

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05455

研究課題名(和文) フコイダンがもつ血管新生抑制活性の発現機構解明を指向した構造活性相関研究

研究課題名(英文) Structure-activity relationship study on the tumor angiogenesis inhibition activity of fucoidan

研究代表者

今村 彰宏 (Imamura, Akihiro)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：30610951

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)：天然フコイダン分子を化学的に再構築するための新規合成法を開発した。本法では、 α -L-フコシド結合を構築するにあたり、まず高立体選択的に α -L-ガラクトシド結合を構築する。続いてガラクトース6位をデオキシ化することでL-フコースへと導くことができる。また、本研究では、多糖であるフコイダンの実用的合成法の確立に向けてフルオラスケミストリーの利用を検討し、精製工程においてFSPE法が有用であることを見出した。そして、確立した手法を用いることで、 α -(1,3)結合でつながったL-フコースオリゴマーの構築に成功し、最後に水酸基を硫酸化することで構造均一なフコイダン分子を創出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従前、フコイダンの生理機能に関する研究は、天然の海草類から抽出した言わば混じり物で行われてきたため、フコイダンの分子構造と生理活性の関係性が真に評価されていなかった。そこで本研究では、有機化学的アプローチにより構造明確で純粋なフコイダン分子を創出することで、明瞭な構造活性相関のデータを取得し、フコイダンの多彩な生理活性を創薬などへ活かせると考えた。本研究では、独創的な化学合成法を開発し、それにより従来困難であった構造均一なフコイダン分子の創出に成功した。現在、合成した純粋なフコイダン分子を利用し、構造活性相関研究を進めている。

研究成果の概要(英文)：We have developed a unique synthetic method for natural fucoidan molecules. Based on the fact that L-fucose is 6-deoxy-L-galactose, our strategy consists of the stereoselective construction of α -L-galactoside and its conversion to α -L-fucoside via C6-deoxygenation. In this study, the usefulness of fluororous chemistry has been examined for the practical construction of polysaccharide molecules like fucoidan and it was found that FSPE (Fluororous Solid Phase Extraction) was useful for quick purification of the desired product. Methods established in this study delivered α -(1,3)-L-fucosyl oligomer (fucan) in good yields. Finally, sulfonation of hydroxyl groups in fucan furnished structurally-defined fucoidan molecule.

研究分野：応用糖質化学

キーワード：フコイダン 糖鎖 有機合成 立体選択的グリコシル化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、海藻由来成分であるフコイダンに血管新生抑制活性があることが分かってきた。フコイダンはコンブやモズクなどの褐藻類に多く含まれる硫酸化フコース含有多糖であり、1960年代以降、様々な生理活性があることが明らかにされ、1996年にがん細胞を死滅させることが医学的に立証されたことを契機として、国内を始め世界中でその機能性に着目した研究が進められてきた。

ところで、これらの研究で試料として使われてきたフコイダンは、天然の藻類から化学処理によって抽出されたものである。ところが、フコイダンの分子構造は海藻の種類や抽出方法、あるいは収穫時期によって大きく異なることから、これまでの研究では分子構造と生理活性の相関関係が非常に曖昧で、真の構造活性評価ができていなかった。また、従来の研究は分子量と生理活性の関係性を調査する「分子量活性相関研究」が中心であり、分子構造と活性の厳密な相関関係を明らかにした例はほとんどない。結果として、活性発現メカニズムの解明や創薬研究への展開が遅れ、有効な生理活性が埋没している。

また、世間には、構造活性相関に基づいた確固たる学術的証拠がないにも拘らず、単純にフコイダンの抗がん作用を謳う食品やサプリメントが平然と存在し、社会問題化している。

つまり我々は、フコイダンを含む海藻という海産資源を豊富に有し、そこに有用な生理活性が潜在していることを知りながら、真の意味で有効活用できていないのである。従って、フコイダンの生理機能発現に必要な活性中心部位の構造情報を取得することは極めて重要な研究課題である。

