

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：32625

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K05486

研究課題名(和文)連続Henry反応を用いる三環性アルカロイド誘導体の網羅的合成と抗がん剤への展開

研究課題名(英文) Synthesis and evaluation of novel tricyclic alkaloid derivatives using sequential Henry reaction toward anti-cancer drugs

研究代表者

赤井 昭二 (AKAI, SHOJI)

女子栄養大学・栄養学部・教授

研究者番号：00322537

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：三環性天然アルカロイドの1つパンクラチスタチンから新奇な抗がん剤のリード化合物の創製を目指し、連続Henry反応と多様性指向型合成を組み合わせ、これまでにない新奇な誘導体の合成研究を行った。その結果、デオキシ、エピ、メトキシの3つの2位誘導体の合成を達成し、2位フッ素体の合成にも目途を立てた。また連続Henry反応を用いて天然物のA環を縮小した5-6-6員環の誘導体の合成法を新たに見出し、多様性指向型合成が誘導体合成に有効であることを明らかにした。また、2位誘導体の細胞毒性試験から、2位OH基の相互作用が活性の発現に重要であることも明らかにし、リード化合物の創製に有用な知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パンクラチスタチンの2位誘導体の合成とその活性試験により、2位OH基が活性発現に極めて重要であることを明らかにすることができた。また、A環のサイズを小さくした5-6-6員環誘導体の合成は比較的容易で、選択性や活性のまったく異なる新たな物質の創製につながる多くの知見が得られた。研究の基軸となる連続Henry反応を用いるパンクラチスタチンの全合成法は、様々な誘導体の合成に優れ、2位をフッ素原子に置換した誘導体は、応用研究により癌組織のイメージングへと発展可能な点で学術的意義の高い研究と言える。このような低分子医薬の基礎研究は、社会的要請の高い抗がん剤へとつながるものであり、社会的意義も十分である。

研究成果の概要(英文)：To create novel lead compounds for anticancer drugs from one of the tricyclic natural alkaloids, pancratistatin, we conducted a synthetic study of novel derivatives by combining the sequential Henry reaction and diversity-oriented synthesis. As a result, three 2-position derivatives (deoxy, epi, and methoxy) were synthesized, and the synthesis of 2-fluorinated derivatives is also in progress. Additionally, the sequential Henry reaction discovered a novel method for synthesizing 5-6-6 membered derivatives with a reduced A-ring of the natural product. This demonstrates the effectiveness of diversity-oriented synthesis for the synthesis of derivatives. Furthermore, cytotoxicity studies of the 2-position derivatives revealed that the interaction of the 2-position OH group is crucial for the expression of activity, providing valuable insights for creating lead compounds.

研究分野：有機合成化学

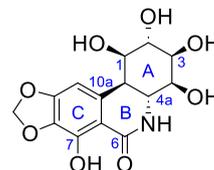
キーワード：パンクラチスタチン ニトロアルドール Henry反応 アナログ 抗腫瘍活性

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

モルヒネなどの含窒素天然有機化合物はアルカロイドと呼ばれ、微量で多彩な生物活性を示すことから、新たな医薬品開発のための重要な素材(リード)となっている。しかし天然から得られる試料は、多くの場合、極めて少なく、新薬開発には合成化学的手法による全合成と誘導体合成によって行われる構造-活性相関の研究が重要な役割を果たしている。

ユリ科植物の鱗茎から単離された天然アルカロイドの1つ、パンクラチスタチン(PST, Figure 1)は、6-6-6員環の三環性の特異な化学構造を有することに加え、顕著な細胞毒性を示すことから抗癌剤のリードとして盛んに研究されている(Hudlicky, *AngewChemIntEd*, 2016)。しかしながら、植物中の含有量は低く、抽出も困難である(難溶性)ことから、新薬開発に向けた簡便な合成法の確立と構造-活性相関の解明が望まれていた(Hudlicky, *SciRep*, 2017)。多くの誘導体合成が報告されていたが、高活性かつ水性溶媒または薬学上、許容される媒体への低溶解性を克服した化合物は、残念ながら得られていなかった。

