

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：13903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860065

研究課題名(和文) 活性天然物をシーズとする創薬を指向したアナログ合成研究の展開

研究課題名(英文) Synthesis of bioactive compounds

研究代表者

住井 裕司 (Sumii, Yuji)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10612848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素微少環境選択的がん細胞増殖抑制物質 (+)-dictyoceratin-A (1)、-C (2)の不斉全合成法を開発し、in vitro,およびin vivo試験を行った。種々アナログ化合物を合成し、分子全体の構造が生物活性に關与することを見出し、分子プローブ化にも成功した。潜在性結核菌に対する抗菌物質3-alkylamino demethyl(oxy)aaptamine (3)の全合成経路の確立に成功し、3のin vitroでの潜在性結核菌に対する抗菌活性を確認した。また、合成経路を改良し、3を百ミリグラムスケールで合成可能にした。アナログ化合物を合成し、構造活性相関の知見を得た。

研究成果の概要(英文)：We developed enantioselective synthesis of (+)-dictyoceratin-A and -C, hypoxia-selective growth inhibitors, from marine sponge. We tested the in vitro bioactivity of both enantiomers, and found that both enantiomers showed same hypoxia-selective growth inhibitory activity. We evaluated in vivo anti-tumor activity and structure-activity relationships of analogues of dictyoceratin-A and -C. We found that the whole structure of 1 or 2 is important for the hypoxia-selective growth inhibitory activity. We also synthesized bioactive probe molecular based on 1 and 2.

We succeeded the total synthesis of 3-alkylamino demethyl(oxy)aaptamine (3), an anti-dormant mycobacterial substance from marine sponge. We confirm the in vitro anti-dormant mycobacterial activity of 3. We also improved the synthetic methodology of 3 and successfully prepared hundreds milligram of 3. Moreover, we synthesized some analogues of 3 and found important information of structure-activity relationships.

研究分野：生物活性天然物の全合成およびアナログ合成

キーワード：海洋天然物 全合成 構造活性相関 アナログ合成 細胞増殖抑制物質 抗結核物質 ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

(1) 天然物の全合成研究は、合成研究者の力量を示すべく、複雑な炭素骨格や立体化学を有する化合物がターゲットとして選ばれるほか、活性天然物の構造確認や新規反応の有用性を証明する手段として行われることが多い。しかし、良好な生物活性を有し、創薬シーズとして展開が望まれる活性天然物でも、比較的シンプルな構造を持つ化合物は合成ターゲットとして好まれず、活性天然物をシーズとして創薬研究が展開されるのはごく一部の化合物だけである。Yondelis (ecteinascidin 743)、Halaven (halichondrin B の合成アナログ化合物) のように、複雑な構造の微量活性天然物が有機合成によって供給されて医薬品が創出された例もあるが、複雑な構造を有する天然物を医薬リード化合物へ展開することは容易なことではない。

(2) これまでに私たちは、新しい医薬シーズの開発を目的として連携研究者が見出した、強力ながん血管新生阻害作用を示すアルカロイド cortistatin A の全合成研究 (*Org. Lett.* 2011, 13, 3514) を行ってきた。しかし、全合成は多工程を要し、大量合成が困難であるという問題点から、天然物全合成ではなく短工程で合成可能な、構造を簡略化した活性アナログ化合物の創製研究を展開し、医薬リード化合物の創製を検討してきた (PCT, WO 2012036287 A1, *ACS Med. Chem. Lett.* 2012, 3, 673-677.)。

