

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460017

研究課題名(和文) 強力な抗腫瘍性を有する糖脂質ニグリカノシドの合成研究

研究課題名(英文) Synthetic Study of Antimitotic Glycolipid Nigrificanoside

研究代表者

宮岡 宏明 (MIYAOKA, Hiroaki)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10231622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ニグリカノシドは、脂肪酸2分子が第二級炭素間でエーテル結合した脂肪酸二量体に、糖がエーテル結合した特異な構造の糖脂質であり、強力な抗腫瘍活性を示している。ジエポキシドエステルを加水分解した後、TsOHを作用させることにより、 β -ラク톤の形成およびエーテル結合の形成が一挙に進行し、ヒドロキシテトラヒドロフランを得ることに成功した。この化合物の11位、10'位の炭素結合を切断することができれば、ニグリカノシドの脂肪酸部に相当する立体化学を持つ化合物を合成することが可能である。

研究成果の概要(英文)：Nigrificanosides, isolated from green alga, are unique structural glycolipids. Nigrificanosides contain the same components as the monogalactosyldiacylglycerols, the ether linkages connecting the lipids to each other and to the galactose residue are without precedent. Nigrificanoside A dimethyl ester display strong antitumor activity. The seven asymmetric centers of nigrificanoside except galactose residue are not determined. Synthesis of dihydroxytetrahydrofuran derivative from diepoxyester was successfully carried out by hydrolysis of ester and then treatment with TsOH. A compound equivalent to the fatty acid dimer residue of nigrificanoside would be synthesized if C-C bond at C11-C10' of dihydroxytetrahydrofuran derivative would be cleavage.

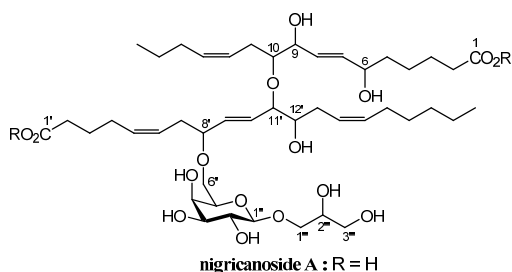
研究分野：化学系薬学

キーワード：ニグリカノシド 糖脂質

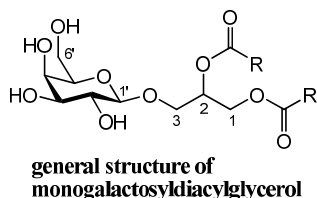
1. 研究開始当初の背景

天然物には vincristine、vinblastine などのピンカルカロイドや paclitaxel あるいはその誘導体である taxotere のように、現在広く臨床でがん治療に用いられているものがある。また、discodemolide、dolastatin-10、E7389、epothilone B のように、次世代の抗がん剤として臨床試験が行われている天然物も多く存在している。しかし、抗がん剤には強い副作用を持つものが多く、未だ完全な抗がん剤は存在せず、現在でも新しい作用機序、新規な構造を持つ抗がん剤の開発が求められている。

ニグリカノシドAは2007年 Andersen らによりドミニカ国ポーツマス近海で採集された緑藻 *Avrainvillea nigricans* から単離、構造決定された糖脂質であり、C₁₆ および C₂₀ からなる酸素官能基化された2つの脂肪酸、ガラクトース、グリセロールからなる monogalactosyldiacylglycerol (MGDG) である。



通常の MGDG はグリセロールの C-1 位および C-2 位に2つの脂肪酸がそれぞれエステル結合し、グリセロールの C-3 位がガラクトースとグリコシド結合した構造であるが、ニグリカノシドAは、2つの脂肪酸がエーテル結合で結合し、さらにこの脂肪酸の二両体がガラクトースの C-6'' 位にエーテル結合している大変に稀な構造で、本化合物以外にこのような構造の化合物は知られていない。本化合物の構造は 2D-NMR により決定されているが、ガラクトース以外の7個の不斉炭素の立体化学は決定されておらず、未だ完全な構造決定に至っていない。



