

がん微小環境におけるストレス応答を標的とする  
ビグアニド誘導体の創薬化学的研究

成瀬 康介

## 目次

### 理論の部

緒言	1
著者の研究方針	5
第一章 ビグアニド誘導体に関する HIF-1 転写活性化阻害、UPR 活性化阻害および低栄養選択的細胞毒性の構造活性相関	7
第一節 分子設計	7
第二節 合成	8
第一項 リンカー鎖長に関するビグアニド誘導体の合成	8
第二項 塩基性部位に関するフェネチル誘導体の合成	9
第三項 疎水性部位に関するビグアニド誘導体の合成	13
第三節 構造活性相関	17
第一項 低酸素ストレス応答と小胞体ストレス応答	17
第二項 評価系の構築	20
第三項 リンカー鎖長に関する評価	25
第四項 塩基性部位に関する評価	26
第五項 芳香環における置換基効果の評価	29
小括及び考察	34
第二章 ビグアニド誘導体の生物活性	36
第一節 低栄養選択的細胞毒性	36
第一項 低栄養および低酸素選択的細胞毒性	36
第二項 p53 発現の影響	38
第二節 HIF-1 $\alpha$ タンパク質発現阻害	41

第三節 GRP78 タンパク質発現阻害.....	42
第四節 血管新生阻害作用 .....	43
第一項 VEGF タンパク質分泌阻害 .....	43
第二項 鶏卵漿尿膜 (CAM) 法による血管新生阻害能の評価 .....	44
小括 .....	46
総括および結論 .....	47
謝辞 .....	49

## 実験の部

実験の部.....	50
有機合成における General Procedure.....	52
第一章第二節第一項に関する研究 .....	52
第一章第二節第二項に関する研究 .....	57
第一章第二節第三項に関する研究 .....	63
生物学的評価における General Procedure.....	75
第一章第三節第二項に関する研究 .....	76
第一章第三節第三～五項に関する研究 .....	77
第二章第一節に関する研究 .....	77
第二章第二節に関する研究 .....	78
第二章第三節に関する研究 .....	78
第二章第四節第一項に関する研究 .....	79
第二章第四節第二項に関する研究 .....	80
Abbreviation list .....	81
引用文献 .....	83
主論文の基礎となる公表論文 .....	88

## 理論の部

## 緒言

### 目的

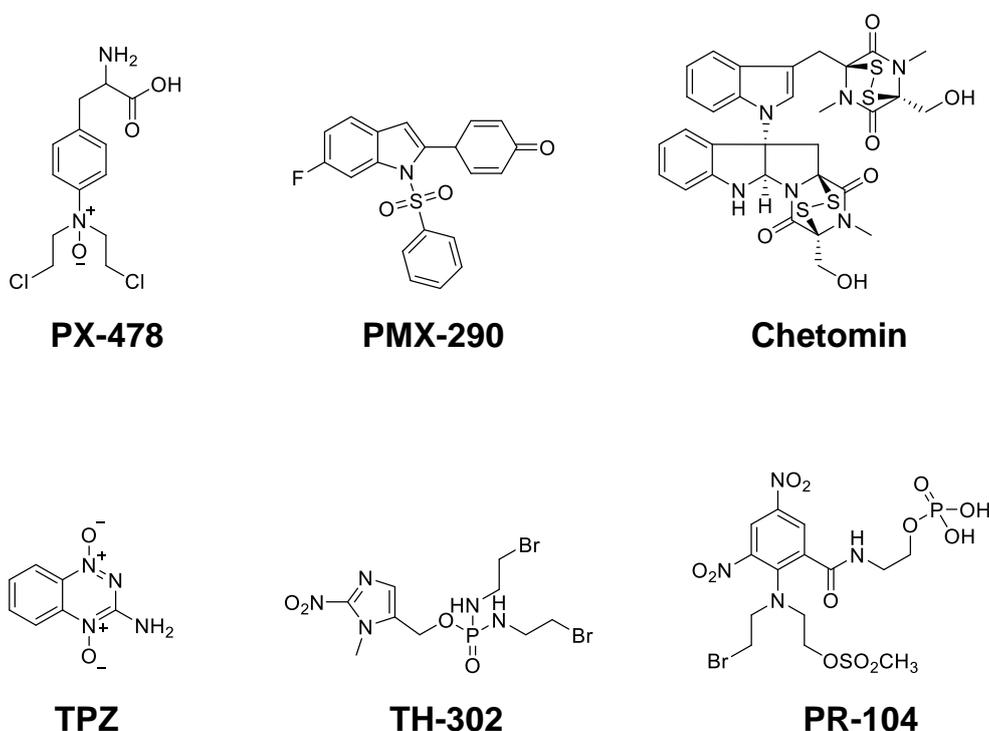
日本における死亡原因の約 1/3 はがんであり、現代の高齢化社会においては、がんはほとんどの人が避けられない病気であるといえる。近年のがん罹患率の上昇と患者の高齢化に伴い、腫瘍選択性が高く、予後の改善や再発予防を考慮した高い quality of life (QOL) を可能とする治療戦略が強く求められている。抗がん薬開発の潮流は、従来の遺伝子毒性に基づく細胞毒性物質 (cytotoxic drug) から、がん細胞特異的に発現するキナーゼなどの特定のタンパク質を標的とした分子標的薬開発へと転換してきている。これに伴い、ゲノム診断による個別化医療・診断薬の開発も進められてきた。分子標的薬の臨床開発のスピードは、これまでの抗がん剤の開発スピードの概念を覆すほどであり、がんの分子標的薬が今後のがん化学療法を中心を占めていくことは疑いようがない。しかしながら、その特異性は完全ではないケースや、重篤な副作用、一旦奏功した後の耐性化なども問題になっており、現在もなお、従来の化学療法剤や放射線が重要な役割を担い、多剤併用や様々な治療法を組み合わせる集学的治療が試みられている。そこで著者は、がん治療における高い治療効果と副作用の低減を可能とする、新たながん治療薬の開発を目指し、研究を開始した。

### 従来の研究概要

腫瘍の発生・進展には血管新生が必須であるが、急激に増殖するがん細胞に対して十分な血管新生が伴わず、固形がん組織の血管系は無秩序で脆弱であるため、酸素や栄養の供給が不均一となり、がん組織内には低酸素、低栄養、アシドーシスなどのストレス環境が存在する。<sup>1-3</sup> そのようながん微小環境は、がん細胞の他にそれを取り巻く腫瘍血管、リンパ管、繊維芽細胞、免疫細胞、骨髄由来細胞などの間質細胞等の様々な細胞および細胞間基質から構成されている。がん細胞は劣悪ながん微小環境に対して、正常細胞とは異なる適応機構により生存を可能にしている。<sup>4-6</sup> また、がん微小環境に適応したがん細胞は、放射線や化学療法に対する治療抵抗性の獲得、悪性化、予後の不良、転移・再発などのリスク増大の要因になると考えられている。さらに、がんの増殖、浸潤、転移能は、がん細胞の持つ特性のみではなく、微小環境ストレス下におけるがん細胞の様々な適応応答系の相互作用が深く関わっていることや、がん幹細胞の幹細胞性の維持も微小環境が寄与していることが明らかにされてきた。<sup>7-10</sup>

低酸素誘導因子 (hypoxia inducible factor-1: HIF-1) は低酸素ストレスに応答して細胞内で活性化される転写因子であり、種々の低酸素ストレス応答遺伝子群の転写活性化を引き起こし、血管新生、解糖系代謝、転移・浸潤などが活性化されることが明らかになっている。<sup>2, 11</sup> よって、がん治療薬の開発において HIF シグナル経路は魅力的な腫瘍特

異的分子標的となると考えられ、今日までに、多くの HIF-1 関連遺伝子産物を対象とした分子標的薬剤や、低酸素環境特異的に細胞毒性を発揮する薬剤が開発されているが、<sup>12-17</sup> 臨床段階で確たる評価が得られず、未だに承認に至る薬剤はない (Figure 1)。

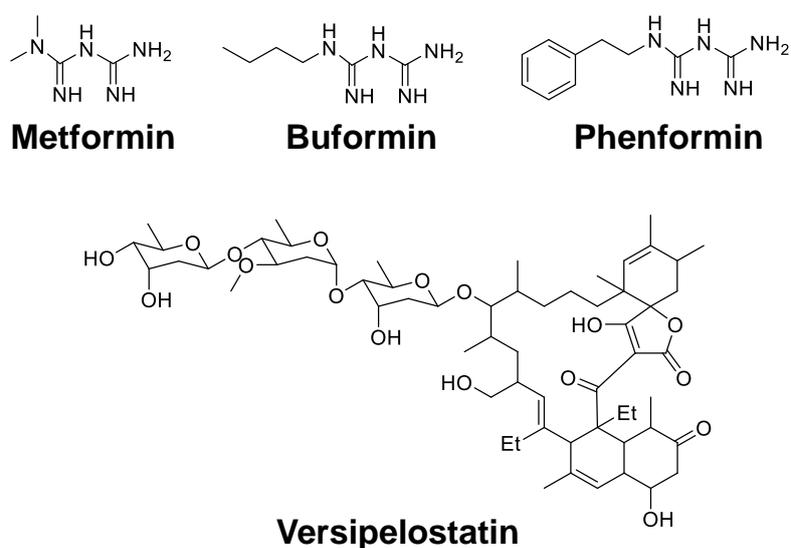


**Figure 1.** 報告されている HIF-1 阻害剤および低酸素毒性化合物

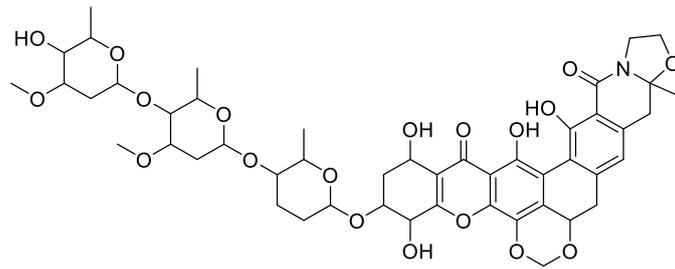
一方で、がん微小環境ストレス下にあるがん細胞では、小胞体ストレス応答 (unfolded protein response: UPR) が活性化しており、UPR 関連遺伝子や小胞体シャペロンが、がん細胞の生存や腫瘍の形成・増大に関与していることが明らかになってきている。UPR を標的とした治療は、がん細胞に特異的な効果が期待できると同時に、抗がん剤耐性の改善を目指した効果的な戦略になると考えられるが、今日まで、UPR 阻害剤の作用機序については徐々に明らかになってきているものの標的分子は明らかになっていない。<sup>18, 19</sup> これまでに、富田らのグループにより、放線菌由来の新規化合物 versipelostatin (VST)<sup>20</sup> や抗糖尿病薬 biguanide 系化合物の metformin, buformin, phenformin などの UPR 阻害作用<sup>21</sup>が見出されており、これらのグルコース飢餓特異的な細胞毒性も報告されている (Figure 2)。また、門田、江角らのグループは、膵がん細胞である PANC-1 細胞を用いた栄養飢餓耐性解除を指標としたスクリーニング法を開発し、これまでに、キガマイシン、アクチゲニン、ピルヴィニュームパモエートなどの化合物が見出されている。<sup>22-24</sup> これらに関しても標的分子は未だ明らかになっていないが、PI3K-AKT 経路に対す

