

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：32660  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2012～2014  
 課題番号：24590025  
 研究課題名(和文)分子標的型インドールアルカロイドの新規合成とそのアポトーシス誘導抗がん機序の解明  
  
 研究課題名(英文)A Novel Synthesis of Molecular-Targeting Indole Alkaloids and Elucidation of Anticancer Mechanism by Inducing Apoptosis  
  
 研究代表者  
 小中原 猛雄 (KONAKAHARA, Takeo)  
  
 東京理科大学・理工学部・教授  
  
 研究者番号：80084333  
  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：一連の  $\beta$ -カルボリン誘導体の抗腫瘍活性をヒト子宮頸がん由来の細胞HeLa S-3で調べ、その作用機序を明らかにすると共に、担がんマウスによる安全性の検証を行った。この化合物は強いチューブリン重合阻害活性を示し、マウスのがん細胞の増殖を抑制した。また、各種  $\beta$ -カルボリン及びエリプチシン誘導体の配糖体やPEGエステルを多種合成し、水溶性、親油性、抗腫瘍活性間の相互関係を明らかにした。さらに、新規環境調和型有機合成法としてフルオラス固相合成法を提案し、本法が液相法、固相法の長所を活かした新しい方法であることを明らかにした。一方、ピリドピリミジン誘導体の新規合成法の開発も行い、興味ある結果を得た。

研究成果の概要(英文)：First, we have synthesized a series of new  $\beta$ -carboline derivatives, and evaluated their antitumor activity against HeLa S-3 cells to clarify its action mechanism and to provide its safety for a biological body using tumor-bearing mice. This compound acted as a tubulin polymerization inhibitor stronger than nocodazole, and suppressed the growth of the tumor of the mice. Glycosides and polyethylene glycol esters of many kinds of both  $\beta$ -carboline and ellipticine derivatives were also synthesized to evaluate their hydrophilicity and lipophilicity in connection with antitumor activity.

Second, we advocated a new concept of the fluorous-solid phase (FSP) synthesis, using a macroreticular fluorous polystyrene resin, as a sustainable organic synthesis. This new methodology provides both high reactivity as an advantage of a liquid-phase reaction and easy separation of the product as that of a solid-phase reaction. Finally, we applied it to the synthesis of  $\beta$ -carboline derivatives.

研究分野：医歯薬学

 キーワード：抗がん剤 オラス合成  $\beta$ -カルボリン エリプチシン ピリジン ピリミジン アポトーシス ヘテロ環合成 フル

## 1. 研究開始当初の背景

エリプチシン、 $\beta$ -カルボリンはインドールアルカロイドの一種であり、いずれも興味ある生理活性を示す。その誘導体の多くはインターカレーターとしてDNAと強い相互作用をもつほか、トポイソメラーゼ (および ) またはCDKを阻害し、抗腫瘍活性を示す。したがって、これらの化合物は酵素およびDNAを認識する優れた分子素子として機能する可能性がすこぶる大きく、近年これらの化合物の抗腫瘍活性に関する報告が急増している。これまでに我々は350種類以上の  $\beta$ -カルボリン誘導体を合成し、その抗腫瘍活性を精査した結果、3-(3-phenoxybenzyl)amino- $\beta$ -carboline (**1**)

が高い抗腫瘍活性

(HeLa S-3細胞;  $IC_{50}$

= 0.11  $\mu$ M)を示し、

G2/M期停止を經由

してアポトーシスを誘導することを明らかにした(T. Konakahara *et al*, *Eur. J. Med. Chem.*,

**2011**, *46*, 636-646)。また、この化合物は  $\beta$ -チューブリンを標的としているタキソールなどと異なり、 $\beta$ -チューブリンを標的としていることもわかり(T. Konakahara *et al*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*, 4784-4787)、これまでにない全く新しい作用機序をもつ新規抗がん剤のシーズ化合物であることを明らかにした。

本研究では主に  $\beta$ -チューブリンを標的とする  $\beta$ -カルボリン系新規抗がん治療薬の創製を目指す。遷移金属触媒を用いる  $\beta$ -カルボリンおよびエリプチシン骨格の新規構築法の開発と併せ、これらの化合物を新しい環境調和型合成法とも言えるフルオラス合成法に適用するとともに、液相法と固相法の長所を併せもつ新たな合成法、フルオラス固相法を開発する。このような研究例はこれまでに殆どなく、複素環化合物の環境調和型合成研究が活発化している現在、注目されるべき位置にある。また、置換基の種類及び位置が酵素活性、強いては抗がん活性に与える影響、生成する酵素-アルカロイド複合体の構造を解明した例は未だなく、近年ポストゲノム創薬の手法として世界的に研究が活性化されつつある、ケミカルバイオロジーの研究分野にも貴重な情報を提供するものである。

