

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月23日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580248

研究課題名（和文） 海洋アルカロイド、ラメラリンの分子作用機構に基づく新規抗ガン活性分子の設計と合成

研究課題名（英文） Design and synthesis of novel anticancer compound based on the molecular mode of action of the marine pyrrole alkaloid lamellarin

研究代表者

石橋 郁人（ISHIBASHI FUMITO）

長崎大学・大学院水産・環境科学総合研究科・教授

研究者番号：10192486

研究成果の概要（和文）：DNA トポイソメラーゼ I の阻害により抗ガン活性を示す海洋天然物ラメラリンの分子レベルでの酵素阻害作用機構に基づいて、イソラメラリン及びビスラクトンと命名した二種類の新規五環性化合物を抗ガン剤候補分子として設計し、合成した。イソラメラリンは、培養ガン細胞株 HeLa に対して親化合物ラメラリンを凌ぐ高い増殖阻害活性を示すこと、及び、その作用は、ラメラリンと同じくトポイソメラーゼ I の阻害に基づくことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Based on the molecular mode of action of topoisomerase I inhibition of the marine anticancer alkaloid lamellarin, two novel lamellarin analogs named as isolamellarin and bislactone were designed as anticancer agents and synthesized. Isolamellarin was shown to have twice as high antiproliferative activity as the parent compound lamellarin D on HeLa cell line due to topoisomerase I inhibition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産科学

キーワード：天然物化学・生理活性物質

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ラメラリン類は、ホヤやカイメン等の海洋生物から単離されるピロール型の多環性アルカロイドである。多くのラメラリンは、ガン細胞に対する強力な増殖抑制活性、エイズウイルス増殖阻害活性、多剤耐性(MDR)克服活性等の多彩な生理活性を有しており、医薬開発のためのリード化合物として有望である。

(2) ラメラリンの抗ガン作用は、主に DNA

トポイソメラーゼ I の阻害にことが知られているが、近年、フランス INSERM の Bailly 等により分子レベルでのトポイソメラーゼ I 阻害作用機構が明らかになった。これによると、本酵素阻害は、二本鎖 DNA の主溝(major groove)側からインターカレートしたラメラリンが、トポイソメラーゼ I と水素結合し、強固に結合した DNA-トポイソメラーゼ I-ラメラリン複合体を形成することにより起こると説明されている。

## 2. 研究の目的

この DNA-酵素-薬剤複合体モデルによると、ラメラリンの 8 位水酸基、20 位水酸基およびラクトンカルボニル基は、それぞれ酵素と水素結合し、複合体形成に重要な役割を果たしているが、中心のピロール環は酵素あるいは DNA と直接的には相互作用を行っていない (Fig. 1)。

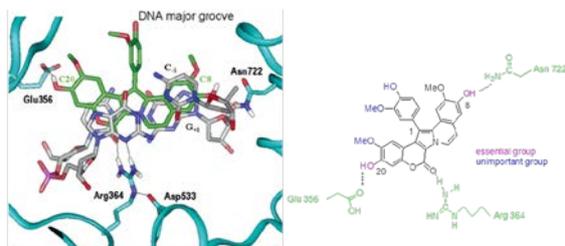


Fig. 1. ラメラリンDとトポイソメラーゼIとの複合体

従って、共役構造を維持できるのであれば、ピロール環の窒素原子は環内の他の位置に移動可能であると考えられ、活性発現に必要な 8 位と 20 位の水酸基を残しつつ窒素の位置を変換したイソラメラリン(2)およびビスラクトン(3)と名付けた 2 種のラメラリン誘導体にもトポイソメラーゼ I 阻害による抗ガン活性を持つことが期待できる (Fig. 2)。本研究では、(1) イソラメラリン(2)およびビスラクトン(3)を合成し、ガン細胞増殖阻害活性やトポイソメラーゼ I 阻害活性等の生理活性を調べ、抗ガン剤リードとしての有効性を検討する。

