

機関番号：36301
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590114
 研究課題名（和文） 活性型カルボニル基をファーマコフォアとする化合物ライブラリー構築に関する研究
 研究課題名（英文） Small molecular library of alpha-fluorinated and -hydroxylated carbonyl compounds synthesized by newly developed reactions
 研究代表者
 河瀬 雅美（KAWASE MASAMI）
 松山大学薬学部・教授
 研究者番号：20112641

研究成果の概要（和文）：新規有機合成反応の開発を迫り、官能基特異的な化合物ライブラリーの構築と創薬のリード化合物の発見を目的として、活性型カルボニル化合物（トリフルオロメチルケトン、ジフルオロメチルケトン、 α -ヒドロキシケトン、および α 、 β -不飽和ケトン）の新規合成法を開発し、それらの薬理活性物質探索研究から腫瘍選択性の高い細胞毒性を有する化合物やクオラムセンシング阻害活性物質を見出した。

研究成果の概要（英文）： A novel transformation of *N*-acylprolines to enol esters was realized by utilizing chlorodifluoroacetic or trifluoroacetic anhydrides in the presence of inorganic bases. Mesoionic 4-trifluoroacetyl-1,3-oxazolium-5-olates reacted with phosphorus-ylides to give 3(beta)-trifluoromethylpyrroles in good yields. Biological results: Screenings of a variety of structurally diverse ketones led to the identification of several apoptosis- and autophagy-inducers and quorum sensing (QS) inhibitors of alpha-trifluoromethylacyloins, *N*-acyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolines, and 2-trifluoroacetylbenzoxazoles as a lead molecule.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：化合物ライブラリー、カルボニル化合物、トリフルオロメチルケトン、クロロジフルオロメチルケトン、ヒドロキシケトン、アポトーシス、オートファジー、クオラムセンシング

1. 研究開始当初の背景

近年、含フッ素生理活性物質や医薬品が増え、含フッ素医薬品は1970年代には全医薬品の2%を占めるだけであったが、現在では18%を超えている（C. Isanbon *et al.*, *J. Fluorine Chem.*, **127**: 303, 2006）。2002年度、米国で新たに認可された医薬品31個のうち、9個

が含フッ素医薬品である。フッ素原子が導入される意義はさまざまであるが、フッ素原子を導入すればもとの化合物になかった特性が現れることが多い。カルボニル基の隣の炭素原子にフッ素原子が導入されると、フッ素原子の強力な電子求引性によりカルボニル基が求核攻撃されやすく、例えば、酵素のセ

リン、スレオニン、チロシン残基と結合し酵素阻害作用を示す。また、水中で容易に水和物を形成するため、種々のプロテアーゼの遷移状態アナログとしてのプロテアーゼ阻害剤として知られている(河瀬、有機合成化学協会誌、59: 755, 2001)。特に、アラキドニルトリフルオロメチルケトン(ホスホリパーゼ A₂)の特異的阻害剤として開発され、生化学分野でプローブとして汎用されている(M. Lehn *et al.*, *Pharm. Pharmacol. Commun.*, 5: 389, 1998)。ジフルオロメチル基 (>CF₂)はカルボニル (>C=O) 等価体と見なされ、各種プロテアーゼ阻害剤のファーマコフォアとして興味がある(G. Magueur *et al.*, *J. Fluorine Chem.*, 127: 637, 2006)。

今回、 α 位にフッ素、水酸基あるいはケトン基を有するカルボニル化合物の新規合成法の開発と化合物ライブラリーの構築を行う。しかし、現段階において含フッ素有機化合物の合成法は十分に整備されているとは言い難い。これまでの含フッ素化合物の合成法は、①高価なフッ素化試薬によるフッ素原子の導入か、②比較的安価で大量に入手可能な含フッ素化合物を出発物質として用いる方法である。しかしながら、①の方法を用いた場合、フッ素原子導入時における反応の制御が問題になる。一方、②のフッ素ビルディングブロックの開発は、多様性指向型合成法に基づく化合物ライブラリー構築の実現に適していると考えた。そして、含フッ素有機化合物から革新性の高い医薬リードやバイオプローブ化合物の探索可能な方法として注目した。

2. 研究の目的

新規有機合成反応の開発を追及し、官能基特異的な化合物ライブラリーを構築し、創薬のシード化合物を見出すことを目的とする。化合物としては活性型カルボニル化合物の新規合成法の開発とそれらの薬理活性物質探索研究を行う。本研究で対象とする活性型カルボニル化合物としては、 α 位にフッ素、水酸基、ケトン基あるいは二重結合を有するカルボニル化合物、すなわちトリフルオロメチルケトン、ジフルオロメチルケトン、 α -ヒドロキシケトンおよび α , β -不飽和ケトンである。

