

平成22年 5月 7日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2010
 課題番号：19510211
 研究課題名（和文） ゲルセジン型ゲルセミウム塩基を基盤とした新規抗腫瘍薬リード化合物の創製研究
 研究課題名（英文） Search for gelsedine-type *Gelsemium* alkaloids to develop new antitumor lead compounds
 研究代表者
 北島 満里子（KITAJIMA MARIKO）
 千葉大学・大学院薬学研究院・准教授
 研究者番号：60195261

研究成果の概要（和文）：植物塩基由来の新規抗腫瘍薬開発のためのリード化合物の創製のため、ゲルセミウム属植物含有アルカロイドの探索、生物活性評価を行った。その結果、ゲルセミウム属植物より特異な構造を有する新規アルカロイド類を見出すとともに、Humantenine 型アルカロイドから Gelsedine 型アルカロイドへの効率的な供給法を確立した。ヒト腫瘍細胞に対する細胞毒性評価を行った結果、Yohimbane 型アルカロイドに顕著な活性が認められた。

研究成果の概要（英文）：To discover and develop lead compound for new antitumor agent originated from plant alkaloids, chemical investigation and biological evaluation of *Gelsemium* alkaloids were carried out. As a result, several new alkaloids having novel structures were isolated from *Gelsemium* plants. Chemical transformation of a humantenine-type alkaloid to gelsedine-type alkaloids was accomplished. Yohimbane-type alkaloids showed the cytotoxic effects on some human tumor cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：天然物化学、アルカロイド、構造解析、化学変換、細胞毒性

1. 研究開始当初の背景

植物由来の抗腫瘍薬としてタキソール系、カンプトテシン系薬剤が開発され、ユニークな作用機序および腫瘍細胞選択性に基づく特異な臨床応用などから注目されている。しかしながらこれらを含む既存の抗腫瘍薬は重篤な副作用や多剤耐性ががん細胞の出現な

どに起因する様々な問題を抱えているうえ、がん患者の増加により、新しい薬剤の開発が強く望まれている。我々はマチン科ゲルセミウム属植物より腫瘍細胞に対する強力な細胞毒性活性を有するアルカロイド類を見出した。そこで、本化合物群を素材とした新規抗腫瘍薬開発のための先導化合物の創製を

目指した研究を進めることとした。

2. 研究の目的

腫瘍細胞に対する強力な細胞毒性活性を有することが明らかとなったゲルセミウム属植物含有ゲルセジン型アルカロイドを素材とした新規抗腫瘍薬リード化合物の創製のため、新規活性化合物の探索、誘導体合成、活性化合物の効率的合成法の確立、活性評価を行う。

3. 研究の方法

新規抗腫瘍性天然物の探索のため、ゲルセミウム属植物（タイ産 *Gelsemium elegans*、熱川バナナワニ園にて採取した *Gelsemium elegans*、千葉大学薬用植物園にて採取した *Gelsemium rankinii*）の詳細な成分探索を行った。得られた化合物について構造解析と構造確認のための化学変換を行った。

腫瘍細胞に対する顕著な細胞毒性作用を有する Gelsedine 型アルカロイドについて誘導体合成と合成経路の確立の検討を行った。

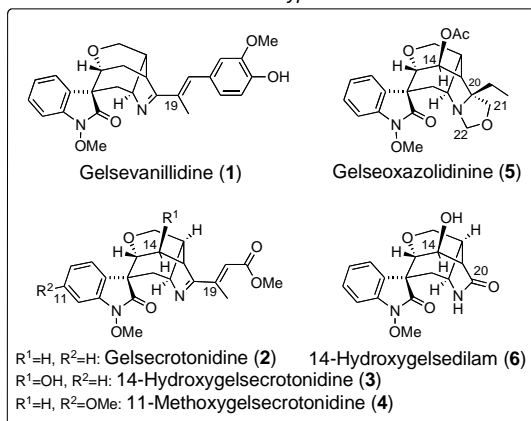
上記研究において得られたアルカロイドについて、ヒト腫瘍細胞（肺癌細胞 A549、大腸癌細胞 HT29、結腸癌細胞 HCT116 など）に対する毒性評価を行った。

