療に有効な新規医薬品のリード化合物を天然資源、特に薬用としての背景がある漢方系生薬・伝承薬およびそれらの近縁植物から探索することを目標とした。天然資源に低分子医薬品のリード化合物を求めることは、人為的には考えの及ばない新規な構造の化合物が得られる可能性がある他、同じ生合成経路で作られた構造類似化合物を同一植物中から効率よく得られる点で大きな意義があると考えられる。単離した化合物の化学構造は、最新の核磁気共鳴（NMR）スペクトルを中心とした非破壊的手法により明らかにする。化学構造の決定後、それぞれの化合物の HL-60 白血病細胞に対する細胞毒性活性試験を行い、50% 細胞増殖抑制濃度（IC<sub>50</sub>）値を求めて構造活性相関について考察する。特に強い活性の認められた化合物については、固形がんに対する作用を評価する。また、活性化合物により誘導される細胞死のメカニズムを細胞の形態的变化ならびに分子生物学的手法により検討する。

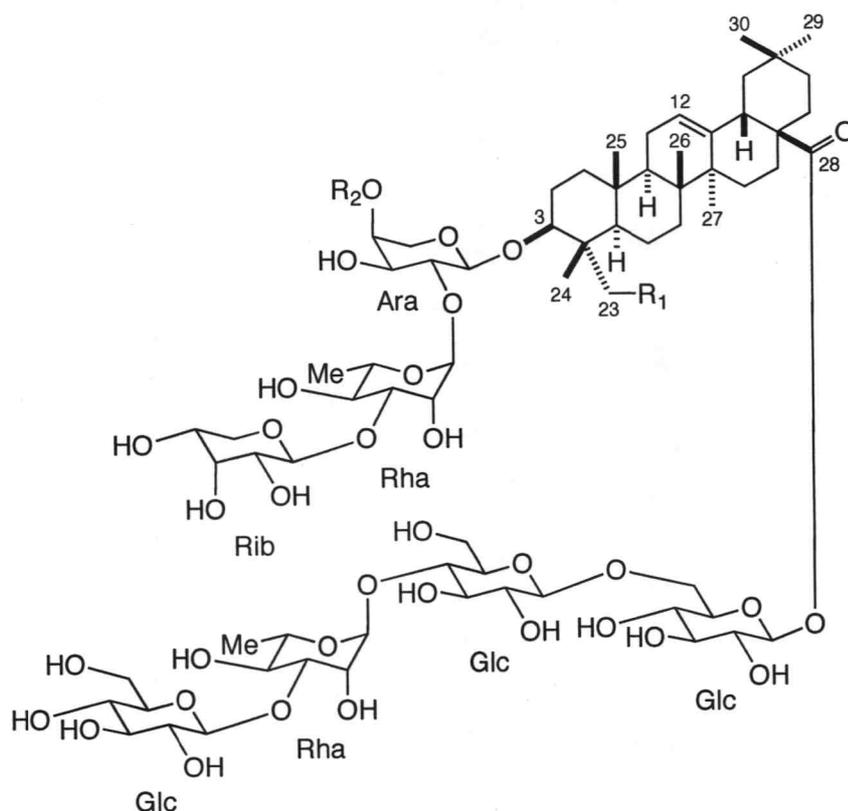
## 2. 研究成果の概要

上記の観点から、本年度は、シュウメイギク（キンポウゲ科 *Anemone hupehensis* var. *japonica*）およびリュウゼツラン科 *Furcraea foetida* を研究対象とし、細胞毒性活性成分の探索を行なった。また、昨年度 *Agave utahensis* より得られたステロイド配糖体のアポトーシス誘導活性について評価した。

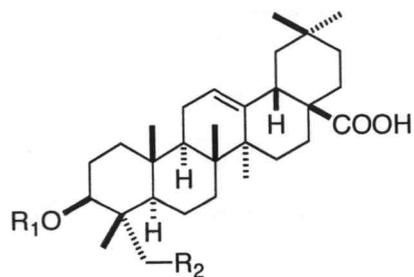
(1) シュウメイギクのトリテルペン配糖体成分と細胞毒性活性

シュウメイギク [*Anemone hupehensis* Lem. var. *japonica* (Thunb.) Bowles et Stearn] は、日本の本州、四国、九州および中国に分布するキンポウゲ科の多年草である。主に観賞用として栽培される他、中国では根が薬用として打撲傷による腫れや消化不良などの治療を目的に用いられる。本植物の原種である *A. hupehensis* からは数種のトリテルペン配糖体が単離されているが、本植物の含有成分に関する詳細な報告はない。

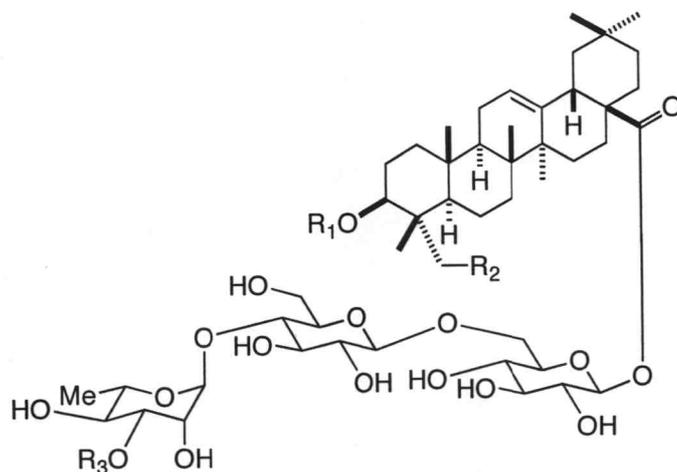
シュウメイギクの全草（乾燥重量 3.3 kg）をメタノール（26 L）で抽出し、減圧下濃縮した。得られた抽出エキス（180 g）を Diaion HP-20 を充填したカラムに付し、30%メタノール、50%メタノール、メタノール、エタノール、酢酸エチルで順次極性を下げながら溶出させ、5画分に分画した。メタノール溶出画分（50 g）について、シリカゲルおよび ODS シリカゲルカラムクロマトにて分離、精製を行った結果、3種の新規トリテルペン配糖体 **1**（45.3 mg）、**2**（6.7mg）、**3**（35.3 mg）、および8種の既知トリテルペン配糖体（**4-11**）が単離された。新規化合物の構造を、高分解能 MASS、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY、HMQC、HMBC、NOESY スペクトルの詳細な検討と加水分解等の化学変換により、それぞれ以下のように決定した。



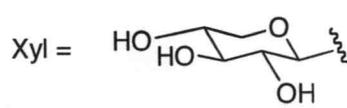
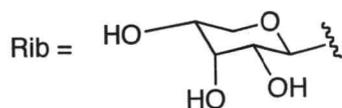
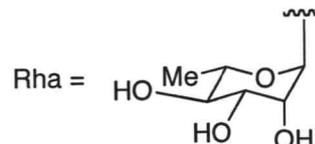
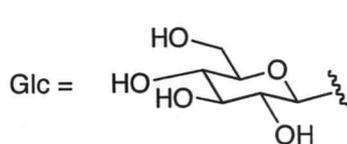
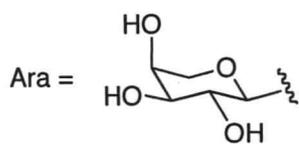
|   | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> |
|---|----------------|----------------|
| 1 | H              | H              |
| 2 | H              | Glc            |
| 3 | OH             | H              |



|   | $R_1$                   | $R_2$ |
|---|-------------------------|-------|
| 4 | Rib-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara | H     |
| 5 | Rib-(1→3)-Rha-(1→2)-Xyl | H     |
| 6 | Rib-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara | OH    |



|    | $R_1$                   | $R_2$ | $R_3$                   |
|----|-------------------------|-------|-------------------------|
| 7  | H                       | H     | H                       |
| 8  | Rib-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara | H     | H                       |
| 9  | Ara                     | OH    | H                       |
| 10 | Rib-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara | OH    | H                       |
| 11 | Rib-(1→3)-Rha-(1→2)-Ara | OH    | Rha-(1→4)-Glc-(1→6)-Glc |



化合物 1-11 および oleanolic acid の HL-60 ヒト細胞に対する細胞毒性活性を評価したところ、4-6 に活性が認められ、IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 3.1 μM、2.3 μM、5.7 μM であった。構造活性相関について考察したところ、アグリコンが oleanolic acid で、その 3 位に 3 個の単糖からなる糖鎖が結合したモノデスマシド型トリテルペン配糖体の 4 と 5 は、比較的強い活性を示した (IC<sub>50</sub> 3.1、2.3 μM)。化合物 4 のアグリコンの 23 位メチル基が水酸化された構造の 6 では、活性は減弱した。化合物 4 のアグリコンである oleanolic acid、および oleanolic acid の 28 位のカルボキシ基に糖鎖の結合した 7 には活性は認められなかった。また、4 の 28 位のカルボキシ基に糖鎖が結合したビスデスマシド型配糖体の 8 には活性が認められなかった。

活性の認められた 4-6 について、さらに A549 ヒト肺腺がん細胞、HSC-2 および HSC-4 ヒト口腔扁平上皮がん細胞に対する細胞毒性活性を評価した。その結果、4 および 5 は A549、HSC-2 細胞に対して IC<sub>50</sub> 1.5-5.9 μM と比較的強い活性を示したが、HSC-4 細胞に対する活性はそれぞれ IC<sub>50</sub> 13.0、11.7 μM と低い傾向にあった。化合物 6 の A549 および HSC-2 細胞に対する IC<sub>50</sub> はそれぞれ 9.6、16.3 μM であり、HSC-4 細胞に対しては活性を示さなかった (IC<sub>50</sub> > 20 μM)。

## (2) *Furcraea foetida* のステロイド配糖体成分と細胞毒性活性

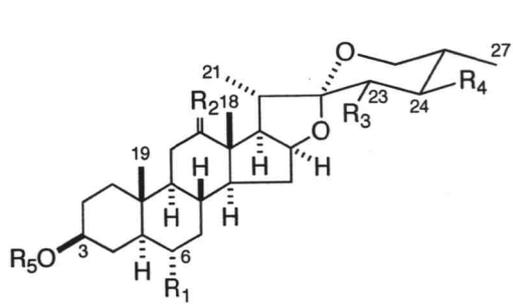
*F. foetida* は南アメリカ北部に分布するリュウゼツラン科の常緑多年草である。本植物の含有成分については 1 種のステロイド配糖体 (furcreastatin) の単離報告があるに過ぎない。今回、*F. foetida* に含まれる新規細胞毒性活性成分の探索を行った。

*F. foetida* の葉 (生重量 13 kg) をメタノール (30 L) で 2 回抽出し、減圧下濃縮した。得られた抽出エキス (1.0 kg) を Diaion HP-20 を充填したカラムに付し、30%メタノール、50%メタノール、メタノール、エタノール、酢酸エチルで順次極性を下げながら溶出させ、5 画分に分画した。メタノール溶出画分について、シリカゲルおよび ODS シリカゲルカラムクロマトにて分離、精製を行い、3 種の新規ステロイド配糖体 1 (8.8 mg)、2 (2.3 mg)、3 (22 mg)、および 9 種の既知ステロイド配糖体 (4-12) を単離した。これらの化合物の構造を、高分解能 MASS、<sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR、<sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY、HMQC、HMBC、NOESY スペクトルの詳細な検討と加水分解等の化学変換により、以下のように決定した。

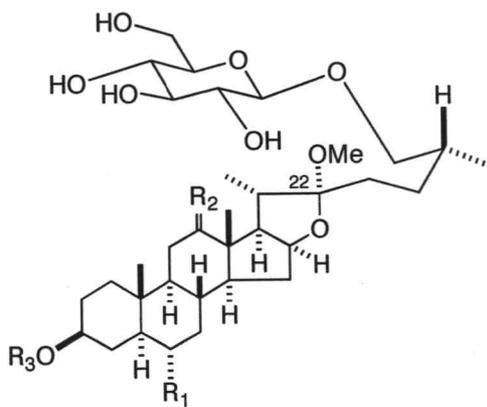
化合物 1-12 の HL-60 細胞に対する細胞毒性活性を評価したところ、4、5、10 に活性が認められ、IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 3.5 μM、3.5 μM、5.0 μM であった。化合物 4 と 5 は、アグリコンの 3 位に 6 個の単糖からなる糖鎖が結合した spirostan 配糖体であり、比較的強い活性を示した (両者ともに IC<sub>50</sub> は 3.5 μM)。化合物 4 の 6α 位に水酸基の導入された 6 には活性が認められなかった。化合物 10 は、アグリコンの 3 位に 6 個の単糖からなる糖鎖が結合した furostan 配糖体であり、比較的強い活性が認められた (IC<sub>50</sub> 5.0 μM)。化合物 10 の 6α 位に水酸基が、あるいは 12 位にカルボニル基が導入されることにより活性は消失した。

活性の認められた 4、5、10 について、A549 細胞、HSC-2 および HSC-4 細胞に対する細胞毒性活性を評価した。その結果、4 と 5 は A549、HSC-2 および HSC-4

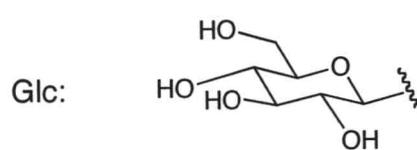
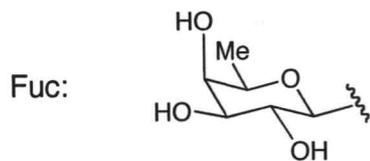
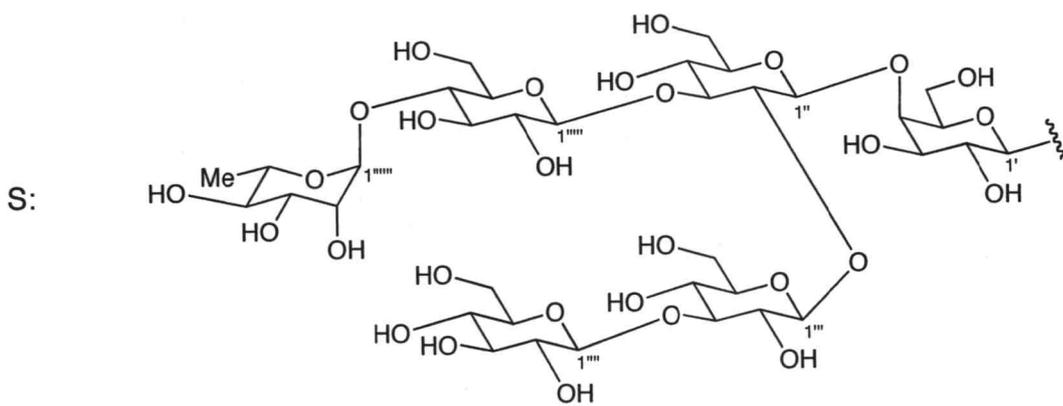
細胞に対して IC<sub>50</sub> 1.4-4.6 μM の比較的強い活性を示した。化合物 **4** のプロト体に相当する furostan 配糖体 **10** は、今回試験を行った全ての細胞種に対して **4** と同様の強い活性を示した。



|   | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> | R <sub>4</sub> | R <sub>5</sub> |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 1 | H              | H,H            | H              | -O-Glc         | S              |
| 2 | -O-Glc         | H,H            | OH             | H              | Fuc            |
| 4 | H              | H,H            | H              | H              | S              |
| 5 | H              | O              | H              | H              | S              |
| 6 | OH             | H,H            | H              | H              | S              |
| 7 | -O-Glc         | H,H            | OH             | H              | H              |
| 8 | -O-Glc         | H,H            | H              | H              | Glc            |
| 9 | -O-Glc         | H,H            | OH             | H              | Glc            |



|    | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> | R <sub>3</sub> |
|----|----------------|----------------|----------------|
| 3  | OH             | H,H            | S              |
| 10 | H              | H,H            | S              |
| 11 | H              | O              | S              |
| 12 | -O-Glc         | H,H            | Glc            |



(3) *Agave utahensis* から得られたステロイド配糖体のアポトーシス誘導活性

昨年度、リュウゼツラン科 *A. utahensis* の全草から単離され、HL-60 細胞に対して細胞毒性活性を示した 5 $\beta$ -spirostan 配糖体 (1-3) について、細胞死の形態を位相差顕微鏡により評価した。その結果、20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で 1 もしくは 3 を接触させた HL-60 細胞に、アポトーシスの誘導を示唆する形態的变化 (核クロマチンの凝集) が観察された。そこで、1 を 18 時間接触させた HL-60 細胞から DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動を行った結果、アポトーシス細胞に特徴的な DNA の断片化が観測された (図 1)。また、1-3 を 6 時間接触させた HL-60 細胞からタンパク質を抽出し、アポトーシス実行因子である caspase-3 の活性を測定した結果、1 と 3 に活性化が認められた (表 1)。化合物 1 と糖鎖配列のみが異なる 2 には活性化が認められなかった。Spirostan 配糖体の糖鎖構造のわずかな違いが、アポトーシス誘導活性の有無に関与することが示された。

