

	ウスグチカズキ
氏 名（本籍）	臼口和希（兵庫県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第 60 号
学位授与年月日	令和 7 年 3 月 6 日
学位授与の条件	学位規程第 3 条第 1 項該当者
学位論文の題名	低栄養環境適応応答を標的とした抗腫瘍活性化合物の合成とその効率的合成を指向した位置選択的アシル化反応の開発
論文審査委員	主 査 教 授 土反 伸和 副 査 教 授 奥田 健介 副 査 准教授 山田 健

論文内容の要旨

緒言

がんは現代において死因となる疾患の第一位であり、様々な器官で原発しその性質は多岐にわたる。高齢化などの原因からがんの罹患患者数は年々増加傾向にあるが、近年の医学薬学の発展によってそれぞれのがん種に応じた治療選択肢が充実したことでその治療が可能になってきた。¹⁾ しかし、様々ながん種の中でも膵臓がんは早期の発見や治療が困難であるだけでなく、現在の膵臓がん治療に用いられている標準治療薬の選択肢が少ないことから治療の予後が不良な場合も多く、その画期的な治療・診断法の確立が望まれる。

固形がんにはがん微小環境と呼ばれる特徴的な環境が存在する。がん微小環境はがんの無秩序な増殖に伴ってがん周辺に形成される低酸素、低栄養、低 pH を特徴とした劣悪な環境であり、このような環境に対してがんはグルコーストランスポーターの活性化や、分子シャペロンの発現量増加などの適応応答によって生存することが知られている。^{2,3)} これら固形がん固有のがん微小環境に対する適応応答は、がんの放射線療法や既存の治療薬への抵抗性の獲得に関与することが報告されており、がんの難治化原因の一つとして考えられている。一方で、がん微小環境における適応応答は新たな治療標的として注目を集めており、がんの適応応答阻害に基づいた創薬研究が活発に行われている。

がん微小環境を標的とした新規治療戦略に基づく創薬研究を遂行するうえで、低栄養環境において高選択的に毒性を示すような創薬シード候補分子となる天然物や合成化合物の発見が重要である。またそれら活性化合物の発見は、がん微小環境に対するがんの適応応答メカニズムの解明に向けた分子プローブの創成にも繋がる。このような背景のもと、がん細胞に対して低栄養環境選択的な毒性を示すような天然物についての単離、合成例が報告されてきた。その一例として江角らのグループによって見出された、局方薬であるゴボウシに含まれていることが知られるリグナンの一種 (–)-arctigenin が挙げられる。⁴⁾ ヒトすい臓がん細胞株である PANC-1 細胞は極度の低栄養条件においても 48 時間以上生存し、現行の膵臓がん標準治療薬であるゲムシタビンに対して抵抗性をもつ。(–)-Arctigenin はこの PANC-1 細胞の飢餓耐性を解除することによって低栄養培地における選択的な細胞死を誘起する。実際、(–)-arctigenin を含むゴボウシの抽出エキスをを用いてゲム

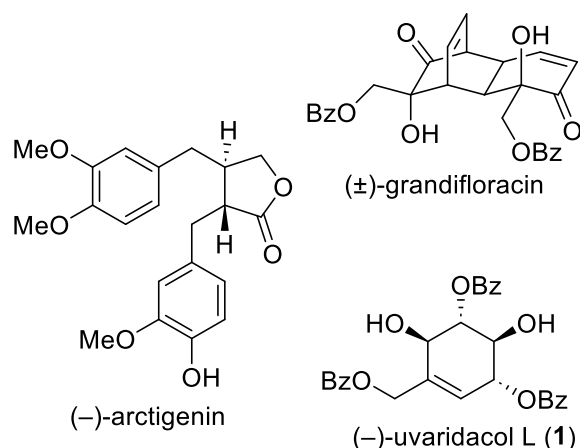
シタビンならびにフルオロピリミジンに不応な膀胱がん患者に対する臨床試験が行われ有望な結果が得られており、低栄養環境を標的とした全く新しい治療戦略の先駆けとして高い注目を集めている。⁵⁾

このような化合物に注目した新規治療戦略に基づく創薬研究の更なる発展には、低栄養環境において選択毒性を示すような化合物の安定供給や効率的な構造変換手法の確立が重要である。そこで、私は低栄養選択毒性化合物の効率的な合成手法の確立と、それに伴う新規反応の開発を行った。

