

2023 年度 課程博士学位論文

抗腫瘍活性物質の創製を指向した
エチレングリコール単位含有アルキル鎖を有する
アセトゲニンチオフェン誘導体の合成研究

【薬学】 薬品製造学分野

大田 海斗

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。また、本論文は未発表データを含んでいる。

Kaito Ohta, Hiromi Ii, Chiami Moyama, Shota Ando, Hisanori Nambu, Susumu Nakata, Naoto Kojima. Thiophene carboxamide analogs with long alkyl chains comprising ethylene glycol units inhibit glioblastoma cell proliferation by activating AMPK. *J. Med. Chem.* **2023**, *66*, 6403–6413. [第一章、第二章]

目次

序論	1
本論	13
第一章 アセトゲニンチオフェン誘導体の THF 環部分をトリエチレングリコール構造に置換した誘導体に関する構造活性相関研究	13
第一節 緒言	13
第二節 トリエチレングリコールメチルエーテル側鎖を有する誘導体の合成および活性評価	13
第三節 末端アルキル側鎖の長さの異なる誘導体の合成と活性評価	16
第一項 末端アルキル側鎖の長さの異なる誘導体の合成	16
第二項 末端アルキル側鎖の長さの異なる誘導体のマウス膠芽腫幹細胞に対する増殖抑制活性の評価	19
第三項 ヒト膠芽腫 U251 細胞におけるテモゾロミドとの併用効果の評価	20
第四項 マウス膠芽腫幹細胞における AMPK の活性化の評価	21
第五項 マウス膠芽腫幹細胞およびヒト結腸がん SW48 細胞に対する生体内抗腫瘍活性の評価	22
第四節 有望な生物活性を示した誘導体の短工程合成の検討	24
第二章 エチレングリコール単位を側鎖に有するチオフェンカルボキサミド誘導体のエチレングリコール単位、複素環およびその連結部位に関する構造活性相関研究	26
第一節 緒言	26
第二節 誘導体の合成	26
第三節 生物活性評価	30
第一項 ヒト肺がん A549 細胞に対する増殖抑制活性の評価	30
第二項 A549 細胞における AMPK の活性化の評価	33
第三項 ヒト肺がん A549 細胞異種移植モデルマウスを用いた抗腫瘍活性の評価	34
結論	35
法令遵守	36
謝辞	37
実験の部	38
<合成の部>	38
第一章第二節の実験	38
第一章第三節第一項の実験	43
第一章第四節の実験	48
第二章第二節の実験	49
<生物活性評価の部>	63
引用文献	68
論文目録	76

略号表

本論文で使用した略号を以下に示す。

化学構造にかかわる略語

Ac	: acetyl
Bn	: benzyl
dansyl	: 5-(dimethylamino)naphthalene-1-sulfonyl
Me	: methyl
<i>n</i> -	: normal
<i>p</i> -	: phosphorylated
<i>t</i> -	: tertiary
TBDMS	: <i>t</i> -butyldimethylsilyl

試薬、溶媒に関する略語

DIAD	: diisopropylazodicarboxylate
DMAP	: <i>N,N</i> -dimethyl-4-aminopyridine
DMF	: <i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	: dimethylsulfoxide
DPPA	: diphenylphosphoryl azide
EDC	: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
THF	: tetrahydrofuran
TMZ	: temozolomide
Tris	: tris(hydroxymethyl)aminomethane

その他略語

AMP	: adenosine mono-phosphate
AMPK	: AMP-activated protein kinase
ATP	: adenosine triphosphate
ATR	: attenuated total reflection
ca.	: circa
CI	: combination index
DMEM	: Dulbecco's modified eagle's medium
EC ₅₀	: 50% effect concentration
ED ₅₀	: 50% effective dose
ED ₇₅	: 75% effective dose
EGFR	: epidermal growth factor receptor
EI	: electron ionization

ESI	: electrospray ionization
FAB	: fast atom bombardment
FBS	: fetal bovine serum
GAPDH	: glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase
GSCs	: glioblastoma stem cells
HPLC	: high performance liquid chromatography
HRMS	: high-resolution mass spectrometry
IC ₅₀	: 50% inhibitory concentration
IR	: infrared absorption spectrometry
MS	: mass spectrometry
NADH	: nicotinamide adenine dinucleotide, reduced form
ND1	: NADH dehydrogenase subunit 1
NFATc2	: nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 2
NMR	: nuclear magnetic resonance
NSCLC	: non-small cell lung cancer
OXPHOS	: oxidative phosphorylation
PBS	: phosphate-buffered saline
PTLC	: preparative thin-layer chromatography
PVDF	: poly vinylidene difluoride
SCID	: severe combined immunodeficiency
SD	: standard deviation
SDS	: sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	: SDS polyacrylamide gel electrophoresis
SMP	: submitochondrial particle
TBS	: tris buffered saline
TBS-T	: tris buffered saline with Tween
TKI	: tyrosine kinase inhibitor
TLC	: thin-layer chromatography
TMH	: transmembrane helices

序論

がんは 1981 年から現在に至るまで、我が国における死因の第一位を占める疾患である。¹ がんの危険因子として、加齢や生活習慣などが知られている。その治療は、一般的に手術療法・化学療法・放射線療法・免疫療法の 4 つの療法を組み合わせることにより行われる。化学療法を担う抗がん剤は、化学兵器として開発されたサルファマスタードから合成誘導されたナイトロジェンマスタードが 1940 年代に最初の抗がん剤として使用されて以来、今日に至るまで研究され続けてきた。しかしながら、副作用やがん細胞の治療抵抗性の獲得などが問題となっており、依然として新規作用機序を有する抗がん剤の開発が求められている。

細胞が生命機能を維持していく上で、エネルギー産生は必要不可欠である。細胞はエネルギー源として adenosine triphosphate (ATP) を使用しており、ATP は大きく分けて 2 つの代謝経路により産生される。一つは嫌気的条件下にて細胞質で行われる解糖系であり、もう一つは好気的条件下にてミトコンドリアで行われる tricarboxylic acid cycle (TCA) 回路や酸化リン酸化 (oxidative phosphorylation; OXPHOS) によるエネルギー産生である。前者は、グルコース 1 分子につき ATP とピルビン酸を 2 分子ずつ産生する。後者では、解糖系により産生したピルビン酸がアセチル CoA に変換されたのち、TCA 回路および OXPHOS を介して ATP が産生される。このときグルコース 1 分子に対して最大 36 分子の ATP が産生され、解糖系に比べて効率的なエネルギー産生が可能である。一般的に、正常細胞は後者によるエネルギー産生を行っている。一方で、がん細胞は好気性条件下においてもエネルギー産生効率の悪い解糖系により ATP を産生しており、この現象は 1927 年に Warburg らによって見出され、現在でも Warburg 効果として広く認知されている。² そのため、解糖系に対して阻害活性を示す 2-deoxy-D-glucose はヒト乳がん MCF-7 や SkBr3、BT54、MDA-MB-468 細胞に対して増殖抑制活性を示すことが報告されている。³

一方で、がん細胞の OXPHOS の機能についての研究は行われてきたものの、その報告例は少なかった。2005 年ごろからがん細胞の OXPHOS 機能に関する報告例が増え、OXPHOS 機能は化学療法や放射線治療における治療抵抗性を引き起こすメカニズムの 1 つとして報告されるようになり、^{4,6} それのがん治療の標的になり得ることが提唱されてきた。⁷⁻⁹ これを裏付けるように、2019 年にアポトーシス抑制たんぱく質である BCL-2 に対する阻害剤であるベネトクラクス¹⁰ が急性骨髄性白血病または慢性リンパ性白血病に、2022 年 6 月にミトコンドリア機能の阻害により活性を示す有機ヒ素製剤である darinaparsin が再発性または難治性の末梢性 T 細胞リンパ腫に対する治療薬として本邦において承認された。¹¹ また、メトホルミンはミトコンドリア電子伝達系複合体 I を阻害することにより OXPHOS 機能の低下を引き起こし、その結果、AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化を介して抗腫瘍活性を示すことが報告されている。¹² 現在、メトホルミンの膠芽腫に対する臨床試験が進行しており、OXPHOS 機能阻害は、がん治療戦略の一つとして期待されている。

著者の所属する研究室では、ミトコンドリア電子伝達複合体 I を阻害することにより AMPK を活性化するバンレイシ科アセトゲニン類についての構造活性相関研究を展開している。¹³ バンレイシ科アセトゲニン類は、熱帯・亜熱帯域に生息するバンレイシ科植物に含ま

れるポリケチドの一つである。これらの構造的特徴として、 γ -ラクトン環から長いアルキル側鎖が伸長した構造を有しており、その大部分の化合物はアルキル側鎖上にヒドロキシ基、ケトン基、2,5-二置換テトラヒドロフラン (THF) 環、2,6-二置換テトラヒドロピラン環またはエポキシドなどの酸素官能基を持つことが挙げられる。¹⁴ 1982年に Bates らによって、最初のアセトゲニン類として **uvaricin** が単離されて以降、これまでに 500 種類以上の天然物が単離、報告されている。¹⁵

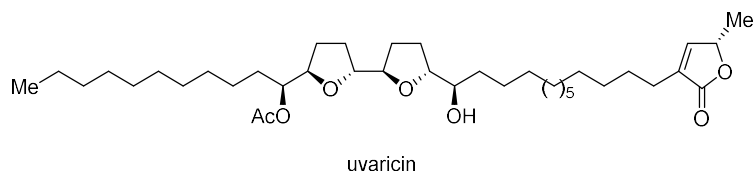
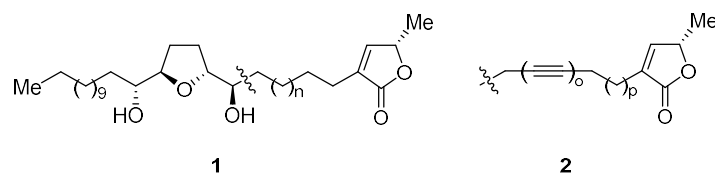


Figure 1. 天然アセトゲニン類 **uvaricin** の構造

アセトゲニン類は、免疫抑制活性、殺虫活性、抗マalaria活性および抗腫瘍活性などの多様な生物活性を示すことが知られている。中でも、抗腫瘍活性は新規作用機序を有する抗腫瘍活性物質の開発という観点から注目を集めてきた。アセトゲニン類は、ミトコンドリア電子伝達系複合体 I を阻害し、エネルギー代謝の盛んながん細胞に対してアポトーシスを誘導することにより活性を示すと考えられている。^{16,17} 三芳らは、アセトゲニン類の標的部位がミトコンドリア電子伝達系複合体 I の ND1 サブユニットであることを報告しており、ラクトン環が ND1 サブユニットの膜内ドメインである TMH4 と TMH5 の間に存在し、2つの隣接する第二級ヒドロキシ基を含む THF 環部分が水溶性ドメインに位置していると推定した。¹⁸ その後、2022年に Hirst らはクライオ電子顕微鏡法を用いてより詳細な結合様式について報告した。¹⁹

このような特徴的な構造と作用機序が研究者の興味を引き立て、全合成研究²⁰ や構造活性相関研究²¹ が報告されてきた。アセトゲニン類の構造活性相関研究として、アルキル鎖部位、 γ -ラクトン環部位および THF 環部分の 3つのユニットについて報告されており、THF 環部分においては、その構造の簡略化を目的とした例が多く報告されている。²¹ アルキル鎖については、三芳らが THF 環部分とラクトン環を連結するリンカー側鎖について調査している。彼らは、天然物と同じ長さのリンカー側鎖をもつ **1e** のリンカー側鎖を長くしても短くしても活性が減弱すること (Table 1)、また、天然物と同じ長さのリンカー側鎖を有していても、そこに含まれる連続するアルキン構造により自由度が低下すると活性が減弱することを報告している。^{22,23}

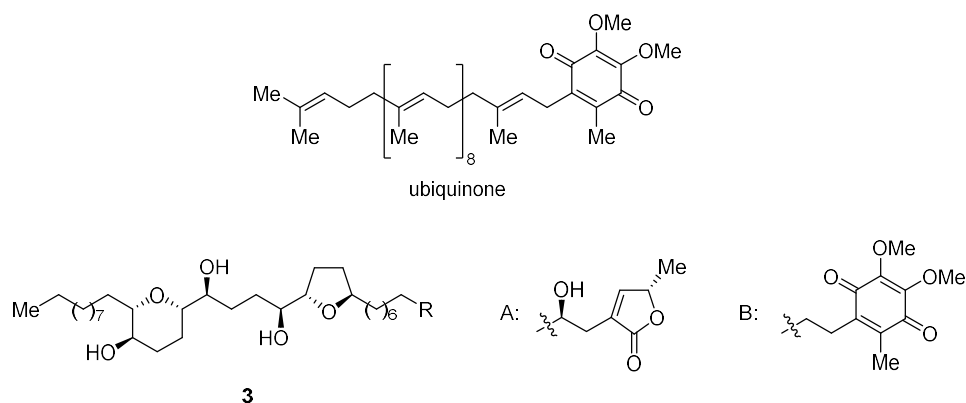
Table 1. リンカー側鎖についての構造活性相関研究



Compounds	IC ₅₀ (nM)	Compounds	IC ₅₀ (nM)
1a (n = 1)	131	1g (n = 12)	34
1b (n = 3)	11	1h (n = 13)	117
1c (n = 5)	10	1i (n = 15)	1050
1d (n = 6)	10	2a (o = 4, p = 2)	280
1e (n = 9)	2.3	2b (o = 3, p = 4)	72
1f (n = 11)	16	2c (o = 2, p = 6)	12

γ -ラクトン環部位については、Koertらの天然アセトゲニン類である mucocin **3a** の γ -ラクトン環をキノン環に置換した報告例がある (Table. 2)。彼らは、ミトコンドリア電子伝達系における電子伝達体の一つであるユビキノンの作用部位にアセトゲニン類が作用すると仮定し、ユビキノンと mucocin のハイブリッド型分子 **3b** を設計し、その生物活性を調査した。その結果、誘導体 **3b** は天然物より 10 倍強い NADH オキシダーゼ阻害活性を示すことが明らかになっている。²⁴

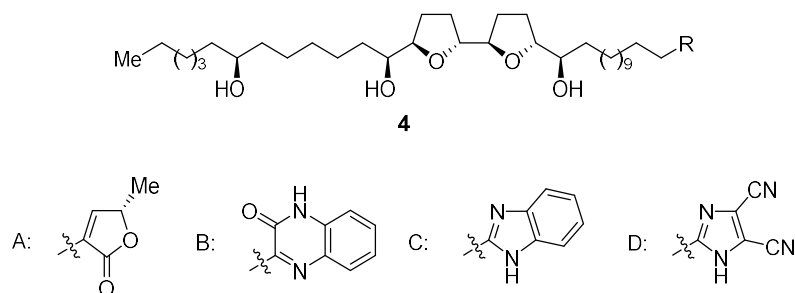
Table 2. Mucocin のラクトン環をキノン環に置換した誘導体とその阻害活性



Compounds	IC ₅₀ (nM)
3a (mucocin; R = A)	34
3b (R = B)	3.6

また、Lewinらはラクトン環部分を複素環に置換した誘導体**4**について報告している (Table 3)。彼らは、天然アセトゲニン類 *squamocin* から半合成した誘導体**4**の NADH オキシダーゼに対する阻害活性について調査しており、天然物と同程度の活性を有する誘導体**4c**を見出している。^{25,26}

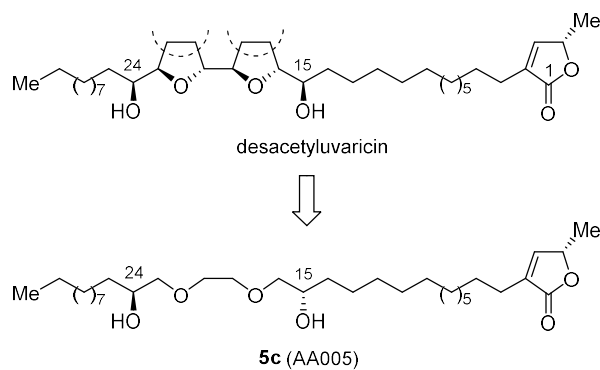
Table 3. *Squamocin* 誘導体とその NADH オキシターゼ阻害活性



Compounds	IC ₅₀ (nM)
4a (<i>squamocin</i> , R = A)	0.8
4b (R = B)	2.0
4c (R = C)	0.9
4d (R = D)	14

THF 環部分の改変の報告例として、Wuらの研究グループが報告した bis-THF 環アセトゲニン類 *desacetyluvaricin* の bis-THF 環構造を 2,5-dioxahexyl 構造に置換した誘導体の合成研究が挙げられる。彼らは 15 位および 24 位の立体異性体を含む 4 つの誘導体 **5a-d** を合成し、そのヒトがん細胞に対する増殖抑制活性を評価したところ、THF 環構造を簡略化した誘導体においても強い増殖抑制活性を示すことを報告している (Table 4)。²⁷ その中で、顕著な増殖抑制活性を示した AA005 (**5c**) を用いてさらなる生物活性評価を行っており、ヒト大腸がん HT29 細胞に対して AMPK の活性化を介して増殖抑制活性を示すことを報告している。また、**5c** は生体内においてヒト乳がん MDA-MB-468 細胞やヒト大腸がん SW620 細胞に対する強い抗腫瘍活性を示すことが明らかにされている。^{28,29}

Table 4. THF 環構造を 2,5-dioxaheptyl 構造に置換した誘導体に対する増殖抑制活性評価



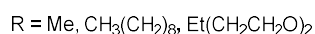
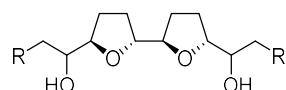
Compounds	EC ₅₀ [μg/mL]			
	KB ^a	A2780 ^b	HCT-8 ^c	HT-29 ^d
5a (15 <i>R</i> , 24 <i>R</i>)	>1	>1	0.066	0.272
5b (15 <i>S</i> , 24 <i>R</i>)	>1	>1	0.097	1.12
5c (15 <i>S</i> , 24 <i>S</i> , AA005)	>1	>1	0.032	0.11
5d (15 <i>R</i> , 24 <i>S</i>)	>1	>1	0.065	7.83
adriamycin	0.00289	0.00102	0.00465	0.00098

[a] Human oral carcinoma cell lines. [b] Human ovarian carcinoma cell lines.

[c] Human colon adenocarcinoma cell lines. [d] Human colon adenocarcinoma cell lines.

また、他の簡略化の一例として、ポリエーテル構造に置換したものが挙げられる。Wu らは、アセトゲニン類の THF 環部分がイオノフォアとして機能すると仮定した場合、^{脚注1} その等価体としてポリエーテル構造に置換できると考えた。そこで、天然 mono-THF 環アセトゲニン (10*RS*)-corossolin の mono-THF 環部分をジエチレングリコール構造に置換した誘導体 **6a** および **6b** を合成し、ヒト前骨髄球性白血病細胞 HL-60 およびヒト慢性骨髄性白血病 K562 に対する増殖抑制活性を評価したところ、天然物と比較して同程度の活性を示すことを報告している (Table 5)。³⁴ ところで、天然アセトゲニン類についての構造活性相関研究において、THF 環を一つ有する天然物よりも二つのものの方が、強い増殖抑制活性を示す傾向にあることが知られている。³⁵ Wu らは bis-THF 環構造の等価体としてトリエチレングリコール構造を有する誘導体 **6b** についても活性評価を報告しており、**6a** よりも高い活性を有することを報告している。これら天然アセトゲニン類の THF 環の簡略化の報告例から、天然アセトゲニン類の THF 環は活性発現に必須の構造単位ではないことが考えられる。

^{脚注1} 佐々木らは、ラクトン環部分を除去し bis-THF 環構造を有する誘導体のイオノフォアとしての機能を ¹H NMR を用いて調査した結果、Ca²⁺イオンに対して特異的に複合体を形成することを報告している。³⁰⁻³²



また、Wu らは佐々木らと同様に ¹H NMR を用いてアセトゲニン的一种である annonacin や squamocin が Ca²⁺イオンと複合体を形成できることを明らかにしている。また、これらをヒト肝がん HepG2 細胞に作用させたところ、ミトコンドリア内の Ca²⁺イオン濃度が上昇し、ミトコンドリアの膜電位が低下することを報告している。³³

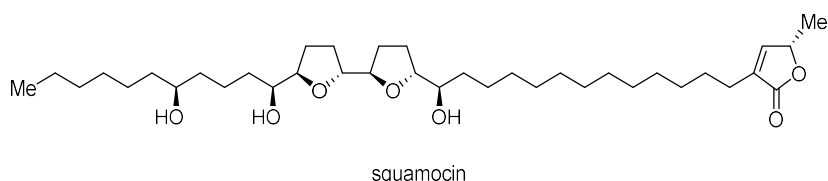
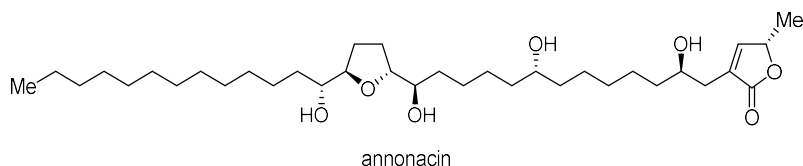
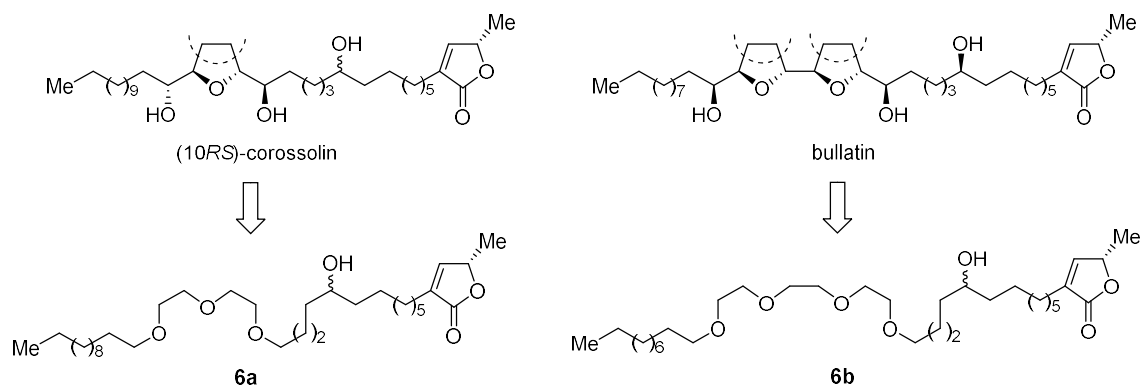


Table 5. THF 環部分をポリエーテル構造に置換した誘導体の構造と
ヒトがん細胞に対する増殖抑制活性



conc. (μM)	IG%					
	for HL-60 ^a			for K562 ^b		
(10RS)-corossolin	100	10	1	100	10	1
6a	63	56	5	10	2	0
6b	100	50	0	31	18	0
	100	65	21	55	25	22

[a] Human promyelocytic leukemia cell lines. [b] Human chronic myelogenous leukemia cell lines.

一方、アセトゲニン類と同様にミトコンドリア電子伝達系 I を阻害することにより生物活性を示す呼吸鎖阻害系殺虫剤と呼ばれる化合物群が存在している (Figure 2)。³⁶ これらは、含窒素複素環と脂溶性側鎖がアミド結合で連結した構造を有している。

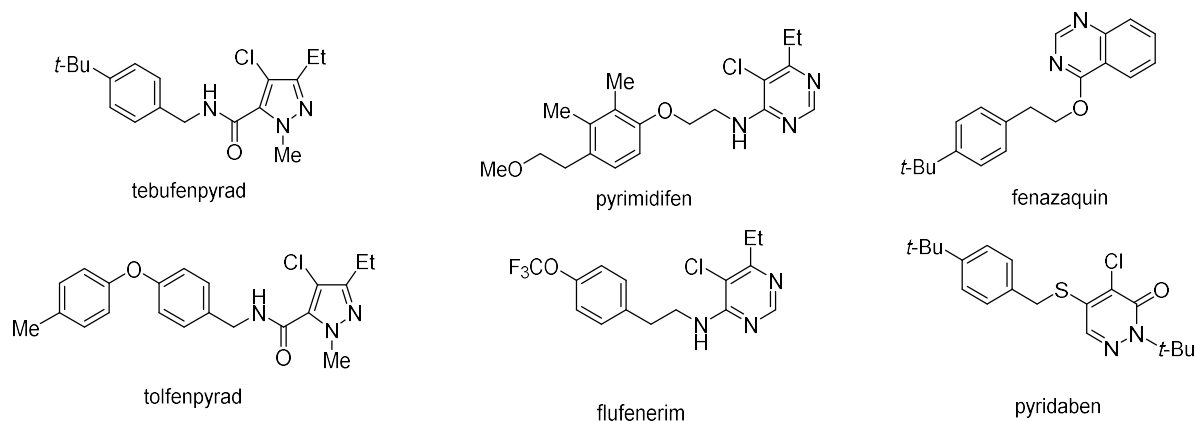


Figure 2. 呼吸鎖阻害系殺虫剤群の構造

著者の所属する研究グループはアセトゲニン類の γ -ラクトン環を複素環、THF 環部分を含む長いアルキル側鎖を脂溶性側鎖とそれぞれ見立てれば、両者の構造的特徴が類似していると考えた。そこで、アセトゲニン類の γ -ラクトン環部分を呼吸鎖阻害系殺虫剤由来の含窒素複素環に置換したハイブリッド型アセトゲニン類が新たな抗腫瘍活性物質になり得ると仮定

し、アセトゲニン類の γ -ラクトン環部分を含窒素複素環に置換した誘導体を合成し、その生物活性を評価してきた (Figure 3)。³⁷⁻³⁹

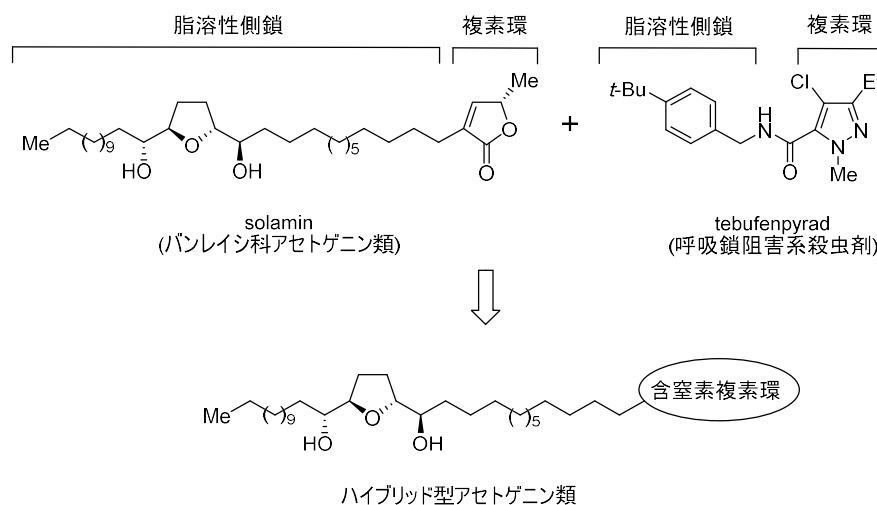


Figure 3. ハイブリッド型アセトゲニン類の設計

その結果、天然 mono-THF アセトゲニン類の一種である solamin⁴⁰⁻⁴² の α,β -不飽和- γ -ラクトン環部位を tebufenpyrad 由来の 1-メチルピラゾールに置換した誘導体 **7** が solamin と比較してヒト肺がん NCI-H23 細胞に対する増殖抑制活性が約 80 倍に増強することを報告した (Figure 4)。⁴³ 次に tebufenpyrad の複素環と脂溶性側鎖がアミド結合で連結していることから、**7** の炭素—炭素結合をアミド結合に置換した誘導体 **8** の活性は、さらに 18 倍に増強することを見出した。⁴⁴ しかしながら、**8** は NCI-H23 異種移植モデルマウスを用いた *in vivo* 試験の際、10 mg/kg の用量での投与では急性毒性を示した。そこで、投与量を 5 mg/kg まで減量して実験を行ったが、この投与量において腫瘍の増殖抑制は観測されないことが明らかになった。⁴⁵ そこで、複素環の検討を行った結果、呼吸鎖阻害系殺虫剤由来の含窒素複素環以外の複素環に置換しても強い増殖抑制活性を示すことが明らかになった。特に、複素環に 3-チオフェン環を有する JCI-20679 (**9**) は、NCI-H23 移植モデルマウスを用いた *in vivo* 試験において、急性毒性を示すことなく腫瘍の増殖を有意に抑制することが判明している。⁴⁶ 近年、これまでに未検討であった膠芽腫幹細胞に対する抗腫瘍活性が評価され、生体内において膠芽腫幹細胞に対して抗腫瘍活性を示すこと、⁴⁷ および膠芽腫標準治療薬であるテモゾロミド (TMZ) の効果を相乗的に増強することを報告している。⁴⁸

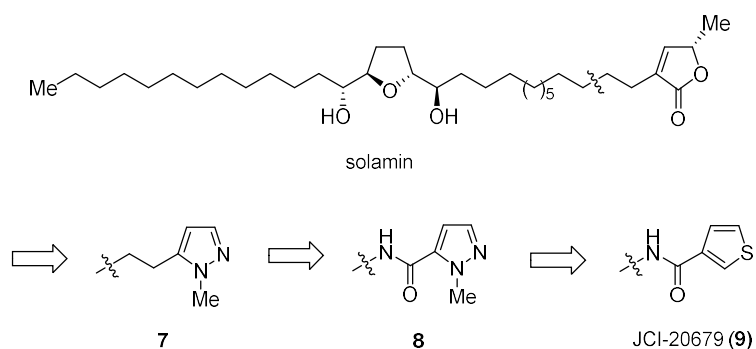


Figure 4. JCI-20679 (9) の創製

次に、有望な抗腫瘍効果を示した JCI-20679 のさらなる生物活性を評価した。JCI-20679 は天然物と同様にミトコンドリア電子伝達系複合体 I を阻害することによりミトコンドリア機能を障害し、AMPK を活性化させる。その活性化に依存して転写因子 *nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 2* (NFATc2) の発現が抑制されることにより、膠芽腫幹細胞に対して増殖抑制活性を示すことが判明した。^{47,49,50} この結果から JCI-20679 は、新たな作用機序を有する抗腫瘍活性物質としての可能性を秘めている。しかしながら、その合成には総 23 工程かかり、中でも 2 つの隣接する第二級ヒドロキシ基を含む THF 環部分の構築には 16 工程要し、迅速な誘導体合成の妨げになっている。そこで著者は活性を維持しつつ、合成に工程数のかかる THF 環部分を合成容易な構造単位に置換した誘導体を見出すことができれば、迅速な構造活性相関研究を展開できると考えた。そこで著者は先述の Wu らの THF 環部分をポリエーテル構造に置換した研究に着目し、³⁴ JCI-20679 の THF 環部分の構造をポリエーテル構造に置換した誘導体 **10** の生物活性に興味を持った (Figure 5)。その際に、より高活性が期待できる bis-THF 環構造のミミックとなるトリエチレングリコール構造に置換した誘導体 **10** について検討することにした。

