

海洋無脊椎動物からの成人 T 細胞白血病の治療薬リード化合物の探索

濱田 季之

鹿児島大学大学院理工学研究科生命化学専攻

〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-24

TEL : 099-285-8114

要旨

鹿児島県を含む南九州に多発する難治性疾患、成人 T 細胞白血病 (Adult T-cell Leukemia: ATL) の新規治療薬の開発に向けて、マレーシア産海綿および薩南諸島産軟体サンゴから、これまでに抗 ATL 活性の報告のない炭素骨格を有する天然有機化合物を単離した。今後、新たな作用機序を有する ATL 治療薬の開発が期待できる。

1. 緒言

成人 T 細胞白血病 (Adult T-cell Leukemia: ATL) とは、鹿児島県を含む南九州に多発している極めて難治性の白血病で、HTLV-1 ウィルスに T 細胞が感染することで引き起こされる。これまでに抗がん剤による多剤併用療法、特異抗体療法、幹細胞移植療法などが開発されてきたが、一部の病型で成功例が出ているものの、本疾患のほとんどの患者にとっては福音となっていない。ATL は容易に再発し、薬剤耐性を獲得することが多く、現在最も成功しているといわれる LSG15 療法でも、5 年生存率は 20% 以下というのが現状である。従って、ATL の治療成績を向上させるためには、新たな機序に基づく抗がん剤の発見が急務となっている。

近年、多くの生物活性物質が、特に薬用植物や海棲生物から単離・同定され、有用な抗がん剤リード化合物も多く発見されている。そのため、当研究室では、そのような生物資源を用いて S1T 細胞 (ATL 患者由来の癌細胞) に対する細胞傷害性 (以下、抗 ATL 活性) を指標にした抗 ATL 化合物の探索研究を行ってきた。その研究過程において、最近、ジャマイカのシソ科植物 *H. vertillata* から多剤耐性克服活性も示す新規抗 ATL 化合物ヒプトシドを発見した¹⁻⁴⁾。更なる新規抗 ATL 治療薬リード化合物を開発するために、マレーシアボルネオ島近海、および、薩南諸島近海に生息する海洋無脊椎動物を探索源として、これまでの抗がん剤と異なる作用機序を持っている抗 ATL 化合物を探索した。

2. 結果

2. 1 マレーシア産海綿 *Niphates caribica* からの抗 ATL 化合物の探索

マレーシアボルネオ島のセパンガー島近海 (Fig. 1) で採取した海綿 *N. caribica* (Fig.

2) 273 g を MeOH で抽出した。濃縮後、得られた MeOH 抽出物 (96 g) を AcOEt と H₂O で二層分配し、AcOEt 層を 90% MeOHaq. と *n*-hexane にて、H₂O 層をさらに *n*-BuOH と H₂O にてそれぞれ二層分配した。*n*-hexane 層と 90% MeOHaq. 層に抗 S1T 活性が見られたので、それらの層について分離・精製を進めた(Fig. 3)。*n*-Hexane 層についてシリカゲルカラムクロマトグラフィーや ODS-HPLC を行うことで、二種類の化合物を含んだ混合物を 11.6 mg 単離し、化合物 **1** および **2** と命名した。また、90% MeOHaq. 層 (15 g) について、シリカゲルカラムクロマトグラフィー、ODS カラムクロマトグラフィー、pTLC、および ODS-HPLC による分離・精製を行い、6 種類の化合物を単離した。それぞれ、化合物 **3** (6.4 mg)、化合物 **4** (4.6 mg)、化合物 **5** (4.4 mg)、化合物 **6** (4.6 mg)、化合物 **7** (4.4 mg)、および化合物 **8** (4.4 mg) と命名した。

