

平成21年 5月15日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19790014
 研究課題名 (和文) 血管新生阻害剤の創製を指向した海洋天然物の合成研究
 研究課題名 (英文) Synthetic studies of marine natural products having anti-angiogenic activities
 研究代表者
 古徳 直之 (KOTOKU NAOYUKI)
 大阪大学・大学院薬学研究科・助教
 研究者番号： 20362618

研究成果の概要：

我々が海洋生物の二次代謝産物より見いだした、血管新生阻害活性を示す二種の生物活性天然物について合成研究を行った。イソキノリン側鎖を有する新規ステロイドアルカロイド cortistatin A については全合成の鍵となる CD 環フラグメントの立体選択的な合成に成功するとともに、構造を単純化した活性リード化合物の設計・合成を行った。また、イソマラバリカン型トリテルペン globostellatic acid X methyl ester の合成研究の一環として、活性発現に重要な共役オレフィン側鎖を含む BC 環モデル化合物の合成に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	570,000	3,770,000

研究分野：有機合成化学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

キーワード：血管新生・海洋天然物・全合成・リード化合物・抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

従来がん化学療法に用いられてきた抗がん剤は、がん細胞だけでなく正常細胞にも非選択的に作用する cytotoxic なものがほとんどであった。これに対し近年、分子生物学の急速な進歩に伴い、がん細胞の異常増殖や悪性化のメカニズムが明らかになってきており、これらの原因となる分子やシグナル伝達経路の機能を制御することによりがんを治療する分子標的治療の概念が広がりつつある。中でも最近、血管新生が固形がんの進行と密接に関わっている事が明らかとなり、腫瘍組織に特異的に作用する分子

標的治療薬としての血管新生阻害剤の開発が精力的に進められている (Carmeliet, P. et al. *Nature*, **407**, 249-257 (2000))。一方、天然薬物資源はこれまでも創薬研究に多大な貢献をしてきており、多様な化学構造と特徴的な生物活性を示す天然物は、ポストゲノム時代といわれる 21 世紀においても、難治性疾患の治療薬のシーズとして、あるいはそれら疾患の発生メカニズムを解明するための生化学ツールとして、重要な役割を担っていくと考えられる。特に近年、ecteinascidin 743 を始めとする海洋生物由来天然物が新たな作用メカニズムを有する抗

がん剤として次々と臨床試験に付されており、有望な医薬探索ソースとして注目を集めている (Jimeno, J. et al. *Marine Drugs*, **2**, 14-29 (2004))。これら海洋天然物の多くは海綿やホヤなどの底生海洋生物からごく微量しか得られないため、医薬品として大量かつ安定的に供給するためには化学合成が不可欠であり、その複雑な骨格を効率的に構築するための革新的な合成法の開発が必要である。一方で、活性発現に不要な部分を簡略化することで、より短工程で合成可能なリード化合物をデザインし、医薬品へ展開していく試みもなされている (Choi, H.-W. et al. *Pure Appl. Chem.* **75**, 1-17 (2003); Wender, P. A. et al. *Curr. Drug Discovery Technol.* **1**, 1-22 (2004), etc.)。

こうした背景のもと、申請者らは以前より、海綿類を中心とする海洋生物の抽出エキストラライブラリーから新規な血管新生阻害物質を探索しており、すでに、インドネシアで採集した海綿から血管内皮細胞の増殖を選択的に阻害する活性物質 bastadin 類を見いだしている。主活性物質の bastadin 6 は、血管内皮細胞の遊走阻害実験や管腔形成阻害実験など *in vitro* での血管新生阻害活性を示すだけでなく、移植腫瘍マウスでの *in vivo* 抗腫瘍効果を示す優れた活性物質であることを明らかにしている (Aoki, S. et al. *Anti-cancer Drugs* **17**, 269-278 (2006))。申請者はこの bastadin 6 をシーズとする新規血管新生阻害物質の創製を目的として研究を行い、bastadin 6 の効率的な全合成 (Kotoku, N. et al. *Tetrahedron* **61**, 7211-7218 (2005)) を達成するとともに、より簡便に合成可能なリード化合物の創製を目指し、各種類縁体を合成して構造活性相関研究を行ってきた。また、詳細な作用メカニズムの解明に向けて、プローブ分子の合成とそれを用いた標的タンパクの同定について現在検討中である。

