

## 平成20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。

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 の残基 1、残基 4 間で架橋して、その 18 員環部位を活性配座構造に固定したアナログの合成研究を行うとともに、臨床での応用を考慮した水溶性アナログの 14 員環シクロイソジチロシンのジフェニルエーテルの酸素原子を窒素原子に置換したアザシクロイソジチロシン構造を有するアナログの合成を行った。また、ユリ科 *Trillium erectum* および *Chamaelirium luteum*、リュウゼツラン科 *Agave utahensis* の細胞毒性活性成分探索を行い、22 種の新規化合物を含む合計 36 種の化合物を単離・構造決定し、*T. erectum* よりの 7 種、*A. utahensis* よりの 3 種の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。軟体サンゴ由来ジテルペノイド *clanone* および海綿由来のメロジテルペノイド *strongyloporine-16* はヒト卵巣癌細胞株 OVCAR3 細胞に対して 30%以上の増殖抑制作用を示すことを見出した。また、海綿 *Xestospongia Vanilla* 由来の海産ノルジテルペノイド *xestenone* の全合成を達成し、その絶対配置を含めた構造を明らかにした。

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 NPI-2358 (Phase II) 及びその誘導体 KPU-244 を開発した。NPI-2358 の母核であるジケトピペラジンの新規合成法の研究を進め、酸触媒存在下に

*N*- $\alpha$ -ketoacyl amino acid amides の環化によるモノデヒドロジケトピペラジンの合成法を開発した。また、(1)フルオロアルケン類合成では触媒と試薬の精緻な設計に基づく脱フッ素アシル置換反応の開発、(2)フルオロアルケニルエステル誘導体のアシル化剤としての特異な反応性解明、(3) 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の開発、(4)2-シロキシフランを用いた炭素-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、ホスフィニルジペプチドイソスターを指向し、リン原子上に不斉を有する光学活性イミノメチルホスフィナートの新規合成法を開発し、リパーゼを用いた速度論的光学分割に利用した。 $\beta$ -セクレターゼのコンフォメーション変化に基づき分子設計した多置換ピペリジン誘導体はその阻害活性を示すことを解明した。

代謝、薬効評価領域グループでは、退行期疾患や老化との関連性が指摘されている D-アミノ酸の体内動態制御システムを網羅的に解明することの一環として、統合失調症治療薬の標的分子として注目されている一方で腎毒性物質の可能性が指摘されている D-セリンの安全な投与設計を検討した。ラットでの D-セリンによる腎障害発症閾値を D-セリンの血中動態および腎機能形態変化を指標に検討した結果、ラットでは 1mmol/kg 体重以下の投与量では腎近位尿細管障害は惹起されないことを示した。一方、cAMP により活性化される Epac を介する細胞内シグナル経路が、ヒト栄養膜細胞のシンシチウム化に関与することを明らかにするとともに、ヒト卵巣癌細胞において微小管動態制御因子であるスタスミンを過剰発現すると低酸素誘導因子(HIF)と血管内皮細胞増殖因子(VEGF)発現が高進し、癌細胞の生存に関わる可能性を示唆した。さらに、海綿・軟体サンゴ由来のジテルペノイドに卵巣癌細胞の増殖抑制作用を認めた。

# 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

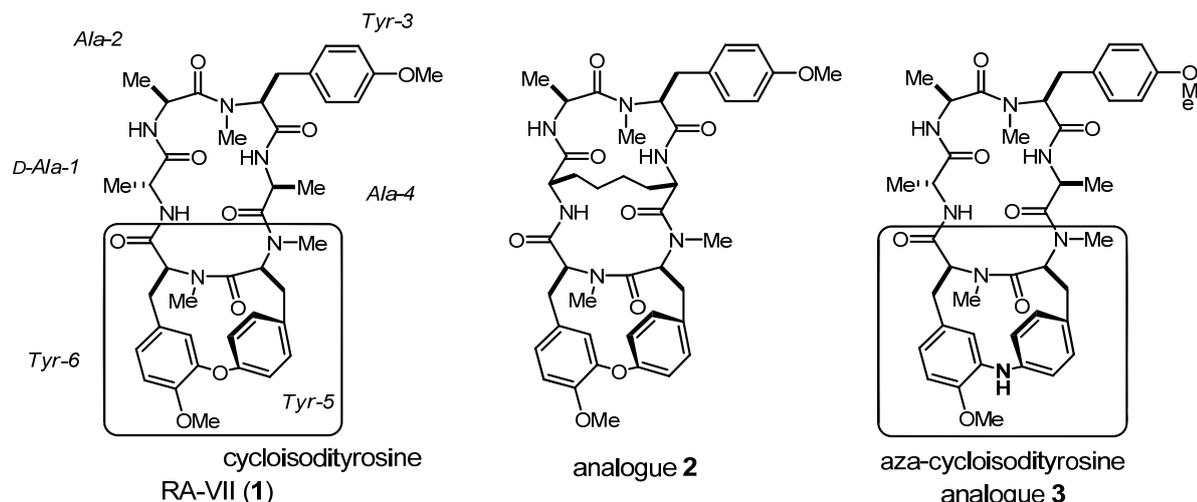
加齢とともに発病頻度が高くなる退行期疾患のうち、癌，リュウマチなどにターゲットを絞り、民間伝承天然薬物素材を中心に活性物質の探索，構造解明を行っていくとともに得られた活性化合物については各種アナログ合成を行い，構造活性相関的研究を構築してゆき，新規シズ分子を設計してゆく。研究対象化合物は、すでに当研究室でアカネ *Rubia cordifolia*、*R. akane* の根の抽出エキスより単離・構造決定した抗腫瘍性環状ヘキサペプチド RA-VII とその関連ペプチド類（RA 類）をベースとし、その強い抗腫瘍活性と特異な環状イソジチロシン構造、さらに 80S リボソームに結合する蛋白質合成阻害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

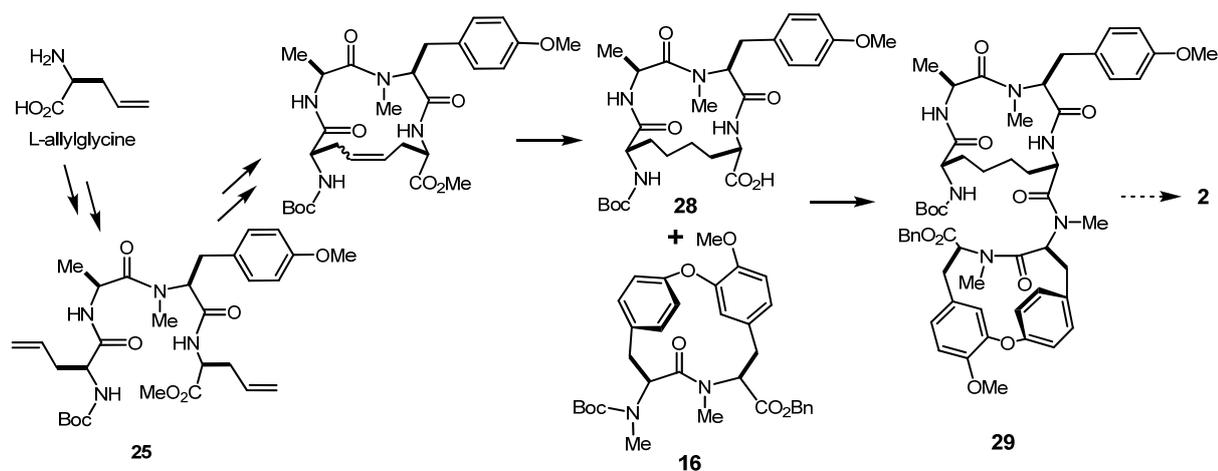
アカネ科 *Rubia* 属植物（アカネ *Rubia akane*, *R. cordifolia*）の根より、抗腫瘍活性を示す二十余种の RA 系化合物が単離されている。その中でも、RA-VII (**1**) は特に強い抗腫瘍活性を示す化合物で、その活性発現機構は 80S リボソームに結合することにより、蛋白質の合成を阻害するためであると考えられている。また、最近ではアクチンにも作用することが明らかにされている。RA-VII (**1**) は以前制がん剤として臨床試験が行われていたが、毒性が強く、また水溶性が低いために製剤化が困難なことから、開発が中断されている。そこで、RA 系化合物を制がん剤として開発するには、毒性を低減するとともに、抗腫瘍活性が強く、かつ水溶性のアナログを見出す必要がある。著者は、活性配座構造を効果的に固定する目的で、18 員環部位を残基 1、残基 4 間で架橋したアナログ (**2**) を、水溶性を改善する試みとして、14 員環を形成するシクロイソジチロシンのジフェニルエーテル構造をジフェニルアミンに置換したアナログ (**3**) をデザインし、それらの合成を試み

た。



### (1) 18員環部位の配座構造を固定したアナログの合成

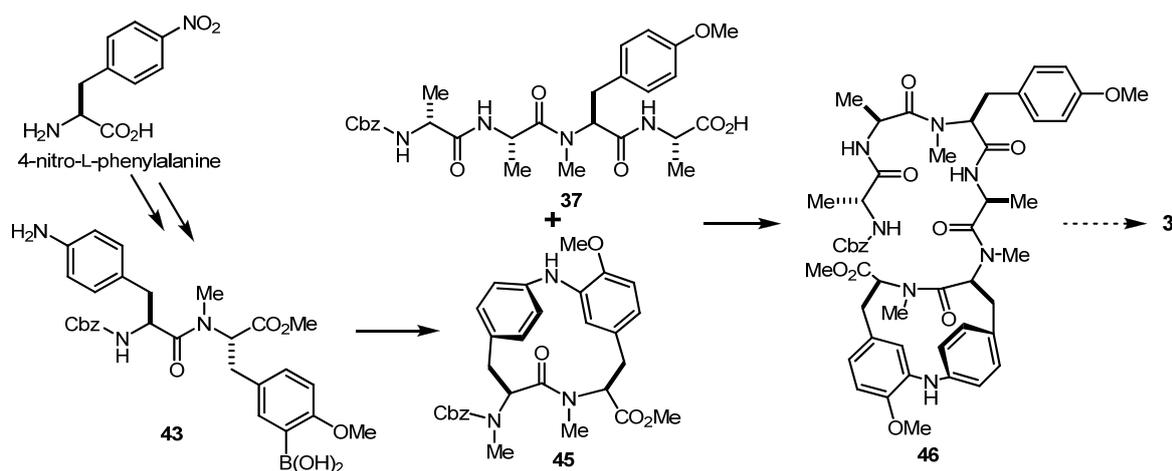
RA-VII (1) は溶液中において、ペプチド結合の *cis* / *trans* 異性に由来する 2~3 種の配座異性体の混合物として存在する。そのうち Tyr-5/Tyr-6 間が *cis* 配置、他の 5 箇所のペプチド結合が *trans* 配置をとる配座構造が活性発現に重要であることが明らかとなっている。この配座構造は、ペプチド骨格の修飾やアミノ酸残基側鎖の欠損により維持できなくなり、活性が消失する。そこで、活性配座構造に固定化するために 3 環性アナログ (2) をデザインした。本アナログが強い活性を示せば、18 員環部位の活性配座構造を維持しつつ、各部位を多様に修飾したアナログのデザインが可能になる。市販の L-アリルグリシンの N 末側にペプチド鎖を伸長させてテトラペプチド (25) とした。オレフィンメタセシスによる環化後、還元、けん化して (28) とした。これに別途合成したシクロイソジチロシン (16) を縮合させてヘキサペプチド (29) へ誘導した。現在 (29) のマクロ環化反応の条件検討を行っている。



### (2) アザシクロイソジチロシンアナログ (3) の合成

RA-VII (1) は構造中に水溶性官能基を持たない。そこで、立体構造を殆ど変えることなく水溶性を改善するために、シクロイソジチロシンのエーテル酸素原子を窒素原子に置き

換えたアザシクロイソジチロシンアナログ (3) の合成を試みた。アナログ (3) は、塩基性窒素原子を有するため、酸化合物と水溶性の塩を形成できると考えられる。また、この窒素原子は酸素原子と同様に Tyr-5、Tyr-6 の芳香環の電子密度を上昇させるため、電子的にもほぼ等価の置換修飾と考えられる。市販の 4-ニトロ-L-フェニルアラニンおよび 3-ヨード-L-チロシンよりボロン酸ジペプチド (43) を合成し、酢酸銅 (II) 処理による環化後 N-メチル化して (45) を得た。これに別途合成したテトラペプチド (37) と縮合させて、ヘキサペプチド (46) とした。現在 (46) のマクロ環化反応の条件検討を行っている。



一方、中国産のコロハ *Trigonella foenum-graecum* L. をメタノールで抽出して得たエキスについて各種クロマトグラフィー及び ODS-HPLC を用いて分離・精製を行った。その結果、4 種の新規アルカロイドを単離した。これらの化合物について、高分解能 ESI-MS により分子式を決定し、赤外 (IR) スペクトル、一次元 NMR ( $^1\text{H}$ 、 $^{13}\text{C}$ ) 及び二次元 NMR ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY、HMQC、HMBC) スペクトルの解析をもとに構造決定を行った。

一方、コロハはマメ科植物 *Trigonella foenum-graecum* L. の種子であり、古来より生薬、食品、香料として用いられてきた。本研究では、生薬コロハに含まれるアルカロイド成分に着目し、医薬としての用途との関連性を検証していくことを目的に、アルカロイド成分の単離・構造決定を行った。化合物 4 は、 $\gamma$ -ヒドロキシイソロイシンの  $\gamma$  位水酸基とカルボキシル基との間でラク톤を形成した 3-アミノ-4,5-ジメチルテトラヒドロフラン-2-オンに脂肪酸がアミド結合した構造であると考えられた。ラク톤部位の立体構造については、NOESY スペクトルの解析により推定した。さらに、化合物 4 の  $^1\text{H}$  NMR 及び  $^{13}\text{C}$  NMR スペクトルデータが、合成誘導体として報告されている (3*S*,4*S*,5*R*)-3-[(*tert*-Butyloxycarbonyl)amino]-4,5-dimethyltetrahydrofuranone (Fig. 1) の文献値と極めて類似していることから、Fig. 2 に示す相対配置をもつと決定した。脂肪酸は ESI-MS の結果よりパルミチン酸であると考えられた。

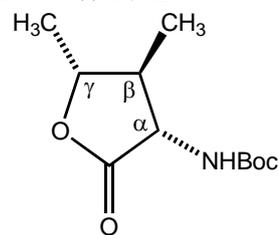
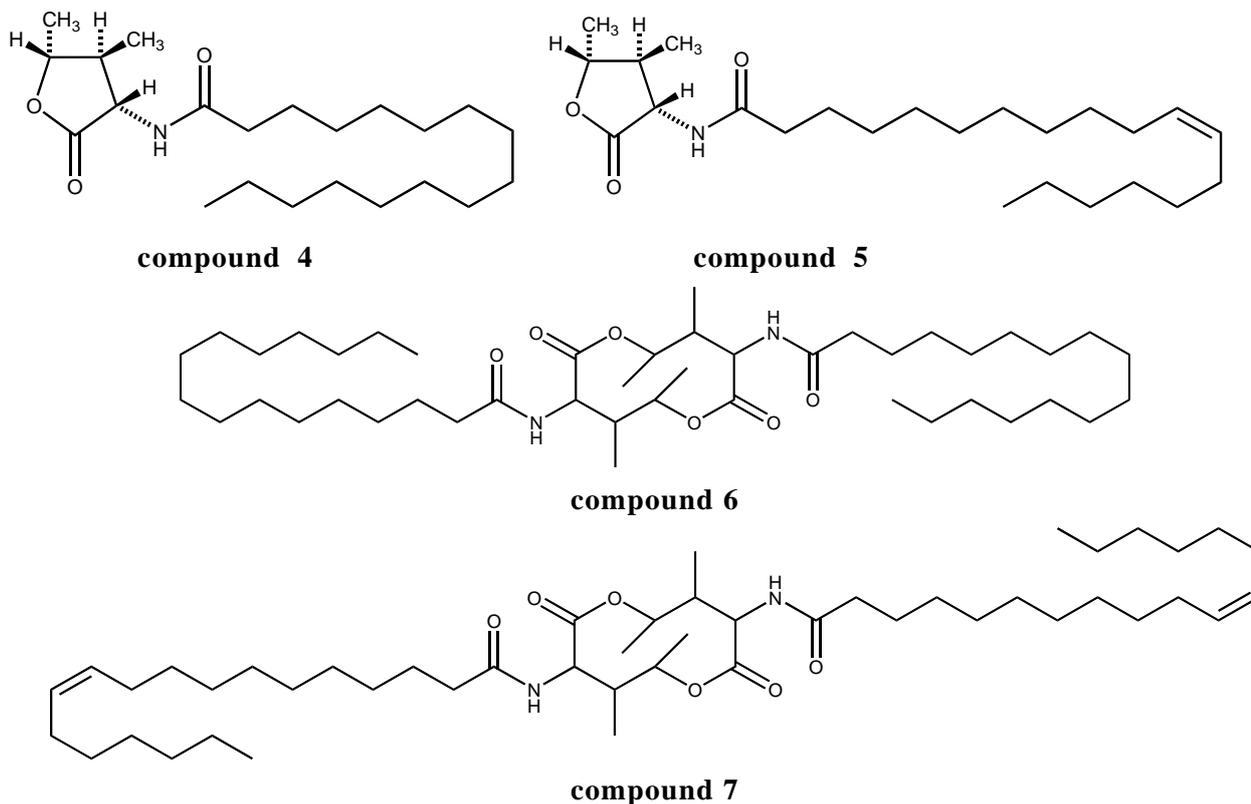


Fig. 1

化合物 5 は化合物 4 の脂肪酸がオレイン酸に置き換わった構造であるとそのスペクトルデータより考えられた。

また、化合物 6 及び 7 は、それぞれ化合物 4 及び 5 もしくはそれらの類縁体が二量体化した構造であることが、種々の機器スペクトルデータより推測された、その MS データはその推測をよく支持した。