化合物 **1** から **8** までの 8 種類の化合物については、¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT-135 スペクトル、二次元 (COSY, HMQC, HMBC) スペクトルデータにより構造解析を行い、相対立体配置を含めた化学構造を Fig. 4 のように決定した。化合物 **1**、**2**、**3**、**6**、**8** は、それぞれ、既知化合物の phyllactones D と E, phyllofolactone G, phyllactones A と B であることが文献値⁵⁾⁶⁾との NMR データの比較で分かった。新規化合物 **4** と **5** は、それぞれ化合物 **1** と **2** の E 環部分の水酸基がメトキシ化されたものであった。また、新規化合物 **7** は、化合物 **6** や **8** の立体異性体であった。化合物 **6** ~ **8** の相対立体配置については、NOE やカップリング定数を用いて決定した (Fig. 5)。絶対配置については、これから決定する予定である。

化合物 **1** ~ **5** については ATL 患者由来の S1T 細胞株に対する増殖阻害活性を調べた。その結果、化合物 **4** と **5** が IC₅₀ 値が 10 μg/mL 以下で活性を示すことが分かっている。化合物 **6** ~ **8** については、絶対配置の検討が終わり次第、生物活性試験を行う予定である。



Fig. 1 海綿の採集地



Fig. 2 マレーシア産海綿
Niphates caribica

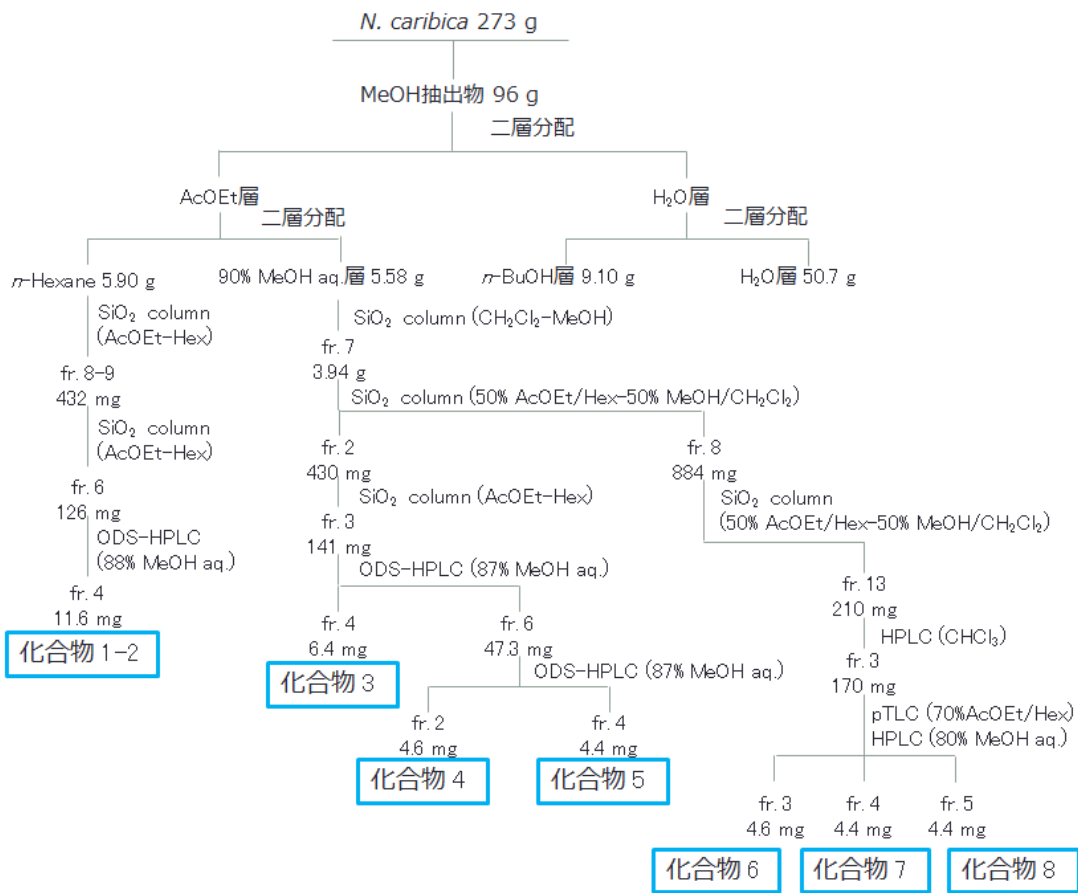


Fig. 3 マレーシア産海綿 *Niphates caribica* からの分離・精製スキーム

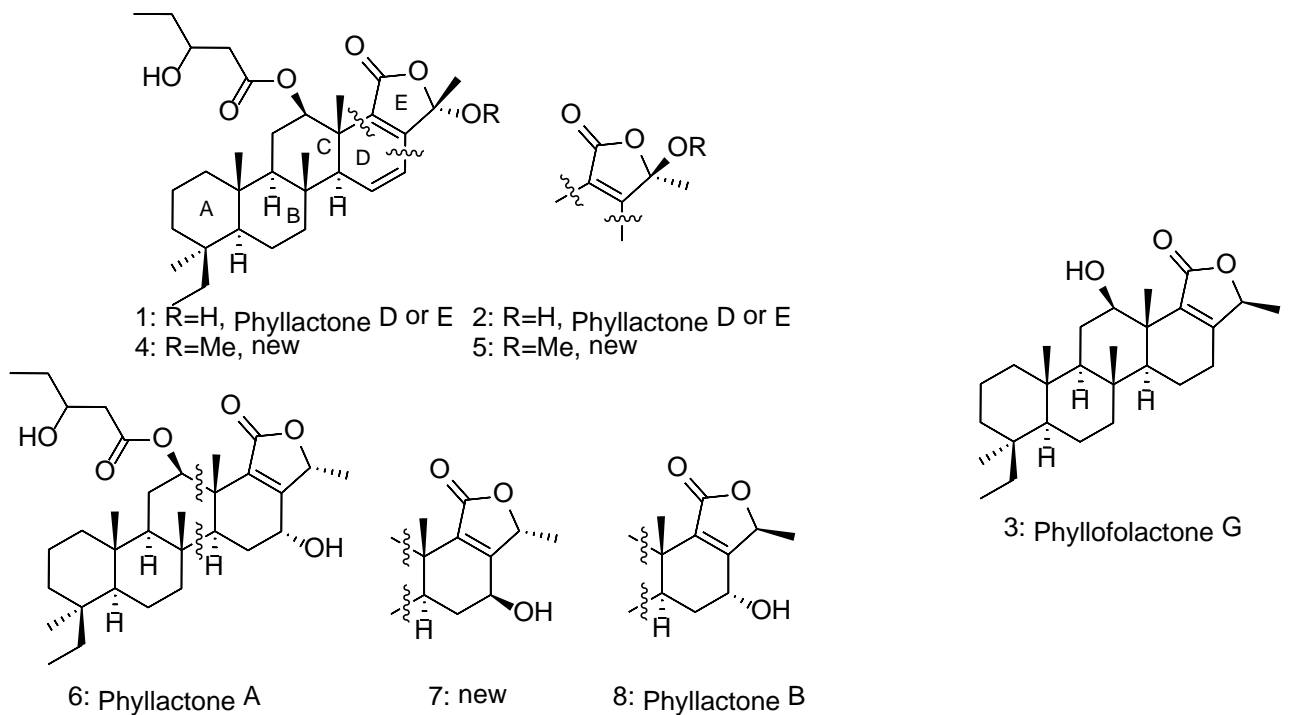


Fig. 4 化合物 1 ~ 8 の化学構造

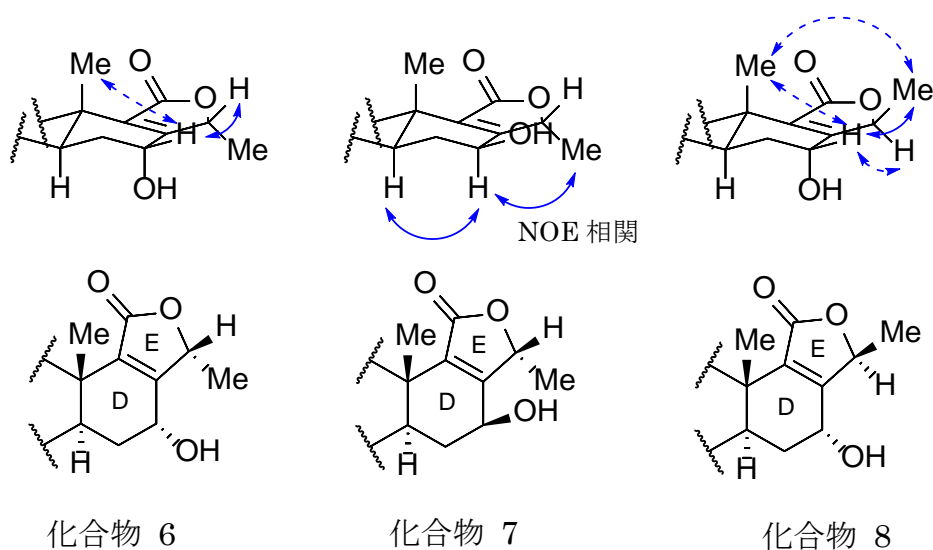


Fig. 5 化合物 6 ~ 8 の D-E 環部分の相対配置と NOE 相関

2. 2 マレーシア産海綿 *Aaptos aaptos* からの抗 ATL 化合物の探索

2015 年にマレーシアボルネオ島のセパンガー島近海で採取した海綿 *Aaptos aaptos* の MeOH 抽出物 (19 g) を AcOEt と H₂O で二層分配した。強い抗 ATL 活性を示した AcOEt 層 (335 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーや HPLC などを駆使して分離・精製し、化合物 9 (2.7 mg)、化合物 10 (6.2 mg)、化合物 11 (1.1 mg)、化合物 12 (3.1 mg)、および化合物 13 (1.2 mg) を得た。

