

ジヒドロキシトリテルペノイドエステル誘導体の合成と腫瘍細胞傷害活性

Synthesis of dihydroxytriterpenoid ester derivatives and evaluation of their cytotoxicities against human cancer cell lines

○呉浩南<sup>1</sup>, 浮谷基彦<sup>2</sup>, 赤澤寛行<sup>3</sup>, 成瀬孔明<sup>1</sup>, 五十嵐蒼汰<sup>4</sup>, 黒田楓<sup>4</sup>, 古井戸隆誠<sup>4</sup>  
Haonan Wu<sup>1</sup>, Motohiko Ukiya<sup>2</sup>, Hiroyuki Akazawa<sup>3</sup>, Komei Naruse<sup>1</sup>, Souta Igarashi<sup>4</sup>,  
Kaede Kuroda<sup>4</sup>, Ryuusei Koido<sup>4</sup>

Abstract: Betulin, uvaol, and alkanediols were conjugated with amino acids. Their *in vitro* cytotoxic activities against human cancer cell line (leukemia, lung, stomach, and breast) were evaluated by MTT assay. The cytotoxicity of uvaol-L-Ala was comparable to the value of betulin-L-Ala, indicating that amino-acid conjugation enhances activity irrespective of the parent triterpenoid skeleton.

1. 緒言

がんは日本人の死因の第1位で、一生のうちのがんと診断される確率は、男性・女性ともにおおよそ2人に1人とされている<sup>1)</sup>。これまでに本研究室では、天然物誘導体のがん治療への利用を目指して、多様な生理活性が報告されているテルペノイドのうち、水酸基を2つ有するジヒドロキシトリテルペノイド(ベツリン, エリスロジオール)のジエステル型アミノ酸結合体を合成し、がん細胞に対する細胞傷害活性を評価した。その結果, Ala, Val などのアミノ酸結合体において, 元の分子よりも活性が向上する傾向が見られ<sup>2)</sup>, 特にベツリン(ルパン型トリテルペノイド)では, L/D-Ala との結合体が最も高い活性を示すことを明らかにした<sup>3)</sup>。

しかし, ジヒドロキシトリテルペノイド-アミノ酸結合体に関する構造と細胞傷害活性との関係は十分に解明されておらず, また, モノエステル型アミノ酸結合体では, トリテルペノイド28位エステルの報告はあるが<sup>4),5)</sup>, 3位エステルに注目した報告がほとんどない。

そこで本研究では, ジヒドロキシトリテルペノイド-アミノ酸結合体の腫瘍細胞傷害活性の作用機構と構造の関係を解明するために, 以下の6項目の検討を行った。

- ① 母体骨格の影響: 基本骨格がベツリンと異なるトリテルペノイドであるウバオール(ウルサン骨格)を基質に用い, 種々のアミノ酸とのジエステル型アミノ酸結合体を合成した。
- ② アミノ基位置(アミノ酸の鎖長)の影響: ベツリンを基質に用い, 炭素鎖の長いアミノ酸を用いた結合体を合成した。
- ③ テルペノイド以外の母体骨格: 非天然物として水酸基を2つ有するアルカンジオールである1,4-シクロヘキサンジオールおよび1,6-ヘキサンジオー

ルを基質として用い, L-Ala とのジエステル型結合体を合成した。

- ④ 末端置換基の影響: ベツリンを基質に用い, 末端にカルボン酸, トリフルオロメチル基を持つ分子(コハク酸, トリフルオロクロトン酸)をエステル結合した分子を合成した。
- ⑤ 結合様式の影響: ベツリンを基質に用い, アミノエチルエーテル誘導体を合成した。
- ⑥ モノエステルの結合部位による影響: ベツリンを基質に用い, 種々のアミノ酸との3位および28位モノエステル型アミノ酸結合体を合成した。

本報告では, 以上の6項目の結合体の合成, およびヒト腫瘍細胞株に対する傷害活性について報告する。

2. 方法

2.1 ウバオール-アミノ酸結合体(1-8)の合成(Figure 1)

ウバオールをチオ炭酸 *O,O'*-ジ-2-ピリジル(DPTC)を縮合剤として4-ジメチルアミノピリジン(DMAP)存在下, *N-tert*-ブトキシカルボニル(Boc)-L-またはD-アミノ酸と脱水トルエン中, アルゴン雰囲気下で24時間攪拌し粗生成物を得, 分取薄層クロマトグラフィーで精製し, Boc-アミノ酸結合体を合成した。Boc-アミノ酸結合体は3M塩酸/ジオキサン溶液に溶かし, ヘキササンで沈殿させた後, 遠心分離を行い脱保護アミノ酸結合体を得た。アミノ酸にはアラニンなどを用い, ジエステル体4種(1-4), 28位モノエステル体4種(5-8)を得た。

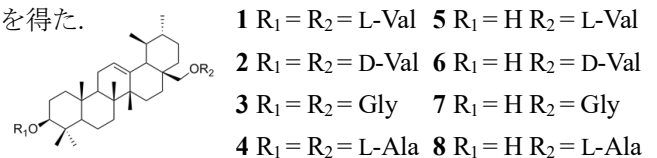


Figure 1. ウバオール-アミノ酸結合体(エステル型)

1: 日大理工・院(前)・応化 2: 日大理工・教員・応化 3: 日大短大・教員・総合 4: 日大理工・学部・応化

## 2.2 ベツリン-アミノ酸結合体 (9-15) の合成 (Figure 2)

2.1 と同じ方法で 4-アミノ酪酸, 6-アミノヘキサン酸を用い, ジエステル体 2 種 (9, 10), モノエステル体 2 種 (11, 12) を得た. また, 2.1 と同じ方法でグリシン, アラニン, ロイシンを用い, Boc-アミノ酸結合体を合成した後, 0.25 M 水酸化ナトリウム溶液(THF/MeOH/H<sub>2</sub>O = 2:1:1) にて部分加水分解を行い, 3 種の 3 位モノアシル体 (13-15) を得た.