**Fig. 2**

### 3. 研究評価及び今後の研究計画

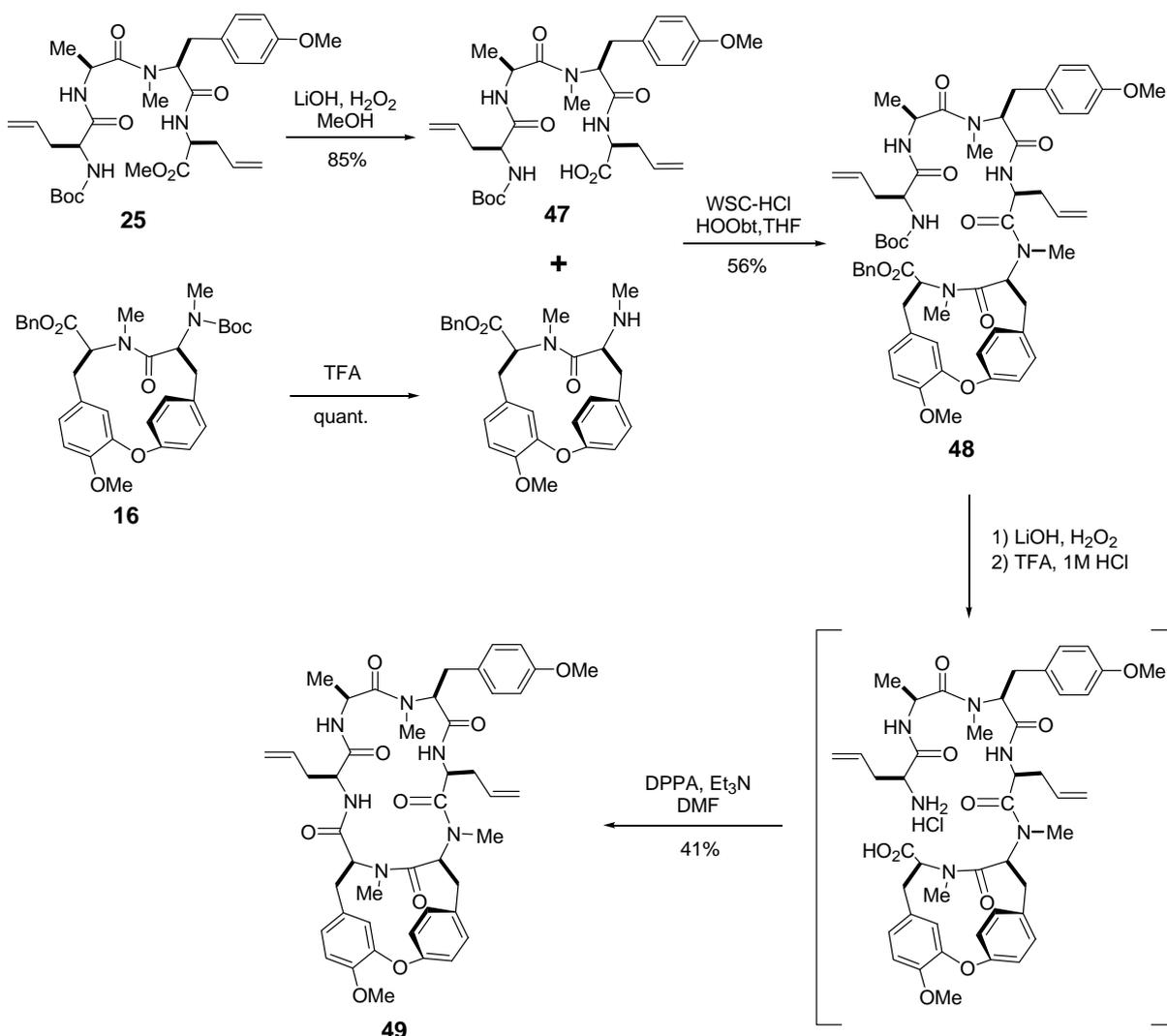
平成 20 年度の本研究では、前年度に引続き抗腫瘍活性ヘキサ環状ペプチド RA-VII (1) のチロシン残基の芳香環部位の構造活性についての知見を得るべく、茜草根よりチロシン残基が修飾された新規アナログを探索するとともに、18 員環部位の配座を固定したアナログの合成を行った。Boger らは、RA-VII (1) の 14 員環イソジチロシン部位 (Tyr-5、Tyr-6) を共にグリシンに置き換え、18 員環部分のみから構成されるヘキサペプチドを合成し、このものに活性が無いことを示した。また、Tyr-6 の *N*-メチル基を持たない [*N*-desmethyl-Tyr-6]RA-VII 及び 14 員環部分のみから構成されるシクロイソジチロシン誘導体を合成し、それらの活性が比較的強いことから、14 員環シクロイソジチロシン部位が活性本体であると提唱している。したがって、RA 類の 18 員環構造における活性発現部位の特定、及びそのトポロジーの解明を行うには、シクロイソジチロシン構造を組み込んだアナログをデザインする必要がある。また、これまでの配座構造の研究から、RA-VII (1) 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、今回、RA-VII (1) 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 (2)

をデザインした。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られる。

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を用いた。メタセシス反応の歴史は古く、様々な試薬が開発されている。その中でも、Grubbs 触媒は現在最も使用されている触媒であり、本触媒の開発者である Grubbs R. H.、Chauvin Y.、Schrock R. R. は 2005 年ノーベル化学賞を受賞している反応を利用した。

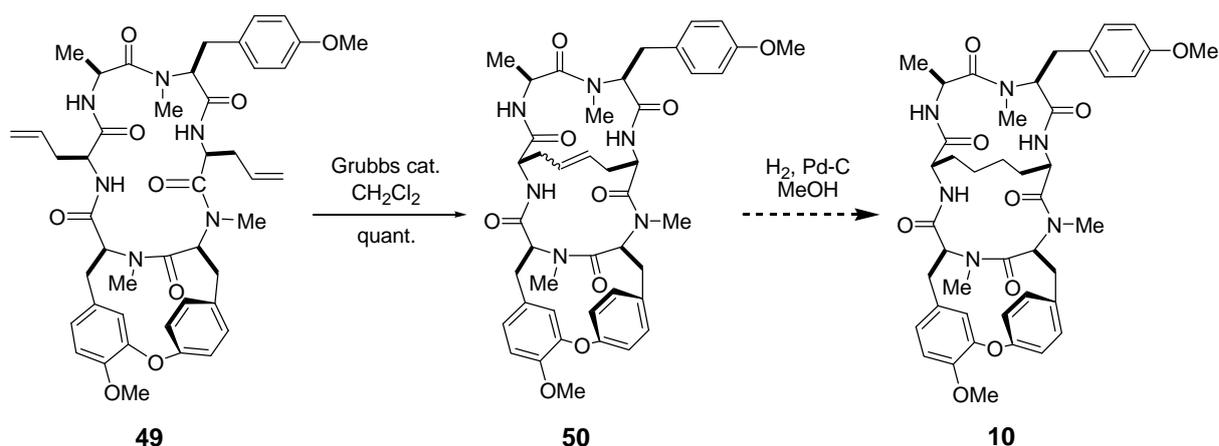
研究成果 (1) よりのテトラメチレンブリッジを形成した後にマクロ環化反応を行うと、その反応点の距離より反応が進行しなかった。そこで、マクロ環化反応を先に行い、最後にオレフィンメタセシス反応にて架橋することにした。この方法では、モンテカルロ法を用いた最安定コンフォメーションの計算でも、反応点が 3.2 Å と通常のマクロ環化反応とほぼ同等の距離となった。



最後に、得られた環状ヘキサペプチド(**49**)をオレフィンメタセシス反応により架橋させた。この反応は第二節と同様に、触媒として第 2 世代 Grubbs 試薬を用い、残基 1 と残基 4 のアリルグリシン間で閉環させた。ヘキサペプチド (**49**) を 3 mM の濃度となるようにジクロロメタンに溶解させて、5 mol% の Grubbs 触媒を加えて、40 °C で 18 時間攪拌したところ、ほぼ定量的に 3 環性不飽和ヘキサペプチド (**50**) が得られた。

今後は、得られた 3 環性不飽和ヘキサペプチド (**50**) を接触還元に付し、3 環性アナ

ログ (2) 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。



一方、RA-VII (1) は構造中に水溶性官能基を持たないため、水に不溶であることが医薬品として開発するうえで大きな問題点であった。従って、医薬品を指向したアナログには水溶性を増し、かつ活性を維持することが求められる。このような水溶性を改善したアナログでは体内動態のプロフィールが変化することも予想されるため、開発上問題となっていた RA-VII (1) の毒性が改善される可能性もある。

そこで、RA-VII (1) の立体構造を殆ど変えることなく水溶性を改善するために、シクロイソジチロシンのエーテル酸素原子を窒素原子に置き換えたアザシクロイソジチロシンアナログ (3) の合成を試みた。アナログ (3) は塩基性窒素原子を有するため、生理学的に許容される酸化合物と水溶性の塩を形成できると考えられる。また、窒素原子は酸素原子と同様に Tyr-5、Tyr-6 の芳香環の電子密度を上昇させるため、電子的にもほぼ等価の置換修飾と考えられるが、窒素原子は酸素原子に比べてより電子供与性が強いため、その細胞毒性、ならびに抗腫瘍活性におよぼす影響について興味を持たれる。

アザシクロイソジチロシンの合成法は、これまでのシクロイソジチロシンの合成方法をもとに考案した。シクロイソジチロシンは 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、高度に歪みがかかり、合成が困難とされている。また、天然型 L,L-シクロイソジチロシンは C 末側不斉炭素がエピ化し易いことも、その合成を困難にしている。N,N'-ジメチルシクロイソジチロシンの合成については、Inaba ら、Boger ら、Zhu らによりすでに行われている。Boger らは、Ullmann 反応を用いてジフェニルエーテル結合を構築しているが、反応時にシクロイソジチロシンの C 末側不斉炭素がエピ化していたことを後に報告している。Inaba らは、*o,o'*-ジブromoチロシンと *o,o'*-ジクロロチロシン間の 3 価タリウム塩を用いたフェノール酸化的カップリング反応と、続くキノンの還元によりジフェニルエーテル環を形成しているが、その環化収率は著しく低い。また、Zhu らによる合成法においては、ドーパ誘導体による 4-ニトロ-3-フルオロチロシンの芳香環上での求核置換反応を用いてジフェニルエーテル化している。この方法は各行程が実用的な収率で進行するものの、2 つのアミノ酸ユニットの不斉合成を必要とし、行程数が長くなることが欠点となっている。また、シクロイソジチロシンの N,N'-ジメチル化は再現性に問題があった。シクロイソジチロシンの N-メチル化については、当研究室における研究成果から、予め一方の窒素原子をメチ

ル化しておき、環化後に、もう一方の窒素原子をメチル化することで再現性良くへ *N,N'*-ジメチル体へ誘導できることが明らかになっている。そこで、アザシクロイソジチロシンの合成方法としては、当研究室で進められてきたボロン酸前駆体を用いたシクロイソジチロシン合成法を応用することにした。

最終的に得られたヘキサペプチド (46) の C 末側保護基を水酸化リチウムと 35% 過酸化水素水を用いて加水分解し、N 末側保護基を 10% パラジウム活性炭で接触還元により除去後、*HOO*bt を加えて濃度が 1.3 mM となるように *N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解させ、縮合剤として *WSC-HCl* を用いて 3 日間反応させたところ、4%と低収率ながらアザシクロイソジチロシンアナログ (3) が得られた。今後は、保護基の除去の条件、マクロ環化反応の条件を検討して環化収率の向上を図り、配座構造の解析、細胞毒性試験を行いたい。

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。

結論的には、*RA-VII* の残基 1、残基 4 間で架橋して、その 18 員環部位を活性配座構造に固定したアナログの合成研究を行った。本アナログの合成に成功すれば、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を行っていききたい。

また、14 員環シクロイソジチロシンのジフェニルエーテルの酸素原子を窒素原子に置換したアザシクロイソジチロシン構造を有するアナログの合成を行った。今後は本アナログの収率向上を目指してマクロ環化反応条件の検討を行うとともに、水溶性の評価、および細胞毒性試験を行っていききたい。

また、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。

一方、今回コロハから得られた化合物 4 及び 5 は、 $\gamma$ -ヒドロキシイソロイシンに由来する、 $\gamma$ -ラクトン構造を有し、そのアミノ基が脂肪酸とアミド結合した構造であることがわかった。また化合物 6 及び 7 は、 $\gamma$ -ヒドロキシイソロイシン 2 分子が 10 員環ビスラクトン構造を形成した構造であることが示唆された。ほ乳類においては発見されたことのない特異なアミノ酸であり、血漿中の脂質やグルコース濃度を下げる効果があると報告されているので、現在までに報告例がない化合物 4 ~ 7 について、本作用があるのか検討したい。

#### 4. 研究成果の公表

原著論文

- (1) Lee, J.-E.; Hitotsuyanagi, Y.; Takeya, K.

Structures of cytotoxic bicyclic hexapeptides, *RA-XIX*, *-XX*, *-XXI*, and *-XXII*, from

*Rubia cordifolia* L.

Tetrahedron, **64**(18), 4117-4125 (2008).

- (2) Lee, J.-E.; Hitotsuyanagi, Y.; Nakagawa, Y.; Kato, S.; Fukaya, H.; Takeya, K.  
Design and synthesis of a bis(cycloisodityrosine) analogue of RA-VII, an antitumor bicyclic hexapeptide.  
Bioorg. Med. Chem Lett., **18**(24), 6458-6461 (2008).
- (3) Lee, J.-E.; Hitotsuyanagi, Y.; Kim, I.-H.; Hasuda, T.; Takeya, K.  
A novel bicyclic hexapeptide, RA-XVIII, from *Rubia cordifolia*: Structure, semi-synthesis, and cytotoxicity.  
Bioorg. Med. Chem., **18**(2), 808-811 (2008).
- (4) Lee, J.-E.; Hitotsuyanagi, Y.; Fukaya, H.; Kondo, K.; Takeya, K.  
New cytotoxic bicyclic hexapeptides, RA-XXIII and RA-XXIV, from *Rubia cordifolia* L.  
Chem. Pharm. Bull., **56**(5), 730-733 (2008).

#### 国際学会発表

- (1) Koichi Takeya, Ji-Ean Lee, Yukio Hitotsuyanagi, Tomoyo Hasuda, Ik-Hwi Kim, Tomoyo Hasuda  
A Novel Bicyclic Hexapeptide from *Rubia cordifolia*: Structure, Semi-synthesis, and Cytotoxicity  
7th Joint Meeting of AFERP, ASP, GA, PSE & SIF, 2008年8月, Athens, Greece

#### 国内学会発表

- (1) Amal Ahmed Atwa Sallam, Yukio Hitotsuyanagi, Koichi Takeya, El Sayed Shaker Mansour, Attallah Fouad Ahmed, Sahar Gedara  
New saponin from *Bryonia dioica* L.  
日本生薬学会 第55回年会, 2008年9月, 長崎
- (2) 李 知彦, 一柳幸生, 近藤和行, 深谷晴彦, 竹谷孝一  
*Rubia cordifolia* より得られた新規環状ペプチド RA-XXIII 及び -XXIV について  
日本生薬学会 第55回年会, 2008年9月, 長崎
- (3) 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系ヘキサペプチド配糖体の構造  
日本薬学会 第129年会, 2009年3月, 京都
- (4) 小沢 圭, 青柳 裕, 桂 明玉, 金 永日, 李 諸文, 蓮田知代, 竹谷孝一  
Jolkinolide 類の合成研究  
日本薬学会 第129年会, 2009年3月, 京都
- (5) 中川貴恵, 一柳幸生, 竹谷 孝一  
抗腫瘍性環状ペプチド RA-VII の3環性配座固定アナログのデザインと合成  
日本薬学会 第129年会, 2009年3月, 京都
- (6) 藤林早紀, 一柳幸生, 都筑幹夫, 竹谷孝一

コロハから得られた新規含窒素化合物について

日本薬学会 第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都

- (7) 加藤沙織, 李 智彦, 一柳幸生, 深谷晴彦, 竹谷孝一

抗腫瘍性ペプチド RA-VII の N-メチル化アナログの配座構造と細胞毒性活性

日本薬学会 第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都

- (8) 蓮田知代, 一柳幸生, 竹谷孝一

抗腫瘍性環状ヘキサペプチド RA-V をハプテンとするモノクローナル抗体の作製とその応用 (2)

日本薬学会 第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都

# 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スクリーニング

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治療に有効な新規医薬品のシ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シ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。

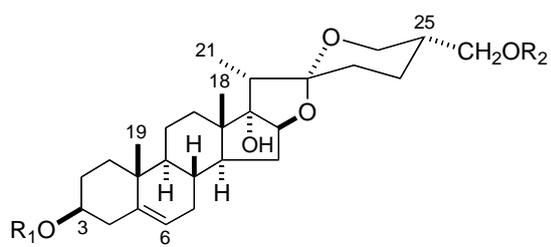
## 2. 研究成果の概要

上記の観点から、本年度は、北米の伝承薬（ハーブ）であるユリ科植物 *Trillium erectum* の地下部と *Chamaelirium luteum* の根および根茎、ユリ科近縁植物であるリュウゼツラン科 *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。

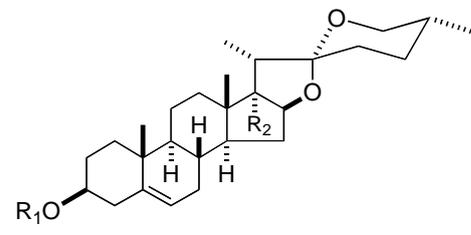
(1) *Trillium erectum* のステロイド配糖体成分と細胞毒性活性

