

## 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25年 5月15日現在

機関番号： 12501

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2010 ~ 2012

課題番号： 22510224

研究課題名（和文） 植物塩基由来の新規抗腫瘍薬リード化合物の探索と創製研究

研究課題名（英文） Search for new antitumor lead-compounds originated from plant alkaloids

## 研究代表者

北島 満里子 (KITAJIMA MARIKO)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号： 60195261

研究成果の概要（和文）：植物塩基由来の新規抗腫瘍薬開発のためのリード化合物の探索と創製のため、*Gelsemium* アルカロイド並びにコルヒチノイドの化学的研究、生物活性評価を行った。その結果、*Gelsemium* 属植物より特異な構造を有する新規アルカロイド類を見出した。*Gelsemium* アルカロイドの一種である Sarpagine 型アルカロイドの重要中間体を金触媒環化反応により合成した。一方、4位ハロゲン化 colchicine 並びに7位に $\alpha$ -hydroxyacetoamide を有する 4-chlorocolchicine が強力な抗腫瘍活性を有することがわかった。高活性 colchicine 誘導体のプロドラッグ化合物を合成し、腫瘍細胞選択性を評価した。

研究成果の概要（英文）：To discover and develop lead-compounds for new antitumor medicines originated from plant alkaloids, chemical investigation and biological evaluation of *Gelsemium* alkaloids and colchicinoids were carried out. As results, several novel alkaloids were isolated from *Gelsemium* plants. Key intermediates of sarpagine-type alkaloids, one of the members of *Gelsemium* alkaloids, were synthesized utilizing gold-catalyzed cyclization. 4-Halocolchicines and 4-chlorocolchicine derivatives bearing an  $\alpha$ -hydroxyacetoamide side chain at C-7 were found to show potent antitumor activities. Pro-drugs of highly-active colchicine derivatives were prepared and their selective toxicity to the tumor cells was evaluated.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：天然物化学、生物活性物質

## 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の現在、がん患者は増加の一途をたどっている。既存の抗腫瘍薬は重篤な副作用や多剤耐性がん細胞の出現など様々な問題を抱えており、これらを凌駕する新しい

薬剤の開発が強く望まれている。我々は植物塩基であるゲルセミウムアルカロイド並びにコルヒチノイドが腫瘍細胞に対する強力な細胞毒性作用を有することを見出した。そこで、これら植物塩基を素

材として新規抗腫瘍薬開発のための先導化合物の探索と創製研究を行うこととした。

## 2. 研究の目的

植物塩基由来の新規抗腫瘍薬リード化合物の探索と創製を目的とし、腫瘍細胞に対する強力な細胞毒性を有することが明らかとなったゲルセミウムアルカロイド並びにコルヒチノイドを素材として、新規抗腫瘍性天然アルカロイドの探索、各種誘導体の合成、活性評価、構造活性相関研究による高活性化合物の取得、活性化合物の効率的合成法の確立、腫瘍細胞選択性の向上を目指したプロドラッグ化を行う。

## 3. 研究の方法

新規抗腫瘍性天然物の探索のため、マチン科 *Gelsemium* 属植物、ユリ科 *Sandersonia* 属植物などの詳細な成分探索を行った。得られた化合物について構造解析と構造確認のための化学変換を行った。

腫瘍細胞に対する顕著な毒性作用を有する gelsedine 型アルカロイドの誘導体合成と全合成研究を行った。同様に腫瘍細胞毒性作用を有する yohimban 型アルカロイド sempervirine の誘導体合成を検討した。

Colchicine の 4 位並びに 7 位アミノ基における各種誘導体を合成した。

上記研究において得られたアルカロイド、誘導体について、ヒト腫瘍細胞（肺癌細胞 A549、大腸癌細胞 HT29、HCT116 など）に対する毒性評価を行った。

強力な抗腫瘍活性が認められた colchicine 誘導体を用いて、腫瘍細胞選択性の獲得を目指したプロドラッグ化を行った。

## 4. 研究成果

(1) ゲルセミウムアルカロイドを基盤とした新規抗腫瘍薬リード化合物の探索と創製研究

マチン科 *Gelsemium elegans* より特異な構造を有する新規 gelsedine 型アルカロイド 4 種 (1-4) を単離した (Fig. 1、文献 2)。

