

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292056

研究課題名(和文) 特筆すべき抗癌作用を持つ特異構造希少天然物の合成と構造活性相関・標的同一化への展開

研究課題名(英文) Total synthesis of natural products with potent cytotoxicity and unique structures directed toward their chemical biological studies.

研究代表者

桑原 重文 (Kawahara, Shigefumi)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30170145

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：新しい抗癌剤の開発を指向したケミカルバイオロジー研究に資するべく、極めて強力な細胞毒性と特異な化学構造を有する天然物(amphidinolide N, nigricanoside Aなど)の全合成研究を行った。前者については、立体選択的なワンポットTHF環形成法を開発してC17-C29フラグメントの効率的合成を達成し、後者については、Evans不斉アルキル化を用いて南東フラグメントの調製を完了した。また、nigricanoside Aの2つのオキシリピン鎖のより効率的な合成法の開発と構造活性相関研究のためのユニットの調製を意図して、2種の天然オキシリピンの全合成を行った。

研究成果の概要(英文)：Total synthetic studies on two potent cytotoxins, amphidinolide N and nigricanoside A were conducted with the intention of promoting their chemical biological studies. The synthesis of the C17-C29 fragment of the former natural product was accomplished by developing an efficient one-pot THF ring-forming process. The southeastern segment of the latter was also prepared by exploiting the Evans asymmetric alkylation as a key step. The total synthesis of two natural oxylipins, the structures of which are similar to the oxylipin units incorporated in nigricanoside A, were also achieved and provided some important information useful for the total synthesis of nigricanoside A.

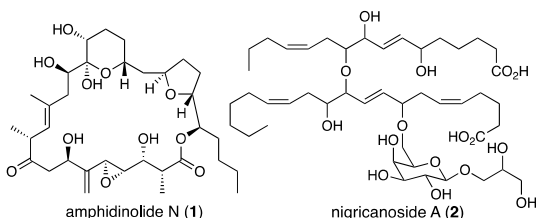
研究分野：有機合成化学

キーワード：amphidinolide nigricanoside total synthesis oxylipin cytotoxic

1. 研究開始当初の背景

癌の化学療法は、新規抗癌剤の開発と多剤併用療法をはじめとした投与法の工夫によって着実にその治療成績の向上させてきているが、未だ決定打となるような治療薬・治療法の開発には至っていない。近年、より効率的な抗癌剤開発を目指して、化合物ライブラリーのバーチャルスクリーニング、バイオインフォーマティクスを活用した標的構造情報の取得など、新しい薬剤開発法が活発に研究されてきたが、必ずしも実用的新薬の創製に直結していないのが現状と言えよう。そのような状況のもと、癌細胞に対する強力な殺傷・抑制効果が既に証明されている天然物を起点として、最新の標的特定技術やドラッグデザイン法と融合することにより新規抗癌剤の合理的設計・創製に繋げようとする天然物ケミカルバイオロジー研究が注目を集めている。

申請者は、特筆に値する強力な抗癌作用を持つ天然物[amphidinolide N (1), nigricanoside A (2)など]の全合成を成し遂げ、薬剤設計及びケミカルバイオロジー領域の研究者と連携して、新規抗癌剤の創製を目指した。



1 は、海洋性渦鞭毛藻からごく微量単離された 26 員環マクロライドであり、マウス白血病細胞 L1210 及びヒト上皮癌細胞 (KB) に対してピコモルオーダー (IC₅₀ = 78 pM 及び 93 pM) の驚異的細胞毒性を示す。近年、上述の halichondrin B (不斉点 32 個の海産ポリケチド) をリードとし、最新の精密有機合成と構造最適化・簡略化により開発された完全有機合成による悪性腫瘍治療薬ハラヴェン TM が話題となったが、1 は halichondrin B よりも活性が強く、化学構造もシンプルであるため、実用的抗癌剤リードとしてのより大きな可能性を持っていると考えた。