ユリ科 *T. erectum* は北米に分布する多年草であり、その根は ‘Bethroot’ と呼ばれ、民間薬として子宮、尿路、肺からの出血の治療に用いられてきた。日本に自生する同属植物の *T. tschonoskii* や *T. kamtschaticum* からステロイド配糖体が単離されているが、*T. erectum* の成分に関する報告は無い。

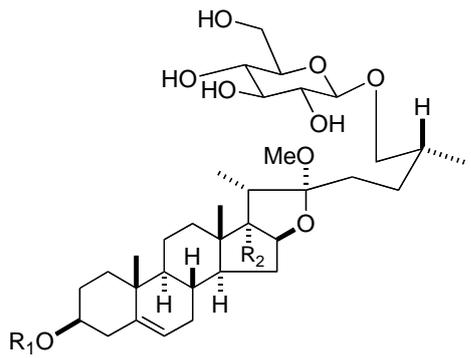
*T. erectum* の地下部 (乾燥重量 2.5 kg) をメタノール (6 L) で抽出し、減圧下濃縮した。得られた抽出エキス (360 g) を Diaion HP-20 を充填したカラムに付し、30%メタノール、50%メタノール、メタノール、エタノール、酢酸エチルで順次極性を下げながら溶出させ、5画分に分画した。メタノール溶出画分について、シリカゲルおよび ODS シリカゲルカラムクロマトにて分離、精製を行った結果、6 種の新規ステロイド配糖体 **1** (5.2 mg)、**2** (49 mg)、**3** (24 mg)、**4** (13 mg)、**5** (6.7 mg)、**6** (16 mg) および 14 種の既知ステロイド配糖体 (**7-20**) 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。



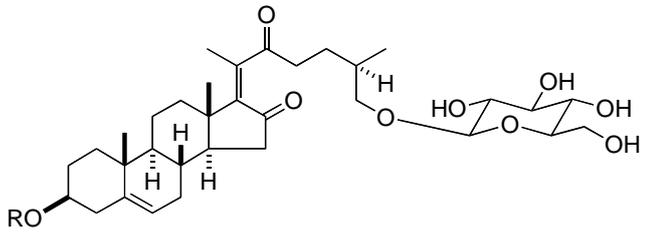
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
1	H	β-D-Glc	5	β-D-Glc	H
2	S <sub>1</sub>	β-D-Glc	6	S <sub>2</sub>	H
3	S <sub>2</sub>	β-D-Glc	7	S <sub>1</sub>	H
4	S <sub>3</sub>	β-D-Glc			



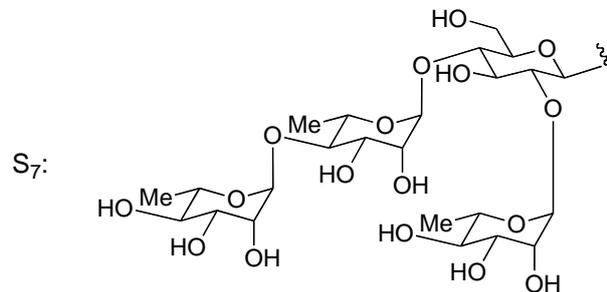
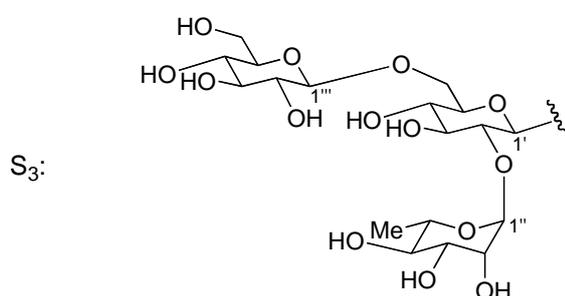
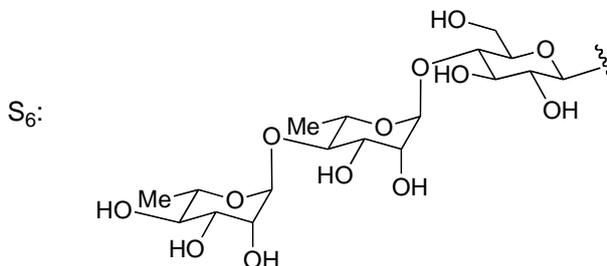
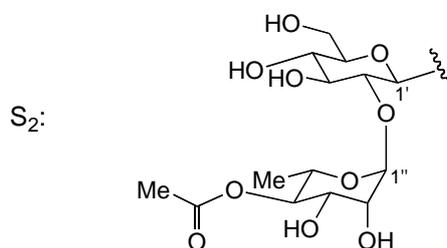
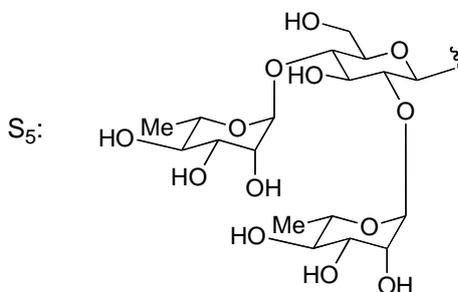
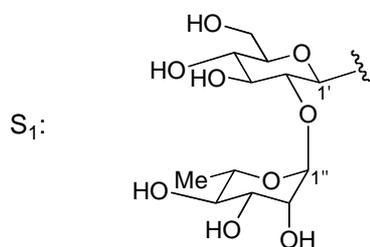
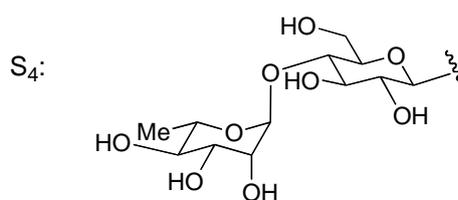
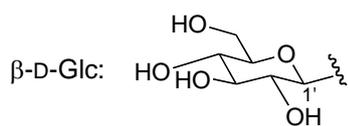
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
8	S <sub>1</sub>	OH	12	S <sub>7</sub>	OH
9	S <sub>4</sub>	OH	13	S <sub>1</sub>	H
10	S <sub>5</sub>	OH	14	S <sub>5</sub>	H
11	S <sub>6</sub>	OH	15	S <sub>7</sub>	H



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
16	S <sub>5</sub>	H
17	S <sub>1</sub>	OH
18	S <sub>5</sub>	OH
19	S <sub>7</sub>	OH



	R
20	S <sub>1</sub>



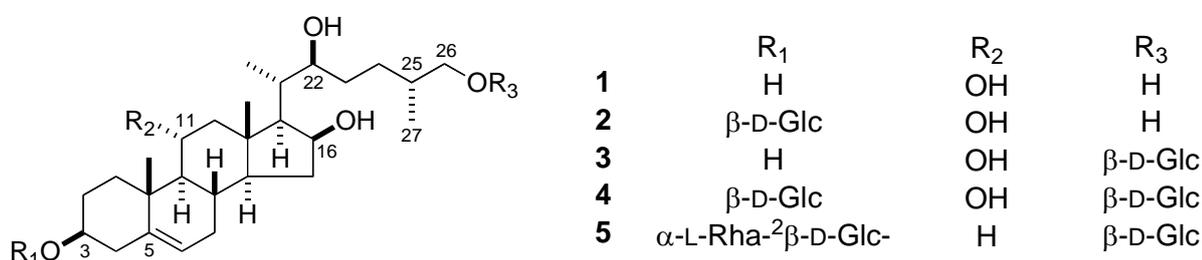
化合物 **1-20** の HL-60 ヒト細胞に対する細胞毒性活性を評価したところ、**8**、**10**、**12-16** に活性が認められ、それらの IC<sub>50</sub> 値は、6.1  $\mu$ g/mL (**8**)、3.6  $\mu$ g/mL (**10**)、2.7  $\mu$ g/mL (**12**)、2.3  $\mu$ g/mL (**13**)、8.9  $\mu$ g/mL (**14**)、1.7  $\mu$ g/mL (**15**)、2.9  $\mu$ g/mL (**16**) であった。構造活性相関について考察したところ、アグリコンが (25*R*)-spirost-5-ene-3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -diol (pennogenin) または (25*R*)-spirost-5-ene-3 $\beta$ -diol (diosgenin) で、アグリコンに結合した  $\beta$ -D-glucopyranosyl 基の 2 位に  $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl 基が結合した糖鎖 (S<sub>1</sub>、S<sub>5</sub>、S<sub>7</sub>) を有する化合物 (**8**、**10**、**12**、**13**、**14**、**15**) が活性を示すことが明らかとなった。また、**8** の 27 位に水酸基が導入された化合物 (**7**) や 27 位に  $\beta$ -D-glucopyranosyl 基が導入された化合物 (**2**) には活性が認められなかった。

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

ユリ科 *C. luteum* は、北アメリカの高地に分布する多年草である。その根および根茎を乾燥させたものは、アメリカにおいて ‘False Unicorn Root’ と呼ばれ、民間薬とし

て主に婦人科系疾患の改善、利尿、制吐などを目的に用いられてきた。本植物の含有成分の研究は、1942年に一例の報告があるに過ぎない。今回、*C. luteum*に含まれる新規細胞毒性活性成分の探索を行った。

*C. luteum*の根および根茎（乾燥重量 3.0 kg）をメタノール（6 L）で抽出し、減圧下濃縮した。得られた抽出エキス（530 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。50%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、5種の新規ステロイド配糖体 **1**（63.2 mg）、**2**（37.9 mg）、**3**（61.7 mg）、**4**（262 mg）、**5**（37.8 mg）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。

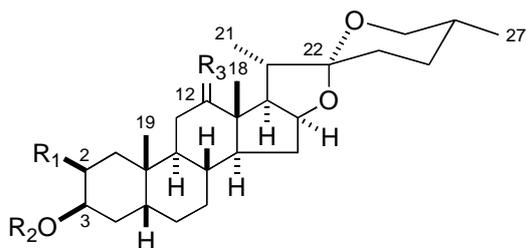


化合物 **1** [(22*S*,25*R*)-cholest-5-ene-3<sup>⊕</sup>,11<sup>⊖</sup>,16<sup>⊕</sup>,22,26-pentol]の構造については、各種スペクトルデータの詳細な解析と X 線結晶解析ならびに MTPA エステル化体による Mosher 法を適用することにより、絶対立体配置を含めて決定した。化合物 **4** と **5** はアグリコンの 3 位水酸基と 26 位水酸基に糖が結合したビスデスモシド型の配糖体である。この様にアグリコン部が高度に水酸化されたステロールのビスデスモシド型配糖体が天然から単離された例は少なく、構造上興味深い。

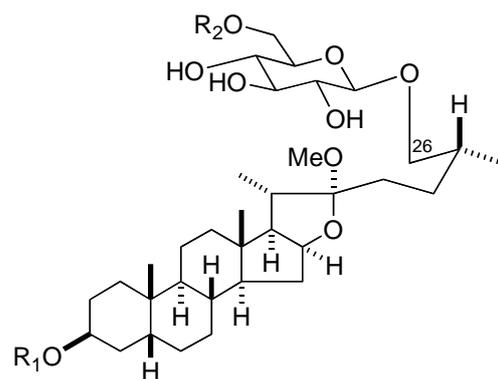
化合物 **1-5** はいずれも HL-60 細胞に対して細胞毒性活性を示さなかった。

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

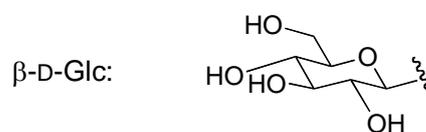
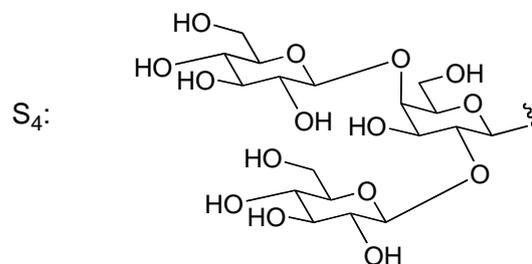
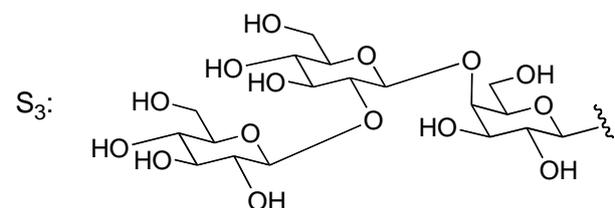
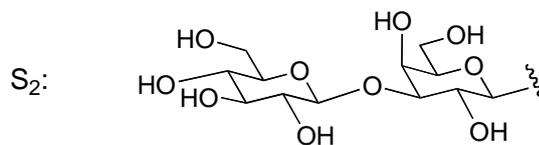
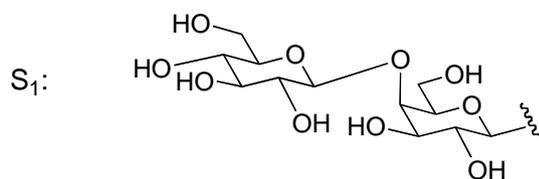
昨年度に引き続き、リュウゼツラン科植物 *A. utahensis* の全草のメタノール抽出エキスの分離、精製を行った。Diaion HP-20 カラムクロマトにより得られた粗画分のうち、メタノール溶出画分について、シリカゲルおよび ODS シリカゲルカラムクロマト、分取 HPLC にて分離、精製を行ったところ、11 種の新規ステロイド配糖体 **1**（150 mg）、**2**（14 mg）、**3**（820 mg）、**4**（13 mg）、**5**（4.5 mg）、**6**（78 mg）、**7**（12 mg）、**8**（4.5 mg）、**9**（50 mg）、**10**（42 mg）、**11**（7.0 mg）が単離された。これらの構造を、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。



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
1	H	S <sub>1</sub>	H,H
2	H	S <sub>2</sub>	H,H
3	H	S <sub>3</sub>	H,H
4	H	S <sub>1</sub>	O
5	H	S <sub>2</sub>	O
6	OH	S <sub>1</sub>	H,H
7	OH	S <sub>3</sub>	H,H
8	OH	S <sub>4</sub>	H,H



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
9	S <sub>1</sub>	H
10	S <sub>3</sub>	H
11	S <sub>3</sub>	β-D-Glc



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、5β-spirostan 配糖体の 1-3 に活性が認められ、それらの IC<sub>50</sub> 値は、4.9 μg/mL (1)、7.0 μg/mL (2)、4.9 μg/mL (3) であった。5β-Spirostan 配糖体のうち、アグリコンの 2 位に水酸基が導入された化合物 (6-8) と 12 位にカルボニル基が導入された化合物 (4、5)、および 5β-furostan 配糖体 (9-11) には活性が認められなかった。

### 3. 研究評価及び今後の研究計画

北米の薬用植物 *Trillium erectum* および *Chamaelirium luteum*、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った。

ユリ科 *T. erectum* のメタノール抽出エキスから、6 種の新規ステロイド配糖体 (1-6) および 14 種の既知ステロイド配糖体 (7-20) が単離された。化合物 1-20 の HL-60 ヒト白血病細胞に対する細胞毒性活性を評価したところ、8、10、12-16 に活性が認められ、

それらの IC<sub>50</sub> 値は、6.1 µg/mL (8)、3.6 µg/mL (10)、2.7 µg/mL (12)、2.3 µg/mL (13)、8.9 µg/mL (14)、1.7 µg/mL (15)、2.9 µg/mL (16) 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 (25*R*)-spirost-5-ene-3β,17α-diol (pennogenin) または(25*R*)-spirost-5-ene-3β-diol (diosgenin)で、アグリコンに結合した β-D-glucopyranosyl 基の 2 位に α-L-rhamnopyranosyl 基が結合した糖鎖(S<sub>1</sub>、S<sub>5</sub>、S<sub>7</sub>)を有する化合物(8、10、12、13、14、15)が活性を示すことが明らかとなった。また、8の 27 位に水酸基が導入された化合物(7)や 27 位に β-D-glucopyranosyl 基が導入された化合物(2)には活性が認められなかった。

ユリ科 *C. luteum* のメタノール抽出エキスから 5 種の新規ステロイド配糖体

(1-5) が単離された。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、さらに数種のステロイド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 *A. utahensis* のメタノール抽出エキスから新規化合物 11 種 (1-11) が単離された。これらの化合物はいずれも 5β-スピロスタンあるいは 5β-フロスタンを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 1-11 の HL-60 細胞に対する細胞毒性活性を評価したところ、5β-spirostan 配糖体の 1-3 に活性が認められ、それらの IC<sub>50</sub> 値は、4.9 µg/mL (1)、7.0 µg/mL (2)、4.9 µg/mL (3) であった。5β-Spirostan 配糖体のうち、アグリコンの 2 位に水酸基が導入された化合物 (6-8) と 12 位にカルボニル基が導入された化合物 (4、5)、および 5β-furostan 配糖体 (9-11) には活性が認められなかった。

今後、1) HL-60 細胞に対して細胞毒性を示した化合物に対しては、固形がんである A549 ヒト肺がん細胞および肺正常線維芽細胞に対する細胞毒性活性を評価し、細胞種の違いによる細胞毒性活性の感受性の差を考察するとともに、それら活性化合物の各種培養細胞に対する 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、2) 作用メカニズムの解明の第一歩として、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、3) 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 類の発現、ミトコンドリア膜電位の変化を確認することで分子生物学的にアポトーシス誘導活性の評価を検討する、予定である。

#### 4. 研究成果の発表

原著論文

(1) Akihito Yokosuka, Yoshihiro Mimaki.

Steroid glycosides from the underground parts of *Trillium erectum* and their cytotoxic activity  
*Phytochemistry*, **69**, 2724-2730 (2008).