*N*<sub>6</sub>-Methylgelsedilam (1)、15-hydroxy-*N*<sub>6</sub>-methylgelsedilam (2) は、18,19-norgelsedine 骨格でラクタム構造を有するアルカロイドである。*N*<sub>6</sub>-Methylgelsedilam (1) は、gelsenicine (5) からの化学変換によりその構造を確認した (Scheme 1)。

Gelsesyringalidine (3)、14-dehydrogelsefuranidine (4) は、それぞれ gelsenicine (5) の 19 位に syringaldehyde、furfural 由来の側鎖を有する gelsedine 型アルカロイドで、gelsenicine (5) からの化学変換によりその構造を決定した (Scheme 2)。

### Gelsedine Type

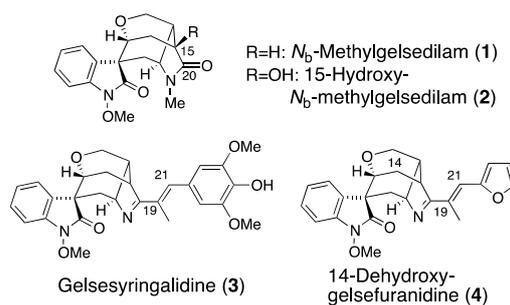
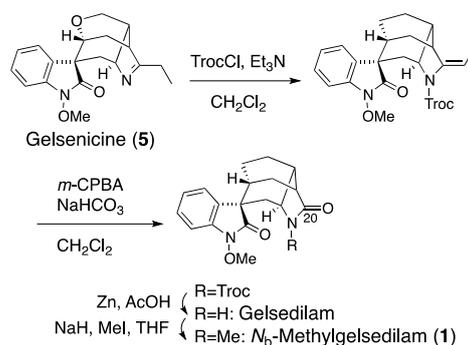
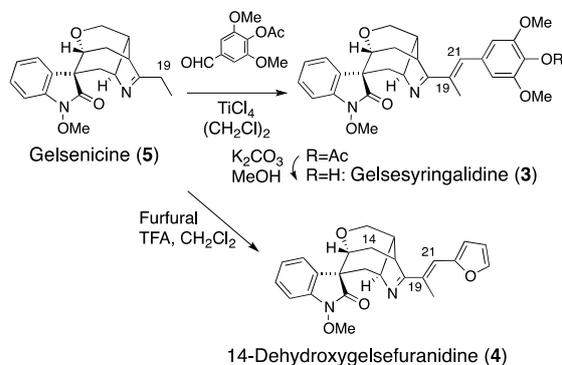


Fig. 1



Scheme 1



Scheme 2

また、*G. elegans*、*G. rankinii* より新規 humantenine 型アルカロイド 8 種 (6-13)、koumine 型アルカロイド 1 種 (14)、gelsemine 型アルカロイド 2 種 (15, 16)、sarpagine 型アルカロイド 2 種 (17, 18) を単離した (Fig. 2、文献 2、5)。

Humantenoxenine (6)、15-hydroxyhumantenoxenine (7) は、通常のゲルセミウムアルカロイドよりさらに酸化段階が進行し、β-アミノ-α,β-不飽和ケトン構造を有する humantenine 型アルカロイドである。Kounaminal (14) はアミナル構造を有する koumine 型アルカロイドである。