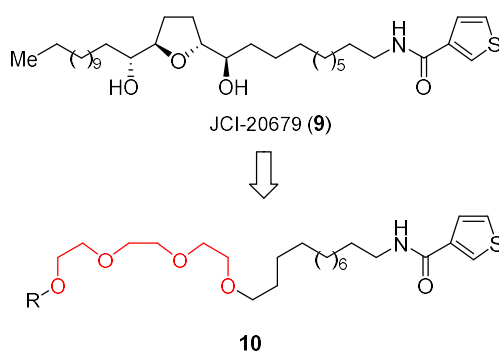
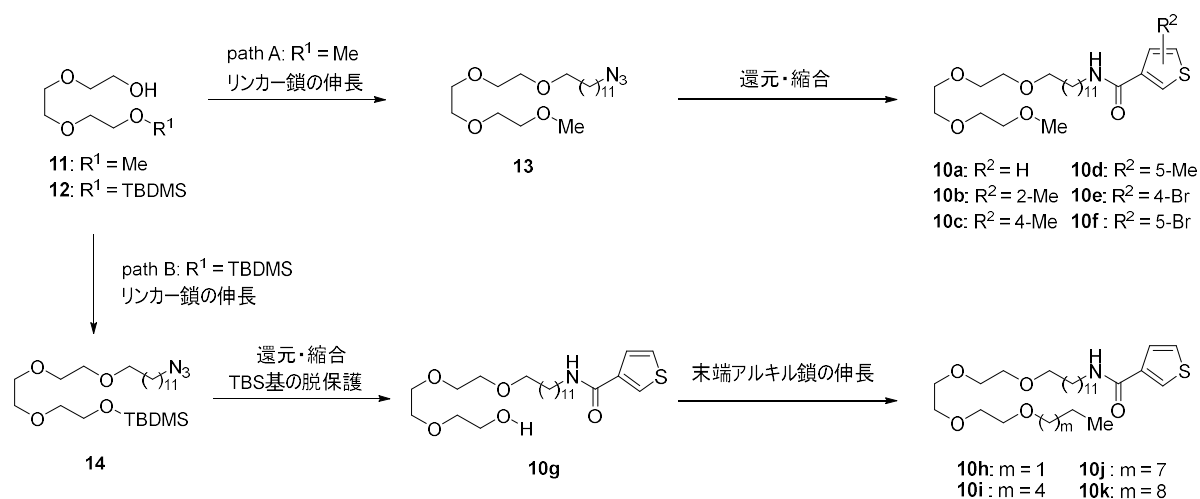


Figure 5. JCI-20679 の THF 環部分をトリエチレングリコール構造に置換した誘導体 **10** の設計

まず、JCI-20679 の THF 環部分の簡略化の是非を検討することを目的にメチルエーテル誘導体 **10a-f** を合成し、その膠芽腫幹細胞に対する増殖抑制活性を評価したところ、弱いなが

らも **10a** および **10e** は活性を示し、簡略化しても活性を発現できることが示唆された (第一章第二節)。次に、**10a** の末端アルキル鎖の長さが活性に与える影響について調査したところ、活性増強には一定の長さの末端アルキル鎖の存在が必要であることが明らかになった (第一章第三節第二項)。

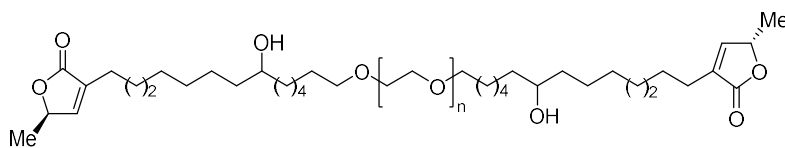


Scheme 1. 誘導体 **10** の合成経路

次に、顕著な活性を示す **10k** についてさらなる生物活性を評価したところ、**10k** は TMZ の効果を相乗的に増強することが明らかになった (第一章第三節第三項)。また、**10k** は JCI-20679 と同様に AMPK の活性化を介して活性を示すことが示唆された (第一章第三節第四項)。さらに *in vivo* 評価においても、腫瘍の増殖を有意に抑制することを見出した (第一章第三節第五項)。また、**10k** の保護基を用いない合成を検討した結果、総工程を 5 工程まで短縮できることを明らかにした (第一章第四節)。これらの結果から **10k** は、合成容易な新規抗がんリード化合物として期待できることが示唆された。

次に、**10k** のさらなる活性向上を目的として **10k** の構造活性相関研究を展開した。Yao と Zhou らの研究グループは、誘導体 **5c** の構造活性相関研究の一環として分子両末端にラクトン環を有する誘導体 **15** のエチレングリコール単位数に関する構造活性相関研究の結果、軽微であるもののエチレングリコール単位数の増加に伴って増殖抑制活性が向上すること、またジエチレングリコール構造が活性発現に必須であることを報告している (Table 6)。⁵¹ そこで著者は、**10k** のエチレングリコール単位数が活性に及ぼす影響について興味を持ち、様々な長さのエチレングリコール単位数を持つ誘導体を合成し、その生物活性を調査した (Figure 8) [第二章]。

Table 6. エチレングリコール単位数に関する構造活性相関研究



15

Compounds	IC ₅₀ (μM)					
	MCF7 ^a	SGC7901 ^b	HCT116 ^c	HT29 ^d	BEAS-2B ^e	HLF ^f
15a (n = 1)	5.95±0.59	2±0.39	5.18±0.18	>50	>50	>50
15b (n = 2)	1.9±0.66	0.27±0.03	1.1±0.08	3.3±0.97	9.3±0.98	4.9±0.17
15c (n = 3)	1.8±0.18	0.44±0.01	2.3±0.16	9.9±1.47	>50	5.8±0.62
15d (n = 4)	2.5±0.59	0.18±0.02	0.6±0.02	6.5±1.33	>50	3.8±0.61
15e (n = 5)	3±0.2	0.9±0.14	2.7±0.13	16.1±0.78	>50	>50

[a] Human metastatic mammary carcinoma cell lines. [b] Human gastric carcinoma cell lines.

[c] Human colon carcinoma cell lines. [d] Human colon adenocarcinoma cell lines.

[e] Human bronchial epithelium cell lines. [f] Human lymphatic fibroblasts cell lines.

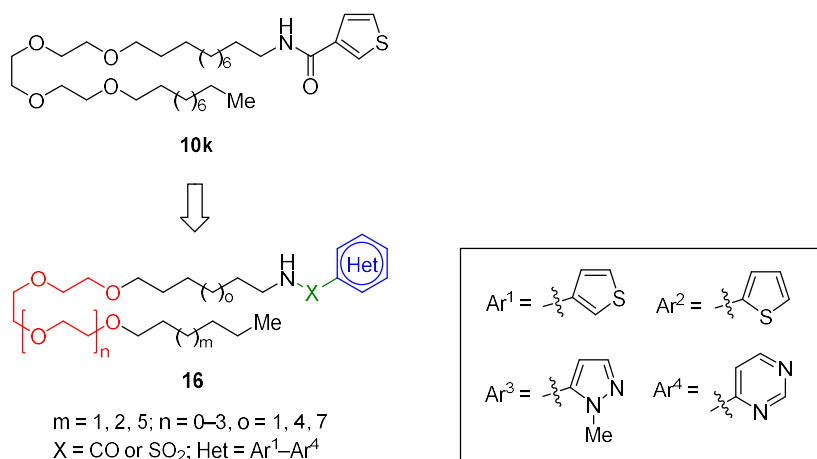


Figure 6. 誘導体 **10k** についての構造活性相関研究の概略

また、これまでに **7** の複素環に関する構造活性相関研究から、⁴⁴ 著者は **10k** の複素環を置換よることによる活性変化に興味を持ち、置換した誘導体の生物活性を調査した。また、*in vivo* 試験において急性毒性を示した **8** のアミド結合をスルホンアミド結合に置換した 1-メチルピラゾールスルホンアミド誘導体 **17** はモデルマウスを用いた *in vivo* 試験において急性毒性なく、腫瘍の増殖を抑制することがこれまでに報告されている (Figure 7)。⁴⁵ そこで **10k** のアミド結合をスルホンアミド結合に置換することによる活性変化を調査することを目的に、スルホンアミド誘導体 **16k-m** を合成し、その生物活性を調査した。

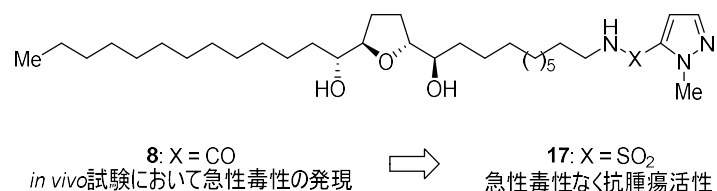


Figure 7. 連結部位をスルホンアミド結合に置換した誘導体 **17** の構造

誘導体 **16** は **10k** の合成経路を応用することにより合成された (第二章第二節)。得られた誘導体のヒト肺がん A549 細胞に対する増殖抑制活性を評価したところ、エチレングリコール単位数、複素環、および連結部位はいずれも増殖抑制活性に影響し、中でもエチレングリコール単位数の増加が活性増強に大きく寄与していることが示唆された (第二章第三節第一項)。これら誘導体も JCI-20679 と同様に AMPK の活性化を介して増殖抑制活性を示していることが示唆された (第二章第三節第二項)。加えて、**16c** は *in vivo* 試験において急性毒性なく腫瘍の増殖を抑制した。これらの結果から、**16c** は有望なリード化合物であることが示唆された (第二章第三節第三項)。

本論

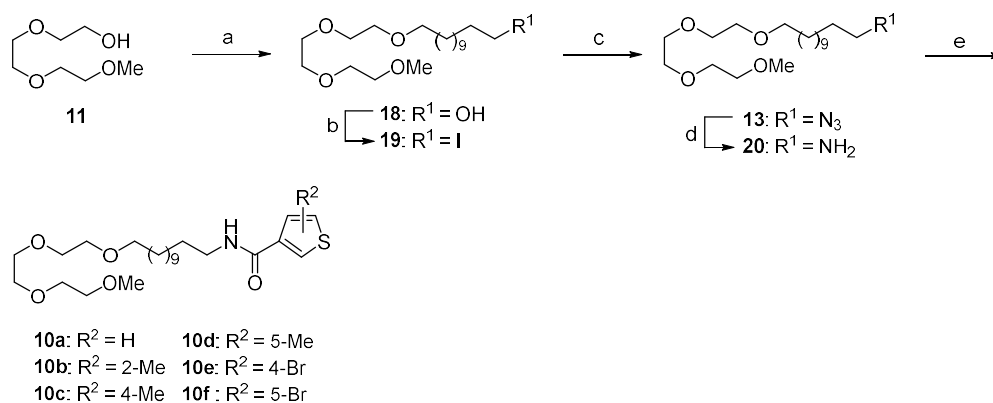
第一章 アセトゲニンチオフェン誘導体の THF 環部分をトリエチレングリコール構造に置換した誘導体に関する構造活性相関研究

第一節 緒言

膠芽腫は成人発症の原発性悪性脳腫瘍の中で、最も頻度が高い疾患であり、WHO の定める悪性度分類において、最も悪性度の高いグレード 4 に分類されている。罹患者の生存期間中央値は約 13.5 カ月、5 年生存率は 5.8% である。⁵² 膠芽腫の治療は、手術療法・放射線療法・化学療法の組み合わせにより行われる。化学療法においては、DNA アルキル化剤の一つである TMZ が唯一の標準治療薬として使用されている。^{52,53} TMZ は、DNA のグアニンの O⁶ 位をアルキル化し、細胞死を誘発することにより抗腫瘍活性を示すことが知られている。しかしながら、DNA 修復酵素 O⁶-メチルグアニン-DNA メチルトランスフェラーゼ (MGMT) のアップレギュレーション⁵⁴ または後天的な DNA ミスマッチ修復欠損⁵⁵⁻⁵⁸ により膠芽腫細胞は TMZ に対して治療抵抗性を獲得することが報告されており、その治療効果は限定的である。そのため、新たな作用機序を持つ治療薬が必要とされている。

第二節 トリエチレングリコールメチルエーテル側鎖を有する誘導体の合成および活性評価

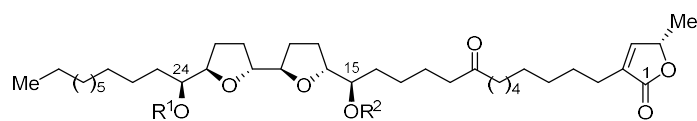
まず、メチルエーテル鎖を側鎖にもつ誘導体の合成に着手した。三芳らの研究グループは、アセトゲニン類の末端アルキル鎖をメチル基にまで減炭しても、酵素阻害活性を維持していることを報告している。⁵⁹ また、出発原料となるトリエチレングリコールメチルエーテル **11** が入手容易かつ安価であることからメチル基を末端アルキル鎖に持つ誘導体 **10a-f** にて THF 環部の簡略化の是非を検討した。**11** に対して、12-ブロモ-1-ドデカノールを用いて側鎖部分を伸長することにより、中程度の収率でアルコール **18** を得た。次にヒドロキシ基を Appel 反応によりヨウ素へと変換した後、アジ化ナトリウムを作用させることによりアジド体 **13** を高収率で得た。Staudinger 反応により、第一級アミン体 **20** へと変換したのち、シリカゲルクロマトグラフィーによる精製を行わないまま次の反応に使用した。縮合剤として 1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド (EDC)、縮合補助剤として *N,N*-ジメチル-4-アミノピリジン (DMAP) を用いて、チオフェン-3-カルボン酸と縮合することにより目的の誘導体 **10a** を 89% で得た。また、置換基を有する種々のチオフェン-3-カルボン酸を用いることにより、誘導体 **10b-f** も高収率で得ることができた (Scheme 2)。



Scheme 2. Synthesis of analogs **10a–f** with a substitution group on the thiophene ring. Reagents and conditions: (a) 12-bromo-1-dodecanol, NaH, DMF, 0 °C to rt, 62%; (b) I₂, PPh₃, imidazole, CH₂Cl₂, 0 °C to rt, 86%; (c) NaN₃, DMSO, rt, quant.; (d) PPh₃, H₂O, Et₂O, 0 °C to rt, quant.; (e) substituted thiophene-3-carboxylic acid, EDC·HCl, DMAP, THF, 0 °C to rt; **10a** (89%); **10b** (97%); **10c** (97%); **10d** (93%); **10e** (94%); **10f** (87%).

得られた誘導体のマウス膠芽腫幹細胞に対する増殖抑制活性を評価した。比較対象として、リード化合物である JCI-20679 の活性の結果も併記している (Figure 8)。JCI-20679 または誘導体 **10a-f** が 100 nM および 500 nM の最終濃度となるように調製した培養液 (0.05%DMSO 含有) を用いて 72 時間インキュベートし、生存細胞数を計測した。また、コントロールには、それらと同量の DMSO を含む培養液を用いた。グラフの縦軸は生存細胞数を示しており、グラフが低いほど活性が強いことを示している。**10a** を 500 nM の濃度で作用させることにより、生存細胞数がコントロールと比較して有意に減少したものの、JCI-20679 と比較して減少数は僅かであった (コントロール群: 6.29×10^5 ; **10a**: 4.13×10^5 ; JCI-20679: 1.53×10^5)。次に、**10a** のチオフェン環上の置換基が増殖抑制活性に与える影響を評価した。置換基を有する誘導体 **10b-d** と **10f** はいずれの濃度においても活性を示さなかったが、4-ブromo誘導体 **10e** を 500 nM の濃度にて作用させると、**10a** と同程度の増殖抑制活性を示した (**10e**: 4.00×10^5)。これらの結果から、JCI-20679 の THF 環部分の構造をトリエチレングリコール構造に置換した誘導体が増殖阻害活性を発現できることを見出した。^{脚注2} しかしながら、チオフェン環上の置換基はその増殖抑制活性に影響を与えるものの、有望な活性増強は見られなかった。そこで、無置換体である **10a** を用いてさらなる検討を行うことにした。

^{脚注2} Cortes らは、天然 bis-THF アセトゲニン類 *guanacone* の THF 環に隣接する 2 つの第二級ヒドロキシ基が活性に与える影響について報告している。⁶⁰ 彼らは、天然物および 15 位と 24 位のヒドロキシ基をアセチル化した誘導体 **A-C** についてヒトがん細胞に対する増殖抑制活性および NADH オキシダーゼ阻害活性を評価しており、ヒドロキシ基をアセチル化しても活性を維持していることを報告している。このことから、ヒドロキシ基によるプロトン供与能は活性発現には必須ではないと考えている。



Guanacone : $R^1 = R^2 = H$
 compound A: $R^1 = H, R^2 = COCH_3$
 compound B: $R^1 = COCH_3, R^2 = H$
 compound C: $R^1 = R^2 = COCH_3$

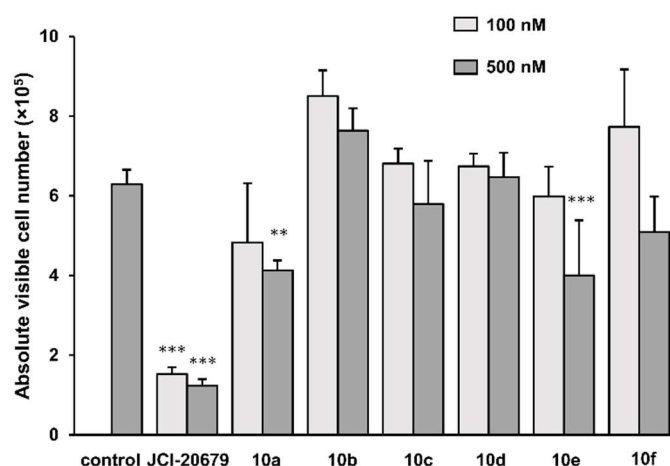


Figure 8. Inhibition of cell proliferation was assessed using the trypan blue exclusion test to count viable cell number following 72 h of treatment with given analogs at a concentration of 100 or 500 nM (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Dunnett's multiple comparison test).

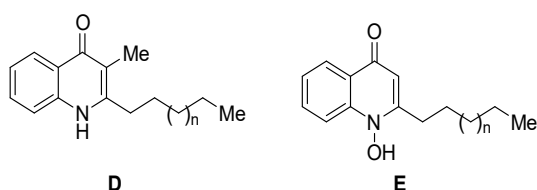
この図は、文献 (Ohta *et al.*, *J. Med. Chem.* **2023**, *66* (9), 6403-6413.) の図 3 の化合物番号を変更して引用した。

第三節 末端アルキル側鎖の長さの異なる誘導体の合成と活性評価

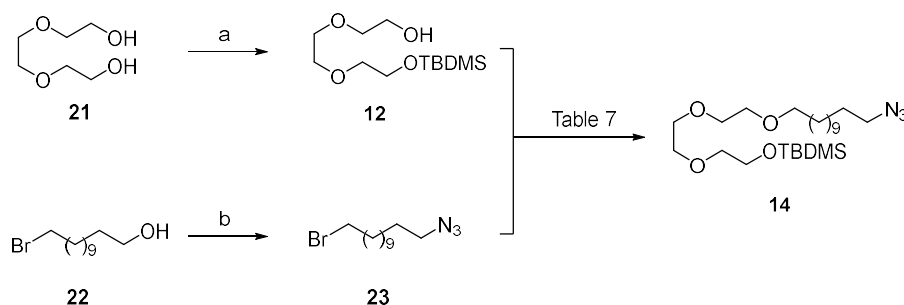
第一項 末端アルキル側鎖の長さの異なる誘導体の合成

Oettmeier らは、ミトコンドリア電子伝達系複合体 I 阻害活性を示すキノロン誘導体^{脚注3}において直鎖アルキル側鎖の長さが活性に影響を与えることを報告している。⁶¹ また、先行研究にて JCI-20679 の末端アルキル側鎖の長さがヒトがん細胞に対する増殖抑制活性に影響することが報告されていることから、⁶² **10a** についても同様の可能性があることが示唆されたため、**10a** の末端アルキル側鎖の長さに関する構造活性相関を検討した。著者は、末端アルキル鎖を合成の終盤に導入する経路を用いれば、効率的に誘導体が合成できると考えた (Scheme 3)。まず、出発物質であるモノ-*tert*-ブチルジメチルシリル (TBDMS) トリエチレングリコール **12** を文献既知の方法⁶³ で市販のトリエチレングリコール **21** から合成した。次に、12-ブロモ-1-ドデカノール **22** に対してジフェニルリン酸アジド (DPPA)、アゾジカルボン酸

^{脚注3} 彼らは、NADH オキシダーゼ阻害剤 (**D** および **E**) のアルキル鎖の長さ ($n = 1-10$) が活性に与える影響について調査したところ、一定の長さのアルキル鎖を持つ誘導体の活性が高いことを報告している。⁶¹



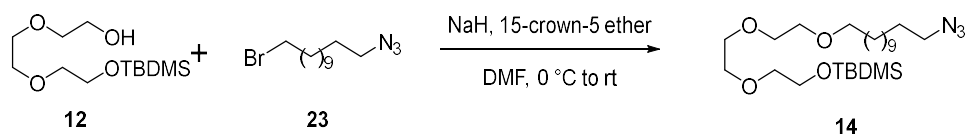
ジイソプロピル (DIAD) およびトリフェニルホスフィンを作用させることにより 1-アジド-12-ブロモドデカン **23** を合成した。その後、**12** に対して **23** を用いて前節と同じ反応条件にてアルキル化反応を行い、**14** を合成したものの、25%と低収率であった (Table 7, entry 1)。そこで本アルキル化反応の条件検討を行った (Table 7)。



Scheme 3. Reagents and conditions: (a) TBDMSCl, NaH, THF, 0 °C to rt, 66%; (b) DPPA, DIAD, PPh₃, THF, 0 to 35 °C, 80%.

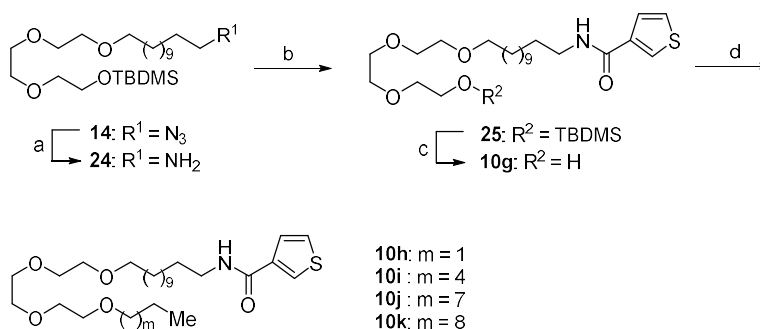
副生成物として bis-TBDMS-トリエチレングリコールが得られたことから、求電子剤 **23** の当量を向上することにより改善できると考えた。そこで、**12** を 1 当量として、**23** および塩基の当量を検討することにした。まず、1 当量の **12** に対して小過剰の **23** を用い、水素化ナトリウムの当量を検討した。水素化ナトリウムの当量を 1.2、1.5 または 2.0 当量にて反応を行ったところ、収率はそれぞれ 24%、52%および 34%であった (entries 2, 3, 4)。次に求電子剤の当量を検討した。1.2 当量の水素化ナトリウム存在下で、**23** を 1.5、2.0 当量を使用したところ、収率はそれぞれ 46%、61%と収率の向上が見られた (entries 5, 6)。そこで、**23** の当量を 2.0 とし、再度水素化ナトリウムの当量を検討したところ、1.5 当量では収率に変化は見られなかったが、2.0 当量を使用した場合では収率が低下した (entries 7, 8)。いずれにしても **14** は中程度の収率でしか得られなかった。その原因として、**12** と水素化ナトリウムが反応して生成したナトリウムアルコキシドにおいて、そのナトリウムイオンとポリエーテル鎖の酸素原子がキレートすることによる求核性の低下、または高配位シリケートの生成により求核性が低下したのではないかと考えた。そこでナトリウムイオンと親和性の高い 15-クラウン-5 エーテルを添加することにより収率が改善できるのではないかと考え、entries 6-8 の条件に対して水素化ナトリウムと同じ当量の 15-クラウン-5 エーテルを添加したところ、いずれも収率が向上した (entries 9-11)。最も高い収率で目的物が得られた entry 9 を最適条件として、続く合成を行うことにした。

Table 7. アルキル化反応の条件検討



entry	12:23 比	NaH (eq.)	15-crown-5-ether (eq.)	yield (%)
1	1:0.3	1.0	-	25
2	1:1.2	1.2	-	24
3	1:1.2	1.5	-	52
4	1:1.2	2.0	-	34
5	1:1.5	1.2	-	46
6	1:2	1.2	-	61
7	1:2	1.5	-	61
8	1:2	2.0	-	48
9	1:2	1.2	1.2	68
10	1:2	1.5	1.5	67
11	1:2	2.0	2.0	62

合成した **14** のアジド基を還元し、シリカゲルクロマトグラフィーによる精製を行うことなくチオフェン-3-カルボン酸との縮合反応に付すことにより TBDMS 保護チオフェンカルボキサミド体 **25** を 2 段階 89% で得た。フッ化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム を用いて **25** の TBDMS 基を脱保護することにより、第一級アルコール **10g** を高収率で合成した。次に水素化ナトリウムの存在下、1-ヨードプロパンを用いて末端アルキル鎖部分を伸長することにより誘導体 **10h** を収率 77% で得た。また、異なる長さのヨードアルカンを用いることにより、種々の末端アルキル側鎖を持つ誘導体 **10i-k** を 59–84% の収率で得た (Scheme 4)。



Scheme 4. Synthesis of analogs **10g-k** with variable-length alkyl side chains. Reagents and conditions: (a) PPh₃, H₂O, Et₂O, 0 °C to rt; (b) thiophene-3-carboxylic acid, EDC·HCl, DMAP, THF, 0 °C to rt, 89% from **14**; (c) *n*-Bu₄NF, THF, rt, 89%; (d) R²-I, NaH, DMF, 0 °C to rt; **10h** (77%); **10i** (84%); **10j** (69%); **10k** (59%).

第二項 末端アルキル側鎖の長さの異なる誘導体のマウス膠芽腫幹細胞に対する増殖抑制活性の評価

得られた誘導体 **10g-k** の膠芽腫幹細胞に対する増殖抑制活性は、第二節第二項と同じ手法により評価した (Figure 9)。その結果、ヒドロキシ基を有する誘導体 **10g** は 500 nM の濃度においても活性を示さず、活性発現にはヒドロキシ基をアルキル化する必要があることが示唆された。次に、末端アルキル側鎖の長さに着目した。短いアルキル側鎖を持つ誘導体 (**10h** および **10i**) は、**10h** の 500 nM 濃度を除いて、いずれも活性を示さなかった。一方で、長いアルキル側鎖として *n*-ノニル基または *n*-デシル基を有する誘導体 (**10j** および **10k**) は、100 nM の濃度において JCI-20679 に匹敵する増殖抑制活性を示した (**10j**: 1.63×10^5 ; **10k**: 1.59×10^5 ; JCI-20679: 1.53×10^5)。以上の結果から活性増強には、一定の長さの末端アルキル鎖の存在が必要であることが示唆された。三芳らは、bis-THF アセトゲニン類の末端アルキル側鎖に *n*-ドデシル基およびメチル基を有する誘導体の NADH オキシダーゼ阻害活性を比較しており、末端アルキル鎖の長さは活性にほとんど影響を与えないことを報告している。⁵⁹ しかしながら、彼らはウシ心臓ミトコンドリアから調製したミトコンドリア内膜の反転小胞である亜ミトコンドリア粒子 (SMP) を用いており、誘導体の細胞内動態などが考慮されていない。今回、長い末端アルキル鎖を有する誘導体 **10j** および **10k** が強い増殖抑制活性を示したのは、高い脂溶性により膜透過性などが向上したためであると考察している。化合物 **10j** および **10k** は同程度の強さの増殖阻害活性を示したが、低濃度での処理に際して、**10k** は **10j** よりも安定した再現性をもって増殖阻害活性を示したため、以後の検討には **10k** を用いることにした。

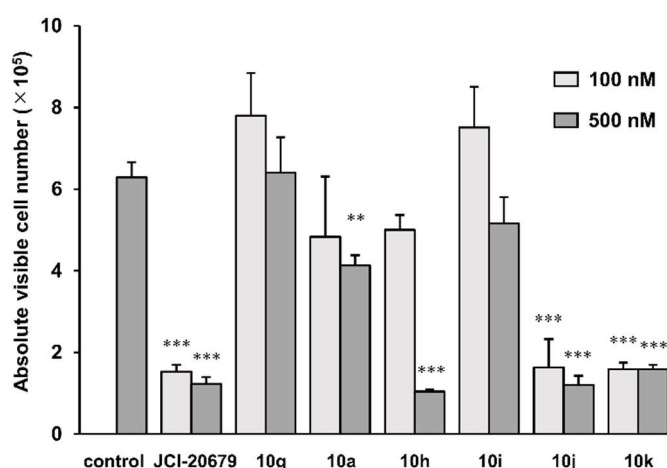


Figure 9. Inhibition of cell proliferation was assessed using the trypan blue exclusion test to count viable cell number following 72 h of treatment with given analogs at a concentration of 100 or 500 nM (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, Dunnett's multiple comparison test).

