

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32684

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590019

研究課題名(和文) 抗腫瘍活性海洋天然物を創薬シードとする合成研究と新規医薬品の創製

研究課題名(英文) Development for medicinal chemistry on antitumor isoquinoline marine natural products as lead compound

研究代表者

齋藤 直樹 (SAITO, NAOKI)

明治薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80142545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：東南アジアに生息する海洋生物が生産する抗腫瘍活性イソキノリン天然物をリード化合物として、新規微量天然物の探索、構造解析と化学誘導を行い、さらにレニエラマイシンGとクリプロスタチン4の全合成を達成した。次に天然物およびその各種誘導体に全合成中間体を加え、ヒト実験腫瘍細胞に対する殺細胞活性を検定し、生物活性発現に必要な官能基を選定した。一方、天然物の左半部モデル化合物を合成し、創薬開発候補化合物として有望な化合物群を見出した。

なお、以上の研究成果は学術専門誌(14)と国内外学会やセミナーにおいて発表した。

研究成果の概要(英文)：In the course of our research on new metabolites, which involves the isolation and characterization of biologically active compounds and the preparation of their respective analogues, we can isolate several new marine isoquinolines, such as renieramycin V-Y from blue sponges. The second, we are succeeded to the total syntheses of renieramycin G and cibrastatin 4. Furthermore, many model compounds of the left half of renieramycins were prepared from phenylalanine derivatives. The initial cytotoxicity profiles of natural products and their derivatives along with synthetic analogues are also presented.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・化学系薬学・合成化学

キーワード：海洋天然物 抗腫瘍活性 イソキノリン 国際共同研究 構造解析 全合成 エクチナサイジン レニエラマイシン

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 海洋天然物化学の変遷：1980年代後半から世界的に海洋天然物の探索研究が活発に展開され、数千におよぶ多種多様な新規海洋天然物が見出された。

(2) 海洋生物由来創薬ターゲットの歴史：1960年代から、米国フロリダ半島沿岸に生息する群体ホヤ (*Ecteinascidia turbinata*) のメタノール抽出液の探索が展開され、エクチナサイジン 743 (Et 743: 商品名ヨンデリス; 一般名トラベクテジン) は、その斬新かつ複雑な構造と新規性の高い作用機構から新規制癌剤の創薬リードとして世界的に注目されてきた。1996年、E. J. Corey 教授による最初の全合成をはじめとして 2011年までに5つの全合成が達成された。

(3) これまでの経緯：申請者は 2001年からタイ国に生息する海洋生物の二次代謝産物の探索研究を展開し、プーケット島沿岸において Et 743 を生産する群体ホヤ *Ecteinascidia thurstoni* の採集に成功した。一方、バンコク東側に位置するチョンブリ県シーシャン島沿岸に生息する青色海綿 *Xestospongia* sp. がサフラシンと同じ基本骨格を持つ一群のレニエラマイシン類を生産することを見出した。私たちは、これらの天然物について、化学誘導と生物活性試験の検定と全合成研究などの創薬基礎研究を精力的に展開してきた。

(4) 研究準備状況：本研究で取り扱う海洋生物の採集及び標的海洋天然物の供給は、日本学術振興会「アジア・アフリカ学術基盤形成事業」として当該研究代表者とともに平成 22~24 年度に明治薬科大学が日本側拠点機関として採択された研究課題「生物活性天然物や酵素の機能を生かした難病早期診断治療・診断薬の開発」(日本側コーディネーター：櫻庭 均 教授) の中で、海外拠点機関の協力を得て「生物多様性条約」に準拠しながら展開する体制が整備されている。

## 2. 研究の目的

(1) 海洋生物由来二次代謝物の化学誘導化、ヒト実験腫瘍細胞に対する *in vitro* 細胞毒性試験を実施し、新規制癌剤の開発候補化合物を選定する。

(2) これまでの探索研究をさらに展開してマイナー成分の探索を展開し、新たな創薬ターゲット分子の発見に努める。

(3) 本系天然物の標的タンパク質(薬物受容体)の構造を追求し、ドッキング・スタディを経て活性の増強、選択性の向上による副作用の軽減を目的とした化学修飾を行う。

(4) 活性発現に必要な官能基を含む様々な部分骨格を保持した低分子化合物を合成し、新規合成医薬品の開発につなげる。

(5) 天然物全合成経路の開発により標的分子の安定供給手段を確立する。

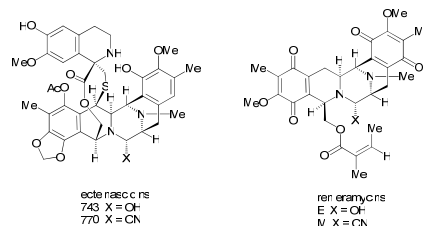
(6) 天然物の化学変換、部分合成および全合成研究を展開する過程で新規概念や方法