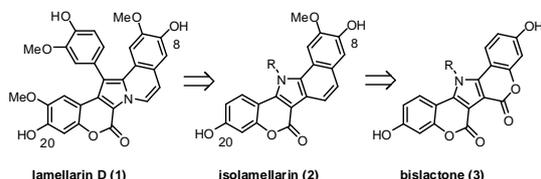


Fig. 2. Structure Modification of Lamellarin D (1) to Isolamellarin (2) and Bislactone (3)

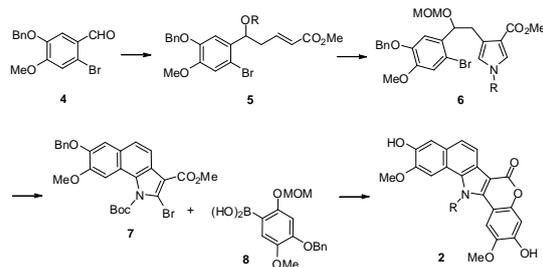
- (2) ピロール窒素原子上に種々の置換を導入したアナログを合成し、構造と活性の関係を調べる。
- (3) 構造活性相関の結果のフィードバックにより新たな候補分子の設計と合成を行い、より高活性・高選択的な阻害分子の開発を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 合成

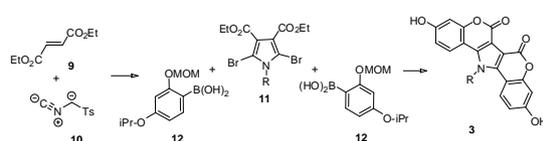
イソラメラリン(2)の合成計画を Scheme 1 に示す。2-ブロモベンズアルデヒド 4 と 5-ブロモクロトン酸との Reformatski 反応により 5 とし、このものとトシルメチルイソシアニド (TosMIC) アニオンとの [3+2] 双極子環状付加反応によりピロール環を構築し 6 を得、このものの分子内 Heck 反応等によりベンゾインドール 7 とする。五環性のイソラメラリ

ン骨格は、7 と芳香族ボロン酸 8 との Suzuki-Miyaura クロスカップリング反応とラクトン化により構築することとした。



Scheme 1. Strategy for the synthesis of Isolamellarin

一方、対称性の化合物ビスラクトン(3)は、フマル酸ジエチル(9)と TosMIC(10)を用いたピロール環形成反応及び臭素化により得られる 2,5-ジブロモピロール 11 と芳香族ボロン酸 12 とのダブル Suzuki-Miyaura 反応及びラクトン化により合成することとした (Scheme 2)。



Scheme 2. Strategy for the synthesis of bislactone 3

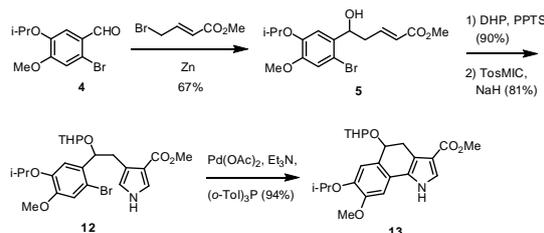
### (2) 生理活性

合成したイソラメラリン、ビスラクトン及び主要な合成中間体のがん細胞株 (HeLa) 及び正常細胞株 (Vero) に対する増殖阻害活性は、コロニーアッセイ法あるいは MTT 法により評価した。また、トポイソメラーゼ I 阻害活性は、Bailly 等の DNA relaxation assay により評価した。