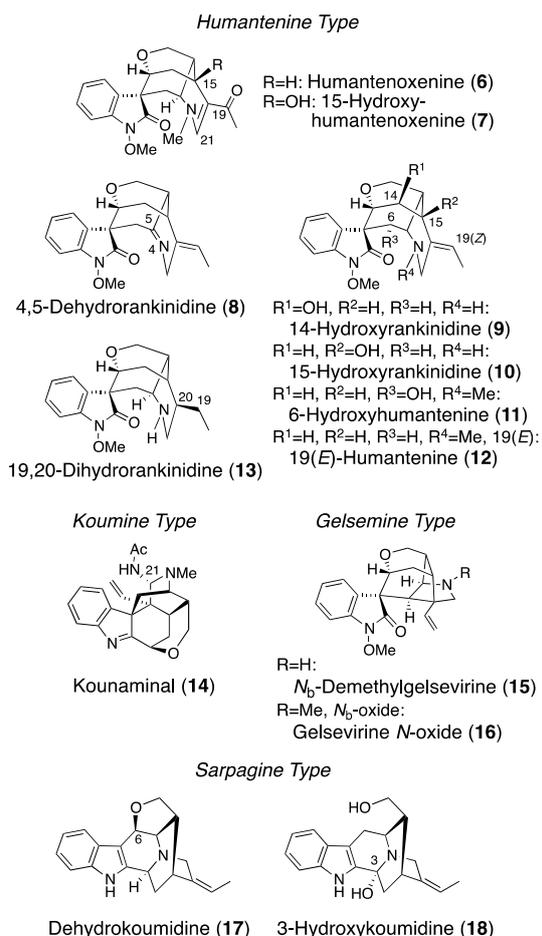


Fig. 2

腫瘍細胞に対する顕著な細胞毒性作用を有する gelsedine (19)型アルカロイドの全合成研究の一環として、金触媒環化反応を利用した sarpagine 型アルカロイド 20 の全合成研究を行い、重要中間体を得た (Fig. 3)。また、腫瘍細胞に対する毒性作用を有する

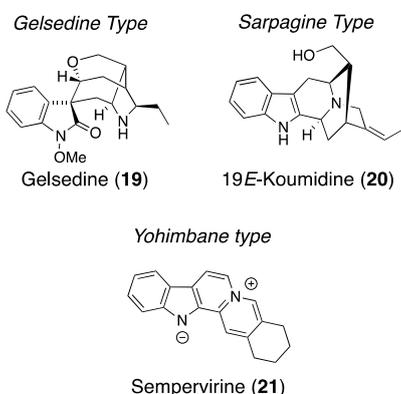


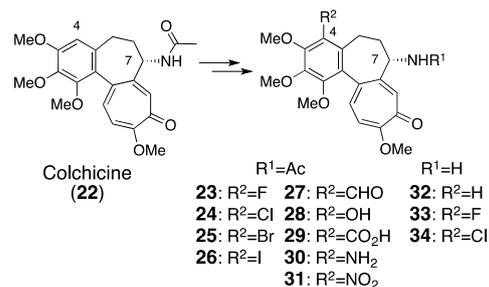
Fig. 3

yohimban 型アルカロイド sempervirine (21) の誘導体合成を行った。

得られたアルカロイド類の生物活性評価を行った。

(2) コルヒチンを基盤とした新規抗腫瘍薬リード化合物の探索と創製研究

Colchicine (22) より 4 位ハロゲン化体を含む colchicine 誘導体 23-31 並びに deacetylcolchicine 誘導体 32-34 を合成した (Scheme 3、文献 3)。



Scheme 3

得られた誘導体について、ヒト肺癌細胞 A549、ヒト大腸癌細胞 HT29、HCT116 に対する細胞毒性評価を行った (Table 1)。その結果、4 位ハロゲン化 colchicine 誘導体 23-26 が、colchicine (22) を上回る活性を有することが明らかとなった。

Compound	IC <sub>50</sub> value (μM)		
	A549	HT29	HCT116
Colchicine (22)	0.054	0.008	0.011
23	0.033	0.007	0.008
24	0.012	0.010	0.009
25	0.014	0.006	0.007
26	0.032	0.006	0.007
27	1.007	0.128	0.054
28	0.225	0.484	NT
30	2.185	1.550	NT
31	0.073	0.031	0.038