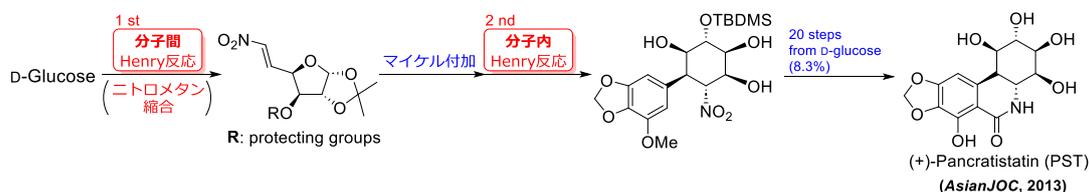


1: (+)-Pancratistatin (PST)

Figure 1. 抗腫瘍活性天然アルカロイド (パンクラチスタチン)

2. 研究の目的

本課題では、強い抗腫瘍活性を有する三環性アルカロイドの1つパンクラチスタチン(PST)に着目し、研究代表者の開発した Henry 反応を連続して用いる立体選択的多置換シクロポリオール構築法(Scheme 1)を基軸として、従来にはない A 環(シクリトール)誘導体や 2 位ヒドロキシ基誘導体、さらに発展的研究により B 環(ラクタム)の誘導体の合成して、パンクラチスタチン(PST)の欠点である「難溶解性」を克服した誘導体の合成と新奇抗がん剤のリード化合物を見出すことを目的とした。縮環構造の環サイズの変化させることで、単純に水溶性置換基の増減に加え、分子の平面性を崩し安定性を低下させ水溶性の向上を期待した。



Scheme 1. 研究代表者の開発した連続 Henry 反応を利用するパンクラチスタチン(PST)の効率的全合成法

3. 研究の方法

研究代表者が確立した連続 Henry 反応による立体選択的多置換シクロポリオール骨格の構築法を基軸に多様性指向型合成(DOS)を取り入れて、これまででない新奇な PST 誘導体として A 環を縮小した 5-6-6 および拡大した 7-6-6 員環骨格の誘導体の合成、2 位の様々な誘導体の合成、および B 環(ラクタム)の誘導体の合成と抗腫瘍活性試験を計画した(Figure 2)。

まず、本研究課題では PST の A 環サイズを縮小した新規誘導体の合成(Figure 2, 右)と並行して、確実に合成可能な 2 位のデオキシ体、エピ体、およびフッ素体(Figure 2, 左)を立体選択的に合成し、それらの抗腫瘍活性試験について行う方法(計画)とした。特に 2 位フッ素体は、①水素原子とファンデアワールス半径がほぼ同じであり、PST と同様に受容体ポケットに取り込まれることが期待できること、②電気陰性度が大きく部分分極(δ^-)した状態のため、ヒドロキシ基よりも水素受容能が高められた誘導体と考えられること、③フッ素原子が結合している炭素原子の電子密度を低下させることで分子全体の静電ポテンシャルエネルギーが変化すること、加えて④ ^{18}F 同位体標識へと発展でき PET(ポジトロン断層撮影)によるがん組織のイメージングへの応用も視野に入れられること、以上のことから特に活性試験が望まれる誘導体と考え、精力的に合成研究を進めた。いずれの誘導体も、既存の抗がん剤とは異なる骨格構造をもつことから薬剤耐性を有する腫瘍細胞にも有効な新薬リードとして期待でき、社会貢献できる研究へと発展可能であり、他の研究者では行われていない独自の視点で計画を立案した。

4. 研究成果

[2 位ヒドロキシ基誘導体の合成]