さらにごく最近、同じアッセイ系を用いたスクリーニングにより、血管内皮細胞に対して数百倍から数千倍という非常に強力な選択的増殖抑制活性を示す新規ステロイドアルカロイド類およびトリテルペン類を活性成分として見だし、その化学構造を明らかにした。いずれの化合物も、bastadin 6 よりかなり低濃度で血管新生阻害活性を示すことから、新規抗がん剤シーズとして非常に有望であるものの、海綿より単離できる量がごくわずかであり、作用機序の解明や *in vivo* での有効性の検討など、さらなる研究を行うためには化学合成による化合物の供給が不可欠である。そこで今回申請者は、これら2種の活性物質に対する合成化学的研究から新規抗がんリード化合物の創出に寄与できるのではないかと考え、本研究を着想するに至った。

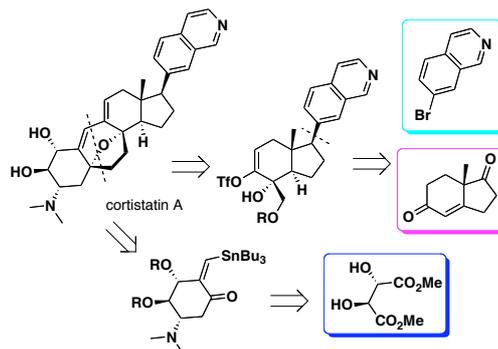
2. 研究の目的

本研究では、我々が海洋生物の二次代謝産物より見いだした、強力かつ選択的な血管新生阻害活性を示す二種の生物活性天然物について全合成研究を行い、効率的かつ実用的な合成手法の確立を目指す。また、その構造をモチーフとして、より短工程で合成可能な活性リード化合物を設計・合成する。合成した化合物については、すでに確立している、*in vitro* および *in vivo* での血管新生阻害活性評価系を用いて評価し、その結果を新たなリード化合物のデザインに生かしていくなど、合成化学的研究と活性評価の緊密な連携を通じて、血管新生を標的とする新規な抗がん剤シーズの創製を指向した創薬化学的研究を目的とする。

3. 研究の方法

1) Cortistatin A の全合成研究

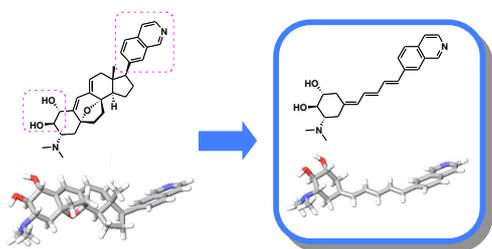
インドネシア産海綿 *Corticium simplex* より単離した cortistatin 類は、8-oxabicyclo[3.2.1]octene 構造を有する変異ステロイド骨格にイソキノリン側鎖が連結した、合成化学的に興味深い非常に特異な化学構造を有する新規アルカロイドである (Aoki, S. et al. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 3148-3149 (2006))。主活性物質である cortistatin A は、血管内皮細胞に対して、非常に強力かつ高選択的な増殖抑制活性を示す有用な化合物であるが、海綿から単離できる量はごくわずかであるため、化合物の供給には化学合成が不可欠である。そこで本化合物について、最初の不斉全合成を目指して検討を行う。合成ルートは、図に示したように二つのセグメントを B 環部で連結する収束型合成法を計画しており、後の類縁体合成にも適用可能な効率的な合成法の確立を目指す。



2) Cortistatin A モデル化合物の合成と活性評価

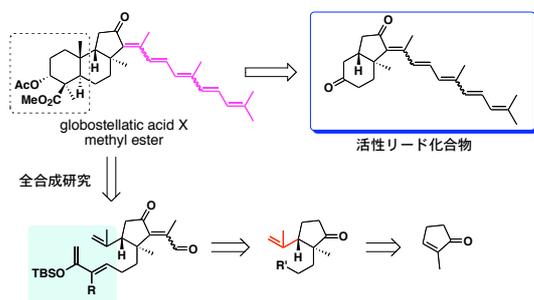
これまでに同種の実験室から、側鎖の化学構造や各種官能基の異なる数種の cortistatin 類縁体を単離しており、それらの活性評価の結果から、A 環のジメチルアミノ基および側鎖のイソキノリン構造が、強力かつ選