この図は、文献 (Ohta *et al.*, *J. Med. Chem.* **2023**, *66* (9), 6403-6413.) の図 4 の化合物番号を変更して引用した。

第三項 ヒト膠芽腫 U251 細胞におけるテモゾロミドとの併用効果の評価

リード化合物 JCI-20679 は、*in vitro* での解析により TMZ のヒト膠芽腫 U251 細胞に対する活性を相乗的に増強すること、加えて生体内において TMZ との併用により各々を単剤で使用よりも腫瘍の増殖を有意に抑制することが報告されている。⁴⁸ そこで、第二章第二項で見出した **10k** が JCI-20679 と同様に TMZ の効果を相乗的に増強するかを評価するために統計学的手法である combination index (CI) 法および isobologram 解析を用いて評価した。^{64,65} Isobologram 解析は、作用させた濃度のプロットを直線で結び、2 剤を併用した際のプロットが直線より原点側 ($CI < 0.9$) に位置していれば相乗効果、直線付近 ($0.9 \leq CI \leq 1.1$) に位置していれば相加効果、直線より外側 ($CI > 1.1$) に位置していれば拮抗効果と示している。今回、**10k** の 25, 50, 100 nM と TMZ の 12.5, 25, 50 μ M の濃度でそれぞれ組み合わせ、isobologram 解析により評価し、併用指標を CI 値により評価した。U251 に対する **10k** と TMZ を ED₅₀ および ED₇₅ で併用した際のプロットはいずれも直線より原点側に存在し、その CI 値は ED₅₀ のとき 0.325、ED₇₅ のとき 0.765 であり、相乗的な効果の増強作用が検出された (Figure 10)。

次に、JCI-20679 と **10k** の TMZ との相乗効果を比較した。まず、JCI-20679 と **10k** が ED₅₀ および ED₇₅ を示す濃度に着目した。**10k** は、ED₅₀ は 43 nM、ED₇₅ は 103 nM の濃度にて相乗効果を示した。対して JCI-20679 は ED₅₀ は 179 nM、ED₇₅ は 638 nM の濃度にて相加・相乗効果を示したことから、⁴⁸ **10k** の方が低い濃度で併用効果を示している。加えて、各々の ED₅₀ を示したときの併用効果に着目すると **10k** は相乗効果 ($CI = 0.325$) を示し、JCI-20679 は相加効果 ($CI = 0.972$) を示していることから、**10k** は JCI-20679 よりも高い併用効果が期待できることが示唆された。

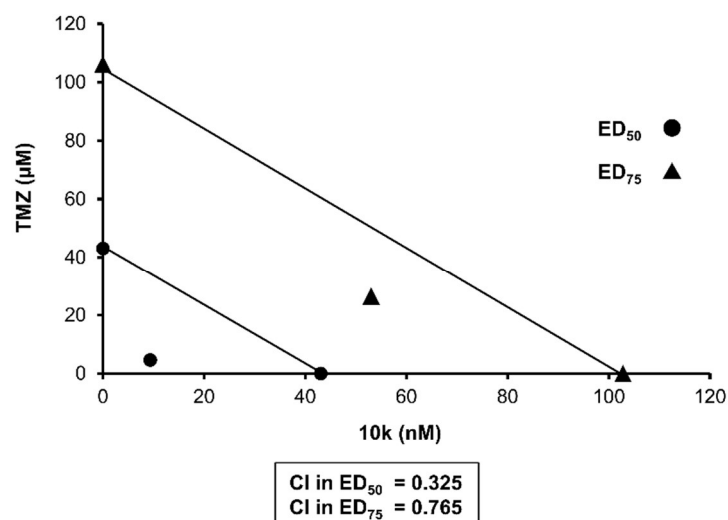


Figure 10. Analog **10k** and TMZ show synergy in U251 cells. U251 cells were treated with **10k** and/or TMZ, and cell proliferation was assessed as described in the Experimental Methods Section. The isobologram analysis of **10k** and TMZ at ED₅₀ and ED₇₅ concentrations is shown, with the combination indexes in the box below.

この図は、文献 (Ohta *et al.*, *J. Med. Chem.* **2023**, *66* (9), 6403-6413.) の図 5 の化合物番号を変更して引用した。

第四項 マウス由来膠芽腫幹細胞における AMPK の活性化の評価

先行研究として、JCI-20679 はミトコンドリア機能を阻害することにより AMP/ATP 比を増加し、AMPK の活性化を介して増殖抑制活性を示すことが報告されている。⁴⁷ そこで、著者は簡略化した誘導体 **10** においても AMPK の活性化能を検討することとし、リン酸化 AMPK (p-AMPK) のタンパク質量は、p-AMPK に対する抗体を使用したウェスタンブロット解析により行った (Figure 11A)。GAPDH をローディングコントロールとして用い、バンドを定量化し、p-AMPK のタンパク質の発現量を評価した。増殖抑制活性を示さない誘導体 **10d** は、p-AMPK タンパク質の発現量の増加が観測されず、強い増殖抑制活性を示した誘導体 (**10j** および **10k**) は p-AMPK タンパク質の発現量の増加が観測され、AMPK の活性化と増殖抑制活性が関連していることを見出した。次に **10k** の AMP/ATP 比を測定した。最終濃度 500 nM の **10k** を膠芽腫幹細胞に作用させたところ、ATP の減少 (DMSO: 1.00±0.02; **10k**: 0.58±0.18)、AMP の増加が観測され (DMSO: 1.00±0.08; **10k**: 1.50±0.44)、その結果、AMP/ATP 比が増大した (DMSO: 1.00±0.09; **10k**: 2.91±1.10) (Figure 11B)。これらから、標的タンパク質は未解明ではあるものの、本誘導体 **10** はリード化合物である JCI-20679 と同様に AMPK の活性化を介して増殖抑制活性を示すことが示唆された。

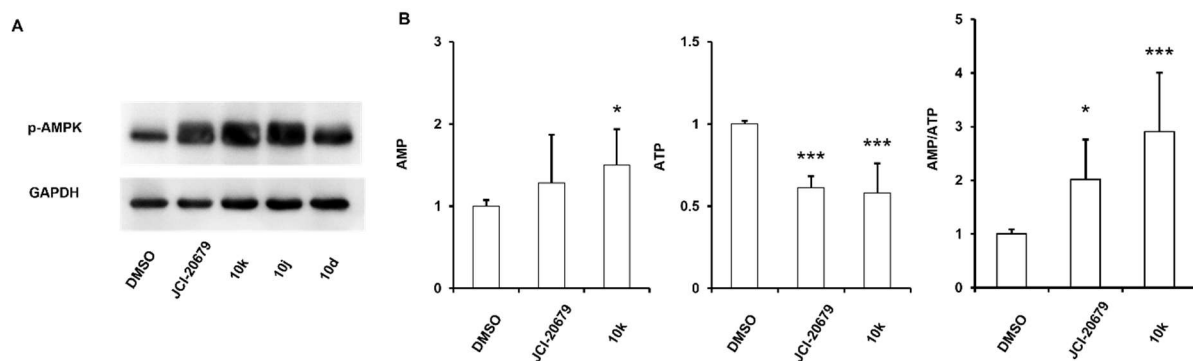


Figure 11. Analog **10k** activates AMPK and increases the AMP/ATP ratio. (A) Expression levels of p-AMPK α proteins in the GSCs treated with 500 nM JCI-20679, **10k**, **10j**, or **10d** for 48 h. (B) Intracellular AMP and ATP levels in GSCs treated with 500 nM JCI-20679 or **10k** for 48 h. The AMP/ATP ratio calculated from the AMP and ATP levels (n = 8; *P < 0.05; ***P < 0.001, Dunnett's multiple comparison test).

この図は、文献 (Ohta *et al.*, *J. Med. Chem.* **2023**, 66 (9), 6403-6413.) の図 6 の化合物番号を変更して引用した。

第五項 マウス膠芽腫幹細胞およびヒト結腸がん SW48 細胞に対する生体内抗腫瘍活性の評価

新規リード化合物としての **10k** の有効性を評価するために、膠芽腫幹細胞移植マウスモデルを用いて評価した。膠芽腫幹細胞モデルマウスは、予め luciferase 遺伝子を導入した膠芽腫幹細胞を大脳に移植することにより作成した。^{47,66-68} 移植日から **10k** を 10 mg/kg の用量で腹腔内に週 3 回投与した。生存時間分析では、死亡、明らかな神経学的症状の発生、または体重の 20%以上の減少を打ち切りイベントとして Kaplan–Meier 曲線を作成した (Figure 12A)。グラフの横軸は生存日数、縦軸は生存率を示しており、各時点における累計生存率を表している。**10k** 投与群 (生存期間中央値 28 日) と、コントロール群 (生存期間中央値 14 日) の生存率を log-rank test にて検定したところ、**10k** 投与による統計学的有意な生存率の改善が認められた。次に、**10k** の抗腫瘍活性を luciferase の発光シグナルを介して評価した。移植 3 週間後に D-luciferin を腹腔内に投与し、腫瘍の大きさを示す発光の検出結果を Figure 12B とし、その発光強度値をプロットした (Figure 12C)。Figure 12B では発光強度が低いほど、Figure 14C では発光強度値の中央値が小さいほど腫瘍の大きさが小さいことを示している。その結果、**10k** 投与後の発光強度は、コントロール群よりも有意に低下したことから (コントロール群: 22.5 \pm 29.5 ; **10k**: 1.1 \pm 0.8)、**10k** は生体内において膠芽腫幹細胞の増殖を抑制することが示された。

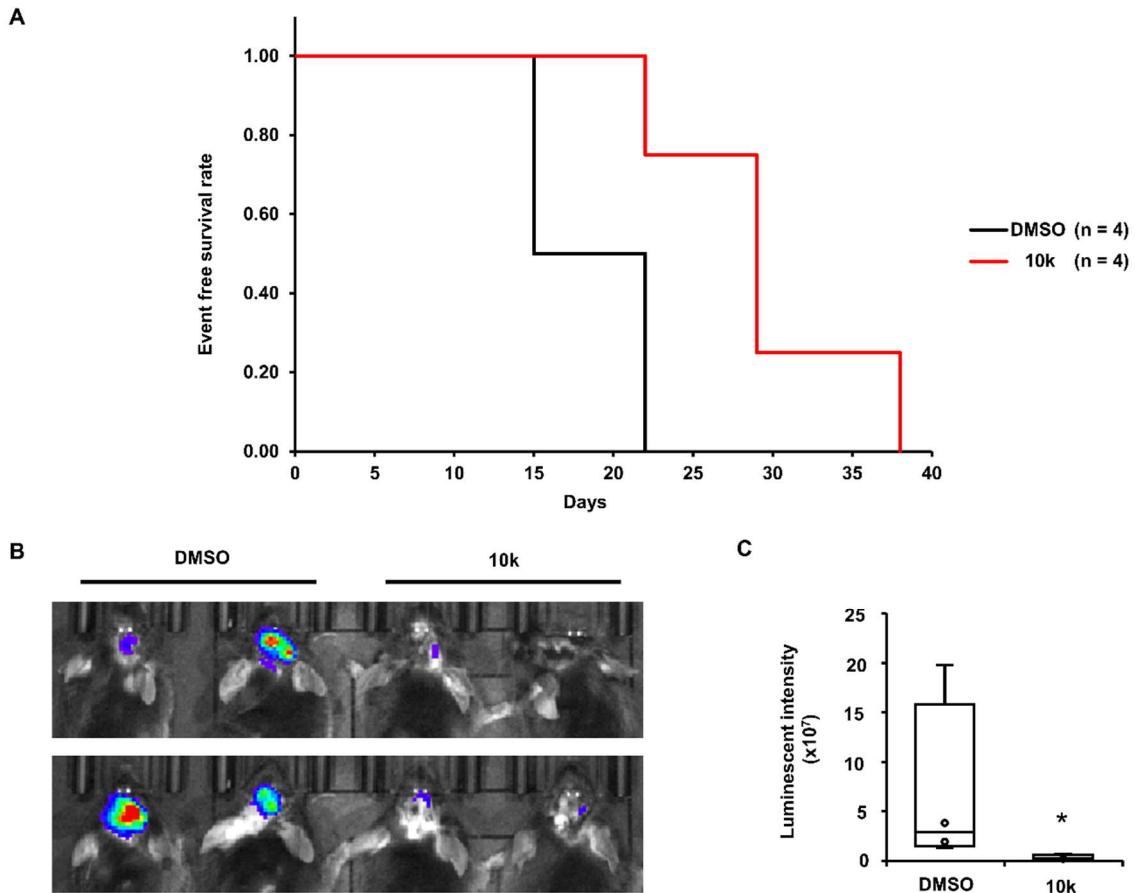


Figure 12. Analogue **10k** prolongs overall event-free survival. (A) Event-free survival rate in mice transplanted with GSCs in the brain and treated with either solvent or **10k** (10 mg/kg; $n = 4$ in each treatment group). The event-free survival rate was analyzed *via* the Kaplan–Meier method ($*P < 0.05$). (B) Glioblastoma size assessed by the bioluminescence intensity in mice. (C) Luminescence values after 3 weeks of treatment are shown ($n = 4$; $*P < 0.05$).

この図は、文献 (Ohta *et al.*, *J. Med. Chem.* **2023**, 66 (9), 6403-6413.) の図7の化合物番号を変更して引用した。

10k の膠芽腫以外のがんに対する有効性を評価することを目的に、ヒト結腸がん SW48 異種移植モデルマウスを用いて検討した。**10k** を 20 mg/kg の用量にて移植3日目から腹腔内に連日投与した。**10k** の抗腫瘍活性は、マウス体表からノギスを用いて腫瘍の直径と短径を測定し、腫瘍体積を計算式 (直径×短径²)×0.5 にて算出し、評価した。グラフの横軸は移植日を0日とした経過日数、縦軸は各時点における腫瘍体積を示している (Figure 13A)。投与開始から 3.5 週間後の投与群の平均腫瘍サイズは対照マウス群と比較して約 35% 減少した (**10k**: 352±73 mm³、コントロール群: 997±180 mm³)。この結果から、**10k** は膠芽腫以外の腫瘍の増殖も有意に抑制することを明らかにした。また、Figure 13B では投与開始 3.5 週間後のマウスの平均体重を示しており、マウスの有意な体重減少を観測しなかったため、この用量は許容量であることが示唆された (Figure 13B)。この結果から、**10k** は膠芽腫幹細胞以外の他種のがんに対しても抗腫瘍活性を示す可能性が示唆された。

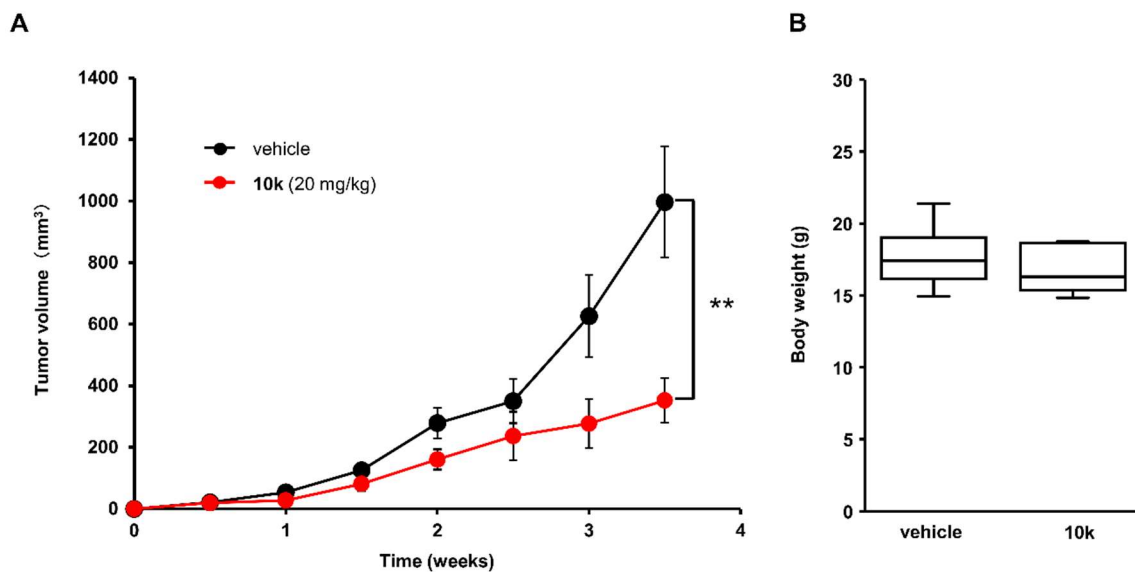
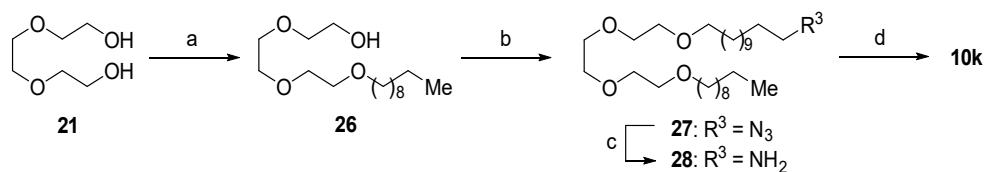


Figure 13. Administration of **10k** inhibits tumor growth in the severe combined immunodeficient (SCID) mice bearing a human colon cancer SW48 xenograft. (A) DMSO/EtOH (control) or **10k** (20 mg/kg, n = 8 in each treatment group) was intraperitoneally administered daily from day 4 onward. Tumor volume was calculated as $0.5 \times (\text{major diameter}) \times (\text{minor diameter})^2$. (B) Bodyweight after 3.5 weeks of treatment is shown (**P < 0.01, Mann–Whitney U test).

この図は、文献 (Ohta *et al.*, *J. Med. Chem.* **2023**, 66 (9), 6403-6413.) の図 8 の化合物番号を変更して引用した。

第四節 有望な生物活性を示した誘導体の短工程合成の検討

有望な抗腫瘍活性を示した **10k** のより短工程の合成を検討した。第三節第二項では、末端アルキル鎖の長さの異なる種々の誘導体を効率よく合成することを目的とした経路を採用していたが、より短工程での合成を目的にヒドロキシ基を保護しない合成を検討した。先述と同じトリエチレングリコール **21** を出発原料として、アルキル化剤として 1-ヨードデカンおよび **23** を用いて 2 回のエーテル化反応を行い、2 段階 45% の収率でアジド体 **27** を得た。これまでと同様の手法により還元・縮合反応に付すことにより **10k** を合成した (Scheme 5)。第三節第二項の経路は総 7 工程、総収率 17% に対して、本経路は総 5 工程、総収率 31% であることから、2 工程短縮し、総収率は 14% 向上した。



Scheme 5: Alternate synthetic route for **10k** production without the protected group. Reagents and conditions: (a) 1-iododecane, NaH, 15-crown-5 ether, DMF, 0 °C to rt, 46%; (b) **23**, NaH, 15-crown-5

ether, DMF, 0 °C to rt, 98%; (c) PPh₃, H₂O, Et₂O, 0 °C to rt; (d) thiophene-3-carboxylic acid, EDC·HCl, DMAP, THF, 0 °C to rt, 85% from **27**.

リード化合物 JCI-20679 の総 23 工程と比較して、誘導体 **10k** は総 5 工程にて合成可能である。また **10k** は、JCI-20679 よりも TMZ と高い相乗効果を示し、JCI-20679 と同様に AMPK を活性化した。これらの結果から、**10k** は合成容易な新規抗がんリード化合物として期待できる。以上のように、著者は JCI-20679 と同程度の生物活性を有しつつ、短工程で合成可能な誘導体を見出すことに成功した。

第二章 エチレングリコール単位を側鎖に有するチオフェンカルボキサミド誘導体のエチレングリコール単位、複素環およびその連結部位に関する構造活性相関研究

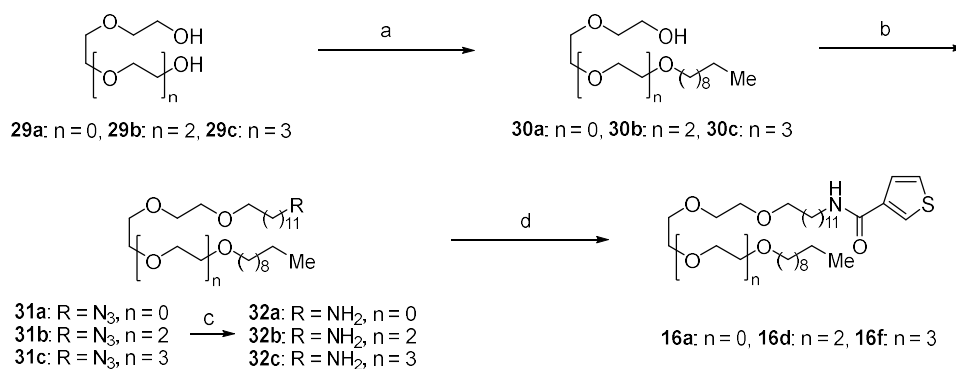
第一節 緒言

肺がんの罹患率は高く、手術療法、化学療法、放射線療法および免疫療法の組み合わせにより治療されるが、我が国におけるがんの部位別死亡数の一位を占めるため、その予後は不良であるといえる。¹ 肺がんは小細胞肺がんとは非小細胞肺がん (NSCLC) に分類され、NSCLC の罹患者の割合は約 85% とその大部分を占める。⁶⁹ NSCLC における最も一般的な発がん因子は上皮成長因子受容体 (EGFR) の遺伝子変異であり、これはアジア人患者に多くみられることが報告されている。⁷⁰ EGFR 変異 NSCLC の第一選択薬としてチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) が使用されているが、それに対する治療抵抗性の獲得のため効果は依然として限定的であり、さらなる有効な薬物療法の確立が求められている。これら治療抵抗性の獲得の機序の一つとして、OXPHOS 機能が亢進していることが報告されており、⁷¹ ミトコンドリア機能阻害剤であるメトホルミンと TKI であるアファチニブの併用により、アファチニブの治療抵抗性株に対する活性が向上することが報告されている。⁷² そのため、ミトコンドリア機能の阻害は、肺がんの治療戦略として期待される。

著者は、第一章にて見出した誘導体 **10k** の活性増強を目的とした構造活性相関研究を展開するとともに、ヒト肺がん A549 細胞に対する生物活性を検討した。序論で述べたように、**10k** のエチレングリコール単位数、複素環およびその連結部位が活性に与える影響について検討した。

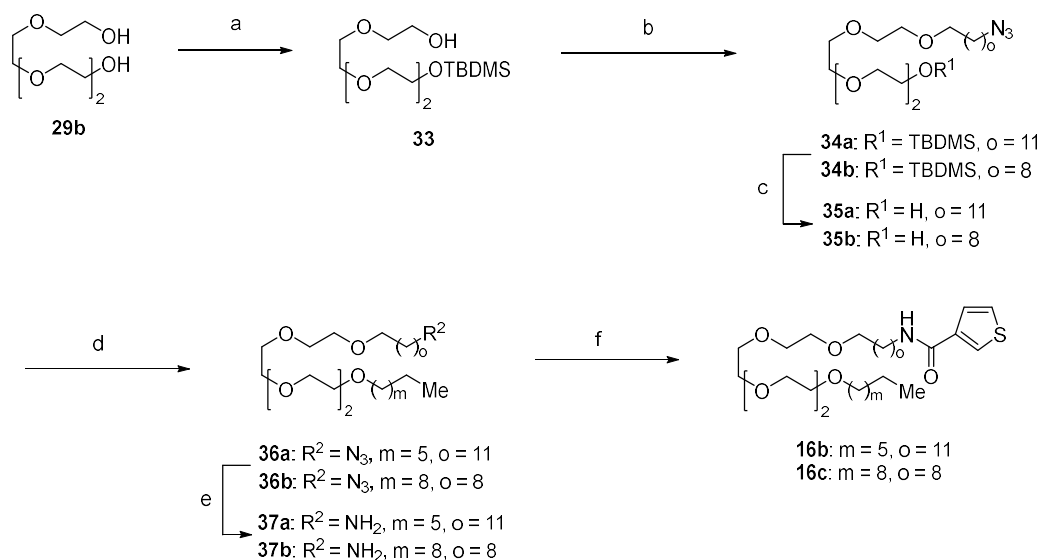
第二節 誘導体の合成

最初に、**10k** のエチレングリコール単位数による活性変化を調査するために異なるエチレングリコール単位を有する誘導体 **16a-f** を合成した。目的の誘導体は、**10k** の第一章第四節の合成経路を応用することにより合成できると考えた。まず、末端アルキル鎖およびリンカー側鎖が **10k** と同じ長さである誘導体 **16a**、**16d** および **16f** を合成した。市販のジエチレングリコール **29a** に対して 1-ヨードデカンおよび **23** を用いて 2 回の伸長反応によりアジド体 **31a** を得た。次に **31a** のアジド基を還元し、縮合反応により **16a** を得た。テトラエチレングリコールおよびペンタエチレングリコール構造を有する誘導体 **16d** および **16f** は、対応する出発原料 **29b** または **29c** を使用して、同経路により合成した (Scheme 6)。



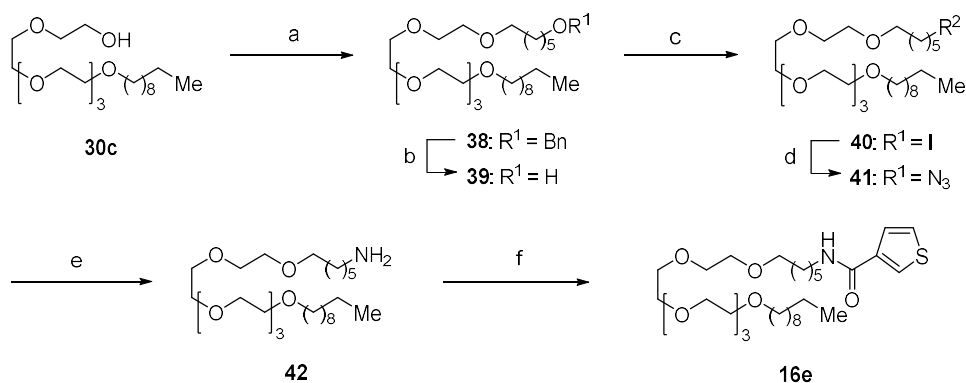
Scheme 6. Synthesis of analogs **16a**, **16d** and **16f**. Reagents and conditions: (a) 1-iododecane, NaH, DMF, 0 °C to rt, **30a** (38%), **30b** (45%), **30c** (55%); (b) **23**, NaH, 15-crown-5 ether, DMF, 0 °C to rt, **31a** (71%); **31b** (73%); **31c** (63%); (c) PPh_3 , H_2O , Et_2O , 0 °C to rt; (d) thiophene-3-carboxylic acid, EDC·HCl, DMAP, THF, 0 °C to rt, **16a** (86% from **31a**); **16d** (97% from **31b**); **16f** (69% from **31c**).

次に、**16d** とは異なる長さのアルキル鎖を有するテトラエチレングリコール誘導体 **16b-c** を合成した。文献既知の mono-TBDMS-テトラエチレングリコール **33**⁷³ を合成し、そのものに対して **23** を用いてアルキル化することにより中程度の収率で TBDMS 保護アジド体 **34a** を得た。**34a** の TBDMS 基を脱保護して第一級アルコール **35a** を得たのち、1-ヨードヘプタンを用いて側鎖を伸長することによりアジド体 **36a** を得た。**36a** のアジド基を還元して第一級アミン体 **37a** へと変換したのち、チオフェン-3-カルボン酸と縮合することにより誘導体 **16b** を得た。リンカー鎖部位に n -ノニル鎖を有する誘導体 **16c** は、対応する長さを有するアルキル化試薬⁷⁴を使用し、同じ手法により合成した (Scheme 7)。



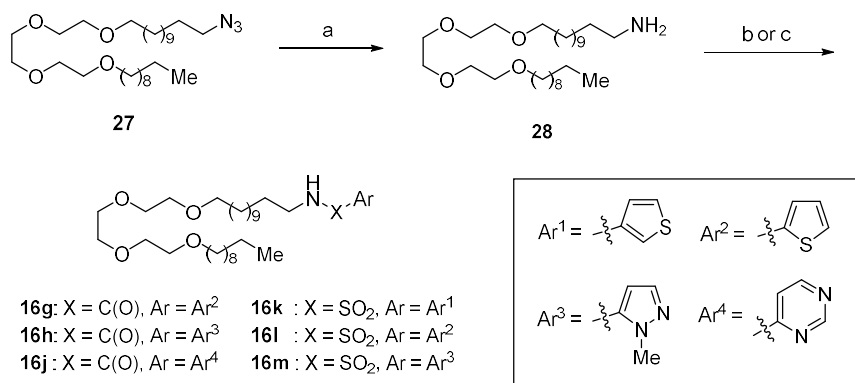
Scheme 7. Synthesis of analogs **16b–c**. Reagents and conditions: (a) TBDMSCl, NaH, THF, 0 °C to rt, 40%; (b) 1-azido-bromoalkane, NaH, 15-crown-5 ether, DMF, 0 °C to rt, **34a** (76%); **34b** (56%); (c) *n*-Bu₄NF, THF, rt, **35a** (80%); **35b** (93%); (d) Alkyl iodide, NaH, DMF, 0 °C to rt, **36a** (74%); **36b** (81%); (e) PPh₃, H₂O, Et₂O, 0 °C to rt; (f) thiophene-3-carboxylic acid, EDC·HCl, DMAP, THF, 0 °C to rt, **16b** (55% from **36a**); **16c** (84% from **36b**).

リンカー鎖に *n*-ヘキシル基を有するペンタエチレングリコール誘導体 **16e** は、1-ベンジルオキシ-6-ブロモヘキサン⁷⁵をアルキル化剤として用いて合成を行うことにした。誘導体 **16e** は、**30c** に対して 1-アジド-6-ブチルヘキサンを用いれば、これまでと同様に合成できると考えた。しかしながら、一般的にアジド基を持つ化合物は爆発性を有することが知られており、その指標は (C+O)/N 比で表される。(C+O)/N 比が高い数値を示すほど危険性は小さく、(C+O)/N が 3 未満の化合物はその取扱いに注意する必要があるとされている。1-アジド-6-ブロモヘキサンは C/N = 2 と爆発の危険性があり、安全性の観点からこの経路を回避した。そこでアジド基を合成途中で導入する経路での合成を検討することにし、まず、**30c** を文献既知の手法で合成した 1-ベンジルオキシ-6-ブロモヘキサンを用いてアルキル化し、ベンジル (Bn) エーテル体 **38** を合成した。続いて **38** の Bn 基を接触水素還元により脱保護し、第一級アルコール **39** を得た。ヒドロキシ基をヨウ素化反応、アジド化反応に付すことによりアジド体 **41** を得た。**16a** と同じ反応条件にて還元、縮合反応に付すことにより所望の誘導体 **16e** を合成した (Scheme 8)。



Scheme 8. Synthesis of analogs **16e**. Reagents and conditions: (a) 1-benzyloxy-6-bromohexane, NaH, 15-crown-5 ether, DMF, 0 °C to rt, 61%; (b) H₂ (3 atm), 10% Pd(OH)₂-C, EtOAc, rt, 89%; (c) I₂, PPh₃, imidazole, CH₂Cl₂, 0 °C to rt, 91%; (d) NaN₃, DMSO, rt, 94%; (e) PPh₃, H₂O, Et₂O, 0 °C to rt; (f) 3-thiophene carboxylic acid, EDC·HCl, DMAP, THF, 0 °C to rt, 74% from **41**. Bn = benzyl.

