

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07141

研究課題名(和文)次世代天然物ライブラリー構築を指向した生物活性フッ素化天然有機化合物

研究課題名(英文)Fluorinated Natural Products Library

研究代表者

一柳 幸生 (Hitotsuyanagi, Yukio)

東京薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80218726

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：複雑な構造を有する生物活性天然有機化合物を基盤とする「次世代天然有機化合物ライブラリー」構築に向けて、3系統の抗腫瘍性有機化合物群として、(1)分子中に官能基を多く持つテルペノイドである生薬アタンシに含まれるカッシノイド化合物のブルサトール類、(2)特有の反応性を示す生薬茜草根由来のRA系環状ペプチド化合物、(3)反応試薬類に敏感な官能基を持つアオツツラフジCocculus trilobusに含まれるアルカロイド化合物のシノコクリンについて種々のフッ素化試薬を用いて、それぞれの化合物の骨格炭素原子にフッ素原子を導入したアナログを合成し、培養ヒト癌細胞株を用いて毒性評価した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医薬品を開発するうえで、化合物の骨格炭素上にフッ素原子を導入すると、酸化的代謝に対する安定性が向上して薬効の持続性が伸長することや、脂溶性が高まり薬物吸収が促進する効果、水素結合等による酵素との親和性の増大効果などが期待できるため、化合物のデザインとしてフッ素化アナログは一般的な手法となっている。一方、天然有機化合物由来の医薬品は临床上多く利用されているが、天然物は複雑な構造を有するものが多く、フッ素化アナログ合成の試みは少ない。本研究では種々の抗腫瘍性天然有機化合物についてフッ素化を行い、次世代天然有機化合物ライブラリー構築の可能性を検証するものである。

研究成果の概要(英文)：Fluorination of antitumor natural products with complex structures were performed to explore the feasibility of constructing the next-generation compound library. Those include (1) brusatol and related multi-functional quassinoids from the fruits of Brucea javanica, (2) RA-series peptides, bicyclic antitumor hexapeptides from the roots of Rubia cordifolia, and (3) sinocoluline, a chemically labile morphinan alkaloid from the roots of Cocculus trilobus, and the synthesized fluorinated compounds were evaluated their cytotoxicity against HL-60, HCT-116, and MFC-7 cell lines.

研究分野：天然物化学

キーワード：化合物ライブラリー フッ素化 天然有機化合物

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年開発された医薬品には、構造中にフッ素原子が導入されたものが多い。一般的に、フッ素原子を導入することにより、フッ素原子の強い電子求引性により酸化的代謝に対する安定性が向上(ブロック効果)して薬効の持続性が伸長することや、脂溶性が高まり、薬物吸収が促進する効果(脂溶性効果)、水素結合等による酵素との親和性の増大効果などが期待できる。ステロイド骨格へのフッ素原子の導入は、合成副腎皮質ホルモン剤を開発するうえで多くの実績がある。また、慢性C型肝炎治療薬のハーボニー(HARVONI)配合錠では、二種類の構成成分のレジパスビル(NS5A阻害剤)とソホスビル(NS5Bポリメラーゼ阻害剤)の両分子中にフッ素原子が導入されている(図1)。このように、医薬品を開発するうえで、骨格炭素上にフッ素原子を導入するアナログデザインはきわめて一般的な手法となっている。

