

N-23

## オレアナン型トリテルペン誘導体の調製及び生物活性

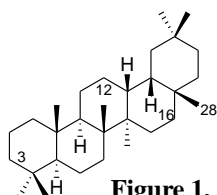
## Synthesis of oleanane-type triterpenoid derivatives and evaluation of their biological activity

○山崎貴司<sup>1</sup>, 浮谷基彦<sup>2</sup>, 石井健太<sup>1</sup>, 荻原英里<sup>1</sup>, 栗田雅弘<sup>1</sup>, 多知洋介<sup>1</sup>, 秋久俊博<sup>2</sup>\*Takashi Yamazaki<sup>1</sup>, Motohiko Ukiya<sup>2</sup>, Kenta Ishii<sup>1</sup>, Eri Ogihara<sup>1</sup>, Masahiro Kurita<sup>1</sup>, Yosuke Tachi<sup>1</sup>, Toshihiro Akihisa<sup>2</sup>

Abstract: Several derivatives were prepared from three oleanane-type triterpenoids, echinocystic acid, quillaic acid, and oleanolic acid, by esterification and reduction. These derivatives were evaluated for their cytotoxicities against four human cancer cell lines and inhibitory effects on human topoisomerases I and II. Among these compounds, echinocystic acid methyl ester (**2**) exhibited potent cytotoxicities against three cancer cell lines, A549 (lung), AZ521 (stomach), and SK-BR-3 (breast) with IC<sub>50</sub> values of 2.4, 3.1, and 2.4 μM respectively. Some structure-activity relationships between cytotoxicities and topoisomerase inhibitory effects were discussed.

## 1. 緒言

トリテルペノイドは生物体内でスクアレンの環化によって生合成される化合物群であり、抗炎症活性などの生物活性を有することから、植物起源生薬においては活性本体として機能しているものとみなされている。オレアナン型トリテルペノイドは **Figure 1** に示す基本骨格を有するが、近年、オレアナン型トリテルペノイドの化学構造修飾物に一酸化窒素産生抑制活性、腫瘍細胞傷害活性などの様々な生物活性が見出されてきており<sup>[1]</sup>、機能性化合物創製のテンプレート化合物として有用と考えられている。



**Figure 1.** Oleanane 骨格

オレアナン型トリテルペノイドの誘導体調製には、C-3 位 のみに水酸基を持つ Oleanolic acid (3β-Hydroxyolean-12-en-28-oic acid ; **11**) が反応基質として用いられることが多いが、我々はこれまでに C-3 位および C-16 位に水酸基を有する種々のジヒドロキシトリテルペノイドが発がん予防効果、腫瘍細胞傷害活性などの有用な生物活性を有することを明らかにしている<sup>[2]</sup>。このような背景から、本研究では、3,16-ジヒドロキシ構造を有するオレアナン型トリテルペノイドの構造修飾およびそれらのヒト腫瘍細胞に対する傷害活性を評価することを計画した。構造修飾の基質としては Echinocystic acid (3β,16α-Dihydroxyolean-12-en-28-oic acid; **1**), Quillaic acid (3β,16α-Dihydroxy-23-

oxoolean-12-en-28-oic acid; **6**), および Oleanolic acid (**11**) を用いた。調製化合物については、ヒト腫瘍細胞に対する傷害活性を評価するとともに、細胞増殖に関わる酵素であるトポイソメラーゼ(TOP) I, II に対する阻害活性を評価した。

## 2. 実験

2-1. Echinocystic acid (**1**), Quillaic acid (**6**)の調製

Echinocystic acid (**1**)および Quillaic acid (**6**)はそれぞれ、ヒマワリ (*Helianthus annuus* L.; キク科) 花卉に含まれる Helianthoside II, シャボンノキ(*Quillaja saponaria* Mol.; キラヤ科) から得られる Quillaja saponin を 1M-HCl 中、3 時間加熱還流を行い加水分解して得た。

## 2-2. オレアナン型トリテルペノイド誘導体の調製

1) Echinocystic acid (**1**)誘導体

Echinocystic acid (**1**)のメチルエステル化、アセチル化、コハク酸およびジメチルコハク酸エステル化によって化合物 **2-5** を調製した (**Figure 2**)。

2) Quillaic acid (**6**)誘導体

Quillaic acid (**6**)のメチルエステル化、アセチル化、NaBH<sub>4</sub>還元により化合物 **7-10** を調製した (**Figure 2**)。