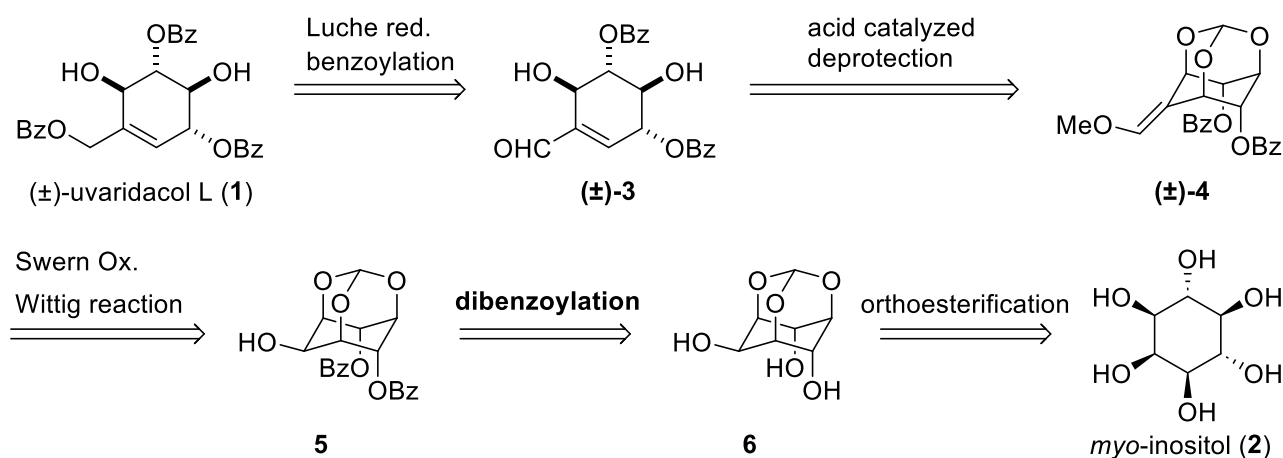
第一章 (±)-Uvaridacol L 並びにその誘導体の合成

【Uvaridacol L の合成】

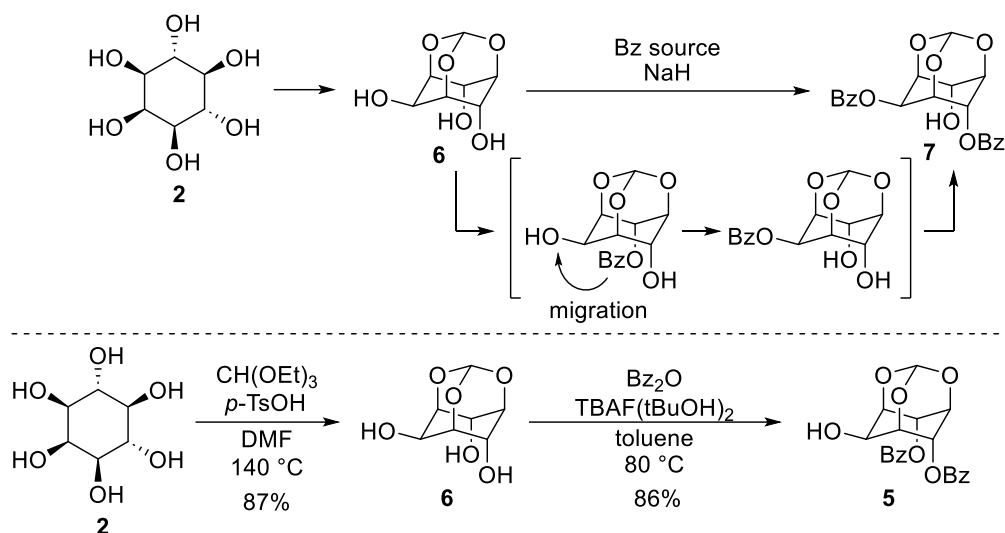
(-)-Uvaridacol L (**1**) は Awale らによって *Uvaria dac* の葉部より単離された天然物である。(-)-arctigenin や (+)-grandifloracin⁶⁾ などの天然物と同様に PANC-1 細胞に対してがん微小環境における低栄養状態を模倣した培地において、選択的に毒性を示すことが報告されており、がん微小環境を標的とした創薬研究において注目されている。⁷⁾ しかし、これまでにその全合成例については報告がなかったため、栄養飢餓耐性解除に基づく新規治療薬の創薬シード候補分子としての **1** の評価と、その構造活性相関研究の展開を目指してまず(±)-**1** の合成に着手した。**1** の



ようなシクロヘキセン環を基本骨格にもつカルバシュガー型天然物の合成例についてはいくつかの報告例があり、中でも *myo*-inositol (**2**) を原料とした合成法は、その他の合成法と比較して短工程で所望するシクロヘキセン骨格を構築できることから、⁸⁾ それらの手法に準じて(±)-**1** の逆合成解析を行った(Scheme 1)。本合成では **2** のオルトエステル保護体(**6**)のアキシャル位水酸基のみを選択的にジベンゾイル化する必要がある。しかし **6** をアシル化する場合、1 段階目のアシル化がアキシャル位水酸基で進行した後に、エクアトリアル位水酸基へとアシル基が転位し 2 段階目のアシル化が進行することで **7** となることから、アキシャル位水酸基選択的に直接ジアシル化した反応例はなかった(Scheme 2: 上式)。⁹⁾

