

海藻からの成人 T 細胞白血病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理学専攻

〒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 細胞白血病の新規治療薬の開発に向けて、鹿児島県南九州市に群生する紅藻ハナヤナギから 2 種の新規天然有機化合物 (3 と 4) 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

難治性疾患のひとつ、成人 T 細胞白血病 (Adult T-cell leukemia : ATL) は、白血球中の T 細胞に HTLV-1 (human T-cell Leukemia virus type 1) というウイルスが感染して発症する血液のガンである¹⁾。2014~2015 年において、HTLV-1 感染者 (キャリア) は全国に約 71.6~82 万人と推定され²⁾、患者の多くは九州・沖縄地方に偏在している³⁾。発症すると皮膚の発疹やリンパ節の腫脹や高カルシウム血症が起きる。また、強い免疫不全が起こることにより日和見感染症を高頻度に合併する¹⁾。発症率は感染者数の 5%と低い、現在において ATL に有用な治療薬がないため寛解する確率が低い。代表的な治療法として CHOP 療法、LSG15 療法、EPOCH 療法などがあるが、骨髄抑制や脱毛、食欲不振、吐き気などの副作用¹⁾があるため ATL に対してのより効果的な治療薬の開発を目指す必要がある。

我々は、エトポシドのような単剤で用いる新規抗がん剤の開発に加え、mLSG15 などの多剤併用療法を組み合わせることで治療成績の改善が期待される生物活性物質の開発を目指す。

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^{4,7)}。更なる新規抗 ATL 治療薬リード化合物を開発するために、鹿児島県南九州市番所鼻海岸の“海の池”に群生する紅藻ハナヤナギ (*Chondria armata*) 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。

フジマツモ科 (Rhodomelaceae) に属するハナヤナギ (*Chondria armata*) は熱帯および亜熱帯地域に生息し、日本においては本州南部の太平洋岸から鹿児島沿岸地域などの南西の島々に分布している (Red Data Book of Kagoshima Prefecture 2016)。温暖な海域に生息するハナヤナギは、様々な二次代謝産物を有する紅藻として知られている。これまでに報告されている化合物として、奄美群島の徳之島において駆虫薬として用いられていたドウモイ酸 (domoic acid)⁸⁾が挙げられる。ドウモイ酸はグルタミン酸受容体のアゴニストとして作用し、脳内海馬の特定の領域の神経細胞を選択的に破壊することで記憶障害を引き起こす⁹⁾。また、過去にイワスナギンチャク (*Palythoa* sp.) から単離され、マウスにおける LD₅₀ が 0.15 µg / kg の強い致死活性を有する猛毒パリティキシン (palytoxin)¹⁰⁾も過去にハナヤナギからも単離された¹¹⁾。上記の化合物以外からも国内産のハナヤナギから生物活性を有する二次代謝産物の単離報告がいくつかなされている¹²⁾。また、インド産およびオーストラリア産からのハナヤナギからは構造内に Br 基や Cl 基を有するトリテルペン系化合物の単離報告がされており、生物活性の報告は無いものの独特な二次代謝産物として知られている^{13,14)}。

著者らは以前、鹿児島県南九州市番所鼻にて採取されたハナヤナギから ATL 患者由来のがん細胞株である S1T 細胞に対する細胞傷害活性 (抗 ATL 活性) および核磁気共鳴 (NMR) スペクトルから得られる化学構造情報を指標に二次代謝産物の探索を行い、2 種の新規化合物 bandokorol **1** と **2** を単離した¹⁵⁾。本研究では、同海藻から更に 2 種類のハロゲン含有トリテルペノイド (**3** と **4**) を単離・構造決定したので報告する。

