

静岡大学 博士論文

スペクトル幅が広く高い活性と選択性をもつ
新規な分子標的リン糖抗がん剤に関する研究

2011年 6月

大学院 自然科学系教育部

光・ナノ物質機能専攻

山田 学

目次

第 1 章 序論	8
1.1 白血病と治療法の動向	8
1.1.1 がんの種類とがん組織	8
1.1.2 白血病の種類と治療の歴史	11
1.1.3 白血病の分子標的薬剤	14
1.1.4 白血病の抗がん剤の考え方	19
1.2 多標的型分子標的薬剤の構想	21
1.2.1 細胞周期と細胞死	21
1.2.2 従来型抗がん剤の調査	23
1.2.3 分子標的療法薬剤の調査	25
1.2.4 リン糖の特徴と抗がん剤への期待	30
1.2.5 多標的型分子標的薬剤の構想	34
1.3 リン糖の研究動向	35
1.3.1 擬似糖合成の動向	35
1.3.2 ピラノース型リン糖の研究動向	37
1.3.3 フラノース型リン糖の研究動向	39
1.4 本研究の目的	43
引用文献	44
第 2 章 ピラノース型リン糖の合成	48
2.1 β -ニトロホスフィン誘導体のニトロ基の変換反応	48
2.2 ピラノース型リン糖の合成と考察	51
2.2.1 ピラノース型リン糖の合成	51
2.2.2 ピラノース型リン糖の異性体構造の考察	55
2.3 まとめ	56
引用文献	57
第 3 章 ペントフラノース型リン糖の探索	58
3.1 2-ホスホレンの 3, 4 位アルキル基効果	58
3.1.1 3, 4 位アルキル置換ホスホレン化合物の合成	58
3.1.2 3, 4 位アルキル置換 4-ブromoホスホレン化合物の合成	60
3.1.3 3, 4 位アルキル置換ホスホレンの生理活性評価	63

3.2	2-ホスホレンの4位ハロゲン基効果	65
3.2.1	4位ハロゲン置換-2-ホスホレン化合物の合成	65
3.2.2	4位ハロゲン置換ホスホレンの生理活性評価	68
3.3	ホスホランの2,3位ハロゲン基効果	69
3.3.1	2,3位ハロゲン付加ホスホラン化合物の合成	69
3.3.2	2,3位ハロゲン付加ホスホランの生理活性評価	72
3.4	ジブロモホスホランの構造異性体効果	73
3.4.1	ジブロモホスホランの構造異性体分離	73
3.4.2	触媒によるジブロモホスホランの選択的合成	75
3.4.3	臭化マンガン触媒による付加反応機構	77
3.4.4	ジブロモホスホラン構造異性体の生理活性評価	78
3.5	ホスホランの1位フェニルの官能基効果	80
3.5.1	1位部分置換フェニルホスホラン化合物の合成	80
3.5.2	1位部分置換フェニルホスホラン化合物の生理活性評価	83
3.6	ホスホラン化合物のブロモ基数の効果	84
3.6.1	トリブロモ-3メチルフェニルホスホランの合成	84
3.6.2	トリブロモ-3メチルフェニルホスホランの生理活性評価	85
3.7	まとめ	86
	引用文献	88

第4章 新規なリン糖抗がん剤の生理活性と作用機序 89

4.1	新規なリン糖抗がん剤の生理活性	89
4.1.1	生理活性評価法 (MTT法)	89
4.1.2	リン糖の高生理活性の検証	90
4.1.3	リン糖の広いスペクトル幅の検証	92
4.1.4	リン糖の高選択性の検証	93
4.1.5	新規なリン糖抗がん活性評価のまとめ	94
4.2	新規なリン糖抗がん剤の作用機序	95
4.2.1	フローサイトメトリーによる細胞周期解析	96
4.2.2	白血病の細胞周期を制御しているタンパク質の解明	100
4.2.3	新規リン糖抗がん剤の作用機序まとめ	102
4.3	新規なリン糖抗がん剤の固形癌への適用	103
4.3.1	胃癌細胞に対するリン糖の抗がん効果	103
4.3.2	皮膚癌細胞に対するリン糖の抗がん効果	103

4.3.3 新規なリン糖抗がん剤の固形癌適用のまとめ	105
4.4 まとめ	106
引用文献	107
第5章 結論	108
論文目録	112
謝辞	120

要旨

現在、日本の死因別死亡率で年々増加傾向にある病気が悪性新生物、すなわち ”がん” である。このがんの増加傾向は日本だけでなく、世界的な傾向である。「第3次対がん10か年総合戦略」では、「がんの罹患率・死亡率の激減」を謳っており、がん対策は我が国の重要な政策の一つである。がんの治療法としては外科的療法だけでなく、放射線療法、免疫療法、化学療法なども行われており、中でも化学療法が最も一般的である。特に、近年の化学療法（抗がん剤）では、分子標的療法薬剤が注目されている。従来の抗がん剤は、いわば毒をもってがん細胞の分裂・増殖の過程に直接作用するため副作用が大きい。分子標的療法薬剤は、がん細胞の持つ特異的な性質あるいはシグナル伝達系を分子レベルで捉え、それを標的として効率よく作用するように創製された薬剤である。代表的な分子標的療法薬剤の一つである“グリベック”は、慢性骨髄性白血病の特効薬として劇的な成果をあげた薬剤である。

しかし、グリベックが全ての白血病の患者に有効に効く訳ではなく、効果にはがん細胞の種類依存性がある。また、後期がんや変異がん細胞に対する効果が低い問題がある。副作用に対する緩和ケアの問題もある。それ故、グリベック後継薬剤あるいは新規な抗がん剤の開発が必要である。がん細胞の生死判別法であるMTT法でグリベックを評価すると、ヒト慢性白血病細胞K562には優れた活性を示したが、急性白血病細胞U937には抗がん活性が低かった。白血病を完治させるためには、急性白血病細胞にも活性があるスペクトルの広い新規な抗がん剤が必要である。新規な抗がん剤を具現化するために、以前から研究を行ってきた炭素-リン（C-P）結合を持つ化合物で、グリベックと複素環の構造が異なる複素環化合物あるいは擬似糖類に注目した。本研究では、従来の抗がん剤とは構造が異なり、生体内で生命維持・遺伝子に重要な役割を果たしているリンを含む擬似糖誘導体であるリン糖誘導体の合成とがんの相互作用及び抗がん剤として開発する為の応用研究を行った。

糖のヘミアセタール環内の酸素原子を窒素や硫黄で置き換えた擬似糖の多くは天然にその存在が確認され、生理活性を示す化合物が多数報告されている。当該の酸素原子をリン原子で置き換えたリン糖においては研究例が少ないが、炭素-リン結合を有するホスホン酸等の鎖状リン誘導体の生理活性は広く知られている。医薬では抗菌活性のホスホマイ

シンや抗がん活性を示すシクロホスファミドなどもあり、リン糖誘導体にも生理活性が期待できる。また、このシクロホスファミドと Rp-8-Br-cAMPS が六員環構造、Ribarivin と AZT が五員環構造を有し、Bialaphos, Fosfomycin 等の直鎖状リン化合物が P-C、P=O 結合を有している。そこで、新規リン糖誘導体の構造を六員環のヘミアセタール環状内にリン原子を含有するピラノース型リン糖と五員環の含リン複素環化合物であるフラノース型リン糖として、この化合物の新規合成と抗がん活性評価の検証を行った。

ピラノース型リン糖については、グルコース等の糖類を出発物質として、C=Nへのリン化合物の付加を用いた合成ルートを考えて。このルートの最大の課題であるニトロ基のアルデヒド基への変換はオゾンを用いた方法で初めて成功させ、新規ピラノース型リン糖を合成した。しかし、糖を用いた合成法は、合成ルートが10ステップと多くて全収率が2%以下であった。そこで、糖を出発物質としない新たな化学合成ルートで、フラノース型リン糖を合成することとした。

フラノース型リン糖については、5員環の含リン複素環化合物である2-ホスホレン類を出発物質として、様々な官能基の導入反応や官能基変換反応を用いて種々のリン糖誘導体の合成を行い、白血病細胞に対する抗がん活性を評価した。

- 1) 5員環の3位にアルキル基、4位にハロゲン基を導入したホスホレン化合物において、3位はメチル基、4位はブロモ基の活性効果が高かった。
- 2) 2位、3位にハロゲンを付加したホスホラン化合物においては、ジブロモ基の活性効果が最も高かった。また、ジブロモ付加反応で $MnBr_2$ 触媒を用いることにより、収率を78%から96%まで向上させ、かつ最も活性が高いジアステレオマーを3倍の選択性で合成することができた。
- 3) 1位のフェニルの官能基効果を検討した結果、*m*-ブロモフェニルのホスホランの活性が少し高いことがわかった。また、ブロモ基の数が多いほど活性が高くなることもわかった。

今回合成したペントフラノース型リン糖誘導体；2,3-ジブロモ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド(DBMPP)と2,3,4-トリブロモ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド(TBMPP)のU937抗がん活性を評価した結果、市販薬剤グリベックの250倍の活性を示した。また、ヒ

ト慢性白血病細胞 K562 に対しても強い活性を示した。

フローサイトメーターによる解析を行ったところ、細胞のプログラム死であるアポトーシスによる作用機序を確認した。健常血液と白血病血液を混合して毒性評価を行った結果、新規リン糖が健常細胞には害を与えず、がん細胞にのみに作用しているということが確認できた。固形がんである胃がん細胞にも、選択的な活性効果があった。

数種の白血病細胞等に対するMTT法によるリン糖の *in vitro* 評価の結果によれば、新規なリン糖抗がん剤は、1) がん細胞に対する強い活性、2) がん細胞に対する高い特異性と選択性、3) がん細胞に対する広いスペクトル、を示すことが検証できた。

今後の課題としては、立体選択的・特異的リン糖合成、当該のリン糖抗がん剤の *in vivo* 評価等があるが、本研究目的のスペクトル幅が広く、高い活性と選択性をもつ新規な多標的型分子標的抗がん剤としての開発が大いに期待できる。

Title of Thesis :

Research on novel molecular targeting anti-cancer agents, phospho sugar, having wide spectra, high activities, and high selectivities.

Outline :

More recently, a malignant neoplasm, cancer, is the first of the cause of death in Japan. Gleevec[®] of anti-cancer agents has the low biological activity against human leukemia cell lines of U937. We have been searching more biologically activated anti-cancer agents.

Phospho sugars have a phosphorus atom instead of the oxygen atom in the hemiacetal ring of the normal sugars. Many of them are expected to exert important biological activities, therefore, a lot of studies on them have actively been performed. Since then researches on synthesis and evaluation of phospho sugars are rapidly progressing to develop new type of molecular targeting chemotherapeutic anti-tumour agents.

We have been searching biologically active phospho sugars and we have first found new anti-tumor phospho sugar derivatives by using MTT *in vitro* evaluation methods for some of these phospho sugars against leukemia cells.

The novel phospho sugar analogues, 4-bromo-3- and/or 4-(methyl substituted or unsubstituted)-1-phenyl-2-phospholene 1-oxides, exerted anti-proliferative effect against U937 leukemia cells evaluated by MTT *in vitro* methods. Especially 4-bromo-3,4-dimethyl-1-phenyl-2-phospholene 1-oxide, whose 3- and 4-positions were substituted with the methyl groups, possesses quite higher anti-cancer activity than Gleevec[®].

We have reported that the new synthetic method of 2,3-dibromo-3-methyl-1-phenyl phospholane 1-oxide gave diastereomeric products in the yield of was prepared to 96 % and the ratio of the four diastereomer was changed by the catalyst used, and among the catalysts used especially manganese dibromide catalyst gave the most active product mixture. MTT *in vitro* bio-assay method revealed that the prepared dibromo phospholane (mixture of diastereomers) have quite efficient anti-cancer activities against leukemia cells in manners of (i) wide spectra, (ii) high activities, and (iii) high specificities and selectivities.

第1章 序論

1.1 白血病と治療法の動向

1.1.1 がんの種類とがん組織

近年の日本の病気別の死亡率の推移¹⁾によれば、図 1.1 に示す様に、死亡原因のほとんどが減少傾向にあるのに対し、年々増加傾向にある病気が悪性新生物（悪性新腫瘍）、すなわち ”がん” である。このがんの増加傾向は日本だけでなく、世界的な傾向である。

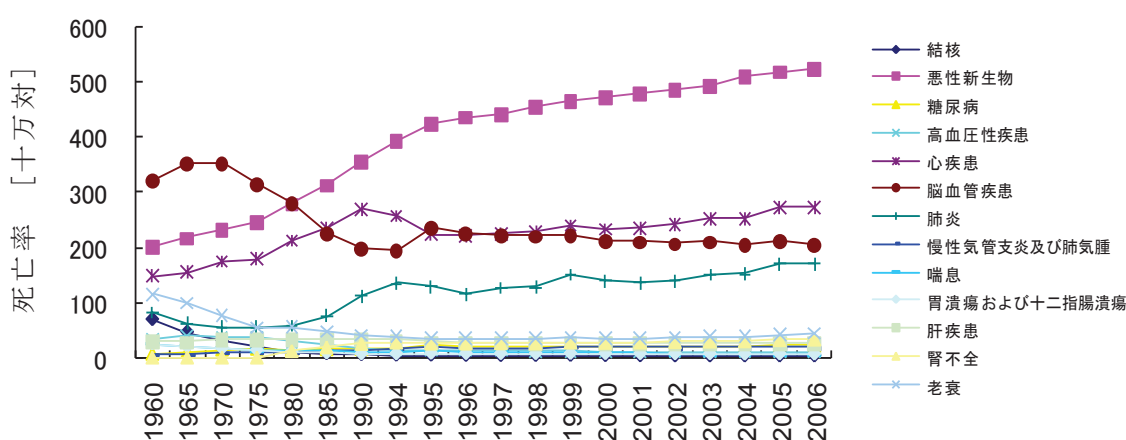


図 1.1 病気別の死亡率の推移¹⁾ (厚生労働省統計 2006 年)

文部科学省/厚生労働省の「第3次対がん10か年総合戦略：H16-H25」では、

- ① 進展が目覚ましい生命科学の分野との連携を一層強力に進め、がんのより深い本態解明に迫る。
- ② 基礎研究の成果を幅広く予防、診断、治療に応用する。
- ③ 革新的ながんの予防，診断，治療法を開発する。
- ④ がん予防の推進により、国民の生涯がん罹患率を低減させる。
- ⑤ 全国どこでも質の高いがん医療を受けることができるよう均てん化を図る。

などの「がんの罹患率・死亡率の激減」を謳っており、日本の死亡原因第一位であるがんについて、研究と予防および医療を総合的に推進することにより、がんの罹患率と死亡率の激減(30%程度)を目指している。

厚生労働省の統計によるがん死亡の部位を図 1.2 に示す。2005 年にが

んで死亡した人は、32万5941人であり、がん死亡者数が多い部位は、1位：肺（19%）、2位：胃・食道（19%）、3位：肝臓・胆のう（16%）、4位：腸（13%）、5位：乳房・子宮・前立腺（9%）である。さらに、2007年には、男性のがん死亡原因の1位は肺がんと変わらないが、女性の死亡原因の1位は乳癌になっている。

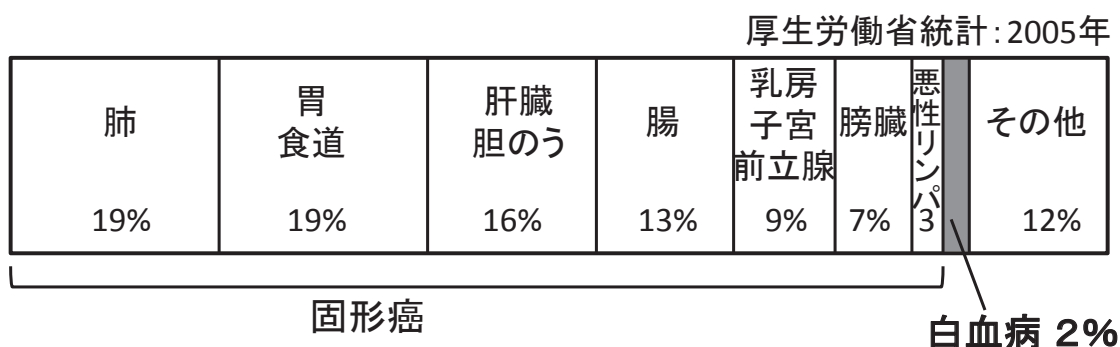
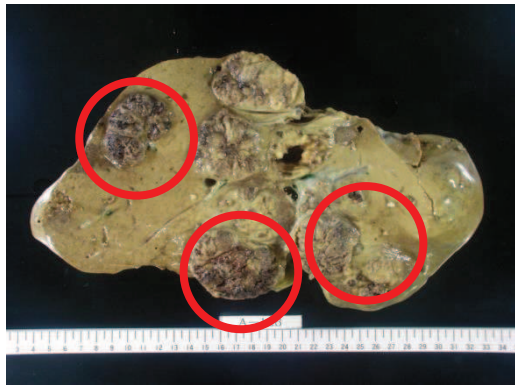


図 1.2 がん死亡の部位¹⁾（厚生労働省統計 2005 年）

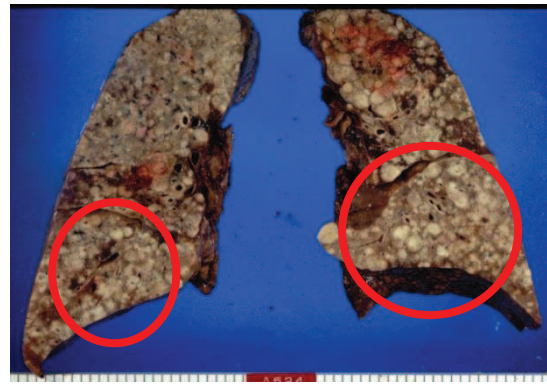
また、肺・胃・食道・結腸・直腸・肝臓・胆のう・胆管・膀胱・乳房・子宮・卵巣・前立腺・悪性リンパのがんは固形癌であり、血液がんは白血病だけである。この固形癌組織の例（A:肝臓がん,B:肺がん,C:大腸がん）と血液がん組織（白血病細胞）の例を図 1.3 と図 1.4 に示す。丸で囲んだ部分が癌組織であり、固形癌は組織が固く、血液がんは組織が少し変形している。

白血病はがん死亡全体から見ると2%と低いですが、青年層の死因としては事故死に次いで第二位（死者 7400 名）を占めている。また、固形癌は高齢者が罹患して青年層では少ないのに対して、白血病は乳児から高齢者まで広く発症する為、青年層では多いがんである。白血病は古から行われている外科療法が使えないため「不治の病」と言われてきたが、化学療法や骨髄移植法などにより死亡率は40%と激減した。しかし、まだ死亡率がとても高い病である。図 1.4 を見て分かる様に、白血病のがん細胞は一つの細胞であるため、抗がん剤の効果や作用機序を研究するのによく用いられるがん細胞である。

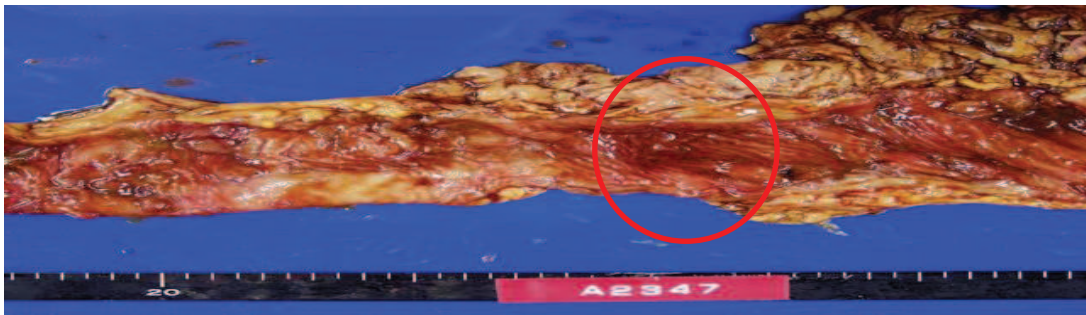
これらの理由から、この白血病を治す抗がん剤を研究する事にした。



A: 肝臓癌



B: 肺癌



C: 大腸癌

図 1.3 固形癌組織例 [A: 肝臓癌, B: 肺癌, C: 大腸癌]
(浜松医科大学: 病理部三浦先生提供)



急性リンパ性白血病細胞



急性骨髄性白血病細胞

図 1.4 白血病細胞の例 (浜松医科大学: 血液内科中村先生提供)

1.1.2 白血病の種類と治療の歴史

白血病 (leukemia) は、正常でない造血細胞が骨髄で異常に増殖し、正常な造血を阻害する病気である。そして、増殖した白血病細胞が血液の中にも出てくる疾患である。白血病には、急性白血病・慢性白血病・骨髄性白血病やリンパ性白血病など数多くの種類がある。⁴⁾

白血病および類縁疾患分類は、下記の様になっている。²⁾

1. 急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia, AML)
2. 急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia, ALL)
3. 慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia, CML)
4. 慢性リンパ性白血病群
 - 1) 慢性リンパ性白血病 (chronic lymphocytic leukemia, CLL)
 - 2) 前リンパ球性白血病 (prolymphocytic leukemia, PLL)
 - 3) 毛様細胞白血病 (hairly cell leukemia, HCL)
 - 4) 大顆粒リンパ球性白血病 (large granular lymphocytic leukemia, LGLL)
5. 骨髄増殖性疾患群 (myeloproliferative disorders, MPD)
 - 1) 真性赤血球増多症 (polycythemia vera, PV)
 - 2) 本態性血小板血症 (essential thrombocythemia, ET)
 - 3) 慢性好中球性白血病 (chronic neutrophilic leukemia, CNL)
 - 4) 骨髄線維症 (myelofibrosis, MF)
6. 成人T細胞白血病・リンパ腫 (adult T-cell leukemia/lymphoma, ATLL)
7. 骨髄異形成症候群 (myelodaysplatic syndromes, MDS)
8. 骨髄異形成/骨髄増殖性疾患群 (myelodaysplstic/myeloproliferative disorders)
 - 1) 慢性骨髄単球性白血病 (chronic myelomonocytic leukemia)

白血病は骨髄の造血幹細胞から分化して増殖する各細胞の遺伝子の突然変異で起きる疾患である。この白血病は大きく急性白血病と慢性白血病に大別される。クローン増殖する急性白血病は分化する機能を失った幼若細胞が増殖して起こる。慢性白血病は分化と成熟を伴って増殖し、さらなる分化によって骨髄性白血病とリンパ性白血病に分かれる。^{2,3)}

1～8の白血病をヒト血液細胞樹形図の上を示すと図1.5の様になる。白血病患者の内訳は、急性白血病患者が慢性白血病患者の4倍である。その理由は、急性白血病細胞は慢性白血病細胞の上流にあり、増殖が大きいからである。

つまり、上流の急性白血病のがん細胞によく効く抗がん剤を開発できれば、1～8の白血病にも効果があり、スペクトル幅が広い抗がん剤になるはずである。

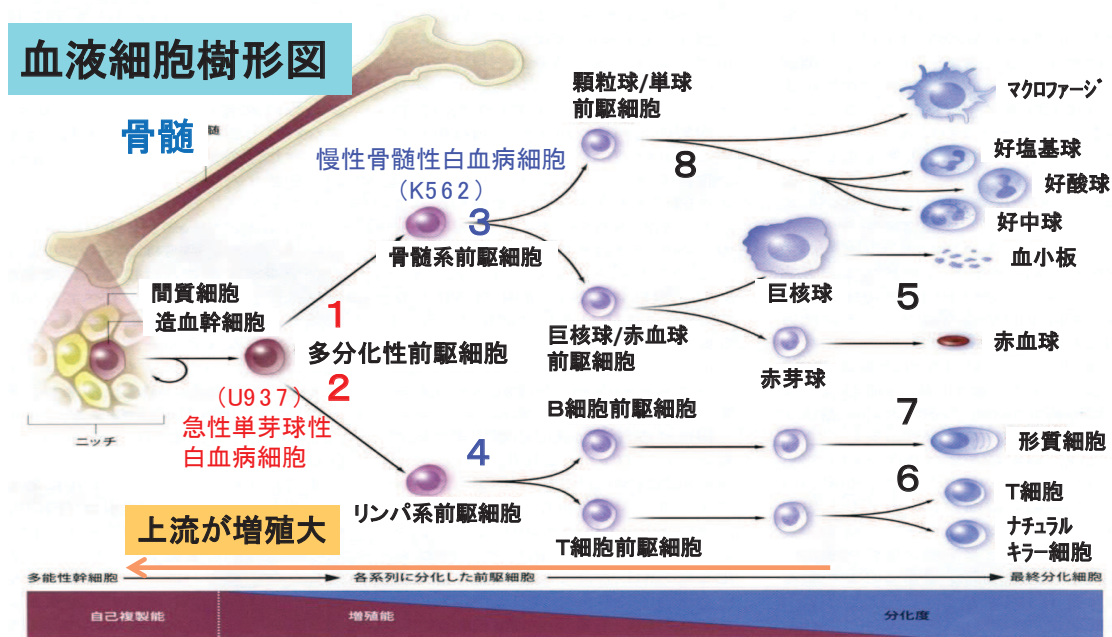


図 1.5 ヒト血液細胞樹形図と白血病細胞^{2,3)}

次に、白血病治療の歴史について、以下に記述する。⁴⁾

1845年、白色がかった血液で死亡した血液患者をドイツの病理学者であるウィルヒョウ (Virchow) が調査し、その症例を報告したのが白血病の最初である。その後、発病の経過が比較的ゆっくりな慢性白血病と発病の経過が早い急性白血病とに分類された。さらに、骨髄性白血病とリンパ性白血病とに分類される様になった。

白血病が初めて報告されてから100年近く、白血病には有効な治療法は無かった。急性白血病では発病から数週～数ヶ月で亡くなり、慢性白血病では数ヶ月～数年で亡くなる病気であった。

しかし、1960年代には、Ara-c 抗がん剤によって白血病が治った症例が出始めた。さらに、1970年代には、血小板などの輸血療法により、急性白血病の70%から80%の患者が、一旦ではあるが治る様になった。しかし、再発症も数多く、複数の抗がん剤を併用した薬剤療法では、30%程度の治癒率に留まった。

また、1990年代には、造血幹細胞の移植による治療が本格的に行われる様になった。この治療法は、放射線と大量の抗がん剤によって白血病幹細胞を一気に死滅させ、その後に正常な造血幹細胞を移植するものである。しかし、放射線と大量の抗がん剤によって正常な造血細胞も一緒に死滅させるため、患者の造血能力は完全に無くなり、そのままでは死亡してしまう。そのため、HLA型の一致した人の正常な造血幹細胞を移植する必要があるが、一致したHLA型の人を見つけるのはとても大変である。この放射線と抗がん剤を用いる治療法はかなり強力であるため、体力がない患者には行う事ができない。この治療法の抗がん剤としては、アルキル化剤に分類されるリン化合物のシクロホスファミド [N, N-Bis(2-chloroethyl) tetrahydro-2H-1, 3, 2-oxazaphosphorin-2-amine 2-oxide monohydrate] である。このシクロホスファミドは歴史上初めての抗がん剤であり、ナイトロジェンマスタード誘導体として開発された。この抗がん剤はDNAを傷害する機能があるため、がん細胞を死滅させることができる。しかし、正常な細胞も傷つけるため、白血球や血小板などを減少させる副作用がある。⁵⁾

そして、2001年には、シクロホスファミドなどの従来の抗がん剤よりも副作用が少ない抗がん剤として、分子標的薬剤であるメシル酸イマチニブ (グリベック) が実用化され、慢性骨髄性白血病 (CML) の治癒に大きな効果をもたらした。⁷⁾

1.1.3 白血病の分子標的薬剤

図 1.6 に示す様に、従来の抗がん剤よりも副作用が少ない分子標的薬剤は、がんの化学療法を画期的に進歩させた。^{4, 5, 6)}

従来の抗がん剤はがん細胞の分裂や増殖に直接作用する毒性の抗がん剤であり、がん細胞を死滅させるだけでなく、正常な細胞まで障害を与えてしまう。特に副作用として、骨髄抑制・心毒性・腎毒性・脱毛・口内炎・悪心・嘔吐などが生じる。⁵⁾

アルキル化剤・代謝拮抗剤・植物アルカロイド・抗癌抗生物質・プラチナ製剤などの従来の抗がん剤に対して、分子標的薬剤はがん細胞を直接攻撃する様に作られた抗がん剤である。がん細胞の増殖や転移に関わる分子を標的として作用するため、副作用が少なく、効率的にがん細胞の増殖や転移を抑えることができると期待されている。また、がん細胞にだけ攻撃できるので、正常な細胞へのダメージも抑えられる抗がん剤である。⁶⁾

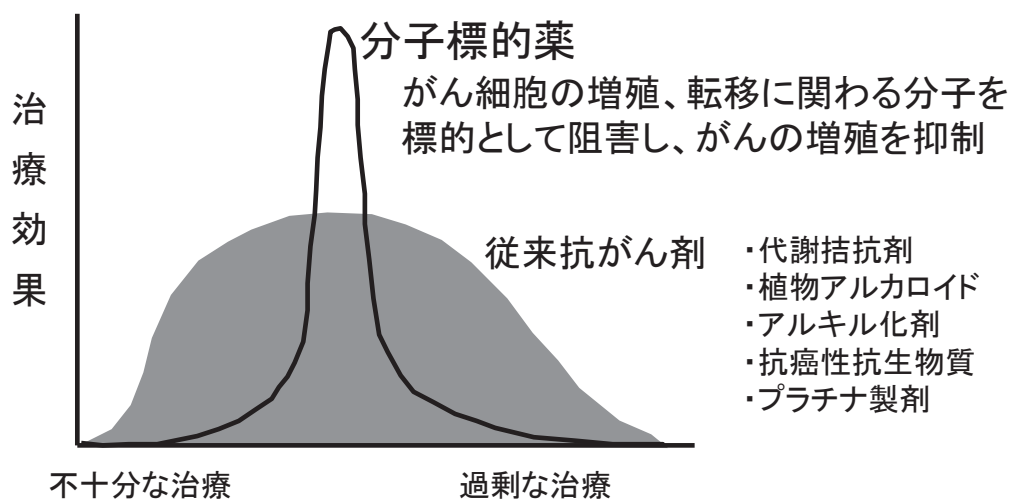


図 1.6 従来の抗がん剤と分子標的療法薬剤^{4, 5, 6)}

その代表的な分子標的薬剤である“メシル酸イマチニブ”は、慢性骨髄性白血病の抗がん剤として有名である。このメシル酸イマチニブ抗がん剤を投与するだけで、慢性骨髄性白血病の患者が寛解（白血病細胞が検出されないが完治ではない）できる様になった。⁴⁾

ノバルティス ファーマ株式会社の市販薬剤は、グリベック⁷⁾と呼ばれ、その分子構造を図 1.7 に示す。(2001 年認証)

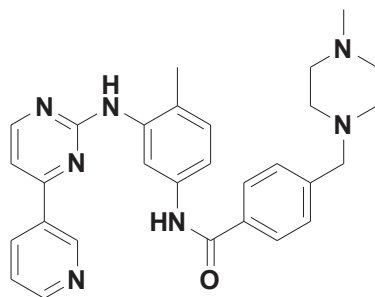


図 1.7 市販薬剤グリベック（イマチニブ）分子構造⁷⁾

慢性骨髄性白血病が発症する機構とグリベックが抗がん効果を発現する機構を図 1.8 に示す。

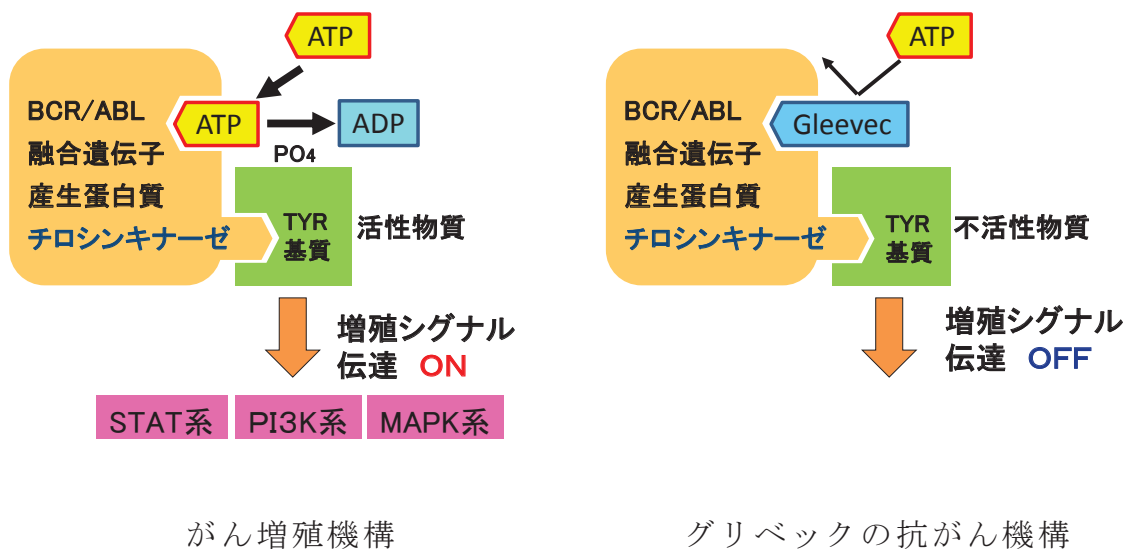


図 1.8 グリベックの抗がん機構⁸⁾

慢性骨髄性白血病でのがん増殖機構とグリベックの抗がん機構は、以下の様に考えられている。^{4,8)}

血液細胞の中にあるアデノシン三リン酸 (ATP) が異常になった BCR/ABL 遺伝子の産生蛋白質の分子 (ポケット) に結合すると、フィラデルフィア染色体 (Ph) を作る増殖シグナルが STAT 系・PI3K 系・MAPK 系へ伝達し、白血病細胞が増殖する。このがん細胞の増殖を抑制するためには、この ATP が結合するのを阻害すれば良い。グリベックが異常になった BCR/ABL 遺伝子産生蛋白質のポケットを塞ぎ、ATP の結合を妨害する。これにより、増殖シグナルが伝達されなくなって、白血病細胞は死んでいく。つまり、グリベックが BCR/ABL 遺伝子産生蛋白質のポケットに結合する分子構造であることが重要になる。

しかし、グリベックが全ての白血病の治癒に効果がある訳ではなく、がん細胞の種類に依存性がある。慢性骨髄性白血病にはすごく効果があるが、急性骨髄性白血病には効果が少ない。また、グリベックで一旦良くなっても再発する患者もいる。さらに、後期がん患者や変異がん細胞の患者に対する治癒効果が低い問題もある。

そこで、慢性骨髄性白血病細胞 K562 と急性単芽球性白血病細胞 U937 の二種類を用いて、がん細胞の生死判別法のひとつである MTT 法で市販薬剤グリベックの抗がん効果 (生理活性評価) の確認を行った。MTT 法については第 4 章で詳細を記述するが、吸光度によってサンプル中のがん細胞の生存数を知ることができる。即ち、吸光度の減少が低濃度で現れるほどより高い活性を持つという事を意味する。(図 1.9、図 1.10)

また、生理活性効果を分かり易くするために、50%阻害濃度 IC_{50} (Inhibitory Concentration 50%) を算出した。 IC_{50} は、がん細胞生存率が 50% になる吸光度における薬剤 (抗がん剤) 濃度であり、小さいほど生理活性が高いことを意味する。