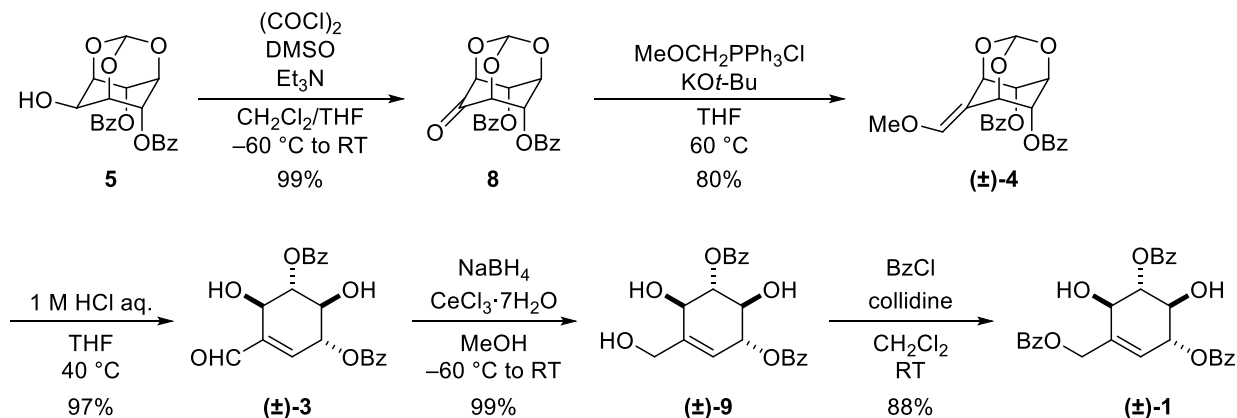


Scheme 1. (±)-Uvaridacol L の逆合成解析



Scheme 2. *myo*-Inositol orthoformate のジアシル化

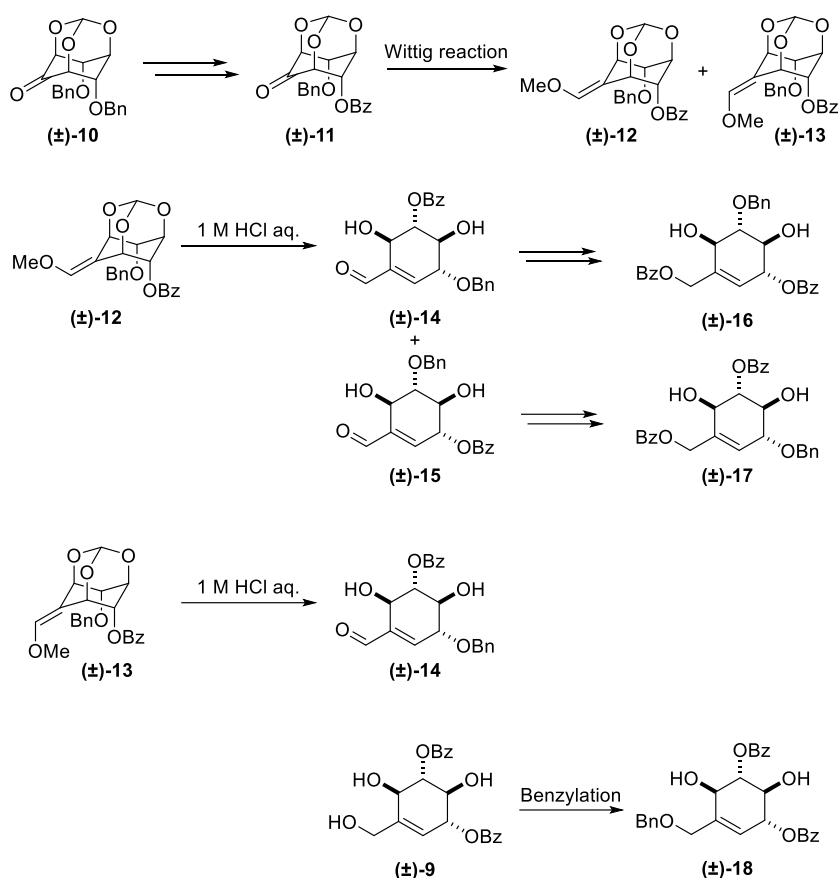
そこで(±)-**1**の効率的な合成を目指しアキシアル位水酸基選択的なジベンゾイル化反応の条件検討を行ったところ、TBAF を触媒として用いる条件においてベンゾイル基の転位が進行することなくアキシアル位水酸基のみがベンゾイル化された化合物 **5** を選択的に得ることができた(Scheme 2:下式)。続いて、合成できた **5** を基質としてエクアトリアル位水酸基を酸化した後、Wittig 反応によってメトキシオレフィン(**4**)を合成した。続く酸の活性化によって進行する開環反応によって得られる共役アルデヒド(**3**)の 1,2-還元が続く、1 級水酸基のベンゾイル化によって **1** のラセミ全合成を全 7 工程、総収率 50%で達成した(Scheme 3)。