また、これら化合物は単離精製過程で2個のカルボキシ基をジメチルエステルに誘導しているが、得られたニグリカノシドAジメチルエステルは、ヒト乳がん細胞 MCF-7、ヒト結腸がん細胞 HCT-116 に対してそれぞれ IC₅₀ 3 nM の強力な増殖阻害活性を示している。さらに、ニグリカノシドAジメチルエステルは *in vitro* において 10 μM の濃度でチューブリンの重合を促進することから、新しい

抗がん剤のリード化合物として注目されている。MGDG は、高等植物や緑藻の主要な細胞膜構成脂質として知られているが、このような生物活性を示すものは無く大変に興味深い。

また、本化合物の脂肪酸部分の構造ががん細胞に対する細胞増殖阻害活性に大きく影響することが示唆されており、脂肪酸部の構造活性相関にも興味もたれている。

ニグリカノシドAは微量成分であり、8年間かけて集められた緑藻 *Avrainvillea nigricans* 28 kg からニグリカノシドAジメチルエステルが 800 mg 単離されているのみであり、天然からの追加供給は困難な状況にある。本化合物の完全構造決定や構造活性相関などの生物活性の検討を行うには、化学合成による本化合物の供給が必須である。

私は、これまで一貫して生物活性を有する天然物の合成研究に取り組んできている。そのテーマの一つとしてオキシリピン(酸素官能基を有する脂肪酸誘導体)の合成研究を行ってきており、これまでにいくつかのオキシリピンの全合成を達成している。ニグリカノシドAは、脂肪酸2分子がエーテル結合で結合したオキシリピンの配糖体とみなすことができるが、エーテル結合で2分子の脂肪酸がつながったオキシリピンはこれまでに知られておらず、新規オキシリピン配糖体の合成という観点からも興味深い。

2. 研究の目的

そこで、構造が特異で合成化学の点からも興味深く、新規抗がん剤のリード化合物として注目されているニグリカノシドAのアナログ合成及び全合成を目的に本研究を行う。研究期間内に以下の3項目を順に行いたいと考えている。

1. 新規エーテル合成法の確立

ニグリカノシドAは脂肪酸2分子が第二級炭素間でエーテル結合を形成した脂肪酸二両体構造を有しているが、このような第二級炭素間のエーテル結合の形成は、一般に脱離反応を伴うため困難である。そこで、新規エーテル合成法を確立する。

2. ニグリカノシドAのアナログ合成

1. で開発した新規エーテル合成法を用い、脂肪酸部を単純化したニグリカノシドのアナログの合成を行い、ニグリカノシドの基本的な合成法を確立する。

3. ニグリカノシドAの全合成

ニグリカノシドAの一部の立体化学が未決定であるため、予想される立体化学を有する数種の化合物の合成を行うことによりその全合成を行い、全構造を明らかにする。

現在までに、ニグリカノシドAの全合成は報告されていないが、最近2例の合成研究が論文として報告された。これらの報告は、糖と C₂₀ 脂肪酸が結合したモデル化合物の合成

あるいは C₁₆ 脂肪酸の合成であり、全合成の達成には遠い。しかし、本化合物の構造の特異性、興味深い生物活性から考えて、さらに本化合物の合成研究が活発に行われることが予想される。第二級炭素間のエーテル結合は従来の方法では形成が難しく、新規エーテル合成法を開発する必要がある。この点を解決することができれば、他の化合物の合成にも応用可能な、新規エーテルの合成法を提供することができる。ニグリカノシド A の全合成の過程では、天然物の他に多くのアナログ、ジアステレオマーなどが得られる。これら化合物を生物活性の研究者に供給することにより、本化合物の詳細な作用機序や構造活性相関に関する研究が進展するものと期待される。

