

氏名	つねかわ りゅうじ 恒川 龍二
学位の種類	博士(薬学)
学位記番号	博士甲第〇〇号
学位授与の日付	2020年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	フラボノイド類の位置選択的合成、および抗がん剤耐性克服作用の検討
論文審査委員	(主査) 須貝 威 教授(農学博士) (副査) 増野 匡彦 教授(薬学博士) 登美 斉俊 教授(博士(薬学))

論文内容の要旨

① 序論

フラボノイド類には、生物活性を示す化合物が数多く見出されており、フィセチン(**1a**)や2',4',6'-トリヒドロキシジヒドロカルコン(**2**)、3',4',7'-トリメトキシフラボン(**3**)はその一例である(Figure 1)。これらの化合物は、天然資源から単離する手法や、独立した芳香環を有する化合物を複数連結させる化学合成などによって供給されているが、その量は十分といえず、効率よく純度よい物質を大量に供給できる合成手法が求められている。

著者は、植物の二次代謝産物として自然界に豊富に見出され、容易に入手できるケルセチン(**4a**)やナリンギン(**5**)、ヘスペリジン(**6**)などのフラボノイドに着目した。これらの化合物には、上述した生物活性を有するフラボノイドの炭素骨格そのものが予め備わっているため、それらの合成原料として期待できる。また、このような入手容易なフラボノイドを出発原料に、希少なフラボノイドを化学合成する、いわゆる半合成法の開拓は非常に有用である。

フラボノイドは構造的特徴として、多数のフェノール性ヒドロキシ基を有し、さらに配糖体においては、アルコール性ヒドロキシ基も多数存在する。そのため、化学的に合成・変換するにあたり、複数のヒドロキシ基の中で、目的とする位置でのみ反応を進行させる必要があり、位置選択的変換の手法が非常に重要である。

著者は、博士課程において、フラボノイドを題材にした位置選択的変換の手法開拓、それらの手法を応用したフラボノイド合成、合成したフラボノイドの生物活性の評価に取り組んだ。以下本論では、1) ケルセチン(**4a**)からフィセチン(**1a**)を合成した研究、および、ナリンギン(**5**)からトリヒドロキシジヒドロカルコン配糖体を合成した研究、2) ヘスペリジン(**6**)類から3',4'-ジメトキシフラボン類を合成し、その抗がん剤耐性克服作用を評価した研究の成果を示す。

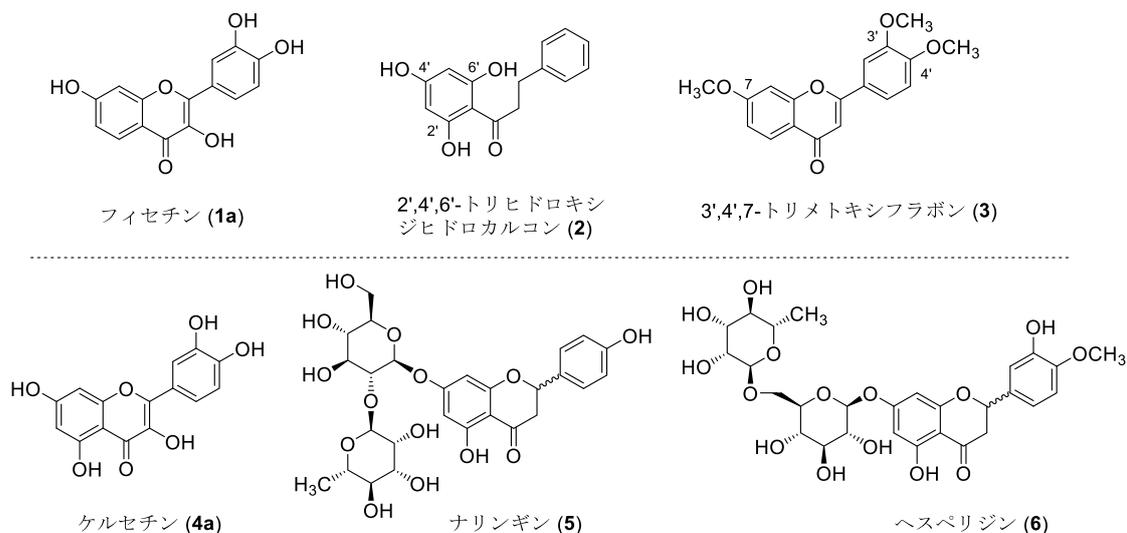
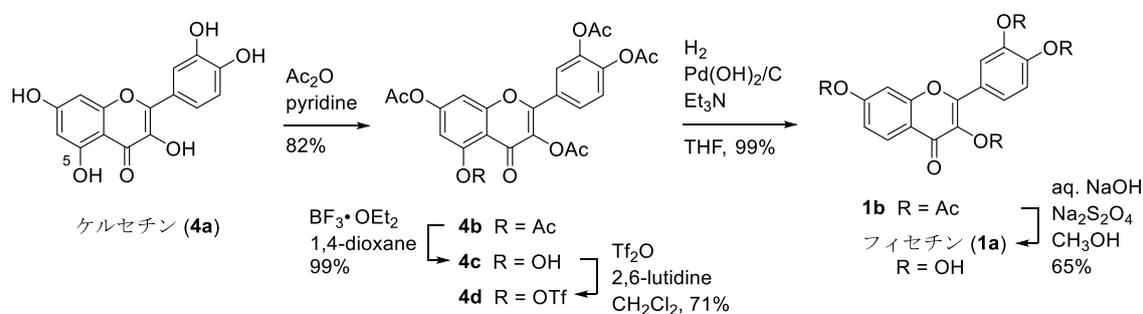