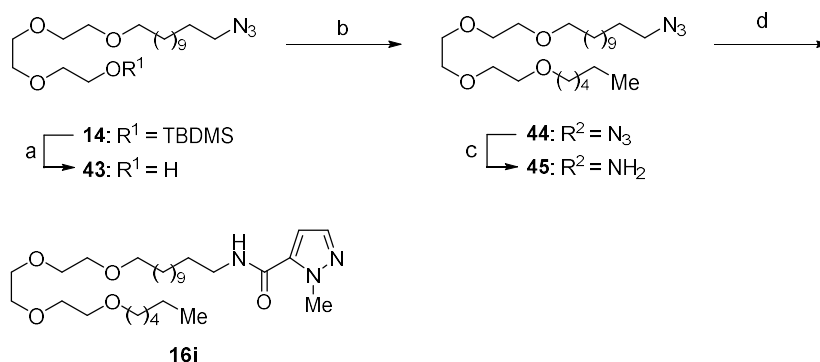
複素環および連結部位の構造活性相関研究を目的に、異なる複素環および連結部位を有する誘導体 **16g-h** および **16j-m** を合成した。第一章第四節の経路により第一級アミン体 **28** を調製し、そのものに対して 2-チオフェンカルボン酸と縮合させることにより 2-チオフェンカルボキサミド誘導体 **16g** を得た。他のカルボキサミド誘導体 **16h** および **16j** も同様の手法により合成した。次に連結部位にスルホンアミド結合を有する誘導体 **16k-m** は、**28** に対して塩基としてトリエチルアミンを使用し、市販または合成したアリアルスルホニルクロリド⁴⁵を用いることにより中程度の収率で合成した (Scheme 9)。



Scheme 9. Synthesis of analogs **16g-h** and **16i-m**. Reagents and conditions: (a) PPh₃, H₂O, Et₂O, 0 °C to rt; (b) Ar-COOH, EDC·HCl, DMAP, THF, 0 °C to rt, **16g** (86% from **27**); **16h** (53% from **27**); **16j** (98% from **27**); (c) Ar-SO₂Cl, Et₃N, CH₂Cl₂, rt, **16k** (77% from **27**); **16l** (71% from **27**); **16m** (94% from **27**).

次にチオフェン環以外の複素環を有する誘導体における末端アルキル鎖が活性に与える影響を調査することを目的に *n*-ヘキシル基を末端アルキル鎖に持つ 1-メチルピラゾールカルボキサミド誘導体 **16i** を合成した。当初、末端アルキル鎖を合成の終盤に導入する経路にて **16i**

の合成を検討した。*N*-(21-ヒドロキシ-13,16,19-トリオキサヘンイコサ-1-ニル)-1-メチル-1*H*-ピラゾール-5-カルボキシドを基質として伸長反応を行ったものの、望まない *N*-アルキル化反応が進行し、目的の **16i** は得られなかった。そこで、先に末端アルキル鎖を導入することにした。第一章第三節第一項の TBDMS-保護アジド体 **14** の TBDMS 基を脱保護した後、1-ヨードヘキサンを用いて側鎖を伸長し、*n*-ヘキシルエーテル体 **44** を得た。アジド基を還元したのち、1-メチル-1*H*-ピラゾール-5-カルボン酸と縮合することにより、誘導体 **16i** を得た (Scheme 10)。



Scheme 10. Synthesis of analog **16i**. Reagents and conditions: (a) *n*-Bu₄NF, THF, rt, 98%; (b) 1-iodohexane, NaH, DMF, 0 °C to rt, 43%; (c); PPh₃, H₂O, Et₂O, 0 °C to rt; (d) 1-methyl-1*H*-pyrazole-5-carboxylic acid, EDC·HCl, DMAP, THF, 0 °C to rt, 69% from **44**.

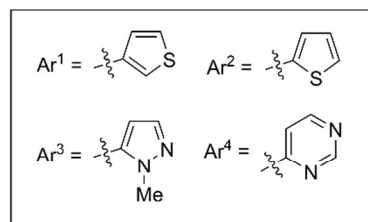
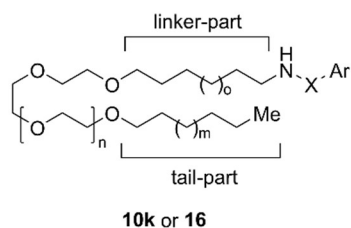
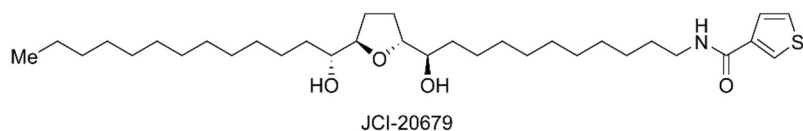
第三節 生物活性評価

第一項 ヒト肺がん A549 細胞に対する増殖抑制活性の評価

NSCLC はミトコンドリア機能が亢進していることが知られており、その一つである A549 細胞を用いて、⁷⁶ リード化合物 (JCI-20679 および **10k**) および合成した誘導体 **16a-1** の増殖抑制活性を評価した (Figure 14)。化合物が最終濃度 500 nM となるように調製した培養液 (0.05%DMSO 含有) を用いて、72 時間インキュベートし、細胞増殖を定量解析した。また、コントロールには、それらと同量の DMSO を含む培養液を用いた。DMSO 処理した時の生存細胞数を基準として、各化合物を作用させた生存細胞数を用いて、相対的な生存率を算出し、評価した。両リード化合物 (JCI-20679 および **10k**) は、コントロール群と比較して腫瘍の増殖を抑制した。次に、著者はエチレングリコール単位数の影響に注目した。ジエチレングリコール誘導体 **16a** は活性を示さなかったが、テトラエチレングリコール誘導体 **16b-d** はいずれも **10k** よりも有意な活性を示した (**16b**: 38±9%; **16c**: 27±6%; **16d**: 31±5%)。また、ペンタエチレングリコール誘導体 **16f** は顕著な増殖抑制効果を示したが、分子量を下げるためにリンカー側鎖を減炭した誘導体 **16e** の活性は **16f** よりも減弱した (**16e**: 51±8%; **16f**: 26±6%)。次いで、同じ長さの末端アルキル側鎖およびリンカー側鎖を有する誘導体 (**10k**, **16a**, **16d** および **16f**) の活性を比較したところ、活性とエチレングリコール単位数の間には、正の相関関係がある

ことが示唆された (**16a**: 86±6%; **10k**: 49±9%; **16d**: 31±5%; **16f**: 26±6%)。しかしながら、**16d** と **16f** 間の活性の差はほとんど見られず、ペンタエチレングリコール構造よりもテトラエチレングリコール構造の方が分子量の観点から望ましいと考えた。顕著な活性を示した **16c** と **16f** のうち、溶解性の観点から **16c** を用いてさらなる生物活性を評価することにした。次に、複素環について着目した。序論で述べたように先行研究として JCI-20679 を含む THF 環部分を持つ誘導体において、複素環を変化させても強い活性を示すことが明らかになっている。^{43,46,77} まず、ピリミジン誘導体 **16j** はほとんど活性を示さなかった。2-チオフェン誘導体 **16g** および 1-メチルピラゾール誘導体 (**16h** および **16i**) は **10k** と同程度の増殖抑制活性を示した (**16g**: 48±16%; **16h**: 37±9%; **16i**: 46±41%)。これら複素環に関する構造活性相関研究の結果から、ポリエーテル構造を有する化合物においても THF 環を有する誘導体と同様に 3-チオフェン環以外の複素環に変換しても活性を維持できることが示唆された。最後に、複素環とリンカー側鎖の連結部位に焦点を当てた。先行研究にて THF 環部分を有するスルホンアミド誘導体 **17** は強い増殖抑制活性を示すことを報告している。⁴⁵ しかしながら、トリエチレングリコール構造を有するチオフェンスルホンアミド誘導体 **16k-l** は活性を示さず、1-メチルピラゾールスルホンアミド誘導体 **16m** は弱い増殖抑制活性を示した (**16m**: 77±19%)。また、**16k-m** と同じ複素環を持つカルボキサミド誘導体 (**10k**、**16g** および **16h**) の増殖抑制活性を各々比較すると (**10k** 対 **16k**、**16g** 対 **16l**、**16h** 対 **16m**)、活性は大きく減弱した。以上の *in vitro* 試験の結果から、**10k** の活性を向上させるためには複素環や連結部位を置換することよりも、エチレングリコール単位数を増加させることが適していることが示唆された。

A



compounds	m	n	o	X	Ar
10k	5	1	7	CO	Ar ¹
16a	5	0	7	CO	Ar ¹
16b	2	2	7	CO	Ar ¹
16c	5	2	4	CO	Ar ¹
16d	5	2	7	CO	Ar ¹
16e	5	3	1	CO	Ar ¹
16f	5	3	7	CO	Ar ¹

compounds	m	n	O	X	Ar
16g	5	1	7	CO	Ar ²
16h	5	1	7	CO	Ar ³
16i	1	1	7	CO	Ar ³
16j	5	1	7	CO	Ar ⁴
16k	5	1	7	SO ₂	Ar ¹
16l	5	1	7	SO ₂	Ar ²
16m	5	1	7	SO ₂	Ar ³

B

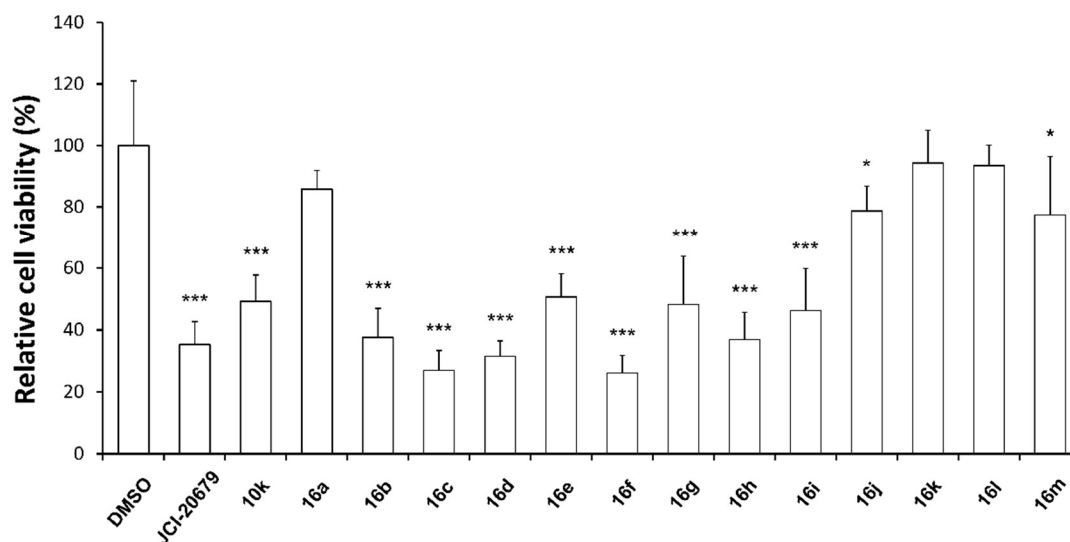


Figure 14. (A) Structures of lead compound (JCI-20679 and **10k**) and analogs **16a–l**. (B) Cell viability profile in A549 cells treated with compounds. A549 cells were treated with DMSO, 500 nM compounds for 3 days, and WST-8 assay was performed (n = 9). *p<0.05 and ***p<0.001 by Dunnet's multiple comparison test.

第二項 A549細胞における AMPK の活性化の評価

Chen らは AMPK 活性化作用を有する chrysin が A549 に対して増殖抑制活性を示すことを報告している。⁷⁸ また、第一章第三節第四項に示すように **10k** が GSCs に対して AMPK の活性化を介して増殖抑制活性を発現していることから、**16** の A549 に対する AMPK の活性化を評価した。まず、リード化合物 (JCI-20679 および **10k**) は GSCs と同様に A549 においても AMPK を活性化した (Figure 15A)。増殖抑制活性を示さない **16a** は AMPK を活性化させなかったのに対して、強い活性を持つ **16c** および **16h** は p-AMPK タンパク質を増加させた。THF 環を有する 1-メチルピラゾールカルボキサミド誘導体 **8** が *in vivo* 試験において急性毒性を発現した先行研究の結果から、複素環および連結部位に 1-メチルピラゾールカルボキサミドを持つ **16h** も毒性発現が示唆されるため、**16c** を用いてさらなる検討をすることにした。誘導体 **16c** は濃度依存的に p-AMPK タンパク質レベルを増加し (Figure 15B)、それに伴って **16c** は濃度依存的に細胞の増殖を抑制した (Figure 15C)。これらの結果から、本誘導体 **16** はリード化合物と同様に AMPK の活性化を介して増殖抑制活性を発揮する可能性が示唆された。

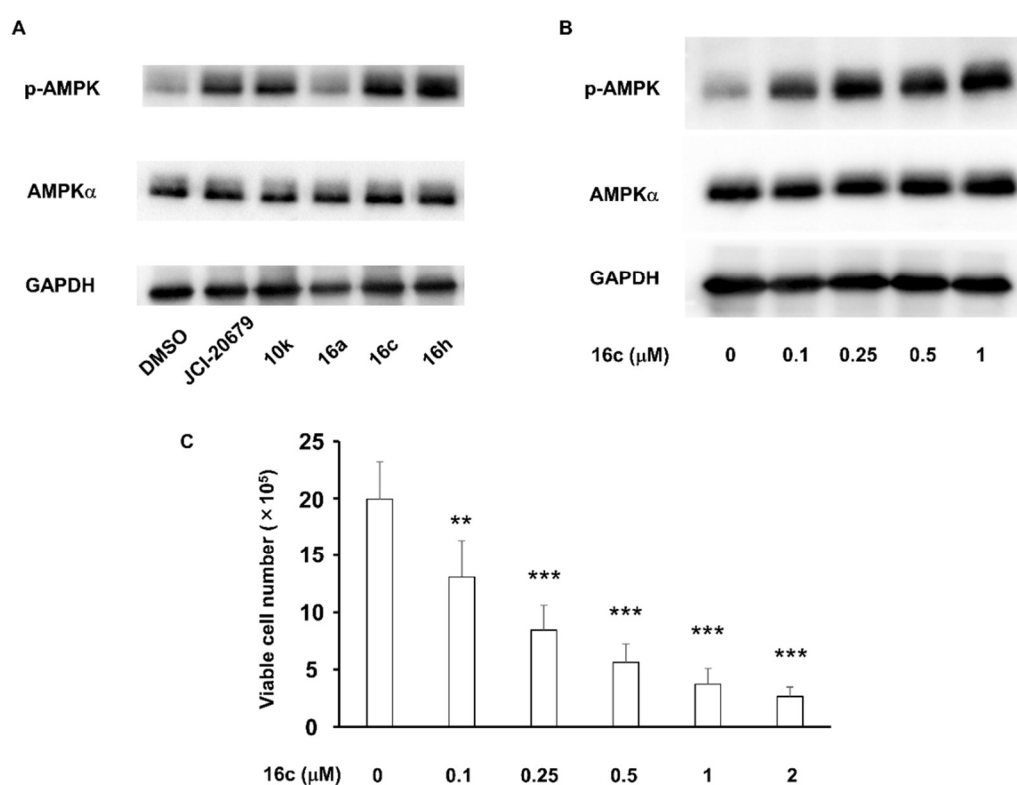


Figure 15. Analogs induce phosphorylation of AMPK α proteins. (A) Expression levels of p-AMPK α proteins in A549 cells treated with 500 nM JCI-20679, **10k**, **16a**, **16c**, or **16h** for 72 h. (B) Expression levels of p-AMPK α proteins in A549 cells treated with 0.1, 0.25, 0.5, 1 μ M **16c** for 72 h. Protein expression was evaluated by western blotting. (C) Viable cell number in A549 cells treated with 0.1, 0.25, 0.5, 1 or 2 μ M **16c** for 72 h were assessed with trypan blue exclusion assay. (** p <0.01 and *** p <0.001 by Dunnet's multiple comparison test)

第三項 ヒト肺がん A549 細胞異種移植モデルマウスを用いた抗腫瘍活性の評価

A549 細胞を移植した異種移植マウスを用いて **16c** の抗腫瘍効果を評価した。投与量 15 mg/kg を週 3 回腹腔内に 4 週間投与した。第一章の SW48 細胞と同様に腫瘍体積とマウスの体重を測定し、評価した。誘導体 **16c** の投与により移植 4 週間目の平均腫瘍サイズはコントロール群と比較して約 45%減少した (Figure 16A; **16c**: $94 \pm 9 \text{ mm}^3$, control: $208 \pm 26 \text{ mm}^3$)。さらに、投与開始 4 週間後のマウス体重はコントロール群と比較して有意差が観測されないことから、この投与量では急性毒性を示さないことが示唆された (Figure 16B)。以上の結果から、**16c** は肺がん治療薬のリード化合物として有望である可能性が示唆された。

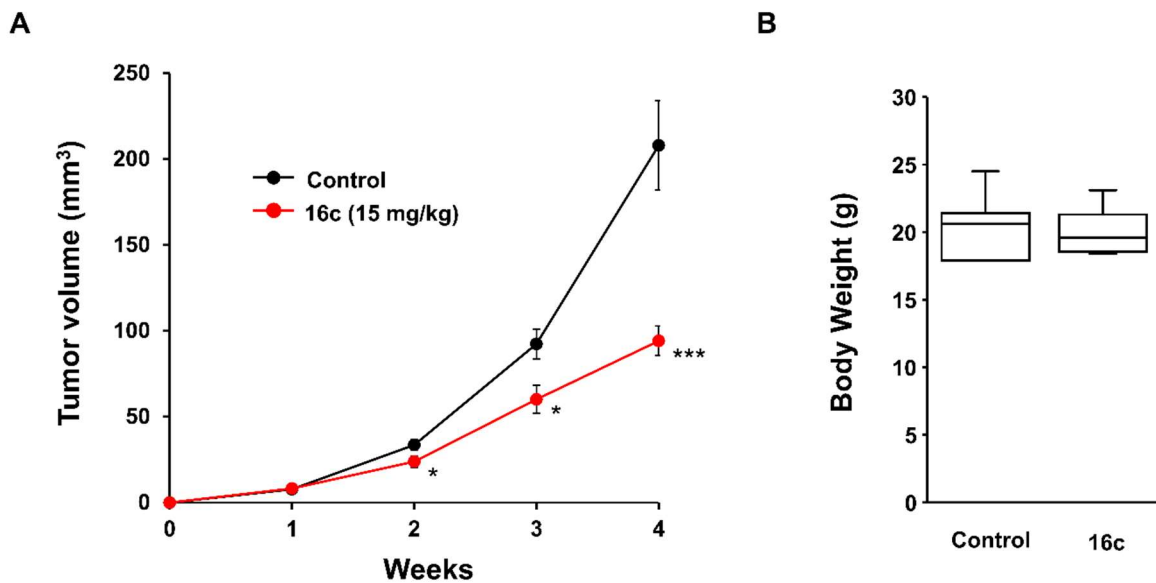


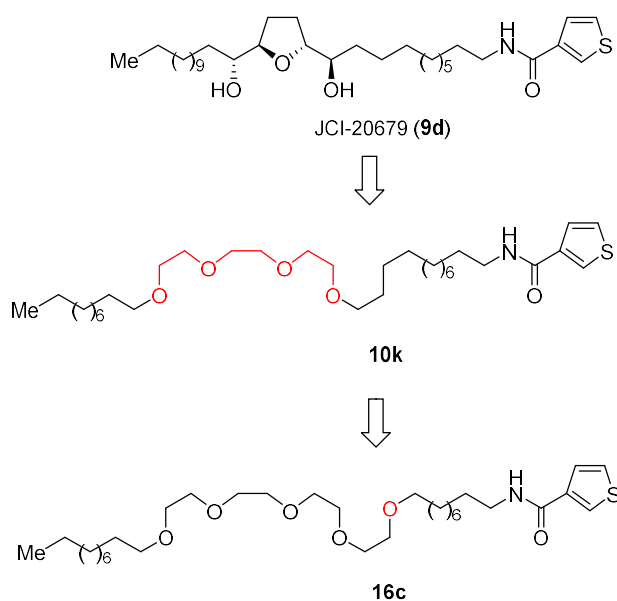
Figure 16. Tumor growth and body weight changes in nude mice bearing a human lung cancer A549 xenograft. A549 cells were implanted into CB17 SCID mice, and DMSO or **16c** was intraperitoneally administered three times a week ($n = 12$ for DMSO, $n = 14$ for **16c** group). (A) Tumor size was measured once a week. The graph represents tumor volume expressed as the mean \pm SE. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ by a two-tailed Student's t-test. (B) Bodyweight after 4 weeks of treatment is shown as a boxplot.

結論

ミトコンドリア代謝機能の阻害効果を発揮し、AMPK の活性化を介して抗腫瘍活性を示すアセトゲニンチオフェン誘導体 JCI-20679 の THF 環部分の構造の簡略化を指向し、エチレングリコール単位に置換した誘導体を合成し、その生物活性を解析した。

第一章では、JCI-20679 の THF 環部分をトリエチレングリコール構造に置換した誘導体 **10k** を合成し、膠芽腫幹細胞に対する増殖抑制活性を評価した。その結果、THF 環部分を簡略化しても活性を維持でき、その活性増強には、一定の長さの末端アルキル鎖の存在が必要であることが明らかになった。顕著な増殖抑制活性を示した **10k** を用いてさらなる生物活性の評価を行ったところ、TMZ の効果を相乗的に増強することを見出した。さらに、**10k** はリード化合物である JCI-20679 と同様に AMPK の活性化を介して増殖抑制活性を示すことが示唆された。さらに、生体内において膠芽腫幹細胞およびヒト結腸がん SW48 細胞に対して抗腫瘍活性を示したことから、総 5 工程で効率的に合成できる **10k** は新規抗がんリード化合物として有望である可能性が示唆された。

第二章では、第一章で見出した誘導体 **10k** のトリエチレングリコール構造、複素環およびその連結部位についての構造活性相関研究を展開した。いずれの構造単位も活性増強に影響を与えており、中でもエチレングリコール単位数の増加が活性増強に大きく寄与していることが示唆された。これら誘導体は **10k** と同様に AMPK の活性化を介して増殖抑制活性を示していることから、同様の作用機序を保持していることが示唆された。顕著な増殖抑制活性を示した誘導体 **16c** を用いてヒト肺がん A549 細胞異種移植モデルマウスを用いた *in vivo* 試験を実施した結果、急性毒性なく生体内腫瘍の増殖を有意に抑制することを見出した。以上の結果から、本誘導体はミトコンドリア機能阻害によるがん治療戦略の発展に貢献しうる可能性が示唆された。



法令遵守

動物実験は、京都薬科大学動物実験委員会による審査を受け、承認を得て (承認番号：CLON-19-001、A21-011)、実験計画に従って実施した。

謝辞

本研究に際し、懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました京都薬科大学 薬品製造学分野 南部寿則 教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり御助言と御教示を賜りました京都薬科大学 薬品製造学分野 山下正行 教授(現：名誉教授)、小島直人 准教授(現：長崎国際大学薬学部 教授)に篤く御礼申し上げます。

副査として、御助言を賜りました京都薬科大学 薬化学分野 古田 巧 教授および京都薬科大学 薬品化学分野 大石真也 教授に深く御礼申し上げます。

合成した誘導体の生物活性試験を行って頂きました京都薬科大学 臨床腫瘍学分野 中田 晋 准教授、飯居宏美 助教、安藤翔太 博士、茂山千愛美 博士、河野 雪那 学士に深く御礼申し上げます。

質量分析の測定を行って頂きました京都薬科大学共同利用機器センター 長谷川功紀 准教授(現：福島県立医科大学 教授)、服部恭尚 講師、安藤友繫 助教(当時)、扇田隆司 助教に御礼申し上げます。

研究上の討論の際に、貴重な御助言をいただきました京都薬科大学 薬品製造学分野 友原啓介 講師、岩崎宏樹 助教、松本卓也 博士に感謝申し上げます。

化合物の合成に関して、多大なご協力をいただいた京都薬科大学 薬品製造学分野 木下祐輔 学士、新谷友梨 学士、竜石侑理 学士、藤井真人 学士、塩見典大 学士、三輪稀良奈 学士、稲田純平 学士、高橋みのり 学士、濱 舞 学士、田中菜津子 学士、高橋萌衣 学士、丸岡真也 学士、木澤志穂 氏、高橋達也 氏、酒井里歌 氏、服部まこ 氏に感謝致します。

研究にご協力いただきました京都薬科大学 薬品製造学分野 森山将吾 学士、細見紘幸 学士に感謝致します。

学部および大学院での学生生活を送る上で、共に研究に励み、協力いただきました中井美里 学士、大野紗希 学士、小菅真央 学士、後藤瑞貴 学士、佐藤朱夏 学士、竹中智香 学士、小柴佐和子 氏、足立 みさと 氏、梶見 怜加 氏並びに薬品製造学分野に在籍した諸氏に感謝いたします。

末筆になりますが、日々の学生生活を支援していただきました家族に心から感謝を申し上げます。

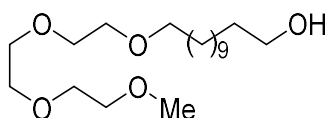
実験の部

<合成の部>

本実験に際し、各反応は特に明記がない限り、窒素またはアルゴン雰囲気下で行った。融点 (M.p.) は、ヤナコ微量融点測定装置または三商融点測定器 SMP-500 を用いて測定し、すべて未補正である。水素核磁気共鳴スペクトル ($^1\text{H-NMR}$)、炭素核磁気共鳴スペクトル ($^{13}\text{C-NMR}$) は、Bruker AscendTM 500 (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 Hz), JEOL ECS-400 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 Hz) または Bruker UltrashieldTM 300 (^1H : 300 MHz; ^{13}C : 75 Hz) のいずれかを使用し、テトラメチルシランまたはクロロホルム-d を内部標準として測定した。分裂様式の記載は、singlet, doublet, triplet, quartet, quintet, septet, multiplet, broad をそれぞれ s, d, t, q, qn, sep, m, br と略した。赤外吸収スペクトル (IR) は島津 FTIR-8400S を用いた液膜法または JASCO FT/IR-4600 Fourier Transform Infrared Spectrometer を用いた Attenuated Total Reflection (ATR) 法により測定した。高分解能質量分析 (High-resolution MS) 及び質量分析 (MS) は、JEOL SX-102A (FAB), SHIMADZU LUMS-IT-TOF (ESI), または JEOL JMS-GC-mate II [EI, CI (合成の部において CI は、chemical ionization 示す)] のいずれかを用いて測定した。薄層クロマトグラフィー (TLC) には、Merck silica gel 60 F₂₅₄ を用いた。分取薄層クロマトグラフィー (PTLC) には Merck silica gel 60 F₂₅₄ (膜厚 0.5 または 1.0 mm) を用いた。スポットの検出には、UV 照射または発色試薬として 5% リンモリブデン酸/エタノール溶液または 2.5% パラアニスアルデヒド/エタノール溶液を噴霧し、加熱時の呈色により行った。オープンシリカゲルカラムクロマトグラフィーの吸着剤として、KANTO CHEMICAL silica gel 60N (spherical, neutral, 63-210 μm) または FUJI SILYSIA CHEMICAL CHROMATOREX PSQ 100B (60-200 μm) を用いた。フラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーの吸着剤として、Merck silica gel 60 (15-40 μm) を用いた。生物活性を評価した化合物は、ポンプに SHIMADZU LC-10ATVP、紫外線可視吸光検出器に SHIMADZU SPD-10AVP、カラムに COSMOSIL 5C₁₈-Ar-II 5.0 μm (4.6 mm \times 250 mm) または CHIRALPAK IB 5.0 μm (4.6 mm \times 250 mm) を用いる分析高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により純度が 95% 以上であることを確認した。試薬は特に明記しないものは富士フィルム和光純薬株式会社製試薬、東京化成工業株式会社製、ナカライテスク株式会社製、関東化学株式会社製、シグマアルドリッチ社製または combi-Blocks 社製を用いた。

第一章第二節の実験

13,16,19,22-Tetraoxa-1-tricosanol (18)

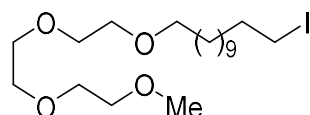


18

トリエチレングリコールモノメチルエーテル (1.24 g, 7.57 mmol) の脱水 DMF (5.0 mL) 溶液に、氷冷下で水素化ナトリウム (60% in oil, 182 mg, 4.54 mmol) を加え、室温で 50 分間攪拌した。同温で 12-ブロモ-1-ドデカノール (0.669 g, 2.52 mmol) の脱水 DMF (5.0 mL) を加え、同温で 24 時間攪拌した。室温で水を加え、酢酸エチルを用いて抽出した。飽和食塩水を用いて 3 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させた。減圧下で溶媒を留去し、残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 5:1 to 1:1) により精製し、**18** (0.542 g, 62%) を得た。

無色透明油状物: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.26–1.31 (m, 16H), 1.55–1.59 (m, 4H), 3.39 (s, 3H), 3.45 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 3.54–3.60 (m, 4H), 3.63–3.68 (m, 10H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 25.6, 25.9, 29.31, 29.32, 29.4 (3C), 29.5 (2C), 32.6, 58.8, 62.7, 69.9, 70.3, 70.4, 70.5 (2C), 71.4, 71.8; IR (NaCl) cm^{-1} : 3466; MS (EI) m/z (%): 348 (0.2) $[\text{M}]^+$, 103 (34.6), 85 (62.1), 83 (91.8), 59 (100.0), 58 (59.2), 55 (53.4); HRMS (EI) m/z : Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{40}\text{O}_5$: 348.2876; Found: 348.2874 $[\text{M}]^+$.

13,16,19,22-Tetraoxa-1-iodotricosane (19)

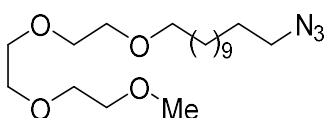


19

トリフェニルホスフィン (439 mg, 1.67 mmol) およびイミダゾール (310 mg, 4.56 mmol) の脱水 CH_2Cl_2 (6.0 mL) 溶液に、氷冷下でヨウ素 (424 mg, 1.67 mmol) を加え、室温で遮光下 30 分間攪拌した。反応液に **18** (530 mg, 1.52 mmol) の脱水 CH_2Cl_2 (7.0 mL) を同温に加え、遮光下同温で 22 時間攪拌した。室温で飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルを用いて抽出した。飽和食塩水を用いて 2 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させた。減圧下で溶媒を留去し、残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 5:1 to 1:1) により精製し、**19** (596 mg, 86%) を得た。

黄色透明油状物: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.26–1.42 (m, 16H), 1.58 (qn, 2H, $J = 7.0$ Hz), 1.82 (qn, 2H, $J = 7.2$ Hz), 3.19 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 3.39 (s, 3H), 3.45 (t, 2H, $J = 6.9$ Hz), 3.54–3.60 (m, 4H), 3.63–3.68 (m, 8H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 7.4, 26.1, 28.6, 29.47, 29.53 (2C), 29.6 (2C), 29.7, 30.6, 33.6, 59.1, 70.1, 70.6, 70.65, 70.68, 70.8, 71.6, 71.9; IR (NaCl) cm^{-1} : No characteristic absorptions were observed.; MS (CI) m/z (%): 459 (49.0) $[\text{M} + \text{H}]^+$, 292 (100.0), 103 (54.2); HRMS (CI) m/z : Calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{40}\text{IO}_4$: 459.1971; Found: 459.1966 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

13,16,19,22-Tetraoxa-1-azidotricosane (13)

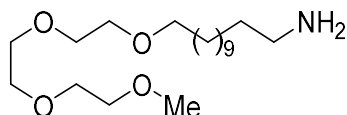


13

19 (228 mg, 0.470 mmol) の脱水 DMSO (4.7 mL) 溶液に、室温でアジ化ナトリウム (61.2 mg, 0.941 mmol) を加え、同温で 2 時間攪拌した。水を加え、Et₂O を用いて抽出した。室温で水を加え、Et₂O を用いて抽出した。水を用いて 2 回洗浄し、飽和食塩水を用いて 2 回洗浄した。無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させ、減圧下で溶媒を留去た。残渣をフラッシュカラムクロマトグラフィー (*n*-酢酸エチル : 酢酸エチル = 1:2) により精製し、**13** (176 mg, quant.) を得た。

無色透明油状物: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.26–1.38 (m, 16H), 1.54–1.63 (m, 4H), 3.26 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 3.38 (s, 3H), 3.45 (t, 2H *J* = 6.9 Hz), 3.54–3.60 (m, 4H), 3.63–3.68 (m, 8H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 26.1, 26.8, 28.9, 29.2, 29.5 (2C), 29.58, 29.61, 29.64, 29.7, 51.5, 59.1, 70.1, 70.57, 70.64, 70.7 (2C), 71.6, 72.0; IR (NaCl) cm⁻¹: 2098; MS (CI) *m/z* (%): 374 (17.3) [M + H]⁺, 346 (53.8), 270 (27.8), 226 (35.5), 198 (94.5), 182 (100.0), 103 (36.9); HRMS (CI) *m/z*: Calcd for C₁₉H₄₀N₃O₄: 374.3019; Found: 374.3024 [M + H]⁺.