論の開発をめざす。

## 3. 研究の方法

(1) 研究材料の入手方法：本研究の展開に必要な海洋天然物 (Et 770, RM) はそれらの起源海洋生物をタイ側協力研究者である Khanit Suwanborirux 博士 (チュラ大・薬) に採集を委託入手した。

(2) 研究材料の新たな入手経路の開拓：フィリピンの青色海綿の生態調査と採集を Gisela P. Concepcion 教授 (フィリピン大学・海洋資源研究センター) に依頼し、新たな供給経路の開拓に努めた。



(3) 原海洋生物を採集後、青酸カリウム (KCN) 前処理後、アルカロイドの一般的抽出、分離、精製を行い、Et 770 と RM をそれぞれ準備した (*J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 935-937; **2003**, *66*, 1441-1446)。

(4) 天然物の化学誘導と生物活性の検定：数多くの天然物誘導体を合成した (Et 770: *Chem. Pharm. Bull.*, **2006**, *54*, 1010-1016; RM: *Bioorg. & Med. Chem.*, **2009**, *17*, 4548-4558)。各種誘導体について、ヒト腫瘍細胞に対する殺細胞活性を指標として構造活性相関を解析した。

(5) 私たちのサフラマイシン抗生物質の合成研究成果を基軸として、レニエラマイシン類の全合成を展開した。

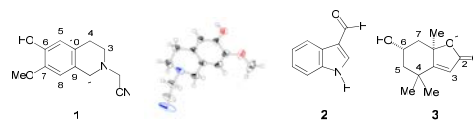
(6) 活性発現に必要な構造単位を備えた部分構造の合成による新規合成医薬品の開発：本系化合物の活性発現に必要な官能基を含む構造単位を推定し、左半部モデル化合物の合成を展開した。

(7) その他：本系天然物の生物活性発現機構を解明する手がかりを得るために、生物系専門家の協力を得ていくつかの創薬基盤研究を展開した。

## 4. 研究成果

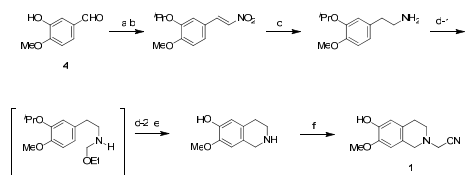
以下に主な研究成果をまとめた。

(1) 研究材料の供給：2011年10月にプーケット島南東において群体ホヤ *Ecteinascidia thurstoni* (湿重量 51.3 kg) を採集し、KCN 前処理後、常法により抽出、分離、精製し、Et 770 (359 mg) と Et 786 (Et 770 の S-oxide: 320 mg) を得た。



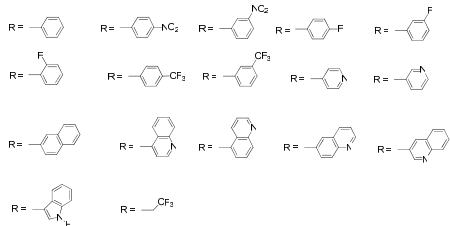
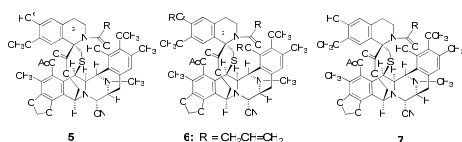
ここで低極性フラクション (4.55 g) についてから新規低分子テトラヒドロイソキノリン

化合物 **1** (10.0 mg) を 2 つの既知化合物 **2** (8.7 mg) と **3** (3.6 mg) とともに得た。さらにイソバニリン **4** から 9 工程で **1** の合成に成功した (*Heterocycles*, **2014**, *88*, 363-375)。