Figure 1

② 位置選択的変換の手法開拓およびフラボノイド合成—1-1: フィセチンの合成

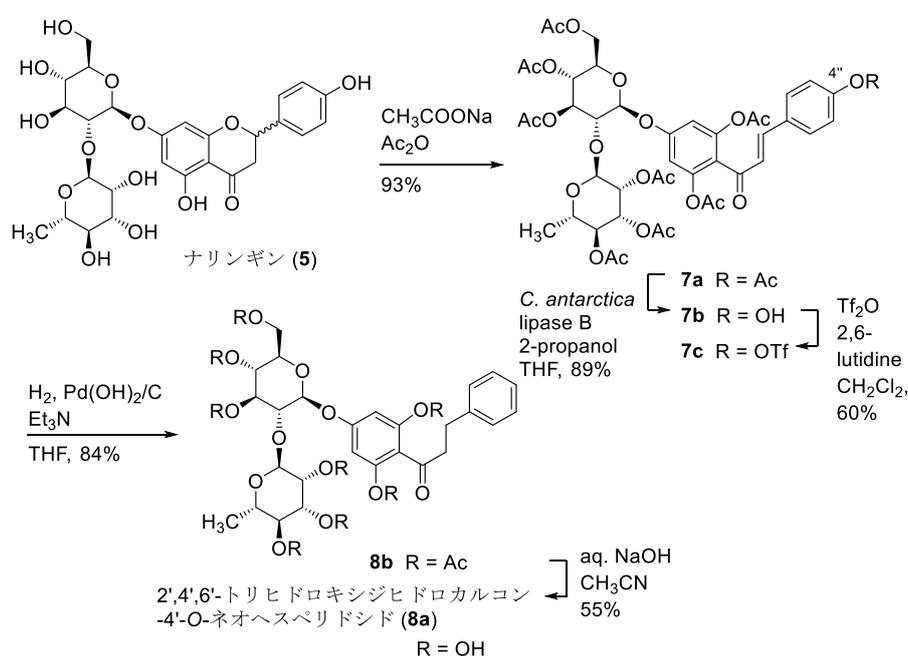
フィセチン(1a)は、イチゴなどに見出されるフラボノールで、抗酸化作用や抗がん作用をはじめ多くの有用な生物活性を示し、神経保護作用なども注目されている。天然資源から供給される 1a は微量なため、著者はケルセチン(4a)を出発原料とする 1a の合成に取り組んだ。4a から 1a を合成するには、5 位ヒドロキシ基の位置選択的な脱酸素が要求される。著者は、ルイス酸による 5 位置選択的脱アセチル化を活用し、これを実現した(Scheme 1)。4a のヒドロキシ基を全てアセチル化し、得られた 4b に対し、 $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ を作用させると望む 5 位でのみ脱アセチル化が進行し、4c が生じた。遊離となった 5 位ヒドロキシ基をトリフルリル化し 4d とした後、水素雰囲気下、塩基としてトリエチルアミンを用い、水酸化パラジウムを作用させると、分子内に多数存在する酢酸エステルを損なうことなく、5 位の芳香環—酸素原子間の結合開裂(脱酸素)に成功し 1b を得た。最後に、残りのアセチル基を還元剤共存下でアルカリ加水分解し、目的とする 1a を 5 工程、37%の収率で合成した。本合成は、安価で入手容易な 4a を原料とする「半合成」であり、1a の量的供給に寄与すると期待される。