計画に従い D-Glucose から Henry 反応(分子間)を含む 6 工程でニトロオレフィン体 **4** を、ま

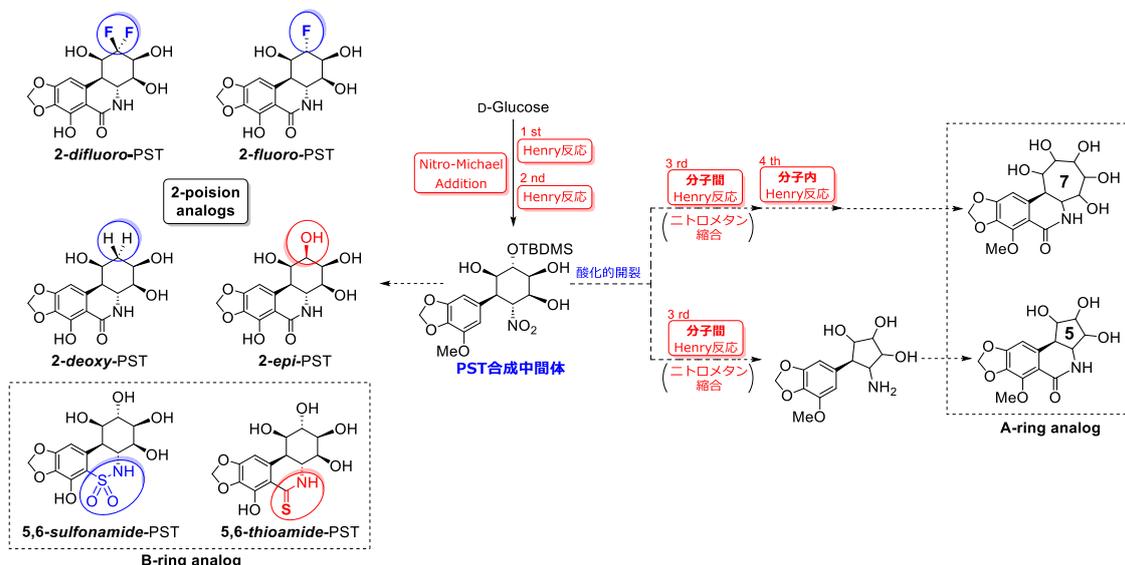


Figure 2. 新規 PST 誘導体の合成計画

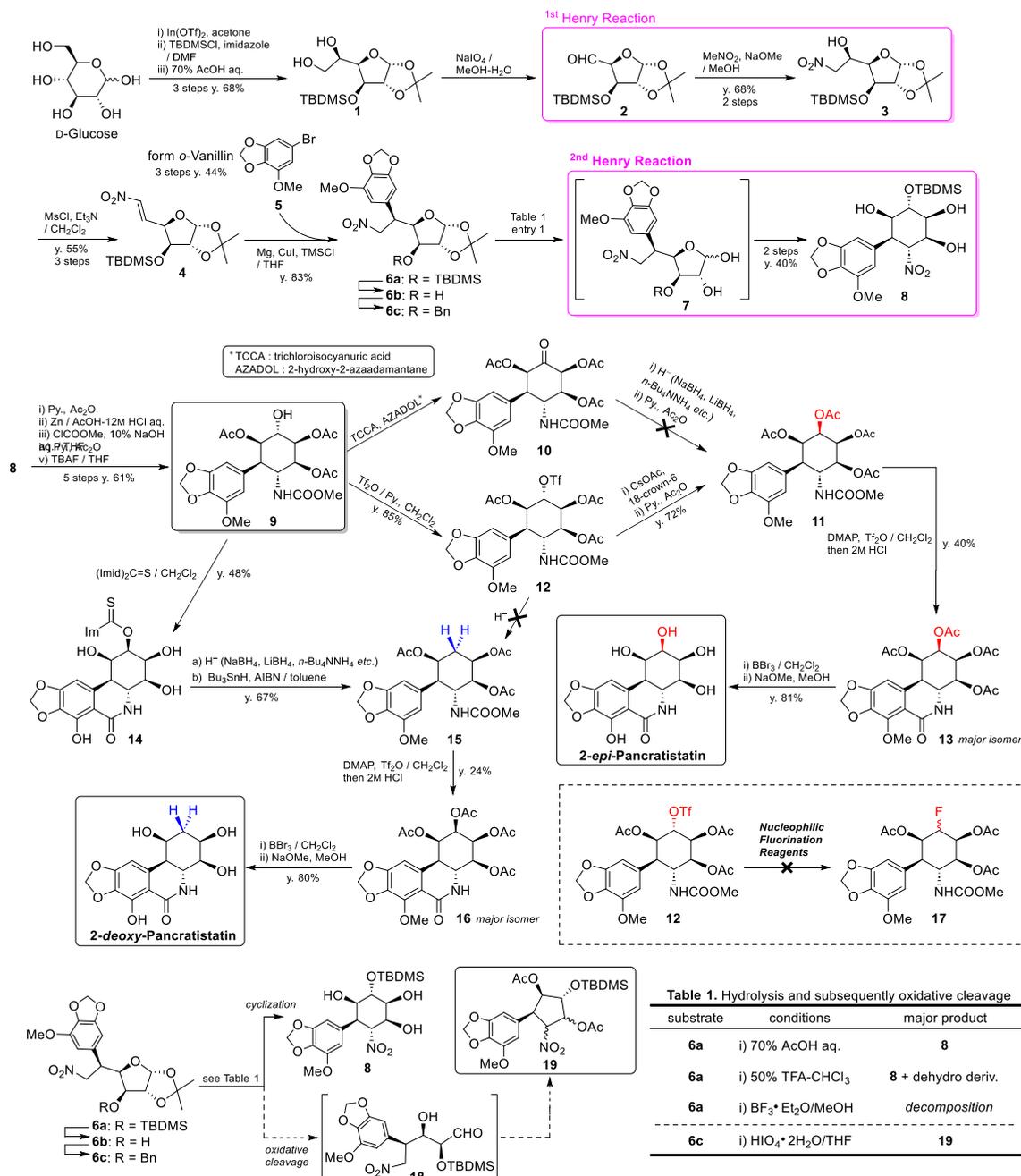
た臭化アリール **5** を α -Vanillin から 3 工程 (収率 49%) でそれぞれ合成した。**4** と **5** のニトロマイケル付加によって **6a** を合成し、2 度目の Henry 反応 (分子内) により nitro-cyclitol (**8**) を立体選択的に得た。次いで **8** のニトロ基を還元、カルバメート化した後、シリルエーテル基を脱保護して種々の 2 位誘導体合成の足掛かりとなる **9** を得た。先ず 2-*epi*-PST の合成のため、**9** の 2 位ヒドロキシ基を酸化/還元により立体反転することを試みた。ケトン **10** は定量的に得られたが、不安定であったため、精製することなくヒドリド還元し、アセチル化の後、単離・精製したが、 β 脱離が進行したと推定される高極性物質と **11** の複雑な混合物となった。酸化/還元の条件検討を行ったが改善されなかったため、次に脱離基による立体反転を試みた。**9** にトリフルオロメタンスルホニル (Tf) 基を導入し **12** とし、次いで酢酸セシウムによる S_N2 反応で 2 位を立体反転した **11** を収率良く得ることに成功した。次いで Bischler-Napieralski 反応を用いた環化により B 環 (ラクタム) を構築し、最後に 4 つのアセチル基と芳香族メチル基を脱保護することで 2-*epi*-PST を合成することに成功した。