る阻害活性や、グルコース欠乏時の低酸素下におけるフマル酸呼吸の阻害活性を見出し、<sup>25</sup> アクチゲニン、ピルヴィニュームパモエートについては UPR 阻害活性を有することも明らかとなっている。<sup>26, 27</sup> さらに、アクチゲニンを含む漢方生薬の牛蒡子の製剤が、膀胱がんを対象とした新薬として臨床試験に進んでいる (Figure 3)。

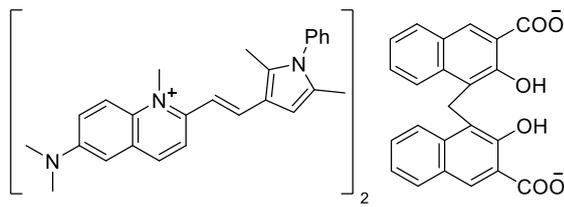
以上の研究背景より、がん微小環境に特徴的な適応機構として、HIF-1 阻害作用に加え、UPR 阻害作用やグルコース飢餓特異的な細胞毒性を有する化合物を開発できれば、腫瘍特異性に優れた新たながん治療薬になり、既存の抗がん剤との併用も視野に入れた戦略が展開できると考え、研究を開始した。



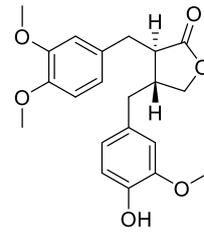
**Figure 2.** 報告されている UPR 阻害剤



**Kigamicin D**



**Pyrvinium pamoate**



**Arctigenin**

**Figure 3.** 報告されている栄養飢餓耐性解除薬

## 著者の研究方針

著者は、以上のような、がん微小環境ストレス応答に対して修飾作用を有する化合物を、『がん微小環境モジュレーター』と定義した。今回、リード化合物として、富田らのグループにより UPR 阻害作用及びグルコース飢餓特異的な細胞毒性が報告された抗糖尿病薬のビグアニド系化合物に着目した。<sup>21</sup> ビグアニド系糖尿病治療薬は 1950 年代に開発された後、一時重篤な副作用が問題となり使用されない時期があったものの、その後の「metformin の再評価」によって再び注目されるようになった。<sup>28</sup> さらに近年、症例研究などにより metformin 服用患者では、がんによる死亡・発がん率が有意に低いことが明らかになったことから<sup>13,14</sup> metformin の抗がん効果が注目されており、<sup>29-31</sup> がん細胞及びがん幹細胞の増殖抑制、<sup>32</sup> UPR 阻害、<sup>21</sup> 血管新生阻害効果<sup>33</sup> などが報告されている。一方、これまでにミトコンドリア呼吸鎖の抑制作用や LKB-1/adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) 経路を介したメカニズムなどが提唱されているが、作用機序や分子標的は未だに明らかとなっていない。<sup>32,34,35</sup> 以上のことから、ビグアニドは著者の目指す、がん微小環境モジュレーターのリード化合物として魅力的と考え、ビグアニドをリードとした誘導体合成をする。

次に、がん微小環境モジュレーターのスクリーニング及び構造活性相関研究に用いる、がん微小環境を模倣した *in vitro* スクリーニング評価系を構築する。低酸素あるいは低栄養ストレス負荷を行い、ルシフェラーゼアッセイによって低酸素・低栄養条件下において誘導される HIF-1 転写活性化、UPR 活性化への影響をそれぞれ評価する。低酸素応答ルシフェラーゼアッセイ系としては、すでに当研究室で構築している、HIF-1 が結合する hypoxia responsive element (HRE) をプロモーター領域に有する p2.1 プラスミドベクター<sup>36</sup> を HEK293 細胞に遺伝子導入し、安定発現株を樹立して構築したアッセイ系を用いる。低栄養応答ルシフェラーゼアッセイとしては、UPR 応答配列である ER stress responsive element (ERSE) を有する、pGRP78pro160-luc プラスミドベクター<sup>20</sup> を HEK293 細胞に導入して、安定発現株を樹立し、低栄養応答ルシフェラーゼアッセイ系を構築し、使用する。さらに、低酸素または低栄養ストレス条件における細胞毒性試験を構築・実施し、通常条件と比較してストレス条件においてより強い細胞毒性を示す選択性を評価・構造活性相関を考察するとともに、化合物をスクリーニングする。低酸素・低栄養、2 つのストレス適応応答を阻害し、ストレス条件下特異的に毒性を発揮する化合物は、複数の環境ストレス負荷のかかるがん微小環境においてのみ特異的に作用する優れた治療薬になり得ると考えられる。<sup>37</sup> 得られた候補化合物については、さらにストレス応答によって誘導されるタンパク質レベルでの発現に対する影響について、イムノブロット法あるいは ELISA によって評価する。最後に組織レベルのストレス適応応答として血管新生誘導に着目し、これに対する阻害作用について、鶏卵漿尿膜 (CAM) 法にて評

価する。

以下、得られた知見を各章に分けて論述する。

# 第一章

## ビグアニド誘導体に関する HIF-1 転写活性化阻害、UPR 活性化阻害

### および低栄養選択的細胞毒性の構造活性相関

#### 第一節 分子設計

がん微小環境モジュレーターのリード化合物として、富田らのグループにより UPR 阻害作用及びグルコース飢餓特異的な細胞毒性が報告された抗糖尿病薬の biguanide 系化合物、中でも最も強い作用が報告された phenformin に着目した。<sup>21</sup>phenformin は Figure 4 に示すように、塩基性部位であるビグアニド部位と疎水性部位であるベンゼン環をアルキレンリンカーを介して結合した構造を有している。そこで分子設計として、アルキレンリンカーの長さの変換、塩基性のビグアニド部位の窒素含有ヘテロ環やバイオイソスターへの変換、ベンゼン環への置換基導入、ベンゼン環からイソプロピル基やピリジル基への変換を行った。

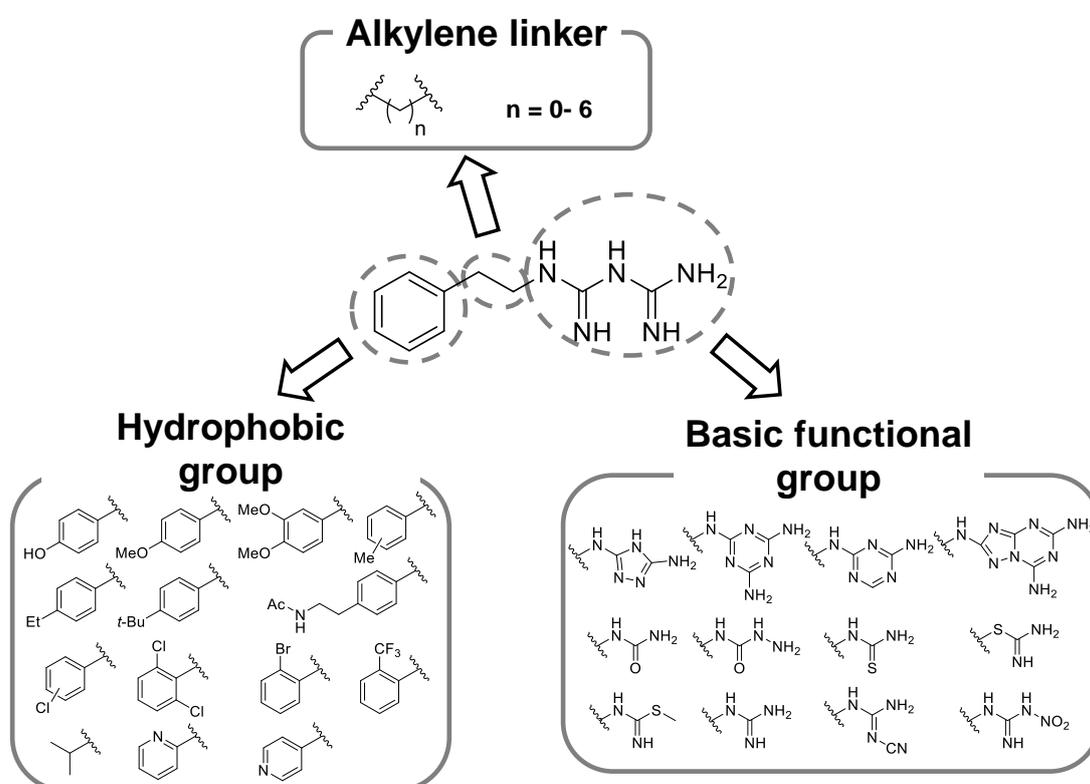


Figure 4. 分子設計

## 第二節 合成

### 第一項 リンカー鎖長に関するビグアニド誘導体の合成

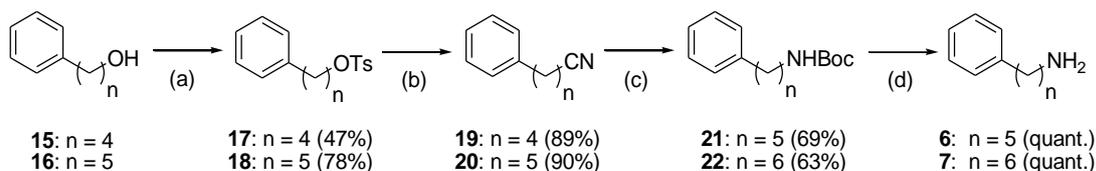
ビグアニドの合成は Mayer らのマイクロウェーブ反応を利用した方法<sup>38</sup>を参考にし、Scheme 1 に示すように、アルキレン鎖長の異なる各種第一級アミン (**1-7**) と cyanoguanidine を用い、dry CH<sub>3</sub>CN 中、TMSCl を加え、マイクロウェーブ反応を行った後、*i*PrOH を加えて、さらにマイクロウェーブ反応を行うことで、目的の各種誘導体を収率よく得ることができた。