3. 研究の方法

有機合成と生物活性のグループ間の連携を保ちつつ、下記の研究テーマを推進する。

(1) リード化合物の合成：生物活性を示す化合物および類縁化合物の構造活性相関を行い、より活性の高い化合物を合成する。

(2) クロロジフルオロメチルケトン体とト

リフルオロメチルケトン体の合成を目的に、無水トリフルオロ酢酸あるいは無水クロロジフルオロ酢酸を利用する Dakin-West 反応を、これまで触媒として検討されていない無機塩基を用い検討する。

(3) 4-Trifluoroacetyl-1,3-oxazolium-5-olates の分子変換反応によるトリフルオロメチルケトン基を有する複素環化合物の合成を目的として、リンイリドとの反応を詳細に検討する。

(4) アミノ酸の Dakin-West 反応を利用して、トリフルオロメチルケトンあるいはクロロジフルオロケトンへの変換反応を目的として、*N*-チオアシル- α -アミノ酸と無水トリフルオロ酢酸との反応を検討する。

(5) クロロジフルオロメチルケトンの新規合成法の開発：2-メチルベンズオキサゾールをピリジン存在下、無水クロロジフルオロ酢酸との反応を検討し、クロロジフルオロメチルケトン基の導入反応の確立を目指す。

(6) クロロジフルオロアセチル基の新しい導入反応を見出しているため、クロロジフルオロメチル基上のクロルを変換する反応の開発を行い、ジフルオロメチルケトン類の新規構築法を確立する目的で、クロル基を他の官能基に変換する反応を検討する。

(7) 腫瘍選択性の高い細胞毒性を示す物質の探索：ヒト口腔扁平上皮癌細胞やヒト口腔正常細胞を種々の濃度の試料あるいは対照の抗腫瘍薬と培養し、50%細胞障害濃度(CC₅₀)を求める。正常細胞に対するCC₅₀値を癌細胞に対するCC₅₀値で割り、腫瘍選択係数TS値を求める。

腫瘍選択性の高い細胞毒性化合物については、細胞死のタイプ(アポトーシス、オートファジー、ネクローシス)を同定し、最終的に細胞死誘導のメカニズムを解明する。また、抗ヘリコバクターピロリ活性物質、ウレアーゼ阻害活性物質、多剤耐性克服物質などの探索も行う。

(8) 強力な抗ヘリコバクターピロリ活性を示す1-(2-benzoxazolyl)-3,3,3-trifluoropropan-2-oneのベンゼン部位に種々の置換基(フッ素、クロロ、メトキシル、メチル、シアノ基)を導入した誘導体を合成し、それらの抗菌作用を検討し、緑膿菌などの薬剤耐性病原菌の抗菌薬として期待されるクオラムセンシング(QS)阻害活性を検討する。

(9) 研究体制：本研究では新規有機合成反応の開発を中心に、得られた新規化合物をリード化合物としてその関連化合物の生物活性を指標として構造活性相関を行う。

分担者間の連携：合成と生物活性のグループ間の連携を保ちながら、分担者間の研究成果を踏まえ、化合物の選定および研究の方向性を決定する。

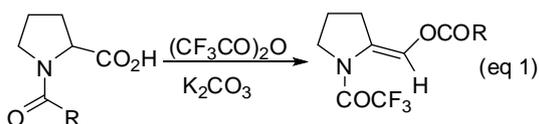
① 有機合成：河瀬、萩本(松山大学)

- ② 腫瘍選択性の高い物質の探求:坂上(明海大学)
- ③ 抗菌物質の探索: Joseph Molnar 教授 (ハンガリー)

4. 研究成果

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。

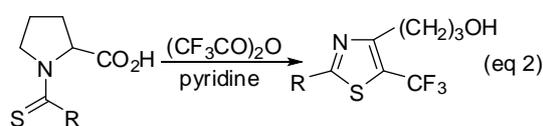
(1) クロロジフルオロメチルケトン体とトリフルオロメチルケトン体の合成: 無水トリフルオロ酢酸あるいは無水クロロジフルオロ酢酸を利用する Dakin-West 反応を、これまで触媒として検討されていない無機塩基を用い検討した。目的のクロロジフルオロメチルケトン体とトリフルオロメチルケトン体の生成は、ともに低収率であった。しかし、N-アシルプロリンの反応では主生成物としてエノールエステルの生成を見出した(式1)。本反応は、メソイオン中間体を經由しユニークな N-acyl 転移を起こしていることを明らかにした。(雑誌論文①)



