

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18590113

研究課題名（和文）核内受容体 LXR $\alpha$  選択的アゴニスト リカルデイン類の合成と動脈硬化改善薬の創製研究課題名（英文）Synthesis of the Selective Nuclear Receptor LXR $\alpha$  Agonist, Riccardins and Development of Anti-arteriosclerosis Drug

研究代表者

福山 愛保 (FUKUYAMA YOSHIYASU)

徳島文理大学・薬学部・教授

研究者番号：70208990

研究成果の概要：大環状ビスビベンジル化合物リカルデイン C はコレステロールのセンサー蛋白である核内レセプター LXR $\alpha$  の特異的アゴニスト活性を有する天然物として知られ、新しい抗コレステロール薬への展開が期待されている。リカルデイン C の効率的合成法の開発と、活性発現に必要な構造因子を明らかにする目的で合成研究を行い、その合成に成功した。さらに、7 種の誘導体を調製し、アゴニスト活性を検討した結果、リカルデイン C のみに LXR $\alpha$  特異的アゴニスト活性が発現したが、他の誘導体には全く活性が認められなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,400,000	0	1,400,000
2007 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	600,000	4,000,000

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：①リカルデイン ②パラジウム触媒 ③核内受容体 ④コレステロール代謝  
⑤天然物合成 ⑥大環状ビスビベンジル ⑦LXR $\alpha$ アゴニスト ⑦鈴木・宮浦反応

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 動脈硬化は、ガンに次いで二番目の死亡原因である脳卒中や虚血性心疾患等の原因因子として認知され、その予防と治療薬の開発は社会的ニーズである。動脈硬化疾患のうち最も重要で多いのはアテローム動脈硬化で、その病態は動脈内層の肥厚化（アテローム）を特徴とし、肥厚化したアテロームにはコレステロールを多く含んでいる。これは、

マクロファージが多量な酸化低密度リポ蛋白（酸化 LDL）を取り込み、血管壁の内皮細胞の隙間に入り込んでコレステロールを抱えたまま泡沫細胞となることから始まる。アテローム動脈硬化を予防や改善するには、血中コレステロール濃度を制御する必要がある。

(2) 現在、コレステロールの生合成を阻害するスタチン類がコレステロール値降下薬と

して使用されているが、コレステロール生合成の初期段階を阻害するためステロイドホルモン等の生成が抑制され、生体恒常性維持の破綻による副作用の発現が危惧されている。

(3) 最近、体内のコレステロールを胆汁酸に変換して排出できるコレステロールのセンサー蛋白として人肝臓 X レセプター (LXR) が発見された。核内レセプター LXR には 肝臓や小腸に高く発現する  $\alpha$  タイプと、全身に存在する  $\beta$  タイプが知られている。LXR $\alpha$  は肝臓内のコレステロール含量を感知して、HDL の構成成分である ApoA-1 蛋白を介して過剰コレステロールを細胞外へ排出 (HDL 新生) する。この制御に必須な蛋白が ATP 結合カセット膜トランスポーターである ABCA1 であり、LXR によって転写調整されている。したがって、LXR の制御がコレステロール排出の促進により HDL 新生を促し、動脈硬化改善に結びつくと考えられる。

(4) 浅川は苔類ウスベゼニゴケ (*Blasia pusilla*) から単離した大環状ビスビベンジル化合物リカルデイン C (Fig. 1) が 10-100  $\mu$ M 濃度で LXR $\alpha$  の特異的アゴニスト活性を有することを見いだした。さらに、本化合物は ABCA1 の遺伝子発現を促進することで ApoA-1 依存的にコレステロールを細胞外に排出することも証明された。