## 2. 研究の目的

化学療法剤開発ではドラッグ、酵素 (またはDNA) 複体内での高い相互作用を実現

することが重要である。そのため本研究ではFig. 1のようなインドールアルカロイド骨格に膜透過性、水溶性、標的分子結合性を付与し、その抗がん活性を検討する。

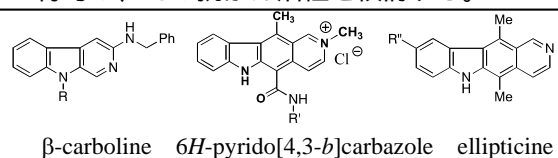


Fig.1. Indole alkaloid

### (1) $\beta$ -カルボリン系分子標的型抗がん剤の開発とその構造活性相関:

$\beta$ -カルボリン誘導体は様々な生理活性を示し、抗腫瘍活性を有する化合物である。我々はこれまでに、様々な置換基を有する

$\beta$ -カルボリン誘導体を合成し、その抗腫瘍活性について報告してきた。その結果、化合物**1**が、既存の抗がん剤であるアドリアマイシンなどと同程度の高い抗腫瘍活性を示し(特願2005-146762)、アポトーシスを誘導することを明らかにした。しかし癌細胞への選択性や水溶性の低さが問題となっており、本研究では、癌細胞に特異的に発生するとされるグルコーストランスポーター(GLUT)を利用するために、 $\beta$ -カルボリン誘導体の9位にグルコピラノシル基のような糖骨格を導入する。これにより、水溶性が増すとともに、癌細胞に特異的に取り込まれ、細胞内でドラッグを放出するプロドラッグとして作用することが期待される。また、これまでの研究で我々は、上記  $\beta$ -カルボリン誘導体が  $\beta$ -チューブリンを標的分子とすることを明らかにした。そこで、この  $\beta$ -カルボリンを基本骨格とする種々の誘導体を合成し、その構造活性相関を明らかにすると共に、その作用機序を明らかにする。この化合物は、 $\beta$ -チューブリンを標的とするタキソールなどと違い、これまでにない全く新しい作用機序をもつニュータイプの抗がん剤となることが期待される。また、液相法と固相法のそれぞれの長所をもつ新しいフルオラス固相法を開発するとともに、遷移金属触媒を用いるカップリング反応を利用して、これらの化合物およびその類縁体の簡便かつ効率的で収率の高い新規合成法を開発する。

### (2) エリプチシン系分子標的型抗がん剤の開発とその構造活性相関:

我々は、これまでの研究でエリプチシンが強い抗腫瘍活性を示す一方(特願2005-

144012)、肝細胞においてMAT1Aを発現することを明らかにしている。この研究では、エリプチシンおよびその類縁体の骨格(Fig. 1)に種々の置換基を導入し、その構造活性相関を明らかにする。はじめに、これらの化合物を簡便に合成する液相法を開発し、さらにこの方法を固相法およびフルオラス法に拡張する。そして、一連の研究の中で置換基の導入位置、種類および長さが活性に与える影響を明らかにする。また、 $\beta$ -カルボリンの場合と同様に、グルコピラノシル基のような糖骨格をリンカー経由で導入し、新規エリプチシン配糖体をプロドラッグとして合成し、その細胞特異性を検証する。また、これまでに我々は鈴木-宮浦カップリング反応を用いるエリプチシンの新規全合成を報告したが(T. Konakahara *et al.*, *Tetrahedron Letters*, **2010**, 51, 2335–2338)、その改良法の開発も併せて行う。

### (3) 作用機序の分子生物学的解明研究：

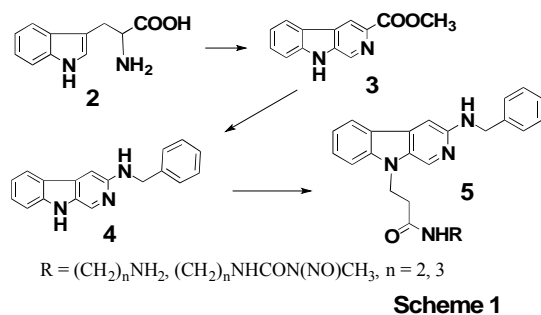
$\beta$ -チューブリンには多くのアイソフォームが存在するが、化合物1を中心とするその周辺化合物と相互作用するのは、6- $\beta$ -チューブリンであることを明らかにした。本研究では6- $\beta$ -チューブリンのプロモーターアッセイを行い、その認識配列の同定を行う。