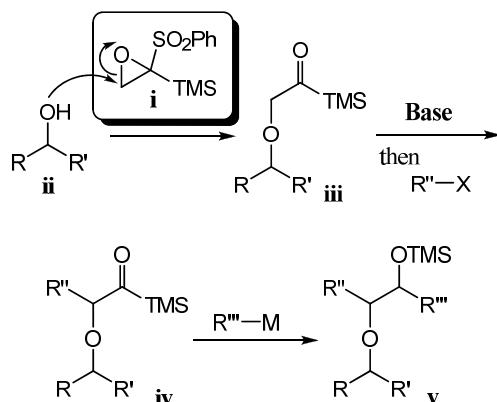
3. 研究の方法

ニグリカノシド A の全合成における問題は「第二級炭素間のエーテル結合の形成」と「7 個の不斉炭素の立体配置が未決定」の 2 点である。平成 26 年度は「第二級炭素間のエーテル結合の形成」を解決し、平成 27 年度以降は「7 個の不斉炭素の立体配置が未決定」を解決し、さらにニグリカノシド A のアナログ合成および全合成に焦点を絞り検討を行う。

ニグリカノシド A の 2 つのエーテル結合のうち、2 つの脂肪酸ユニットを結合しているエーテル結合は、第二級炭素間同士のエーテル結合である。一般的に、アルコキシドと第二級ハロゲン化アルキルを用いた Williamson エーテル合成では、脱離反応が優先するため、エーテル結合の形成は困難である。

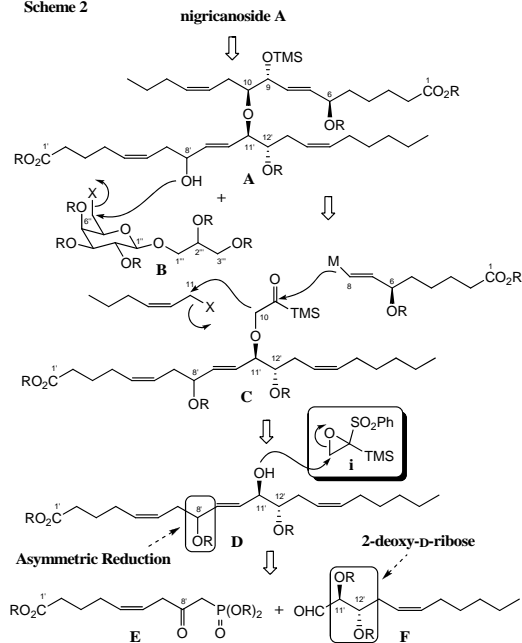
そこで、Scheme 1 に示すエーテル新規合成法を立案した。TMS スルホニルエポキシド **i** に対して、第二級アルコール **ii** を反応させると、エポキシド **i** は末端エポキシドであるため容易にエーテル結合が形成され、スルホニル基の脱離も起こるため、ケトン **iii** が一挙に得られるものと考えられる。さらにケトン **iii** の立体選択的なアルキル化、TMS ケトン **iv** に対する有機金属種の求核付加反応及び Brook 転位により、エーテル **v** が合成できるものと考えた。

Scheme 1



上記のエーテル合成法を踏まえ、次ページの Scheme 2 に示した収束的な合成計画を立案した。ニグリカノシド A は、脂肪酸の二両体セグメント A の C-8' 位とグリセロガラクトースセグメント B の C-6'' 位でエーテル結合し、保護基を除去することで合成可能と考えられる。脂肪酸の二両体セグメント A は上記のエーテル合成法により合成することを考えた。すなわち、C₂₀ 脂肪酸セグメントであるアルコール D と TMS スルホニルエポキシド **i** を反応させ、ケトン C とした後、C-10' 位の炭素鎖の延長、C-1 ~ C-8 セグメントの導入により得ること計画した。