2. 研究の目的

(1) 従来行われてきた天然抽出物を利用した研究手法では、フコイダンにおける構造活性相関の曖昧さをいつまで経っても払拭できない。そこで本研究では、化学合成によって厳格に構造制御したフコイダンを利用して、分子構造と生理活性の厳密な相関関係を明らかにすることを目的とする。

本研究では特に、フコイダンがもつ血管新生抑制活性に着目し研究を進める。過去に血管新生抑制活性が評価されたフコイダンの内、天然由来の高分子量フコイダン(30 kDa 超)には血管新生抑制活性があり、逆に低分子量フコイダン(4 ± 1 kDa)には血管新生促進活性が認められている。これらの研究から、フコイダンがもつ血管新生活性は、中分子量領域(5–30 kDa)に抑制と促進の分水嶺が存在することが示唆される。そこで本研究では、活性発現の鍵となる中分子量領域に焦点を絞り研究を遂行する。

(2) 本研究を進めるためには、まず構造均一のフコイダン分子を取得する必要がある。本研究では、これを有機合成化学により達成する。しかし、多糖であるフコイダンを化学的に合成するためには克服すべき課題が複数存在するため、まずフコイダン分子を効率的に合成するための基盤技術の確立を目指す。また、フコイダンを含む多糖の実用的合成法の開発にも取り組む。

3. 研究の方法

(1) 中分子量フコイダンの合成技術の確立

分子量 5,000 を超えるサイズのフコイダン糖鎖に対する合成技術を確立する。フコイダンには共通して α -L-フコースグリコシド(フコシド)が存在するが、1,2-*cis* 配置であるこの結合に対する確立された立体選択的合成法は存在しない。そのため、フコイダンのような α -L-フコシド構造を含む糖鎖の構築は非常に難しい。しかし、L-フコースは、言い換えると 6-デオキシ-L-ガラクトースであることから、仮に α -L-ガラクトース結合を立体選択的に構築可能であれば、グリコシル化後に 6 位をデオキシ化することで α -L-フコース結合へと導ける。本研究では、このコンセプトに則り、フコイダン合成に資する新規 α -L-フコシド構築法を開発する。

(2) 合成フコイダンを用いた血管新生活活性評価

合成化学により創出した構造均一フコイダンを用いて血管新生活活性を評価する。従前の研究では、高分子量フコイダンには血管新生抑制活性があり、逆に低分子量フコイダンには血管新生促進活性が認められている。そのため、分子量および分子構造が明確な合成フコイダンを用いて血管新生活活性を評価する。

4. 研究成果

(1) 新規 α -L-フコシド合成法の開発

研究方法(1)で概説したコンセプトに従い、新規 α -L-フコシド構築法を開発した(概要: 図1)。まず、4,6 位を di-*tert*-butylsilylene (DTBS) 基で架橋した L-ガラクトース供与体を調製した。我々は先行研究において、4,6 位を

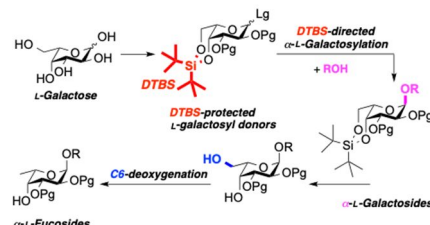


図1. 新規 α -L-フコース結合構築法の概要

DTBS 基で保護した D-ガラクトース供与体をグリコシル化に用いることで、高立体選択的に α -D-ガラクトシドを得られることを見出している。そのため、本研究ではこれを L-ガラクトースに応用することで高立体選択的に α -L-ガラクトシドが得られると考えた。しかし、市販の L-ガラクトースは高価であるため、安価で入手可能な D-ガラクトースから誘導して L-ガラクトースを調製した。その後、適切な保護基を導入することで供与体へ導いた (図 2)。次に、得られた L-ガラクトース供与体を各種糖受容体とグリコシル化に供し、立体選択的に α -L-ガラクトシドが得られるか検証した。その結果、用いた受容体すべてにおいて α -L-ガラクトシドが極めて高収率 (82–98%) で得られた (図 3)。重要なことに、すべてのグリコシル化において立体異性体である β -グリコシドは確認されなかった。