国内学会発表

(1) 横須賀章人、三巻祥浩

リュウゼツラン科植物の化学成分 (13) *Agave utahensis* の新規ステロイド配糖体

の構造と細胞毒性活性について

日本生薬学会第55回年会、2008年9月、長崎

# 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 Lewis 酸や Brønsted 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化合物の合成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) 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) 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
- (3) 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
- (4) 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

## 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

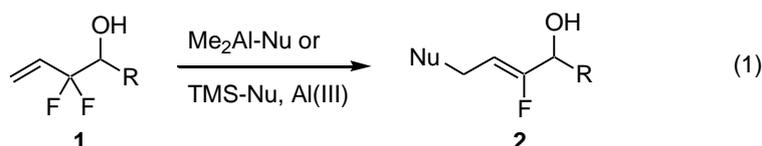
本研究テーマは当研究室においてここ数年来取り組んで来たものであり，これまでの成果を踏まえて継続的に検討を加えた．

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，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，フルオロオレフィン<sup>1</sup>は立体的にも静電的にもアミド結合により類似するため，アミド結合の理想的なミミックと考えられている．一方，フルオロオレフィン<sup>1</sup>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<sup>1</sup>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<sup>1</sup>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<sup>1</sup>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。

今回、新たな方法論の開発として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り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を目指し検討を開始した。本反応ではフッ素とアルミニウムの親和性に着目して触媒や試薬の設計を行っているところに特徴がある (式 1)。



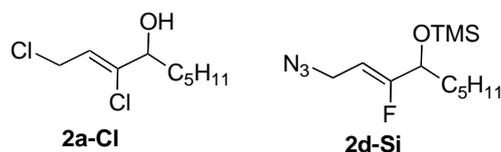
具体例を Table 1 に示す。塩化メチレンのようなアルミニウムに対して配位性の弱い溶媒を用いたとき、3,3-ジフルオロ-1-アルケン **1a** ( $R = n\text{-C}_5\text{H}_{11}$ ) は比較的良好な反応性を示した。例えば、 $\text{Me}_2\text{AlCl}$  (2 equiv) との反応は室温、30分程度で進行して、フッ素置換塩化アリル誘導体 **2a** (収率 70%) が得られた (entry 1)。 $\text{Me}_3\text{Al}$  のようなトリアルキルアルミニウムを用いると *Z* 選択的なアルキル化が進行した (entry 2)。アミノ基の導入を目的として、アルミニウムアルコキシド [ $(i\text{-PrO})_3\text{Al}$ ] 共存下  $\text{TMSN}_3$  との反応を行ったところ、アジド化が高収率で進行してアジド体 **2d** と *O*-TMS 体 **2d-Si** がほぼ 1:1 の混合物として生成した。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 9:1 であった。**2d-Si** の脱シリル化は 10% 塩酸の処理で容易に行うことができる (entries 4,5)。

Table 1. Reaction of **1a** ( $R = n\text{-C}_5\text{H}_{11}$ ) with Nucleophiles

entry	Reagent(s)	temp	time (h)	<b>2</b>	Nu	Yield(%)	<i>Z/E</i>
1 <sup>a</sup>	$\text{Me}_2\text{AlCl}$	rt	0.5	<b>2a</b>	Cl	70 <sup>c</sup>	14 : 1
2 <sup>a</sup>	$\text{Me}_3\text{Al}$	rt	6	<b>2b</b>	Me	77	> 20 : 1
3 <sup>a</sup>	$i\text{-Bu}_2\text{AlH}$	rt	22	<b>2c</b>	H	40 <sup>d</sup>	2 : 1
4 <sup>a</sup>	$\text{TMSN}_3$ , $(i\text{-PrO})_3\text{Al}$	rt	4	<b>2d</b>	$\text{N}_3$	79 <sup>e</sup>	6 : 1
5 <sup>a</sup>	$\text{TMSN}_3$ , $(i\text{-PrO})_3\text{Al}$	0 °C	3	<b>2d</b>	$\text{N}_3$	87 <sup>e</sup>	9 : 1
6 <sup>b</sup>	4-MeOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH <sub>2</sub> , $\text{Me}_3\text{Al}$	rt	47	<b>2e</b>	ArNH	21	10 : 1

a) Solvent:  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . b) Solvent: THF c) Dichloride **2a-Cl** was also formed in 7% yield.

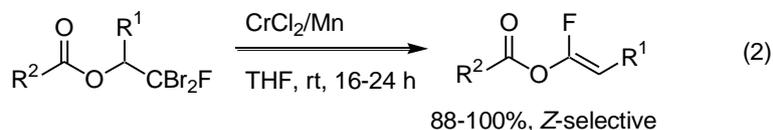
d) **1a** was recovered in 40%. e) After the reaction under indicated conditions, reaction mixture was treated with 10% HCl in THF for 15 min to cleave *O*-silylated product **2d-Si**.



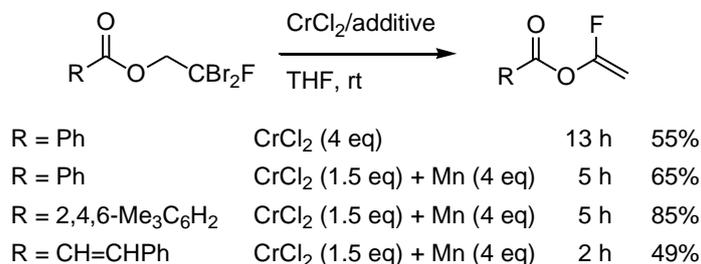
上記の反応例はメディシナルケミストリー領域での応用性が期待される官能基化されたフッ素置換オレフィン類の有用な合成法を提供するものと期待でき、今後さらに詳細な検討を加えていく。

(2) 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

前年度までの検討により、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を Cr(II) で処理すると、特異なエステル転位反応が進行し、1-フルオロアルケニルエステル誘導体が高収率かつ Z 選択的に得られることを見出している (式 1)。

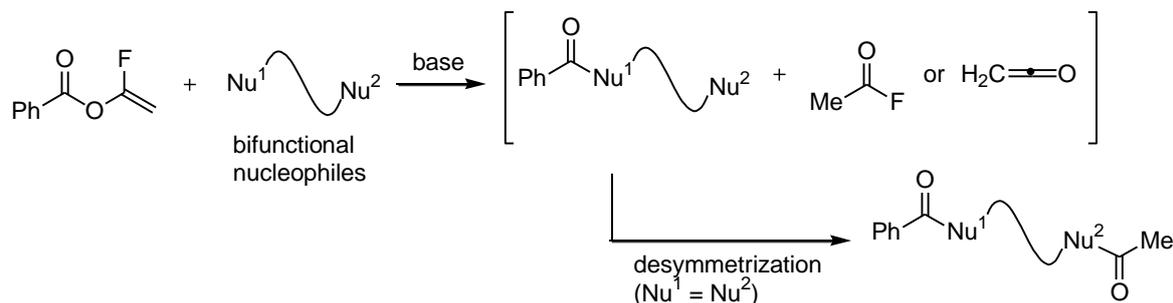


本年度は、更なる反応条件の最適化と基質適用範囲の拡大を試みた (Scheme 1)。すなわち、CrCl<sub>2</sub> 単独および CrCl<sub>2</sub>/Mn 系を用いた反応について反応時間を精査したところ Mn の添加により反応時間が大幅に短縮されることを見出した。また、立体的にかさ高いエステルや α,β-不飽和エステルも収率良く転位生成物を与えることを明らかにした。

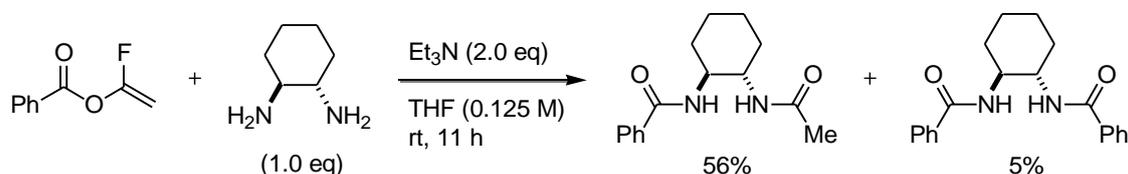


Scheme 1.

生成物の 1-フルオロアルケニルエステル類は、求核アシル置換反応により酸フッ化物ないしケテンを生成すると考えられ、二官能性求核種に対する二重アシル化反応が進行するものと考えられる (Scheme 2)。そこで、環構造により自由度が規制された 1,2-ジアミンとの反応を検討したところ、中程度の収率ながら良好な選択性で非対称ジアミド生成物が得られることを見出した (Scheme 3)。

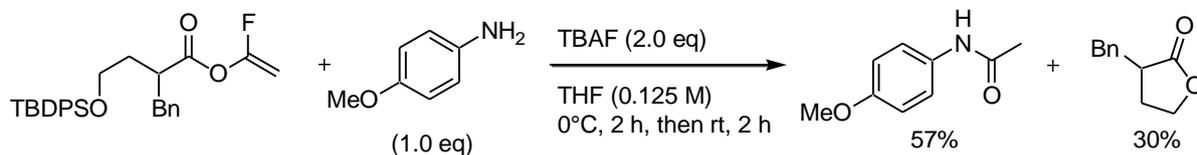


Scheme 2.



Scheme 3.

また、分子内にシリルエーテル部位を備えた 1-フルオロアルケニルエステルを用い、分子内求核アシル置換により選択的にアセチル供与体を発生させる意図で、フッ化物イオン存在下、*p*-アニシジンとの反応を検討した (Scheme 4)。この場合、詳細な機構は検討中であるが選択的にアセトアニリドが生成することを見出している。



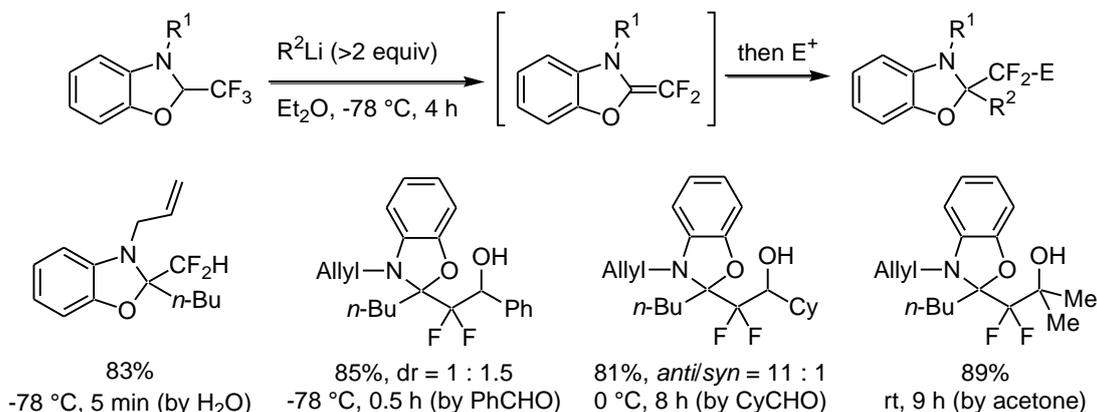
Scheme 4.

以上の知見は 1-フルオロアルケニルエステル類が加水分解酵素に対する特異的な非可逆的阻害剤を開発する上での有用な分子設計となりうることを示すものである。

### (3) 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、最近、安価で入手容易なトリフルオロアセトアルデヒドへ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可能性を検討している。その一環として、*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トランスファー反応が進行することを見出した (Scheme 5)。本反応では、中間体の求電子剤処理によって種々の官能基を導入することが可能であり、求電子剤としてプロトン、アルデヒド、ケトン、イミニウム、*N*-ハロスクシンイミドを用いた反応を見出している。この合成手法は、化学的に安定とされる C-F 結合を形式的に化学修飾するものであり、学術的な興味を持たれる。加えて、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おり、新たな阻害剤の開発につながる知見と考えている。

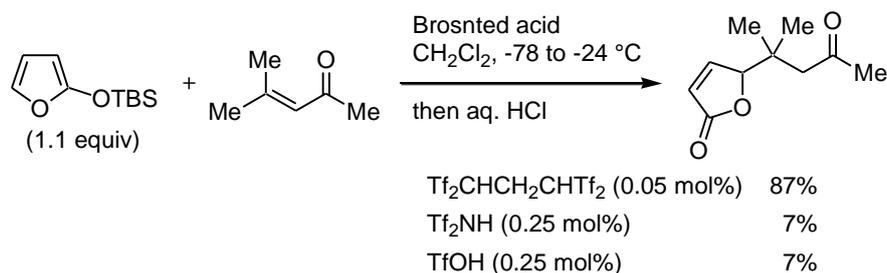


Scheme 5.

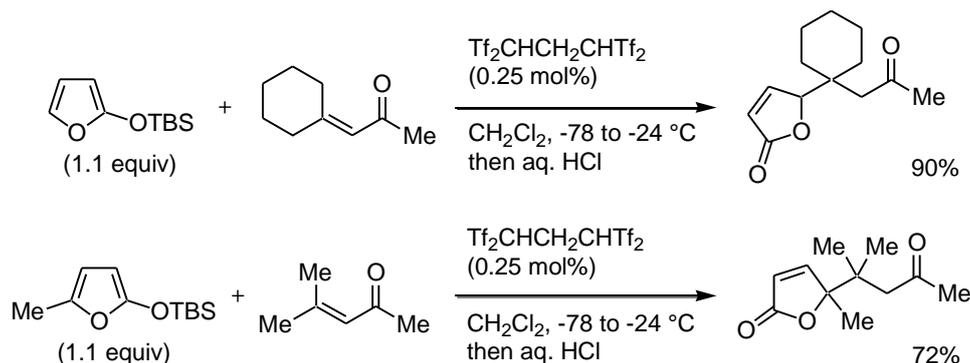
#### (4) 新規な Brønsted 酸触媒の開発を基盤とする効率的合成反応の開発

我々は、前年度までの検討からビス(トリフルオロメタンスルホニル)メチル(Tf<sub>2</sub>CH-)基を有する化合物が優れた Lewis 酸リガンドとして機能することを見出している。本年度は、同構造を有する Brønsted 酸の開発を目指し検討を行った。

種々検討の結果、テトラキス(トリフルオロメタンスルホニル)プロパン Tf<sub>2</sub>CHCH<sub>2</sub>CHTf<sub>2</sub> が 2-シリルオキシフランを用いた α,β-不飽和ケトンへのビニロガス Mukaiyama-Michael 反応の触媒として機能することを見出した (Scheme 6)。本触媒は既存の Brønsted 酸触媒である TfOH, Tf<sub>2</sub>NH に比べ、高い触媒活性を有しており、0.05 mol% 程度の触媒使用量でも円滑に反応が進行することを明らかにしている。また、反応点が立体的に込み合った基質間での C-C 結合形成にも成功している (Scheme 7)。



Scheme 6.



Scheme 7.

### 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) 1-フルオロアルニルエステル誘導体の合成に関する検討では、CrCl<sub>2</sub>/Mn 系を用いるエステル転位反応の基質適用を拡大することに成功した。また、そのアシル化剤としての

反応性に関する検討では、特に二官能性求各種であるジアミンとの反応を精査し、適切なジアミンの選択により、非対称アミドが選択的に得られることを見出した。さらに、分子内求核アシル置換反応を組み込んだ反応系では、選択的に 1-フルオロアルケニル部分をアシル供与体として利用でき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 *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を見出した。さらに中間体の各種求電子剤処理によって種々の官能基が簡便に導入できることを見出した。 $\alpha,\alpha$ -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を検討する。

(4) 新規な酸触媒の開発では、新たな展開として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 Brønsted 酸触媒を開発した。すなわち、対称な 1,3-プロパン二酸を有する 1,1,3,3-テトラキス（トリフルオロメタンスルホニル）プロパンが 2-シロキシフランを求核種とするビニログス Mukaiyama-Michael 反応の優れた有機酸触媒であることを明らかにした。本反応は、反応点近傍が立体的に込み合った基質間での C-C 結合形成を可能とし、触媒使用量も 1 mol% 以下と極めて効率的である。今後は、本触媒の立体選択的な反応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.; Taguchi, T.

Tetrakis(trifluoromethanesulfonyl)propane: Highly effective Brønsted Acid Catalyst for Vinylogous Mukaiyama-Michael Reaction of  $\alpha,\beta$ -Enones with Silyloxyfurans.

*Chem. Commun.*, 2385-2387 (2008).

(2) Yanai, H.; Taguchi, T.

Novel defluorinative alkylation of trifluoroacetaldehyde *N,O*-acetal derivatives and its application to multi-component reaction

*Chem. Commun.*, 1034-1036 (2009).

##### 学会発表

(国際学会)

(1) Taguchi, T.; Yanai, H.; Saito, A.

Development of Lewis acid and Brønsted acid catalysts for Diels-Alder reaction of  $\alpha,\beta$ -unsaturated lactone derivatives.

236th American Chemical Society National Meeting, August, 2008, Philadelphia, PA, USA.

(2) Sato, A.; Okada, M.; Okatani, R.; Yanai, H.; Taguchi, T.

Synthesis of fluoroalkene-containing dipeptide isosteres through Cr(II)-mediated

fluoroalkenylation reaction.

236th American Chemical Society National Meeting, August, 2008, Philadelphia, PA, USA.

- (3) Taguchi, T.; Yanai, H.; Takahashi, A.

Development of efficient Lewis acid catalysts for the Diels-Alder reaction of  $\alpha,\beta$ -unsaturated esters and lactones.

International Meeting on Fluorinated-Peptide Chemistry -In Conjunction with the Ishikawa-Kobayashi Fluorine Symposium-, November, 2008, Tokyo, Japan.

- (4) Wada, F.; Yanai, H.; Taguchi, T.

Synthesis of 1-fluoroalkenyl esters and its utility as double acylating reagents.

International Meeting on Fluorinated-Peptide Chemistry -In Conjunction with the Ishikawa-Kobayashi Fluorine Symposium-, November, 2008, Tokyo, Japan.