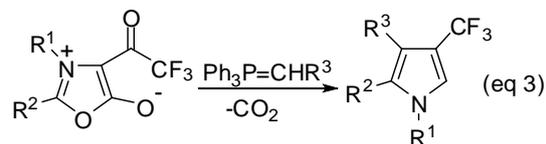
(2) α -トリフルオロメチルアシロインによるヒト口腔癌細胞に対する細胞障害作用のメカニズムの解明: α -トリフルオロメチルアシロインは、ヒト口腔癌細胞に対して高い腫瘍選択性を示すが、DNA の断片化やカスパーゼの活性化などのアポトーシスマーカーをほとんど誘導しない。今回、アクリジン陽性の酸性オルガネラの形成などのオートファジーマーカーを誘導することを見出した(雑誌論文②)。

(3) N-アシルテトラヒドロイソキノリン-1-カルボン酸と無水トリフルオロ酢酸の反応から得られた 1-trifluoroacetyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline 類と 1 位にエステル基、カルボキシル基、ケトン基を有するテトラヒドロイソキノリン類および関連化合物 36 個の化合物ライブラリーを構築し、ヒト口腔扁平上皮癌細胞とヒト口腔正常細胞に対する 50%細胞障害濃度(CC₅₀)を求めた。正常細胞に対する CC₅₀ 値を癌細胞に対する CC₅₀ 値で割り、腫瘍選択係数を求めたところ、腫瘍選択性の高い細胞毒性化合物を見出した。これらの化合物は、DNA の断片化やカスパーゼの活性化などのアポトーシスマーカーをほとんど誘導しなかったが、アクリジン陽性の酸性オルガネラの形成などのオートファジーマーカーを誘導することを見出した。(雑誌論文④)

(4) アミノ酸の Dakin-West 反応を利用して、トリフルオロメチルケトンあるいはクロロジフルオロケトンへの変換反応を目的として、N-チオアシル- α -アミノ酸と無水トリフルオロ酢酸との反応を検討した。プロリンから誘導された N-チオアシルプロリンをピリジン存在下、無水トリフルオロ酢酸と反応させると、目的のトリフルオロメチルケトン体ではなく、5-trifluoromethylthiazole 類が好収率で得られた(式2)。しかし、N-benzyl-N-thioacyl-phenylalanine では、10%前後の低収率であった。本反応は、N-チオアシル- α -アミノ酸が脱水閉環したメソイオン中間体を經由して進行していると考えられる。なお、本反応はトリフルオロメチル基が導入されたチアゾール類の合成法として有用である。(学会発表①)



(5) 4-Trifluoroacetyl-1,3-oxazolium-5-olates の分子変換反応によるトリフルオロメチルケトン基を有する複素環化合物の合成を目的として、リンイリドとの反応を詳細に検討した。目的のトリフルオロメチルケトン類は得られなかったが、3-トリフルオロメチルピロール類が好収率で生成した(式3)。(学会発表②) 本反応は、入手容易な原料からこれまで合成困難な 3-trifluoromethylpyrrole 類の簡便な合成法を提供している。(雑誌論文⑧)



(6) 強力な抗ヘリコバクターピロリ活性を示す 1-(2-benzoxazolyl)-3,3,3-trifluoro-propan-2-one のベンゼン部位に種々の置換基(フッ素、クロロ、メトキシル、メチル、シアノ基)を導入した誘導体を合成し、それらの抗菌作用を検討し、緑膿菌などの薬剤耐性病原菌の抗菌薬として期待されるクオラムセンシング(QS) 阻害活性を示す化合物を見出した。

(7) クロロジフルオロアセチル基の新しい導入反応を開発したので、クロロジフルオロメチル基上のクロルを変換する反応による、ジフルオロメチルケトン類の新規合成法を確立する目的で、クロル基を他の官能基に変換する反応を種々検討し、有機亜鉛化学を基盤とする反応により目的とする変換反応が達成できた。

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 10 件)