2. 材料と方法

2-1. 海藻の採集

紅藻ハナヤナギ (*Chondria armata*)は、鹿児島県南九州市番所鼻海岸の“海の池”にて採取した。

2-2. 抽出および単離

紅藻ハナヤナギ (9 kg, 湿重量) を MeOH で抽出し、得られた抽出液を減圧下で濃縮を行うことで 680 g の抽出物を得た。このうち 346 g を CH₂Cl₂ と 50% MeOH aq. で二層分配を行った。得られた CH₂Cl₂ 抽出物 (15 g) のうち 5.6 g をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Silica gel 60, φ: 40×300 mm, mobile phase : 10% AcOEt / *n*-hexane – 20% AcOEt / *n*-hexane – 40% AcOEt / *n*-hexane – 100% AcOEt – 50% MeOH / CH₂Cl₂) にて分離を行い、8 個の画分を得た。**fr.3** (175 mg のうち 156 mg) を recycle HPLC (column : JAIGEL-SIL, φ 20×500 mm, 3.5 mL / min, 5 cycles, CHCl₃) にて分離を行い、8 個の画分を得た。さらに、**fr.3-5** (17.8 mg) を順相 HPLC (column : Cosmosil 5SL- II, φ: 4.6×250 mm, 1.0 mL / min, 90 µL inject, 10% AcOEt / *n*-hexane) にて分離を行い 14 個の画分を得た。得られた 7 番目と 8 番目のフラクションをまとめて、逆相 HPLC (column : Cosmosil 5C₁₈-MS- II, φ: 4.6×250 mm, 1.0 mL / min, 90 µL inject, 80% MeOH / H₂O) にて

分離を行い、**fr.3-5-7-7 (compound 3; 1.5 mg)**、**fr.3-5-7-8 (compound 4; 0.8 mg)** を単離した。

2-3. ATL 患者由来の S1T 細胞株に対する細胞傷害活性

各画分および単離・精製した化合物の生物活性は、ATL 患者由来の癌細胞株である S1T 細胞に対する細胞傷害活性を、WST-8 法を用いて評価した。試験するサンプル (0.1 mg) を DMSO (50 μ L) に溶かした後に滅菌水で 9 倍希釈した。その後、96 well プレートの各 well にサンプル溶液 10 μ L、RPMI-1640 培地 (10% ウシ胎児血清、1% L-グルタミン、1% ストレプトマイシン含有) 90 μ L および S1T 細胞を含む RPMI-1640 培地 100 μ L を加え 72 時間培養した。なお、1 well あたりの細胞数は 10,000 程度になるように調製した。その後、発色試薬 WST-8 (10 μ M) を加えて 4 時間培養し、マイクロプレートリーダー (Infinite M200 FA) を用いて 450 nm の吸光度を測定し、細胞の生存率を算定した。

3. 結果と考察

鹿児島県南九州市番所鼻産ハナヤナギ (9 kg, 湿重量) を MeOH で抽出し、その抽出物を CH_2Cl_2 と 50% MeOH aq. で二層分配した。得られた CH_2Cl_2 抽出物から各種カラムクロマトグラフィー法を駆使し、**compound 3** (1.5 mg)、および **compound 4** (0.8 mg) を単離した (**Figure 1**)。