#### Scheme 1. アルキレン鎖長に関するビグアニド誘導体の合成

Reagent and conditions: (i) dicyandiamide, TMSCl, CH<sub>3</sub>CN, 130 or 150 °C under microwave irradiation, 10 or 15 min. (ii) *i*PrOH, 125 °C under microwave irradiation, 1 min

Scheme 1 における各種第一級アミンのうち、**1-5** に関しては購入したものを使用した。一方で **6** および **7** に関しては、Scheme 2 に示すように、それぞれアルコール体 (**15** および **16**) を出発原料として合成を行って用いた。まず、Moussa らの方法<sup>39</sup>に従い、dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中 pyridine 存在下にて、トシル化を行い、**17** および **18** をそれぞれ 47%、78% の収率で得た。続いて、Barker らの方法<sup>40</sup>に従い、DMSO 中 120 °C で KCN との反応を行い、ニトリル体の **19** および **20** をそれぞれ 89%、90% の収率で得た。次のニトリルの還元反応においては、LAH 還元とジボラン還元について検討を行ったところ、どちらの場合も低収率もしくは精製困難であった。そこで、比較的穏やかな条件で還元反応が進行し、同時に Boc 保護も行うことができるため、精製も容易である Butini らの方法<sup>41</sup> を参考にした。dry MeOH 中、Boc<sub>2</sub>O および NiCl<sub>2</sub> 存在下にて NaBH<sub>4</sub> を用いることで還元反応を行い、**21** および **22** をそれぞれ 69%、63% の良好な収率で得た。最後に、4 M HCl/EtOAc を用いて脱保護を行った後、アミンシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる脱塩を行い、**6** および **7** をそれぞれ定量的に得た。



### Scheme 2. 化合物 6 および 7 の合成

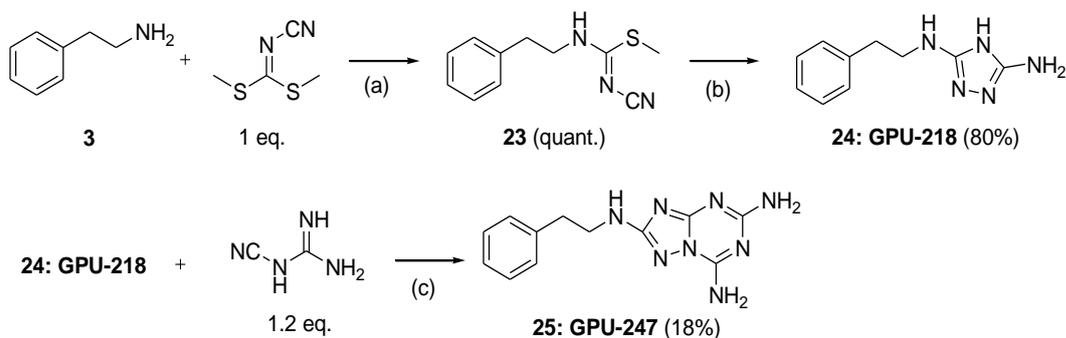
Reagent and conditions: (a) TsCl, pyridine, dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C to rt; (b) KCN, DMSO, 120 °C; (c) (i) (Boc)<sub>2</sub>O, NiCl<sub>2</sub>, NaBH<sub>4</sub>, dry MeOH, 0 °C to rt; (ii) diethylenetriamine, rt; (d) (i) 4M HCl/EtOAc, EtOAc, rt; (ii) NH silica gel column chromatography.

## 第二項 塩基性部位に関するフェネチル誘導体の合成

塩基性のビグアニド部位を窒素含有ヘテロ環やカルボニルアナログへ変換することにより、脂溶性をあげることによる活性の増強を期待してフェネチル誘導体の合成を行った。

### 窒素含有ヘテロ環への変換

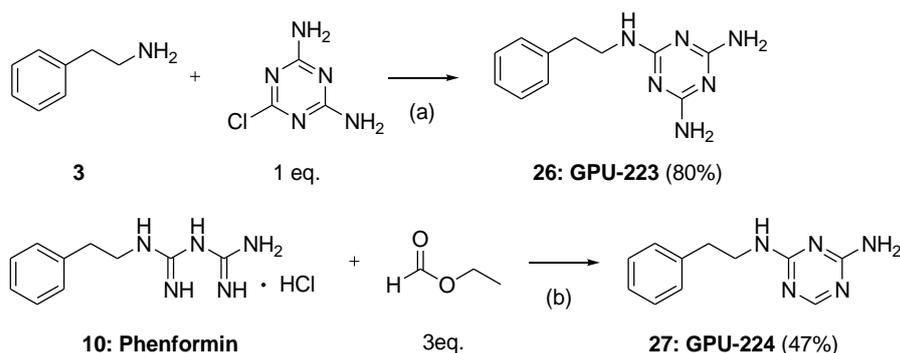
Dolzhenko らの方法<sup>42</sup>に従い、塩基性のビグアニド部位を 1,2,4-triazole 及び [1,2,4,]triazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazine に変換した誘導体を合成した。*i*PrOH 中、室温下撈拌することで、phenethylamine (**3**) と dimethyl-*N*-cyanodithiocarbonimidate の反応を行い、化合物 **23** を定量的に得た。続いて、EtOH 中、加熱還流することで **23** と hydrazine hydrate の反応を行い、**24: GPU-218** を 80% の収率で得た。さらに、濃塩酸を加えた H<sub>2</sub>O 中、加熱還流することで **24: GPU-218** と cyanoguanidine の反応を行い、**25: GPU-247** を 18% の収率で得た (Scheme 3)。



### Scheme 3. GPU-218 および GPU-247 の合成

Reagent and conditions: (a) *i*PrOH, rt; (b) hydrazine hydrate, EtOH, rt to reflux; (c) conc. HCl, H<sub>2</sub>O, reflux.

さらに、ビグアニド部位を 1,3,5-triazine に変換した誘導体を合成した。Scheme 4 に示すように、まず、Ma らの方法<sup>43</sup>に従い、H<sub>2</sub>O 中 NaOH を加え、加熱還流することで、phenethylamine (**3**) と 2-chloro-4,6-diamino-1,3,5-triazine の反応を行い、**26: GPU-223** を 73% の収率で得た。また、Lebel らの方法<sup>44</sup>に従い、MeOH 中、NaOMe を加え、加熱還流することで、phenformin hydrochloride (**10**) と ethyl formate の反応を行い、**27: GPU-224** を 47% の収率で得た。

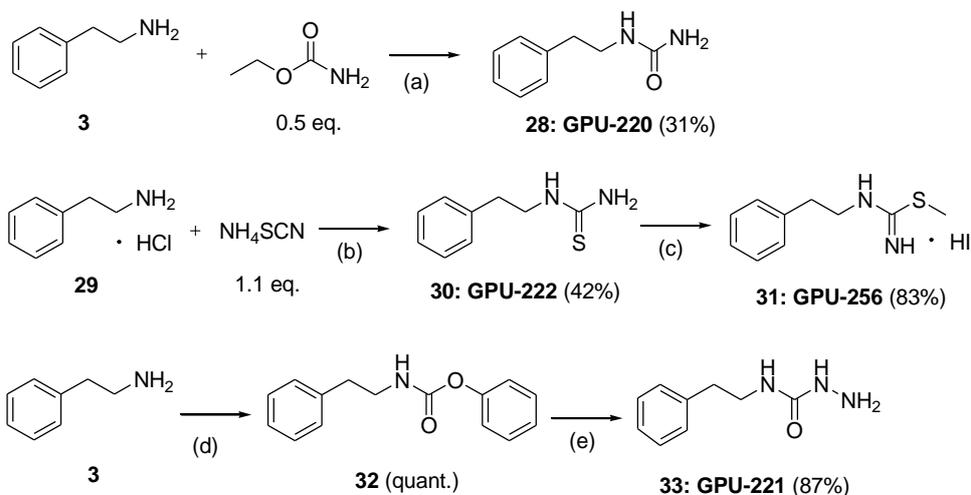


**Scheme 4. GPU-223 および GPU-224 の合成**

Reagent and conditions: (a) NaOH, H<sub>2</sub>O, reflux; (b) NaOMe, MeOH, reflux.

#### カルボニルアナログへの変換

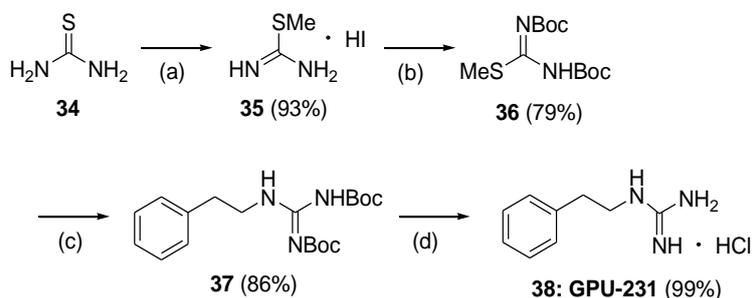
ビグアニド部位をバイオイソスターである urea、thiourea および semicarbazide に変換することを試みた。Scheme 5 に示すように、urea の導入では、Vauthey らの方法<sup>45</sup>を用いて、phenethylamine (**3**) と ethyl carbamate を toluene 中、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> を加え、加熱還流することで、**28: GPU-220** を 31% の収率で得た。thiourea の導入では、Muccioli らの方法<sup>46</sup>に従って、bromobenzene 中、phenethylamine 塩酸塩 (**29**) と ammonium isothiocyanate を加え、加熱還流することで **30: GPU-222** を 42% の収率で得た。さらに、EtOH 中、MeI を加え、加熱還流することで、**31: GPU-256** を 83% の収率で得た。semicarbazide の導入では、Yogeeswari らの方法<sup>47</sup>を用いて合成を行った。まず、CHCl<sub>3</sub> 中 triethylamine を加え、phenethylamine (**3**) と phenyl chloroformate を反応させ、**32** を定量的に得た後、EtOH 中 hydrazine monohydrate を加え、加熱還流することで、**33: GPU-221** を 87% の収率で得た。



### Scheme 5. GPU-220, GPU-222, GPU-256 および GPU-224 の合成

Reagent and conditions: (a)  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , toluene, reflux; (b) bromobenzene, reflux under  $\text{N}_2$ ; (c) MeI, EtOH, reflux; (d) phenyl chloroformate, triethylamine,  $\text{CHCl}_3$ , 0 °C to rt; (e) hydrazine monohydrate, EtOH, reflux.