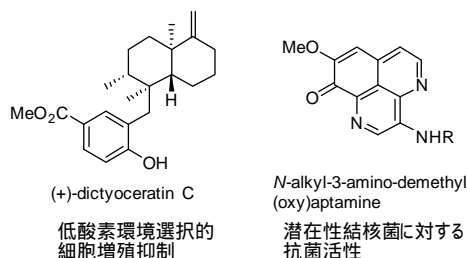
(3) 一方、活性評価系が多様化することで、新規な構造を有する天然物だけでなく、構造既知物質が活性新規な天然物として見出される報告例が増加している。一般にこれらの活性天然物は全合成ターゲットとして注目度が低いが、アナログ合成による創薬研究を行えば、新規医薬シーズへと展開できる可能性がある。このような視点から、申請者らは研究室で構築された評価系を用いて、海綿から見出された低酸素環境選択的がん細胞増殖抑制物質 furospinosulin-1 の合成研究を行った。Furospinosulin-1 はフラン環にイソプレンが連結した非常にシンプルな化学構造であるものの、経口投与でも抗腫瘍活性を示す化合物である (*ChemMedChem*, 2010, 5, 1919-1926)。そこで、各種アナログ化合物を合成して構造活性相関を解析し、furospinosulin-1 をシーズとした新規抗がんリード化合物の創製研究を行ってきた (PCT, WO 2011138956 A1, *Tetrahedron* 2011, 67, 6673-6678)。また、furospinosulin-1 の標的分子を明らかにするため、プローブ分子の設計・合成を行い、分子生物学的な手法と合わせて作用機構を解析し、ごく最近 furospinosulin-1 の標的分子を明らかにしている。

このように、活性天然物が非常にシンプル

な化学構造であっても、活性評価と連携してアナログ合成研究を行えば、天然物を凌駕する活性を有する化合物の創製や医薬リード化合物への展開が期待でき、さらには未知の作用メカニズムを発見できる可能性を秘めている。このような背景から、申請者は研究室で構築された新規な活性評価系で見出された活性天然物について合成研究を展開し、活性評価と連携したアナログ合成による詳細な構造活性相関研究を経て、新しい医薬シーズの創製を目指す研究を着想した。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、申請者らの研究室で最近見出された低酸素環境選択的がん細胞増殖抑制活性を示す (+)-dictyoceratin-C と、潜在性結核菌に対して抗菌作用を示す *N*-alkyl-3-amino-demethyl (oxy)aaptamine の2種の化合物を合成ターゲットとして合成研究を展開し、新たな医薬リード化合物を創製する。



(2) (+)-Dictyoceratin-C の合成研究

低酸素環境選択的がん細胞増殖抑制活性物質として見出された (+)-dictyoceratin-C の有用性を確かめるため、まず全合成による供給を検討し、マウスを用いる抗腫瘍活性の有無を評価する。また、構築した全合成経路を利用して置換基や官能基が異なる、容易に合成可能なアナログ化合物を種々合成し、活性を評価することにより構造活性相関を解析する。一方、同種の実験室から単離報告されている類縁体の中で、(+)-dictyoceratin-C のみ絶対立体配置が異なることから、光学活性体を全合成して絶対立体配置の確認を行うとともに、両エナンチオマーの活性を評価する。

蓄積した構造活性相関の情報をもとに、どの部分構造が活性発現に必須であるかを特定し、異なる骨格や構造を簡略化したアナログ化合物などを設計・合成するとともに、工程数や大量供給を見据えた合成経路を考察して、より優れた医薬リード化合物の創製を目指す。

(3) *N*-Alkyl-3-amino-demethyl (oxy)aaptamine の合成研究

Aaptamine 類は抗菌活性や細胞毒性など多岐にわたる生物活性が報告されており、これまでも合成研究が行われているが、構造活性相関研究は官能基の誘導化に留まるのみである。そこで、潜在性結核菌に対しても

抗菌活性を示すことが見出された *N*-alkyl-3-amino-demethyl(oxy)aaptamine について、種々アナログ化合物を設計・合成し、結核菌と同じ遅生育型のワクチン株である *M. bovis* BCG を用いて抗菌活性を評価して、詳細に構造活性相関を解析することにより、新規抗結核薬のリード化合物の創製を目指す。まず 3-amino-aaptamine の合成法を確立し、3 位アミノ基の置換基の寄与について主に活性評価を行う。次に類縁体の構造を参考にして設計・合成したアナログ化合物の活性を評価し、より強力な抗結核作用を示す化合物を見出すとともに、工程数や大量合成を見据えた合成経路の構築を検討する。