3) Oleanolic acid (**11**)誘導体

Oleanolic acid (**11**)のメチルエステル化、アセチル化、コハク酸およびジメチルコハク酸エステル化によって化合物 **12-15** を調製した (**Figure 2**)。

## 2-3. 生物活性試験

## 1) 腫瘍細胞傷害活性試験

4 種のヒト由来腫瘍細胞株[HL60 (白血病), A549

1 : 日大理工・院 (前)・応化, CST, Nihon-U 2 : 日大理工・教員・応化, CST, Nihon-U

(肺がん), AZ521 (胃がん), SK-BR-3 (乳がん)]に対する傷害活性を MTT 法<sup>[3]</sup>により評価した. 傷害活性は IC<sub>50</sub> 値(μM)として算出した.

## 2) トポイソメラーゼ I, II 阻害活性試験

TOP-I, II に対する阻害試験は文献記載の方法<sup>[3]</sup>により行った. 傷害活性は IC<sub>50</sub> 値(μM)として算出した.

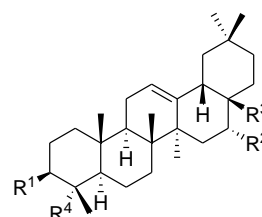
## 3. 結果と考察

Echinocystic acid (**1**)より 4 種の誘導体(**2–5**), Quillaic acid(**6**)より 4 種の誘導体(**7–10**), Oleanolic acid (**11**)より 4 種の誘導体(**12–15**)を調製した. これらの腫瘍細胞傷害活性および TOP-I, II 阻害活性を **Table 1** に示した.

肺がん細胞株 A549 に対し化合物 **2** (IC<sub>50</sub> 2.4 μM)および **14** (9.3 μM)が, 胃がん細胞株 AZ521 に対し化合物 **2** (3.1 μM)および **7** (8.7 μM)が, 乳がん細胞株 SK-BR-3 に対し化合物 **1** (9.2 μM), **2** (2.4 μM), **7** (5.7 μM)が抗がん剤である Cisplatin よりも高い細胞傷害活性を示した (**Table 1**). また, TOP-II に対しては, 化合物 **1** (IC<sub>50</sub> 24.7 μM)が参照化合物 Etoposide よりも高い阻害活性を示した (**Table 1**).

以上の結果から, 下記の構造活性相関が見出された.

- (1) C-16 位 OH 基は細胞傷害活性に必要である (**1** vs **11**).
- (2) C-28 位 COOH 基のメチルエステル化は細胞傷害活性を増強させる (**1** vs **2**, **11** vs **12**).
- (3) 3,16-diOH 基のジアシル化は細胞傷害活性を低下させる (**1** vs **3**, **4**, **5**).
- (4) C-28 位 COOH 基のメチルエステル化は, TOP 阻害活性を低下させる (**1** vs **2**, **11** vs **12**).



- 1** R<sup>1</sup> = OH R<sup>2</sup> = OH R<sup>3</sup> = COOH R<sup>4</sup> = CH<sub>3</sub>  
**2** R<sup>1</sup> = OH R<sup>2</sup> = OH R<sup>3</sup> = COOCH<sub>3</sub> R<sup>4</sup> = CH<sub>3</sub>  
**3** R<sup>1</sup> = OCOCH<sub>3</sub> R<sup>2</sup> = OCOCH<sub>3</sub> R<sup>3</sup> = COOH R<sup>4</sup> = CH<sub>3</sub>  
**4** R<sup>1</sup> = OCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH R<sup>2</sup> = OCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH  
R<sup>3</sup> = COOH R<sup>4</sup> = CH<sub>3</sub>  
**5** R<sup>1</sup> = OCOCH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>COOH R<sup>2</sup> = OCOCH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>COOH  
R<sup>3</sup> = COOH R<sup>4</sup> = CH<sub>3</sub>  
**6** R<sup>1</sup> = OH R<sup>2</sup> = OH R<sup>3</sup> = COOH R<sup>4</sup> = CHO  
**7** R<sup>1</sup> = OH R<sup>2</sup> = OH R<sup>3</sup> = COOCH<sub>3</sub> R<sup>4</sup> = CHO  
**8** R<sup>1</sup> = OH R<sup>2</sup> = OH R<sup>3</sup> = COOCH<sub>3</sub> R<sup>4</sup> = CH<sub>2</sub>OH  
**9** R<sup>1</sup> = OH R<sup>2</sup> = OH R<sup>3</sup> = COOH R<sup>4</sup> = CH<sub>2</sub>OH  
**10** R<sup>1</sup> = OCOCH<sub>3</sub> R<sup>2</sup> = OCOCH<sub>3</sub> R<sup>3</sup> = COOH R<sup>4</sup> = CHO  
**11** R<sup>1</sup> = OH R<sup>2</sup> = H R<sup>3</sup> = COOH R<sup>4</sup> = CH<sub>3</sub>  
**12** R<sup>1</sup> = OH R<sup>2</sup> = H R<sup>3</sup> = COOCH<sub>3</sub> R<sup>4</sup> = CH<sub>3</sub>  
**13** R<sup>1</sup> = OCOCH<sub>3</sub> R<sup>2</sup> = H R<sup>3</sup> = COOH R<sup>4</sup> = CH<sub>3</sub>  
**14** R<sup>1</sup> = OCO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COOH R<sup>2</sup> = H R<sup>3</sup> = COOH R<sup>4</sup> = CH<sub>3</sub>  
**15** R<sup>1</sup> = OCOCH<sub>2</sub>C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>COOH R<sup>2</sup> = H R<sup>3</sup> = COOH R<sup>4</sup> = CH<sub>3</sub>