Compound	IC <sub>50</sub> value (μM)	
	A549	HT29
Colchicine (22)	NT	NT
32	0.036	0.025
33	0.101	0.080
34	0.301	0.250

A549, human lung adenocarcinoma; HT29, human colon adenocarcinoma; HCT116, human colorectal carcinoma; NT, not tested

Table 1

そこで、4-fluorocolchicine (23)、4-chlorocolchicine (24) についてマウスを用いた *in vivo* 試験 (HCT116 ヒト大腸癌細胞、腹腔内投与) を行った (Table 2)。Colchicine (22) では 1 mg/kg/day で腫瘍細胞の増殖を

32.8%阻害したものの毒性が強くマウスの死亡率が 2/5 であったのに対し、**23**、**24** においてはマウスが死亡すること無く有効な活性を示した。したがって 4 位へのフルオロ基 (**23**)、クロロ基 (**24**) の導入により colchicine (**22**) の毒性が軽減されることがわかり、これら化合物の有効性が示された。

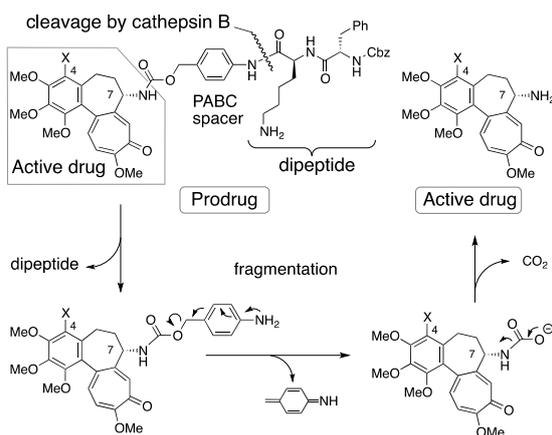
Compd	Schedule on days	Dose (mg/kg/day)	Total dose (mg/kg)
Control	1-5 & 8-12	-	-
<b>22</b>	1, 3, 5	1	3
<b>23</b>	1-5 & 8-12	0.25	2.5
<b>23</b>	1-5 & 8-12	1	10
<b>24</b>	1-5 & 8-12	5	50

Compd	Tumor weight (g, mean $\pm$ S.D.)	Inhibition rate (%)	Mortality
Control	1.61 $\pm$ 0.34	-	0/5
<b>22</b>	1.08 $\pm$ 0.51	32.8	2/5
<b>23</b>	1.21 $\pm$ 0.44	25.0	0/5
<b>23</b>	0.71 $\pm$ 0.28	55.6	0/5
<b>24</b>	0.51 $\pm$ 0.08	68.4	0/5

Table 2

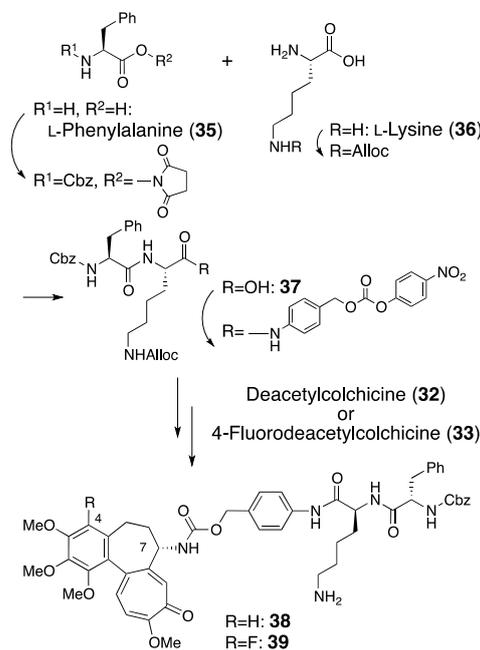
続いて、腫瘍細胞選択性の獲得を目指して、高活性 4 位ハロゲン化 colchicine 誘導体について、腫瘍細胞において過剰発現している酵素ジペプチターゼ cathepsin B を利用したプロドラッグ化を行った。酵素によって認識・切断されるジペプチド鎖をあらかじめ活性化化合物に結合させておき、腫瘍細胞内において酵素によるジペプチド鎖の切断とこれに続くフラグメンテーション反応により活性化化合物が腫瘍細胞選択的に放出されるという手法である (Scheme 4)。