Scheme 1

③ 位置選択的変換の手法開拓およびフラボノイド合成—1-2: 2',4',6'-ジヒドロカルコン配糖体の合成

2',4',6'-トリヒドロキシジヒドロカルコン(2)は、抗炎症作用やチロシナーゼ阻害作用を有することから、その配糖体にも有用な生物活性が期待できる。著者は、安価なナリンギン(5)を原料とし、フィセチン(1a)の合成において確立した効率良い脱酸素手法と、酵素触媒を用いる位置選択的脱アセチル化を組み合わせ、4''位における位置選択的脱酸素手法を新たに開拓し、配糖体 8a を合成した(Scheme 2)。5 から一工程で得られるカルコン 7a を基質とした、リパーゼ触媒によるエステル交換は 4''位において位置選択的に進行した。得られたフェノール 7b はトリフルリ化した後、上述した条件で脱酸素し、残存するアセチル基をアルカリ条件下除去し、8a を 5 工程、収率 23% で合成した。



Scheme 2

以上示した、フィセチン(1a)およびジヒドロカルコン配糖体(8a)の合成は、いずれも位置選択的な脱アセチル化と、その位置における脱酸素を組み合わせる変換を鍵工程とし、保護基としてアセチル基のみを用いているため、脱保護においてブレンステッド酸・ルイス酸性条件を必要としないことから、配糖体を原料や標的物質とするフラボノイド合成へ広く応用が期待できる。

④ フラボノイド合成および生物活性評価—2-1: 3',4'-ジメトキシフラボン類の合成

フラボノイドは、人の食習慣において摂取される機会が多く、ATP-binding cassette トランスポーターなどを介した薬物との相互作用に関心が持たれており、breast cancer resistance protein (BCRP)/ABCG2 と相互作用する化合物が数多く見出されている。

杉本らは、3',4',7-トリメトキシフラボン(3)が、BCRP を過剰発現させたヒト慢性骨髄性

白血病由来の K562/BCRP 細胞において、抗がん剤イリノテカンの活性代謝物で、BCRP の基質として知られている、SN-38 に対する耐性を顕著に克服することを見出した。また、イソフラボンであるダイゼイン(9)より、その 5 位にヒドロキシ基が加わったゲニステイン(10)の方が強い SN-38 耐性克服作用を示す知見が得られていた。そこで、著者は、より強い抗がん剤耐性克服作用を期待して、3 の 5 位にヒドロキシ基を導入した 5-ヒドロキシ-3',4',7-トリメトキシフラボン(11)、同じ位置に水素結合受容体であるフッ素原子を導入した類縁体 12、また、7 位に糖鎖などを有する類縁体 13-16 などを合成し、その作用を検討することとした(Figure 2)。