市販薬剤グリベックは、慢性骨髄性白血病細胞 K562 では $IC_{50} = 3 \mu M$ の優れた生理活性を示したが、急性単芽球性白血病細胞 U937 では $IC_{50} = 500 \mu M$ と抗がん活性がかなり低かった。

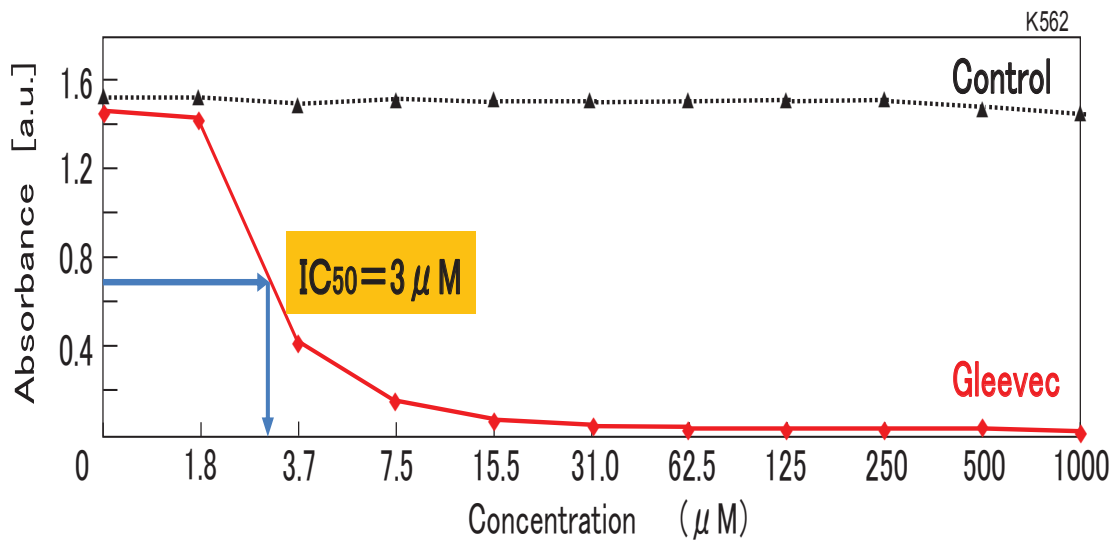


図 1.9 グリベックのK562に対する生理活性評価結果
(37°C、48 h)

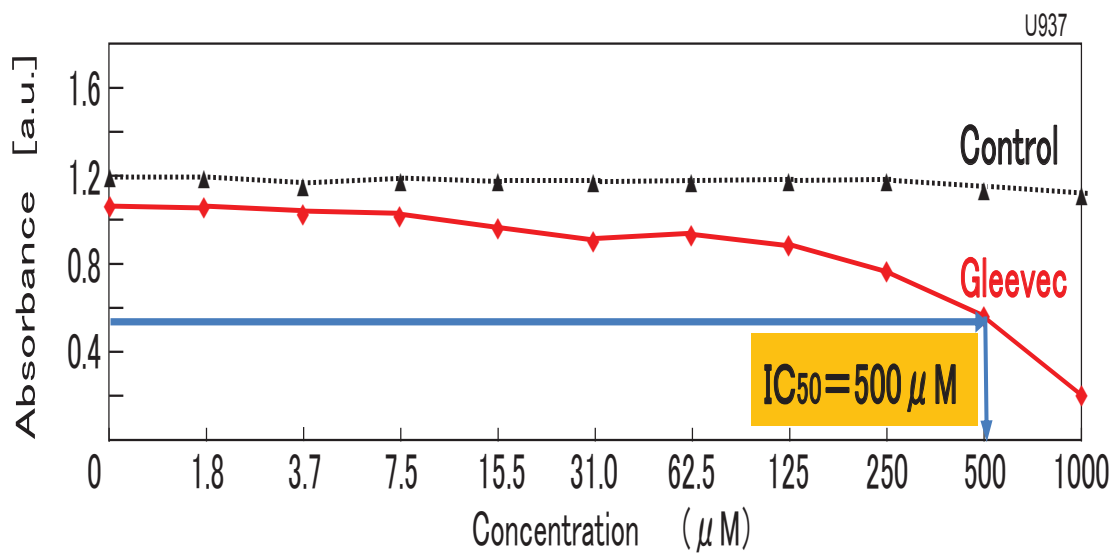


図 1.10 グリベックのU937に対する生理活性評価結果
(37°C、48 h)

市販薬剤グリベックが、慢性白血病細胞K562に抗がん効果が高いが、急性白血病細胞U937には抗がん効果が低いのは、図1.11に示す様に、BCR/ABL 遺伝子の型が異なっているためと考えられる。また、発病後さらにBCR/ABL 遺伝子が突然変異を重ねると、変異型のBCR/ABL 遺伝子による産生蛋白質が作られる様になる。そのためグリベックは効かなくなってしまうと考えられる。

BCR/ABL 遺伝子のポケットに合わせるだけでなく、遺伝子にも直接作用する新規な抗がん剤が必要である。

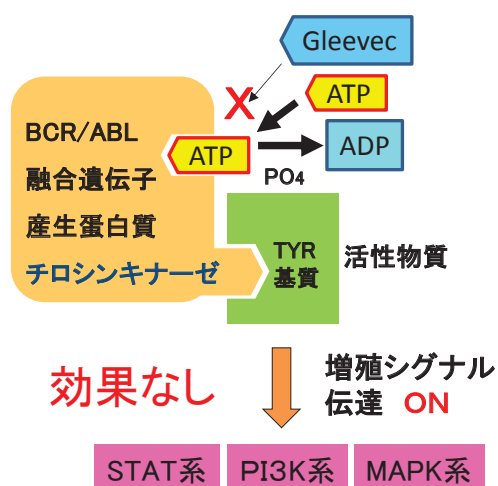


図 1.11 急性白血病細胞に対するグリベックの抗がん機構⁸⁾

1.1.4 白血病の抗がん剤の考え方

現状の単一型分子標的薬剤グリベックは一つの白血病細胞を治すことはできるが、白血病細胞の変異や他の白血病細胞には効果がないため完治はできない。そのため種類の違う単一型分子標的薬剤を多段階で投与するが、白血病細胞の変異も起こりやすくなり完治しにくい。

そこで、「複数の白血病細胞を一つの多標的型分子標的薬剤で攻撃ができれば、1薬剤の投与で白血病細胞を完治できるはずである」と考えた。(図 1.12)

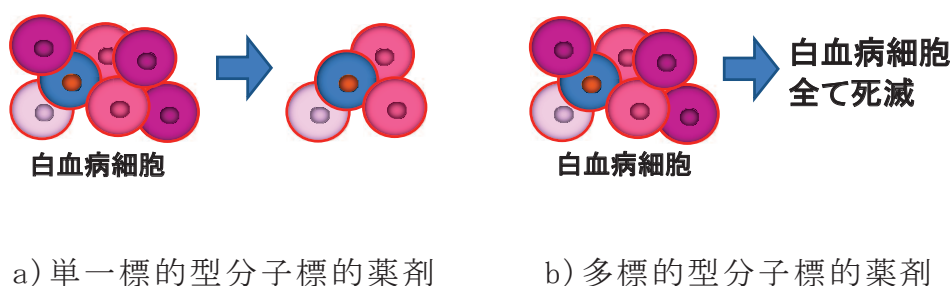


図 1.12 多標的型分子標的薬剤の概念図

また、最近の白血病研究では、図 1.13 に示す様に、急性骨髄性白血病は、自己複製可能な造血幹細胞が変化した白血病前駆細胞が分化し、白血病細胞を増殖させると考えられている。つまり、白血病の増殖は、自己複製の能力がある白血病幹細胞を基にすると考えられている。⁹⁾

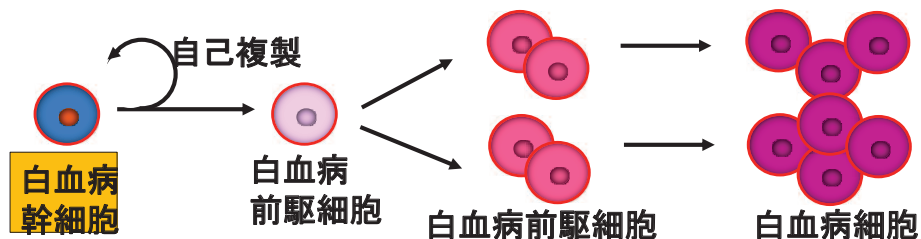


図 1.13 白血病幹細胞による急性白血病細胞⁹⁾

造血幹細胞は各種血液細胞の基であり、極めて数が少ない。この造血幹細胞は造血の時にだけ作動する。まず、二つに分裂し、その一つは自己複製機能を持つ造血幹細胞であり再び休眠する。もう一つの造血幹細胞は分化して前駆細胞となり、分化と分裂を繰り返しながら多くの血液細胞を生成する。分化した前駆細胞は自己複製機能を失くして行く。

急性骨髄性白血病でも同様に、白血病幹細胞が分化と分裂を繰り返して末端の白血病細胞を生成すると考えられている。つまり、正常な造血幹細胞の遺伝子に異常が起こることによって白血病幹細胞ができ、自律的に増殖する。⁹⁾

白血病を完治させるためには、白血病細胞の上流にある白血病幹細胞の遺伝子を攻撃できる多標的型分子標的薬剤が必要であると考えた。

1.2 多標的型分子標的薬剤の構想

1.2.1 細胞分裂周期と細胞死

多標的型分子標的薬剤を構想する前に、細胞分裂周期と細胞死について、以下に述べる。¹⁰⁾

細胞は、図 1.14 に示す細胞分裂周期によって、コントロールされている。細胞分裂周期は、M期、G₁期、S期、G₂期の4つに分けられる。M期では有糸分裂を行っている。S期はDNAの複製のための染色体分裂を行う。そして、DNA修復と細胞分裂が正常に行われるかを確認して、細胞周期を停止させる制御機構がG₁期とG₂期である。G₁チェックポイントはM期とS期の間にあり、G₂/MチェックポイントはS期とM期の間に存在する。

G₁チェックポイントでは、DNA修復の完了と栄養/増殖因子の存在を確認する。DNA合成に必須な酵素がG₁期で活性化され、活発に分裂する細胞はS期に入っていく。分裂を続けない細胞はS期に入らず、G₀期と呼ばれる周期外に出る。G₂/Mチェックポイントでは、染色体DNAの分配やDNA複製の完了やDNA損傷の修復を確認する。そして、分裂準備の最終段階が開始し、タンパク質の合成が増える。分裂中期チェックポイントでは、紡錘体形成の完了を確認し、有糸分裂により娘細胞が放出される。

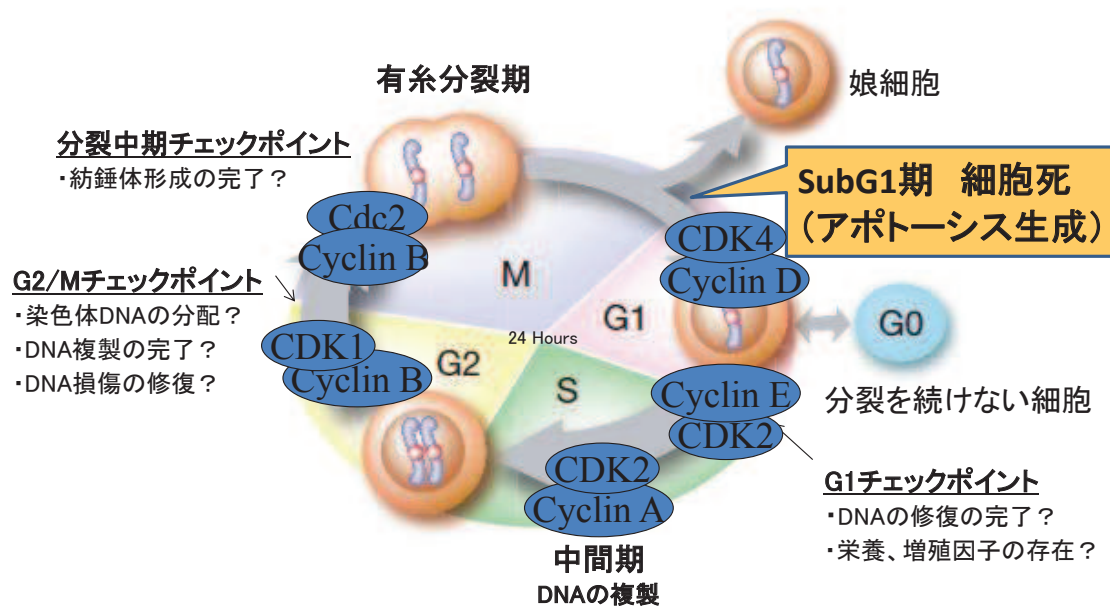


図 1.14 細胞分裂周期¹⁰⁾

G1、G2/M、分裂中期などのチェックポイントでは、タンパク質リン酸化酵素(CDK)とサイクリン(Cyclin)の2種類のタンパク質からなる複合体が重要な役割を果たしている。人間の細胞のほとんどは、損傷した組織の細胞の再生以外では細胞分裂をしていない。がん細胞はこれらのチェックポイントに異常をきたして、がん細胞を異常増殖させ、アポトーシス(細胞自殺)を誘導しなくなる。¹⁰⁾

また、細胞は増殖と死滅を行いながら全体のバランスを保っている。細胞の増殖には増殖因子(EGF)が働き、その受容体(EGFR)との結合で自己リン酸化して、増殖シグナルをRas蛋白質に伝える。次に、Ras蛋白質はGTPと結合してRaf蛋白質をリン酸化し、さらにシグナルを進める。このような機構により、増殖シグナルは次々と伝達される。最終的には、核内の転写を活性化させ、DNAポリメラーゼや染色体凝縮因子などの増殖蛋白質を生産する。¹¹⁾

がん細胞では、この受容体に変異が起こり、増殖因子の存在がなくても常に活性状態になり、増殖シグナルを次々と伝達させる。このため、がん細胞は制御の効かない異常増殖を続ける。この様に、がん細胞が変異を起こし、制御の効かない蛋白質を作る遺伝子のがん遺伝子と呼ぶ。代表例として、EGFRが変異したerbBがん遺伝子がある。がん細胞の増殖には、細胞内増殖因子と細胞内分裂転写遺伝子を繋ぐ、細胞内シグナル伝達遺伝子が作用している。¹¹⁾

つまり、多標的型分子標的薬剤が、白血病の細胞周期に関与している増殖シグナル遺伝子に作用して、白血病細胞を死滅させる事ができれば、結果としてアポトーシス(細胞自殺)を誘導できると考えた。

1.2.2 従来型抗がん剤の調査

従来型抗がん剤は毒性が強いが、がん細胞を死滅させる効果には優れている。このことから従来型抗がん剤について再調査し、多標的型分子標的薬剤の構想を立てることにする。

従来型の抗がん剤は、大きく細胞周期依存性抗がん剤と細胞周期非依存性抗がん剤の2つに分類される。

A) 細胞周期依存性抗がん剤

がん細胞の細胞周期に入って細胞死させるため、増殖の速い悪性腫瘍に対する効果が強い。抗がん剤としては、代謝拮抗薬・植物アルカロイドなどがある。

B) 細胞周期非依存性抗がん剤

がん細胞のDNAを直接攻撃して細胞死させるため、細胞周期に入って無くても効く。抗がん剤としては、アルキル化剤、抗癌性抗生物質、プラチナ製剤などがある。DNAに直接作用するため副作用も強い。これらの抗がん剤の特徴と分子構造を表1.1と図1.15に示す。¹²⁾

代謝拮抗薬

代表的な薬剤としてシタビラン(Ara-C)があり、急性白血病に効く。細胞周期のS期に作用するが、DNA合成阻害にも作用しているため骨髄抑制などの副作用が強い。

植物アルカロイド

代表的な薬剤としてイリノテカンがあり、肺癌・食道癌などに効く。細胞周期のM・G2期に作用するが、DNA合成阻害にも作用しているため骨髄抑制・神経毒性の副作用が強い。

アルキル化剤

代表的な薬剤としてシクロホスファミドがあり、急性白血病・悪性リンパ腫に効く。DNA傷害に作用しているため骨髄抑制・胃腸出血などの副作用が強い。

抗癌性抗生物質

代表的な薬剤としてマイトマイシンCがあり、慢性リンパ性白血病・胃癌などに効く。DNA合成阻害に作用しているため骨髄抑制・尿毒症・腎障害などの副作用が強い。

プラチナ製剤

代表的な薬剤としてシスプラチンがあり、前立腺癌・卵巣癌などに効く。DNA傷害に作用するため骨髄抑制・腎毒性などの副作用が強い。

これらのことより、がん細胞増殖が大きい急性白血病に効果を出すためには、がんの細胞周期に入って死滅させる細胞周期依存性抗がん剤であることが重要である。また、副作用を抑えるためには、DNA合成阻害やDNA傷害に直接作用しない分子標的抗がん剤である必要がある。そこで、現状の分子標的薬剤について調査する。

表 1.1 従来抗がん剤と特徴¹²⁾

分類	代表的 抗がん剤	細胞周期 依存性	細胞周期非依存性	
			DNA 合成阻害	DNA 傷害
代謝拮抗剤	シタラビン	○S 期	○	—
植物アルカロイド ^{*)}	イリノテカン	○M, G2 期	○	—
アルキル化剤	シクロホスファミド ^{*)}	—	—	○
抗癌性抗生物質	マイトマイシン C	—	○	—
プラチナ製剤	シスプラチン	—	—	○

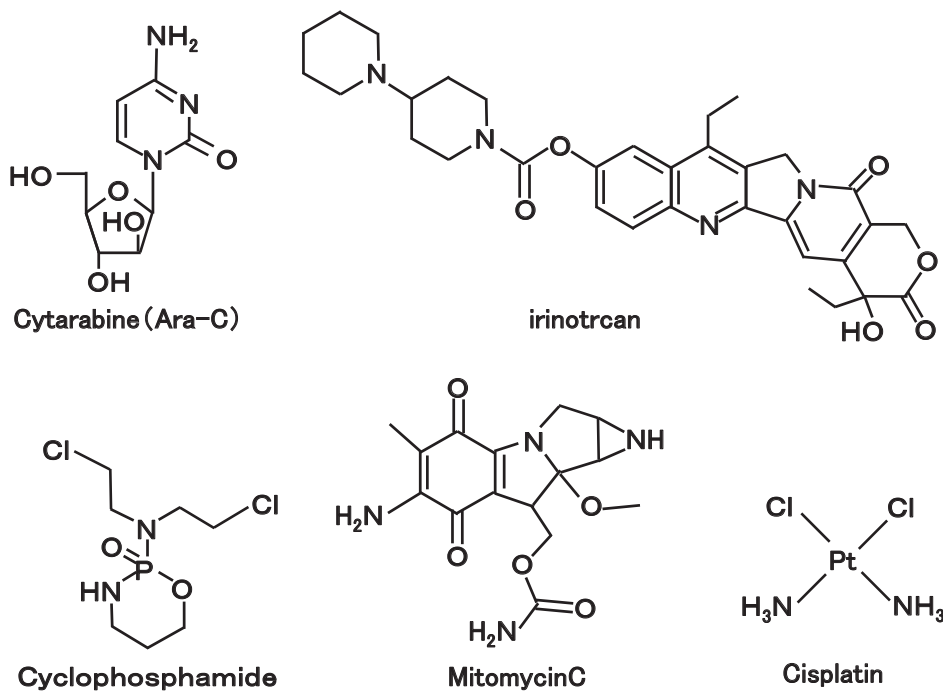


図 1.15 従来抗がん剤の分子構造¹²⁾

1.2.3 分子標的療法薬剤の調査

分子標的治療はがん治療を指して用いられる事が多く、1980年代初めのモノクローナル抗体から始まった。そして、1990年代終わりの小分子化合物の臨床試験から一般的に使われる様になった。

従来の抗がん剤であるアルキル化剤・代謝拮抗剤・植物アルカロイド・抗癌抗生物質・プラチナ製剤が細胞を傷害するのに対し、分子標的治療薬はがん細胞を直接攻撃する抗がん剤である。この分子標的薬剤はがん細胞の増殖や転移に関わる分子を標的として阻害する。そのため、臨床試験以前は腫瘍を縮小させず、腫瘍の増大を抑えるだけと考えられていた。がん細胞に対して特異的に効果を示すため、至適投与量は最小有効量であり、そのため毒性のプロファイルが異なることが期待される。

実際に、分子標的治療が広く実施される様になると、分子標的治療薬は腫瘍の縮小効果を示した。ゲフィチニブ分子標的治療薬では、初め想定していなかった分子（変異 EGFR）が標的となって、良好な臨床効果を示した。しかし、毒性に関しては、想定外の間質性肺炎で毒性が出る事があり、一概に毒性が少ないとは言えない。¹³⁾

この様な分子標的療法薬剤はモノクローナル抗体と小分子化合物に分けられ、その代表例を以下に示す。

<モノクローナル抗体>

①ハーセプチン（トラスツズマブ） $C_{6444}H_{9980}N_{1720}O_{2018}S_{44}$ 分子量：148,000

HER-2の細胞外ドメインに結合するヒト化モノクローナル抗体で、分子標的薬で承認された第一号である。¹⁴⁾

ハーセプチンは細胞表面のHER-2受容体に特異的に結合した後、ナチュラルキラー細胞（NK細胞）、単球を作用細胞とした抗体依存性細胞障害作用（ADCC:antibody dependent cell mediated cytotoxicity）により抗腫瘍効果を発揮する。また、ハーセプチンが細胞表面のHER2受容体に結合してHER-2受容体数を低下させることにより、細胞増殖シグナルが低減して直接的に細胞増殖を抑制する。（図 1.16）

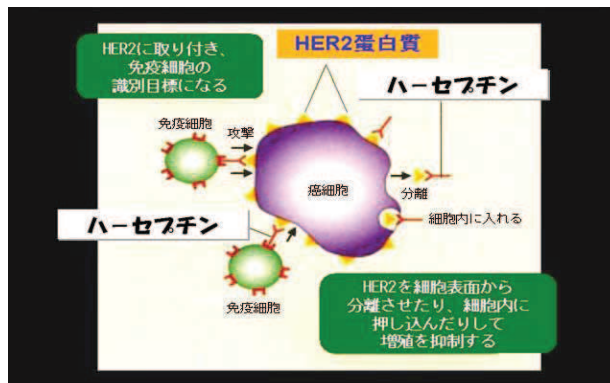


図 1.16 分子標的薬剤ハーセプチンのシグナル伝達阻害機構¹⁴⁾

②マイロターグ (ゲムツズマブオゾガマイシン) 分子量：153,000

がん細胞の表面のヒト CD33 抗原に結合するヒト化モノクローナル抗体であり、再発又は難治性の CD33-陽性の急性骨髄性白血病に効果がある。しかし、骨髄抑制、血液障害、出血、肝障害、腎障害、肺障害の副作用もある。マイロターグの分子構造はかなり複雑であるが、糖骨格を有している。(図 1.17)¹⁵⁾

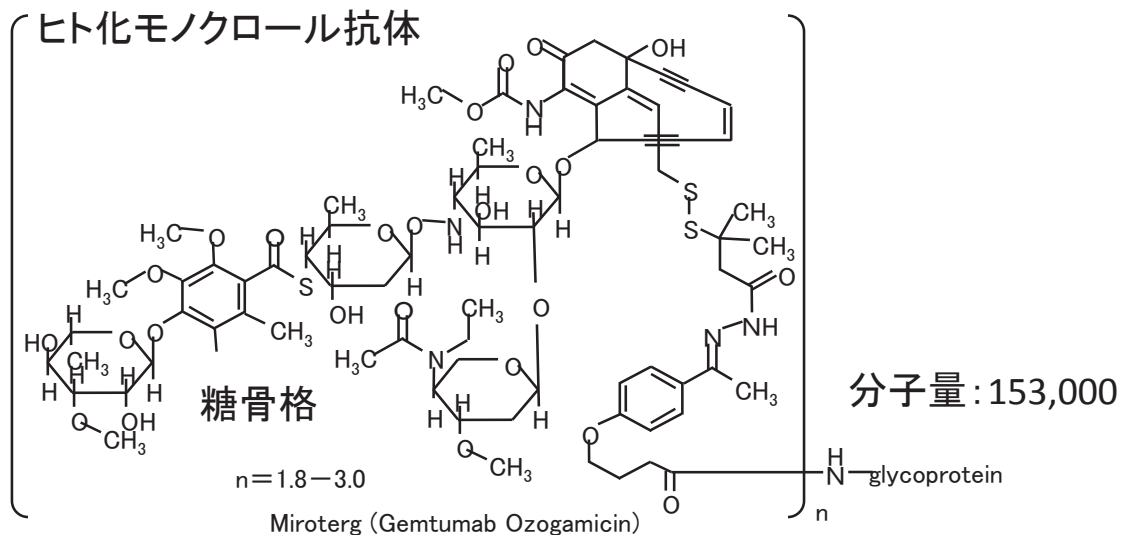


図 1.17 マイロターグ (ゲムツズマブオゾガマイシン) 分子構造¹⁵⁾

- ③ リツキサン (リツキシマブ) $C_{6416}H_{9874}O_{1987}S_{44}$ 分子量 : 143,860
 がん細胞上のヒト CD20 抗原をブロックし、CD20 抗原陽性の B 細胞性非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫に効果がある。しかし、B 型肝炎ウイルスキャリア患者で劇症肝炎が増悪する副作用がある。¹⁶⁾
- ④ ゼバリン (イブリツモマブチウキタセン)
 イブリツモマブに放射性物質イットリウム 90 を結合したものである。CD20 抗原陽性の低悪性度又は慮胞性 B 細胞性非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫に効果がある。リツキサンとの併用で使用する。骨髄抑制などの血液障害の副作用が大きい。(認可試験中)¹⁷⁾
- ⑤ アービタックス (セツキシマブ) $C_{6484}H_{10042}N_{1732}O_{2023}S_{36}$ 分子量 : 145,782
 がん細胞表面に存在する EGFR のリガンド結合部位に結合して EGFR の活性化を阻害するヒト・マウスキメラ化モノクローナル抗体である。大腸がん、非小細胞肺癌に効果がある。¹⁸⁾
- ⑥ ベクチビックス (パニツムマブ) $C_{6398}H_{9878}N_{1694}O_{2016}S_{48}$ 分子量 : 144,162
 アービタックスと同様に、がん細胞表面に存在する EGFR のリガンド結合部位に結合して EGFR の活性化を阻害するヒト化モノクローナル抗体である。進行・再発の大腸癌の第 3 分子標的薬である。¹⁹⁾
- ⑦ アバスチン (ベバシズマブ) $C_{6538}H_{10008}N_{1716}O_{2032}S_{44}$ 分子量 : 149,000
 血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) に対する遺伝子組み換え型ヒト化モノクローナル抗体である。大腸癌、非小細胞肺癌に効果がある。²⁰⁾

< 小分子化合物 >

分子標的療法薬剤の小分子化合物の特徴を下記に記述する。(図 1.19)

- ⑧ グリベック (イマチニブ) $C_{29}H_{31}N_7O$ 分子量 : 494
 4-(4-Methylpiperazin-1-ylmethyl)-*N*-[4-methyl-3-(4-pyridin-3-ylpyrimidin-2-ylamino)phenyl]benzamide-monomethane-sulfonate
 慢性骨髄性白血病 (CML) や GIST (消化管間質腫瘍) に効果を示す。⁷⁾
- ⑨ イレッサ (ゲフィチニブ) $C_{22}H_{24}ClFN_4O_3$ 分子量 : 447
N-(3-chloro-4-fluoro-phenyl)-7-methoxy-6-(3-morpholin-4-ylpropoxy)quinazolin-4-amine
 上皮成長因子受容体 (EGFR) のチロシンキナーゼを選択的に阻害し、非小細胞肺癌に効果がある。急性肺障害、間質性肺炎の併発などの副作用がある。²¹⁾

イレッサは、上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ (EGFR-TK) の自己リン酸化を阻害することにより、腫瘍細胞の増殖をもたらすシグナル伝達を抑制する。EGFR は非小細胞肺癌を含め多くの悪性腫瘍で過剰発現しており、腫瘍の増殖に関与している。がん細胞の対照的な増殖シグナル伝達系の機能分子は、チロシンキナーゼ (TK) である。ヒトには 90 種類以上の TK 分子が知られているが、大きく受容体型 TK と非受容体型 TK に分かれる。受容体型 TK 細胞膜貫通型の糖たんぱくであり、細胞外ドメインに上皮成長因子 (EGF) 受容体を持つ。この受容体ドメインに EGF が結合し、二量体を形成すると隣接した細胞内チロシンキナーゼドメインがチロシン残基の自己リン酸化反応を生じ、三次元構造が変化して TK は持続的な活性状態となる。(図 1.18)

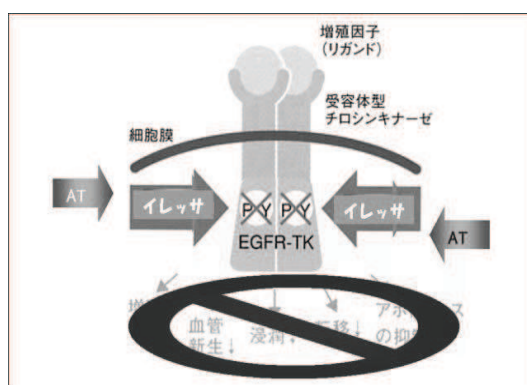


図 1.18 分子標的薬剤イレッサのシグナル伝達機構²¹⁾

⑩タルセバ (エルロチニブ) $C_{22}H_{23}N_3O_4$ 分子量：393

N-(3-ethylphenyl)-6,7-bis(2-methoxyethoxy)quinazolin-4-amine
ゲフィチニブと同様に、上皮成長因子受容体 (EGFR) のチロシンキナーゼを選択的に阻害し、非小細胞肺癌に延命効果がある。急性肺障害、間質性肺炎の併発などの副作用がある。²²⁾

⑪アムノレイク (タミバロテン) $C_{22}H_{25}NO_3$ 分子量：351

4-[(5,6,7,8-Tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl) carbamoyl]benzoic acid

前骨髄球の分化誘導をブロックするキメラ遺伝子の働きを阻害し、再発・難治性急性前骨髄性白血病 (AML) に効果がある。血液障害、呼吸困難、腹水貯留、肝機能不全などの副作用がある。²³⁾

⑫ベルケード (ボルテゾミブ) $C_{19}H_{25}N_2BO_4$ 分子量: 356

がん細胞内の酵素複合体(プロテアソーム)を阻害し、細胞周期調節不全が引き起こされる。再発・難治性の多発性骨髄腫に効果がある。骨髄抑制などの血液障害の副作用がある。²⁴⁾

⑬ネクサバル (ソラフェニブ) $C_{21}H_{16}ClF_3N_4O_3$ 分子量: 465

4-[4-[[4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl]carbamoylamino]phenoxy]-*N*-methyl-pyridine-2-carboxamine

血管内皮増殖因子受容体(VEGFR)や血小板由来成長因子受容体(PDGFR)のチロシンキナーゼを選択的に阻害して血管新生形成に対抗する。悪性の腎細胞癌に効果がある。²⁵⁾

⑭スーテント (スニチニブ) $C_{20}H_{26}FN_4O_2$ 分子量: 368

血管内皮増殖因子受容体(VEGFR)や血小板由来成長因子受容体(PDGFR)など複数のキナーゼを選択的に阻害して血管新生形成に対抗する。悪性の腎細胞癌やGIST(消化管間質腫瘍)に効果がある。²⁶⁾

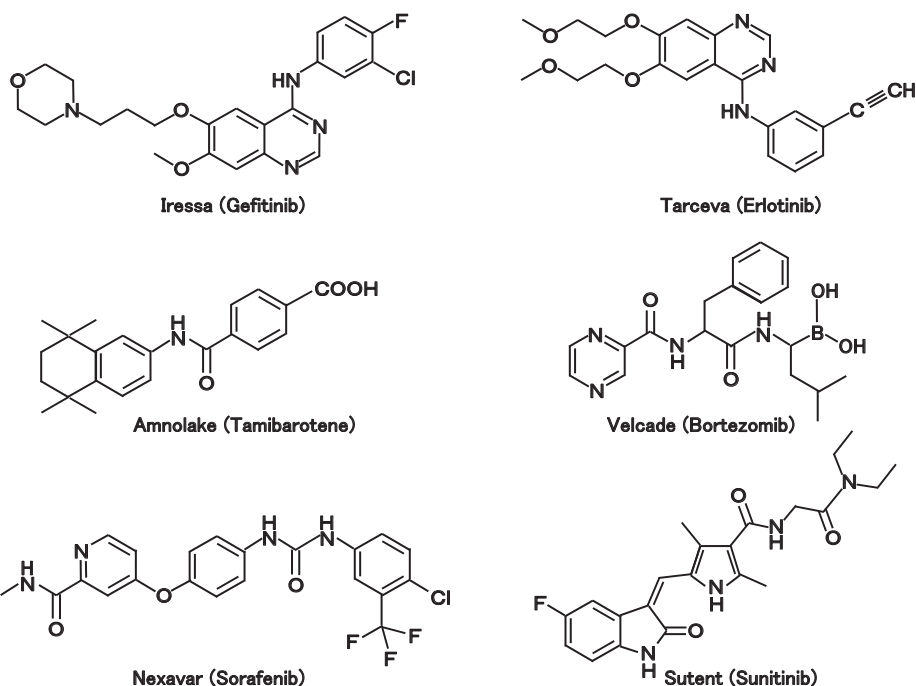


図 1.19 分子標的療法薬剤の小分子化合物構造²¹⁻²⁶⁾

現状の分子標的療法薬剤には、小分子化合物で細部内に入って細胞周期を止める多標的型分子標的薬剤は存在していない。そこで、本研究室で生理活性効果を研究しているリン糖について、多標的型分子標的薬剤としての可能性を検討することとした。

1.2.4 リン糖の特徴と抗がん剤への期待

糖は、図 1.20 に示す様に、炭水化物の構成成分のひとつで、栄養学的にはエネルギー源(グルコース、グリコーゲン)として生体内でエネルギーの貯蔵源として働き、また、生物学的には、ある種の修飾された炭水化物は生きている細胞の膜の一部を形成し、他のものは遺伝情報を伝達する DNA 中に見出され細胞間の認識などに働く重要な分子である。²⁷⁾

糖は、多数の水酸基を持つアルデヒドあるいはケトンの総称である。炭素数が 3 から 9 の簡単な構造をした単糖類と、それらが結合した二糖類や多糖類がある。タンパク質や核酸と違い、その結合の仕方は極めて多様で枝分かれしたような構造をもつものも多い。

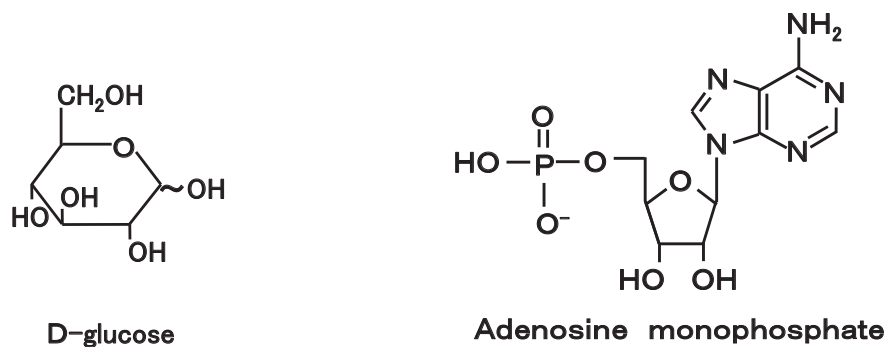


図 1.20 糖とヌクレオチド (AMP)²⁷⁾

糖のフラノース、あるいはピラノース環内における酸素原子を他の原子で置き換えた化合物は一般に擬似糖と総称され、図 1.21 に示す様に、環内酸素原子をヘテロ原子 (C、P、N、S、Se) によって置き換えられた擬似糖はヘテロ糖と呼ばれている。