同様に **12** にヒドリド試薬を作用させて 2 位のデオキシ化を試みた。種々反応条件を検討したが、未反応あるいは分解反応が起こるのみで、目的物は得られなかった。そこでラジカルによるデオキシ化としてよく知られる Barton-McCombie 反応 (キサンテートとスズヒドリドによる還元) を試みた。**12** に対応するキサンテート誘導体 **14** から中程度の収率ではあるが、目的物 **15** を得ることに成功した。2-*epi*-PST 体と同様に B 環を構築後、脱後を行って 2-deoxy-PST を得ることも成功した。続いて 2-deoxyfluoro-PST の合成も、同様に **12** へフッ素化試薬を作用させフッ素体を得ようと試みた。求核的フッ素化剤であるフッ化セシウム (CsF)、テトラブチルアンモニウムフルオリド ($\text{Bu}_4\text{N}\cdot\text{F}$)、ジメチルアミノ三フッ化硫黄 (Et_2NSF_3 ; DAST)、Deoxo-Fluor ($(\text{MeOCH}_2\text{CH}_2)_2\text{NSF}_3$)、PhenoFluor および AlkylFluor との S_N 反応を検討したが、いずれも分解反応が起こるのみで目的物は得られなかった。また、ケトン **10** の *gem*-ジフルオリド化も検討したが、これも高極性の分解物が得られるのみであった。やむなく合成行程の初期にフッ素化を行い、2-deoxyfluoro-glucofuranose 誘導体を経て目的物へ導く計画へと変更し、現在、対応するニトロオレフィン体を合成した。今後、PST の合成と同様の工程で 2-deoxyfluoro-PST を得る予定である。

[A 環アナログ (縮小/拡大) の合成]