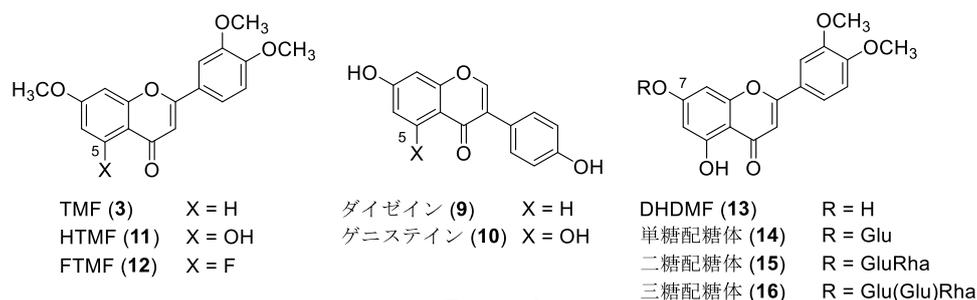
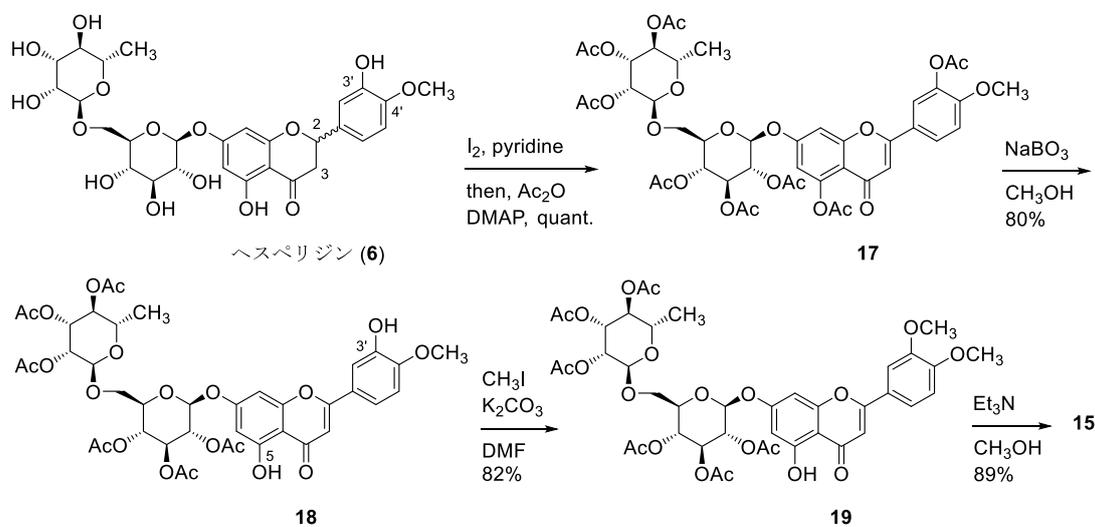


Figure 2

11 は、6 の糖鎖を除去した後、2-3 位間を脱水素し、3'位と 7 位のヒドロキシ基をメチル化して合成した。12 は、3,5-ジメトキシフルオロベンゼンを 3,4-ジメトキシ桂皮酸塩化物と縮合した後、得られたカルコンの脱メチル化および環化を経てフラボン骨格を構築し得た。15 の合成には、上述した 1a および 8a の合成を参考に、アセチル基の位置選択的な除去を活用した(Scheme 3)。3'位ヒドロキシ基への位置選択的メチル基の導入は、6 の 2-3 位間を脱水素した後、全てのヒドロキシ基をアセチル化した 17 に対する、NaBO₃を用いたフェノール性アセトキシ基選択的な脱アシル化と、続くメチル化で達成した。得られた 15 から 7-ヒドロキシ体(13)および単糖配糖体 14 を合成した。16 は、三糖配糖体であるモノグルコシルヘスペリジンに、15 の合成手法を応用して得た。



Scheme 3

⑤ フラボノイド合成および生物活性評価—2-2: 3',4'-ジメトキシフラボン類の抗がん剤耐性克服作用の評価

合成した 3',4'-ジメトキシフラボン類 **11**–**16** の抗がん剤耐性克服作用を、杉本らの報告に従い、K562/BCRP 細胞におけるフラボン類共存下、SN-38 感受性試験で評価した(Figure 3)。克服作用の評価は化学療法学講座において、杉本・片山・近藤らの指導のもと実施した。**11**、**12**、**13**、**14** は SN-38 剤耐性克服作用を示した。一方、**15**、**16** は示さなかった。フラボノイドが、K562/BCRP 細胞における SN-38 の GI₅₀ 値を 50%低下させる際の濃度として reversal index(RI₅₀ 値)を、**3** および **11**–**14** について算出し、結果を Table 1 に示した。