4. 研究成果

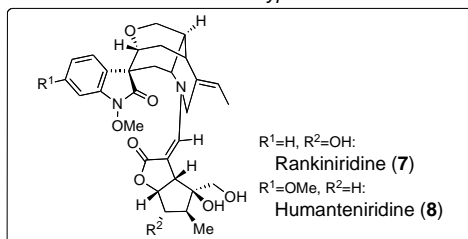
(1) *Gelsemium* 属植物含有新規アルカロイド類の探索と構造解析

Gelsemium elegans、*Gelsemium rankinii* より新規 Gelsedine 型アルカロイド 6 種 (1-6)、Humantenine 型アルカロイド 2 種 (7, 8) を単離した。

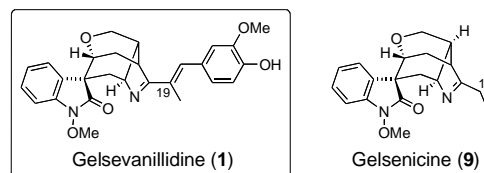
New Gelsedine-type Alkaloids



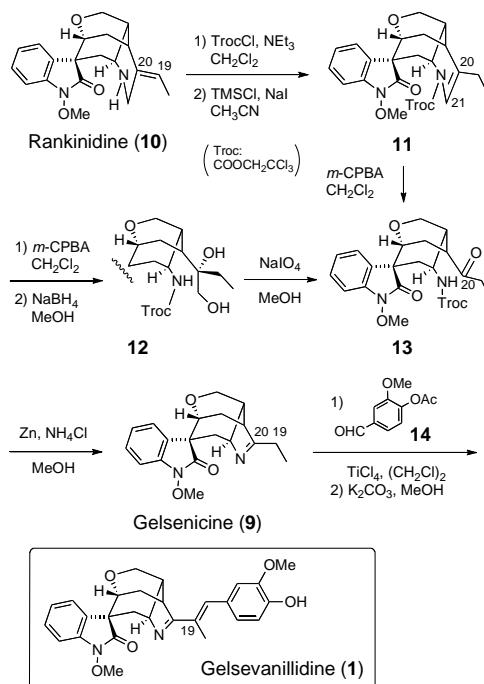
New Humantenine-type Alkaloids



Gelsevanillidine (1) と命名した新規 Gelsedine 型アルカロイドは、既知アルカロイドである Gelsenicine (9) の 19 位にバニリン残基を有する化合物であり、各種スペクトルの解析と既知 Humantenine 型アルカロイド Rankinidine (10) から Gelsenicine (9) を経た化学変換によりその構造を決定した (論文 1)。

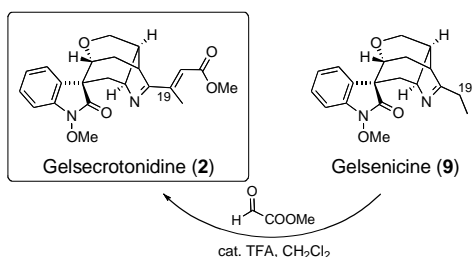


Rankinidine (10) の N_6 を 2,2,2-trichloroethoxycarbonyl (Troc) 基で保護した後、TMSCl, NaI を用いて C19, 20 位の二重結合を C20, 21 位に異性化させて Enamine-carbamate 11 とした。続いて *m*-CPBA 酸化、続く $NaBH_4$ 還元により、Diol 12 に導いた。次にジオール部分を $NaIO_4$ を用いて酸化的に開裂し、Keto-carbamate 13 とした。本化合物は、Enamine-carbamate 11 の *m*-CPBA 酸化においても得られた。13 の N_6 -Troc 基を Zn/NH_4Cl in MeOH にて脱保護し二級アミンとすることにより、 N_6 -C20 位間で閉環反応が進行し Gelsenicine (9) に導くことができた。続いて、 $(CH_2Cl)_2$ 中 $TiCl_4$ 存在下 Gelsenicine (9) とバニリン誘導体 14 を縮合した後、脱保護することにより Gelsevanillidine (1) を得た。合成品の各種スペクトルが天然品のもので完全に一致したことから絶対配置を含めて 1 の構造を決定することができた。また、

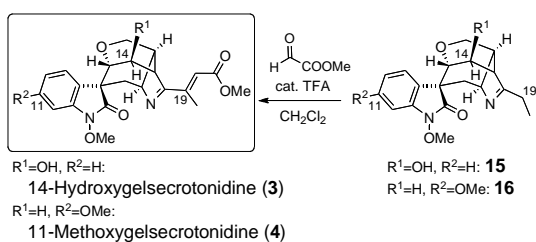


上述の反応により大量入手可能な Humantenine 型アルカロイド Rankinidine (10) から Gelsedine 型アルカロイド Gelsenicine (9) への効率的な供給経路が確立できた。