13,16,19,22-Tetraoxa-1-tricosylamine (20)

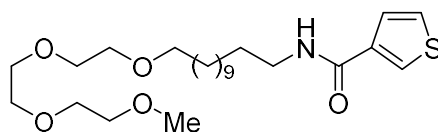


20

13 (464 mg, 1.24 mmol) の脱水 Et₂O (6.2 mL) 溶液に、氷冷下トリフェニルホスフィン (326 mg, 1.24 mmol) を加え、室温で 5 分間攪拌した。同温で水 (6.2 mL) を加え、同温で 22 時間攪拌した。室温で 6N 塩酸を加えて、pH を 1 に調製した後、Et₂O を用いて洗浄した。水層を 6N 水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH を 11 に調製した後、Et₂O を用いて抽出した。減圧下で溶媒を留去し、**20** (427 mg, quant.) を得た。

白色ワックス状固体: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.26–1.33 (m, 16H), 1.40–1.47 (m, 2H), 1.52–1.61 (m, 2H), 2.68 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz), 3.39 (s, 3H), 3.45 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz), 3.54–3.59 (m, 4H), 3.63–3.67 (m, 8H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 26.1, 26.9, 29.50, 29.52, 29.61 (3C), 29.64 (2C), 33.9, 42.3, 59.0, 70.0, 70.5, 70.58, 70.62 (2C), 71.5, 71.9; IR (CHCl₃) cm⁻¹: 3378; MS (CI) *m/z* (%): 348 (92.3) [M + H]⁺, 316 (22.6), 272 (34.1), 244 (21.5), 228 (60.7), 200 (100.0), 184 (63.2); HRMS (CI) *m/z*: Calcd for C₁₉H₄₂NO₄: 348.3114; Found: 348.3107 [M + H]⁺.

N-(13,16,19,22-Tetraoxatricosan-1-yl)-thiophene-3-carboxamide (10a)

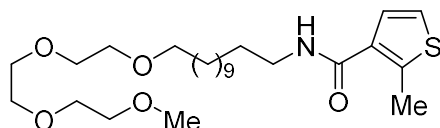


10a

20 (212 mg, 0.610 mmol) の脱水 THF (3.1 mL) 溶液に、氷冷下でチオフェン-3-カルボン酸 (156 mg, 1.22 mmol)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩 (281 mg, 1.46 mmol) および *N,N*-ジメチル-4-アミノピリジン (149 mg, 1.22 mmol) を加えた。室温で 22 時間攪拌した。室温で、水を加えて、酢酸エチルを用いて抽出した。飽和食塩水を用いて 2 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムを用いて乾燥後、減圧下で溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン: 酢酸エチル = 1:2) で精製し、**10a** (247 mg, 89%) を得た。

白色ワックス状固体: M.p. 39.3–42.0 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.26–1.33 (m, 16H), 1.54–1.66 (m, 4H), 3.38 (s, 3H), 3.39–3.46 (m, 2H), 3.54–3.59 (m, 5H), 3.63–3.67 (m, 9H), 5.97 (s, 1H), 7.33 (dd, 1H, *J* = 5.0, 3.2 Hz), 7.36 (dd, 1H, *J* = 5.0, 1.2 Hz), 7.84 (dd, 1H, *J* = 3.2, 1.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 26.0, 26.9, 29.2, 29.36, 29.44 (4C), 29.5, 29.6, 39.8, 58.9, 69.9, 70.4, 70.47, 70.49 (2C), 71.4, 71.8, 126.0 (2C), 127.8, 137.7, 163.0; IR (NaCl) cm⁻¹: 1651; MS (EI) *m/z* (%): 457 (12.6) [M]⁺, 310 (61.3), 294 (45.8), 111 (100.0); HRMS(EI) *m/z*: Calcd for C₂₄H₄₃NO₅S: 457.2862; Found: 457.2856 [M]⁺.

***N*-(13,16,19,22-Tetraoxapentacosan-1-yl)-2-methylthiophene-3-carboxamide (10b)**

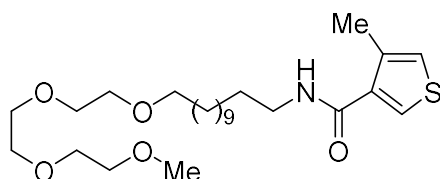


10b

チオフェン-3-カルボン酸の代わりに 2-メチルチオフェン-3-カルボン酸を用いて **10a** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン: 酢酸エチル = 1:2) で精製し、**20** (200 mg, 0.575 mmol) と 2-メチルチオフェン-3-カルボン酸 (164 mg, 1.15 mmol) から **10b** (262 mg, 97%) を得た。

淡黄色透明油状物: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.26–1.33 (m, 16H), 1.58–1.59 (m, 4H), 2.70 (s, 3H), 3.38 (s, 3H), 3.41–3.47 (m, 4H), 3.53–3.68 (m, 12H), 5.76 (br, 1H), 7.03 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz), 7.08 (d, 1H, *J* = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 14.5, 25.8, 26.8, 29.1, 29.2, 29.27, 29.31 (4C), 29.4, 39.4, 58.7, 69.7, 70.17, 70.24, 70.3 (2C), 71.2, 71.6, 121.3, 126.3, 132.0, 143.7, 164.4; IR (ATR) cm⁻¹: 3334, 1632; MS (EI) *m/z* (%): 471 (18.3) [M]⁺, 324 (32.2), 125 (100.0); HRMS(EI) *m/z*: Calcd for C₂₅H₄₅NO₅S: 471.3018; Found: 471.3021 [M]⁺.

***N*-(13,16,19,22-Tetraoxapentacosan-1-yl)-4-methylthiophene-3-carboxamide (10c)**

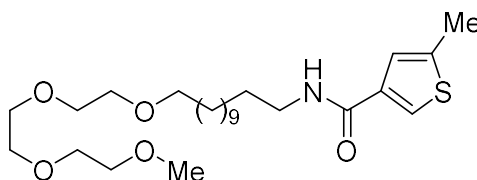


10c

チオフェン-3-カルボン酸の代わりに4-メチルチオフェン-3-カルボン酸を用いて **10a** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル = 1:2) で精製し、**20** (105 mg, 0.301 mmol) と 4-メチルチオフェン-3-カルボン酸 (85.6mg, 0.602 mmol) から **10c** (138 mg, 97%) を得た。

淡黄色透明油状物: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.26–1.33 (m, 16H), 1.58 (br s, 4H), 2.42 (s, 3H), 3.38 (s, 3H), 3.37–3.47 (m, 4H), 3.53–3.67 (m, 12H), 5.84 (br, 1H), 6.93–6.95 (m, 1H), 7.58 (d, 1H, $J = 4.4$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 15.4, 25.9, 26.8, 29.2, 29.3, 29.38, 29.43 (4C), 29.5, 39.6, 58.8, 69.8, 70.3, 70.38, 70.41 (2C), 71.3, 71.7, 122.5, 127.0, 137.1, 137.3, 164.8; IR (ATR) cm^{-1} : 3335, 1635; MS (EI) m/z : 471 (22.1) $[\text{M}]^+$, 324 (43.1), 308 (30.2), 125 (100); HRMS (EI) m/z : Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{45}\text{NO}_5\text{S}$: 471.3018; Found: 471.3014 $[\text{M}]^+$.

***N*-(13,16,19,22-Tetraoxapentacosan-1-yl)-5-methylthiophene-3-carboxamide (10d)**

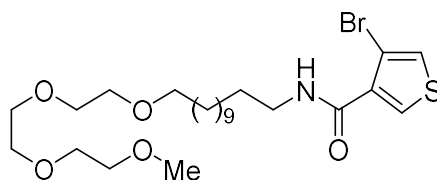


10d

チオフェン-3-カルボン酸の代わりに5-メチルチオフェン-3-カルボン酸を用いて **10a** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル = 1:2) で精製し、**20** (100 mg, 0.288 mmol) と 5-メチルチオフェン-3-カルボン酸 (82.0 mg, 0.577 mmol) から **10d** (126 mg, 93%) を得た。

白色ワックス状固体: M.p. 43.6–45.0 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.26–1.33 (m, 16H), 1.53–1.60 (m, 4H), 2.48 (d, 3H, $J = 4.4$ Hz), 3.38 (s, 3H), 3.35–3.47 (m, 4H), 3.53–3.69 (m, 12H), 5.91 (br, 1H), 7.01–7.02 (m, 1H), 7.58 (d, 1H, $J = 1.5$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 15.1, 26.0, 26.9, 29.2, 29.4, 29.45 (4C), 29.50, 29.6, 39.7, 58.9, 69.9, 70.4, 70.45, 70.49 (2C), 71.4, 71.8, 124.0, 125.7, 137.3, 140.6, 163.1; IR (ATR) cm^{-1} : 3330, 1625; MS (EI) m/z : 471 (29.2) $[\text{M}]^+$, 324 (45.3), 308 (29.5), 125 (100); HRMS (EI) m/z : Calcd for $\text{C}_{25}\text{H}_{45}\text{NO}_5\text{S}$: 471.3018; Found: 471.3023 $[\text{M}]^+$.

***N*-(13,16,19,22-Tetraoxapentacosan-1-yl)-4-bromothiophene-3-carboxamide (10e)**



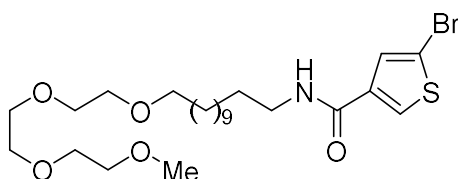
10e

チオフェン-3-カルボン酸の代わりに4-ブロモチオフェン-3-カルボン酸を用いて **10a** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル =

1:2) で精製し、**20** (200 mg, 0.575 mmol) と 4-ブロモチオフェン-3-カルボン酸 (238 mg, 1.15 mmol) から **10e** (289 mg, 94%) を得た。

無色透明油状物: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.27–1.39 (m, 16H), 1.53–1.67 (m, 4H), 3.38 (s, 3H), 3.41–3.48 (m, 4H), 3.53–3.69 (m, 12H), 6.67 (br, 1H), 7.33 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz), 8.05 (d, 1H, $J = 4.8$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 25.8, 26.7, 29.0, 29.1, 29.2, 29.26, 29.29 (2C), 29.31, 29.4, 39.6, 58.7, 69.8, 70.2, 70.29, 70.32 (2C), 71.2, 71.6, 107.2, 125.0, 131.0, 135.7, 161.6; IR (ATR) cm^{-1} : 3307, 1644; MS (EI) m/z : 537 (4.7) $[\text{M} + 2]^+$, 535 (5.5) $[\text{M}]^+$, 388 (19.2), 83 (100); HRMS (EI) m/z : Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{BrNO}_5\text{S}$: 535.1967; Found: 535.1965 $[\text{M}]^+$.

N-(13,16,19,22-Tetraoxapentacosan-1-yl)-5-bromothiophene-3-carboxamide (10f)



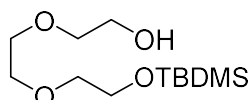
10f

チオフェン-3-カルボン酸の代わりに 5-ブロモチオフェン-3-カルボン酸を用いて **10a** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (n -ヘキサン: 酢酸エチル = 1:2) で精製し、**20** (155 mg, 0.446 mmol) と 5-ブロモチオフェン-3-カルボン酸 (185 mg, 0.892 mmol) から **10f** (209 mg, 87%) を得た。

白色ワックス状固体: M.p. 35.6–37.0 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.26–1.32 (m, 16H), 1.53–1.60 (m, 4H), 3.38 (s, 3H), 3.36–3.47 (m, 4H), 3.53–3.69 (m, 12H), 5.93 (br, 1H), 7.32 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz), 7.74 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 25.9, 26.9, 29.2, 29.3, 29.4 (6C), 39.8, 58.8, 69.9, 70.3 (2C), 70.4 (2C), 71.3, 71.7, 112.8, 128.8, 129.2, 137.8, 161.8; IR (ATR) cm^{-1} : 3302, 1611; MS (EI) m/z : 537 (13.8) $[\text{M} + 2]^+$, 535 (12.6) $[\text{M}]^+$, 456 (35.6), 388 (64.1), 59 (100); HRMS (EI) m/z : Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{42}\text{BrNO}_5\text{S}$: 535.1967; Found: 535.1962 $[\text{M}]^+$.

第一章第三節第一項の実験

8-(*t*-Butyldimethylsilyloxy)-3,6-dioxa-1-octanol (12)

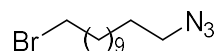


12

水素化ナトリウム (60% in oil, 1.06 g, 44.0 mmol) の脱水 THF (80.0 mL) 溶液に、氷冷下でトリエチレングリコール (5.33 mL, 40.0 mmol) を加え、同温で 10 分間攪拌した。同温で *t*-ブチルジメチルシリルクロリド (7.23 g, 48.0 mmol) を加え、室温で 3 時間攪拌した。室温で水を加え、酢酸エチルを用いて抽出した。飽和食塩水を用いて洗浄し、無水硫酸マグネシウムを用

いて乾燥させた。減圧下で溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(*n*-ヘキサン:酢酸エチル=2:1 to 1:1)により精製し、**12** (7.06 g, 67%)を得た。**12**の¹H NMR スペクトルは文献の値と一致した。⁶³

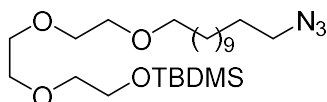
1-Azido-12-bromododecane (23)



23

12-ブロモ-1-ドデカノール **22** (2.00 g, 7.54 mmol) の脱水 THF (75 mL) 溶液に、氷冷下でトリフェニルホスフィン (3.96 g, 15.1 mmol) を加え 15 分間攪拌した。同温で、アゾジカルボン酸ジイソプロピル (4.87 mL, 22.6 mmol) およびジフェニルリン酸アジド (3.25 mL, 15.1 mmol) を加えた。50 °Cで 24 時間攪拌した後、減圧下溶媒を除去した。残渣をクロロホルムに溶解した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル = 20:1) で精製し、**23** (1.74 g, 80%) を得た。**23**の¹H NMR スペクトルは文献の値と一致した。⁷⁹

1-Azido-21-(*t*-butyldimethylsilyloxy)-13,16,19-trioxahenicosane (14)

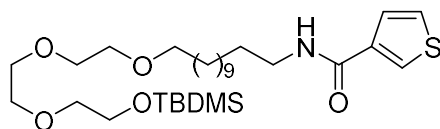


14

12 (200 mg, 0.756 mmol) の脱水 DMF (0.76 mL) 溶液に、氷冷下で水素化ナトリウム (60% in oil, 36.3 mg, 0.908 mmol) を加えた。同温で 10 分間攪拌した後、15-クラウン-5 エーテル (0.186 mL, 0.908 mmol) と **23** (439 mg, 1.51 mmol) を同温で加えた。同温で 16 時間攪拌した後、氷冷下で水を加え、酢酸エチルを用いて抽出した。水および飽和食塩水を用いて洗浄し、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させた。減圧下で溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン to *n*-ヘキサン:酢酸エチル = 20:1) で精製し、**14** (244 mg, 68%) を得た。

無色透明油状物: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.07 (s, 6H), 0.89 (s, 9H), 1.27–1.38 (m, 16H), 1.54–1.65 (m, 4H), 3.26 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 3.45 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz), 3.54–3.60 (m, 4H), 3.63–3.66 (m, 6H), 3.77 (t, 2H, *J* = 5.5 Hz); ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ: -5.24, -5.21, 18.4, 26.0 (3C), 26.2, 26.8, 28.9, 29.2, 29.56, 29.57, 29.60, 29.64, 29.66, 29.73, 51.6, 62.8, 70.2, 70.8 (2C), 70.9, 71.7, 72.8; IR (NaCl) cm⁻¹: 2095; MS (FAB) *m/z*: 474 [M + H]⁺; HRMS (FAB) *m/z*: Calcd for C₂₄H₅₂N₃O₄Si: 474.3727; Found: 474.3723 [M + H]⁺.

***N*-{21-(*tert*-Butyldimethylsilyloxy)-13,16,19-trioxahenicosan-1-yl}-thiophene-3-carboxamide (25)**



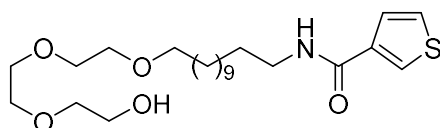
25

14 (1.17 g, 2.47 mmol) の脱水 Et₂O (12.4 mL) 溶液に、氷冷下でトリフェニルホスフィン (972 mg, 3.71 mmol) を加えた。室温で 5 分間攪拌した後、同温で水 (12.4 mL) を加えた。同温で 69 時間攪拌した後、同温で 6M 水酸化ナトリウム水溶液を加え、Et₂O を用いて抽出した。無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させ、減圧下、溶媒を留去した。

残渣の脱水 THF (25 mL) 溶液に、氷冷下でチオフェン-3-カルボン酸 (0.633 g, 4.94 mmol)、1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド (1.14 g, 5.93 mmol)、および *N,N*-ジメチル-4-アミノピリジン (0.664 g, 5.44 mmol) を加えた。室温で 28 時間攪拌した後、同温で水を加え、酢酸エチルを用いて抽出した。飽和食塩水を用いて洗浄し、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させた。減圧下で溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 5:1 to 3:1) で精製し、**25** (1.22 g, 89%) を得た。

白色ワックス状固体: M.p. 37.2–38.8 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.06 (s, 6H), 0.89 (s, 9H), 1.26–1.40 (m, 16H), 1.54–1.63 (m, 4H), 3.41 (td, 2H, *J* = 7.2, 6.1 Hz), 3.45 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz), 3.54–3.60 (m, 5H), 3.63–3.68 (m, 5H), 3.77 (t, 2H, *J* = 5.5 Hz), 6.00 (br, 1H), 7.33 (dd, 1H, *J* = 5.1, 3.0 Hz), 7.37 (dd, 1H, *J* = 5.1, 1.4 Hz), 7.84 (dd, 1H, *J* = 3.0, 1.4 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: –5.4 (2C), 18.2, 25.8 (3C), 26.0, 26.9, 29.2, 29.3, 29.4 (4C), 29.5, 29.6, 39.7, 62.6, 69.9, 70.5 (2C), 70.6, 71.4, 72.5, 126.1 (2C), 127.8, 137.7, 163.0; IR (ATR) cm⁻¹: 3326, 1625; MS (EI) *m/z* (%): 557 (5.9) [M]⁺, 500 (100), 294 (49.9), 111 (90.0); HRMS (EI) *m/z*: Calcd for C₂₉H₅₅NO₅SSi: 557.3570; Found: 557.3584 [M]⁺.

***N*-(21-Hydroxy-13,16,19-trioxahenicosan-1-yl)-thiophene-3-carboxamide (10g)**



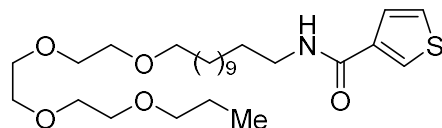
10g

25 (0.500g, 0.896 mmol) の脱水 THF (8.8 mL) 溶液に、氷冷下でフッ化テトラ-*n*-ブチルアンモニウム (ca. 1M in THF, 8.70 mL, 8.70 mmol) を加えた。室温で 1 時間攪拌した後、同温で飽和塩化アンモニウム水溶液を加え、酢酸エチルを用いて抽出した。飽和食塩水を用いて洗浄し、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥した。減圧下で溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 1:3) で精製し、**10g** (0.355 g, 89%) を得た。

淡黄色ワックス状固体: M.p. 58.4–60.4 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 1.26–1.39 (m, 16H), 1.56–1.61 (m, 4H), 2.57 (t, 1H, *J* = 6.2 Hz), 3.42 (td, 2H, *J* = 7.0, 6.1 Hz), 3.45 (t, 2H, *J* = 6.8 Hz), 3.58–3.75 (m, 12H), 5.94 (br, 1H), 7.34 (dd, 1H, *J* = 5.1, 3.0 Hz), 7.36 (dd, 1H, *J* = 5.1, 1.4 Hz), 7.84 (dd, 1H, *J* = 3.0, 1.4 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 25.9 (2C), 26.9 (2C), 29.2, 29.3, 29.4 (3C), 29.6, 39.8, 61.6, 69.9, 70.2, 70.5, 71.5, 72.4 (2C), 126.0, 126.2, 127.8, 137.7, 163.1; IR (ATR) cm⁻¹: 3327,

1624; MS (EI) m/z (%): 443 (17.6) $[M]^+$, 332 (7.9), 310 (65.2), 294 (47.7), 111 (100.0); HRMS (EI) m/z : Calcd for $C_{23}H_{41}NO_5S$: 443.2705; Found: 443.2703 $[M]^+$.

N-(13,16,19,22-Tetraoxapentacosan-1-yl)-thiophene-3-carboxamide (10h)

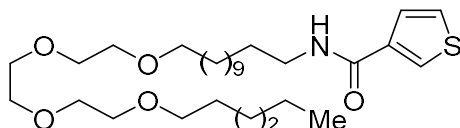


10h

10g (50.0 mg, 0.113 mmol) の脱水 DMF (3.0 mL) 溶液に、氷冷下で水素化ナトリウム (60% in oil, 22.6 mg, 0.565 mmol) を加えた。同温で 10 分間攪拌した後、同温で 1-ヨードプロパン (32.8 μ L, 0.338 mmol) を加えた。室温で 19 時間攪拌した後、同温で水を加え、酢酸エチルを用いて抽出した。飽和食塩水を用いて洗浄し、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させた。減圧下で溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n -ヘキサン : 酢酸エチル = 5:1 to 酢酸エチル) で精製し、**10h** (42.0 mg, 77%) を得た。

淡黄色ワックス状固体: M.p. 40.7–42.5 °C; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.91 (t, J = 7.5 Hz, 3H), 1.26–1.38 (m, 16H), 1.52–1.63 (m, 6H), 3.39–3.46 (m, 2H), 3.42 (t, 4H, J = 6.9 Hz), 3.57–3.60 (m, 4H), 3.63–3.67 (m, 8H), 5.93 (br, 1H), 7.34 (dd, 1H, J = 5.0, 2.8 Hz), 7.37 (dd, 1H, J = 5.0, 1.5 Hz), 7.84 (dd, 1H, J = 2.8, 1.5 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 10.4, 22.7, 25.9, 26.9, 29.2, 29.3, 29.40, 29.42 (2C), 29.5 (2C), 29.6, 39.7, 69.88, 69.89 (2C), 70.46, 70.47, 71.4, 73.0 (2C), 126.1 (2C), 127.8, 137.7, 163.0; IR (ATR) cm^{-1} : 3327, 1625; MS (EI) m/z (%): 485 (16.6) $[M]^+$, 310 (61.4), 294 (50.6), 111 (100.0); HRMS (EI) m/z : Calcd for $C_{26}H_{47}NO_5S$: 485.3175; Found: 485.3171 $[M]^+$.

N-(13,16,19,22-Tetraoxaoctacosan-1-yl)-thiophene-3-carboxamide (10i)

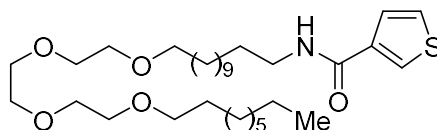


10i

1-ヨードプロパンの代わりに 1-ヨードヘキサンを用いて **10h** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (n -ヘキサン : 酢酸エチル = 5:1 to 2:1) で精製し、**10g** (200 mg, 0.451 mmol) と 1-ヨードヘキサン (0.200 mL, 1.36 mmol) から **10i** (200 mg, 84%) を得た。

淡黄色ワックス状固体: M.p. 47.4–48.3 °C; 1H NMR (300 MHz, $CDCl_3$) δ : 0.88 (t, 3H, J = 6.9 Hz), 1.26–1.33 (m, 22H), 1.54–1.61 (m, 6H), 3.39–3.46 (m, 2H), 3.45 (t, 4H, J = 6.8 Hz), 3.57–3.66 (m, 12H), 5.93 (br, 1H), 7.33 (dd, 1H, J = 5.1, 2.9 Hz), 7.37 (dd, 1H, J = 5.1, 1.4 Hz), 7.84 (dd, 1H, J = 2.9, 1.4 Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ : 13.9, 22.5 (2C), 25.6, 25.9, 26.9, 29.2 (2C), 29.3 (2C), 29.4 (2C), 29.5, 29.6, 31.5, 39.7, 69.9 (2C), 70.4 (2C), 70.5 (2C), 71.4 (2C), 126.0, 126.1, 127.8, 137.7, 163.0; IR (ATR) cm^{-1} : 3333, 1624; MS (EI) m/z (%): 527 (18.4) $[M]^+$, 310 (66.6), 294 (51.2), 111 (100.0); HRMS (EI) m/z : Calcd for $C_{29}H_{53}NO_5S$: 527.3644; Found: 527.3642 $[M]^+$.

N-(13,16,19,22-Tetraoxidehentriacontan-1-yl)-thiophene-3-carboxamide (10j)

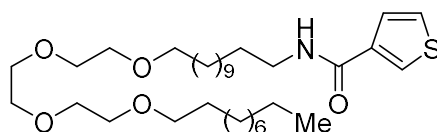


10j

1-ヨードプロパンの代わりに 1-ヨードノナンを用いて **10h** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 5:1 to 2:1) で精製し、**10g** (50.0 mg, 0.113 mmol) と 1-ヨードノナン (67 μ L, 0.338 mmol) から **10j** (44.4 mg, 69%) を得た。

淡黄色ワックス状固体: M.p. 55.8–56.9 °C; $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.88 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz), 1.26–1.38 (m, 28H), 1.54–1.63 (m, 6H), 3.40 (q, 2H, $J = 6.9$ Hz), 3.45 (t, 4H, $J = 6.9$ Hz), 3.57–3.60 (m, 4H), 3.63–3.66 (m, 8H), 5.93 (br, 1H), 7.34 (dd, 1H, $J = 5.0, 2.8$ Hz), 7.36 (dd, 1H, $J = 5.0, 1.1$ Hz), 7.84 (dd, 1H, $J = 2.8, 1.1$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 14.0, 22.5, 25.9 (2C), 26.9, 29.1 (2C), 29.2 (2C), 29.3 (2C), 29.4, 29.5 (2C), 29.6 (2C), 31.7 (2C), 39.7, 69.9 (2C), 70.4 (4C), 71.4 (2C), 126.0, 126.1, 127.8, 137.7, 163.0; IR (ATR) cm^{-1} : 3332, 1624; MS (EI) m/z (%): 569 (28.0) $[\text{M}]^+$, 310 (89.0), 294 (74.1), 111 (100.0); HRMS (EI) m/z : Calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{59}\text{NO}_5\text{S}$: 569.4114; Found: 569.4109 $[\text{M}]^+$.

N-(13,16,19,22-Tetraoxidedotriacontan-1-yl)-thiophene-3-carboxamide (10k)



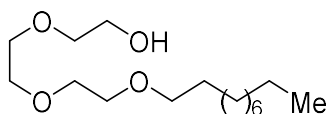
10k

Method A; 1-ヨードプロパンの代わりに 1-ヨードデカンを用いて **10h** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 5:1 to 2:1) で精製し、**10g** (50.0 mg, 0.113 mmol) と 1-ヨードデカン (76 μ L, 0.334 mmol) から **10k** (38.9 mg, 59%) を得た。

Method B; **14** の代わりに **27** を用いて **25** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 5:1 to 2:1) で精製し、**27** (265 mg, 0.531 mmol) から **10k** (264 mg, 85%) を得た。

淡黄色ワックス状固体: M.p. 60.0–62.0 °C; $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.88 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz), 1.26–1.33 (m, 30H), 1.53–1.62 (m, 6H), 3.38–3.45 (m, 2H), 3.44 (t, 4H, $J = 6.8$ Hz), 3.56–3.66 (m, 12H), 5.92 (br, 1H), 7.33 (dd, 1H, $J = 5.1, 2.9$ Hz), 7.36 (dd, 1H, $J = 5.1, 1.4$ Hz), 7.83 (dd, 1H, $J = 2.9, 1.4$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 14.0, 22.6 (2C), 26.0 (2C), 26.9 (2C), 29.2 (3C), 29.37 (2C), 29.44 (2C), 29.5, 29.6 (2C), 31.8 (2C), 39.7, 69.9 (2C), 70.47 (2C), 70.48 (2C), 71.4 (2C), 126.1 (2C), 127.8, 137.7, 163.0; IR (ATR) cm^{-1} : 3334, 1623; MS (EI) m/z (%): 583 (24.4) $[\text{M}]^+$, 310 (81.9), 294 (66.6), 111 (100.0); HRMS (EI) m/z : Calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{61}\text{NO}_5\text{S}$: 583.4270; Found: 583.4264 $[\text{M}]^+$.