具体的には擬似糖内の酸素原子を炭素で置き換えたカルバ糖²⁸⁾、窒素原子で置き換えたアザ糖²⁹⁾、硫黄原子で置き換えたチオ糖³⁰⁾などがある。

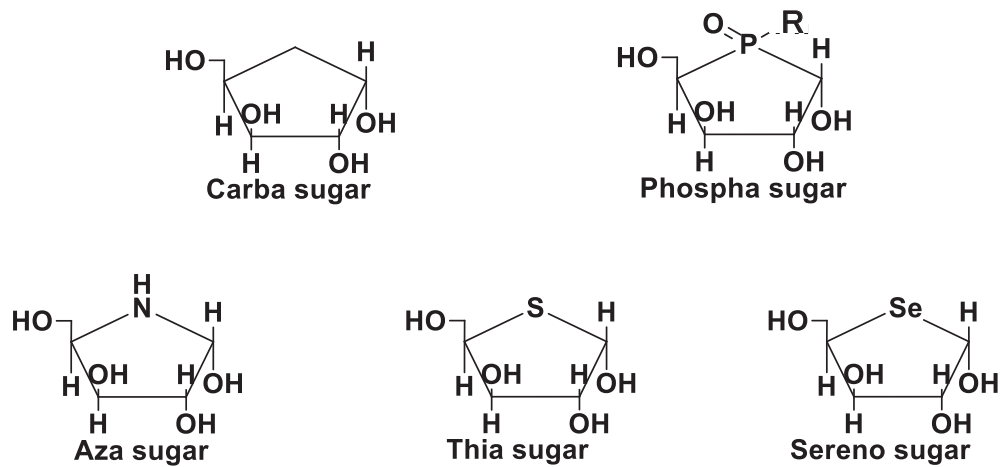


図 1.21 擬似糖（ヘテロ糖）²⁸⁻³⁰⁾

これらの擬似糖の中には抗菌活性、抗腫瘍活性、抗ウイルス活性、 α -D-glycosidase 阻害剤などの有用な生理活性を示すものが存在していることが知られ、天然擬似オリゴ糖やその類似体の合成が広く行われている。³¹⁾

アザ糖には炭水化物のプロセッシングに影響を与えることが知られており、ウイルス感染、がん、糖尿病、結核およびリソソーム蓄積病などの治療薬³²⁾としての研究が進められている。ピラノース型アザ糖である5-アミノ-5-デオキシ-D-グルコピラノースは天然に存在し、抗生物質ノジリマイシン³³⁾の成分である。同様なチオ糖である5-チオ-5-デオキシ-D-グルコピラノース³⁴⁾は、血糖濃度増加作用や避妊作用が知られている。また、ポリヒドロキシピペリジン類やピロリジン誘導体 glycosidase 阻害剤で知られている。³⁵⁾

糖類の生理活性には、その糖骨格自身によって見出されるだけでなく、多くはヌクレオシド誘導体³⁶⁾として高い活性を示し、現在医薬品として利用されている。治療薬の研究の中心的役割を担う核酸代謝拮抗剤開発の上で、主流であった核酸塩基の修飾に関する研究から近年では核酸塩基の糖部分の修飾の研究へと移行し始めている。³⁷⁾

図 1.22 に示す様に、抗インフルエンザ剤としての Ribavirin³⁸⁾、エイズウイルス阻害剤の AZT³⁹⁾などが挙げられ、擬似糖においても Neplanocin A⁴⁰⁾、4'-Thio-ddC⁴¹⁾などがその生理活性が確認されている。

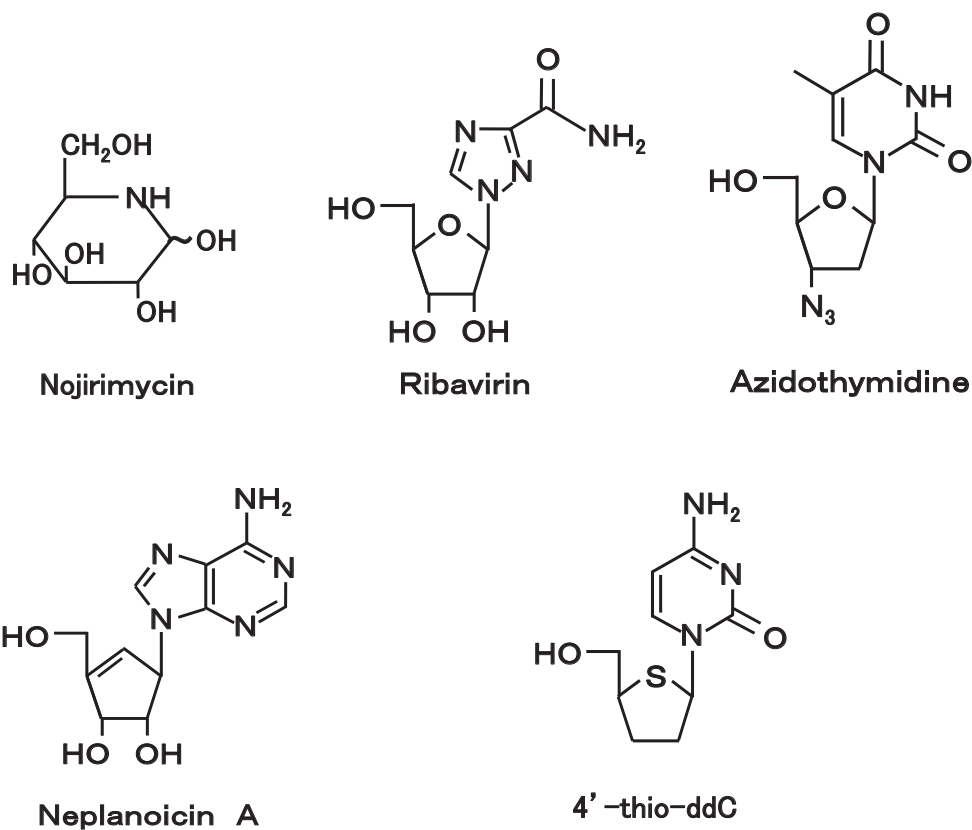


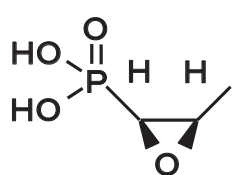
図 1.22 生理活性を示す化合物例³⁸⁻⁴¹⁾

また、含リン複素環化合物の中にも、図 1.23 に示す様な生理活性化合物が報告されている。

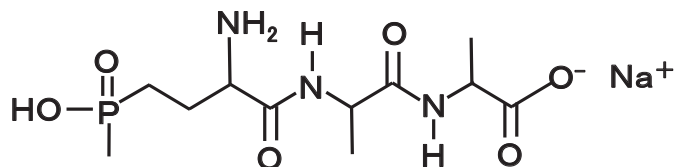
抗がん活性を示すシクロホスファミド⁴²⁾やプロテインキナーゼ (PKA) 阻害を示す Rp-8-Br-cAMPS⁴³⁾があるが、リン糖合成は他の擬似糖合成よりも困難であるため他の擬似糖と比較して報告例は少なく、その誘導体の合成がなされていない⁴⁴⁾。環を形成していない、つまり糖骨格を模していないリン化合物の生理活性にいたっては抗菌活性のホスホマイシン⁴⁵⁾、除草活性のピアラホス⁴⁶⁾などが存在している。

リン原子は、生体内に於いてリン酸エステルとして存在して核酸を構成し、また、アデノシン三リン酸 (ATP) に代表されるような高エネルギー結合にも関与して生体内に於けるエネルギーの授受にも関わっている。さらに、炭素—リン結合を持った化合物も生体内に存在することが知られている。

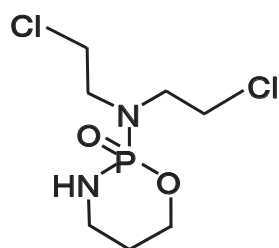
以上のことより、生理活性を有するリン糖は、炭素ーリン結合を含む天然産生化合物の性質から新しい生理活性物質として期待される。また、リン糖類の最近の研究成果から新しい抗腫瘍剤、とりわけ多標的型分子標的抗がん剤として大いに期待できる。



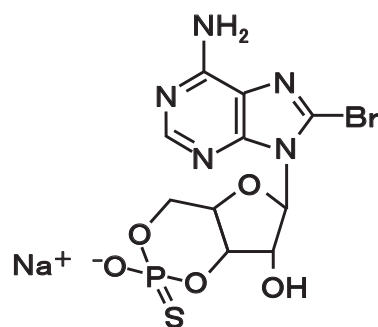
fosfomicin



Bialaphos



Cyclophosphamide



Rp-8-Br-cAMPS

図 1.23 生理活性を示す含リン複素環化合物とリン化合物⁴²⁻⁴⁶⁾

1.2.5 多標的型分子標的薬剤の構想

1.2.3 項で述べた様に、糖のヘミアセタール環内の酸素原子をリン原子で置き換えたリン糖は天然には存在せず、化学合成や生理活性などのキャラクターゼーション等に関する研究例が少ない。しかし、炭素—リン結合を有するホスホン酸等の鎖状リン誘導体の生理活性は広く知られている。医薬では抗菌活性のホスホマイシンや抗がん活性を示すシクロホスファミドなどもあり、リン糖誘導体にも生理活性が大いに期待できる。この様に、リン糖における生理活性は大変興味深いものであり、新規リン糖誘導体は慢性骨髄性白血病の抗がん剤であるグリベックを凌ぎ、スペクトル幅が広くて高い活性と選択性をもつ多標的型分子標的薬剤になる可能性を秘めている。そこで、生理活性に優れる新規リン糖の分子構造を決定するために、下記の分子設計指針をたてた。

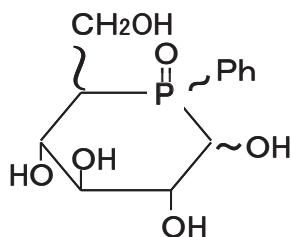
抗がん活性を示すシクロホスファミドと PKA 阻害を示す Rp-8-Br-cAMPS は六員環構造を有し、Ribarivin と AZT が五員環構造を有している。また、Bialaphos, Fosfomycin 等の直鎖状リン化合物が P-C, P=O 結合を有している。これらが生理活性を示すキーフラグメントであると考えられる。

従って、高い生理活性を持つ新規リン糖誘導体の基本骨格として、

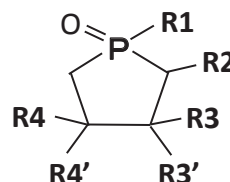
- 1) 六員環構造 又は五員環構造であり、環状内にリン原子を有する
- 2) P-C、P=O 結合を有する

の 2 点が重要であると考えた。

以上の事より、新規リン糖誘導体の候補としては、図 1.24 に示す様に、六員環構造としてヘミアセタール環状内にリン原子を含有するピラノース型リン糖、五員環構造として含リン複素環化合物であるフラノース型リン糖誘導体を基本構造と決めた。



ピラノース型リン糖



フラノース型リン糖

図 1.24 新規リン糖誘導体の基本構造

1.3 リン糖の研究動向

1.3.1 擬似糖合成の動向

一般に、単糖類は溶液中でアルデヒド型、フラノース型、ピラノース型、セプタノース型の異性体が平衡として存在している。ヘミアセタール環内にヘテロ原子（イオウ、窒素、リンなど）が入った糖では、図 1.25 のような平衡が考えられる。

これらのC-4位、C-5位、C-6位にイオウ(-SH)、窒素(-NH)、リン(-PH)などを導入すれば、それらのカルボニル基に対する反応性と生成する環の安定性によって、ヘミアセタール環内にイオウ原子、窒素原子、リン原子を持つ糖を合成することができる。

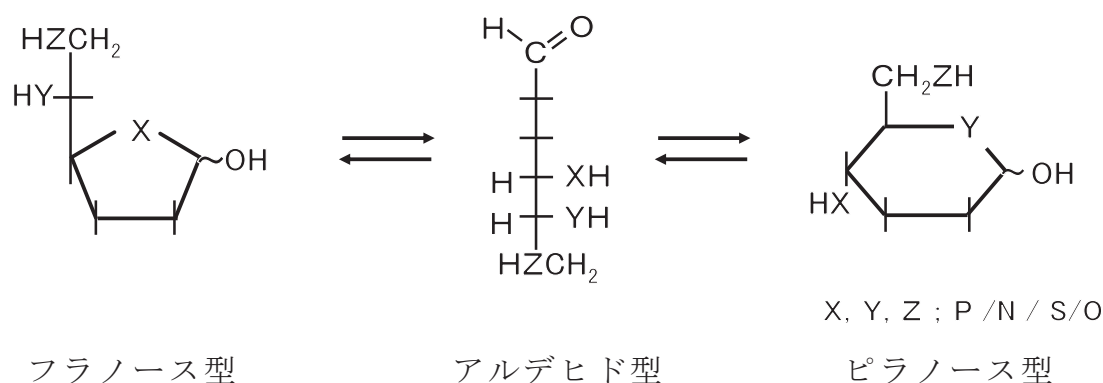


図 1.25 ヘテロ糖の平衡状態構造

また、ヘミアセタール環内にイオウ、窒素が入ったチオ糖(thio sugar)とアザ糖(aza sugar)では、ピラノース型、フラノース型のものが合成され、数多くの研究がなされている。^{47, 48)}

擬似糖誘導体の多くは糖を出発物質として合成され、炭素-ヘテロ原子結合形成のキーステップを経て、ヘミアセタール環の開環及び閉環により合成されている。例えば、図 1.26 に示すように、1968年 Whistlerらによるチオ糖誘導体において、ソルボース誘導体を原料にした例が報告されている。⁴⁹⁾

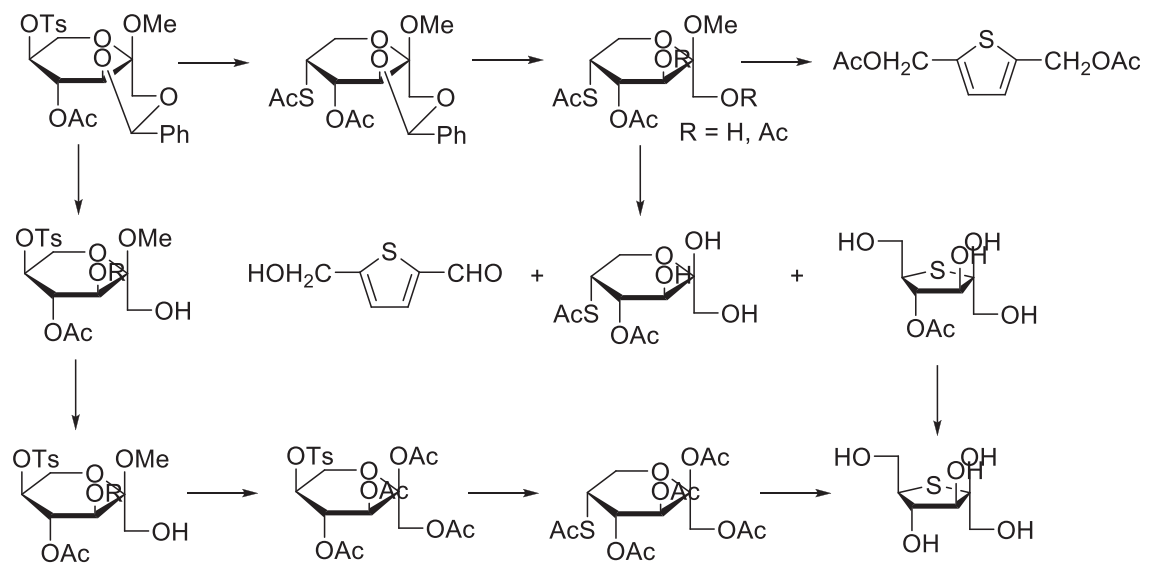


図 1.26 糖を出発物質とするチオ糖誘導体の合成⁴⁹⁾

1.3.2 ピラノース型リン糖の研究動向

ヘミアセタール環内にリン原子を持つリン糖に関しては、その合成がチオ糖やアザ糖に比較して困難であるためその報告例は少ない。そこで、本研究室ではリン糖の合成を試みているが、目的とするヘキソピラノース型リン糖はまだ合成できていない。研究室の合成例を以下に示す。

(i) Michaelis-Arbuzov 反応を用いたピラノース型リン糖

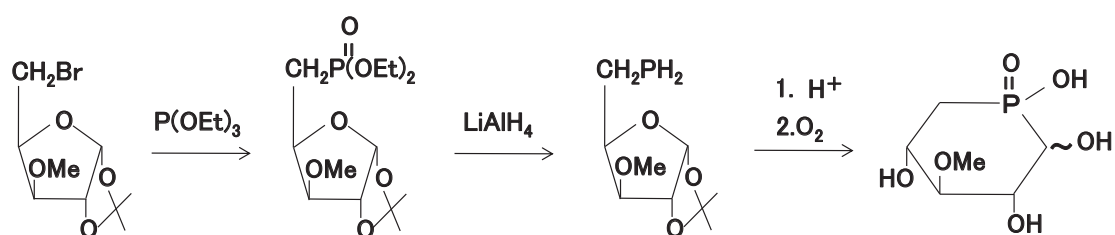


図 1.27 Michaelis-Arbuzov 反応を用いたリン糖誘導体の合成⁵⁰⁾

(ii) エポキシドを用いたペントフラノース型リン糖

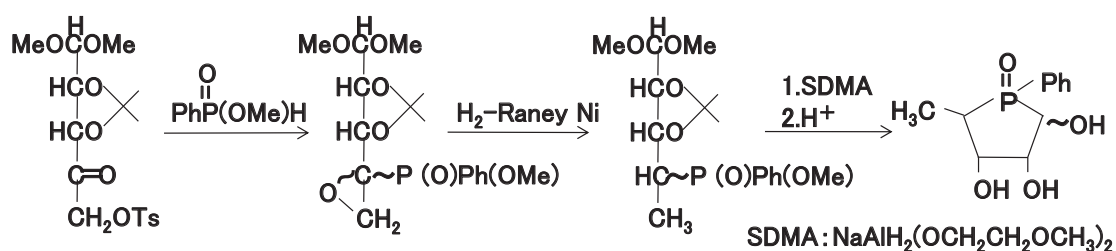


図 1.28 エポキシドを用いたリン糖誘導体の合成⁵¹⁾

(iii) C=N へのリン化合物付加を用いたヘキソピラノース型リン糖

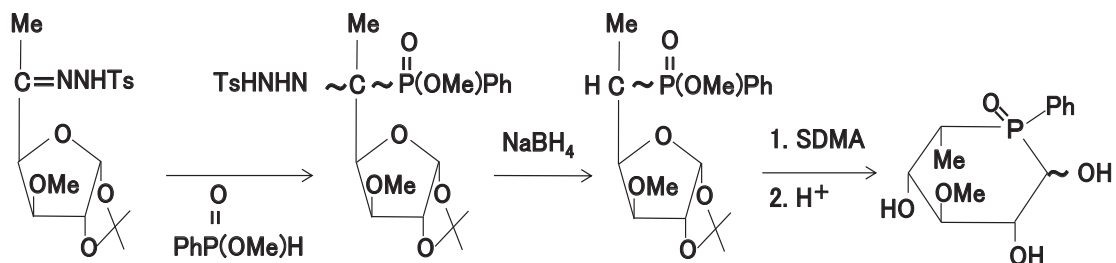


図 1.29 C=N へのリン化合物付加を用いたリン糖誘導体の合成⁵²⁾

(iv) $C=C(NO_2)$ へのリン化合物の付加を用いたC-6位にニトロ基を持つヘキソピラノース型リン糖

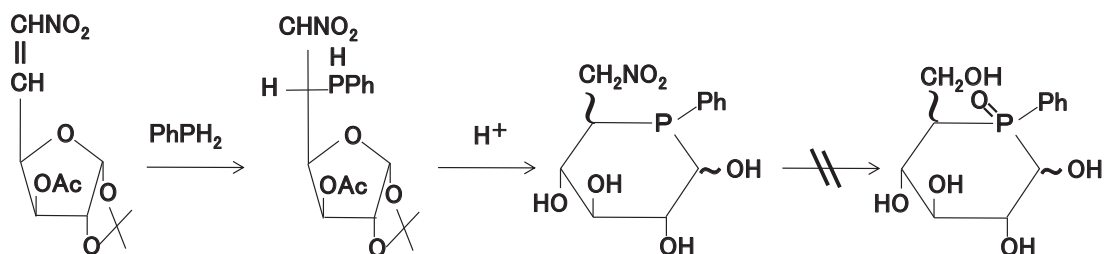
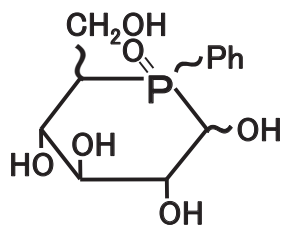


図 1.30 $C=C(NO_2)$ へのリン化合物付加を用いたリン糖合成⁵³⁾

これら(i)～(iv)の方法の中で、(iv)の $C=C(NO_2)$ へのリン化合物付加を用いた方法が目的とするヘキソピラノース型リン糖を合成できる可能性を持っているが、ニトロ基をアルデヒド基へ変換する試みはまだ成功していない。

第2章では、まず β 位にニトロ基を持ったホスフィン誘導体を用いて、ニトロ基をアルデヒド基、さらに水酸基へ変換し、ヒドロキシル誘導体を合成することを可能にする。次に、この知見を基に、グルコース糖を出発物質として、六員環構造のヘミアセタール環状内にリン原子を含有する新規ピラノース型リン糖の合成を試みる。



新規ピラノース型リン糖

1.3.3 フラノース型リン糖の研究動向

リン糖の合成においては、図 1.31 に示す様に、1968 年 Whistler らによって 5 員環のピラノース型の化合物が初めて合成されて以来、いくつかの合成法によってリン糖化合物⁵⁴⁾が合成されてきた。

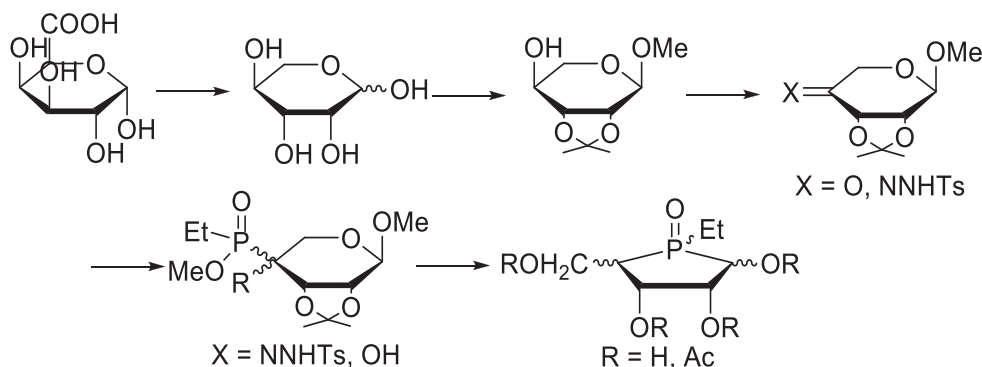


図 1.31 糖を出発物質とする 5 員環リン糖誘導体の合成⁵⁴⁾

しかし、糖を出発原料とするフラノース型リン糖の合成法では、下記の問題点を有している。

- 1) C-P 結合生成反応を行うための前駆体を合成するまでの経路が多段階に及ぶ為、各段階での収率が大きく影響し結果的に最終生成物の収率を大きく低下させてしまう。
- 2) リン糖誘導体を合成する際、立体配座などの影響によりリン糖誘導体のアノマー位だけに選択的に反応させることが比較的困難である。

そこで、本研究室では、その様な欠点を解決するために含リン複素環化合物である 5 員環ホスホレン化合物を出発物質としたリン糖合成に関する研究が行われている。

この合成法の利点としては、

- 1) 原料となるホスホレン化合物が簡便かつ大量に合成できること。
- 2) ホスホレン自身が反応性の高い二重結合を有していること。
- 3) ホスホレンが強い電子吸引基を有していること。

などがある。

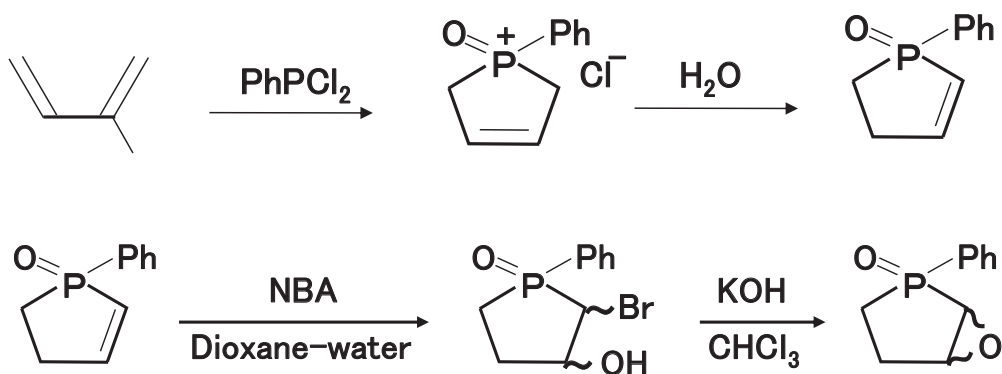
これらの特徴を利用することによって比較的短経路でのリン糖合成が可能になると考えられている。しかし、一方ではリン原子が不斉中心に

なることによりホスホレン自身がエナンチオマー混合物として生成するため、生理活性物質を単一の光学異性体として合成する上で光学異性体の分割が合成段階のどこかで必要不可欠となる問題点を含んでいる。また、ホスホリル基を持つ化合物の反応性に関しては多くの研究がなされているが、その多くは鎖状化合物であり、ホスホレンのような5員環構造の化合物に対する反応の報告はあまり多くはないことから、ホスホレンを用いたリン糖合成に関する研究は化学的見地からも重要であると言える。

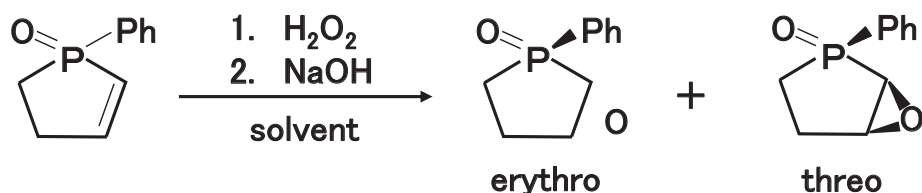
本研究室の糖を出発物質としないフラノース型リン糖合成と生理活性の研究例を下記に示す。

i) エポキシホスホランの合成と生理活性⁵⁵⁾

2-ホスホレン化合物から 2-ブロモ-3-ヒドロキシ-ホスホランと erythro 体と threo 体の 2,3-エポキシホスホランが合成できている。この erythro 体 2,3-エポキシホスホランは、慢性白血病細胞 K562 に対する生理活性 (IC_{50} : $250\mu\text{M}$) を示すことを見い出している。また、この erythro 体を選択的に合成する方法も見出している。(図 1.32)



IC_{50} : $>1000\mu\text{M}$ (K562)



IC_{50} : $250\mu\text{M}$ (K562)

$>1000\mu\text{M}$ (K562)

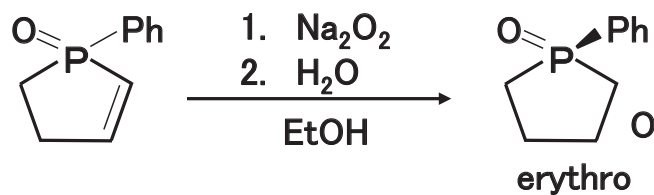


図 1.32 エポキシホスホランの合成⁵⁵⁾

ii) 1-メトキシホスホレンの合成と生理活性⁵⁶⁾

4位にブロモ基やヨード基を付加した1-メトキシホスホレンでは、慢性白血病細胞 K562 に対する IC_{50} が $48\mu\text{M}$ 、 $160\mu\text{M}$ を示すことを見い出している。(図 1.33)

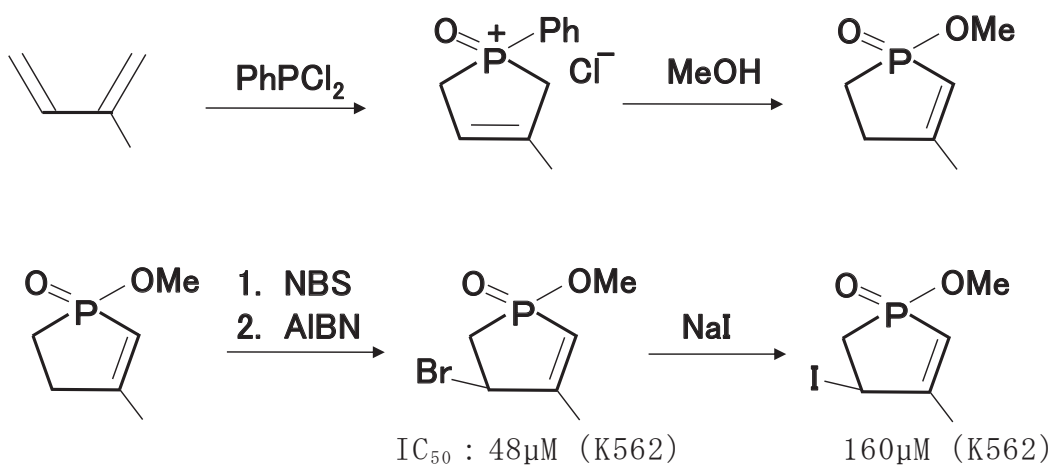


図 1.33 4-ブロモ-1-メトキシ-2-ホスホレンと
4-ヨード-1-メトキシ-2-ホスホレンの合成⁵⁶⁾

本研究室では、数種類のホスホレンとホスホラン誘導体が合成されており、慢性白血病細胞 K562 に対して生理活性を示す物質も出てきている。また、ブロモ基を導入すると生理活性が高くなることもわかってきている。しかし、官能基の種類、配位位置、数と生理活性の関係は、まだわかっていない。

そこで、5員環の含リン複素環化合物である 2-ホスホレン類を出発物質として、様々な官能基の導入反応や官能基変換反応を用いてホスホラン誘導体の合成を行うことにより、急性白血病細胞 U937 に対して高い生理活性を示すフラノース型リン糖の構造を検討した。(図 1.34)

- i) 2-ホスホレンによる 3, 4 位のアルキル基効果
- ii) 2-ホスホレンによる 4 位のハロゲン基効果
- iii) ホスホランによる 2, 3 位のハロゲン基効果
- iv) ホスホランによる 1 位フェニルの官能基効果

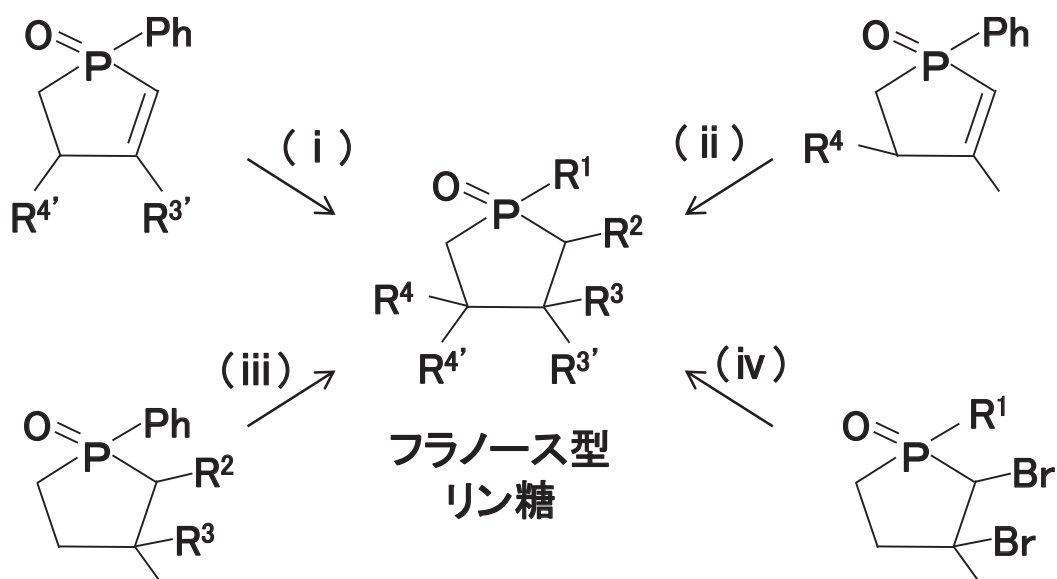


図 1.34 ホスホレン化合物を用いた新規リン糖誘導体の合成経路

1.4 本研究の目的

本研究では、慢性白血病細胞 K562 よりも上流にある急性白血病細胞 U937 にも抗がん活性を示す新規なリン糖抗がん剤を開発し、1種類の抗がん剤で複数の白血病に効く、スペクトル幅の広さと高い活性・選択性を有する新規な多標的型分子標的療法薬剤を創出することを最終目的とする。その実現に向けて、新規なピラノース型リン糖とフラノース型リン糖誘導体について、下記方針で研究を進める。

1. ピラノース型リン糖については、グルコース糖を出発物質としたルートで化学合成を行う。この合成ルートの課題であるニトロ基のアルデヒド基への変換を可能にして、新規ピラノース型リン糖を化学合成できるかを明らかにする。
2. フラノース型リン糖については、5員環の含リン複素環化合物である2-ホスホレン類を出発物質として、様々な官能基の導入反応や官能基変換反応を用いて種々のリン糖誘導体を合成し、生理活性に優れた分子構造を探索する。また、官能基効果（置換リン糖誘導体の抗がん活性効果）は、急性白血病細胞 U937 の抗がん活性評価（MTT法）により行う。
 - i) 5員環の2,4位にアルキル基を導入したホスホレン化合物を合成し、3,4位のアルキル基効果を明らかにする。
 - ii) 5員環の4位にハロゲン基を導入したホスホレン化合物を合成し、4位のハロゲン基効果を明らかにする。
 - iii) 5員環の2位、3位にハロゲンを付加したホスホラン化合物を合成し、2位と3位のハロゲン基効果を明らかにする。
 - iv) ホスホラン化合物の1位のフェニルの官能基（置換基）効果を明らかにする。
3. 新規なフラノース型リン糖抗がん活性効果を評価し、その作用機序を解明する。

引用文献

- 1) 厚生労働省：人口動態統計年報，(2005, 2006)。
- 2) 大野竜三，よくわかる白血病のすべて（永井書店），(2005)。
- 3) S. Abramson, *J. Exp. Med.*, **145**, 1567 (1977)
- 4) a) 大野竜三，日本内科学会誌，**91**, 130 (2002)。
b) 朝長万左男，日本内科学会誌，**91**, 136 (2002)。
c) 大野竜三，日本内科学会誌，**86**, 127 (1997)。
d) 久保田一，北関東医学，**37**, 253 (1987)。
e) 友安茂，昭和医会誌，**67**, 117 (2007)。
f) 中牧剛，昭和医会誌，**67**, 351 (2007)。
- 5) a) 鹿取信，標準薬理学第6版（医学書院），440 (2001)。
b) 田口敦夫，日本内科学会誌，**98**, 90 (2009)。
- 6) a) 曾根三郎，日本臨床，**62**, 1232 (2004)。
b) 北村正樹，耳展，**67**, 455 (2004)。
- 7) a) F. Leonetti, C. Capaldi, and A. Carotti, *Tetrahedron Letters*, **48**, 3455–3458 (2007)。
b) Y. Deguchi, S. Kimura, E. Ashihara, T. Niwa, K. Hodohara, Y. Fujiyama, and T. Maekawa, *Leukemia Reserch*, **32**, 980–983 (2008)。
- 8) a) 山田尚，慈恵医大誌，**121**, 105 (2006)。
b) 山田尚，日薬理誌，**132**, 339 (2008)。
- 9) 日経サイエンス 癌幹細胞説，(2006)。
- 10) a) 村松正寶，細胞の世界，(2005)。
b) 岡山博人，日本老年医学会雑誌，**35**, 713 (1998)。
c) 井出利憲，薬学雑誌，**126**, 1087 (2006)。
- 11) 実験医学 シグナル伝達マップ，(2004)。
- 12) a) Goodman and Gilmans, *The Pharmacological Basis of Therapeutics 10th edition The McGraw-Hill Company New York USA*, 1383 (2001)。
b) 伊藤猛雄，薬理学，(1999)。
- 13) T. Mizukami, *Japan Journal Cancer Chemother*, **35**, 2294 (2008)。
- 14) G. D. Lewis, *Cancer Immunol. Immunother*, **37**, 255 (1993)。
- 15) 原田尚，スズケン 話題の新薬 2006①，(2006)。
- 16) 中外製薬，医薬品インタビューフォーム リツキサン，**10**, (2008)。
- 17) *J. Nucl. Med. Technol.*, **31**, 61 (2003)。

- 18) T. Kawamoto, *Molecular Biology & Medicine*, **1**, 511-529 (1983).
- 19) 武田薬品工業, ベクティビックス, 1-68 (2010).
- 20) 中外製薬, アバスチン, (2009).
- 21) T. Mizukami, *Japan Journal Cancer Chemother*, **35**, 2294 (2008).
- 22) F. A. Shepherd, *N. Engl. J. Med.*, **353**, 123-132 (2005).
- 23) スズケン, タミバロテン, (2005).
- 24) T. Hidesima, *Cancer Res*2001, **61**, 3071-3076 (2001).
- 25) Wikipedia, ソラフェニブ, (2010).
- 26) ファイザー製薬, スニチニブ, (2006).
- 27) a) 藤原清彦, よくわかる生化学 -分子生物学的アプローチ- (株)サイエンス社, **46**, (2000).
b) McMURRY, マクマリー有機化学概説 伊東椒・児玉三明訳, 東京化学同人出版, **4**, 438 (2002).
- 28) P. Wang, L. A. Agrofoglio, M. G. Newton, and C. K. Chu., *J. Org. Chem.*, **64**, 4173 (1999).
- 29) a) G. Legler and E. Julich, *Carbohydr. Res.*, **128**, 61-62 (1984).
b) S. Takayama, R. Martin, K. Laslo, G. Siuzdak, and C. H. Wong, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 8146-8147 (1997).
c) B. G. Davis, M. A. T. Maughan, T. M. Chapman, R. Villard, and S. Courtney, *Org. Lett.*, 103-104 (2002).
- 30) J. Branalt, I. Kvarnstrom, G. Niklasson, and S. C. T. Svensson, *J. Org. Chem.*, **59**, 1783-1784 (1994).
- 31) a) 小早川誠一郎, *有機合成協誌*, **43**, 26-27 (1985).
b) C. S. Wilcox and J. J. Gaudino, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 3102-3103 (1986).
c) T. Suami, *Pure Appl. Chem.*, **59**, 1509-1510 (1987).
d) 葛原弘美, 坂入信夫, *有機合成協誌*, **46**, 37-38 (1988).
e) S. Ogawa and Y. Nakamura, *Carbohydr. Res.*, **226**, 79-80 (1992).
- 32) a) A. Karpas, G. W. J. Fleet, R. A. Dwek, S. Petursson, S. K. Namgoong, N. G. Ramsden, G. S. Jacob, and T. W. Rademacher, *Proc. atl. Acad. Sci.*, **85**, 9229 (1988).
b) P. E. Goss, M. A. Baker, J. P. Carver, and J. W. Dennis, *Clin. Cancer. Res.*, **1**, 935 (1995).
- 33) a) S. Inoue, T. Tsuruoka, and T. Niida, *J. Antibiot., Ser. A*, **19**, 288 (1960).
b) S. Inoue, T. Tsuruoka, T. Ito, and T. Niida, *Tetrahedron*, **24**, 2125 (1968).