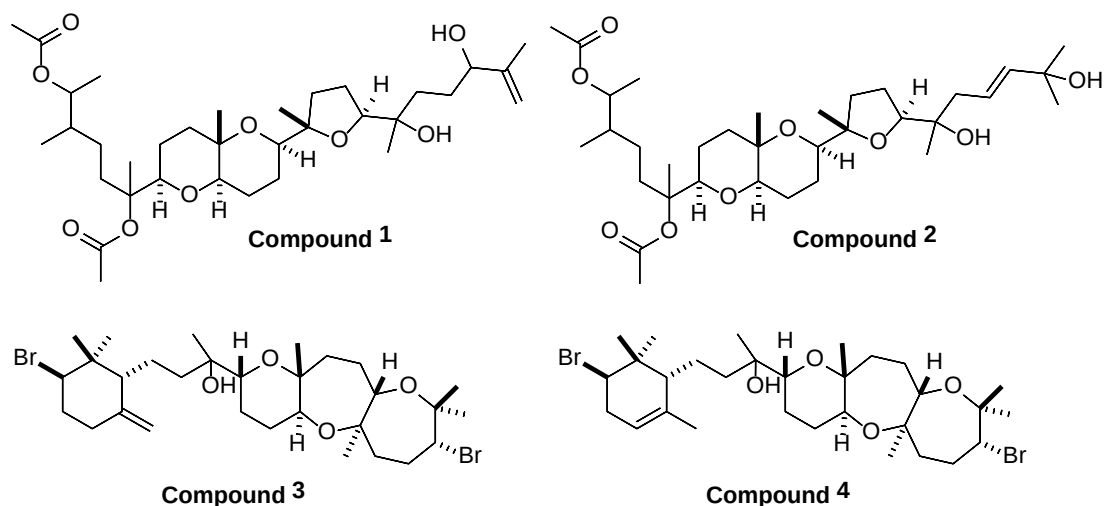
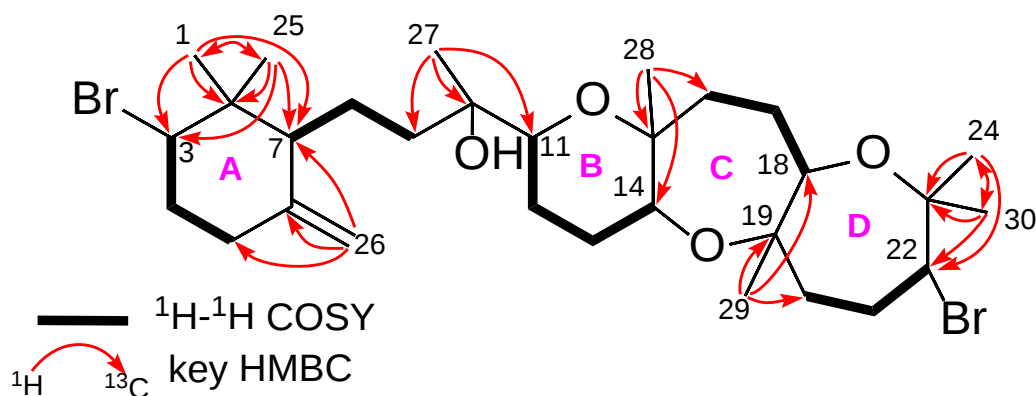


Figure 1. 番所鼻産ハナヤナギから単離した **compound 1 ~ 4** の化学構造

Compound 3 は淡黄色無定形結晶として得られた。**Compound 3** の FAB-MS の 3 本の分子イオンピーク m/z 633、635 および 637 (ピーク強度比 1:2:1)、ならびに HR-FAB-MS の m/z 633.2153 $[\text{M}+\text{H}]^+$ より、その分子式は $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_4\text{Br}_2$ と決定した。 ^1H - ^1H

COSY スペクトルより 5 つの部分構造が得られ、さらに、HMBC スペクトルより、H-1 および H-25 から C-2、C-3 および C-7 への相関、H-26 から C-5、C-6 および C-7 への相関、H-27 から C-9、C-10 および C-11 への相関、H-28 から C-14、C-15 および C-16 への相関、H-29 から C-18、C-19 および C-20 への相関、そして H-24 および H-30 から C-22 および C-23 への相関が確認できたことにより、六員環 2 個と七員環 2 個の 4 つ



の環構造を持つ平面構造が推定できた (Figure 2)。BCD 環部分はオーストラリア産ハナヤナギから単離された *armatol B*¹¹⁾ と同じ構造であったが、A 環が六員環の化合物は今回が初めてである。

Figure 2. Compound 3 の ^1H - ^1H COSY および key HMBC 相関

さらに NOESY スペクトル (Figure 3) より、H-3/H-7 の NOE 相関と H-11/H-28、H-28/H-16 β 、H-16 β /H-18、および H-18/H-22 の NOE 相関が見られたことから、これらのプロトンが同一方向に配向していることが分かった。また、H-14/H-29 の NOE 相関より、これらが先程のプロトンとは、逆方向に配向していることが分かった。それにより、A 環と BCD 環のそれぞれの相対配置を決定した。A 環と BCD 環との相対配置については未定である。