択的な血管新生阻害活性の発現に関与している事が示唆されている。また、cortistatin A の X 線結晶構造解析および分子力場計算によるコンホメーション解析から、この化合物が比較的平坦な三次元構造を取っているものと考えられた。したがって、A 環部とイソキノリンを、平面性と適当な長さを有するリンカーでつなぐことで得られる化合物は、cortistatin A と同等の作用を示すことが期待される。例えば、トリエン構造をリンカーにもつ化合物の最安定コンホメーションを計算すると、A 環部とイソキノリンの空間的な配置は cortistatin A と類似していることが分かる。そこで、リンカーの構造や長さの異なる種々の化合物を合成し、活性評価を行う事で、活性発現に必要な構造単位を明らかにするとともに、容易に合成可能な活性リード化合物の創製を目指す。



3) Globostellatic acid 類の合成研究

インドネシア産海綿 *Rhabdastrella globostellata* より単離した新規イソマラバリカン型トリテルペノイド globostellatic acid 類は、血管内皮細胞の増殖を選択的に抑制するとともに、血管新生の重要な過程である血管内皮細胞の遊走を阻害する作用を示す (Aoki, S. et al. *Bioorg. Med. Chem.*, **15**, 4818-4828 (2007))。血管新生抑制剤のリード化合物として非常に有望である本化合物についても全合成研究を行う。現在、不斉共役付加反応と分子内[4+2]環化反応を鍵工程とする合成経路を計画している。



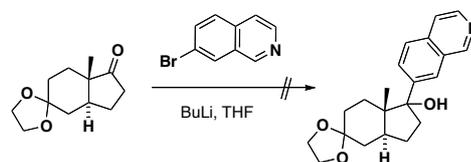
また、これまでに単離した数種の類縁体の活性評価から、ポリエン側鎖の立体化学やその長さが血管新生阻害活性と密接に関係していること、および母核部分の A 環の官能基は活性発現にあまり関与していないことを示唆する結果が得られていることか

ら、母核部分をより単純化した種々の類縁体を合成し、詳細な構造活性相関を解析することで、容易に供給可能で、より優れた活性リード化合物の創出を目指す。

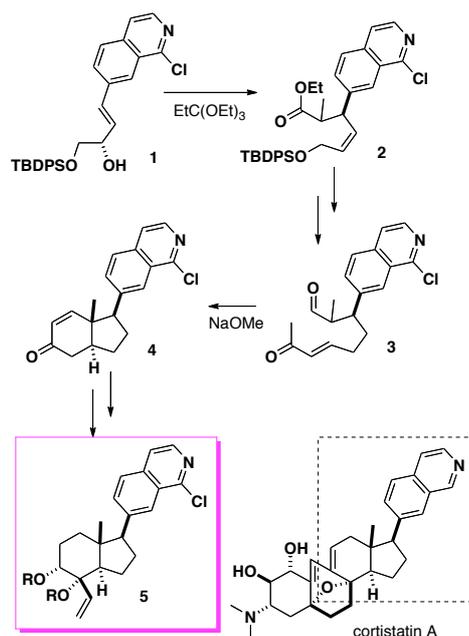
4. 研究成果

1) Cortistatin A の合成研究

イソキノリン側鎖を有する新規ステロイドアルカロイド cortistatin A の全合成研究に際し、我々は A 環部と CD 環部の二つのセグメントを合成し、B 環部で連結する合成ルートを考案した。CD 環部の構築には、イソキノリン側鎖の導入が鍵となる。当初は、7-プロモイソキノリンから調製した有機リチウム反応剤の求核付加による導入を検討したが、目的の反応はほとんど進行しなかった。