Scheme 3. (±)-Uvaridacol L の合成

【Uvaridacol L 誘導体の合成】

前述した合成例では保護基を用いることなく **1** の合成を行ったが、幅広い誘導体合成を行うには適切な保護基を用いた合成法も重要になるため、アキシアル位水酸基をベンジル基で保護した *myo*-イノシトールオルトエステルを用いた誘導体合成についても検討を行った。過去の報告例にあった合成ルートをもとにジアキシアルベンジルケトン(**10**)を合成し、^{8a)}片側のベンジル基のみを脱保護した後にベンゾイル化することでアキシアル位水酸基に異なる置換基が導入されたケトン(**11**)を合成した。



Scheme 4. (±)-Uvaridacol L 誘導体の合成

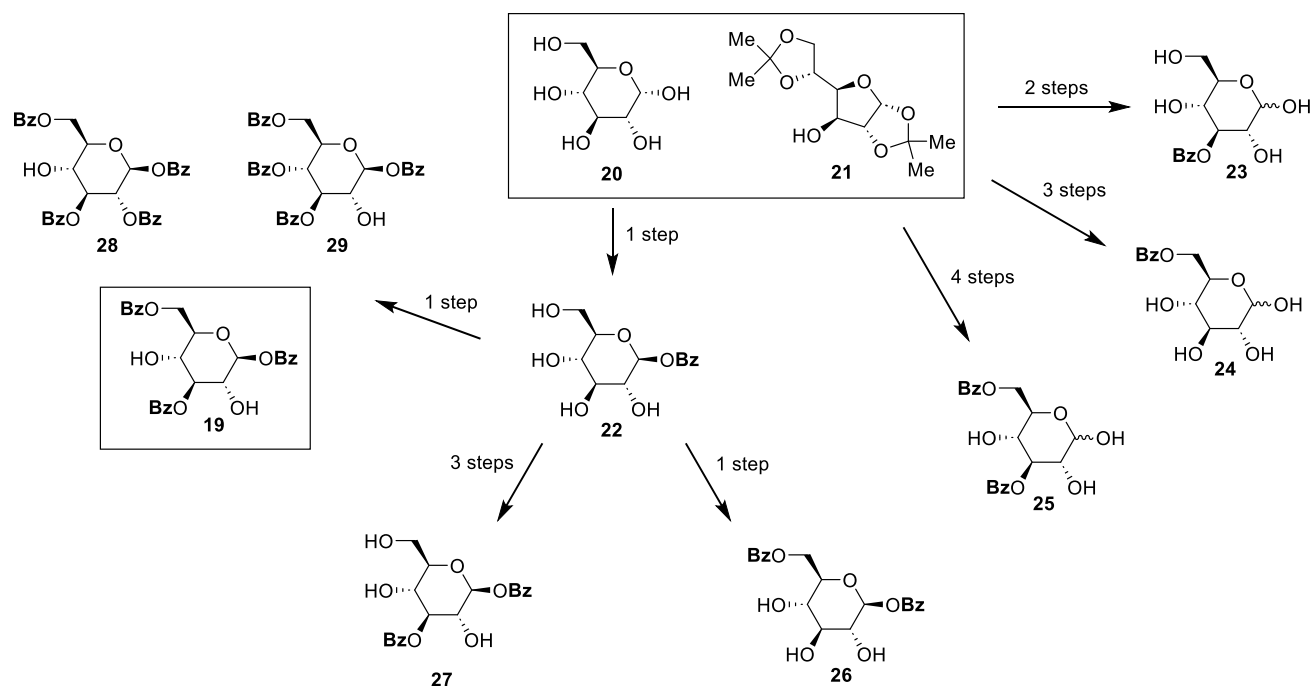
その後、Wittig 反応によってメトキシオレフィン中間体(**12**, **13**)を合成した。**12** および **13** の酸による開環反応を試みたところ、それぞれの置換基と二重結合の幾何異性によって反応選択性が異なることを見出した (Scheme 4)。得られた共役アルデヒド(**14**, **15**)からの構造変換ならびに、**1** の前駆体 **9** からの 1 級水酸基のベンジル化によって、**1** の 3 つあるベンゾイル基のうち 1 つをベンジル基へと置換した各種誘導体(**16**, **17**, **18**)を合成した。これら誘導体によるがん細胞の獲得した栄養飢餓耐性解除能を評価したところ、得られた誘導体は **1** と比較してその活性が大きく変化しなかったことから、**1** の有するエステルカルボニル酸素は活性に必須でないことが明らかとなった。

