

天然褐藻類由来の硫酸化多糖を母骨格としたフォーカスライブラリーの合成と生物活性

高橋大介

研究成果報告:

フコイダンは、ヒバマタ、モズク及びワカメなどの天然褐藻類に含まれるL-フコースを基本骨格とした硫酸化多糖類であり、これまでに、アポトーシス誘導活性および血管新生阻害活性をはじめとする抗腫瘍活性を発現することが報告されている。そのため現在、副作用を軽減する新たな抗癌剤のリード化合物として期待されている。しかし、天然より単離・抽出される高分子量フコイダンは、褐藻類の種によって糖鎖構造や分子量が異なること、さらには、同じ種からの抽出物でも、その抽出方法によって分子量や硫酸化のパターンが不均一になる問題点を有している。そのため、純粋かつ化学構造が明確なフコイダンを天然から入手することが困難であり、フコイダンの詳細な構造活性相関に関する研究は未だ行われていない。そこで本研究では、ヒバマタ(*F. vesiculosus*)由来フコイダンの提唱構造(Fig. 1)を母骨格とし、その構成単糖であるL-フコースの重合度や硫酸化パターンの異なる低分子量フコイダンのフォーカスライブラリーを化学合成し、乳癌細胞を用いた機能評価を行うことで、低分子量フコイダンの構造活性相関の解明と、活性発現機構の解明、さらには生体侵襲の極めて少ない新規抗癌剤のリード化合物の創製を目的として行った。

まず、天然のヒバマタ由来フコイダン1の提唱構造[→3)-Fuc α -(1→4)-Fuc α -(1→]_nを基本骨格とした、硫酸化パターンの異なる5種類の四糖鎖2-6をデザインした。ま

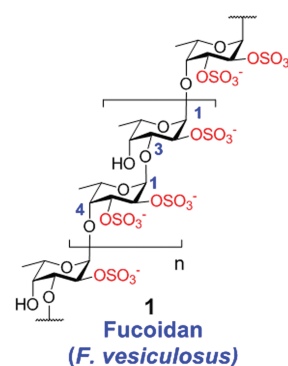
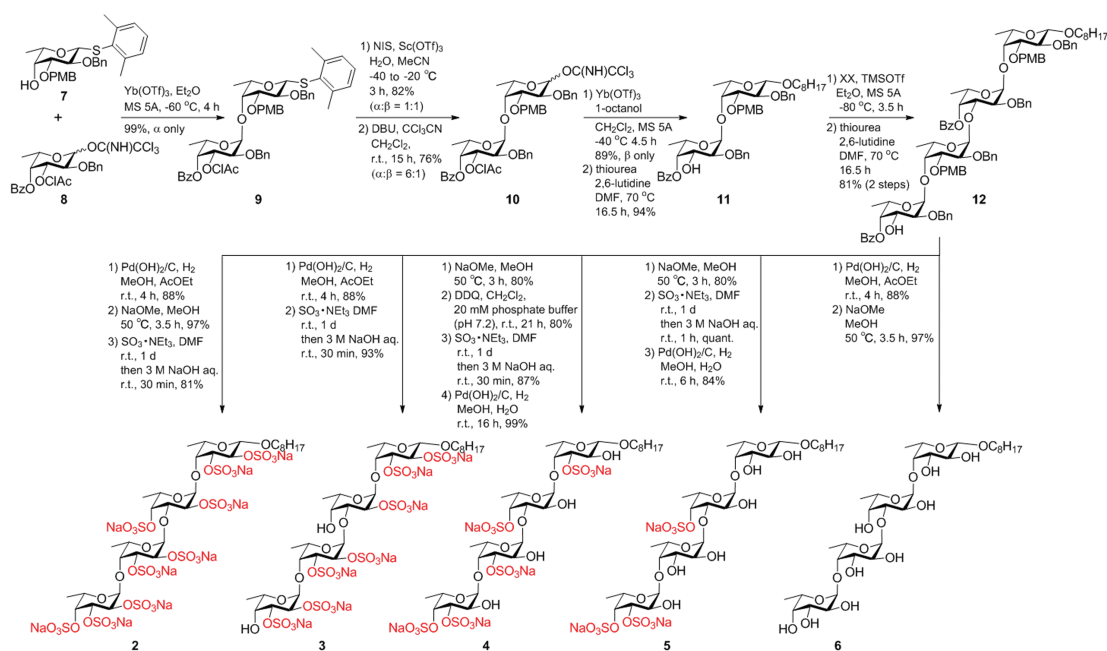