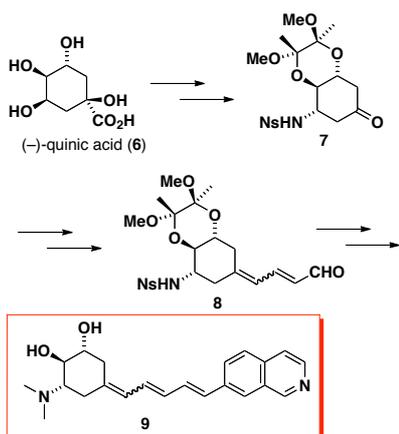
そこで次に、転位反応による不斉転写でイソキノリン側鎖連結部の不斉炭素を構築することとした。検討の結果、イソキノリン環を有するアリルアルコール体 **1** に対して酸性条件下オルトプロピオン酸エチルを作用させることで、Johnson-Claisen 転位反応による不斉転写が進行し、目的の不斉炭素を立体選択的に構築することに成功した。また、得られた化合物 **2** から数工程を経て合成できるケトアルデヒド **3** に対して NaOMe を作用させることで分子内 Michael-aldol 反応が立体選択的に進行し、cortistatin A



の CD 環に相当する *trans* 縮環型化合物 **4** の合成に成功した。さらに続く官能基変換により、8 位不斉炭素に相当する三級アルコールの導入にも成功し、全合成に必要な全ての官能基を有するセグメント **5** の合成を達成した。Cortistatin A の合成研究は世界中で活発に合成研究が行われているが、我々の合成戦略は、転位反応によるイソキノリン部の立体選択的な導入など、独自性の高い合成ルートである。今後は、A 環フラグメントとのカップリングと、B 環の構築を経て、全合成を達成できると考えている。A 環フラグメントについては、(-)-キナ酸を出発物質とした合成を計画しており、分子内 Heck 反応を用いて B 環の 7 員環構造を構築できると考えている。

2) Cortistatin A をシーズとする活性リード化合物の創製

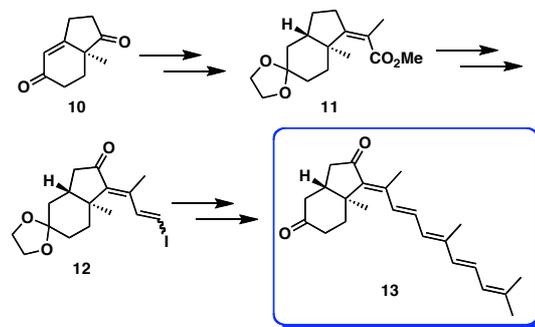
Cortistatin 類の活性発現に重要だと考えられる A 環部とイソキノリン側鎖を直線的なリンカーで結合させたアナログ化合物 **9** の合成を検討した。(-)-キナ酸(**6**)を出発物質とし、数工程を経て、窒素官能基を立体選択的に導入した化合物 **7** を得た。さらに、Horner-Emmons 反応によってリンカー部の延長とイソキノリンの導入を行い、目的のアナログ化合物 **9** の合成を達成した。得られた化合物の活性評価を行ったところ、血管内皮細胞に対する増殖抑制効果は低く、他の細胞との選択性もほとんど示さないことが明らかになった。構造の自由度が大きすぎるのが原因と考えられるため、環構造を導入するなど、より天然物に近い構造を有するアナログの設計・合成を進めることで、優れたリード化合物を創出できると考えている。



3) Globostellatic acid X methyl ester の合成研究

天然より得られた類縁体の構造活性相関の結果をもとに、活性発現に重要な共役オ

レフィン側鎖を含む BC 環モデル化合物を設計し、合成を検討した。市販の光学活性ケトン **10** を原料とし、立体選択的な 1,4-還元の後、イノラートアニオンの付加反応によって、立体的に混み合ったケトンへのオレフィン導入に成功し、化合物 **11** を高収率かつ抗立体選択的に得ることが出来た。さらに、位置選択的なアリル位酸化反応、Stille カップリングによるポリエン側鎖の導入を経て、目的の BC 環モデル化合物 **13** の合成に成功した。また、同様の方法を用いて、BC 環部の官能基が異なる数種のモデル化合物もあわせて合成し、血管内皮細胞に対する増殖抑制活性を評価した。その結果、共役オレフィン側鎖だけでなく、母核部分も活性発現に関与していることを明らかにした。今後は、今回の研究で開発した方法論を利用して、天然物の不斉合成に向けて検討するとともに、より強力な活性を有し、かつ短工程で合成可能なリード化合物の設計・合成も進めていく予定である。