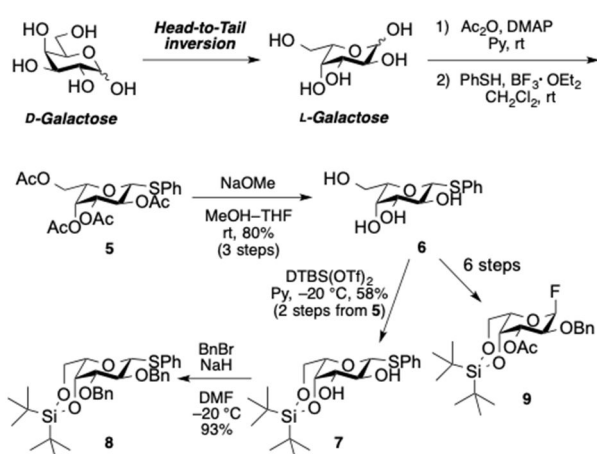
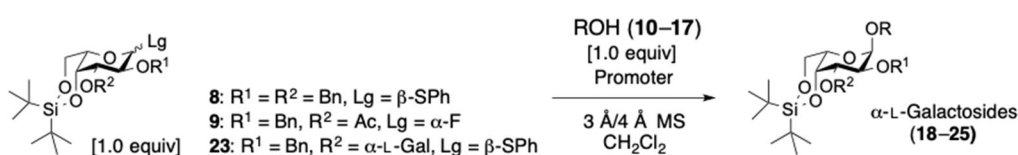


図2. 4,6-O-DTBS-L-ガラクトース供与体の合成



entry	donor	ROH	promoter	temp [°C]	t [h]	product	%yield ^a
1	8		NIS TfOH	0	0.5	18	98
2	8		NIS TfOH	0	0.5	19	98
3	8		NIS TfOH	-20	0.5	20	96
4	8		NIS TfOH	0	0.5	21	90
5	8		NIS TfOH	0	0.5	22	97
6	9		Cp ₂ HfCl ₂ AgOTf TTBP	0	3	23	97
7	23		NIS TfOH	-80 → -30 ^c	22	24	82
8	8 ^b		p-NO ₂ PhSCL AgOTf	-80 → -50 ^c	42	25	95

^a Isolated yield. ^b Two equiv of **8** was used. ^c The reaction temperature was gradually increased. SE: 2-(Trimethylsilyl)ethyl, PMP: *p*-Methoxyphenyl, NIS: *N*-Iodosuccinimide, TTBP: 2,4,6-Tri-*tert*-butylpyrimidine

図3. L-ガラクトース供与体と各種糖受容体とのグリコシル化

続いて、得られた α -L-ガラクトシドを α -L-フコシドへ導くため、6位デオキシ化を検討した。様々な脱離基および反応試薬を試した結果、Barton-McCombie 反応および 6-OTs 体の LiAlH₄ 還元によるデオキシ化が良好な結果を与えることを見出した。次に、最適化したデオキシ化条件を先に調製した各種 α -L-ガラクトシド誘導體へ適用し、 α -L-フコシドへと導いた。その結果、フコース α -(1,2)-ガラクトース、フコース α -(1,6)-*N*-アセチル-グルコサミン、フコース α -(1,3)-フコー

スを始めとして、天然に存在する α -L-フコシド誘導体の合成に成功した(図4)。これにより、高立体選択的 α -L-ガラクトシル化を鍵反応とする新規 α -L-フコシド合成法の開発を達成した。