糖脂質と同じ構成要素 (脂肪酸, 糖, グルセロール) を持ちながら、それらが前例の無い様式で連結した nigricanoside A (2) は、希少海洋性緑藻 28 kg からジメチルエステル (2-Me) として僅か 0.8 mg だけ得られた癌細胞増殖抑制物質である。2-Me は癌細胞 MCF-7 及び HCT-116 に対して IC₅₀ 3 nM の細胞毒性を示し、2 そのものは更に強力な細胞毒性を持つことが示唆されている。2-Me は癌細胞の有糸分裂を阻害することが示されているが詳細は不明であり、高級脂肪酸がエーテル結合で連結した天然物は 2 が初例であることを考えると、新しい範疇の抗癌剤リードとなる可能性を秘めている。申請者は、不

明のまま残されていた 2 の立体化学を解明及び全合成を行う計画を立てた。

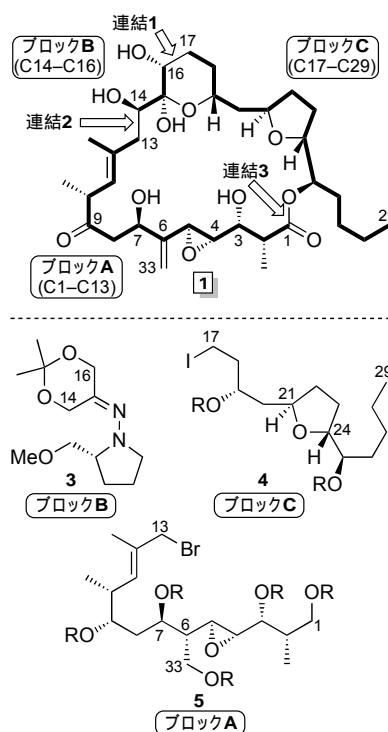
2. 研究の目的

本研究では、天然からの取得が困難な 1 及び 2 の合成法を確立して詳細な生理活性評価のために十分な量の標品を供給するとともに、全合成の過程で得られた合成化学上の知見に基づき各種の類縁体・誘導体・プローブを調製して、ケミカルバイオロジー研究へと展開することを目的とした。また、2 については、分子に含まれる 2 つのオキシピリン鎖の合成法の効率化、及び構造活性相関研究を行う際の各種オキシピリンユニットを確保することを意図して、類似構造を持つ天然物の合成も行うこととした。

3. 研究の方法

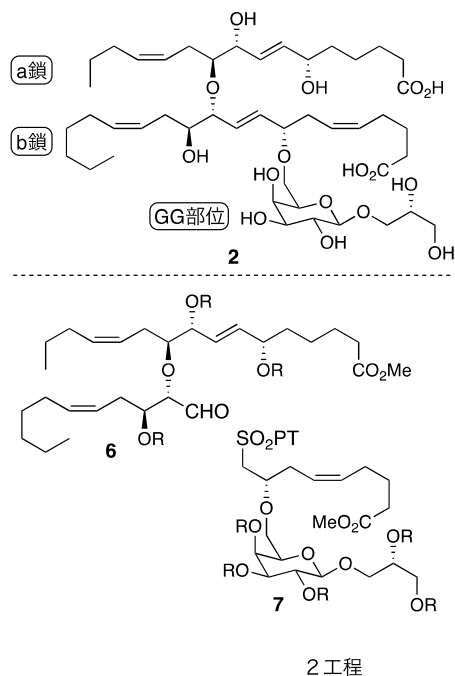
(1) Amphidinolide N (1) の合成研究

構造活性相関に用いる様々な類縁体の合成にも適用可能とするために、下に示すように合成標的分子 1 を大きく 3 つの合成ブロック (A, B, C, それぞれ 3, 4, 5) に分けて調製した後に、それらを連結すること (連結 1: ヒドラゾン誘導体 3 のヨウ化物 4 によるアルキル化, 連結 2: 生成したアルキル化体の臭化物 5 によるアルキル化, 連結 3: セコ酸のマクロラクトン化) で分子を組み上げる収束的全合成戦略を採用した。また、1 の構造の中で最も不安定であると予想されるアリルエポキシド構造単位 (C4-C33 部位) の構築を合成経路の最終段階に設定することとした。



