

## 平成19年度 ハイテク・リサーチ・センター整備事業 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 | 研究総括 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 | 教授  | 川島 悦子 | 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                    |
| 内分泌分子薬理学 | 准教授 | 田村 和広 | 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。

**退行期疾患の民間伝承知識に基づく活性成分の単離、構造解析遂行の天然物化学領域グループの3研究室：**

**天然医薬品化学：**茜草根（*Rubia cordifolia*）より微量新規環状ペプチドRA-XVIII ～ -XXIVを単離・構造決定し細胞毒活性データを追加した。また、市販のアミノ酸より短行程でイソジチロシン合成方法を開発し、ビスアナログをデザイン合成した。ヘキサ-N-メチルRAの配座解析と細胞毒活性の知見考察を加えた。

**漢方資源応用学：**麦門冬、*Stryphnodendron fissuratum*の果皮、*Agave utahensis*の全草の細胞毒性活性成分探索を行い、14種の新規化合物を含む合計29種の化合物を単離・構造決定した。麦門冬からの8種ホモイソフラボンと*Agave utahensis*からの4種ステロイド配糖体はHL-60白血病細胞に対して細胞毒性活性を示した。

**生物分子有機化学：**沖縄産海綿(S-02-2)からの生物活性成分探索を行い、ステロイド関連物質を単離した。また、*cis*から*trans*-デカリンへの異性化及び分子内Diels-Alder反応の連続反応による四環性骨格の構築を鍵反応とした、抗マラリア活性を有する海産ジテルペノイド7,20-diisocyanoadocianeの形式全合成を達成した。

### 退行期疾患に関連した特異的酵素阻害剤の分子設計・合成領域グループの3研究室

**有機合成化学：**これまでの成果を踏まえて検討を加えた結果、(1) ペプチドイソスターを指向したフルオロアルケン類の合成ではクロム化学を基盤とする方法論を確立した。(2) フルオロアルケニルエステル誘導体の二重アシル化剤としての反応性を明らかにした。(3) TFAEを用いたフッ素置換キノリン類の合成法を見出した。(4) 不飽和ラクトン類の付加環化反応に有効な新規な炭素酸触媒を開発した。

**薬品化学：**殺固形がん細胞活性の医薬候補化合物 NPI-2358 及び KPU-244 を基に、有効な抗腫瘍化合物の創製をめざし、構造活性相関に基づく誘導体の合成を実施し、新たに6種類のピリジン環含有新規誘導体合成を行った。一方、腫瘍部位特異的な薬効発現を狙った新規DDS開発として自己分解型のスペーサーを有するオリゴアルギニンペプチドをデザインし、一連のモデル薬物（蛍光物質）架橋体を合成した。半減期約9分の架橋体で細胞透過の促進が観察され、化合物や遺伝子等の輸送担体利用の可能性が示唆された。

**分子機能解析学：**ジペプチドの加水分解遷移状態をミミックしたジペプチドイソスターは、ペプチド性プロテアーゼ阻害剤の創製研究に活用できる有用な合成素子である。本研究年度においては、ジペプチド加水分解遷移状態をホスフィニル基でミミックしたホスフィニルジペプチドイソスターの不斉合成を中心に検討し、リン原子の不斉を活用するホスフィニルジペプチドイソスターの新しい立体制御合成法を開発した。

### 退行期疾患におけるD-アミノ酸代謝メカニズム、関連因子、薬物作用評価領域グループの2研究室

**病態生理学：**退行期疾患や老化との関連性が指摘されているD-アミノ酸の動態制御システム解明を目的に、腎障害モデルラットでのD-メチオニン体内動態に対する腎の寄与を検討した結果、健常ラットでは投与したD-メチオニンのほぼ全量がL-体に変換されること、腎がD-メチオニン代謝の約60%を担っていることを明らかにした。さらに、統合失調症治療薬の標的分子である D-セリンの定量法を開発した。

**内分泌分子薬理学：**PI3K/AKT シグナル経路を介して微小管動態調節蛋白質・スタスミンが、低酸素下での VEGF、HIF-1 $\alpha$ 発現に関与する結果並びに絨毛栄養膜細胞の分化に必要である結果を得た。本因子が、月経後に起こる子宮内膜のリモデリングと胎盤形成に役割をもつ新しい標的分子である可能性が考えられた。

# 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，新規シー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，医薬品創製研究のリ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

RA 系化合物は、生薬茜草根（アカネ *Rubia akane*、*R. cordifolia* の根）より単離された環状ペプチド化合物で 18 種の類縁体が単離されているが、中でも RA-VII (**8**) に強い抗腫瘍活性が認められ、その活性発現機構は 80S リボソームに結合し、蛋白質合成を阻害し、アクチンにも作用することが明らかにされている。RA-VII (**8**) は制がん剤として臨床治験が行われ，リードとして有望な化合物であるが、そのままでは毒性が強いこと、水溶性が低いことなどが問題とされている。これらの問題を解決しうる RA 系アナログのデザインには、詳細な構造活性相関に関する情報が不可欠とな

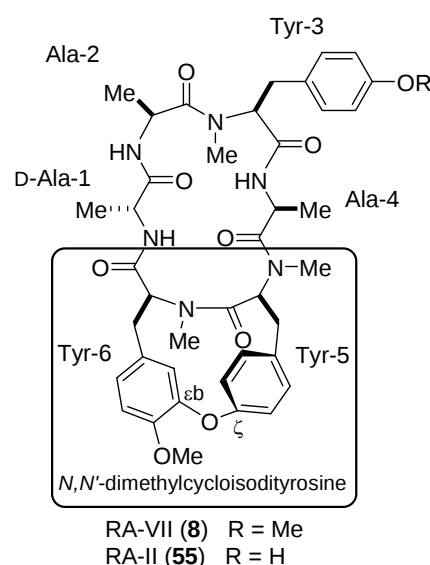


Figure 1

っている。

主 RA 類は 3 つの *N*-メチル-L-チロシン、2 つの L-アラニン、1 つの D-アラニンより構成された環状ヘキサペプチドであり、このうち 2 つの *N*-メチル-L-チロシンは C 末側  $\epsilon$  位炭素原子と N 末側  $\zeta$  位水酸基の酸素原子との間でエーテル結合し、特異なシクロイソジチロシン構造を形成していることから、構造化学的にも注目されている (図 1)。

本研究では、RA 類の構造活性相関情報を得るため、天然由来 RA 類の構造の多様性に期待し、*Rubia cordifolia* より新規 RA 類の探索を行った。次に、アナログ合成に必要な *N,N'*-ジメチルシクロイソジチロシンの合成法を確立し、活性発現に重要と考えられる Tyr-3 残基の側鎖の配座構造と活性に関する情報を得るため、側鎖の配向を固定したビスシクロイソジチロシンアナログの合成を行った。また、分子内水素結合により RA-VII (8) の配座構造の安定化に関与する D-Ala-1 および Ala-4 残基のアミド水素原子をメチル基に置き換えたアナログを合成し、配座構造への影響を検証した。

### 芳香環が修飾された新規環状ペプチド RA-XVIII の構造および活性

茜草根をメタノール抽出して得られるエキスについて、シリカゲルカラム、HP-20 カラム、HPLC 等を用いてペプチド成分の分離・精製を行ったところ、新規化合物とし

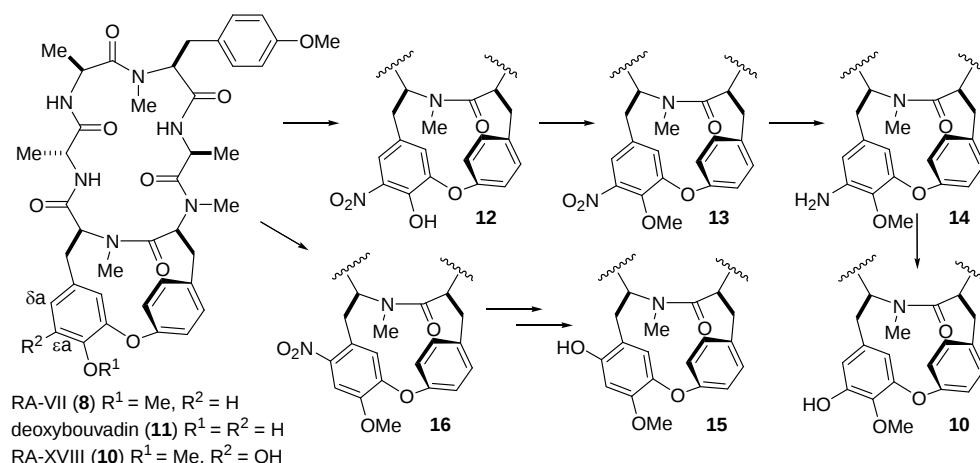


Figure 2

て RA-XVIII (10) を単離した。

10 はスペクトルデータ解析により、RA-VII (8) の Tyr-6 残基の  $\epsilon\alpha$  位に水酸基が置換した化合物であると推定した。10 は、deoxybouvadin (11) より合成することにより、構造を証明した (図 2)。また、この合成ルートを活用し、RA-VII (8) より 10 の水酸基の位置異性体アナログ 15 を合成した。10、15、及び合成中間体は、いずれも RA-VII (8) に比べ活性が低下した。また、 $\epsilon\alpha$  位に置換基が導入されたアナログは  $\delta\alpha$  位に導入されたものより強い活性を示した。

### 残基 2 にアラニンをもたない新規環状ペプチド RA-XIX、-XX、-XXI、-XXII、-XXIII、及び-XXIV の構造および活性

新規ペプチド RA-XIX (18) ~ -XXIV (23) はスペクトルデータの解析より、RA-VII (8) あるいは deoxybouvadin (11) の残基 2 のアラニンが RA-XIX (18) ではロイシン、RA-XX (19) 及び RA-XXI (20) では 2-アミノ酪酸 (Abu)、RA-XXII (21) ではスレオニン、RA-XXIII (22) 及び RA-XXIV (23) ではグルタミンに置換した構造と決定した (図 3)。RA-XIX (18) 及び RA-XX (19) は RA-VII (8) の減成反応により得られた 29 を用い

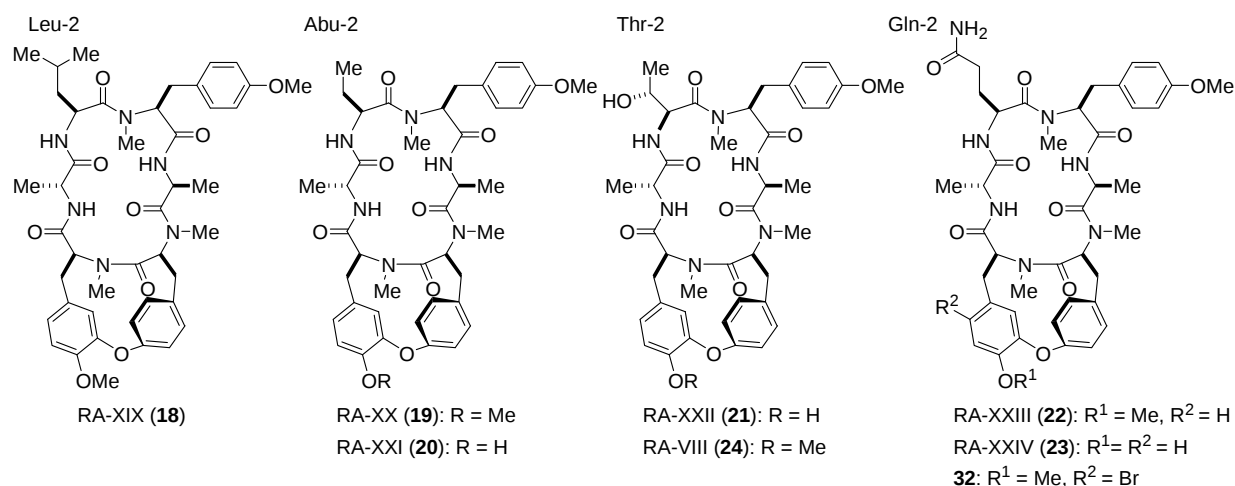


Figure 3

て合成することにより構造を証明した (図 4)。RA-XXIII (22) は臭素化体 32 の X 線結晶解析により証明した。また、RA-XXI (20)、RA-XXII (21)、及び RA-XXIV (23) はそれぞれ 19、RA-VIII (24)、及び 22 との化学的関連付けにより構造を証明した (図 3)。細胞毒性活性は  $8 > 19 > 18 > 22$  及び  $20 > 21$  となり、残基 2 のアルキル側鎖の伸長や、この部位への極性基の導入は、細胞毒性活性を低下させることを確認した。

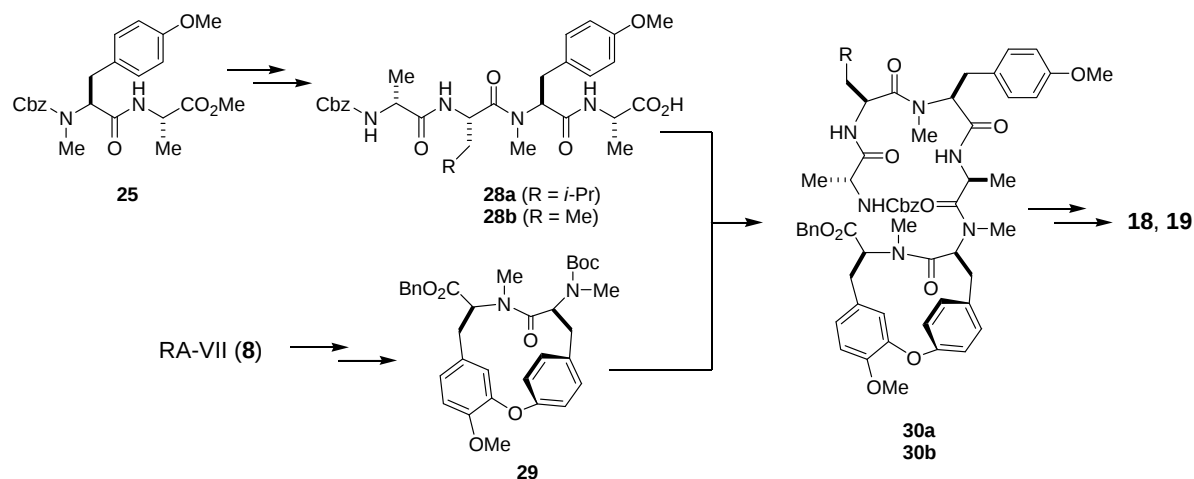


Figure 4

### *N,N'*-ジメチルシクロイソジチロシンの合成

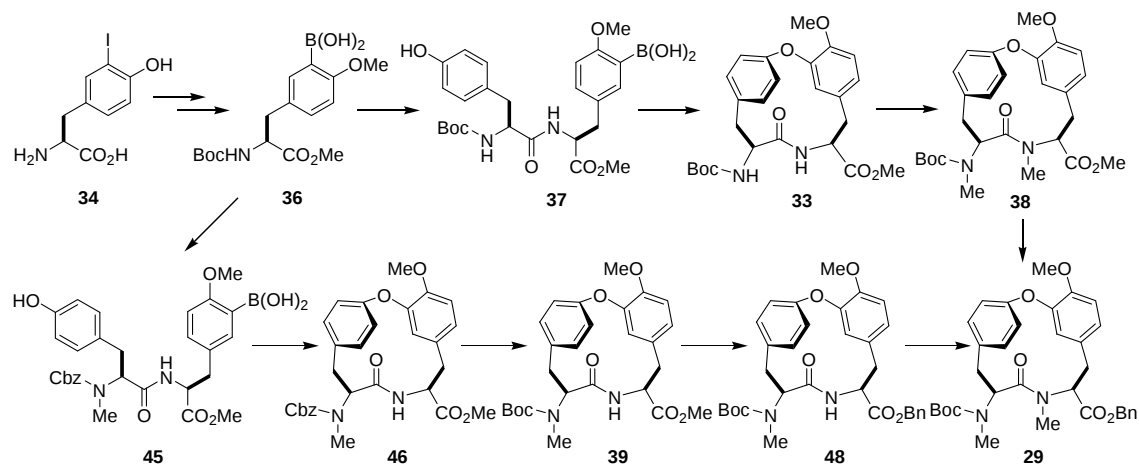
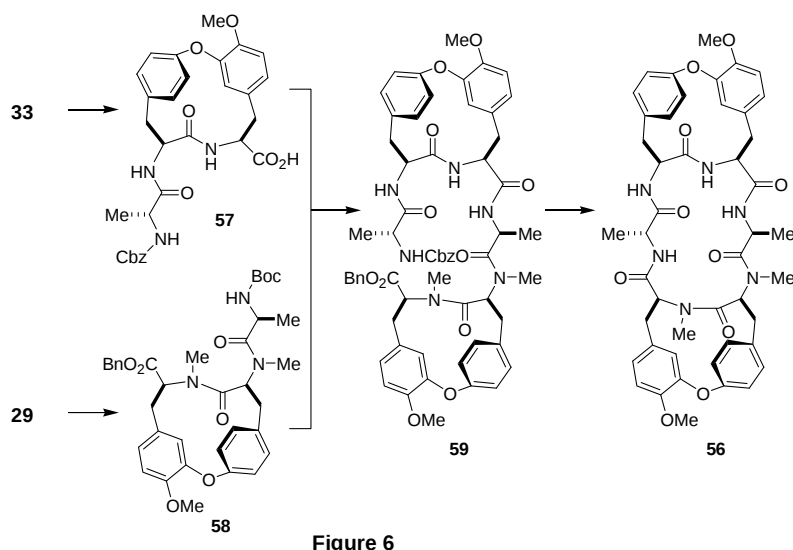


Figure 5

RA 類を構成するシクロイソジチロシン部位は RA 類の活性発現に重要であるが、14員環部位にジフェニルエーテル結合とともに平面性を示すペプチド結合を有するため高度に歪みがかかること、ならびに天然型 L,L-シクロイソジチロシンは熱力学的に安定な L,D-型に異性化し易いため、合成が困難とされていたが、Evans らのアリールボロン酸を用いた合成法を参考に、市販の amino acid 誘導体より、短行程で N,N'-ジメチルシクロイソジチロシンを合成する方法を開発した (図 5)。

### Tyr-3 残基の側鎖の配向を固定した RA-VII アナログの合成



RA 類は溶液中において、2-3 種の配座異性体の混合物として存在する。これらのコンホマーの構造の違いは、Ala-2/Tyr-3、Ala-4/Tyr-5 間の 3 級アミド結合の立体配置 (シス、トランス) の違いに由来する。各種溶媒中に於いて常に存在比率が最も高いコンホマーは、Ala-2/Tyr-3、Ala-4/Tyr-5、Tyr-5/Tyr-6 の

3 級アミド結合がそれぞれトランス、トランス、シス配置の配座が活性配座であること、Tyr-3 残基の芳香環側鎖も活性発現に重要であることが判明している。この部位の単結合の回転により側鎖の自由度が高く、その影響が不明であったので、Ala-2、Tyr-3 を L,L-シクロイソジチロシンに置き換えて Tyr-3 残基の側鎖の配向を固定したビスシクロイソジチロシンアナログ 56 をデザイン、に合成した。56 は NMR スペクトルにおいて、重クロロホルム溶媒中、単一のコンホマーとして観測された。NOESY スペクトルと X 線結晶解析データの比較より、56 は溶液中、結晶状態ともにほぼ同一の構造を有しており、結晶構造を RA-II (55) のものと比較すると、Tyr-3 残基の芳香環の配向を含め、類似していることから、56 は RA 類の配座構造を再現していた。56 は細胞毒性を殆んど示さないことから、Tyr-3 残基側鎖のこのような配座構造は活性に関与しないと考えられた (図 7)。

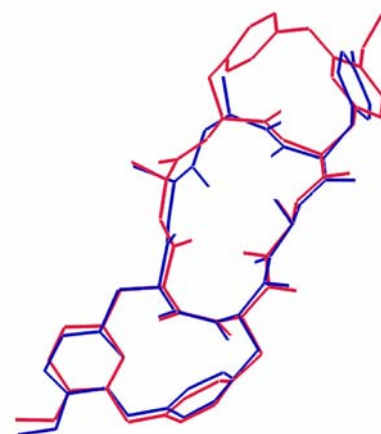


Figure 7. Superposition of the crystal structures of analogue 56 and RA-II (55).

