

令和元年6月25日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14986

研究課題名(和文) がん細胞のミトコンドリアを特異的な標的とする新規ラメラリン誘導体の創製

研究課題名(英文) Design, synthesis and biological evaluation of novel lamellarin derivatives targeting cancer cells mitochondria

研究代表者

石橋 郁人 (ISHIBASHI, Fumito)

長崎大学・水産・環境科学総合研究科(水産)・教授

研究者番号：10192486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：高い抗がん活性を持つ海洋天然物ラメラリンに、がん細胞のミトコンドリアに選択的に集積する特性を持つトリフェニルホスホニウム(TPP)カチオンを有機合成化学的手法により結合させることにより、がん細胞のミトコンドリアを特異的なターゲットとする高選択的な抗がん活性化合物の創製を目指した。ラメラリンの効率的な構築法の開発から始め、本法により合成したラメラリンアルコールに、TPPカチオン部位をリンカーを介してエステル結合させた。TPP結合型ラメラリンは、がん細胞株に対して、TPP部を持たないラメラリンアルコールの約3倍の増殖阻害活性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん活性化合物にTPPカチオンを結合させることによるがん細胞選択性の増大効果は既に複数例報告されているが、本研究により導入効果の実証例がさらに増えた。がん細胞に集積するリガンドを利用する原理は、広く他の抗がん活性物質への応用にも期待できる。ラメラリンの合成法は多く知られているが、パラジウムなどの高価なレアメタル触媒を用いた反応を基盤としたものが殆どである。本研究の結果、Paal-Knorr反応を利用した簡便で効率的なラメラリンの新規合成方法が確立された。

研究成果の概要(英文)：The marine alkaloids lamellarins displays high anticancer activity by inhibiting both nuclear and mitochondrial topoisomerase I, however, they are equally toxic to normal cell lines. TPP cation is known to accumulate in mitochondria in preference to mitochondria of tumor cells compared with nontumor cells. We aimed to create novel mitochondria-targeting agents by incorporating TPP cation in the structure of lamellarin. We established a novel synthetic route to 1-dearyl lamellarin, which is applicable for synthesis of lamellarin itself. By this method the lamellarin alcohol was synthesized and the TPP cation moiety is tethered to the C-1 position of lamellarin through a valerate linker. The ester-linked compound is designed to be hydrolyzed under physiological condition and liberate active lamellarin alcohol after passing through mitochondrial inner membrane. The TPP-lamellarin thus synthesized showed 3-fold higher cytotoxicity against HeLa cells than the parental lamellarin alcohol.

研究分野：天然物化学

キーワード：ラメラリン ピロールアルカロイド ミトコンドリア トポイソメラーゼ 抗がん活性化合物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ホヤやカイメン等の海洋無脊椎動物から単離されるラメラリン類は、種々の培養がん細胞株に対して極めて高い増殖阻害活性(LC₅₀ 20 nM)を示す。しかしながらラメラリン類は、がん細胞だけでなく正常細胞に対しても潜在的に有毒であるため、ラメラリンをモデルとした新規抗がん剤の開発のためには、がん細胞に対する選択性を高める必要がある。ラメラリンの抗がん作用は、サブμMレベルの低濃度では主に細胞核内のトポイソメラーゼ (Top1)の阻害に基づく細胞周期休止により、μMレベルの投与ではミトコンドリアに直接作用しアポトーシスを誘発することにより起こることが知られている。ミトコンドリアの機能阻害の発現には比較的高濃度の薬剤が必要である理由は、低分子に対するミトコンドリア内膜の透過性が低いためと考えられる。一方、米国国立癌研究所(NCI)のグループは、ラメラリンのミトコンドリア内での分子標的がミトコンドリアトポイソメラーゼ (Top1mt)であることを明らかにした。

