

## 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5月15日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590006

研究課題名（和文） 2,3-ベンゾジアゼピン類の高効率合成法の開発と  
中枢神経系疾患治療薬開発への展開研究課題名（英文） Development of Novel Methodology for the Synthesis of 2,3-  
Benzodiazepines and Application for Neuro-therapeutic Agents

研究代表者

松谷 裕二（MATSUYA YUJI）

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・教授

研究者番号：50255858

研究成果の概要（和文）：新しい神経性疾患治療薬開発を念頭に置いた医薬品シーズ探索を目的とし、2,3-ベンゾジアゼピン誘導体の合成研究を行った。合成には、筆者が独自に開発したベンゾシクロブテン誘導体とジアゾメチレン化合物の連続的電子環状反応を利用した。その結果、これまで報告例のない新規な複素環骨格「ジアザベンゾトロポン」型化合物ライブラリーを得ることができた。これら誘導体について中枢神経系保護活性の評価を実施したところ、期待していた活性は認められなかったものの、腫瘍細胞に対する顕著なアポトーシス誘導活性を示す化合物が見出された。このように、オリジナルな手法にて初めて合成されたジアザベンゾトロポン類が、新規抗癌剤シーズとして期待されるという知見を得ることに成功した。

研究成果の概要（英文）：Synthetic and medicinal studies of 2,3-benzodiazepine derivatives were performed for the purpose of exploring novel drug seeds of neuronal disorders. We could establish new method of constructing 2,3-benzodiazepine nucleus based on our original tandem electrocyclic reactions using benzocyclobutenes and diazomethylene anion as starting materials, and succeed in constructing a novel diazabenzotropone compounds library. Although these compounds were found not to exhibit neuronal protecting activity, some of them showed notable apoptosis-inducing activity against some lymphoma cells. Thus, we found that novel diazabenzotropone derivatives, synthesized utilizing our original reactions, could be a new candidate of novel anticancer agents.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：有機化学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学

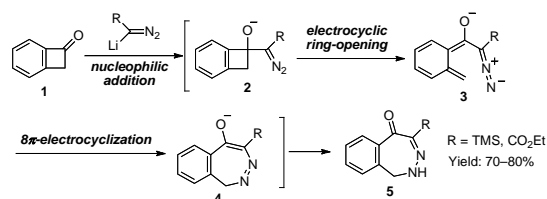
キーワード：2,3-ベンゾジアゼピン、ジアザベンゾトロポン、AMPA レセプター、神経性疾患、電子環状反応、アポトーシス誘導、抗癌活性

含窒素複素環骨格は、アルカロイド等の生理活性天然物や医薬品成分の基本骨格として広く存在する部分構造であり、それらの効率的合成法の開発は、有機合成化学および医薬品開発研究において非常に重要な課題である。その中で、特に医薬品に汎用されているものとしてベンゾジアゼピン骨格が挙げられる。ベンゾジアゼピンは、窒素原子の位置によりいくつかの種類が存在する。例えば1,4-ベンゾジアゼピン誘導体は、脳内の中枢神経系において主に GABA 受容体に作用することが知られており、睡眠薬や抗不安薬として利用されている。一方で、ある種の2,3-ベンゾジアゼピン誘導体が、神経系のグルタミン酸受容体の一つである AMPA レセプターのアンタゴニストとして作用することが報告され、最近注目を集めている。グルタミン酸は中枢神経系の興奮性伝達物質であり、その拮抗作用を有する本化合物群は過剰刺激による中枢神経の細胞死を抑制すると考えられ、認知症や痙攣、パーキンソン病といった様々な神経領域疾患の治療薬としての可能性を有している。AMPA 受容体に対する選択的拮抗作用を示す化合物は、従来にない新しいメカニズムを有する薬剤であることから、最近いくつかの研究グループにより2,3-ベンゾジアゼピン誘導体の構造活性相関研究が展開されている。

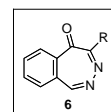
ところで最近筆者は、ベンゾシクロブテン誘導体の連続的電子環状反応を活用した縮環系化合物合成に取り組んできており、その一環としてベンゾシクロブテン誘導体とジアゾメチレン化合物による2,3-ベンゾジアゼピン誘導体の新規合成法を開発し報告した。本法は従来の2,3-ベンゾジアゼピン合成とは全く異なる方法論を用いており、それゆえこれまで報告のなかった新規誘導体の供給を可能とした。このように、筆者オリジナルの合成手法にて、新しい2,3-ベンゾジアゼピン誘導体合成が達成され、その構造活性相関研究へと展開されれば、新規医薬品探索の有効な手段になると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究推進の基盤となる2,3-ベンゾジアゼピン誘導体合成法の概略を次に示す。ベンゾシクロブテン環は熱エネルギーにより4 $\pi$ 電子環状反応が進行し、反応性に富んだオルトキノジメタン中間体(3)を生成する。これが分子内に存在するジアゾ基と8 $\pi$ 環化反応を起こすことで、2,3-ベンゾジアゼピン-5-オン骨格(5)が高効率にて形成される。