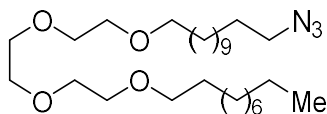
3,6,9-Trioxa-1-nonadecanol (26)



26

21 (1.78 mL, 13.4 mmol) の脱水 DMF (13 mL) 溶液に、氷冷下で水素化ナトリウム (60% in oil, 796 mg, 19.9 mmol) と 15-クラウン-5 エーテル (3.95 mL, 19.9 mmol) を加えた。同温度で 10 分間攪拌した後、1-ヨードデカン (4.24 mL, 19.9 mmol) を加え、室温で 21 時間攪拌した。同温で水を加え、酢酸エチルを用いて抽出した。飽和食塩水を用いて洗浄し、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させた。減圧下で溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 5 : 1 to 酢酸エチル) で精製し、**26** (1.78 g, 46 %) を得た。**26** の ¹H NMR スペクトルは文献の値と一致した。⁸⁰

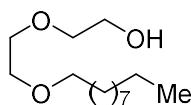
1-Azido-13,16,19,22-Tetraoxadotriacontane (27)



27

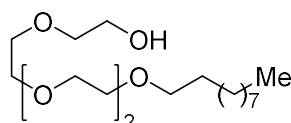
21 の代わりに **26** および 1-ヨードデカンの代わりに **23** を用いて **26** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 10:1) で精製し、**26** (1.79 g, 6.16 mmol) と **23** (2.68 g, 9.24 mmol) から **27** (3.03 g, 98%) を得た。

無色透明油状物: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 0.88 (t, 3H, *J* = 6.7 Hz), 1.22–1.38 (m, 30H), 1.53–1.64 (m, 6H), 3.26 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 3.45 (t, 4H, *J* = 6.8 Hz), 3.56–3.66 (m, 12H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 14.0, 22.6, 25.7, 26.0, 26.6, 28.8 (2C), 29.0 (3C), 29.3 (4C), 29.5 (2C), 29.6, 29.7, 31.8, 51.4, 70.0 (2C), 70.5 (4C), 71.4 (2C); IR (ATR) cm⁻¹: 2093; MS (ESI) *m/z*: 522 [M + Na]⁺; HRMS (ESI) *m/z*: Calcd for C₂₈H₅₇N₃O₄Na: 522.4247; Found: 522.4250 [M + Na]⁺.

3,6-Dioxahexadecan-1-ol (30a)⁸¹**30a**

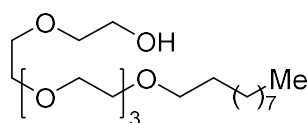
トリエチレングリコールの代わりにジエチレングリコールを用いて **26** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 2:1) で精製し、ジエチレングリコール (0.893 mL, 9.42 mmol) から **30a** (873 mg, 38%) を得た。

淡黄色透明油状物: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 0.88 (t, 3H, *J* = 6.7 Hz), 1.24–1.35 (m, 14H), 1.59 (qn, 2H, *J* = 6.8 Hz), 2.51 (t, 1H, *J* = 6.2 Hz), 3.47 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz), 3.57–3.76 (m, 8H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 14.1, 22.7, 26.1, 29.3, 29.5, 29.56, 29.57, 29.58, 31.9, 61.9, 70.2, 70.5, 71.6, 72.5; IR (ATR) cm⁻¹: 3424; MS (FAB) *m/z*: 247 [M+H]⁺; HRMS (FAB) *m/z*: Calcd for C₁₄H₃₁O₃: 247.2273; Found: 247.2272 [M+H]⁺.

3,6,9,12-Tetraoxatricoan-1-ol (30b)⁸²**30b**

トリエチレングリコールの代わりにテトラエチレングリコールを用いて **26** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 1:1 to 酢酸エチル) で精製し、テトラエチレングリコール (0.422 mL, 2.57 mmol) から **30b** (388 mg, 45%) を得た。

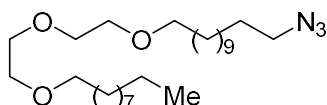
無色透明油状物: ¹H NMR (500MHz, CDCl₃) δ: 0.88 (t, 3H, *J* = 6.7 Hz), 1.26–1.34 (m, 14H), 1.58 (quin, 2H, *J* = 6.9 Hz), 2.55 (br s, 1H), 3.45 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz), 3.56–3.75 (m, 16H); ¹³C NMR (75 Hz, CDCl₃) δ: 14.1, 22.7, 26.1, 29.3, 29.5, 29.56, 29.60, 29.61, 31.9, 61.8, 70.1, 70.4, 70.58, 70.61, 70.64, 71.6, 72.5, 76.6; IR (ATR) cm⁻¹: 3434; MS (FAB) *m/z*: 335 [M+H]⁺; HRMS (FAB) *m/z*: Calcd for C₁₈H₃₉O₅: 335.2797; Found: 335.2799 [M+H]⁺.

3,6,9,12,15-Pentaoxa-1-pentacosanol (30c)⁸³**30c**

トリエチレングリコールの代わりにペンタエチレングリコールを用いて **26** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 1:1) で精製し、ペンタエチレングリコール (0.885 mL, 4.20 mmol) から **30c** (872 mg, 55%) を得た。

無色透明油状物: $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.88 (t, 3H, $J = 6.9$ Hz), 1.26–1.33 (m, 14H), 1.57 (qn, 2H, $J = 6.9$ Hz), 2.95 (br s, 1H), 3.45 (t, 2H, $J = 6.9$ Hz), 3.56–3.75 (m, 20H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 14.1, 22.7, 26.1, 29.4, 29.5, 29.6 (2C), 29.7, 31.9, 61.7, 70.0, 70.3, 70.5, 70.56 (2C), 70.59, 70.62 (2C), 71.6, 72.7; IR (ATR) cm^{-1} : 3456; MS (FAB) m/z : 379[M+H] $^+$; HRMS (FAB) m/z : Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{43}\text{O}_6$: 379.3060; Found: 379.3060 [M+H] $^+$.

1-Azido-13,16,19-trioxanonacosane (31a)

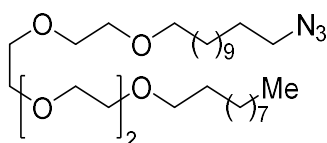


31a

26 の代わりに **30a** を用いて **27** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 10:1) で精製し、**30a** (873 mg, 3.54 mmol) から **31a** (1.38 g, 71%) を得た。

淡黄色透明油状物: $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.88 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz), 1.26–1.37 (m, 30H), 1.55–1.62 (m, 6H), 3.26 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 3.45 (t, 4H, $J = 6.8$ Hz), 3.58–3.60 (m, 4H), 3.64–3.66 (m, 4H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 Hz, CDCl_3) δ : 14.1, 22.7, 26.1 (2C), 26.7, 28.8, 29.1, 29.3, 29.45, 29.48, 29.51, 29.53, 29.54, 29.56 (2C), 29.60, 29.64 (2C), 31.9, 51.5, 70.1 (2C), 70.6 (2C), 71.5 (2C); IR (ATR) cm^{-1} : 2094; MS (FAB): m/z (%): 456 [M+H] $^+$; HRMS (FAB) m/z : Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{54}\text{N}_3\text{O}_3$: 456.4165; Found: 456.4161 [M+H] $^+$.

1-Azido-13,16,19,22,25-pentaoxapentatriacontane (31b)

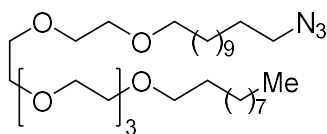


31b

26 の代わりに **30b** を用いて **27** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 10:1) で精製し、**30b** (681 mg, 2.04 mmol) から **31b** (813 mg, 73%) を得た。

無色透明油状物: $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.86 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz), 1.24–1.37 (m, 30H), 1.51–1.63 (m, 6H), 3.24 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 3.43 (t, 4H, $J = 6.8$ Hz), 3.54–3.58 (m, 4H), 3.61–3.64 (m, 12H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 14.1, 22.6, 26.0, 26.7, 28.8, 29.1, 29.3, 29.41, 29.43, 29.45, 29.46, 29.49, 29.50, 29.52, 29.57, 29.59 (2C), 29.62, 31.9, 51.4, 70.0 (2C), 70.55 (4C), 70.58 (2C), 71.5 (2C); IR (ATR) cm^{-1} : 2092; MS (FAB) m/z : 544 [M+H] $^+$; HRMS (FAB) m/z : Calcd for $\text{C}_{30}\text{H}_{62}\text{N}_3\text{O}_5$: 544.4689; Found: 544.4700 [M+H] $^+$.

1-Azido-13,16,19,22,25,28-hexaoxaoctatriacontane (31c)

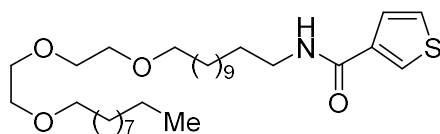


31c

26 の代わりに **30c** を用いて **27** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 10:1) で精製し、**30c** (723 mg, 1.91 mmol) から **31c** (705 mg, 63%) を得た。

白色ワックス状固体: M.p. 40 °C以下; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 0.85 (t, 3H, *J* = 6.8 Hz), 1.24–1.36 (m, 30H), 1.50–1.62 (m, 6H), 3.23 (t, 2H, *J* = 7.0 Hz), 3.42 (t, 4H, *J* = 6.8 Hz), 3.53–3.57 (m, 4H), 3.60–3.63 (m, 16H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 14.0, 22.6, 26.0 (2C), 26.3, 28.8, 29.1, 29.2, 29.39, 29.40 (2C), 29.43, 29.47, 29.49 (2C), 29.52, 29.6 (2C), 31.8, 51.4, 70.0 (2C), 70.51 (5C), 70.54 (3C), 71.5 (2C); IR (ATR) cm⁻¹: 2094; MS (FAB) *m/z*: 610 [M+Na]⁺; HRMS (FAB) *m/z*: Calcd for C₃₂H₆₅N₃NaO₆: 610.4771; Found: 610.4762 [M+Na]⁺.

N-(13,16,19-Trioxanonacosan-1-yl)-thiophene-3-carboxamide (16a)

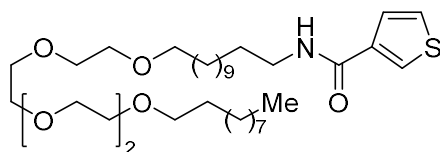


16a

14 の代わりに **31a** を用いて **25** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 2:1) で精製し、**31a** (200 mg, 0.434 mmol) から **16a** (201 mg, 86%) を得た。

無色針状結晶: M.p. 74.8–75.2 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 0.86 (t, 3H, *J* = 6.7 Hz), 1.24–1.36 (m, 30H), 1.51–1.62 (m, 6H), 3.35–3.45 (m, 6H), 3.55–3.65 (m, 8H), 6.18 (br s, 1H), 7.30 (dd, 1H, *J* = 5.0, 3.0 Hz), 7.37 (dd, 1H, *J* = 5.0, 1.3 Hz), 7.84 (dd, 1H, *J* = 3.0, 1.3 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 14.1, 22.6, 26.0 (2C), 26.9, 29.3 (2C), 29.41, 29.43, 29.47, 29.50 (3C), 29.51, 29.55, 29.57 (2C), 29.7, 31.8, 39.8, 70.0 (2C), 70.6 (2C), 71.5 (2C), 126.0, 126.3, 127.8, 137.8, 163.0; IR (ATR) cm⁻¹: 3330, 1623; MS (FAB) *m/z*: 540 [M+H]⁺; HRMS (FAB) *m/z*: Calcd for C₃₁H₅₈NO₄S: 540.4087; Found: 540.4083 [M+H]⁺.

N-(13,16,19,22,25-Pentaoxapentatriacontan-1-yl)-thiophene-3-carboxamide (16d)

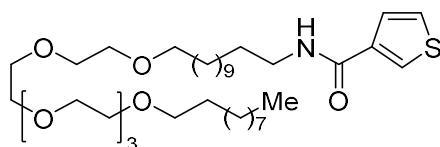


16d

14の代わりに**31b**を用いて**25**と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(クロロホルム)で精製し、**31b** (100 mg, 0.184 mmol) から**16d** (114 mg, 97%)を得た。

白色ワックス状固体: M.p. 60.2–61.1 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 0.88 (t, 3H, *J* = 6.7 Hz), 1.26–1.39 (m, 30H), 1.57 (qn, 6H, *J* = 6.7 Hz), 3.38–3.47 (m, 6H), 3.56–3.59 (m, 4H), 3.62–3.66 (m, 12H), 5.93 (br s, 1H) 7.34 (dd, 1H, *J* = 5.1, 3.0 Hz), 7.37 (dd, 1H, *J* = 5.1, 1.5 Hz), 7.84 (dd, 1H, *J* = 3.0, 1.5 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 14.1, 22.6, 26.0 (2C), 26.9, 29.3 (2C), 29.40, 29.43, 29.45, 29.48 (2C), 29.50, 29.55, 29.56, 29.57 (2C), 29.7, 31.8, 39.8, 70.0 (2C), 70.5 (4C), 70.6 (2C), 71.5 (2C), 126.0, 126.3, 127.8, 137.8, 163.0; IR (ATR) cm⁻¹: 3332, 1623; MS (FAB) *m/z*: 628 [M+H]⁺; HRMS (FAB) *m/z*: Calcd for C₃₅H₆₆NO₆S: 628.4611; Found: 628.4619 [M+H]⁺.

N-(13,16,19,22,25,28-Hexaoxaoctatriacontan-1-yl)-thiophene-3-carboxamide (16f)

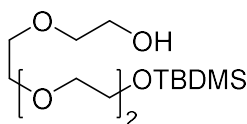


16f

14の代わりに**31c**を用いて**25**と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 10: 1 to 1:1)で精製し、**31c** (389 mg, 0.661 mmol) から**16f** (306 mg, 69%)を得た。

白色ワックス状固体: M.p. 57.4–57.8 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 0.88 (t, 3H, *J* = 6.7 Hz), 1.26–1.33 (m, 30H), 1.57 (qn, 6H, *J* = 7.0 Hz), 3.38–3.46 (m, 6H), 3.56–3.59 (m, 4H), 3.62–3.65 (m, 16H), 5.97 (br s, 1H), 7.35 (dd, 1H, *J* = 5.1, 2.9 Hz), 7.37 (dd, 1H, *J* = 5.1, 1.4 Hz), 7.84 (dd, 1H, *J* = 2.9, 1.4 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 14.1, 22.6, 26.01, 26.03, 26.9, 29.3 (2C), 29.40, 29.43, 29.45, 29.48 (2C), 29.51, 29.55, 29.56 (2C), 29.57, 29.7, 31.8, 39.8, 70.0 (2C), 70.5 (5C), 70.6 (3C), 71.48, 71.49, 126.0, 126.3, 127.8, 137.8, 163.0; IR (ATR) cm⁻¹: 3332, 1623; MS (FAB) *m/z*: 672 [M+H]⁺; HRMS (FAB) *m/z*: Calcd for C₃₇H₇₀NO₇S: 672.4873; Found: 672.4879 [M+H]⁺.

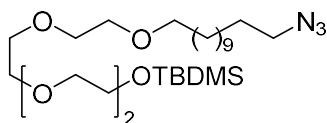
11-(*t*-Butyldimethylsilyloxy)-3,6,9-trioxaundecan-1-ol (33)



33

21の代わりにテトラエチレングリコールを用いて**12**と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 20:1 to 5:1)で精製し、テトラエチレングリコール (4.44 mL, 25.7 mmol) から**33** (3.16 g, 40%)を得た。**33**の¹H NMRスペクトルは文献の値と一致した。⁷³

1-Azido-24-(*t*-butyldimethylsilyloxy)-13,16,19,22-tetraoxatetracosane (34a)

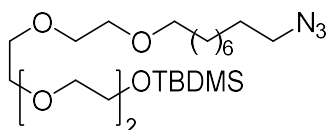


34a

12 の代わりに **33** を用いて **14** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 20:1 to 5:1) で精製し、**33** (200 mg, 0.648 mmol) から **34a** (255 mg, 76%) を得た。

無色透明油状物: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.07 (s, 6H), 0.89 (s, 9H), 1.24–1.40 (m, 16H), 1.54–1.66 (m, 4H), 3.26 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 3.45 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 3.54–3.59 (m, 4H), 3.63–3.68 (m, 10H), 3.77 (t, 2H, $J = 5.4$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : -5.3 (2C), 18.3, 25.9 (3C), 26.0, 26.7, 28.8, 29.1, 29.42, 29.43, 29.47, 29.51, 29.52, 29.6, 51.4, 62.7, 70.0, 70.55, 70.58, 70.65, 70.66, 71.49, 71.50, 72.6; IR (ATR) cm^{-1} : 2093; MS (ESI) m/z : 540 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRMS (ESI) m/z : Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{NaO}_5\text{Si}$: 540.3803; Found: 540.3794 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

1-Azido-21-(*t*-butyldimethylsilyloxy)-10,13,16,19-tetraoxahenicosane (34b)

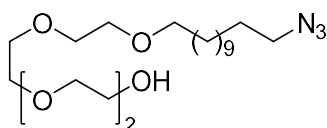


34b

12-ブロモ-1-ドデカノールの代わりに 1-アジド-9-ブロモノナン、**11** の代わりに **33** を用いて **18** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane : 酢酸エチル = 20:1 to 5:1) で精製し、**33** (200 mg, 0.648 mmol) と 1-アジド-9-ブロモノナン (481 mg, 1.94 mmol) から **34b** (171 mg, 56%) を得た。

無色透明油状物: $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.06 (s, 6H), 0.89 (s, 9H), 1.25–1.37 (m, 10H), 1.55–1.65 (m, 4H), 3.26 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 3.45 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 3.55–3.59 (m, 4H), 3.63–3.66 (m, 10H), 3.77 (t, 2H, $J = 5.5$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : -5.3 (2C), 18.3, 25.9 (3C), 26.0, 26.7, 28.8, 29.0, 29.3, 29.4, 29.6, 51.4, 62.7, 70.0, 70.57 (2C), 70.60, 70.7, 71.5 (2C), 72.6; IR (ATR) cm^{-1} : 2093; MS (ESI) m/z : 498 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRMS (ESI) m/z : Calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{NaO}_5\text{Si}$: 498.3334; Found: 498.3339 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

24-Azido-3,6,9,12-tetraoxatetracosan-1-ol (35a)

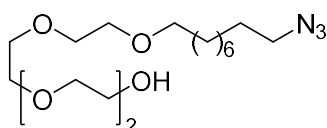


35a

25 の代わりに **34a** を用いて **10g** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 1:1 to 1:2) で精製し、**34a** (326 mg, 0.629 mmol) から **35a** (204 mg, 80%) を得た。

淡黄色油状物: $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 1.26–1.39 (m, 16H), 1.55–1.74 (m, 4H), 2.69 (br, 1H), 3.26 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 3.45 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 3.58–3.74 (m, 16H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 26.0, 26.6, 28.7, 29.1 (2C), 29.37 (2C), 29.42, 29.45, 29.47, 51.4, 61.6, 69.9, 70.2, 70.4, 70.47, 70.50, 70.51, 71.5, 72.5; IR (ATR) cm^{-1} : 3458, 2093; MS (ESI) m/z : 426 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRMS (ESI) m/z : Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{NaO}_5$: 426.2938; Found: 426.2939 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

21-Azido-3,6,9,12-tetraoxahenicosan-1-ol (35b)

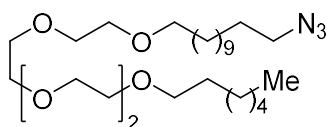


35b

25 の代わりに **34b** を用いて **10g** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 1:1 to 1:2) で精製し、**34b** (398 mg, 0.835 mmol) から **35b** (281 mg, 93%) を得た。

淡黄色油状物: $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 1.25–1.39 (m, 10H), 1.55–1.62 (m, 4H), 2.84 (br, 1H), 3.26 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 3.45 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 3.58–3.74 (m, 16H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 25.9, 26.6, 28.7, 29.0, 29.2, 29.3, 29.5, 51.3, 61.6, 69.9, 70.2, 70.42, 70.44, 70.47, 70.48, 71.4, 72.5; IR (ATR) cm^{-1} : 3456, 2092; MS (ESI) m/z : 384 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRMS (ESI) m/z : Calcd for $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{N}_3\text{NaO}_5$: 384.2469; Found: 384.2471 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

1-Azido-13,16,19,22,25-pentaoxadotriacontane (36a)



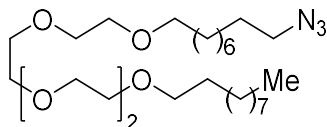
36a

12-ブロモ-1-ドデカノールの代わりに 1-ヨードヘプタン、**11** の代わりに **35a** を用いて **18** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 5:1 to 1:2) で精製し、**35a** (117 mg, 0.290 mmol) と 1-ヨードヘプタン (95.0 μg , 0.580 mmol) から **36a** (108 mg, 74%) を得た。

無色透明油状物: $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 0.88 (t, 3H, $J = 6.9$ Hz), 1.23–1.40 (m, 24H), 1.54–1.68 (m, 6H), 3.26 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 3.45 (t, 4H, $J = 6.8$ Hz), 3.57–3.59 (m, 4H), 3.63–3.66 (m, 12H); $^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 14.1, 22.6, 25.98, 26.01 (2C), 26.7, 28.8, 29.1, 29.42, 29.43, 29.47, 29.49, 29.50, 29.52, 29.6, 31.8, 51.4, 70.0, 70.49 (2C), 70.50 (2C), 70.53 (2C), 70.54, 71.5 (2C); IR

(ATR) cm^{-1} : 2093; MS (ESI) m/z : 524 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRMS (ESI) m/z : Calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{NaO}_5$: 524.4034; Found: 524.4039 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

1-Azido-10,13,16,19,22-pentaoxadotriacontane (36b)

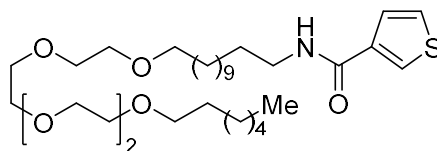


36b

12-ブロモ-1-ドデカノールの代わりに 1-ヨードデカン、**11** の代わりに **35b** を用いて **18** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 5:1) で精製し、**35b** (171 mg, 0.473 mmol) と 1-ヨードデカン (0.211 mL, 0.946 mmol) から **36b** (191 mg, 81%) を得た。

無色透明油状物: ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.88 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz), 1.26–1.38 (m, 24H), 1.55–1.69 (m, 6H), 3.26 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 3.45 (t, 4H, $J = 6.8$ Hz), 3.57–3.60 (m, 4H), 3.62–3.66 (m, 12H); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 14.1, 22.6, 25.97, 26.02, 26.6 (2C), 28.8, 29.0, 29.25, 29.28, 29.33, 29.4, 29.50, 29.54, 29.6, 31.8, 51.4, 70.0 (2C), 70.52 (2C), 70.54 (2C), 71.4 (2C), 71.5 (2C); IR (ATR) cm^{-1} : 2093; MS (ESI) m/z : 524 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRMS (ESI) m/z : Calcd for $\text{C}_{27}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{NaO}_5$: 524.4034; Found: 524.4035 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

N-(13,16,19,22,25-Pentaoxadotriacontan-1-yl)-thiophene-3-carboxamide (16b)

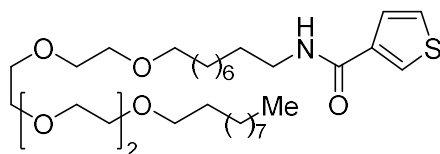


16b

14 の代わりに **36a** を用いて **25** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 5:1 to 1:1) で精製し、**36a** (174 mg, 0.347 mmol) から **16b** (112 mg, 55%) を得た。

白色ワックス状固体: M.p. 51.6–52.4 °C; ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.88 (t, 3H, $J = 7.0$ Hz), 1.22–1.39 (m, 24H), 1.55–1.63 (m, 6H), 3.40–3.46 (m, 6H), 3.57–3.60 (m, 4H), 3.62–3.66 (m, 12H), 5.96 (br, 1H), 7.34 (dd, 1H, $J = 5.0, 3.0$ Hz), 7.37 (dd, 1H, $J = 5.0, 1.3$ Hz), 7.84 (dd, 1H, $J = 3.0, 1.3$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 14.0, 22.5, 25.95, 25.98, 27.0, 29.1, 29.2, 29.37 (2C), 29.43, 29.45 (2C), 29.52, 29.53, 29.6, 31.7, 39.8, 69.9 (3C), 70.48 (2C), 70.52 (3C), 71.4 (2C), 126.1, 126.2, 127.8, 137.7, 163.0; IR (ATR) cm^{-1} : 3333, 1623; MS (EI) m/z (%): 585 (11.3) $[\text{M}]^+$, 310 (44.3), 294 (42.4), 111 (100.0); HRMS (EI) m/z : Calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{59}\text{NO}_6\text{S}$: 585.4063; Found: 585.4066 $[\text{M}]^+$.

N-(10,13,16,19,22-Pentaoxadotriacontan-1-yl)-thiophene-3-carboxamide (16c)

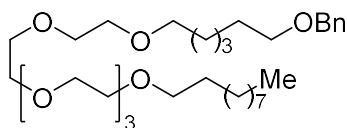


16c

14 の代わりに 36b を用いて 25 と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 2:1 to 1:1) で精製し、36b (169 mg, 0.337 mmol) から 16c (165 mg, 84%) を得た。

白色ワックス状固体: M.p. 50.5–52.3 °C; ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 0.88 (t, 3H, *J* = 7.0 Hz), 1.23–1.40 (m, 24H), 1.55–1.63 (m, 6H), 3.43 (td, 2H, *J* = 7.2, 6.0 Hz), 3.45 (t, 4H, *J* = 6.8 Hz), 3.57–3.60 (m, 4H), 3.62–3.66 (m, 12H), 5.96 (br, 1H), 7.34 (dd, 1H, *J* = 5.1, 3.1 Hz), 7.38 (dd, 1H, *J* = 5.1, 1.3 Hz), 7.85 (dd, 1H, *J* = 3.1, 1.3 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 14.0, 22.6, 25.9, 26.0, 26.8, 29.1, 29.21, 29.24, 29.3, 29.4 (2C), 29.45 (2C), 29.49, 29.6, 31.8, 39.7, 69.90, 69.91, 70.4 (3C), 70.5 (2C), 71.36, 71.43 (2C), 126.09, 126.10, 127.8, 137.7, 163.0; IR (ATR) cm⁻¹: 3332, 1622; MS (EI) *m/z* (%): 585 (78.3) [M]⁺, 268 (69.6), 252 (71.2), 111 (100.0); HRMS (EI) *m/z*: Calcd for C₃₂H₅₉NO₆S: 585.4063; Found: 585.4064 [M]⁺.

1-Benzylxy-7,10,13,16,19,22-hexaoxadotriacontane (38)

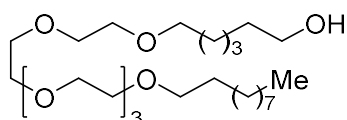


38

23 の代わりに 1-ベンジルオキシ-6-ブロモヘキサン、12 の代わりに 30c を用いて 14 と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 2:1) で精製し、30c (785 mg, 2.07 mmol) と 1-ベンジルオキシ-6-ブロモヘキサン (846 mg, 3.12 mmol) から 38 (705 mg, 61%) を得た。

無色透明油状物: ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ: 0.88 (3H, t, *J* = 6.7 Hz), 1.25–1.43 (m, 18H), 1.52–1.66 (m, 6H), 3.44 (t, 4H, *J* = 6.7 Hz), 3.45 (t, 2H, *J* = 6.7 Hz), 3.55–3.58 (m, 4H), 3.61–3.65 (m, 16H), 4.49 (s, 2H), 7.23–7.37 (m, 5H); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 14.0, 22.6, 25.9, 25.98, 26.00, 29.2, 29.4, 29.49 (2C), 29.52, 29.54, 29.6, 31.8, 70.0 (2C), 70.3, 70.50 (6C), 70.53 (2C), 71.3, 71.5, 72.8, 127.4, 127.5 (2C), 128.2 (2C), 138.6; IR (ATR) cm⁻¹: No characteristic absorptions were observed.; MS (EI) *m/z* (%): 568 (3.8) [M]⁺, 477 (2.0), 91 (100); HRMS (EI) *m/z*: Calcd for C₃₃H₆₀O₇: 568.4339; found: 568.4338 [M]⁺.