### 3. 研究の方法

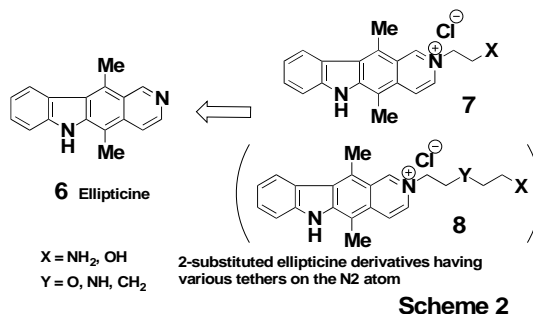
下記の方法により各種インドールアルカロイドを合成し、その抗がん活性とその発現機構を調べる。

#### (1) $\beta$ -カルボリン誘導体の新規液相合成法の開発と作用機序の解明：

すでに報告した方法に従い(*Heterocycles*, **1998**, 48, 2477–2480)、トリプトファン(2)を出発原料として、 $\beta$ -カルボリン-3-カルボン酸エステル3を合成し、これを鍵化合物として、各種3-benzylamino- $\beta$ -carboline 誘導体4,5を合成する(Scheme 1)。

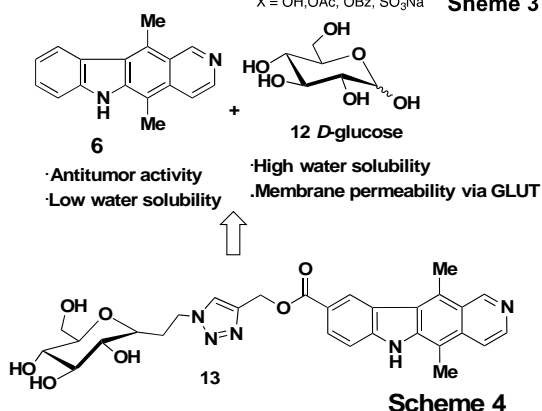
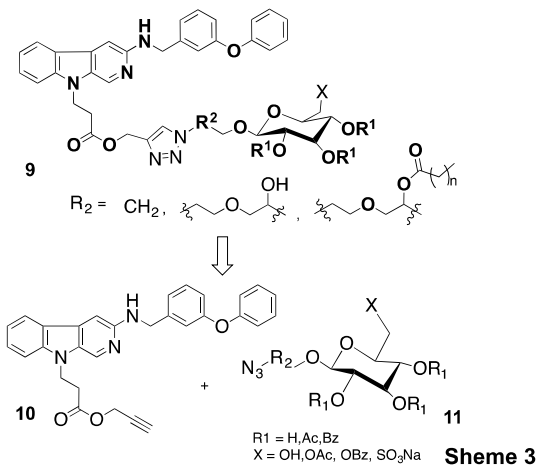


また、エリプチシンの抗腫瘍活性に著しい影響を与えるN2上のテザー(Scheme 2)の種類をさらに種々変えて、その構造活性相関と作用機序を明らかにする。



#### (2) $\beta$ -カルボリンおよびエリプチシン配糖体の合成と作用機序の解明：

がん細胞ではGLUTが異常に発現するとされている。もしこの性質を利用することができれば、 $\beta$ -カルボリンまたはエリプチシン配糖体(プロドラッグ)を特異的にがん細胞内に送り込むことができる。このことにより、がん細胞だけを攻撃する副作用の低い抗がん剤を創製できる可能性がある。配糖体の逆合成解析をScheme 3, 4に示す。これまでの研究で最も強い活性を示した3-フェノキシベンジルアミノ体骨格のN9 原子上にリンカーを介してプロパルギルエステルを導入し(化合物10)、グルコースに導入されたアジド(化合物11)、



物11)との間でクリック反応により配糖体9を合成する(Scheme 3)。また、エリプチシンの場合、骨格の9位にカルボキシ基を導入後、同様にプロパルギルエステルとし、グルコースアジドとのクリック反応により、配糖体13を合成する(Scheme 4)。得られた配糖体の抗がん活性を評価するとともに、がん細胞特異性を検証し、GLUT 経由での細胞内取込み効率を調べる。