**Fig. 2** Structures of compounds **1–15**

## 4. 参考文献

- [1] H. Sun, et al.: 「Structure-activity relationships of oleanane- and ursane-type triterpenoids」, *Bot. Stud.* **47**, 339–368, 2006.
- [2] M. Ukiya, et al.: 「Constituent of compositae plants III. Anti-tumor promoting effects and cytotoxic activity against human cancer cell lines of triterpene diols and triols from edible chrysanthemum flowers」, *Cancer Lett.*, **177**, 7–12, 2002.
- [3] T. Kikuchi, et al.: 「Albanol A from the root of *Morus alba* L. induces apoptosis cell death in HL60 human leukemia cell line」, *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 568–571, 2010.

**Table 1.** Cytotoxicities against four human cancer cell lines and topoisomerase inhibitory effects of compounds **1–15**

Compounds	Cytotoxicity (IC <sub>50</sub> : μM)				TOP Inhibition (IC <sub>50</sub> : μM)	
	HL60	A549	AZ521	SK-BR-3	Topo I	Topo II
<b>1</b> Echinocystic acid	>100	27.0	30.3	9.2	47.4	24.7
<b>2</b> Echinocystic acid methyl ester	13.1	2.4	3.1	2.4	65.2	>100
<b>3</b> Echinocystic acid 3,16-di- <i>O</i> -acetate	99.6	85.2	93.5	>100	>100	>100
<b>4</b> Echinocystic acid 3,16-di- <i>O</i> -succinate	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>5</b> Echinocystic acid 3,16-di- <i>O</i> -dimethylsuccinate	83.6	>100	>100	>100	>100	>100
<b>6</b> Quillaic acid	-	>100	91.4	>100	-	-
<b>7</b> Quillaic acid methyl ester	-	65.4	8.7	5.7	-	-
<b>8</b> Quillaic acid 3,16-di- <i>O</i> -acetate	-	-	-	-	-	-
<b>9</b> Methyl 3β,16α,23-trihydroxyolean-12-en-28-oate	-	-	-	-	-	-
<b>10</b> 3β,16α,23-Trihydroxyolean-12-en-28-oic acid	-	-	-	-	-	-
<b>11</b> Oleanolic acid	44.7	>100	>100	>100	12.9	>100
<b>12</b> Oleanolic acid methyl ester	>100	39.4	28.7	50.7	>100	>100
<b>13</b> Oleanolic acid 3- <i>O</i> -acetate	>100	>100	>100	>100	>100	>100
<b>14</b> Oleanolic acid 3- <i>O</i> -succinate	18.2	9.3	10.6	>100	>100	>100
<b>15</b> Oleanolic acid 3- <i>O</i> -dimethylsuccinate	24.3	31.1	36.3	41.8	>100	>100
Reference compounds						
Cisplatin	4.2	18.4	9.5	9.7		
Camptothecin	-	-	-	-	6.8	-
Etoposide	-	-	-	-	-	34.5