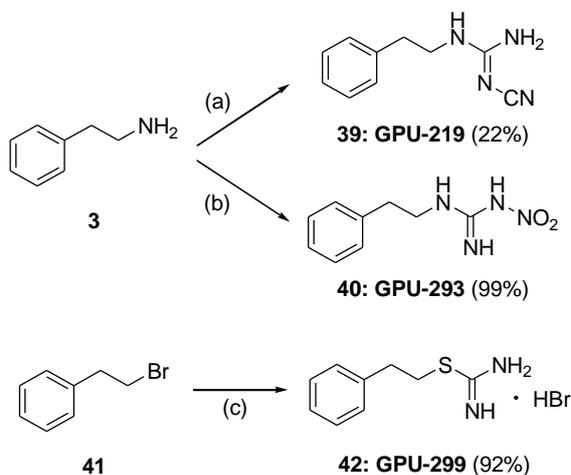
phenformin のビグアニド部位をグアニジンに変換した化合物の合成を行った。Scheme 6 に示すように、Gers らの方法<sup>48</sup>に従って、thiourea (**34**) と MeI を EtOH 中、加熱還流することで **35** を 93% の収率で得た。続いて、NaOH を加えた混合溶媒中 ( $\text{H}_2\text{O} : 1,4\text{-dioxane} = 1 : 1$ ) で  $\text{Boc}_2\text{O}$  と反応させ、Boc 保護体の **36** を 79% の収率で得た。さらに **36** と phenethylamine (**3**) を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  中、室温下攪拌して反応させ、**37** を 79% の収率で得た。最後に 4 M HCl-1,4-dioxane を用いて **37** の脱保護を行い、**38: GPU-231** を 99% の収率で得た。



### Scheme 6. GPU-231 の合成

Reagent and conditions: (a) MeI, EtOH, reflux; (b)  $\text{Boc}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{O}/1,4\text{-dioxane}$ , NaOH aq, rt; (c) phenethylamine (**3**),  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rt; (d) 4 M HCl-1,4-dioxane, rt.

グアニジンは強塩基性であることから、その強塩基性の減弱を目的としてグアニジン部位にシアノ基とニトロ基を導入した化合物および一つの窒素原子を硫黄原子に変えた化合物 **42: GPU-299** の合成を行った。シアノ基の導入では、Level らの方法<sup>44</sup>に従って、1 M HCl 水溶液中、phenethylamine (**3**) と sodium dicyanamide を加え、加熱還流することで、**39: GPU-219** を 22% の収率で得た。ニトロ基の導入では、Makovec らの方法<sup>49</sup>に従って、混合溶媒 (Et<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O = 3 : 1) 中、phenethylamine (**3**) と *N*-methyl-*N*-nitroso-*N'*-nitroguanidine を加え、20 °C 以下で撹拌することで、**40: GPU-293** を 99% の収率で得た。**42: GPU-299** の合成では、Gers<sup>48</sup> らの方法に従って、EtOH 中、phenethylbromide (**41**) と thiourea (**34**) を加え、加熱還流することで、**42: GPU-299** を 92% の収率で得た。



**Scheme 7. GPU-219, GPU-293 および GPU-299 の合成**

Reagent and conditions: (a) sodium dicyanamide, 1 M HCl aq., reflux; (b) *N*-methyl-*N*-nitroso-*N'*-nitroguanidine, Et<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (3:1), 20 °C; (c) thiourea (**34**), EtOH, reflux.

### 第三項 疎水性部位に関するビグアニド誘導体の合成

疎水性のベンゼン環部位への置換基導入などによる活性への影響を検討するために、第一項と同様に、Mayer らのマイクロウェーブ反応を利用した方法<sup>38</sup>を参考にし、Scheme 8 に示すように、ベンゼン環に OH、OMe、アルキルやハロゲンを導入した各種フェネチルアミン (**43–57**) を用い、疎水性部位に関するビグアニド誘導体の合成を行った。

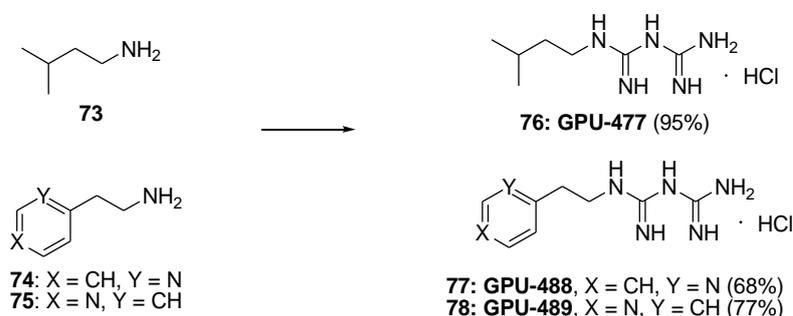


- |                                |                                                       |                                               |                                                  |
|--------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| <b>43:</b> R = 4-OH            | <b>51:</b> R = 4-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHAc | <b>58:</b> GPU-252, R = 4-OH (80%)            | <b>66:</b> GPU-471,                              |
| <b>44:</b> R = 4-OMe           | <b>52:</b> R = 2-Cl                                   | <b>59:</b> GPU-301, R = 4-OMe (30%)           | R = 4-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHAc (97%) |
| <b>45:</b> R = 3,4-di-OMe      | <b>53:</b> R = 3-Cl                                   | <b>60:</b> GPU-470, R = 3,4-di-OMe (89%)      | <b>67:</b> GPU-469, R = 2-Cl (88%)               |
| <b>46:</b> R = 2-Me            | <b>54:</b> R = 4-Cl                                   | <b>61:</b> GPU-529, R = 2-Me (85%)            | <b>68:</b> GPU-474, R = 3-Cl (88%)               |
| <b>47:</b> R = 3-Me            | <b>55:</b> R = 2,6-di-Cl                              | <b>62:</b> GPU-476, R = 3-Me (94%)            | <b>69:</b> GPU-473, R = 4-Cl (84%)               |
| <b>48:</b> R = 4-Me            | <b>56:</b> R = 2-Br                                   | <b>63:</b> GPU-475, R = 4-Me (94%)            | <b>70:</b> GPU-485, R = 2,6-di-Cl (76%)          |
| <b>49:</b> R = 4-Et            | <b>57:</b> R = 2-CF <sub>3</sub>                      | <b>64:</b> GPU-528, R = 4-Et (93%)            | <b>71:</b> GPU-527, R = 2-Br (80%)               |
| <b>50:</b> R = 4- <i>t</i> -Bu |                                                       | <b>65:</b> GPU-531, R = 4- <i>t</i> -Bu (88%) | <b>72:</b> GPU-530, R = 2-CF <sub>3</sub> (80%)  |

#### Scheme 8. ベンゼン環に置換基を導入したビグアニド誘導体の合成

Reagent and conditions: (i) dicyandiamide, TMSCl, CH<sub>3</sub>CN, 130 or 150 °C under microwave irradiation, 10 or 15 min. (ii) *i*PrOH, 125 °C under microwave irradiation, 1 min

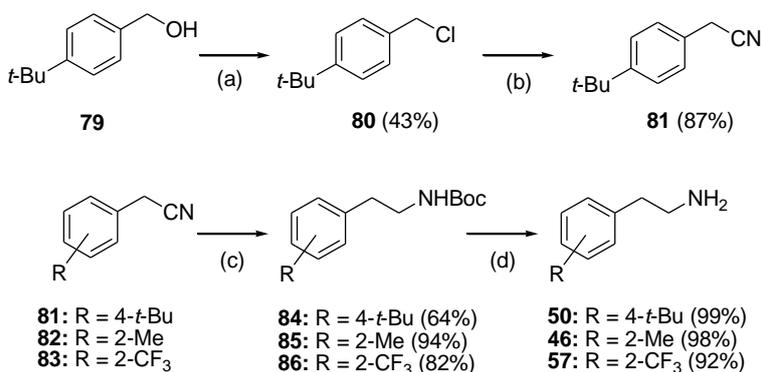
また、Scheme 9 に示すように、疎水性部位としての芳香環の重要性を確かめるために、isopentylamine (**73**) を用いて芳香環の代わりに脂肪鎖を有する化合物 **76:** GPU-477 を合成し、さらに、ベンゼン環をヘテロ芳香環のピリジル基に変換した、**77:** GPU-488 および **78:** GPU-489 を合成した。



#### Scheme 9. GPU-477, GPU-488 および GPU-489 の合成

Reagent and conditions: (i) dicyandiamide, TMSCl, CH<sub>3</sub>CN, 130 °C under microwave irradiation, 10 or 30 min. (ii) *i*PrOH, 125 °C under microwave irradiation, 1 min; (iii) **77** and **78** needed NH silica gel column chromatography for purification.