(国内学会)

- (1) 矢内 光, 三村英之, 河田恒佐, 田口武夫

トリハロアセトアルデヒド *N,O*-アセタールの脱ハロゲン化を機軸とする炭素-炭素結合形成反応の開発

第 34 回 反応と合成の進歩シンポジウム, 2008 年 11 月, 京都

- (2) 高橋 新, 矢内 光, 田口武夫

テトラキストリフルオロメタンスルホニルプロパンを炭素酸触媒とするシリルオキシフラン誘導体の Mukaiyama-Michael 反応

第 94 回 有機合成シンポジウム, 2008 年 11 月, 東京

- (3) 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: C-F 結合切断に基づくジフルオロメチルアニオン前駆体としての利用

第 32 回 フッ素化学討論会, 2008 年 11 月, 名古屋

- (4) 高橋 新, 矢内 光, 田口武夫

炭素酸触媒を用いるビニロガス Mukaiyama-Michael 反応の開発

第 32 回 フッ素化学討論会, 2008 年 11 月, 名古屋

- (5) 矢内 光, 吉野泰裕, 高橋 新, 田口武夫

テトラキス(トリフルオロメタンスルホニル)プロパンを Brønsted 酸触媒とするビニロガス Mukaiyama-aldol 反応の開発

第 32 回 フッ素化学討論会, 2008 年 11 月, 名古屋

- (6) 佐藤謙介, 矢内 光, 福田寛人, 中村裕子, 岡田みどり, 田口武夫

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アルケンの合成

第 32 回 フッ素化学討論会, 2008 年 11 月, 名古屋

- (7) 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クロム種によるフルオロオレフィン合成法を用いた, アミノペプチダーゼ阻害剤ベスタチンのフッ素化類縁体の合成研究

第 32 回 フッ素化学討論会, 2008 年 11 月, 名古屋

- (8) 張敏, ソータン, 三島正章, 園田高明, 深谷治彦, 小野泰蔵, 高橋 新, 矢内 光, 田口武夫  
Rf 基で置換された炭素酸および窒素酸の気相酸性度  
第 32 回 フッ素化学討論会, 2008 年 11 月, 名古屋
- (9) 矢内 光, 市川辰徳, 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*-アセタールの位置特異的脱フッ素アルキル化反応を利用するジフルオロメチレン化合物の収束的合成  
日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都
- (10) 矢内 光, 長嶋宏幸, 田口武夫  
トリクロロアセトアルデヒド *N,O*-アセタールを用いた交差 Reformatsky 型反応  
日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都
- (11) 樋口由佳, 小坂 剛, 矢内 光, 田口武夫  
有機還元剤 TDAE を用いたジブロモフルオロメチル化合物のラジカル環化反応  
日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都
- (12) 佐藤謙介, 矢内 光, 福田寛人, 中村裕子, 岡田みどり, 田口武夫  
フッ素-アルミニウム親和性に基づく脱フッ素アリル置換反応  
日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都
- (13) 岡谷理恵子, 岡田みどり, 佐藤 梓, 中村裕子, 矢内 光, 田口武夫  
アミノアルデヒド類のフルオロアルケニル化反応  
日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都
- (14) 高橋 新, 矢内 光, 加藤麻衣子, 田口武夫  
テトラキス (トリフルオロメタンスルホニル) プロパンを炭素酸触媒として用いた 2-シリルオキシフランの  $\alpha,\beta$ -不飽和アルデヒドに対する共役付加反応  
日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都
- (15) 吉野泰裕, 矢内 光, 高橋 新, 田口武夫  
テトラキス (トリフルオロメタンスルホニル) プロパンを用いた高効率的なケトン類のビニロガス Mukaiyama-aldol 反応  
日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都

# 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。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-244 に着目し、そのベンゾフェノ構造の誘導を計画し、殊にベンゾフェノ環上への主に極性官能基の導入を行なった。一方、イミダゾール窒素へのリン酸の導入も計画し、水溶性プロドラッグの可能性も検討した。また、NPI-2358 の母核であるジケトピペラジン類の新規合成法研究を進め、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検討した。

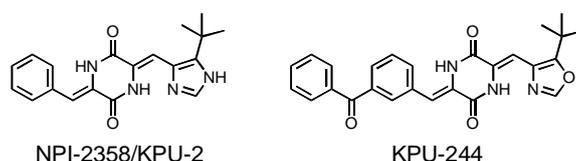


図 1 固形がん細胞に強い殺細胞活性を有する医薬候補化合物

## 2. 研究成果の概要

### 1) ジケトピペラジン類の新規合成法の研究

2つのアミノ酸が縮合・環化したジケトピペラジン(DKP)類においては、一方の側鎖のみがデヒドロ構造を有する天然由来生理活性物質が知られている。例えば、NPI-2358 の元となった天然由来 monodehydroDKP “phenylahistin” もその一例である。このような monodehydropiperazine-2,5-dione(monodehydroDKP)類の新規合成法開発にあたって、我々は  $\alpha$ -ketoester と Boc-NH<sub>2</sub> を触媒量の *p*-TsOH 存在下に還流することで Boc-dehydroamino acid ester を合成する Gladiali らの報告に注目した (図 2A)。<sup>1</sup>そしてこの方法を分子内反応に応用すれば、環化時のラセミ化を抑制できる合成法が確立できるのではないかと考えた。すなわち、酸触媒存在下に *N*- $\alpha$ -ketoacyl amino acid amides から、monodehydroDKPs への変換反応を検討した (図 2B)。

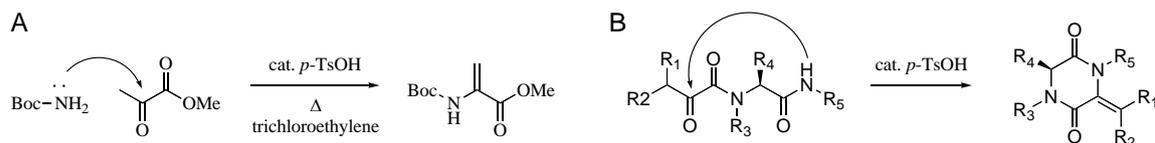


図2 酸触媒による $\alpha$ -ケト酸からのデヒドロアミノ酸構造の構築

① 酸触媒による *N*- $\alpha$ -ketoacyl amino acid amides からの monodehydroDKPs への変換

*N*-pyruvoyl-Phe-NH-allylを基質に用い、トルエン中で種々の酸存在下に還流したところ、少なくとも *p*-TsOH 程度の

酸性度 (pKa = -6.57) を有する酸を触媒として用いることで、monodehydro-DKPs へ変換できることを見いだ

した(表 1, Entry 1- 4)。また、

酸を反応溶媒として用いる場合には、TFA 程度の酸性度

(pKa = -0.25) で反応が進行

することも明らかとなった

(表 1, Entry 5- 9)。これらの

反応条件において、Phe 残基

の  $\alpha$  位はほとんどエピメリ

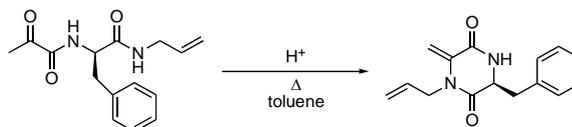
化を受けず、光学純度の高い

monodehydroDKPs が得られ

ることも解った。

次に、酸触媒として最も収率の良かった *p*-TsOH を用

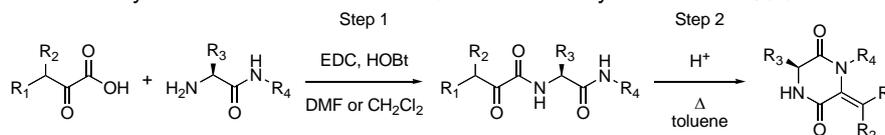
表 1 MonodehydroDKP 形成における酸触媒の影響



Entry	acid	amount	pKa	time (h)	Yield (%)	ee <sup>a</sup> (%)
1	TFA	3 mol%	-0.25	24	N.D.(0.3) <sup>c</sup>	N.D.
2	MSA	3 mol%	-2.6	24	N.D (1) <sup>c</sup>	N.D.
3	PTS	3 mol%	-6.57	20	92	> 99 <sup>d</sup>
4	TFMSA	3 mol%	-14	24	41 (85) <sup>c</sup>	> 99 <sup>d</sup>
5	TFA	0.5% <sup>b</sup>	-0.25	24	N.D.(1) <sup>c</sup>	N.D.
6	TFA	1% <sup>b</sup>	-0.25	24	26 (47) <sup>c</sup>	> 99 <sup>d</sup>
7	TFA	5% <sup>b</sup>	-0.25	24	42 (76) <sup>c</sup>	> 99 <sup>d</sup>
8	TFA	10% <sup>b</sup>	-0.25	24	62 (85) <sup>c</sup>	> 99 <sup>d</sup>
9	AcOH	10% <sup>b</sup>	4.76	24	N.D.(7) <sup>c</sup>	N.D.

<sup>a</sup> Enantiomeric excess values were determined by chiral HPLC using CHIRALCEL OD column eluted with *n*-hexane : EtOH (5:1). <sup>b</sup> v/v % in toluene, <sup>d</sup> The values in the parenthesis indicate HPLC yield. <sup>e</sup> No another enantiomer was detected. N.D.: not determined.

表 2 種々の *N*- $\alpha$ -Ketoacyl amino acid amides からの monodehydroDKPs の合成



entry	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	yield (%) Step 1	<i>p</i> -TsOH	time (h)	yield (%) Step 2	E/Z <sup>a</sup>	ee (%) <sup>b</sup>
1	H	H	Bzl	H	65	5	18	96	-	>99
2	Me	H	Bzl	H	94	5	17	86	1/25	>99
3	Me	Me	Bzl	H	74	5	18	94	-	>99
4	Ph	H	Bzl	H	66	5	6	35	1/>99 <sup>c</sup>	73
5	H	H	Bzl	Bn	30	3	24	53	-	>99
6	H	H	Bzl	<i>i</i> -Pr	73	5	72	20	-	>99
7	H	H	Bzl	<i>i</i> -Bu	57	3	72	43	-	>99
8	H	H	Bzl	allyl	40	3	20	92	-	>99
9	H	H	<i>i</i> -Bu	allyl	71	5	10	96	-	>99
10	H	H	CH <sub>2</sub> -O-Bzl	allyl	86	5	40	64	-	>99

<sup>a</sup>E/Z ratio was determined by NMR. <sup>b</sup>Enantiomeric excess values were determined by chiral HPLC using CHIRALCEL OD column. <sup>c</sup> The E-form was not detected.

い、複数の *N*- $\alpha$ -ketoacyl amino acid amides に対して同様の反応をトルエン中で実施し、monohydroDKPs への変換を検討した。基質の *N*- $\alpha$ -ketoacyl amino acid amides は、 $\alpha$ -ケト酸とアミノ酸アミドを EDC-HOBt 法にて縮合し、調製した。その結果、 $\alpha$ -ケト酸部が pyruvoyl 基や  $\beta$ -aliphatic- $\alpha$ -ケト酸の場合は、異性化を伴わず、良好な収率で monohydroDKPs を与えることが解った (表 2, entry 1-3)。しかしながら、 $\beta$ 位に芳香環を有する phenylpyruvic acid を用いた場合は、大幅な収率の低下(原料回収)が観察された(表 2, entry 4)。これは、反応点となる  $\alpha$ -ケト部が芳香環との共役により、酸存在下に反応性の低いエノール型へ異性化するためと思われる。次にアミド窒素に対して置換基の効果を検討したところ(表 2, entry 5-8), isopropyl 基や tert-Butyl 基で大きく収率が低下した。したがって反応性には、置換基の立体障害が大きく影響すると思われる。一方、アミノ酸側鎖の置換では、反応は良好に進行し、ラセミ化・収率等への大きな影響は見られなかった。

## ② MonohydroDKPs から天然物の合成へ

合成した MonohydroDKPs *exo* メチレン部位の修飾を足がかりに、天然由来 monohydroDKPs 合成が可能になると考え、修飾法として Mizoroki-Heck 反応を検討した。最初に Iodobenzene を用い基質である c( $\Delta$ Ala-Phe)との反応を検討したところ、マイルドな収率ではあるが反応の進行を確認することができた。今後、収率の向上を検討すると共に、monohydroDKP を含む天然物の全合成へと展開する予定である。

## 2) NPI-2358 誘導体の合成と構造活性相関

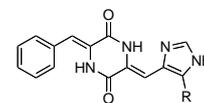
今回、新たに実施したイミダゾール環側の *tert*-butyl 基の誘導では、isopropyl 基までは活性が維持されるものの、分岐の無いアルキル鎖では活性が低下した。このことから NPI-2358 において分岐鎖がチューブリンとの結合に重要な意味を持つことが明らかとなった(表 3)。

チューブリンとコルヒチンが結合するとチューブリンの自家蛍光強度が減弱する事が知られており、この変化を利用して結合定数 ( $K_a$ ) を求めることができる。そこで誘導体の結合定数を測定し、殺細胞活性 ( $IC_{50}$ ) の相関を検討したところ、図 3 に示すように高い相関があることが示唆された。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。

## 3) 誘導体 KPU-244 のベンゾフェノ構造の誘導

高活性な誘導体である KPU-244 のベンゾフェノ構造の誘導体の合成を進め、約 20 種類の新規誘導体の合成に成功した。今後、活性評価に付し、有効性を検討していく予定である。

表 3 Cytotoxicity of NPI-2358 analogs



compound	structure (R-)	$IC_{50}$ (nM) <sup>a</sup>
NPI-2358	<i>tert</i> -butyl-	15
KPU-108	methyl-	339
KPU-109	<i>n</i> -propyl-	153
KPU-111	isopropyl-	16
KPU-110	<i>n</i> -butyl-	112
KPU-112	<i>sec</i> -butyl-	31

<sup>a</sup> HT-29 cells

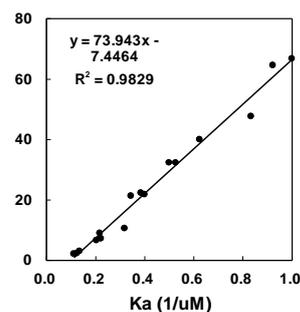


図 3.  $IC_{50}$  と  $K_a$  の相関

### 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。また、今回、新たに実施したイミダゾール環側の *tert-butyl* 基の誘導から、分岐鎖がチューブリンとの結合に重要な意味を持つことが明らかとなった。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では、約 20 種類の新規誘導体の合成に成功し、現在活性評価を行っている。一方、水溶性プロドラッグについては検討を重ねているが、分子がコンパクトなため修飾点が少なく、未だ良好な進捗はない。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。

今後、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実施したい。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図る。

### 4. 研究成果の発表

#### 原著論文

- (1) Yuri Yamazaki, Yuki Mori, Akiko Oda, Yuka Okuno, Yoshiaki Kiso, Yoshio Hayashi. Acid Catalyzed Monodehydro-2,5-diketopiperazine Formation from *N*- $\alpha$ -Ketoacyl Amino Acid Amides. *Tetrahedron*, **65**, 3688-3694 (2009).

#### 国内学会発表

- (1) Yuki Mori, Yuri Yamazaki, Akiko Oda, Reiko Okamoto, Masaru Nagahara, Yoshiaki Kiso, Yoshio Hayashi: A synthetic method for monodehydrocyclic dipeptides toward natural product synthesis. 45th Japanese Peptide Symposium, 2008.10, Tokyo.
- (2) Yoshio Hayashi, Yuri Yamazaki, Shigenobu Nishiguchi, Thomas Regnier, Yuki Mori, Akihiro Taguchi, Yoshiaki Kiso. Small peptide-based medicinal chemistry for intractable disease. 45th Japanese Peptide Symposium, 45th Japanese Peptide Symposium, 2008.10, Tokyo.
- (3) 山崎有理, 森雄樹, 岡本玲子, 永原優, 林良雄, 小田暁子, 木曾良明. 酸触媒を用いるモノデヒドロ-2,5-ジケトピペラジン類の合成研究. 第 34 回反応と合成の進歩シンポジウム, 2008.11, 京都.
- (4) 森雄樹, 山崎有理, 吉田智子, 安井裕之, 木曾良明, Gordafaried Deyanat-Yazdi, Saskia Neuteboom, Barbara Potts, G. Kenneth Lloyd, 林良雄. ジケトピペラジン型 Vascular disrupting agent NPI-2358 誘導体の合成と構造活性相関. 第 27 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2008.11, 大阪.