### 3. 研究の方法

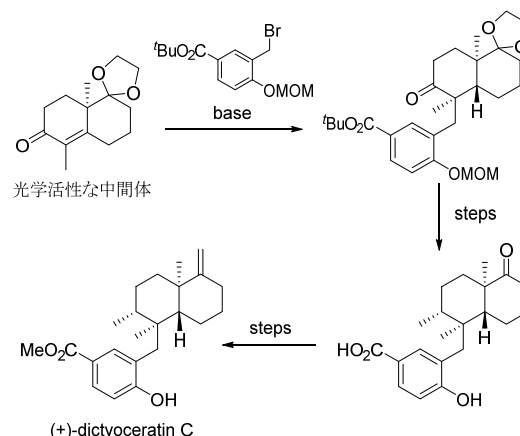
大阪大学大学院薬学研究科・天然物化学研究室で構築された評価系を用いて、底生海洋生物抽出エキストラライブラリーから見出された、低酸素環境選択的にがん細胞の増殖を抑制するテルペノイド (+)-dictyoceratin-C と、潜在性結核菌にも有効な抗菌活性を示すアルカロイド *N*-alkyl-3-amino-demethyl(oxy)aaptamine の 2 種の微量活性天然物を医薬リード候補化合物として合成研究を展開する。始めに活性物質の全合成経路を確立し、次に天然物よりも優れた生物活性や選択性の向上を目的に、官能基や置換基の有無、酸化・還元された化合物といった種々のアナログ化合物を合成し、活性を評価する。集積した構造活性相関データを基に、環の削減や不斉点の除去など大胆に構造を簡略化させたアナログ化合物を設計・合成し、活性を保持した簡便に合成できる構造を模索していく。また、天然物を始め活性の良好な化合物についてはマウスを用いた *in vivo* 試験を行い、有用性を評価していく。

### 4. 研究成果

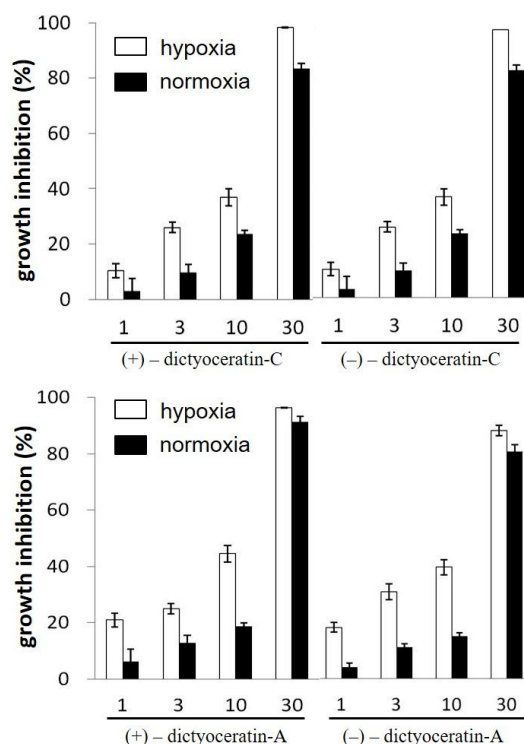
#### (1) (+)-Dictyoceratin-C の合成研究

(+)-Dictyoceratin-C は、研究室で構築された評価系を基に、低酸素環境選択的ながん細胞増殖抑制物質として海綿から見出された化合物である。過去に私たちは、同海綿から慢性骨髄性白血病細胞 K562 を赤芽球細胞へと分化誘導する物質として、構造が類似した smenospongine 類を単離・構造決定している。その際、(+)-dictyoceratin-C は活性を示さず、キノン型の化合物が分化誘導活性を示した。しかし、キノン構造を有する smenospongine 類は低酸素環境選択的ながん細胞増殖阻害活性を示さなかったことから、芳香環部分が活性発現に関与していると考えられる。後に種々の芳香環について構造活性相関を解析することを見据え、文献既知のキラルなエノンに対して、芳香環部分を立体選択的に導入した後、8 位のメチル基と 4 位のエキソメチレンを導入する全合成計画を立てた。