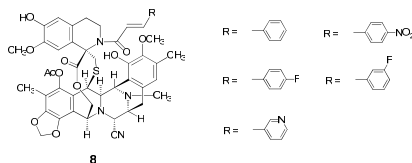


Scheme 1. a)  $K_2CO_3$  (Ph), DMF, 80 °C, 1 h, 100%; b)  $NH_4OAc$ ,  $MeNO_2$ , reflux, 3 h, 54%; c)  $(-)$ -NaBH<sub>4</sub>,  $S_2O_8^{2-}$ ,  $HOAc/CH_2Cl_2$ , 25 °C, 4 h (1); d)  $NC_2$ ,  $Et_3N$ ,  $MeOH/THF$ , -77 °C, 30 min, 59% (2 steps); e)  $(-)$ -NaBH<sub>4</sub>,  $HOAc$ ,  $K_2CO_3$ ,  $EtOH$ , 25 °C, 5 h; f)  $TFA$ , 25 °C, 5 h, 52% (2 steps); g)  $TC_4$ ,  $CH_2Cl_2$ , 25 °C, 5 h, 84%; h) 37%  $HCHO/CH_2O$ ,  $KCN$ ,  $NH_4Cl$ ,  $Et_3N$ ,  $Et_3N$ , 5 h, 81%.

(2) 天然物の化学誘導と生物活性試験について: Et 770 の 2'-*N*-アシル誘導体 **5** は活性増強に有望である。そこで、Et 770 に存在する 2 つのフェノール性水酸基をアリル保護体 **6** としてから、*N*'-アシル化により **7** を経て、脱保護により 17 個の誘導体を合成した。

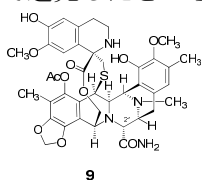


さらに、図に示すケイ皮酸アミド誘導体 **8** を 5 種類を合成しました。



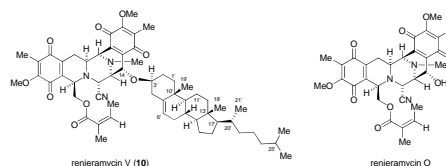
次に Et 770 の *N*-2 アシル誘導体についてヒト腫瘍細胞 (HCT116, QG56, DU145) に対する殺細胞活性を MTT アッセイ (IC<sub>50</sub> 値) で検定した結果、天然物を超える強い活性を示すいくつかの化合物を見出した。

さらに、Et 786 から Et 770 への化学変換を検討した。すなわち、Et 786 を  $ReOCl(PPh_3)_3$  存在下、フェニールシランで還元したところ、Et 770 (55.1%) とともに化合物 **9** (12.7%) が得られた。本品は 21 位にアミドを持つ初めての化合物であり、その生物活性に興味を持たれたが、まったく殺細胞活性を示さなかった (*Bioorg. & Med. Chem.*, **2011**, *19*, 4421-4436; *Chem. Pharm. Bull.*, **2013**, *61*, 1052-1064)。

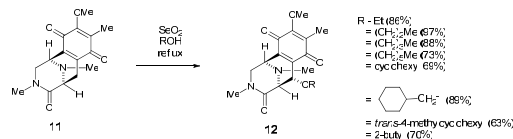


(3) 青色海綿 (*Xestospongia* sp.) の新たな二次代謝物の探索: ①タイに生息する青色

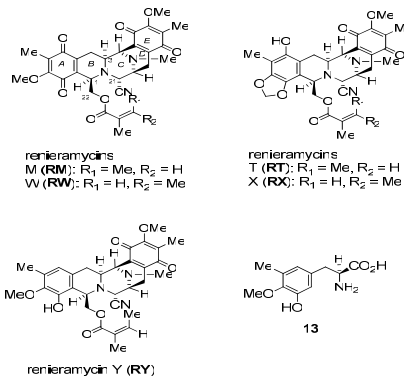
海綿 *Xestospongia* sp. 由来低極性フラクションからレニエラマイシン V (RV: **10**) を見出した。RV はレニエラマイシン O (RO) とコレステロールがエーテル結合で結ばれたユニークな構造を有している (*Heterocycles*, **2012**, *84*, 309-314)。



一方、RV の合成に興味を持ち、右半部モデル化合物 **11** を、アルコール中、二酸化セレン存在下、加熱することにより C-5 位へ酸素官能基を持つ化合物群 (**12**) の合成に成功した (*Heterocycles*, **2012**, *86*, 317-330)。