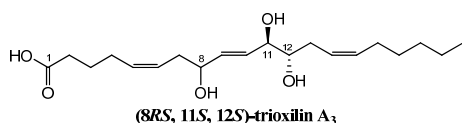
Scheme 2



まず、モデル化合物を用いて Scheme 1 に示した新規エーテル合成法の開発について検討を行う。フェニルチオ酢酸エチルより TMS スルホニルエポキシド **i** を合成し、これに第二級アルコール **ii** を作用させて、ケトン **iii** の合成を行う。さらにケトン **iii** をエノラートとした後、 α 位のアルキル化を行い TMS ケトン **iv** にした後、これに有機金属種の求核付加反応及び Brook 転位を行いエーテル **v** の合成を行う予定である。この合成においては、アルキル化及び Brook 転位の立体選択性について十分な検討を行う。

さらに、開発した新規エーテル合成法を用いて、合成計画に則り、脂肪酸部を単純化したニグリカノシドのアナログ合成を行い、基本的なニグリカノシド合成法を確立する。次に確立された合成法に従い、予想される立体化学を有する数種の化合物の合成を行うことによりニグリカノシド A の全合成を達成し、全構造を明らかにする。ニグリカノシド A は、可能な立体異性体は 128 個考えられるが、その全てを合成するのは困難である。そこで、脂肪酸ユニットの立体化学は、天然由来の関連化合物の構造から推定した。ニグリカノシド A の C₂₀ 脂肪酸ユニットと同じ位置

に水酸基とオレフィンを持つ化合物は trioxilin A₃ として天然から得られている。Trioxilin A₃ の C-8 位に関しては *R*, *S* 両異性体が存在することが知られているが、C-11、C-12 位は 11*R*, 12*S* 体しか得られていない。そこで、ニグリカノシド A の C-11' 位と C-12' 位の絶対配置を 11'*R*, 12'*S* と仮定して合成を行うことにする。また、C16 脂肪酸ユニットとは、これまでの合成研究の論文より 6*R*, 9*R*, 10*S* と推定して合成を行うことにした。合成を行う際は、なるべく少ない数の化合物の合成で天然物と一致させるため、合成した化合物の NMR データと天然物の NMR データを随時比較し、天然物の構造を推定しながら合成を進める。



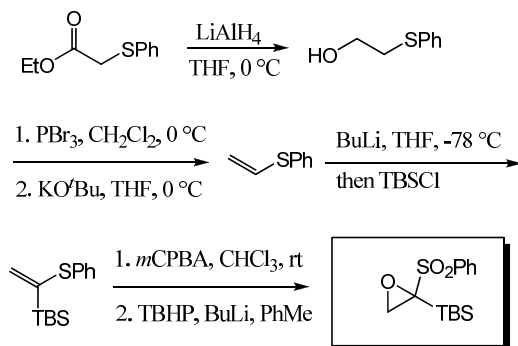
また、薬学的見地から、合成の過程で得られる天然物、その立体異性体及びアナログなどの多くの化合物を生物活性の研究者に供給し、本化合物の詳細な作用機序や構造活性相関の解明も目指す。

4. 研究成果

(1) TBS スルホニルエポキシドの合成

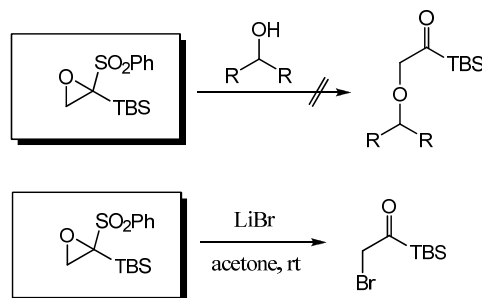
まず、当初計画した TMS スルホニルエポキシドの合成を検討したが、中間体が不安定な化合物のようで合成することはできなかった。そこで、TMS を TBS に替えて合成を行った (Scheme 3)。フェニルチオ酢酸エチルを LiAlH₄ で還元してアルコールとし、臭素化、臭素の脱離により、フェニルビニルスルフィドを合成した。これを BuLi によりビニルアニオンとした後、TBSCl を作用させて TBS を導入し、*m*CPBA によるスルフィドの酸化及びエポキシ化を行う事により、当初計画したエーテル合成の重要な基質となる 2-TBS-2-フェニルスルホニルオキシランを合成することができた。