## 4. 研究成果

### (1) イソラメラリン類の合成

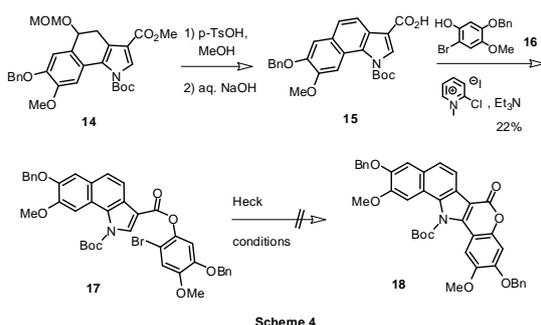
合成は、2-ブロモベンズアルデヒド 4 と 4-ブロモクロトン酸メチルとの Reformatski 反応から始め、収率 67% でアクリル酸誘導体 6 を得た。このものの水酸基をメトキシメチルエーテルで保護した後、TosMIC から生じたアニオンとの [3+2] 双極子環状付加反応により高収率でピロール誘導体 12 を得た。このものの分子内 Heck 反応は、リガンドとしてトリ *o*-トリルフォスフィンを使用することで



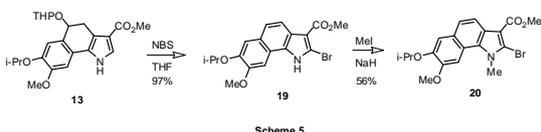
Scheme 3

良く進行し、高収率で **13** を得ることが出来た (Scheme 3)。

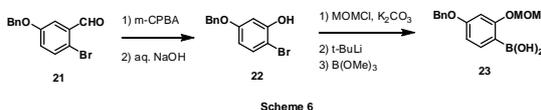
この三環性の中体からイソラメラリンへの変換は、まずは、分子内 Heck 反応を利用する方法を検討した (Scheme 4)。化合物 **13** と同様の方法で調製した **14** の脱水反応及び加水分解反応によりカルボン酸 **15** へと導き、2-ブロモフェノール **16** とのエステル化により **17** とした。このものの分子内 Heck 反応によるイソラメラリン骨格の構築を種々試みたが、目的物 **18** は得られず、エステルが加水分解され生じたフェノール **16** を微量改修しただけであった。



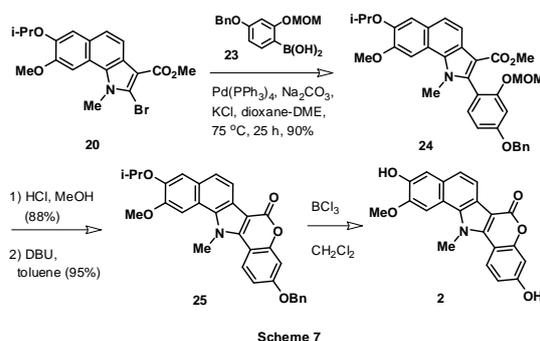
そこで、分子間 Suzuki-Miyaura クロスカップリング反応を利用した方法を検討した。分子内 Heck 反応生成物 **13** のピロール2位を NBS で臭素化したところ、脱水反応まで進行し、効率的に 2-ブロモベンゾピロール **19** が得られた。次いで窒素原子をメチル化し、**20** を収率 56% で得た (Scheme 5)。



Suzuki-Miyaura 反応に使用する芳香族ボロン酸 **23** は、芳香族アルデヒド **21** の Baeyer-Villiger 酸化及びリチオ化経路のボロン酸化反応により調製した (Scheme 6)。

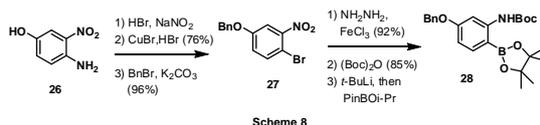


2-ブロモベンゾピロール **20** とボロン酸 **23** とのクロスカップリング反応は、一般的な Suzuki-Miyaura 反応条件下で良く進行し、カップリング体 **24** が高収率で得られた。次いでラクトン環の形成とフェノール水酸基の脱保護を行い、目的のイソラメラリン-1 (IL-1) (**2**) の全合成を完結した。イソバニリンからの工程数は 11 工程と比較的短く、通算収率も 14% と良く、合成法としては満足出来るものであった。