- ① M. Saeki, Y. Hagimoto, H. Uno, M. Kawase, The Dakin-West Reaction of *N*-Acyloprolines in the Presence of Inorganic Bases: Unexpected Formation of Enol Esters. *Heterocycles*, **2009**, 79, 821-830. (査読あり)
- ② A. Ideo, K. Hashimoto, J. Shimada, M. Kawase, H. Sakagami, Type of Cell Death Induced by alpha-Trifluoromethyl Acylolins in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Anticancer Res.*, **2009**, 29, 175-182. (査読あり)
- ③ U. Das, H.N. Pati, A.K. Panda, E. De Clercq, J. Balzarini, J. Molnar, Z. Barath, I. Ocsozski, M. Kawase, H. Sakagami, J.R. Dimmock, 2-(3-Aryl-2-propenoyl)-3-methylquinoxaline-1,4-dioxides: A Novel Cluster of Tumor-specific Cytotoxins which Reverse Multidrug Resistance. *Bioorg. Med. Chem.*, **2009**, 17, 3909-3915. (査読あり)
- ④ H. Hatano, H. Takekawa, K. Hashimoto, M. Ishihara, M. Kawase, C. Qing, W. Qin-Tao, H. Sakagami, Tumor-specific Cytotoxic Activity of 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline Derivatives against Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *Anticancer Res.*, **2009**, 29, 3079-3086. (査読あり)
- ⑤ M. Kawase, H. Sakagami, N. Motohashi, The Chemistry of Bioactive Mesoionic Heterocycles. *Top. Heterocycl. Chem.* (Bioactive Heterocycles VII), Springer-Verlag, **2009**, 16, 135-152. (査読あり)
- ⑥ U. Das, H. Sakagami, Q. Chu, Q. Wang, M. Kawase, P. Selvakumar, R.K. Sharma, J.R. Dimmock, 3,5-Bis(benzylidene)-1-[4-2-(morpholin-4-yl)ethoxyphenylcarbonyl]-4-piperidone Hydrochloride: A Lead Tumor-specific Cytotoxin Which Induces Apoptosis and Autophagy. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 20, 912-917. (査読あり)
- ⑦ U. Das, A. Doroudi, H.I. Gul, H.N. Pati, M. Kawase, H. Sakagami, Q. Chu, J.P. Stables, J.R. Dimmock, Cytotoxic 2-Benzylidene-6-(nitrobenzylidene)cyclohexanones Which Demonstrate Substantially Greater Toxicity for Neoplasms than Non-malignant Cells. *Bioorg. Med. Chem.*, **2010**, 18, 2219-2224. (査読あり)
- ⑧ R. Saijo, Y. Hagimoto, M. Kawase, New

Synthesis of 3-Trifluoromethylpyrroles by Condensation of Mesoionic 4-Trifluoroacetyl-1,3-oxazolium-5-olates with Phosphorus-ylides. *Org. Lett.*, **2010**, 14, 4776-4779. (査読あり)

- ⑨ H.N. Pati, U. Das, H. Sakagami, M. Kawase, Q. Chu, Q. Wang, J.P. Stables, J.R. Dimmock, 1,3-Diaryl-2-propenones and 2-Benzylidene-1,3-indandiones: A Quest for Compounds Displaying Greater Toxicity to Neoplasms than Normal Cells. *Archiv der Pharmazie*, **2010**, 9, 535-541. (査読あり)
- ⑩ S. Das, U. Das, H. Sakagami, K. Hashimoto, M. Kawase, D. K. J. Gorecki, J. R. Dimmock, Sequential Cytotoxicity: A Theory Examined Using a Series of 3,5-Bis(benzylidene)-1-diethylphosphono-4-oxopiperidines and Related Phosphonic Acids. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, 20, 6464-6468. (査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 萩本有理、河瀬雅美、*N*-チオアシル- α -アミノ酸の Dakin-West 反応を利用した 5-トリフルオロメチルチアゾール類の合成、日本薬学会 130 年会、2009/3/28 (岡山)
- ② 西條 亮介、萩本 有理、河瀬 雅美、メソイオンとイリドの反応：3-トリフルオロメチルピロール類の合成、第 36 回反応と合成の進歩シンポジウム、2010/11/1 (名古屋)

[その他]

ホームページ等

<http://syl.matsuyama-u.ac.jp/mtuhp/KgApp?kyoinId=ymkogbykggy>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河瀬 雅美 (KAWASE MASAMI)
松山大学薬学部・教授
研究者番号：20112641

(2) 研究分担者

萩本 有理 (HAGIMOTO YURI)
松山大学薬学部・講師
研究者番号：30435078

(3) 連携研究者

坂上 宏 (SAKAGAMI HIROSHI)
明海大学歯学部・教授
研究者番号：50138484