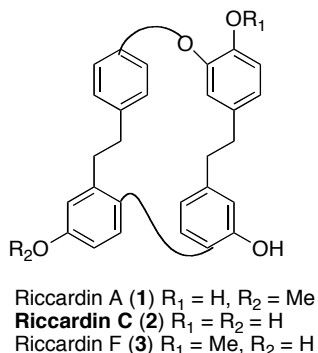


Fig. 1

## 2. 研究の目的

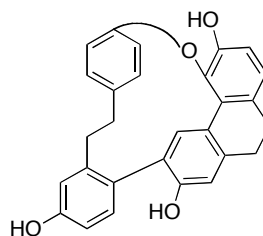
大環状ビスビベンジル類は苔類特有の成分で、2 個のベンゼン環どうしの結合様式が異なる多数の類似体が見いだされている。しかし、リカルデイン類 (Fig. 1) の結合様式のみの大環状ビスビベンジル類に LXR 特異的作用が認められた。すなわち、化合物 2 は LXR $\alpha$  アゴニスト、化合物 3 は LXR $\alpha, \beta$  のアンタゴニスト、一方、化合物 1 は全く活性を示さないことが分かっている。

(1) リカルデイン類のこのような活性発現

の違いに起因する構造的要素を明らかにするために、まず、リカルデイン類の全合成を検討する。

(2) リカルデイン C に存在する三個の水酸基と LXR $\alpha$  特異的アゴニスト活性と構造相関を明らかにする目的で、水酸基が部分保護された全ての誘導体を合成する。

(3) リカルデイン類の中に非常に歪みがかかった新奇な構造からならカビクラリン (4) が知られていて、その生理活性だけでなく合成標的としても非常に魅力的な化合物である。化合物 4 はリカルデイン C から一電子酸化で生成していると考えられるので、リカルデイン C (2) の合成完了後、2 に対する酸化カップリング法、D 環での選択的ヨード化続くラジカルあるいはパラジウムによる閉環法でカビクラリン (4) の合成を目指す。



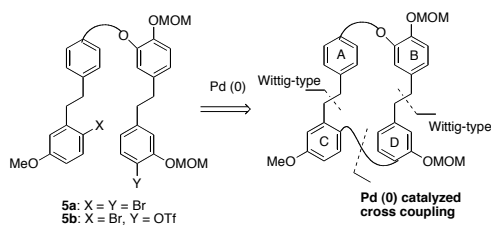
Carvicularin (4)

Fig. 2

(5) 合成品の X-線結晶解析および分子力場計算と NMR によって、結晶および溶液中の安定立体構造を決定する。そして、LXR $\alpha, \beta$  に対して活性発現に必要なリカルデイン類の構造要素を明らかにし、それらの情報に基づきリカルデイン C をシード化合物とした新しい動脈硬化改善薬の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 従来の大環状ビスビベンジルの合成における鍵段階となる大環状閉環法は、ベンジル位間での分子内 Wittig 型反応で行われているが、ビアリール型大環状ビスビベンジルに対する閉環収率は非常に悪いことが分かっている。(Nogardi, *JCS Perkin Trans I*, 1990) 我々は、分子内パラジウム触媒 Stille-Kelly 反応を適用して、すでにこのタイプの全合成に成功している。(TL, 1999, 2004) 今回のリカルデイン類の大環状構築もビアリール間での分子内パラジウム触媒クロスカップリング反応で行い、全てのリカルデイン類 1-3 の効率的合成を目指す。



(2) すでにリカルデイン C (2) のみが LXR $\alpha$  を活性化することが分かっている。

(Fig. 3) 合成したリカルデイン A (1)、C (2) と F (3) の LXR に対するアゴニスト活性を再検討する。すなわち、LXREx4-tk-luk レポーターベクターおよびインターナルコントロール用  $\beta$ -gal ベクターと LXR $\beta$  と RXR $\alpha$  発現用ベクターを CV-1 細胞に重トランスフェクションし、化合物による LKRE 転写活性を測定することで活性を評価する。