### RA-VII のヘキサ-N-メチルアナログの合成

RA-VII (8) において D-Ala-1 および Ala-4 のアミド水素は、それぞれ Ala-4 および D-Ala-1 のアミドカルボニル酸素と水素結合を形成し、活性配座構造を安定化させているが、Ala-2 残基のアミド水素は分子内水素結合に関与せず、溶媒に曝された環境にあ

る。そこで、D-Ala-1、Ala-2、Ala-4 のアミド水素をメチル基により置換して配座構造に対する影響を検証するため、RA-VII (8) のヘキサ-N-メチル体 **62** を合成した(図 8)。アナログ **62** は重クロロホルム中 3 種の安定なコンホマーの混合物として観測され、そ

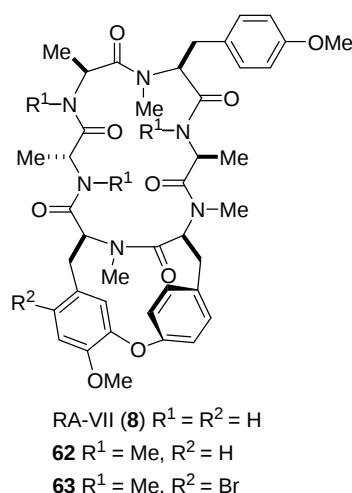


Figure 8

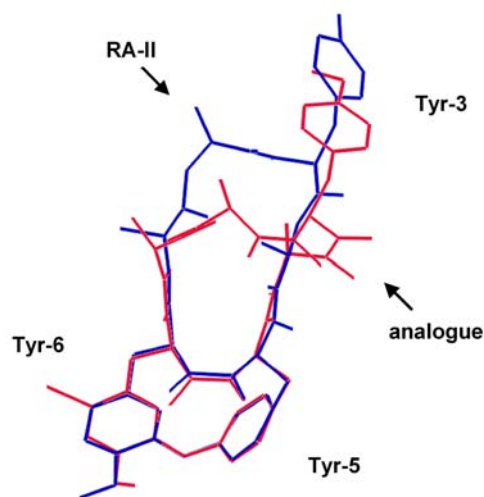


Figure 9. Superposition of the crystal structures of analogue **63** and RA-II (**55**).

の主コンホマー (93%) の構造は臭化物 **63** の結晶構造とほぼ一致し、Tyr-3/Ala-4 間のアミド結合がシス配置となるユニークな構造であった。**63** の結晶構造を RA-II (**55**) のものと比較すると (図 9)、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していた。アナログ **62** および **63** の細胞毒性活性は RA-VII (8) の約 1/300 ~ 500 であった。

### 3. 研究評価及び今後の研究計画

平成 19 年度の本研究では、前年度に引続き RA-VII (8) 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、Tyr-3 残基の配座を固定したアナログの合成を行った。茜草根をメタノール抽出物について詳細な分離・精製を行ったところ、微量新規成分として RA-XVIII (10) を単離した。**10** はスペクトルデータ解析により、RA-VII (8) の Tyr-6 残基の  $\epsilon a$  位に水酸基が置換した化合物と推定されたので、deoxybouvadin (11) より合成することにより構造を証明した (図 2)。また、この合成ルートを活用し、RA-VII (8) より **10** の水酸基の位置異性体アナログ **15** を合成した。**10**、**15**、及び合成中間体は、いずれも RA-VII (8) に比べ活性が低下した。また、 $\epsilon a$  位に置換基が導入されたアナログは  $\delta a$  位に導入されたものより強い活性を示した。また、さらに新たに新規ペプチド RA-XIX (18) ~ -XXIV (23) を単離した。それらのスペクトルデータの詳細な解析より、RA-VII (8) あるいは deoxybouvadin (11) の残基 2 のアラニンが RA-XIX (18) ではロイシン、RA-XX (19) 及び RA-XXI (20) では 2-アミノ酪酸 (Abu)、RA-XXII (21) ではスレオニン、RA-XXIII (22) 及び RA-XXIV (23) ではグルタミンに置換した構造と決定した (図 3)。RA-XIX (18) 及び RA-XX (19) は RA-VII (8) の減成反応により得られた **29** を用いて合成することにより構造を証明した (図 4)。RA-XXIII (22) は臭素化体 **32** の X 線結晶解析により証明した。また、RA-XXI (20)、RA-XXII (21)、及び RA-XXIV (23) はそれぞれ **19**、RA-VIII (24)、及び **22** との化学的関連付けにより構造を証明した (図 3)。細胞毒性活性は  $8 > 19 > 18 > 22$  及び  $20 > 21$  となり、残基 2 のアルキル側鎖の伸長や、この部位への極性基の導入は、細胞毒性活性を低下させることを確認した。

一方、RA 類を構成するシクロイソジチロシン部位は RA 類の活性発現に重要であるが、14 員環部位にジフェニルエーテル結合とともに平面性を示すペプチド結合を有するため高度に歪みがかかること、ならびに天然型 L,L-シクロイソジチロシンは熱力学的に安定な L,D-型に異性化し易いため、合成が困難とされていたが、Evans らのアリールボロン酸を用いたジフェニルエーテル合成法を参考に、市販のアミノ酸誘導体より、短行程で *N,N'*-ジメチルシクロイソジチロシンを合成する方法を開発した (図 5)。これにより、各種 RA 類誘導体の全合成ルートの確立が出来たと思っており、構造活性相関キー化合物合成にチャレンジしていける道が開けたので、今後のアナログ合成に応用していく。RA 類は溶液中において、2-3 種の配座異性体の混合物として存在し、Ala-2/Tyr-3、Ala-4/Tyr-5、Tyr-5/Tyr-6 の 3 級アミド結合がそれぞれトランス、トランス、シス配置の配座が活性配座であること、Tyr-3 残基の芳香環側鎖も活性発現に重要であることが示されていたが、単結合の回転により側鎖の自由度が高く、この部位の活性配座 (配向) は不明であった。そこで、Ala-2、Tyr-3 を L,L-シクロイソジチロシンに置き換えて Tyr-3 残基の側鎖の配向を固定したビスシクロイソジチロシンアナログ **56** をデザインし、**56** を合成した (図 6)。アナログ **56** は溶液中、結晶状態ともにほぼ同一の構造を有しており、RA-II (**55**) との比較により、Tyr-3 残基の芳香環の配向を含め、類似していたが、アナログ **56** は細胞毒性を殆んど示さないことから、Tyr-3 残基側鎖のこのような配座構造は活性に関与しないと考えられた (図 7)。

また、RA-VII (**8**) において D-Ala-1 および Ala-4 のアミド水素は、それぞれ Ala-4 および D-Ala-1 のアミドカルボニル酸素と水素結合を形成し、活性配座構造を安定化させているが、Ala-2 残基のアミド水素は分子内水素結合に関与せず、溶媒に曝された環境にあることより、D-Ala-1、Ala-2、および Ala-4 のアミド水素をメチル基により置換して配座構造に対する影響が検証された。RA-VII (**8**) を水酸化ナトリウム末で塩基として、ヨウ化テトラブチルアンモニウム存在下ヨウ化メチルにて処理し、ヘキサ-*N*-メチル体 **62** が得られた (図 8)。アナログ **62** は重クロロホルム中 3 種の安定なコンホマーの混合物として観測され、その主コンホマー (93%) の構造は臭化物 **63** の結晶構造とほぼ一致し、Tyr-3/Ala-4 間のアミド結合がシス配置となるユニークな構造であることが判明した。**63** の結晶構造を RA-II (**55**) のものと比較すると (図 9)、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しており、アナログ **62** および **63** の細胞毒性活性は RA-VII (**8**) の約 1/300 ~ 500 であることが検証された。

現在、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) Nishimura, K.; Hitotsuyanagi, Y.; Sakakura, K.-i.; Fujita, K.; Tachihara, S.; Fukaya, H.; Aoyagi, Y.; Hasuda, T.; Kinoshita, T.; Takeya, K.  
Three new diterpenoids, tricalysiolide H and tricalysiones A and B, from *Tricalysia dubia*.  
Tetrahedron, **63**(21), 4558-4562 (2007).
- (2) Nishimura, K.; Hitotsuyanagi, Y.; Sugeta, N.; Fukaya, H.; Aoyagi, Y.; Hasuda, T.; Kinoshita, T.; Takeya, K.  
Tricalysiamides A-D, Diterpenoid Alkaloids from *Tricalysia dubia*.  
J. Nat. Prod., **70**(5), 758-762 (2007).
- (3) Awang, K.; Lim, C. S.; Mohamad, K.; Morita, H.; Hirasawa, Y.; Takeya, K.; Thoison, O.; Hadi, A. H. A.  
Erythrocarpines A-E, new cytotoxic limonoids from *Chisocheton erythrocarpus*.  
Bioorg. Med. Chem., **15**(17), 5997-6002 (2007).
- (4) Villeneuve, M.; Kawai, M.; Watanabe, M.; Aoyagi, Y.; Hitotsuyanagi, Y.; Takeya, K.; Gouda, H.; Hirono, S.; Minnikin, D. E.; Nakahara, H.  
Conformational behavior of oxygenated mycobacterial mycolic acids from *Mycobacterium bovis* BCG.  
Biochimica et Biophysica Acta, Biomembranes, **1768**(7), 1717-1726 (2007).

#### 国際学会発表

- (1) Takeya, K., Nishimura, K., Hitotsuyanagi, Y., Fukaya, H., Aoyagi, Y., Hasuda, T., Kinoshita T.  
New Diterpenoids from *Tricalysia dubia*  
The International Congress and 55th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research, 2007 年 9 月, Graz, Austria

#### 国内学会発表

- (1) 李 知彦, 一柳幸生, 竹谷孝一  
抗腫瘍性環状ペプチド RA-VII の芳香環部位の構造活性について  
第五回次世代を担う有機化学シンポジウム, 2007 年 5 月, 東京
- (2) 山崎 朗, 中津川千紘, 戸部福也, 加藤玲子, 青柳 裕, 竹谷孝一  
*Salvia leucantha* の成分について  
日本生薬学会 第 54 回年会, 2007 年 9 月, 名古屋
- (3) 蓮田知代, 一柳幸生, 竹谷孝一  
抗腫瘍性環状ペプチド RA-VII に対するモノクローナル抗体の作成とその応用  
(2)  
日本生薬学会 第 54 回年会, 2007 年 9 月, 名古屋
- (4) 青柳 裕, 一柳幸生, 蓮田知代, 松山沙樹, 深谷晴彦, 竹谷孝一, 相山律男, 松崎 健, 橋本秀介  
トリプトライド C 環アナログの合成とそれらの細胞毒活性

第 26 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2007 年 11 月, 相模原

- (5) Amal Sallam, 一柳幸生, 竹谷孝一, El Sayed Shaker Mansour, Attallah Fouad, Sahar Gedara

*Daucus glaber* (セリ科) より単離した新規セスキテルペンラクトンの構造

日本薬学会 第 128 年会, 2008 年 3 月, 横浜

- (6) 李 知彦, 一柳幸生, 竹谷孝一

*Rubia cordifolia* より得られた新規環状ペプチド RA-XIX, -XX, -XXI 及び-XXII について

日本薬学会 第 128 年会, 2008 年 3 月, 横浜

- (7) 小沢 圭, 青柳 裕, 桂 明玉, 金 永日, 李 諸文, 深谷晴彦, 蓮田知代, 竹谷孝一

*ent*-Kaurene から *ent*-Abietane 型ジテルペンへの効率的変換反応

日本薬学会 第 128 年会, 2008 年 3 月, 横浜

# 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

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、また、化学療法後の再発時にはがん細胞が耐性を獲得していることが多く、そのような場合には現存する抗がん剤では対処できない。したがって、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ことに変わりはない。近年開発された塩酸イリノテカン、タキソテール、タキソールは既存の抗がん剤と作用機序が異なっており、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癌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に対して効果をもつ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指とした。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。

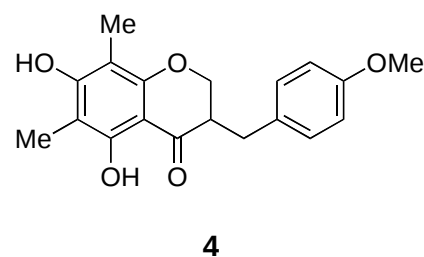
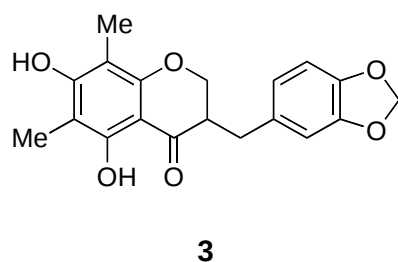
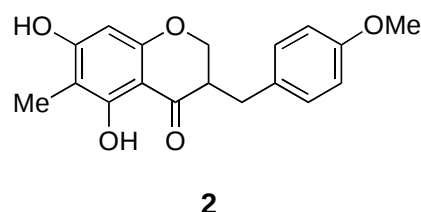
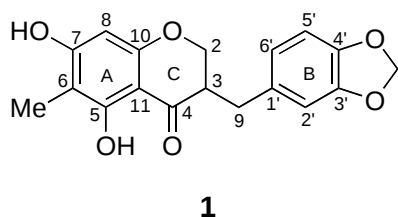
## 2. 研究成果の概要

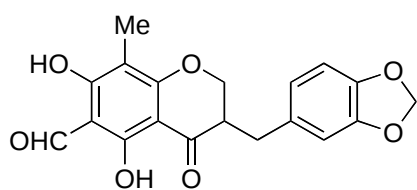
上記の観点から、本年度は、漢方系生薬の麦門冬、ブラジル産伝承生薬の *Stryphnodendron fissuratum* の果皮、リュウゼツラン科植物 *Agave utahensis* の全草の 3 種を研究対象とし、細胞毒性活性成分の探索を行なった。

(1) 麦門冬 (*Ophiopogon japonicus* の根の膨大部) の細胞毒性活性成分の探索

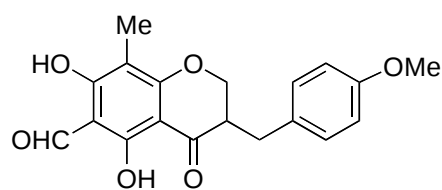
麦門冬はジャノヒゲ *O. japonicus* の根の膨大部を乾燥したもので、主に粘膜性消炎薬ならびに滋養強壮薬として用いられる。また、麦門冬は神農本草経の上品に収載されている漢方の要薬であり、止渴、鎮咳、去痰を目的に麦門冬湯、炙甘草湯などに配合されている。含有成分としては、ステロイドサポニン、ホモイソフラボノイド、ボルネオール誘導体等が知られている。昨年度、本生薬中の細胞毒性活性を指標とした成分検索を行い、3 種のホモイソフラボン類を単離し、構造を明らかにした。麦門冬の低極性画分にはさらに多数のホモイソフラボノイド類が含有されており、それらの中に HL-60 細胞に対して強い細胞毒性活性を示すものの存在が示唆されていることから、大量の麦門冬を酢酸エチルにより抽出し、活性成分の探索を行なった。

麦門冬 (乾燥重量 15 kg) を酢酸エチル (15 L) で温浸 (2 時間、2 回) し、減圧下濃縮した。得られた酢酸エチル抽出エキス (24 g) をシリカゲルカラムクロマト (ヘキサン-アセトン系) により、14 個の粗画分に分画した。それらの粗画分をさらにシリカゲルカラムクロマト、逆相カラムクロマト、ゲル濾過カラムクロマトにより分離・精製を進めた結果、8 種の既知ホモイソフラボンが単離された。化合物 **1** (9.2 mg)、**2** (1.4 mg)、**3** (10.2 mg)、**4** (38.0 mg)、**5** (2.3 mg)、**6** (1.7 mg)、**7** (9.6 mg)、**8** (1.7 mg) の構造を、物性値とスペクトルデータを文献値と比較することにより以下のように同定した。化合物 **2** と **6** の本生薬からの単離はこれが初めてである。化合物 **1-8** の HL-60 細胞に対する細胞毒性活性 (IC<sub>50</sub> 値) はそれぞれ、3.8 µg/mL (**1**)、3.0 µg/mL (**2**)、0.40 µg/mL (**3**)、0.060 µg/mL (**4**)、11.2 µg/mL (**5**)、6.1 µg/mL (**6**)、6.7 µg/mL (**7**)、6.9 µg/mL (**8**) であった。このうち、**3** と **4** はポジティブコントロールである etoposide や cisplatin に匹敵もしくはそれを上回る強い活性を示した。構造活性相関について考察したところ、A 環の C-6 位および C-8 位メチル基の存在が活性の増強に大きく関与していること、B 環の置換基が 3',4'-メチレンジオキシ基であるよりも 4'-メトキシ基である方が若干強い細胞毒性活性を有することが明らかとなった。