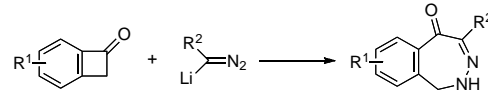
- (1) 本研究の第一の目的は、上記合成法の一般性を検証しながら適用範囲拡張を目指し、種々の置換様式を有する2,3-ベンゾジアゼピン誘導体合成法へと発展、確立させることである。これには、共存置換基のリミテーションの検討や、形成された2,3-ベンゾジアゼピン骨格上の置換基修飾も含まれる。
- (2) 第二の目的は、ジアザベンゾトロポン化合物の合成とその反応性の検討である。上記反応の生成物(5)は、1,2-ジヒドロ型の2,3-ベンゾジアゼピンであるが、この1,2-酸化型は擬芳香性を有するベンゾトロポン類のジアザ類縁化合物と見なすことができる(例えば6)。詳細なデータベース検索の結果、このような骨格を有する化合物の報告は皆無であった。特徴的な反応性や生物活性が期待されるため、その調査を実施する。
- (3) 第三の目的は、得られた2,3-ベンゾジアゼピン誘導体の生物活性評価と構造活性相関研究である。合成した誘導体の活性評価によりリード構造を見出し、それを基にした分子設計、合成、活性評価により、新たな医薬品シーズを探索する。



## 3. 研究の方法

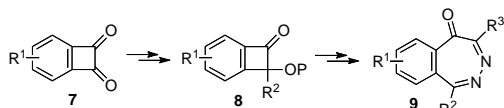
- (1) 2,3-ベンゾジアゼピン合成における、置換基バリエーションの検討

下記スキームにおける、置換基R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>の適用範囲について検討を行う。これにより、合成可能な2,3-ベンゾジアゼピン誘導体のバリエーションを精査する。



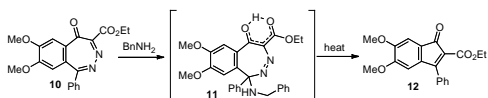
- (2) ジアザベンゾトロポン化合物合成の検討

下図に示す通り、酸化状態を高くした基質(ベンゾシクロブテンジオン類7)を用いることで、ジアザベンゾトロポン型化合物(9)を合成することを検討する。



### (3) ジアザベンゾトロポニン型化合物の反応性に関する検討

ジアザベンゾトロポニン化合物 (**10**) について、アミン触媒的な脱窒素反応が進行するという興味深い知見を得ている（下記スキーム参照）。そこで、アミン類以外の様々な求核剤との反応を検討して、その化学反応性の解明を進める。



### (4) AMPA 受容体アンタゴニスト活性の評価と構造活性相関の検討

合成、供給された 2,3-ベンゾジアゼピン誘導体について、AMPA 受容体に対するアフィニティーを *in vitro* 試験にて評価する。

### (5) その他、生物活性のスクリーニングと構造活性相関研究

新規ジアザベンゾトロポニン化合物について、各種生物活性のスクリーニングを行う。また、ここで得られた情報を基にして、構造活性相関の検討を行い、次の分子設計へとフィードバックして新たなリード化合物の探索を進めていく。

## 4. 研究成果

4,5-ジメトキシベンゾシクロブテン-1,2-ジオンから 2 工程で合成されるベンゾシクロブテノン誘導体 **1a-f** に対し、 $-78^{\circ}\text{C}$  の低温下にてリチオジアゾアセテートを反応させ、その後徐々に室温まで昇温させたところ、オルトキノジメタン中間体 (**2**) の形成と、引き続き  $8\pi$  電子環状反応が円滑に進行し、2,3-ベンゾジアゼピン体 **3a-f** を良好な収率で得ることができた。本化合物は緩やかな酸処理によってシラノールの脱離が進行し、ジアザベンゾトロポニン骨格を有する 2,3-benzodiazepin-5-one 誘導体 **4a-f** を合成することに成功した (Scheme 2, Table 1)。更に、5 位のオキシ構造や 4 位のエトキシカルボニル基について、還元反応による官能基変換も行い、全 12 種類のジアザベンゾトロポニン誘導体ライブラリーを得ることに成功