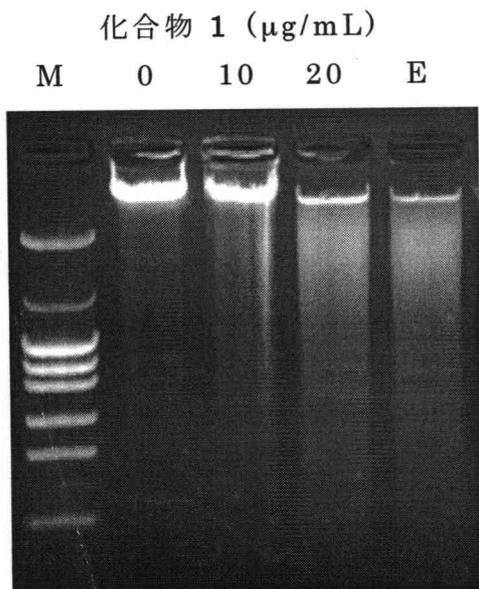
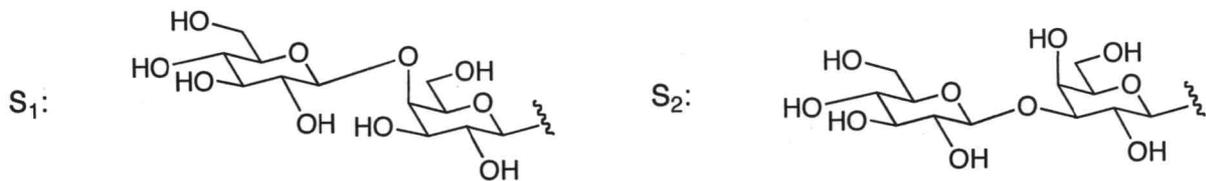
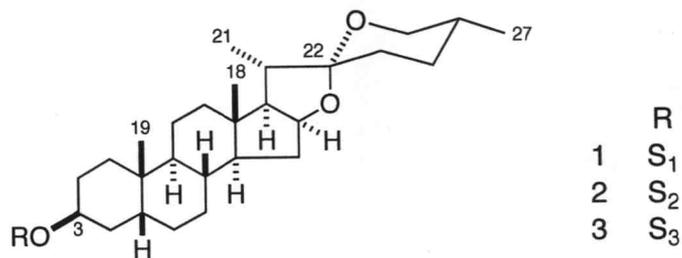


図 1 アガロースゲル電気泳動  
(E : etoposide(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ))

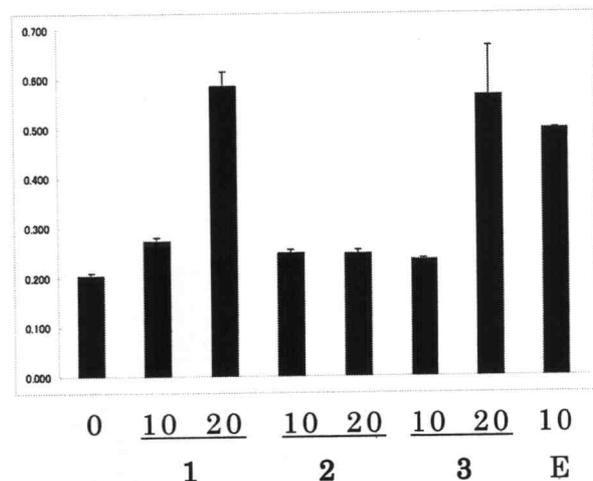


表 1 Caspase-3 活性  
(E : etoposide (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ))

### 3. 研究評価及び今後の研究計画

シュウメイギク (キンポウゲ科 *A. hupehensis* var. *japonica*) およびリュウゼツラン科 *F. foetida* を研究対象とし、細胞毒性活性成分の探索を行なった。また、昨年度リュウゼツラン科 *A. utahensis* より得られたステロイド配糖体のアポトーシス誘導活性について評価した。

シュウメイギクのメタノール抽出エキスから、3種の新規トリテルペン配糖体 (1-3) および 8種の既知トリテルペン配糖体 (4-11) が単離された。化合物 1-11 の HL-60 細胞に対する細胞毒性活性を評価したところ、4-6 に活性が認められ、それらの IC<sub>50</sub> 値は、それぞれ 3.1 μM、2.3 μM、5.7 μM であった。化合物 4-6 はいずれもアグリコンの 28 位にカルボキシ基を有するモノデスモシド型トリテルペン配糖体である。化合物 4 のアグリコンである oleanolic acid、4 の 28 位のカルボキシ基に糖鎖が結合したビスデスモシド型配糖体である 8 は活性を示さなかったことから、4 のアグリコンの 3 位水酸基に結合した糖鎖および 28 位のカルボキシ基の存在が活性の発現に関与していることが示唆された。化合物 4-6 について、A549、HSC-2 および HSC-4 細胞に対する細胞毒性活性を評価した結果、4 と 5 は A549、HSC-2 細胞に対して IC<sub>50</sub> 1.5-5.9 μM と比較的強い活性を示したが、HSC-4 細胞に対する活性はそれぞれ IC<sub>50</sub> 13.0、11.7 μM と低い傾向にあった。化合物 6 の A549 および HSC-2 細胞に対する IC<sub>50</sub> はそれぞれ 9.6、16.3 μM であり、HSC-4 細胞に対しては活性を示さなかった (IC<sub>50</sub> > 20 μM)。これらのトリテルペン配糖体の細胞毒性活性は、細胞種の違いによる感受性の差異が認められ、特に HSC-4 細胞に対しては顕著であった。

リュウゼツラン科 *F. foetida* のメタノール抽出エキスから 3種の新規ステロイド配糖体 (1-3) および 9種の既知ステロイド配糖体 (4-12) が単離された。化合物 1-12 の HL-60 細胞に対する細胞毒性活性を評価したところ、アグリコンの 3 位に 6 個の単糖からなる糖鎖が結合したステロイド配糖体 4、5、10 にそれぞれ IC<sub>50</sub> 3.5 μM、3.5 μM、5.0 μM と比較的強い活性が認められた。化合物 4、5、10 について、A549 細胞、HSC-2 および HSC-4 細胞に対する細胞毒性活性を評価した結果、IC<sub>50</sub> 1.4-4.6 μM と比較的強い活性を示した。化合物 4 のプロト体に相当するフロスタン配糖体 10 は、今回試験を行った全ての細胞種に対して 4 と同様の強い活性を示した。細胞毒性活性を有するフロスタン配糖体はめずらしく、細胞毒性発現メカニズムに興味を持たれる。

シュウメイギクおよび *F. foetida* から得られた細胞毒性活性物質については、作用メカニズムの解明の第一歩として、1) 細胞死がアポトーシス様か、ネクローシス様か、オートファジー様であるのかを位相差顕微鏡により形態学的に判定する、2) アポトーシス様の細胞死を示した場合は、DNA ラダーの検出、caspase-3 の発現を確認することでアポトーシス誘導活性を評価する、3) オートファジー様の細胞死を示した場合は、標的タンパク質である LC3 をウエスタンブロット法により検出し、オートファジー誘導活性を評価する、予定である。

昨年度、リュウゼツラン科植物 *A. utahensis* の全草から単離され HL-60 細胞に対して細胞毒性活性を示した 5β-spirostan 配糖体 (1-3) について、位相差顕微鏡に

よる細胞の形態変化、DNAのアガロースゲル電気泳動およびcaspase-3活性により、アポトーシス誘導活性を評価した。その結果、**1**もしくは**3**を20 µg/mLの濃度で接触させたHL-60細胞にアポトーシスの誘導が認められた。化合物**1**と糖鎖配列のみが異なる**2**には活性化が認められなかった。5β-Spirostan配糖体の糖鎖構造のわずかな違いがアポトーシス誘導活性の有無に関与することが示された。今後は、caspase-8、-9の発現、ミトコンドリア膜電位の変化を確認することで更に詳細なアポトーシスの分子生物学的評価を行う予定である。

#### 4. 研究成果の発表

##### 原著論文

- (1) Akihito Yokosuka, Tomoe Sano, Ken Hashimoto, Hiroshi Sakagami, Yoshihiro Mimaki.  
Triterpene glycosides from the whole plant of *Anemone hupehensis* var. *japonica* and their cytotoxic activity.  
Chemical & Pharmaceutical Bulletin, **57**, 1425-1430 (2009).
- (2) Akihito Yokosuka, Tomoe Sano, Ken Hashimoto, Hiroshi Sakagami, Yoshihiro Mimaki.  
Steroidal glycosides from *Furcraea foetida* and their cytotoxic activity.  
Chemical & Pharmaceutical Bulletin, **57**, 1161-1166 (2009).
- (3) Akihito Yokosuka, Maki Jitsuno, Satoru Yui, Masatoshi Yamazaki, Yoshihiro Mimaki.  
Steroidal glycosides from *Agave utahensis* and their cytotoxic activity.  
Journal of Natural Products, **72**, 1399-1404 (2009).

# フッ素の特異性を基盤とする酵素阻害剤の分子設計と合成法の開発

田口 武夫（有機合成化学教室・教授）

## 1. 当初の研究目標

有機フッ素化合物はフッ素の特異的な性質に基づくユニークな性質を有する例が多数知られており、とくに生理活性や材料物性の面で重要性が広く認識されている。本研究は医薬品など生理活性物質の精密化学的研究の一環として、生体関連物質や生理活性物質のフッ素による化学修飾を基盤とする薬理効果の発現や増強あるいは作用選択性の向上など応用面への展開を指向して、効率的な合成法の開発および生理活性物質の分子設計におけるフッ素導入の基本的な考え方の構築を目的とするものである。

さらに、効率的な合成法の開発では、有機合成化学的に重要な炭素—炭素結合形成反応の効率化を目的として、フッ素系置換基の特性に着目した新規な Lewis 酸触媒や Brønsted 酸触媒の開発およびフッ素化合物合成への適用を検討する。

これまでの研究成果を踏まえて下記を当初の研究目標として展開する。

- (1) ペプチドミメティクスを指向したフルオロアルケン誘導体の合成法の開発
- (2) トリフルオロアセトアルデヒド *N,O*-アセタールを用いる有用なフッ素化合物の合成法の開発
- (3) 新規な Brønsted 酸触媒の開発を基盤とする効率的合成反応の開発
- (4) 酵素阻害活性を指向したフッ素置換アルケニルエステル類の合成と反応性に関する検討

## 2. 研究成果の概要

上記の当初の研究目標に沿って研究を行い、下記に示す成果を達成した。

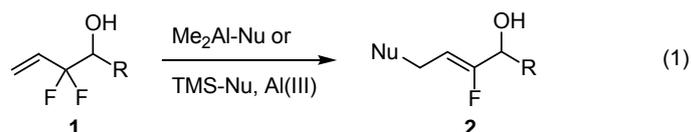
### (1) ペプチドミメティクスを指向したフルオロアルケン誘導体の合成法の開発

本研究テーマは当研究室においてここ数年来取り組んで来たものであり、これまでの成果を踏まえて継続的に検討を加えた。

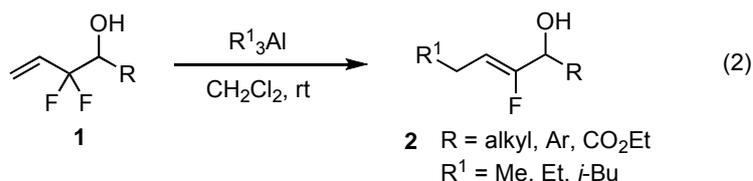
一般にペプチドは生体内の酵素によりアミド結合の加水分解を受けるため、生理活性ペプチドを医薬品として直接用いることは困難な場合が多い。この問題点に対して、フルオロオレフィン（FO）はアミド結合との類似性のため、アミド結合の理想的なミミックと考えられている。一方、FO はアミド結合と異なり生体内でプロテアーゼなどの酵素による加水分解に対して安定である。さらに、FO の炭素—炭素二重結合には回転自由度がない点もアミド結合と大きく異なる性質である。このような FO の特性に着目して、生理活性ペプチド内の特定のアミド結合を FO に置き換えて、*in vivo* で加水分解酵素に対する抵抗性の付与や疎水性の制御あるいはペプチドの活性配座の解析など、ペプチド系生理活性物質についての基礎的研究と医薬品を指向した応用展

開が注目されている。従って、効率的な合成法の開発は重要な研究課題である。なお、本研究プロジェクトの竹谷グループでは抗腫瘍活性を有する環状ペプチド **RA**s の構造活性相関研究を展開しており、我々の研究の成果は竹谷グループの構造活性相関研究への利用も期待される。

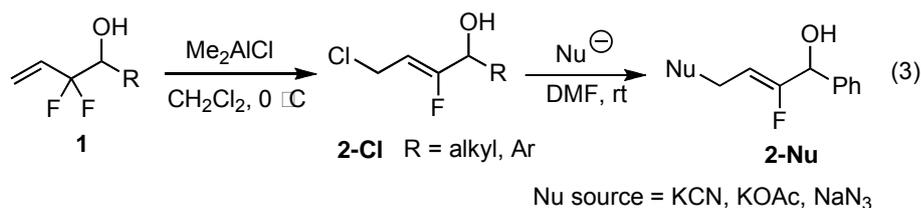
我々は、昨年度に引き続いて新たな方法論の開発として取り組んできたジフルオロアリル化合物の脱フッ素アリル置換反応による官能基化されたフルオロオレフィン化合物の簡便な合成法の確立を目指し検討を加えた (式 1)。本反応ではフッ素とアルミニウムの親和性に着目して基質の構造や触媒と用いる試薬の設計を行っているところに特徴がある (式 1)。



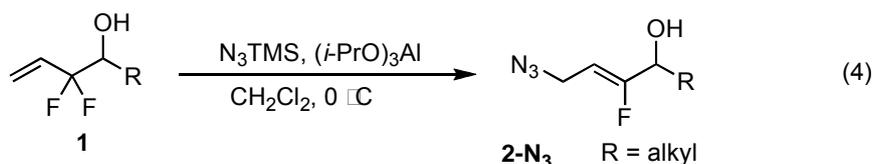
基質としてはフッ素の脱離反応の促進を意図して、4位に遊離の水酸基を有する3,3-ジフルオロ-1-アルケン **1** を用いて検討した。Me<sub>3</sub>AlやEt<sub>3</sub>Alのようなトリアルキルアルミニウムを用いたアルキル化反応は比較的容易に進行して、高立体選択性 (Z選択的) で目的物が得られた (式2)。



Me<sub>2</sub>AlClのような塩化アルキルアルミニウムを用いたときには、反応は低温、短時間で完結して対応する塩化物 **2-Cl** がZ選択的に生成する。得られた塩化物 **2-Cl** は反応性に富み、シアノ化、アセトキシ化、アジド化などの置換反応が好収率に進行する (式3)。従って、塩化物 **2-Cl** は種々のフッ素置換アルケン合成に有用な中間体となり得ることが示唆された。



アミノ基の導入を目的とした直接的なアジド化反応は、アルミニウムアルコキシド [(*i*-PrO)<sub>3</sub>Al] 共存下、TMSN<sub>3</sub>との反応により高収率で進行することを見出した。立体選択性に関しては反応を氷冷下で行ったとき Z/E 比は約10:1であった (式4)。



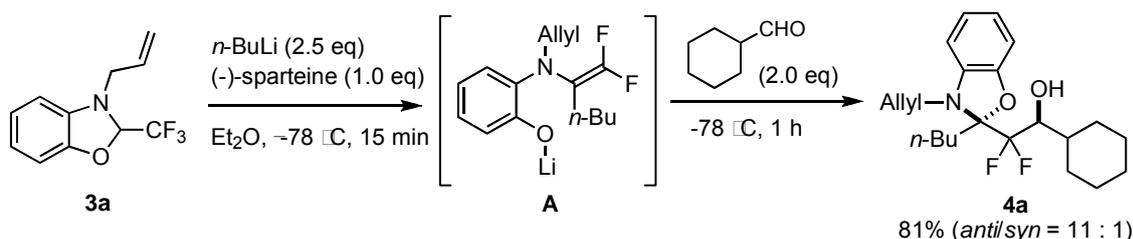
上記の反応例はメディシナルケミストリー領域での応用性が期待される官能基

化されたフッ素置換オレフィン類の有用な合成法を提供するものと期待でき、今後さらに詳細な検討を加えていく。

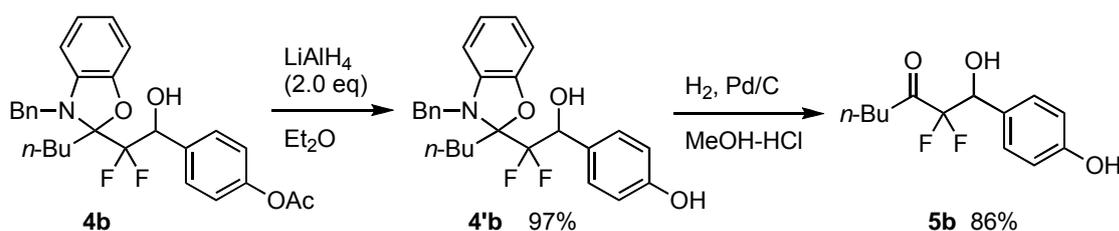
## (2) トリフルオロアセトアルデヒド *N,O*-アセタールを用いる有用なフッ素化合物の合成法の開発

有機フッ素化合物の合成において、入手容易で適度に官能基化されたフッ素化合物をビルディングブロックとして用いた新規な反応性の開拓に基づく反応開発は、フッ素化試薬の開発と並んで重要な研究課題である。

我々は、入手容易なトリフルオロアセトアルデヒドヘミアセタール類から導いたトリフルオロアセトアルデヒド *N,O*-アセタールの合成素子としての反応開発を検討している。既に *N,O*-アセタール化合物に 2 当量のアルキルリチウム反応剤を作用させると速やかにフッ素のβ-脱離と位置特異的なアルキル導入反応が進行し、さらに中間体の求電子剤処理によって種々の結合形成が可能であることを見出している。特に求電子剤としてアルデヒドやケトンを用いたときの生成物であるα,α-ジフルオロケトン誘導体は、各種のプロテアーゼに対する遷移状態ミミックとして機能することが知られているなど、メデイシナルケミストリー領域での応用が期待される。本反応はこのような分子の効率的な合成法を提供するものである。引き続き検討を加えた結果、スパルテインのようなジアミンの添加が大幅な反応加速をもたらすことを見出した(スキーム 1)。さらに、得られた *N,O*-アセタール化合物はフッ素置換により加水分解に対して安定であり、ケトンへの変換は困難である。この事実は *N,O*-アセタール構造は保護されたケトンと見なすことができ、分子内の他の部分での種々の変換に利用できる。*N,O*-アセタール化合物の脱保護には *N*-ベンジル誘導体を用いて酸性条件下、接触還元により容易に行えることを見出した(スキーム 2)。以上の知見はトリフルオロアセトアルデヒド *N,O*-アセタール構造のユニークな反応性という学術的な意義に加えて、生理活性の面から興味を持たれる種々のジフルオロ化合物の効率的な新規合成法を提供するものである。



Scheme 1.

