

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05454

研究課題名(和文) 癌の転移と浸潤を抑制するプロアントシアニジン類の合成と化学生物学的研究

研究課題名(英文) Chemical biological studies on proanthocyanidins which suppress metastasis and invasion of cancer

研究代表者

真壁 秀文 (Makabe, Hidefumi)

信州大学・学術研究院農学系・教授

研究者番号：90313840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではまずピロガロール基を有するエピガロカテキン4,5量体の合成と抗腫瘍活性の評価を行った。合成の鍵反応としては縮合反応であるが、亜鉛やトリメチルシリルトリフラートを用いたところ反応が進行した。抗腫瘍活性としては、ガン細胞増殖阻害活性を転移に関わるFABP5遺伝子の抑制効果が見られた。続いて、顕著なガン細胞増殖阻害活性を示すエピガロカテキン2量体の蛍光プローブ分子の創製を行った。この化合物の4"位にカルボン酸側鎖を導入してfluorescein amineを導入したが、収率に課題を残した。最後に、自己縮合反応を用いてエピカテキンがレート2,3量体の合成も達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、プロアントシアニジン類のうちでピロガロール部分を有するものが癌細胞増殖阻害活性を持ち、エピカテキンを構成単位とした5量体以上のものがガンの転移に関わる遺伝子の発現を抑制することを明らかにした。ガン細胞の増殖阻害のみに焦点を当てた従来の研究より、転移を抑制する点で優位性がある。また、プロアントシアニジン類は農産物の可食部以外に含まれているので未利用農産物の有効利用に繋がる研究成果である。

研究成果の概要(英文)： Syntheses of epigallocatechin tetramer and pentamer were achieved. The key condensation was accomplished using a dimeric epigallocatechin electrophile and dimeric or trimeric epigallocatechin nucleophile in the presence of zinc triflate or TMSOTf. The condensed products were successfully converted to epigallocatechin tetramer and pentamer. These compounds showed significant antitumor activity against prostate PC-3 cell lines.

Synthesis of fluorescent probe of epigallocatechin dimer was achieved. Condensation of carboxylic acid and fluorescein amine afforded fluorescent probe of epigallocatechin dimer in a trace yield. The improvement of condensation yield is now underway.

Synthesis of epicatechin epicatechin 3,3"-digallate was achieved. The self condensation of epicatechin gallate derivative using ytterbium triflate afforded dimer of epicatechin gallate in 73% yield. The condensed product was successfully converted to epicatechin 3,3"-digallate.

研究分野：生物有機化学

キーワード：プロアントシアニジン 抗腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

カテキンやエピカテキンに代表される flavan-3-ol 系ポリフェノールは、分離が難しい混合物で得られるため、個々の化合物の性質や生理活性の研究は遅れている。従って、各種の化合物を化学合成により供給し、新たな生理活性の発見が急務となっている。そこで申請者は flavan-3-ol 系ポリフェノールの汎用性の高い合成法の開発を行った。その結果、カテキンまたはエピカテキンの重合体であるプロシアニジン類では 6 量体まで (Makabe, H. et al, *Scientific Reports* **2017**, 7, 7791.), ガロカテキンまたはエピガロカテキンの重合体であるプロデルフィニジンでは 3 量体までの合成を達成した。生理活性に関しては合成物を用いて抗腫瘍活性の研究を行い、以下のことを明らかにした。

(1) 2 量体などの低重合体ではエピガロカテキン等を構成単位としたピロガロール基を有するプロデルフィニジン類が顕著な抗腫瘍活性を示すが、エピカテキン等の重合体であるプロシアニジン類は活性を示さない (Makabe, H. et al, *Tetrahedron* **2013**, 69, 3543.). ただし、ピロガロール基の抗腫瘍活性における役割は未解明であるため、明らかにする必要がある。

(2) 連携研究者の藤井教授が見出した癌転移原因遺伝子 FABP5 (fatty acid binding protein 5) (Fujii, H. et al *Int. J. Oncol.* **2008**, 32, 767.) の発現抑制活性と癌細胞浸潤阻害活性は、エピカテキンの 5 量体以上の化合物に活性が見られた。エピカテキン 6 量体の FABP5 発現は  $30 \mu\text{M}$  で約 60% 抑制され、浸潤は同濃度で 95% 阻害された。研究課題の核心をなす学術的「問い」は次の通りである。