した。

Scheme 2

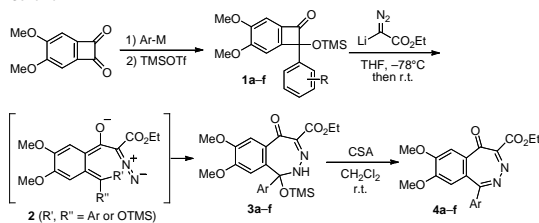


Table 1

entry	substrate	R	yield (%) of 3	yield (%) of 4
1	<b>1a</b>	H	75	87
2	<b>1b</b>	4-Me	69	94
3	<b>1c</b>	2-Me	81	84
4	<b>1d</b>	4-MeO	64	99
5	<b>1e</b>	4-Br	71	88
6	<b>1f</b>	4-CF <sub>3</sub>	44	95

また、合成したジアザベンゾトロポニン化合物 (**4a-f**) について、アミン触媒脱窒素反応の精査を行った。Scheme 2, Table 1 に示す通り、エタノール中でベンジルアミンを作用させ、加熱することでほぼ定量的にインダノン誘導体 (**5a-f**) を生成することが明らかとなった。

Scheme 2

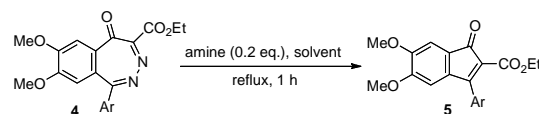


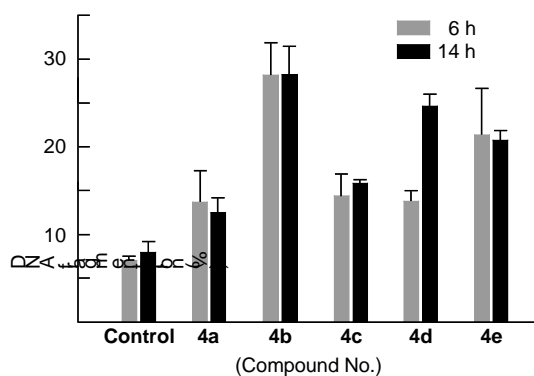
Table 2

entry	substrate	solvent	amine	yield (%)
1	<b>a</b>	benzene	none	0
2	<b>a</b>	benzene	BnNH <sub>2</sub>	24
3	<b>a</b>	DME	BnNH <sub>2</sub>	30
4	<b>a</b>	DCE	BnNH <sub>2</sub>	66
5	<b>a</b>	DMF	BnNH <sub>2</sub>	88
6	<b>a</b>	EtOH	BnNH <sub>2</sub>	93
7	<b>a</b>	EtOH	pyrrolidine	59
8	<b>a</b>	EtOH	Et <sub>3</sub> N	0
9	<b>a</b>	EtOH	DMAP	0
10	<b>b</b>	EtOH	BnNH <sub>2</sub>	97
11	<b>c</b>	EtOH	BnNH <sub>2</sub>	47
12	<b>d</b>	EtOH	BnNH <sub>2</sub>	quant.
13	<b>e</b>	EtOH	BnNH <sub>2</sub>	
14	<b>f</b>	EtOH	BnNH <sub>2</sub>	quant.

合成した新規ジアザベンゾトロポニン誘導体について、AMPA レセプターアンタゴニスト活性の評価を行ったが、残念ながら有意な活性を認めるには至らなかった。一方、その検討過程で本化合物群が細胞死を誘発している可能性が見出されたため、*in vitro* にてアポトーシス誘導作用の評価を行った。その結果の一部を Figure 1 に示す。ヒトリンパ腫細胞を化合物 ( $10\mu\text{M}$ ) で処理し、6 時間または 14 時間インキュベーション後の DNA フラグメンテーションの割合を、フローサイトメトリーにて定量した。これらの結果から、母

核 1 位のフェニル基上のパラ位にかき高い置換基を有する誘導体 (4b, 4e) において、顕著なアポトーシス誘導活性が認められることが判明した。この結果は、更なる化合物構造のチューニングにより活性増強に結びつけられれば、有望な抗癌剤シーズの発掘に繋がるものである。

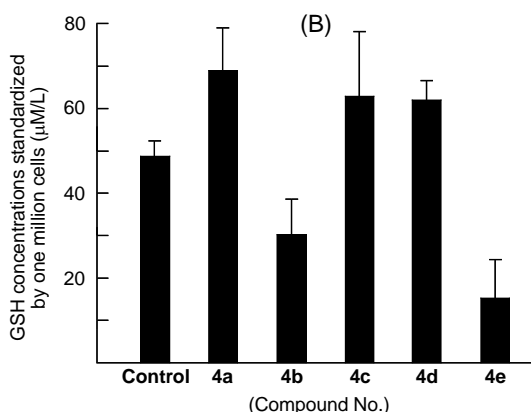
Figure 1



また、上述の通り、合成されたジアザベンゾトロポン誘導体は特異な化学反応性を示し、特にアミン類のような求核性化合物に対する感受性が大きいことが判っている。これは、ジアゼピン環の 1 位に求核付加反応が生じやすいためであると推定されている。そこで、生体内に存在する強い求核性構造として知られるシステイン残基との相互作用を調べるべく、ジアザベンゾトロポン誘導体と N-acetylcystein (NAC) との反応を検討した。その結果、NMR スペクトル追跡により、これらが室温下にて定量的に相互作用し、付加生成物を生じていることを示唆する結果が得られた。