(2) nigricanoside A (2) の合成研究

研究当初、2 の立体化学は不明であったため、2 の部分構造に類似した天然物の立体化学から 2 の立体化学を予想し、その立体異性体を起点として様々なジアステレオマーを系統的、且つ効率的に合成して 2 の立体化学を決定すると同時に、全合成も達成する計画を立てた。しかし研究の途上で、同様な意図による研究が他のグループによりなされ、2 の立体化学が下記のように決定されるに至った。しかし、その合成法には多くの改善の余地があったこと、2 そのものの合成ではなく 2 のメチルエステル体 (2-Me) の合成であったこと、活性試験も 2-Me のみで実施されていたことから、より効率的な合成法を確立して 2 そのものを合成し、その活性試験を実施することとした。合成戦略としては、当初、a 鎖と b 鎖を調製してからエーテル結合部位で連結し、その連結体を GG (ガラクトシルグリセロール) 部位と連結する戦略に沿って合成を進めたが、a 鎖と b 鎖モデル化合物の直接的なエーテル化による連結は困難であることが分かった。そこで、下図に示すように、a 鎖と b 鎖の左側部分からなるアルデヒドユニット 6 と b 鎖の右側部分と GG 部位とで構成される 7 をスルホンカップリング等で連結する合成戦略を検討することとした。

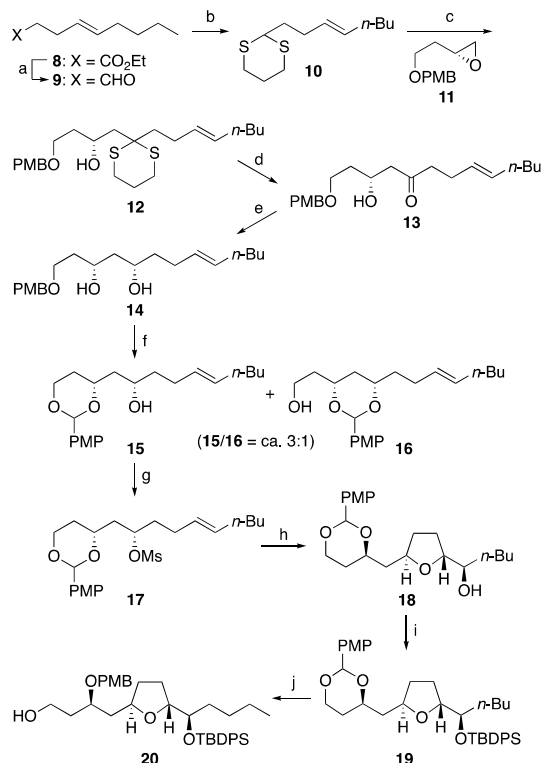


4. 研究成果

(1) Amphidinolide N (1) の合成研究

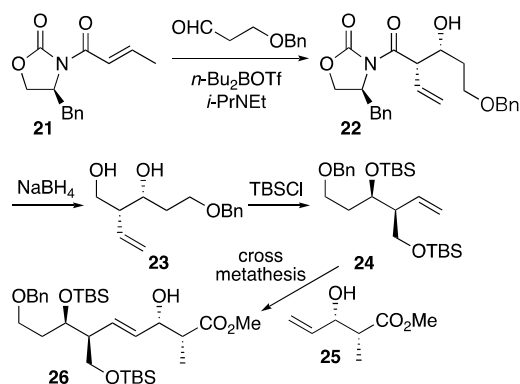
まず 1 のブロック C (4) の調製を行った。既知のエステル 8 をアルデヒド 9 を経てジアン誘導体 10 に導いた。10 のアニオンで既知のエポキシド 11 を開環して 12 とした後、加水分解と立体選択的還元により 14 を得た。14 を酸化的にアセタール 15 に変換し、メシル化により 17 に導いた。17 を Shrapless 不斉時ヒドロキシル化に付した後、

ワンポットで塩基処理を行ったところ、THF 環化も同時に進行した 18 が得られた。18 を各種官能基変換に付して 20 に導いた。20 は 1 工程で 4 に変換可能である。