① ピロガロール基を認識し、癌細胞の増殖に関わる標的タンパク質が存在するのではないかとピロガロール基を持つプロデルフィニジンが顕著な抗腫瘍活性を持つ理由を解明する。

② 新規に見いだされたエピガロカテキンオリゴマー (Huang, et al. *J. Funct. Foods*, **2016**,

20, 463.) は癌細胞増殖阻害、癌転移原因遺伝子の FABP5 発現抑制・癌細胞浸潤阻害全てにおいて顕著な活性を示すのではないかと、なぜなら本化合物は上記の活性に必要な構造因子を全て有しているからである。従って、本化合物の重合度別に合成し、上記活性の評価と、エピカテキンオリゴマーも含めて FABP5 発現抑制におけるメカニズムの解明を行う。

## 2. 研究の目的

本研究は、プロアントシアニジン類が有する癌の増殖、転移と浸潤の抑制活性における構造活性相関と活性発現機構について化学生物学的アプローチにより解明することが目的である。申請者はプロアントシアニジン類の合成研究を行い、エピガロカテキン等を構成単位としたピロガロール基を有するプロデルフィニジン類が顕著な抗腫瘍活性があることを見いだした。また、癌転移原因遺伝子の発現抑制と癌細胞浸潤抑制活性ではエピカテキンの 5 量体以上に顕著な活性があることも見いだした。本研究では上記の知見を基に、未だに解明されていないピロガロール基を有するプロデルフィニジン類の癌細胞増殖阻害活性に関与する標的タンパク質の同定を行う。また、癌細胞増殖阻害と癌の転移・浸潤抑制活性に必須な構造因子であるピロガロール基とエピカテキン重合体の骨格を持つ、新規化合物エピガロカテキンオリゴマーを合成し、上述の抗腫瘍活性に関して新しい学術的知見を得ることを目指す。

### 3. 研究の方法

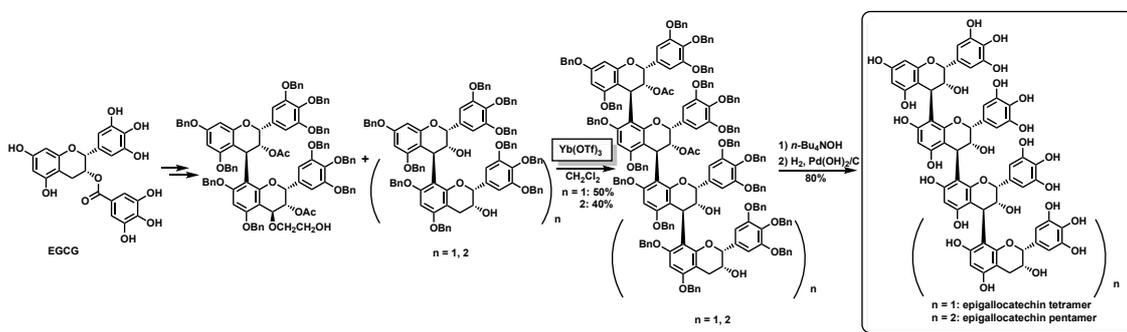
(1) 新規化合物であるエピガロカテキンオリゴマーの合成を行う。合成が達成出来た後に、前立腺癌細胞増殖阻害活性、癌転移原因遺伝子 FABP5 発現抑制および癌細胞浸潤阻害活性の評価と解析を行う。