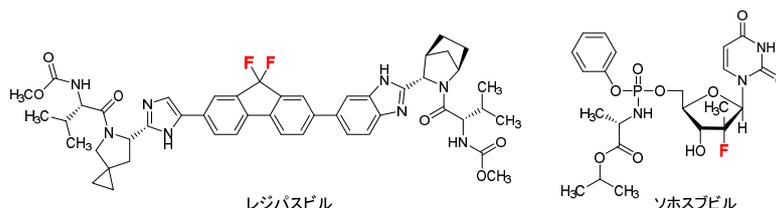


図1 C型肝炎治療薬ハーボニー®の配合成分

2. 研究の目的

現在医薬品開発において、ターゲットとする生理活性を有する化合物の探索には、自動化された評価系を構築後、化合物ライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングにより活性物質を検出する方法が用いられる。このような手法では、構造多様性に富むライブラリーを用いることが活性物質にヒットする確率を高めることになる。天然有機化合物は構造多様性に富むことは言うまでもないが、現在使用されている医薬品の中に天然由来の化合物が多く存在することから、天然物は潜在的に医薬品となり得る構造特性を有していると考えられる。しかし、創薬化学で用いられる化合物ライブラリー中の天然物のサンプル数は通常10%未満であるが、比較的容易に調達可能な化合物に限定されるため、その数を増やすことは困難である。天然物の化合物ライブラリーを拡充する一つの方法は、これらの化合物を化学修飾して誘導体化することである。上述したように、生物活性物質にフッ素原子を導入すると体内動態や活性プロフィールが変化することから、生物活性天然物のフッ素化は価値の高いアナログの創製と見做すことができる。しかし、官能基が多く構造が複雑な化合物分子にフッ素原子を導入することは化学的に困難を伴うため、天然有機化合物のフッ素化アナログの合成例は少ない。この研究では、「次世代天然有機化合物ライブラリー」構築に向けてさまざまな天然有機化合物のフッ素化アナログの調製と配座構造解析に応用できる基本技術を確認することを目的とする。

3. 研究の方法

モデル化合物として、各試薬の種々の立体選択性・特異性を検討するために、以下の(1)~(3)に示す3系統の抗腫瘍活性物質を用いることとした。(1)分子中に官能基を多く持つテルペノイドであるカッシノイド化合物 ブルサトール、(2)種々の試薬に対し特有の反応性を示すペプチド化合物 RA-VII、(3)反応試薬類に敏感な官能基を持つアルカロイド化合物 シノコクリンを用い、フッ素化反応を試みることにした。これらの反応基質のそれぞれの構造特性を考慮したフッ素化反応の条件検討をすることで、さまざまな天然有機化合物への応用が可能になると考えられる。一方、「次世代ライブラリー」では各化合物について *in silico* 研究に適応可能な精密な三次元構造(配座構造)が求められる。フッ素原子は元素のなかで最も大きい電気陰性度を持ち、C-F結合に大きな双極子があることや、分子内水素結合の形成により配座構造が元の分子と異なることが多い。そこで、フッ素化したアナログについて化学計算的手法により最安定配座構造を求め、密度汎関数理論(DFT)により構造最適化を行う。

4. 研究成果

(1) カッシノイド化合物 ブルサトール

ブルセアンチンはアフリカに生育するニガキ科植物 *Brucea antidysenterica* より見いだされたカッシノイドである。強い抗腫瘍活性を示し、かつて米国癌研究所(NCI)において制癌剤として臨床研究が行われたが、医薬品として開発されるには至っていない(図2)。また、カッシノイド類のなかにはクロロキン耐性を持つマラリア原虫に有効性を示すユーリコマンノンなどもあり、医薬品のリードとして注目される化合物群である。カッシノイド類は、比較的小さな分子構造のなかにヒドロキシ基をはじめ多くの官能基を有し、位置特異的に化学修飾を行うことは困難であり、骨格炭素上にフッ素原子を導入したカッシノイドアナログは知られていない。これまでに報告されているアナログは、殆どがエステル基側鎖のカルボン酸成分を置換したものに限定さ