Scheme 8 および Scheme 9 における各種第一級アミンのうち、**43–45**、**47–49**、**52–56**、**73–75** に関しては購入したものを使用した。一方で、*4-tert-butylphenethylamine* (**50**)、*2-methylphenethylamine* (**46**) および *2-trifluoromethylphenethylamine* (**57**) は、*4-tert-butylbenzyl alcohol* (**79**)、*2-methylbenzyl nitrile* (**82**) および *2-trifluoromethylbenzyl nitrile* (**83**) を出発原料として合成を行った。Scheme 10 に示すように、化合物 **81** の合成では、第二節第一項の Scheme 2 と同様に、Moussa らの方法<sup>39</sup>に従い、トシル化を試みたところ、目的のトシル体ではなく、クロロ化された化合物 **80** が 43% の収率で得られた。これは、トシルエステルの位置が求電子性の高いベンジル位であったために、目的のトシル体を形成後、速やかに反応系中の塩化物イオンによる置換反応が起こったと考えられる。化合物 **80** を用いて、Barker らの方法<sup>40</sup>に従い、DMSO 中 120 °C で KCN との反応を行い、ニトリル体の **81** を 87% の収率で得た。次のニトリルの還元反応に関しても、第二節第一項の Scheme 2 と同様に、Butini らの方法<sup>41</sup>を参考に合成を行い、**84–86** をそれぞれ 64%、94%、82% の収率で得た。最後に、4 M HCl/EtOAc を用いて脱保護を行った後、アミンシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる脱塩を行い、**50**、**46** 及び **57** をそれぞれ 99%、98%、92% の収率で得た。

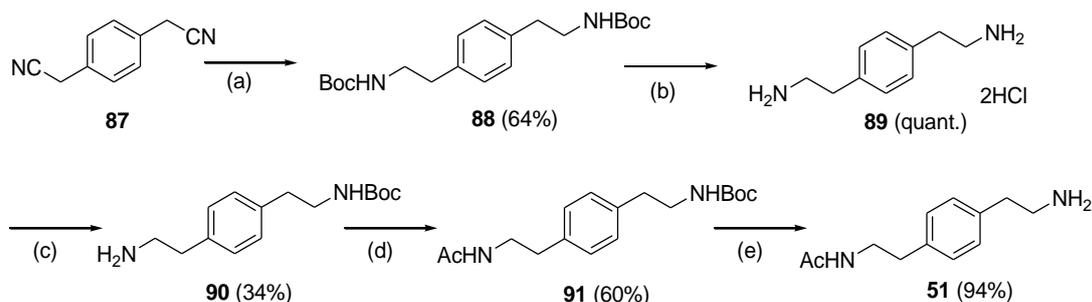


#### Scheme 10. 化合物 **50**、**46** 及び **57** の合成

Reagent and conditions: (a) TsCl, pyridine, dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C to rt; (b) KCN, DMSO, 120 °C; (c) (i) (Boc)<sub>2</sub>O, NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, NaBH<sub>4</sub>, dry MeOH, 0 °C to rt; (ii) diethylenetriamine, rt; (d) (i) 4 M HCl/EtOAc, EtOAc, rt; (ii) NH silica gel column chromatography.

化合物 **51** の合成に関しても、まず、Butini らの方法<sup>41</sup>にしたがって、1,4-phenylenediacetonitrile (**87**) を出発原料として DiBoc 保護体の **88** を 64% の収率で得た。続いて、5% HCl/MeOH を用いて脱保護を行い、**89** を定量的に得た。次に Lee らの方法<sup>50</sup>を参考に、氷冷下、MeOH を用いて **89** を懸濁し、NaOH 水溶液をゆっくり加え、室温で 1 h 攪拌した後、氷冷下、MeOH に溶解した (Boc)<sub>2</sub>O をゆっくり加え、室温で 66 h 攪拌し、MonoBoc 体の **90** を 34% の収率で得た。なお、後処理の際に副生成物として

DiBoc 保護体の **88** も得られた。さらに、Nadres らの方法<sup>51</sup>に従って、氷冷下、dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中、**90**、DMAP、NEt<sub>3</sub>を加えた後、acetic anhydride をゆっくり加え、室温で 4 h 攪拌し、AcBoc 保護体の **91** を 60%の収率で得た。最後に、5% HCl/MeOH を用いて Boc 基のみ脱保護を行った後、飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液及び CHCl<sub>3</sub> を用いて、中和、抽出を行い、目的の化合物 **51** を 94%の収率で得た。



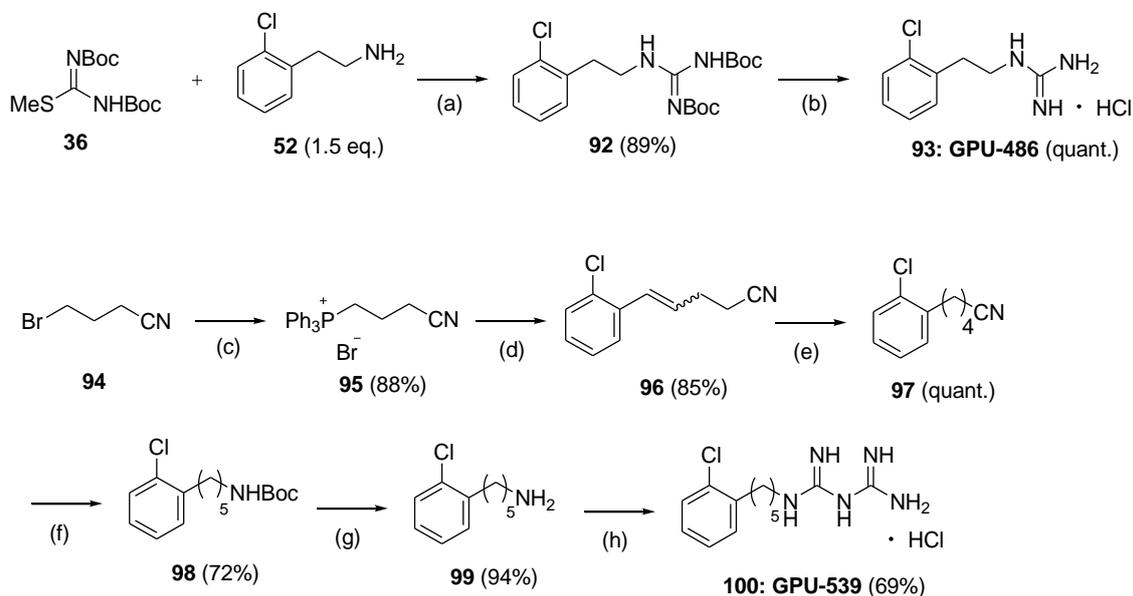
### Scheme 11. 化合物 **51** の合成

Reagent and conditions: (a) (i) (Boc)<sub>2</sub>O, NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, NaBH<sub>4</sub>, dry MeOH, 0 °C to rt; (ii) diethylenetriamine, rt; (b) 5% HCl/ MeOH, rt; (c) (Boc)<sub>2</sub>O, NaOH aq, MeOH, 0 °C to rt; (d) Ac<sub>2</sub>O, NEt<sub>3</sub>, DMAP, dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 0 °C to rt; (e) 5% HCl/MeOH, rt; (ii) sat. NaHCO<sub>3</sub> aq.

### GPU-486 および GPU-539 の合成

構造活性相関研究の結果（第三節第三～五項にて述べる）により、さらに高い活性と選択的な毒性を目指してベンゼン環のオルト位に Cl 基、n = 2 のアルキレンリンカー、およびグアニジンを含む **GPU-486**、さらに、ベンゼン環のオルト位に Cl 基、n = 5 のアルキレンリンカー、およびビグアニドを含む **GPU-539** の合成を行った。Scheme 12 に示すように、**GPU-486** は **GPU-231** の合成 (Scheme 6) と同様に、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 中、室温で *N,N'*-bis(*tert*-butoxycarbonyl)-*S*-methylisothiourea (**36**) と 2-chlorophenylethylamine (**52**) を反応させ、化合物 **92** を 89%の収率で得た後、脱保護を行うことで得られた。一方、**GPU-539** の合成においては、まず Leach らの方法<sup>52</sup>を参考に、ウィティッヒ反応とオレフィンの還元を行った。PPh<sub>3</sub> と 4-bromobutyronitrile (**94**) を toluene 中、窒素雰囲気下、加熱還流することでホスホニウムブロマイド **95** を 88%の収率で得た。さらに、氷冷下、dry THF に sodium hydride を加えた後、**95** をゆっくり加え、窒素雰囲気下、室温で 15 min 攪拌した。その後、dry DMSO を加え、室温で 2 h 攪拌した後、2-chlorobenzaldehyde をゆっくり滴下し、さらに室温で 4 h 攪拌することで、5-(2-chlorophenyl)pent-4-enitrile の EZ 混合物 (**96**) を 85%の収率 (*E* 体 : *Z* 体 = 1 : 4) で得た。EZ の混合比率は <sup>1</sup>H NMR による分析にて決定した。次に、オレフィンの還元では、混合溶媒 (EtOAc : 1,4-dioxane = 4 : 1) に **96** を加え、窒素雰囲気下、Pd/C 存在下に室温で 8 h 攪拌することで、**97** を

定量的に得た。その後の化合物 **97** から **100: GPU-539** の合成は、Scheme 10 及び Scheme 8 と同様の方法で行った。



### Scheme 12. GPU-486 および GPU-539 の合成

Reagent and conditions: (a)  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , rt; (b) 4 M HCl/EtOAc, rt; (c)  $\text{PPh}_3$ , toluene, reflux, under  $\text{N}_2$ ; (d) NaH, 2-chlorobenzaldehyde, dry THF, dry DMSO, under  $\text{N}_2$  at 0 °C to rt, (*E* form : *Z* form = 1 : 4); (e) Pd/C, EtOAc, 1,4-dioxane, under  $\text{H}_2$ , quant.; (f) (i)  $(\text{Boc})_2\text{O}$ ,  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NaBH}_4$ , dry MeOH, 0 °C to rt; (ii) diethylenetriamine, rt; (g) (i) 4M HCl/EtOAc, EtOAc, rt; (ii) NH silica gel column chromatography; (h) (i) dicyandiamide, TMSCl, dry  $\text{CH}_3\text{CN}$ , 130 °C under microwave irradiation, 10 min. (ii) *i*PrOH, 125 °C under microwave irradiation, 1 min.