#### 【要約】

微小管を標的にした抗腫瘍薬化合物 NPI-2358 (Phase II) 及びその誘導体 KPU-244 を開発したが、より強力な誘導体創製をめざし、詳細な SAR に基づく合成・活性評価を実施している。本年度は、NPI-2358 の母核であるジケトピペラジンの新規合成法の

研究を進め、酸触媒存在下に *N*- $\alpha$ -ketoacyl amino acid amides の環化によるモノデヒドロジケトピペラジンの合成法を開発した。一方、NPI-2358 の SAR から、イミダゾール環側鎖の分岐アルキル構造の重要性を示唆することができた。KPU-244 が有するベンゾフェノ構造の最適化については、約 20 種類の新規誘導体を合成し、現在活性評価に付している。

# 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

海洋生物は、陸上生物に比べて種類も多く、含有する物質もユニークな構造で、強力な生物活性を示すものが多く、海洋生物由来の物質は医薬品のリード化合物として期待されているものが多い。そこで、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。さらに、医薬品開発の観点から、医薬品のリードとして期待される天然有機化合物の全合成法の確立による、天然物の量的確保および誘導体の合成を第二の目的として、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、沖縄県石垣島および西表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既知化合物および新規化合物の単離、構造決定を行っている。今年度は、生物系研究室 (内分泌分子薬理学教室) と共同でこれまでに単離した化合物について、それらの生物活性についての検討を行う。

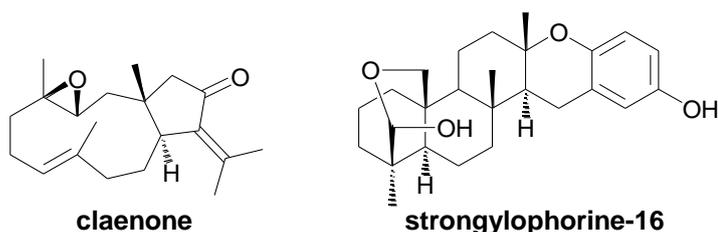
### (2) 生物活性物質の化学合成

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天然有機化合物の全合成法の開発を行う。本年度は、海綿 *Xestospongia vanilla* より単離されたノルジテルペノイド *xestenone* の全合成の検討を中心に研究を行う。これまでに、アリルフェニルスルホンを用いた one-pot シクロペンタン合成法を開発しており、その合成法を鍵反応として用いた *xestenone* の合成を行う。さらに、one-pot シクロペンタン合成法を応用した、他のテルペン類の合成も検討する。また、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。

## 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

昨年度までに沖縄県石垣島近海にて採集した海綿や軟体サンゴなどの海洋無脊椎動物から多くの海洋天然物の単離、構造決定を行っている。本年度は生物系研究室 (内分泌分子薬理学教室) と共同でこれまでに得ている化合物について、ヒト卵巣癌細胞株 OVCAR3 細胞および同じ生殖臓器の正常細胞である子宮内膜間質細胞における増殖活性について検討を行った。検討した化合物のうち、軟体サンゴ由来のジテルペノイド *claenone* および海綿由来のメロジテルペノイド *strongyloporine-16* は、OVCAR3 細胞に対して 30%以上の増殖抑制作用を示した。しかし、これら化合物は内膜間質細胞の増殖にほとんど影響を及ぼさず、正常細胞に対しては影響が少ないと推定された。



## (2) 生物活性物質の化学合成

### 海産ノルジテルペノイド Xestenone の合成研究

Xestenone は Andersen らによって海綿 *Xestospongia Vanilla* から単離、構造決定された海産ノルジテルペノイドである (Figure 1)。本化合物の C-3 位と C-7 位の相対配置が *cis* 配置であることが  $^1\text{H-NMR}$  における NOE 実験により決定されているが、C-12 位水酸基の相対配置及び、本化合物の絶対配置は決定されていない。そこで著者らは xestenone の立体化学を含む構造を明らかにし、さらにそれらの生物活性を検討するため、合成研究を行った。

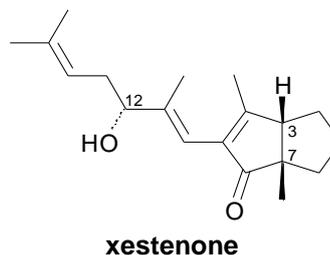
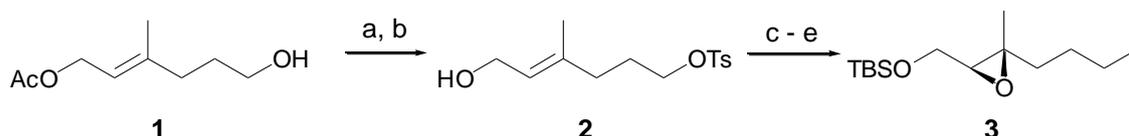


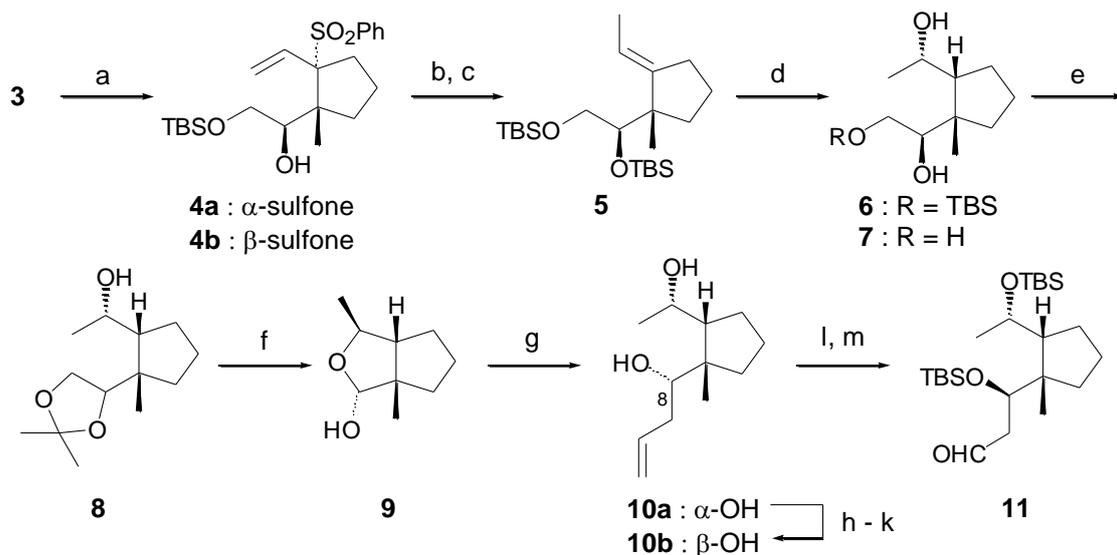
Figure 1. Proposed Structure of Xestenone

既知のアルコール **1** に対し一級水酸基のトシル化、脱アセチル化を行い、アリルアルコール **2** を得た (Scheme 1)。次に Sharpless 不斉エポキシ化反応、ヨウ素化、一級水酸基のシリル化を行い、one-pot シクロペンタン合成の基質となる光学活性なエポキシヨウダイド **3** を合成した。



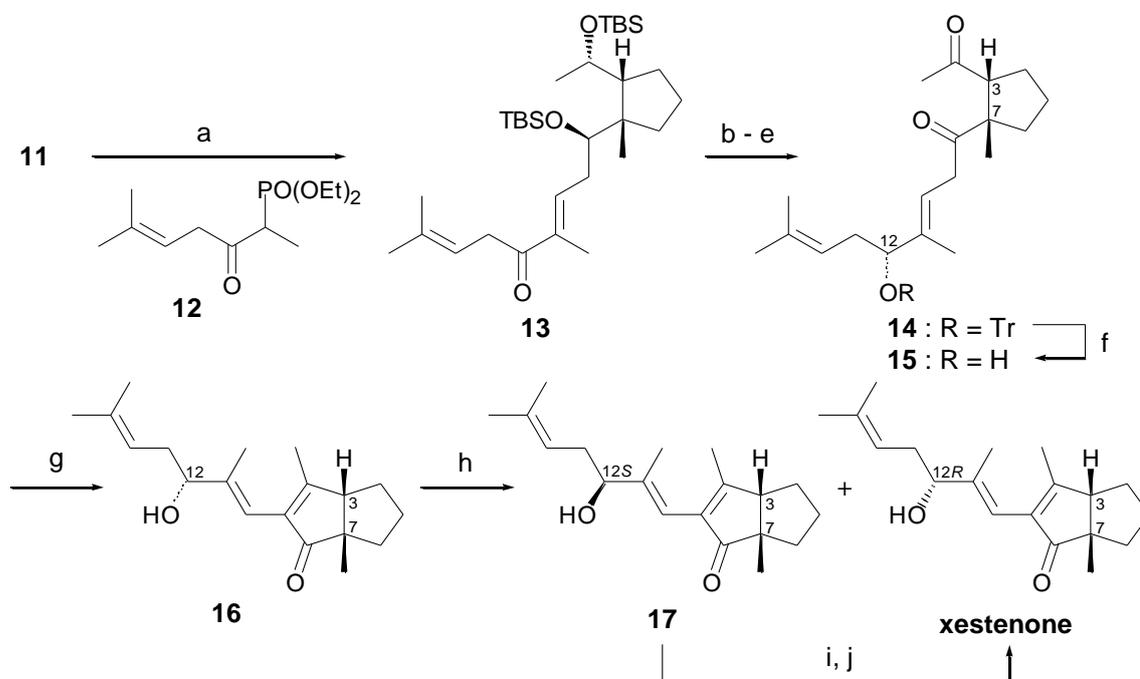
**Scheme 1.** Reagents and conditions: Reagents and conditions: (a) TsCl, Py,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , r.t., 90%; (b)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH, r.t., 94%; (c) TBHP, L-(+)-DIPT,  $\text{Ti}(\text{O}^i\text{Pr})_4$ , 4ÅMS,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-20^\circ\text{C}$ , 94% ee; (d) NaI,  $\text{NaHCO}_3$ , acetone, r.t., 90% (2 steps); (e) TBSCl,  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMAP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 95%.

エポキシヨウダイド **3** に対し allyl phenyl sulfone と  $^t\text{BuLi}$  により調製したアニオンを反応させカップリングの進行を確認した後、さらに系中で  $^t\text{BuLi}$ 、 $\text{Me}_3\text{Al}$  を作用させたところ望む 5-*exo* 環化が進行し、シクロペンタン **4a** および **4b** が定量的な収率で得られた (Scheme 2)。シクロペンタン **4a** および **4b** は分離することなく、生じた水酸基を TBS 基で保護した後、ナトリウムアマルガムを作用させたところオレフィンの異性化を伴う脱スルホニル化が進行しオレフィン **5** が単一生成物として得られた。オレフィン **5** に対しヒドロホウ素化-酸化を行い立体選択的に酸素官能基を導入したところ、ジオール **6** とさらに TBS 基が脱保護されたトリオール **7** が生成した。これらの混合物は精製が困難であったためこれらを分離することなくアセトン中 *p*-TsOH を作用させたところ、ジオール **6** の TBS 基の脱保護とアセトニド化が進行し、アセトニド **8** が単一生成物として得られた。次に、アセトニド **8** に対し過ヨウ素酸を作用させたところ、アセトニドの脱保護、1,2-ジオールの酸化開裂、ヘミアセタール化が一挙に進行しヘミアセタール **9** が得られた。ヘミアセタール **9** に対し Grignard 反応を行いアリル基の導入を行いジオール **10a** および **10b** を得た (**10a** : **10b** = 1 : 2)。なお、望みの C-8 位の水酸基が  $\beta$  配置のジオール **10b** はジオール **10a** から 4 工程を経ることでさらに優先して得ることができた (**10a** : **10b** = 1 : 5)。ジオール **10b** に対しビスシリル化、オゾン酸化を行うことで xestenone 合成における上部フラグメントとなるアルデヒド **11** を合成した。



**Scheme 2. Reagents and conditions:** (a) allyl phenyl sulfone,  $n$ BuLi, THF,  $-20$  °C then  $n$ BuLi,  $\text{Me}_3\text{Al}$ , r.t., quant. (**4a** : **4b** = 10 : 1); (b) TBSOTf, 2,6-lutidine,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0$  °C, quant.; (c) Na(Hg),  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , MeOH, r.t., quant.; (d) catecholborane, THF,  $35$  °C then NaOH aq.,  $\text{H}_2\text{O}_2$  aq.; (e)  $p$ -TsOH, acetone, r.t., 95% (2 steps); (f)  $\text{HIO}_4$ , THF/ $\text{H}_2\text{O}$  (2 : 1),  $45$  °C, 86%; (g) allylmagnesium bromide,  $\text{Et}_2\text{O}$ ,  $-78$  °C, 99% (**10a** : **10b** = 1 : 2); (h) TBDPSCI, imidazole, DMF, r.t.; (i) IBX,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , reflux; (j)  $\text{NaBH}_4$ , MeOH, reflux; (k) TBAF, THF,  $40$  °C, 83% (**10a** : **10b** = 1 : 5, 4 steps); (l) TBSOTf, 2,6-lutidine,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0$  °C, 99% (from **10b**); (m)  $\text{O}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-78$  °C then Zn, AcOH, KI, MeOH, r.t., quant.

アルデヒド **11** に対しホスホナート **12** を用いた Horner-Wadsworth-Emmons 反応を行い、 $\alpha,\beta$ -不飽和ケトン **13** を得た。 $\alpha,\beta$ -不飽和ケトン **13** に対し Luche 還元を行い、アリルアルコ



**Scheme 3. Reagents and conditions:** (a) **12**,  $n$ BuLi, THF, r.t., 49% (60% BRSM); (b)  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , MeOH, r.t., 99%; (c) TrCl, DMAP, Py, reflux; (d) TBAF, DMF,  $65$  °C, quant. (2 steps); (e) TFAA, DMSO,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $-78$  °C, 95%; (f)  $\text{Yb}(\text{OTf})_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , r.t., 79%; (g) NaOH aq., MeOH, r.t., 90%; (h) separation by HPLC (CHIRALPAK IA<sup>TM</sup>), hexane : EtOH = 95 : 5; (i)  $p$ - $\text{NO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{CO}_2\text{H}$ , DIAD,  $\text{Ph}_3\text{P}$ , THF, r.t.; (j)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , MeOH, r.t., 95% (2 steps).

ールとした後 ( $\alpha$ -OH :  $\beta$ -OH = 1 : 1)、生じた水酸基を Tr 基で保護し、続く TBS 基の除去、酸化によりジケトン **14** を得た。次に弱酸性条件下 Tr 基の脱保護を行いアルコール **15** を得た。次に、アルコール **15** に対してメタノール中水酸化ナトリウムを作用させることにより、分子内アルドール縮合を行い、エノン **16** を得ることができた。エノン **16** は、xestenone の C-12 位水酸基に関するジアステレオマー混合物であると考えられる。さらに、キラルカラムを用いた HPLC による C-12 位に関するジアステレオマーの分離を行い、xestenone およびその C-12 位に関するジアステレオマーである化合物 **17** を得ることができた。Xestenone のスペクトルデータおよび比旋光度は天然物のそれらと一致し、xestenone の不明であった C-12 位の相対配置および絶対配置を 3*S*, 7*S*, 12*R* と決定することに成功した。

### 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、生物系研究室（内分泌分子薬理学教室）と共同でこれまでに得ている海洋生物由来の化合物について、ヒト卵巣癌細胞株 OVCAR3 細胞および内膜間質細胞を用いて抗腫瘍活性について検討を行ったところ、ジテルペノイド *clae*none およびメロジテルペノイド *strongyloporine-16* は、OVCAR3 細胞に対して 30%以上の増殖抑制を認めるものの、正常細胞に対しては影響が少ないことを明らかにすることができた。今後は、*clae*none および *strongyloporine-16* の *in vivo* における活性を検討していきたい。また、新規あるいは既知化合物の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、海綿 *Xestospongia Vanilla* から単離、構造決定された海産ノルジテルペノイド xestenone の合成研究を中心に研究を行った。Xestenone の C-12 位水酸基の相対配置及び、本化合物の絶対配置は決定されていないため、著者らは xestenone の立体化学を含む構造を明らかにし、さらにそれらの生物活性を検討するため、xestenone の合成研究を行った。

著者らはこれまでの研究において、allyl phenyl sulfone と Lewis 酸を用いた第四級不斉炭素を含むシクロペンタンの one-pot 合成法を開発している。Xestenone の合成において、この one-pot シクロペンタン合成法を鍵反応として用いることにより、効果的に合成が達成されるものと考え本研究を行った。まず、既知のアルコール **1** より one-pot シクロペンタン合成の基質となる光学活性なエポキシヨードライド **3** を合成した。エポキシヨードライド **3** に対し、allyl phenyl sulfone と <sup>t</sup>BuLi により調製したアニオンを反応させカップリングを行い、さらに系中で <sup>t</sup>BuLi、Me<sub>3</sub>Al を作用させたところ望む 5-*exo* 環化が進行し、シクロペンタン **4a** および **4b** が高収率で得られた。シクロペンタン **4a** および **4b** より炭素鎖の延長等により、分子内アルドール縮合により xestenone の C-12 位に関するジアステレオマー混合物を合成することができた。この混合物をキラルカラムを用いた HPLC により分離したところ、3*S*, 7*S*, 12*R* の絶対配置を有する化合物と天然物 xestenone が一致することがわかり、ここに xestenone の全合成を決定することができた。

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、次年度は抗マラリア活性を有するジテルペノイド *kalihinol A* のゴウ瀬尾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) Miyaoka, H., Hara, Y., Shinohara, I., Kurokawa, T., Kawashima, E., Yamada, Y.  
Synthesis of Marine Oxylipin Agardhilactone and its Analogues: a Structure Revision.  
*Heterocycles*, 77 (2), 1185-1208 (2009).