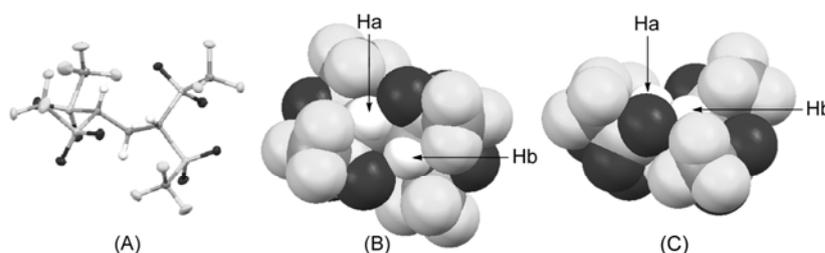


Scheme 2.

### (3) 新規な Brønsted 酸触媒の開発を基盤とする効率的合成反応の開発

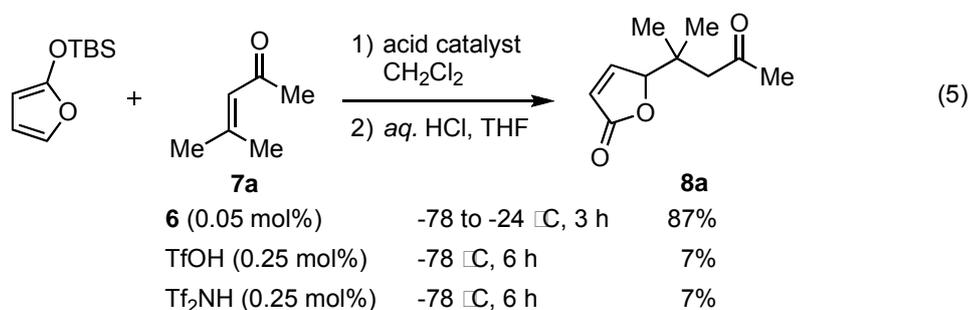
我々はこの数年来、効率的な合成反応の開発を目的として新規な触媒について検討を重ねてきた。特にトリフルオロメタンスルホニル ( $\text{CF}_3\text{SO}_2 = \text{Tf}$ ) 基の強力な電子求引性と適度な立体的嵩高さに着目して、トリフルオロメタンスルホニル誘導体を触媒の基本構造として研究を展開している。前年度までの検討結果を踏まえて、1,3-プロパン二酸である 1,1,3,3-テトラキス (トリフルオロメタンスルホニル) プロパン  $\text{Tf}_2\text{CHCH}_2\text{CHTf}_2$  を触媒、あるいは、このものとケイ素求核種との反応で系内に発生するケイ素ルイス酸触媒の pre-catalyst として用いる、反応の効率化について詳細な検討を行った。

炭素酸  $\text{Tf}_2\text{CHCH}_2\text{CHTf}_2$  **6** の X 線結晶構造解析および気相酸性度  $\Delta G_{\text{acid}}$  の測定結果から、**6** の酸性プロトン近傍は立体的に込み合った構造であり (Figure 1), その酸性度は気相において硫酸 ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) やトリフルオロメタンスルホン酸 ( $\text{TfOH}$ ) を上回るものであることが明らかになった。 ( $\Delta G_{\text{acid}}$ :  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 302.2 kcal/mol;  $\text{TfOH}$ , 299.5 kcal/mol;  $\text{Tf}_2\text{CHCH}_2\text{CHTf}_2$  **1**, 295.7 kcal/mol)。



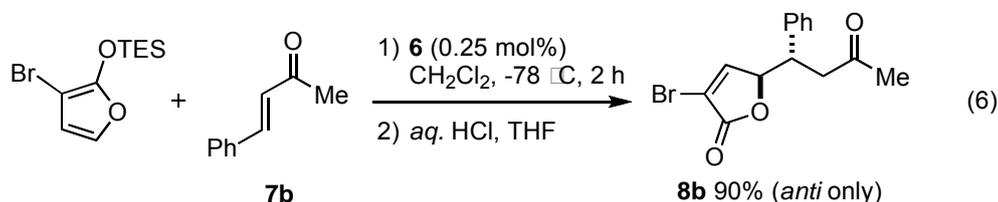
**Figure 1.** X-ray structure of  $\text{Tf}_2\text{CHCH}_2\text{CHTf}_2$  **6**. (A) ORTEP diagram; (B) Space-filling model, top view; (C) Space-filling model, side view.

炭素酸  $\text{Tf}_2\text{CHCH}_2\text{CHTf}_2$  **6** は、シリル化求核種として 2-シリルオキシフランやケテンシリルアセタールを用いたカルボニル化合物との種々の炭素-炭素結合形成反応に極めて有効な触媒 (pre-catalyst) として機能することを確立した。例えば、 $\alpha,\beta$ -不飽和ケトンに対する VMM 反応モデルでは、2-TBSO-フランと 4-メチル-3-ペンテン-2-オン **7a** の反応が 0.05 mol% の  $\text{Tf}_2\text{CHCH}_2\text{CHTf}_2$  **6** を効率的に進行する (式 5)。

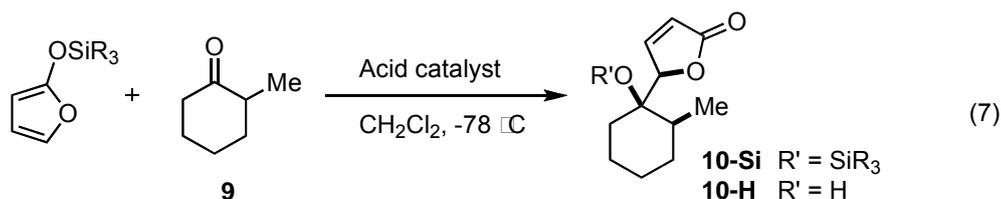


特筆すべきことに、炭素酸 **6** に代えて、 $\text{TfOH}$  や  $\text{Tf}_2\text{NH}$  などの Brønsted 酸を用い

ても反応はほとんど進行しなかった. また, 2-シリルオキシフランのシリル基とフラン環上の置換基を工夫すると,  $\beta$ -置換- $\alpha,\beta$ -不飽和ケトンに対する 1,4-付加がジアステレオ選択的に進行することを見出した. すなわち, 0.25 mol% の炭素酸 **6** を用いて, 3-ブromo-2-TESO-フランとベンザルアセトン **7b** を反応させたところ, *anti*-**8b** のみが収率 90% で得られた (式 6).

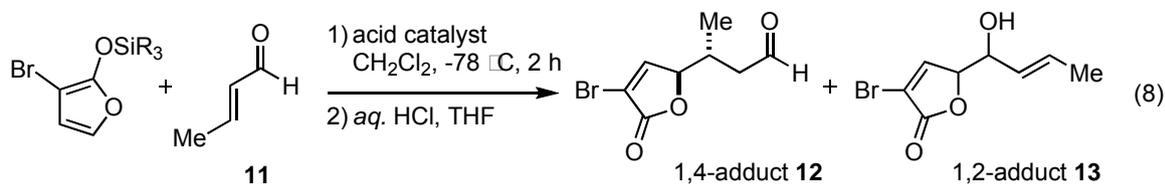


さらに,  $\text{Ti}_2\text{CHCH}_2\text{CHTi}_2$  **6** はケトンに対する VMA 反応も効率よく触媒することを見出した. ケトンはアルデヒドに比べて求電子性が著しく低いため, 一般に化学量論量ないしそれに準じた量の Lewis 酸を使用しなければ, ケイ素エノラートの付加は効率よく進行しないとされている. 一方で,  $\alpha$ -メチルシクロヘキサノン **9** と 2-TBSO-フランの反応は, わずか 0.5 mol% の **6** を用いた場合でも円滑に進行し, 選択性良く VMA 付加体 **10** を与え, 既に報告されている  $\text{TiCl}_4$  や  $\text{Bi}(\text{OTf})_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  などの Lewis 酸に比べて触媒回転数の著しい向上が見られた (式 7).



|  |                                    |                             |            |
|--|------------------------------------|-----------------------------|------------|
| <b>6</b> (0.5 mol%)  | $\text{R}_3\text{Si} = \text{TBS}$ | 77% (dr = 11 : 1)           | TON = 154  |
| $\text{TiCl}_4$ (40 mol%)                                    | $\text{R}_3\text{Si} = \text{TBS}$ | 70% (dr = 10 : 1)           | TON = 1.75 |
| $\text{Bi}(\text{OTf})_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (5 mol%) | $\text{R}_3\text{Si} = \text{TMS}$ | 65% (dr = 12 : 1 : 1 : 0.5) | TON = 13   |

さらに, これまでに報告されている Lewis 酸触媒を用いる  $\alpha,\beta$ -不飽和アルデヒド (例えば **11**) と 2-シリルオキシフランの反応は 1,2-付加体 **13** を優先して与えることが知られているが, 炭素酸 **6** を用いると 1,4-付加体 **12** が選択的に得られることを見出した (式 8).



|  |                                    |                        |
|--|------------------------------------|------------------------|
| <b>6</b> (0.5 mol%)                          | $\text{R}_3\text{Si} = \text{TES}$ | 97% (12/13 = 20 : 1)   |
| $\text{BF}_3 \cdot \text{iOEt}_2$ (100 mol%) | $\text{R}_3\text{Si} = \text{TMS}$ | 68% (as 1,2-adduct 13) |

以上のように炭素酸 **6** は新しい世代の酸触媒として位置づけることが出来ると考えられ, シリル化求核種を用いる反応の効率化に極めて有用であることを確立しつつある. 今後, 有用なフッ素化合物合成への適用も検討していく予定である.

### 3. 研究評価及び今後の研究計画

当初の研究目標に従って研究を進め上記の成果を挙げることができた。研究目標は概ね達成できたと判断している。以下に各項目について研究評価及び今後の研究計画について述べる。

(1) ジペプチドイソスターを指向したフルオロアルケン誘導体の合成法の開発では、以前より検討を行っているジフルオロアリル化合物の脱フッ素アリル置換反応の新展開として、クロロ化およびアジド化といったヘテロ原子求核種を用いた反応を開発した。本反応はメディシナルケミストリー領域での応用性が期待される官能基化されたフッ素置換オレフィン類の有用な合成法を提供するものと期待でき、今後も、基質の適用範囲の拡大を目指して、詳細な検討を加えていく。

(2) 入手容易なトリフルオロアセトアルデヒド *N,O*-アセタールを用いる有用なフッ素化合物の合成法の開発では、医薬品化学の分野で興味もたれる $\alpha,\alpha$ -ジフルオロケトンの新規合成法としてトリフルオロアセトアルデヒド *N,O*-アセタールの位置特異的な脱フッ素アルキル化反応が進行し、さらに中間体はアルデヒドやケトンと容易に反応して対応する付加体が得られることを見出した。ジアミン添加による反応加速や、*N*-ベンジル誘導体を用いることにより接触還元法で *N,O*-アセタールのケトンへの変換が容易に行えることを見出した。 $\alpha,\alpha$ -ジフルオロケトン構造はプロテアーゼ阻害剤開発において汎用される機能単位であることから、本手法の更なる効率化とプロテアーゼ阻害剤の合成への応用を検討する。

(3) 新規な酸触媒の開発では、ビストリフルオロメタンスルホニルアルカン構造を有する炭素酸 1,1,3,3-テトラキス(トリフルオロメタンスルホニル)プロパンの構造と酸性度の解析を行った。本炭素酸は2-シリルオキシフランやケテンシリルアセタールのようなケイ素求核種を用いる Mukaiyama-Michael 反応や Mukaiyama-Aldol 反応において優れたプレ触媒として機能することを明らかにした。今後は、本触媒の立体選択的な反応やフッ素置換基質への適用について検討する。

### 4. 研究成果の公表

学術論文発表

- (1) Takahashi, A.; Yanai, H.; Zhang, M.; Sonoda, T.; Mishima, M.; Taguchi, T.  
Highly Effective Vinylogous Mukaiyama-Michael Reaction Catalyzed by Silyl Methide Species Generated from 1,1,3,3-Tetrakis(trifluoromethanesulfonyl)propane.  
*J. Org. Chem.* 2010, 75, 1259-1265.
- (2) Yanai, H.; Yoshino, Y.; Takahashi, A.; Taguchi, T.  
Carbon Acid Induced Mukaiyama Aldol Reaction of Sterically Hindered Ketones.  
*J. Org. Chem.* 2010, 75, DOI:10.1021/jo100915e.
- (3) Yanai, H.; Taguchi, T.  
Trihaloacetaldehyde *N,O*-acetals: useful building blocks for dihalomethylene compounds.

*Tetrahedron*, 2010, 66, 4530-4541.

学会発表

(国際学会)

- (1) Takahashi, A.; Yanai, H.; Yoshino, Y.; Taguchi, T.  
Tetrakis(trifluoromethanesulfonyl)propane: A highly effective Brønsted acid catalyst for C-C bond forming reactions using 2-silyloxyfurans.  
International Conference on Fluorine Chemistry '09 Kyoto, May, 2009, Kyoto, Japan.
- (2) Yanai, H.; Ichikawa, T.; Taguchi, T.  
Trifluoroacetaldehyde *N,O*-acetals: Useful building blocks for functionalized difluoromethylene compounds.  
International Conference on Fluorine Chemistry '09 Kyoto, May, 2009, Kyoto, Japan.
- (3) Sato, K.; Yanai, H.; Taguchi, T.  
Regio- and stereoselective synthesis of functionalized fluoro-olefins using *gem*-difluoroallylic substrates.  
International Conference on Fluorine Chemistry '09 Kyoto, May, 2009, Kyoto, Japan.
- (4) Okada, M.; Sato, A.; Okatani, R.; Yanai, H.; Taguchi, T.  
Cr(II)-mediated fluoroalkenylation reaction of aldehyde: Synthesis of fluoroalkene-containing bestatin analogues.  
19th International Symposium on Fluorine Chemistry, August, 2009, Jackson Hole, WY, USA.
- (5) Yanai, H.; Ichikawa, T.; Taguchi, T.  
Trifluoroacetaldehyde *N,O*-acetals: Highly effective building block for  $\alpha,\alpha$ -difluoroketone derivatives.  
19th International Symposium on Fluorine Chemistry, August, 2009, Jackson Hole, WY, USA.
- (6) Taguchi, T.; Takahashi, A.; Yanai, H.  
Tetrakis(trifluoromethanesulfonyl)propane: Highly effective Brønsted acid catalyst for vinylogous Mukaiyama-Michael and aldol reactions using 2-silyloxyfurans.  
19th International Symposium on Fluorine Chemistry, August, 2009, Jackson Hole, WY, USA.