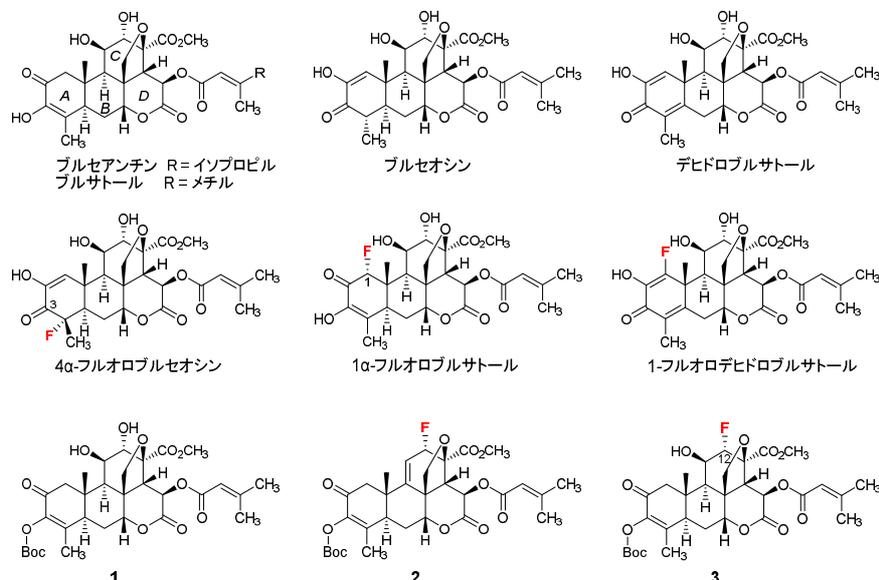


図2 ブルセオシンとその1位、4位、12位フッ素化アナログ

れている。ブルセアンチンと側鎖エステル基の構造だけが異なるブルセオシンが、生薬アタンシ (*Brucea javanica* の果実) から容易に得られる。そこで、先ずその A 環部へフッ素原子を導入したアナログの合成を検討した。アタンシを抽出・分離して得た配糖体のブルセオシド A を部分加水分解して生じるブルセオシンを異性化することで、ブルセオシンを得た。ブルセオシンを 1-クロロメチル-4-フルオロ-1,4-ジアゾニアビシクロ[2.2.2]オクタン ビス(テトラフルオロボラート)(Selectfluor)で処理すると、4-フルオロブルセオシンが主生成物として得られた。一方、ブルセオシンおよびデヒドロブルセオシンを同様に処理すると、それぞれ 1-ブルセオシンおよび 1-フルオロデヒドロブルセオシンが得られた。これらの生成物は、フッ素原子を持たない化合物と比べていずれもヒト前骨髄性白血病細胞(HL-60)に対する細胞毒性が低下した。

次に、C 環部のフッ素化を検討した。ブルセオシンの活性発現に重要と考えられている C 環部の 2 つのヒドロキシ基は、いずれもアキシャル配向となるため立体障害により反応性が低い。ブルセオシンの 3 位を *tert*-ブトキシカルボニル(Boc)基で保護した 1 についてピリジン-2-スルホニルフルオリド(PyFluor)、1,3-ビス(2,6-ジイソプロピルフェニル)-2-フルオロイミダゾリウムテトラフルオロボラート(AlkylFluor)、パーフルオロ-1-ブタンスルホニルフルオリド(PBSF)、4-*tert*-ブチル-2,6-ジメチルフェニルサルファートリフルオリド(FLUOLEAD)、三フッ化 *N,N*-ジエチルアミノ硫黄(DAST)を用いて 11 位、12 位のフッ素化を検討したところ、PyFluor、AlkylFluor、PBSF は反応が進行せず、FLUOLEAD では脱 Boc 化体を得られた。DAST を用いるとフッ化物 2 および 3 が得られた。DAST によるヒドロキシ基のフッ素置換反応は、 S_N2 反応で進行すると考えられている。化合物 3 の 12 位フッ素原子の立体が保持されたのは、12 位のヒドロキシ基の隣接基関与により 11、12 位間で 配向のエポキシドが生成後、フッ化物イオンが 12 位を 側から求核攻撃して生成したものと考えられた。化合物 2 および 3 の脱 Boc 化体の HL-60 細胞に対する細胞毒性は、ブルセオシンに比べて大きく低下した。