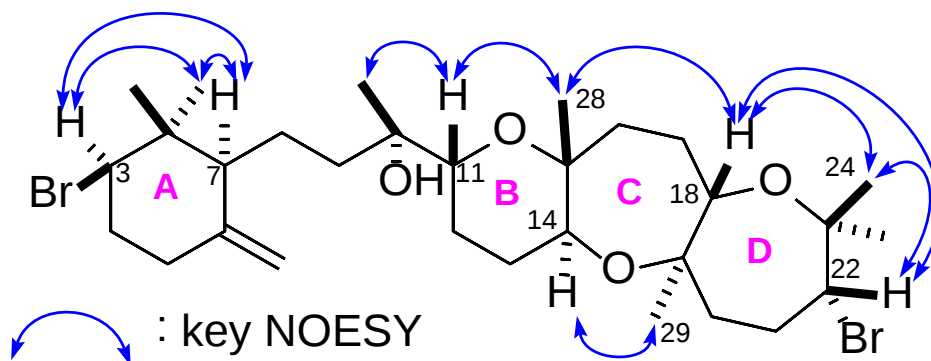


Figure 3. Compound 3 の key NOESY 相関

Compound 4 は、compound 3 と同様の FAB-MS および HR-FAB-MS (m/z 633.2154

[M+H]⁺) が得られたことから、分子式は C₃₀H₅₀O₄Br₂ と決定した。NMR データも **compound 3** のものとよく似ていたが、**compound 3** の A 環上のエキソメチレンプロトンのシグナルが消失し、代わりに、新たなオレフィンプロトンとメチルプロトンのシグナルが現れたこと、および HMBC スペクトルより、そのメチルプロトン Me-26 より C-5 と C-6 のオレフィン炭素ならびに C-7 に相関を示すことにより、**Figure 1** に示す平面構造と決定した (**Figure 4**)。

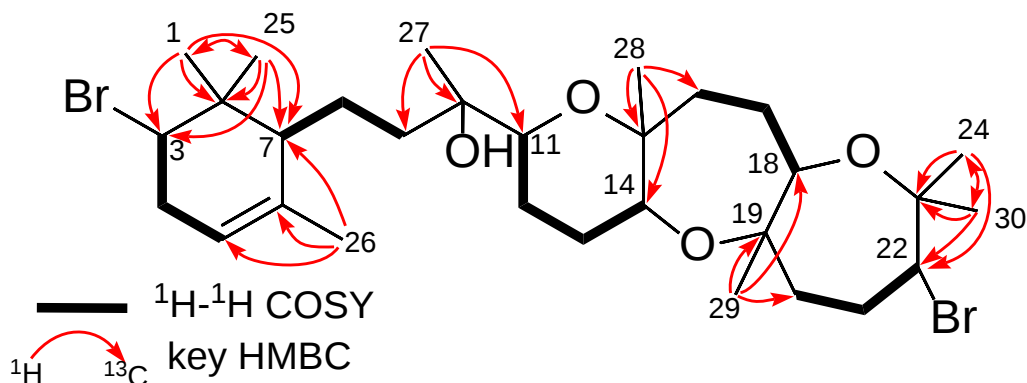


Figure 4. Compound 4 の ¹H-¹H COSY および key HMBC 相関

また、相対配置についても **compound 3** と同様であった (**Figure 5**)。一部の相対配置ならびに絶対配置については未決定であるが、過去に単離された *armatol* 類と同様と考える。

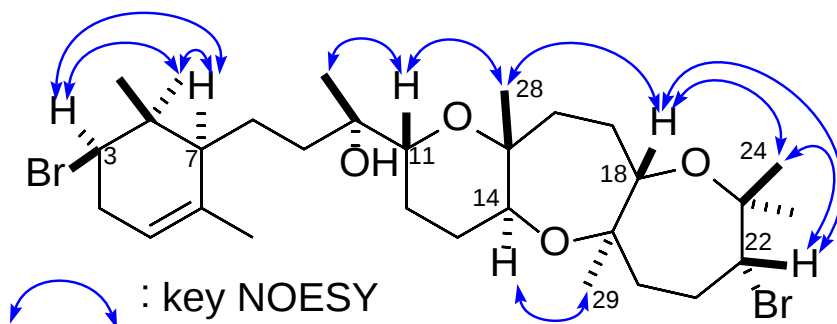


Figure 5. Compound 4 の key NOESY 相関

単離した 2 つの化合物の S1T 細胞に対する細胞傷害活性試験を行ったところ、**compound 3** において IC₅₀ 値 6.3 μM、**compound 4** において 4.6 μM とやや強い細胞傷害活性を有していた。今後も薩南諸島に生息する海藻類に含まれる二次代謝産物を探索しつつ、成人 T 細胞白血病の治療薬のリード化合物になり得る化合物を開発していきたい。