- 34) R. L. Whistler and W. C. Lake, *Biochem. J.*, **130**, 919 (1972).
- 35) L. E. Fellows, *New Sci.*, **123**, 45 (1989).
- 36) a) H. Mituya, K. J. Weinhold, P. A. Furman, M. H. St. Clair, S. N. Lehrman, R. L. Gallo, D. Bolognesi, D. W. Barry, and S. Broder, *Proc. atl. Acad. Sci.*, **82**, 7096 (1985).
- b) R. Z. Sterzycki, I. Gazzouli, V. Brankovan, J. C. Martin, M. M. Mansuri, J. J. T. Witkowski, R. K. Robins, R. W. Sidwell, and L. N. Simon, *J. Med. Chem.*, **15**, 1150 (1972).
- c) M. Arita, K. Adachi, Y. Ito, H. Sawai, and M. Ohno, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 4049 (1983).
- d) J. A. Secrist, R. M. Riggs, K. N. Tiwari, and J. A. Montgomery, *J. Med. Chem.*, **35**, 533 (1992).
- 37) 松田彰, *有機合成化学*, **48**, 907 (1990).
- 38) J. T. Witkowski, R. K. Robins, R. W. Sidwell, and L. N. Simon., *Med. Chem.*, **15**, 1150 (1972).
- 39) a) H. Mituya, K. J. Weinhold, P. A. Furman, M. H. St. Clair, S. N. Lehrman, R. L. Gallo, D. Bolognesi, D. W. Barry, and S. Broder, *Proc. atl. Acad. Sci.*, **82**, 7096 (1985).
- b) R. Z. Sterzycki, I. Gazzouli, J. C. Martin, and M. M. Mansuri, *J. Med. Chem.*, **33**, 2150 (1990).
- 40) M. Arita, K. Adachi, Y. Ito, H. Sawai, and M. Ohno, *J. Am. Chem. Soc.*, **105**, 4049 (1983).
- 41) J. A. Secrist III, R. M. Riggs, K. N. Tiwari, and J. A. Montgomery, *J. Med. Chem.*, **35**, 533 (1992).
- 42) 鹿取信, *標準薬理学第6版*, 441 (2001).
- 43) 秋山徹, 河府和義, *阻害剤ハンドブック* (羊土社), 30 (2007).
- 44) 前德基樹, *平成14年度静岡大学大学院理工学研究科修士論文*, (2003).
- 45) D. Hendlin, D. O. Stapley, M. Jackson, H. Wallick, A. K. Miller, F. J. Wolf, T. W. Miller, L. Chaiet, F. M. Kahan, E. L. Foltz, H. B. Woodruff, S. Hernandez, and S. Mochales, *Science.*, **166**, 122 (1969).
- 46) H. Nakashita, K. Watanabe, O. Hara, T. Hidaka, and H. Seto, *J. Antibiot.*, **50**, 212 (1997).
- 47) T. J. Adley and L. N. Owen, *Proc. Chem. Soc.*, **30**, 418 (1961).
- 48) J. K. N. Jones and W. A. Szarek, *Can. J. Chem.*, **41**, 636 (1963).

- 49) R. L. Whistler, and M. Chmielewski, *J. Org. Chem.*, **40**, 639–640 (1975).
- 50) a) R. L. Whistler and C. -C. Wang, *J. Org. Chem.*, **33**, 4455 (1968).
b) S. Inokawa, Y. Tsuchiya, K. Seo, H. Yoshida, and T. Ogata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **44**, 2279 (1971).
c) K. Seo and S. Inokawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **46**, 2303 (1973).
d) S. Inokawa, H. Kitagawa, K. Seo, H. Yoshida, and T. Ogata, *Carbohydr. Res.*, **30**, 127 (1973).
e) K. Seo and S. Inokawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **46**, 3301 (1973).
- 51) H. Yamamoto, Y. Nakamura, H. Kawamoto, S. Inokawa, M. Yamashita, M. -A. Armour, and T. Nakashima, *Carbohydr. Res.*, **102**, 185 (1982).
- 52) a) H. Yamamoto, C. Hosoyamada, H. Kawamoto, S. Inokawa, M. Yamashita, M. -A. Armour, and T. Nakashima, *Carbohydr. Res.*, **102**, 159 (1982).
b) H. Yamamoto, C. Hosoyamada, H. Kawamoto, S. Inokawa, M. Yamashita, M. -A. Armour, and T. Nakashima, *Carbohydr. Res.*, **102**, C1 (1982).
- 53) a) H. Takayanagi, M. Yamashita, K. Seo, H. Yoshida, T. Ogata, and S. Inokawa, *Carbohydr. Res.*, **38**, C19 (1974).
b) H. Takayanagi, K. Seo, M. Yamashita, H. Yoshida, T. Ogata, and S. Inokawa, *Carbohydr. Res.*, **63**, 105 (1978).
c) P. Luger, M. Yamashita, and S. Inokawa, *Carbohydr. Res.*, **84**, 25 (1980).
- 54) a) H. Yamamoto, Y. Nakamura, S. Inokawa, M. Yamashita, M. Armour, and T. Nakashima, *J. Org. Chem.*, **49**, 1364 (1984).
b) T. Hanaya, N. Shigetoh, and H. Yamamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **61**, 2499 (1988).
c) T. Hanaya, Y. Fujii, and H. Yamamoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **67**, 2596 (1994).
d) M. Yamashita, A. Yabui, T. Oshikawa, T. Hanaya, and H. Yamamoto, *Heterocycles*, **38**, 1449–1451 (1994).
- 55) S. Ito, M. Yamashita, T. Niimi, M. Fujie, V. K. Reddy, H. Totsuka, B. Haritha, K. Maddali, S. Nakamura, K. Asai, T. Suyama, J. Yamashita, Y. Iguchi, G. Yu, and T. Oshikawa, *Heterocyclic Communications*, **15**, 23–30 (2009).
- 56) 陶山哲也, 平成 20 年度静岡大学大学院工学研究科修士論文, (2008).

第2章 ピラノース型リン糖の合成

2.1 β -ニトロホスフィン誘導体のニトロ基の変換反応

ニトロ基をアルデヒド基へ変換する方法としては、下記に示す様な方法が数多く報告されている。しかし、 β 位にニトロ基を持ったホスフィン誘導体のニトロ基をアルデヒド基に変換する方法は報告されていない。

1) 強酸を用いる方法

① Nef 反応¹⁾

2) 酸化による方法

② KMnO_4 ²⁾、③ $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}$ ³⁾、④ $t\text{-BuOK}/t\text{-BuOOH}/\text{VO}(\text{acac})_2$ ⁴⁾、

⑤ $\text{NaNO}_2/n\text{-PrONO}$ ⁵⁾、⑥ O_2/NaOH ⁶⁾、⑦ $\text{H}_2\text{O}_2/\text{K}_2\text{CO}_3$ ⁷⁾、

⑧ 塩基性シリカゲル⁸⁾、⑨ $\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6/\text{Et}_3\text{N}$ ⁹⁾、

⑩ $\text{Me}_3\text{SiCl}/\text{Li}_2\text{S}/\text{Ce}(\text{NH}_4)_2(\text{NO}_3)_6$ ¹⁰⁾、⑪ $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}/\text{HMPA}/\text{MoO}_5$ ¹¹⁾

3) 還元による方法

⑫ TiCl_3 ¹²⁾、⑬ CrCl_2 ¹³⁾、⑭ VCl_2 ¹⁴⁾

実際に、①～⑭の変換方法を試みたが、これらすべての方法においてニトロ基をアルデヒド基に変換できなかった。これはリン原子の電子吸引性が影響して、 $\text{C}=\text{N}$ 結合を分解できないためと考えられる。

そこで、 β -ニトロホスフィン誘導体 **1** において、図 2.7 に示す様に、 $\text{C}=\text{N}$ 結合をもっと強力に分解する必要があると考え、ナトリウムメトキシドのような強塩基存在下でオゾンを用いて $\text{C}=\text{N}$ 結合を分解する方法を試みた。また、糖骨格への応用を考慮して、R基にメチル基、エチル基、イソプロピル基、フェニル基を用いて実験を行った。

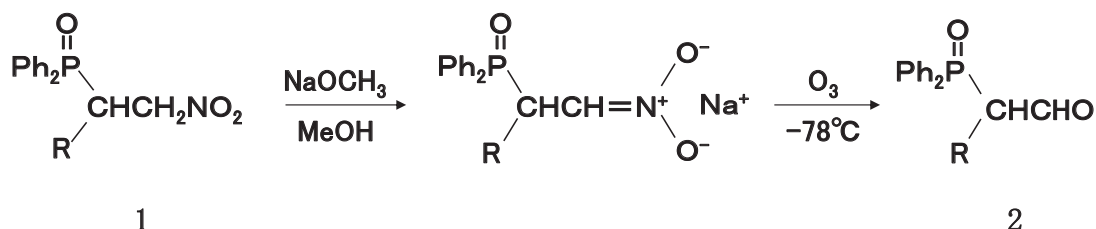


図 2.1 β -ニトロホスフィン誘導体 **1** のアルデヒド基への変換
($\text{R} = \text{CH}_3, \text{C}_2\text{H}_5, i\text{-C}_3\text{H}_7, \text{C}_6\text{H}_5$)

β -ニトロホスフィン誘導体 **1** をナトリウムメトキシドのような強塩基存在下で、 -78°C でオゾン/酸素の気流を通して反応させると、ニトロ基がアルデヒド基 **2** に 67-99% の高収率で変換できた。

ニトロ誘導体 **1** からアルデヒド誘導体 **2** への確認は、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル上の δ 9.8ppm 付近のアルデヒドプロトンに帰属されるシグナルの存在と δ 4.5-4.8ppm のニトロメチレンプロトンに帰属されるシグナルの消失により行った。また、IR スペクトルではニトロ基に帰属される 1545cm^{-1} の吸収の消失と 1650cm^{-1} 付近のカルボニルの吸収によりアルデヒド誘導体の構造を決定した。また、元素分析、マススペクトルもこの構造を支持した。(表 2.1)

ナトリウムメトキシドのような強塩基存在下でオゾンを用いて $\text{C}=\text{N}$ 結合を分解する方法により、 β -ニトロホスフィン誘導体 **1** のメチル基からフェニル基の全ての官能基において、ニトロ基をアルデヒド基に変換できた。

表 2.1 ニトロ基を変換したアルデヒド誘導体 **2**

Compound 2 No.	R	Yield (%)	m.p. ($^{\circ}\text{C}$)	MS m/z	IR (KBr) $\nu_{\text{C=O}}$ (cm^{-1})	$^1\text{H-NMR}$ CHO δ (ppm)
a	CH_3	90	130-131	258(M^+)	1650	9.60(d,1H)
b	C_2H_5	99	147-148	272(M^+)	1650	9.84(d,1H)
c	i- C_3H_7	90	168-169	286(M^+)	1640	9.26(d,1H)
d	C_6H_5	67	189-190	320(M^+)	1705	9.95(bs,1H)

次に、水素化ホウ素ナトリウムを用いて、ホスフィン誘導体のアルデヒド基を水酸基へ変換することを試みた。(図 2.2)

アルデヒド誘導体 **2** の無水メタノール溶液に 10 当量の水素化ホウ素ナトリウムを加え、16 時間還流して β 位に水酸基のあるヒドロキシル誘導体 **3** を 63-92% の高収率で得た。

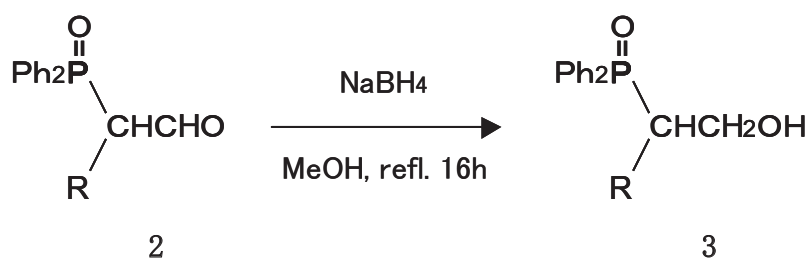


図 2.2 アルデヒド誘導体 **2** の水酸基への変換
(R = CH₃, C₂H₅, i-C₃H₇, C₆H₅)

アルデヒド誘導体 **2** からヒドロキシル誘導体 **3** への確認は、¹H-NMR スペクトル上の δ 3.1-5.8ppm の水酸基プロトンに帰属するシグナルの存在と δ 9.8ppm 付近のアルデヒドプロトンに帰属されるシグナルの喪失により行った。また、IR スペクトルでは原料のカルボニルに帰属される 1650cm⁻¹ 付近の吸収の消失と 3300cm⁻¹ 付近の水酸基の吸収によりヒドロキシル誘導体 **3** の構造を決定した。また、元素分析、マススペクトルもこの構造を支持した。(表 2.2)

表 2.2 アルデヒド基を変換したヒドロキシル誘導体 **3**

Compound 3 No.	R	Yield (%)	m.p. (°C)	MS m/z	IR (KBr) ν _{OH} (cm ⁻¹)	¹ H-NMR OH δ (ppm)
a	CH ₃	82	140-141	260(M ⁺)	3200	4.46(bs, 1H)
b	C ₂ H ₅	89	105-106	274(M ⁺)	3300	5.77(s, 1H)
c	i-C ₃ H ₇	92	148	288(M ⁺)	3350	4.60(s, 1H)
d	C ₆ H ₅	63	168-170	322(M ⁺)	3400	3.14(s, 1H)

以上の検討により、β位にニトロ基を持ったホスフィン誘導体を用いて、ニトロ基をアルデヒド基、さらに水酸基に変換する合成方法を見出すことができた。次に、この変換方法を用いて、新規ピラノース型リン糖の合成を行った。

2.2 ピラノース型リン糖の合成と考察

2.2.1 ピラノース型リン糖の合成

新規ピラノース型リン糖の合成ルートを図 2.3 に示す。

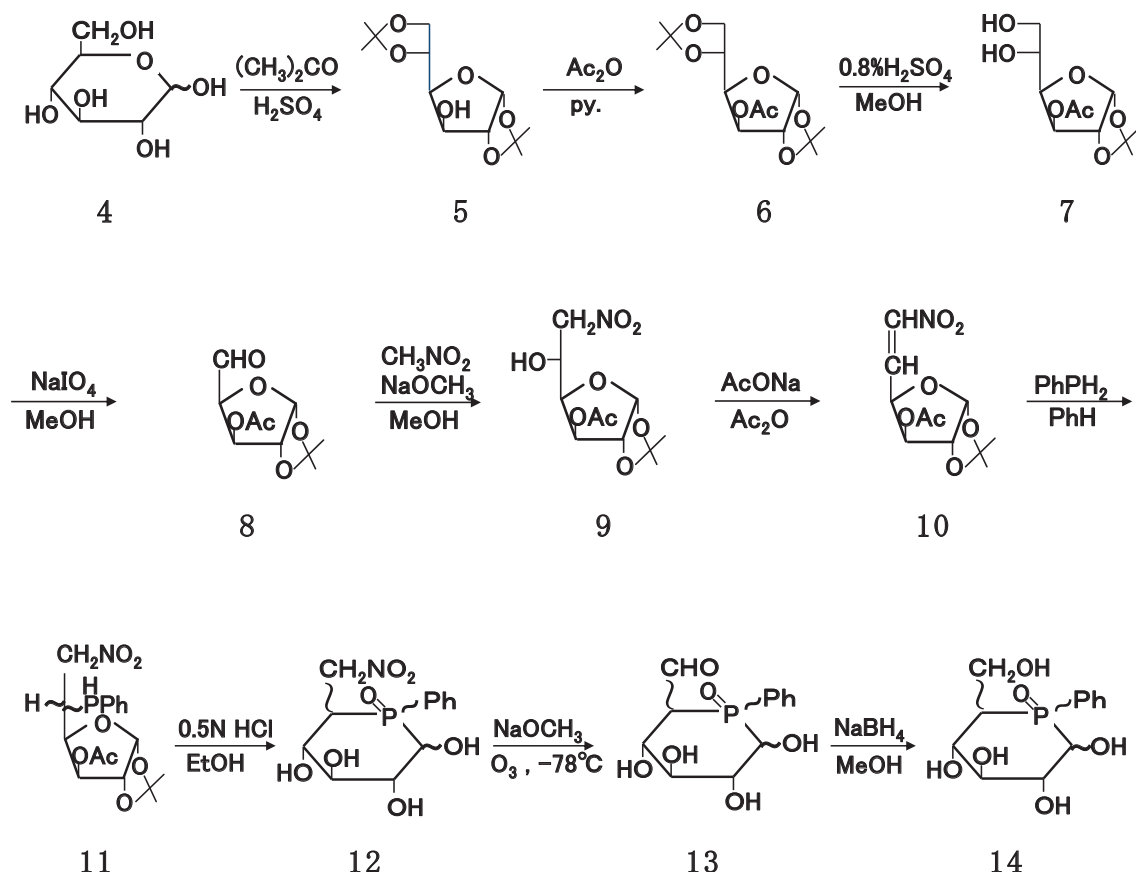


図 2.3 ピラノース型リン糖 **14** の合成経路

新規ピラノース型リン糖 **14** の合成には $\text{C}=\text{C}(\text{NO}_2)$ へのリン化合物の付加を用いた合成ルートで行った。その合成方法と結果を下記に示す。

- 1) D-グルコース **4** を出発物質として、アセトンと濃硫酸を用いて、1, 2; 5, 6 位の水酸基をイソプロピリデン基で保護した化合物 **5** を収率 59% で合成した。

m. p. 111°C , $R_f=0.60$ (酢酸エチル:石油エーテル=1:1),

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 60Hz): δ (ppm); 1.30, 1.43 (ss, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.32, 1.48 (ss, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 3.11 (s, 1H, OH), 3.4-4.5 (m, 5H, H-3, 4, 5, 6, 6'), 4.50 (d, 1H, $J=4.0\text{Hz}$, H-2), 5.90 (d, 1H, $J=4.0\text{Hz}$, H-1).

- 2) 無水酢酸とピリジンを用いて、化合物 **5** の 3 位の水酸基をアセチル基で保護した化合物 **6** を収率 100% で合成した。

$R_f=0.78$ (酢酸エチル:石油エーテル=1:1),

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 60Hz): δ (ppm); 1.26, 1.33 (ss, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.26, 1.43 (ss, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 2.02 (s, 3H, OAc), 3.9-4.2 (m, 4H, H-4, 5, 6, 6'), 4.43 (d, 1H, $J=4.0\text{Hz}$, H-2), 5.17 (d, 1H, $J=3.0\text{Hz}$, H-3), 5.80 (d, 1H, $J=4.0\text{Hz}$, H-1).

- 3) 0.8% 硫酸水溶液を用いて、化合物 **6** の 5, 6 位のケタールを選択的に加水分解して化合物 **7** を収率 96% で合成した。

m. p. 115°C , $R_f=0.20$ (酢酸エチル:ベンゼン=1:1),

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 60Hz): δ (ppm); 1.26, 1.46 (ss, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 2.08 (s, 3H, OAc), 3.3-3.4 (m, 4H, H-4, 5, 6, 6'), 3.79 (s, 2H, OH-5, 6), 4.48 (d, 1H, $J=4.0\text{Hz}$, H-2), 5.25 (d, 1H, $J=4.0\text{Hz}$, H-3), 5.84 (d, 1H, $J=4.0\text{Hz}$, H-1).

- 4) メタ過ヨウ素酸ナトリウムを用いて、化合物 **7** の 5 位をアルデヒドに変換したアルドース **8** を収率 92% で合成した。

$R_f=0.20$ (酢酸エチル:石油エーテル=1:1),

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 60Hz): (ppm); 1.26, 1.46 (ss, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 2.46 (s, 3H, OAc), 3.3-4.6 (m, 2H, H-2, 4), 5.22 (d, 1H, $J=3.0\text{Hz}$, H-3), 5.88 (d, 1H, $J=4.0\text{Hz}$, H-1), 9.60 (s, 1H, CHO).

- 5) ニトロメタンとナトリウムメトキシドを用いて、ニトロメタンとアルドース **8** が縮合した化合物 **9** を収率 91% で合成した。

m. p. $125-126^\circ\text{C}$, $R_f=0.41$ (酢酸エチル:ベンゼン=1:1),

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 60Hz): δ (ppm); 1.27, 1.43 (ss, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 3.77 (s, 2H, OH-3, 5), 3.9-4.9 (m, 6H, H-2, 3, 4, 5, 6, 6'), 5.89 (d, 1H, $J=4.0\text{Hz}$, H-1).

- 6) 無水酢酸と無水酢酸ナトリウムを用いて、化合物 **9** を脱水してデオキシニトロエノース **10** を収率 81% で合成した。

m. p. $112-113^\circ\text{C}$, $R_f=0.59$ (酢酸エチル:石油エーテル=1:1),

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 60Hz): δ (ppm); 1.28, 1.45 (ss, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$), 1.96 (s, 3H, OAc), 4.48 (d, 1H, $J=4.0\text{Hz}$, H-2), 5.02 (dd, 1H, $J=3.0\text{Hz}$, H-4), 5.27 (d, 1H, $J=3.0\text{Hz}$, H-3), 5.93 (d, 1H, $J=4.0\text{Hz}$, H-1), 7.14 (s, 2H, $\text{CH}=\text{CHNO}_2$).

- 7) ニトロエノース **10** のベンゼン溶液を 1.5 倍当量のフェニルホスフィンのベンゼン溶液に窒素雰囲気下、40–50 °C でゆっくり滴下した。1 時間攪拌後、溶媒と過剰のフェニルホスフィンを除去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離して、1 : 1 付加物 **11** を収率 65 % で合成した。化合物 **11** には、L-イド体と D-グルコ体の 2 種類の異性体が存在した。¹H-NMR スペクトルには、L-イド体と D-グルコ体に対応する 1.98ppm, 2.06ppm と 1.91ppm, 1.93ppm に、3-O-アセチルのプロトンに帰属されるシグナルが存在し、その積分比より L-イド体と D-グルコ体の生成比は 7 : 2 であることがわかった。

L-イド体 **11a**:

m. p. 104–106 °C, $R_f=0.49$ (酢酸エチル : n-ヘキサン = 1 : 3),
¹H-NMR (CDCl₃, 60Hz) : δ (ppm) ; 1.23, 1.35 (ss, 6H, C(CH₃)₂), 1.96, 2.06 (ss, 3H, OAc), 2.7–3.3 (m, 1H, H-5), 3.9–4.6 (m, 4H, H-2, 4, 6, 6'), 4.17, 4.26 (dddd, 1H, $J_{PH}=219$ Hz, $J_{HH}=6.0$ Hz, $J'_{PH}=215$ Hz, $J'_{HH}=3.5$ Hz, PH), 5.03 (d, 1H, $J=2.5$ Hz, H-3), 5.81, 5.83 (dddd, 1H, $J=4.0$ Hz, H-1), 7.1–7.7 (m, 5H, C₆H₅),
IR (cm⁻¹) : 2325 (P-H), 1735 (C=O), 1550 (NO₂), 1430 (P-Ph), 1375 (NO₂), 720 (C-P).

D-グルコ体 **11b**:

$R_f=0.49$ (酢酸エチル : n-ヘキサン = 1 : 3),
¹H-NMR (CDCl₃, 60Hz) : δ (ppm) ; 1.23, 1.40 (ss, 6H, C(CH₃)₂), 1.91, 1.93 (ss, 3H, OAc), 2.8–3.4 (m, 1H, H-5), 4.0–4.7 (m, 4H, H-2, 4, 6, 6'), 4.13, 4.18 (dddd, 1H, $J_{PH}=227$ Hz, $J_{HH}=7.0$ Hz, $J'_{PH}=221$ Hz, $J'_{HH}=6.0$ Hz, PH), 5.2 (m, 1H, H-3), 5.75 (d, 1H, $J=4.0$ Hz, H-1), 7.1–7.8 (m, 5H, C₆H₅),
IR (cm⁻¹) : 2325 (P-H), 1735 (C=O), 1550 (NO₂), 1430 (P-Ph), 1375 (NO₂), 720 (C-P).

- 8) 化合物 **11** のエタノール溶液に等量の 0.5 N 塩酸水溶液を加え 80 °C で 3 時間反応させた後、40–50 °C で 16 時間保った。その後、弱塩基型の陰イオン交換樹脂を用いて反応溶液中の陰イオンを交換して粗製の化合物 **12** を得た。化合物 **12** の IR スペクトルでは、

化合物 **11** の P-H 基に帰属される 2325cm^{-1} の吸収がないことによりヘミアセタール環内にリン原子が導入された化合物 **12** が生成していることを確認した。

IR (cm^{-1}): 3250 (OH), 1550 (NO_2), 1440 (P-Ph), 1375 (NO_2), 720 (C-P).

- 9) 粗製の化合物 **12** をナトリウムメトキシドとオゾンを用いて反応させた後、陽イオン交換樹脂を用いて陽イオンを交換して粗製の化合物 **13** を得た。粗製の化合物 **13** の IR スペクトルでは、化合物 **12** のニトロ基に帰属される 1550 , 1375cm^{-1} の吸収がなく、 1720cm^{-1} にカルボニル基に帰属される吸収があることよりアルデヒド誘導体 **13** が生成していることを確認した。

IR (cm^{-1}): 3250 (OH), 1720 (C=O), 1440 (P-Ph), 1160 (P=O), 720 (C-P).

- 10) 粗製の化合物 **13** を水素化ホウ素ナトリウムを用いて反応させた後、陽イオン交換樹脂を用いてナトリウムイオンを除去して粗製の化合物 **14** を得た。粗製の化合物 **14** の IR スペクトルでは、化合物 **13** のカルボニル基に帰属される 1720cm^{-1} の吸収がなくなっていることより、リン糖 **14** が生成していることを確認した。

IR (cm^{-1}): 3300 (OH), 1440 (P-Ph), 1160 (P=O), 720 (C-P).

合成したリン糖 **14** の立体異性体には、C-1 位が α と β 、C-5 位の異性に基づく L-イド体と D-グルコ体、リン原子上が R と S の全部で 8 種類が考えられる。

2.2.2 ピラノース型リン糖の異性体構造の考察

合成したリン糖 **14** の立体異性体構造を決定するために、無水酢酸とピリジンをを用いてアセチル化を行って化合物 **15** を得た。その化合物 **15** を分離精製した結果、4種類の異性体を得た。合成したリン糖のアセチル化物 **15** の立体異性体には、C-1位が α と β 、C-5位がL-イド体とD-グルコ体、リン原子上がRとSの全部で8種類が考えられるが、リン原子上のRとSは分離できていないので4種類になっている。

第1成分 **15a** : 全収率 0.2%, m. p. 203-206°C

第2成分 **15b** : 全収率 0.1%, m. p. 239-242°C

第3成分 **15c** : 全収率 0.1%, m. p. 180-182°C

第4成分 **15d** : 全収率 1.5%, m. p. 212-213°C,

MS: (m/z); 498 (M⁺), $[\alpha]_D^{12} +60.5^\circ$ (C 0.62, CHCl₃)

¹H-NMR (CDCl₃, 60Hz): δ (ppm); 1.50 (s, 3H, OAc), 1.82 (s, 3H, OAc), 1.95 (s, 3H, OAc), 2.04 (s, 3H, OAc), 2.10 (s, 3H, OAc), 2.2-2.9 (m, 2H, H-6, 6'), 4.0-4.4 (m, 2H, H-3, 4), 4.9-5.4 (m, 1H, H-5), 5.4-5.9 (m, 2H, H-1, 2), 7.3-8.1 (m, 5H, C₆H₅),

IR (cm⁻¹): 1750 (C=O), 1440 (P-Ph), 1220 (P=O), 720 (C-P).

化合物 **15d** の¹H-NMR スペクトルでは、1.5-2.1ppmにO-アセチルのプロトンに帰属されるシグナルが存在し、IR スペクトルでは化合物 **14** の水酸基に帰属される3300cm⁻¹の吸収がなく、カルボニル基に帰属される1750cm⁻¹の吸収があることより化合物 **15** の構造を支持した。化合物 **15d** の立体配置はX線回折等を詳細に行わないと明らかにできないが、化合物 **11** でD-グルコ体よりL-イド体の方が多く生成していることより化合物 **15d** は1, 2, 3, 4, 6, -ペンタ-O-アセチル-5-デオキシ-5-C-(フェニルホスフィニル)- β -L-イドピラノースと推定できる。(図 2.4)

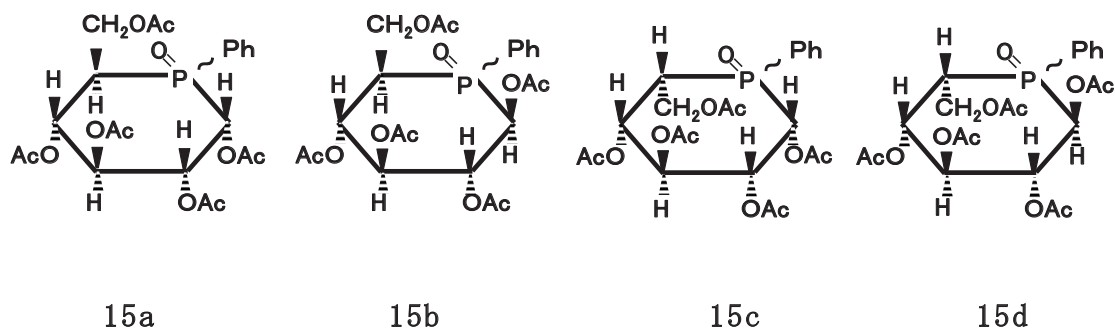


図 2.4 ピラノース型リン糖のアセチル化物 **15** の構造異性体

2.3 まとめ

ヘミアセタール環内にイオウ、窒素が入ったピラノース型のチオ糖とアミノ糖は合成されているが、六員環構造にリン原子を持つピラノース型リン糖は合成された報告例がない。また、 $C=C$ へのリン化合物付加を用いた方法が目的とするピラノース型リン糖を合成できる可能性を持っているが、ニトロ基をアルデヒド基へ変換する試みはまだ成功していない。本章では、このピラノース型リン糖の合成ルートの課題であるニトロ基のアルデヒド基、さらに水酸基への変換を β 位にニトロ基を持ったホスフィン誘導体を用いて検討し、以下の知見を得た。

- (1) ナトリウムメトキシドの強塩基存在下で、オゾンを用いた方法だけが、リン原子の電子吸引の影響を受けた $C=N$ 結合を分解でき、ニトロ基をアルデヒド基へ変換できる。
- (2) このオゾンを用いた $C=N$ 結合の分解反応は、メチル基、エチル基、イソプロピル基、フェニル基などの官能基の影響を受けない。
- (3) 水素化ホウ素ナトリウムを用いて、ホスフィン誘導体のアルデヒド基を水酸基へ変換できる。

さらに、これらの知見をもとに、 $C=C(NO_2)$ へのリン化合物の付加とオゾンを用いたニトロ基の変換反応により、新規ピラノース型リン糖を合成するルートを検討し、以下の知見を得た。

- (4) ピラノース型リン糖誘導体においても、オゾンを用いた方法で $C=N$ 結合を分解でき、ニトロ基をアルデヒド基へ変換できる。
- (5) リン糖誘導体の異性体には、 $C-1$ 位が α と β 、 $C-5$ 位の異性に基づくL-イド体とD-グルコ体、リン原子上がRとSの全部で8種類が考えられるが、主生成物である β -L-イドピラノース **15c** (図 2.4) と他の異性体の構造は同定できていない。
- (6) 新規ピラノース型リン糖の合成には成功したが、出発物質のグルコース糖から10段階の反応工程を経由するため収率は2%と低い。

以上の検討により、六員環構造のヘミアセタール環状内にリン原子を含有する新規ピラノース型リン糖の合成を初めて実現させたことは合成化学的にも興味深い成果である。しかし、グルコースなどの糖を用いた合成法では合成経路が長く、収率が非常に悪い。今回の収率では、リン糖の生理活性評価は難しいため、抗がん剤の評価は断念することとした。そこで、糖を出発物質としないフラノース型リン糖の探索について第3章で検討する。

引用文献

- 1) W. E. Noland, *Chem. Rev.*, **55**, 137 (1955).
- 2) H. Shechter and F. T. Williams, *J. Org. Chem.*, **27**, 3699 (1962).
- 3) A. H. Pagano and H. Shechter, *J. Org. Chem.*, **35**, 295 (1970).
- 4) P. A. Bartlett, F. R. Green, and T. R. Webb, *Tetrahedron Lett.*, 331 (1977).
- 5) N. Kornblum and P. A. Wade, *J. Org. Chem.*, **38**, 1418 (1973).
- 6) J. R. Williams, L. P. Unges, and R. H. Moore, *J. Org. Chem.*, **43**, 1271 (1978).
- 7) G. A. Olah, M. Arvanaghi, Y. D. Unkar, and B. K. S. Prakash, *Synthesis*, 662 (1980).
- 8) E. Keinan and Y. Mazur, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 3861 (1977).
- 9) G. A. Olah and B. G. B. Gupta, *Synthesis*, 44 (1980).
- 10) G. A. Olah, B. G. B. Gupta, S. C. Narang, and R. Malhotra, *J. Org. Chem.*, **44**, 4272 (1979).
- 11) M. R. Galobardes and H. W. Pinnick, *Tetrahedron Lett.*, **22**, 5235 (1981).
- 12) J. E. McMurry and J. Melton, *J. Org. Chem.*, **38**, 4367 (1973).
- 13) J. R. Manoon and E. Premuzic, *Tetrahedron*, **23**, 4105 (1967).
- 14) R. Kirchhoff, *Tetrahedron Lett.*, 2533 (1976).