2. 研究の目的

研究代表者らは、がん細胞のミトコンドリア内に効率的にラメラリンを輸送することができれば、がん細胞に対する選択性を高め、かつ更に低薬量化することが可能と考えた。一方、トリフェニルホスホニウム(PPP)カチオンは、フェニル基とホスホニウム基といった親油性及びイオン性の両面の性質を有しており、ミトコンドリアのマトリックス内部が持つ大きな負電荷との静電的相互作用により、内膜を通り抜けマトリックス内部へと侵入し易いことが知られている。さらに、がん細胞のミトコンドリア膜電位は正常細胞に比べて高く、より多くの親油性 PPP カチオン類をミトコンドリア内部に蓄積することも報告されている。従って、ラメラリンに PPP カチオンを結合させることにより、がん細胞に選択的なミトコンドリア標的薬とすることが可能と考えた(図1)。

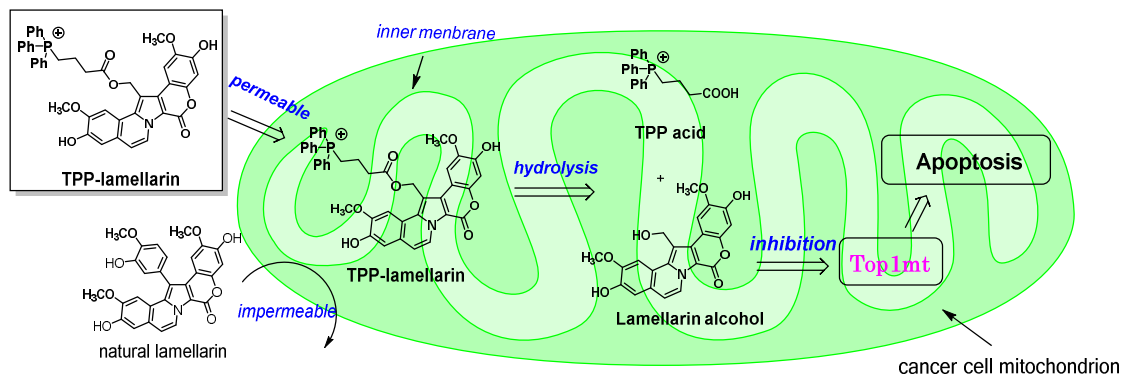


図1 TPPカチオン結合型ラメラリンのミトコンドリアに対する作用

3. 研究の方法

研究代表者らは、ラメラリンの Top1 阻害活性への構造要求性を既に明らかにしている(図2左図)。活性発現には、青色で図示した高度に共役した平面状の5環系骨格、8位及び20位の水酸基、及びラクトンカルボニル基(図2白抜矢印)の存在が必要である。一方、1位の芳香環は阻害活性に大きくは関与しておらず、除去、あるいはアルキル基等で置換した誘導体も十分な Top1 阻害活性と細胞増殖阻害活性を保持することが明らかになっている。従って、PPP カチオン部位は、Top1mt 阻害活性への影響が少ないラメラリンの1位に結合することとした。また、PPP 部位は、ミトコンドリア内部に侵入した後には不要であるため、生理的条件下で加水分解され、活性型のラメラリンアルコールが遊離することが好ましい。従って、PPP 部位は適当な長さのリンカー部位を介してエステル結合あるいはアミド結合によりラメラリン部位に連結することとした。