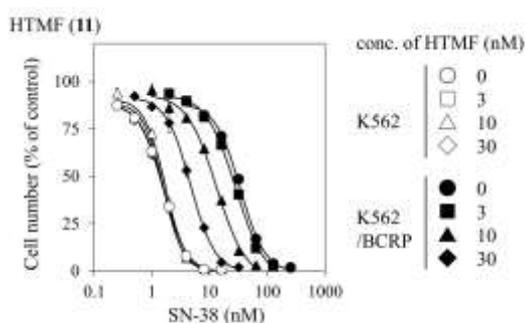


Figure 3

Table 1

化合物	RI ₅₀ 値 (nM)
TMF (3)	18
HTMF (11)	7.2
FTMF (12)	25
DHDMF (13)	68
単糖配糖体 (14)	91

5 位にヒドロキシ基を導入した **11** は、もとの **3** より強い抗がん剤耐性克服作用を示し、同じ位置にフッ素原子を導入した **12** の作用は **3** と同程度だった。**7** 位に親水性のグルコースを導入した **14** は、ヒドロキシ体である **13** と同程度の抗がん剤耐性克服作用を示した。

続いて、最も強い抗がん剤耐性克服作用を示した **11** が、K562/BCRP 細胞において、BCRP の基質である蛍光色素 Hoechst 33342 の細胞内蓄積量に及ぼす影響を検討した(Figure 4)。

11 存在下、K562/BCRP 細胞内の Hoechst 33342 蓄積量は、濃度依存的に上昇した。著者は、**11** による、BCRP 基質の細胞内蓄積量を高める作用が、上述した抗がん剤耐性克服作用に寄与していると考えている。

K562/BCRP 細胞は、人為的に BCRP を遺伝子導入した細胞である。そこで、実際のがん環境により近い、内因性の BCRP を発現している細胞株においても **11** が抗がん剤耐性克服作用を示すか検証した。内因性の BCRP を発現するヒト多発性骨髄腫由来の RPMI-8226 細胞とヒト肺がん由来の NCI-H460 細胞においても **11** の抗がん剤耐性克服作用が確認できた。

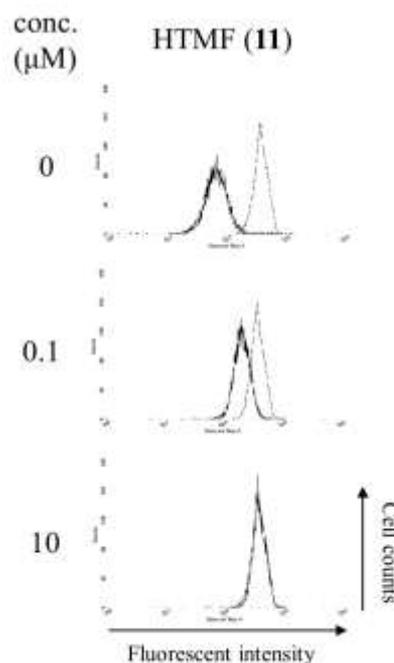
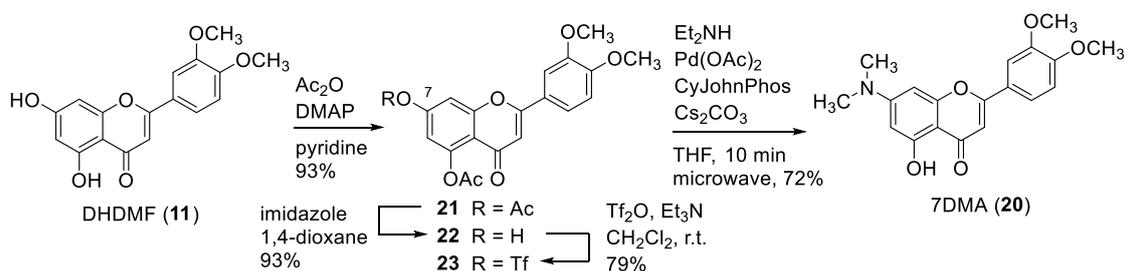