(3) 固相およびフルオラス固相合成法による  $\beta$ -カルボリン配糖体合成法の開発：

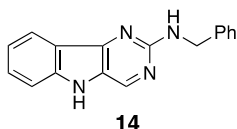
Scheme 3および4に示したターゲット化合物の合成では、ステップ数が長く、有機溶媒に溶けにくい糖の誘導体を用いるため、長時間を要し、さらに取扱が困難である。そこで、本研究では液相法で開発したこれらの化合物をフルオラス固相法に拡張する。

(4) エリプチシン類縁体の固相合成法の開発：

Scheme 1,2に示したターゲット化合物の合成では、ステップ数が長く、有機溶媒に不溶のピリジニウム塩を用いるため、長時間を要し、さらに取扱が困難である。そこで、本研究では液相法で開発したこれらの化合物合成法を固相法およびフルオラス法に拡張する。

(5) 遷移金属を用いるカップリング反応による  $\beta$ -カルボリン骨格の新規構築法の開発：

これまでに我々は化合物1が高い抗腫瘍活性を示すことを明らかにした。一方、4位の炭素原子が窒素原子に置換された5*H*-pyrimido-[5,4-*b*]indole誘導体14は中枢神経系に作用し、多種多様の生理活性を示すことが知られているものの、抗がん剤を目的とした構造活性相関の研究は行われていない。そこで本研究では、新たな抗がん剤を開発することを目的に、化合物14の合成に着手する。



#### 4. 研究成果

(1)  $\beta$ -カルボリン誘導体の構造活性相関における構造最適化とその作用機序の解明：

我々がこれまでに開発した化合物1の高い抗腫瘍活性をさらに凌駕する高い抗腫瘍活性をもつ  $\beta$ -カルボリン誘導体開発のために、化合物1の1位置換基の最適化を行った。また、化合物1の水溶性向上のために、種々の

長さのPEG鎖を化合物1の9位に2個のメチレン鎖を介してエステル結合で導入したところ、高い水溶性が得られた。また、化合物1と同等の抗腫瘍活性をもつ化合物4の作用機序解明のために、細胞免疫染色法により4による処理前後の微小管構造の変化を観察した。その結果、通常、細胞質全体に網目状の重合チューブリンが観察されるのに対し、4はノコダゾールと同様に微小管ネットワークの形成を阻害した。さらに、チューブリン重合阻害活性試験を行った結果、4はノコダゾールよりも強い重合阻害能を示した(投稿準備中)。

一方、4の安全性を調べるために、HeLa S-3担がんマウスを用いた動物実験を行い、4の投与限界濃度を求めた。投与限界濃度以下での投薬試験の結果、化合物4はマウスのがんの増殖を抑制する効果を示すことが明らかになった(投稿準備中)。

(2) ellipticin-2-ium 塩のN2上のテザーが与える活性への影響：

Scheme 2に示す12種類の誘導体を合成し、そのHeLa S-3に対する抗腫瘍活性を精査した。その結果、ある誘導体は非常に高い活性( $IC_{50}=1.3-19.3 \mu M$ )を示し、また、9位へのOH基の導入はその活性を著しく促進した。また、これらの化合物の水溶性はellipticineそのものに比べ、大きく向上した。

(3)  $\beta$ -カルボリンおよびエリプチシン配糖体の合成：

$\beta$ -カルボリンにグリコシル基を導入した誘導体9を合成し(Scheme 3)、この化合物が高い水溶性を発現することを確認した。また、エリプチシンでは化合物13の構造(Scheme 4)を改良し、9-hydroxyellipticineを母核とする化合物13'のエステル誘導体を合成した。そして、これらの化合物の抗腫瘍活性が親化合物のそれより少し低下するものの依然として高い抗腫瘍活性を維持することを始めて明らかにした(投稿中)。

(4)  $\beta$ -カルボリン類縁体の新規合成：

化合物1の合成には8ステップ以上の多段階を必要とする。今回開発した方法は、 $\beta$ -カルボリンの合成を可能にするばかりでなく、 $\beta$ -カルボリン類縁体5*H*-pyrimido[5,4-*b*]indole (14)を選択的に高収率で、しかもわずか2ステップで合成することができる画期的な方法である(投稿準備中)。