(a) DIBAL, Et₂O, -78 °C, 1 h, 91%; (b) HS(CH₂)₂SH, BF₃·OEt₂, CH₂Cl₂, -78 °C, 3 h, 87%; (c) *n*-BuLi, THF/HMPA (10:1), -78 °C, 2 h, 78%; (d) CaCO₃, MeI, MeCN/MeOH (3:1), rt, 15 h, 88%; (e) Et₂BOMe, THF/MeOH (4:1), NaBH₄, -78 °C, 1.5 h, 94%; (f) DDQ, 4Å MS, CH₂Cl₂, -20 °C, 16 h, 55%; (g) MsCl, Et₃N, 0 °C to rt, 1 h; (h) AD-mix-, MeSO₂NH₂, *n*-BuOH/H₂O (1:1), 0 °C, 12 h, then Na₂S₂O₃, K₂CO₃, 50 °C, 3 h, 81% from 15; (i) TBDPSCl, imidazole, DMF, rt, 16 h, 71%; (j) DIBAL, CH₂Cl₂, 0 °C to rt, 1.5 h, 54%.

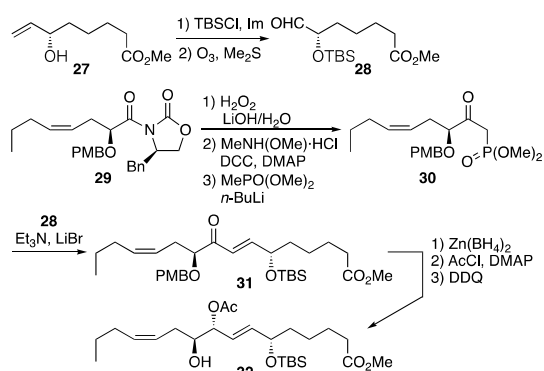
ブロック A (5) については、C1-C9 フラグメント 26 の調製を行った。21 の Evans 不斉アルドール反応により 22 とした後、還元により 23 を得た。23 をシリル基で保護して 24 に変換した後、別途調製した 25 とのクロスメタセシス反応を行った。現在までのところ 25 の二量化が主反応となり、26 の生成はごく微量であった。嵩高い TBS 保護基が原因である可能性があるため、現在保護基の種類について検討中である。



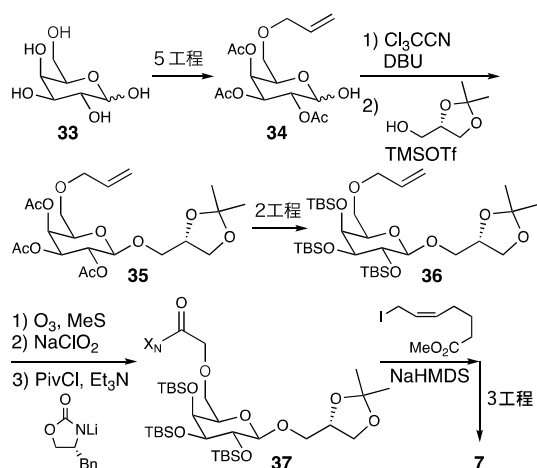
ブロック B (3)は既知物質であるため、5 の調製が終わり次第、3つのブロックをアルキル化により連結して 1 の全合成を目指す。

(2) Nigriganoside A (2)の合成研究

まず、研究初頭に行った a 鎖保護体の合成について述べる。Sharpless 速度論的分割で得た 27 を 2 工程でアルデヒド 28 に導いた。また、Crimmins 不斉アルキル化で得た 29 を 3 工程でホスホネート 30 に変換した。30 と 28 を HWE 反応により連結して 31 とした後、ジアステレオ選択的 *anti*-還元を含む 3 工程で a 鎖保護体 32 を得ることができた。各種の酸を用いて 32 とアリルエポキシド型 b 鎖モデルを連結しようと試みたが成功には至らず、「研究の方法」で述べた新合成戦力を試みることにした。