### 第三節 構造活性相関

構造活性相関を解析する上で、以下に説明するがん細胞の低酸素ストレス応答と小胞体ストレス応答に対する活性を指標とした。

#### 第一項 低酸素ストレス応答と小胞体ストレス応答

##### 低酸素ストレス応答

低酸素状態はがん細胞の種類を問わず、固形がんにも共通の特徴である。腫瘍内では、がん細胞の無秩序な増殖と不規則な血管新生によって、酸素分圧が 20 mmHg 以下の低酸素領域が 2-30%程度存在すると言われている (Table 1)。このような低酸素環境においては低酸素ストレス応答を司るマスター転写因子、HIF-1<sup>53</sup> が誘導され、エネルギー代謝や糖輸送に関する遺伝子および血管新生や増殖、転移・浸潤、血管新生に関与する遺伝子群の発現を誘導して環境への適応が図られる。<sup>54</sup>HIF-1 は HIF-1 $\alpha$  と HIF-1 $\beta$  の 2 つのサブユニットからなりヘテロ二量体を形成して DNA に結合する。このうち、HIF-1 $\alpha$  のタンパク質安定性は酸素依存的に制御されている。酸素依存性分解ドメイン中の特定のプロリン残基がプロリン水酸化酵素 (proline hydroxylases: PHDs) により水酸化され、リジン残基がアセチル転移酵素 (arrest-defective protein 1: ARD1) によってアセチル化されると von Hippel Lindau (VHL) と複合体を形成し、さらにユビキチンリガーゼが結合してユビキチン化され、プロテアソーム系によって分解される。酸素濃度が低下すると PHDs の酵素活性が著しく低下するため、安定化して蓄積して核に移行し、標的遺伝子のプロモーター、エンハンサー領域にある低酸素応答性領域 (hypoxia responsive element: HRE) に結合して低酸素依存的転写活性化を誘導する。その結果、がんの悪性化や解糖系代謝、血管新生にかかわる様々な遺伝子の発現が誘導される。<sup>11,55</sup>種々のがんにおいて、HIF-1 の活性化によって悪性化が進行するという報告もあり、また、動物レベルにおいて HIF-1 活性の抑制が抗がん治療に効果的であることも報告されている。<sup>56</sup>よって、HIF-1 の活性を抑制することができれば、がんの増殖を抑制し、悪性度を下げ、がん治療の効率を高めることができると期待される。

Table 1. 各種がん組織の酸素濃度<sup>3</sup>

がん種	腫瘍酸素濃度 <sup>a</sup>	周囲正常組織酸素濃度 <sup>a</sup>
神経膠芽腫	4.9	N.D
頭頸部がん	12.2	40.0
肺がん	7.5	38.5
乳がん	10.0	ND
膵臓がん	2.7	51.6
子宮頸がん	5.0	51
前立腺がん	2.4	30.0

<sup>a</sup> mmHg

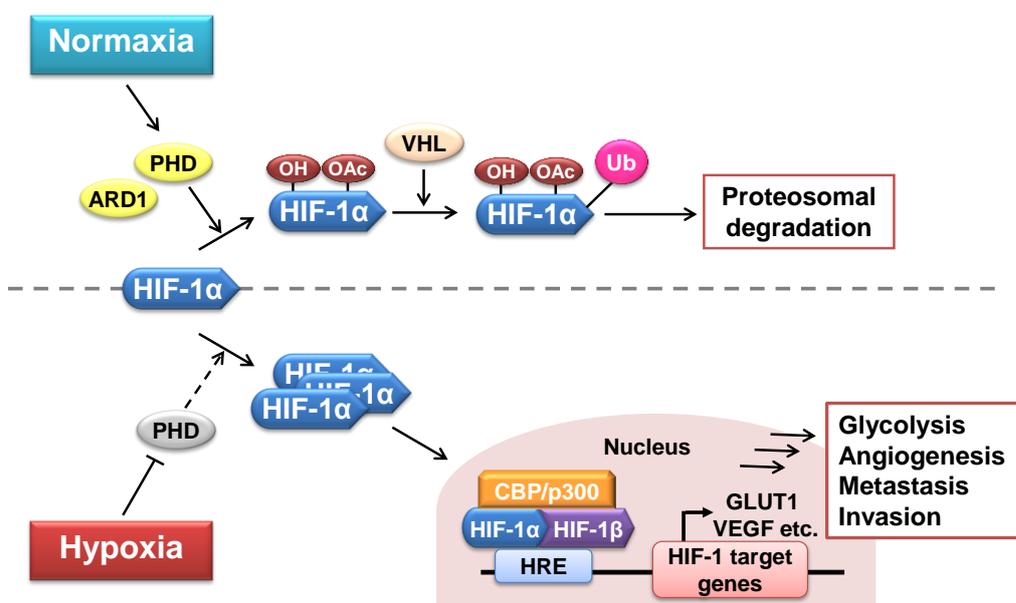


Figure 5. HIF-1α による低酸素応答機構<sup>57</sup>

### 小胞体ストレス応答 (unfolded protein response: UPR)

小胞体 (ER) はタンパク質の品質管理を行う重要な細胞内小器官である。膜結合型タンパク質あるいは分泌タンパク質は小胞体内に運び込まれ、様々な修飾を受けることで機能をもった成熟型タンパク質に成長する。この過程で小胞体内に存在する分子シャペロンがタンパク質の折り畳みを効率的に進めている。細胞内外からの様々な刺激あるいはストレスにより小胞体内でのタンパク質の折り畳みが障害され、小胞体内腔に折り畳み不全タンパク質 (unfolded proteins) が蓄積する状態が ER ストレスである。刺激やストレスが過剰な場合、あるいは長時間持続する場合、細胞はアポトーシスを起こして死

滅するが、これに対して、小胞体機能異常に対する防御システムである小胞体ストレス応答 (UPR) を活性化されることも良く知られている。UPR は、タンパク質の成熟を支える重要なシステムであるとともに、非常時における細胞死からの防御にも不可欠な役割を果たしている。<sup>1</sup>

小胞体膜上には3つの1回膜貫通型タンパク質である inositol-requiring protein 1 (IRE1)、protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)、activating transcription factor 6 (ATF6) が小胞体ストレスセンサーとして存在する。これらは通常、小胞体内腔で分子シャペロン glucose-regulated protein 78 (GRP78) と結合することにより不活性な状態にあるが、ERストレスを感知してGRP78が折り畳み不全タンパク質に結合するために遊離することで活性化される。IRE1はホモダイマーを形成して活性化し、転写因子X box binding protein 1 (XBP1) のプレmRNA を切断し活性型のXBP1をコードするmRNA に変換する。翻訳された活性型XBP1は核に輸送され、小胞体分子シャペロン (GRP78 など) の遺伝子転写調節領域に存在するERSE (ER stress response element) あるいはATF6サイトに結合して分子シャペロンの転写を促進する。PERK はオリゴマーを形成して活性化し、真核生物翻訳開始因子2 $\alpha$  ( $\alpha$  subunit eukaryotic initiation factor 2: eIF2 $\alpha$ ) を直接リン酸化して蛋白質の翻訳を抑制する。ATF6は小胞体ストレス負荷時に膜内切断を受け、切断された断片のうち、細胞質側の約50 kDa のATF6断片は核に移行してERSEに結合し、分子シャペロンの転写を促進する。また一方で、折り畳み不全タンパク質を小胞体からサイトゾルへと逆輸送し、ユビキチン・プロテアソーム系によって分解する小胞体関連分解 (ER associated degradation: ERAD) という機構も存在し、小胞体内の環境維持に重要な役割を果たしている (Figure 6)。<sup>58</sup>

固形がん組織細胞におけるERストレスは、がん微小環境における低酸素・低栄養ストレスによるものであり、UPR活性化はがん細胞微小環境における生存に重要であると考えられ、実際に低酸素環境におけるがん細胞の生存に寄与していることが報告されている。<sup>1</sup>さらに、GRP78の発現増加は様々ながん種で報告されており、抗がん剤への薬剤耐性や放射線耐性、血管新生や腫瘍細胞の増殖への寄与が報告されている。<sup>59-62</sup>よって、がん細胞におけるUPRの活性を抑制することができれば、がん細胞は微小環境の過酷な環境に対応できなくなり、増殖抑制効果や、薬剤耐性などの悪性度を下げ、がん治療の効率を高めることができると期待される。

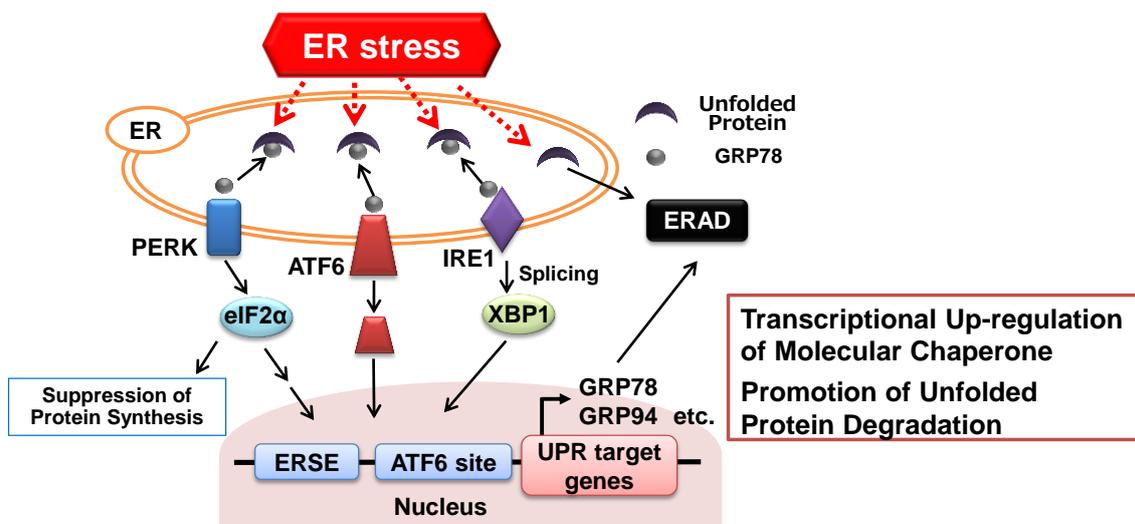


Figure 6. 小胞体ストレス応答機構<sup>1</sup>

## 第二項 評価系の構築

がん微小環境を模倣した *in vitro* スクリーニング評価系として、低酸素・低栄養条件下において誘導される HIF-1 転写活性化、UPR 活性化への影響を低酸素応答ルシフェラーゼアッセイ及び UPR 応答ルシフェラーゼアッセイにて評価することとした。さらに、グルコース欠乏培地や低酸素ストレスを用いた細胞毒性試験による、ストレス下選択的な細胞毒性の評価も行い、今回合成した誘導體群のスクリーニング評価を計画した。