Figure 4

⑥ フラボノイド合成および生物活性評価—2-3: 7-ジメチルアミノフラボンの合成と抗がん剤耐性克服作用の評価

11 および **13** の抗がん剤耐性克服作用の比較から、7 位置換基へのアルキル基の導入が作用に有利と考えた。また、これまで BCRP の阻害剤として分子内に窒素原子を有する化合物が数多く見出されている。そこで、著者はメトキシ基よりメチル基が多い、ジメチルアミノ基を 7 位に有する **20** を合成し、その耐性克服作用を検討することとした

20 は、**11** から一工程で得られるジアセタート **21** に対する、イミダゾールを用いた 7 位選択的脱アセチル化を活用し、7 位選択的にスルホン酸エステルを構築した後、パラジウム触媒を用いて、ジメチルアミンを脱酸素的に導入し合成した(Scheme 4)。



Scheme 4

20 の K562/BCRP 細胞における SN-38 耐性克服作用は、 RI_{50} 値が 7.5 nM で、**11** と同様に強い抗がん剤耐性克服作用を示した。**20** の抗がん剤耐性克服作用は、**11** と同様に、内在性の BCRP を発現する RPMI-8226 細胞と NCI-H460 細胞においても確認できた。

以上の研究は 7-アミノフラボンに関する初の検証で、今回新たな知見が得られた。

⑦ 総括

著者は、天然に豊富なフラボノイド類を資源基盤とする、有用な生物活性化合物の合成という観点から、安価なフラボノイドを原料とし、フィセチン(**1a**)およびジヒドロカルコン配糖体(**8a**)、3',4'-ジメトキシフラボン類の合成を達成した。位置選択的脱アセチル化を活用し、1) 5 位および 4'位における位置選択的脱酸素、2) 3'位ヒドロキシ基への位置選択的メチル基導入手法を開拓し、フラボノイドの構造変換における、アセチル基とそれに関連した選択的変換手法の有用性を実証した。

3',4'-ジメトキシフラボン類の抗がん剤耐性克服作用の検討においては、HTMF(**11**)の顕著な作用を見出し、構造活性相関において新たな知見を開拓した。

以上の合成に関する位置選択的変換手法および抗がん剤耐性克服作用に関する新たな知見は、今後のフラボノイドの医薬・健康分野への応用に貢献すると考えられる。

論文審査結果の要旨

博士論文発表は、2020年2月21日(金)11時05分から、慶應義塾大学薬学部1号館地下1階マルチメディア講堂にて、研究科委員会のメンバーなどの出席の下、学部内公開の形で実施された。なお、本発表の前に、副査2名による事前の個人面接が行われており、論文内容に関する疑問点の指摘並びに改善に関する指導が行われた。

25分間の口頭発表では、研究の背景並びに問題点、研究過程並びに研究成果が整然と提示された。その後の15分間の試問では、質問に対して概ね的確な応答がなされた。本発表では、申請者が行った「フラボノイド類の位置選択的合成、および抗がん剤耐性克服作用の検討」に関する研究結果について述べた。

本論の前半部分は、位置選択的変換手法の開拓と、それらを応用したフラボノイド合成に関し、フィセチン(**1a**)および2',4',6'-トリヒドロキシジヒドロカルコン配糖体(**8a**)の合成について述べた。**1a**の合成においては、ルイス酸を用いた5位選択的脱アセチル化を鍵工程とし、分子内に多数の酢酸エステルを共存させても、効率・選択性良く進行する脱酸素条件を見出し、豊富な資源であるケルセチン(**4a**)を出発原料とする、**1a**の効率良い合成を達成した。**8a**の合成においては、**1a**の合成を参考に、位置選択的脱アシル化と、続く脱酸素を組み合わせる合成計画を立案した。最も立体的に空いた位置で進行する、酵素触媒を用いた位置選択的脱アセチル化を活用し、位置選択的にトリフルル基を導入しトリフラート**7c**を調製した後、**1a**の合成において確立した脱酸素手法を応用し、ジヒドロカルコン配糖体**8a**の合成を達成した。両合成において、フラボノイド骨格上のヒドロキシ基に対する変換における、アセチル基とそれに関連する位置選択的変換手法の有用性を示した。