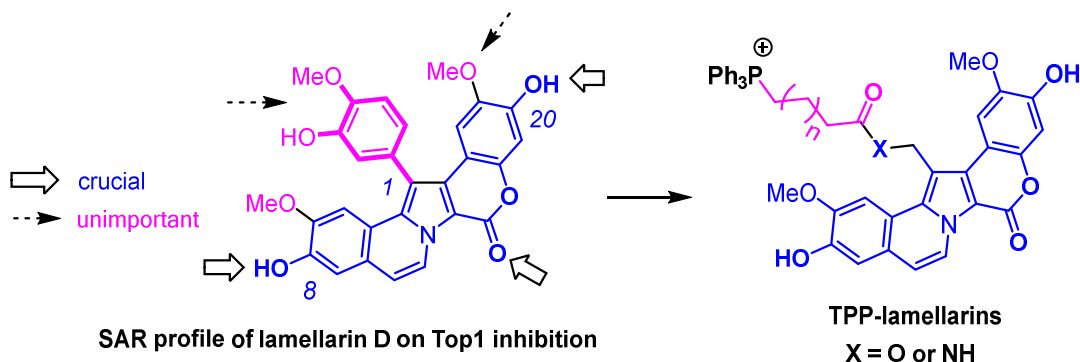


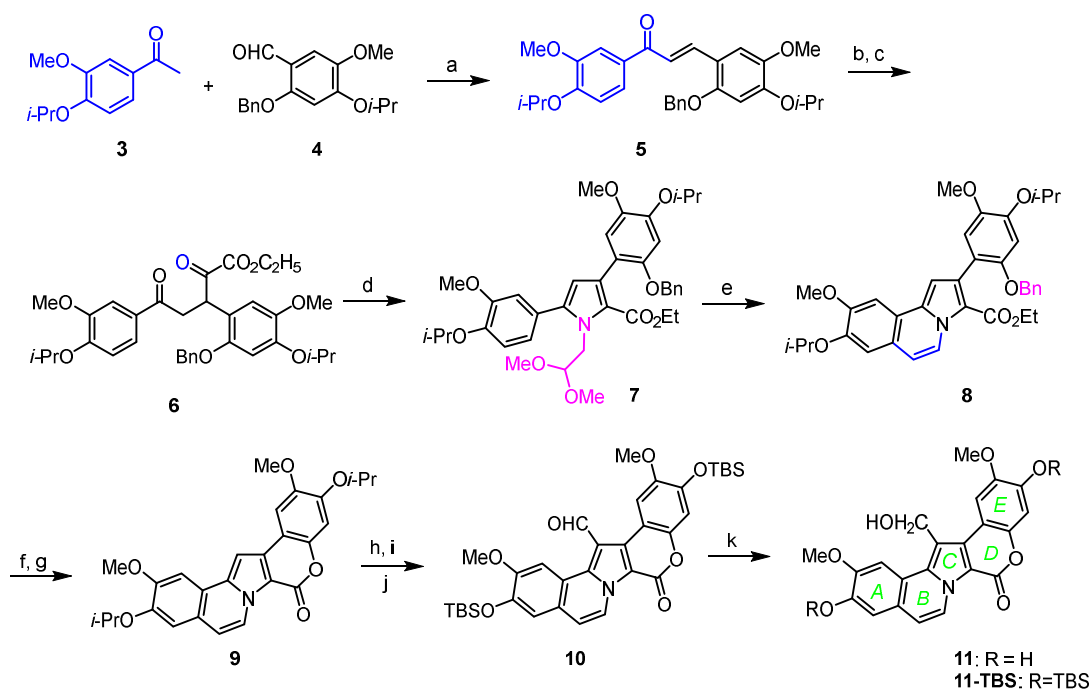
図2 TPP結合型ラメラリンの分子設計

また、ラメラリンアルコールの合成にあたっては、天然物そのものの合成にも適応可能な新規ラメラリン骨格構築法を開発することとした。

4. 研究成果

ラメラリン骨格の構築方法としては、Paal-Knorr ピロール合成法を基盤とする方法、及び Barton-Zard ピロール合成法を利用する方法の 2 種類を検討した。

Scheme 1 に Paal-Knorr 反応を鍵反応とする合成法を示す。出発物質として用いたケトン 3 はアセトパニロンのイソプロピル化により、アルデヒド 4 はイソパニリンからイソプロピル化、Bayer-Villiger 反応と加水分解、*O*-ベンジル化及び Vilsmeier ホルミル化の 4 工程で調製した。両者の縮合によりカルコン 5 を得、さらにニトロ酢酸エチルを共役付加させた後 Neff 反応によりニトロメチン基をカルボニル基へと変換することにより化合物 6 を得た。この 1,4-ジケトンと 2,2-ジメトキシエチルアミンとの Paal-Knorr 反応によりピロール骨格を構築した。この縮合反応の触媒としては、*p*-TsOH (収率 52%)、Sc(OTf)₃ (収率 56%)、MgI₂ (収率 67%) の 3 種を検討した。ヨウ化マグネシウムを用いた場合最も収率が高かったが、エステル アミド交換体が 12% 副生した。ピロール 7 からラメラリン骨格化合物 9 への変換は、研究代表者らがデアリルラメラリンの合成において用いた方法 (Ohta, T. et al. *J. Org. Chem.* 2009, 74, 8143-8153) に準じ行った。即ち、ルイス酸触媒下での分子内脱メタノール縮合により B 環部分を構築し 8 とし、さらに、脱ベンジル化次いでラクトン化を行うことにより 9 を得た。ここまで、全工程 7 工程、通算収率 46% であり、簡便かつ効率的なラメラリン骨格構築法を確立した。なお、化合物 9 から天然型ラメラリンへの変換法については既に上記論文にて報告しており、ラメラリンの形式合成が完成したこととなる。ラメラリン骨格化合物 9 の 1 位へのヒドロキシメチル基の導入は、Vilsmeier 試薬によるホルミル化、保護基の脱着、並びにヒドリド還元により行った。なお、これ以降の化合物は有機溶媒に難溶性で取り扱いが困難であることが予想されるので、保護基としては、親油性が高く生理的条件下での分解が予想される TBS 基を選択した。