(2) ピロガロール基を持つプロデルフィニジンに結合している蛍光プローブや磁気ビーズを用いたアプローチにより標的タンパク質を同定する。

### 4. 研究成果

#### (1) ピロガロール基を有するエピガロカテキン4, 5量体の合成と抗腫瘍活性

プロアントシアニジン類は縮合型タンニン的一种であり、抗酸化活性をはじめとする様々な生物活性を有することが知られている。研究代表者はプロアントシアニジン類の優れた生物活性を特異な構造に着目し、合成研究を行ってきたが、その過程でピロガロール基を持つ化合物が顕著な抗腫瘍活性を有することを明らかにしてきた。本研究では、未だに合成や生物活性の報告のないピロガロール基を有するエピガロカテキン重合体の合成と構造活性相関の研究を行った。エピガロカテキンオリゴマーのうち4, 5量体は2016年にオクラの種子に含まれていることが報告されているが、単離精製が困難であるため合成研究を行った。合成は以前研究代表者が開発したエピガロカテキンの2量体求電子剤を用いて2量体および3量体の求核剤と亜鉛トリフラートをルイス酸として縮合する方法を試みた。その結果、エトキシエトキシ基を持つエピガロカテキンの2量体求電子剤では反応が全く進行しないことを確認した。そのため様々な脱離基を持つ求電子剤と縮合反応を検討した結果、エチレングリコール基を持つ化合物が縮合反応を起こすことを明らかにした。また、ルイス酸のスクリーニングも行い、亜鉛トリフラートのほかにトリメチルシリルトリフラートでも縮合反応が進行することも見いだした。縮合物は順次保護基の脱保護反応に供し、エピガロカテキン4, 5量体の初めての合成を達成した (Scheme 1)。



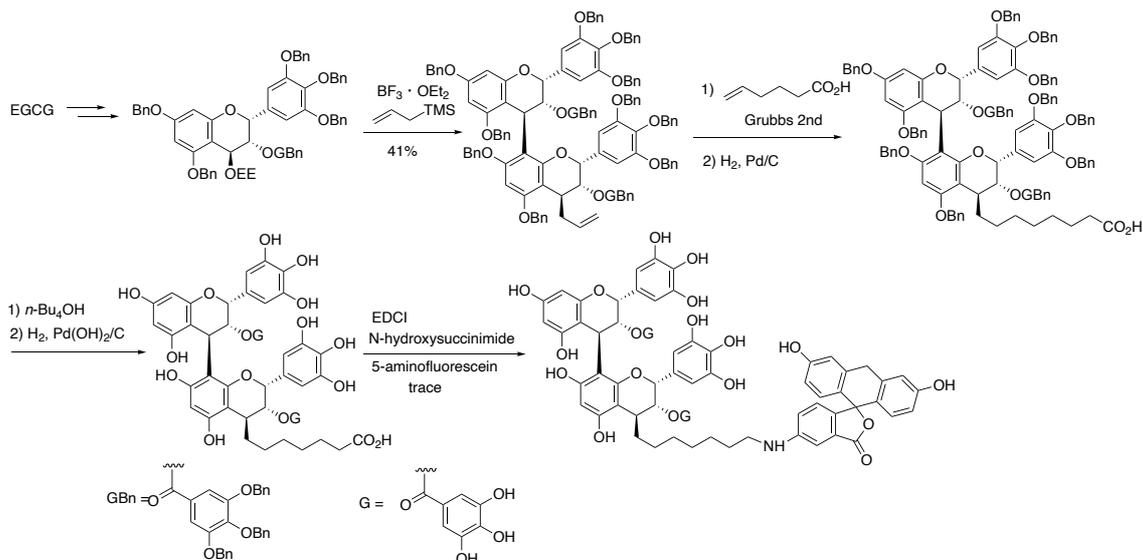
Scheme 1. ピガロカテキン4, 5量体の合成

合成したエピガロカテキン4, 5量体に対して、ヒト前立腺癌細胞PC-3株を用いて細胞増殖抑制試験を行った結果、エピガロカテキン4, 5量体と比較して強い活性が認められた。また、癌転移原因遺伝子のfatty-acid binding protein 5 (FABP5)の遺伝子発現抑制試験を行ったところ、発現が抑制される傾向が見られた。ただし、まだ有意差のあるデータが得られていないため、再現性の評価を行