後半部分は、フラボノイド合成と生物活性の評価に関し、3',4'-ジメトキシフラボン類の合成と、その抗がん剤耐性克服作用の検討について述べた。3',4',7'-トリメトキシフラボン(TMf, **3**)は顕著な抗がん剤耐性克服作用を有し、従来報告されている構造活性相関を参考に、その5位にヒドロキシ基が置換したHTMF(**11**)やフッ素原子を導入したFTMF(**12**)が、より強力な作用を示すと予測した。天然に豊富に存在するヘスペリジン(**6**)などを出発原料とし、種々の類縁体を合成し、各化合物の抗がん剤耐性克服位作用を検討した。各類縁体の合成において、まず、ヘスペリジンから、糖鎖の除去および脱水素、位置選択的メチル化を経てHTMFを合成した。次に、3,5-ジメトキシフルオロベンゼンと3,4-ジメトキシ桂皮酸塩化物を原料とし、二成分の縮合と生じるカルコンの位置選択的脱メチル化、酸化的条件下における環化によりFTMFを合成した。二糖配糖体(**15**)の合成では、過ホウ素酸ナトリウムによる官能基選択的脱アセチル化を活用した3'位ヒドロキシ基に対する位置選択的なメチル基導入手法の開拓し、さらに、合成した二糖配糖体から、非還元末端糖の部分加水分解により単糖配糖体(**14**)およびDHDMF(**13**)を合成した。二糖配糖体の合成において新たに開拓した3'位ヒドロキシ基に対する選択的なメチル基の導入手法を、三糖を有するモノグルコシルヘスペリジンに応用し、三糖配糖体

(16)を合成し、本手法の有用性を示した。合成した6種の化合物について、その抗がん剤耐性克服作用を評価した。SN-38とK562/BCRP細胞を用いた検討において、リード化合物であるTMFに比べ、HTMFがより強力な抗がん剤耐性克服作用を示すことを見出した。ついで、HTMFがK562/BCRP細胞において、BCRP基質であるHoechst33342の細胞内蓄積量を増加させる知見を与えた。また、RPMI-8226細胞とNCI-H460細胞を用いた検討から、HTMFは、内在性にBCRPを発現している細胞においても、抗がん剤耐性克服作用を示すことを見出し、HTMFの抗がん剤耐性克服作用の性質を明らかにした。

続いて、7-ジメチルアミノフラボンの抗がん剤耐性克服作用について説明した。合成したDHDMFとHTMFの作用の比較から、7位の置換基に着目し、7位にジメチルアミノ基を導入した7DMA(20)を候補化合物として考案した。DHDMFを出発原料に、7位選択的脱アセチル化を活用し、7位にトリフルリル基を導入し、続くアミノ化で7-DMAを合成した。7DMAはK562/BCRP細胞においてHTMFと同程度に強力な抗がん剤耐性克服作用を示し、7位に窒素原子を導入したフラボン類に関し、初の知見を与えた。

最後に博士論文発表の内容を総括した。自然界に豊富に存在するケルセチン(4a)およびナリンギン(5)、ヘスペリジン(6)を題材とし、酵素触媒や化学的手法などを活用する位置選択的変換手法を新たに開拓し、フィセチン(1a)、トリヒドロキシジヒドロカルコン配糖体(8a)、3',4'-ジメトキシフラボン類の合成を達成した。また、抗がん剤耐性克服作用の評価においてはヘスペリジンより短工程で合成可能なHTMF(11)の強力な作用を見出し、FTMF(12)や三糖配糖体(16)、7DMA(20)などの新規化合物の合成を通じて、構造活性相関に関する新たな知見を与えた。