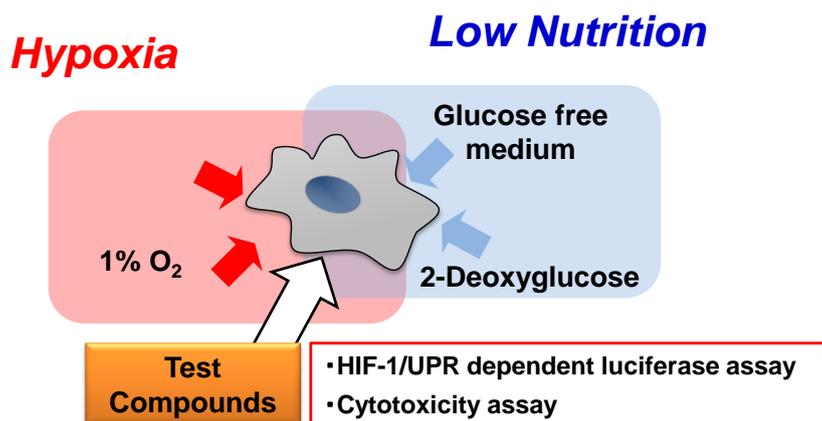


Figure 7. がん微小環境モジュレーターのスクリーニング戦略

## 低酸素・UPR 応答ルシフェラーゼアッセイ

低酸素応答ルシフェラーゼアッセイには、HIF-1 が結合する hypoxia responsive element (HRE) をプロモーター領域に有する p2.1 プラスミドベクター (Figure 8)<sup>36</sup> とネオマイシン耐性遺伝子を含んだ pcDNA3.1 ベクターと共に HEK293 細胞に遺伝子導入、G418 にてセレクションした安定発現株を樹立して構築した、すでに本研究室において確立されていた HEK293 p2.1 #3 を用いたアッセイ系を用いた。<sup>63</sup>

UPR 応答ルシフェラーゼアッセイには、UPR 応答配列である ER stress responsive element (ERSE) を有する、pGRP78pro160-luc プラスミドベクター (Figure 8)<sup>20</sup> を pcDNA3.1 ベクターと共に HEK293 細胞に遺伝子導入し、G418 でのセレクションによる安定発現株の樹立を試みた。セレクションした 96 種類の単一クローンの内、さらに G418 のタイトレーションを続け、増殖を続けた 73 種類の単一クローンを凍結保存した後、正常に成育した 57 種類のクローンより、通常培地処理時の活性と比較して 2-DG (20 mM) 処理時の活性比が高いクローン、#62、#74、#85 (活性比: 3.14, 3.76, 5.57) を選出出した (Figure 9)。

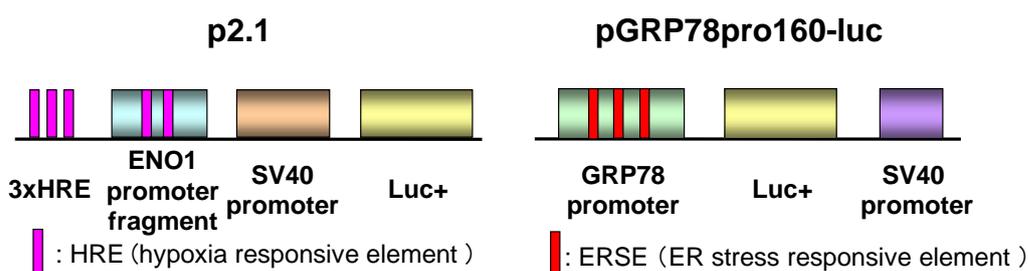


Figure 8. 低酸素及び UPR 応答プラスミドベクター<sup>20,36</sup>

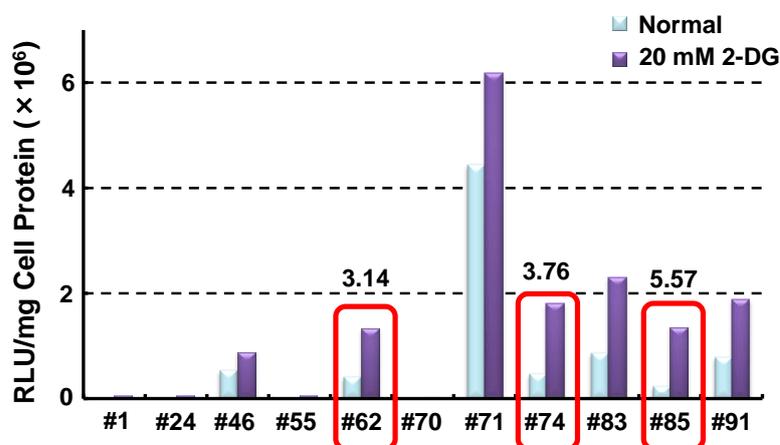
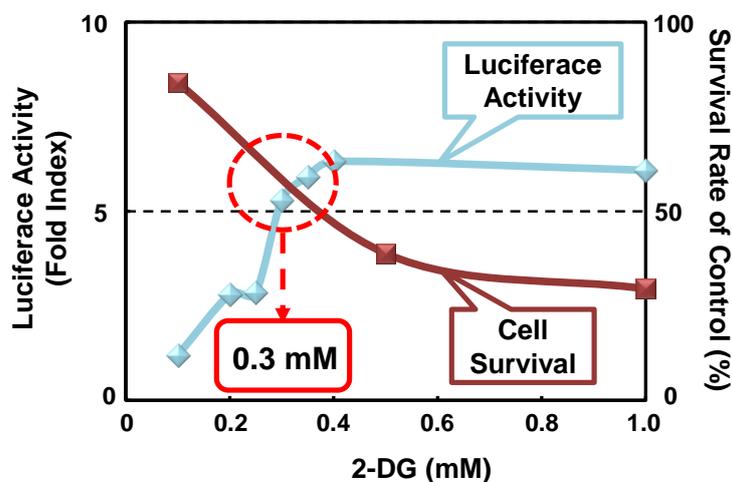


Figure 9. UPR 応答レポーター導入クローンのルシフェラーゼ活性

GRP78 promoter activity was obtained using HEK293 GRP78 clones treated with 20 mM 2-DG for 24 h.

その後、最も活性比が高いクローン HEK293 GRP78 #85 を用いて、ルシフェラーゼアッセイと MTT アッセイによる細胞毒性試験を行い、2-DG 濃度の最適化を検討した結果、Figure 10 に示すように、ルシフェラーゼ活性は 0.3 mM 以上で高活性であり、一方で 0.5 mM 以上で細胞の生存率が約 40% と低下したことから、2-DG 濃度は 0.3 mM が適当であると考え、実際の UPR 応答ルシフェラーゼアッセイによる化合物の評価は 0.3 mM 2-DG にて低栄養ストレス負荷をかけることとした。

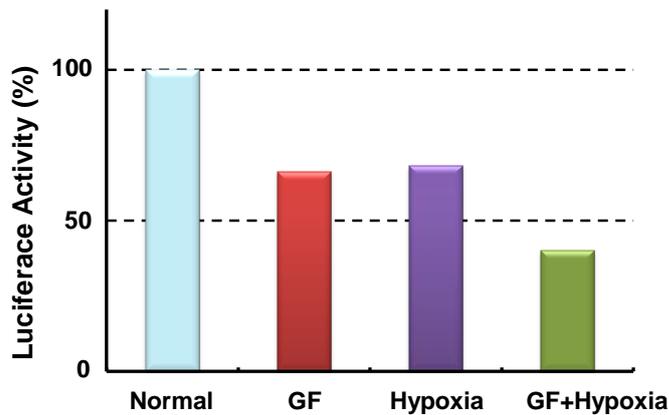
さらにストレスの検討として、グルコース欠乏培地 (GF)、低酸素処理 (1% O<sub>2</sub>: Hypoxia)、グルコース欠乏培地+低酸素処理 (Hypoxia+GF) の 3 通りのストレスによるルシフェラーゼ活性を検討した結果、Figure 11 に示すようにいずれのストレスにおいても、ルシフェラーゼ活性は通常培地処理時の活性と比較して低くなった。特に Hypoxia+GF 処理では、顕微鏡観察において著しい細胞へのダメージが見られ、ストレス過剰であることが示唆された。UPR は低酸素条件においても活性化することが知られており<sup>1, 64</sup>、低酸素・低栄養ダブルストレスにも興味をもたれるが、本クローンはストレス耐性が低く、Hypoxia+GF 処理のような強いストレスに対しては不適當であると考えられた。



**Figure 10.** HEK293 GRP78 #85 を用いた 2-DG 濃度の最適化

GRP78 promoter activity was obtained using HEK293 GRP78 #85 treated with 0.1–1.0 mM 2-DG for 24 h.

Cell viability was determined by MTT assay using HEK293 GRP78 #85 treated with 0.1–1.0 mM 2-DG for 24 h.

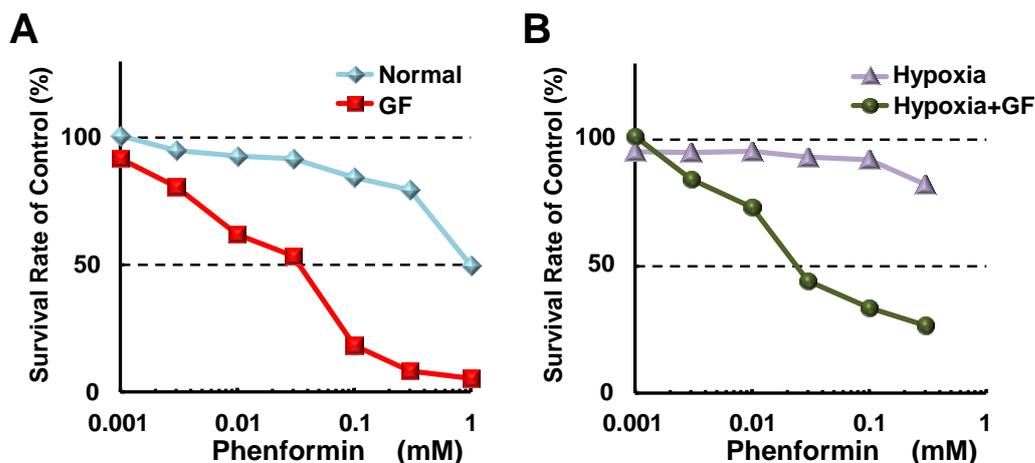


**Figure 11.** HEK293 GRP78 #85 を用いたストレスの検討

GRP78 promoter activity was obtained using HEK293 GRP78 #85 incubated in normal medium, glucose-free medium (GF), normal medium under 1% O<sub>2</sub> (Hypoxia), glucose-free medium under 1% O<sub>2</sub> (GF+ Hypoxia) for 48 h