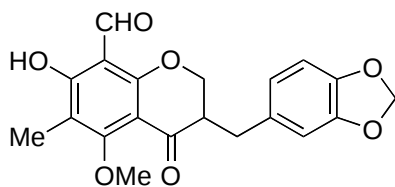




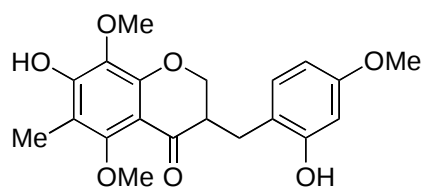
5



6



7

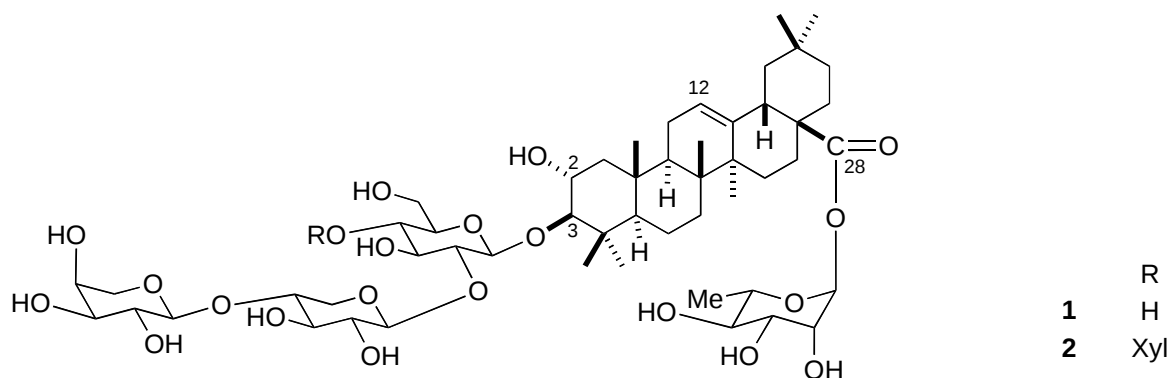


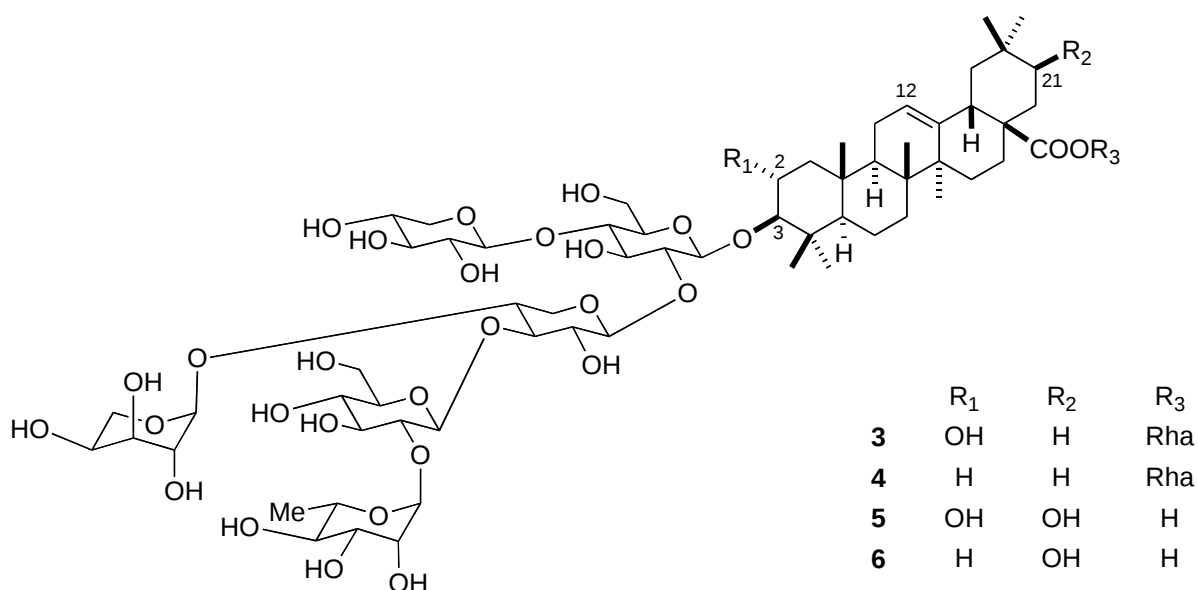
8

## (2) *Stryphnodendron fissuratum* の果皮の成分

マメ科 *Stryphnodendron* 属植物は、ブラジル原産の高さ 3~5 m の落葉亜高木である。ブラジルでは、茶剤、煎剤、エキスとして止血、止瀉などを目的に、また、外用として潰瘍、腫れ物の治療に用いられてきた。これらの作用は樹皮に多く含まれるタンニンに基づく効果であると推定されており、その他の含有成分としては、ショ糖、ゴム質などが知られているに過ぎない。今回、*S. fissuratum* に含まれる新規細胞毒性活性成分の探索を行った。

*S. fissuratum* の果皮 (乾燥重量 2.0 kg) をエタノールで抽出し、減圧下濃縮後、得られたエタノール抽出エキスを水に懸濁させ、ブタノールで分配した。得られたブタノール可溶性画分を Diaion HP-20 を充填したカラムに付し、20%メタノール、40%メタノール、60%メタノール、80%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 7 画分に分画した。80%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、6 種の新規トリテルペン配糖体 **1** (10.2 mg)、**2** (83.6 mg)、**3** (32.5 mg)、**4** (59.9 mg)、**5** (79.1 mg)、**6** (17.8 mg) を単離した。これらの化合物について、高分解能 MASS、 $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY、HMQC、HMBC、1D-TOCSY、HSQC-TOCSY、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、それぞれの構造を以下のように決定した。

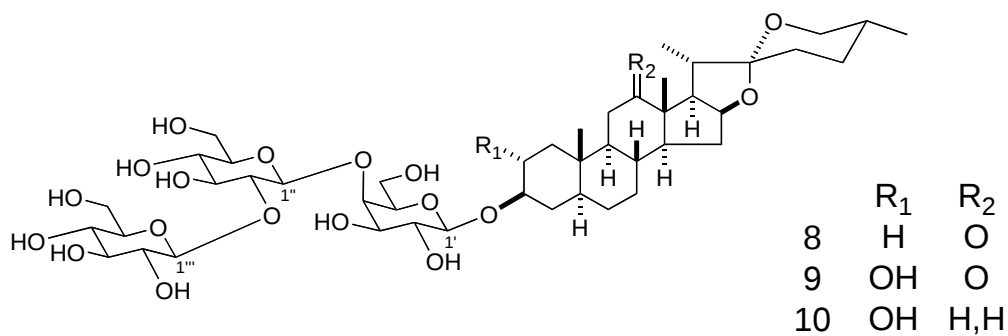
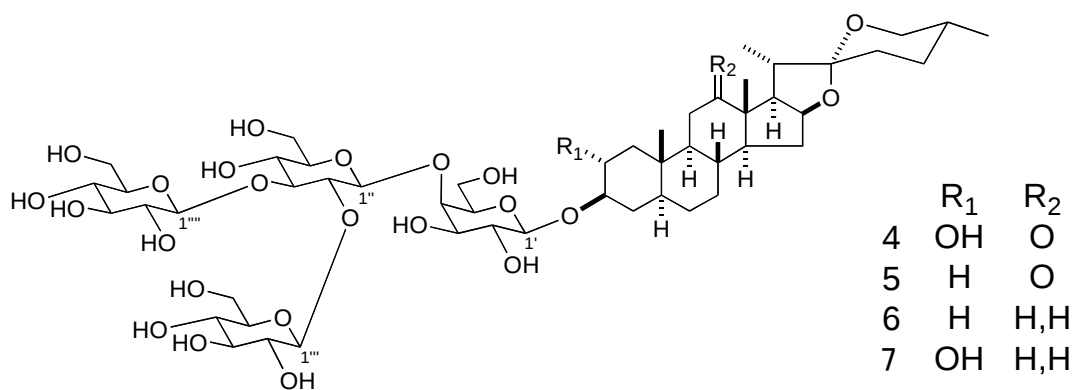
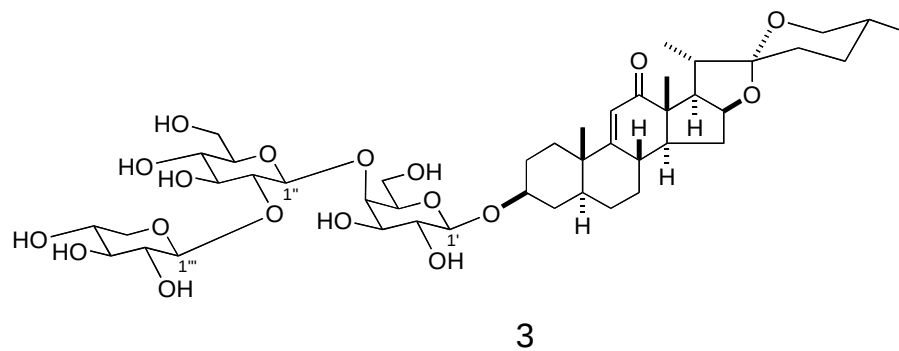
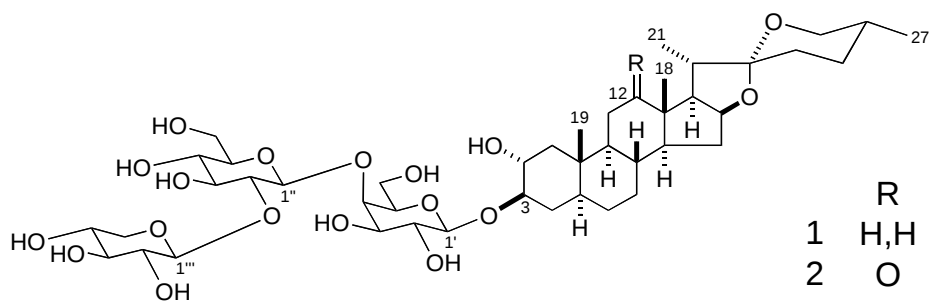


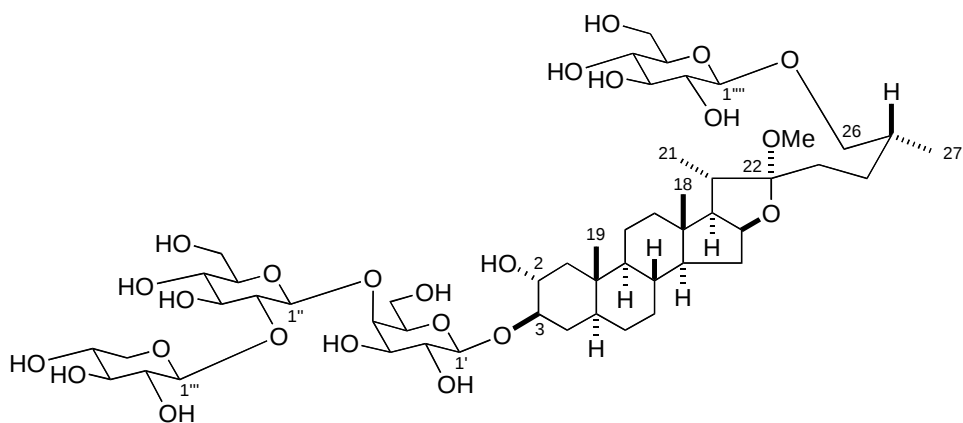


化合物 **3–6** の末端 L-arabinosyl 基は通常の  $^4C_1$  型配座ではなく、 $^1C_4$  型配座として存在していることを、 $^1H$ 、 $^{13}C$  NMR の化学シフト値、 $^1H$  NMR のスピン結合定数 ( $J$  値)、アノマーの  $^1J_{C-H}$  値 (171.9 Hz)、HMBC スペクトルにおけるアノマープロトンから 3 位炭素、5 位炭素への強い遠隔相関により確認した。このように L-arabinose が  $^1C_4$  型配座をとることは、今まで L-arabinose の 2 位水酸基が D-glucose などの  $^4C_1$  型配座の糖で置換された場合にのみ起こることが報告されているが、末端 arabinose では例がない。これは、arabinosyl 基が 4 位水酸基に結合した xylosyl 基の 3 位ビシナル水酸基に、かさ高い rhamnosyl-(1→2)-glucosyl 基が結合したためと考えられるが、配糖体構造においては初めての例であり、大変興味深い。化合物 **1–6** はいずれも HL-60 細胞に対して細胞毒性活性を示さなかった。

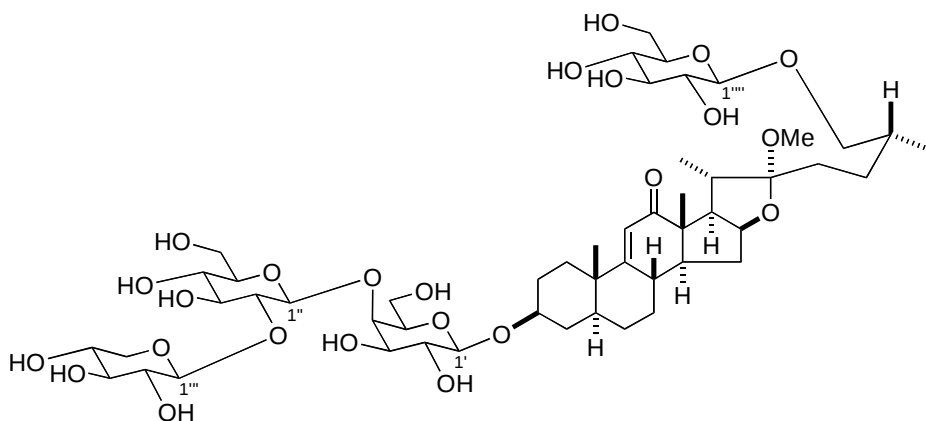
### (3) *Agave utahensis* のステロイド配糖体成分と細胞毒性活性

リュウゼツラン科植物 *A. utahensis* の全草のメタノール抽出エキスについて、昨年度に引き続き分離・精製を行った。Diaion HP-20 カラムクロマトにより得られた粗画分のうち、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、分取 HPLC にて分離・精製を行ったところ、新規化合物 8 種 (**1–5**、**11–13**) を含む 15 種の化合物が単離された。これらの化合物について、高分解能 MASS、 $^1H$  NMR、 $^{13}C$  NMR、 $^1H$ - $^1H$  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、それぞれの構造を以下のように決定あるいは同定した。化合物 **1–15** の HL-60 細胞に対する細胞毒性活性を評価したところ、**1**、**6**、**7**、**10** に活性が認められ、それらの細胞毒性活性の強さ ( $IC_{50}$  値) はそれぞれ、12.3  $\mu g/mL$  (**1**)、9.4  $\mu g/mL$  (**6**)、5.5  $\mu g/mL$  (**7**)、11.3  $\mu g/mL$  (**10**) であった。

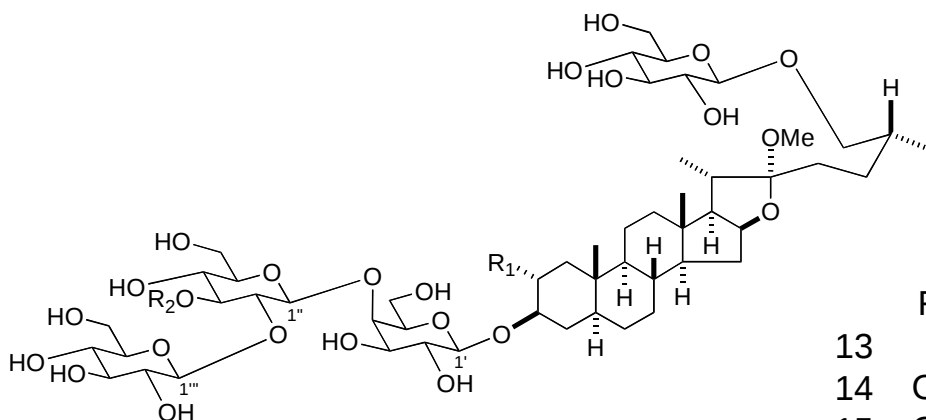




11



12



|    | R <sub>1</sub> | R <sub>2</sub> |
|----|----------------|----------------|
| 13 | H              | H              |
| 14 | OH             | H              |
| 15 | OH             | β-D-Glc        |

### 3. 研究評価及び今後の研究計画

麦門冬、ブラジル産伝承生薬の *Stryphnodendron fissuratum* の果皮、リュウゼツラン科植物 *Agave utahensis* の全草の 3 種を研究対象とし、細胞毒性活性成分の探索を行なった。

麦門冬 (*Ophiopogon japonicus* の根の膨大部) の酢酸エチル抽出エキスについて細胞毒性活性成分の探索を行い、8 種の既知ホモイソフラボン (1-8) を単離した。化合物 1-8 はいずれも HL-60 細胞に対して細胞毒性活性を示し、IC<sub>50</sub> 値はそれぞれ

3.8  $\mu\text{g/mL}$  (1)、3.0  $\mu\text{g/mL}$  (2)、0.40  $\mu\text{g/mL}$  (3)、0.060  $\mu\text{g/mL}$  (4)、11.2  $\mu\text{g/mL}$  (5)、6.1  $\mu\text{g/mL}$  (6)、6.7  $\mu\text{g/mL}$  (7)、6.9  $\mu\text{g/mL}$  (8) であった。このうち、3 と 4 はポジティブコントロールである etoposide や cisplatin に匹敵もしくはそれを上回る強い活性を示した。A 環の C-6 位および C-8 位メチル基の存在が活性の増強に大きく関与していること、B 環の置換基が 3',4'-メチレンジオキシ基であるよりも 4'-メトキシ基である方が若干強い細胞毒性活性を有することなどの興味深い構造活性相関が明らかとなった。今後は特に強い活性が認められた化合物 4 ( $\text{IC}_{50}$ , 0.060  $\mu\text{g/mL}$ ) について、他の腫瘍細胞に対する活性をパネルスクリーニング等で評価するとともに、作用メカニズムならびに *in vivo* での活性を検討していく予定である。

マメ科 *Stryphnodendron fissuratum* の果皮のエタノール抽出エキスを各種カラムクロマトにて分離・精製を行い、6 種の新規オレアナン型トリテルペン配糖体 1-6 を単離した。これらの化合物のうち 3-6 の末端 L-arabinosyl 基は通常の  $^4\text{C}_1$  型配座ではなく、 $^1\text{C}_4$  型配座として存在しており、配糖体構造においては初めての例である。いずれの化合物にも HL-60 細胞に対する細胞毒性活性は認められなかった。TLC 上、さらに数種のトリテルペン配糖体と推定されるスポットを認めたことから、続けて成分検索を進めていく予定である。

リュウゼツラン科植物 *Agave utahensis* の全草のメタノール抽出エキスから新規化合物 8 種 (1-5、11-13) を含む 15 種の化合物が単離された。これらの化合物はいずれも  $5\alpha$ -スピロスタンあるいは  $5\alpha$ -フロスタンのアグリコンの基本骨格とするステロイド配糖体である。化合物 1-15 の HL-60 細胞に対する細胞毒性活性を評価したところ、スピロスタノール型ステロイド配糖体である 1、6、7、10 に活性が認められ、それらの細胞毒性活性の強さ ( $\text{IC}_{50}$  値) はそれぞれ、12.3  $\mu\text{g/mL}$  (1)、9.4  $\mu\text{g/mL}$  (6)、5.5  $\mu\text{g/mL}$  (7)、11.3  $\mu\text{g/mL}$  (10) であった。フロスタノール型ステロイド配糖体には活性が認められなかった ( $\text{IC}_{50} > 20 \mu\text{g/mL}$ )。本植物については、TLC 上、さらに多くのステロイド配糖体成分を含むことが予想されることから、継続して分離・精製を行い、細胞毒性活性成分の探索を続けていく予定である。また、今回細胞毒性活性を示したスピロスタノール型ステロイド配糖体については、他の腫瘍細胞に対する細胞毒性活性や正常細胞に対する細胞毒性活性を評価し、細胞種による細胞毒性活性の特異性を判定していくとともに、その細胞毒性メカニズムがアポトーシス様であるかネクロトーシス様であるのか、またはオートファジー様であるのか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していく予定である。

#### 4. 研究成果の発表

原著論文

(1) Akihito Yokosuka, Sachiko Kawakami, Mitsue Haraguchi, Yoshihiro Mimaki.