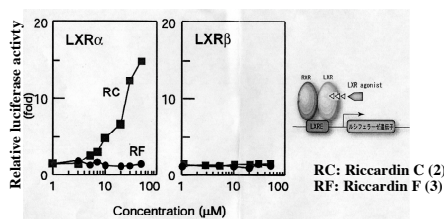


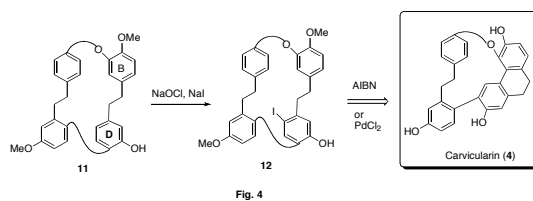
Fig. 3

(3) リカルデイン A (1)、C (2) と F (3) の X-線結晶解析を行う。同時に化学計算プログラムにより三種の水溶液中で安定立体構造を算出する。次いで、これらの立体構造と NMR の NOE データも考慮した安定立体構造を比較することで、三種の正確な三次元構造を見出す。さらに、分子シミュレーションプログラムを使って三種の三次元構造と LXR 間での仮想ドッキング実験を行い、活性発現可能な幾つかの分子を合理的にデザインする。

(4) デザインした分子の合成とそれらの LXR に対する活性評価を繰り返すことで、低濃度で活性を示す LXR 特異的アゴニストを見出す。

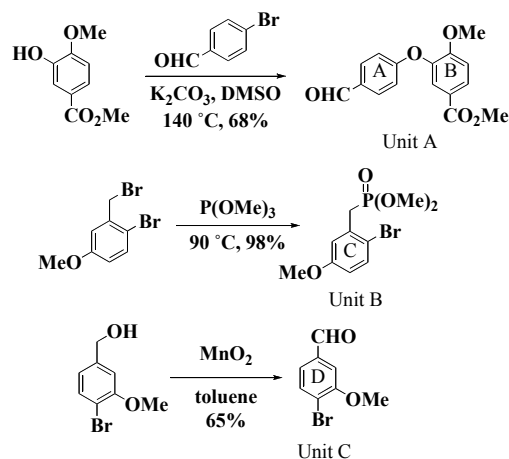
(5) 平行して、カビクラリン (4) の合成も行う。カビクラリンの構造は非常に歪みが大きく困難そうに思えるが、生合成から推測すると不可能ではないと判断した。すなわちリカルデイン C (2) の B-D 環での酸化的フェノールカップリングで生成しているはずである。従って、D 環上の水酸基に対するオルト位に効率よくラジカルを発生させればカビクラリンに誘導できると考えた。リカルデインジメチルエーテル体 11 の D 環の水酸基を利用して選択的にオルト位をヨウ素化 (NaOCl, NaI, MeOH) して 12 とする。次いで、AIBN 等でラジカルを発生させるか、原らが開発した Pd (II) を用いる方法でビアリール結合を形成させてカビクラリン (4) に導く計画である (Fig. 4)。そして、合成物