化合物 11 は緑色固体として得られた。FABMS スペクトル m/z 213 [M+H]⁺ から分子式 C₁₂H₈N₂O₂ と決定した。¹H、¹³C、APT および HSQC の NMR スペクトルデータの詳細な分析により、1 種類のメチレン炭素 (δ_c 105.9)、5 種類のメチン炭素 (δ_c 143.0, 130.0, 116.4, 100.4, 99.5) および 6 種類の四級炭素 (δ_c 155.8, 152.7, 135.4, 133.2, 125.3, 120.7) の 12 個の炭素の存在を明らかにした。すべての水素原子は、HSQC スペクトルに基づいて帰属し、また、¹H-¹H COSY および HMBC スペクトルから化合物 11 の化学構造を決定した (Fig. 6)。この化合物は、過去に Aaptamin の類縁体として全合成された報告例⁷⁾はあるが、天然物から単離された前例はないため、化合物 11 は天然物として新規な構造を有する化合物であると考えられる。

残りの化合物のうち、化合物 9 および 12 についても同様の化学構造決定を行い、それぞれ既知化合物である 8,9,9-Trimethoxy-9H-benzo[de][1,6]naphthyridine と aaptamine であることが分かった⁸⁾。

また、これらの化合物について、ATL 患者由来の S1T 細胞株に対する増殖阻害活性を調べた。その結果、新規化合物 11 は強い抗 ATL 活性 (IC₅₀ 0.29 μ g/mL) を示した。