第 2 章 β-1,3,6-tribenzoyl-D-glucose の合成と構造活性相関

1 はシクロヘキセン環を基本骨格として複数の水酸基からなる連続した不斉中心を有しており、そのうち 3 つの水酸基がベンゾイル基によって修飾されている。一方で、グルコースの β-アノマーは、**1** と同様に酸素で官能基化されたメチル基を有する 6 員環であるピラン環を基本骨格として連続した不斉中心に水酸基をもつ。β-グルコースの 1 位、3 位、6 位水酸基をベンゾイル化することで得られる β-1,3,6-トリベンゾイルグルコース(**19**)は、(–)-**1** と対応する位置にベンゾイル基を有することとなるため、その構造類似性からグルコースの骨格をそのまま利用した(–)-**1** のスキヤホールドホッピングが可能であると考えた。

また、グルコースの構造修飾法についてはこれまでに多くの合成手法が開発されていることから、¹⁰⁾ それらの手法を用いることでグルコース誘導体の網羅的な合成が可能である。そのため、合成した多置換アシルグルコースがこれまでに示したような天然物と同様の活性を持つならば、構造多様性に優れた創薬シード化合物としての高いポテンシャルが期待できる。そこで私は α-D-グルコース(**20**)ならびにアセトナイド保護体

(21)を基質として 19 と、19 の構造を中心とした多置換ベンゾイルグルコース誘導体の網羅的な合成を行った (Scheme 5)。さらに合成したモノ、ジ、トリ、テトラベンゾイルグルコース誘導体群についてがん細胞の獲得した栄養飢餓耐性解除能の活性を評価したところ、3 置換体(19)のみが(-)-1 と同程度の活性を示したことからトリアシルグルコースの創薬的価値が確認できた。



Scheme 5. グルコース誘導体群の合成

第3章 α-D-グルコースの6位選択的アシル化反応の開発

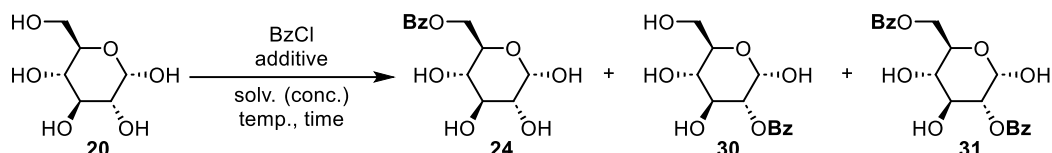
19 が低栄養選択毒性を示したことから、その更なる構造活性相関研究を行うべく、効率的な誘導体合成を指向したグルコースの位置選択的修飾法の開発を目指した。

グルコースはその分子量に対して水酸基の数が多いことから極性が非常に高く、一般的な有機化学合成に用いられる多くの溶媒に難溶である。また、アノマー位水酸基は溶媒中で異性化することでα-アノマーとβ-アノマーとの両アノマー間で平衡化しアノマー混合物となることが知られている。このような合成上の課題を解決すべく、グルコースを扱う合成例の多くの場合でアノマー位水酸基をメチル基によって保護したα-メチル-D-グルコシドを基質とするか、合成の初期に1位アノマー位水酸基へと安定な置換基を導入することが通例となっている。また、糖類に複数ある水酸基はすべてが反応点であることから、所望する位置の構造修飾を行う場合には適切な保護基を利用することが一般的である。しかし、我々の見出した低栄養環境選択毒性を有する3置換アシル化グルコース誘導体の構造活性相関をはかる上ではいずれかの合成段階において保護基の脱保護過程が必要となり、合成にかかる時間的および経済的コストが懸念されることから、保護基を用いない合成法の確立が望まれる。そこで私は、まず汎用性の高いグルコースの6位水酸基選択的なアシル化反応の開発を行った。

グルコースのアシル化反応においてしばしば溶媒として用いられているピリジンは、無保護のグルコースの溶解性に優れる分子であるだけでなく反応系中では塩基としても働くことから、ピリジン系塩基を溶媒として用いた位置選択的アシル化反応についての検討を行った。ピリジンを溶媒として用いた条件と比較して2-ピコリンを溶媒として用いる条件では、反応の進行が緩やかになり過剰にベンゾイル化が進行した2,6-ジベ

ンゾイルグルコース(**31**)の生成がみられなかった(Table 1: entries 1,2)。

一方で反応系中での酸塩化物の分解が確認できたことから、乾燥剤として MS4A を添加したところ再現良くベンゾイル化が進行するようになった (Table 1: entry 3)。さらに反応時間を 48 時間としたところ **31** が多く生成された。反応条件を緩やかにするべく濃度を 0.02 M とし反応温度を $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ まで下げたところ、過剰なベンゾイル化は抑えられたが原料の **20** が残存した(Table 1: entries 4-6)。そこで、活性化剤として DABCO を加えたところ反応が劇的に加速し、NMR 収率 97%、単離収率 85%で目的の **24** を得ることができた(Table 1: entry 7)。