(国内学会)

- (1) 矢内 光, 市川辰徳, 田口武夫  
ポリハロケトン類の有用な保護基: *N*-ベンジル-*N,O*-アセタール  
第 33 回 フッ素化学討論会, 2009 年 10 月, 東京
- (2) 市川辰徳, 矢内 光, 田口武夫  
ジアミンの添加による位置特異的脱フッ素アルキル化反応の顕著な加速効果

第 33 回 フッ素化学討論会, 2009 年 10 月, 東京

- (3) 高橋 新, 矢内 光, 田口武夫

炭素酸触媒を用いるジアステレオ選択的ビニロガス Mukaiyama-Michael 反応

第 33 回 フッ素化学討論会, 2009 年 10 月, 東京

- (4) 佐藤謙介, 矢内 光, 中村裕子, 佐藤 梓, 岡田みどり, 田口武夫

3,3-ジフルオロ-1-アルケン誘導体のアリル置換反応によるフッ素置換アリルアジドの合成

第 33 回 フッ素化学討論会, 2009 年 10 月, 東京

- (5) 中村裕子, 岡田みどり, 佐藤 梓, 岡谷理恵子, 矢内 光, 福田寛人, 田口武夫

Pantocin B フルオロオレフィンアナログの合成

第 33 回 フッ素化学討論会, 2009 年 10 月, 東京

- (6) 市川辰徳, 矢内 光, 田口武夫

選択的 C-F 結合切断を機軸とするジフルオロケトン類の迅速合成

日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月, 岡山

- (7) 吉野泰裕, 高橋 新, 矢内 光, 田口武夫

立体的に込み合ったケトンに対する効率的な Mukaiyama アルドール反応の開発

日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月, 岡山

- (8) 佐藤謙介, 矢内 光, 佐藤 梓, 中村裕子, 岡田みどり, 田口武夫

3,3-ジフルオロ-1-アルケンを用いるフルオロアルケニルアジドの位置および立体選択的  
合成

日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月, 岡山

- (9) 岡田みどり, 佐藤 梓, 岡谷理恵子, 中村裕子, 矢内 光, 田口武夫

フルオロアルケニル化反応を基軸とするジペプチドイソスター合成への展開

日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月, 岡山

- (10) 中村裕子, 岡田みどり, 佐藤 梓, 岡谷理恵子, 矢内 光, 福田寛人, 田口武夫

Pantocin B フルオロアルケンアナログの合成

日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月, 岡山

# 退行期疾患を指向した含窒素生物活性天然物およびアナログの合成

林 良雄(薬品化学教室・教授)

## 1. 当初の研究目標

本研究は高齢化医療での大きな課題である退行期疾患治療薬創製において、特に死因の主要な原因であるがんを治療する新しい医薬品開発をめざし、天然由来の含窒素生体機能分子に注目し、創薬化学研究を実施するものである。精密有機合成により含窒素抗がん活性分子の合成手法を確立すると共に、誘導体合成を行ない、それらの生物活性評価データに基づく構造活性相関研究を展開することで医薬品創製をめざす。既に、このような方針の下に、固形がん細胞に強い殺細胞活性を有する医薬候補化合物 NPI-2358 およびKPU-244を見いだしているが、さらに強力な抗がん活性を有する誘導体の開発、および化合物の物性あるいは薬剤学的付加価値を高めた化合物の創製をめざし、詳細な構造活性相関に基づく誘導体の合成・活性評価を実施している。最近、新たな高活性誘導体として、KPU-244のオキサゾール環をイミダゾール環に変換したKPU-105を見いだしている。本年度は、昨年度に引き続き、殺細胞活性が増強された誘導体 KPU-105に着目し、そのベンゾフェノ構造の誘導において、極性官能基の導入のみならず、種々の官能基を環上へ導入した。一方、水溶性プロドラッグの開発に関しては、新たな修飾部位の模索をおこない、生体内の酵素により親化合物を産生できる。新しいNPI-2358水溶性プロドラッグの開発をめざすこととした。

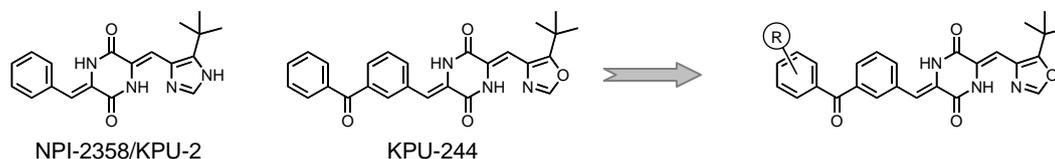


図1 固形がん細胞に強い殺細胞活性を有する医薬候補化合物とその誘導体合成

また、NPI-2358の母核であるジケトピペラジン構造を構築する新規合成法研究を進めてきたが、その応用として、天然由来ジケトピペラジン誘導体であるトリプロスタチンの誘導体合成にも着手し、細胞周期に作用する新規生物活性に基づく実用的な抗がん剤の合成を検討した。

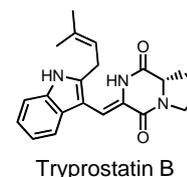


図2 天然由来チューブリン重合阻害物質

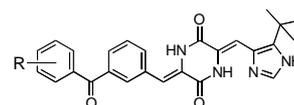
## 2. 研究成果の概要

### 1) NPI-2358 誘導体の合成と構造活性相関

KPU-244 から誘導された KPU-105 の構造を基に合成した誘導体の解離定数 (Kd) を測定すると共に、ヒト大腸がん由来 HT-29 細胞に対する殺細胞活性 (IC<sub>50</sub>) を測定した。解離定数はチューブリンに化合物が結合するとチューブリンの自家蛍光強度が変化する事が知られており、この変化から算出した。その結果の一部を Table 1 に示す。外側のベンゼン環への大きな置換基の導入は、活性を低下させる傾向が観察された。活性を維持できる置換部位としては *p*- および

*m*-位が寛容であったが、*p*-位置換体の方が高活性となる傾向が示唆された。コントロール化合物 **3** に比べ、メトキシ基や原子半径の大きなハロゲン原子による置換は、活性を減弱させたが、電子吸引性の F 原子の導入では活性の増強が観測され、KPU-133 および-146 において、KPU-105 の約 3 倍、Plinabulin の約 30 倍強力な活性を示す化合物を獲得した。ブタ由来チューブリンを用いて測定された解離定数の値と殺細胞活性値は必ずしも相関しなかったが、その傾向は類似している。KPU-133 および KPU-146 などは、Plinabulin の後継化合物候補として今後の検討が期待される。今後、得られた相関をもとに、より有効な化合物の探索を行いたいと考えている。

表 1 KPU-105 の構造活性相



| entry | compound                | structure (R-)   | Kd ( $\mu$ M) <sup>a</sup> | IC <sub>50</sub> (nM) <sup>b</sup> |
|-------|-------------------------|------------------|----------------------------|------------------------------------|
| 1     | Plinabulin ( <b>2</b> ) | NA <sup>c</sup>  | 1.06                       | 15 ± 3.8                           |
| 2     | KPU-105 ( <b>3</b> )    | H-               | 0.62                       | 1.4 ± 0.2                          |
| 3     | KPU-133                 | <i>p</i> -F-     | 0.65                       | 0.5 ± 0.1                          |
| 4     | KPU-146                 | <i>m</i> -F-     | 0.58                       | 0.6 ± 0.1                          |
| 5     | KPU-147                 | <i>o</i> -F-     | 0.81                       | 3.0 ± 2.0                          |
| 6     | KPU-135                 | <i>p</i> -Cl-    | 0.84                       | 1.1 ± 0.1                          |
| 7     | KPU-152                 | <i>m</i> -Cl-    | ND <sup>d</sup>            | 2.0 ± 0.8                          |
| 8     | KPU-134                 | <i>p</i> -Br-    | 0.21                       | 4.0 ± 0.1                          |
| 9     | KPU-153                 | <i>p</i> -I-     | ND <sup>d</sup>            | 41 ± 12                            |
| 10    | KPU-136                 | <i>p</i> -OMe-   | 0.70                       | 3.8 ± 0.4                          |
| 11    | KPU-137                 | <i>m</i> -OMe-   | 0.73                       | 39 ± 12                            |
| 12    | KPU-138                 | <i>o</i> -OMe-   | 11.2                       | 360 ± 66                           |
| 13    | KPU-151                 | <i>p</i> -isoPr- | 8.96                       | 1520 ± 600                         |

<sup>a</sup> Dissociation constant against porcine tubulin,

<sup>b</sup> Cytotoxicity against HT-29 cells, <sup>c</sup> Not applicable, <sup>d</sup> Not determined.

## 2) 生体内酵素に親化合物を産生するPlinabulinの水溶性プロドラッグの研究

Plinabulin 有望な医薬品候補化合物ではあるが、注射剤にも関わらず、その水溶性は (<0.1 mg/mL)は非常に悪い。したがって、次世代の創薬として、薬剤学的付加価値の向上を目的に難水溶性を改善する必要がある。一般に薬物の水溶性を向上させるためには、薬物自体の化学構造を親水性へと改変する手法と水溶性の補助基を付与する方法が考えられるが、親化合物の化学構造を変更することは医薬品開発上得策ではないため、Plinabulin の水溶性プロドラッグに創製に焦点を当てた。特に、生体内の酵素で切断される新規な水溶性補助基を付与した Plinabulin 水溶性プロドラッグのデザイン・化学合成を実施し、得られた誘導体のプロドラッグとしての可能性を検討した

### ① リン酸エステルの導入

水溶性プロドラッグとして、親化合物のリン酸付加体が良く利用されている。そこで最初のアプローチとして、plinabulin のイミダゾール環窒素上へのリン酸構造の導入を試みた。酵素により切断可能な構造とするため、当初はジケトピペラジン環の窒素原子に対しアミナル構造を介してリン酸構造を導入することを計画したが、生成した化合物 **1** の NMR 解析および X 線結晶構造解析を行ったところ、リン酸構造は DKP 環のカルボニル酸素にアセタール結合で導入され、DKP 環のラクタム構造がラクタム構造に変換していることが解った(図 3)。この結果は、plinabulin 上の窒素原子が置換基の立体障害や水素結合の影響で反応できなかったためと考えられる。化合物 **1** からリン酸型水溶性プロドラッグを得るために、化合物 **1** の ethyl ester を種々の条件下に加水分解したが、不安定なモノメチルエステル体が生成した。この化合物は HPLC 精製時に分解し、同定不可能な化合物を与えた。したがって、実用的なリン酸型水溶性プロドラッグは得られなかった。しかし、プロドラッグを設計する上で、plinabulin 上のカルボニル酸素が修飾可能であることを見いだした。



Scheme 1 親化合物へのリン酸構造の導入

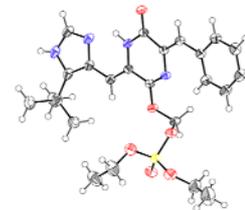
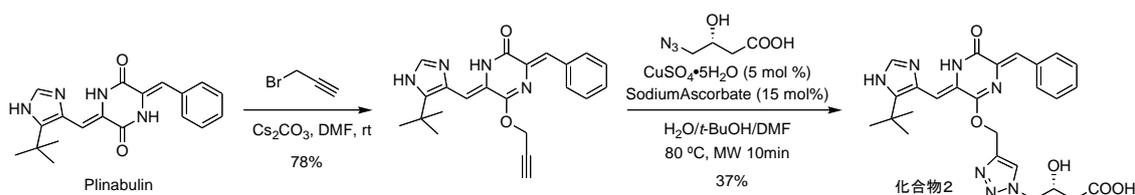


図3 化合物1のX線結晶解析像

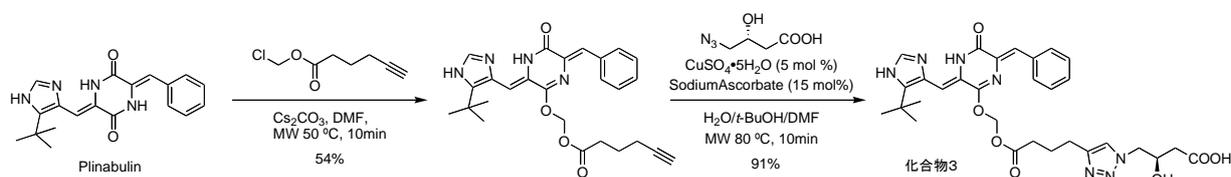
## ② Huisgen 反応を利用した水溶性修飾基の導入

上記カルボニル酸素に対してアセタール結合を用いてアルキニル基を導入し、次いで水溶性修飾基を Huisgen 反応により導入することを計画した。まず、モデル化合物として、化合物 2 の合成を試みた。すなわち Scheme 2 に示すように、plinabulin に先ず propargyl 基を導入し、次いで、銅触媒存在下にアジド基を有する  $\beta$ -hydroxybutanoic acid を反応させたところ、Huisgen 反応が進行し化合物 2 が生成した。化合物 2 は親化合物に比べ、リン酸緩衝液(PBS)への溶解性(0.24mg/mL)に改善が見られた。しかし、この水溶性補助基はエーテル結合で plinabulin に連結しているため、生理的条件下 *in vitro* でのブタ由来エステラーゼ処理では加水分解は起こらず、親化合物の産生は観察されなかった。



Scheme 2 親化合物への極性基の導入

そこで、アセタール構造を介して、酵素分解可能なエステル結合を有する水溶性プロドラッグ化合物 3 の合成を計画した。plinabulin にクロロメチルエステルを塩基存在下に microwave 照射により付加し、中程度の収率ながら合成中間体を得、これと前述のアジド化合物を Huisgen 反応に付すことで、化合物 3 を得ることに成功した。この化合物のリン酸緩衝液への溶解性は 0.25mg/mL であった。



Scheme 3 親化合物への極性基の導入

化合物 3 の生理的条件下 *in vitro* での esterase による加水分解反応を検討したところ、HPLC 解析から plinabulin への変換を確認することができた。このことから化合物 3 は plinabulin の水溶性プロドラッグとして機能するものと思われる。今後の課題として、アジド誘導体を種々変更することで多様な水溶性補助基の付与が可能になると考えられる。

### 3) トリプロスタチンの誘導体合成

Tryprostatin B は、マウス tsFT210 細胞において G2/M 期特異的細胞周期阻害活性 ( $IC_{50} = 12.5 \mu M$ ) を示すジケトピペラジン化合物として、1995 年に *Aspergillus fumigatus* BM939 の二次代謝産物中から単離構造

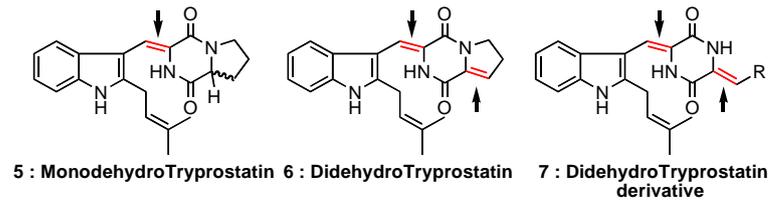
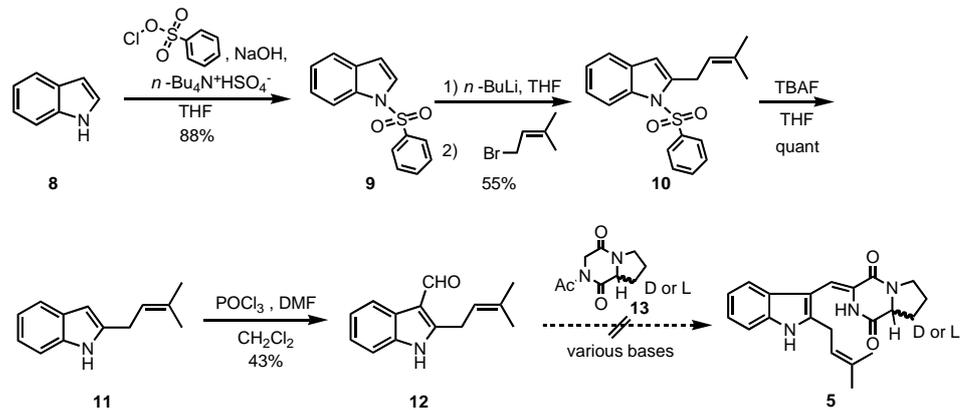


図4 トリプロスタチンへの平面構造の導入

決定された天然物で、微小管結合タンパク MAP2 に作用して微小管形成を阻害することが分かっている。活性は穏やかであることから、高活性誘導体へ変換できれば新規作用に基づく抗がん剤の創製に繋がる。類似のジケトピペラジン化合物で、チューブリン重合阻害剤である phenylahistin から 我々が実施した臨床治験化合物 plinabulin への誘導において、分子の平面性向上が活性向上に重要だったことから、tryprostatin B においても、分子の平面性を強化する誘導が活性向上に有効ではないかと考え、図4に示すような Monodehydro-tryprostatin 5、Didehydro-tryprostatin 6 および類縁誘導体の合成を計画した。

最初のアプローチとして Scheme 3 に示す合成経路を計画した。すなわち、インドール 8 の窒素原子を Ts 基で保護後、次いで 2 位をジメチルア

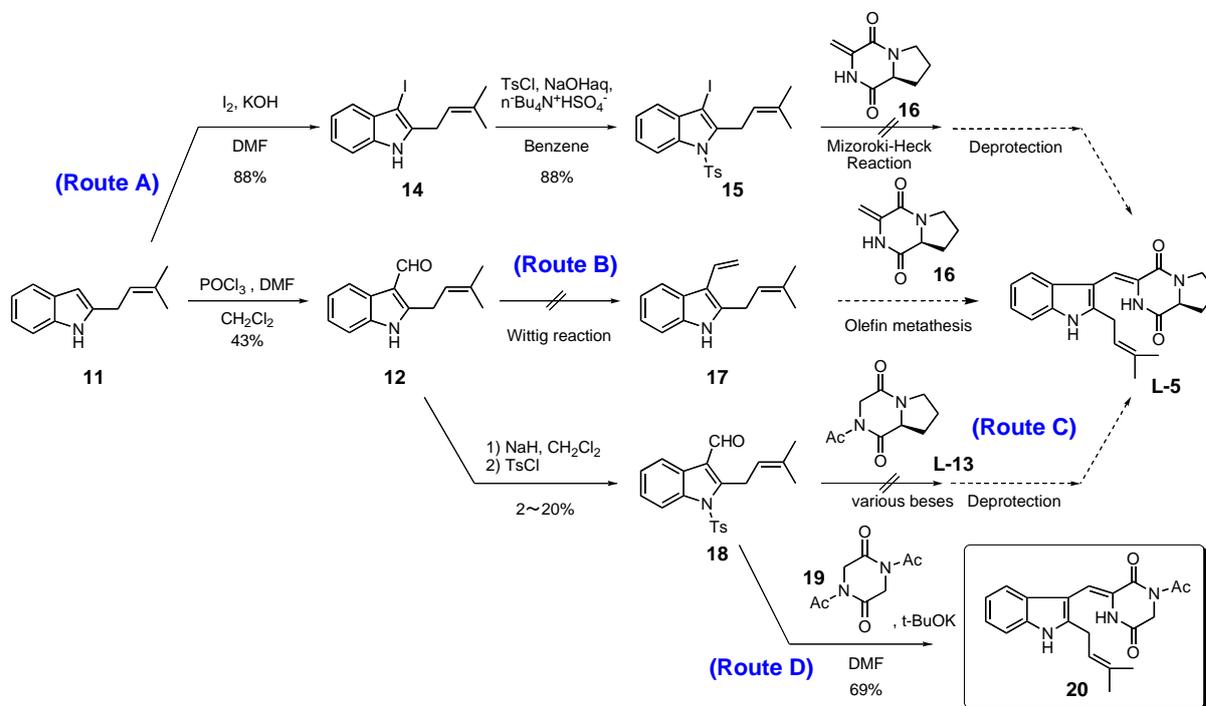


Scheme 3 Monodehydro-tryprostatin 5 の合成

リル化した。得られた化合物 10 の Ts 基を除去し、Vilsmeier 反応によりアルデヒド 12 を得た。しかし、種々の塩基性条件下このアルデヒドを用いた *N*-acetylcyclo (Gly-Pro) 13 への縮合反応は進行しなかった。