Stryphnosides A-F, six new triterpene glycosides from the pericarps of *Stryphnodendron fissuratum*.

Tetrahedron, **64**, 1474-1481 (2008).

国内学会発表

(1) 横須賀章人、三卷祥浩

リュウゼツラン科植物の化学成分 (12) *Agave utahensis* の新規 spirostan  
配糖体について

日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月、横浜

# 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、当研究室で行っている新規なルイス酸やブレンステッド酸の開発を基盤とする環化反応や付加反応の展開、新規な不斉分子としての軸不斉アミド誘導体の合成と不斉反応への応用など非フッ素化合物での展開の発展としてフッ素化合物への適用拡大も検討する。

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) フッ素置換オレフィン構造を生物学的アミド等価置換とするペプチドミメティックスを指向したフルオロアルケン誘導体の効率的合成法の開発
- (2) 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二重アシル化剤としての反応性についての検討
- (3) トリフルオロアセトアルデヒドヘミ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
- (4) 新規なルイス酸やブレンステッド酸の開発を基盤とする効率的合成反応の開発、特にラクトン誘導体の環化反応と付加反応についての検討

上記のほか、軸不斉アミド誘導体の合成と不斉反応への応用を検討する。

## 2. 研究成果の概要

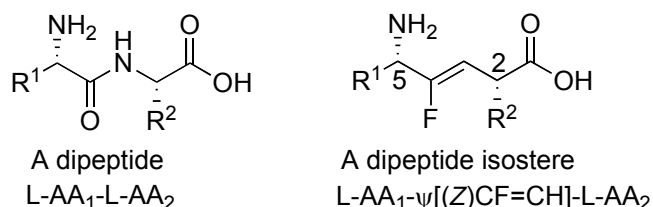
上記の当初の研究目標に沿って研究を行い、下記に示す成果を達成した。

- (1) フッ素置換オレフィン構造を生物学的アミド等価置換とするペプチドミメティックスを指向したフルオロアルケン誘導体の効率的合成法の開発

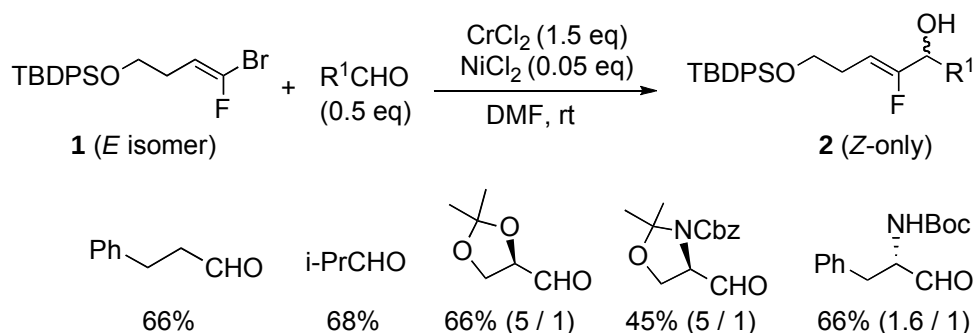
本研究テーマは当研究室においてここ数年来取り組んで来たものであり、これまでの成果を踏まえて継続的に検討を加えた。

一般にペプチドは生体内に存在する酵素によりアミド結合の加水分解を容易に受けるため、ある生理活性ペプチドを医薬品として用いることは困難な場合が多い。この問題点に対してアミド結合をオレフィンに置き換えたアナログの利用が検討されている。とりわけオレフィンにフッ素を導入することにより、立体的にも静電的にもアミド結合により類似するため、フルオロオレフィンはアミド結合の理想的なミミックと考えられている。一方、フルオロオレフィン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な結

合である。さらに、フルオロオレフィンの炭素-炭素二重結合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。このようなフルオロオレフィンの特性に着目して、生理活性ペプチド内の特定のアミド結合をフルオロオレフィンに置き換えて、*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。



我々は、これまでにこれらの研究に必要なフルオロオレフィン化合物である 2,5-ジ置換 4-フルオロ-3-アルケンカルボン酸のオレフィン部の立体配置と 2 位と 5 位のジステレオ選択性を完全に制御した合成法をはじめとして関連反応の開発を行って来た [Chem. Lett. 2002, 28-29; Tetrahedron Lett. 43, 5845-5848 (2002); Tetrahedron 61, 5741-5753 (2005)]. さらに、ブロモフルオロアルケン誘導体と低原子価クロムとの反応によるフルオロアルケニルクロム種の発生とアルデヒドへの付加反応によるフルオロアルケン類の立体特異的合成法の開発を検討してきた [J. Fluorine Chem. 126, 1166-1173 (2005)]. 今回は本反応の更なる詳細な検討を加えた。その結果、CrCl<sub>2</sub>(II)-NiCl<sub>2</sub> 系を用いることにより (*E*)-ブロモアルケンと α-アミノアルデヒドを含めた各種アルデヒドとの反応で対応する (*Z*)-フルオロアリルアルコール誘導体が比較的好収率で得られることを見出した (Scheme 1)。本反応はこれまで殆ど知られていないフルオロアルケニル金属種の合成化学的展開の可能性を示唆するものである。

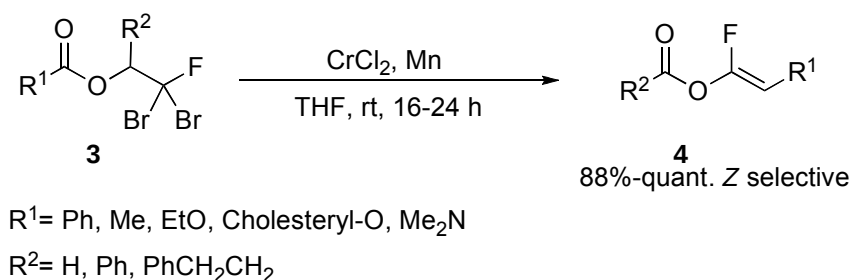


Scheme 1

## (2) 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二重アシル化剤としての反応性についての検討

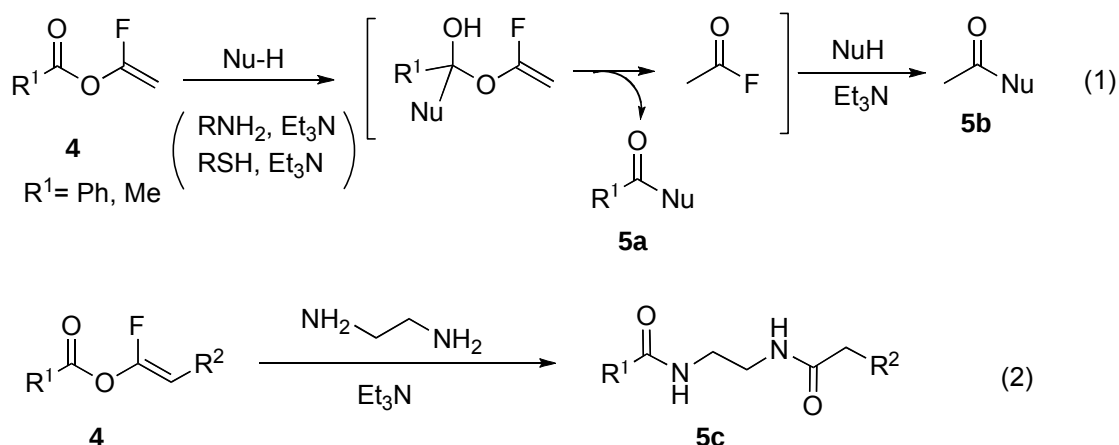
我々は、ジブロモフルオロメチルカルビニルエステル誘導体 **3** と塩化クロム(II)との反応によりエステル基の転位を伴った新規な反応が進行して 1-フルオロア

ルケニルエステル誘導体 **4** が高収率かつ高 Z 選択性で得られることを見出している (Scheme 2)。



Scheme 2

生成物の 1-フルオロアルケニルエステル構造 **4** はエステル加水分解により求核試薬に対してアシル剤として反応性に富む酸フッ化物を生成すると考えられるので、**4** は二重アシル化剤としての反応性を示すと期待される。そこでこれらの反応性について、まず適当なアミンあるいはチオール求核種を用いて検討したところ、予想したようにアシル化剤として反応性に富んだ中間体の生成が確認された (Scheme 3, Eq 1)。さらに、エチレンジアミンのような求核中心を 2 つ有する化合物との反応では非対称なジアミドが主生成物として得られることが分かった (Scheme 3, Eq 2)。これらの知見は 1-フルオロアルケニルエステル構造 **4** が種々の加水分解酵素に対して特異的な非可逆的阻害剤の分子設計を提供するものと期待される。



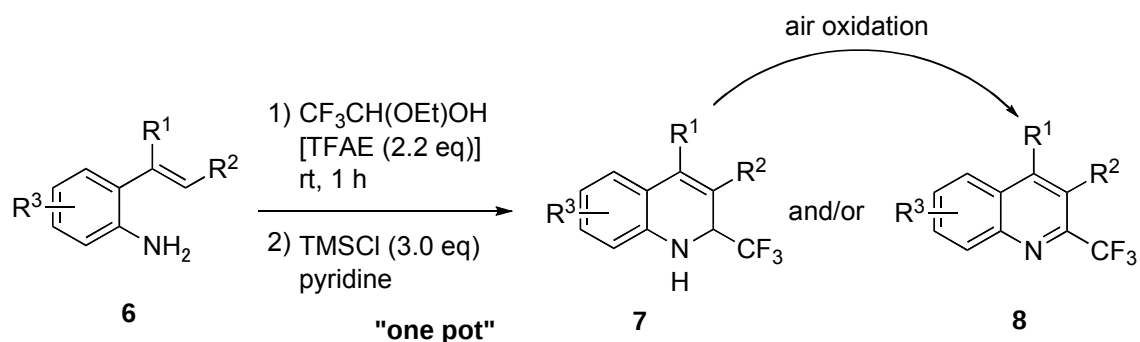
Scheme 3

### (3) トリフルオロアセトアルデヒドヘミ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効率的な合成において、入手が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利用することは必須であり、フッ素化試薬の開発と並んでこれらを用いた反応開発は重要である。

我々は安価で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 (TFAE) の反応開発を展開しているが、最近の成果としてオルト-アミノスチレン誘導体 **6** と TFAE との反応により 2-トリフルオロメチルキノリンおよび関連の

1,2-ジヒドロ体などの効率的な合成法の開発に成功した (Scheme 4)。抗マラリヤ剤や DPP-IV 阻害剤などに 2-トリフルオロメチルキノリン構造を有するものが報告されており、本反応はこれらの合成法としての応用が期待される。

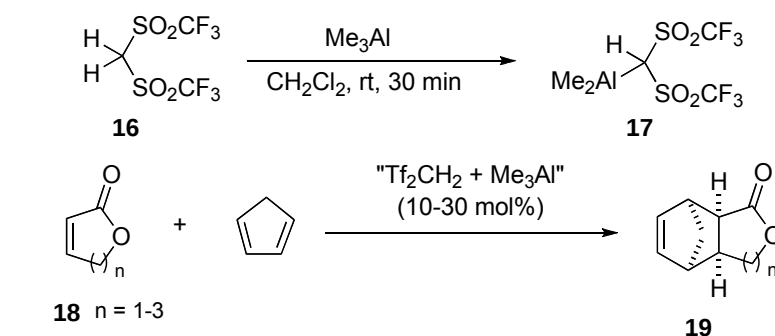


Scheme 4

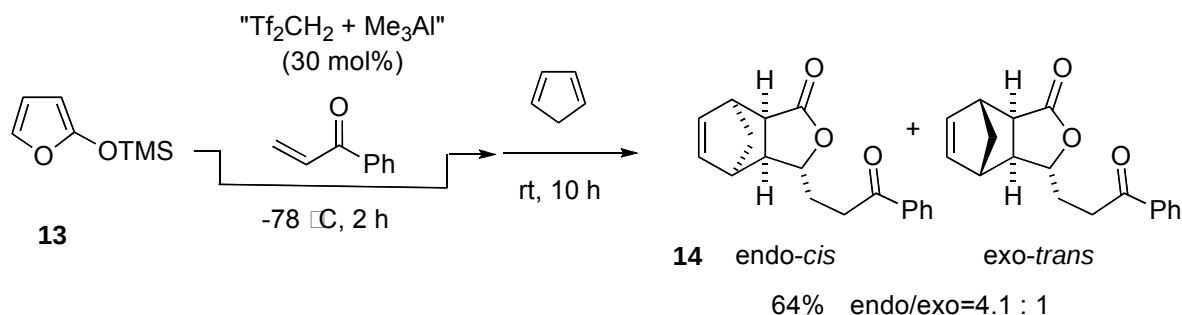
- (4) 新規なルイス酸やブレンステッド酸の開発を基盤とする効率的合成反応の開発、特にラクトン誘導体の環化反応と付加反応についての検討

2点配位型ルイス酸のコンセプトを基盤として、我々はこれまで成功例がほとんど知られていなかったエステル基を結合部とするジエン-ジエノフィルの分子内 Diels-Alder 反応および分子内 [3+2] 付加環化反応に極めて有効なルイス酸の開発に成功した [Chem. Rec. 7, 167-179 (2007)]。

さらに、これまでの研究の流れに沿ってビストリフルオロメタンスルホニルアルカン構造を基盤とする炭素酸触媒の開発に取り組み始めた。前年度からの継続として 19 年度は Scheme 5 に示したように、ビストリフルオロメタンスルホニルメタンとトリメチルアルミニウムとの反応を詳細に検討し、生じるアルミニウムメチドの構造を明らかにし、さらにこのものが不飽和ラクトンとシクロペンタジエンとの Diels-Alder 反応の触媒として有効であることを見出した。さらに、本触媒は Scheme 6 に示したように、2-シリルオキシフラン **13** のエノンに対する Mukaiyama-Michael 付加反応にも有効であり、反応は低温で速やかに進行するので、引き続く Diels-Alder 反応がワンポットで可能であることを見出した。



Scheme 5



Scheme 6

### 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。全体的には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と応用に関しては、フッ素化学の領域では未解決な課題として残されているフッ素置換アルケニル金属種の発生と反応に焦点を当てて取り組み、これまでの知見を踏まえてブロモフルオロアルケンと低原子価クロム-ニッケル系との反応によるアルケニルクロム種の各種アルデヒドへの付加反応を展開した。今後はこの成果を展開して抗腫瘍活性を有するジペプチドベスタチンの化学修飾を行う。

(2) 1-フルオロアルニルエステル誘導体の合成とアシル化剤としての反応性に関する検討では、アミンやチオール類に対して良好な反応性を示すこと、さらにジアミン類に対しては非対称アミドが主生成物として得られることから、本化合物が二重アシル化剤として良好に機能することを明らかにした。今後は更なる詳細な検討と各種の加水分解酵素を標的とした分子設計と合成ならびに活性評価を検討する。

(3) 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 TFAE 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をもたれる2位にフッ素置換基を有するキノリン類の効率的な合成法を開発した。引き続き検討から、現在は TFAE とオルト-アミノフェノール類から得られる N,O-アセタール誘導体がアルキルリチウム試薬と極めて特異な反応性を示すことを見出しており、今後詳細な検討を加えていく。

(4) 新規なルイス酸触媒の開発では、これまで蓄積してきたこの分野での研究成果に基づいて、昨年度からはビストリフルオロメタンスルホニルアルカン構造に着目した炭素酸を用いた反応開発へと展開を図り、不飽和ラクトン誘導体の Diels-Alder 反応やワンポットでのシロキシフランのエノンへの付加反応と生じた不飽和ラクトンの連続的な Diels-Alder 反応に有効な触媒としてビストリフルオロメタンスルホニルメタン-トリメチルアルミニウム系の開発に成功した。今後もこのような新規なブレンステッド酸の活用について広範に検討し、生理活性的に興味をもたれる有機フッ素化合物の効率的な合成法の開拓も行っていく。

#### 4. 研究成果の公表

##### 学術論文発表

- (1) Sakagami, K.; Yasuhara, A.; Chaki, S.; Yoshikawa, R.; Kawasaki, Y.; Saito, A.; Taguchi, T.; Nakazato, A.  
Synthesis, in vitro pharmacology, and pharmacokinetic profiles of 2-[1-amino-1-carboxy-2-(9*H*-xanthen-9-yl)-ethyl]-1-fluorocyclopropane carboxylic acid and its 6-heptyl ester, a potent mGluR2 antagonist.  
Bioorg. Med. Chem., 16, 4359-4366 (2008).
- (2) Yanai, H.; Mimura, H.; Kawada, K.; Taguchi, T.  
Convenient synthesis of fluorinated quinoline, 1,2-dihydroquinoline and 1,2,3,4-tetrahydroquinoline Derivatives.  
Tetrahedron, 63, 2153-2160 (2007).
- (3) Yanai, H.; Takahashi, A.; Taguchi, T.  
Development of effective Lewis acids for the catalytic Diels-Alder reaction of  $\alpha,\beta$ -unsaturated lactones with cyclopentadiene.  
Tetrahedron Lett., 48, 2993-2997 (2007).
- (4) Yanai, H.; Takahashi, A.; Taguchi, T.  
Dimethylaluminum methide complex  $\text{Tf}_2\text{CHAlMe}_2$ : an effective catalyst for Diels-Alder reaction of  $\alpha,\beta$ -unsaturated lactone derivatives with cyclopentadiene.  
Tetrahedron, 63, 12149-12159 (2007).