Scheme 3



2-TBS-2-フェニルスルホニルオキシランに対して、第二級アルコールを作用させ、オキシランの開裂、フェニルスルホニル基の脱離による、2-アルコキシ-1-TBS エタノンの合成

を検討した。塩基性条件および酸性条件など種々の反応条件を試みたが、目的の反応は進行しなかった。2-TBS-2-フェニルスルホニルオキシランの反応性を確認するため、LiBr を作用させたところ、オキシランの開裂、フェニルスルホニル基の脱離が進行し、2-プロモ-1-TBS エタノンが高収率で得られた。従って、2-TBS-2-フェニルスルホニルオキシランは、末端エポキシドであるが、嵩高い求核試薬に対する反応性は、かなり低いことが判明した。

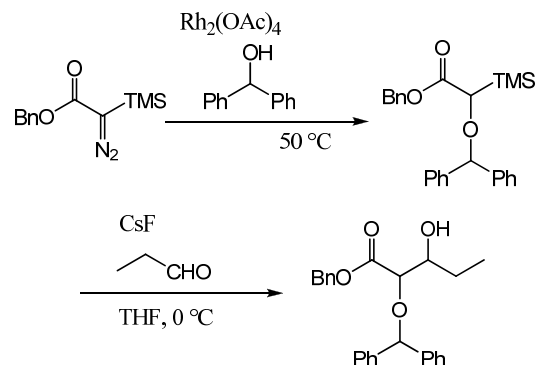


(2) TES ジアゾエステルを用いたエーテルの合成

上述のようにエーテル形成反応の基質として想定していた 2-TBS-2-フェニルスルホニルオキシランと第二級アルコールの反応は、残念ながら目的の 2-アルコキシ-1-TBS エタノンは全く得られないことが判明したので、当初の計画を修正し、TES ジアゾエステルと第二級アルコールから、2-アルコキシ-2-TES エステルの合成を行うことにした。

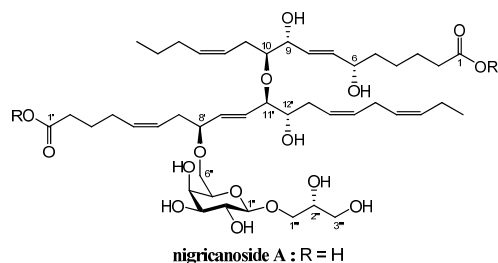
1 当量の TES ジアゾエステルと 1.5 当量の第二級アルコールを Rh(OAc)₄ 存在下で反応させたところ、良好な収率でエーテル結合が形成され、2-アルコキシ-2-TES エステルが得られた (Scheme 4)。さらに、2-アルコキシ-2-TES エステルとアルデヒドを CsF 存在下で反応させたところ、脱 TES 化を伴うアルドール反応が進行し、対応する 3-ヒドロキシ-2-アルコキシエステルを得ることができた。

Scheme 4



(3) 研究計画の修正

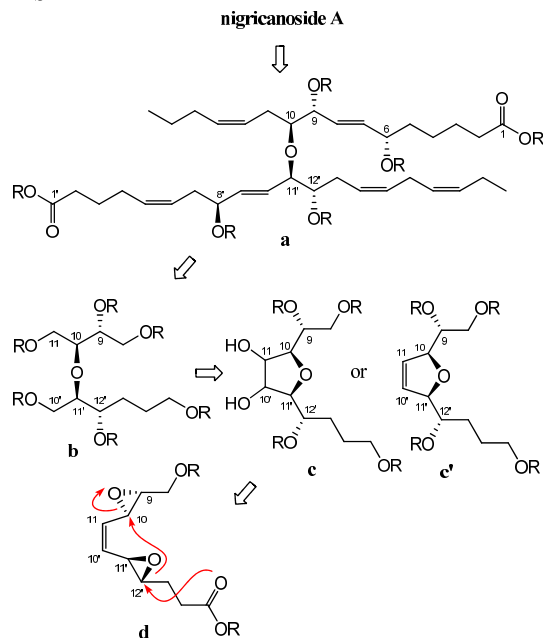
本研究を遂行中の 2015 年に、MacMillan 及び Ready らのグループはニグリカノシド A の最初の全合成に成功し、これまで不明であったニグリカノシド A の 7 つの不斉中心の立体化学を明らかにした。