(5) エリプチシンの5-カルボン酸 PEG エステルの合成とその抗腫瘍活性、水溶性、脂溶性の評価：

11-methyl-6H-pyrido[4,3-*b*]carbazole-5-carboxylic acid 及び相当する 9-methoxy 置換体の PEG エステル 12 種類を合成した。そして、これらの化合物の抗腫瘍活性、水溶性および脂溶性 (log P) を評価した。エチレングリコール鎖の末端はメトキシ基よりもヒドロキシ基の方が抗腫瘍活性も水溶性も高いことがわかった。また、エチレングリコール鎖長 *n* が長くなるにつれて、水溶性は向上したが、抗腫瘍活性は若干低下した。また、HPLC 法で求めた各化合物の log P 値と抗腫瘍活性の相間を調べた (投稿準備中)。

(6) エリプチシンの6-プロピオン酸 PEG エステルの合成とその抗腫瘍活性、水溶性、脂溶性の評価：

5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-*b*]carbazol-6-yl)propanoic acid 及び相当する 9-methoxy 置換体の methoxy-PEG エステル 10 種類を合成した。そして、これらの化合物の抗腫瘍活性、水溶性および脂溶性 (log P) を評価した。その結果、PEG 鎖の導入により抗腫瘍活性は若干低下したが、PEG 鎖長 *n* が大きくなってあまり変化しないことがわかった。一方、水溶性は *n* の増加と共に増大したが、log P の値はほぼ一定であった。

(7) ピリドピリミジン類の合成とその抗腫瘍活性：

3,5-dimethylisoxazole を出発原料とし、8~10 工程を経て種々のピリドピリミジン誘導体を比較的良い収率で合成することに成功し、さらに、これらの化合物の HeLa S-3 細胞に対する抗腫瘍活性を評価した。その結果、これまで抗菌剤としてみられてきたこれらの類縁体が、抗腫瘍剤としても有効であることをはじめて明らかにした。

(8) 4-aminopyrimidine および 4-aminoquinazoline 誘導体の合成：

塩基として <sup>t</sup>BuOK、添加剤として 18-crown-6 を用い、<sup>t</sup>BuOH 中 100 °C で *N*-シアノエナミンとイソシアニドを反応させることで、種々の 4-アミノピリミジン誘導体を比較的高い収率で合成するにはじめて成功した。また、基質を *N*-シアノエナミンから 2-アミノベンゾニトリルに代え、同様の条件下でイソシアニドと反応させることで、種々の 4-アミ

ノキナゾリン誘導体を中程度の収率で得ることに成功した (投稿準備中)。

(9) *N*-カルボリン誘導体のフルオラス固相合成法の達成：

新規なフルオラスポリスチレンゲル(FPS)を開発し、これを用いて液相法の高い反応性と固相法の容易な単離精製を特徴とする新規なフルオラス固相合成法を、有機合成のひとつとして新たに提唱した。この FPS は化学的に高い耐久性をもち、幅広い反応に適用可能であることがわかった。本研究では、*N*-カルボリン誘導体の合成を通して、通常の液相法、固相法と比較検討し、フルオラス固相合成法が優れた合成法であることを明らかにした。

## 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 31 件)

A Novel Macroreticular-Type Fluorous Polystyrene resin and its application to the Synthesis of a 3-Amino- $\beta$ -carboline Derivative with *N*-Methyl-*N*-nitrosourea Conjugation via Fluorous Solid-Phase Reaction: A Comparative Study of Fluorous solid-, Solid-, and Liquid-Phase Reactions, Keiko Suzuki, Munenori Kumagai, Masamichi Utsunomiya, Norio Sakai, Takeo Konakahara\*, *Tetrahedron*, **2015**, 71. DOI: 10.1016/j.tet.2015.05.072, on-line. 査読有

Synthesis and in vitro antitumor activity of novel 2-alkyl-5-methoxycarbonyl-11-methyl-6H-pyrido[4,3-*b*]carbazol-2-ium and 2-alkyl-ellipticin-2-ium chloride derivatives, Ryota Mori, Asako Kato, Kousuke Komenoi, Haruaki Kurasaki, Touru Iijima, Masashi Kawagoshi, Y. B. Kiran, Shoichi Takeda, Norio Sakai, Takeo Konakahara\*, *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, 82, 16-35. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.05.032. 査読有