Scheme 4

活性化化合物としては上述のフラグメンテーションで放出可能であり、活性が保持されている deacetylcolchicine (**32**) と 4-fluorodeacetylcolchicine (**33**) を用いた。L-フェニルアラニン (**35**) と L-リシン (**36**) より

誘導したジペプチド Phe-Lys **37** と活性化化合物を self-immolative (自己犠牲) *p*-aminobenzyloxycarbonyl (PABC) spacer を介して結合させたプロドラッグ **38**、**39** を合成した (Scheme 5)。



Scheme 5

次に合成したプロドラッグ **38**、**39** についてウシ肝臓由来の cathepsin B による開裂反応 (pH 5.0, 37°C) を行った。HPLC 分析により経時変化をモニターした結果、反応時間の経過とともにプロドラッグの量が減少し、活性化化合物 **32**、**33** の量が増加したことから、活性化化合物の放出を確認できた。また、活性化化合物とともにジペプチドの生成も確認されたことから、cathepsin B によるペプチド鎖の開裂と続く spacer 部のフラグメンテーション反応が期待通り進行したことが明らかとなった。

プロドラッグ **38**、**39** と deacetylcolchicine 誘導体 **32**、**33** の腫瘍細胞選択性を HT29 ヒト大腸癌細胞、正常ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) に対する細胞毒性より評価した (Table 3)。その結果、活性化化合物 **32**、**33** の選択性がそれぞれ 1.4、0.9 であったのに対し、プロドラッグ **38**、**39** ではそれぞれ 1.7 であった。更なる選択性の向上を目指し、他のプロドラッグ化について検討中である。

Compound	IC <sub>50</sub> value (□M)		Selectivity (HUVEC/HT29)
	HT29	HUVEC	
<b>38</b>	0.044	0.075	1.7
<b>39</b>	0.091	0.151	1.7
<b>32</b>	0.025	0.034	1.4
<b>33</b>	0.080	0.075	0.9

Table 3

また、強力な活性を有する 4-chlorocolchicine (**24**)について 7 位側鎖の acylamide 基の各種誘導体 (*N*-alkanoyl 誘導体、*N*-aroyl 誘導体) を合成した (文献 1)。活性評価の結果、7 位に  $\alpha$ -hydroxyalkyl amide 基を有する **40**、**41** がマウスを用いた *in vivo* 試験 (HCT116 ヒト大腸癌細胞、静脈内投与) において強力な抗腫瘍活性を示し、広い有効用量範囲と良好な代謝安定性を有することがわかった (Fig. 4、Table 4)。

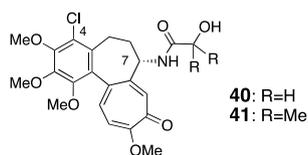


Fig. 4

Cytotoxicities				
Compound	IC <sub>50</sub> value ( $\mu$ M)			
	A549	HT29	HCT116	
<b>40</b>	0.0163	0.0080	0.0082	
<b>41</b>	0.0194	0.0078	0.0081	

Antitumor activities				
Compd	Dose (mg/kg/day)	Total dose (mg/kg)	IR <sup>a</sup> (%)	Mortality
<b>40</b>	20.0	60.0	43.6	0/3
<b>40</b>	40.0 <sup>b</sup>	120.0	66.7	0/3
<b>41</b>	50.0	150.0	58.5	0/4
<b>41</b>	100.0 <sup>b</sup>	300.0	67.3	0/4

<sup>a</sup> Inhibition rate. <sup>b</sup> Half of maximum dose.