② フィリピンに生息する青色海綿 (*Xestospongia* sp.) の探索: タイに生息する青色海綿と同種海綿がフィリピンに生息している可能性が極めて高いと判断し、フィリピン大学海洋資源研究センターの Gisela P. Concepcion 教授に予備的な調査を依頼した。2011 年、9 月にミンドロー島沿岸水深 -3 ~ -5 m で標的的海洋生物 (*Xestospongia* sp.) 湿重量 200 g を採集し、KCN 前処理後、粗抽出エキス (9.52 g) を得、これを分離精製したところ、3 つの新規化合物 (レニエラマイシン W~Y (RW~RY)) を既知物質 (RM & RT) とともに得ることに成功した。なお、主生成物は RM (184.5 mg) であった (RT: 1.1 mg; RW: 1.4 mg; RX: 1.1 mg; RY: 0.9 mg)。

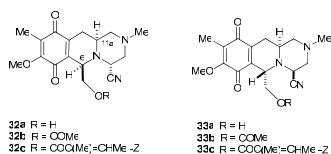


これまで得られた本系天然物の 1 位側鎖はアングリカ酸エステル (Z 型) だが、RW は RM の、また、RX は RT の不飽和エステルが異性化したチグリニン酸エステル (E 型) である。一方、RY は、最近提唱されている本系天然物が 3-hydroxy-5-methyl-O-methyltyrosine (**13**) から生合成されているという研究報告を裏付ける重要な新知見となった (*Tetrahedron*, **2012**, *68*, 7422-7428)。

(4) 全合成研究: ①レニエラマイシン G の



(*Chem. Pharm. Bull.*, **2013**, *61*, 853-869)。  
 新たな左半部モデル化合物 (**32**, **33**) の合成と生物活性の検定 (*unpublished results*)。



(6) その他：生物系の専門家との共同研究  
*Cancer Cell Int.*, **2012**, *12*:14, 1-14 & *J. Nat. Prod.*, **2013**, *76*, 1468-1474)。

このように、本研究課題に関する様々な研究成果を得ることができた。

【謝辞】原海洋生物の生態調査・採集：チュラロンコン大・薬 Khanit Suwanborirux 准教授、フィリピン大・海洋資源研 Gisela P. Concepcion 教授。