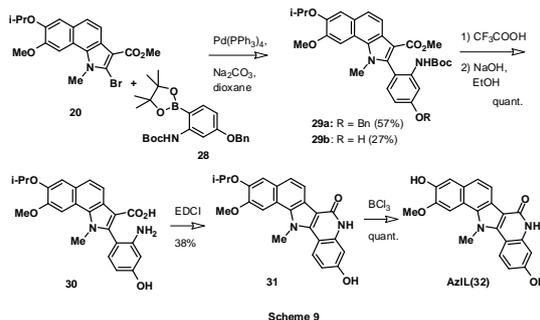


## (2) ラクトム型イソラメラリンの合成

イソラメラリンは生体内で加水分解可能なラクトン環を有しているため、代謝により *in vivo* では活性を失う可能性が危惧される。そこで、ラクトン環を難分解性のラクタム環へと変換したアザイソラメラリン (AzIL) の合成を行った。合成はイソラメラリンの中体 **20** を利用することとし、クロスカップリングに使用するアミノフェニルボロン酸エステル **28** は、アミノベンゼン **26** の Sandmeyer 反応等により合成した (Scheme 8)。



2-ブロモベンゾインドール **20** とボロン酸エステル **28** との Suzuki-Miyaura カップリング反応は良く進行したが、反応中に生成物のベンジル保護基が一部はずれ、**29a** と **29b** の混合物が得られた。次いで **29b** をアミノ酸 **30** へと導き、EDCI を用いたラクタム化により **31** を得た。最後にイソプロピル保護基を除去し、アザイソラメラリン (**32**) を合成した (Scheme 9)。

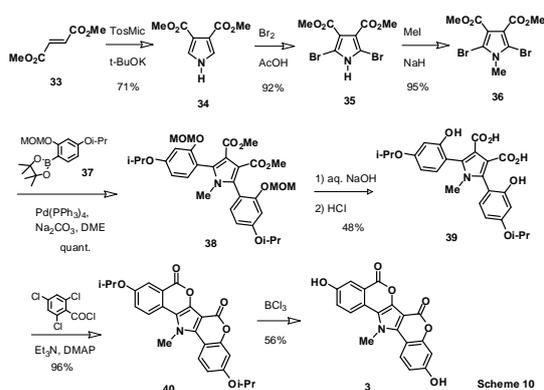


## (3) ビスラクトンの合成

ビスラクトンに関しても、分子内ダブル Heck 反応を利用した方法をまずは試みたが、反応が進行しなかったため、分子間 Suzuki-Miyaura 反応を基盤とする方法により合成した (Scheme 10)。

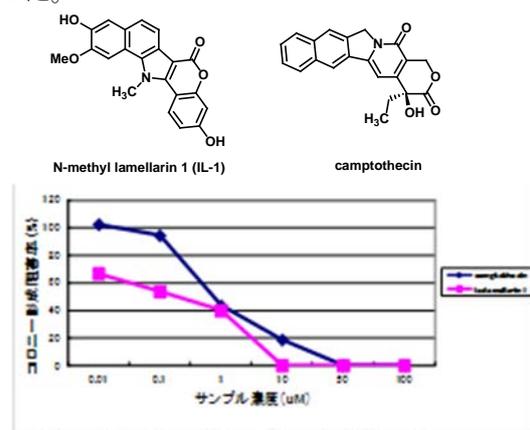
フマル酸ジメチルと TosMIC との反応によりピロール骨格を形成し、2位と5位を臭素化し **35** とした。ピロールアミノ基をメチル

化した後、芳香族ボロン酸エステル **37** とのダブル Suzuki-Miyaura クロスカップリング反応を行い **38** を得た。**38** の脱 MOM 体のエステル交換反応によるビスラクトン化は進行しなかったため、一旦、脱 MOM 化及びエステルの加水分解によりジヒドロキシ-ジエステル **39** へと導いた後、山口法によるビスラクトン化を行い **40** を高収率で得た。最後に、イソプロピル保護基を除去し、目的のビスラクトン (**3**) を合成した。