第3章 ペントフラノース型リン糖の探索

3.1 2-ホスホレンの3, 4位アルキル基効果

3.1.1 3, 4位アルキル置換ホスホレン化合物の合成

はじめにホスホレン化合物の合成として、1,3-ジエン類とジクロロフェニルホスフィン(フェニル亜ホスホン酸ジクロリド)との反応を行った。この反応は1,3-ジエン類の種類を変えることによって無置換ホスホレン化合物、或いは3,4置換の2-ホスホレン化合物の合成が可能である。イソプレンや2,3-ジメチル-1,3-ブタジエンを用いた場合に生成される3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン 1-オキシド **17** や3,4-ジメチル-1-フェニル-2-ホスホレン 1-オキシド **18** は3位や4位のメチル基が糖骨格から枝分かれしているのでブランチ糖の範疇となり、本来のペントフラノース型リン糖合成ではメチル基が余分なもののように思われる。しかし、無置換化合物に比べ3位にメチル基を有するホスホレンに関しては生成速度が早く合成が容易であり、誘導体合成においてジアステレオマーが単離できるなどの利点がある。

2-ホスホレン化合物の合成は、三価のリンのハロゲン化合物と1,3-ジエン類との[4+2]環化付加反応が、続く加水分解或いは加アルコール分解により合成されることが知られている¹⁾。

3,4位にアルキル基を導入した2-ホスホレン化合物 **16-18** (3,4位メチル置換あるいは非置換)の合成を図3.1に示す。

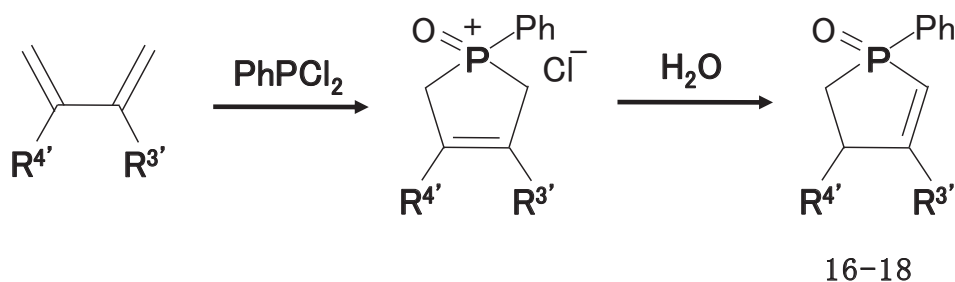


図 3.1 3,4-アルキル ($R^{3'}$, $R^{4'}$ 置換)-2-ホスホレン化合物 **16-18** の合成
(**16**: $R^{3'}=H, R^{4'}=H$, **17**: $R^{3'}=CH_3, R^{4'}=H$, **18**: $R^{3'}=CH_3, R^{4'}=CH_3$)

2-ホスホレン化合物 **16-18** の合成には、三価のリン化合物としてジクロロフェニルホスフィン、1,3-ジエン類として1,3-ブタジエン、イソプレン、2,3-ジメチル-1,3-ブタジエンの三種類を用いた。両物質を[4+2]環化付加反応を行った後に加水分解反応を行うことで不飽和結合の位置が3位から2位へと移動し、続く減圧蒸留によって精製することで、1,3-ブタジエンを用いた場合には無置換ホスホレン化合物 **16**、イソプレンを用いた場合には3置換化合物 **17**、2,3-ジメチル-1,3-ブタジエンを用いた場合には3,4置換化合物 **18** を得た。構造決定は¹H-NMR及びマススペクトルにより行った。いずれも中間体である塩化物塩ホスホニウムクロリドを経て加水分解する際にクロロ基が電子求引基であるため二重結合の位置がホスホリル基 (P=O) と共役できる位置に移動できることにより2-ホスホレン類の生成が説明される。(図3.2)

2-ホスホレン化合物 **16-18** の合成結果を表3.1に示す。

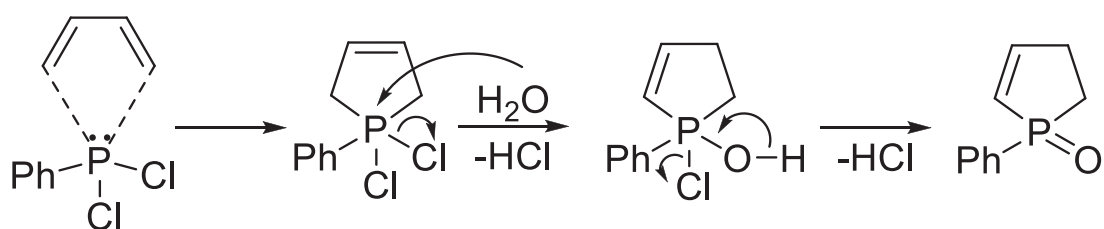


図 3.2 2-ホスホレン **16** の反応機構

表 3.1 3,4-アルキル-2-ホスホレン化合物 **16-18** の合成結果

Compound	R ^{3'}	R ^{4'}	Conditions	Yield	b.p.
16	H	H	CHCl ₃ , r.t., 4 weeks	22%	145-152 °C / 0.08 mmHg
17	CH ₃	H	CHCl ₃ , r.t., 2 weeks	68%	148-161 °C / 0.10 mmHg
18	CH ₃	CH ₃	CHCl ₃ , r.t., 2 weeks	30%	130-132 °C / 0.12 mmHg

3.1.2 3, 4 位アルキル置換 4-ブロモホスホレン化合物の合成

4 位がブロモ化した 2-ホスホレン化合物についても、3, 4 位のアルキル基効果があるかを確認するために、4-ブロモ-3, 4-アルキル-2-ホスホレン化合物 **20-22** の合成を行った。

まず、3 位の置換基効果を確認するためにエチル基を導入した 3-エチル-1-フェニル-2-ホスホレン 1-オキシド **19** を合成し、検討に追加した。

THF (テトラヒドロフラン) 溶媒下で、3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン 1-オキシド **17** とヨウ化メチル、*n*-ブチルリチウムとの反応により、3-エチル-1-フェニル-2-ホスホレン 1-オキシド **19** を収率 34% で合成した。(図 3.3)

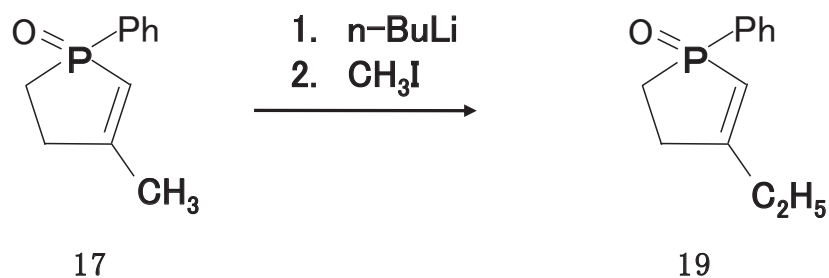


図 3.3 3-エチル-2-ホスホレン **19** の合成

次に、3, 4-アルキル-2-ホスホレン化合物 **16-19** と NBS (N-bromosuccinimide) のクロロホルム溶液をアルゴン置換した後、50 °C 下で AIBN (2, 2'-azobisisobutyronitrile) を加え、6 時間還流して 4-ブロモ置換化合物 **20-23** を合成した。(図 3.4)



図 3.4 3, 4-アルキル-4-ブロモ-2-ホスホレン化合物 **20-23** の合成
(**20**:R^{3'}=H,R^{4'}=H ; **21**:R^{3'}=CH₃,R^{4'}=H ; **22**:R^{3'}=CH₃,R^{4'}=CH₃ ;
23:R^{3'}=C₂H₅,R^{4'}=H)

3, 4-アルキル-4-ブロモ-2-ホスホレン化合物 **20-23** の合成結果を表 3.2 に示す。¹H-NMR にて δ 5.00ppm 付近に C-4 位プロトン由来の新たなピークを確認したこと、及びマススペクトルにて臭素を示唆する 2 本の同位体ピークが確認されたことによりこれらの化合物が合成されたことを確認した。

表 3.2 3, 4-アルキル-4-ブロモ-2-ホスホレン化合物 **20-23** の合成結果

No.	R ^{3'}	R ^{4'}	Yield [%]	¹ H-NMR	
				C-3	C-4
20	H	H	27	6.26-6.37(dt,1H)	5.30-5.35(t,1H)
21	CH ₃	H	56	2.22(s,3H)	4.96-5.17(dd,1H)
22	CH ₃	CH ₃	77	1.73(s,3H)	2.21(s,3H)
23	CH ₂ CH ₃	H	40 (2steps)	2.14-2.18(q,2H)	4.94(s,1H)

4 位ブロモ化の反応機構を図 3.5 に示す。アリル位の反応には、NBS と AIBN によるラジカルブロモ化²⁾が知られている。AIBN によってラジカル化され、水素ラジカルと NBS が反応しブロモイオンを発生、そしてさらに 4 位の水素が反応して 4 位がラジカル化され、臭化水素が発生して NBS と反応、臭素 Br₂ を発生し、4 位のラジカルに臭素が反応し、片方はブロモイオンとなり、またそれが反応することでブロモ化が起きる。あるいは、AIBN により生じたブロモラジカルによりアリル位の水素引き抜き反応が起き、アリル位のラジカルが臭素と反応して 4-ブロモ体を生じ臭素ラジカルが再生する。

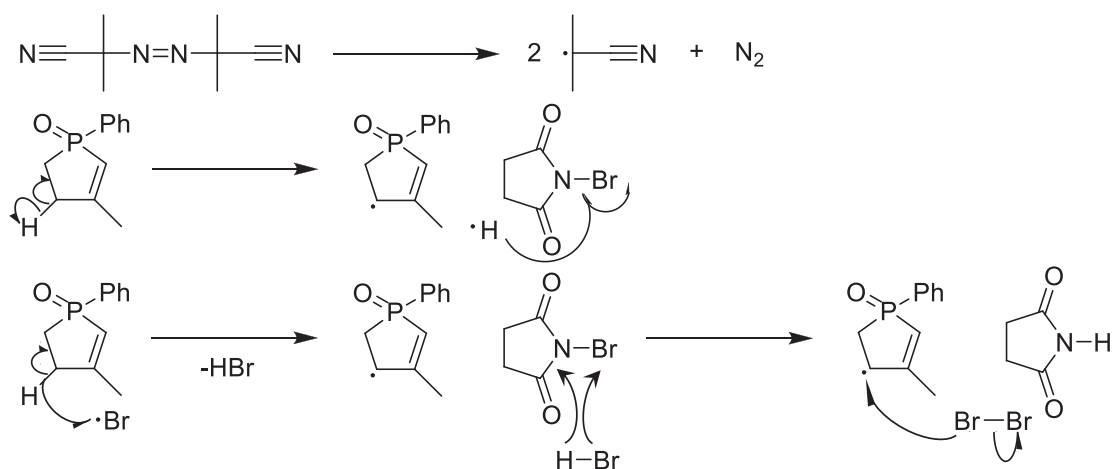


図 3.5 4位ブロモ化の反応機構

さらに、4-メチル-4-ブロモ-2-ホスホレン化合物 **21** の収率の向上を目的として溶媒の検討を行った。AIBN の開始剤としての作用温度が約 80℃で反応が進みやすいという性質があり、クロロホルムでは環流でも 60℃前後にしかならず、AIBN の作用温度に達しない。

そこで、四塩化炭素、シクロヘキサン、アセトニトリルについて溶媒検討を行った。しかし、溶媒を変化させてもあまり収率に変化がなかった (表 3.3)。その理由としては、ホスホリル基の吸引力が 4 位を不活性にしているためと考えられる。

表 3.3 4-ブロモ-2-ホスホレン化合物 (**21**) の合成溶媒効果

Compound	Solvent	Temperature [°C]	Yield [%]
21	CHCl ₃	60	32
	CCl ₄	80	34
	Cyclohexane	85	37
	CH ₃ CN	80	35

3.1.3 3, 4 位アルキル置換ホスホレンの生理活性評価

生理活性評価は、1.1.3 項で説明したように、市販薬剤のグリベックで抗がん活性が低かった急性白血球細胞U937 を用いたMTT法³⁾で行った。50%阻害濃度 IC₅₀ (Inhibitory Concentration 50%) を算出した。IC₅₀ は、がん細胞生存率が50%になる吸光度における薬剤 (抗がん剤) 濃度であり、小さいほど生理活性が高いことを意味する。市販薬剤グリベックの急性白血球細胞U937 に対する IC₅₀ は 500μM である。

3 位と 4 位をアルキル置換した 2-ホスホレン **16-18** の生理活性評価結果を表 3.4 に示す。ホスホレン **16-18** の生理活性は、3,4 位ジメチル置換化合物 **18** > 3 位メチル置換化合物 **17** > 3 位水素化合物 (非置換) **16** の順に生理活性が高く、3 位、4 位ともにメチル基に置換した化合物の IC₅₀ が 350μM であった。この値はグリベックの IC₅₀ (500μM) より高い活性を示している。

表 3.4 3, 4 位アルキル置換ホスホレン **16-18** の生理活性
(U937 細胞、37°C、48h)

Compound	Substituents at 3- and/or 4-position		IC ₅₀ [μM]
	R ^{3'}	R ^{4'}	
16	H	H	>1000
17	CH ₃	H	900
18	CH ₃	CH ₃	350

グリベック IC₅₀ : 500μM

また、3 位と 4 位をアルキル置換した 4-ブromo-2-ホスホレン **20-23** の生理活性評価結果を表 3.5 に示す。3 位と 4 位をアルキル置換した 4-ブromo-2-ホスホレン **20-23** の生理活性も、3 位、4 位ジメチル置換化合物 **20** > 3 位メチル置換化合物 **21** > 3 位水素化合物 (非置換) **22** の順に生理活性が高く、3 位、4 位ともにメチル基に置換した化合物の 50%阻害濃度 IC₅₀ が 6 μM で最も生理活性が高く、市販薬剤グリベックの 500μM より大幅に向上している。また、3 位をエチル基で置換した化合物 **23** は逆に生理活性が悪くなってしまった。理由は明確ではないが、エチル基がメチル基より長くなったために立体障害が生じたと考えられる。

表 3.5 3, 4 位アルキル置換-4-ブロモ-2-ホスホレン **20-23** の生理活性
(U937 細胞、37°C、48h)

Compound	Substituents at 3- and/or 4-position		IC ₅₀ [μ M]
	R ^{3'}	R ^{4'}	
20	H	H	>1000
21	CH ₃	H	87
22	CH ₃	CH ₃	6
23	CH ₂ CH ₃	H	>1000

市販薬剤グリベック IC₅₀ : 500 μ M

以上の結果より、2-ホスホレン化合物で高い生理活性を示すためには、4位をブロモ化した2-ホスホレンの3位と4位をメチル基にすれば良いことがわかった。

3.2 2-ホスホレンの4位ハロゲン基効果

3.2.1 4位ハロゲン置換-2-ホスホレン化合物の合成

4位のブロモ基の生理活性が高かったため、他のハロゲン基効果について検討を行った。ハロゲン基置換については、3-メチル-2-ホスホレン化合物を用いて、ブロモ基、クロロ基、ヨード基で行った。また、4位のアセトキシ基とヒドロキシ基の置換効果についても検討を行った。

i) 4-ブロモ-2-ホスホレン **21** の合成

ブロモ基置換化合物 **21** については、3.2.2項で合成を行っているので省略する。

ii) 4-クロロ-2-ホスホレン化合物 **24** の合成

3-メチル-2-ホスホレン化合物 **17** と NCS (N-chlorosuccinimide: 1.2eq.) のクロロホルム溶液をアルゴン置換した後、50℃下で AIBN (2,2'-azobisisobutyronitrile: 0.15eq.) を加え、6時間還流して、クロロ基を導入した4-クロロ-3-メチル-2-ホスホレン化合物 **24** を収率30%で合成した。(図3.6)

4-クロロ-3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン 1-オキシド **24** は、表3.6に示す様に、¹H-NMRにてδ4.60ppm付近に4位プロトン由来の新たなピークを確認したこと、及びマススペクトルのクロロ基の同位体ピークにより合成を確認した。反応機構は前述のNBSのラジカルブロモ化反応とほぼ同様であるが、ラジカルブロモ化反応に比べ総じて収率が低下している。理由としては、①クロロラジカル生成能が低い②そのアリル位への攻撃能が低い③溶媒に対する溶解度が低いなどが考えられる。

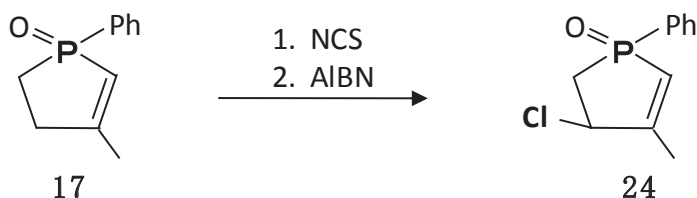


図 3.6 4-クロロ-2-ホスホレン化合物 **24** の合成

iii) 4-ヨード-2-ホスホレン化合物 **25** の合成

4-ブロモ-3-メチル-2-ホスホレン化合物 **21** のアセトン溶液に NaI (sodium iodide: 2.0eq.) を加え、12 時間還流して 4-ヨード-3-メチル-2-ホスホレン化合物 **25** を収率 60% で合成した。(図 3.7)

この化合物は $^1\text{H-NMR}$ 及びマススペクトルによって同定を行ったが、 $^1\text{H-NMR}$ では出発物質との化学シフト値が似通ったものになっているため、HPLC を測定しリテンションタイムを比較することで新たな化合物の出現を確認した。

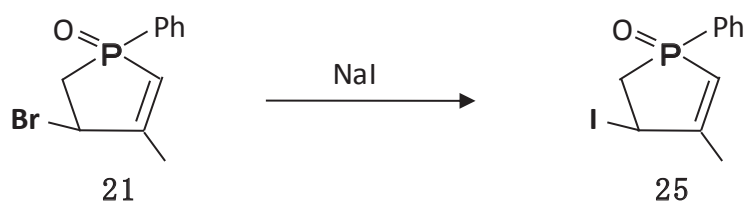


図 3.7 4-ヨード-2-ホスホレン化合物 **25** の合成

iv) 4-アセトキシ-2-ホスホレン化合物 **26** の合成

4-ブロモ-3-メチル-2-ホスホレン化合物 **21** のアセトニトリル溶液に AcONa (sodium acetate: 1.5eq.) を加え、75°C で 48 時間還流して 4-アセトキシ-3-メチル-2-ホスホレン化合物 **26** を収率 79% で合成した。(図 3.8)

4-アセトキシ-3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン 1-オキシド **26** は、表 3.6 に示すように、 $^1\text{H-NMR}$ にて δ 5.00ppm 付近の 4 位プロトン由来のピークが δ 5.73ppm までシフトしたのを確認したこと、及びマススペクトルにて出発物質由来の臭素を示唆する 2 本の分子イオンピークが消失したことにより合成を確認した。

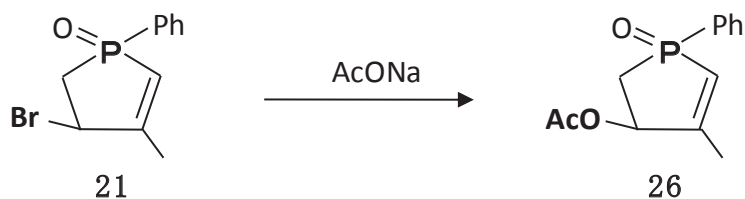


図 3.8 4-アセトキシ-2-ホスホレン化合物 **26** の合成

v) 4-ヒドロキシ-2-ホスホレン化合物 **27** の合成

4-アセトキシ-3-メチル-2-ホスホレン化合物 **26** のメタノール溶液に NaOMe (sodium methoxide: 2.0eq.) を加え、室温で 12 時間攪拌して 4-ヒドロキシ-3-メチル-2-ホスホレン化合物 **27** を収率 43% で合成した。(図 3.9)

4-ヒドロキシ-3-メチル-1-フェニル-2-ホスホレン 1-オキシド **27** は、表 3.6 に示すように、¹H-NMR にて δ 5.70ppm 付近の 4 位プロトン由来のピークが δ 4.20ppm 辺りまでシフトしたのを確認したこと、またアセトキシ基由来の δ 2.20ppm 付近のピークが消失し新たにヒドロキシ基由来の δ 3.28ppm にピークが出現したこと、及びマススペクトルにより合成を確認した。

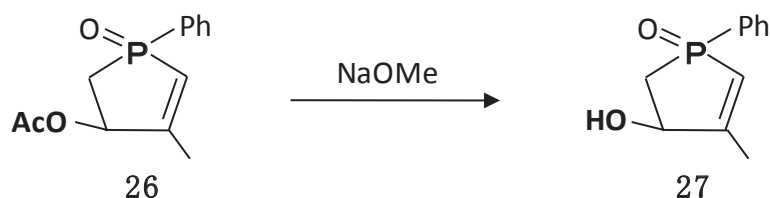


図 3.9 4-ヒドロキシ-2-ホスホレン化合物 **27** の合成

表 3.6 4 位ハロゲン置換-2-ホスホレン化合物 **21, 24-27** の合成結果

No.	R ³	R ^{4'}	Yield [%]	¹ H-NMR δ [ppm]		MS [m/z]	
				C(3)	C(4)		
21	CH ₃	Br	56	2.22(s,3H)	4.96-5.17(dd,1H)	—	271.4
24	CH ₃	Cl	30	2.08(s,3H)	4.66-4.69(d,1H)	—	227.3
25	CH ₃	I	60	2.21(s,3H)	4.82-5.14(dt,1H)	—	317.7
26	CH ₃	OAc	79	2.13(s,3H)	5.73(t,1H)	2.20(s,3H,OAc)	251.6
27	CH ₃	OH	43	2.08(s,3H)	4.20-4.23(dd,1H)	3.28(s,1H,OH)	209.5

3.2.2 4位ハロゲン置換ホスホレンの生理活性評価

4位をハロゲンで置換した3-メチル-2-ホスホレン化合物 **21**, **24-27** の生理活性評価(急性性白血病細胞U937)の結果を表 3.7 に示す。

4位をハロゲンで置換した3-メチル-2-ホスホレン **21**, **24**, **25** の生理活性は、ブromo置換化合物 **21** > ヨード置換化合物 **24** > クロロ置換化合物 **25** の順に高かった。また、アセトキシ基置換化合物 **26** とヒドロキシ基置換化合物 **27** は、ブromo置換化合物 **21** より生理活性が低かった。

表 3.7 4位置換 3-メチル-2-ホスホレン **21**, **24-27** の生理活性
(U937 細胞, 37°C, 48h)

Compound	Substituents at 3- and/or 4-position		IC ₅₀ [μM]
	R ^{3'}	R ⁴	
21	CH ₃	Br	83
24	CH ₃	Cl	800
25	CH ₃	I	160
26	CH ₃	OAc	750
27	CH ₃	OH	>1000

市販薬剤グリベック IC₅₀ : 500μM

以上の結果より、2-ホスホレン化合物で高い生理活性を示すためには、4位をブromo基にすれば良いことがわかった。

3.3 ホスホランの 2,3 位ハロゲン基効果

3.3.1 2,3 位ハロゲン付加ホスホラン化合物の合成

4 位の置換基効果でブロモの生理活性が高かったので、2,3 位のハロゲン基付加効果について検討を行った。2,3 位へのハロゲン基付加については、3-メチル-2-ホスホレン化合物を用いて、ブロモ基、クロロ基、ヨード基、フルオロ基で行った。

i) 2,3-ジブロモホスホラン化合物 **28** の合成

3-メチル-2-ホスホレン化合物 **17** のジクロロメタン溶液に二酸化マンガニ触媒 (2.0eq.) と過剰の臭素をアルゴン雰囲気下に加え、室温で 12 時間攪拌して 2,3-ジブロモ-3-メチルホスホラン混合物 **28** を収率 78% で合成した。(図 3.10)

2,3-ジブロモ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド (**28**) は、表 3.8 に示す様に、 $^1\text{H-NMR}$ ではオレフィン由来である $\delta 6.00$ ppm 辺りピークの消失を確認したこと、及びマススペクトルでは数本の同位体ピークを確認したことから合成されたと判断した。

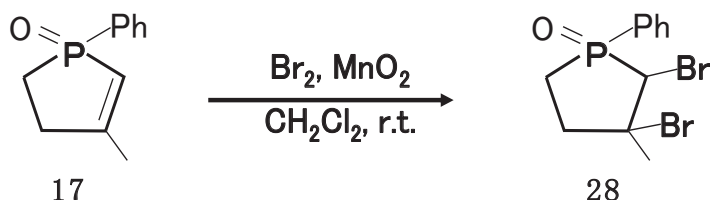


図 3.10 2,3-ジブロモホスホラン化合物 **28** の合成

ii) 2,3-ジクロロホスホラン化合物 **29** の合成

3-メチル-2-ホスホレン化合物 **17** のクロロホルム溶液に四塩化チタン触媒 (0.5eq.) と過剰の塩化スルフリルをアルゴン雰囲気下に加え、 45°C で 5 時間攪拌して 2,3-ジクロロ-3-メチルホスホラン混合物 **29** を収率 40% で合成した。(図 3.11)

2,3-ジクロロ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド **29** は、表 3.8 に示す様に、 $^1\text{H-NMR}$ ではオレフィン由来である $\delta 6.00$ ppm 辺りピークの消失を確認したこと、及びマススペクトルでは数本の同位体

ピークを確認したことから合成されたと判断した。また、ジブロモ体 **28** の $^1\text{H-NMR}$ と比較すると、3位の炭素上のクロロ基によりピークが高磁場側にシフトするが、2位のクロロ基の影響で全体では2位のプロトンは低磁場側にシフトする。

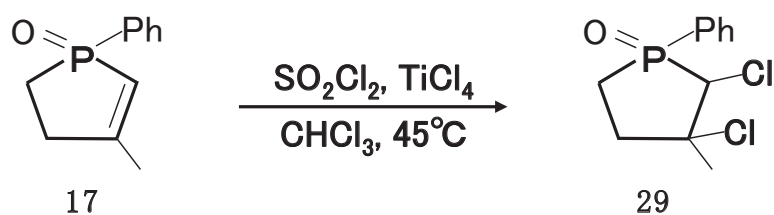


図 3.11 2,3-ジクロロホスホラン化合物 **29** の合成

iii) 2,3-ジヨードホスホラン化合物 **30** の合成

2,3-ジブロモ-3-メチルホスホラン混合物 **28** のアセトン溶液にヨウ化ナトリウム (2.0eq.) を加え、5時間還流して2,3-ジヨード-3-メチルホスホラン混合物 **30** を収率95%で合成した。(図 3.12)

2,3-ジヨード-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド **30** は、表 3.8 に示す様に、 $^1\text{H-NMR}$ 及びマススペクトルによって同定を行ったが、 $^1\text{H-NMR}$ では出発物質との化学シフト値が似通ったものになっているため、HPLC を測定しリテンションタイムを比較することで新たな化合物の出現を確認した。

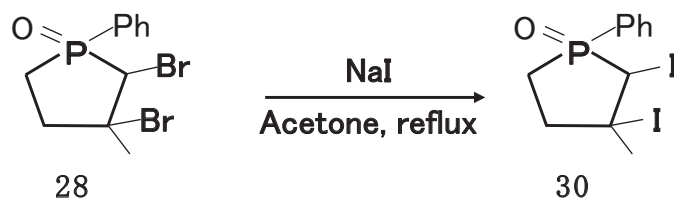


図 3.12 2,3-ジヨードホスホラン化合物 **30** の合成

iv) 2,3-ジフルオロホスホラン化合物 **31** の合成

3-メチル-2-ホスホレン化合物 **17** のジクロロメタン溶液に 5% の F_2/N_2 を $-40^\circ C$ で攪拌しながら通気させて 2,3-ジフルオロホスホラン混合物 **31** を収率 18% で合成した。(図 3.13)

2,3-ジフルオロ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド **31** は、表 3.8 に示す様に、 1H -NMR 及びマススペクトルによって同定を行った。

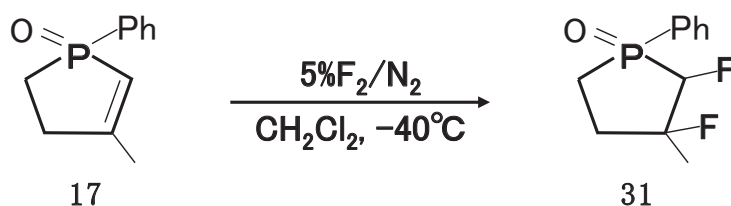


図 3.13 2,3-ジフルオロホスホラン化合物 **31** の合成

表 3.8 2,3 位ハロゲン付加ホスホラン化合物 **28-31** の合成結果
(化合物は異性体未分離の混合物)

No.	Substitution group			Yield[%]	1H -NMR δ [ppm]		MS [m/z]
	$R^{2'}$	$R^{3'}$	R^3		C(2)-H	C(3)-CH ₃	
28	Br	Br	CH ₃	78	3.33(d,1H)	2.18-2.19(m,3H)	353.2
29	Cl	Cl	CH ₃	40	4.38(dd,1H)	1.86(s,3H)	263.6
30	I	I	CH ₃	95	3.85(d,1H)	2.11(s,3H)	307.6
31	F	F	CH ₃	18	4.50-5.44(m,1H)	1.24-1.85(m,3H)	231.0

3.3.2 2,3位ハロゲン付加ホスホランの生理活性評価

2,3位をハロゲン付加したホスホラン化合物 **28-31** の生理活性評価 (MTT法 IC_{50} : 急性単芽球性白血病細胞U937)の結果を表3.9に示す。

2,3位をハロゲン付加したホスホラン混合物(28-31)の生理活性は、ジブromo混合物 **28** > ジョード混合物 **30** > ジクロロ混合物 **31** > ジクロロ混合物 **29** の順に高かった。特に、ジブromo混合物 **28** の50%阻害濃度 IC_{50} が28 μ Mで最も生理活性が高く、市販薬剤グリベックの IC_{50} (500 μ M)より大幅に向上している。

以上の結果より、2-ホスホラン化合物で高い生理活性を示すためには、2,3位をブromo基にすれば良いことがわかった。

表3.9 2,3位ハロゲン付加ホスホラン混合物 **28-31** の生理活性 (U937細胞, 37°C, 48h)

Compound	Substituents at 2- and/or 3-position			IC_{50} [μ M]
	R ²	R ³	R ^{3'}	
28	Br	Br	CH ₃	28
29	Cl	Cl	CH ₃	750
30	I	I	CH ₃	80
31	F	F	CH ₃	700

市販薬剤グリベック IC_{50} : 500 μ M

3.4 ジブロモホスホランの構造異性体効果

3.3.2 項においてジブロモホスホランの生理活性が高かったが、置換基の立体構造効果についてはまだわかっていない。そこで、2、3位にジブロモが付加した 2,3-ジブロモ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド(DBMPP)**28** を用いて構造異性体効果を検討した。

このホスホラン化合物(DBMPP)**28** には、4つのジアステレオマー(図 3.14)が存在する。今までの生理活性評価結果は4つのジアステレオマーの混合物の結果であり、それらの立体構造と生理活性の関係はわかっていない。まず、ジブロモホスホラン化合物(DBMPP)**28** の4つのジアステレオマーを分離し、その立体構造と生理活性効果の関係を明らかにする。また、生理活性効果の高いジアステレオマーを選択的に収率良く合成する方法についても検討する。

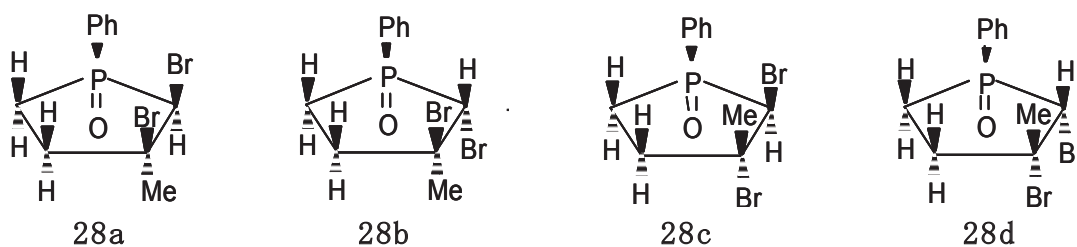


図 3.14 2,3-ジブロモ-2-メチル-1-フェニルホスホラン
1-オキシドのジアステレオマー構造 28a-d

3.4.1 ジブロモホスホランの構造異性体分離

3.4.1 項で二酸化マンガン触媒を用いて合成した 2,3-ジブロモ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシドのジアステレオマー混合物(DBMPP)**28** の分離を行った。(表 3.10)

2,3-ジブロモ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシドのジアステレオマー混合物**28** を H P L C (column: Wakopak Wakosil Φ 20.0 mm \times 250 mm; eluent: CHCl_3 : MeOH = 30 : 1; flow rate: 5.0 ml/min) を通して、4つのジアステレオマー**28a**、**28b**、**28c**、**28d** に分離した。それぞれの生成比は、異性体**28a**が27%、異性体**28b**が32%、異性体**28c**が23%、異性体**28d**が18%であり、選択的に合成されていない。

4つのジアステレオマー**28a**、**28b**、**28c**、**28d**の構造は、¹H-NMR スペクトルの C(2)-H と C(3)-Me の化学シフトと双極子モーメントによって決定した。

¹H-NMR スペクトル上において、フェニル基と同じ側にある C(2)-H と C(3)-Me のピークは、磁気異方性効果により高磁場シフトする。つまり、C(2)-H のピークでは δ 4.19ppm, δ 4.20ppm が **28a** 又は **28d** であり、 δ 4.51ppm が **28b** 又は **28c** である。また、C(3)-Me のピークでは、 δ 1.52ppm, δ 1.55ppm が **28b** 又は **28d** であり、 δ 1.56ppm が **28a** 又は **28c** である。これらの化学シフトの差より、4つのジアステレオマー**28a**、**28b**、**28c**、**28d** は、図 3.16 に示した立体構造であることがわかった。

しかし、C(3)-Me の δ 1.55ppm と δ 1.56ppm の化学シフトが小さいため、**28a-d** の立体構造から双極子モーメントを分子軌道法 (MOPAC) で計算し、HPLC の順番と比較した。双極子モーメントが小さいと極性が低くなって HPLC の時間が短くなる。計算した双極子モーメントの順序と HPLC の順序が一致していることより、**28a-d** の立体構造を決定した。

表 3.10 2,3-ジブromo-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド **28** のジアステレオマー分離

No.	HPLC ^a [min]	Dipole Moment [D]	¹ H-NMR ^b Chemical Shift / δ ppm (Coupling Constant J_{HP} /Hz)				Diastereomer ^c of MnO ₂ Catalyst
			C(2)-H	C(3)-Me	C(4,5)-H	P(1)-Ph-H	
28a	8.1	4.05	4.51(5.1)	1.56	2.24-3.13	7.51-7.88	27%
28b	9.1	5.43	4.19(7.8)	1.56	2.20-3.10	7.53-7.86	32%
28c	9.9	5.65	4.51(7.3)	1.55	2.24-2.95	7.51-7.84	23%
28d	11.5	7.05	4.20(7.2)	1.52	2.22-3.05	7.48-7.84	18%

^a The retention time was observed by HPLC analysis (column: Wakopak, Wakosil Φ 4.6 mm \times 250 mm; eluent: CHCl₃ : MeOH = 30 : 1; flow rate: 0.5 ml/min).