の活性を評価する。



#### 4. 研究成果

(1) リカルデイン C の全合成  
合成計画に従って、先ずユニット A、B と C は市販品から各々調製した (Scheme 1)。

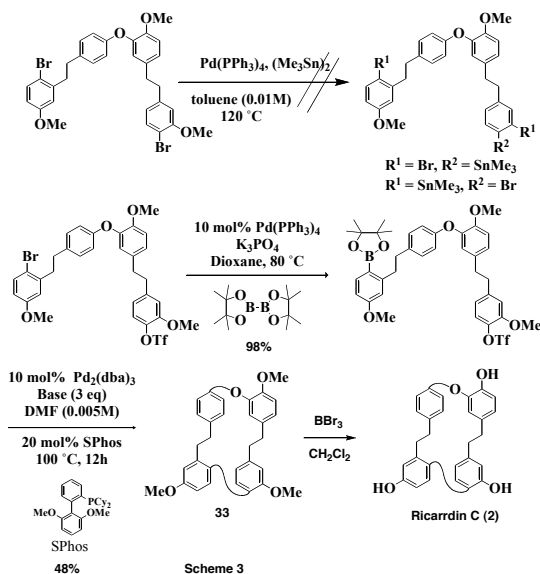
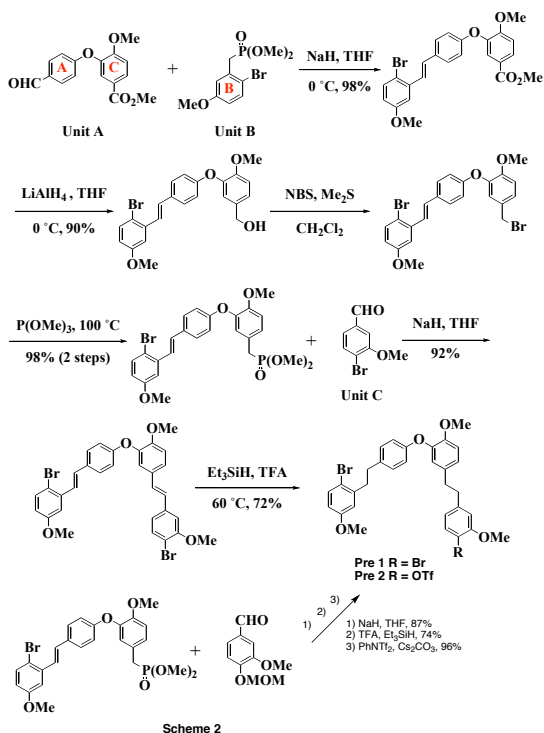


Scheme 1

ユニット A と B 間、次いでユニット C とで Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) 反応を 2 回繰り返して、環化中間体 pre 1 を得た。脱ハロゲン化反応の副反応を抑え二重結合の還元には、トリフルオロ酢酸中トリエチルシラン還元が良く、目的とするジブromo体を 72% の収率で得ることができた。もう一つの環化中間体 pre 2 は 2 回目の HWE 反応にバニリンを用い、最後に水酸基を Tf 化し調製できた (Scheme 2)。

最初、環化中間体 pre 1 に対してパラジウム触媒下 Kelly 反応によってどちらか片方のアリール臭素をアリールスズに変換し、精製することなく分子内 Stille 反応を行うことにした。環化の条件はプラジオチン A、D 全合成で成功した 16 員環の環化反応の条件 [Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, (Me<sub>3</sub>Sn)<sub>2</sub>, toluene] を適用したが、反応は進行せずほぼ原料回収に終わった。次に環化中間体 pre 2 に対してモデル等を用いて鈴木-宮浦反応の条件検討した結果、1、4-ジオキサン中 Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> 触媒下ピナコールジボランと反応すると、選択的に C-Br 側のみにピナコールボランの挿入が起こり目的物が定量的に得られた。最後の 18 員環形成は DMF 中 Pd<sub>2</sub>(dba)<sub>3</sub> 触媒下配位子として Sphos を用いると 48% の収率で進行した。最後にメチル基を除去し、リカルデイン C

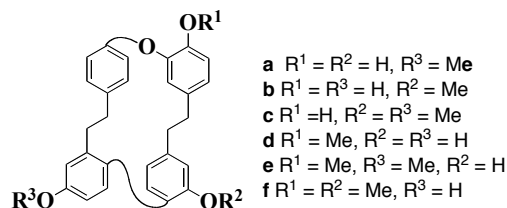
の合成が完了した (Scheme 3)。



## (2) リカルデイン C 誘導体の調製

リカルデイン C の全合成が達成でき、量的な供給も可能となったことから、リカルデイン C のフェノール性水酸基を部分的にメトキシ基で保護した類縁体を合成し、3 個のフェノール性水酸基が LXR $\alpha$  特異的アゴニスト活性にどのように関与しているか検討することにした。リカルデイン C トリメチル体 **33** に対する三臭化ホウ素による部分的脱メチル化により、**a-c** の 3 種の類縁体を得た。次にリカルデイン C をトリメチルシリルジアンメタンと反応させることでフェノール性水