##### 国内学会発表

- (1) 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  
第 50 回天然有機化合物討論会, 2008 年 9 月, 福岡
- (2) 太田浩一朗, 黒川隆夫, 川島悦子, 宮岡宏明  
海産ノルジテルペノイド Xestenone の合成研究  
第 52 回香料・テルペンおよび製油化学に関する討論会, 2008 年 10 月, 板倉
- (3) 宮岡宏明, 本多達也, 川島悦子  
海産ポリケチド Ascospiroketal A および B の合成研究  
第 34 回反応と合成の進歩シンポジウム, 2008 年 11 月, 京都
- (4) 金原 淳, 川島悦子, 宮岡宏明  
触媒を用いた分子内[4+2]環化付加-Retro-Diels-Alder の連続反応  
日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都
- (5) 太田浩一朗, 荻原 望, 川島悦子, 宮岡宏明  
海産ノルジテルペノイド Chabrolol C の合成研究  
日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月, 京都

# 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

プロテアーゼはペプチドあるいは蛋白質を特異的に認識して切断する酵素であり、生体内プロセスを調節する上で重要な働きをしている。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、プロテアーゼに対する特異的酵素阻害薬のリードジェネレーションを目指し研究を展開している。本年度は、これまでの研究成果を踏まえて、ペプチド性プロテアーゼ阻害剤の重要な部分構造となるホスフィニルジペプチドイソスター (PDI) の不斉合成について新たな検討を加えた。また、アルツハイマー病との関連が示唆されるプロテアーゼである $\beta$ -セクレターゼに着目し、低分子量型阻害剤の合成と活性評価について検討した。

## 2. 研究成果の概要

### (1) ホスフィニルジペプチドイソスターの立体制御合成

$\alpha$ -アミノホスフィン酸誘導体 **1** は PDI としてアスパラギン酸およびメタロプロテアーゼ阻害剤の重要な部分構造に利用されている化合物である (Figure 1)。**1** の絶対配置および相対配置は活性発現に影響することが明らかにされているが、**1** の立体制御合成に関する例は極めて少ない。これまで、我々はイミノメチルホスフィナート **2** からリン原子の不斉を利用して、**1** の官能基を保護した **3** の高ジアステレオ選択的ラセミ合成に成功した (Scheme 1)。また、**1** の光学活性体を得るうえで鍵となる **2** の両エナンチオマーの合成にも成功した。すなわち、**4** と (*S*)-フェニルエチルアミンから導いたジアステレオマー **5** および **6** を分離した後、それぞれのジアステレオマーを光学活性イミノメチルホスフィナート (*R<sub>P</sub>*)-**2** および (*S<sub>P</sub>*)-**2** へと変換した (Scheme 2)。しかしながら、本法はジアステレオマー **5** および **6** の分離が比較的困難であり大量合成に適さない等の問題点を残していた。以上の背景を踏まえ、我々はリパーゼによる速度論的光学分割法を利用する **2** の光学活性体の合成法を新たに検討した。

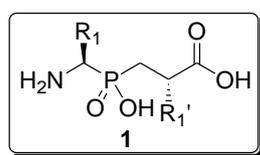
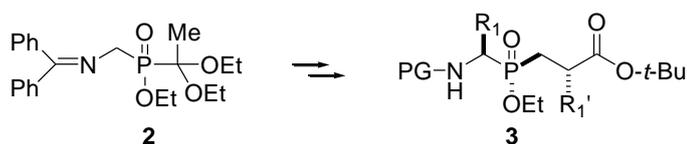
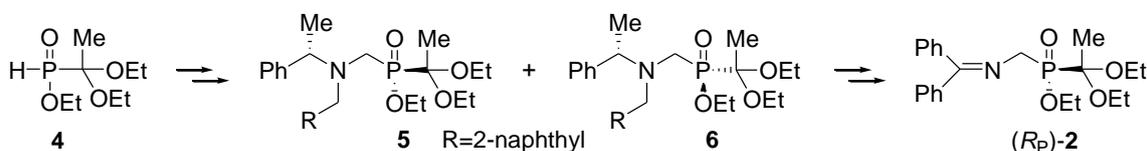


Figure 1



Scheme 1

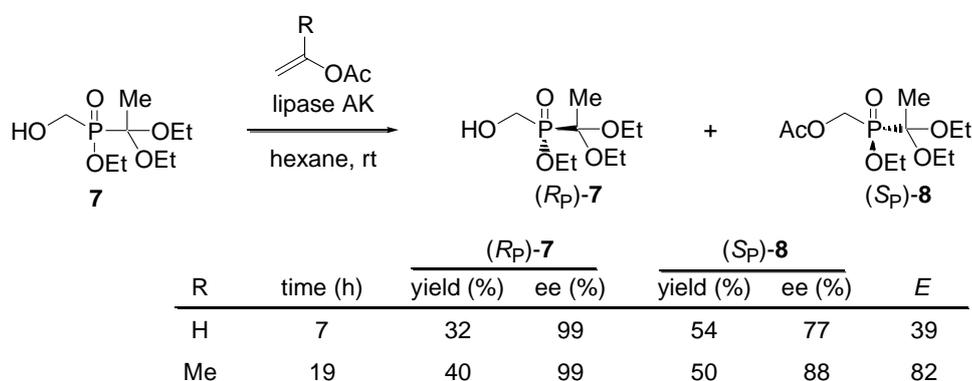


Scheme 2

### (1)-④ ヒドロキシメチルホスフィナートの速度論的光学分割

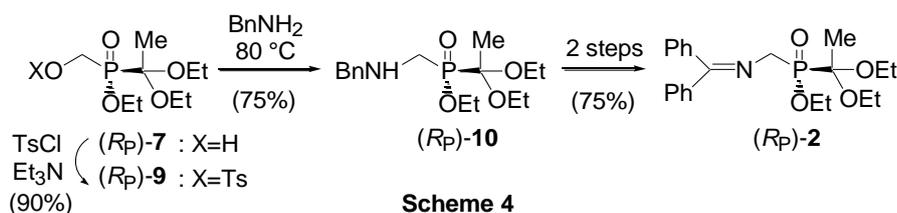
リパーゼを用いる不斉アシル化反応は、炭素上に不斉を有するアルコールの速度論的光学分割に主に利用されてきたが、リパーゼがリン原子上の不斉を認識できれば、**7**の光学分割が可能と考えられる。そこで、種々の条件でアシル化反応を検討した。

リパーゼ *AK* (*Pseudomonas fluorescens*) を用いてビニルアセタートによるアルコール**7**のアシル化を検討したところ、アセタート(*S<sub>P</sub>*)-**8** (54%) および所望の絶対配置を有するアルコール(*R<sub>P</sub>*)-**7** (32%) が得られた (Scheme 3)。両化合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより容易に分離可能であった。*(R<sub>P</sub>)-7* は高い光学純度 (99% ee) で得られ、両エナンチオマー間の反応性の違いを示す鏡像体選択比 (*E*) は *E*=39 であった。反応条件を種々検討したところ、アシル化剤としてイソプロペニルアセタートを用いると *E* は 82 に向上することが明らかとなった。



Scheme 3

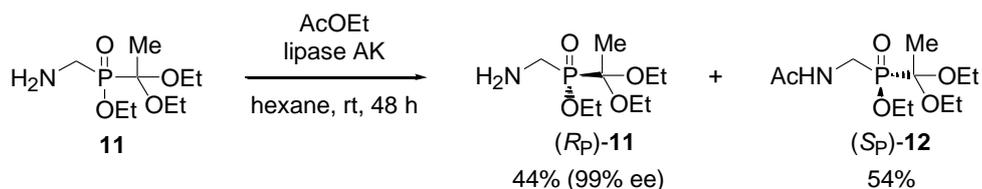
*(R<sub>P</sub>)-7* をトシラート(*R<sub>P</sub>)-9*)に変換し、無溶媒でベンジルアミンと 80 °C で反応させたところ、生成物(*R<sub>P</sub>)-10* が収率良く得られた (Scheme 4)。*(R<sub>P</sub>)-10* から標的とするイミノメチルホスフィナート(*R<sub>P</sub>)-2* を合成した。



Scheme 4

### (1)-② アミノメチルホスフィナートの速度論的光学分割

より効率的な(*R<sub>P</sub>)-2*の合成を目指し、アルコール**7**の代わりにアミン**11**を用いて同様の速度論的光学分割を検討した。リパーゼ *AK* 存在下、**11** に対しアシル化剤として酢酸エチルを作用させたところ、アセトアミド(*S<sub>P</sub>)-12* (54%) および所望の絶対配置を有するアミン(*R<sub>P</sub>)-11* (44%) が高い光学純度 (99% ee) で得られた (Scheme 5)。本反応は 10 g スケールで実施しても問題なく進行し、4.3 g の(*R<sub>P</sub>)-11* (99% ee) を得ることが出来た。



Scheme 5

## (2) $\beta$ -セクレターゼ阻害剤を指向する多置換ピペリジン誘導体の合成と評価

アルツハイマー病 AD は脳内にアミロイド  $\beta$  ペプチド  $A\beta$  からなるアミロイド繊維が沈着してできる老人斑が広範に認められる神経性疾患であり、進行性の痴呆を特徴とする。 $A\beta$  はアミロイド前駆体タンパク APP が  $\beta$ -および  $\gamma$ -セクレターゼにより 2 段階の切断を受け産生される。 $\beta$ -セクレターゼは AD の治療標的の一つとして注目され、これまで多くのペプチド性阻害剤が報告されている。しかしながら、低分子量非ペプチド性阻害剤の報告例は相対的に知られていなかった。

$\beta$ -セクレターゼは 501 個のアミノ酸残基からなるタイプ I の 1 回膜貫通型タンパク質であり、アスパラギン酸プロテアーゼに分類される。活性部位の近傍には  $\beta$ -ヘアピン構造を取ったフラップが存在する。フラップ領域はチロシン残基 (Tyr<sub>71</sub>) が蝶番となりコンフォメーションを変化し open form あるいは closed form を取ることができる (Figure 2)。基質ペプチドおよびペプチド性阻害剤は closed form に作用し複合体を形成することが知られている。しかしながら、open form に作用する  $\beta$ -セクレターゼ阻害剤は殆ど報告されていない。我々はある種の多置換ピペリジン誘導体がアスパラギン酸プロテアーゼの一種であるレニンの open form に作用し阻害活性を示すことに着目し、open form に作用する非ペプチド性  $\beta$ -セクレターゼ阻害剤として Figure 3 に示す誘導体 **13** を設計した。すなわち、**13** の N 原子は活性部位の二つのアスパラギン酸 (Asp<sub>32</sub>, Asp<sub>228</sub>) と水素結合し、ナフチル基部分は疎水性の S1-S3 ポケット、アリール基部分はフラップに位置するチロシン残基 Tyr<sub>71</sub> とそれぞれ相互作用し、阻害活性を示すと期待した。以上の作業仮説に基づき標的ピペリジン誘導体 **13** の合成と活性評価を検討した。

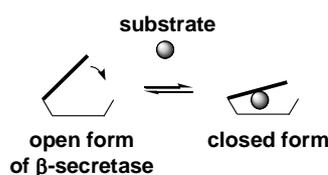


Figure 2

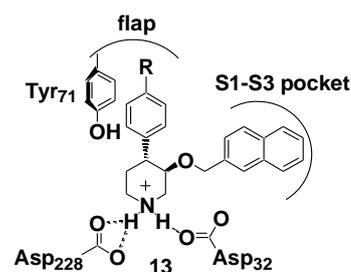
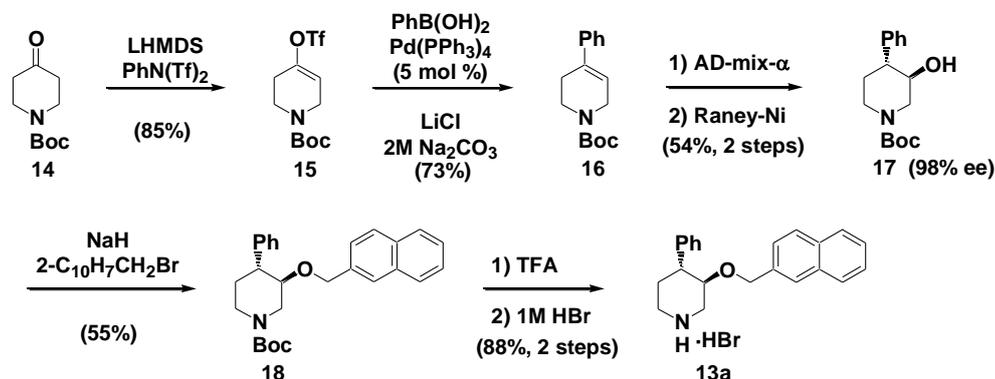


Figure 3

### (2)-① ピペリジン誘導体の合成

4-ピペリドン **14** から導いたエノールトリフレート **15** に対しフェニルホウ酸を用いた Suzuki カップリング反応に付し生成物 **16** を得た (Scheme 6)。AD-mix- $\alpha$  によるオレフィンの不斉ジヒドロキシル化反応、Raney-Ni によるベンジル位の脱ヒドロキシル化を経て光学活性アルコール **17** へ誘導した。キラルカラムを用いた HPLC 分析より **17** の光学純度は 98% ee であることを確認した。**17** からナフチルメチル基の導入および Boc 基の脱保護を経て臭化水素酸塩として **13a** を合成した。また、フェニ

ル基以外のアリール基を有するピペリジン誘導体 **13b-e** も同様の方法により合成した。



Scheme 6

### (2)-② ピペリジン誘導体のβ-セクレターゼ阻害活性評価

**13a-e** のβ-セクレターゼ阻害活性はリガンド濃度 (DMSO 溶液) を 10 μM に設定し阻害率で評価した (Table 1)。**13a,b** の阻害活性は極めて低いものであったが、R にフェニル基を有する **13c** は 37%まで阻害率が向上した。また、4-ベンジルオキシフェニル基を有する **13d** は阻害率 42%を示した。**13d** のエナンチオマー *ent*-**13d** においては活性の低下が認められ、絶対配置が活性発現に影響していることが明らかとなった。3-*n*-プロピルオキシフェニル基を有する誘導体 **13e** は最も強い阻害活性 (63%) を示し、芳香環上のアルコキシ基の位置および疎水性なども活性発現に影響することが明らかとなった。

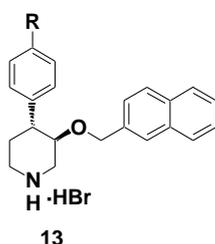


Table 1

compound	R	inhibition (%) at 10 μM
<b>13a</b>	H	15
<b>13b</b>	OMe	13
<b>13c</b>	Ph	37
<b>13d</b>	4-BnO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	42
<i>ent</i> - <b>13d</b>	4-BnO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	12
<b>13e</b>	3- <i>n</i> -PrO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	63

### 3. 研究評価および今後の研究計画

平成 20 年度の HRC 研究ではリパーゼを用いた速度論的光学分割法を経由する光学活性イミノメチルホスフィナート (*R<sub>P</sub>*)-**2** の新規合成法を見出した。リン原子上に不斉を有するホスフィン酸誘導体の速度論的光学分割は前例に乏しく本手法の特徴を示すものである。また、本手法は(*R<sub>P</sub>*)-**2** の大量合成が可能である点など従来法の問題を解決するものであり、PDI<sub>s</sub> 合成をより簡便にするものと考えられる。今後、PDI<sub>s</sub> の誘導体合成を種々検討し、PDI<sub>s</sub> 含有ペプチドを基盤とするプロテアーゼ阻害剤の探索研究へ展開する予定である。

一方、我々は多置換ピペリジン誘導体がβ-セクレターゼ阻害活性を示すことも明らかとした。フラップのコンフォメーション変化に着目したβ-セクレターゼ阻害剤の分子設計は報告例が極めて少なく、本研究の特徴を示すものである。今後、多置換ピペ

リジン誘導体の構造最適化を検討し活性の向上を図ると共に、ドッキングスタディあるいは X 線結晶構造解析により阻害剤の結合様式についても明らかにしていく予定である。

#### 4. 研究成果の公表

##### 学術論文公表

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

##### 国内学会発表

- (1) Haruki, T.; Ichikawa, H.; Mori, J.; Yamagishi, T.; Hikishima, S.;  
Yokomatsu, T.  
Stereocontrolled Synthesis of  $\alpha, \beta'$ -Disubstituted  
Aminomethyl(2-carboxyethyl)phosphinates as Phosphinyl Dipeptide  
Isosteres  
第 45 回 ペプチド討論会、2008 年 10 月、東京
- (2) 森 淳一郎, 春木 晶充, 山岸 丈洋, 横松 力  
ホスフィニルジペプチドイソスターを指向する光学活性アミノメチルホスフ  
ィナートの合成  
第 34 会反応と合成の進歩シンポジウム、2008 年 11 月、京都
- (3) 谷口 智恵美, 吉田 篤史, 山岸 丈洋, 疋島 貞雄, 横松 力  
 $\beta$ -セクレターゼ阻害剤を指向する多置換ピペリジン誘導体の合成と評価  
第 27 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2008 年 11 月、大阪
- (4) 田代 直子, 森 淳一郎, 山岸 丈洋, 横松 力  
ジペプチドイソスターを指向した  $\alpha$ -アミノ-*H*-ホスフィナートのカップリング  
反応  
日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月、京都
- (5) 吉田 篤史, 谷口 智恵美, 山岸 丈洋, 横松 力  
 $\beta$ -セクレターゼ阻害剤を指向する多置換ピペリジン誘導体の合成と評価  
日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月、京都

# 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、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、一部の 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標的分子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発症機序には不明な点が多く、その解明は統合失調症治療薬としての D-セリンの可能性評価に繋がるものと考えられる。

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および 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ず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。本年度は、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-および 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明らかにするとともに、腎機能形態にどのような変化が認められるかを観察した。

## 2. 研究成果の概要

### (1) GC-MS を用いた D-および L-セリンの分別定量法を確立

上記の目的に従い、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。これまで DL-ロイシンや DL-メチオニンのキラル分別定量では、これらのアミノ酸をジアステレオマーに誘導化し、アキラルな GC カラムで分離する方法を採用してきた。そこで、我々がこれまで用いてきた誘導化法により DL-セリンの誘

導化を試みた。すなわち、DL-セリンのカルボキシル基を塩酸酸性下メタノールでメチルエステル化した後、(+)- $\alpha$ -methoxy- $\alpha$ -trifluoromethylphenylacetyl chloride (MTPA-Cl)でアシル化を試みた。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アミンを添加することで 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。また、トリエチルアミンを用いることでセリンをラセミ化させることなく誘導化できることを見いだした。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。DL-[2,3,3- $^2$ H $_3$ ]セリンを内標準物質として用い、D-及び L-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-及び L-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。

## (2) D-セリン大量投与時の D-セリンの血中動態及び腎機能変化の検討

D-セリン大量投与によって腎機能および形態がどのように変化するかを観察した。統合失調症患者に対して投与されている D-セリン量(0.28 mmol/kg 体重, 30mg/kg 体重)をよりも 15 倍以上多い量に相当する D-セリン 4.8 mmol/kg 体重(500 mg/kg 体重)をラットに腹腔内投与し、数日にわたって採血及び採尿した。血液生化学、尿検査を行うとともに腎の組織化学染色を行った。その結果、対照として同量の L-セリンや D-アラニンを投与した群では腎の形態に変化が認められなかったのに対して、D-セリン投与後 2 日目において、多くの近位尿細管で上皮が脱落した壊死像が認められた。一度障害を受けた近位尿細管も投与後 7 日で管腔が肥大しているものの上皮の存在が確認できるほど回復していた。投与後 14, 28 日目になると近位尿細管はほとんど修復されていた。グルコースやタンパク質の尿中排泄量は、投与後 1 日目で著明に上昇したが、その後減少し、投与後 7 日では投与前と同じレベルまで改善した。クレアチニンクリアランスは投与後 2 日目で大きく低下したが、その後改善傾向を示した。以上のことから、D-セリンによる腎障害は一過性のもので、日数経過とともに回復することが示唆された。