##### 学会発表

###### (国際学会)

- (1) T. Taguchi, H. Yanai, A. Saito, W. Sakamoto, and A. Takahashi  
Development of efficient Lewis acid catalysts for Diels-Alder reactions of dienophiles having  $\alpha,\beta$ -unsaturated ester moiety.  
15th European Symposium on Fluorine Chemistry, July, 2007, Prague, Czech
- (2) A. Sato, M. Okada, R. Okatani, Y. Nakamura, H. Yanai, and T. Taguchi  
Chromium-mediated fluoroalkenylation reaction of aldehydes: Synthesis of (*Z*)-fluoroallylic alcohols.  
15th European Symposium on Fluorine Chemistry, July, 2007, Prague, Czech

###### (国内学会)

- (1) 高橋 新, 矢内 光, 田口武夫  
テトラキス(トリフルオロメタンシルホニル)プロパンを Brønsted 酸触媒とするケテンシリルアセタール誘導体の Mukaiyama-Michael 反応  
第 31 回フッ素化学討論会、2007 年 10 月、弘前
- (2) 和田英貴子, 矢内 光, 東條 学, 齊藤重紀夫, 田口武夫  
1-フルオロアルケニルエステル誘導体の効率的合成と新規アシル化剤としての反応性

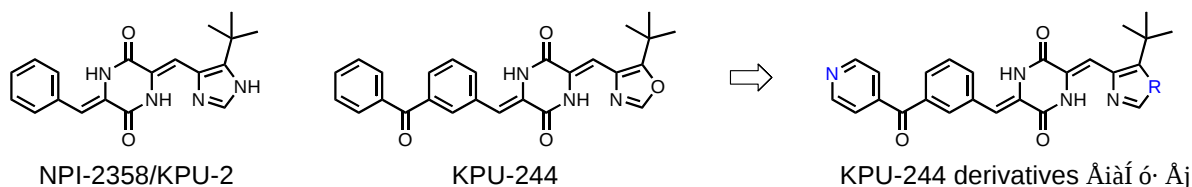
- 第 31 回フッ素化学討論会、2007 年 10 月、弘前
- (3) 中村裕子, 岡田みどり, 矢内 光, 田口武夫  
フッ素置換オレフィン類の閉環メタセシス反応  
第 31 回フッ素化学討論会、2007 年 10 月、弘前
- (4) 矢内 光, 三村英之, 河田恒佐, 田口武夫  
トリフルオロアセトアルデヒド *N*, *O*-アセタール誘導体の脱フッ素アルキル化  
反応と連続的アルドール型反応への展開  
日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月、横浜
- (5) 岡谷理恵子, 岡田みどり, 佐藤 梓, 中村裕子, 矢内 光, 田口武夫  
ペプチドイソスターを指向したフルオロアルケニルクロム種 (III) による *Z*-フルオロオレオレフィンの合成  
日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月、横浜
- (6) 和田芙貴子, 矢内 光, 岸本海人, 田口武夫  
1-ハロアルケニルエステル誘導体の二重アシル化剤としての反応性  
日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月、横浜

# 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** を見いだしているが、誘導体開発は未だ不十分であり、種々の誘導体の合成・活性評価を行ない、詳細な構造活性相関を実施する必要がある。また、さらに強力な抗がん活性を有する誘導体の開発のみならず、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も創薬の必須課題であり、本研究において注力する。



## 2. 研究成果の概要

上記の観点から、平成19年度は、特に、**NPI-2358**から誘導され、約4倍殺細胞活性が増強された誘導体 **KPU-244** に着目した新規誘導体の開発を実施した。この **KPU-244** は**NPI-2358**にさらにベンゾイル基が付加した誘導体であるが、この部分の誘導は全く行なわれていないため、活性に及ぼす置換基等の効果は不明である。そこで、置換基の導入および環構造のさらなる変換を実施し、強力な活性を有する化合物創製をめざした。一方、化合物の物性を改善するため、活性を低下させずに極性官能基やリン酸エステル構造を導入することで、水溶性プロドラッグの可能性の探索を行った。その成果の概要は以下になる。

### (1) 新規誘導体の開発

高活性な誘導体である**KPU-244**のベンゾフェノン構造に窒素原子を導入した誘導体の合成を進め、現在までに6種類の新規誘導体の合成に成功した。このようなピリジン環への変換において、誘導体の若干の水溶性向上が見られた。今後、活性評価に付き、有効性を検討していく予定である。

### (2) 水溶性プロドラッグの可能性の探索

**NPI-2358**へのスペーサー構造の導入とその先に水溶性補助基の導入を行い、生体内で、親化合物としての**NPI-2358**を再生するプロドラッグの創製を開始しているが、骨格が頑丈なため、スペーサーの導入に手間取っている。リン酸エステル構造を有する化合物は合成できたが、エステル部の加水分解において、スペーサー自体も脱離して

しまい最終のプロドラッグ体は未だ得られていない。

### (3) DDSをめざしたプロドラッグの可能性の探索

腫瘍部位特異的な薬効の発現を可能とする新規DDSの作動メカニズム開発として、自己分解型のスペーサーを有するオリゴアルギニンペプチドの利用を消化管吸収能改善をモデルに探索した。薬剤のモデルとして蛍光物質を用いて、一連の新規スペーサー含有オリゴアルギニンペプチドモデルを複数合成し、その半減期を検討した。オリゴアルギニンペプチドは細胞透過性を向上できる分子であるが、約9分から120分の半減期を有する一連の蛍光物質架橋体化合物を獲得できた。これらの架橋体を用いた細胞移行および細胞透過の研究から、半減期約9分の架橋体において有意に細胞透過の促進が観察され、化合物や遺伝子等の輸送担体として、利用できる可能性が示唆された。

## 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。19年度は6種類の誘導体を新たに合成したが、20年度もこれに引き続き、殺細胞活性が増強された誘導体 **KPU-244** のベンゾフェノ構造の誘導を実施する。殊に、ベンゾフェノ環上への主に極性官能基の導入を行いたい。一方、イミダゾール窒素へのリン酸構造の導入を行い、水溶性プロドラッグの可能性も探る。また、**NPI-2358** の母核であるジケトピペラジン類の合成法研究を進め、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図る。この一連の研究の流れは新しい抗がん剤開発研究の分野への貢献が十分期待できるものである。

## 4. 研究成果の発表

### 原著論文

- (1) Hayashi, Y., Takayama, K., Suehisa, Y., Fujita, T., Nguyen, J.-T., Futaki, S., Yamamoto, A., Kiso, Y. Development of oligoarginine-drug conjugates linked to new peptidic self-cleavable spacers toward effective intestinal absorption. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 5129-5132 (2007)
- (2) Skwarczynski, M., Sohma, Y., Noguchi, M., Kimura, T., Hayashi, Y., Kiso, Y. Application of O-N intramolecular carbon-carbamate migration: Migration of protective groups in amino acids and water-soluble prodrug strategy. *PEPTIDES 2006 (Proceedings of the 29<sup>th</sup> European Peptide Symposium)* 204-205 (2007).
- (3) Skwarczynski, M., Noguchi, M., Hirota, S., Sohma, Y., Kimura, T., Hayashi, Y., Kiso, Y. Development of first photoactivated prodrugs of paclitaxel via modification of phenylisoserine moiety. *PEPTIDES 2006 (Proceedings of the 29<sup>th</sup> European Peptide Symposium)* 214-215 (2007).

### 総説・著書等

- (1) 特に無し

#### 国際学会発表

- (1) Hayashi, Y., Yamazaki, Y., Skwarczynski, M., Sohma, Y., Taniguchi, A., Noguchi, M., Neuteboom, S., Potts, B., Lloyd, G. K., Kiso, Y. Application of Intramolecular Migration Reaction in Peptide Chemistry to Chemical Biology, Chemical Pharmaceuticals and Medicinal Chemistry. 20th American Peptide Symposium, July 1, 2007, Montreal, Canada.
- (2) Koder, H., Nishishita, N., Hirano, Y., Kiso, Y., Hayashi, Y. Synthesis of Polylactides with Side Chain Functionality: Ring Opening Polymerization of a Homobislactone Prepared from Lysine. 20th American Peptide Symposium, July 1, 2007, Montreal, Canada.
- (3) Hayashi, Y., Yamazaki, Y. A new microtubule targeting agent as a vascular targeting anti-cancer drug. The 12th Akabori Conference (Japanese-German Symposium on Peptide Science) May 17, 2008, Kyoto.

#### 国内学会発表

- (1) 林 良雄, 山崎 有理, 微小管作用に基づくジケトピペラジン型 Vascular Disrupting Agent の創製 第 11 回がん分子標的治療研究会総会 2007 年 7 月 6 日 大阪

# 海洋生物由来の生物活性物質の探索と化学合成

川島 悦子（生物分子有機化学教室・教授）

## 1. 当初の研究目標

海洋に生息する動物、植物や微生物が産生する海洋天然物は、その化学構造がユニークで強力な生物活性を示すものが多く、医薬品のリードとして期待されているものが多い。そこで、著者らは海洋生物由来の新規化合物の単離と化学構造の解明を行い、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見出すことを第一の目的として研究を行っている。また、医薬品開発の観点から医薬品として期待される生物活性を有する天然有機化合物の全合成法の確立を第二の目的としている。さらに探索や合成で得られた化合物およびその誘導体の広範な生物活性試験を行い、医薬品のリード化合物やリード化合物の創出も目指している。

### (1) 生物活性物質の探索

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クロマトグラフィー等により有機化合物の単離を行い、各種スペクトルデータおよび化学変換反応等により、それらの構造決定を行う。また、今年度は他の研究グループと共同でこれまで単離された化合物の生物活性についても検討する。

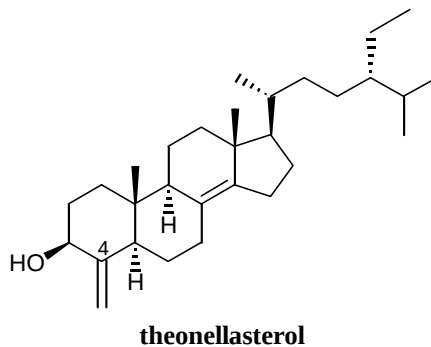
### (2) 生物活性物質の化学合成

昨年度に引き続き、退行期疾患などの疾病の治療薬として期待される生物活性を有する海洋天然有機化合物の合成を行う。本年度は、海綿由来のジテルペノイドであり、マラリア原虫に対して増殖阻害活性を示す 7,20-diisocyanoadociane の合成研究を中心に行う。これまでに、モデル化合物を用いた分子内 Diels-Alder 反応による perhydropyrene 骨格の構築法を開発しているが、それらの知見を基に 7,20-diisocyanoadociane の合成を目指す。また、昨年度に引き続きプロテアソーム阻害作用を持ち  $\alpha$ -置換  $\alpha$ -アミノ酸構造を有する海洋天然物 salinosporamide A の合成も検討する。さらに、アリルフェニルスルホンを用いる one-pot シクロペンタン合成法を用いる海洋生物由来のテルペン類の合成も行う。

## 2. 研究成果の概要

### (1) 生物活性物質の探索

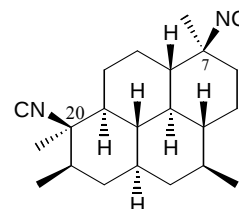
沖縄県石垣島近海にて、スキューバダイビングにより採集した海綿や軟体サンゴなどの海洋無脊椎動物のうち、海綿（未鑑定、採集番号 S-02-2、フリーズドライ）のメタノール抽出物を水と酢酸エチルにて分配し、その酢酸エチル可溶部を各種クロマトグラフィー等により精製し、メタノールから再結晶にて精製したところ、既知ステロイド化合物である theonellasterol が得られた。本化合物の化学構造は、NMR スペクトル等のスペクトルデータの文献値との比較により確認した。Theonellasterol は C-4 位にメチレン基をもつ特異なステロイド化合物である。



## (2) 生物活性物質の化学合成

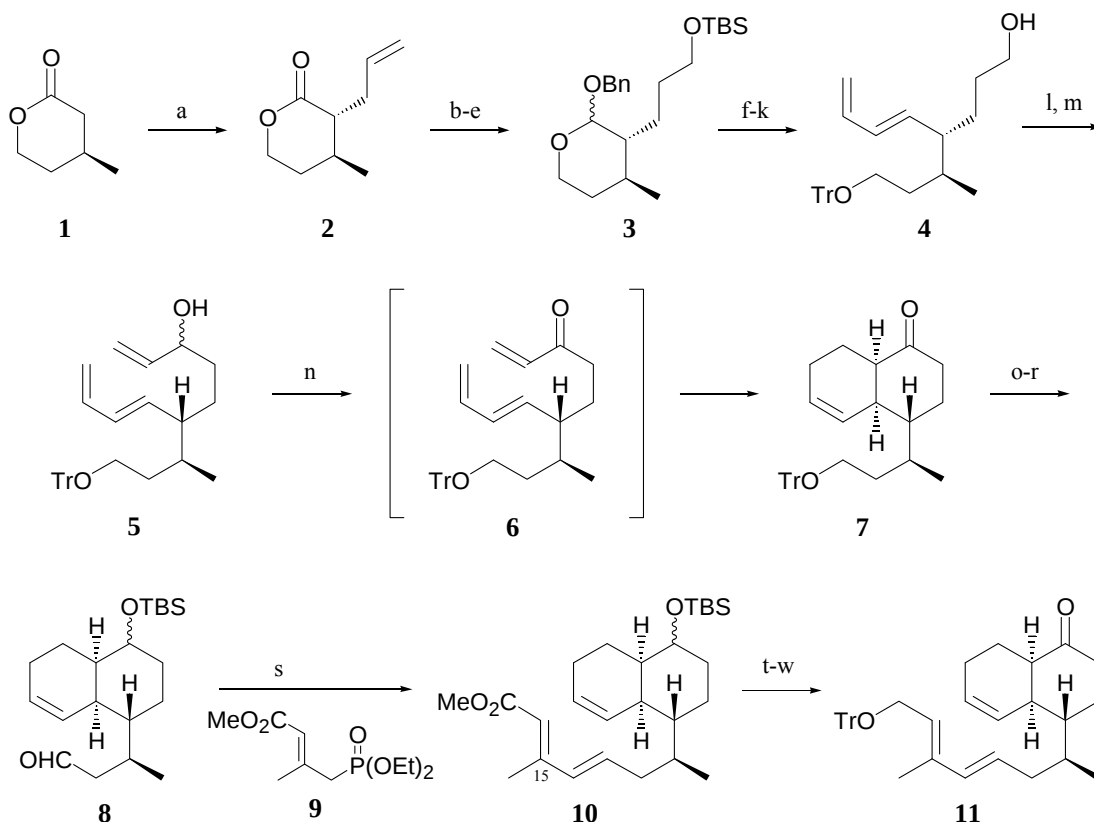
### 抗マラリア活性を有する海産ジテルペノイド 7,20-Diisocyanoadocianeの合成

7,20-Diisocyanoadociane は、1976 年 Wells らによって、オーストラリア産の *Adocia* 属の海綿より単離された、all-trans-perhydropyrene 骨格上に四つのメチル基と二つのイソシアノ基を有する特異な構造の海産ジテルペノイドである。本化合物は、熱帯熱マラリア原虫 *Plasmodium falciparum* のクロロキン感受性株 Strain D6 に対して IC<sub>50</sub> 14 nM、クロロキン耐性株 Strain W2 に対して IC<sub>50</sub> 13 nM という強力な抗マラリア活性を示している。著者らは 7,20-diisocyanoadociane の特異な構造および生物活性に興味を抱き、本化合物の立体選択的な全合成を目指した合成研究を行ってきた。今回、異性化および分子内 Diels-Alder 反応の連続反応を鍵反応として用いた方法により 7,20-diisocyanoadociane の形式合成を達成することができた。