そこで、Scheme 4, ルート A に示すようにアルキル化体 11 をヨウ素化後、N-Ts 体 15 とし、別途合成した c(DAla-Pro) 16 と Heck 反応を複数の条件下に試みたが、反応の進行は確認できなかった。次に、アルデヒド体 12 を Wittig 反応に付すことでオレフィン体 17 とし、c(DAla-Pro) 16 との olefin metathesis 反応で目的物 5 を得ることを計画したが (ルート B)、Wittig 反応でのオレフィン体の生成が確認できなかった。本ルートは続く olefin metathesis 反応においても反応点が 2 カ所存在することから、副反応の可能性が大きく、早い段階で断念した。ところで Scheme 1 で、最終段階のアルデヒド 12 を用いたアルドール反応が進行しなかった原因として、インドール 3 位ホルミル基の低い求電子性が考えられた。そこで、アルデヒド 12 の共役する窒素原子に再度電子吸引性の Ts 基を導入後に、*N*-acetylcyclo (Gly-L-Pro) との縮合を試みたが、種々の塩基条件下でも反応は進行しなかった (ルート C)。そこで、今度は、ジケトピペラジン側の反応性を向上させることを考え、反応生成物は tryprostatin B には相当しないが、*N,N*-ジアセチル無水グリシン 19 を用いて、種々の塩基存在下に反応を検討したところ (ルート D)、*t*BuOK を用いたケースにおいて反応が進行し、縮合体 20 が得られた。本ル

ートでは Ts 体 18 を得る反応の収率が悪く、反応条件の検討および他の電子求引性基の導入を種々検討したが、いずれも良好な結果が得られず、縮合体 20 のスケールアップには問題が残る。しかし、縮合体 20 の脱アセチル化でデヒドロトリプトファン誘導体構造を有する化合物合成の可能性を見いだすことができた。



Scheme 4 モノデヒドロトリプロスタチン誘導体の合成

### 3. 研究評価及び今後の研究計画

固形がん細胞に強い殺細胞活性を有する医薬候補化合物 NPI-2358 および KPU-244 を見いだしているが、より有効な化合物の開発をめざし、詳細な構造活性相関に基づく誘導体の合成・活性評価を実施してきた。20年度は NPI-2358 の母核であるジケトピペラジン類の新しい合成法研究を進め、論文として報告した。今回、新たに KPU-244 および KPU-105 を基に実施したベンゾフェノン構造への置換基の導入による構造活性相関研究から、KPU-133 および-146 という、KPU-105 の約 3 倍、Plinabulin の約 30 倍強力な活性を示す化合物を獲得することができた。これらの化合物は、第二世代の Plinabulin として今後、高次の評価に進める可能性がある。

一方、水溶性プロドラッグについては、Plinabulin 分子がコンパクトなため修飾点が見つけられずにいたが、検討を重ねる中で、水溶性補助基の連結部分として、ジケトピペラジン環のカルボニル酸素が利用できることが解り、この酸素原子に、Huisgen 反応を利用して、カルボキシル基と水酸基と言う 2 つの極性官能基を有する水溶性補助基構造を付与することに成功した。水溶性補助基全体の連結はアセタール結合を介したエステル構造であり、この部分が生体内で、エステラーゼなどの酵素により加水分解させると予想される。In vitro ではあるが、今回動物由来のエステラーゼを用いた実験で、本水溶性プロドラッグから親化合物が産生することを確認した。化合物 3 で示したこの水溶性プロドラッグの水溶性は 0.24 mg/mL と未だ十分で

はないが、今後水溶性補助基の極性官能基を変換することで、さらに高い水溶性を有するプロドラッグの開発が可能になると考えている。前年度の報告書で述べたが、同様なジケトピペラジン誘導体として知られ、抗腫瘍作用が期待されるトリプロスタチン誘導体の合成も開始した。トリプロスタチン誘導体の合成経路の確立をめざした合成研究が進みつつあり、この中で、まだ数種類ではあるが、誘導体が得られている。今後化合物の数を増やし、殺細胞活性を基本とする生物評価にて、その有効性を検討する予定である。このような有機合成を基本として細胞周期に作用する新規生物活性に基づく実用的な抗がん剤の創製をさらに次年度も押し進めたい。また、平成22年度に関しては退行期の罹患が重篤な状態に発展する新興・再興感染症を治療する新しい医薬品開発をめざし、天然由来の含窒素生体機能分子に注目し、創薬化学研究を実施したい。精密有機合成により継続中の含窒素抗がん活性分子の創製研究を進めるとともに、感染症に関しては海洋由来新規ハイブリッド型抗菌剤およびシステインプロテアーゼ阻害剤を基盤とする重症急性呼吸器症候群（SARS）治療薬の創製を実施することで、退行期疾患に対する統合的なアプローチを充実させていきたい。

#### 4. 研究成果の発表

##### 原著論文

- (1) Yamazaki, Y., Mori, Y., Oda, A., Okuno, Y., Kiso, Y., Hayashi, Y. Acid Catalyzed Monodehydro-2,5-diketopiperazine Formation from N- $\alpha$ -ketoacyl Amino Acid Amides. *Tetrahedron*, **65**, 3688-3694 (2009)  
Regnier, T., Sarma, D., Hidaka, K., Bacha, U., Freire, E., Hayashi, Y., Kiso, Y. New Developments for the Design, Synthesis and Biological Evaluation of Potent SARS-CoV 3CL<sup>pro</sup> Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 2722-2727 (2009)

##### 総説・著書等

特に無し

##### 国際学会発表

- (1) Yamazaki, Y., Mori, Y., Oda, A., Kiso, Y., Hayashi, Y. Acid catalyzed monodehydro-2,5-diketopiperazine formation toward natural product synthesis. 21st American Peptide Symposium: Breaking Away, 2009/6, Bloomington, USA
- (2) Yamazaki, Y., Sumikura, M., Yoshida, T., Mori, Y., Yasui, H., Kohno, K., Kiso, Y., Deyanat-Yazdi, G., Neuteboom, S., Potts, B., Lloyd, G. K., Hayashi, Y. Cyclic dipeptide-based microtubule depolymerization agents as vascular targeting anti-cancer drugs. 7th AFMC International Medicinal Chemistry Congress, 2009/8, Cairns, Australia
- (3) Hayashi, Y., Yamazaki, Y., Sumikura, M., Yoshida, T., Mori, Y., Yasui, H., Kohno, K., Kiso, Y., Neuteboom, S., Potts, B., Lloyd, G. K. "Plinabulin" a cyclic dipeptide-based vascular targeting anti-cancer agent based on microtubule depolymerization activity. 3rd Asia-Pacific International Peptide Symposium / 13th Korean Peptide and Protein Symposium: "Peptides at Cutting Edge", 2009/11, Jeju Island, Korea
- (4) Hayashi, Y., Yamazaki, Y., Sumikura, M., Yoshida, T., Mori, Y., Yasui, H., Kohno, K.,

Kiso, Y., Neuteboom, S., Potts, B., Lloyd, G. K. "Plinabulin" a diketopiperazine-type vascular targeting anti-cancer agent based on microtubule depolymerization activity. ACS Spring 2010 National Meeting & Exposition, 2010/3, San Francisco, USA

#### 国内学会発表

- (1) Sumikura, M., Yamazaki, Y., Yoshida, T., Mori, Y., Yasui, H., Kiso, Y., Neuteboom, S., Potts, B., Lloyd, G. K., Hayashi, Y. Synthesis and structure-activity relationship study of cyclic dipeptide-based microtubule depolymerization agents with a benzophenone structure. 46th Japanese Peptide Symposium, 2009/11, Kitakyushu
- (2) Sarma, D., Regnier, T., Hidaka, K., Konno, S., Bacha, U., Freire, E., Kiso, Y., Hayashi, Y. Synthesis of Tripeptide-type SARS-CoV 3CLpro Inhibitors with a Highly Electrophilic Carbonyl Group. 46th Japanese Peptide Symposium, 2009/11, Kitakyushu
- (3) Sarma, D., Thomas, R., 日高興士, 今野翔, Bacha, U., Freire, E., 木曾良明, 林良雄 高親電子性カルボニル基を有する SARS コロナウイルス 3CL プロテアーゼ阻害剤の開発 第28回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2009年11月, 東京
- (4) 角倉真紀子, 山崎有理, 吉田智子, 森雄樹, 安井裕之, 木曾良明, Neuteboom, S., Potts, B., Lloyd, G. K., 林良雄 ベンゾフェノン構造を有するジケトピペラジン型微小管脱重合剤の開発 第28回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2009年11月, 東京
- (5) 山崎有理, 森雄樹, 小田暁子, 奥野友香, 木曾良明, 林良雄 酸触媒環化反応を用いたモノデヒドロ-2,5-ジケトピペラジン化合物の合成研究 日本薬学会第130年会, 2010年3月, 岡山

# 海洋生物由来の生物活性物質の探索と化学合成

宮岡 宏明 (生物分子有機化学教室・准教授)

## 1. 当初の研究目標

海洋生物は、陸上生物とは異なる進化を遂げてきたため、海洋生物由来の天然物（海洋天然物）は、陸上生物由来の天然物とは異なった構造の化合物が多い。また、海洋天然物は強力な生物活性を示すものが多く、医薬品のリード化合物として期待されている。そこで我々は、退行期疾患などの治療薬として期待されるリード化合物を海洋天然物から見出すこと、医薬品開発の観点から、医薬品のリード化合物として期待される海洋天然物の量的確保およびその誘導体の合成を目指した海洋天然物の合成法の確立を目的に研究を行っている。

### (1) 生物活性物質の探索および生物活性

昨年度までの研究において、沖縄県石垣島近海に生息する海綿や軟体サンゴなどの無脊椎動物から数種の新規有機化合物および既知化合物の単離を行っており、そのうちの数種の化合物が、腫瘍細胞に対して増殖阻害作用を示すことを明らかにした。そこで今年度は、昨年度に引き続き、生物系研究室（内分泌分子薬理学教室）と共同でこれら化合物の生物活性についてさらに検討を行う。

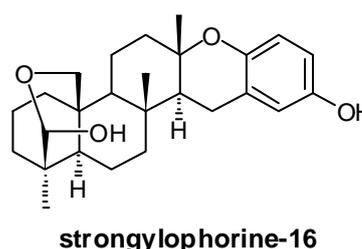
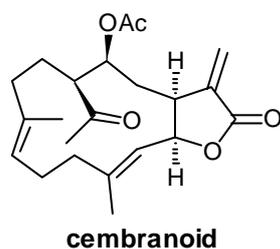
### (2) 生物活性物質の化学合成

昨年度に引き続き、医薬品のリード化合物として期待される生物活性を有する海洋天然物の合成法の開発を行う。**Kalihinol A** は、海綿 *Acanthella* sp. より単離されたジテルペノイドであり、*trans*-デカリン上に2つイソシアノ基、2つメチル基、1つのヒドロキシ基、塩素原子を含むテトラヒドロピランが結合した海洋天然物にしか見られない特異な構造の化合物である。また、**kalhinol A** は熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* に対して強力な抗マラリア活性を示しており、抗マラリア薬のリード化合物として期待されている。そこで、今年度は **kalhinol A** の全合成の検討を中心に研究を行う。さらに、生物活性を有する他の海洋天然物の合成についても検討を行う。

## 2. 研究成果の概要

### (1) 生物活性物質の探索および生物活性

昨年度は、内分泌分子薬理学教室と共同で、下記に示した軟体サンゴ由来のセンブラノドおよび海綿由来のメロジテルペノイド **strongyloporine-16** を含む数種の化合物が、ヒト卵巣癌細胞株 **OVCAR3** 細胞に対して増殖抑制作用を示すことを明らかにした。今年度は、これら化合物の細胞増殖抑制活性の作用機序を調べるため **OVCAR3** 細胞の微小管に対する影響を調べたところ、パクリタキセルが微小管の重合を促進する  $1 \mu\text{M}$  の濃度では、微小管の



重合と脱重合に対して影響が見られなかった。従って、これら化合物の細胞増殖抑制活性は、別の機序が関与していることが考えられた。さらに、化学療法剤に抵抗性を示し臨床的効果に課題を残している卵巣明細胞癌(ES2 細胞株)に対して strongyloporine-16 が、5 nM から 500 nM の濃度間で用量依存的に増殖を阻害することを確認した。この 500 nM での最大抑制効果は、パクリタキセル 50 nM の効果に匹敵する強さであった。

## (2) 生物活性物質の化学合成

### 海産ジテルペノイド Kalihinol A の全合成

Kalihinol A は 1984 年 Scheuer らによりグアム産の海綿 *Acanthella* sp. から単離、構造決定された最初の kalihinane 型ジテルペノイドであり、*trans*-デカリン上に 2 つのイソシアノ基、2 つのメチル基、ヒドロキシ基および塩素原子を含むテトラヒドロピラニル基を有する多官能基化された化合物である (Figure 1)。

Kalihinol A の相対配置は X 線結晶解析により決定され、絶対配置は著者らのグループにより CD 励起キラルティー法により決定されている。Kalihinol A

が見出されて以来、これまでに 40 を超える kalihinane 型ジテルペノイドが単離されているが、これら化合物はイソシアノ基、イソチオシアノ基またはホルムアミド基等を有する三環性化合物であり、抗寄生虫活性、抗菌活性、抗真菌活性などの興味深い生物活性を有している。なかでも kalihinol A は、熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* に対して強力な抗マラリア活性 ( $EC_{50}$   $1.2 \times 10^{-9}$  M) を示しており、この抗マラリア活性は現在臨床で多剤耐性マラリアの治療に用いられている mefloquine よりも強力である。また、宿主細胞に対する毒性の指標として用いたマウス乳がん細胞 FM3A の  $EC_{50}$  と比較した選択毒性比 (SI) は 317 であり、この値は mefloquine (SI = 90) よりも選択性が高く、本化合物は抗マラリア薬のリード化合物として注目を集めている。そこで著者らは、ヨードエーテル化反応によるテトラヒドロピランの構築および分子内 Diels-Alder 反応によるデカリンの構築を鍵工程とした合成法により、kalihinol A の最初の全合成を達成した。

Shapless 不斉エポキシ化反応等により合成したキラルなエポキシド **1** に対し、CuI 存在下、Grignard 試薬 **2** の位置選択的なカップリング反応を行いジオール **3** を高収率で得た (Scheme 1)。続いてジオール **3** の 2 つのヒドロキシ基を Ac 基で保護、TBDPS 基を除去し、生じた第二級アルコールに hexachloacetone,  $Ph_3P$  を作用させることで、立体反転を伴った C-14 位への塩素原子の導入を行い **4** とした。2 つの Ac 基を脱保護、第一級ヒドロキシ基を Piv 基で保護し、iodonium di-*sym*-collidineperchlorate (IDCP) を用いて分子内ヨードエーテル化反応を行い、続いて  $^nBu_3SnH$  および  $Et_3B$  を用いて還元的脱ヨウ素化を行うことでテトラヒドロピラン **5** を合成した。テトラヒドロピランの構築ができたので、次に分子内 Diels-Alder 反応による *cis*-デカリンの構築を行った。テトラヒドロピラン **5** に対して接触水素化により Bn 基を脱保護、生じた第一級ヒドロキシ基を Dess-Martin 酸化してアルデヒドとした後、臭化ビニルマグネシウムを作用させることによりビニル基を導入し、生じた第二級ヒドロキシ基を TBS 基で保護し、Piv 基を除去することによりアルコール **6** を得た。アルコール **6** のヒドロキシ

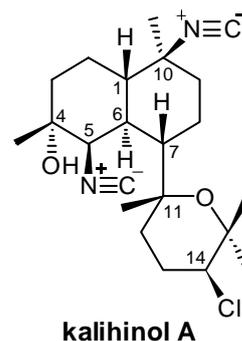
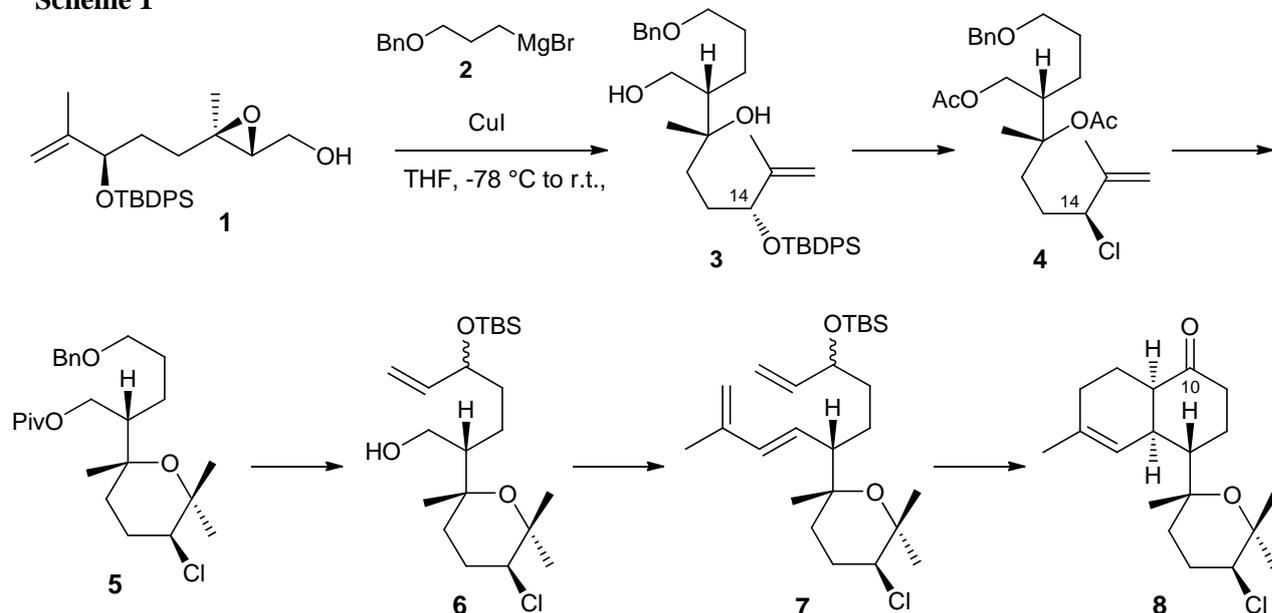