ラットにおける D-セリンによる腎障害がどのくらいの投与量で惹起されるかを検討した。ラットに D-セリンを 0.6 – 4.8 mmol/kg 体重 (62.5 – 500 mg/kg 体重) の範囲で腹腔内投与し、投与後 24 h まで採血および採尿するとともに、投与後 24 h で腎を摘出した。血液生化学、尿検査および腎の組織像から障害の有無を判定した。また、血漿中 D-および L-セリン濃度を GC-MS で分別定量した。その結果、投与量が 1.8 mmol/kg 体重以上の時、全例(各 n=6)で腎近位尿細管上皮の脱落が観察された。その障害部位は腎髄質と皮質の境界領域であり、障害範囲も投与量が増すにつれて広がる傾向にあった。投与量が 1.2 mmol/kg 体重の時、21 例中 7 例のラットに腎近位尿細管障害が認められたが、0.6 mmol/kg 体重の投与量では全例( n=6)で腎に異常は認められなかった。血液生化学・尿検査所見も腎組織所見を支持する結果が得られた。すなわち、D-セリンを 1.8 mmol/kg 体重以上投与すると、vehicle 投与群に比べて、著しい血漿クレアチニン上昇、タンパク質および糖の尿中排泄量増加が認められた。1.2 mmol/kg 体重投与時では、腎組織障害が観察された群は障害が認められなかった群に比べてわずかに血漿クレアチニン上昇、タンパク質および糖の尿中排泄量増加が認められた。

D-および L-セリンの血漿中濃度時間推移を求めた。いずれの投与量においても、D-セリンは投与後 20min で極大濃度に達した後、二相性の消失を示した。しかし、0.6 mmol/kg 体重の投与時に比べて 1.8 mmol/kg 体重以上の投与量で消失クリアランスが有意に低下し、D-セリンの消失が大きく遅延した。このことから代謝過程が飽和した可能性が示唆された。1.2 mmol/kg 体重投与時では、腎障害が観察された群と認められなかった群で、動態パラメータに差異はなかった。一方、D-セリンの投与量に関わらず L-セリンの血漿中濃度はほぼ一定だった。ラットでは、D-ロイシンや D-メチオニンなど一部の D-アミノ酸は D-アミノ酸酸化酵素により対応する 2-オキソ酸に代謝された後、トランスアミナーゼにより L-アミノ酸に変換される。D-セリンも D-アミノ酸酸化酵素の基質となることから、その一部は L-セリンに変換されるものと予想していたが、今回の結果より D-セリンは L-セリンにほとんど変換されないことが示唆された。

障害の発症しない投与量上限を 1.0 mmol/kg 体重と推定し、この投与量で D-セリンを 1 日 1 回 7 日間投与し、腎の形態変化を観察した。その結果、腎に障害は認められず、この投与量が安全な投与量上限であることが示唆された。

これにより、次の点が確認された。

- ① 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が明らかになった。
- ② D-セリン 1.8 mmol/kg 体重以上投与すると消失の遅延が認められた。
- ③ 腎障害を発症しない D-セリンの投与量上限は 1.0mmol/kg 体重であることが示唆された。

### 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。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 DL-セリンの分別定量法を確立し、ラットにおける D-セリンの体内動態を解析した。その結果、目標の一つとしたラットにおける D-セリンによる腎障害発症閾値を推定することができた。この知見は、ヒトに対する D-セリンの安全な投与設計に有益な情報を与えるものと考えられる。

最近、D-アミノ酸酸化酵素活性欠損ラットに D-セリンを大量投与しても腎障害が惹起されなかったと報告された。このことから、D-セリン大量投与による腎障害は、D-セリンが毒性本体なのではなく、D-アミノ酸酸化酵素による D-セリンの代謝産物が毒性本体と考えられた。D-セリンは D-アミノ酸酸化酵素によって、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。D-セリンよりも D-アミノ酸酸化酵素に対して親和性が高い D-アラニン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、共通代謝産物である過酸化水素やアンモニアが毒性本体ではなく、3-ヒドロキシピルビン酸が毒性本体ではないかと考えている。また、腎障害を認める量の D-セリンを投与すると代謝反

応の飽和が認められていることから、補酵素である FAD の枯渇や虚血も一因をなしている可能性もある。今後は、これらのことを念頭に D-セリンによる腎障害発症の機序について検討する予定である。

#### 4. 研究成果の発表

##### 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  
第 51 回 日本腎臓学会学術総会、2008 年 5 月、福岡
- (2) 長谷川 弘、増田奈美、篠原佳彦、橋本隆男、市田公美  
腎毒性物質 D-セリンのトキシコキネティクス  
第 4 回 D-アミノ酸研究会学術講演会、2008 年 9 月、名古屋
- (3) 長谷川 弘、増田奈美、篠原佳彦、橋本隆男、市田公美  
ラットにおける D-セリン大量投与による腎障害  
日本薬学会 第 129 年会、2009 年 3 月、京都

# 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

高血圧症、脳卒中、心臓病、糖尿病は、食・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である。これらは退行性疾患であり、完治が難しく日本の医療費を圧迫している。これまで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である。

近年、婦人科系疾患である子宮内膜症、子宮筋腫、卵巣癌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疑われており、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。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。このように、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性疾患として捉えることができる。しかし、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。さらに、他の内分泌代謝性退行性疾患である多嚢胞性卵巣症候群、ホルモン産生腫瘍、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。

- 1) 胎盤は、胎児由来の栄養膜細胞と子宮内膜細胞から構成される高次機能組織であり、胎児-母体間のガス交換や栄養供給、妊娠維持に重要なホルモンを産生する。昨年度の検討から、栄養膜を構成する合胞体栄養膜細胞:シンシチオトロホプラストからの絨毛性ゴナドトロピン(hCG)やプロゲステロン(P4)の産生・分泌において、**Exchange protein directly activated by cAMP (Epac)**が仲介する経路が関与することが考えられた。そこで、この胎盤形成における **Epac** の生理的意義について、ヒト絨毛癌細胞株 (BeWo 細胞)の分化系を用いて詳細に解析した。
- 2) 微小管(MT) 作用薬は、抗悪性腫瘍薬として広く使用されている。MT 動態の制御因子であるスタスミン発現を変化させると **MT** 作用薬の抗腫瘍活性が、修飾されるか否かについて、スタスミン発現をノックダウンすることにより検討した。また、共同研究者(生物分子有機化学教室)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、その抗腫瘍活性を検討した。
- 3) 子宮内膜症の病態とその抑制薬を解析するため、ヒト子宮内膜細胞を移植した再現性の高い内膜症モデルについてヌードマウスを使って作成することを試みた。

## 2. 研究成果の概要

- 1) ヒト栄養膜細胞における **Exchange protein directly activated by cAMP (Epac)** の役割

### ① ヒト胎盤組織における Epac の局在

胎盤において、Epac1 はサイトトロホプラストと シンシチオトロホプラスト、浸潤性の絨毛外栄養膜細胞(EVT) と血管内皮・平滑筋細胞に局在していた。特に EVT では細胞膜に集積しており栄養膜細胞の浸潤にも関与している可能性が示唆された。

Epac2 も同様な細胞にみられたが、細胞質全体に局在していた。

### ② 栄養膜細胞の機能的分化に対する Epac アゴニストの影響

機能的分化マーカーとなる hCG、P4 分泌能の獲得に対する Epac の関与を検討した。cAMP 安定体 (Db)、PKA アゴニスト (6Phe) を処置すると hCG と P4 産生が高進した。これらの産生は、Epac アゴニスト (8CPT) 処置でも増加した。また、共処置群では、hCG mRNA 発現とその分泌は 6Phe 単独処置に比べ、やや低下したが、P4 分泌およびその合成酵素 P450<sub>scc</sub> 発現は、単独処置時よりも上昇した。よって、hCG と P4 の産生・分泌経路は必ずしも同一ではないことが示唆された。

### ③ 栄養膜細胞のシンシチウム化に対する Epac アゴニストの作用

8CPT または Db の処置によりシンシチウム化細胞は有意に増加したが、6Phe 処置では変化しなかった。また、この 8CPT または Db によるシンシチウム化は PKA 阻害薬(H89)の存在下でも確認された。さらに、Epac1 とその標的因子である Rap1 の発現をノックダウンすると 8CPT 及び Db によるシンシチウム化が抑制された。また、Epac2 をノックダウンしても、Db や 8CPT によるシンシチウム化に影響はなかった。

## 2) ヒト卵巣癌細胞におけるスタスミン発現と増殖抑制効果

### ① スタスミン過剰発現と HIF-1 $\alpha$ 発現

子宮内膜と血管内皮細胞において、スタスミンの発現抑制は、低酸素下で誘導される HIF-1 $\alpha$ 蛋白質と VEGF 発現を低下させること、また、同時に Akt のリン酸化も抑制する(昨年度報告)。そこで、ヒト卵巣癌細胞株(OVCAR3)での低酸素下における HIF-1 $\alpha$  と VEGF 発現に対するスタスミン強制発現の効果を調べた。作製した発現ベクターの導入により効率良くスタスミン発現を誘導できた。スタスミン強制発現により、低酸素培養下での HIF-1 $\alpha$ 蛋白質レベルは上昇した。これに伴い、低酸素誘導性の VEGF mRNA 発現も上昇した。一方、逆に 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た。

### ② 卵巣癌細胞の増殖に及ぼすスタスミン発現抑制の効果と微小管作用薬の併用効果

OVCAR3 細胞の増殖は、スタスミン発現の抑制により、わずかに低下したが、有意差はなかった。一方、MT 作用薬であるパクリタキセルまたはビンブラスチンは、それぞれ単独で、3pM から 1 $\mu$ M の間で用量依存的にその増殖を抑制し、最大抑制効果はそれぞれ 65% 並びに 50% であった。スタスミン発現を抑制した条件下にて、各 MT 作用薬を作用させるとその増殖抑制効果は高まる傾向にあったが、MT 作用薬単独時と比べて有意差はなかった。

### ③ 海綿と軟体サンゴ由来化合物の抗腫瘍活性

OVCAR3 の増殖は、ジテルペノイド(claenone, strongylophorine-16)誘導体を中心に 4 種類の各化合物の処置により 0.5pM~5nM で用量依存的に抑制された。しかし、in vitro にて同様な増殖能を示す子宮内膜間質細胞株の増殖にはほとんど影響しなかった。

また、これら化合物は、正常血管内皮細胞(HUVEC)の管腔形成に影響を及ぼさなかった。しかし、1 $\mu$ M以上の用量では管腔形成の阻害が認められた。これら化合物が、微小管動態に影響しているか否かを検討したところ、比較薬として用いたパクリタキセルでは重合促進がみられたが、いずれの化合物も重合型と遊離型のチューブリンの比率に影響することはなく、微小管動態を変化させないことが分かった。

### 3) ヒト子宮内膜細胞を用いた内膜症モデル

子宮内膜症の発症メカニズムと病態の解明を目的とした検討の一環として、子宮内膜症モデル動物の作成を試みた。即ち、C57BL/6系またはヌードマウスに腺上皮細胞株(EM1)と間質細胞株(EtsT 499)を投与し、様々な条件(種差、投与方法、E2:17 $\beta$ -エストラジオール投与の有無)が異所性の細胞生着とその状態にどのように影響するかを検討した。アミン反応性細胞トレーサー(CFDA-SE)で細胞を蛍光標識し、マトリゲルで懸濁した両細胞を卵巣摘出マウスに投与した。E2を隔日投与し、2週間後、剖検を行った。病変観察時において蛍光標識CFDAによる蛍光が、血管に富んだ病変と考えられる腫留部分に見られた。系統差及び投与部位の違いにおける病変形成率への影響を確認したところ、C57BL/6系では病変は形成されなかったが、ヌードマウスでは46%の頻度で病変が確認された。投与部位による病変形成率の差はなかった。病変形成率とサイズに対するE2投与による影響も認めなかった。さらに、ヒト細胞がマウス体内に生着しているかを確認するため、摘出病変組織を用いてRT-PCR解析を行ったところ、ヒト腺細胞株由来ヒトパピローウイルスE7遺伝子の発現が検出された。しかし、血管新生因子であるVEGFと血管内皮マーカーCD31の発現にE2投与による差は見られなかった。

### 3. 研究評価と今後の研究計画

栄養膜細胞のシンシチウム化は胎盤形成において必須な変化である。今回の検討において、PKAアゴニストは栄養膜細胞のシンシチウム化を誘導しなかったのに対し、Epacアゴニスト(8CPT)単独処置で明らかにシンシチウム化が促進された。この促進作用は、PKA阻害薬存在下でも見られた。さらに、8CPTおよびDbによるシンシチウム化は、Epac1かRap1のノックダウンにより抑制された。心筋細胞では8CPT処置によりCx43(ギャップジャンクション形成に関わる細胞接触部位の膜貫通型蛋白質)の細胞接点での集積が高進し、さらにEpacが介在する経路の下流にあるRap1がカドヘリンを介し、細胞間ジャンクションを調節するという報告もある。よって、Epac-Rap1経路が栄養膜細胞のシンシチウム化に重要な役割を果たしていると考えられる。今後はEpacとPKAの具体的な役割を解析していく。本研究では、Epacを介するシグナル伝達経路がヒト栄養膜細胞の機能的分化とシンシチウム化に関与することを明らかにした点、生殖生理学上重要な知見を得た。なお、本成果は、幸いなことに2008年日本胎盤学会にて学会優秀賞(相馬賞)を受賞している。

卵巣癌細胞においてスタスミンを過剰発現すると低酸素誘導因子(HIF)と血管内皮細胞増殖因子(VEGF)発現が高進することを明らかにし、スタスミン発現がVEGF発現に関与することを示唆した。一方、PI3K阻害薬によりAkt活性化を抑制すると、低酸素下におけるHIF-1 $\alpha$ 蛋白質レベルは減少したが、スタスミン発現を抑制すると、Aktリ

ン酸化が抑制されたことから、スタスミンは、低酸素下で PI3K/Akt シグナルを介して HIF-1 $\alpha$ と VEGF レベルを調節し、癌の生存に寄与するものと考えられる。ヒト癌細胞を用いた検討で、MT 作用薬は HIF-1 $\alpha$ の産生を阻害する。しかし、MT 作用薬の低酸素時の HIF-1 $\alpha$ 発現の抑制機序は、現在のところ不明である。乳癌細胞において、MT 作用薬の効果は、スタスミン発現を抑制すると増強される。そこで、卵巣癌細胞においても同様の効果が見られるか否かを検討したが、本実験では、有意な結果は認められなかった。研究分担者宮岡らにより単離同定された海綿・軟体サンゴ由来化合物(ジテルペノイド)において卵巣癌細胞の増殖抑制作用が認められた。今後はこの抗腫瘍活性について担癌マウスを用いた *in vivo* での検討を行い、機序を明らかにしていく。

子宮内膜症の成因として逆流した月経血中の子宮内膜細胞塊が腹腔に移植されるという説が有力であるが、その詳しい発症メカニズムは、未だに不明である。本研究では、子宮内膜腺細胞と間質細胞の投与により、これら細胞を含む内膜症様病変を形成させることができた。この病変は胸腺を欠くヌードマウスでは形成されやすいので免疫能の低下が病態に関与することが示唆された。しかし、E2 投与による病変の拡大は、観察されず、今後この理由を解析する。また、病変は血管に富んでおり血管新生が高進していた。これまでに、子宮内膜症モデル動物として、げっ歯類の子宮片の移植やヒト子宮内膜病変組織のヌードマウスへの直接的移植などの方法が報告されている。今回、ヒト子宮内膜細胞株のヌードマウスへの投与により子宮内膜症様病変の形成に成功し、よりヒト病態に近い方法を提案できた。

#### 4. 研究成果の発表

##### 原著論文

(1) Yoshie M, Kashima H, Bessho T, Takeichi M, Isaka K, Tamura K.

Expression of stathmin, a microtubule regulatory protein, is associated with the migration and differentiation of cultured early trophoblasts. Hum Reprod. 23(12): 2766–2774 (2008).

(2) Yoshie M, Miyajima E, Kyo S, Tamura K. Stathmin, a microtubule regulatory protein, is associated with hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  levels in human endometrial and endothelial cells. Endocrinology. 150(5):2413–2418 (2009)

##### 国内学会発表

(1) 金山 けい, 吉江 幹浩, 加島英明, 田村 和広

ヒト栄養膜細胞のホルモン産生における Exchange protein directly activated by cAMP (Epac)の役割

第 61 回西東京内分泌代謝研究会 2008 年 6 月、東京

(2) 吉江 幹浩, 金山 けい, 杓掛 真彦, 武市 信, 樋熊 千夏, 西洋孝, 井坂 恵一, 田村 和広

ヒト絨毛癌細胞のシンシチウム化における Exchange protein directly activated by cAMP (Epac)の役割

第 16 回日本胎盤学会学術集会 2008 年 11 月、浜松

- (3) 宮島 恵理, 吉江 幹浩, 沓掛 真彦, 田村 和広

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞におけるスタスミンによる HIF-1 $\alpha$ の調節

第 62 回西東京内分泌代謝研究会 (東京)

- (4) 金山 けい, 吉江 幹浩, 井坂 恵一, 沓掛 真彦, 田村 和広

ヒト胎盤形成における Exchange protein directly activated by cyclic AMP (Epac)を介した cAMP シグナリング

第 82 回日本薬理学会年会、2009 年 3 月、横浜

- (5) 吉江 幹浩, 草間 和哉, 沓掛 真彦, 田村 和広

ヒト子宮内膜間質細胞の脱落膜化における cAMP 仲介因子 Exchange protein directly activated by cAMP (Epac)の役割

日本薬学会 第 129 年会 2009 年 3 月、京都