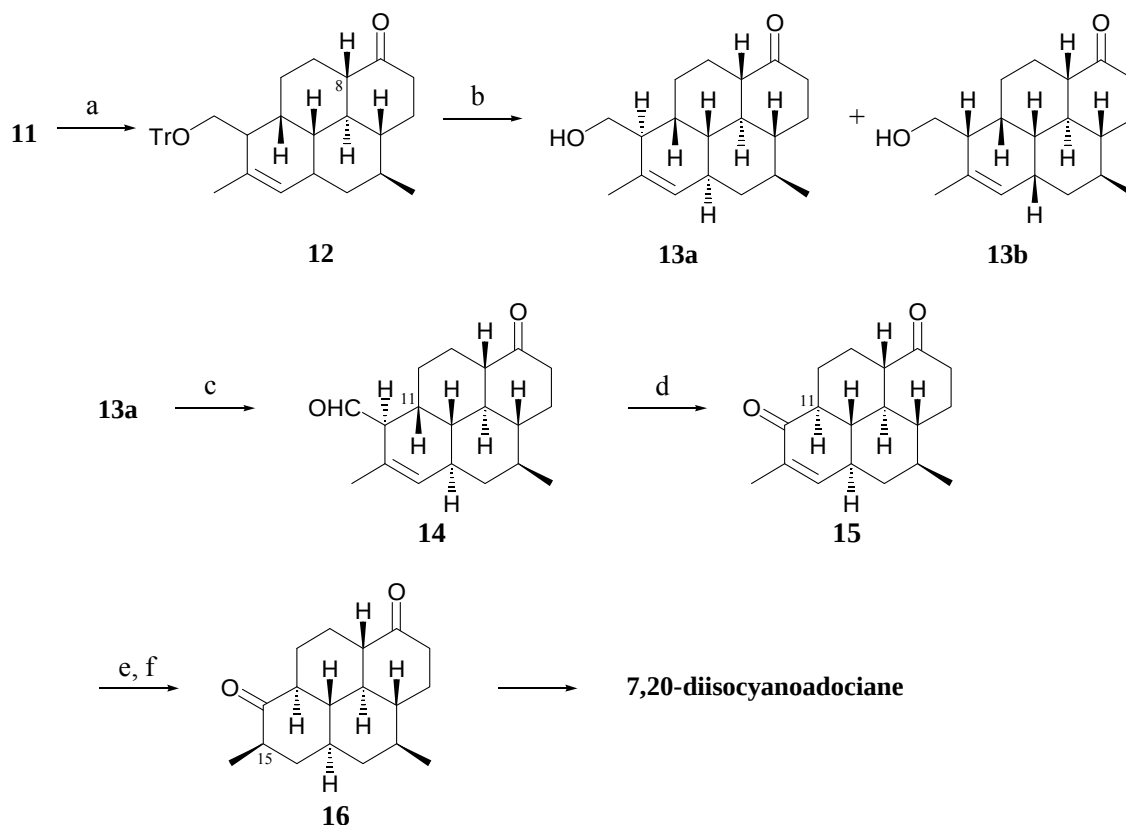
7,20-diisocyanoadociane

既知の光学活性なラクトン **1** に対し LDA を塩基として用い、HMPA 存在下 -78 °C で allyl bromide を作用させたところ、ラクトン **1** の  $\alpha$  位の立体選択的なアリル化が進行し、ラクトン **2** が得られた (Scheme 1)。次にラクトン **2** に対して DIBAH を作用させヘミアセタールへと還元し、続いて BnOH および *p*-TsOH によりアセタール化し、ベンジルアセタールを得た。ベンジルアセタールのアリル基をヒドロホウ素化-酸化により水酸基を導入し、生じた水酸基を TBS で保護することにより、TBS エーテル **3** を得た。続いて、TBS エーテル **3** のベンジルアセタールを脱保護してヘミアセタールとし、これに対して allylmagnesium bromide を作用させることでアリル化を行い、二級水酸基に関するジアステレオマー混合物 (5 : 3) を得た。これらジアステレオマー混合物は分離することなく、一級水酸基のみを選択的に Tr 基で保護し、二級水酸基をトシラートに変換した後、DMSO 中で NaH を作用させることにより脱離反応を行い、ジエンを構築することができた。これに TBAF を作用させて TBS 基を除去することによりアルコール **4** を得ることができた。次に、アルコール **4** を IBX 酸化してアルデヒドとした後、vinylmagnesium chloride によりジエノフィル部を導入しトリエン **5** を得た。トリエン **5** の二級水酸基を IBX 酸化したところエノン **6** の生成、それに続く *endo* 選択的な分子内 Diels-Alder 反応が連続的に進行し、*cis*-デカリン **7** が立体選択的に得られた。ケトン **7** に NaBH<sub>4</sub> を作用させ、ケトン還元し、生じた二級水酸基を TBS 基で保護し、Tr 基を Et<sub>2</sub>AlCl により脱保護、生じた一級水酸基を IBX で酸化し、アルデヒド **8** を得た。アルデヒド **8** に対し (EtO)<sub>2</sub>P(O)CH<sub>2</sub>C(Me)=CHCO<sub>2</sub>Me (**9**) および LHMDs から調製した Horner-Wadsworth-Emmons 試薬を作用させることで、*E*-エステル **10** が得られた。この際 C-15 位に関する *Z*-エステルが 15*E* : 15*Z* = 21 : 1 の比率で副成している。本反応では、塩基として LDA を用いると *E* 体から *Z* 体への異性化が進行しやすく、反応の再現性も乏しかったが、塩基として LHMDs を用いることで選択的に *E* 体を得ることに成功した。*E*-エステル **10** を LiAlH<sub>4</sub> により還元し、生じた一級水酸基を Tr 基で保護した後、TBAF により TBS 基を脱保護しアルコールとし、二級水酸基を IBX 酸化することにより、本合成の鍵反応である異性化-分子内 Diels-Alder 反応の連続反応の基質となるトリエン **11** を得ることに成功した。



**Scheme 1.** Reagents and conditions: (a) LDA, HMPA, THF, -78 °C, then allyl bromide, 79%; (b) DIBALH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, -78 °C; (c) BnOH, *p*-TsOH, benzene, reflux, 98% (2 steps); (d) BH<sub>3</sub>-THF, THF, 0 °C, then NaOH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, r.t., 86%; (e) TBSCl, imid., DMF, r.t., 97%; (f) H<sub>2</sub>, Pd(OH)<sub>2</sub>, AcOEt, r.t., 86%; (g) allylmagnesium bromide, Et<sub>2</sub>O, 0 °C, 99%; (h) TrCl, pyridine, r.t., 90%; (i) TsCl, DMAP, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, reflux, 89%; (j) NaH, DMSO, r.t.; (k) TBAF, THF, r.t., 84% (2 steps); (l) IBX, DMSO/THF, r.t., 92%; (m) vinylmagnesium chloride, THF, 0 °C, 88%; (n) IBX, DMSO/THF, r.t., 74%; (o) NaBH<sub>4</sub>, MeOH, 0 °C, 99%; (p) TBSOTf, 2,6-lutidine, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C, 93%; (q) Et<sub>2</sub>AlCl, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 97%; (r) IBX, DMSO/THF, r.t., 95%; (s) **9**, LHMDs, HMPA, THF, -78 °C, 81%; (t) LiAlH<sub>4</sub>, Et<sub>2</sub>O, 0 °C, 95%; (u) TrCl, pyridine, r.t.; (v) TBAF, THF, 50 °C; (w) IBX, DMSO/THF, r.t., 78% (3 steps).

トリエン **11** を mesitylene 中 DBU および BHT 存在下 220 °C で加熱したところ、C-8 位の異性化および分子内 Diels-Alder 反応の連続反応が進行し *exo* 環化体および *endo* 環化体の混合物 **12** (*exo* : *endo* = 5 : 6) が得られた (Scheme 2)。この際、トリエン **11** の保護基を Tr 基から Bn 基または MOM 基に変更した化合物も同様な条件下で反応を行ったが、*exo/endo* の選択性に大きな変化はなかった。環化体の *exo/endo* 混合物 **12** は分離が困難であったため、Et<sub>2</sub>AlCl を作用させることにより、Tr 基を脱保護し、*exo* 環化体由来のアルコール **13a** および *endo* 環化体由来のアルコール **13b** を分離した。アルコール **13a** の水酸基を IBX により酸化しアルデヒド **14** とした後、これに THF 中 TBAF を作用させることにより、脱ホルミル化反応を行ったところ、C-11 位の異性化も進行し、エノン **15** を得ることができた。次にエノン **15** のオレフィンの水素添加反応により還元し、これに MeOH、THF 混合溶媒中 NaOMe を作用させることにより、C-15 位のメチル基の立体化学を整え、all-*trans*-perhydropyrene 骨格を有するジケトン **16** の合成に成功した。ジケトン **16** は Corey らの 7,20-diisocyanoadociane の全合成中間体であり、ここに 7,20-diisocyanoadociane の形式全合成を達成することができた。



**Scheme 2.** Reagents and conditions: (a) DBU, BHT, mesitylene, 220 °C, 82% (*exo* : *endo* = 5 : 6); (b) Et<sub>2</sub>AlCl, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, r.t., 63% (**13a** : **13b** = 5 : 6); (c) IBX, DMSO/THF, r.t., 72%; (d) TBAF, THF, r.t., 67%; (e) H<sub>2</sub>, Pd-C, AcOEt, r.t., 81%; (f) NaOMe, MeOH/THF, r.t., 86%.

### 3. 研究評価及び今後の研究計画

#### (1) 生物活性物質の探索

沖縄県石垣島近海にて採集した数種の海洋無脊椎動物（海綿および軟体サンゴ）のうち、海綿（S-02-2）の酢酸エチル可溶部の化学成分を精査したところ既知ステロイド化合物 theonallasterol が単離された。Theonallasterol が含有されていたことから、本海綿（S-02-2）は *Teonella* 属海綿と推定されるが、これまで *Teonella* 属海綿からは強力な抗腫瘍作用を有する swinholide 類が見出されていることから、swinholide 関連化合物等が含有されている可能性が高い。今後も海綿（S-02-2）の酢酸エチル可溶部について精査を行いたい。

また現在、他の研究室と共同でこれまでの探索研究で見出している新規あるいは既知化合物の生物活性について検討を行っているが、その検討も継続する。

#### (2) 生物活性物質の化学合成

本年度は、抗マラリア活性を有するジテルペノイド 7,20-diisocyanoadociane の合成研究を中心に研究を行った。マラリアは、エイズや結核と共に三大感染症の一つで、2005年の WHO/UNICEF 統計によれば、年間死亡者数は100万人以上と推定されており、また年間罹患患者数は3億人以上と桁外れに多い。現在、マラリア原虫による感染症は熱帯、亜熱帯地域などの100ヶ国以上で猛威をふるっているが、地球温暖化によりマラリア原虫を媒介するハマダラカの生息地域も拡大し、現在流行の見られない地域においても、マラリアの脅威にさらされることが懸念されている。また、薬剤耐性マラリア原虫も出現しており、新たな抗マラ

リア薬の探索，開発が行われている。このような状況下、著者らは抗マラリア活性を有するジテルペノイド 7,20-disocyanoadociane の合成研究を行った。

7,20-Disocyanoadociane の合成における鍵反応は、C-8 位の異性化—分子内 Diels-Alder 反応の連続反応による四環性骨格の構築である。まず、分子内 Diels-Alder 反応を用いた *cis*-デカリンの構築による鍵反応の基質であるトリエン **11** の合成を行った。既知のキラルなラクトン **1** を出発原料とし、側鎖の導入、ジエン、ジエノフィル部の構築を行ったトリエン **5** の二級水酸基を酸化することで、エノンの生成に続く *endo* 選択的な分子内 Diels-Alder 反応が連続的に進行し、*cis*-デカリン **7** を得た。さらに、ジエン部を構築し、鍵反応の基質であるトリエン **11** を合成した。次にトリエン **11** を用いて、異性化—分子内 Diels-Alder 反応の連続反応を行った。トリエン **11** を *mesitylene* 中 DBU 存在下 220 °C で加熱することにより、C-8 位の異性化および分子内 Diels-Alder 反応の連続反応が進行し四環性化合物 **12** (*exo* : *endo* = 5 : 6) を得ることに成功した。さらに、Tr 基を脱保護しアルコールとすることで *exo* 環化体と *endo* 環化体を分離し、*exo* 環化体由来のアルコールを酸化、脱炭酸反応および C-11 位の異性化、エノンの 1,4-還元を行うことで、*all-trans*-perhydropyrene 骨格をもつジケトン **16** の合成に成功した。ジケトン **16** からは 7,20-diisocyanoadociane の全合成が行われていることから、7,20-diisocyanoadociane の形式全合成を達成することができた。今後、本化合物の更なる効率的な合成を目指し、出発原料の光学純度の向上、異性化—分子内 Diels-Alder 反応の連続反応における *exo/endo* 選択性の向上について検討を行う予定である。

また、今後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、次年度はアリルフェニルスルホンを用いる *one-pot* シクロアルカン合成法を用いる海洋生物由来のテルペン類の合成を行う計画である。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) Miyaoka, H., Yamanishi, M., Hoshino, A., Mitome, H., Kawashima, E.

Practical Synthesis of a Key Intermediate for Lactacystin from (*R*)-4-Hydroxymethyl-2-phenyl-4,5-dihydrooxazol-4-ylmethyl acetate.

Chem. Pharm. Bull., 56 (5), 738-741 (2008).

##### 国際学会発表

- (1) Miyaoka, H., Ota, K., Kurokawa, T., Honda, T., Kawashima, E.

Synthetic studies on marine norditerpenoids xestenone and secoxestenone

234th ACS National Meeting, 2007/8, Boston, USA.

##### 国内学会発表

- (1) 太田浩一郎，本多達也，黒川隆夫，川島悦子，宮岡宏明

*One-pot* シクロペンタン合成法を用いた海産ノルジテルペノイド Secoxestenone および Xestenone の全合成研究

第 5 回 次世代を担う有機化学シンポジウム，2007 年 5 月，東京

- (2) 宮岡宏明，大久保裕介，室井麻紀子，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 7,20-Diisocyanoadociane の合成研究

第 33 回 反応と合成の進歩シンポジウム, 2007 年 11 月, 長崎

- (3) 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海産ノルジテルペノイド Chabrolol C の合成研究

日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月, 横浜

- (4) 大久保裕介, 室井麻紀子, 見留英路, 川島悦子, 宮岡宏明

抗マラリア活性を有する 7,20-Diisocyanoadociane の合成研究

日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月, 横浜

# 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理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）。

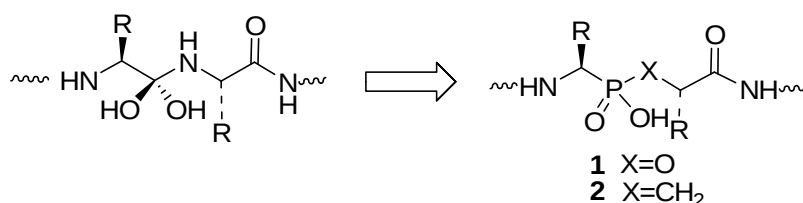


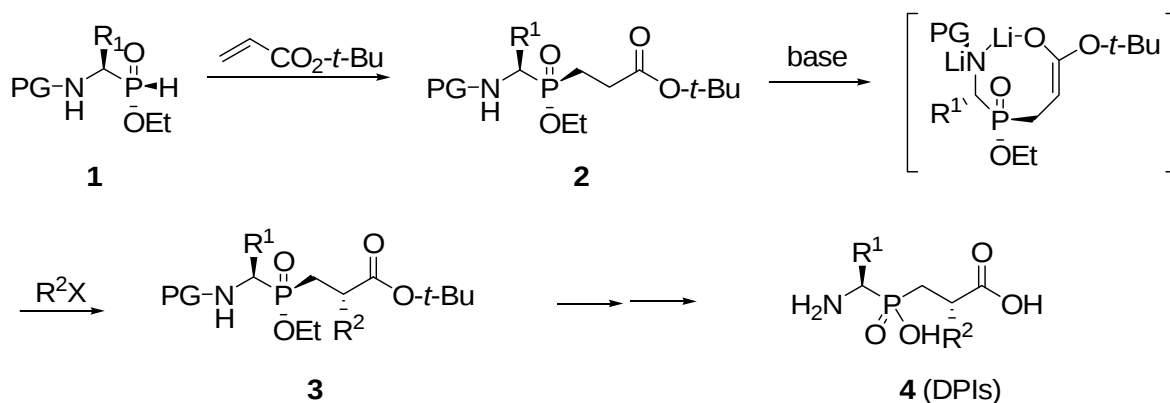
Fig 1

本研究年度においては、アミロイド $\beta$ ペプチドの代謝・産生に関与する酵素（ $\beta$ -セクレターゼ）の阻害剤創製を目的として、平成18年度までの研究成果を踏まえて、ホスフィン酸型ジペプチドイソスター（**2**, PDIs）の鍵構造である $\alpha$ 位および $\beta'$ 位に置

換基を有するアミノメチル（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検討した。

#### 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（合成計画）

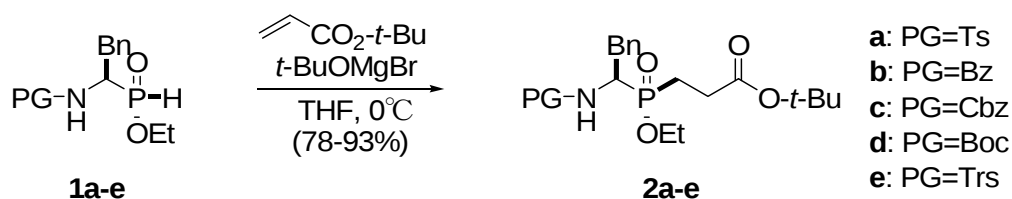
平成 18 年度の研究において、我々は $\alpha$ -アミノ-*H*-ホスフィナート **1** の立体制御合成に成功した。**1** からリン原子上の不斉を保持して **2** に誘導し、さらにリン原子の不斉を  $\beta'$  位に転写させることが出来れば標的化合物の合成が可能であると考えられる (Scheme 1)。すなわち、**1** の *t*-ブチルアクリレートに対する立体特異的なマイケル付加反応により **2** に導き、**2** にリチウム系塩基性試薬を作用させると、アミノ基とのキレーションにより環状キレート構造を有するシス-エノラートが生成すると予想した。このエノラートのアルキル化反応はリン原子の不斉に影響されて進行し、ジアステレオ選択的に **3** が得られると期待した。**3** は、保護基の除去などを経て PDIs (**4**) に誘導可能である。



Scheme 1

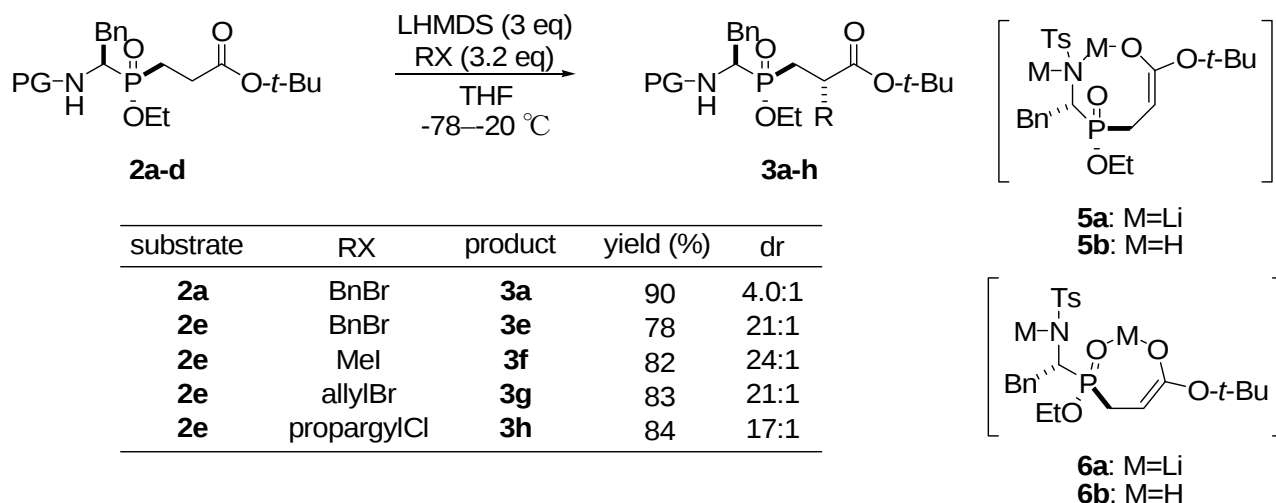
#### $\alpha$ -アミノ-*H*-ホスフィナートのマイケル付加反応

以上の合成計画に基づき、ラセミ体の $\alpha$ -アミノ-*H*-ホスフィナート **1a-e** から *t*-ブチルエステル誘導体 **2a-e** への変換を検討した。マグネシウムアルコキシドを触媒とする光学活性な *H*-ホスフィナートのマイケル付加反応はリン原子の不斉を保持し立体特異的に進行することが報告されている。この方法を参考にし、*t*-BuOMgBr (10 mol %)存在下、**1a** と *t*-ブチルアクリレートの反応を検討したところ、**2a** が単一生成物として得られたが収率は低いものであった (10%)。低収率の原因として、多くのヘテロ原子を有する生成物が触媒に配位し触媒が再生できない可能性が考えられた。そこで、化学量論量の *t*-BuOMgBr を用いて反応を行ったところ、良好な収率 (83%) で **2a** を得ることが出来た。**2a** のリン原子の立体化学が保持されていることは、X 線結晶構造解析により確認した。また、窒素原子上に他の保護基を有する誘導体 **1b-e** から同様の方法により付加体 **2b-e** を得た。