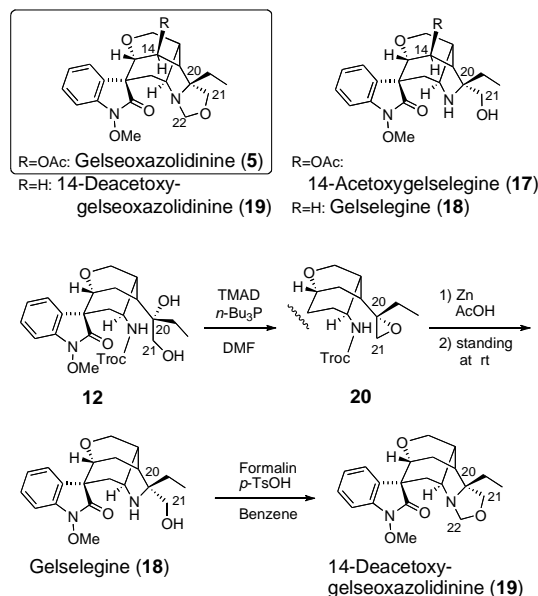
新規 Gelsedine 型アルカロイド Gelsecrotonidine (2) は、Gelsenicine (9) の 19 位に酢酸由来の C2 ユニットの有するアルカロイドであり、Gelsenicine (9) からの化学変換により絶対配置を含めてその構造を決定した (論文 2)。すなわち、CH₂Cl₂ 中触媒量の Trifluoroacetic acid 存在下、Gelsenicine (9) と Methyl glyoxylate を縮合させることで、2 を得ることができた。



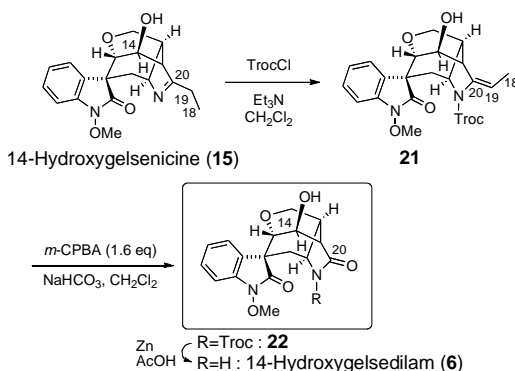
さらに、Gelsecrotonidine (2) の 14 位に水酸基が導入された 14-Hydroxygelsecrotonidine (3) や 11 位メトキシ体の 11-Methoxygelsecrotonidine (4) を得た。これら化合物についてもそれぞれ、既知アルカロイド 14-Hydroxygelsenicine (15)、4,20-Dehydrogelsemicine (16) から導くことにより、絶対配置を含めてその構造を決定した (論文 2)。



新規アルカロイド Gelseoxazolidinine (5) はオキサゾリジン環を有する特異な六環性 Gelsedine 型アルカロイドである (論文 1)。生合成的に 14-Acetoxygelselegine (17) の N₆ と C21 位一級水酸基の間で C1 ユニットが縮合することにより生成すると考えられた。そこで、この考えに沿って、前述の合成中間体 12 から Gelselegine (18) を経て Gelseoxazolidinine (5) の 14-Deacetoxy 体 (19) を合成した。合成した 19 と Gelseoxazolidinine (5) の各種スペクトルを比較することにより 5 の構造を確認した。

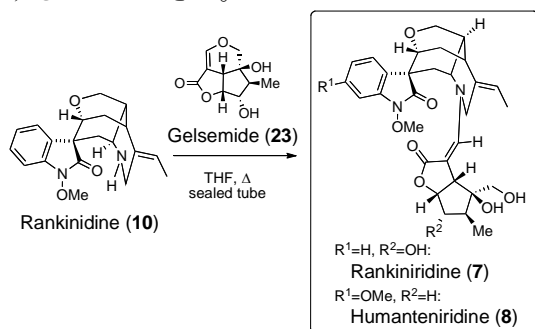


新規 Gelsedine 型アルカロイド 14-Hydroxygelsedilam (6) は、通常の *Gelsemium* アルカロイドの 18, 19 位が欠如したラクタム構造をとった特異な化合物であり、14-Hydroxygelsenicine (15) からの化学変換によりその構造を決定した (論文 2)。15 の N₆ を保護するとともに N₆, C20 位の二重結合を C19, 20 位に異性化させて Enamine-carbamate 21 とした。続いて 1.6 当量の *m*-CPBA で処理することにより、C19, 20 位を酸化的に開裂し、ラクタム体に導いた。最後に N₆ を脱保護することにより 14-Hydroxygelsedilam (6) を得ることができた。