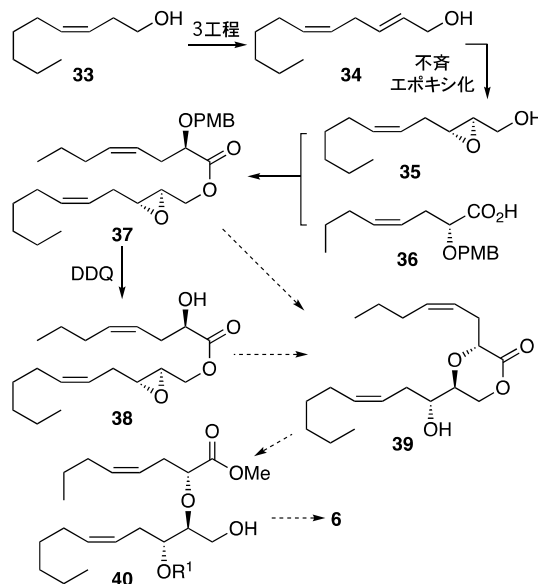


まず、GG 部位 7 の合成について述べる。D-ガラクトース 33 から 5 工程で調製した 34 と (*S*)-グリセロールアセトニドとのグリコシル化により 35 を得た後、保護基の脱着を行って 36 とした。36 の二重結合をオゾン分解により開裂し、カルボン酸への酸化と Evans 型不斉補助基の連結により 37 に導いた。37 を Evans 不斉アルキル化に付した後、定法に従って PT スルホン 7 に導いた。

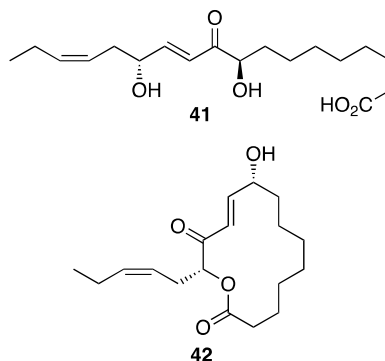


フラグメント 6 については、まず既知のアルコール 33 に対する酸化、Wittig 増炭、還元によりアリルアルコール 34 とした。34 を

Sharpless 不斉エポキシ化反応に付してエポキシアルコール 35 とした後、Crimmins 不斉アルキル化で別途調製したカルボン酸 36 と縮合してエステル 37 を得た。37 は PMB 基の脱保護によりアルコール 38 を与えた。37 及び 38 に対する酸処理または塩基処理による分子内エーテル環化反応は現在までのところ、好適な条件が得られていないが、より簡単な基質では環化した例があるため、今後も検討を続けたい。環化生成物 39 が得られたら、メタノリシスによる 40 への変換、a 鎖の右側への増炭、b 鎖の水酸基の酸化により 6 に導く。



2 の a 鎖及び b 鎖に類似した構造を持つ天然物の合成については、下記の 2 つ [LDS-1 (41), sacrolide A (42)] について全合成を達成した。効率的な合成経路を確立するとともに、41 の合成では、メチルエステルの加水分解にリパーゼを用いると高収率で反応が進行することを見出し、2 の全合成における最終段階 (2-Me → 2) に使える可能性を見出した。



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 2 件)

Yuki Takayasu, Yusuke Ogura, Ryo Towada, Shigefumi Kuwahara. Synthesis of the (9*R*,13*R*)-isomer of a LDS-1, a flower-inducing oxylipin isolated from *Lemna paucicostata*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 査読有, 80, 2016, 1459-1463. DOI: 10.1080/09168451.2016.1166935

Yuki Fujishima, Yusuke Ogura, Ryo Towada, Masaru Enomoto, Shigefumi Kuwahara, Stereoselective synthesis of the C17–C29 fragment of amphidinolide N, *Tetrahedron Lett.*, 査読有, 2016, 57, 5240-5242. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2016.10.038>

〔学会発表〕(計4件)

毛利朋世, 十和田諒, 小倉由資, 桑原重文, Sacrolide A の全合成, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 18 日, 京都女子大学(京都府京都市東山区)

毛利朋世, 十和田諒, 桑原重文, 日本農芸化学会東北支部第 151 回大会, 2016 年 10 月 9 日, 山形大学農学部(山形県鶴岡市)

Tomoyo Mohri, Ryo Towada, and Shigefumi Kuwahara, Synthetic study of the antimicrobial and cytotoxic macrolide, sacrolide A, Campus Asia Program: Tohoku University's Chemistry Summer School, 2016 年 8 月 18 日, 東北大学理学研究科(宮城県仙台市)

藤島悠記, 福山圭, 小倉由資, 桑原重文, Amphidinolide N の C17-C29 フラグメントの合成研究, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年 3 月 28 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

〔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.agri.tohoku.ac.jp/youki/seibutsuyuki/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑原 重文 (KUWAHARA, SHIGEFUMI)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号: 30170145