^b300MHz, (CD₃OD) significative proton at ppm

^cDiastereomer ratio of HPLC peak area.

3.4.2 触媒によるジブロモホスホランの選択的合成

二酸化マンガン触媒を用いた合成法では収率が78%と低く、¹H-NMRの結果から2,3-ジブロモ異性体だけでなく、4位にブロモ基が導入した4-モノブロモ体が含まれていることがわかった。これらのことから、二酸化マンガン触媒による合成では反応位置及びジアステレオマー選択性が低いと判断した。

3-メチル-2-ホスホレン化合物 **17** へのブロモ付加反応を選択的に促進させるためには、ブロモカチオンのC=Cへの攻撃性が重要である。

そこで、図 3.15 に示す様に、触媒としては、臭化マンガン、臭化銅、臭化亜鉛、臭化鉄、塩化ニッケルを用いて、3-メチル-2-ホスホレン化合物 **17** へのブロモ付加合成を行った。その触媒による合成収率向上の結果を表 3.11 に示す。

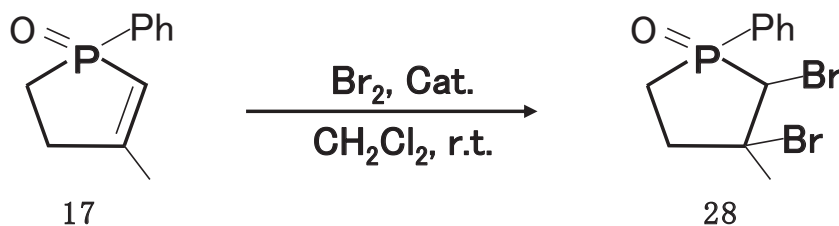


図 3.15 各種触媒を用いた 2,3-ジブロモホスホラン化合物 **28** の合成
(Catalyst: MnO₂, MnBr₂, CuBr₂, ZnBr₂, NiCl₂, FeBr₂)

3-メチル-2-ホスホレン化合物 **17** へのブロモ付加の促進触媒として、臭化マンガンを用いたものが、収率96%と最も良かった。また、¹H-NMRピークからもジブロモ体のみを効率よく合成できていることがわかった。

次に、3.5.1 項と同様な方法で、臭化マンガン触媒を用いて合成した2,3-ジブロモ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド (DBMPP) **28** のジアステレオマー混合物の分離を行った。(表 3.12)

4つのジアステレオマー**28a**、**28b**、**28c**、**28d**の構造は、二酸化マンガンを合成したジアステレオマーと同様に、¹H-NMR スペクトルの C(2)-H と C(3)-Me の化学シフトによって決定し、図 3.16 に示した立体構造である。

表 3.11 2,3-ジブロモ-3-メチル-1-フェニルホスホラン **28** 合成
の触媒効果

Entry	Catalyst	Conditions ^a	Yield [%]
1	None	CH ₂ Cl ₂ , R.t., 48 h.	33
2	MnO ₂ (2.0 equiv)	CH ₂ Cl ₂ , R.t., 12 h.	78
3	MnBr ₂ (1.0 equiv)	CH ₂ Cl ₂ , R.t., 12 h.	92
4	MnBr ₂ (0.5 equiv)	CH ₂ Cl ₂ , R.t., 4 h.	94
5	MnBr ₂ (0.5 equiv)	CH ₂ Cl ₂ , R.t., 1 h.	96
6	CuBr ₂ (0.5 equiv)	CH ₂ Cl ₂ , R.t., 1 h.	94
7	ZnBr ₂ (0.5 equiv)	CH ₂ Cl ₂ , R.t., 1 h.	86
8	NiCl ₂ (0.5 equiv)	CH ₂ Cl ₂ , R.t., 1 h.	61
9	FeBr ₂ (0.5 equiv)	CH ₂ Cl ₂ , R.t., 1 h.	31

^aR.t. means reaction temperature at room temperature.

3.4.3 臭化マンガン触媒による付加反応機構

3-メチル-2-ホスホレン化合物 **17** への臭素の付加反応機構を図 3.16 に示す。

臭化マンガン触媒を用いた臭素の付加反応機構は、4つのジアステレオマーを選択的に生成する。まず、ブロモカチオンがC=C二重結合へ求核攻撃をして、隣の臭素原子の孤立電子対が空のp軌道と重なって環状ブロモニウムイオンの中間体を生成する。そして、 MnBr_3^- イオンがC-3 またはC-2 へ攻撃をしてブロモが付加される。この時、ジブロモ構造はトランス体となる。シスジブロモ体は、 $\text{S}_{\text{N}}1$ 機構でC-3 またはC-2 上のカルボカチオンへのブロモアニオンの攻撃により異性化する。

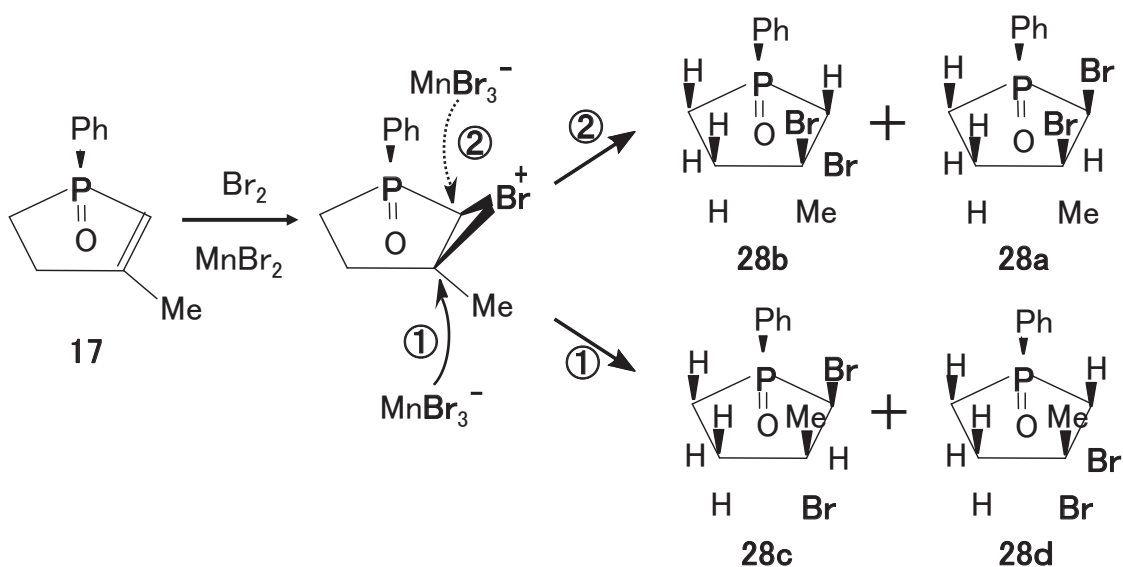


図 3.16 ジブロモ付加反応の選択的ジアステレオマー生成機構

3.4.4 ジブロモホスホラン構造異性体の生理活性評価

分離した4つのジアステレオマー**28a**、**28b**、**28c**、**28d**の生理活性をMTT法(急性単芽球性白血病細胞U937)により評価した。(表3.12)

2,3-ジブロモ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド(DBMPP)**28**の4つのジアステレオマーの生理活性は、異性体**28d**>混合物**28**>異性体**28c**>異性体**28a**>異性体**28b**の順に高く、異性体**28d**の生理活性が20 μ Mで最も高いことがわかった。

臭化マンガン触媒を用いたジアステレオマーの生成比は、異性体**28a**が3%、異性体**28b**が36%、異性体**28c**が6%、異性体**28d**が55%であり、生理活性が高い異性体**28d**が選択的に合成されている。

表 3.12 2,3-ジブロモ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド **28a-d** の MnO₂ と MnBr₂ の触媒効果

No.	HPLC ^a [min]	Diastereomer ^c by Catalyst		IC ₅₀ [μ M]
		MnO ₂	MnBr ₂	
28a	8.1	27%	3%	27
28b	9.1	23%	6%	31
28c	9.9	32%	36%	125
28d	11.5	18%	55%	20

^a The retention time was observed by HPLC analysis (column: Wakopak, Wakosil Φ 4.6 mm \times 250 mm; eluent: CHCl₃ : MeOH = 30 : 1; flow rate: 0.5 ml/min).

^cDiastereomer ratio of HPLC peak area.

生理活性効果が高い 2,3-ジブロモ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド(DBMPP:**28**)には4つのジアステレオマーが存在し、今までの生理活性評価は4つのジアステレオマー混合物であった。

ジブロモホスホラン化合物(DBMPP)**28**の4つのジアステレオマーを分離してその立体構造と生理活性効果の関係を検討した。さらに、生理活性効果の高いジアステレオマーを選択的に収率良く合成する方法についても検討して、以下の知見を得た。

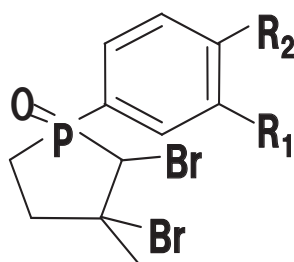
- 1) 4つのジアステレオマーの生理活性は、 MnO_2 と MnBr_2 触媒では異性体 **28d** > 混合物 **28** > 異性体 **28c** > 異性体 **28a** > 異性体 **28b** の順に高く、異性体 **28d** の白血病細胞 U937 に対する生理活性 IC_{50} は $20\mu\text{M}$ と高かった。
- 2) 触媒に臭化マンガン触媒を用いると、ブロモ付加が選択的に促進され、収率を 78% から 96% へ向上できる。さらに、生理活性が高い異性体 **28d** を 18% から 55% まで選択的に合成できる。

以上の結果より、2,3-ジブロモ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド (DBMPP) **28** の単離に成功し、生理活性が高い立体構造を特定できた。また、臭化マンガン触媒を用いることで、生理活性が高い異性体を選択的に合成できる。

3.5 ホスホランの1位フェニルの官能基効果

3.5.1 1位の部分置換フェニルホスホラン化合物の合成

2,3位へブロモ基を付加した化合物 **28** の生理活性が高かったので、1位のフェニル基を部分置換した時の生理活性効果について検討を行った。1位フェニル基の部分置換については、2,3-ジブロモ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド **28** を基本構造として、m-ニトロ基、m-シアノ基、m-ブロモ基、p-ブロモ基の置換基で行った。(図 3.17)



37-40

図 3.17 フェニル基のm位, p位を置換したジブロモ化合物 **37-40**
(**37**:R₁=NO₂,R₂=H;**38**:R₁=CN,R₂=H;**39**:R₁=Br,R₂=H;**40**:R₁=H,R₂=Br)

2,3-ジブロモ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド **28** のフェニル基のm位、p位をブロモ基、ニトロ基、アミノ基、シアノ基で置換した化合物 **37-40** の合成を図 3.18 に示す経路で行った。

以下、合成法について説明する。

- i) フェニル-2-ホスホレン **17** は、3.2.1 項の方法で合成した。
- ii) m-ニトロフェニル-2-ホスホレン **32** は濃硫酸に溶解したホスホラン化合物 **17** を氷浴中で硝酸(HNO₃:1.2eq.)を滴下し、6時間0℃で攪拌して合成した。
- iii) m-アミノフェニル-2-ホスホレン **36** は、m-ニトロフェニル-2-ホスホレン **32** を塩化スズ(SnCl₂:2.0eq.)と濃塩酸で0℃, 4h還元して合成した。
- iv) m-シアノフェニル-2-ホスホレン **33** は、m-アミノフェニル-2-ホスホレン **36** を水に溶解させ、氷浴中で濃硫酸、亜硝酸ナトリウム水溶液(NaNO₂:1.0eq.)を注ぎ0℃, 5分反応させ、シアン化銅溶液(CuCN:2.0eq.)を滴下して0℃, 5分で合成した。(収率66%)

- v) m-ブロモフェニル-2-ホスホレン **34** は、m-アミノフェニル-2-ホスホレン **36** を水に溶解させ、氷浴中で濃硫酸、亜硝酸ナトリウム水溶液 (NaNO_2 :1.0eq.) を注ぎ 0°C 、5分反応させ、臭化銅溶液 (CuBr :2.0eq.) を滴下して 0°C 、5分で合成した。
- vi) 準備したm-位、p-位置換したフェニル-2-ホスホレン **17, 32-35** を 3.4.1 項で行ったジブロモ付加と同様な方法で、2,3ジブロモ-(m-位、p-位置換したフェニル)-ホスホラン **37-40** を合成した。
- vii) m位への導入は $\text{P}=\text{O}$ の強い電子求引性のためそのまま原料となる 1-フェニルホスホレンに対し置換基を導入することができるが o-位や p-位に置換基を導入する場合、まず置換基を導入したフェニル基 (p-ジブロモベンゼン) を用意してホスホレンと反応させる必要がある。1-メトキシ-2-ホスホレンを塩化チオニルで反応させた 1-クロロ-2-ホスホレンに対して、室温で Grignard 反応を行ったところ p-位にブロモ基を有した (p-ブロモフェニル)-2-ホスホレン **35** を得た。

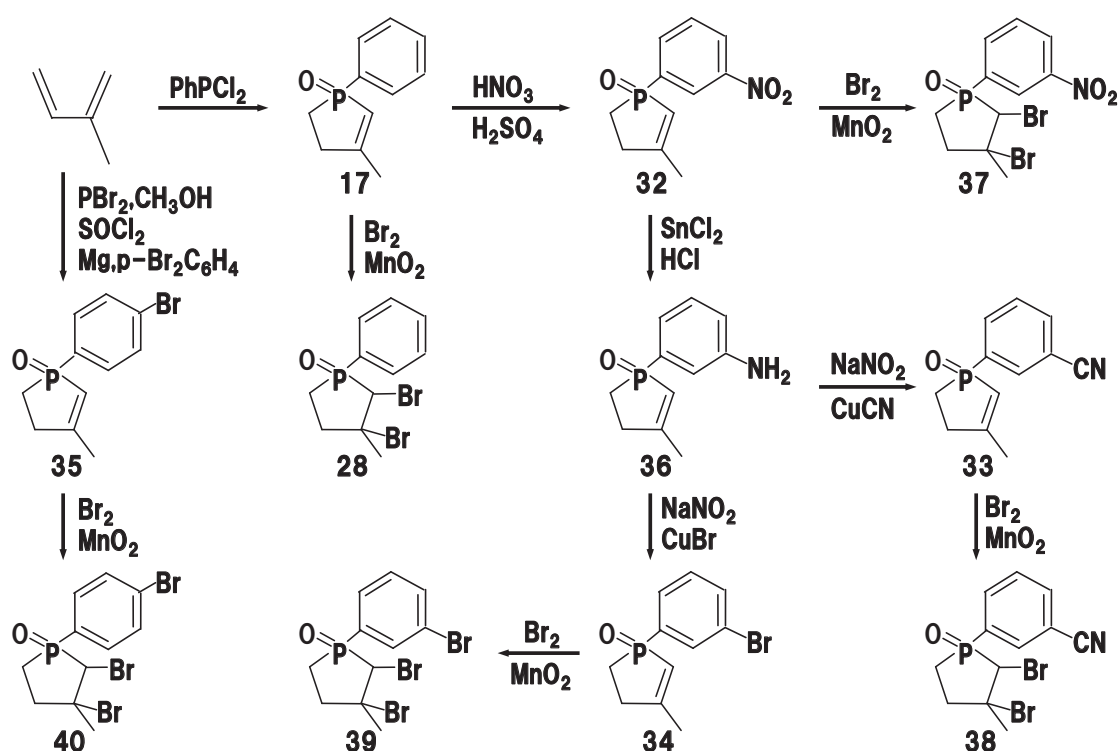


図 3.18 m 位、p 位置換したフェニルジブロモ化合物の合成経路

2-ホスホレン化合物 **17, 32-35** とホスホラン化合物 **28, 36-39** の合成結果をそれぞれ表 3.13、表 3.14 に示す。

表 3.13 3-メチル-1-(置換フェニル)-2-ホスホレン 1-オキシド **17, 32-35** の合成結果

No	Substituent		Conditions	Yield [%]
	R ₁ (m)	R ₂ (p)		
17	H	H	PhPCl ₂ , R.t., 2weeks	68
32	NO ₂	H	HNO ₃ , H ₂ SO ₄ , 0°C, 6h	97
33	CN	H	NaNO ₂ , CuCN, 0°C, 5min	66
34	Br	H	NaNO ₂ , CuBr, 0°C, 5min	47
35	H	Br	Mg, p-Br ₂ C ₆ H ₄ , THF, 4h, r.t.	64

表 3.14 2,3-ジブromo-3-メチル-1-(置換フェニル)-ホスホラン 1-オキシド **28, 37-40** の合成結果

No	Substituent		Catalyst	Conditions	Yield [%]
	R ₁ (m)	R ₂ (p)			
28	H	H	MnO ₂ (2.0 eq.)	CH ₂ Cl ₂ , R.t., 12 h.	78
37	NO ₂	H	MnO ₂ (2.0 eq.)	CH ₂ Cl ₂ , R.t., 16 h.	65
38	CN	H	MnO ₂ (2.0 eq.)	CH ₂ Cl ₂ , R.t., 16 h.	62
39	Br	H	MnO ₂ (2.0 eq.)	CH ₂ Cl ₂ , R.t., 16 h.	65
40	H	Br	MnO ₂ (2.0 eq.)	CH ₂ Cl ₂ , R.t., 16 h.	65

3.5.2 1位部分置換フェニルホスホラン化合物の生理活性評価

1位のフェニル基を部分置換した2,3-ジブromo-3-メチル-1-(置換フェニル)-ホスホラン 1-オキシド **28, 37-40** の生理活性評価 (MTT法: 急性白血病細胞 U937) の結果を表 3.15 に示す。

1位のフェニル基を部分置換したホスホラン化合物 **28, 37-40** の生理活性評価結果は、m-ブromoフェニル基化合物 **39** > フェニル基 (非置換) 化合物 **28** > p-ブromoフェニル基化合物 **40** > m-シアノフェニル基化合物 **38** > m-ニトロフェニル基化合物 **37** の順に生理活性が高かった。また、ブromo基の数が多い化合物ほど生理活性が高かった。特にブromo基が3つある2,3-ジブromo-3-メチル-1-(m-ブromoフェニル)-ホスホラン **39** の50%阻害濃度 IC₅₀ が15μMで最も生理活性が高く、市販薬剤グリベックの500μMより大幅に向上している。

表 3.15 2,3-ジブromo-3-メチル-1-(置換フェニル)-ホスホラン 1-オキシド **28, 37-40** の生理活性 (U937細胞, 37°C, 48h)

Compound	Substituted and/or		Number of Br	IC ₅₀ ^a [μM]
	unsubstituted phenyl derivative			
	R ₁ (m)	R ₂ (p)		
17	H	H	0	>1000
28	H	H	2	28
37	NO ₂	H	2	250
38	CN	H	2	70
39	Br	H	3	15
40	H	Br	3	58

^a The concentration of compounds **17, 28,** and **37-40** which caused half absorbance intensity by MTT evaluation against U937 cells.

以上の結果より、ホスホラン化合物で高い生理活性を示すためには、1位のフェニル基のm位をブromoで部分置換すれば良いことがわかった。また、ブromo基が多いホスホラン化合物ほど生理活性が高いこともわかった。

3.6 ホスホラン化合物のブロモ基数の効果

3.2.2 項で 4 位のブロモ基の生理活性が高かった事と 3.3.2 項で 2,3 位のジブロモ基の生理活性が高かった事から、2,3,4 位にトリブロモ基を導入すれば生理活性がより向上すると考え、2,3,4-トリブロモ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド (TBMPP) **41** を合成し、その生理活性を評価した。(急性白血病細胞U937)

3.6.1 トリブロモ-3-メチルホスホラン(TBMPP)**41** の合成

4-ブロモ-3-メチル-2-ホスホレン化合物 **21** の四塩化炭素溶液に臭素 (4.0eq.) をアルゴン雰囲気下に加え、80°C で 6 時間攪拌して 2,3,4-トリブロモ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド (TBMPP) **41** の 4 つのジアステレオマー混合物を収率 30% で合成した。(図 3.19)

TBMPP (**41**) は、 $^1\text{H-NMR}$ ではオレフィン由来である δ 6.00ppm 辺りピークの消失を確認したこと、及びマススペクトルでは数本の同位体ピークを確認したことから合成されたと判断した。

Data for TBMPP: Formula: $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{Br}_3\text{OP}$; Mol. Wt.: 430.90; MALDI-TOF-MS (m/z) 429.4 (MH^+ , 30), 431.4 (MH^+ , 66), 433.4 (MH^+ , 100).

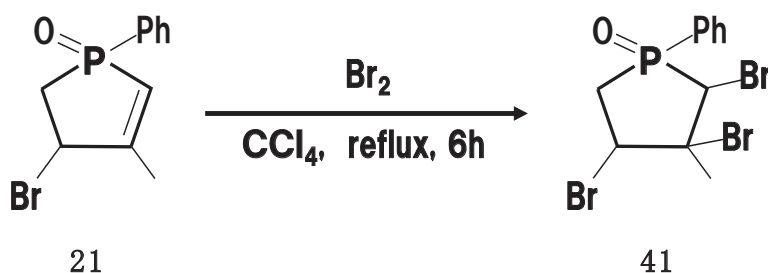


図 3.19 2,3,4-トリブロモ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド (TBMPP) **41** の合成

3.6.2 トリブロモ-3-メチルホスホラン (TBMPP) **41** の生理活性評価

2, 3, 4 位にトリブロモ基を導入した 2, 3, 4-トリブロモ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド (TBMPP) **41** の生理活性 (IC_{50} : 急性白血病細胞 U937) を評価し、4 位にモノブロモ基を導入した 4-ブロモ-3-メチル-2-フェニルホスホレン 1-オキシド (BMPP) **21** と 2, 3 位にジブロモ基を導入した 2, 3-ジブロモ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド (DBMPP) **28** と比較として、ブロモ基の数と生理活性効果 (50% 阻害濃度 IC_{50}) の関係を図 3.20 に整理した。

その結果、トリブロモ (TBMPP) **41** > ジブロモ (DBMPP) **28** > モノブロモ (BMPP) **21** の順位に、ブロモ基の数が多いほど生理活性が高かった。特に、トリブロモ (TBMPP) **41** の 50% 阻害濃度 IC_{50} が $2 \mu\text{M}$ で最も生理活性が高く、市販薬剤グリベックの IC_{50} ($500 \mu\text{M}$) より 250 倍向上している。

以上の結果より、ブロモ基の数が増加すると生理活性が向上する。

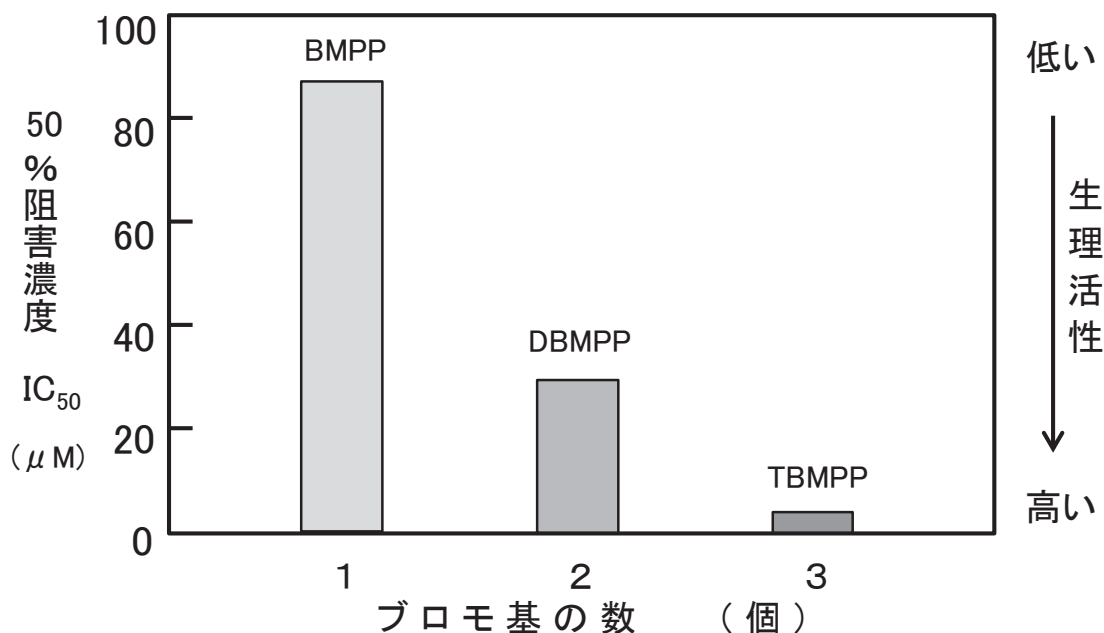


図 3.20 ブロモ基の数と生理活性効果の関係 (U937 細胞, 37°C , 48h)

3.7 まとめ

糖を出発物質としないフラノース型リン糖の合成法として、5員環の含リン複素環化合物である 2-ホスホレン化合物を出発物質とする合成ルートを用いた。この合成方法は、様々な官能基の導入反応や官能基変換反応が容易であるため 2-ホスホレン誘導体やホスホラン誘導体の官能基を検討することができる。ホスホラン誘導体の官能基を検討した新規なフラノース型リン糖の生理活性評価結果のまとめを表 3.16 に示す。

本章では、生理活性が高いフラノース型リン糖誘導体の構造を決定するために、2-ホスホレン誘導体やホスホラン誘導体の官能基を検討し、以下の知見を得た。急性単芽球性白血病細胞U937 において、市販薬剤グリベックよりも 250 倍優れた抗がん剤効果も得られている。

- (1) 2-ホスホレン化合物において、3 位と 4 位のアルキル基をメチル基にすると生理活性が高くなる。
- (2) 2-ホスホレン化合物において、4 位のハロゲン基をブロモ基にすると生理活性が高くなる。
- (3) ホスホラン化合物において、2, 3 位のハロゲン基をブロモ基にすると生理活性が高くなる。
- (4) ホスホラン化合物において、1 位のフェニル基を m-ブロモ置換すると生理活性が高くなる。
- (5) ブロモ基が多いホスホラン化合物ほど生理活性が高い。

以上の検討結果を総合すると、ブロモ基とメチル基の数が多く、特に 2, 3, 4 位が効果的であることがわかった。

したがって、最も生理活性が高くなる新規ペントフラノース型リン糖誘導体は、下記の構造[2, 3, 4-トリブロモ-3, 4-ジメチル-1-(m-ブロモフェニル)-ホスホラン 1-オキシド]になると予測される。(図 3.21)

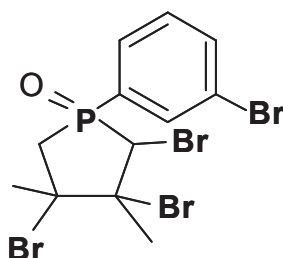


図 3.21 構造－活性相関より高活性が期待される新規フラノース型リン糖誘導体

表 3.16 フラノース型リン糖の生理活性評価 (IC₅₀) まとめ
(U937 細胞, 37°C, 48h)

部位	No.	官能基						Br 基 の数	IC ₅₀ [μM]
		R ¹	R ²	R ³	R ^{3'}	R ^{4'}	R ⁴		
3 位	16	Ph	H	H	H	H	H	0	>1000
4 位	17	Ph	H	H	CH₃	H	H	0	900
	18	Ph	H	H	CH₃	CH₃	H	0	350
	20	Ph	H	H	H	H	Br	1	>1000
	22	Ph	H	H	CH₃	CH₃	Br	1	6
	23	Ph	H	H	CH ₂ CH ₃	H	Br	1	>1000
4 位	21	Ph	H	H	CH₃	H	Br	1	83
	24	Ph	H	H	CH₃	H	Cl	0	800
	25	Ph	H	H	CH₃	H	I	0	160
	26	Ph	H	H	CH₃	H	OAc	0	750
	27	Ph	H	H	CH₃	H	OH	0	>1000
2 位	28	Ph	Br	Br	CH₃	H	H	2	28
3 位	28a	Ph	Br	Br	CH₃	H	H	2	27
	28b	Ph	Br	Br	CH₃	H	H	2	31
	28c	Ph	Br	Br	CH₃	H	H	2	125
	28d	Ph	Br	Br	CH₃	H	H	2	20
	29	Ph	Cl	Cl	CH₃	H	H	0	750
	30	Ph	I	I	CH₃	H	H	0	80
	31	Ph	F	F	CH₃	H	H	0	700
1 位	37	m-NO ₂ Ph	Br	Br	CH₃	H	H	2	250
	38	m-CN Ph	Br	Br	CH₃	H	H	2	70
	39	m- Br Ph	Br	Br	CH₃	H	H	3	15
	40	p- Br	Br	Br	CH₃	H	H	3	58
2, 3, 4	41	Ph	Br	Br	CH₃	H	Br	3	2

市販薬剤グリベック IC₅₀ : 500μM

引用文献

- 1) L. D. Quin, J. P. Gratz, and T. P. Barket, *J. Org. Chem.*, **33**, 1034-1036 (1968).
- 2) マクマリー有機化学(上), 352 (1988).
- 3) S. Nakamura, S. Yamashita, D. Yokota, I. Hirano, T. Ono, M. Fujie, K. Shibata, T. Niimi, T. Suyama, K. Maddli, K. Asai, J. Yamashita, Y. Iguchi, and K. Ohnishi, *Invest. New Drugs*, **28**(4), 381 (2010).