Table 4

一方、ユリ科 *Sandersonia* 属植物の成分探索を行い、*S. aurantiaca* より新規コルヒチノイド metacolchicine (**42**)を見出した (Fig. 5、文献 4)。本化合物は通常のコルヒチノイドと比べ炭素多い特異な構造を有している。



Fig. 5

## 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 25 件)

- (1) H. Nishiyama, M. Ono, T. Sugimoto, T. Sasai, N. Asakawa, T. Matsumoto, T. Yaegashi, M. Nagaoka, T. Matsuzaki, N. Kogure, M. Kitajima, and H. Takayama: Synthesis and Biological Evaluation of

4-Chlorocolchicine Derivatives as Potent Anticancer Agents with Broad Effective Dosage Ranges. *Med. Chem. Comm.*, **3**, 1500-1504 (2012) 査読有, DOI: 10.1039/c2md20250f.

- (2) Y. Yamada, M. Kitajima, N. Kogure, S. Wongseripipatana, and H. Takayama: Seven New Monoterpenoid Indole Alkaloids from *Gelsemium elegans*. *Chem. Asian J.*, **6**, 166-173 (2011) 査読有, DOI: 10.1002/asia.201000538.
- (3) N. Yasobu, M. Kitajima, N. Kogure, Y. Shishido, T. Matsuzaki, M. Nagaoka, and H. Takayama: Design, Synthesis, and Antitumor Activity of 4-Halocolchicines and their Pro-drugs Activated by Cathepsin B. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2**, 348-352 (2011) 査読有, DOI: 10.1021/ml100287y.
- (4) M. Kitajima, A. Tanaka, N. Kogure, and H. Takayama: Metacolchicine, A New Colchicinoid from *Sandersonia aurantiaca*. *Heterocycles*, **83**, 1903-1907 (2011) 査読有.
- (5) M. Kitajima, H. Kobayashi, N. Kogure, and H. Takayama: New Oxindole and Indole Alkaloids from *Gelsemium rankinii*. *Tetrahedron*, **66**, 5987-5992 (2010) 査読有, DOI: 10.1016/j.tet.2010.06.032.

[学会発表] (計 77 件)

- (1) 遠藤慎平, 八十歩直子, 北島満里子, 小暮紀行, 高山廣光: 腫瘍細胞選択性を有するコルヒチン系ダブルプロドラッグ化合物の合成研究. 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 29 日, 横浜.
- (2) 北島満里子, 八十歩直子, 小暮紀行, 宍戸祐之, 松崎健, 長岡正人, 高山廣光: がん細胞選択毒性を有する Colchicine 系抗腫瘍薬の創製研究. 第 54 回天然有機化合物討論会, 2012 年 9 月 19 日, 東京.
- (3) 八十歩直子, 北島満里子, 小暮紀行, 宍戸祐之, 松崎健, 長岡正人, 高山廣光: 新規 colchicine 誘導体を利用した腫瘍細胞選択的プロドラッグ化合物の創製研究. 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 30 日, 札幌.
- (4) N. Kogure, Y. Yamada, M. Kitajima, S. Wongseripipatana and H. Takayama: New Monoterpenoid Indole Alkaloids from *Gelsemium elegans*. The 6<sup>th</sup> International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia and 2<sup>nd</sup> New Phase International Conference on Cutting-Edge Organic Chemistry in Asia (ICCEOCA-6/