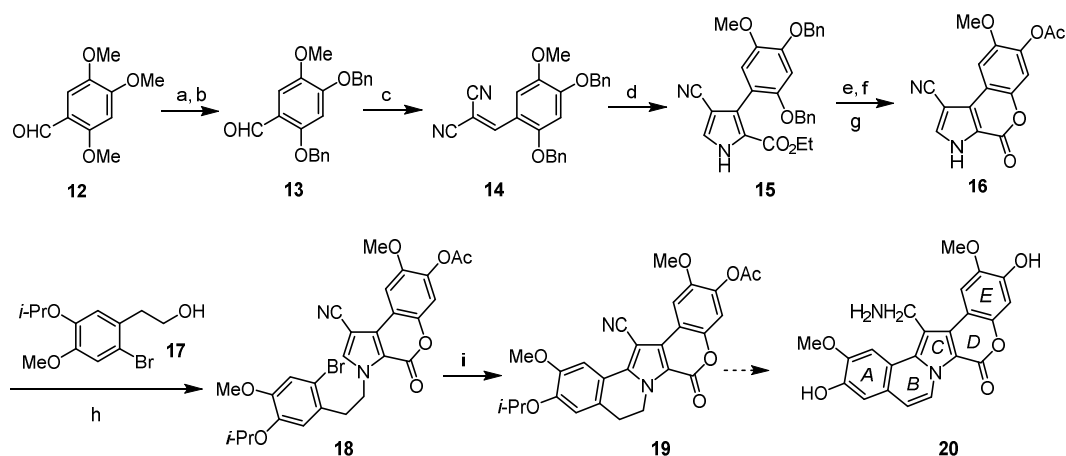


Scheme 1 Synthesis of 1-hydroxymethylamellarin D employing Paal-Knorr reaction

reagents, (a) NaOH, THF, MeOH, H₂O, 91%; (b) O₂NCH₂CO₂Et, Et₃N, 100%; (c) NaOH, EtOH then H₂SO₄, 99%; (d) (MeO)₂CHNH₂, MgI₂, MS₄A, toluene, 67%; (e) TMSOTf, CH₂Cl₂, 85%; (f) H₂, Pd(OH)₂/C, EtOAc, 99%; (g) AcOH, 100 °C, 91%; (h) POCl₃, DMF, 98%; (i) AlCl₃, CH₂Cl₂, 98%; (j) TBSCl, Imidazole, 80%; (k) NaBH₄, THF, 81%