第4章 新規なリン糖抗がん剤の生理活性と作用機序

4.1 新規なリン糖抗がん剤の生理活性

慢性骨髄性白血病細胞K562、急性単芽球性白血病細胞U937以外の白血病細胞に対する新規なリン糖であるブロモホスホラン類（DBMPP、TBMPP）の抗がん活性を評価した。

4.1.1 生理活性評価法（MTT法）

がん細胞の生死判別法のひとつであるMTT法は比色法の一つであり、黄色のテトラゾリウム塩である3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)を青色のホルマザン産物へ転換することを原理としている¹⁾。放射性同位体を使用せずかつ短時間で結果が得られるため、薬剤感受性試験などのスクリーニング試験に多用されている方法である。

そのMTT法の原理を図4.1に示す。脱水素酵素による反応によってMTTとNADHの間に酸化還元反応が起こり、MTTがホルマザンに還元されNADHがNAD⁺に酸化される。脱水素酵素はミトコンドリアの呼吸鎖に関連する酵素であるので、サンプル中の細胞が生存していればホルマザンへの還元が活発に起こり570 nmの吸収が見られるが、ミトコンドリアが死滅している場合はホルマザンが生成されないため吸収が見られない。従って、吸光度の度合いによってサンプル中の細胞の生存数をおおよそ知ることができる。即ち、吸光度の減少が低濃度で現れるほどよりよい活性を持つということの意味する。

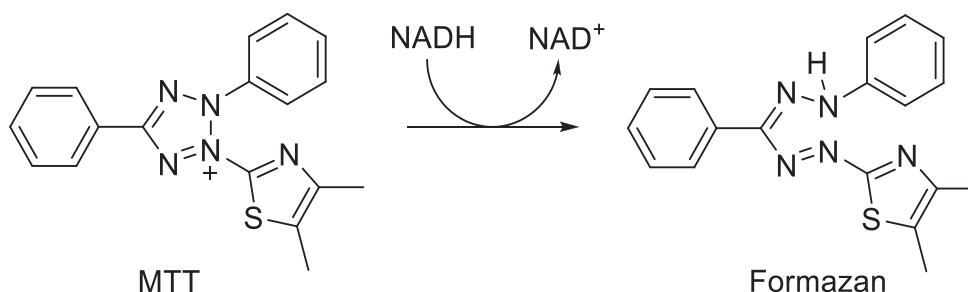


図 4.1 MTT法の原理図¹⁾

4.1.2 リン糖の高生理活性の検証

まず、白血病細胞の増殖に対するリン糖の抑制効果を評価した。トリブロモホスホラン TBMPP(10 μ M)とジブロモホスホラン DBMPP(20 μ M)をそれぞれ添加して、急性白血病細胞 U937(3 $\times 10^4$ 個)の増殖を評価した。その結果、新規な分子標的抗リン糖がん剤であるブロモホスホラン(DBMPP、TBMPP)を添加したものは白血病細胞が増殖せず、逆に 5.6%、14.8%まで大幅に減少した。新規なリン糖は、白血病細胞の増殖に対する抑制効果があることがわかった。(図 4.2)

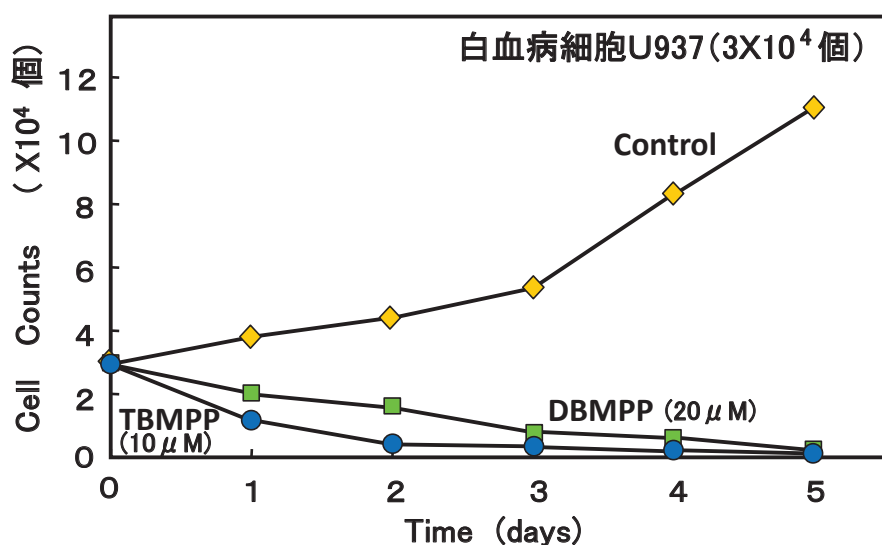


図 4.2 急性白血病細胞 U937 の細胞増殖に対するリン糖抗がん剤(DBMPP, TBMPP)の効果

次に、白血病である慢性白血病細胞 K562 と急性白血病細胞 U937 に対する抗がん効果を評価するために、2,3 位にジブロモを導入した 2,3-トリブロモ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド (DBMPP) 28 と 2,3,4 位にトリブロモ基を導入した 2,3,4-トリブロモ-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド (TBMPP) 41 と市販薬剤グリベックの生理活性評価(MTT 法)を行った。(図 4.3、図 4.4)

慢性白血病細胞 K562 においては、ブロモ基の数が多いほど生理活性が高く、トリブロモホスホラン(TBMPP)の 50%阻害濃度 IC_{50} が 8 μ M であり、グリベックの 3 μ M に近い値を示した。また、グリベックでも効果が小さい急性白血病細胞 U937 においても、TBMPP の 50%阻害濃度 IC_{50} が 2 μ M で最も高く、グリベックの 250 倍の生理活性を示した。

新規なリン糖であるブロモホスホラン(DBMPP、TBMPP)は、慢性白血病細胞K562だけでなく、細胞分裂の上流の白血病細胞である急性白血病細胞U937（図 1.5 参照）にも抗がん作用があり、高生理活性であることがわかった。

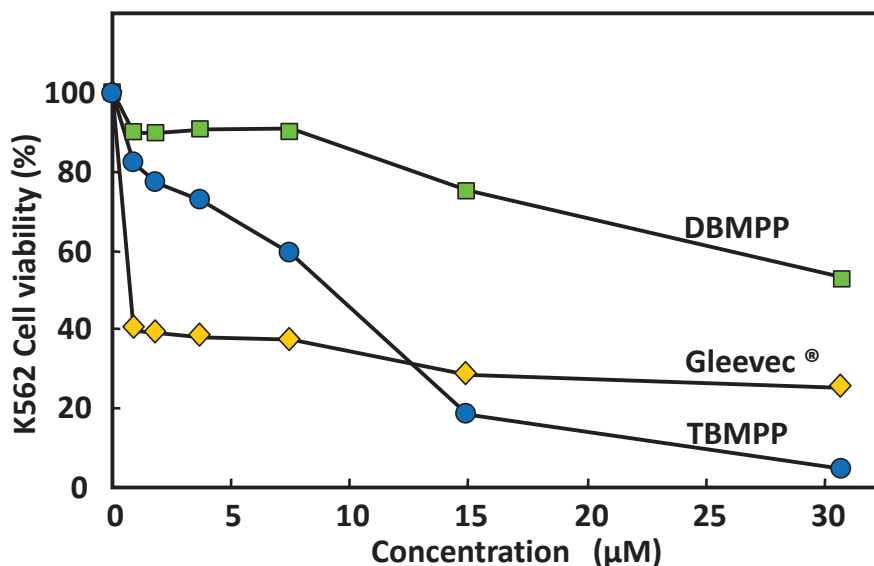


図 4.3 慢性白血病細胞 K562 に対するリン糖抗がん剤 (DBMPP, TBMPP) の効果

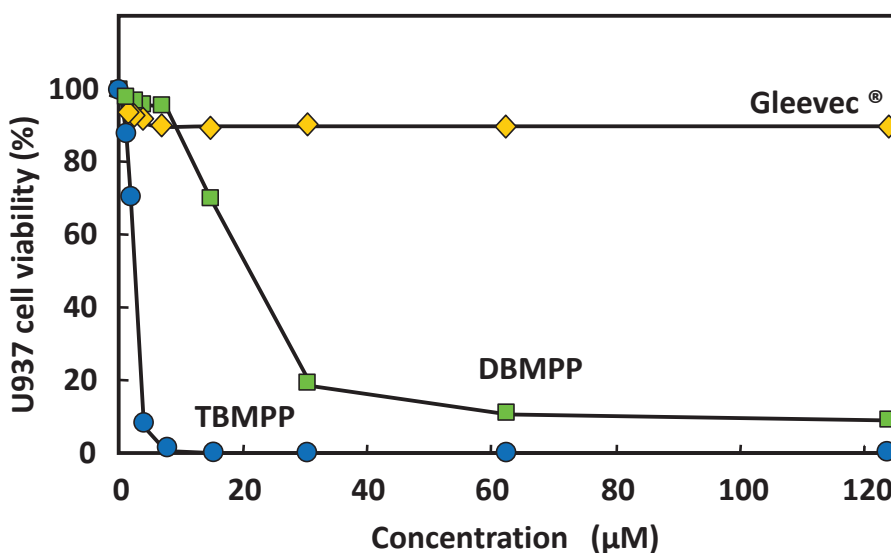


図 4.4 急性白血病細胞 U937 に対するリン糖抗がん剤 (DBMPP, TBMPP) の効果

4.1.3 リン糖の広いスペクトル幅の検証

1.1.3 項で示した様に、白血病細胞には種々のがん細胞が存在する。そこで、全部で11種類のヒト白血病細胞に対するリン糖抗がん剤の生理活性を評価して、リン糖抗がん剤のスペクトル幅の広さを調査した。その結果を表4.1に示す。

ヒト白血病細胞株としては、①慢性骨髄性白血病細胞 K562、②急性単芽球性白血病細胞 U937、③急性前骨髄性白血病細胞 HL60、④急性前骨髄性白血病細胞 NB4、⑤急性骨髄性白血病細胞 YRK2、⑥急性単芽球性白血病細胞 NOMO-1、⑦急性リンパ性白血病細胞 CEM、⑧急性リンパ芽球性白血病細胞 MOLT4、⑨急性B前駆リンパ性白血病細胞 SUP-B15、⑩慢性巨核芽球性白血病細胞 MEG-01、⑪慢性骨髄性白血病細胞 SHG3 を用いて、DBMPP 28 と TBMP 41 のMTT評価（50%阻害濃度 IC₅₀）を行った。

50%阻害濃度 IC₅₀ の評価結果において、新規なリン糖抗がん剤であるブromoホスホラン類(DBMPP、TBMP)は、多くの白血病細胞(K562、U937、HL60、NB4、YRK2、NOMO-1、CEM、MOLT4、SUP-B15、MEG-01、SHG3)に対して高い抗がん作用を示した。新規リン糖抗がん剤は、高い活性と広いスペクトル幅を持っていることがわかった。

表 4.1 各種白血病細胞に対するリン糖の生理活性評価(IC₅₀)
(37°C, 48h)

No.	ヒト白血病細胞名		TBMPP	DBMPP
			IC ₅₀ (μ M)	IC ₅₀ (μ M)
1	K562	慢性骨髄性白血病細胞(CML)	9.1 \pm 0.8	28 \pm 1.7
2	U937	急性単芽球性白血病細胞(AML)	6.2 \pm 1.1	22 \pm 1.8
3	HL60	急性前骨髄性白血病細胞(AML)	4.8 \pm 1.0	18 \pm 1.5
4	NB4	急性前骨髄性白血病細胞(AML)	3.2 \pm 0.9	15 \pm 1.4
5	YRK2	急性骨髄性白血病細胞(AML)	5.3 \pm 1.3	28 \pm 2.6
6	NOMO-1	急性単芽球性白血病細胞(AML)	5.5 \pm 0.8	18 \pm 2.1
7	CEM	急性リンパ性白血病細胞(ALL)	6.9 \pm 0.3	29 \pm 2.4
8	MOLT4	急性リンパ芽球性白血病細胞(CLL)	6.7 \pm 1.2	26 \pm 1.8
9	SUP-B15	急性B前駆リンパ性白血病細胞(PLL)	7.1 \pm 1.0	24 \pm 2.8
10	MEG-01	慢性巨核芽球性白血病細胞(CML)	8.6 \pm 1.4	27 \pm 1.9
11	SHG3	慢性骨髄性白血病細胞(CMML)	5.4 \pm 0.6	26 \pm 2.1

4.1.4 リン糖の高選択性の検証

ハロゲン誘導体はそのハロゲン脱離による毒性が懸念されるため、リン糖ハロゲン誘導体の毒性評価を行った。健常血液のみと健常血液に白血病細胞K562を40%加えた混合血液の異なる試料に対するジブロモホスホラン(DBMPP) 28の影響をMTT法で評価した。(図4.5)

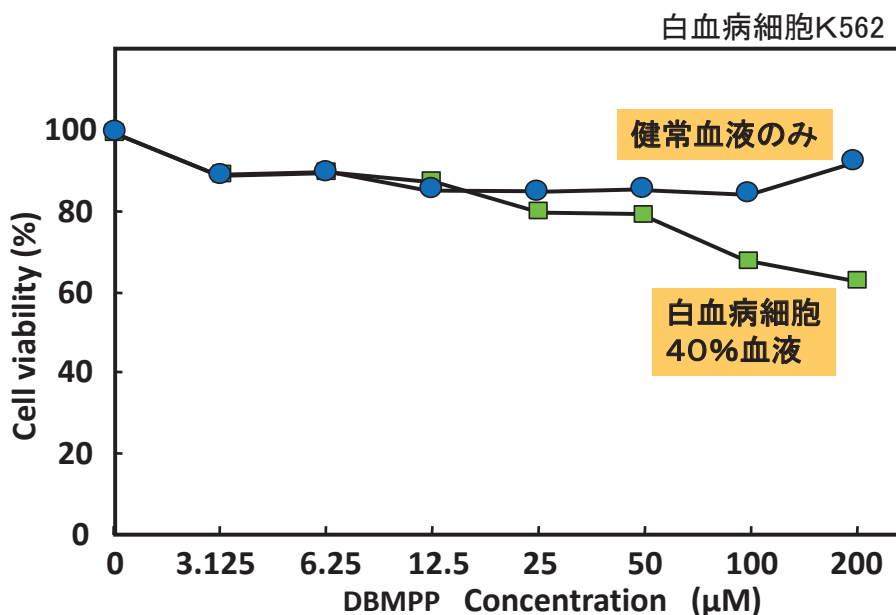


図4.5 健常血液と白血病細胞40%混合血液の異なる試料に対するDBMPPのMTT評価

健常人の血液では吸光度の減少はほとんど見られない。一方、白血病細胞K562を40%加えた混合血液は吸光度の減少が見られることから、血液中に存在するがん細胞にのみリン糖抗がん剤が作用されているということが示唆される。即ち、リン糖抗がん剤が健常細胞には害を与えず、がん細胞にのみに作用しているということが考えられる。つまり、新規なリン糖抗がん剤はがん細胞だけを攻撃する高い選択性を持ち、毒性が少ないと予測される。

4.1.5 新規なリン糖抗がん活性評価のまとめ

慢性骨髄性白血病細胞 K562 よりも上流にある急性単芽球性白血病細胞 U937 に対して、新規なリン糖抗がん剤は市販薬剤グリベックの 250 倍の高い活性を示した。

また、新規なリン糖抗がん剤は、11 種類の白血病細胞に対して活性であり、スペクトル幅が広い抗がん剤である。

さらに、新規なリン糖抗がん剤は健常細胞に害を与えず、がん細胞だけを攻撃する高い選択性を持つ。

以上の事より、新規なリン糖であるブロモホスホラン類 (DBMPP、TBMPP) は、一つの抗がん剤で複数の白血病細胞に効果がある多標的型分子標的薬剤の可能性がある。

4.2 新規なリン糖抗がん剤の作用機序

細胞死にはアポトーシス（細胞の自殺）とネクローシス（毒物死）がある。アポトーシスによる細胞死は様々な情報を細胞が自ら総合的に判断して、細胞内に内蔵された自死装置を作動させることによって起こる。一方、ネクローシスによる細胞死は毒物や放射線照射といった化学的および物理的な要因によって引き起こされる。アポトーシスは G1 期に入る前 DNA を断片化して小さくなったものであるなのでこの時を SubG1 期と呼び、この細胞状態が薬剤投与後に増えているようであればアポトーシスであるということになるのである。図 4.6 に示す様に、アポトーシスは細胞が縮小して小さく断片化するのに対して、ネクローシスは細胞が水泡化して大きく膨潤し、壊れる。²⁾

1.2.1 項でも述べたが、近年のアポトーシス制御に関する多数の因子・遺伝子の同定などの研究に伴ってがん増殖には、アポトーシス制御の異常が関与していることがわかってきた。また、抗がん剤ががん細胞のアポトーシスを誘導することもわかってきた。³⁾

リン糖抗がん剤が細胞周期依存型抗がん剤であるためには、がん細胞の細胞周期を制御するタンパク質に作用し、増殖の細胞周期を止めなければならない。つまり、アポトーシス細胞死を誘導しなければならない。

本項では、アポトーシスが起きているかを評価し、細胞周期を制御するどのタンパク質に作用しているかを考察する。

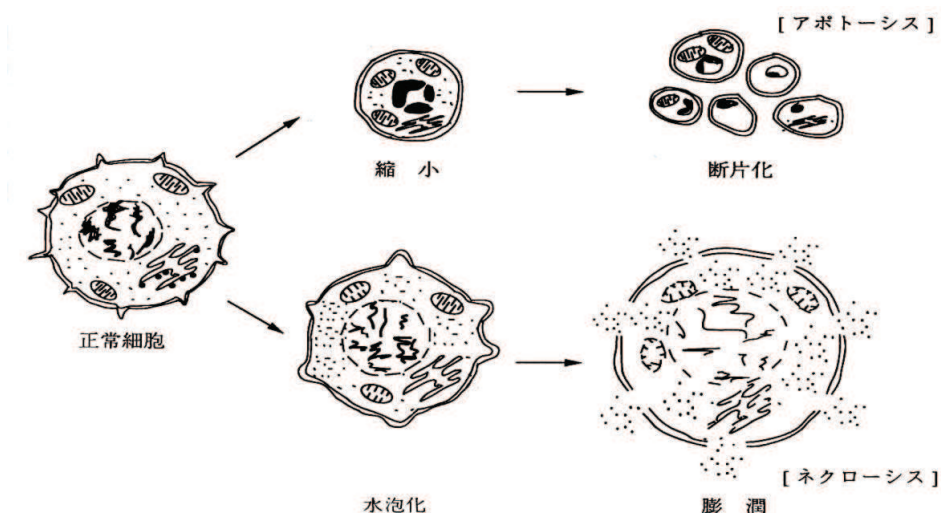


図 4.6 アポトーシスとネクローシス²⁾

4.2.1 フローサイトメトリーによる細胞周期解析

(1) フローサイトメトリー法

フローサイトメトリー法⁴⁾は短時間に多数の細胞個々の様々な特性を測定できる方法である。たとえば、細胞のサイズ変化やDNAから細胞周期を解析することができる。(図4.7)

分子標的リン糖抗がん剤であるブロモホスホラン(DBMPP、TBMPP)の白血病細胞U937に対するアポトーシスを確認するため、DNA断片化細胞をフローサイトメトリーで検出し、細胞周期解析を行った。実際は、エタノールでDNAをヨウ化プロピジウム(PI)で染色して細胞周期のSubG1および、その他の細胞周期に存在するDNA含量をもつ細胞の計測値を測定した。

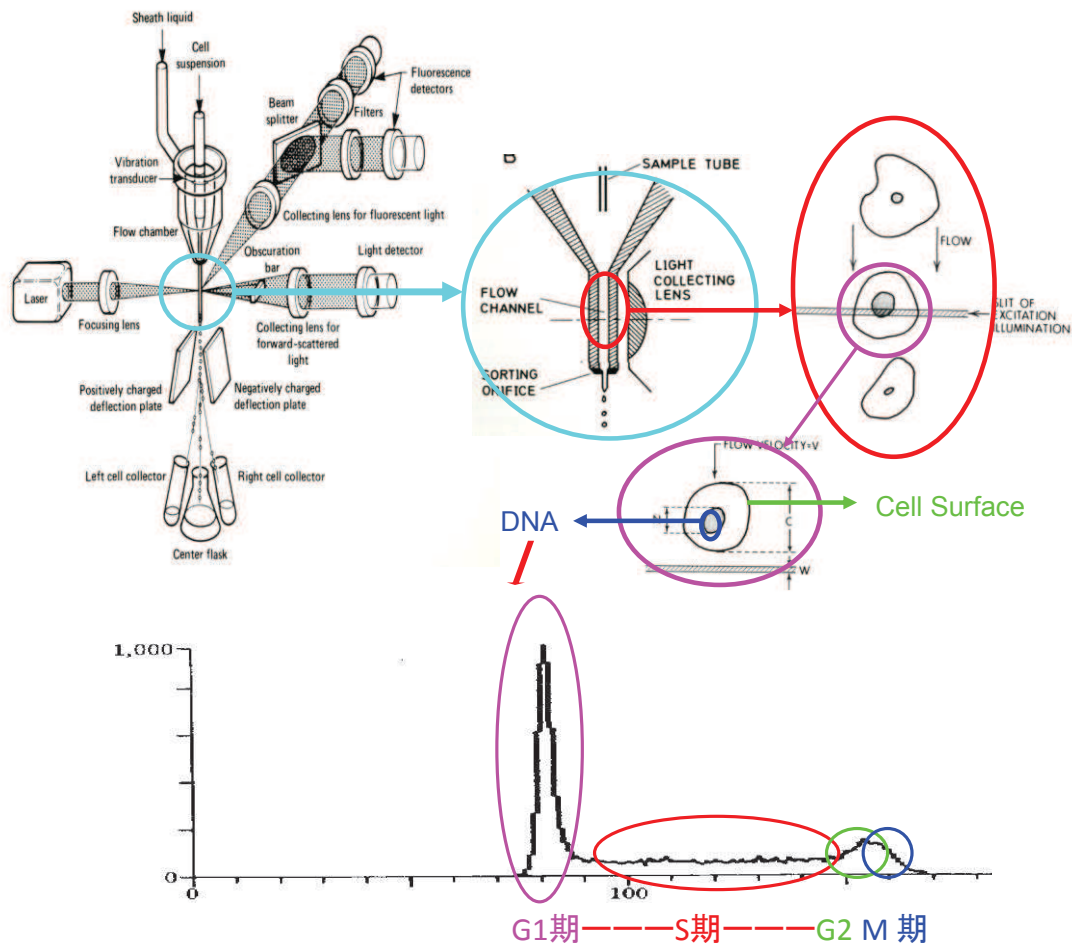


図 4.7 フローサイトメトリー概略図⁴⁾

(2) 核の細分化観察によるアポトーシスの確認

がん細胞の死滅がアポトーシスであるかを核(DNA)の細分化の観察により確認をした。(図 4.8)

リン糖抗がん剤であるトリブロモホスホラン(TBMPP)と投与することで、がん細胞が縮小して断片化しているのがわかる。つまり、リン糖がアポトーシスを誘導している。

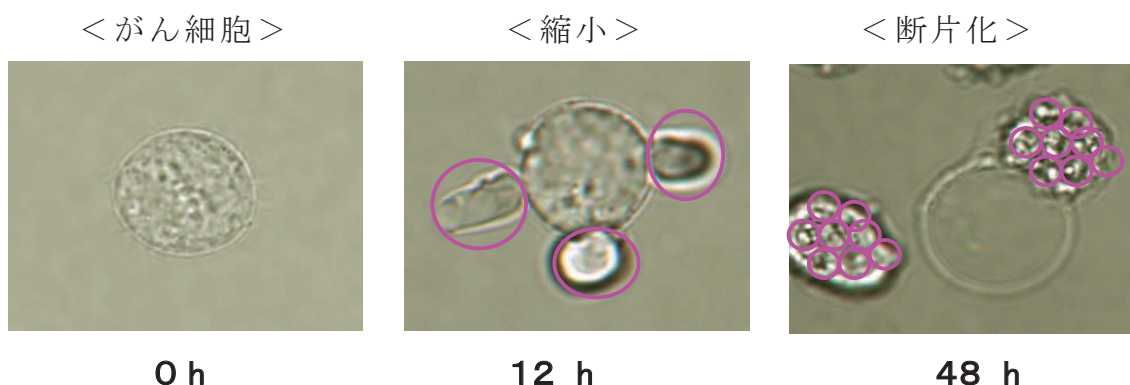


図 4.8 核の細分化観察 (白血病細胞 K562, TBMPP:20μM)

(3) 細胞周期の DNA 解析によるアポトーシスの確認

リン糖抗がん剤投与によるアポトーシスの生成を確認するために、リン糖抗がん剤(TBMPP)を投与した急性単芽球性白血病細胞 U 937 のフローサイトメトリーによる細胞周期の DNA 解析を行った。(図 4.9)

48 時間後にアポトーシスの細胞状態である SubG1 期に起因するピークが増加しているのがわかる。

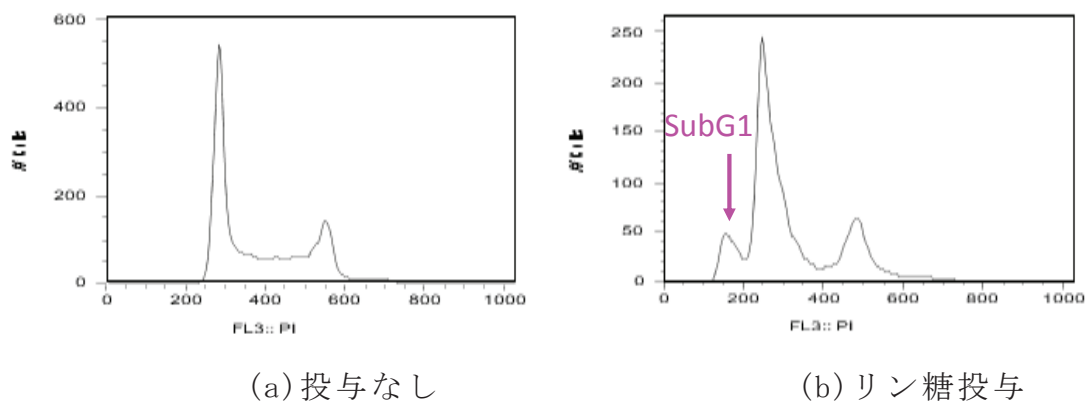


図 4.9 リン糖投与の白血病細胞 U 937 の細胞周期解析
TBMPP (10μM、48 h)

(4) リン糖抗がん剤投与によるアポトーシス生成率

リン糖抗がん剤の投与によりアポトーシスの生成率がどの程度増加しているかを定量するために、リン糖抗がん剤 TBMPP の投与量 (10 μ M, 20 μ M) で、急性単芽球性白血病細胞 U937 の細胞周期解析を行った。

その結果、TBMPP (10 μ M) は、G1 期と S 期の細胞を減少させ、G2/M を増加させている。TBMPP (20 μ M) では、アポトーシス (SubG1 期) が増加し、アポトーシス生成比率が 78% になった。(図 4.10)

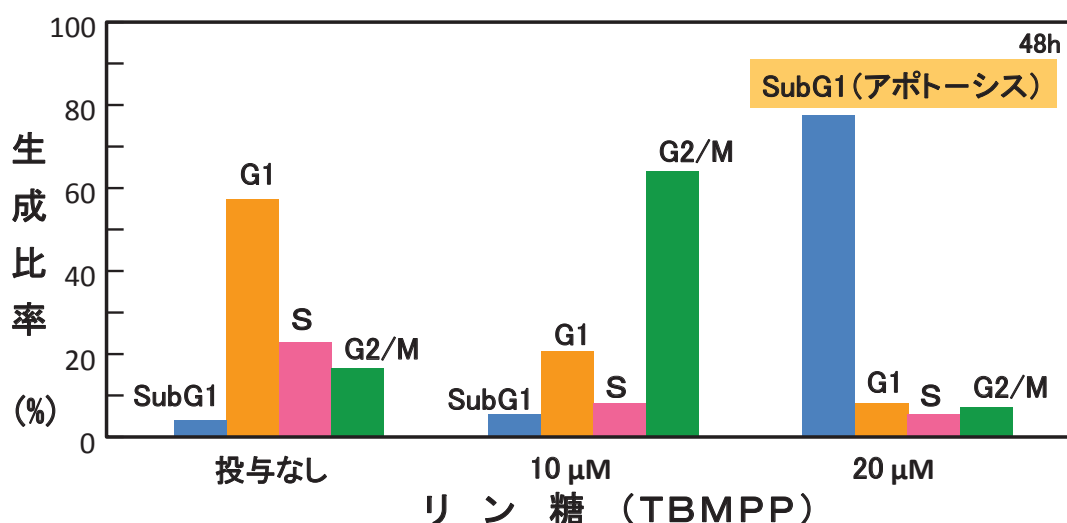


図 4.10 リン糖投与の白血病細胞 U937 のアポトーシス生成比

(5) 白血病細胞の種類に対するアポトーシス生成率

白血病細胞の種類に対するアポトーシス生成率を評価するために、11 種類の白血病細胞 (K562、U937、HL60、NB4、YRK2、NOMO-1、CEM、MOLT4、SUP-B15、MEG-01、SHG3) に対して、トリブロモホスホンラン (TBMPP) を 20 μ M 投与し、48 時間後のアポトーシスの比率を評価した。(図 4.11)

その結果、全ての白血病細胞において、75~83% のアポトーシスが認められた。

以上の結果から、フローサイトメーターによる細胞周期解析により、新規なリン糖抗がん剤であるブロモホスホンラン (TBMPP, DBMPP) は、全ての白血病細胞に対して SubG1 の出現よりアポトーシスを誘導して死滅させていることが判明した。

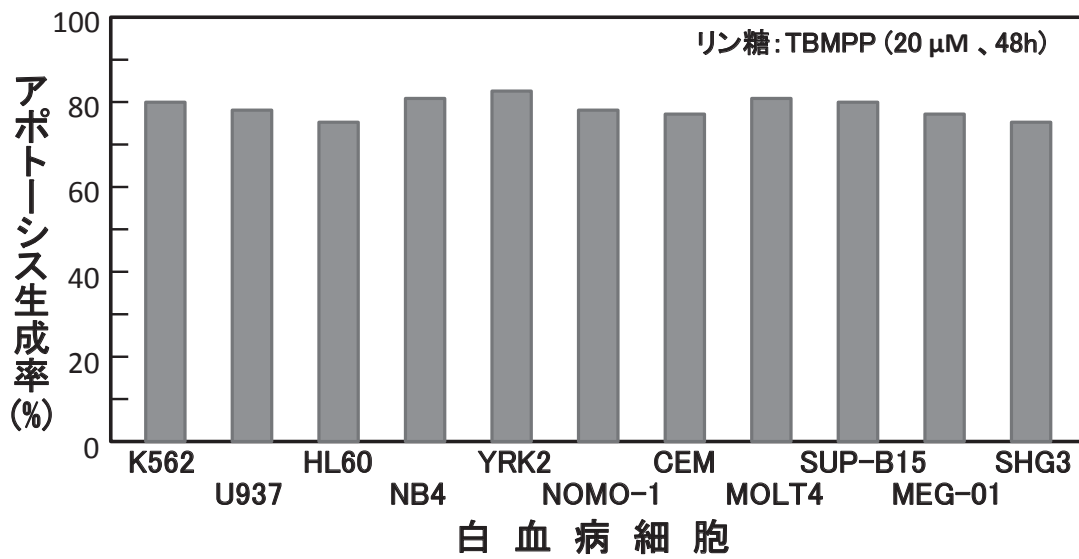


図 4.11 各種白血病細胞に対するリン糖投与のアポトーシス生成率
(TBMPPP : 20μM、48 h)

4.2.2 白血病の細胞周期を制御しているタンパク質の解明⁵⁾

新規なリン糖抗がん剤は、がん細胞の細胞周期を制御しているタンパク質にどの様に作用しているかを明確にするためにタンパク質発現解析を行った。⁶⁾

慢性骨髄性白血病細胞 K562 と新規なリン糖抗がん剤 (DBMPP) を用いて、がん抑制遺伝子の DUB-3、PHLPP、p27 とがん増殖遺伝子の Aurora-A、Aurora-B、Survivin、FoxM1、Skp2、hKIS、KPC1、Pirh2 についてタンパク質発現解析を行った (図 4.12)。その結果、リン糖 (DBMPP) はがん遺伝子 FoxM1 のタンパク質を抑制、つまり、がん細胞の増殖を抑制できていることがわかった。

次に、急性単芽球性白血病細胞 U937 とリン糖 (DBMPP) を用いて、がん抑制遺伝子の p27、p21 とがん遺伝子の FoxM1、KIS、Skp2、Cyclin D1、Survivin、Aurora-B、Actin についてタンパク質発現解析を行った (図 4.13)。その結果、リン糖 (DBMPP) は、がん抑制遺伝子のタンパク質を促進し、がん増殖遺伝子 FoxM1、KIS、Skp2、Cyclin D1、Survivin、Aurora-B のタンパク質を抑制できていることがわかった。

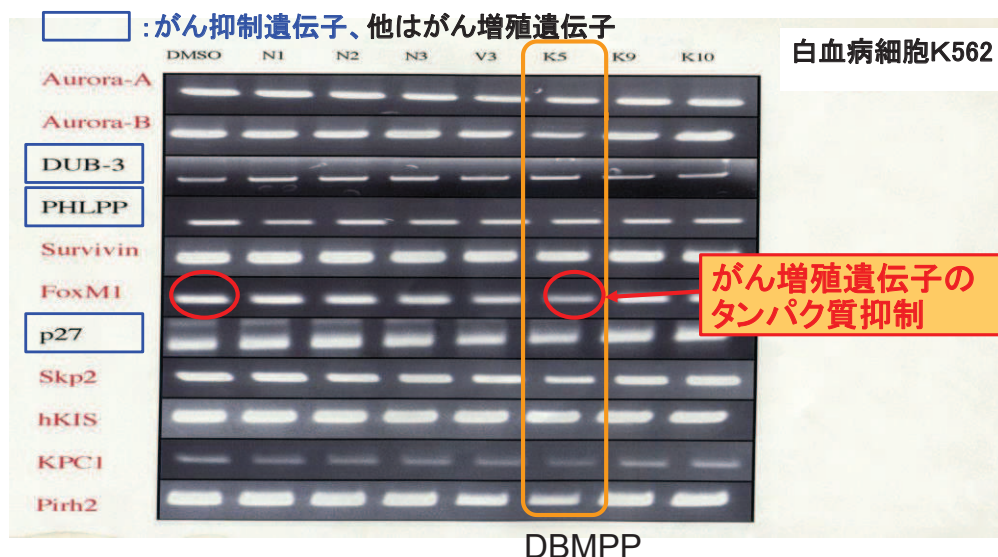


図 4.12 リン糖 (DBMPP) による白血病細胞 K562 のタンパク質発現解析

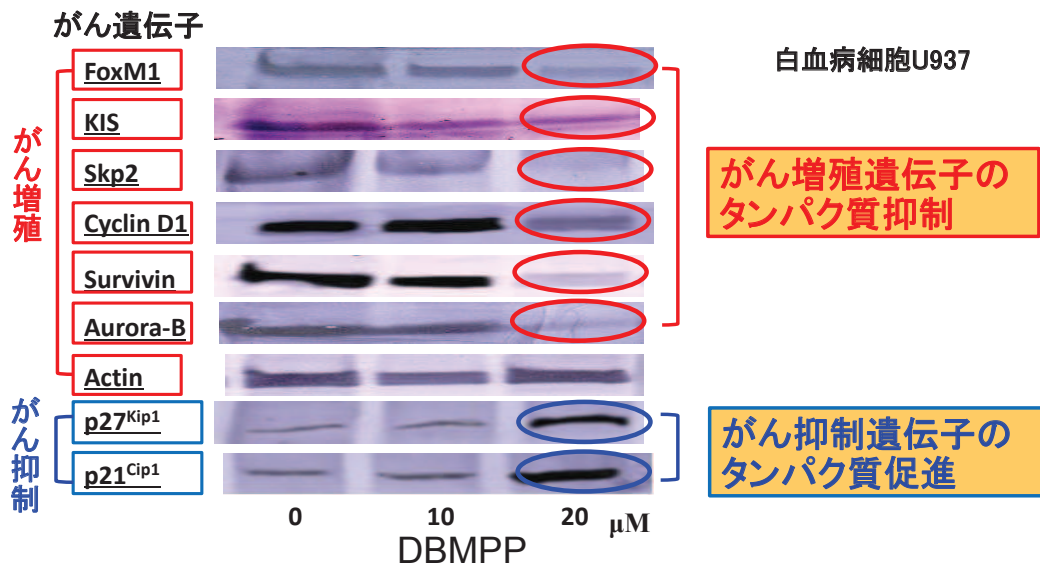


図 4.13 リン糖 (DBMPP) による血病細胞 U937 のタンパク質発現解析

4.2.3 新規リン糖抗がん剤の作用機序まとめ

これらの細胞周期解析とタンパク質発現解析結果より、新規なリン糖抗がん剤は、アポトーシスに関与しているがん抑制遺伝子とがん増殖遺伝子にどのように作用しているかを細胞周期上にまとめた。(図 4.14)

新規なリン糖抗がん剤は、アポトーシスに関与しているシグナル遺伝子(タンパク質)に作用して、がん細胞を死滅させている。また、リン糖抗がん剤は、がん増殖遺伝子及びがん抑制遺伝子に関与し、単剤で複数のアポトーシス関連遺伝子を同時にコントロールしていることが分かった。

これは、新規なリン糖抗がん剤が、白血病における多標的型分子標的薬剤の可能性のあることを示唆している。

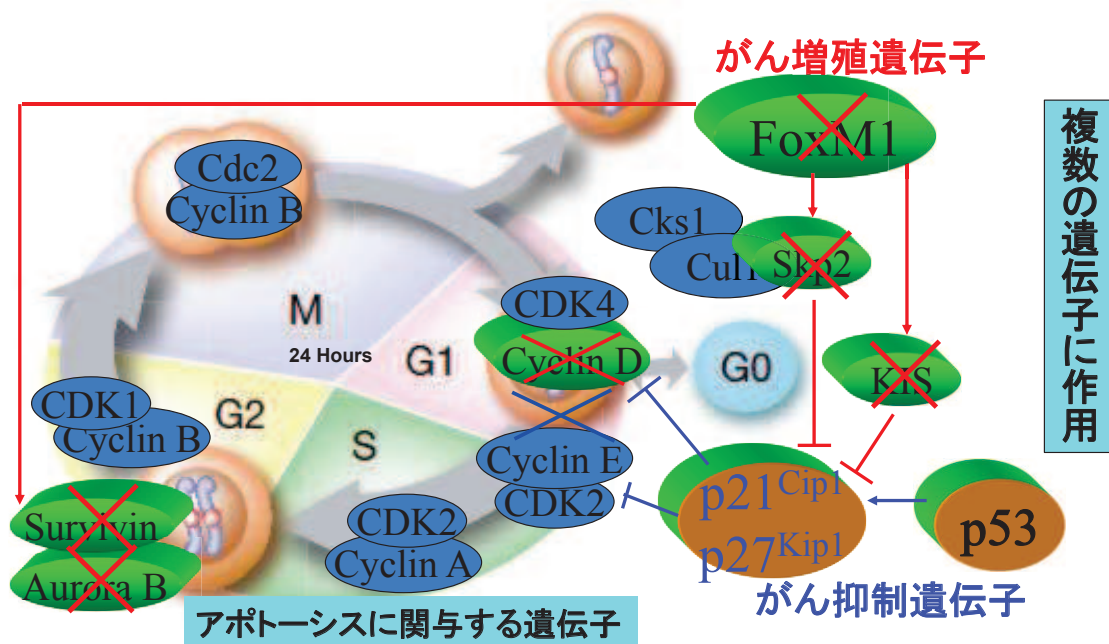


図 4.14 リン糖抗がん剤が関与しているシグナル遺伝子まとめ

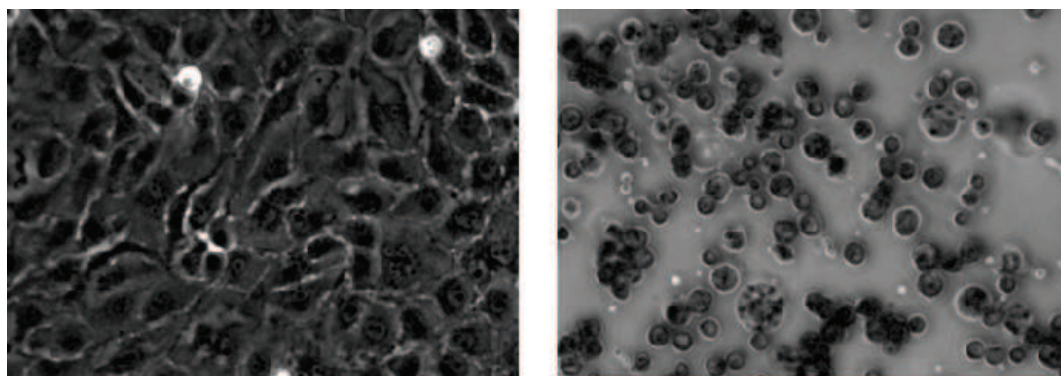
4.3 新規なリン糖抗がん剤の固形癌への適用

新規な抗リン糖がん剤の更なるスペクトル幅の広さを調査するために胃癌や皮膚癌などの固形癌細胞に対する生理活性評価を行った。

4.3.1 胃癌細胞に対するリン糖の抗がん効果

胃癌細胞 (MKN-45) に対して、新規なリン糖抗がん剤であるジブロモホスホラン DBMPP **28** を 200 μ M 投与し、その細胞の様子を位相差顕微鏡で観察した。(図 4.15)