発表に続く質問討論においては、以下の内容について議論した。前半の研究課題に関しては、1) 脱アセチル化、脱酸素の組み合わせはどこまで適用可能か、2) グリーンケミストリーの視点から、保護・脱保護の工程をどのように評価するか、3) 出発原料の候補となりうる、天然資源に豊富なフラボノイドは他にどのような物質が想定されるか、について訊ねられた。文献・実験結果に基づいた考察を述べ回答した。後半の研究課題に関しては、1) フッ素原子は、最適な水素受容性置換基と言えるか、2) ここまでの研究成果に基づくと、今後、どのような置換パターンを持つ化合物に展開・合成すべきか、3) 膜ベシクルを用いた基質輸送の阻害実験など、どこまで物質移送を直接的に検証したか、4) BCRPの分子構造をどこまで考えて設計したか、5) 配糖体は、医薬品・健康食品という視点からみると、どのような有用性を期待して分子設計・合成したか、6) メトキシフラボン類は、どのような代謝を予想しているか、について訊ねられた。こちらも文献・実験結果に基づいた考察を述べ回答した。

恒川君の発表・質問討論は、以下のようにまとめられる。フラボノイドを題材とした位置選択的変換手法の開拓において、位置選択的脱アセチル化と、続く、同じ位置における還元的脱酸素を組み合わせる手法を確立し、ケルセチン(4a)の5位、および、ナ

リンギン(5)の4'位ヒドロキシ基を選択的に脱酸素し、有用な生物活性が期待されるフィセチン(1a)およびトリヒドロキシジヒドロカルコン配糖体 8a の合成を達成した。ヘスペリジン(6)を題材とした合成では、官能基選択的脱アセチル化を鍵工程に、ヘスペリジンに対する3'位ヒドロキシ基に対する選択的なメチル基導入を達成し、3',4'-ジメトキシフラボン類の効率良い合成手法を確立した。フラボノイドの生物活性評価においては、天然に豊富なヘスペリジン(6) から短工程で合成可能な、HTMF(11)の強力な抗がん剤耐性克服作用を見出した。抗がん剤耐性克服作用に関する構造活性相関においては、5位フッ素原子、7位の三糖、7位ジメチルアミノ基に関する新たな知見を与え、HTMFと同程度に強力な作用を有し、7位に窒素原子を有する新たなリード化合物、7DMA(20)を見出した。これらの研究成果により、アセチル基とそれに関連する位置選択的変換手法が、フラボノイドを題材とした位置選択的合成に有用であることを示した。また、抗がん剤耐性克服作用に関する検討は、フラボノイドの耐性克服作用に関する性質や構造活性相関において、多くの知見をもたらした。質問討論では、本研究の独自性・有用性・今後の発展性を確認した。

提出論文並びに論文発表に対し、2名の副査からは以下のような見解が示された。

増野教授：天然資源由来の化合物を活用し、従来知られた有機化学的変換反応を巧みに組み合わせ、着実に標的化合物を合成した。分子設計も博士課程研究期間の中で、最善を尽くしており、博士の学位に値するものである。

登美教授：有機合成化学を専攻しながら、自ら設計・合成した化合物をもって、トランスポーターの生化学的研究にも果敢に挑戦した。予備審査時点における、研究方針・技法の確認を理解し、その後は研究をまとめるための実験を可能な限り実施・検証した。博士の学位に値するものである。

なお、副査2名に共通する意見は以下の通りである。副査面談における疑問点や質問に対し、それぞれ文書にまとめて改善点を明示した上で論文改訂・発表にフィードバックし、当日のQ&Aも十分に改善されていた。

以上の経緯を踏まえ、博士論文発表会後に行われた薬学研究科委員会の合否判定会議で本研究論文に関する討議が行われた。恒川龍二君提出の学位論文の内容は博士の学位を授与するに値するものであると評価され、学位を授与することが決定した。

論文目録

【主論文に関する原著論文】

- 1) R. Tsunekawa, K. Hanaya, S. Higashibayashi, T. Sugai
Synthesis of fisetin and 2',4',6'-trihydroxydihydrochalcone 4'-*O*- β -neohesperidoside based on site-selective deacetylation and deoxygenation, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2018**, *82*, 1316-1322.
- 2) R. Tsunekawa, K. Katayama, K. Hanaya, S. Higashibayashi, Y. Sugimoto, T. Sugai
Synthesis of 5-hydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone and related compounds and elucidation of their reversal effects on BCRP/ABCG2-mediated anticancer drug resistance, *ChemBioChem* **2019**, *20*, 210-220.