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 5 件)

- 1) Synthesis of CD-ring structure of cortistatin A, an anti-angiogenic steroidal alkaloid from marine sponge. Kotoku, N.; Sumii, Y.; Hayashi, T.; Kobayashi, M. *Tetrahedron Lett.* **2008**, *49*, 7078-7081. (査読有り)
- 2) Structure-activity relationship (SAR) study of bastadin 6, an anti-angiogenic brominated-tyrosine derived metabolite from marine sponge. Kotoku, N.; Hiramatsu, A.; Tsujita, H.; Hirakawa, Y.; Sanagawa, M.; Aoki, S.; Kobayashi, M. *Arch. Pharm.* **2008**, *341*, 568-577. (査読有り)
- 3) Synthesis of BC-ring model compound of globostellatic acid X methyl ester, an anti-angiogenic substance from marine sponge. Kotoku, N.; Tamada, N.; Hayashi, A.; Kobayashi, M. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**,

18, 3532-3535. (査読有り)

4) Stereoselective total synthesis of arenastatin A, a spongean cytotoxic depsipeptide. Kotoku, N.; Narumi, F.; Kato, T.; Yamaguchi, M.; Kobayashi, M. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 7147-7150. (査読有り)

5) Concise asymmetric total synthesis of scyphostatin, a potent inhibitor of neutral sphingomyelinase. Fujioka, H.; Sawama, Y.; Kotoku, N.; Ohnaka, T.; Okitsu, T.; Murata, N.; Kubo, O.; Li, R.; Kita, Y. *Chem. Eur. J.* **2007**, *13*, 10225-10238. (査読有り)

[学会発表] (計8件)

1) ○ Kotoku, N. “Anti-angiogenic marine natural products” *Frontiers in Medicinal Chemistry* (2009年3月17日、ハイデルベルク大学)

2) ○ 古徳直之、玉田 尚、林亜紗実、小林資正『海綿由来血管新生阻害物質 **globostellatic acid X methyl ester** の構造活性相関』第17回天然薬物の開発と応用シンポジウム (2008年11月14日、九州大学医学部百年講堂)

3) ○ 古徳直之、玉田 尚、林亜紗実、小林資正『海綿由来の血管新生阻害物質 **globostellatic acid X methyl ester** のモデル化合物の合成と活性評価』第58回日本薬学会近畿支部大会 (2008年10月25日、神戸薬科大学)

4) ○ 古徳直之『海綿由来の血管新生阻害物質をシーズとする活性リード化合物の合成』第12回がん分子標的治療研究会総会 (2008年6月27日、学術総合センター)

5) 古徳直之、平川陽一、○林 剛史、小林資正『海綿由来血管新生阻害物質 **cortistatin A** のA環部分の合成』日本薬学会第128年会 (2008年3月26日、パシフィコ横浜)

6) 古徳直之、○平川陽一、小林資正『血管新生阻害物質 **cortistatin A** のA環フラグメントの構築』第57回日本薬学会近畿支部大会 (2007年10月27日、大阪薬科大学)

7) ○ 古徳直之、辻家崇維、荒井雅吉、小林資正『海綿由来の血管新生阻害物質 **bastadin 6** の標的タンパク質の探索』第57回日本薬学会近畿支部大会 (2007年10月27日、大阪薬科大学)

8) ○ 古徳直之、渡部康雄、青木俊二、住井裕司、田辺大樹、荒井雅吉、小林資正『海綿由来の血管新生阻害物質 **cortistatin** 類の構造活性相関と作用メカニズムの解析』第49回天然有機化合物討論会 (2007年9月19日、札幌コンベンションセンター)

[その他]

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b012/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

古徳 直之 (KOTOKU NAOYUKI)
大阪大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：20362618

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：