左はコントロールとして DMSO を投与した 48 時間培養後の胃癌細胞であり、右は 200 μ M のリン糖 (DBMPP) を投与した 48 時間後の胃癌細胞培養サンプルである。コントロールは胃癌細胞が活発に細胞分裂を行っているため、サンプル表面全体に細胞がひしめき合っている。それに対して、リン糖 (DBMPP) を投与したサンプルは胃癌細胞が死滅しているため、細胞が縮小して減少している。



Control

リン糖投与

図 4.15 胃癌細胞 (MKN-45) に対するリン糖 (DBMPP) の生理活性 (48 時間後)

4.3.2 皮膚癌細胞に対するリン糖の抗がん効果

ヒトメラニン欠乏性腫瘍 (C32GT) とヒト悪性メラノーマ細胞 (G361) に対して、新規な分子標的リン糖抗がん剤であるジブロモホスホラン DBMPP **28** をそれぞれ 100 μ M と 200 μ M 投与し、その細胞の様子を位相差顕微鏡で観察した。

4.3.3 新規なリン糖抗がん剤の固形癌適用のまとめ

これらの胃癌や皮膚癌での評価結果より、本研究で開発した新規なリン糖抗がん剤である 2,3-ジブromo-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド DBMPP **28** や 2,3,4-トリブromo-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド TBMPP **41** は、血液がんである白血病細胞だけでなく、胃癌細胞(NKH-45)、ヒトメラニン欠乏性腫瘍(C32TG)、悪性メラノーマ細胞(G361)などの固形癌細胞にも抗がん活性を示した。今後、詳細に解析をしなければいけないが、固形癌まで効果がある抗がん剤になる可能性がある。

つまり、新規なリン糖抗がん剤は、今までの単一のがん細胞だけにしか攻撃ができない抗がん剤ではなく、種々のがん細胞を攻撃できるスペクトル幅が広い多標的型分子標的抗がん剤になる可能性がある。

4.4 まとめ

新規なリン糖抗がん剤であるブロモホスホラン（DBMPP、TBMPP）の高い活性と選択性、スペクトル幅の広さを調査するために、種々の白血病細胞の生理活性を評価した。また、この新規なリン糖抗がん剤の作用機序を推定するために、フローサイトメーターによる細胞周期解析とタンパク質発現解析を行った。さらに、胃癌や皮膚癌などの固形癌への適応の可能性も調べた。

その結果、下記の知見を得た。

- 1) リン糖抗がん剤は11種類の白血病細胞に対して高い生理活性を示し、白血病細胞に対してのスペクトル幅が広い。特に上流の白血病細胞である急性単芽球性白血病細胞U937では、市販薬剤グリベックの250倍の抗がん効果を示した。さらに、リン糖抗がん剤はがん細胞だけを攻撃する高い選択性を持つ。
- 2) フローサイトメーターによる細胞周期解析により、リン糖抗がん剤は、全ての白血病細胞に対してアポトーシスを誘導して死滅させていることが判明した。細胞周期内のアポトーシス生成率は83%と高かった。
- 3) リン糖抗がん剤は、アポトーシスに関与しているシグナル遺伝子（タンパク質）に作用して、がん細胞を死滅させている。また、リン糖抗がん剤はがん増殖遺伝子及びがん抑制遺伝子に関与し、単剤で複数のアポトーシス関連遺伝子を同時にコントロールしている。
- 4) リン糖抗がん剤は、胃癌や皮膚癌などの固形癌への適応の可能性がある。

以上の結果より、新規なリン糖抗がん剤ブロモホスホラン（DBMPP、TBMPP）は、1) がん細胞に対する強い活性、2) がん細胞に対する高い特異性と選択性、3) がん細胞に対する広いスペクトル、を示すことが検証できた。

引用文献

- 1) T. Mosmann, *J. Immun. Methods.*, **65**(1-25), 55-63 (1983).
- 2) 田沼靖一, 西尾勝, アポトーシス 細胞の生と死, **4**, 7 (1996).
- 3) 辻本賀英, 実験医学 アポトーシス研究の新たな挑戦, **19**, 193 (2001).
- 4) a) 松村 浩, フローサイトメトリー入門 (医学書院), 84, (1994).
b) M. R. Melamed, *Flow Cytometry and Sorting*, (1990).
- 5) S. Nakamura, S. Yamashita, D. Yokota, I. Hirano, T. Ono, M. Fujie, K. Shibata, T. Niimi, T. Suyama, K. Maddli, K. Asai, J. Yamashita, Y. Iguchi, and K. Ohnishi, *Invest. New Drugs*, **28**(4), 381 (2010).
- 6) 岡田雅人, タンパク質実験ノート (羊土社) 東京, (2006).

第 5 章 結論

一つの抗がん剤で複数のがん細胞を死滅させる多標的型分子標的薬剤を創出する最終目的に対して、上流の増殖が大きな白血病細胞である急性単芽球性白血病細胞 U937 にも市販薬剤グリベックの 250 倍以上の高い抗がん活性を示す新規な抗がん剤を創出することができた。

その新規な抗がん剤は、五員環構造として含リン複素環化合物であるフラノース型リン糖誘導体の 2,3-ジブromo-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド (DBMPP) **28** と 2,3,4-トリブromo-3-メチル-1-フェニルホスホラン 1-オキシド (TBMPP) **41** である。

その新規なリン糖抗がん剤は、11 種類 of 白血病細胞にも高い生理活性を示し、スペクトル幅が広いことを検証した。また、リン糖抗がん剤は白血病細胞だけを攻撃し、健常細胞は攻撃しないことがわかった。さらに、白血病細胞だけでなく、胃癌や皮膚癌などの固形癌にも適用できる可能性がである。

以上の結果より、新規なリン糖抗がん剤ブromoホスホラン (DBMPP、TBMPP) は、1) がん細胞に対する強い活性、2) がん細胞に対する高い特異性と選択性、3) がん細胞に対する広いスペクトル、4) アポトーシス誘導、5) 複数のがん増殖遺伝子に作用してタンパク質抑制する効果及びがん抑制遺伝子に作用してタンパク質促進するマルチ標的を持つ新規な構造と作用機序、を示すことが検証でき、種々のがん細胞を攻撃できる多標的型分子標的薬剤になる可能性がある。今後、多標的型分子標的薬剤として大いに期待できる。

今後の課題としては、

1. リン糖の作用機序、構造活性の相関、特定アポトーシス遺伝子解明によりリン糖抗がん剤の更なる生理活性向上
2. 新規な多標的型分子標的薬剤の実用化に向けて、実験動物を用いた *in vivo* 実験評価と薬剤投与時の水溶化 (包接化合物、界面活性剤、リポソーム等)

が考えられる。

以下に本論文の各章を総括する。

【第1章】

これまでの化学療法（抗がん剤）は、毒をもってがん細胞の分裂・増殖の過程に直接作用するため副作用が大きい。近年、特に注目されている分子標的薬は、がん細胞の持つ特異的な性質を分子レベルでとらえ、それを標的として効率よく作用するようにつくられた薬である。この分子標的薬の一つである“グリベック”は、慢性骨髄性白血病の特効薬として劇的な成果をあげた。しかし、グリベックがすべての白血病の患者に効くわけではなく、ヒト慢性骨髄性白血病細胞（K562）には優れた活性を示したが、ヒト急性単芽球性白血病細胞（U937）には抗がん活性が低かった。そこで、急性白血病細胞（U937）にも活性がある抗がん剤を研究する必要があると考えた。

一方、リン糖に関しては、糖のヘミアセタール環内の当該の酸素原子をリン原子で置き換えたリン糖においては研究例が少ないが、炭素—リン結合を有するホスホン酸等の鎖状リン誘導体の生理活性は広く知られている。医薬では抗菌活性のホスホマイシンや抗がん活性を示すシクロホスファミドなどもあり、リン糖誘導体にも生理活性が大いに期待できる。この様に、リン糖における生理活性は大変興味深いものであり、新規リン糖誘導体は慢性骨髄性白血病の抗がん剤であるグリベックを凌ぐ抗がん効果を発現する可能性を秘めている。

以上のことから、急性単芽球性白血病細胞（U937）にも抗がん活性を示す新規抗がん剤を創出することを最終目的とし、六員環構造としてヘミアセタール環状内にリン原子を含有するピラノース型リン糖、五員環構造として含リン複素環化合物であるフラノース型リン糖誘導体について研究を行った。

【第2章】

ヘミアセタール環内にイオウ、窒素が入ったピラノース型のチオ糖とアミノ糖は合成されているが、六員環構造にリン原子を持つピラノース型リン糖は合成された報告例がない。また、 $C=C(NO_2)$ へのリン化合物付加を用いた方法が目的とするピラノース型リン糖を合成できる可能性を持っているが、ニトロ基をアルデヒド基へ変換する試みはまだ成功していない。

そこで、 β 位にニトロ基を持ったホスフィン誘導体を用いて、ニトロ基のアルデヒド基への変換を検討し、オゾンを用いた方法だけがリン原子の影響を受けたC=N結合を分解できことを見つけ出した。

これらの知見をもとに、 $C=C(NO_2)$ へのリン化合物の付加とオゾンを用いたニトロ基の変換反応により、目的とする新規ピラノース型リン糖の合成を初めて実現させた。しかし、グルコースなどの糖を用いた合成法では合成経路が長くて収率が非常に低い。そこで、糖を出発物質としないフラノース型リン糖の合成について第3章で検討した。

【第3章】

糖を出発物質としないフラノース型リン糖の合成法として、5員環の含リン複素環化合物である2-ホスホレン化合物を出発物質とする合成経路を用いた。この合成方法は、様々な官能基の導入反応や官能基変換反応が容易であるため2-ホスホレン誘導体やホスホラン誘導体の官能基を検討することができる。

第3章では、生理活性が高いフラノース型リン糖誘導体の構造を決定するために、2-ホスホレン誘導体やホスホラン誘導体の官能基を検討し、生理活性を発現するキーフラグメントは、ホスホラン環内の置換可能（官能基導入可能）な位置の1～5位内で、1位：*m*-ブロモフェニル基、2位：ブロモ基、3位：ブロモ基、メチル基、4位：ブロモ基、メチル基であることがわかった。また、ジブロモホスホラン化合物（DBMPP）**28**の4つのジアステレオマーの生理活性は、異性体**28d**>混合物**28**>異性体**28c**>異性体**28a**>異性体**28b**の順に高く、異性体**28d**の IC_{50} が $20\mu M$ と異性体**28b**の $125\mu M$ より高かった。触媒を二酸化マンガンから臭化マンガンに変更するとブロモ付加が選択的に促進され、全収率を78%から96%へ向上できることを見出した。

また、ブロモ基が多いほど生理活性が高く、トリブロモホスホラン化合物（TBMPP）**41**の IC_{50} が $2\mu M$ と高かった。

以上のことから、最も生理活性が高くなる新規フラノース型リン糖誘導体は、[2,2,4-トリブロモ-3,4-ジメチル-1-(*m*-ブロモフェニル)-ホスホラン1-オキシド]になると予測される。

【第4章】

フラノース型リン糖誘導体であるブロモホスホラン (DBMPP、TBMPP) は、白血病細胞U937には高い生理活性を示すが、そのスペクトル幅の広さはわかっていない。また、その作用機序も不明である。

第4章では、リン糖抗がん剤は今までの単一のがん細胞だけにしか攻撃ができない抗がん剤ではなく、血液がんや固形がんなどの種々のがん細胞を攻撃できるスペクトル幅が広い分子標的抗がん剤であることがわかった。また、リン糖抗がん剤は全ての白血病細胞に対して SubG1 の出現よりアポトーシスを誘導して死滅させていることが判明した。さらに、リン糖抗がん剤は、マイクロチューブリン関連遺伝子を抑制し、ストレスタンパク関連遺伝子を促進し、アポトーシス関連遺伝子を促進していることがわかった。

以上のことから、リン糖がん剤は、種々のがん細胞を攻撃できるスペクトル幅が広い分子標的抗がん剤であり、アポトーシスに関与しているシグナル遺伝子 (タンパク質) に作用してがん細胞を死滅させ、がん遺伝子及びがん抑制遺伝子に関与して単剤で複数のアポトーシス関連遺伝子を同時にコントロールしている。

論文目録

- 1) Manabu Yamada, Kazuhide Asai, Junko Yamashita, Takuya Suyama, Taishi Niimi, Kasthuraiah Maddali, Michio Fujie, Satoki Nakamura, Motohiko Kimura, Yasutaka Tanaka, Mitsuo Toda, and Mitsuji Yamashita, "Synthesis of Some 1-Aryl-2,3-dibromophospholanes as Novel Anti-cancer Agents", *Heterocyclic Communications*, **16**, 173-180(2010).
- 2) Manabu Yamada, Kazuhide Asai, Junko Yamashita, Takuya Suyama, Taishi Niimi, Kasthuraiah Maddali, Michio Fujie, Satoki Nakamura, and Mitsuji Yamashita, "Preparation and characterization of phospho sugar analogues, 2,3-dibromo-3-methyl-1-phenylphospholane 1-oxide derivatives, as novel anti-cancer agents", *Phosphorus, Sulfur, Silicon and Related Elements*, **185**, 2286-2291(2010).
- 3) Manabu Yamada, Mitsuji Yamashita, Takuya Suyama, Junko Yamashita, Kazuhide Asai, Taishi Niimi, Nobuhisa Ozaki, Michio Fujie, Maddali Kasthuraiah, Satoki Nakamura, and Kazunori Ohnishi, "Preparation and characterization of novel 4-bromo-3,4-dimethyl-1-phenyl-2-phospholene 1-oxide and the analogous phosphorus heterocycles or phospho sugars", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **20**, 5943-5946(2010).

B 学位論文内容に関わる論文（未発表論文も含む）

- 1) Junko Yamashita, Takuya Suyama, Kazuhide Asai, Manabu Yamada, Taishi Niimi, Mitsuo Toda, Yasutaka Tanaka, Motohiko Kimura, Michio Fujie, Satoki Nakamura, Kazunori Ohnishi, Masayuki Sato, David F. Wiemer, and Mitsuji Yamashita, "Syntheses and Evaluation of Branched Deoxyhalo Phospha Sugars as Novel Anti-leukemic Agents", *Heteroatom Chemistry*, in press.
- 2) Kenji Tsunekawa, Mitsuji Yamashita, Michio Fujie, Taishi Niimi, Takuya Suyama, Kazuhide Asai, Satoru Ito, Junko Yamashita, Manabu Yamada, Nobuhisa Ozaki, and Satoki Nakamura, "Preparation of phospho sugar analogues and their evaluation as novel molecular targeting anticancer agents", *Phosphorus, Sulfur and Silicon and the Related Elements*, **186**, 936-944(2011).
- 3) Keita Kiyofuji, Kenji Tsunekawa, Mitsuji Yamashita, Junko Yamashita, Michio

- Fujie, Kazuhide Asai, Takuya Suyama, Satoru Ito, Valluru Krishna Reddy, Manabu Yamada, Keisuke Ogawa, Nobuhisa Ozaki, Masaki Sugiyama, Mayumi Yamaoka, Reiko Makita, Satoki Nakamura, Takashi Aoki, Yu Gang, Kengo Aoshima, Nao Kamikage, Yasuo Takehara, Harumi Sakahara, Hisao Takayanagi, Sophie Laurent, Burtea Carmen, Vander Luce Elst, and Robert N. Muller, "Preparation and evaluation of novel sugar dendritic Gd-DTPA complexes for MRI contrast agents and phospho sugars for anti-tumour agents", *International Journal of Advanced Materials Research*, **222**, 217-220(2011).
- 4) Junko Yamashita, Mitsuji Yamashita, Michio Fujie, Kazuhide Asai, Takuya Suyama, Satoru Ito, Valluru Krishna Reddy, Manabu Yamada, Keisuke Ogawa, Nobuhisa Ozaki, Satoki Nakamura, Takashi Aoki, Yu Gang, Gengo Aoshima, Tatsunori Kato, Nao Kamikage, Keita Kiyofuji, Yasuo Takehara, Harumi Sakahara, Hisao Takayanagi, Tatsuo Oshikawa, Sophie Laurent, Carmen L. Burtea, Vander L. Elst, and Robert N. Muller, "R & D of novel medicinal materials for curing cancer: Sugar modified Gd-DTPA MRI contrast agents and phospho sugar anti-cancer agents", *Journal of Automation, Mobile Robotics & Intelligent Systems*, **3**, 80-83(2009).
- 5) Junko Yamashita, Mitsuji Yamashita, Michio Fujie, Kazuhide Asai, Takuya Suyama, Satoru Ito, Vallura Krishina Reddy, Manabu Yamada, Keisuke Ogawa, Nobuhisa Ozaki, Satoki Nakamura, Takashi Aoki, Gang Yu, Kengo Aoshima, Tatsunori Kato, Nao Kamikage, Keita Kiyofuji, Yasuo Takehara, Harumi Sakahara, Hisao Takayanagi, Tatsuo Oshikawa, Sophie Laurent, Carmen Burtea, L. Vander Elst, and Robert N. Muller "R&D of novel medicinal materials for curing cancer : Sugar modified Gd-DTPA MRI contrast agents and phospho sugar anti-cancer agents", *Journal of Automation, Mobile Robotics & Intelligent Systems*, **3**, 2080-2143 (2009).
- 6) Junko Yamashita, Takuya Suyama, Kazuhide Asai, Manabu Yamada, Taishi Niimi, Michio Fujie, Satoki Nakamura, Kazunori Ohnishi, and Mitsuji Yamashita, "Research and development of phospho sugar anti-cancer agents with anti-leukemic activity", *Heterocyclic Communications*, **16**, 89-97(2010).
- 7) Manabu Yamada, Mitsuji Yamashita, and Saburo Inokawa, "Synthesis of 5-deoxy-5-*C*-(diphenylphosphinyl)-1,2-*O*-isopropylidene-3-*O*-methyl-β-L-ido furanose", *Carbohydrate Research*, **113**, 10-12 (1983).

- 8) Manabu Yamada, Mitsuji Yamashita, and Saburo Inokawa, "Synthesis of diphenyl(1-nitromethyl-1-alkyl)phosphine oxides and their conversion to diphenyl(1-formyl-1-alkyl)phosphine oxides", *Synthesis*, **12**, 1026-1027 (1982).
- 9) Manabu Yamada, Mitsuji Yamashita, and Saburo Inokawa, "Synthesis of a chiral phosphine and a phosphinite from carbohydrates and application to asymmetrical hydrogenation", *Carbohydrate Research*, **95**, 9-12 (1981).

C その他の論文

- 1) Arigala Uma Ravi Sankar, Mitsuji Yamashita, Kambam Srinibasulu, Nobuhisa Ozaki, Takashi Aoki, Michio Fujie, Keisuke Ogawa, Shingo Okada, Manabu Yamada, Yasutaka Tanaka, Motohiko Kimura, and Mitsuo Toda, "Synthesis and in vitro studies of Gd-DTPA derivative as new potential MRI contrast agents", *Tetrahedron Letters*, **51**, 2431-2433 (2010).
- 2) Mitsuji Yamashita, Manabu Yamada, Motoyuki Sugiura, Hiroyuki Nomoto, and Tatsuo Oshikawa, "Functional group interconversion of a β -nitro group of phosphorus compounds and synthesis of some phosphino sugars", *Nippon Kagaku Kaishi*, **7**, 1207-1213 (1987).
- 3) Mitsuji Yamashita, Takashi Morizane, Keiji Fujita, Kaname Nakatani, Manabu Yamada, Hiroaki Yamashita, and Tatsuo Oshikawa, "Reaction of α -hydroxyphosphonates with some reagents", *Shizuoka Daigaku Kogakubu Kenkyu Hokoku*, **36**, 37-40 (1985).
- 4) Mitsuji Yamashita, Manabu Yamada, Kenji Tsunekawa, and Saburo Inokawa, "Convenient synthesis of (1-alkyl-2-hydroxyethyl)diphenylphosphine oxides", *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **56**, 3533-4 (1983).
- 5) Mitsuji Yamashita, Manabu Yamada, Kenji Tsunekawa, Tatsuo Oshikawa, Kuniaki Seo, and Saburo Inokawa, "Synthesis of 5-deoxy-3-O-methyl-5-C-(phenylphosphinyl)-L-idopyranose", *Carbohydrate Research*, **121**, 4-5 (1983).
- 6) Mitsuji Yamashita, Manabu Yamada, Kenji Tsunekawa, Tatsuo Oshikawa, Kuniaki Seo, and Saburo Inokawa, "Synthesis of 5-deoxy-5-C-(phenylphosphinyl)-L-idopyranose", *Carbohydrate Research*, **122**, 1-3 (1983).
- 7) Mitsuji Yamashita, Yukio Soeda, Nobuyoshi Suzuki, Manabu Yamada, Kenji Tsunekawa, Tatsuo Oshikawa, and Saburo Inokawa, "Stereochemistry of nucleophilic substitution of menthyl derivatives with anion of

- diphenylphosphine oxide by an action of sodium dihydridobis(2-methoxy-ethanolato)aluminate”, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **56**, 1871-1872(1983).
- 8) Mitsuji Yamashita, Nobuyoshi Suzuki, Manabu Yamada, Yukio Soeda, Hiroaki Yamashita, Kaname Nakatani, Tatsuo Oshikawa, and Saburo Inokawa, “Nucleophilic substitution with phosphide anions prepared by an action of sodium dihydridobis (2-methoxyethanolato)aluminate on phosphorus compounds”, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **56**, 219-222(1983).
- 9) Mitsuji Yamashita, Koji Hiramatsu, Manabu Yamada, Nobuyoshi Suzuki, and Saburo Inokawa, “ Synthesis of sugar derivatives of tervalent phosphorus compounds and their application to homogeneous asymmetric hydrogenation”, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, **55**, 2917-2921 (1982).
- 10) Mitsuji Yamashita, Nobuyoshi Suzuki, Manabu Yamada, Masayuki Shibata, Kiyoshi Serizawa, and Saburo Inokawa, “A convenient method for the preparation of C-phosphino derivatives of D-glucose by a substitution reaction using SDMA as the key reagent”, *Carbohydrate Research*, **99**, 5-8 (1982).

D 口頭発表など

国際会議発表

- 1) Mitsuji Yamashita, Nobuhisa Ozaki, Junko Yamashita, Michio Fujie, Masaki Sugiyama, Keisuke Ogawa, Takashi Aoki, Satoru Ito, Valluru Krishna Reddy, Manabu Yamada, Kengo Aoshima, Nao Kamikage, Arigala Uma Ravi Sankar, Gang Yu, Keita Kiyofuji, Yasuo Takehara, Harumi Sakahara, Hisao Takayanagi, Sophie Laurent, Carmen Burtea, L. Vander Elst, and Robert N. Muller, “Researches on Sugar Modified Dendritic Gd-DTPA Complexes for MRI Contrast Agent,” *12th Bi-Annual Conference on Contrast Agents and Multimodal Molecular Imaging (EMRF)*, Mons, Belgium, May 19-21 (2010).
- 2) K. Kiyofuji, K. Tsunekawa, M. Yamashita, J. Yamashita, M. Fujie, K. Asai, T. Suyama, S. Ito, V. Krishna Reddy, M. Yamada, K. Ogawa, N. Ozaki, M. Sugiyama, M. Yamaoka, R. Makita, S. Nakamura, T. Aoki, G. Yu, K.

- Aoshima, N. Kamikage, Y. Takehara, H. Sakahara, H. Takayanagi, S. Laurent, C. Burtea, L. Vander Elst, and R. N. Muller, "Preparation and Evaluation of Novel Sugar Dendritic Gd-DTPA Complexes for MRI Contrast Agents and Phospha Sugars for Anti-tumour Agents," *Inter-academia (IA) 2010*, Riga, Latvia, Aug.
- 3) Kenji Tsunekawa, Mitsuji Yamashita, Michio Fujie, Taishi Niimi, Takuya Suyama, Kazuhide Asai, Satoru Ito, Junko Yamashita, Manabu Yamada, Nobuhisa Ozaki, and Satoki Nakamura, "Preparation of Phospha Sugar Analogues and Their Evaluation as Novel Molecular Targeting Anti-cancer Agents," *18th International Conference on Phosphorus Chemistry (18th ICPC)*, Wrocław, Poland, July 11-15 (2010).
 - 4) Nobuhisa Ozaki, Mitsuji Yamashita, Masaki Sugiyama, Takashi Aoki, Keisuke Ogawa, Michio Fujie, Arigala Uma Ravi Sankar, Manabu Yamada, Junko Yamashita, Kambam Srinivasulu, Reiko Makita, Yasuo Takehara, Harumi Sakahara, Sofie Laurent, Carmen Burtea, and Robert N. Muller, "Research and Development of Novel MRI Contrast Agents Having Sugar-chains for Diagnosing Early Stage Tumors and MRA," *25th International Carbohydrate Symposium (ICS 2010)*, Tokyo, Japan, August 1-6 (2010).
 - 5) Mayumi Yamaoka, Akiho Sawada, Kazuhide Asai, Takuya Suyama, Taishi Niimi, Junko Yamashita, Manabu Yamada, Kambam Srinivasulu, Mitsuji Yamashita, Michio Fujie, Satoki Nakamura, Kazunori Ohnishi, and David F. Wiemer, "Synthesis and MTT *in vitro* Evaluation of Novel Phospha Sugar Derivatives for Developing Anti-cancer Agents," Pusan National University-Shizuoka University Joint Symposium and Graduate Students Forum for Promotion of the DDP Hamamatsu, Japan, Feb. 4-6 (2010).
 - 6) Mitsuji Yamashita, Junko Yamashita, Manabu Yamada, Michio Fujie, Taishi Niimi, Kazuhide Asai, Takuya Suyama, Satoki Nakamura, Takashi Aoki, Keisuke Ogawa, Nobuhisa Ozaki, Gang Yu, Kengo Aoshima, Yasuo Takehara, Harumi Sakahara, Norio Miura, Sophie Laurent, Carmen Burtea, L. Vander Elst, and Robert N. Muller, "Medical Materials for Earlier Finding and Curing Tumors: Syntheses and Evaluation of Sugar-Ball-Dendritic MRI Contrast Agents and Deoxybromophospha Sugars for Tumors", *9th International Conference on Heteroatom Chemistry (ICHAC-9)*, June 30 – July 4 (2009), Oviedo Spain.

- 7) Mitsuji Yamashita, Junko Yamashita, Manabu Yamada, Michio Fujie, Taishi Niimi, Kazuhide Asai, Takuya Suyama, Satoki Nakamura, Takashi Aoki, Keisuke Ogawa, Nobuhisa Ozaki, Gang Yu, Kengo Aoshima, Yasuo Takehara, Harumi Sakahara, Norio Miura, Sophie Laurent, Carmen Burtea, L. Vander Elst, and Robert N. Muller, "Medical Materials for Earlier Finding and Curing Tumors: Syntheses and Evaluation of Sugar-Ball-Dendritic MRI Contrast Agents and Deoxybromophospha Sugars for Tumors", 9th International Conference on Heteroatom Chemistry (ICHAC-9), June 30 – July 4 (2009), Oviedo Spain.
- 8) Junko Yamashita, Mitsuji Yamashita, Manabu Yamada, Taishi Niimi, Michio Fujie, Kazuhide Asai, Takuya Suyama, Maddali Kasthuraiah Reddy, and Satoki Nakamura, "NOVEL PREPARATION OF DEOXYBROMOPHOSPHA SUGAR ANALOGUES AND *IN VITRO* EVALUATION AS ANTI-TUMOUR AGENTS", EuroCarb 15, July 19-24 (2009), Vienna, Austria
- 9) Junko Yamashita, Mitsuji Yamashita, Manabu Yamada, Taishi Niimi, Michio Fujie, Kazuhide Asai, Takuya Suyama, Maddali Kasthuraiah Reddy, and Satoki Nakamura, "MEDICAL MATERIALS FOR EARLY FINDING AND CURING TUMORS: SYNTHESIS AND EVALUATION OF *DEOXYBROMO-PHOSPHA* SUGARS FOR ANTI-TUMOR AGENTS", 22nd International Congress on Heterocyclic Chemistry (IHC-22), August 2-7 (2009), St. John's, Newfoundland and Labrador, CANADA.
- 10) Mitsuji Yamashita, Junko Yamashita, Michio Fujie, Kazuhide Asai, Takuya Suyama, Satoru Ito, Valluru Krishna Reddy, Manabu Yamada, Keisuke Ogawa, Nobuhisa Ozaki, Satoki Nakamura, Takashi Aoki, Nobuhisa Ozaki, Gang Yu, Kengo Aoshima, Tatsunori Kato, Nao Kamikage, Keita Kiyofuji, Yasuo Takehara, Harumi Sakahara, Hisao Takayanagi, Tatsuo Oshikawa, Sophie Laurent, Carmen Burtea, L. Vander Elst, and Robert N. Muller, "Research on Novel Materials for Cancer Finding and Chemotherapy at the Early Stage (2) --- Preparation and Evaluation of Novel Sugar Dendritic Gd-DTPA Complexes for MRI Contrast Agents and Novel Phospha Sugars for Ant-tumor Agents" 8th Inter-academia 2009: September 14-16 (2009), Kazimierz Dolny, Poland.
- 11) Nobuhisa Ozaki, Mitsuji Yamashita, Masaki Sugiyama, Takashi Aoki, Keisuke Ogawa, Michio Fujie, Arigala Uma Ravi Sankar, Manabu Yamada, Junko Yamashita, Kambam Srinibasulu, Reiko Makita, Yasuo Takehara,

Harumi Sakahara, Sofie Laurent, Carmen Burtea, and Robert N. Muller
“Research and Development of Novel Contrast Agents Having Sugar-chains
for Diagnosing Early Stage Tumors and MRA”, 25th International
Carbohydrate Symposium 2010: August 1-6 (2010), Tokyo, Japan.

国内学会発表

- 1) 山下光司・山田 学・藤江三千男・山岡真弓・清藤圭太・尾崎伸久・杉山雅紀・浅井一秀・新美大志・陶山拓也・山下純子・澤田亜季歩・牧田礼子・Kambam Srinivasulu・中村悟己・大西一功、「がんの早期発見・早期治療を目指す医用材料—新規なリン糖誘導体の合成と抗がん剤としての評価」第37回有機典型元素化学討論会、室蘭市（室蘭市民会館）、2010年11月25日～11月27日.
- 2) 山岡真弓・山田 学・山下光司・藤江三千男・澤田亜季歩・山下純子・浅井一秀・新美大志・陶山拓也・清藤圭太・中村悟己・杉山雅紀・牧田礼子・戸田三津夫、「新規なリン糖誘導体の合成および抗がん剤の研究開発」第40回複素環化学討論会、仙台市（仙台市民会館）、2010年10月14日～10月16日.
- 3) 山下純子・山田 学・浅井一秀・新美大志・陶山拓也・澤田亜季歩・山下光司・藤江三千男・中村悟己、「新規なリン糖の化学合成及びMTT法による抗がん剤評価」第2回リン化学討論会、浜松（静岡大学）、2009年12月5日.
- 4) 山下純子、山下光司、浅井一秀、山田 学、藤江三千男、中村悟己 「リン糖抗がん剤の開発研究」日本化学会第89春季年会（千葉）、2009年3月27-30日.
- 5) 山下光司、藤江三千男、山下純子、山田 学、杉山雅紀、尾崎伸久、浅井一秀、新美大志、陶山拓也、マツダリ カスツライアー、中村悟己 「新しい抗がん剤並びにMRI造影剤の研究開発 — ブロモ基を有する含リン複素環化合物あるいはデオキシブロモリン糖誘導体の合成と抗がん活性並びに肝細胞がんの画像化の評価」 第39回複素環化学討論会（千葉、柏）、2009年10月14-16日.
- 6) 山下純子、山下光司、青木峻、尾崎伸久、杉山雅紀、山田 学、山岡真弓、澤田亜季歩、清藤圭太、常川謙二、藤江三千男、中村悟己、竹原康雄、阪原晴海、「がんの早期発見・早期治療の技術革新のための医工連携による医用材料開発研究」、第40回中部科学関係学協会支部連合秋季大会（岐

阜)、2009年11月7-8日.

- 7) 山下純子, 山田 学, 尾崎伸久, 清藤圭太, 常川謙二, 浅井一秀, 陶山卓也, 新美大志, 杉山雅紀, Uma Ravi Sankar Arigala, 山岡真弓, 澤田亜季歩, 戸田三津夫, 田中康隆, 木村元彦, 山下光司, 藤江三千男, 中村悟己, 竹原康雄, 阪原晴海、「がんの早期発見・早期治療の技術革新のための医工連携による 医用材料開発研究」、平成 21 年度日本生体医工学東海支部大会、(名古屋) 2009年10月17日.
- 8) 山下光司・藤江三千男・山下純子・山田 学・清藤圭太・尾崎伸久・杉山雅紀・安部聡一郎・浅井一秀・新美大志・陶山拓也・澤田亜季歩・山岡真弓・中村悟己、「がんの早期発見・早期治療を目指す医用材料—新規なリン糖誘導体の合成と生理活性評価」第 36 回有機典型元素化学討論会 (鳥取)、2009年12月10-12日.
- 9) 山下光司、山下純子、藤江三千男、陶山卓也、新美大志、清藤圭太、山田学、中村悟己、竹原康雄、阪原晴海 「がんの早期発見・早期治療を目指す医用材料—ブロモ基を環構造に有する含リン複素環化合物あるいはリン糖誘導体の合成と生理活性の評価」第 35 回有機典型元素化学討論会 (東京)、2008年12月11-13日.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、特別の御指導を賜りました山下光司博士をはじめとして、陶山哲也修士と浅井一秀修士などの研究室の皆様方及び、抗がん活性評価や遺伝子関連解析をして頂きました浜松医科大学の中村悟己博士と藤江三千夫博士に深く感謝致します。

また、主指導教員の田中康隆先生、副指導教員の昆野昭則先生、渡辺修治先生のご指導に心から感謝致します。