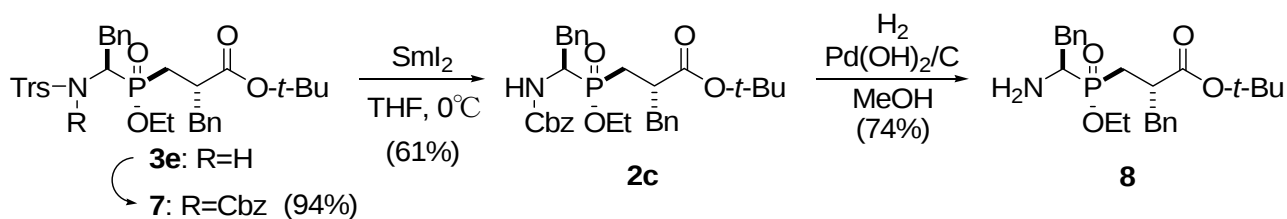
### α-アミノホスフィナート誘導体のα'位アルキル化反応

以上のように合成した付加体 **2a-e** のアルキル化反応を検討した (Scheme 2)。THF 中-78℃にてトシルアミド **2a** に対して LHMDS を作用させてエノラートを発生させた後、ベンジルブロミドと処理したところ生成物 **3a** が 4:1 のジアステレオマー比で得られた。中間体として 8 員環および 7 員環キレート構造を有するシス-エノラート **5a** および **6a** を想定し、計算の簡略化のためリチウム原子をプロトンに置き換えた **5b** および **6b** の分子モデリングを行ったところ、何れもトシル基がオレフィン平面の一方を遮蔽しているコンホメーションが相対的に安定であることが明らかとなった。このことより、窒素原子上の保護基を立体的に大きくすることによりジアステレオ選択性の向上が期待された。窒素原子上の保護基を種々検討したところ、嵩高い 2, 4, 6-トリイソプロピルベンゼンスルホニル (Trs) 基を有する **2e** を用いると、選択性の向上が認められ 21:1 のジアステレオマー比で **3e** が得られた。**2e** とヨウ化メチル、アリルブロミド、プロパルギルクロリドの反応においても一般性良く極めて高いジアステレオ選択性で生成物 **3f-h** が得られた。**3a** および **3e** の立体化学は X 線結晶構造解析により確認した。



Scheme 2

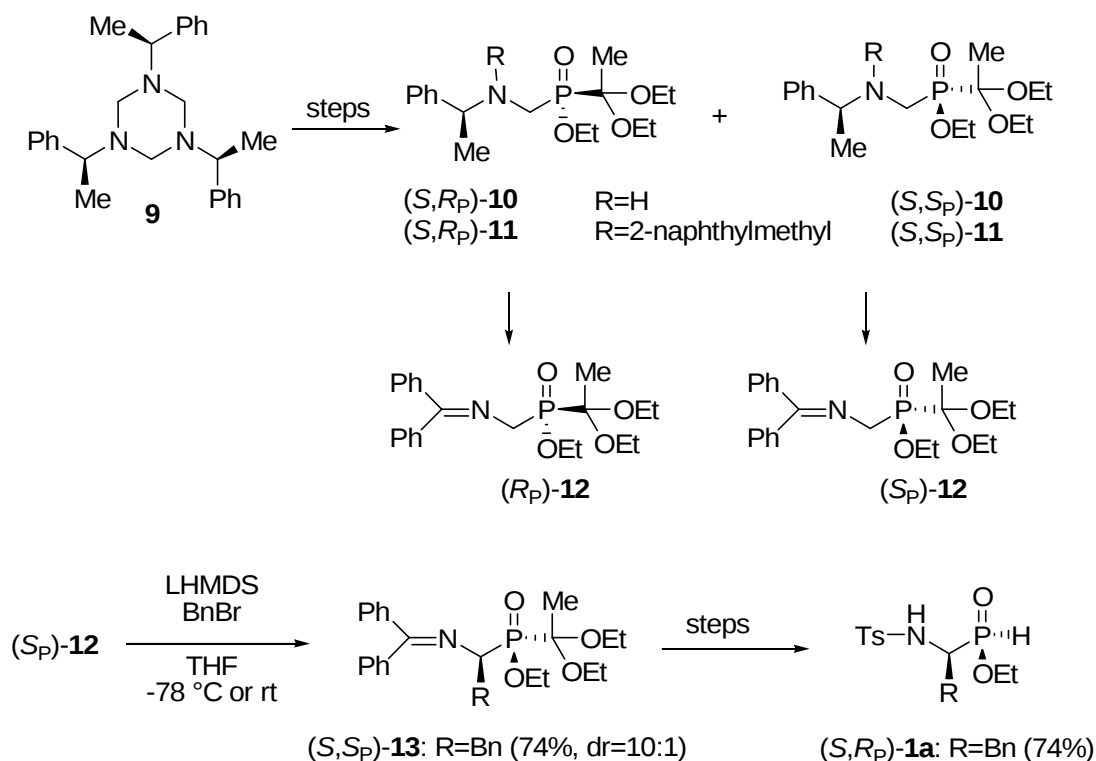
**3e** のトリシル基は Cbz 基を導入して **7** とした後、ヨウ化サマリウムを作用させる方法により除去可能であった。その後、Cbz 基を接触還元により除去しアミン **8** へ導いた (Scheme 3)。



Scheme 3

### 光学活性体の合成

以上のように、リン原子の不斉により制御された PDI s のラセミ合成法が確立したので、次に光学活性体の合成を検討した (Scheme 4)。すなわち、(*S*)-フェネチルアミンから得られたトリアジン **9** をラセミ体の合成法に準じてアミノメチルホスフィナート (*S,R<sub>P</sub>*)-**10** および (*S,S<sub>P</sub>*)-**10** のジアステレオマー混合物 (1:1) に誘導した。この段階でそれぞれのジアステレオマーを分離することはできなかった。しかし、窒素上に 2-ナフチルメチル基を導入し (*S,R<sub>P</sub>*)-**11** および (*S,S<sub>P</sub>*)-**11** に誘導すると、カラムクロマトグラフィーでそれぞれのジアステレオマーを容易に分離することができた。(*S,R<sub>P</sub>*)-**11** および (*S,S<sub>P</sub>*)-**11** は、それぞれ、(*R<sub>P</sub>*)-**12** および (*S<sub>P</sub>*)-**12** に誘導した。ラセミ体の合成法に準じて、(*S<sub>P</sub>*)-**12** の  $\alpha$  位をベンジル化すると光学活性  $\alpha$ -アミノ-*H*-ホスフィナート (*S,R<sub>P</sub>*)-**1a** が良好な収率で得られた。(*S,R<sub>P</sub>*)-**1a** を前述したラセミ合成ルートに従って変換すると、**8** の光学活性体の合成が可能となる。



Scheme 4

### 3. 研究評価および今後の研究計画

平成19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ホスフィンニルジペプチドイソスター (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 **1a-d** とアクリレート誘導体の立体特異的マイケル反応により得られたアミノホスフィン酸誘導体 **2a-d** は、 $\beta'$ 位のアルキル化反応において、リン原子の不斉により誘導される極めて高いジアステレオ選択性が発現することを見出した。本反応は、リン原子の不斉がアミノメチレンホスフィン酸誘導体の $\alpha'$ 位のアルキル化反応のジアステレオ選択性を高める効果があることを示す最初の反応例である。従来、類似の基質を用いた反応においてこのように高い選択性を示す反応は報告されていないことから、本合成手法の特徴の一つと考えられる。また、紙面の都合で詳細は述べなかったが、アミノ-H-ホスフィナート誘導体 **1a-d** とイミンあるいはアルデヒドとの反応を検討し論文としてまとめた。さらに、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19年度の成果を踏まえて、光学活性 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) Kaboudin, B.; Haruki, T.; Yamagishi, T.; Yokomatsu, T.  
Diastereoselective addition of  $\alpha$ -substituted  $\alpha$ -amino-*H*-phosphinates to imines using Yb(OTf)<sub>3</sub> as an efficient Lewis acid catalyst  
Tetrahedron, **63**(40), 8199-8205 (2007).
- (2) Kaboudin, B.; Haruki, T.; Yamagishi, T.; Yokomatsu, T.  
Diastereoselective Synthesis of Novel  $\alpha$ -Amino- $\alpha'$ -hydroxyphosphinates by Hydrophosphinylation of  $\alpha$ -Amino-*H*-phosphinates to Aldehydes  
Synthesis 3226-3232 (2007).
- (3) Haruki, T.; Yamagishi, T.; Yokomatsu, T.  
Asymmetric Synthesis of Optically Active  $\alpha$ -Substituted  $\alpha$ -Amino-*H*-phosphinates through Resolution of 1,1-Diethoxyethyl(aminomethyl)phosphinates  
Tetrahedron:Asymmetry, **18**, 2886-2893 (2007).

#### b) 学会口頭発表

- (1) 山岸 丈洋, 市川 博之, 森 淳一郎, 春木 晶充, 横松 力  
 $\alpha$ -アミノホスフィン酸誘導体の立体制御合成  
第33回 反応と合成の進歩シンポジウム、2007年11月、長崎
- (2) 谷口智恵美, 山岸丈洋, 横松力  
ピペリジン誘導体の合成と $\beta$ -セクレターゼ阻害活性評価  
日本薬学会第128年会、2008年3月、横浜
- (3) 森 淳一郎, 春木 晶充, 山岸 丈洋, 横松 力

リパーゼを用いた速度論的光学分割を経由する光学活性アミノメチルホスフィナートの合成

日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月、横浜

- (4) 市川 博之，春木 晶充，山岸 丈洋，横松 力

$\alpha$ -アミノホスフィン酸誘導体の立体制御合成

日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月、横浜

- (5) 春木 晶充，山岸 丈洋，疋島 貞雄，横松 力

$\beta$ -セクレターゼ阻害剤を指向した新規アミノホスフィニルペプチドの合成

日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月、横浜

# 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

「ほ乳類の体内に 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、哺乳類の生体内に様々な D-アミノ酸が微量存在していることが明らかになった。特に、D-セリンはヒトを含めた哺乳類の脳に存在し、N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体の co-agonist として作用していることが明らかになった。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、こうした疾患への新規治療薬としての D-セリンの有用性が期待されている。しかし、発酵・加工食品中にも様々な 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のにもかかわらず、ほとんどの D-アミノ酸の体内動態は全く不明なままである。

我が国の慢性維持透析患者数は 2006 年には 26 万人を越えた。また、2005 年に新しく導入された透析患者数は 36,000 人強と 20 年連続して増加した。このような末期腎不全患者の増加から考えると、その上流にある腎機能が低下した患者群、すなわち慢性腎臓病患者はその数倍から数十倍存在すると予想される。慢性腎臓病患者の血漿中には健常者に比べて高濃度に D-アミノ酸が存在する。腎には D-アミノ酸を代謝する酵素である D-アミノ酸酸化酵素 (DAO) が存在することから、腎は DAO による代謝と尿中排泄の二面から D-アミノ酸の体内量を規定している臓器と考えられる。しかし、D-アミノ酸から生成する  $\alpha$ -ケト酸や L-アミノ酸を内因性のものと識別することが困難なことから in vivo で腎が D-アミノ酸動態にどのように寄与しているかは不明であった。

平成 18 年度では、これまで不可能であった「D-アミノ酸および 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」新しい研究法の開発を目指し、ガスクロマトグラフ-質量分析計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。本年度は、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および L-型への変換率を明らかにすること、および 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。さらに、D-セリンの体内動態を解明することを目的として、その分析法の開発に着手した。

## 2. 研究成果の概要

### (1) D-メチオニンの体内動態にはたす腎の寄与

上記の目的に従い、腎障害モデル動物を用いて D-メチオニンの体内動態にはたす腎の寄与を検討した。まず、DL-メチオニンの GC-MS による分別定量に必要な内標準物質とする DL-[S-methyl, 3,3,4,4- $^2\text{H}_7$ ]メチオニンを DL-[3,3,4,4- $^2\text{H}_4$ ]メチオニンから収率 70% で合成した。ついで、前年度に DL-ロイシンに対して確立した方法に準じて、DL-メチオニンを GC-MS により分別定量する方法を開発した。すなわち、メチオニンのカルボキシル基をメチルエステル化した後、アミノ基を (+)- $\alpha$ -methoxy- $\alpha$ -trifluoromethylacetyl chloride (MTPA-Cl) によりジアステレオマーアミドとすると、この誘導体 (MTPA-OMe 誘導体) は GC において良好な分離を示すばかりでなく、

化学イオン化法を用いた MS 分析において分子量関連イオンを基準ピークとして与えた。そこで、分子量関連イオンをモニタリングイオンとし、感度、精度等を検討したところ、D-メチオニンの体内動態を解明するうえに必要な感度および精度を有していることが明らかになった。

D-メチオニンおよび L-メチオニンのラットにおける体内動態解析法を開発した。すなわち、安定同位体で標識したメチオニン、すなわち D- $[^2\text{H}_3]$ メチオニンおよび L- $[^2\text{H}_3]$ メチオニンをそれぞれ個別にラットに静脈内投与し、経時採血した。DL- $[^2\text{H}_7]$ メチオニンを内標準物質に用いて、血漿中 D- $[^2\text{H}_3]$ メチオニン、L- $[^2\text{H}_3]$ メチオニンおよび内因性 L-メチオニンを GC-MS で定量した。その結果、D- $[^2\text{H}_3]$ メチオニンの消失は L- $[^2\text{H}_3]$ メチオニンに比べて遅いこと、L- $[^2\text{H}_3]$ メチオニンから D- $[^2\text{H}_3]$ メチオニンの生成は認められないが、D- $[^2\text{H}_3]$ メチオニンから L- $[^2\text{H}_3]$ メチオニンが生成すること、しかも D- $[^2\text{H}_3]$ メチオニンの 90%以上が L- $[^2\text{H}_3]$ メチオニンに変換されることを見いだした。

腎障害によって D-メチオニンの体内動態、特に L-型への変換がどのように変化するかを明らかにすることを目的として、まず腎障害モデル動物として 5/6 腎摘除ラットの作成を試みた。一般に、片腎摘除後、残腎の 2/3 を摘除することで 5/6 腎摘除ラットを作成するが、残腎からの摘除量のわずかな違いによってラットの生存率や腎障害の指標である血漿クレアチニンに大きな差が生じた。そこで、種々の工夫をこらし残腎 2/3 摘除にあたって体重  $\times 1/200 \times 2/3 \times 0.8$  を目標量として摘除することで、血漿クレアチニンのほぼ一定な障害ラットを作成できた。5/6 腎摘除後 1 週に腎 DAO 活性を測定したところ、単位重量あたりの DAO 活性は健常ラットとほぼ同じであり、この期間に腎 DAO は誘導されていないことが明らかになった。5/6 腎摘除ラットおよび sham ラットに D- $[^2\text{H}_3]$ メチオニンおよび L- $[^2\text{H}_3]$ メチオニンをそれぞれ個別にラットに静脈内投与し、それらの血漿中動態を追跡した。その結果、5/6 腎摘除によって D- $[^2\text{H}_3]$ メチオニンの消失が遅延すること、生成した L- $[^2\text{H}_3]$ メチオニンの AUC も約 2/3 に低下すること、L- $[^2\text{H}_3]$ メチオニンの消失も遅延することが明らかになった。動態パラメータをもとに D- $[^2\text{H}_3]$ メチオニンから L- $[^2\text{H}_3]$ メチオニンへの変換率を求めたところ、約 42%と健常ラットの 1/2 以下に低下した。これらの結果をもとに D- $[^2\text{H}_3]$ メチオニンから L- $[^2\text{H}_3]$ メチオニンへの変換に対する腎の寄与率を求めたところ約 58%であった。D- $[^2\text{H}_3]$ メチオニンの尿中排泄量は 5/6 腎摘除によって増加したが、その排泄量は投与量に比べてわずかであった。以上のことから、腎が D- $[^2\text{H}_3]$ メチオニンの代謝に大きく寄与していることが明らかになった。

## (2) 血漿中 DL-セリンの分別定量法の開発

D-セリンの体内動態を求めるのに必要な DL-セリンの GC-MS による分別定量法を開発した。DL-ロイシンや DL-メチオニンで用いた誘導化法により DL-セリンの誘導化を試みた。しかし、水酸基に MTPA が導入されず、GC-MS で検出することができなかった。有機合成化学講座との連携のもと誘導化法に改良を加え、MTPA によるアシル化反応時に triethylamine を添加することで N-アシル化とともに O-アシル化も十分な収率で進行し、目的とした誘導体を得ることに成功した。この誘導体は GC において 10 min 以内の分析時間で良好なジアステレオマー分離を示し、MS において分子量関連イオンを基準ピークとして与えた。D-セリンを添加した血漿を用いて測定精度を求めたところ、D-セリンの血漿中動態測定に十分な精度・再現性を有していることが明らかになった。

### 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。まず、生体試料中の DL-メチオニンを安定同位体希釈分析法で分別定量する方法を開発した。ついで、安定同位体標識メチオニンの各エナンチオマーをラットに投与し、それらの体内動態を解析した結果、エナンチオマー間で血漿中動態に差異があること、D-メチオニンから L-型への変換は認められるがその逆反応は進行しないこと、D-メチオニンのほとんどすべてが L-型に変わることを明らかにした。D-ロイシンの L-型への変換率（約 30%）に比べて D-メチオニンの L-型への変換率が非常に高いことは驚きであった。従来より D-メチオニンは L-メチオニンと栄養学的に同等であるといわれていたが、本研究はこれを証明した初めての例である。5/6 腎摘除ラットにおける D-メチオニンの血漿中動態から、D-メチオニンの L-型への変換への腎の寄与を定量評価し、腎が D-メチオニンの代謝に大きく寄与していることを明らかにした。本研究手法は *in vivo* で特定臓器の働きを評価できる方法として、D-アミノ酸のみならず広範な薬物等に適用できる方法と考えている。

D-セリンは統合失調症治療薬の標的分子として注目されているが、血液脳関門難透過性のため十分な脳内濃度を得るためには大量の投与を必要とする。その一方で、ラットに D-セリンを大量投与すると腎障害が発症することが知られている。どの程度の投与量で腎障害が発症するのか、ヒトで腎障害が発症するのかなど未解明な点が多く、ラットで認められる D-セリンによる腎障害の発症機序を解明することはヒトに対する D-セリンの適正使用に大きな知見を与えるものと考えられる。本年度は、D-セリンによる腎障害発症機序解明の一環として D-セリンの体内動態解析法を開発することを計画目標に掲げていたが、分析法を確立するにとどまった。しかし、ラットにおける D-セリンの体内動態を解明するための準備は整った。今後はトキシコキネティクス/トキシコダイナミックス手法を用い、D-セリンによる腎障害発症閾値解明に着手する予定である。