酸基の部分的なメチル化を行った。この方法では **c** 以外の 5 種の類縁体を得ることができ、全てのメチル誘導体 6 種が調製できた。



(3) 核内受容体 LXR $\alpha$  に対する活性相関  
得られた類縁体 8 種について LXR に対するアゴニスト活性を調べた。活性の測定は国立医薬品衛生研究所の最上らに依頼した。LXR アゴニストの活性評価は、レポーターアッセイ法により行い、CV-1 細胞に、ヒト LXR $\alpha$  (あるいは LXR $\beta$ ) および RXR $\alpha$  の発現ベクター、LXR 応答配列をエンハンス領域に含むルシフェラーゼレポーター遺伝子、効率補正用の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現ベクターを導入し、薬物処理 24 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。天然品と合成品の LXR $\alpha$  と LXR $\beta$  に対するアゴニスト活性は天然物のものとほぼ同程度あることが確認された。

次に合成した全ての類縁体について、LXR アゴニスト活性を調べた。結果を Fig. 5 に示した。驚いたことにリカルデイン C 以外の全ての類縁の LXR $\alpha$  に対するアゴニスト活性が大きく減少し、さらに LXR $\alpha$  と LXR $\beta$  に対する選択性もほぼ消失してしまった。このことより、LXR $\alpha$  特異的アゴニスト活性の発現にはリカルデイン C の 3 個のフェノール性水酸基全てが必須で、活性発現に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

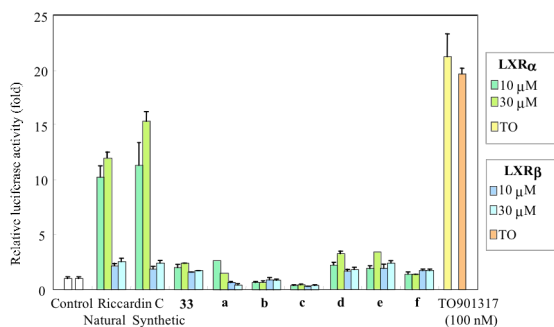


Figure 5 リカルデイン C 類縁体の LXR 活性試験

リカルデイン C をリード化合物として更に活性の高い化合物の創製を目指して誘導体を合成する場合、フェノール水酸基を足がかりとする方法が最も容易であるが、残念ながら今回の構造活性相関の結果から、水酸基以外を修飾した誘導体を合成する必要があることがわかった。今後この結果をもとにしたリカルデイン C の創薬への展開に期待し