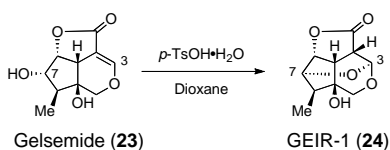
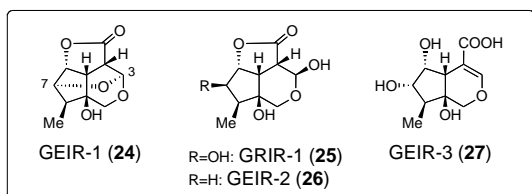


新規アルカロイド Rankiniridine (7)、Humanteniridine (8) は、Humantenine 型アルカロイドの N₆ にイリドイドユニットが結合した新しいタイプのアルカロイドである (論文 4)。Rankiniridine (7) は、既知アルカロイド Rankinidine (10) の二級アミンが、同じ植物に存在する既知イリドイド Gelsemide (23) に Michael 付加し、イリドイドのジヒドロピラン環が開環することにより生成すると考えられた。そこで両化合物の縮合反応を行ったところ Rankiniridine (7) が得られたことから、7 の構造を絶対配置を含めて決定

することができた。



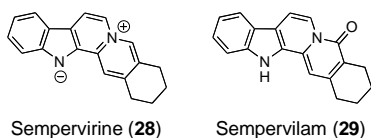
一方、イリドイド成分として新規化合物 4 種 (24-27) を単離した。そのうち、GEIR-1 (24) は X 線結晶構造解析により構造を決定した。本化合物は Gelsemide (23) の 7 位水酸基が α, β -不飽和ラク톤の 3 位炭素に Michael 攻撃することによって生成されると考えられた。そこで、23 を Dioxane 中 *p*-TsOH で処理したところ、GEIR-1 (24) を得ることができた (論文 3)。



(2) *Gelsemium* アルカロイドの生物活性評価

新規アルカロイド Gelsecrotonidine (2)、Rankiniridine (7) を含む各タイプのアルカロイド並びに腫瘍細胞に対する顕著な細胞毒性作用を有する Gelsedine 型アルカロイドの各種誘導体について、ヒト腫瘍細胞 (肺癌細胞 A549、大腸癌細胞 HT29、結腸癌細胞 HCT116 など) に対する細胞毒性評価を行った。その結果、Yohimbane 型アルカロイドの Sempervirine (28)、Sempervilam (29) に活性が認められた。今後、本化合物群についても誘導体合成、構造活性相関研究等を行う予定である。

Yohimbane-type Alkaloids



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 27 件)

- (1) Y. Yamada, M. Kitajima, N. Kogure, S. Wongseripipatana, H. Takayama: Spectroscopic Analyses and Chemical Transformation for Structure Elucidation of Two Novel Indole Alkaloids from *Gelsemium elegans*. *Tetrahedron Lett.*, **50**, 3341-3344 (2009) 査読有.
- (2) Y. Yamada, M. Kitajima, N. Kogure, H. Takayama: Four Novel Gelsedine-type Oxindole Alkaloids from *Gelsemium elegans*. *Tetrahedron*, **64**, 7690-7694 (2008) 査読有.
- (3) N. Kogure, N. Ishii, H. Kobayashi, M. Kitajima, S. Wongseripipatana, H. Takayama: New Iridoids from *Gelsemium* Species. *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 870-872 (2008) 査読有.
- (4) N. Kogure, H. Kobayashi, N. Ishii, M. Kitajima, S. Wongseripipatana, H. Takayama: New Humantenine-type Indole Alkaloids with Iridoid Unit from *Gelsemium* Species. *Tetrahedron Lett.*, **49**, 3638-3642 (2008) 査読有.