っている。

## (2) 作用機序解明に向けたプロデルフィニジンB2の蛍光プローブの合成研究

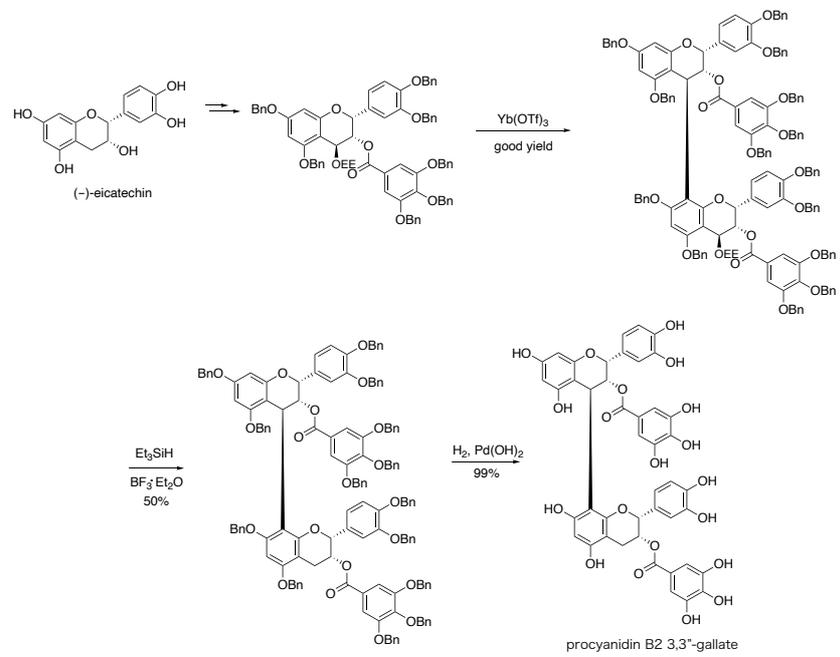
抗腫瘍活性の活性発現メカニズムの解明を目的として、エピガロカテキン2量体を基本骨格とする蛍光プローブの合成に取り組んだ。合成は以下のようにして行った。まず、エピガロカテキンガラレート(EGCG)を出発物質として、フェノール性水酸基をベンジルエーテルとした後に、加水分解のよりガラレート部分を除去してエピガロカテキンベンジル保護体を得た。次に、この化合物の4位にエトキシエチル基を導入後して求電子試薬とし、先の合成したエピガロカテキンのベンジル保護体を求核剤として縮合反応に供した。種々反応を検討した結果、アリルトリメチルシラン存在下でトリフルオロボランエーテルコンプレックスをルイス酸として縮合反応に供したところ、4'位にアシル基が導入されたエピガロカテキンベンジル保護体の2量体を得ることができた。アシル基が導入できたので、5-hexenoic acidと第二世代Grubbs触媒を用いたクロスメタセシス反応に供したところ、4'位にカルボン酸を持つ側鎖を導入することができた。このカルボン酸部位にfluorescein amineとEDCIとヒドロキシスクシンイミドを用いて縮合反応を行い、エピガロカテキン2量体の蛍光ラベル体の初の合成を達成することが出来た。同様に対照実験用のエピカテキン2量体の蛍光ラベル体の合成も行った。ただし、fluorescein amineとの縮合反応の収率は数%程度と大変低いことが問題点であり、現在反応条件を精査して実用的な合成経路の開発を目指している(Scheme 2)。



Scheme 2. プロデルフィニジンB2 蛍光プローブの合成

## (3) ガラート型プロシアニジンの合成研究

研究代表者はガラート型プロシアニジンの新規合成法も開発した。エピカテキンガラレート誘導体をイットリビウムトリフラートで処理すると自己縮合により生成した2量体を良好な収率で調製できた。この化合物の4'位のエトキシエチル (OEE)基をルイス酸存在下で、トリエチルシランを用いて還元的に除去し、全ての保護基を除去し、procyanidin B2 3,3''-digallateを合成した(Scheme 3)。



Scheme 3. Procyanidin B2 3,3''-digallateの合成

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野々部 修平, 戸田 和弥, 松本 桐子, 川口 耕一郎, 轟 拓磨, 梅澤 公二, 真壁 秀文, 藤井 博
2. 発表標題 がん転移促進遺伝子を標的とした抗腫瘍性分子の探索と作用機序の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会, 2019年12月3日, マリンメッセ福岡
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本慎也, 市川幹広, 石原知里, 野々部修平, 服部恭尚, 梅澤公二, 藤井博, 真壁秀文
2. 発表標題 エピガロカテキン重合体の合成研究
3. 学会等名 第60回天然有機化合物討論会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野田礼子, 森雅貴, 河原誠一, 服部恭尚, 藤井博, 真壁秀文
2. 発表標題 ブドウ梗に含まれる proanthocyanidin 類の合成
3. 学会等名 日本農芸化学会 中部支部 第 183 回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 真壁秀文, 梅澤公二, 藤井博
2. 発表標題 オリゴタンニンの合成技術
3. 学会等名 バイオジャパン2018
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	梅澤 公二  (Umezawa Koji)  (00609258)	信州大学・総合理工学研究科・助教    (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------