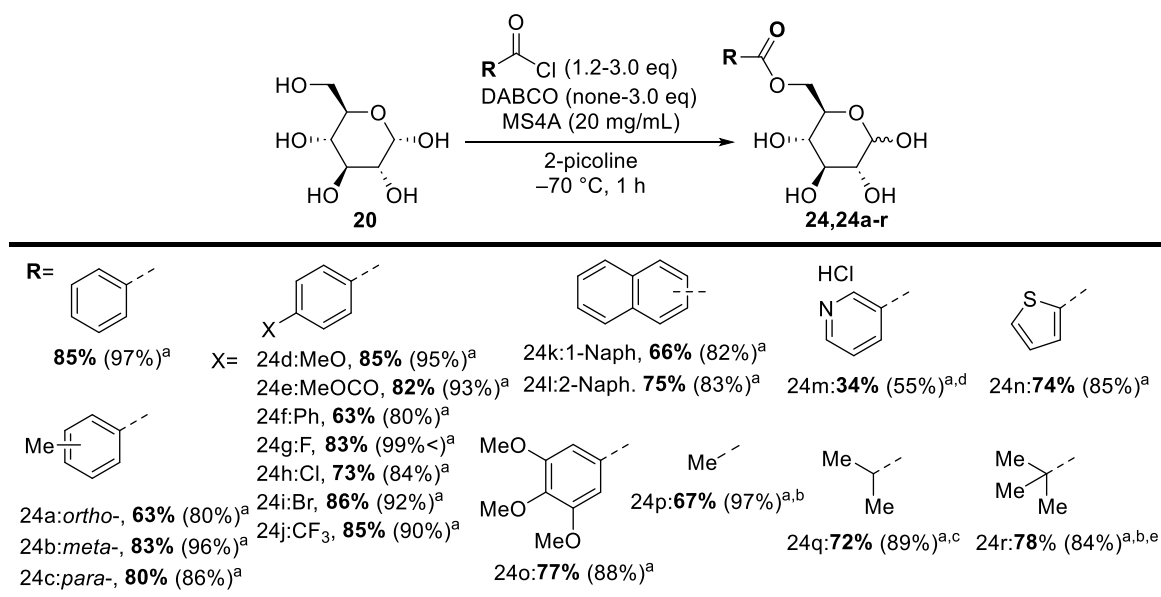


entry	BzCl (eq)	additive	solvent	conc.	temp.	time	yield (%) ^a			
							20	24	30	31
1	1.2	—	pyridine	0.1 M	$-40\text{ }^{\circ}\text{C}$	1 h	45	33	11	9
2	1.2	—	2-picoline	0.1 M	$-40\text{ }^{\circ}\text{C}$	1 h	74	20	3	ND ^b
3	1.2	MS4A (20 mg/mL)	2-picoline	0.1 M	$-40\text{ }^{\circ}\text{C}$	1 h	62	32	3	1
4	1.5	MS4A (20 mg/mL)	2-picoline	0.1 M	$-40\text{ }^{\circ}\text{C}$	48 h	15	47	3	32
5	1.5	MS4A (20 mg/mL)	2-picoline	0.02 M	$-40\text{ }^{\circ}\text{C}$	48 h	24	60	ND ^b	8
6	1.5	MS4A (20 mg/mL)	2-picoline	0.02 M	$-70\text{ }^{\circ}\text{C}$	48 h	28	70	ND ^b	ND ^b
7	1.5	MS4A (20 mg/mL), DABCO (1.5 eq)	2-picoline	0.02 M	$-70\text{ }^{\circ}\text{C}$	1 h	ND ^b	97(85)^c	ND ^b	ND ^b