これまでの合成計画は、ニグリカノシドの立体化学が不明であったため、すべての立体化学を網羅的に作り分けが可能な合成法を志向したものであり、立体化学の明らかな標的化合物の合成という点では、合成の効率性はやや劣る。また、前述のように、TES ジアゾエステルを用いた第二級炭素原子間のエーテル合成には成功しているが、その立体選択性については今後の検討課題である。これらの状況を踏まえ、これまでの合成計画を修正しニグリカノシドの合成を目指すことにした。

ニグリカノシドは、立体化学が明らかになった脂肪酸二量体 **a** と糖部分のエーテル結合で合成可能と考えた。脂肪酸二量体 **a** は、第二級炭素原子間のエーテル結合を含む **b** より炭素鎖の延長等により合成可能と思われる。エーテル **b** はジヒドロキシフラン **c** またはジヒドロフラン **c'** の C10 位 - C11' 位間の炭素結合を切断することにより合成可能である。(以下の位置番号はニグリカノシドに従う) ジヒドロキシフラン **c** またはジヒドロフラン **c'** はジエポキシエステル **d** の分子内環化反応により合成可能と考えた。

Scheme 5

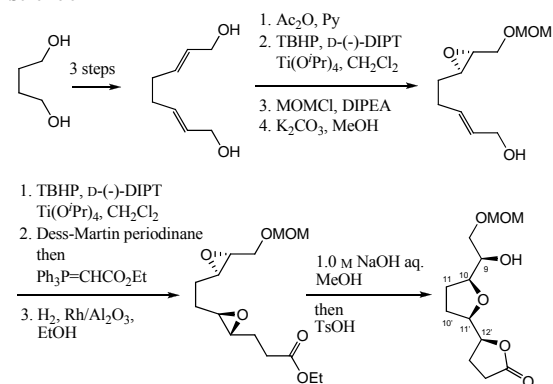


(4) ジエポキシドエステルを用いたエーテル合成

まず、ジエポキシエステルの分子内環化反応を用いるテトラヒドロフラン誘導体の合成法を確立するため、モデル化合物を用いた検討を行った。

ブタン-1,4-ジオールから得た 3 工程を経て合成した *E,E*-アリルアルコールを 2 度の Sharpless 不斉エポキシ化、Wittig 反応による炭素鎖の延長によりジエポキシドエステルを合成した (Scheme 6)。これに NaOH 水溶液でエステルを加水分解した後、TsOH を作用させたところ、 δ -ラク톤の形成およびエーテル結合の形成が一挙に進行し、ヒドロキシテトラヒドロフランが得られた。本化合物は、ニグリカノシドの脂肪酸二量体部分の 9*R*, 10*S*, 11'*R*, 12'*S* の立体化学をもっている。本化合物の 11 位、10'位の炭素結合を切断することができれば、そこから炭素鎖の延長が可能であり、ニグリカノシドの脂肪酸二量体を合成できると思われる。今後は、11 位、10'位に相当する位置が可能な *Z*-オレフィンまたはジオールを持つ化合物を出発原料に用いて、目的の脂肪酸二量体を合成する予定である。

Scheme 6



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)

[学会発表](計 1 件)

幸野純佳、太田浩一朗、釜池和大、宮岡宏明 ジエポキシエステルのタンデム環化反応を用いた *erythro-cis-erythro* 型 Solamin アナログの合成研究、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ps.toyaku.ac.jp/wp/seibutsuyuki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮岡 宏明 (MIYAOKA, Hi roaki)

東京薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：10231622