### 4. 研究成果の公表

#### 国内学会発表

#### (1) 長谷川 弘、増田奈美、篠原佳彦、橋本隆男、市田公美

ラットへの D-セリン大量投与によって惹起される腎障害：ヒドロキシピルビン酸が毒性本体か？

第 3 回 D-アミノ酸研究会学術講演会、2007 年 9 月、徳島

## 退行性疾患に対する薬物作用の評価

田村 和広（内分泌分子薬理学教室・准教授）

### 1. 当初の研究目標

食習慣、運動習慣、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に高血圧症、脳卒中、心臓病、糖尿病などがある。これらは退行性疾患としても認識され、完治が難しく日本の医療費を圧迫している。これまで国内では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、退行性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が役割である。

生殖医療に寄与する不妊症の治療は現在、困難を極めている。なかでも子宮内膜症は、月経困難症や不妊の原因疾患として重要な疾病である。罹患率が少なくとも10人に1人以上の発症率を示すこの子宮内膜症を女性特有な退行性疾患として捉え、この病態の解明に取り組む。近年、婦人科系の疾患のなかでもよく知られている子宮内膜症や子宮筋腫の日本人の罹患率が上昇しており、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疑われている。即ち、日本人女性の晩婚化、少子化、そして高カロリー・高脂質な食生活などによる女性ホルモンをはじめとする体内の内分泌環境変化がこれら疾患の発症に関わっている。子宮内膜症の発症・進行には、上記の一般的な生活習慣病と同様、遺伝的要因に加えて、ライフスタイルやストレスなどの環境因子が複合的に作用し発症すると推察される。事実、生活習慣の改善がこれら疾患の症状をある程度軽減する。本疾患は不妊と関連した重要な婦人科系疾患にもかかわらず、その病態の詳細な分子メカニズムは不明である。現在の治療薬は限られており、抗ゴナドトロピン作用をもつ GnRH アゴニストと病巣に対する直接作用もあるとされるダナゾールのみである。また、再発率も45%と高く、薬物療法を含めた新しい治療法が望まれている。さらに、内分泌代謝性退行性疾患として認識される卵巣疾患である多嚢胞性卵巣症候群(PCOS)、ホルモン産生腫瘍のプロラクチノーマ、血管石灰化についても病態は不明である。そこで、これらの病態を解析すると共に、その抑制薬を天然由来物質から見出すことを試みる。

子宮内膜は月経周期に伴い増殖、肥厚、月経といった組織の再生と崩壊が繰り返される組織である。この子宮内膜のリモデリングには血管新生が必須であり、血管内皮増殖因子(VEGF)がこれを促進する。VEGFの発現調節には卵巣ステロイドと月経時の虚血に起因した低酸素環境が関与すると考えられているが、その全容は解明されていない。そこで、今年度は、低酸素環境下での子宮内膜細胞及び血管内皮細胞のVEGF発現調節における微小管脱重合因子・スタスミンの意義について検討した。また、昨年度に引き続き、ヒト胎盤形成過程におけるスタスミンの役割について栄養膜細胞の融合・分化に着目し解析を行った。

## 2. 研究成果の概要

低酸素環境下でのヒト子宮内膜の血管新生とスタスミン発現との関係を明らかにする目的でヒト子宮内膜間質細胞、腺上皮細胞、臍帯静脈血管内皮細胞を用いて以下の検討を行った。また、昨年度に引き続き、ヒト栄養膜細胞におけるスタスミンの役割を解明するため、絨毛癌細胞株（BeWo細胞）の*in vitro*での融合・分化に対するスタスミンノックダウン及び強制発現の効果について検討した。

### (1) 子宮内膜間質細胞、腺上皮細胞における低酸素誘導性VEGF、HIF-1 $\alpha$ 発現におけるスタスミンの発現意義

#### ① 低酸素誘導性のVEGF発現に対するスタスミン発現抑制の効果

正常月経周期を有する卵巣茎捻転の患者から子宮内膜組織を採取した。なお、患者は文書による十分なインフォームドコンセントを受けた。Satyaswaroopらの方法をもとにコラゲナーゼによる内膜組織の消化の後、内膜間質細胞（ESC）を単離した。本実験では、このESCに加え、前年度に温度感受性SV40T抗原を導入して樹立した子宮内膜間質細胞株（EtsT）、Kyoらにより樹立されたヒト子宮内膜腺細胞株（EM-1）とヒト臍帯静脈血管内皮細胞（HUVEC）を用いた。

低酸素培養時のVEGF発現に及ぼすスタスミン発現抑制の効果をRT-PCR法により解析した。スタスミン siRNA を処置し、脱酸素剤・炭酸ガス発生剤を用いた低酸素培養（0.1～1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>）を5時間行った。低酸素培養は、ESC、EtsT、EM-1、HUVECの全ての細胞において、正常酸素培養に比べ、分泌型VEGFであるVEGF121/165のmRNA発現レベルを顕著に増加させることが確認された。一方、siRNA処置により内在性のスタスミン発現をノックダウンした状態で低酸素培養を行うと、低酸素刺激により誘導されるVEGF121/165 mRNAの発現が全ての細胞で低下した。

#### ② 低酸素誘導性のHIF-1 $\alpha$ 発現に対するスタスミン発現抑制の効果

低酸素下での血管新生時にはヘリックス・ループ・ヘリックス型転写因子 hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ がVEGFの発現を誘導する。そこで、上述した子宮構成細胞並びに内皮細胞におけるHIF-1 $\alpha$ 発現に対するスタスミン siRNA の効果についてウェスタンブロットにて検討した。正常酸素下ではHIF-1 $\alpha$ 蛋白質レベルは極めて低値であったが、低酸素培養によりHIF-1 $\alpha$ レベルの上昇が全ての細胞でみられた。しかしながら、スタスミン siRNA 処置によりスタスミン発現を低下させた細胞では、低酸素培養によるHIF-1 $\alpha$ の発現が顕著に抑制された。免疫蛍光染色法によりESCにおけるHIF-1 $\alpha$ 蛋白質の発現・局在性を観察したところ、正常酸素培養下では、HIF-1 $\alpha$ の発現は細胞質にわずかに検出される程度であったが、低酸素培養

により HIF-1 $\alpha$ の強い蛍光シグナルが核内に検出された。スタスミンの発現量を低下させた後、低酸素培養を行った細胞においても核に HIF-1 $\alpha$ の局在が認められたが、そのシグナルは、同培養条件下でコントロール siRNA を処置した細胞に比べて明らかに弱かった。また、スタスミン発現抑制後の HIF-1 $\alpha$  mRNA の発現レベルは正常酸素下及び低酸素下において対照群と差はなかった。従って、スタスミン発現抑制による VEGF 発現の低下は HIF-1 $\alpha$ 蛋白質レベルの低下が原因であることが示唆された。

### ③ ホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (PI3K) /AKTシグナル伝達経路に対するスタスミン発現抑制の効果

HIF-1 $\alpha$ の発現を制御する細胞内シグナル伝達経路としてPI3K/AKT経路が知られている。本シグナル経路の活性化はHIF-1 $\alpha$ の翻訳を促進することやHIF-1 $\alpha$ 蛋白質の安定性を増加させる。そこで、ヒト子宮内膜細胞と血管内皮細胞でのHIF-1 $\alpha$ 発現におけるPI3K/AKT経路の関与についてPI3K阻害剤 (wortmannin) を用いて検討した。ESC、EM-1、HUVECにwortmanninを処置した後に低酸素培養し、HIF-1 $\alpha$ 、AKTのリン酸化 (活性) をウェスタンブロットにて解析した。wortmannin処置細胞ではPI3Kの活性阻害によるAKTのリン酸化が顕著に抑制され、同時に低酸素培養によるHIF-1 $\alpha$ の増加も抑制された。また、wortmannin処置は、低酸素培養によるVEGF発現を抑制したことから、子宮内膜細胞および血管内皮細胞における低酸素培養時のHIF-1 $\alpha$ 蛋白質発現にはPI3K/AKTシグナル伝達経路が関与していることが示唆された。また、Wortmannin処置は、HIF-1 $\alpha$  mRNAレベルに影響しなかったことから、PI3K/AKTシグナル経路の阻害はHIF-1 $\alpha$ の翻訳または安定性に関連していると考えられる。同様にスタスミン発現をsiRNAにてノックダウンした際のAKTのリン酸化レベルを検討した。スタスミンsiRNA処置は、正常酸素及び低酸素培養に関わらずESC、EtsT、EM-1、HUVECにおいてAKTのリン酸化を顕著に低下させた。この結果から、スタスミンノックダウンによるVEGF発現とHIF-1 $\alpha$ 蛋白質のレベル低下はPI3K/AKTシグナル系の活性抑制を伴っていることが示唆された。

## (2) ヒト栄養膜細胞の融合 (シンシチウム化)・分化におけるスタスミンの発現意義

### ① 絨毛癌細胞におけるhCG、syncytin発現に対するスタスミン強制発現の効果

絨毛上皮を構成するシンシチオトロホプラスト (ST) は単核のサイトトロホプラスト (CT) が融合・分化した多核の細胞であり、妊娠に不可欠なヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG $\beta$ ) やプロゲステロン (P4) を産生する。また、STでは、レトロウィルス由来エンベロープ蛋白質 syncytin が発現している。昨年度は、絨毛癌細胞 (BeWo 細胞) においてジブチリル cAMP (cAMP アナログ) による hCG $\beta$ 、syncytin 発現がスタスミン発現抑制により低下することを明らかにした。今年度は、ドキシサイクリンの添加によりスタスミンを強制発現させることが可能な BeWo 細胞 (pTet-On BWo 細胞) を作成し、スタスミンを強制発現させた際の hCG $\beta$ 、syncytin 発現について検討した。予め pTet-On 細胞に siRNA を処置した後、ドキシサイクリンによりスタスミンを強

制発現させると、hCG $\beta$ 、syncytin 発現が回復した。また、培養メディウムへの hCG 産生をウェスタンブロットにて調べたところ、ドキシサイクリン処置によるスタスミン発現の増加により hCG 分泌も回復した。このように、栄養膜細胞における hCG 産生とシンシチン発現にスタスミンが関与することを示唆する新たなデータを得た。

## ② 絨毛癌細胞の融合におけるスタスミンの役割

培養 BeWo 細胞は、*in vivo* での栄養膜細胞と同様に細胞内 cAMP の増加により融合し、多核のシンシチウム細胞へと変化（シンシチウム化）する。このシンシチウム化モデルを用いて BeWo 細胞の融合に対するスタスミン発現抑制および強制発現の効果について抗デスモソーム蛋白質抗体による細胞膜染色により評価した。BeWo 細胞にジブチリル cAMP を処置すると未処置群と比較して有意に細胞融合率が増加した。一方、スタスミン siRNA 処置群ではジブチリル cAMP による細胞融合が抑制された。この siRNA 処置群にドキシサイクリンを処置し、スタスミンの発現を回復させると細胞融合率が対照群と同レベルまで増加した。以上、スタスミンは栄養膜細胞のシンシチウム化にも関与することが示唆された。

## 3. 研究評価と今後の研究計画

本研究ではヒト子宮内膜間質細胞、腺上皮細胞、血管内皮細胞における低酸素誘導性の VEGF 発現に対するスタスミンの役割について検討した。既に、子宮内膜における VEGF 発現はエストラジオールにより促進されることが知られているが、卵巣ステロイド濃度が低値を示す月経期においても VEGF mRNA の発現が子宮内膜にみられることから、卵巣ステロイド以外の VEGF の発現調節機構として低酸素刺激の重要性が提唱されている。月経時には発達した子宮内膜内の螺旋動脈の萎縮が起こり一時的な虚血（低酸素）状態になることや月経後の子宮内膜の修復・成長は活発な血管新生と相関していることから、低酸素刺激により誘導される VEGF が子宮内膜の再構築に関与すると考えられる。ヒト子宮内膜において VEGF は間質細胞、腺上皮細胞、血管内皮細胞から産生されることが知られているが、我々はスタスミンが子宮内のこれらの細胞に局在していることを既に確認している。本研究により、内膜間質細胞、腺上皮細胞、HUVEC において内因性のスタスミン発現を抑制すると、低酸素培養による VEGF mRNA の発現は著しく抑制されることが示された。低酸素刺激で誘起される VEGF の発現には転写因子 HIF-1 $\alpha$  が重要である。低酸素環境下では HIF-1 $\alpha$  の分解系が抑制されるため細胞内の HIF-1 $\alpha$  含量が増加し、HIF-1 $\beta$  とヘテロダイマーを形成して、VEGF のプロモーター領域の HRE に結合し、その転写を促進する。スタスミン発現を抑制すると子宮内膜間質細胞、腺上皮細胞、HUVEC の HIF-1 $\alpha$  蛋白質量は明らかに低下していた。このことから、スタスミンの発現抑制でみられた低酸素培養誘導性の VEGF 発現の減少は、VEGF の転写因子である HIF-1 $\alpha$  の発現が低下したためと考えられる。さら

に、子宮内膜細胞、HUVECにおいてPI3K/AKTシグナルをwortmanninにて阻害するとHIF-1 $\alpha$ 蛋白質レベルが低下すると共にVEGF発現も抑制されたことから、子宮内膜細胞、内皮細胞における低酸素誘導性のVEGF、HIF-1 $\alpha$ 発現にはPI3K/AKTシグナル伝達経路が関与することが示唆された。また、スタスミンノックダウンにより、AKTのリン酸化が顕著に抑制されたことから、低酸素環境下でのスタスミン発現抑制によるVEGF、HIF-1 $\alpha$ 発現の減少はPI3K/AKTシグナル経路の阻害によるものと考えられる。これらの結果から、月経後に起こる著しい子宮内膜のリモデリングにおいてスタスミンが重要な役割を担っていることが示唆された。

Escuinらはヒト卵巣癌細胞及び乳癌細胞を用いた検討から微小管に作用する薬物（微小管安定化薬及び不安定化薬）は、低酸素刺激時に増加するHIF-1 $\alpha$ の産生を阻害することを報告している。また、微小管を標的としない抗癌剤は、HIF1- $\alpha$ の発現に影響を与えないことから、HIF-1 $\alpha$ の発現は微小管機能と関連していることを考察している。スタスミンは、微小管脱重合活性を有することから、スタスミン発現量の低下が微小管動態に影響し、その結果、HIF1- $\alpha$ の蓄積が抑制された可能性も考えられる。しかし、微小管作用薬がどのように低酸素時のHIF1- $\alpha$ 発現を抑制するのかは、現在のところ明らかとなっていない。卵巣癌や前立腺癌ではHIF-1 $\alpha$ により産生されるVEGFが腫瘍形成を促進することから、HIF-1 $\alpha$ がこれら悪性腫瘍の治療ターゲットとして注目されている。また、悪性腫瘍に対してスタスミンの発現を抑制すると、微小管作用薬の抗腫瘍効果が相乗的に高まるという報告も散見される。そこで、来年度は化学系共同研究者らにより合成、精製された新規の天然由来化合物の抗腫瘍活性がスタスミン発現の制御により変化するのか否かについて検討する。

胎盤を構成する絨毛上皮のうちSTは、ホルモン産生などの重要な役割を担っている。BeWo細胞を用いた検討からジブチリルcAMPによるhCG産生、syncytin発現だけでなく、融合（シンシチウム化）がスタスミンをノックダウンすることにより抑制された。この抑制効果はスタスミンを強制発現することにより回復したことから、STへの融合・分化にスタスミンは必要な因子であることが示唆された。

なお、子宮内膜細胞における低酸素誘導性VEGF発現に対するスタスミン発現抑制の効果に関する研究は、第81回日本薬理学会年会（2008年3月、横浜）優秀発表賞を受賞し、栄養膜細胞におけるスタスミンの発現意義についての研究は第13回国際胎盤学会（2007年9月、キングストン、カナダ）New Investigator Travel Awardを受賞した（吉江幹浩助教）。

#### 4. 研究成果の発表

##### 原著論文

- (1) Kutsukake M, Ishihara R, Yoshie M, Kogo H, Tamura K.  
Involvement of insulin-like growth factor-binding protein-related protein 1 in decidualization of human endometrial stromal cells.  
Molecular Human Reproduction 13, 737-743 (2007)

##### 国際学会発表

- (1) Yoshie M, Tamura K, Kashima H, Isaka K, Kogo H.  
Involvement of a microtubule regulatory protein stathmin in trophoblast proliferation, migration and differentiation.  
13<sup>th</sup> International Federation of Placenta Associations Meeting, 2007 年 9 月, Kingston, Canada

##### 国内学会発表

- (1) 加島英明、吉江幹浩、田村和広、別所俊夫、武市 信、向後博司  
微小管調節因子・スタスミンは絨毛栄養膜細胞の分化と浸潤に寄与する  
第 12 回 日本生殖内分泌学会 2008 年 10 月、東京
- (2) 沓掛真彦、田村和広、石原良輔、井坂恵一、向後博司  
ヒト子宮内膜における IGFBP-rP1 の発現と脱落膜化との関連性  
第 12 回 日本生殖内分泌学会 2008 年 10 月、東京
- (3) 田村和広、吉江幹浩、加島英明、原 孝彦、向後博司  
子宮内膜間質細胞の分化と微小管機能との関係  
第 100 回 日本繁殖生物学会大会 2008 年 10 月、東京
- (4) 吉江幹浩、田村和広、宮島恵理、原 孝彦、京 哲、向後博司  
ヒト子宮内膜細胞において stathmin は PI3K/Akt シグナル経路を介して低酸素刺激による VEGF と HIF-1 $\alpha$  の発現に関与する  
第 81 回 日本薬理学会年会 2008 年 3 月、横浜
- (5) 石原良輔、田村和広、沓掛真彦、百瀬克俊、吉江幹浩、糸数修、原孝彦、向後博司  
子宮内膜における IGFBP-7 発現の脱落膜化に対する役割  
第 81 回 日本薬理学会年会 2008 年 3 月、横浜
- (6) 加島英明、吉江幹浩、田村和広、別所俊夫、武市 信、向後博司  
微小管調節因子・スタスミンは絨毛栄養膜細胞の分化と浸潤に関与する  
第 81 回 日本薬理学会年会 2008 年 3 月、横浜
- (7) 宮島恵理、吉江幹浩、田村和広、向後博司  
ヒト臍帯静脈血管内皮細胞における低酸素培養誘導性 HIF-1 $\alpha$  及び VEGF 発現へのスタスミンの関与  
日本薬学会 第 128 年会 2008 年 3 月、横浜