4. 謝辞

シダ植物の採集でお世話になった喜界島獣医の高坂嘉孝博士、鹿児島大学総合研究博物館の田金秀一郎博士、国際島嶼教育研究センターの鈴木英治特任教授、理工学研究科の宮本旬子教授に深く感謝する。

本研究の一部は、「物質・デバイス領域共同研究拠点」の基盤共同研究（No. 20201355 および 20211347）ならびに科研費補助金(No.17K05838 および No.18K06732)によるものである。

5. 参考文献

- 1) 厚生労働省, 成人 T 細胞白血病の治療を受ける患者さん・ご家族へ 患者さんやご家族が納得した治療を受けていただくために, **2011**.
- 2) 浜口功 他, 平成 28 年度医療研究開発推進事業費補助金（新興・再興感染症に関する革新的医薬品等開発推進研究事業）成果報告書[HTLV-1 疫学研究および検査法の標準化に関する研究], **2017**.
- 3) 国立がん研究センター, がん情報サービス, **2021**.
<https://ganjoho.jp/public/cancer/ATL/index.html>
- 4) [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.
- 5) 有馬 直道, Y. White, 吉満 誠、濱田 季之, *化学工業*, **2015**, 66, 41-45.
- 6) T. Hamada, Y. White, M. Nakashima, Y. Oiso, M. Fujita, H. Okamura, T. Iwagawa, N. Arima, *Molecules*, **2012**, 17, 9931-9938.
- 7) 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.
- 8) K. Daigo, *J. Pharm. Soc. Japan*, **1959**, 79, 350-386.
- 9) B. Grimmelt, M. Nijjar, J. Brown, S. Macnair, S. Wagner, G. Johnson, J. Amend, *Toxicon*, **1990**, 28, 501-508.
- 10) RE. Moore, PJ. Scheuer, *Science*, **1971**, 172 (3982), 495-498.
- 11) S. Mori, K. Sugahara, M. Maeda, K. Nomoto, T. Iwashita, T. Yamagaki, *Tetrahedron Letters*, **2016**, 57 (32), 3612-3617.
- 12) T. Hamada, S. Onitsuka, H. Okamura, *The Osumi Islands, Kagoshima University Research Center for the Pacific Islands* (K. Kawai, R. Terada, and S. Kuwahara eds.), **2017**, 89-94.
- 13) ML. Ciavattaa, S. Wahidulla, L. D'Souza, G. Scognamiglio, G. Cimino, *Tetrahedron*, **2001** 57 (3), 617-623.
- 14) ARB. Ola, AM. Babey, C. Motti, BF. Bowden, *Aust. J. Chem.*, **2010**, 63 (6), 907-914.
- 15) T. Hamada, K. Kobayashi, N. Arima, F. Tani, CS. Vairappan, S. Onitsuka, H. Okamura, *Natural Product Research*, **2020**, 35 (23), 5075-5080.

The Bioassay-guided isolation of growth inhibitors of Adult T-cell leukemia (ATL) from the red alga *Chondria armata*

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

The red alga *Chondria armata* is known to produce and contain a rich diversity of secondary metabolites, such as domoic acid-related alkaloids and triterpene polyethers. Our investigation on red alga *C. armata* from Kagoshima coast, Japan, resulted in the isolation of two new triterpene polyethers, **3** and **4**. The structures of these compounds were determined based on spectroscopic data such as infrared (FTIR), ¹H-NMR, APT, ¹H-¹H-COSY, HSQC, HMBC, NOESY and FAB mass spectrometry (HRFABMS). The anticancer potentials of these compounds were tested against adult T-cell leukemia (ATL), S1T cells.