Figure 1. Structure of Kalihinol A

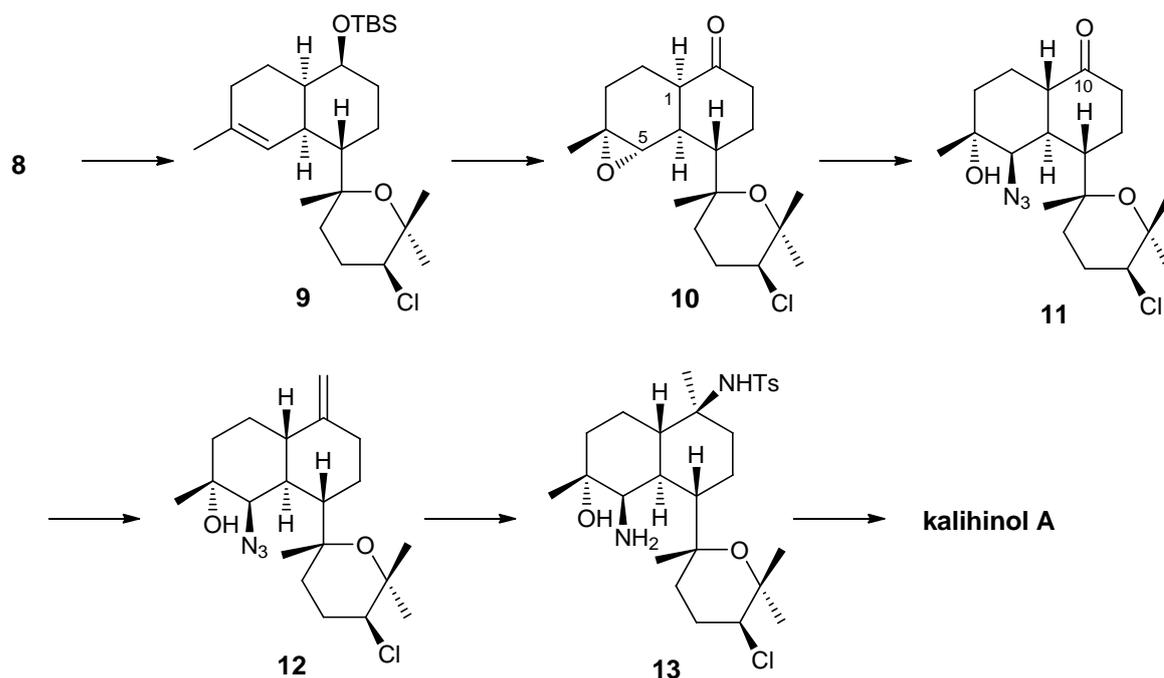
基を酸化してアルデヒドとし、続いてリンイリドを用いた *E*-ジエンの構築によりトリエン **7** を得た。トリエン **7** の TBS 基を除去し、生じた第二級ヒドロキシ基を酸化したところ、エノンを経由した *endo* 選択的な分子内 Diels-Alder 反応が進行し、*cis*-デカリン **8** を高収率かつ単一生成物として得ることができた。

**Scheme 1**



*cis*-デカリン **8** の合成ができたので、次に *cis*-デカリンから *trans*-デカリンへの異性化、イソシアノ基等の官能基の導入を行った(Scheme 2)。*cis*-デカリン **8** の C-10 位のケトンを立体選択的に  $\beta$ -アルコールへ還元し、生じたヒドロキシ基を TBS 基で保護してシリルエーテル **9** とした。シリルエーテル **9** に対して *m*CPBA によりエポキシ化を行うことで  $\alpha$ -エポキシドを単一生成物として得、TBS 基の脱保護、ヒドロキシ基の酸化により  $\alpha$ -エポキシド **10** を合成した。なお、*cis*-デカリン **8** の *m*CPBA による直接的なエポキシ化では、 $\alpha$ -エポキシド **10** の

**Scheme 2**



ジアステレオマーである  $\beta$ -エポキシドが主生成物として得られている。次に、 $\alpha$ -エポキシド **10** の C-5 位にアジド基を導入した後、C-1 位の異性化を行い *trans*-デカリン **11** とし、C-10 位への *exo*-オレフィンの導入により *exo*-オレフィン **12** を合成した。*exo*-オレフィン **12** に対して立体選択的なアジリジンの構築、アジドの還元、アジリジンの還元的開環を行いスルホンアミド **13** とし、Ts 基の除去、2つのアミノ基をイソシアノ基へ変換することで kalihinol A の最初の全合成を達成することができた。

### 3. 研究評価及び今後の研究計画

#### (1) 生物活性物質の探索および生物活性

本年度は、内分泌分子薬理学教室と共同で、ヒト卵巣癌細胞株 OVCAR3 細胞に対して増殖抑制活性を示している化合物について、その作用機序の解明のため、微小管に対する影響を検討したところ、これら化合物は、微小管の重合、脱重合には影響を及ぼさないことが明らかになった。従って、これら化合物は微小管の重合、脱重合以外の作用機序で細胞増殖抑制活性を示していることになる。今後は、これら化合物の作用機序解明とともに、*in vivo* における活性を詳細に評価していきたい。また、新規あるいは既知化合物の探索、生物活性についての検討も継続する。

#### (2) 生物活性物質の化学合成

本年度は、グアム産の海綿 *Acanthella* sp. から単離、構造決定され、抗マラリア活性を有する海産ジテルペノイド kalihinol A の合成研究を中心に研究を行った。

キラルなエポキシド **1** に対し、CuI 存在下、Grignard 試薬 **2** の位置選択的なカップリング反応を行いジオール **3** とした後、立体反転を伴った C-14 位への塩素原子の導入を行い **4** を合成した。さらに、IDCP を用いて分子内ヨードエーテル化反応を行い、続いて還元的脱ヨウ素化を行うことでテトラヒドロピラン **5** を合成した。アリリックな位置にハロゲンを持つオレフィンに対する分子内ヨードエーテル化反応はこれまであまり知られておらず、IDCP を用いる方法は、大変有効であると考えられる。さらに、*E*-ジエンの構築によりトリエン **7** を得た後、トリエン **7** の TBS 基を除去し、生じた第二級ヒドロキシ基を酸化することにより、エノンを経由した *endo* 選択的な分子内 Diels-Alder 反応を行い、*cis*-デカリン **8** を高収率かつ単一生成物として得ることができた。*cis*-デカリン **8** の C-10 位のケトンの還元し、生じたヒドロキシ基を TBS 基で保護してシリルエーテル **9** とした。シリルエーテル **9** に対して *m*CPBA により  $\alpha$ -エポキシドとし、脱保護、酸化により  $\alpha$ -エポキシド **10** を合成した。次に、 $\alpha$ -エポキシド **10** の C-5 位にアジド基を導入した後、C-1 位の異性化を行い *trans*-デカリン **11** とし、C-10 位への *exo*-オレフィンの導入により *exo*-オレフィン **12** を合成した。*exo*-オレフィン **12** に対して立体選択的なアジリジンの構築、アジドの還元、アジリジンの還元的開環を行いスルホンアミド **13** とし、Ts 基を除去し、アミノ基をイソシアノ基へ変換することで kalihinol A の全合成を達成することができた。Kalihinol A の全合成の達成は、初めてであり、今後、合成過程で得られた誘導体も含めた詳細な生物活性の検討も行っていきたい。

来年度以降も、これまでの研究を継続し、疾病の治療薬として期待される生物活性を有する天然有機化合物の合成を行う。特に、次年度は抗マラリア活性を有するジテルペノイド 7-isocyano-11(20),14-epiamphilectadiene の合成を中心に研究を推進する。さらに、生物活性を有する他の天然有機化合物の合成も検討する予定である。

#### 4. 研究成果の発表

##### 原著論文

- (1) Ota, K., Kurokawa, T., Kawashima, E., Miyaoka, H.  
Stereocontrolled One-pot Synthesis of Cycloalkane Derivatives possessing a Quaternary Carbon using Allyl Phenyl Sulfone.  
*Tetrahedron*, 65 (42), 8668-8676 (2009).
- (2) Ota, K., Kurokawa, T., Kawashima, E., Miyaoka, H.  
Total Synthesis and Absolute Configuration of the Marine Norditerpenoid Xestenone.  
*Marine Drugs*, 7 (4), 654-671 (2009).

##### 国際学会発表

- (1) Ota, K., Kurokawa, T., Kawashima, E., Miyaoka, H.  
Total Synthesis of Marine Norditerpenoid Xestenone  
The Eleventh International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry,  
2009/11, Kyoto, Japan

##### 国内学会発表

- (1) 宮岡宏明, 阿部康則, 関谷伸明, 見留英路, 川島悦子  
抗マラリア活性を有する海産ジテルペノイド Kalihinol A の全合成  
第 35 回反応と合成の進歩シンポジウム, 2009 年 11 月, 金沢
- (2) 太田浩一郎, 川島悦子, 宮岡宏明  
One-pot シクロアルカン合成法を用いた Chabrolol C の合成研究  
日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月, 岡山
- (3) 荒川航人, 本多達也, 川島悦子, 宮岡宏明  
海産ポリケチド Ascospiroketal A の合成研究  
日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月, 岡山
- (4) 大久保裕介, 宮岡宏明  
抗マラリア活性を有する海産ジテルペノイド 7-Isocyano-11(20),14-epiamphilectadiene  
の合成研究  
日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月, 岡山

# 特異的酵素阻害薬の分子設計と合成

横松 力 (分子機能解析学教室・教授)

## 1. 当初の研究目標

$\alpha$ 位にアミノ基、ヒドロキシル基、フルオロ基などのヘテロ原子を有する有機リン化合物は、特異な生物活性を示すものが多く知られており、医薬の創製にリン原子団が活用されている。我々は、「退行期疾患治療における天然薬物素材の評価・開発と精密化学を基盤とした創薬研究」の一環として、細胞内情報伝達機構において重要な役割を演じている酵素あるいは受容体を対象として、それらの特異的酵素阻害薬および受容体拮抗薬のリードジェネレーションを指向して、分子内にヘテロ原子団を有するホスホン酸およびホスフィン酸誘導体の合成および機能解析に関する研究を行ってきた。本年度は、これまでの研究成果を踏まえて、アミノメチル (2-カーボキシエチル) ホスフィナート誘導体の不斉合成を中心に検討を加え以下の研究成果を得た。

## 2. 研究成果の概要

### ホスフィン酸型ジペプチドイソスター

既知の生理活性化合物あるいは生体内の機能性物質の特定の部分構造をバイオイソスターで置換する手法は新規な生物活性化合物を見いだす上で有用な方法である。ジペプチドの加水分解遷移状態をミミックした構造は、基質とプロテアーゼ活性中心との親和性の増強に大きく寄与することが知られている。したがってプロテアーゼ阻害剤の創製研究において、ジペプチドの加水分解遷移状態ミミックの設計・合成・機能解析は極めて重要となる。テトラヘドラルなリン原子に3個の酸素原子が置換したホスホン酸誘導体あるいは2個の酸素原子が置換したホスフィン酸誘導体は、 $\alpha$ 位にアミノ基が存在するとジペプチドの加水分解におけるテトラヘドラルな水和遷移状態と類似した構造となることから、ペプチド性プロテアーゼ阻害剤のジペプチドイソスターとして有用と考えられる (Fig 1)。

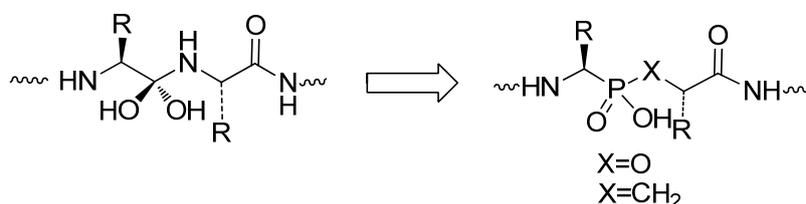


Fig 1

### アミノメチル (2-カーボキシエチル) ホスフィナート誘導体の不斉合成

ホスフィン酸誘導体は酸性プロトンの早いプロトン移動のためリン原子上に不斉を示さないが、対応するホスフィン酸エステルのリン原子は不斉を示すことが知られている (Fig. 2)。リン原子上の不斉を隣接する炭素原子上に転写することが出来れば、ホスフィン酸誘導体の立体制御合成に活用できると考えられる。

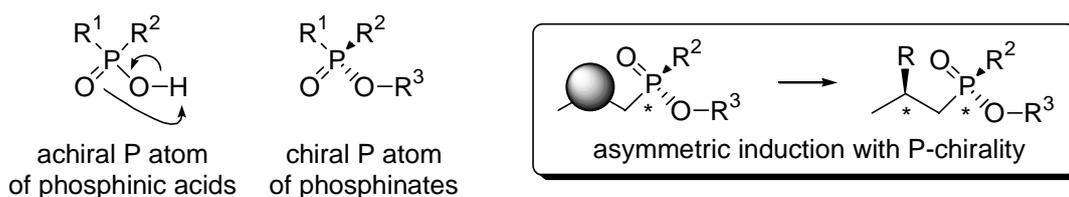
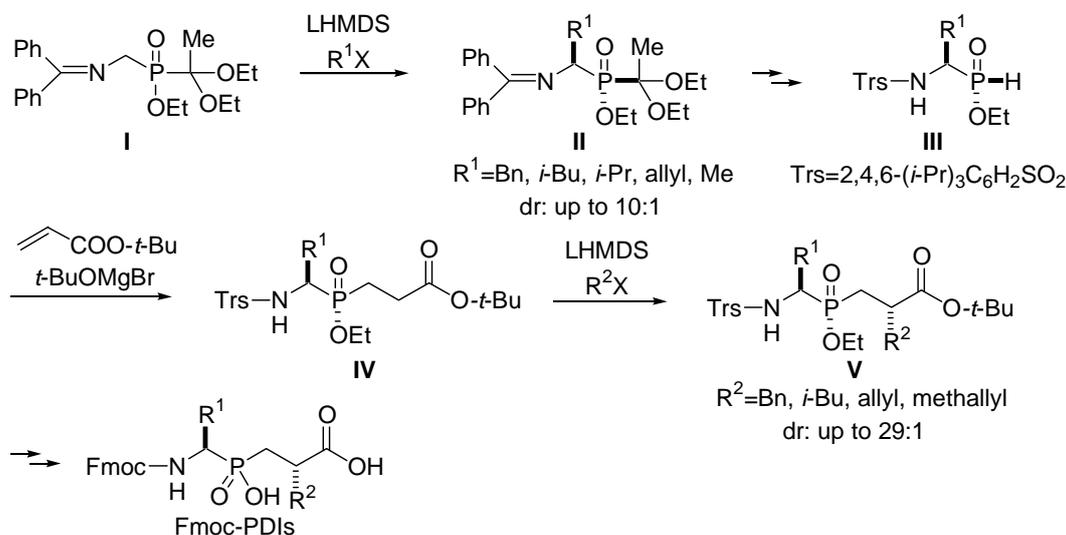


Fig 2

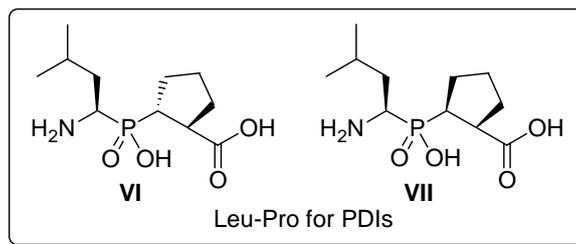
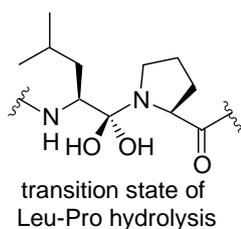
我々はこのような不斉転写の概念を基盤とし、PDIs のジアステレオ選択的合成法を新たに見出している (Scheme 1)。すなわち、リン原子上に嵩高いケタール基を有するラセミ体のアミノメチルホスフィナート **I** から  $\alpha$ 位炭素アニオンのジアステレオ選択的なアルキル化反応により **II** に誘導した。**II** は脱ケタール化するとリン原子の立体配置を保持したままで  $\alpha$ -アミノ-*H*-ホスフィナート **III** に導くことができ、更に **III** を塩基存在下でアクリレートと処理するとリン原子の立体を保持したマイケル付加体 **IV** が高選択的に得られた。引き続き **IV** から発生したリチウムエノラートに親電子剤を作用させると **V** が高い選択性で得られた。 $\alpha$ 位および  $\beta'$  位アルキル化反応において、ジアステレオ選択性はリン原子の不斉により制御されていた。特に **IV** の窒素原子上の保護基は  $\beta'$  位アルキル化のジアステレオ選択性に影響し、嵩高い 2,4,6-トリイソプロピルベンゼンスルホンル (トリシル) 基の活用が最適であることが明らかとなった。