研究代表者が確立した連続 Henry 反応による立体選択的多置換シクロポリオール骨格の構築法に多様性指向型合成 (DOS) を取り入れて、これまでにない新奇な A 環を縮小した 5-6-6 および拡大した 7-6-6 員環骨格の PST 誘導体の合成を目指した。先ず、環サイズを 5 員環へと縮小した誘導体の合成を検討した。

2-*epi*-PST の合成で Henry 反応 (1 段階目) を経て得た **6a** のイソプロピリデン基の除去後、onepot での酸化開裂と分子内 Henry 反応 (2 段階目) によりシクロペンタン環の構築を検討した (Scheme 2, Table 1)。**6a** のイソプロピリデン基の酸加水分解では、反応の進行とともに分子内 Henry 反応 (2 段階目) が逐次進行してしまった (entry 1)。短時間で加水分解を行うべく種々の酸を検討したところ、いずれも分子内 Henry 反応が優先して **8** が得られるか、TBDMS 基の脱保護



Scheme 2. 新規 PST 誘導体の合成計画

と基質の分解が優先した分解物が得られるのみであった (entr 2, 3)。保護基を酸に強い Bn 基に換えた **6c** を HIO₄·2H₂O で処理し、イソプロピリデン基の除去と酸化開裂を onepot で行くと、シクロペンタン環を有する **12** を得ることに成功した。一方、6 員環で環化した **8** に対して NaIO₄ を作用させると、中間体を経由して **12** が得られることが判明した。このことから、**8** を経由した反応条件の最適化について検討することで、**12** を選択的に得ることが可能で、環サイズの異なる 5 員環骨格の新奇な PST 誘導体の合成が可能となった。

[B 環(ラクタム)誘導体の合成]

B 環(ラクタム)のアミド(CONH)結合をチオアミド(CSNH)結合やスルホンアミド(SO₂NH)結合へと置換した誘導体の合成については、新型コロナウイルス感染症による研究活動の制限が影響し、まったく取り組むことができなかった。

[抗腫瘍活性の評価(細胞毒性試験)]

2-deoxyfluoro-PST の合成を検討する一方、先行して合成が可能となった 2-epi-PST と 2-OMe-PST、および 2-deoxy-PST で、それぞれ試料を追合成し、抗腫瘍活性の評価を行った。