ている。

#### 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 22 件)

- ① H. Imagawa, H. Saijo, T. Kurisaki, M. Kubo, Y. Fukuyama, M. Nishizawa, The First Synthesis of Neovibsanin B, *Org. Lett.*, **11**, 1253-1255 (2009), 査読有
- ② M. Ochi, K. Moriyama, K. Ohmae, Y. Fukuyama, K. Nihei, I. Kubo, Sweet and Bitter Constituents of *Wilbrandia* species, *Food Chemistry*, **115**, 61-65 (2009), 査読有
- ③ H. Hioki, M. Motosue, Y. Mizutani, A. Noda, K. Shnimoda, M. Kubo, K. Harada, Y. Fukuyama, M. Kodama, Total Synthesis of Pseudodehydrothyriferol, *Org. Lett.*, **11**, 579-582 (2009), 査読有
- ④ H. Hioki, N. Shima, K. Kawaguchi, K. Harada, M. Kubo, T. Esumi, T. Mogami, T. Hashimoto, Y. Asakawa, Y. Fukuyama, Synthesis of Riccardin C and Its Seven Analogues: the Role of Their Phenolic Hydroxy Groups as LXR $\alpha$  Receptor Agonists, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 746-749 (2009), 査読有
- ⑤ W. Tang, H. Hioki, K. Harada, M. Kubo, Y. Fukuyama, Novel NGF-Potentiating Diterpenoids from a Brazilian Medicinal Plant, *Ptychopetalum olacoides*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 890-894 (2009), 査読有
- ⑥ M. Kubo, Y. Minoshima, A. Arimoto, H. Minami, K. Harada, H. Hioki, Y. Fukuyama, Acetal-Bearing Rearranged Vibrane-type Diterpenoids from *Viburnum awabuki*. *Heterocycles*, **77**, 539-546 (2009), 査読有
- ⑦ T. Esumi, H. Shimizu, A. Kashiyama, C. Sasaki, M. Toyota, Y. Fukuyama, Efficient Construction of a Chiral All-carbon Quaternary Center by Asymmetric 1,4-addition and Its Application to Total Synthesis of (+)-Bakuchiol, *Tetrahedron Lett.*, **49**, 6846-6849 (2008), 査読有
- ⑧ W. Tang, H. Hioki, K. Harada, M. Kubo, Y. Fukuyama, Clerodane Diterpenoids with NGF-Potentiating Activity from *Ptychopetalum olacoides*. *J. Nat. Prod.*, **71**, 1760-1763 (2008), 査読有
- ⑨ H. Hioki, K. Matsushita, M. Kubo, K. Harada, M. Kodama, Y. Fukuyama, Solid-phase Combinatorial Synthesis of 2-Arylquinazolines and 2-Arylquinazolines by an 4-Alkoxyaniline Linker. *J. Comb. Chem.*, **10**, (5), 620-623 (2008), 査読有
- ⑩ M. Moriyama, J.-M. Huang, C.-S. Yang, M. Kubo, K. Harada, H. Hioki, Y. Fukuyama, Two New Sesquiterpenoids and Two New Prenylated Phenylpropanoids from *Illicium fargesii*, and Neuroprotective Activity of Macranthol, *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 1201-1204 (2008), 査読有
- ⑪ Y. Fukuyama, K. Harada, T. Esumi, D. Hojyo, Y. Kujime, N. Kubo, M. Kubo, H. Hioki, Synthesis of (-)-Talaumidin, a Neurotrophic 2,5-Diaryl-3,4-dimethyl Tetrahydrofuran Lignan, and Its Stereoisomers. *Heterocycles*, **76**, 1, 551-567 (2008), 査読有
- ⑫ T. Esumi, M. Zhao, T. Kawakami, M. Fukumoto, M. Toyota, Y. Fukuyama, Synthetic Studies toward Neovibsanins A and B: Construction of the Neovibsanin Core Utilizing Palladium(0)-catalyzed Carbonylative Cyclization with Carbon Monoxide, *Tetrahedron Lett.*, **49**, 2692-2696 (2008), 査読有
- ⑬ W. Tang, H. Hioki, K. Harada, M. Kubo, Y. Fukuyama, Antioxidative Phenylpropanoid-substituted Epicatechins from *Trichilia catigua*, *J. Nat. Prod.*, **70**, 2010-2013 (2007), 査読有
- ⑭ H. Hioki, K. Matsushita, M. Kubo, K. Harada, M. Kodama, Y. Fukuyama, Solid-phase Combinatorial Synthesis of Benzothiazoles, Benzimidazoles and Benzoxazoles Using a Traceless Linker, *Tetrahedron*, **63**, 11315-11324 (2007), 査読有
- ⑮ K. Harada, H. Ito, H. Hioki, Y. Fukuyama, An Efficient Synthesis of the CD rings Model for Merrilactone A. *Tetrahedron Lett.*, **48**, 6105-6108 (2007), 査読有
- ⑯ M. Inoue, N. Lee, T. Sato, M. Hiram, M. Moriyama, Y. Fukuyama, Total Synthesis and Bioactivity of an Unnatural Enantiomer of Merrilactone A: Development of an Enantioselective Desymmerization Strategy. *J. Org. Chem.*, **72**, 3065-3075 (2007), 査読有
- ⑰ M. Moriyama, Jian-Mei Huang, Chun-Shu Yang, H. Hioki, K. Harada, M. Kubo, Y. Fukuyama, Structure and Neurotrophic Activity of Novel Sesqui-neolignans from the Pericarps of *Illicium fargesii*. *Tetrahedron*, **63**, 4243-4249 (2007), 査読有
- ⑱ A. Ohsaki, R. Yokoyama, H. Miyatake, Y. Fukuyama, Two Diterpene Rhamnosides, Mimosasides B and C, from *Mimosa hostilis*. *Chem. Pharm. Bull.*, **54**, 1728-1729 (2006), 査読有
- ⑲ Y. Fukuyama, H. Fujii, M. Kubo, H. Minami, H. Takahashi, Neovibsanin F and its Congeners, Rearranged Vibrane-type Diterpenes from *Viburnum suspensiom*. *J. Nat. Prod.* **69**, 1098-1100 (2006), 査読有