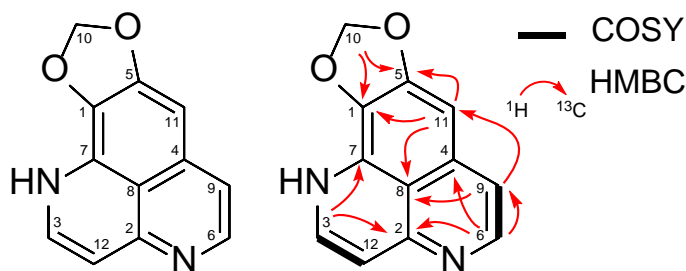


Fig. 6 化合物 11 の化学構造と NMR 相関

2. 3 鹿児島県竹島産軟体サンゴ *Isis hippuris* からの抗 ATL 化合物の探索

2010年5月に鹿児島県竹島にて採取した軟体サンゴ *Isis hippuris* 1.4 kg (wet wt.)について、細かく刻んだ後、MeOH で3回、50%MeOH / CH₂Cl₂ で2回抽出後、抽出物を濃縮して、濃縮物 32 g を得た。この濃縮物を AcOEt と H₂O とで二層分配し、AcOEt 層については一度濃縮後、90%MeOH aq. と *n*-hexane で、H₂O 層は *n*-BuOH と H₂O とでそれぞれ二層分配を行った。そして得られた4つの画分について、抗 ATL 活性試験を行った結果、*n*-hexane 層と 90%MeOH aq. 層に強い活性が見られた。抗 ATL 活性を示した 90%MeOH aq. 層について分離・精製を行った。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分取し、41個のフラクションを得た。20% MeOH / CH₂Cl₂ の溶媒で得られた fr.25 をさらにサイズ排除型リサイクル HPLC {Recycle HPLC (リサイクル数 : 1)} により分取し、5個のフラクションを得た。リテンションタイム 89 min で得られた fr.25-2 をさらに、Recycle HPLC および ODS-HPLC により分取した。得られた化合物を化合物 14 (収量 2.2 mg) と命名した。

化合物 14 は暗赤色の固体として得られ、¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT-135 スペクトルと、二次元 NMR (COSY, HSQC, HMBC) スペクトルデータの解析を行い、構造決定を行った。¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT-135 スペクトルより、13種類の四級炭素 ($\delta_c = 35.3, 35.9, 67.5, 71.1, 72.7, 117.7, 124.7, 133.9, 134.0, 146.7, 169.0, 170.5, 202.7$) と 13種類のメチン炭素 ($\delta_c = 64.2, 68.0, 103.4, 119.2, 119.3, 121.8, 128.2, 129.0, 131.5, 131.6, 133.7, 136.3, 138.1, \dots$), 4種類のメチレン炭素 ($\delta_c = 40.9, 45.3, 45.5, 47.1$), 9種類のメチル炭素 ($\delta_c = 14.0, 15.5, 19.9, 21.5, 24.9, 29.2, 29.9, 31.3, 32.1$) の存在が確認された。また FAB-MS より m/z 630 [M+H]⁺ を観測した。構造解析の結果、本化合物はカロテノイド系化合物であった (Fig. 7)。

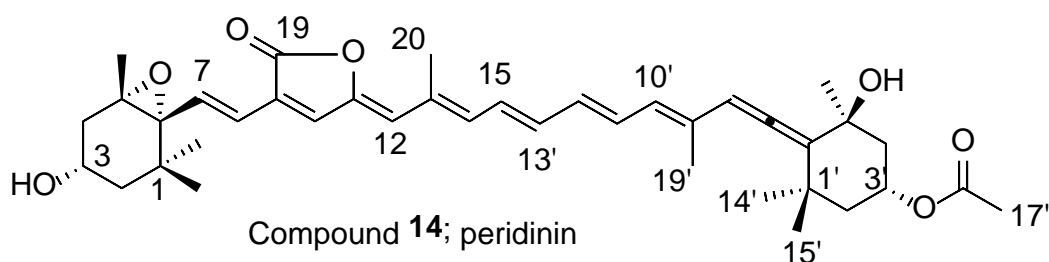


Fig. 7 化合物 **14** の化学構造

化学構造検索の結果、沖縄産同属軟体サンゴから単離された Peridinin^{9) 10)}と化学構造が同じであった。

抗 ATL 活性試験の結果、化合物 TO-D (Peridinin) に強い抗 ATL 活性が見られた。HTLV-1 ウィルスに感染させた T 細胞に対して、Peridinin が増殖抑制活性作用を示した報告例¹¹⁾はあるが、ATL 患者由来のガン細胞株に対して Peridinin が細胞障害性を示したのは、今回が初めてである。