- NICCEOCA-2), Dec. 12, 2011, Hong Kong, China.
- (5) Y. Yamada, M. Kitajima, N. Kogure, S. Wongseripipatana, and H. Takayama: Isolation, Structure Elucidation, Chemical Transformation and Biological Evaluation of Novel *Gelsemium Alkaloids*. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS11), Nov. 30, 2011, Tokyo.
- (6) N. Yasobu, M. Kitajima, N. Kogure, Y. Shishido, T. Matsuzaki, M. Nagaoka, and H. Takayama: Synthesis of 4-Halocolchicines and Their Pro-drug Derivatives having Potent Antitumor Activity. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS11), Nov. 30, 2011, Tokyo.
- (7) 北島満里子, 尾原聡子, 小暮紀行, Dammrong Santiarworn, 高山廣光: アカネ科 *Ophiorrhiza trichocarpon* 含有新規インドールアルカロイド配糖体の構造解析. 第 53 回天然有機化合物討論会, 2011 年 9 月 27 日, 大阪.
- (8) 山田洋介, 小暮紀行, 北島満里子, 高山廣光, Sumphan Wongseripipatana: *Gelsemium elegans* 含有新規アルカロイドの成分探索および化学的研究. 日本生薬学会第 58 回年会 シンポジウム, 2011 年 9 月 24 日, 東京.
- (9) 北島満里子: 薬用資源植物含有生物活性アルカロイドの探索と創薬先導化合物の創製研究. 第 28 回和漢医薬学会学術大会 シンポジウム, 2011 年 8 月 27 日, 富山.
- (10) 八十歩直子, 北島満里子, 小暮紀行, 高山廣光: Colchicine 誘導体を基盤としたプロドラッグ化合物の創製研究. 第 46 回天然物化学談話会, 2011 年 7 月 7 日, 熱川.
- (11) 山田洋介, 小暮紀行, 北島満里子, 高山廣光: Sempervirine 誘導体の合成研究. 第 46 回天然物化学談話会, 2011 年 7 月 7 日, 熱川.
- (12) 山田洋介, 北島満里子, 小暮紀行, 高山廣光: ゲルセミウムアルカロイド Sempervirine をシードとした抗腫瘍薬の創製研究-1-. 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 31 日, 静岡.
- (13) 八十歩直子, 北島満里子, 小暮紀行, 宍戸祐之, 松崎健, 長岡正人, 高山廣光: 新規 colchicine 誘導体を利用したプロドラッグ化合物の創製. 日本薬学会第 131 年会, 2011 年 3 月 29 日, 静岡.
- (14) Y. Yamada, M. Kitajima, N. Kogure, S. Wongseripipatana, H. Takayama: Isolation, Spectroscopic analyses, Chemical Transformation and Biological Evaluation of Novel *Gelsemium Alkaloids*. 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), Dec. 18, 2010, Hawaii, USA.
- (15) 八十歩直子, 小暮紀行, 北島満里子, 松崎健, 長岡正人, 高山廣光: がん細胞選択毒性を有する colchicine 系抗腫瘍薬の創製研究. 第 29 回メディシナルケミストリーシンポジウム, 2010 年 11 月 17 日, 京都.
- (16) 山田洋介, 北島満里子, 小暮紀行, 小林宏美, 石井直子, Sumphan Wongseripipatana, 高山廣光: ゲルセミウム属植物含有新規インドールアルカロイドの探索と化学的研究. 第 52 回天然有機化合物討論会, 2010 年 10 月 1 日, 静岡.
- (17) Y. Yamada, M. Kitajima, N. Kogure, S. Wongseripipatana, H. Takayama: Novel Monoterpenoid Indole Alkaloids from *Gelsemium elegans*. The 57<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society of Pharmacognosy (Tokushima, 2010), and The 5th JSP-CCTNM-KSP Joint Symposium on Pharmacognosy, Sept. 24, 2010, Tokushima.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 3 件)

名称: Colchicine Derivatives

発明者: H. Takayama et al.

権利者: 千葉大学 他

種類: PCT Int. Appl.

番号: WO 2011021397

出願年月日: 2011 年 2 月 24 日

国内外の別: 国外

名称: コルヒチン誘導体

発明者: 高山廣光 他

権利者: 千葉大学 他

種類: 出願

番号: PCT/JP2010/005136

出願年月日: 2010 年 8 月 20 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.p.chiba-u.ac.jp/lab/seitai/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北島 満里子 (KITAJIMA MARIKO)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号: 60195261

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者