(2) 環状ペプチド化合物 RA-VII

RA-VII は、アカネ科アカネ属植物のアカネ *Rubia argy* や *R. cordifolia* 等に含まれる環状ペプチド化合物で、80S リボソームに結合し、タンパク質合成を阻害することにより強い抗腫瘍活性を示す(図 3)。また、アクチンに作用することも明らかになっている。一般にペプチド化合物はアミドカルボニル酸素原子が高い反応性を持つことから、化学修飾に使用可能な試薬の種類が制限される。天然由来 RA 系化合物から芳香環上の親電子置換反応によりアナログ A および B が合成できれば、その手法をチロシン残基を有する他の生物活性ペプチド類へ応用が可能と考えられる。そこで、デオキシボウバルジンを Selectfluor または 1,1'-ジフルオロ-2,2'-ビピリジニウムビス(テトラフルオロボラート)を反応させたところ、芳香環のフッ素化は進行しなかった。アナログ A は、デオキシボウバルジンの Tyr-6 の 位をニトロ化し、アミノ基に還元後ジアゾニウムとしたのちフッ素原子を導入し、ヒドロキシ基をメチル化して合成した。アナログ B は、3-フルオロ-L-チロシンより残基 1~4 に相当するテトラペプチドに変換後、RA-VII の部分加水分解により得られた残基 5、6 に相当するシクロイソジチロシンを連結してヘキサペプチドとしたのち、マクロ環化反応により合成した。アナログ A は HL-60 細胞に対して強い細胞毒性を示したが、アナログ B は大きく活性が低下した。

RA-VII の Tyr-5 残基の 位 (R^1 , R^2) は肝臓で代謝を受けてヒドロキシ化されると、活性が著しく低下する。その 位の酸化を抑制する目的でフッ素置換したアナログ C、D は、嘗て申請者が合成した化合物であるが、その改良合成法を確立して活性を評価した。アナログ C はヒト癌