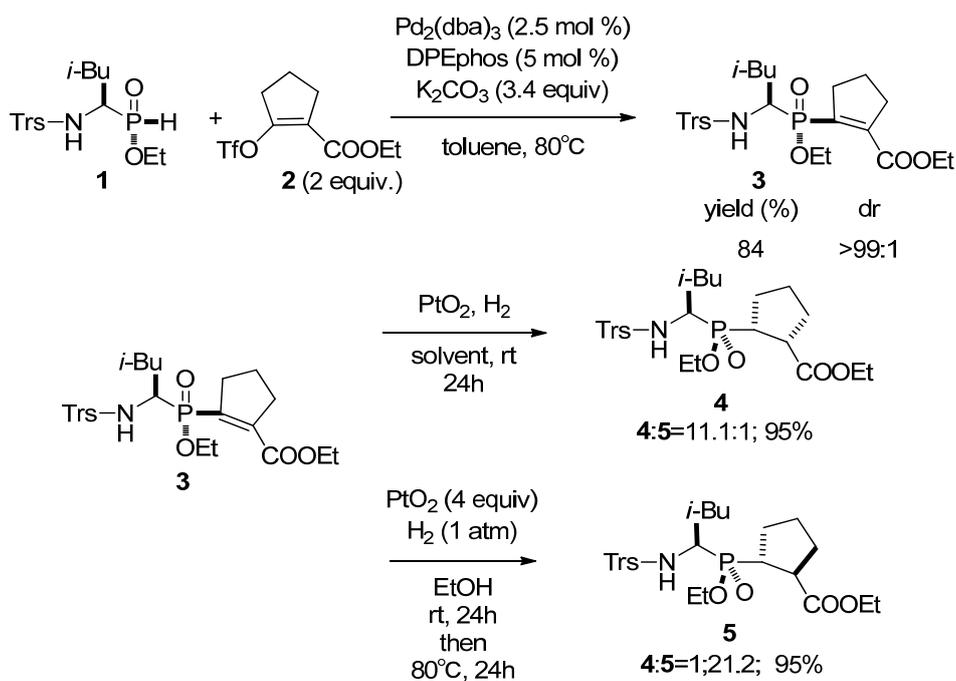
Scheme 1

### Leu-Pro 型ホスフィニルジペプチドイソスターの合成

成人 T 細胞白血病の発症に関与する Human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1) プロテアーゼは Leu-Pro 結合を特異的に切断するアスパラギン酸プロテアーゼであるため、Leu-Pro 型 PDI はペプチド性 HTLV-1 プロテアーゼ阻害剤へ応用できるものと期待される。Scheme 1 に示した手法により  $\alpha$ 位 ( $\text{R}^1$ ) および  $\beta'$  位 ( $\text{R}^2$ ) に様々な側鎖を導入した PDI 誘導体を合成出来ると考えられるが、Xaa-Pro (Xaa は任意のアミノ酸) タイプの PDI への応用は未検討であった。そこで、我々は Leu-Pro 型 PDI として **VI** および **VII** に着目し、新たな立体制御合成法を検討した。



アミノ-*H*-ホスフィン酸誘導体 **1** とトリフラート **2** の Pd 触媒下のクロスカップリング反応を種々検討したところ、配位挟角の大きな二座配位子 EPEphos を用いて、 $K_2CO_3$  存在下トルエン中 80°C で反応を行うと、所望のカップリング体 **3** が立体選択的に合成出来ることを見いだした。また、カップリング生成体 **3** は、白金触媒下、接触還元にあつと、高選択的にシス配置を有する Leu-Pro 型 PDI 誘導体 **4** に変換できた。一方、同じ反応を 80°C 加熱下行うと、トランス配置を有する Leu-Pro 型 PDI 誘導体 **5** が高選択的に得られた。**5** は、速度論的に生成する化合物 **4** が本反応条件下においてエトキシカルボニル基の  $\alpha$  位炭素のエピメリ化を経由して生成したと推定される。



Scheme 2

### 3. 研究評価および今後の研究計画

平成 21 年度の HRC 研究では、プロテアーゼ阻害剤のリードジェネレーションを指向して Leu-Pro 型 PDIs の不斉合成を中心に研究を展開させた。すなわち、アミノ-*H*-ホスフィナート誘導体 **1** とトリフラート **2** の Pd 触媒下のクロスカップリング反応を利用して Leu-Pro 型 PDIs の基本骨格 **3** を構築した。**3** は、熱力学的な接触還元条件にあつとにより、所望の立体配置を有する Leu-Pro 型 PDIs の保護体 **5** に高い選択性で誘導された。本合成ルートは、これまで困難であった Leu-Pro 型 PDIs の不斉合成研究に大きく貢献すると考えられる。また、紙面の都合で詳細は述べなかったが、

光学活性体への適用を踏まえて研究を展開させて、共通重要中間体の光学活性体の合成にも成功した。平成21年度の成果を踏まえて、光学活性 Leu-Pro 型 PDIs の合成を次年度以降の研究として展開する予定である。

#### 4. 研究成果の公表

##### a) 学術論文公表

- (1) T. Yamagishi, H. Ichikawa, T. Haruki, and T. Yokomatsu  
Diastereoselective Synthesis of  $\alpha,\beta'$ -Disubstituted  
Aminomethyl(2-carboxyethyl)phosphinates as Phosphinyl Dipeptide  
Isosteres  
Org. Lett. **10**, 4347-4350 (2008).

##### b) 学会口頭発表

- (1) 春木晶充, 森淳一郎, 山岸丈洋, 疋島貞雄, 横松 力  
ホスフィニルジペプチドイソスターを指向したリパーゼを用いるホスフィン  
酸誘導体の速度論的光学分割  
日本化学会第3回関東支部大会、2009年9月、東京
- (2) 田代直子, 山岸丈洋, 横松 力  
Leu-Pro 型ホスフィニルジペプチドイソスターの合成研究  
35回反応と合成の進歩シンポジウム、2009年11月、金沢

# 退行期疾患関連物質 D-アミノ酸に対する生体の応答

市田 公美 (病態生理学教室・教授)

## 1. 当初の研究目標

「哺乳類の体内に D-アミノ酸は存在しない」との定説や大量の L-アミノ酸存在下微量の D-アミノ酸を検出することの困難さのため、D-アミノ酸研究は非常に遅れていた。しかし、最近、分析技術の進歩により、様々な発酵・加工食品中に多様な D-アミノ酸が含まれており、ヒトは絶えず D-アミノ酸にさらされていることが明らかになった。さらに、哺乳類にも様々な D-アミノ酸が微量存在しているばかりでなく、D-アミノ酸を合成し生理活性物質として利用していることが明らかになり、D-アミノ酸を対象とする研究が盛んになってきた。

D-セリンはヒトを含めた哺乳類の脳内で合成され、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の co-agonist として作用している。最近、アルツハイマー病や統合失調症患者に D-セリンを投与すると認知症状の改善が認められることが報告され、D-セリンはこうした疾患への治療薬の候補として期待されている。その一方で、ラットに D-セリンを大量投与すると急性腎不全を惹起することが知られている。この D-セリンによる腎障害に関して、毒性発症閾値、種差、発症機序等、不明な点が多く、その解明は統合失調症治療薬としての D-セリンの安全な投与設計に繋がるものと考えられる。

白金系抗癌剤の一つであるシスプラチンは、広範な腫瘍に対し効果があるが、腎障害、聴覚障害、末梢神経障害などの副作用があり使用の難しい薬剤である。最近、メチオニンにシスプラチンによる聴覚障害の抑制効果があること、しかも D-体の方が L-体よりも抑制効果が強いことが報告された。一方、生体にとって微量必須元素であるセレンは白金とキレートを形成・捕捉することから、シスプラチンの毒性を緩和することが知られている。メチル水銀の毒性を抑制する効果がある L-セレノメチオニンによるシスプラチン毒性の抑制効果が検討されはじめたが、その光学異性体である D-セレノメチオニンについては不明である。

本課題では、D-アミノ酸の医薬品としての可能性を薬物動態学、安全性学の観点から探索することを目的として遂行している。平成 18 年度では、これまで不可能であった「D-アミノ酸及び L-アミノ酸を区別するのみならず、内因性と外因性を区別する」新しい研究法の確立を目指し、ガスクロマトグラフ-質量分析計(GC-MS)を検出手段とする安定同位体トレーサー法に、キラル分析を加味した新規分析法を開発した。さらに、D-ロイシンを対象に、ラットでは D-ロイシンの L-ロイシンへのキラル変換が約 30%進行することを明らかにした。平成 19 年度では、網羅的に D-アミノ酸の体内動態を明らかにする一環として D-メチオニンの体内動態及び L-型への変換率を明らかにすること、及び D-メチオニンの体内動態にはたす腎の寄与を解明することを目標とした。その結果、ラットでは投与した D-メチオニンのほぼ全量が L-型へのキラル変換されること、腎がそのキラル変換に大きく寄与していることを明らかにした。平成 20 年度は、D-セリンによる腎障害発症閾値を推定することを目的として、D-及び L-セリンの分別定量法を開発し、ラットへ D-セリンを大量投与したときの血中動態を検討した。その結果、D-セリンによって惹起される腎障害は一過性であること、D-セリンを 1.8 mmol/kg 体重以上投与するとその消失に遅延が認められるとともに、投与された全例で腎近位尿細管が脱落し腎障害が惹起されることを明らかにした。本年度は、引き続き D-セリンによる腎障害発症機序を明らかにすることを目標とする。腎障害を惹起する量

の投与では D-セリンの代謝が飽和している可能性があること、腎が D-セリンの主代謝臓器であることに着目し、D-セリン及びその代謝物をラットに大量投与し種々の腎障害マーカーを指標に発症機序を検討する。また、セレノメチオニン光学異性体がシスプラチン誘発腎障害に対し抑制効果を有するかを明らかにすることを目標とする。まず、実験系を確立することを目的に、光学活性なセレノメチオニンの合成、マウスでのシスプラチンの毒性試験とセレノメチオニン併用の効果を検討する。

## 2. 研究成果の概要

### (1) D-セリン大量投与によって惹起される腎障害発症機序

D-セリンは、脳内では D-アミノ酸酸化酵素によって代謝され、その脳内量が調節されている。D-アミノ酸酸化酵素は、脳以外に肝、腎に分布する。D-アミノ酸酸化酵素活性が消失しているラットに D-セリンを投与しても腎障害が惹起されないことから、D-セリンが障害発症本体ではなく、D-アミノ酸酸化酵素による D-セリンの代謝に関与するものが障害発症に関与していると考えた。D-セリンは D-アミノ酸酸化酵素により、3-ヒドロキシピルビン酸、過酸化水素、アンモニアに代謝される。また、補酵素として FAD を要求する。D-アミノ酸酸化酵素の基質となる D-アラニンなどの D-アミノ酸をラットに大量投与しても腎障害が惹起されなかったことから、FAD の過剰消費が原因であったり、共通代謝物である過酸化水素やアンモニアが毒性発症本体なのではなく、3-ヒドロキシピルビン酸が毒性発症本体であると仮説を立て検討を開始した。

まず、3-ヒドロキシピルビン酸の合成を検討した。種々の有機化学的手法、酵素生化学的手法を検討した結果、L-セリンを L-アミノ酸酸化酵素による酸化的脱アミノ化反応で 3-ヒドロキシピルビン酸とする方法が最も効率的な方法であることを見いだした。

3-ヒドロキシピルビン酸をラットに腹腔内投与し、腎障害の有無を観察した。しかし、D-セリンでは重篤な近位尿細管上皮の脱落が観察される量 (4.56mmol/kg 体重) と等モルの 3-ヒドロキシピルビン酸を投与しても腎障害は惹起されなかった。そこで、3-ヒドロキシピルビン酸を腎動脈より投与し腎内濃度を高めたが、同様に腎障害が惹起されなかった。D-セリンは近位尿細管上皮細胞内に存在する D-アミノ酸酸化酵素によって 3-ヒドロキシピルビン酸に代謝される。3-ヒドロキシピルビン酸による腎障害が惹起されないのは近位尿細管で再吸収されないためと考え、培養細胞系を用い 3-ヒドロキシピルビン酸の尿細管細胞への取り込みを検討した。しかし、ラット上皮細胞由来の NRK-52E 細胞、及びラットより摘出した腎より調製した尿細管初代培養において、D-セリン、3-ヒドロキシピルビン酸のいずれにおいても細胞毒性を確認することができなかった。D-アミノ酸酸化酵素は近位尿細管の S3 セグメントに局在すると報告されていることから、同セグメントの上皮細胞を選択的に得て、再検討する必要があることが示唆された。

### (2) シスプラチン誘発腎障害に対するセレノメチオニン光学異性体の抑制効果

まず、市販されている DL-セレノメチオニンを光学分割した。すなわち、DL-セレノメチオニンを無水酢酸により N-アセチル化した後、豚腎由来アシラーゼにより立体選択的な脱アセチル化反応を行い、L-セレノメチオニンと N-アセチル-D-セレノメチオニンを得た。後者を酸加水分解し、D-セレノメチオニンとした。光学活性カラムを装着した HPLC 分析により、いずれも高い光学純度 (99% e.e. 以上) を有していることが確認できた。

マウスにシスプラチンを腹腔内投与後 5 日目に採血及び腎を摘出し、血液生化学検査及び腎組

織形態観察を行った。その結果、シスプラチンを 70  $\mu\text{mol/kg}$  体重投与したとき、著明な血清クレアチニン及び BUN 上昇、近位尿細管刷子縁の消失が観察された。シスプラチン投与前 1h に、シスプラチンと等モルの L-セレノメチオニンまたは D-セレノメチオニンを前投与し、同様の観察を行った。その結果、L-セレノメチオニン前処置群では、クレアチニン、BUN は未処置群に比べて高値であったが、シスプラチン単独投与群に比べて有意にその上昇が抑制された。一方、D-セレノメチオニン前処置群においてもシスプラチン単独投与群に比べてクレアチニン、BUN は低値を示したが、L-セレノメチオニン前処置群に比べてその抑制効果は小さかった。腎臓内のセレン濃度を ICP-MS で測定した結果、D-セレノメチオニン前処置群は L-セレノメチオニン前処置群の約 60% にとどまった。

セレノメチオニンにシスプラチン誘発腎障害を抑制する作用があることが明らかになったが、D-セレノメチオニンの効果は L-体に比べて弱いものであった。シスプラチンの毒性を抑制するためにはセレンが白金とキレート形成することが必要だと考えると、白金とキレートを形成することができないセレノメチオニン自身が活性本体ではなく、セレノメチオニンの代謝物であるセレノホモシステインやセレノシステインが活性本体と考えられる。D-セレノメチオニンは D-アミノ酸酸化酵素により対応する 2-オキシ酸に代謝された後、トランスアミナーゼにより L-セレノメチオニンになるものと考えられる。ほぼ定量的に L-メチオニンにキラル変換される D-メチオニン（平成 19 年度で得られた研究成果）に比べて、D-セレノメチオニンの D-セレノメチオニンへの変換率が低いことが、D-セレノメチオニンの効果は L-体に比べて弱い原因であることが考えられた。

### 3. 研究評価及び今後の研究計画

当初の目標にそって研究を進め、上記の成果を挙げることができた。ラットへの D-セリン大量投与による腎障害の発症機序を解明することはできなかったが、多くの知見を得ることができた。これまで純度の低いものしか入手できなかった 3-ヒドロキシピルビン酸を合成できたことは、今後の展開を容易にするものと考えている。D-セリンによる腎障害の毒性本体は 3-ヒドロキシピルビン酸であるとの仮説のもとに本研究を進めていくためには、細胞内 3-ヒドロキシピルビン酸測定法を開発する必要がある。ラット腎上皮細胞由来とされる ERK-52E 細胞に 3-ヒドロキシピルビン酸を添加しても細胞障害が認められなかった理由を探索している過程で、ERK-52E 細胞がほとんど D-アミノ酸酸化酵素活性をもたないことが明らかになった。D-アミノ酸酸化酵素を発現している近位尿細管 S3 セグメントをラット腎より単離することが今後課せられた課題ではあるが、顕鏡下で細胞を収集するため、実験に供するのに十分な細胞を得るには非常な困難を伴うことが予想される。そこで、ERK-52E 細胞に D-アミノ酸酸化酵素を発現させて検討に使用することを計画している。

一方、シスプラチンにより誘発される腎障害に対して、セレノメチオニンの前投与が有効であることが明らかになった。しかし、D-セレノメチオニンの効果が L-体に比べて弱いものであった。その理由を明らかにするためには、D-セレノメチオニンが L-体にどの程度キラル変換するのかを検討する必要がある。そのため、D-及び L-セレノメチオニンの分別定量法の開発、及び D-及び L-セレノメチオニンの体内動態試験を計画している。本研究により、シスプラチンによる腎障害に対するセレノメチオニン光学異性体による抑制効果とその機序が明らかになれば、シスプラチンを用いた抗癌治療に有用な知見を与えるものと考えている。

天然物化学領域（竹谷）グループにより、アカネ草 (*Rubia cordifolia*) より抗腫瘍活性を有す

る D-アミノ酸含有環状ヘキサペプチド RA 類が発見された。分子設計・合成領域グループによる高活性アナログ創製に必要な薬物動態・代謝特性情報を収集することを目的に、RA 類の中で特に抗腫瘍活性の高い RA-VII を対象に、LC-MS/MS を用いた高感度定量法の開発、生体内動態の検討を計画している。

#### 4. 研究成果の発表

##### 原著論文・総説

- (1) Hiroataka Matsuo, Tappei Takada, Kimiyoshi Ichida, Takahiro Nakamura, Akiyoshi Nakayama, Yuki Ikebuchi, Kousei Ito, Yasuyoshi Kusanagi, Toshinori Chiba, Shin Tadokoro, Yuzo Takada, Yuji Oikawa, Hiroki Inoue, Koji Suzuki, Rieko Okada, Junichiro Nishiyama, Hideharu Domoto, Satoru Watanabe, Masanori Fujita, Yuji Morimoto, Mariko Naito, Kazuko Nishio, Asahi Hishida, Kenji Wakai, Yatami Asai, Kazuki Niwa, Keiko Kamakura, Shigeaki Nonoyama, Yutaka Sakurai, Tatsuo Hosoya, Yoshikatsu Kanai, Hiroshi Suzuki, Nobuyuki Hamajima and Nariyoshi Shinomiya.  
“Common defects of ABCG2, a high-capacity urate exporter, cause gout: a function-based genetic analysis in a Japanese population.”  
*Sci. Transl. Med.*, **1**(5), 5ra11, 1-8 (2009).