- ⑳ Y. Fukuyama, M. Nakaoka, T. Yamamoto, H. Takahashi, H. Minami, Degraded and Oxetane-bearing Limonoids from *Melia azedarach*. *Chem. Pharm. Bull.*, **54**, 1219-1222 (2006), 査読有
- ㉑ S. Suzuki, Y. Okuse, M. Kawase, M. Takiguchi, Y. Fukuyama, H. Takahashi, M. Sato, A Norbergenin Derivatives Inhibits Neuronal Cell Damage Induced by Tunicamycin. *Biol. Pharm. Bull.*, **29**, 1335-1338, (2006), 査読有
- ㉒ T. Esumi, D. Houjyou, H. Zhai, Y. Fukuyama, First Enantioselective Synthesis of (-)-Talaumidin, a Neutrotrophic Diaryltetrahydrofuran-type Lignan. *Tetrahedron Lett.*, **47**, 3979-3983 (2006), 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 島尚喜、原田研一、久保美和、日置英彰、福山愛保、Cavicularin の合成研究、日本薬学会第 129 年会、2009 年 3 月、京都
- ② 島尚喜、川口幸太、原田研一、久保美和、日置英彰、福山愛保、核内受容体 LXR $\alpha$  アゴニスト Riccardin C とその誘導体の合成研究 第 34 回反応と合成の進歩シンポジウム、2008 年 11 月、京都
- ③ 島尚喜、川口幸太、原田研一、久保美和、日置英彰、福山愛保、核内受容体 LXR $\alpha$  アゴニスト Riccardin C の合成研究、日本薬学会第 128 年会、2008 年 3 月、横浜

[図書] (計 1 件)

- ① 福山愛保、神経毒と神経突起、栄養因子活性物質。天然物化学-植物編- (山村庄亮、長谷川宏司 編)、アイピーシー、**2007**

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称：神経細胞賦活剤  
 発明者：橋本麻美子、井ノ瀬利明、木村隆、橋本敏弘、吉川和子、福山愛保  
 権利者：ユニチカ(株)  
 種類：物質特許  
 番号：日本公開特許、**JP2008-292309**  
 出願年月日：2008 年 10 月 30 日  
 国内外の別：国内

名称：神経細胞突起伸展作用を有する置換シクロヘキセンを有効成分として含有する植物を利用することを特徴とする健康組成物  
 発明者：福山愛保、日置英彰、堂上美和、原田研一、加藤榮信  
 権利者：細田真也  
 種類：物質特許  
 番号：日本公開特許、**JP2008-260691**

出願年月日：2008 年 10 月 7 日  
 国内外の別：国内

名称：ビステトラヒドロフラン化合物、その製造方法及び該化合物の用途  
 発明者：西沢麦夫、福山愛保、今川洋  
 権利者：大塚化学(株)  
 種類：物質特許  
 番号：日本公開特許、**JP2007-51664**  
 出願年月日：2007 年 3 月 1 日  
 国内外の別：国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

第 4 2 回徳島新聞賞科学賞受賞、2006 年 6 月 1 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福山 愛保 (FUKUYAMA YOSHIYASU)  
 徳島文理大学・薬学部・教授  
 研究者番号：70208990

(2) 研究分担者

浅川 義範 (ASAKAWA YOSHINORI)  
 徳島文理大学・薬学部・教授  
 研究者番号：50033874

(3) 連携研究者