^aNMR yield, ^bNot detected, ^cIsolated yield

Table 1. 6 位選択的アシル化反応の条件検討

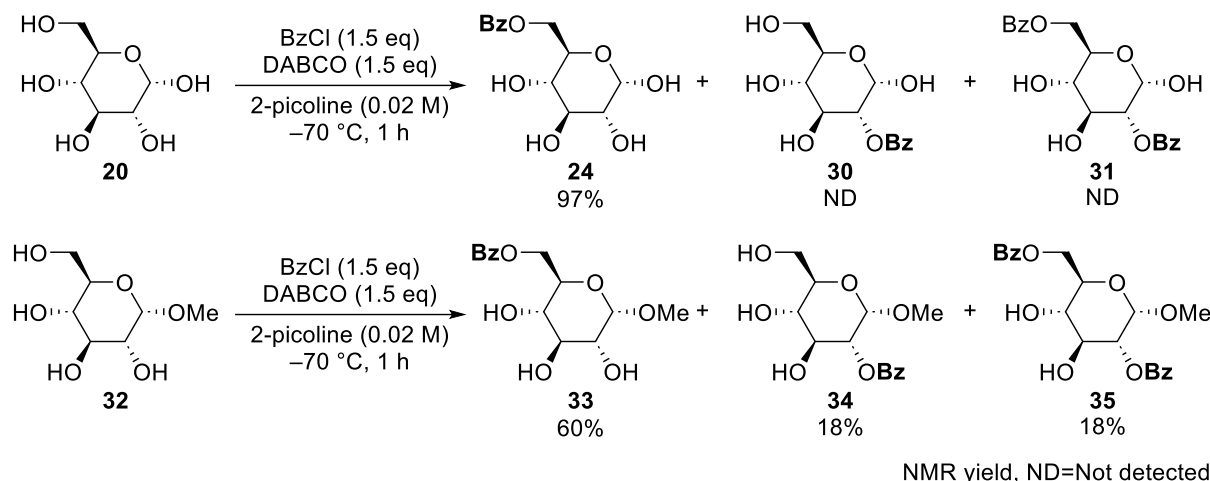
本条件を最適条件として 6 位水酸基選択的なアシル化反応の基質適用性について確認した(Table 2)。4 位に様々な置換基をもつ芳香族アシル基についても問題なく反応が進行したほか、立体的に嵩高い芳香族アシル基についても反応が進行した。また、いくつかの複素環をもつアシル基についても位置選択的に反応が進行した。さらに、いくつかの脂肪族アシル基についても高い位置選択性で反応することが確認できた。



^aDetermined by NMR, ^bDABCO was not added; ^creaction time: 3 h, ^dreaction time: 24 h, ^ereaction temperature: $0\text{ }^{\circ}\text{C}$

Table 2. 6 位選択的アシル化反応の基質適用性

一方で、グルコースの構造修飾における基質として汎用される α -メチル-D-グルコシド(**32**)を最適条件によってベンゾイル化したところ、2 位水酸基にもベンゾイル化が進行した化合物 **34** や **35** の生成が確認できた (Scheme 6)。このことから、一般的には化合物の扱いを困難にすると考えられるアノマー位水酸基が、本反応条件を用いて 6 位水酸基を選択的にアシル化する場合には重要な役割をもつことが示唆された。



Scheme 6. アノマー位水酸基の有無による反応性の違い

総括

本研究では、固形がん特有のがん微小環境における低栄養状態において選択的に毒性を示す天然物 **uvaridacol L** をこれまでに報告例のなかった位置選択的アシル化反応を鍵反応とすることによって短工程で合成することに成功した。また、**uvaridacol L** からのスキヤホールドホッピングによって得られた β -1,3,6-トリベンゾイルグルコースが、低栄養選択的な毒性を示すことを確認しその創薬的価値を見出した。

さらに、グルコース誘導体群の効率的な合成を指向してグルコースの位置選択的なアシル化反応について検討し、汎用性の高い 6 位水酸基選択的なアシル化反応を開発した。またそれら検討の中で、グルコースのアノマー位水酸基が位置選択的なアシル化において重要な役割を持つことを見出し、グルコースを基質とした合成手法に新たな選択肢を提示することができた。

参考文献

1. Sung H., Ferlay J., Siegel R. L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F., *CA Cancer J. Clin.*, **71**, 209–249 (2021).
2. For recent reviews of tumor microenvironment, see: (a) Vaupel P., Kallinowski F., Okunieff P., *Cancer Res.*, **49**, 6449–6465 (1989). (b) Balkwill F. R., Capasso M., Hagemann T., *J. Cell Sci.*, **125**, 5591–5596 (2012). (c) Arneth B., *Medicina*, **56**, 15 (2020). (d) Baghban R., Roshangar L., Jahanban-Esfahlan R., Seidi K., Ebrahimi-Kalan A., Jaymand M., Kolahian S., Javaheri T., Zare P., *Cell Commun. Signal.*, **18**, 59 (2020). (e) De Palma M., Biziato D., Petrova T. V., *Nat. Rev. Cancer*, **17**, 457–474 (2017).
3. For tumor adaptation to nutrient deprivation and malignancy, see: (a) Izuishi K., Kato K., Ogura T., Kinoshita T., Esumi H., *Cancer Res.*, **60**, 6201–6207 (2000). (b) Finicle B. T., Jayashankar V., Edinger A. L., *Nat. Rev. Cancer*, **18**, 619–633 (2018). (c) Kamphorst J. J., Nofal M., Commisso C., Hackett S. R., Lu W., Grabocka E., Vander Heiden M. G., Miller G., Drebin J. A., Bar-Sagi D., Thompson C. B., Rabinowitz J. D., *Cancer Res.*, **75**, 544–553 (2015). (d) Wek R. C., Staschke K. A., *EMBO J.*, **29**, 1946–1947 (2010). (e) Badr H. A., AlSadek D. M. M., Mathew M. P., Li C.-Z., Djansugurova L. B., Yarema K. J., Ahmed H., *Biomaterials*, **70**, 23–36 (2015).