- (2) 長谷川 弘  
「安定同位体トレーサー法による D-アミノ酸の生体内動態研究」  
ぶんせき, (8), 403-410 (2009).

##### 学会発表

- (1) Hiroshi Hasegawa, Yoshihiko Shinohara, Kenji Akahane, Takehisa Matsukawa, Makiko Nakamura, Takao Hashimoto, Kimiyoshi Ichida  
“A strategy for evaluation of metabolic chiral inversion of D-amino acids by stable isotope methodology”  
The 1st International Conference of D-Amino Acids Research, July 2009, Awaji, Japan
- (2) Takehisa Matsukawa, Hiroshi Hasegawa, Yoshihiko Shinohara, Jun Kobayashi, Atsuko Shinohara, Momoko Chiba, Yutaka Inaba, Kimiyoshi Ichida, Kazuhito Yokoyama  
“Simultaneous determination of enantiomers of selenomethionine and [<sup>2</sup>H<sub>3</sub>, <sup>82</sup>Se]selenomethionine in biological fluid by capillary gas chromatography-mass spectrometry”  
The 1st International Conference of D-Amino Acids Research, July 2009, Awaji, Japan

# 退行期疾患に対する薬物作用の評価

立川 英一（内分泌・神経薬理学教室・教授）

## 1. 当初の研究目標

高血圧症、脳卒中、心臓病、糖尿病は、食・運動、休養、喫煙・飲酒などの生活習慣が原因で発症・進行する生活習慣病である。これらは退行期疾患であり、完治が難しく本邦の医療費を圧迫している。これまでに天然物から数々の有用な薬物が開発され、薬物治療に貢献してきた。本プロジェクトでの我々の目標は、退行期疾患の治療のための新ターゲット分子を同定し、新しい薬物作用の評価系を作出することにある。また、天然物化学領域グループと分子設計・分子修飾グループから抽出された活性分子の生物活性、薬理活性を評価することである。

近年、婦人科系疾患である卵巣がん、子宮内膜症、子宮筋腫の罹患率が上昇している。この理由として、ライフスタイルや生活習慣の変化が関係していることがあげられ、日本人女性の晩婚化、少子化、高カロリー・高脂質な食生活などによる内分泌環境の変化が疾患の発症に関わると推定されている。子宮内膜症は、罹患率が高く、月経困難症や不妊の原因疾患として重要な疾患である。子宮内膜症は遺伝的要因に加え、環境因子が複合的に作用し発症する女性特有な退行期疾患として捉えることができるが、病態の詳細は不明である。現在の治療薬は限られており、再発率も高く、薬物療法を含めた新しい治療法が望まれている。そこで、これらの分子病態を解析すると共に、その抑制薬を天然由来素材から見出すことを試みる。

- 1) 微小管(MT)動態の制御因子であるスタスミン発現をノックダウンするとがん細胞の増殖は著しく抑制される。今年度は、卵巣がんでのスタスミン発現の調節メカニズムについてがん生存シグナルとして機能する **mammalian target of rapamycin (mTOR)**に着目して検討した。また、共同研究者(生物分子有機化学教室、宮岡ら)により見出された、沖縄県石垣島や西表島近海に生息する海綿や軟体サンゴ由来新規化合物について、その抗腫瘍活性の機序の検討と *in vivo*での効果の検討を開始した。
- 2) ヒト子宮内膜細胞を移植したマウス内膜症モデルを用いてその病態を悪化させることが判明した血中の出血関連因子の作用の解析を行った。
- 3) ヒト子宮内膜間質細胞(ESC)は、月経周期の分泌期や妊娠時にプロラクチン(PRL)、インスリン様増殖因子結合蛋白質 1(IGFBP-1)を産生・分泌する数石状の脱落膜細胞に分化する。ESCの脱落膜化にはcAMPを介したプロテインキナーゼA(PKA)の活性化が重要と考えられている。これまでの当グループの解析で胎盤絨毛の形成にcAMPシグナル仲介因子である **Exchange protein directly activated by cAMP (Epac)**が関与している知見を得ているが、母体側の胎盤組織を構成する子宮内膜の脱落膜の分化における意義は不明である。そこで、子宮内膜組織でのEpac発現部位を明らかにすると共にESCの脱落膜化におけるEpacシグナル伝達経路の意義について検討した。

## 2. 研究成果の概要

### 1) ヒト卵巣がんにおけるスタスミン発現の意義と卵巣がんの増殖に及ぼす海綿や軟体サンゴ由来新規化合物の作用

#### ① スタスミン発現と卵巣がん

ヒト卵巣癌細胞におけるスタスミンが、がんの生存に極めて重要といわれる HIF-1 $\alpha$  と VEGF の発現に関与している知見を既に得ている。今年度は、そのシグナル経路(仲介因子)の解析を行った。細胞の増殖や生存における役割が示唆されている mTOR は約 290 kDa のセリン・スレオニンキナーゼであり、マクロライド系抗生物質 rapamycin によりその活性が抑制される。正常酸素下、低酸素下において卵巣がん細胞株(SKOV3、ES2)の増殖は、rapamycin により抑制された。また、この時に mTOR の下流に存在する p70S6 キナーゼ(Thr389)のリン酸化は抑制されると共に、HIF-1 $\alpha$  と VEGF 発現は低下した。また、siRNA の導入によりスタスミン発現を抑制すると、低酸素培養下での HIF-1 $\alpha$  と VEGF 発現レベルは抑制されると共に、p70S6 キナーゼのリン酸化は完全に阻害された。

#### ② 海綿と軟体サンゴ由来化合物の抗腫瘍活性

昨年度は、軟体サンゴ由来のセンブラノイドおよび海綿由来のメロジテルペノイド strongyloporine-16 を含む数種の化合物が、ヒト正常細胞に影響しない用量で卵巣癌細胞株 OVCAR3 細胞に対して増殖抑制作用を示すことを明らかにした。これら化合物の細胞増殖抑制活性の作用機序を調べるため OVCAR3 細胞の微小管に対する影響をみたところ、卵巣がん治療に適用されることがあるパクリタキセルが微小管の重合を促進する濃度では、微小管の重合と脱重合は strongyloporine-16 による影響が見られなかった。従って、これら化合物の細胞増殖抑制活性は、別の機序が関与していることが考えられた。さらに、strongyloporine-16 が、ES2 細胞において 5 nM から 500 nM の濃度間で用量依存的にその増殖を阻害することを認めた。この 500 nM でみられる最大抑制効果は、パクリタキセル 50 nM の効果に匹敵するものであった。培養細胞を用いた検討に加えて、これらの抗腫瘍活性の *in vivo* での効果の検討を行った。ES2 細胞分散液(0.2 mL の 50%マトリゲルに浮遊)をヌードマウスに(マウスあたり腹腔内に  $1 \times 10^6$  cells、皮下に  $5 \times 10^6$  cells)投与し、皮下の腫瘍サイズが長径 10mm を超えた 2 週間後に strongyloporine-16 (5 mg/kg, 2 回/週)の投与を開始した。その結果、投与開始 1 週間後(2 回投与後)において、薬物投与群では、対照群の増加率と比べて腫瘍サイズの平均  $25 \pm 3.0\%$  の減少が観察された。なお、同条件下でのパクリタキセル投与群の抑制率は  $37 \pm 1.1\%$  であった。しかし、本検討では ES2 細胞移植後約一ヵ月(投与開始 2 週間後)で全例が死亡したが、各群間の経日的な死亡率に差はみられなかった。

### 2) ヒト子宮内膜細胞を用いた内膜症モデル

ヌードマウスにヒト内膜細胞を移植して形成される細胞塊が内膜病変の性質を有するのか否かについて検討した。その結果、ヌードマウス卵巣摘出時にヒト子宮内膜細胞を腹腔内投与すると摘出部位において、血管形成を伴う内膜症様病変がみられた。出血と子宮内膜症の病態については、内膜症性のう胞内に凝血塊がしばしば認められ、病巣でくりかえし起こる出血は、特徴のひとつである。内膜症患者の内膜間質細胞に

はプロテアーゼ活性化受容体: PAR1 (protease activated receptor 1) が発現しているという報告がある。そこで、ヒト子宮内膜腺細胞 (EM-1) において、血液凝固因子などのこの受容体 (PAR1/2) の刺激が内膜症関連因子 (COX-2、IL-6、VEGF) 発現に与える作用を検討した。培養 EM-1 を用いて、PAR アゴニスト (PAR1: トロンビン、PAR2 アゴニスト、PAR1/2 アゴニスト) を添加し、細胞数の変化及び COX-2、IL-6、VEGF 発現をリアルタイム RT-PCR で解析した。病変での PAR 発現について、内膜細胞移植後、5 日目にて検討した。PAR2 アゴニスト 10  $\mu$ M、PAR1/2 アゴニスト 3、10  $\mu$ M、トロンビン 1 U/mL で有意に細胞数が増加した。COX-2 発現は、いずれのアゴニストでも、各アゴニスト添加後、6 時間で顕著に増加した。IL-6 と VEGF の発現に対しても培養 6 時間において、特に、PAR2 アゴニストの促進効果が認められた。また、病変組織における PAR1/2 の発現も確認された。

### 3) ヒト脱落膜細胞における Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) の役割

#### ① 子宮内膜組織における Epac の局在

ヒト子宮内膜組織及びラット妊娠子宮組織における Epac1 と Epac2 の局在を免疫蛍光染色法にて調べた結果、Epac1、Epac2 ともにヒト子宮内膜では腺上皮細胞、間質細胞に発現しており、ラット妊娠子宮では、胞胚着床部位を取り囲む脱落膜細胞 (ESC)、腺上皮細胞、血管内皮細胞で強く発現していることが分かった。

#### ② ESC の脱落膜化に対する Epac アゴニストの作用

ESC は、cAMP シグナル伝達経路の活性化により脱落膜細胞へと分化し、脱落膜マーカーとして知られるプロラクチン (PRL) や IGFBP-1 を産生・分泌する。また、この過程においてフォークヘッド型転写因子の FOXO1 の発現も増加することが知られている。初代培養ヒト ESC 及びその株化細胞 (EtsT) に Epac アゴニストと PKA アゴニストをそれぞれ単独処置または共処置した後、PRL、IGFBP-1、FOXO1 の発現をリアルタイム RT-PCR 法にて解析した。初代培養 ESC と EtsT で PKA アゴニストの処置によりこれらの発現が誘導されたが、Epac アゴニストの処置では変化しなかった。しかし、PKA アゴニストと Epac アゴニストを共処置すると、PRL と IGFBP-1 の発現は PKA アゴニスト単独処置時より有意に増加した。また、脱落膜化刺激を加えて脱落膜化した ESC では、脱落膜化していない ESC と異なり、Epac の下流シグナル伝達因子として同定されている低分子量 GTP 結合型蛋白質 Rap1 が活性化されることを明らかにした。

#### ③ ESC の脱落膜化に対する Epac ノックダウンの作用

Epac または Rap1 の発現を siRNA によりノックダウンし、脱落膜化における cAMP/Epac シグナル伝達経路の関与をさらに検討した。PKA アゴニスト単独処置及び PKA アゴニストと Epac アゴニストの併用処置による PRL と IGFBP-1 の発現誘導は、Epac1、Epac2 及び Rap1 の siRNA 処置により抑制された。特に Epac2 ノックダウンは、脱落膜マーカーの発現を顕著に抑制した。

### 3. 研究評価と今後の研究計画

卵巣がんは致死率が高く、特に上皮性卵巣がんである卵巣明細胞がんは、しばしば化学療法に抵抗性を示し、かつ予後不良であるという特徴を示す。この卵巣がんを含めた腫瘍形成では低酸素が誘導されており、この条件下で発現が高進する HIF-1 $\alpha$ や VEGF が腫瘍形成の進展に大きく関わっている。最近、がんの生存シグナルとしての mTOR を介したシグナル伝達の関与や HIF-1 $\alpha$ の発現制御における mTOR の役割を示唆するレポートがいくつか発表されている。この mTOR シグナル伝達経路の卵巣がん細胞における病態生理学的意義について解析を行ったところ、mTOR の下流に存在する p70S6 キナーゼのリン酸化と HIF-1 $\alpha$ 並びに VEGF の発現が相関する結果が得られた。すでに我々は、卵巣がんが発現が高進しているスタスミンが、VEGF 発現調節に部分的に関わっていることを報告している。このスタスミンの発現を抑制すると、mTOR 経路のシグナルが減弱される結果が得られたことより、スタスミン発現と mTOR シグナル経路の活性化がリンクし、両者ががんの生存に有利に働いている可能性を示唆した。テルペノイド化合物の抗腫瘍活性については、腫瘍抑制活性を *in vivo* で検証することができたが、死亡率の改善効果がみられなかった。この点については、対照薬として用いたパクリタキセルでも効果がみられなかったので、投与したがん細胞数や投与開始時期などをより適正なものにする必要があると考えられる。さらに、新たに NF $\kappa$ B 阻害作用を有する化合物が共同研究(天然医薬品化学教室、竹谷ら)により分離されているため、これら化合物も含めて *in vivo* での実験を中心に活性を検討する。

子宮内膜症は、子宮組織が、骨盤内に異所性に存在して機能する疾患である。その特徴として、エストロゲンにより悪化し、生殖年齢の約 5~10%、日本では約 13 万人が罹患している。これは、逆流した月経血により、内膜組織が腹膜などに移植されるために発症すると考えられている。何らかの原因により、正常な内膜細胞が質的に変化し、アポトーシスを起こしにくくなり、腹膜などに生着し、浸潤能が増し、免疫能の低下も加わって内膜症は進行していく。この過程では細胞増殖、炎症反応、血管新生がみられる。今回の結果より、逆行性月経血、病巣での出血、卵胞液中に含有されるセリンプロテアーゼが、異所性に存在する腺細胞の PAR を活性化し、内膜症の特徴である炎症性メディエーターの産生を高進することが考えられた。今年度は、PAR を介した IL-6 や VEGF の生成が炎症反応を増悪させ、内膜症の進行に寄与する可能性を示唆した。今後は、PAR アゴニストの内膜細胞生着やアポトーシスに与える影響の検討と PAR アゴニストとアンタゴニストの病変形成と IL-6 や PGE<sub>2</sub> 生成に及ぼす影響を *in vivo* で検討する。

今回の検討により子宮内膜組織における Epac 発現細胞を特定することができた。また、培養内膜間質細胞において、Epac アゴニストの単独処置は、脱落膜マーカー (PRL, IGFBP-1) の発現を指標とした脱落膜化を誘起しないものの、PKA アゴニストとの共存下では、Epac アゴニストは脱落膜化の誘導を増強することを明らかにした。さらに、Epac1、Epac2、Rap1 をノックダウンした条件下では、cAMP アナログ処置により誘導される脱落膜マーカーの発現が抑制された。これらの結果は、ESC の脱落膜形成過程には、PKA を介した経路だけではなく、Epac と Rap1 を介した cAMP シグナル伝達

経路が関与することを示唆している。今後は、Epac アゴニストによる PRL、IGFBP-1 発現調節機構について培養子宮内膜間質細胞を用いて詳細に解析する。また、Epac の発現を抑制した際に発現及び翻訳後修飾が変化する細胞内蛋白質を同定し、脱落膜化と Epac の関係におけるこの同定蛋白質の機能解析を行う。

#### 4. 研究成果の発表

##### 原著論文

- (1) Piao C, Tachikawa E, Hu Y, Sato Y, Yang P, Yamamoto K, Shinada T, Suzuki K. *In vitro* pharmacological activity of the extracts from red ant *Formica aquilonica* as potential therapeutic agents. *J Trad Med*, 26, 61-67 (2009)
- (2) Yoshie M, Kaneyama K, Kusama K, Higuma C, Nishi H, Isaka K, Tamura K. Possible role of the exchange protein directly activated by cyclic AMP (Epac) in the cyclic AMP-dependent functional differentiation and syncytialization of human placental BeWo cells. *Hum Reprod*. in press (2010)

##### 国際学会発表

- (1) Tamura K, Tachikawa E. Stimulation of angiogenesis by prostaglandin E<sub>2</sub> in luteal endothelial cells 14th International Congress of Endocrinology, 2010年3月, 京都

##### 国内学会発表

- (1) 草間 和哉, 吉江 幹浩, 田村 和広, 沓掛 真彦, 立川 英一, 樋熊 千夏, 西洋孝, 井坂 恵一  
ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化における Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) シグナル伝達経路の役割  
第 63 回西東京内分泌代謝研究会 2009 年 7 月, 東京
- (2) 吉江 幹浩, 草間 和哉, 田村 和広, 沓掛 真彦, 井坂 恵一, 立川 英一  
ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化におけるサイクリック AMP グアニンヌクレオチド交換因子 (Epac) の役割  
第 14 回日本生殖内分泌学会学術集会 2009 年 11 月, 東京
- (3) 草間 和哉, 吉江 幹浩, 田村 和広, 沓掛 真彦, 立川 英一, 樋熊 千夏, 西洋孝, 井坂 恵一  
ヒト子宮内膜間質細胞の *in vitro* 脱落膜化過程における Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) シグナル伝達経路の関与  
第 64 回西東京内分泌代謝研究会 2009 年 7 月, 東京
- (4) 草間 和哉, 吉江 幹浩, 田村 和広, 沓掛 真彦, 井坂 恵一, 立川 英一  
子宮内膜間質細胞の脱落膜化における Exchange protein directly activated by cAMP (Epac) を介する cAMP シグナル伝達経路の関与  
日本薬学会 第 130 年会 2010 年 3 月, 岡山