#### (4) 細胞増殖阻害活性

合成した IL-1 の細胞増殖阻害活性試験結果を **Fig. 3** に示す。活性は、最終濃度 0.01~100  $\mu$ M になるように調整したサンプルの DMSO 溶液をヒト子宮頸ガン由来細胞株 HeLa 細胞懸濁液 (200 cells / well) に加え 5% CO<sub>2</sub> 下 37  $^{\circ}$ C で 84 時間培養した後のコロニー形成阻害率で表した。本アッセイでは、培養時間が長すぎたため (通常は 72 時間)、増殖細胞が多くなり、見かけ上の活性値は低くなったが、IL-1 ( $\blacklozenge$ ) は、カンプトテシン ( $\blacksquare$ ) を凌ぐ細胞増殖阻害活性を示すことが分かった。



**Fig. 3** Anti-proliferative Activity of Isolamellarin (IL-1) and Camptothecin on HeLa cell Line

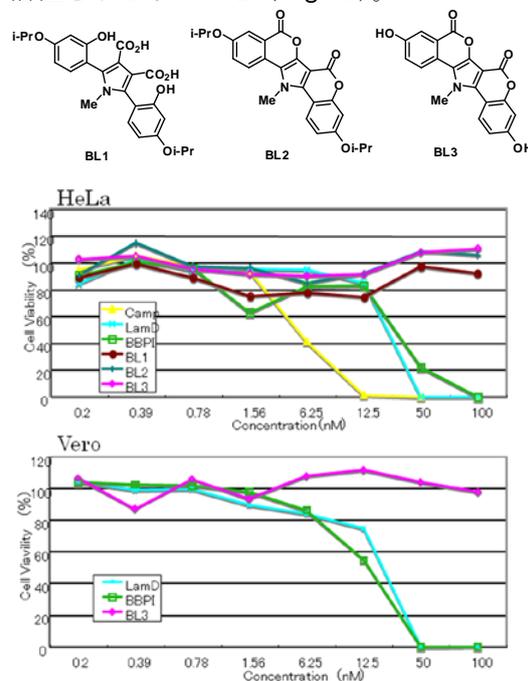
アザイソラメラリン (AzIL, **32**) のがん細胞に対する増殖阻害活性は、MTT 法により評価した。その結果を **Table 1** に示すが、当初の

予想に反し、ラクトン環をラクタム環へと変換すると、活性が大きく低下することがわかった。この理由としては、二級アミドでは (ラクタム窒素が水素化されている) ラクタム-ラクタム互変異性化が起こり、分子構造が大きく変化することが考えられる。アミド窒素をメチル化するなどの方法により互変異性化を防ぐことで活性の増大が期待できる。

**Table 1.** Anti-proliferative activity (MTT assay) of Azaisolamellarin and Isolamellarin-1 (cell viability, % of control)

	Concentration (nM)		
	100	25	12.5
Isolamellarin-1 (IL-1)	31	76	104
Azaisolamellarin (AzIL)	70	83	95

ビスラクトン (**3**, BL3) に関しては、合成中間体 BL1 及び BL2 を含め、ガン細胞 (HeLa) 及び正常細胞 (Vero) に対する増殖阻害活性を調べたが、いずれの化合物も顕著な活性を示さなかった (**Fig. 4**)。

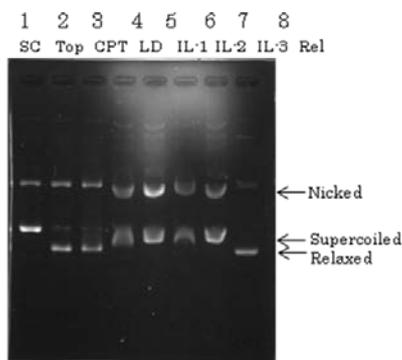


**Fig. 4** Anti-proliferative activity (colony assay) of Bislactone (BL3) and Its Synthetic Intermediates (BL1 and BL2) on HeLa and Vero Cell Lines