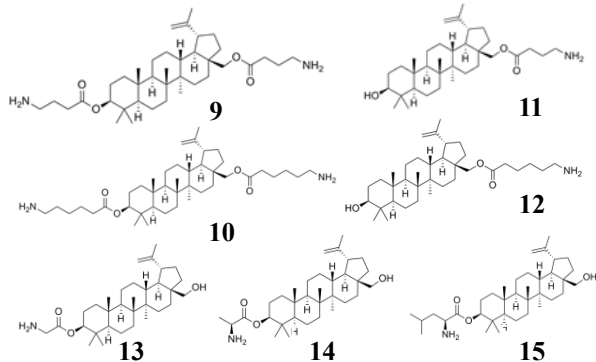


Figure 2. ベツリン-アミノ酸結合体 (エステル型)

## 2.3 アルカンジオールのアミノ酸結合体 (16-17) の合成 (Figure 3)

2.1 と同じ方法で 1,4-シクロヘキサジオール-L-Ala (Boc) (16) と 1,6-ヘキサジオール-L-Ala (17) を得た.

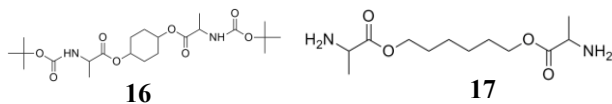


Figure 3. アルカンジオール-アミノ酸結合体 (エステル型)

## 2.4 ベツリン-コハク酸およびトリフルオロクロトン酸エステル (18-20) の合成 (Figure 4)

2.1 と同じ方法で, ベツリン-トリフルオロクロトン酸エステル 2 種 (18, 19) を合成した. また, ベツリンを, 4-ジメチルアミノピリジン (DMAP) 存在下, 無水コハク酸と脱水ピリジン中, アルゴン雰囲気下で 24 時間攪拌し粗生成物を得, 分取薄層クロマトグラフィーで精製し, ベツリン 28-コハク酸エステル (20) を合成した.

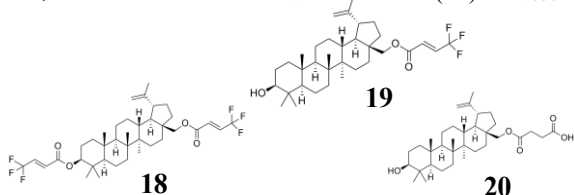


Figure 4. ベツリン-トリフルオロクロトン酸, コハク酸エステル

## 2.5 ベツリン-アミノエチルエーテル結合体 (21-22) の合成 (Figure 5)

ベツリンを, 水素化ナトリウム存在下, 2- (Boc-アミノ) エチルブロミドと脱水テトラヒドロフラン (THF)

中, アルゴン雰囲気下で 24 時間攪拌し粗生成物を得, 分取薄層クロマトグラフィーで精製し, 2 種の Boc-アミノエチルエーテル結合体 (21, 22) を合成した.

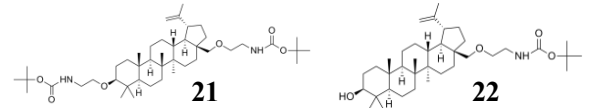


Figure 5. ベツリン-アミノエチルエーテル結合体

## 2.6 細胞傷害活性評価

96 well plate にヒト由来腫瘍細胞株 HL-60 (前骨髄球性白血病), MOLT-4 (ヒトリンパ芽球性白血病), A549 (肺がん), MKN 45 (胃がん), SKBR-3 (乳がん) をそれぞれ  $3 \times 10^3$  cell/well で播種し, 24 時間培養した. 被験物質を添加し 48 時間作用させた後, 0.5% MTT 溶液を加え, 3 時間インキュベート後に 570 nm および 630 nm における吸光度を測定し, 50%細胞傷害濃度 (IC<sub>50</sub>;  $\mu$ M) を算出した.

## 3. 結果

ウバオール誘導体 8 種 (化合物 1-8), ベツリン誘導体 12 種 (化合物 9-15, 18-22) およびその他の誘導体 2 種 (16, 17) を合成した. それらについて細胞傷害活性を評価した結果を Table 1 に示す.

Table 1. ウバオール, 化合物 1-4, および参照化合物の細胞傷害活性.

検体名	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M )		
	MOLT-4	A549	MKN45
ウバオール	—	52.97	11.7
1	—	15.12	7.765
2	13.34	31.29	12.98
3	18.31	31.22	13.75
4	2.747	12.43	3.578
シスプラチン*	3.07	51.5	21.9

\*Reference compound

本研究で合成したウバオール-L-Ala 結合体 (ジエステル型) は出発物質よりも高い活性を示した. これは, 以前報告したベツリンと同じ傾向<sup>3)</sup>であり, ジヒドロキシトリテルペノイド-アミノ酸結合体の細胞傷害活性向上は, 母体骨格の種類によらない可能性が示唆された.

## 4. 参考文献

- [1] 国立がん研究センターがん情報サービス「がん統計」  
<https://www.mhlw.go.jp/seisaku/24.html>
- [2] M. Ukiya, et al. *J. Oleo Sci.* **72**, 461 (2023).
- [3] 林伝皓, 令和 6 年度日本大学大学院理工学研究科修士論文.
- [4] M. Drag-Zalesinska et al. *Biomed. Pharmacother.* **72**, 91 (2015).
- [5] M. Drag-Zalesinska et al. *Cancer Cell Int.* **17**:4 (2017).