海外研究者との交流：日本学術振興会「アジア・アフリカ学術基盤形成事業（2010～2012年度）」

生物活性試験：中外製薬鎌倉研究所（新聞信夫博士、佃拓夫博士）

## 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 14 件)

- ① Shinya Kimura, Waree Pangkrung, Masashi Yokoya, Amane Honda, Plonthip Puthongking, Khanit Suwanborirux, Naoki Saito, Isolation, Structure Characterization and Synthesis of Stabilized 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline Marine Natural Product from Potassium Cyanide Pretreated Thai Tuncate, *Ecteinascidia thurstoni*, *Heterocycles*, 査読有, **88**, **2014**, 363-375.  
 Doi: 10.3987/COM-13-S(S)32.
- ② Mitsuhiro Tsujimoto, Witaya Lowtang-kitcharoen, Nanae Mori, Waree Pangkrung, Plonthip Puthongking, Khanit Suwanborirux, Naoki Saito, Chemistry of Ecteinascidins. Part 4. Preparation of 2'-N-Acyl Ecteinascidin 770 Derivatives with Improved Cytotoxicity Profiles, *Chem Pharm. Bull.*, 査読有, **61**, **2013**, 1052-1064.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/61/10/61\\_c13-00525/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/61/10/61_c13-00525/_pdf)
- ③ Thaniwan Cheun-Arom, Pithi Chanvorachote, Natchanun Sirimangkalakitti, Takushina Chuanasa, Naoki Saito, Ikuo Abe, Khanit Suwanborirux, Replacement of a Quinone by 5-O-Acetylhydroquinone Abolishes the Accidental Necrosis Inducing Effect While Preserving the Apoptosis-Inducing Effect of Renieramycin M on Lung Cancer Cells, *J. Nat. Prod.*, 査読有, **76**, **2013**, 1468-1474.  
 Dx. Doi.org/10.121/np400277m
- ④ Keiyo Nakai, Masashi Yokoya, Naoki Saito, Preparation of Tricyclic Lactam Model Compounds of Renieramycin and Saframycin Anticancer natural Products from Common Intermediate, *Chem. Pharm. Bull.*, 査読有, **61**, **2013**, 853-869.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/61/8/61\\_c13-00361/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/61/8/61_c13-00361/_pdf)
- ⑤ Phattrakorn Powan, Naoki Saito, Khanit Suwanborirux, Pithi Chanvorachote, Ecteinascidin 770, a Tetrahydroisoquinoline Alkaloid, Sensitizes human lung Cancer Cells to Anoikis, *Anticancer Res.*, 査読有, **33**, **2013**, 505-512.  
<http://ar.iiarjournals.org/content/33/2/505.full.pdf+html>
- ⑥ Mari Tatsukawa, Louvy Lynn C. Punzalan, Hilbert D. S. Magpantay, Irene M. Villasenar, Gisela P. Concepcion, Khanit Suwanborirux, Masashi Yokoya, Naoki Saito, *Tetrahedron*, 査読有, **68**, **2012**, 7422-7428.  
 Dx.doi.org/10.1016/j.tet.2012.06.067
- ⑦ Mayuko Mori, Naomi Daikuhara, Junya Yamada, Naoki Saito, Selenium Oxide Oxidation of Hexahydro-1,5-imino-3-benzazocine-7,10-dione in Aliphatic Alcohol for Conversion of Renieramycin Marine Natural Products, *Heterocycles*, 査読有, **2012**, **86**, 317-330.  
 Doi: 10.3987/COM-12-S(N)12
- ⑧ Masashi Yokoya, Kimiko Shinada-Fujino, Saiko Masahiro Mimura, Yoshida, Hiroki Takada, Naoki Saito, Chemistry of Renieramycins. Part 12. An Improved Total Synthesis of (±)-Renieramycin G, *Tetrahedron*, 査読有, **68**, **2012**, 4166-4181.  
 Dx.doi.org/10.1016/j.tet.2012.03.105
- ⑨ Hiroko Tabunoki, Naoki Saito, Khanit Suwanborirux, Kornvika Charupant, Jun-ichi Satoh, Molecular Network Profiling of U373MG Human Glioblastoma Cells Following Induction of Apoptosis by Novel Marine-derived Anti-cancer 1,2,3,4-Tetrahydroisoquinoline Alkaloids, *Cancer Cell Int.*, 査読有, **2012**, *12*:14, 1-14  
 Doi: 10.1186/1475-2867-12-14
- ⑩ Naoki Saito, Miho Yoshino, Kornvika Charupant, Khanit Suwanborirux, Chemistry of Renieramycins. Part 10. Structure of Renieramycin V, A Novel Renieramycin Marine Natural Product Having a Sterol Ether at C-14 position, *Heterocycles*, 査読有, **2012**, **84**, 309-314.  
 Doi: 10.3987/COM-11-S(P)28
- ⑪ Masashi Yokoya, Hiroshi Ito, Naoki Saito, Chemistry of Renieramycins. Part 11. Total Synthesis of (±)-Cribrostatin 4,

- Tetrahedron*, 査読有, **2011**, 67, 9185-9192.  
Dx.doi.org/: 10.1016/j.tet.2011.09.076
- ⑫ Panithi Saktrakulkula, Satoru Toriumi, Masahiro Tsujimoto, Chamunan Patarapanich, Khanit Suwanborirux, Naoki Saito, Chemistry of Ecteinascidins. Part 3. Preparation of 2'-N-Acyl Derivatives of Ecteinascidin 770 and Evaluation of Cytotoxicity, *Bioorg. & Med. Chem.*, 査読有, **19**, **2011**, 4421-4436.  
Dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2011.06.04
- ⑬ Masashi Yokoya, Hiroshi Ito, Naoki Saito, Synthesis of Renieramycins. Construction of the Core Ring System of Cribrostatin 4 Through Modified Pictet-Spengler Cyclization of 3,6-Bisarylpiperazine-2,5-Dione with Diethoxyethyl Benzoate, *Chem. Pharm. Bull.*, **2011**, 59, 787-792.  
[https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/59/6/59\\_6\\_787/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb/59/6/59_6_787/_pdf)
- ⑭ Masashi Yokoya, Kimiko Shinada-Fujino, Naoki Saito, Chemistry of Renieramycins. Part 9. Stereocontrolled Total Synthesis of (±)-Renieramycin G, *Tetrahedron Lett.*, 査読有, **52**, **2011**, 2446-2449.  
Dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2011.02.055

〔学会発表〕 (計 30 件)