#### (5) トポイソメラーゼ I 阻害活性

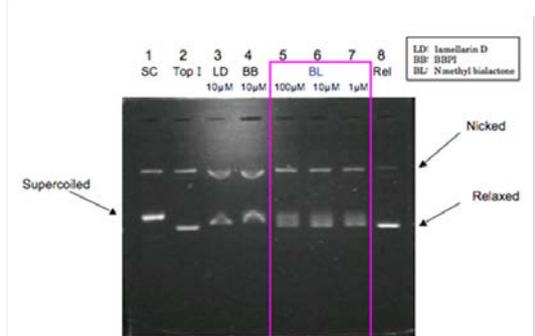
合成したイソラメラリン (IL-1) のトポイソメラーゼ I に対する阻害活性試験結果を **Fig. 5** に示す。トポイソメラーゼ I が存在すると、lane 2 において観察されるように、スーパーコイル型 DNA (SC, lane 1) は弛緩型 DNA (Rel, lane 8) へと変換される。この系にラメラリン D (LD) の様な阻害剤が存在すると、DNA 鎖に切れ目 (ニック) を入れた段階で酵素反応が停止し、nicked DNA (open circular DNA) が蓄積する (lane 4)。10  $\mu$ M の IL-1 存在下では、DNA の生成が観察された (lane 5)。

従って、イソラメラリンは、ラメラリンと同様にトポイソメラーゼ I の結合部位に良く適合し、酵素作用を阻害することが明らかになった。



**Fig. 5. Topoisomerase I inhibition.**  
Effect of isolamellarin (IL-1) and lamellarin D (LD) on relaxation of supercoiled DNA by human topoisomerase I. Supercoiled plasmid pBR322 DNA (0.25 µg, lane 1) was incubated with 5 units of topoisomerase I in the absence (lane 2) and presence of the drug at a concentration of 10 µM (lane 3 to 7) at 37°C for 30 min.

一方、ビスラクトン (BL) は、100 µM の高濃度では僅かにトポイソメラーゼ I 阻害活性を示したものの (lane 5)、10 µM 濃度以下では顕著な活性を示さなかった (lane 6, 7) (Fig. 6)。これらの化合物がイソラメラリンと比較すると大幅に抗ガン活性が低下する事実と良く一致している。



**Fig. 6 トポイソメラーゼ I 阻害活性試験**  
Effect of BBP1 (BB), lamellarin D (LD) and bislactone (BL) on relaxation of supercoiled DNA by human topoisomerase I. Supercoiled plasmid pHOT-1 DNA (0.1 µg, lane 1) was incubated with 5 units of topoisomerase I in the absence (lane 2) and presence of the drug at a concentration of 10 µM (lane 3 to 4 and 6), 100 µM (lane 5), 1 µM (lane 7) at 37°C for 30 min.

ビスラクトンやラクタム型イソラメラリンには活性が見られなかったが、N-メチルイソラメラリン (IL1, IL3) は天然物を凌ぐ高い *in vitro* 抗ガン活性を示した。これらの化合物は天然物と比べ合成の容易さや誘導化の用意さの点で優れており、新しい抗ガン剤のリードとして極めて有望であると考えられる。今後は、*in vivo* においても有効な、より現実的な抗ガン活性物質の開発研究へと展開する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 6 件)