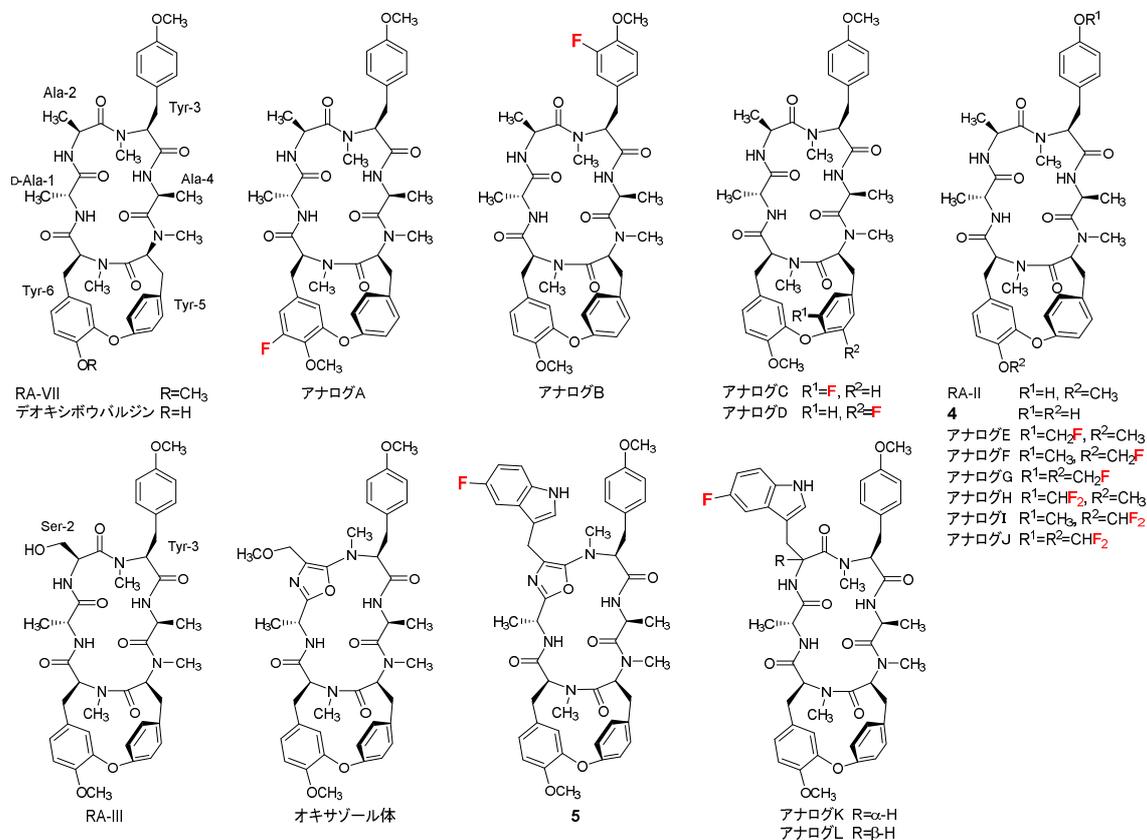


図3 天然RA系化合物とフッ素化アナログ A~D

細胞(MFC-7)に対し RA-VII と同強度の細胞毒性を維持することが示された。アナログ C および D は、MacroModel により得られる最安定配座を DFT により構造最適化したところ、RA-VII の最安定構造とほぼ同一の配座構造を有し、NMR スペクトルの結果もそれを支持していた。

次に、RA-VII が有するチロシン残基のメトキシエーテルのメチル基をフルオロメチル基およびジフルオロメチル基で置換したアナログを合成するため、RA-II、デオキシボウバルジン、および化合物 4 をそれぞれ *p*-トルエンスルホン酸モノフルオロメチルと炭酸カリウム、あるいはプロモジフルオロ酢酸エチルと炭酸カリウムで処理したところ、アナログ E~J が得られた。いずれのアナログも RA-VII と比べると、HL-60 に対する細胞毒性は低下した。また、ジフルオロメチルアナログは対応するモノフルオロメチルアナログとほぼ同等の細胞毒性を示した。

RA-III の残基 2 セリンをアセチル化後 Lawesson 試薬処理により得られる Tyr-3 残基のチオアミド体を酢酸水銀(II)と反応させてオキサゾール体とした。これに 5-フルオロインドールを反応させて生じた化合物 5 を部分加水分解してアナログ K および L を得た。興味深いことに、残基 2 が D 配置のアナログ L は、L 配置のアナログ K よりも HL-60 およびヒト大腸癌細胞(HCT-116) に対し強い細胞毒性を示した。

アミノ酸残基側鎖にアルコール性ヒドロキシ基を有する RA-III、RA-IV(残基 6 の 位に -OH)、RA-VIII(残基 2 がトレオニン)について、DAST を用いた求核置換反応によるフッ素化を試みたが、フッ化物を生成しない(RA-III、RA-VIII)か、安定な状態で得ることはできなかった(RA-IV)。

(3) モルヒナン型アルカロイド シノコクリン

アオツツラフジ *Cocculus trilobus* (ツツラフジ科)より単離されたシノコクリンは抗腫瘍性モルヒナン型アルカロイドで、*in vitro* 実験で抗マalaria作用(肝ステージ)を示すことも示されている。シノコクリンは非晶質性で、第二級アミノ基とフェノール基、アリル型のヒドロキシ基を含むグリコール構造を有している(図 4)。そのため高極性で化学的安定性も低く、扱いが困難な化合物である。そこで、その 6 位もしくは 7 位のヒドロキシ基をフッ素原子で置換したアナ