7,10,13,16,19,22-Hexaoxadotriacontan-1-ol (39)

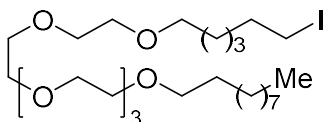


39

38 (614 mg, 1.08 mmol) の脱水酢酸エチル (11 mL) 溶液に、室温で水酸化パラジウム–活性炭素 (パラジウム 20%, 約 50%含水, 61.4 mg) を加え、3 気圧の水素雰囲気下、同温で 3 時間攪拌した。セライトを用いてろ過し、酢酸エチルを用いて洗浄し、減圧下で溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル) で精製し、**39** (475 mg, 89%) を得た。

無色透明油状物: $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.84 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz), 1.22–1.36 (m, 18H), 1.49–1.58 (m, 6H), 1.80 (br s, 1H), 3.41 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.42 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.52–3.56 (m, 4H), 3.59–3.62 (m, 18H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 14.0, 22.6, 25.5, 25.8, 26.0, 29.2, 29.38, 29.44, 29.46, 29.50, 29.51, 31.8, 32.6, 62.6, 69.9, 70.0, 70.48 (6C), 70.50 (2C), 71.2, 71.4; IR (ATR) cm^{-1} : 3472; MS (FAB) m/z : 479 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS (FAB) m/z : Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{55}\text{O}_7$: 479.3948; found: 479.3949 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

7,10,13,16,19,22-Hexaoxa-1-iododotriacontane (40)

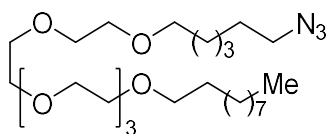


40

トリフェニルホスフィン (278 mg, 1.06 mmol) の脱水 CH_2Cl_2 (1.1 mL) 溶液に、氷冷下でイミダゾール (72.1 mg, 1.06 mmol) およびヨウ素 (269 mg, 1.06 mmol) を加え、同温で 1 時間攪拌した。反応液に **39** (392 mg, 0.818 mmol) の脱水 CH_2Cl_2 (3.0 mL) を同温で加え、室温で 45 分間攪拌した。室温で飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルを用いて抽出した。飽和食塩水を用いて洗浄し、無水硫酸マグネシウムを用いて乾燥させた。減圧下で溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n -ヘキサン : 酢酸エチル = 10:1) で精製し、**40** (441 mg, 91%) を得た。

淡黄色透明油状物: $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.85 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz), 1.23–1.44 (m, 18H), 1.50–1.61 (m, 4H), 1.80 (qn, 2H, $J = 7.0$ Hz), 3.16 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 3.42 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 3.43 (t, 2H, $J = 6.6$ Hz), 3.53–3.57 (m, 4H), 3.60–3.63 (m, 16H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 Hz, CDCl_3) δ : 7.0, 14.1, 22.6, 25.0, 26.0, 29.3, 29.4, 29.49, 29.53 (2C), 29.6, 30.2, 31.8, 33.4, 69.97, 70.03, 70.5 (6C), 70.6 (2C), 71.1, 71.5; IR (ATR) cm^{-1} : No characteristic absorptions were observed.; MS (FAB) m/z : 589 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS (FAB) m/z : Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{54}\text{IO}_6$: 589.2965; found: 589.2980 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

1-Azido-7,10,13,16,19,22-hexaoxadotriacontane (41)

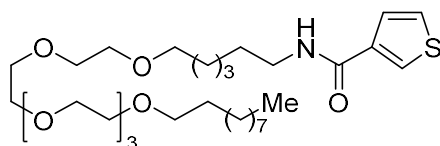


41

19の代わりに40を用いて13と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 2:1) で精製し、40 (382 mg, 0.649 mmol) から41 (308 mg, 94%) を得た。

無色透明油状物: $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.85 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz), 1.23–1.38 (m, 18H), 1.50–1.62 (m, 6H), 3.23 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 3.42 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 3.43 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 3.53–3.56 (m, 4H), 3.60–3.63 (m, 16H); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 14.0, 22.6, 25.6, 26.0, 26.5, 28.7, 29.2, 29.39, 29.41, 29.48, 29.52, 29.6, 31.8, 51.3, 69.96, 70.02, 70.5 (8C), 71.1, 71.5; IR (ATR) cm^{-1} : 2092; MS (FAB) m/z : 504 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS (FAB) m/z : Calcd for $\text{C}_{26}\text{H}_{54}\text{N}_3\text{O}_6$: 504.4013; found: 504.4034 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(7,10,13,16,19,22-Hexaoxadotriacontan-1-yl)-thiophene-3-carboxamide (16e)

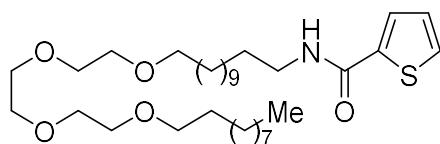


16e

14の代わりに41を用いて25と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 5:1 to 1:1 to クロロホルム) で精製し、41 (239 mg, 0.661 mmol) から16e (205 mg, 74%) を得た。

白色ワックス状固体: M.p. 40 °C以下; $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ : 0.88 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz), 1.26–1.42 (m, 18H), 1.52–1.65 (m, 6H), 3.38–3.48 (m, 6H), 3.55–3.59 (m, 4H), 3.62–3.65 (m, 16H), 6.07 (br s, 1H), 7.33 (dd, 1H, $J = 5.1, 3.1$ Hz), 7.39 (dd, 1H, $J = 5.1, 1.4$ Hz), 7.86 (dd, 1H, $J = 3.1, 1.4$ Hz); $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3) δ : 14.1, 22.6, 25.7, 26.0, 26.6, 29.3, 29.37, 29.42, 29.50, 29.54 (2C), 29.6, 31.8, 39.6, 69.97, 69.99, 70.5 (6C), 70.6 (2C), 71.1, 71.5, 126.1, 126.2, 127.9, 137.7, 163.1; IR (ATR) cm^{-1} : 3329, 1622; MS (FAB) m/z : 588 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS (FAB) m/z : Calcd for $\text{C}_{31}\text{H}_{58}\text{NO}_7\text{S}$: 588.3934; found: 588.3925 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

N-(13,16,19,22-Tetraoxadotriacontan-1-yl)-thiophene-2-carboxamide (16g)



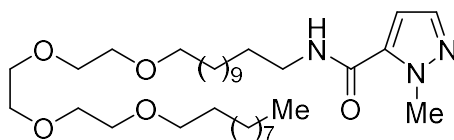
16g

チオフェン-3-カルボン酸の代わりにチオフェン-2-カルボン酸、14の代わりに27を用いて25と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン :

酢酸エチル = 5:1) で精製し、**27** (50.0 mg, 0.100 mmol) とチオフェン-2-カルボン酸 (25.6 mg, 0.200 mmol) から **16g** (50.3 mg, 86%) を得た。

白色ワックス状固体: M.p. 42.1–43.3 °C; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ: 0.87 (t, 3H, *J* = 6.9 Hz), 1.25–1.38 (m, 30H), 1.57 (qn, 4H, *J* = 7.0 Hz), 1.60 (qn, 2H, *J* = 7.0 Hz), 3.41 (t, 2H, *J* = 6.9 Hz), 3.44 (t, 4H, *J* = 6.9 Hz), 3.56–3.58 (m, 4H), 3.63–3.66 (m, 8H), 5.98 (br s, 1H), 7.07 (dd, 1H, *J* = 5.0, 3.8 Hz), 7.46 (d, 1H, *J* = 5.0 Hz), 7.48 (d, 1H, *J* = 3.8 Hz); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ: 14.1, 22.7, 26.0, 26.1, 26.9, 29.26, 29.29, 29.4, 29.46, 29.47, 29.50, 29.51, 29.52, 29.53, 29.58, 29.59, 29.65, 29.66, 31.9, 40.0, 70.0 (2C), 70.57 (2C), 70.59 (2C), 71.5 (2C), 127.5, 127.7, 129.5, 139.2, 161.8; IR (ATR) cm⁻¹: 3321, 1622; MS (EI) *m/z* (%): 583 (13.6) [M+H]⁺, 472 (7.5), 310 (83.9), 294 (66.1), 111 (100), 83 (13.7); HRMS (EI) *m/z*: Calcd for C₃₃H₆₁NO₅S: 583.4270; found: 583.4268 [M]⁺.

N-(13,16,19,22-Tetraoxadotriacontan-1-yl)-1-methyl-1H-pyrazole-5-carboxamide (16h)

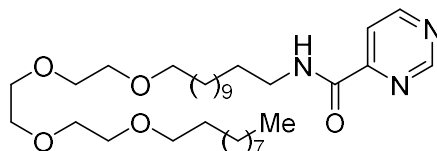


16h

チオフェン-3-カルボン酸の代わりに 1-メチル-1H-ピラゾール-5-カルボン酸、**14** の代わりに **27** を用いて **25** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 2:1) で精製し、**27** (127 mg, 0.283 mmol) と 1-メチル-1H-ピラゾール-5-カルボン酸 (357 mg, 2.83 mmol) から **16h** (86.8 mg, 53%) を得た。

白色ワックス状固体 M.p. 40 °C以下; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.86 (t, 3H, *J* = 6.7 Hz), 1.18–1.32 (m, 30H), 1.52–1.61 (m, 6H), 3.52–3.45 (m, 6H), 3.55–3.65 (m, 12H), 4.16 (s, 3H) 5.95 (br, 1H), 6.45 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 7.42 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 14.1, 22.6, 26.0, 26.1, 26.9, 29.2, 29.3 (2C), 29.4 (4C), 29.5 (4C), 29.7 (2C), 31.8, 39.2, 39.5, 70.0, 70.5 (4C), 70.9 (2C), 71.5, 105.9, 135.4, 137.4, 160.0; IR (ATR) cm⁻¹: 3271, 1641; MS (EI) *m/z* (%): 581 (8.2) [M]⁺, 308 (78.4), 270 (69.0), 109 (100.0); HRMS (EI) *m/z*: Calcd for C₃₃H₆₃N₃O₅: 581.4768; Found: 581.4768 [M]⁺.

N-(13,16,19,22-Tetraoxadotriacontan-1-yl)-pyrimidine-4-carboxamide (16j)

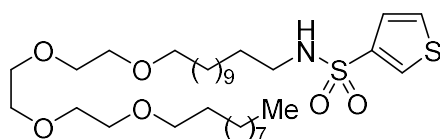


16i

チオフェン-3-カルボン酸の代わりに 4-ピリミジンカルボン酸、**14** の代わりに **27** を用いて **25** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン: 酢酸エチル = 5:1) で精製し、**27** (50.0 mg, 0.100 mmol) と 4-ピリミジンカルボン酸 (24.8 mg, 0.200 mmol) から **16j** (56.8 mg, 98%) を得た。

白色ワックス状固体 M.p. 46.9–47.5 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.88 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz), 1.26–1.41 (m, 30H), 1.53–1.69 (m, 6H), 3.42–3.51 (m, 6H), 3.56–3.60 (m, 4H), 3.63–3.66 (m, 8H), 8.00 (br s, 1H), 8.13 (dd, 1H, $J = 5.2, 1.2$ Hz), 8.97 (d, 1H, $J = 5.2$ Hz), 9.23 (d, 1H, $J = 1.2$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 14.1, 22.7, 26.1, 26.9, 29.27, 29.31, 29.45, 29.48, 29.49, 29.55, 29.56, 29.60, 29.62 (4C), 29.7 (2C), 31.9, 39.6, 70.0 (2C), 70.60 (2C), 70.62 (2C), 71.5 (2C), 118.5, 156.4, 157.7, 159.2, 162.5; IR (ATR) cm^{-1} : 3364, 1656; MS (ESI) m/z : 602 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRMS (FAB) m/z : Calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{61}\text{N}_3\text{NaO}_5$: 602.4509; found: 602.4504 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

N-(13,16,19,22-Tetraoxadotriacontan-1-yl)-thiophene-3-sulfonamide (16k)



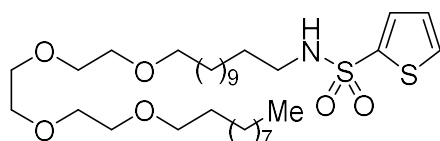
16k

27 (100.0 mg, 0.200 mmol) の脱水 $\text{Et}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}$ (1:1, 2.00 mL) 溶液に、氷冷下でトリフェニルホスフィン (84.7 mg, 0.323 mmol) 加え、同温で 17 時間攪拌した。同温で 1M 水酸化ナトリウム水溶液を加え、 Et_2O を用いて抽出した。無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させ、減圧下、溶媒を留去した。

残渣の脱水 CH_2Cl_2 (2.00 mL) 溶液に、氷冷下で 3-チオフェンスルホニルクロリド (110 mg, 0.600 mmol)、トリエチルアミン (0.139 mL, 1.00 mmol) を加えた。室温で 19 時間攪拌した後、同温で水を加え、 CH_2Cl_2 を用いて抽出した。飽和食塩水を用いて洗浄し、無水硫酸ナトリウムを用いて乾燥させた。減圧下で溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (n -ヘキサン : 酢酸エチル = 5:1) で精製し、**16k** (95.0 mg, 77%) を得た。

白色ワックス状固体: M.p. 40.6–41.7 °C; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.88 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz), 1.22–1.33 (m, 30H), 1.42–1.58 (m, 6H), 3.00 (q, 2H, $J = 6.8$ Hz), 3.45 (t, 4H, $J = 6.9$ Hz), 3.56–3.60 (m, 4H), 3.63–3.66 (m, 8H), 4.33 (br t, 1H, $J = 6.0$ Hz), 7.36 (dd, 1H, $J = 5.1, 1.3$ Hz), 7.43 (dd, 1H, $J = 5.1, 3.0$ Hz), 7.96 (dd, 1H, $J = 3.0, 1.3$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 14.1, 22.7, 26.07, 26.08, 26.5, 29.0, 29.3, 29.4, 29.46, 29.49 (2C), 29.53, 29.57 (2C), 29.60, 29.62 (2C), 29.7, 31.9, 43.3, 70.0 (2C), 70.61 (2C), 70.62 (2C), 71.5, 71.6, 125.4, 127.9, 130.3, 140.1; IR (ATR) cm^{-1} : 3277, 1320; MS (ESI) m/z : 642 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRMS (ESI) m/z : Calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{61}\text{NNaO}_6\text{S}_2$: 642.3838; found: 642.3837 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

N-(13,16,19,22-Tetraoxadotriacontan-1-yl)-thiophene-2-sulfonamide (16l)



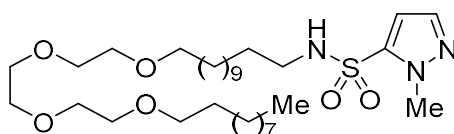
16l

3-チオフェンスルホニルクロリドの代わりに 2-チオフェンスルホニルクロリドを用いて **16k** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (n -ヘキサン : 酢

酸エチル = 5:1) で精製し、**27** (100 mg, 0.200 mmol) と 2-チオフェンスルホニルクロリド (110 mg, 0.600 mmol) から **16l** (87.6 mg, 71%) を得た。

白色ワックス状固体: M.p. 40 °C以下; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.88 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz), 1.23–1.33 (m, 30H), 1.44–1.60 (m, 6H), 3.04 (q, 2H, $J = 6.9$ Hz), 3.45 (t, 4H, $J = 6.9$ Hz), 3.56–3.60 (m, 4H), 3.63–3.66 (m, 8H), 4.43 (br t, 1H, $J = 6.0$ Hz), 7.10 (dd, 1H, $J = 3.7, 1.4$ Hz), 7.59 (dd, 1H, $J = 5.0, 1.4$ Hz), 7.61 (dd, 1H, $J = 5.0, 3.7$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 14.1, 22.7, 26.06, 26.08, 26.5, 29.0, 29.3, 29.4, 29.45 (3C), 29.49 (2C), 29.53, 29.57, 29.61, 29.62, 29.7, 31.9, 43.5, 70.0 (2C), 70.6 (2C), 71.5 (2C), 71.6 (2C), 127.3, 131.7, 132.0, 141.0; IR (ATR) cm^{-1} : 3269, 1336; MS (ESI) m/z : 642 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRMS (ESI) m/z : Calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{61}\text{NNaO}_6\text{S}_2$: 642.3838; found: 642.3827 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

N-(13,16,19,22-Tetraoxadotriacontan-1-yl)-1-methyl-1H-pyrazole-5-sulfonamide (16m)

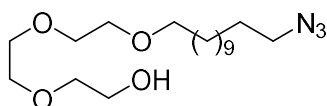


16m

3-チオフェンスルホニルクロリドの代わりに 1-メチル-1*H*-ピラゾール-5-スルホニルクロリドを用いて **16k** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 5:1 to 3:1) で精製し、**27** (50.0 mg, 0.100 mmol) と 1-メチル-1*H*-ピラゾール-5-スルホニルクロリド (27.1 mg, 0.150 mmol) から **16m** (57.9 mg, 94%) を得た。

白色ワックス状固体: M.p. 40 °C以下; ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.86 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz), 1.22–1.32 (m, 30H), 1.48 (qn, 2H, $J = 6.7$ Hz), 1.56 (qn, 4H, $J = 6.7$ Hz), 3.04 (q, 2H, $J = 6.7$ Hz), 3.45 (t, 4H, $J = 6.7$ Hz), 3.55–3.58 (m, 4H), 3.61–3.65 (m, 8H), 4.08 (s, 3H), 4.89 (br s, 1H), 6.74 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz), 7.45 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz); ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3) δ : 14.1, 22.6, 26.0, 26.1, 26.4, 29.0, 29.3, 29.35, 29.40 (2C), 29.44, 29.45 (2C), 29.48, 29.54, 29.57 (2C), 29.63, 31.9, 38.5, 43.3, 70.0, 70.56, 70.57 (2C), 71.50 (2C), 71.52 (2C), 111.0, 137.6, 139.0; IR (ATR) cm^{-1} : 3291, 1325; MS (FAB) m/z : 618 $[\text{M}+\text{H}]^+$; HRMS (FAB) m/z : calcd for $\text{C}_{32}\text{H}_{64}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$: 618.4516; found: 618.4511 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

21-Azido-3,6,9-trioxahenicosan-1-ol (43)



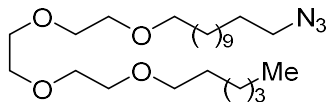
43

25 の代わりに **14** を用いて **10g** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル) で精製し、**14** (243 mg, 0.513 mmol) から **43** (181 mg, 98%) を得た。

無色透明油状物: ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.23–1.40 (m, 16H), 1.55–1.67 (m, 4H), 2.54 (t, 1H, $J = 6.4$ Hz), 3.26 (t, 2H, $J = 7.1$ Hz), 3.45 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 3.58–3.75 (m, 12H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 25.9 (2C), 26.5 (2C), 28.7 (2C), 29.0 (2C), 29.3, 29.4, 51.3, 61.5, 69.8, 70.2, 70.4 (2C),

71.4, 72.4; IR (ATR) cm^{-1} : 3445, 2091; MS (ESI) m/z : 382 $[\text{M}+\text{Na}]^+$; HRMS (ESI) m/z : Calcd for $\text{C}_{18}\text{H}_{37}\text{N}_3\text{O}_4$: 382.2676; Found: 382.2680 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

1-Azido-13,16,19,22-tetraoxaocacosane (44)

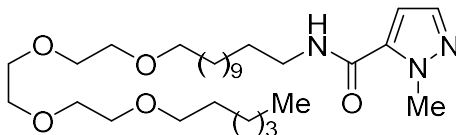


44

12-ブロモ-1-ドデカノールの代わりに 1-ヨードヘキサン、**11** の代わりに **43** を用いて **18** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (n -ヘキサン : 酢酸エチル = 10:1) で精製し、**43** (167 mg, 0.464 mmol) と 1-ヨードヘキサン (0.102 mL, 0.696 mmol) から **44** (87.7 mg, 43%) を得た。

無色透明油状物: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.88 (t, 3H, $J = 6.8$ Hz), 1.27–1.35 (m, 22H), 1.53–1.64 (m, 6H), 3.25 (t, 2H, $J = 7.0$ Hz), 3.45 (t, 4H, $J = 6.8$ Hz), 3.56–3.66 (m, 12H); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 14.0, 22.5, 25.7, 26.0, 26.6, 28.7, 29.1, 29.39 (2C), 29.43, 29.46, 29.48, 29.52, 29.6, 31.6, 51.4, 70.0 (2C), 70.5 (4C), 71.4 (2C); IR (ATR) cm^{-1} : 2093; MS (ESI) m/z : 466 $[\text{M}]^+$; HRMS (ESI) m/z : Calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{49}\text{N}_3\text{O}_4$: 466.3615; Found: 466.3614 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

N-(13,16,19,22-Tetraoxaocacosan-1-yl)-1-methyl-1*H*-pyrazole-5-carboxamide (16i)



16i

チオフェン-3-カルボン酸の代わりに 1-メチル-1*H*-ピラゾール-5-カルボン酸、**14** の代わりに **44** を用いて **25** と同様の操作により反応を行い、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (n -ヘキサン : 酢酸エチル = 5:1) で精製し、**44** (77.7 mg, 0.175 mmol) と 1-メチル-1*H*-ピラゾール-5-カルボン酸 (44.1 mg, 0.175 mmol) から **16i** (63.3 mg, 69%) を得た。

無色透明油状物: ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3) δ : 0.88 (t, 3H, $J = 6.7$ Hz), 1.22–1.37 (m, 22H), 1.53–1.59 (m, 6H), 3.37 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 3.44 (t, 4H, $J = 6.8$ Hz), 3.56–3.66 (m, 12H), 4.17 (s, 3H), 6.28 (br, 1H), 6.51 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz), 7.42 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ : 13.9, 22.5, 25.7, 26.0, 26.9, 29.2, 29.4 (4C), 29.5 (3C), 31.6 (2C), 39.1, 39.5, 70.0 (2C), 70.5 (4C), 71.4 (2C), 105.9, 135.4, 137.4, 160.0; IR (ATR) cm^{-1} : 3324, 1666; MS (EI) m/z (%): 525 (15.3) $[\text{M}]^+$, 416 (25.1), 308 (100.0), 292 (82.2), 138 (38.8), 109 (100.0), 85 (51.2), 43 (75.9); HRMS (EI) m/z : Calcd for $\text{C}_{29}\text{H}_{55}\text{N}_3\text{O}_5$: 525.4142; Found: 525.4141 $[\text{M}]^+$.

<生物活性の部>

第一章の実験

試薬

JCI-20679、**10a-k** および TMZ (Sigma-Aldrich, St.Louis, Mo) は DMSO (ナカライテスク株式会社製, 京都, 日本) に溶解した。

細胞培養

野生型 C57BL/6 マウスを株式会社 Charles River Laboratories Japan (神奈川県, 日本) から入手した。低体温麻酔下で新生児マウスを定位固定装置 (51730D, Stoelting Co.) に固定し、ポリ(エチレンイミン)-DNA 複合体 (in vivo-JetPEI, Polyplus Transfection, New York, USA) を λ から +1.5 AP, 0.7 ML, -1.5 DV の位置に Hamilton シリンジと注入システム (Legato 130, KD Scientific, Holliston, MA) を用いて注入した。以下の DNA プラスミドを用いた: pT2/C-Luc//PGK-SB13 (0.2 μ g, 20207, Addgene, Watertown, MA, USA)、PT/CAGGS-NRASV12 (0.4 μ g, 20205, Addgene)、PT3.5/CMV-EGFRvIII (0.4 μ g, 20280, Addgene)、PT/shP53 (0.4 μ g, 124261, Addgene)。腫瘍組織をメスで細分化し、Accutase 溶液 (Innovative Cell Technologies, San Diego, CA) を用いて分離した後、B27、N2 (Gibco/Thermo Fisher Scientific)、および 10 ng/mL の EGF および bFGF (R&D Systems, Minneapolis, MN) を添加した Neurobasal 培地からなる無血清神経幹細胞培養培地でインキュベートし、膠芽腫幹細胞をニューロスフェアとして培養した。⁶⁶⁻⁶⁸ ヒト膠芽腫 U251 細胞 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) およびヒト結腸がん SW48 細胞 (The European Collection of Authenticated Cell Cultures, Salisbury, U.K.) は、10% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (和光純薬工業, 大阪, 日本) を添加した DMEM (和光純薬工業, 大阪, 日本) 中にて培養した。細胞はすべて、5% CO₂、37 °C の条件下にて培養した。

トリパンブルー色素排出法

膠芽腫幹細胞を 6 well plate に 1×10^5 cells/well で播種し、JCI-20679 または **10a-k** が 100 nM および 500 nM の最終濃度となるように調製した培養液 (0.05% DMSO 含有) を添加した。また、コントロールには、それらと同量の DMSO を含む培養液を用いた。化合物添加後 3 日目にトリプシン処理し、500 μ L の細胞懸濁液として調製した。トリパンブルー染色陽性を死細胞、陰性を生存細胞として Countess II automated cell counter (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて細胞数をそれぞれ測定した。

細胞内 AMP/ATP 比の測定

マウス膠芽腫幹細胞を 6 well plate に 1×10^5 cells/well で播種し、JCI-20679 および **10k** の最終濃度が 500 nM となるように調製した培養液 (0.05% DMSO 含有) を添加し、2 日作用させた。また、それらと同量の DMSO を含む培養液をコントロールとして用いた。細胞を回収し、Accutase 処理にて 500 μ L の細胞懸濁液を調製し、細胞数を計数した。各サンプルの細胞数を

揃え sample とした後、発光測定用白色 96 well plate に 100 μ L ずつ sample を添加し、CellTiter-Glo luminescent cell viability assay kit (G7570, Promega, Madison, WI, USA) を 100 μ L ずつ添加した。96 well plate をシェイカーを用いて 1 分間振盪し、10 分間遮光し、静置した後、プレートリーダーを用いて発光強度を測定することにより ATP 濃度を測定した。AMP の測定は、細胞数を揃えた Sample を PBS を用いて洗浄し Cell pellet にした後、Cell Lytic M 100 μ L を用いて溶解し 1.5 mL チューブに回収した。1400 rpm、4 $^{\circ}$ C で 15 分間振盪した後、4 $^{\circ}$ C、15,000 \times g にて 15 分間遠心分離し、上清を回収した。この溶液を 25 μ L ずつ発光測定用白色 96 well plate に加え、AMP-Glo assay kit (V5011, Promega, Madison, WI, USA) の AMP-Glo Reagent 1 を 25 μ L ずつ添加した。シェイカーを用いて 1 分振盪した後、1 時間遮光して静置した。その後 AMP-Glo Reagent 2 と Kinase-Glo one solution を 1:100 で混合した溶液を 50 μ L ずつ加え、シェイカーを用いて 1 分間振盪した後、1 時間遮光して静置し、プレートリーダーを用い発光強度を測定し AMP 濃度を測定した。測定された ATP 濃度および AMP 濃度は DMSO 処理したものを基準とし、相対値で評価を行った。またその際の AMP/ATP の比率の評価を行った。

ウェスタンブロット解析

SDS buffer (50 mM Tris-HCl, 1% SDS) にプロテアーゼ阻害剤 (ナカライテスク株式会社製, 京都, 日本) および PhosSTOP EASYpack (Roche Diagnostics, IN) を添加した溶液に細胞を溶解させ、氷冷下で超音波を用いて破碎した。溶解液を 4 $^{\circ}$ C、20,000 \times g にて 45 分間遠心分離し、上清に含まれる可溶性タンパク質を回収した。タンパク質溶解液の濃度を Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher) を用いて測定した。タンパク質を溶解した溶媒を用いて希釈し、タンパク濃度を均一にしたサンプル 20 μ L に Sample Buffer (125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% グリセロール, 10% 2-メルカプトエタノール, 0.04% ブロモフェノールブルー) を加え、95 $^{\circ}$ C で 5 分間熱変性を行った。10% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE 法を用いて分離し Semidry 式転写装置 (170 mA/gel, 90 分間) もしくは wet 式転写装置 (350 mA/gel, 60 分間) を用いて分離したタンパク質を PVDF メンブレン (Millipore, Billerica, MA) に転写した。転写されたメンブレンは、3% スキムミルク含有 0.05% Tween 20 を添加した Tris 緩衝液 (TBS; 50 mM Tris, 2.68 mM KCl, 137 mM NaCl, pH 7.4) (TBS-T) または Blocking One-P (ナカライテスク株式会社製, 京都, 日本) でブロッキングし、一次抗体および二次抗体とインキュベートした。抗体と反応させた後、TBS-T を用いて 3 回、TBS を用いて 2 回洗浄した。Clarity Western ECL substrate (170-5060, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) または ChemiLumi One Super substrate (02230-30, Nacalai Tesque) と反応させた後、ChemiDoc XRS Plus system (Bio-Rad) を用いて検出した。

以下の抗体を使用した : p-AMPK α (1:1000; #2535, Cell Signaling Technology, Danvers, MA)、GAPDH (1:1000; 016-25523, 和光純薬工業, 大阪, 日本)、horseradish peroxidase-conjugated horse anti-mouse IgG (1:2000; PI-2000, Vector Laboratories, Burlingame, CA)、および HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:2000; #7074, Cell Signaling Technology)。

膠芽腫幹細胞移植モデルマウスを用いた抗腫瘍活性評価

2 μ L の PBS (166-23555, Wako Pure Chemical Industries) 中にマウス膠芽腫幹細胞が 1×10^3 個となるように細胞懸濁液を調製し、オス C57BL/6 マウス (6 週齢) に対して麻酔下にて移植を行った。自動 infusion system (Legato 130) を用いて、調製した細胞懸濁液を右大脳のブレグマから外側 2 mm、腹側 3 mm の位置に 1 μ L/min の速度で注入した。**10k** は DMSO に 10 mg/mL で溶解し、最終濃度 10% Kolliphor EL (C5135, Sigma-Aldrich) 含有生理食塩水で希釈した (合計 200 μ L/20g 体重)。**10k** を溶解させるのに用いた量と同量の DMSO をコントロール群として使用した。4 匹ずつのオス C57BL/6 マウスに移植日から DMSO のみもしくは **10k** 10 mg/kg を週 3 回腹腔内投与した。全生存期間の評価を行った実験では、死亡、明らかな神経学的症状の発生、または体重の 20% 以上の減少を打ち切りイベントとして無イベント生存曲線を作成した。また腫瘍形成により動きの鈍化や姿勢の変調が見られた場合、頸椎脱臼法を用い安楽死を行った。腫瘍形成を評価する実験は、移植後 1 週間毎に D-luciferin を用いてその発光強度を測定することにより腫瘍の大きさを評価した。D-luciferin (126-05116, 和光純薬工業, 大阪, 日本) を腹腔内に投与 10 分後に IVIS Lumina XR imaging system を用いて発光強度の検出を行った。

ヒト結腸がん細胞 SW48 移植モデルマウスを用いた抗腫瘍活性評価

オス CB-17 SCID マウス (5 週齢) を日本 SLC (静岡, 日本) から購入した。SW48 細胞 (3×10^6 cells) をマトリゲルと PBS (1:1, Corning, NY) の 100 μ L の細胞懸濁液を調製し、麻酔下にて両足付け根に移植した。8 匹ずつのオス CB-17 SCID マウスに、接種後 3 日目から DMSO のみもしくは **10k** 20 mg/kg を毎日腹腔内に投与した。**10k** は DMSO/エタノール (1:1) 溶液に 10 mg/mL で溶解し、10% Kolliphor EL (Sigma, St. Louis, MO) 含有生理食塩水で希釈した。コントロールとして **10k** を溶解させるのに用いた量と同量の DMSO を用いた。腫瘍の大きさについては、ノギスを用いて週 2 回、4 週間測定し、腫瘍体積を (直径 \times 短径²) \times 0.5 として算出した。腫瘍重量は 4 週間の治療後に測定した。

統計解析

データは、特に断りのない限り、平均値 \pm 標準偏差 (SD) で表示した。統計解析は BellCurve for Excel (Social Survey Research Information Co., Ltd. 東京, 日本) を用いて行った。*in vitro* 試験では Dunnett の多重比較検定を用い、膠芽腫幹細胞を用いた *in vivo* 試験では、Kaplan-Meier 法による生存曲線の有意差の判定に log-rank 検定を用い、異種移植アッセイでは 2 群の比較に Mann-Whitney U 検定を用い、それぞれ P 値を算出した。P 値が 0.05 未満であるとき、統計学的に有意差があるとみなした。

併用効果は、**10k** の 25, 50, 100 nM と TMZ の 12.5, 25, 50 μ M において、isobologram 解析により評価し、併用指標を CalcuSyn 2.11 software (Biosoft, Cambridge, U.K.) を用いた combination index (CI) 値により評価した。CI 値が $0.9 < CI$ 、 $0.9 \leq CI \leq 1.1$ 、 $CI < 1.1$ をそれぞれ相乗的、相加的、拮抗的とみなした。

第二章の実験

試薬

JCI-20679, **10k** および **16a-1** は DMSO (ナカライテスク株式会社製, 京都, 日本) に溶解した。

細胞培養

A549 細胞 (ATCC, Manassas, VA, USA) を、10% FBS および 1% ペニシリン-ストレプトマイシン溶液 (和光純薬工業, 大阪, 日本) を添加した DMEM (和光純薬工業, 大阪, 日本) 中、5% CO₂、37 °C の条件下にて培養した。

細胞増殖アッセイ

ヒト肺がん A549 細胞を 96 well plate に 1×10^3 cells/well で播種し、JCI-20679、**10k** または **16a-1** が 500 nM の最終濃度となるように調製した培養液 (0.05% DMSO 含有) を添加した。また、それらと同量の DMSO を含む培養液をコントロールとして用いた。溶液添加後 3 日目に SF キット (ナカライテスク株式会社製, 京都, 日本) を用いて細胞増殖を評価した。450 nm での吸光度を SYNERGY HT (BioTek Instruments, Inc. Winooski, VT, USA) で測定し、DMSO で処理した細胞を対照とした。