4. Awale S., Lu J., Kalauni S. K., Kurashima Y., Tezuka Y., Kadota S., Esumi H., *Cancer Res.*, **66**, 1751–1757 (2006).
5. Ikeda M., Sato A., Mochizuki N., Toyosaki K., Miyoshi C., Fujioka R., Mitsunaga S., Ohno I., Hashimoto Y., Takahashi H., Hasegawa H., Nomura S., Takahashi R., Yomoda S., Tsuchihara K., Kishino S., Esumi H., *Cancer Sci.*, **107**, 1818–1824 (2016).
6. Ueda J, Athikomkulchai S, Miyatake R, Saiki I, Esumi H, Awale S., *Drug Des. Devel. Ther.*, **8**, 39–47 (2014).
7. Awale S., Tawila A. M., Dibwe D. F., Ueda J., Sun S., Athikomkulchai S., Balachandran C., Saiki I., Matsumoto K., Esumi H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **27**, 1967–1971 (2017).
8. (a) Mondal S., Prathap A., Sureshan K. M., *J. Org. Chem.*, **78**, 7690–7700 (2013). (b) Mondal S., Sureshan K. M., *Org. Biomol. Chem.* **12**, 7279–7289 (2014). (c) Mondal S., Sureshan K. M., *J. Org. Chem.*, **81**, 11635–11645 (2016).
9. (a) Das T., Shashidhar M. S., *Carbohydr. Res.*, **308**, 165–168 (1998). (b) Praveen T., Shashidhar M. S., *Carbohydr. Res.*, **330**, 409–411 (2001). (c) Devaraj S., Shashidhar M. S., Dixit, S. S., *Tetrahedron*, **61**, 529–536 (2005). (d) Sureshan, K. M., Devaraj, S., Shashidhar, M. S., *Tetrahedron*, **65**, 2703–2710 (2009).
10. (a) Agarwal, A., Vankar, Y. D., *Carbohydr. Res.*, **340**, 1661–1667 (2005). (b) Silva, S., Sánchez-Fernández, E. M., Mellet, C. O., Tatibouët, A., Rauter, A. P., Rollin, P., *Eur. J. Org. Chem.*, 7941–7951 (2013). (c) Benedeković, G., Kovačević, I., Popsavin, M., Francuz, J., Kojić, V., Bogdanović, G., Popsavin, V., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **26**, 3318–3321 (2016). (d) Takeuchi, H., Fujimori, Y., Ueda, Y., Shibayama, H., Nagaishi, M., Yoshimura, T., Sasamori, T., Tokitoh, N., Furuta, T., Kawabata, T., *Org. Lett.*, **22**, 4754–4759 (2020).

論文審査の結果の要旨

固形がん固有の栄養飢餓環境に適応したがん細胞は転移・浸潤能、血管新生誘導能などを獲得し、既存の放射線療法や化学療法剤に抵抗性を示すことから、その克服は長年の課題である。その一方で、このような栄養飢餓環境は通常組織の細胞には見られないことから、難治性の固形がん細胞に選択性の高い薬剤を開発する上で、がん細胞が獲得した適応応答は分子標的として活用することができる。そのような背景の下、がん細胞に対する低栄養選択毒性を有することが報告された **uvaridacol L** に関し、位置選択的アシル化の開発による短工程での全合成を著者は行った。続いて、**uvaridacol L** の **scaffold hopping** を行うことによって容易に合成することのできる **β-1,3,6-トリベンゾイルグルコース**の合成・評価を行って、本化合物が **uvaridacol L** に匹敵する低栄養選択毒性を有することも見出した。さらに、グルコースの位置選択的なアシル化の探求を行った結果、有機合成化学的手法では前例のない効率的な 6 位選択的アシル化反応の開発にも成功した。

以上のことから本研究では、栄養飢餓耐性解除能における骨格変換に対する許容性の探求や、低栄養選択毒性を有する化合物から展開する様々な誘導体群の効率的合成に寄与する新たな合成法の確立など、**uvaridacol L** を起点とした構造活性相関研究の拡張に寄与する様々な知見が得られた。これらの知見は、低栄養環境適応応答を標的とする抗腫瘍活性化合物の効率的な誘導体展開を可能とし、その構造活性相関研究を推し進める上で有益な知見であると評価される。

本論文は博士（薬学）論文として、适当と判定する。