- ① Shotaro Hirao, Kenji Tara, Kazuyoshi Kuwano, Junji Tanaka, Fumito Ishibashi, Algicidal Activity of Glycerolipids from the Brown Alga *Ishige sinicola* on Red Tide Microalgae, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有、76 巻、2012、372-374
- ② Haruka Kamiyama, Yoshinao Kubo, Hironori Sato, Naoki Yamamoto, Tsutomu Fukuda, Fumito Ishibashi, Masatomo Iwao, Synthesis, structure-activity relationships, and mechanism of action of anti-HIV-1 lamellarin a 20-sulfate analogues, *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有、19 巻、2011、7541-7550
- ③ Tsutomu Fukuda, Fumito Ishibashi, Masatomo Iwao, Synthesis and Biological Activity of Lamellarin Alkaloids: An Overview, *Heterocycles*, 査読有、83 巻、2011、491-529
- ④ Shotaro Hirao, Yuki Yoshinaga, Masatomo Iwao, Fumito Ishibashi, A Formal Total Synthesis of the Telomerase Inhibitor Dictyodendrin B, *Tetrahedron Lett.*, 査読有、51 巻、2010、533-536
- ⑤ Shotaro Hirao, Yumiko Sugiyama, Masatomo Iwao, Fumito Ishibashi, Synthetic Approach to Telomerase Inhibitor Dictyodendrin B: Synthesis of the Pyrrolo[2,3-c]carbazole Core, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 査読有、73 巻、2009、1764-1772
- ⑥ Takeshi Ohta, Tsutomu Fukuda, Fumito Ishibashi, Masatomo Iwao, Design and Synthesis of Lamellarin D Analogues Targeting Topoisomerase I, *J. Org. Chem.*, 査読有、74 巻、2009、8143-8153

〔学会発表〕 (計 8 件)

- ① 吉田賢佑、糸山諒介、福田 勉、石橋郁人、岩尾正倫、Laurent Meijer、光学活性 16-メチルラメラリン N の絶対配置の決定とプロテインキナーゼ阻害活性評価、日本化学会第 92 春季年会、平成 24 年 3 月、横浜
- ② 福永光希、柱野彩、石橋郁人、岩尾正倫、海洋天然物ラメラリンをモデルとした新規トポイソメラーゼ I 阻害活性物質の創製、日本農芸化学会西日本支部・中国四国支部合同大会、平成 23 年 9 月、宮崎
- ③ S. Hirao, Y. Yoshinaga, M. Iwao, F. Ishibashi, Total Synthesis of the Marine Pyrrolocarbazole Alkaloid Dictyodendrin B, 23rd International Congress of Heterocyclic Chemistry,

Glasgow, 31st July to 4th Aug., 2011,  
P-398

- ④ 石橋郁人、海洋産多環性ピロールアルカロイド類の合成と生理活性、日本農芸化学会支部総会・奨励賞受賞講演・特別講演会、平成 23 年 1 月、福岡
- ⑤ 森瀬崇大、石橋郁人、硫酸エステル型ピロールアルカロイドの合成研究、日本農芸化学会西日本支部大会 (第 284 回)、平成 22 年 9 月、熊本
- ⑥ 吉永祐樹、平尾翔太郎、石橋郁人、テロメラーゼ阻害活性物質デイクテオデンドリンAの合成研究、日本農芸化学会西日本支部大会 (第 284 回)、平成 22 年 9 月、熊本
- ⑦ 平尾翔太郎、吉永祐樹、岩尾正倫、石橋郁人、テロメラーゼ阻害活性物質デイクテオデンドリンBの合成、日本農芸化学会 2010 年度大会、平成 22 年 3 月、東京
- ⑧ 平尾翔太郎、岩尾正倫、石橋郁人、テロメラーゼ阻害活性物質デイクテオデンドリンの合成研究：基本骨格化合物の合成、第 39 回複素環化学討論会、平成 21 年 10 月、千葉

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：抗癌活性化合物

発明者：岩尾正倫、石橋郁人、福田勉、長谷川寛雄

権利者：国立大学法人長崎大学

種類：特許

番号：PCT/JP2012/50872

出願年月日：平成 24 年 1 月 17 日

国内外の別：外国

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.fish.nagasaki-u.ac.jp/fish/kyoukan/isibasi/fi-j.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石橋 郁人 (ISHIBASHI FUMITO)

長崎大学・大学院水産・環境科学総合研究科・教授

研究者番号：10192486

### (2) 研究分担者

長富 潔 (OSATOMI KIYOSHI)

長崎大学・大学院水産・環境科学総合研究科・教授

研究者番号：40253702