Fig. 1

た、**2-6**を系統的かつ効率的に合成するため、それぞれ異なる条件で脱保護が可能なBn、Bz、及びPMB基で水酸基を保護した鍵中間体**12**をデザイン及び合成した。すなわち、L-フコースを出発原料とし、単糖アクセプター**7**及び単糖ドナー**8**をそれぞれ8及び10工程で合成後、**7**と**8**のグリコシル化反応を、Yb(OTf)₃存在下、-60℃で行うことで、望む二糖鎖**9**を立体選択的に合成した。次に、**9**から二糖鎖アクセプター**10**及び二糖鎖ドナー**11**へと誘導後、これらを用いたグリコシル化反応、続くClAc基の脱保護を行うことにより、望む四糖鎖鍵中間体**12**を良好な収率で得た。続いて、**12**の水酸基保護基の脱保護及び硫酸化の順序を調整することで、硫酸化パターンの異なるテトラフコシド**2-6**の系統的な合成を達成した (Scheme 1)。



Scheme 1

次に、**1-6**のヒト乳癌細胞MCF-7に対する、細胞増殖抑制活性をMTTアッセイにより評価した。その結果、活性発現には硫酸基が必須であること、及び硫酸化のパターンが細胞増殖抑制活性に大きく影響を及ぼすことを初めて見出し、硫酸化テトラフコシド**2-5**の中でも、3,4-硫酸タイプ**4**が最も高い細胞増殖抑制活性を発現することを明らかにした。次に、細胞増殖抑制活性の発現に必要な最小構造を解明するため、3,4-硫酸タイプの二糖鎖及び六

糖鎖を別途合成後、同様に細胞増殖抑制活性を評価した。その結果、四糖鎖**4**が活性発現に必要な最小構造であることを見出した。さらに、**4**の活性は天然フコイダン**1**の活性と同程度であること、および**4**は、ヒト正常二倍体線維芽細胞WI-38に対して細胞毒性を発現しないことも明らかにした。次に、**1**及び**4**が発現する細胞増殖抑制活性とアポトーシスの関連を検証するため、**1**または**4**をMCF-7細胞に投与後、Hoechstを用いた核染色を行った。その結果、アポトーシス細胞特有の蛍光染色が観察された。一方、caspase阻害剤(Z-VAD-FMK)を、**1**または**4**と同時に投与した場合には、その蛍光が顕著に抑制されたことから、いずれもcaspase依存的なアポトーシス誘導活性を発現することを見出した。さらに、**1**または**4**が引き起こすアポトーシス誘導活性には、caspase-8または-9のどちらが関与しているかを明らかにするため、これらの発現量をウェスタンブロッティング法により解析した。その結果、いずれの場合においても、caspase-8依存的な経路でMCF-7細胞のアポトーシスが誘導されることを明らかにした(Fig. 2)。

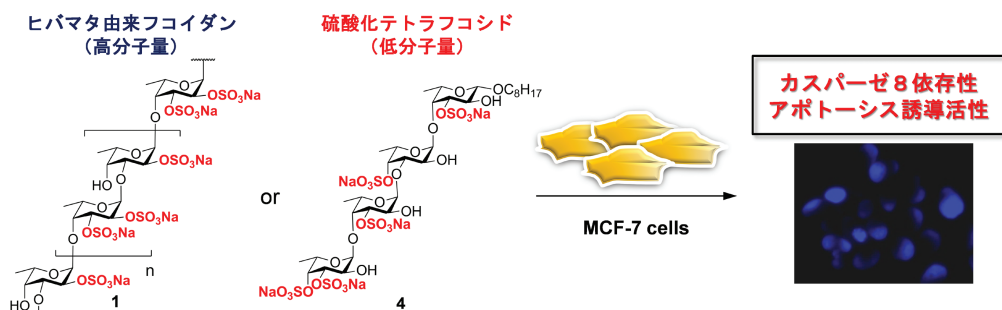


Fig. 2

今後は、硫酸化オリゴフコシド**4**が直接作用する標的タンパク同定も含め、さらに詳細なアポトーシス誘導機構の解明について研究を展開する予定である。

原著論文

Arafuka, S.; Koshiba, N.; Takahashi, D.; Toshima, K.

Systematic Synthesis of Sulfated Oligofucosides and Their Effect on Breast Cancer

MCF-7 Cells *Chem. Commun.* **2014**, 50, 9831-9834.

特許

戸嶋一敦、高橋大介、小柴望実、抗腫瘍活性を有する硫酸化オリゴフコシド類、特願
2013-150907、学校法人慶應義塾、平成25年7月19日

学会発表

1. ○小柴望実、高橋大介、戸嶋一敦

硫酸化オリゴフコシドの系統的合成と乳癌細胞MCF-7に対する効果

第32回日本糖質学会年会、大阪大学、平成25年8月5日

2. ○荒深慎介、小柴望実、高橋大介、戸嶋一敦

フコイダン類縁体の系統的合成と生物活性

第67回有機合成化学協会 関東支部シンポジウム(横浜シンポジウム)、慶應義塾大
学、平成26年5月17日

3. ○荒深慎介、小柴望実、高橋大介、戸嶋一敦

硫酸化多糖フコイダン類縁体の系統的合成と構造活性相関

第8回バイオ関連化学シンポジウム、岡山大学、平成26年9月12日