NAC は生体内において、抗酸化作用を示す glutathione (GSH) の前駆体となる分子であるため、ジアザベンゾトロポン誘導体の活性発現が、細胞内 GSH レベルの低下と関連する可能性が考えられる。そこで、in vitro にてジアザベンゾトロポン誘導体の GSH レベルに及ぼす影響について検討を行った。Figure 2 に示す通り、化合物 4b と 4e において、顕著な GSH レベルの低下が観察された。これは、Figure 1 で明らかとなったアポトーシス誘導活性と相関した結果であるといえる。

Figure 2



以上の結果から、ジアザベンゾトロポン誘導体はその高い求電子性から GSH レベルの低下を引き起こし、細胞内酸化ストレスの増大とカスパーゼ酵素系の活性化を経てアポトーシス誘導をもたらすという作用メカニズムが示唆された。今後、これらの結果を踏まえ、更なる分子設計と合成、活性評価により、より有効性の高い新規抗癌剤候補化合物を探索していく予定である。

## 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 1 件)

Novel 3,4-Diazabenzotropone Compounds (2,3-Benzodiazepin-5-ones): Synthesis, Unique Reactivity, and Biological Evaluation. Matsuya, Y.; Katayanagi, H.; Ohdaira, T.; Wei, Z.-L.; Kondo, T.; Nemoto, H. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 1361-1364. (査読有り)

[学会発表] (計 8 件)

- (1) 杉本健士, 林 理恵, 湊大志郎, 根本英雄, 豊岡尚樹, 松谷裕二: シクロブテノンの連続的電子環状反応を用いた 1,2-ジアゼピン骨格の構築. 日本薬学会第 132 年会, **2012**, *3*, 29-31, 札幌.
- (2) 林 理恵, 杉本健士, 湊大志郎, 根本英雄, 豊岡尚樹, 松谷裕二: ジアゾメチレン挿入反応による新規 1,2-ジアゼピン誘導体の合成. 第 41 回複素環化学討論会, 2011, 10, 20-22, 熊本.
- (3) 林 理恵, 杉本健士, 湊大志郎, 根本英雄, 豊岡尚樹, 松谷裕二: タンデム型電子環状反応による新規 1,2-ジアゼピン誘導体の合成. 平成 23 年度有機合成化学北陸セミナー, 2011, 10, 7-8, 福井.
- (4) 林 理恵, 杉本健士, 根本英雄, 豊岡尚樹, 松谷裕二: タンデム型電子環状反応

- によるジアゼピン環形成反応. 日本薬学会第 131 年会, 2011, 3, 28-31, 静岡.
- (5) 林 理恵, 松谷裕二, 豊岡尚樹, 根本英雄: ジアザトロポン閉環反応を利用したアザコルヒチン骨格構築への応用. 日本薬学会第 130 年会, 2010, 3, 28-30, 岡山.
- (6) 大平卓也, 片柳裕志, 松谷裕二, Zheng-Li Wei, 近藤 隆, 豊岡尚樹, 根本英雄: アポトーシス誘導活性を有するジアザベンゾトロポン類に関する研究. 創薬懇話会 2009, 2009, 12, 10-11, 岐阜.
- (7) 片柳裕志, 大平卓也, 松谷裕二, 豊岡尚樹, 根本英雄: 脳神経保護作用を有する 1-aryl-2,3-benzodiazepine 誘導体の合成研究. 平成 21 年度有機合成化学北陸セミナー, 2009, 10, 9-10, 富山.
- (8) 大平卓也, 片柳裕志, 松谷裕二, Zheng-Li Wei, 近藤 隆, 豊岡尚樹, 根本英雄: 新規ジアザベンゾトロポン類の合成、反応性、および生物活性. 日本薬学会北陸支部第 120 回例会, 2009, 7, 11, 金沢.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松谷 裕二 (MATSUYA YUJI)

富山大学・大学院医学薬学研究部・教授

研究者番号: 50255858

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

東田 千尋 (TOHDA CHIHIRO)

富山大学・和漢医薬学総合研究所・准教授

研究者番号: 10272931