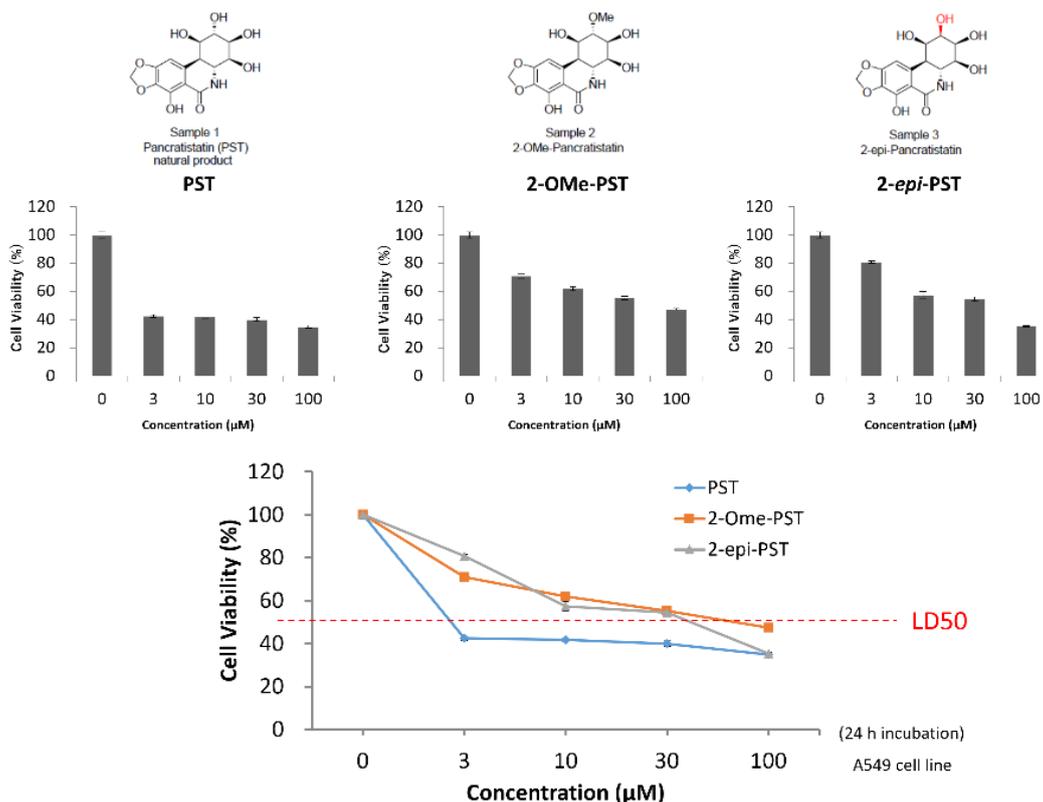


Figure 3. PST, 2-OMe-PST, 2-epi-PST の抗腫瘍活性の評価

ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 (A549 cell line) を用い、*in vitro* で 24 時間後の細胞生存率を MTT 法により測定した。50% 増殖阻害濃度 (LD₅₀) を天然物 (PST) と比較したところ、2-OMe-PST および、2-*epi*-PST は、およそ 1/10 に活性が低下していた。また LD₅₀ を試算するまでのデータは得られなかったが、2-deoxy-PST についても、同様の活性の低下傾向が見られた。このことから、2 位ヒドロキシ基は抗腫瘍活性の発現に重要であり、受容体と水素結合などの、何らかの相互作用があることが示唆された。

[総括]

パンクラチスタチン (PST) の 2 位誘導体の合成とその細胞毒性試験により、2 位ヒドロキシ基が活性発現に極めて重要であることを明らかにすることができた。また、A 環のサイズを小さくした 5-6-6 員環誘導体の合成は比較的容易で、異なる基本骨格を持つ新奇な PST 誘導体の合成に見通しを立てることができた。研究の基軸とした連続 Henry 反応を用いるパンクラチスタチンの全合成法は、様々な誘導体の合成に優れており、現在合成中の 2-deoxyfluoro-PST は高い抗腫瘍活性 (選択的細胞毒性) が期待される。応用研究によりがん組織のイメージングへと発展可能な点で学術的意義の高い研究と言える。このような低分子医薬の基礎研究は、社会的要請の高い抗がん剤へとつながるものであり、新薬の創製につながる多くの知見が得られた。

研究機関の異動が研究課題の初年度であったことに加え、次年度以降は新型コロナウイルス感染症による研究活動の制限が続き、研究室の改修が遅れて思うように合成実験が進められなかった。また、オンライン授業の準備など、時間的配分 (エフォート) を教育に割り当てざるを得ず、成果をまとめて学会発表することも難しかった。現在、ここまで得られた成果をまとめ、専門学術誌へ投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Iwakura Izumi, Hashimoto Sena, Okamura Kotaro, Komori-Orisaku Keiko, Akai Shoji, Yabushita Atsushi	4. 巻 45
2. 論文標題 Crystallization of highly soluble thioglucopyranoside ejected by coherent molecular vibrational excitation using a visible 10 fs pulsed laser	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Journal of Chemistry	6. 最初と最後の頁 12346 ~ 12350
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d1nj01429c	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saneyoshi Hisao, Yamamoto Yuta, Ohta Takayuki, Akai Shoji, Ono Akira	4. 巻 30
2. 論文標題 Thiol-responsive pro-fluorophore labeling: Synthesis of a pro-fluorescent labeled oligonucleotide for monitoring cellular uptake	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 127222 ~ 127222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2020.127222	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwakura Izumi, Komori-Orisaku Keiko, Hashimoto Sena, Akai Shoji, Kimura Kenta, Yabushita Atsushi	4. 巻 3
2. 論文標題 Formation of thioglucoside single crystals by coherent molecular vibrational excitation using a 10-fs laser pulse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42004-020-0281-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 赤井昭二、永井莉乃、千々松美鈴、佐藤憲一
2. 発表標題 スピロ ニトロエポキシド誘導体の合成とその求核開環反応の検討
3. 学会等名 第78回有機合成化学協会関東支部シンポジウム（新津シンポジウム）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------