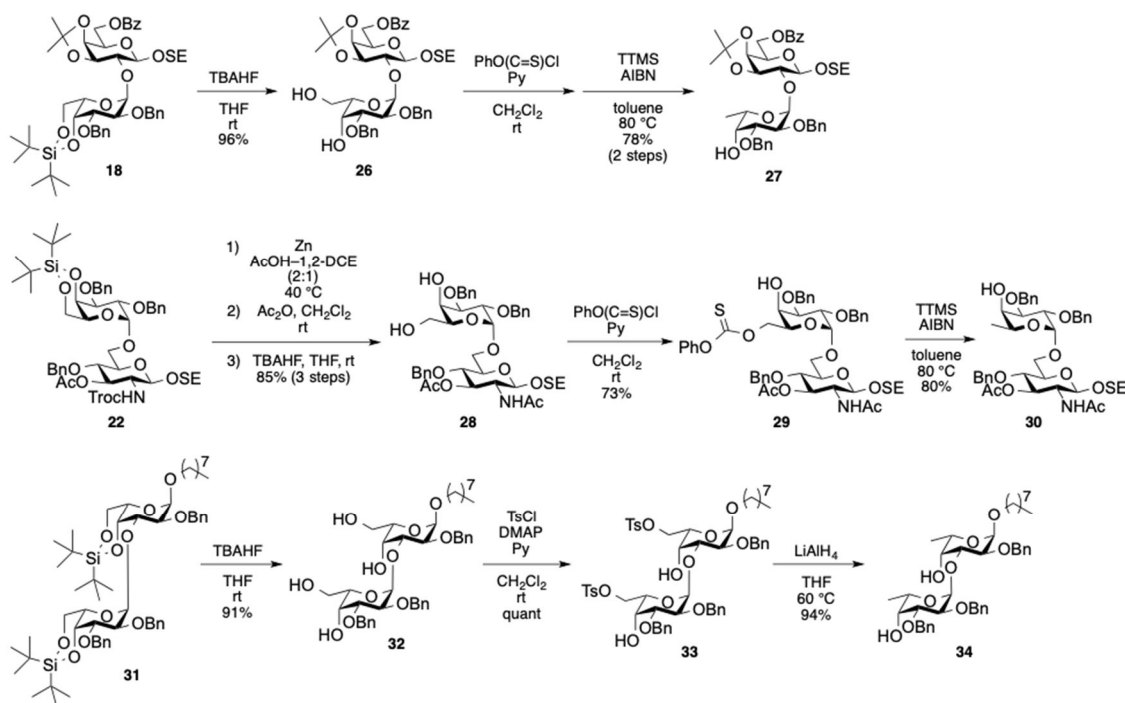


図4. L-ガラクトシドからL-フコシドへの誘導

(2) フルオラスケミストリーを利用した多糖の実用的合成に向けた検討

多糖の化学合成では、オリゴ糖のような比較的低分子の化合物とは異なり、反応成績物の分離・精製が大きな課題である。これは分子自体の極性や各種溶媒に対する貧溶解性が主な要因である。そのため、フコイダンを合成するためにはこの課題を克服することが肝要である。そこで本研究では、フルオラスケミストリーを多糖合成へ応用することを検討した。

本研究では、フルオラス固相抽出法(FSPE)による化合物の分離・精製を志向し、糖鎖の還元末端にフルオラスタグを導入した化合物の合成を目指した。フルオラスタグは $C_{8}F_{17}$ を三箇所に有するエリスリトール誘導体を基本骨格とし、後の化学選択的な除去を見据え、これをヒドロキノンへ導入した誘導体とした(図5)。そして、これを糖鎖末端にグリコシル化により導入することで、フルオラス含有糖鎖を合成した。この際、反応成績物を FSPE で容易に分離・精製できることを確認した。