- ① 森ななえ、辻本光宏、Witaya Lowtangkitcharoen, Khanit Suwanborirux, 齋藤直樹、エクチナサイジン海洋天然物の化学修飾と生物活性評価、日本薬学会第 134 年会、平成 26 年 3 月 29 日、熊本
- ② 中井啓陽、久保圭司、横屋正志、齋藤直樹、レニエラマイシン右半部モデル化合物の合成と生物活性評価、日本薬学会第 134 年会、平成 26 年 3 月 28 日、熊本
- ③ Naoki Saito, Mitsuhiro Tsujimoto, Nanae Mori, Waree Pangkrung, Proenthip Puthongking, Witaya Lowtangkitcharoen, Khanit Suwanborirux, Chemistry of Ecteinascidin Marine Natural Products. Preparation of 2'-N-Acyl Derivatives of Ecteinascidin 770 and Evaluation of Cytotoxicity, The 9<sup>th</sup> FMC International Chemistry Symposium (AIMECS13), 17, Oct, **2013**, Taipei (Taiwan)
- ④ 中井啓陽、久保圭司、中山梨乃、横屋正志、齋藤直樹、抗腫瘍活性テトラヒドロイソキノリン天然物の合成—共通中間体から左半部モデル化合物の合成、第 39 回反応と合成の進歩シンポジウム、平成 25 年 11 月 5 日、福岡
- ⑥ 齋藤直樹、タイ国に生息する海洋生物由来アルカロイドを創薬リードとする化学的研究、第 57 回日本薬学会関東支部大会、平成 25 年 10 月 26 日、東京 (招致講演)
- ⑦ 高田裕樹、三村政博、横屋正志、齋藤直樹、抗腫瘍活性天然物レニエラマイシン M の全合成、日本薬学会第 133 年会、平成 25 年 3 月 29 日、横浜
- ⑧ 森麻悠子、大工原直美、齋藤直樹、レニエラマイシン海洋天然物の化学的研究：右半部モ

デルの二酸化セレン酸化による 5 位への酸素官能基の立体選択的導入、第 38 回反応と合成の進歩シンポジウム、平成 24 年 11 月 5 日、東京

- ⑨ Naoki Saito, Kimiko Shinada-Fujuno, Masashi Yokoya, Chemistry of Renieramycin Antitumor Marine Natural Products. An Improved Total Synthesis of (±)-Renieramycin G, 15<sup>th</sup> tetrahedron Symposium, 27, June, 2012, Amsterdam (the Netherlands)
- ⑩ 辰川真理、平出裕美、齋藤直樹、Hirbert D. S. Magpantay, Louvy L. C. Punzalan, Gisela P. Concepcion, フィリピンに生息する青色海綿由来天然物の構造、日本薬学会第 132 年会、平成 24 年 3 月 31 日、札幌
- ⑪ 横屋正志、伊藤裕史、齋藤直樹、青色海綿由来イソキノリン海洋天然物の全合成研究、第 37 回反応と合成の進歩シンポジウム、平成 24 年 11 月 7 日、徳島
- ⑫ Naoki Saito, Satoru Toriumu, Mitsuhiro Tsujimoto, Panithi Saktrakulkula, Khanit Suwanborirux, Chemistry of Ecteinascidin Marine Natural Products: Synthesis of 6'-O- and 2'-N-Acyl Derivatives of Ecteinascidin 770 for Evaluation of Cytotoxicity, 8<sup>th</sup> FMC International Chemistry Symposium (AIMECS11), 2, Dec, **2011**, Tokyo (Japan)

〔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  
<http://www.my-pharm.ac.jp/pcns6mpu/wordpress/>
- 森ななえ、辻本光宏、ビタヤ・ロタンチャローン、カニ・スワンポリラック、齋藤直樹、タイ国に生息する群体ホヤ由来エクチナサイジン海洋天然物の抗腫瘍活性増強を目指した合成研究、第 3 回 CSJ 化学フェスタ、平成 25 年 10 月 23 日、東京
- 齋藤直樹、アジア圏に生息する海洋生物由来新規制癌剤の開発、イノベーション・ジャパン (大学見本市)、平成 25 年 8 月 29-30 日、東京ビックサイト

6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
齋藤 直樹 (SAITO Naoki)  
明治薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：80142545
- (2) 研究分担者  
横屋 正志 (YOKOYA Masashi)  
明治薬科大学・薬学部・助教  
研究者番号：50338539
- (3) 連携研究者 ( )  
研究者番号：