次にアミド結合型 TPP ラメラリンの合成を指向して、イソシアノ酢酸の[3+2]環状付加反応を利用した合成法を検討した (Scheme 2)。市販の 2,4,5-トリメトキシベンズアルデヒドから始め、2 位と 4 位を選択的に脱メチル化した後、ベンジル保護し 13 とした。次いで、マロニトリルとの脱水縮合により 14 を定量的に得た。この Michael アクセプターとイソシアノ酢酸エチルとの[3+2]環状付加反応によるピロール骨格の構築を検討した。用いる塩基としては、NaH, *t*-BuOK, DBU を、溶媒には THF, *t*-BuOH, MTBE をスクリーニングした結果、DBU/MTBE 系で最も良い収率が得られた。しかしながら、本条件下では中間体のビスシアノ化合物がほぼ等モル得られたため、MTBE 中 DBU と反応させた後、さらに THF 中 *t*-BuOK で処理する 2 段階の反応を行ったところ、高収率 (85%) で目的のピロール 15 が得られた。次いで、脱ベンジル化とラクトン化により 3 環系化合物 16 へと変換した。C, D, E 環部分の構築に続き、A, B 環部分の構築を行った。まず、Mitsunobu 条件下、イソパニリンから 5 工程で調製したアルコール 17 と 16 とを反応させ *N*-アルキル化を行い 18 とした。さらに、18 の分子内 Heck 反応によりラメラリン骨格を構築した。なお、この反応条件 (Pd(OAc)₂, Et₃N, THF, reflux) では、一部アセチル保護基が脱離し収率の低下を招いた。アセチル基の代わりに TBS 基を用いてみたが効果は見られなかった。化合物 19 からアミノメチル体 20 へは残すところ 3 工程であるが、反応経路全体的にあまり収率が高くないことと、化合物 19 以降の化合物が有機溶媒に難溶性で取り扱いが困難であることが予想されるので、これ

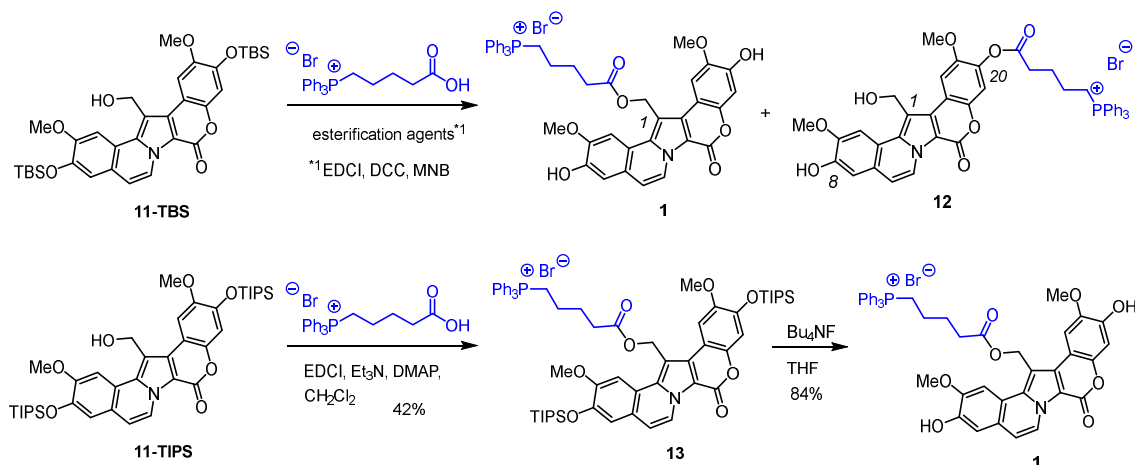
以上の合成の検討は行わなかった。



Scheme 2 Synthetic approach to 1-aminomethylamellarin D

reagents, (a) AlCl_3 , CH_2Cl_2 ; (b) BnBr , K_2CO_3 , DMF, 100%; (c) NCCH_2CN , AcONH_4 , 100%; (d) $\text{CNCH}_2\text{CO}_2\text{Et}$, DBU, MTBE then $t\text{-BuOK}$, THF, 85%; (e) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, AcOEt , 94%; (f) AcOH , reflux, 80%; (g) Ac_2O , pyr, 59%; (h) DIAD, Ph_3P , THF, 42%; (i) $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, Et_3N , THF

ラメラリンアルコール 11-TBS への TPP カチオン部位の結合は、5-トリフェニルホスフィニル吉草酸との直接的なエステル化反応により行った。エステル化試薬として EDCI, DCC, MNB 等を検討し、生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製したが、目的物は単離できなかった。シリカゲル中で分解している可能性があったので、生成物を未精製のまま機器分析に供したところ、目的の 1 の存在が確認されたが、20 位或いは 8 位の水酸基とのエステル体 12 との混合物であることが解った。エステル化反応中に TBS 保護基が外れたためと予想されたので、保護基をより安定なトリイソプロピルシリル (TIPS) 基に変更したところ、13 が得られ、さらに TBAF 処理により目的の TPP ラメラリン 1 を得ることができた。(Scheme 3)。