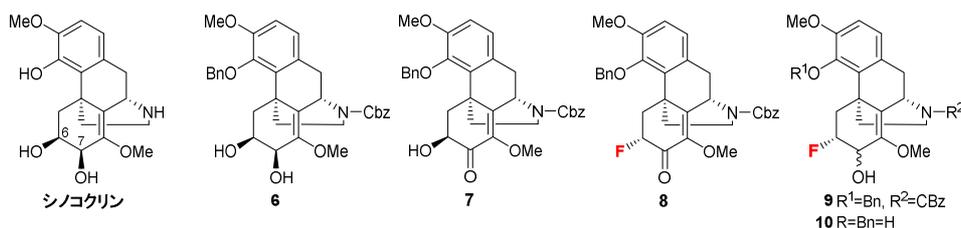


図4 シノコクリンとその6位、7位のフッ素化アナログ

ログの合成を検討した。本アルカロイドでは、ヒドロキシ基をフッ素原子で置換することにより化学的安定性が向上することも期待できる。また、6 位あるいは 7 位にフッ素原子を導入することで配座自由度が高いシクロヘキセン環の配座構造がどのように変化したか NMR スペクトルと理論計算により検証することを目指した。アオツツラフジより得たシノコクリンの第二級アミノ基をベンジルオキシカルボニル(Cbz)基で保護したのち、フェノール性ヒドロキシ基をベンジル(Bn)化して化合物 6 へ誘導し酸化マンガン(IV)で処理したところ、7 位アリルアルコールが選択的に酸化された化合物 7 が得られた。化合物 7 を DAST で処理することで、フッ化物 8 が得られた。化合物 8 は溶液中で Cbz 基が結合したカルバメートのシス - トランス異性体の混合物として存在し、スペクトルが複雑化するとともに線幅が広がりシャープなシグナルを与えないため、6 位の立体配置を決定することはできなかった。本反応は S_N2 反応で進行すると推定されることから、6 位は *R* 配置であると考えられた。化合物 8 を三塩化セリウム存在下、水素化ホウ素ナトリウムを用いて還元して化合物 9 を得たが、8 と同様にスペクトルデータから 7 位の立体配置を決めることはできなかった。化合物 6 を $Pd(OH)_2/C$ と 1,4-シクロヘキサジエンで処理するとベンジル基および Cbz 基が除去されてシノコクリンを与える。そこで、化合物 9 を同一条件で処理したところ化合物 10 は得られなかった。また、化合物 9 は Pd/C を触媒として水素による接触還元条件でも脱 Cbz 化は進行しなかった。

以上、ブルサトール系カッシノイド、RA 系環状ペプチド、およびモルヒナン型アルカロイドシノコクリンについて、それらの炭素骨格にフッ素原子の導入を検討した。ブルサトール系化合物では、1 位、4 位、11 位へフッ素原子を導入したアナログを合成した。RA 系化合物では、残基 3、残基 5 および残基 6 のチロシンの芳香環の 1 位にフッ素原子を導入したアナログ、残基 3 および残基 6 のメトキシ基をフルオロメチル基、もしくはジフルオロメチル基で置換したアナログや、残基 2 に 5-フルオロトリプトファンを導入したアナログを合成した。シノコクリンでは、その 6 位にフッ素原子を導入できたものの、保護基の除去は進行しなかった。

本研究により、さまざまな天然有機化合物の炭素骨格にフッ素原子を導入できることが示された。天然有機化合物の構造と反応性、ならびに各フッ素化試薬の特性を把握してフッ化天然有機化合物を合成することで、次世代天然有機化合物ライブラリーを構築することが可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yukio Hitotsuyanagi, Ryotaro Yokoyama, Huiyu Ren, Daiki Nojima, Yu Tokumaru, Tomoyo Hasuda	4. 巻 5
2. 論文標題 Synthesis and cytotoxicity evaluation of fluorinated brusatol, bruceosin, and dehydrobrusatol	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Results in Chemistry	6. 最初と最後の頁 100988
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rechem.2023.100988	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5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横山涼太郎、野島大暉、蓮田知代、一柳幸生
2. 発表標題 Brusatol のフッ化アナログの合成研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 葛 霄漢、蓮田 知代、一柳 幸生
2. 発表標題 抗腫瘍性環状ペプチドRA-VIIのフルオロメチルおよびジフルオロメチルエーテルアナログ
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深谷 晴彦、北村 理恵、竹谷 孝一、一柳 幸生
2. 発表標題 茜草根より単離したフェニルプロパノイド単位を持つRA系ペプチド化合物の構造
3. 学会等名 日本生薬学会 第66回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 一柳 幸生
2. 発表標題 RA系抗腫瘍性環状ペプチドの構造活性研究
3. 学会等名 日本生薬学会 第66回年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田 悠生、永石 千尋、蓮田 知代、一柳 幸生
2. 発表標題 抗腫瘍性環状ペプチドRA-VIIのフッ化アナログの合成研究（ ）
3. 学会等名 日本薬学会 第140年会
4. 発表年 2020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