Synthesis, Cyclization, and Evaluation of the Anticancer Activity Against HeLa S-3 Cells of Ethyl 2-Acetylamino-3-Ethynylazulene-1-Carboxylates, Marie Hyoudou, Hajime Nakagawa, Takahiro Gunji, Yoshino Ito, Yu Kawai, Reiko Ikeda, Takeo Konakahara, and

Noritaka Abe, *Heterocycles*, **2012**, 86(1), 233-244. DOI: 10.3987/COM-12-S(N)4. 査読有

Structure-activity relationship in the anti-tumor activity of 6-, 8- or 6,8-substituted 3-benzyl-amino- $\beta$ -carboline derivatives, Reiko Ikeda, Takanori Kimura, Tatsuya Tsutsumi, Syunsuke Tamura, Norio Sakai, Takeo Konakahara\*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2012**, 22, 3506-3515. DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.03.077. 査読有

Augmented autocrine bone morphogenic protein (BMP) 7 signaling increases the metastatic potential of mouse breast cancer cells, Hirofumi Sakai, Mutsuo Furihata, Chie Matsuda, Munehisa Takahashi, Hiroshi Miyazaki, Takeo Konakahara, Toru Imamura, Tomoko Okada, *Clinical & Experimental Metastasis*, **2012**, 29, 327-338. DOI: 10.1007/s10585-012-9453-9. 査読有

[学会発表](計 100 件)

5位に水溶性置換基をもつエリプチン誘導体の合成とその抗腫瘍活性、本間 翔二、坂井 教郎、荻原 陽平、小中原 猛雄、第68回有機合成化学協会関東支部シンポジウム(新潟シンポジウム) 新潟大学五十嵐キャンパス(新潟県・新潟市)、2014.11.29-30

6位に水溶性置換基を有するエリプチン誘導体の合成とその評価、赤羽 庸介、坂井 教郎、荻原 陽平、小中原 猛雄、第68回有機合成化学協会関東支部シンポジウム(新潟シンポジウム) 新潟大学五十嵐キャンパス(新潟県・新潟市)、2014.11.29-30

9位に糖骨格をもつエリプチン誘導体の合成とその抗腫瘍活性、佐藤 直哉、赤羽 庸介、坂井 教郎、小中原 猛雄、第44回複素環化学討論会、札幌市民ホール(北海道・札幌市)、2014.9.10-12

9位に親水基を有する3-(*m*-フェノキシベンジル)アミノ- $\beta$ -カルボリン類の合成、對馬 大郎、木越 悠太、伊藤 与詩乃、池田 玲子、坂井 教郎、小中原 猛雄、第43

回複素環化学討論会、長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)、2013.10.18

1-置換- $\beta$ -carboline誘導体の抗腫瘍活性における構造最適化、荻原 崇史、武江 彩子、伊藤 与詩乃、池田 玲子、坂井 教郎、小中原 猛雄、第43回複素環化学討論会、長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)、2013.10.18

-カルボリン誘導体の抗腫瘍活性発現における認識部位の同定、金子 可奈、池田 玲子、木村 貴則、坂井 教郎、小中原 猛雄、第85回日本生化学会大会、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)、2012.12.14-16

カップリング反応を用いる $\beta$ -カルボリン類縁体の新規合成法の開発、築場 康佑、池田 玲子、坂井 教郎、小中原 猛雄、第64回有機合成化学協会関東支部新潟(長岡)シンポジウム、長岡技術科学大学(新潟県・長岡市)、2012.12.1-2

-carboline 8位配糖体の合成、大高 聡仁、池田 玲子、坂井 教郎、小中原 猛雄、第42回複素環化学討論会、京都テルサ(京都府・京都市)、2012.10.11-13

[図書](計 1 件)

(編集及び執筆分担)小中原猛雄(共著者計28名)東京理科大学安全教育企画委員会編、「研究のためのセーフティサイエンスガイド - これだけは知っておこう」、朝倉書店、169頁(i-ii、1-6、147-156頁)、2012.3.20.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小中原 猛雄 (KONAKAHARA Takeo)  
東京理科大学・理工学部・教授  
研究者番号: 80084333

### (2)研究分担者

坂井 教郎 (SAKAI Norio)  
東京理科大学・理工学部・准教授  
研究者番号: 00328569

池田 玲子 (IKEDA Reiko)  
東京理科大学・理工学部・助教  
研究者番号: 60516441

青木 伸 (AOKI Shin)  
東京理科大学・薬学部・教授  
研究者番号: 00222472