トリパンブルー色素排出法

ヒト肺がん A549 細胞を 6 well plate に 5×10^4 cells/well で播種し、**16c** が 100 nM – 2 μM の最終濃度となるように調製した培養液 (0.05% DMSO 含有) を添加した。また、それらと同量の DMSO を含む培養液をコントロールとして用いた。化合物添加後 3 日目にトリプシン処理し、500 μL の細胞懸濁液として調製した。トリパンブルー染色陽性を死細胞、陰性を生存細胞として Countess II automated cell counter (Invitrogen, Carlsbad, CA) を用いて生細胞数を計測した。

ウェスタンブロット分析

SDS buffer (50 mM Tris-HCl, 1% SDS) にプロテアーゼ阻害剤 (ナカライテスク株式会社製, 京都, 日本) および PhosSTOP EASYpack (Roche Diagnostics, IN) を添加した溶液に細胞を溶解させ、氷冷下で超音波を用いて破砕した。溶解液を 4 °C、20,000 × g にて 45 分間遠心分離し、上清に含まれる可溶性タンパク質を回収した。タンパク質溶解液の濃度を Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher) を用いて測定した。タンパク質を溶解した溶媒を用いて希釈し、タンパク濃度を均一にしたサンプル 20 μL に Sample Buffer (125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% グリセロール, 10% 2-メルカプトエタノール, 0.04% ブロモフェノールブルー) を加え、95 °C で 5 分間熱変性を行った。10% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE 法を用いて分離し S セミドライ式転写装置 (170 mA/gel, 90 分間) もしくは wet 式転写装置 (350 mA/gel, 60 分間) を用いて分離したタンパク質を PVDF メンブレン (Millipore, Billerica, MA) に転写した。転写されたメンブレンは、5% スキムミルク含有 0.05% Tween 20 を添加した TBS-T または Blocking

One-P (ナカライテスク株式会社製, 京都, 日本) でブロッキングし、一次抗体および二次抗体とインキュベートした。抗体と反応させた後、TBS-T を用いて 3 回、TBS を用いて 2 回洗浄した。Clarity Western ECL substrate (170-5060, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) または ChemiLumi One Supe substrate (02230-30, Nacalai Tesque) と反応させた後、ChemiDoc XRS Plus system (Bio-Rad) を用いて検出した。

以下の抗体を使用した：p-AMPK α (1:1000; #2535, Cell Signaling Technology, Danvers, MA)、GAPDH (1:1000; 016-25523, 和光純薬工業, 大阪, 日本)、horseradish peroxidase-conjugated horse anti-mouse IgG (1:2000; PI-2000, Vector Laboratories, Burlingame, CA)、および HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:2000; #7074, Cell Signaling Technology)。

ヒト肺がん A549 細胞移植モデルマウスを用いた抗腫瘍活性評価

CB17 SCID マウス (6~8 週齢) を日本 SLC (静岡, 日本) から購入した。A549 細胞 (1×10^6 個) をマトリゲルと PBS (1:1, Corning, NY) の 100 μ L の細胞懸濁液を調製し、麻酔下にて体幹下側に移植した。**16c** を DMSO に 15 mg/mL で溶解し 7.5% Kolliphor EL (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) 含有生理食塩水を用いて必要な濃度まで希釈した。**16c** を溶解させるのに用いた量と同量の DMSO をコントロール群として使用した。A549 細胞移植の翌日から 4 週間にわたり、週に 3 回、DMSO のみまたは **16c** (15 mg/kg) を腹腔内に投与した (合計 200 μ L/体重 20 g)。腫瘍の大きさについては、ノギスを用いて週に 1 回、4 週間測定し、腫瘍体積を (直径 \times 短径 2) $\times 0.5$ として算出した。

統計解析

データは、特に断りのない限り、平均値 \pm 標準偏差 (SD) で表示した。すべての分析データは、少なくとも 3 つの独立した実験から得た。統計解析は BellCurve for Excel (Social Survey Research Information Co., Ltd. 東京, 日本) を用いて行った。*in vitro* 試験では Dunnet の多重比較検定を用い、*in vivo* 試験では 2 群の比較に両側 student の t-検定を用い、それぞれ P 値を算出した。P 値が 0.05 未満であるとき、統計学的に有意差があるとみなした。

引用文献

- (1) 厚生労働省 令和4年度(2022)人口動態統計月報年計(概数)の概況.
- (2) Warburg, O.; Wind, F.; Negelein, E. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J. Gen. Physiol.* **1927**, *8* (6), 519–530.
- (3) Aft, R. L.; Zhang, F. W.; Gius, D. Evaluation of 2-Deoxy-D-Glucose as a Chemotherapeutic Agent: Mechanism of Cell Death. *Br. J. Cancer* **2002**, *87* (7), 805–812.
- (4) Farge, T.; Saland, E.; De Toni, F.; Aroua, N.; Hosseini, M.; Perry, R.; Bosc, C.; Sugita, M.; Stuani, L.; Fraisse, M.; Scotland, S.; Larrue, C.; Boutzen, H.; Féliu, V.; Nicolau-Travers, M.-L.; Cassant-Sourdy, S.; Broin, N.; David, M.; Serhan, N.; Sarry, A.; Tavitian, S.; Kaoma, T.; Vallar, L.; Iacovoni, J.; Linares, L. K.; Montersino, C.; Castellano, R.; Griessinger, E.; Collette, Y.; Duchamp, O.; Barreira, Y.; Hirsch, P.; Palama, T.; Gales, L.; Delhommeau, F.; Garmy-Susini, B. H.; Portais, J.-C.; Vergez, F.; Selak, M.; Danet-Desnoyers, G.; Carroll, M.; Récher, C.; Sarry, J.-E. Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discovery* **2017**, *7* (7), 716–735.
- (5) Lee, K.; Giltnane, J. M.; Balko, J. M.; Schwarz, L. J.; Guerrero-Zotano, A. L.; Hutchinson, K. E.; Nixon, M. J.; Estrada, M. V.; Sánchez, V.; Sanders, M. E.; Lee, T.; Gómez, H.; Lluch, A.; Pérez-Fidalgo, J. A.; Wolf, M. M.; Andrejeva, G.; Rathmell, J. C.; Fesik, S. W.; Arteaga, C. L. MYC and MCL1 Cooperatively Promote Chemotherapy-Resistant Breast Cancer Stem Cells via Regulation of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *Cell Metab.* **2017**, *26* (4), 633–647.e7.
- (6) McCann, E.; O’Sullivan, J.; Marcone, S. Targeting Cancer-Cell Mitochondria and Metabolism to Improve Radiotherapy Response. *Transl. Oncol.* **2021**, *14* (1), 100905.
- (7) Bedi, M.; Ray, M.; Ghosh, A. Active Mitochondrial Respiration in Cancer: A Target for the Drug. *Mol. Cell. Biochem.* **2022**, *477* (2), 345–361.
- (8) Bueno, M. J.; Ruiz-Sepulveda, J. L.; Quintela-Fandino, M. Mitochondrial Inhibition: A Treatment Strategy in Cancer? *Curr. Oncol. Rep.* **2021**, *23* (4), 49.
- (9) Sica, V.; Bravo-San Pedro, J. M.; Stoll, G.; Kroemer, G. Oxidative Phosphorylation as a Potential Therapeutic Target for Cancer Therapy. *Int. J. Cancer* **2020**, *146* (1), 10–17.
- (10) Roberts, A.; Huang, D. Targeting BCL2 With BH3 Mimetics: Basic Science and Clinical Application of Venetoclax in Chronic Lymphocytic Leukemia and Related B Cell Malignancies. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2017**, *101* (1), 89–98.
- (11) Frampton, J. E. Darinaparsin: First Approval. *Drugs* **2022**, *82* (16), 1603–1609.
- (12) Zhao, B.; Luo, J.; Yu, T.; Zhou, L.; Lv, H.; Shang, P. Anticancer Mechanisms of Metformin: A Review of the Current Evidence. *Life Sciences* **2020**, *254*, 117717.

- (13) Sarbadhikary, P.; George, B. P. A Review on Traditionally Used African Medicinal Plant *Annickia Chlorantha*, Its Phytochemistry, and Anticancer Potential. *Plants* **2022**, *11* (17), 2293.
- (14) Neske, A.; Hidalgo, J. R.; Cabedo, N.; Cortes, D. Acetogenins from Annonaceae Family. Their Potential Biological Applications. *Phytochemistry* **2020**, *174*, 112332.
- (15) Tempesta, M. S.; Kriek, G. R.; Bates, R. B. Uvaricin, a New Antitumor Agent from *Uvaria Accuminata* (Annonaceae). *J. Org. Chem.* **1982**, *47* (16), 3151–3153.
- (16) Yong-Fu, X.; McArdle, J. J. Activation of Protein Kinase a Partially Reverses the Effects of 2,3-Butanedione Monoxime on the Transient Outward K⁺ Current of Rat Ventricular Myocytes. *Life Sci.* **1995**, *57* (4), 335–343.
- (17) Wolvetang, E. J.; Johnson, K. L.; Krauer, K.; Ralph, S. J.; Linnane, A. W. Mitochondrial Respiratory Chain Inhibitors Induce Apoptosis. *FEBS Lett.* **1994**, *339* (1–2), 40–44.
- (18) Nakanishi, S.; Abe, M.; Yamamoto, S.; Murai, M.; Miyoshi, H. Bis-THF Motif of Acetogenin Binds to the Third Matrix-Side Loop of ND1 Subunit in Mitochondrial NADH-Ubiquinone Oxidoreductase. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2011**, *1807* (9), 1170–1176.
- (19) Grba, D. N.; Blaza, J. N.; Bridges, H. R.; Agip, A.-N. A.; Yin, Z.; Murai, M.; Miyoshi, H.; Hirst, J. Cryo-Electron Microscopy Reveals How Acetogenins Inhibit Mitochondrial Respiratory Complex I. *J. Biol. Chem.* **2022**, *298* (3), 101602.
- (20) Li, N.; Shi, Z.; Tang, Y.; Chen, J.; Li, X. Recent Progress on the Total Synthesis of Acetogenins from Annonaceae. *Beilstein J. Org. Chem.* **2008**, *4*, No. 48.
- (21) Kojima, N.; Tanaka, T. Medicinal Chemistry of *Annonaceous* Acetogenins: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel Analogues. *Molecules* **2009**, *14* (9), 3621–3661.
- (22) Abe, M.; Kubo, A.; Yamamoto, S.; Hatoh, Y.; Murai, M.; Hattori, Y.; Makabe, H.; Nishioka, T.; Miyoshi, H. Dynamic Function of the Spacer Region of Acetogenins in the Inhibition of Bovine Mitochondrial NADH-Ubiquinone Oxidoreductase (Complex I) †. *Biochemistry* **2008**, *47* (23), 6260–6266.
- (23) Abe, M.; Murai, M.; Ichimaru, N.; Kenmochi, A.; Yoshida, T.; Kubo, A.; Kimura, Y.; Moroda, A.; Makabe, H.; Nishioka, T.; Miyoshi, H. Dynamic Function of the Alkyl Spacer of Acetogenins in Their Inhibitory Action with Mitochondrial Complex I (NADH-Ubiquinone Oxidoreductase). *Biochemistry* **2005**, *44* (45), 14898–14906.
- (24) Hoppen, S.; Emde, U.; Friedrich, T.; Grubert, L.; Koert, U. Natural-Product Hybrids: Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Quinone-Annonaceous Acetogenins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39* (12), 2099–2102.
- (25) Duval, R. A.; Lewin, G.; Peris, E.; Chahboune, N.; Garofano, A.; Dröse, S.; Cortes, D.; Brandt, U.; Hocquemiller, R. Heterocyclic Analogues of Squamocin as Inhibitors of

- Mitochondrial Complex I. On the Role of the Terminal Lactone of Annonaceous Acetogenins. *Biochemistry* **2006**, *45* (8), 2721–2728.
- (26) Duval, R.; Lewin, G.; Hocquemiller, R. Semisynthesis of Heterocyclic Analogues of Squamocin, a Cytotoxic Annonaceous Acetogenin, by an Unusual Oxidative Decarboxylation Reaction. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11* (16), 3439–3446.
- (27) Zeng, B.; Wu, Y.; Jiang, S.; Yu, Q.; Yao, Z.; Liu, Z.; Li, H.; Li, Y.; Chen, X.; Wu, Y. Studies on Mimicry of Naturally Occurring Annonaceous Acetogenins: Non-THF Analogues Leading to Remarkable Selective Cytotoxicity against Human Tumor Cells. *Chem. Eur. J.* **2003**, *9* (1), 282–290.
- (28) Han, B.; Cao, Y.; Li, Z.; Wu, Z.; Mao, Y.; Chen, H.; Yao, Z.; Wang, L. Annonaceous Acetogenin Mimic AA005 Suppresses Human Colon Cancer Cell Growth in Vivo through Downregulation of Mcl-1. *Acta Pharmacol. Sin.* **2019**, *40* (2), 231–242.
- (29) Yu, B.; Yuan, H.; Chen, Y.; Zhou, D.; Gan, Z.; Wang, J.; Li, J.; Yao, Z. Annonaceous Acetogenin Mimic AA005 Inhibits the Growth of TNBC MDA-MB-468 Cells by Altering Cell Energy Metabolism. *ChemBioChem* **2022**, *23* (16), e202200250.
- (30) Sasaki, S.; Maruta, K.; Naito, H.; Maemura, R.; Kawahara, E.; Maeda, M. Novel Acyclic Ligands for Metal Cations Based on the Adjacent Bistetrahydrofuran as Analogs of Natural Annonaceous Acetogenins. *Tetrahedron* **1998**, *54* (11), 2401–2410.
- (31) Sasaki, S. New Calcium-Selective Electrodes Based on Annonaceous Acetogenins and Their Analogs with Neighboring Bistetrahydrofuran. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *36* (31), 5571–5574.
- (32) Sasaki, S.; Naito, H.; Maruta, K.; Kawahara, E.; Maeda, M. Novel Calcium Ionophores: Supramolecular Complexation by the Hydroxylated-Bistetrahydrofuran Skeleton of Potent Antitumor Annonaceous Acetogenins. *Tetrahedron Lett.* **1994**, *35* (20), 3337–3340.
- (33) Liaw, C.; Liao, W.; Chen, C.; Jao, S.; Wu, Y.; Shen, C.; Wu, S. The Calcium-Chelating Capability of Tetrahydrofuranic Moieties Modulates the Cytotoxicity of Annonaceous Acetogenins. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (34), 7885–7891.
- (34) Yao, Z.-J.; Wu, H.-P.; Wu, Y.-L. Polyether Mimics of Naturally Occurring Cytotoxic Annonaceous Acetogenins. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (12), 2484–2487.
- (35) Chen, Y.; Chen, J.; Zhai, J.; Wang, Y.; Wang, S.; Li, X. Antitumor Activity and Toxicity Relationship of Annonaceous Acetogenins. *Food Chem. Toxicol.* **2013**, *58*, 394–400.
- (36) Murai, M.; Miyoshi, H. Current Topics on Inhibitors of Respiratory Complex I. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **2016**, *1857* (7), 884–891.
- (37) Kumar, H. M. S.; Herrmann, L.; Tsogoeva, S. B. Structural Hybridization as a Facile Approach to New Drug Candidates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30* (23), 127514.

- (38) Bérubé, G. An Overview of Molecular Hybrids in Drug Discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **2016**, *11* (3), 281–305.
- (39) Nepali, K.; Sharma, S.; Sharma, M.; Bedi, P. M. S.; Dhar, K. L. Rational Approaches, Design Strategies, Structure Activity Relationship and Mechanistic Insights for Anticancer Hybrids. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *77*, 422–487.
- (40) Nakanishi, Y.; Chang, F.-R.; Liaw, C.-C.; Wu, Y.-C.; Bastow, K. F.; Lee, K.-H. Acetogenins as Selective Inhibitors of the Human Ovarian 1A9 Tumor Cell Line. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (15), 3185–3188.
- (41) Sinha, S. C.; Keinan, E. Total Synthesis of Naturally Occurring Acetogenins: Solamin and Reticulatacin. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115* (11), 4891–4892.
- (42) Myint, S. H.; Cortes, D.; Laurens, A.; Hocquemiller, R.; Lebeuf, M.; Cavé, A.; Cotte, J.; Quéro, A.-M. Solamin, a Cytotoxic Mono-Tetrahydrofuranic γ -Lactone Acetogenin from *Annona Muricata* Seeds. *Phytochemistry* **1991**, *30* (10), 3335–3338.
- (43) Kojima, N.; Fushimi, T.; Maezaki, N.; Tanaka, T.; Yamori, T. Synthesis of Hybrid Acetogenins, α,β -Unsaturated- γ -Lactone-Free Nitrogen-Containing Heterocyclic Analogues, and Their Cytotoxicity against Human Cancer Cell Lines. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (5), 1637–1641.
- (44) Kojima, N.; Fushimi, T.; Tatsukawa, T.; Yoshimitsu, T.; Tanaka, T.; Yamori, T.; Dan, S.; Iwasaki, H.; Yamashita, M. Structure–Activity Relationships of Hybrid Annonaceous Acetogenins: Powerful Growth Inhibitory Effects of Their Connecting Groups between Heterocycle and Hydrophobic Carbon Chain Bearing THF Ring on Human Cancer Cell Lines. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 833–839.
- (45) Ohta, K.; Fushimi, T.; Okamura, M.; Akatsuka, A.; Dan, S.; Iwasaki, H.; Yamashita, M.; Kojima, N. Structure–Antitumor Activity Relationship of Hybrid Acetogenins Focusing on Connecting Groups between Heterocycles and the Linker Moiety. *RSC Adv.* **2022**, *12* (25), 15728–15739.
- (46) Kojima, N.; Fushimi, T.; Tatsukawa, T.; Tanaka, T.; Okamura, M.; Akatsuka, A.; Yamori, T.; Dan, S.; Iwasaki, H.; Yamashita, M. Thiophene-3-Carboxamide Analogue of Annonaceous Acetogenins as Antitumor Drug Lead. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *86*, 684–689.
- (47) Ando, S.; Kojima, N.; Moyama, C.; Fujita, M.; Ohta, K.; Ii, H.; Nakata, S. JCI-20679 Suppresses the Proliferation of Glioblastoma Stem Cells by Activating AMPK and Decreasing NFATc2 Expression Levels. *Mol. Med. Rep.* **2022**, *26* (1), 238.
- (48) Ando, S.; Moyama, C.; Kojima, N.; Fujita, M.; Ohta, K.; Kohno, Y.; Ii, H.; Nakata, S. JCI-20679 Suppresses Autophagy and Enhances Temozolomide-Mediated Growth Inhibition of Glioblastoma Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2022**, *591*, 62–67.

- (49) Kojima, N.; Suga, Y.; Matsumoto, T.; Tanaka, T.; Akatsuka, A.; Yamori, T.; Dan, S.; Iwasaki, H.; Yamashita, M. Synthesis of Dansyl-Labeled Probe of Thiophene Analogue of Annonaceous Acetogenins for Visualization of Cell Distribution and Growth Inhibitory Activity toward Human Cancer Cell Lines. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23* (6), 1276–1283.
- (50) Akatsuka, A.; Kojima, N.; Okamura, M.; Dan, S.; Yamori, T. A Novel Thiophene-3-Carboxamide Analog of Annonaceous Acetogenin Exhibits Antitumor Activity via Inhibition of Mitochondrial Complex I. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2016**, *4* (4), e00246.
- (51) Liu, Y.-Q.; Cheng, X.; Guo, L.-X.; Mao, C.; Chen, Y.-J.; Liu, H.-X.; Xiao, Q.-C.; Jiang, S.; Yao, Z.-J.; Zhou, G.-B. Identification of an Annonaceous Acetogenin Mimetic, AA005, as an AMPK Activator and Autophagy Inducer in Colon Cancer Cells. *PLoS ONE* **2012**, *7* (10), e47049.
- (52) Marenco-Hillebrand, L.; Wijesekera, O.; Suarez-Meade, P.; Mampre, D.; Jackson, C.; Peterson, J.; Trifiletti, D.; Hammack, J.; Ortiz, K.; Lesser, E.; Spiegel, M.; Prevatt, C.; Hawayek, M.; Quinones-Hinojosa, A.; Chaichana, K. L. Trends in Glioblastoma: Outcomes over Time and Type of Intervention: A Systematic Evidence Based Analysis. *J. Neuro-Oncol.* **2020**, *147* (2), 297–307.
- (53) Stupp, R.; Mason, W. P.; van den Bent, M. J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M. J. B.; Belanger, K.; Brandes, A. A.; Marosi, C.; Bogdahn, U.; Curschmann, J.; Janzer, R. C.; Ludwin, S. K.; Gorlia, T.; Allgeier, A.; Lacombe, D.; Cairncross, J. G.; Eisenhauer, E.; Mirimanoff, R. O. Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *352* (10), 987–996.
- (54) Kitange, G. J.; Carlson, B. L.; Schroeder, M. A.; Grogan, P. T.; Lamont, J. D.; Decker, P. A.; Wu, W.; James, C. D.; Sarkaria, J. N. Induction of MGMT Expression Is Associated with Temozolomide Resistance in Glioblastoma Xenografts. *Neuro-Oncology* **2009**, *11* (3), 281–291.
- (55) Ou, A.; Yung, W. K. A.; Majd, N. Molecular Mechanisms of Treatment Resistance in Glioblastoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22* (1), 351.
- (56) Yamashiro, K.; Nakao, K.; Ohba, S.; Hirose, Y. Human Glioma Cells Acquire Temozolomide Resistance After Repeated Drug Exposure *Via* DNA Mismatch Repair Dysfunction. *Anticancer Res.* **2020**, *40* (3), 1315–1323.
- (57) Stark, A. M.; Doukas, A.; Hugo, H.-H.; Hedderich, J.; Hattermann, K.; Maximilian Mehdorn, H.; Held-Feindt, J. Expression of DNA Mismatch Repair Proteins MLH1, MSH2, and MSH6 in Recurrent Glioblastoma. *Neurol. Res.* **2015**, *37* (2), 95–105.
- (58) Shinsato, Y.; Furukawa, T.; Yunoue, S.; Yonezawa, H.; Minami, K.; Nishizawa, Y.; Ikeda, R.; Kawahara, K.; Yamamoto, M.; Hirano, H.; Tokimura, H.; Arita, K. Reduction

- of MLH1 and PMS2 Confers Temozolomide Resistance and Is Associated with Recurrence of Glioblastoma. *Oncotarget* **2013**, *4* (12), 2261–2270.
- (59) Motoyama, T.; Yabunaka, H.; Miyoshi, H. Essential Structural Factors of Acetogenins, Potent Inhibitors of Mitochondrial Complex I. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2002**, *12* (16), 2089–2092.
- (60) Barrachina, I.; Royo, I.; Baldoni, H. A.; Chahboune, N.; Suvire, F.; DePedro, N.; Zafra-Polo, M. C.; Bermejo, A.; El Aouad, N.; Cabedo, N.; Saez, J.; Tormo, J. R.; Enriz, R. D.; Cortes, D. New Antitumoral Acetogenin ‘Guanacone Type’ Derivatives: Isolation and Bioactivity. Molecular Dynamics Simulation of Diacetyl-Guanacone. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (13), 4369–4381.
- (61) Reil, E.; Höfle, G.; Draber, W.; Oettmeier, W. Quinolones and Their N-Oxides as Inhibitors of Mitochondrial Complexes I and III. *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.* **1997**, *1318* (1–2), 291–298.
- (62) Ohta, K.; Akatsuka, A.; Dan, S.; Iwasaki, H.; Yamashita, M.; Kojima, N. Structure–Activity Relationships of Thiophene Carboxamide Annonaceous Acetogenin Analogs: Shortening the Alkyl Chain in the Tail Part Significantly Affects Their Growth Inhibitory Activity against Human Cancer Cell Lines. *Chem. Pharm. Bull.* **2021**, *69* (10), 1029–1033.
- (63) Kan, T.; Kita, Y.; Morohashi, Y.; Tominari, Y.; Hosoda, S.; Tomita, T.; Natsugari, H.; Iwatsubo, T.; Fukuyama, T. Convenient Synthesis of Photoaffinity Probes and Evaluation of Their Labeling Abilities. *Org. Lett.* **2007**, *9* (11), 2055–2058.
- (64) Chou, T.-C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Res.* **2010**, *70* (2), 440–446.
- (65) Chou, T.-C. Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies. *Pharmacol. Rev.* **2006**, *58* (3), 621–681.
- (66) Moyama, C.; Fujita, M.; Ando, S.; Taniguchi, K.; Ii, H.; Tanigawa, S.; Nakata, S. Stat5b Inhibition Blocks Proliferation and Tumorigenicity of Glioblastoma Stem Cells Derived from a *de Novo* Murine Brain Cancer Model. *Am. J. Cancer Res.* **2022**, *12* (3), 1129–1142.
- (67) Tanigawa, S.; Fujita, M.; Moyama, C.; Ando, S.; Ii, H.; Kojima, Y.; Fujishita, T.; Aoki, M.; Takeuchi, H.; Yamanaka, T.; Takahashi, Y.; Hashimoto, N.; Nakata, S. Inhibition of Gli2 Suppresses Tumorigenicity in Glioblastoma Stem Cells Derived from a *de Novo* Murine Brain Cancer Model. *Cancer Gene Ther.* **2021**, *28* (12), 1339–1352.
- (68) Wiesner, S. M.; Decker, S. A.; Larson, J. D.; Ericson, K.; Forster, C.; Gallardo, J. L.; Long, C.; Demorest, Z. L.; Zamora, E. A.; Low, W. C.; SantaCruz, K.; Largaespada, D.

- A.; Ohlfest, J. R. *De Novo* Induction of Genetically Engineered Brain Tumors in Mice Using Plasmid DNA. *Cancer Res.* **2009**, *69* (2), 431–439.
- (69) Cheng, I.; Le, G. M.; Noone, A.-M.; Gali, K.; Patel, M.; Haile, R. W.; Wakelee, H. A.; Gomez, S. L. Lung Cancer Incidence Trends by Histology Type among Asian American, Native Hawaiian, and Pacific Islander Populations in the United States, 1990–2010. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2014**, *23* (11), 2250–2265.
- (70) Batra, U.; Biswas, B.; Prabhash, K.; Krishna, M. V. Differential Clinicopathological Features, Treatments and Outcomes in Patients with Exon 19 Deletion and Exon 21 L858R EGFR Mutation-Positive Adenocarcinoma Non-Small-Cell Lung Cancer. *BMJ Open Respir. Res.* **2023**, *10* (1), e001492.
- (71) Lin, Z.; Li, J.; Zhang, J.; Feng, W.; Lu, J.; Ma, X.; Ding, W.; Ouyang, S.; Lu, J.; Yue, P.; Wan, G.; Liu, P.; Zhang, X. Metabolic Reprogramming Driven by IGF2BP3 Promotes Acquired Resistance to EGFR Inhibitors in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* **2023**, *83* (13), 2187–2207.
- (72) Barrios-Bernal, P.; Hernandez-Pedro, N.; Orozco-Morales, M.; Viedma-Rodríguez, R.; Lucio-Lozada, J.; Avila-Moreno, F.; Cardona, A. F.; Rosell, R.; Arrieta, O. Metformin Enhances TKI-Afatinib Cytotoxic Effect, Causing Downregulation of Glycolysis, Epithelial–Mesenchymal Transition, and EGFR-Signaling Pathway Activation in Lung Cancer Cells. *Pharmaceuticals* **2022**, *15* (3), 381.
- (73) Das, A.; Petkau-Milroy, K.; Klerks, G.; van Genabeek, B.; Lafleur, R. P. M.; Palmans, A. R. A.; Meijer, E. W. Consequences of Dispersity on the Self-Assembly of ABA-Type Amphiphilic Block Co-Oligomers. *ACS Macro Lett.* **2018**, *7* (5), 546–550.
- (74) Kayal, H.; Ahmida, M. M.; Dufour, S.; Taing, H.; Eichhorn, S. H. Cross-Linking of Discotic Tetraazaporphyrin Dyes in 2 and 3 Dimensions by “Click” Chemistry. *J. Mater. Chem. C* **2013**, *1* (42), 7064–7072.
- (75) Alvarez, M.; Granados, R.; Mauleon, D.; Rosell, G.; Salas, M.; Salles, J.; Valls, N. Structure-Activity Relationships among Di- and Tetramine Disulfides Related to Benextramine. *J. Med. Chem.* **1987**, *30* (7), 1186–1193.
- (76) Ögünç Keçeci, Y.; İncesu, Z. Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Became Functional under Aglycemic Hypoxia Conditions in A549 Cells. *Mol. Biol. Rep.* **2022**, *49* (9), 8219–8228.
- (77) Hosomi, H.; Akatsuka, A.; Dan, S.; Iwasaki, H.; Nambu, H.; Kojima, N. Synthesis of Acetogenin Analogs Comprising Pyrimidine Moieties Linked by Amine Bonds and Their Inhibitory Activity against Human Cancer Cell Lines. *Chem. Pharm. Bull.* **2022**, *70* (11), 823–826.
- (78) Shao, J.; Zhang, A.; Qin, W.; Zheng, L.; Zhu, Y.; Chen, X. AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) Activation Is Involved in Chrysin-Induced Growth Inhibition and

- Apoptosis in Cultured A549 Lung Cancer Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *423* (3), 448–453.
- (79) Romuald, C.; Cazals, G.; Enjalbal, C.; Coutrot, F. Straightforward Synthesis of a Double-Lasso Macrocycle from a Nonsymmetrical [C2]Daisy Chain. *Org. Lett.* **2013**, *15* (1), 184–187.
- (80) Yoon, Y.-S.; Sohn, H.-S.; Lee, J.-C. Amphiphilic Polythiophene for the Formation of Gold Nanowire Networks. *Polymer* **2009**, *50* (6), 1395–1402.
- (81) Wissner, A.; Kohler, C. A.; Goldstein, B. M. Analogs of Platelet Activating Factor. 5. Multiple Oxygen Substitution of the Alkoxy Chain. *J. Med. Chem.* **1986**, *29* (7), 1315–1319.
- (82) Liu, G.; Reinhout, M.; Mainguy, B.; Baker, G. L. Synthesis, Structure, and Ionic Conductivity of Self-Assembled Amphiphilic Poly(Methacrylate) Comb Polymers. *Macromolecules* **2006**, *39* (14), 4726–4734.
- (83) *Jp Pat.*, JP2011032403.A, 2011.

論 文 目 録

1. 学位論文の基礎となる報文の著者名、題目、印刷・公表の方法、その時期および該当する章・節

Kaito Ohta, Hiromi Ii, Chiami Moyama, Shota Ando, Hisanori Nambu, Susumu Nakata, Naoto Kojima. Thiophene carboxamide analogs with long alkyl chains comprising ethylene glycol units inhibit glioblastoma cell proliferation by activating AMPK. *J. Med. Chem.* **2023**, 66, 6403–6413.
[第一章、第二章]