Scheme 3 Synthesis of TPP-lamellarin 1

合成した TPP ラメラリン 1 とその TIPS 保護体 13、及びラメラリンアルコール 11 のがん細胞株 (HeLa) に対する細胞毒性を調べた。その結果、TPP ラメラリン 1 (IC_{50} 0.49 μM) は、親化合物 11 (IC_{50} 1.36 μM) の約 3 倍高い活性を示した。一方、TIPS 保護体 13 (IC_{50} 2.63 μM) は顕著な活性を示さなかった。生理的条件下で TIPS 基は加水分解されないことが予想される。TPP 部位導入による活性増大効果が認められたが、その作用がミトコンドリアトポイソメラーゼ特異的な阻害に基づくものかどうかは不明であるので、ミトコンドリアへの局在化の有無や正常細胞への細胞毒性試験など詳細な生理活性を検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 3 件)

Tsutomu Fukuda, Yusuke Nanjo, Masahiro Fujimoto, Kenyu Yoshida, Yuko Natsui, Fumito Ishibashi, Fumiyasu Okazaki, Hideto To, Masatomo Iwao, Lamellarin-inspired potent topoisomerase I inhibitors

with the unprecedented benzo[g][1]benzopyrano[4,3-b]indol-6(13H)-one scaffold, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 査読有, 27 巻, 2019 年, pp. 265-277, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.11.037>

Tsutomu Fukuda, Yuri Matsuo, Fuyuki Matsuoka, Naoki Yoshioka, Gen Onodera, Masanari Kimura, Fumito Ishibashi, and Masatomo Iwao, Synthesis and Evaluation of Topoisomerase I Inhibitors Possessing the 5,13-Dihydro-6H-benzo[6,7]indolo[3,2-c]quinolin-6-one Scaffold, *Heterocycles*, 査読有, 99 巻, 2018 年, published online, [http://dx.doi.org/10.3987/COM-18-S\(F\)70](http://dx.doi.org/10.3987/COM-18-S(F)70)

Tsutomu Fukuda, Teppei Umeki, Keiji Tokushima, Gao Xiang, Yuki Yoshida, Fumito Ishibashi, Yusuke Oku, Naoyuki Nishiya, Yoshimasa Uehara, Masatomo Iwao, Design, synthesis, and evaluation of A-ring-modified lamellarin N analogues as noncovalent inhibitors of the EGFR T790M/L858R mutant, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 査読有, 25 巻, 2017 年, pp. 6563-6580, <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.10.030>

[学会発表] (計8件)

石橋郁人, 安田圭佑, 鈴木辰弥, 脂溶性カチオン部位結合型ラメラリンの合成, 日本農芸化学会西日本支部大会, 2018 年

宮本紘季, 石橋郁人, デニグリン C の合成研究, 日本農芸化学会西日本支部大会, 2018 年

西谷直之, 奥裕介, 福田勉, 旦慎吾, 石橋郁人, 矢守隆夫, 上原至雅, 岩尾正倫, トポイソメラーゼ阻害剤 lamellarin の化学修飾による耐性 EGFR T790M/C797S 阻害剤の創製, 第 22 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2018 年

石橋郁人, 森 夏波, 鹿島千裕, ニンガリン A 型及び B 型アルカロイドの合成, 日本農芸化学会西日本支部大会, 2016 年

Fumito Ishibashi, Design, synthesis, and *in vitro* and *in vivo* biological evaluation of benzo[g][1]benzopyrano[4,3-b]indol-6(13H)-ones (BBPIs): A novel class of potent topoisomerase I inhibitors based on the marine pyrrole alkaloid lamellarin D, The Third Myanmar-Japan Symposium, 2016 年

[図書] (計0件)

[産業財産権]

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 平坂 勝也

ローマ字氏名: HIRASAKA, Katsuya

所属研究機関名: 長崎大学

部局名: 海洋未来イノベーション機構

職名: 准教授

研究者番号 (8 桁): 70432747

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 安田 圭佑

ローマ字氏名: YASUDA, Keisuke

研究協力者氏名: 鈴木 辰弥

ローマ字氏名: SUZUKI, Tatsuya

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。