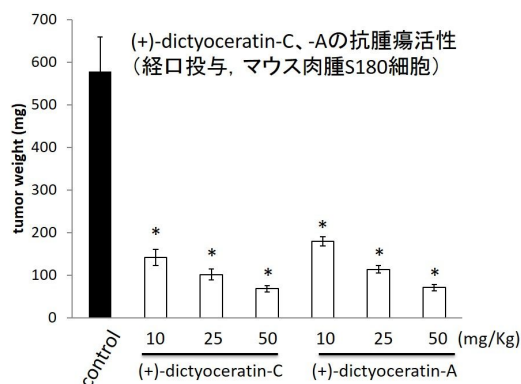
H.26 年度に(+)-dictyoceratin-C、および類縁体である(+)-dictyoceratin-A の不斉合成を達成した。合成方法は、容易に両鏡像異性体が合成可能である光学活性な中間体に対し、芳香環部分を結合させた後、順次官能基変換を行うものである。



この合成法を用いて、dictyoceratin-C、-A の両エナンチオマーを不斉合成し、天然から得られた(+)-dictyoceratin-C、-A の絶対立体構造を決定した。また、これらの化合物の低酸素環境選択的な細胞増殖阻害活性を評価した結果、両鏡像異性体ともに同程度の細胞増殖阻害活性を示すことを見出した。



さらに天然型の(+)-dictyoceratin-C、-A を数百ミリグラム合成し、*in vivo* 抗腫瘍活性を評価し、(+)-dictyoceratin-C、-A どちらも経口投与で抗腫瘍活性を示すことを見出した。



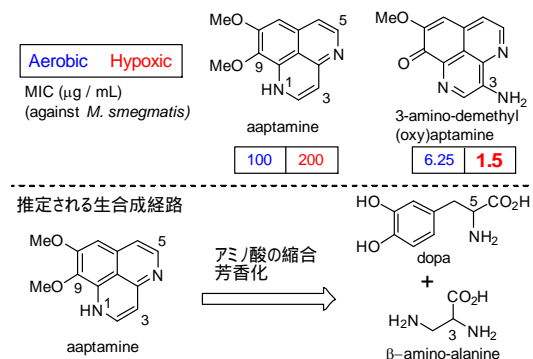
H.27年度は(+)-dictyoceratin-C、-Aの詳細な構造活性相関を行うため、エステル、水酸基、エキソオレフィンなどの官能基や8位のメチル基などが欠損した化合物を合成中間体などから合成し、*in vitro*試験を行った。その結果、(+)-dictyoceratin-C、-Aが有する低酸素環境選択的な細胞増殖抑制活性は、エキソオレフィン、パラ-ヒドロキシ安息香酸メチルエステルの構造など、化合物の構造全体が関与していることが明らかになった。そのため、当初計画していた構造を簡略化した活性アナログ化合物の開発は断念し、(+)-dictyoceratin-C、-Aの標的分子の解明を目指し、(+)-dictyoceratin-C、-Aをもとにした分子プローブの設計・合成を行った。(+)dictyoceratin-Aの水酸基からリンカーを結合させた分子プローブを合成し、*in vitro*試験を行った結果、活性は低下するものの、低酸素環境選択的な細胞増殖阻害活性を有した分子プローブを見出すことに成功した。

## (2) N-Alkyl-3-amino-demethyl(oxy)aaptamineの全合成と各種類縁体の合成

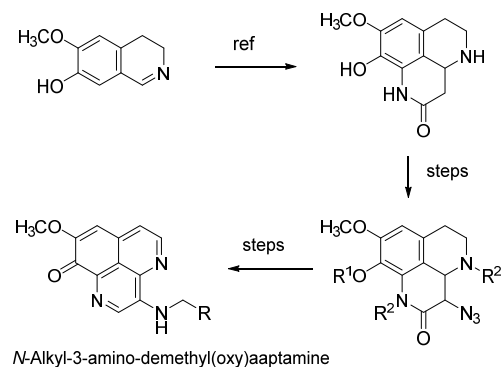
N-Alkyl-3-amino-demethyl(oxy)aaptamine (ADOA)は、潜在性の結核菌に対しても活性を示す抗菌活性物質として、大阪大学大学院薬学研究科・天然物化学研究室で構築された評価系を基に海綿から見出された化合物である。ADOAと同時に見出されたaaptamine類縁体との構造活性相関解析から、潜在性結核菌に対しても抗菌作用を示すには、3位のアミノ基の置換基や9位のカルボニル基が活性発現に関与していることが示唆されている。一方、天然からは5位に側鎖を有する類縁体が単離されており、aaptamine類がアミノ酸の縮合で生合成しているものと考えられる。