[学会発表] (計 61 件)

- (1) 山田洋介, 北島満里子, 小暮紀行, 高山廣光: マチン科 *Gelsemium elegans* 含有新規アルカロイド類の成分探索研究. 日本薬学会第 130 年会, 2010 年 3 月 29 日, 岡山.
- (2) N. Kogure, Y. Yamada, M. Kitajima, S. Wongseripipatana, H. Takayama: Spectroscopic Analyses and Chemical Transformation for Structure Elucidation of Novel Indole Alkaloids from *Gelsemium elegans*. The 4th International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia (ICCEOCA-4), Dec. 1, 2009, Bangkok.
- (3) 山田洋介, 小暮紀行, 北島満里子, 高山廣光: *Gelsemium elegans* 含有新規アルカロイド類の探索と化学変換による構造証明. 第 44 回天然物化学談話会, 2009 年 7 月 10 日, つくば.
- (4) M. Kitajima, Y. Yamada, N. Kogure, S. Wongseripipatana, H. Takayama: Novel Monoterpenoid Indole Alkaloids from *Gelsemium elegans*. The 50th Anniversary Meeting of the American Society of Pharmacognosy, June 29,

- 2009, Honolulu.
- (5) 山田洋介, 北島満里子, 小暮紀行, Samphan Wongseripipatana, 高山廣光: マチン科 *Gelsemium elegans* 含有オキシインドールアルカロイドの成分探索. 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月 28 日, 京都.
 - (6) N. Kogure, Y. Yamada, N. Ishii, C. Nishiya, H. Kobayashi, M. Kitajima, H. Takayama: Studies on Isolation, Synthesis and Biological Function of Anti-tumor *Gelsemium* Alkaloids. NRCT-JSPS Core University Program on Natural Medicine in Pharmaceutical Sciences, The Eighth Joint Seminar, Innovative Research in Natural Products for Sustainable Development. Feb. 3, 2009, Bangkok.
 - (7) 北島満里子, 小林宏美, 小暮紀行, 高山廣光: マチン科 *Gelsemium rankinii* 含有アルカロイドの構造解析. 日本生薬学会第 55 回年会, 2008 年 9 月 20 日, 長崎.
 - (8) N. Kogure, Y. Yamada, N. Ishii, C. Nishiya, H. Kobayashi, M. Kitajima, H. Takayama: Studies on Isolation, Synthesis and Biological Function of Anti-tumor *Gelsemium* Alkaloids. The 22nd Naito Conference on Chemical Biology [I], An Emerging Field Inspired by Natural Product Chemistry., Sep. 11, 2008, Sapporo.
 - (9) 山田洋介, 小暮紀行, 北島満里子, 高山廣光: 新規ゲルセチン型ゲルセミウムアルカロイドの単離と合成研究. 第 43 回天然物化学談話会, 2008 年 7 月 11 日, 大阪.
 - (10) 小暮紀行, 小林宏美, 石井直子, 北島満里子, 高山廣光: イリドイドユニット結合型新規 Humantenine-type ゲルセミウムアルカロイドの構造決定. 第 43 回天然物化学談話会, 2008 年 7 月 11 日, 大阪.
 - (11) 小暮紀行, 石井直子, 北島満里子, 高山廣光: マチン科 *Gelsemium* 属植物より単離した新規イリドイドの構造. 日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月 26 日, 横浜.
 - (12) 岩田紘樹, 中村智徳, 奥澤紘子, 小倉麻由, 草間美嘉, 山田洋介, 北島満里子, 高山廣光, 上野光一: ゲルセミウム属生薬冷葛由来の新規アルカロイドによる腫瘍細胞増殖抑制作用の検討. 日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月 26 日, 横浜.
 - (13) 染谷あゆみ, 小暮紀行, 北島満里子, 高山廣光: マチン科 *Gelsemium* 属植物含有アルカロイド Gelsedilam の全合成研究. 日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月

26 日, 横浜.

- (14) 小林宏美, 小暮紀行, 北島満里子, 高山廣光: マチン科 *Gelsemium rankinii* 含有アルカロイド類の探索研究. 日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月 27 日, 横浜.
- (15) 山田洋介, 北島満里子, 小暮紀行, 高山廣光: マチン科 *Gelsemium elegans* 含有アルカロイドの探索と化学的研究. 日本薬学会第 128 年会, 2008 年 3 月 27 日, 横浜.
- (16) 北島満里子, 山田洋介, 小暮紀行, 高山廣光: マチン科 *Gelsemium elegans* 含有新規オキシインドールアルカロイド類の構造解析. 日本生薬学会第 54 回年会, 2007 年 9 月 15 日, 名古屋.

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/seitai/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北島 満里子 (KITAJIMA MARIKO)
千葉大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号: 60195261

(2) 研究分担者

小暮 紀行 (KOGURE NORIYUKI)
千葉大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号: 80396689

中村 智徳 (NAKAMURA TOMONORI)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 1230188627
(H21: 連携研究者)

(3) 連携研究者