3. 考察

マレーシア産海綿 *N.caribica* から得られた抗 ATL 化合物 **1** ~ **8** は、phyllactone 骨格を有していた。また、同じくマレーシア産海綿 *A.aaptos* から得られた抗 ATL 化合物 **9** ~ **12** は、アルカロイドである aaptamine と同様の炭素骨格である。更に、竹島産軟体サンゴ *I. hippuris* から得られた抗 ATL 化合物 **14** は、カロテノイド系化合物であった。これらの炭素骨格を持つ抗 ATL 化合物が発見されたのは、今回が初めてであり、今後、新たな作用機序を有する ATL 治療薬を開発する上で、有用な知見が得られたと考える。

4. 参考文献

- 1) [特許第 5892508 号] 抗腫瘍剤及びその製造方法, 濱田 季之, 有馬 直道, ヨハン ホワイト, 中島 充賀, 特願 2011-258221, 登録日; 平成 28 年 3 月 4 日.
- 2) 有馬 直道, Y. White, 吉満 誠、濱田 季之, *化学工業*, **2015**, 66, 41-45.
- 3) T. Hamada, Y. White, M. Nakashima, Y. Oiso, M. Fujita, H. Okamura, T. Iwagawa, N. Arima, *Molecules*, **2012**, 17, 9931-9938.
- 4) Y. White, T. Hamada, M. Yoshimitsu, M. Nakashima, M. Hachiman, T. Kozako, K. Matsushita, K. Uozumi, S. Suzuki, H. Kofune, T. Furukawa, N. Arima, *Anticancer Research*, **2011**, 31, 4251-4258.
- 5) X. Fu, L.M. Zeng, J.Y. Su, M. Pais, P. Potier, *J. Nat. Prod.*, **1992**, 55, 1607-1613.
- 6) M.V.R. Reddy, Y. Venkateswarlu, J.V. Rao, *Indian J. Chem. B*, **1993**, 32, 1196-1197.
- 7) A.J. Walz, R.J. Sundberg, *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 8001-8010.
- 8) L. Calcul, A. Longeon, A. Al Mourabit, M. Guyot, M.L. Bourguet-Kondracki, *Tetrahedron*, **2003**, 59, 6539-6544.

- 9) T. Bjornland, F.T. Haxo, S.L. Jensen, *Biochemical Systematics and Ecology*, **2003**, *31*, 1147-1162.
- 10) P.S. Parameswaran, C.T. Achuthankutty, *Proc. of AP Akademi of Science*, **2005**, *9*, 135-138.
- 11) C. Ishikawa, T. Jomori, J. Tanaka, M. Senba, N. Mori, *International of Journal of Oncology*, **2016**, *49*, 1713-1721.

The Bioassay-guided isolation of growth inhibitors of Adult T-cell leukemia (ATL) from marine invertebrates.

Toshiyuki HAMADA

Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University
1-21-35, Korimoto, Kagoshima, Japan
Tel/Fax +81-99-285-8114; E-mail: thamada@sci.kagoshima-u.ac.jp

Adult T-cell leukemia (ATL) is an aggressive malignant disease caused by the human T-cell lymphotropic virus type I (HTLV-I). The affected patients are frequently found in areas where HTLV-I infection is endemic, such as Japan, South America, the Caribbean Basin, West-Central Africa, Northern Iran, Southern India and other isolated tropical regions. In the present study, the *in vitro* inhibitory effects on proliferation and the induction of apoptosis in S1T leukemia cells by the methanol extract of the Malaysian and Japanese marine invertebrates. The bioassay-guided isolation, the structural elucidation and inhibitory activity against S1T cells of 14 compounds, which have three types of carbon skeleton are described. This is the first bioassay-guided isolation of anti-ATL compounds belong to these skeletons. It is expected that these additional studies for elucidating the mechanism of action, anti-tumor effects and toxicity profile of those compounds in a recently developed ATL-mouse model will aid in the development of novel drugs for the treatment of ATL.