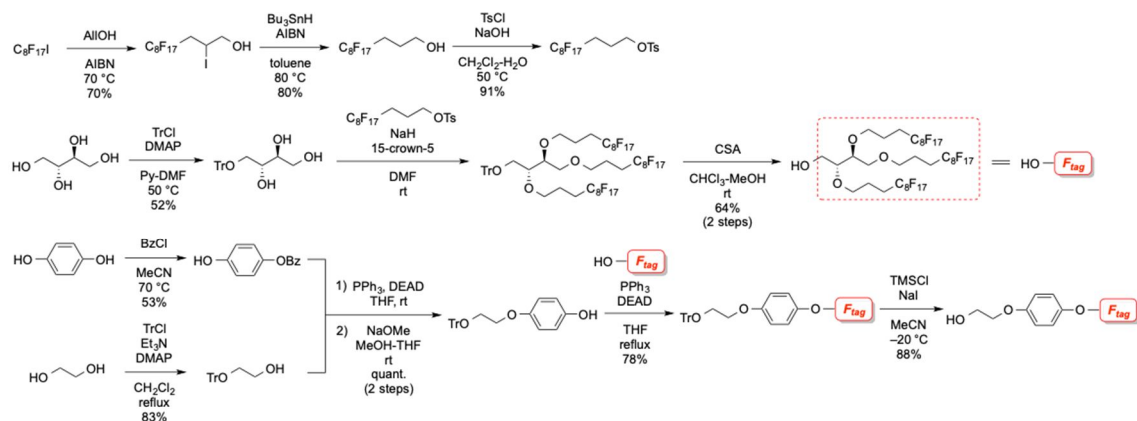


図5. 糖鎖末端導入用フルオラスタグの調製

(3) フコイダン分子の創出

研究成果(1)で得られた化合物 25 の DTBS 基を除去し、すべての 6 位水酸基を Ts 基で保護した誘導体を $LiAlH_4$ 還元で供し、L-フコシドへと高収率で導いた。続いて、接触水素添加反応により Bn 基を除去し、最後に $SO_3 \cdot Et_3N$ 錯体を反応させることにより、エカトリアル配向のすべて水酸基に硫酸化を施した。その結果、オリゴフコイダン分子の合成に成功した。

コロナ禍のため合成フコイダンの活性評価が遅れているが、今後、本研究で確立した合成法を用いて更に長鎖のフコイダン分子を創出し、血管新生活性評価を実施する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Tomida Hiroataka, Matsuhashi Takuya, Tanaka Hide-Nori, Komura Naoko, Ando Hiromune, Imamura Akihiro, Ishida Hideharu	4. 巻 18
2. 論文標題 Indirect synthetic route to -L-fucosides via highly stereoselective construction of -l-galactosides followed by C6-deoxygenation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 5017 ~ 5033
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0ob01128b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagata Sakuto, Tomida Hiroataka, Iwai-Hirose Haruka, Tanaka Hide-Nori, Ando Hiromune, Imamura Akihiro, Ishida Hideharu	4. 巻 9
2. 論文標題 Synthesis of a 1,2-cis-indoxyl galactoside as a chromogenic glycosidase substrate	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 28241 ~ 28247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9ra05797h	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 -

1. 著者名 Vibhute Amol M., Komura Naoko, Tanaka Hide Nori, Imamura Akihiro, Ando Hiromune	4. 巻 21
2. 論文標題 Advanced Chemical Methods for Stereoselective Sialylation and Their Applications in Sialoglycan Syntheses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Chemical Record	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/tcr.202100080	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 今村彰宏、富田紘隆、松橋拓也、石田秀治
2. 発表標題 -L-ガラクトシル化を鍵反応とする -L-フコシド間接的合成法の開発
3. 学会等名 第39回日本糖質学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富田 紘隆、長田 朔人、岩井 遥、今村 彰宏、石田 秀治
2. 発表標題 X- -ガラクトシドの簡便合成法の開発
3. 学会等名 第38回日本糖質学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富田 紘隆、今村 彰宏、石田 秀治
2. 発表標題 -L-ガラクトシル化を基盤とするフコイダンの化学合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松橋拓也、今村彰宏、石田秀治
2. 発表標題 DTBS効果に応用した新規 - フコシド合成法の開発
3. 学会等名 糖鎖科学中部拠点 第15回若手のカフォーラム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松橋拓也、今村彰宏、石田秀治
2. 発表標題 新規合成戦略に基づくフコース含有糖鎖の構築
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2018年～2019年

1. 発表者名 Akihiro Imamura, Hiromune Ando, Hideharu Ishida
2. 発表標題 Chemical synthesis of structurally complex gangliosides via unique synthetic approach
3. 学会等名 Sialoglyco2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018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