そこで私たちは、生合成経路を模倣し、置換基の導入が容易な合成経路を考案した。すなわち、dopamine誘導体とβ-アミノ-β-アミノ酸を縮合した後、酸化環化反応によって縮環構造を構築するものである。この合成計画のもと、H.26年度に合成研究を行い、アラニンと2-(3,4-ジメトキシフェニル)エチルアミンから3環性の縮

環構造を有するdemethyl(oxy)aaptamineが合成できることを見出した。しかし、本合成法では標的化合物が有する3位アミノ基の導入が困難であったため合成計画を見直すこととした。



類縁物質の合成を参考に、新たに合成計画を立て、合成を検討した。その結果、15工程で標的化合物の初の全合成を達成することに成功した。



この合成法を用い、ADOAを数十ミリグラム供給することに成功した。天然から得られたADOAはわずか2mgであり、その抗菌活性の再確認が必須であった。そこで、合成したADOAを用い、結核菌に対する抗菌作用を評価した結果、天然物と同様に潜在性結核菌に対して優れた抗菌活性を示すことを見出した。

H.27年度はADOAの量的供給を目的に全合成経路の細かい部分を改良し、数百ミリグラムのADOAを合成することが可能になった。次に本合成法を利用し、活性天然物をモチーフにした、活性アナログ化合物の設計・合成を行った。側鎖の3位フェニルアミノ基を中心に、種々のアナログ化合物を合成し、その抗菌活性を評価した。その結果、フェニル基との間の炭素鎖、8位のアルキル基、分子サイズ、溶解性などが本化合物の特異な抗菌活性に関与していることが示唆された。

## 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)

Sumii Yuji, Kotoku Naoyuki, Fukuda Akinori, Kawachi Takashi, Arai Masayoshi,

Kobayashi Motomasa、Structure-Activity Relationship and in Vivo Anti-Tumor Evaluations of Dictyoceratin-A and -C, Hypoxia Selective Growth Inhibitors from Marine Sponge、Marine drugs、査読有、2015、13(12)、7419-7432  
DOI:10.3390/md13127074

Sumii Yuji、Kotoku Naoyuki、Fukuda Akinori、Kawachi Takashi、Sumii Yuta、Arai Masayoshi、Kobayashi Motomasa、Enantioselective synthesis of dictyoceratin-A (smenospondiol) and -C, hypoxia-selective growth inhibitors from marine sponge、Bioorganic & Medicinal Chemistry、査読有、2015、23 (13)、966-975  
DOI: 10.1016/j.bmc.2015.01.021  
オープンアクセス  
<http://www.mdpi.com/1660-3397/13/12/7074>

〔学会発表〕(計 3 件)

住井裕司、古徳直之、福田昭典、河内崇志、荒井雅吉、小林資正「低酸素環境選択的増殖阻害物質 dictyoceratin 類の構造活性相関と in vivo 抗腫瘍活性」日本薬学会第 136 年会(横浜)

Naoyuki Kotoku, Yuji Sumii, Takashi Kawachi, Akinori Fukuda, Masayoshi Arai and Motomasa Kobayashi "Synthetic study and target analysis of dictyoceratin-A and -C, hypoxia-selective growth inhibitors from marine sponge."  
PACIFICHEM 2015, Hawaii, USA

住井裕司、古徳直之、福田昭典、河内崇志、角居雄太、荒井雅吉、小林資正「低酸素環境選択的細胞増殖阻害活性物質 dictyoceratin-C の合成研究」第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会(京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：

種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b012/>

6. 研究組織

(1)研究代表者  
住井 裕司 (SUMII Yuji)  
名古屋工業大学大学院工学研究科・助教  
研究者番号：10612848

(2)研究分担者  
該当しない ( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
該当しない ( )

研究者番号：