#### ストレス負荷条件における細胞毒性試験の検討

細胞毒性試験としては、富田らのグループが報告した低栄養細胞毒性試験<sup>21</sup>を参考に、phenformin をポジティブコントロールとして用い、まず、低栄養選択的細胞毒性試験法の構築を試みた。細胞は HT29 を、ストレス負荷としては 2-DG およびグルコース欠乏培地 (GF) を使用して暴露時間や細胞数を検討したところ、グルコース欠乏培地を用いた 3,000 cells/well (96 well plate)、48 h 処理において最も高い選択毒性が見られた (Figure 12A)。さらに、ストレス処理として低酸素処理 (1% O<sub>2</sub>: Hypoxia) を同時に行った結果、Figure 12B に示すように phenformin は低酸素ストレス処理において細胞毒性を示さなかった。さらに、グルコース欠乏培地+低酸素処理においては、グルコース欠乏培地処理とほぼ同様の毒性を示したが、若干ではあるが、グルコース欠乏培地処理のみに比べて毒性の減弱が見られた。これは、何らかの低酸素ストレス応答によりレスキュー機構が働いたのではないかと考えられる。また、今回は低酸素処理 1% O<sub>2</sub> を 48 h としたが、酸素濃度の検討や細胞の種類などを検討することも、今後必要であると考えられる。以上の検討より、スクリーニング評価における細胞毒性試験としては、グルコース欠乏培地処理条件における選択的な細胞毒性を指標とすることとした。



**Figure 12.** 低酸素・低栄養ストレス下における phenformin の細胞毒性

Cell viability was determined by MTT assay using HT29 cells treated with phenformin incubated in normal medium, glucose-free medium, normal medium under hypoxia (1% O<sub>2</sub>), glucose-free medium under hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 48 h

以上の結果より、がん微小環境を模倣した *in vitro* スクリーニング評価系として、低酸素条件下で誘導される HIF-1 転写活性化への影響を HEK293 p2.1 #3 を用いた低酸素応答ルシフェラーゼアッセイ、低栄養条件下で誘導される UPR 活性化への影響を HEK293GRP78 #85 を用いた UPR 応答ルシフェラーゼアッセイ、さらに HT29 細胞とグルコース欠乏培地を用いたグルコース欠乏条件下選択的な細胞毒性の評価を行い、今回合成した誘導體群のスクリーニング評価を行った。また、Accord for Excel および ACD/pK<sub>a</sub> DB Product を用いて、*c logD* や *pK<sub>a</sub>* などの化合物データを算出し、それらと生物活性との相関についても考察した。

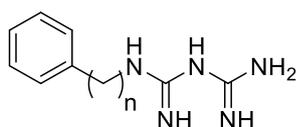
以下、構造活性相関研究の結果について述べる。

### 第三項 リンカー鎖長に関する評価

phenformin はベンゼン環とビグアニド部位がエチレンリンカーを介する構造をとっている。そこで、下記のようにリンカーの長さの最適化の検討を行った。

Table 2 に示すように、アルキレンリンカーの長さの変換 (n = 0–6) の結果、HIF-1 および UPR の活性化に関しては、リンカーを長くするとともに、その抑制作用が増強した。さらに、グルコース欠乏条件における細胞毒性に関しても、リンカーを長くするとともに毒性は増強した。一方で、通常培地条件における細胞毒性に関しても、リンカーを長くするとともに毒性は増強し、細胞毒性の選択性としては、n = 2、4–6 においては n = 5 が最も選択性が高かったものの、選択性の向上はほぼなかったといえる。なお、n = 0 では、すべての活性は消失した。さらに、n = 1 及び 3 では毒性の選択性が減少した。以上の結果より、アルキレンリンカーを長くすることで、いずれの活性も増強することがわかった。これは、脂溶性の向上の結果とも考えられるが、近年、phenformin や metformin の細胞内への取り込みに関する、有機カチオントランスポーター (OCTs) などの必要性が報告されていること、<sup>65–68</sup> ビグアニドの高い極性やグルコース欠乏条件における毒性の選択性があまり変化しなかったことを考慮すると、トランスポーターを介した取り込みが向上した可能性が考えられる。なお、n = 2 以上では HIF-1 及び UPR の活性化抑制作用が増強したが、グルコース欠乏条件における細胞毒性の選択性は n = 3 の場合を除き、ほぼ変化しなかったため、合成の簡便性も考慮し、今後の塩基性部位及びベンゼン環の置換基効果の検討に用いる化合物はエチレンリンカーを有する構造とした。

**Table 2.** リンカー鎖長に関する評価



GPU-No.	n	IC <sub>50</sub> of Transactivation (μM)		Cytotoxicity			c logD (pH 7.4) <sup>e</sup>
		HIF-1 <sup>a</sup>	GRP78 <sup>b</sup>	IC <sub>50</sub> (μM) <sup>c</sup>	Selectivity <sup>d</sup>		
				Glc (+)	Glc (-)	Glc (+)/Glc (-)	
232	0	> 100	> 100	> 1000	> 1000	-	-4.83
239	1	54.7 ± 8.6	126.6 ± 19.8	105.3 ± 10.1	31.0 ± 7.8	3.4	-6.73
Phenformin	2	27.4 ± 6.1	107.8 ± 9.4	976.2 ± 95.0	46.2 ± 9.2	21.1	-6.64
240	3	27.7 ± 6.1	86.8 ± 22.3	407.4 ± 80.8	86.9 ± 9.4	4.7	-6.57
484	4	9.4 ± 0.4	38.8 ± 4.2	228.8 ± 13.8	12.3 ± 2.3	18.6	-6.49
532	5	2.0 ± 0.1	9.6 ± 0.3	84.3 ± 11.7	3.0 ± 1.1	28.1	-6.40
533	6	1.3 ± 0.2	5.5 ± 0.6	27.1 ± 1.3	1.9 ± 0.3	14.3	-6.30

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values for inhibition of HIF-1 activity was obtained using HEK293 p2.1 #3 cells under hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 24 h with test compounds.

<sup>b</sup> IC<sub>50</sub> values for inhibition of GRP78 promoter activity was obtained using HEK293 GRP78 #85 cells treated with 0.3 mM 2-DG and test compounds for 24 h.

<sup>c</sup> IC<sub>50</sub> values from MTT assay using HT29 cells treated with test compounds incubated in normal or glucose-free medium for 48 h.

Values are the mean ± SD of triplicate experiments.

<sup>d</sup> Selectivity was obtained from IC<sub>50</sub> in normal medium/IC<sub>50</sub> in glucose-free medium.

<sup>e</sup> The *c logD* values were calculated by Accord for Excel ver. 7.1.5.

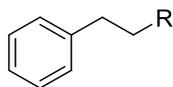
#### 第四項 塩基性部位に関する評価

ビグアニド部位の活性への影響を検討するため、ビグアニド部位を含窒素ヘテロ環や、生物学的等価体であるカルボニルアナログの、**urea**、**thiourea**、**guanidine** に変換した誘導体について評価を行った。さらに塩基性を調節するため、電子求引性基として、シアノ基やニトロ基を付加した誘導体についても評価を行った。

#### 含窒素ヘテロ環の評価

ビグアニド部位を含窒素ヘテロ環に変換して脂溶性の向上による活性の増強を期待した、**GPU-218**、**GPU-223**、**GPU-224** 及び **GPU-247** は Table 3 に示すように、いずれの活性も毒性も示さなかった。これは、環化により脂溶性が向上した一方で、塩基性が低くなってしまったことが原因と考えられる。

**Table 3.** 含窒素ヘテロ環誘導体の評価



GPU-No.	R	IC <sub>50</sub> of Transactivation (μM)		IC <sub>50</sub> of Cytotoxicity (μM) <sup>c</sup>		pK <sub>a</sub> <sup>d</sup>	c logD (pH 7.4) <sup>d</sup>
		HIF-1 <sup>a</sup>	GRP78 <sup>b</sup>	Glc (+)	Glc (-)		
Phenformin		27.4 ± 6.1	107.8 ± 9.4	976.2 ± 95.0	46.2 ± 9.2	12.2	-6.64
218		> 100	> 100	> 100	> 100	4.8	1.49
223		> 100	> 100	> 100	> 100	8.7	-0.25
224		> 100	> 100	> 100	> 100	6.9	0.96
247		> 100	> 100	> 100	> 100	4.6	1.17

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values for inhibition of HIF-1 activity was obtained using HEK293 p2.1 #3 cells under hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 24 h with test compounds.

<sup>b</sup> IC<sub>50</sub> values for inhibition of GRP78 promoter activity was obtained using HEK293 GRP78 #85 cells treated with 0.3 mM 2-DG and test compounds for 24 h.

<sup>c</sup> IC<sub>50</sub> values from MTT assay using HT29 cells treated with test compounds incubated in normal or glucose-free medium for 48 h.

Values are the mean ± SD of triplicate experiments.

<sup>d</sup> The pK<sub>a</sub> values of neutral-monocation equilibria and c logD values were calculated by Accord for Excel ver. 7.1.5.

### カルボニリアナログの評価

一方、カルボニリアナログの評価では、複数の水素ドナーを持つ phenformin の生物学的等価体として合成した GPU-220, GPU-222, GPU-231 のうち、グアニジンを有する GPU-231 のみが、phenformin に匹敵する HIF-1 及び UPR の活性化抑制作用とグルコース欠乏条件における選択的な細胞毒性を示した。pK<sub>a</sub> 値を比較すると、phenformin 及び GPU-231 は生理的 pH においてモノカチオンになる一方で、いずれの活性も示さなかったビグアニドの生物学的等価体である urea, thiourea を有する GPU-220 及び GPU-222 はニュートラルな状態であることがわかった。pK<sub>a</sub> 値の結果から、GPU-221, GPU-219 および GPU-293 も同様に生理的 pH においてニュートラルな状態であると考えられる。この結果は、生理的 pH においてモノカチオン型になることが活性および毒性には必須

であることを示唆するものと考えられる。さらに、前項で述べた取り込みに関する有機カチオントランスポーター (OCTs) などの必要性を考慮すると、生理的 pH においてカチオン型にならない場合は、細胞に取り込まれていない可能性が高いと考えられる。しかしながら、 $pK_a$  値の結果から、**GPU-299** および **GPU-256** は生理的 pH においてモノカチオン型の割合が多いはずであるが、活性を示さなかった。この理由としては、窒素を硫黄に変換したことで、プロトンドナー数が減ってしまったことが挙げられると考えられる。また、 $c \log D$  値から、脂溶性と活性との相関は見られなかった。

**Table 4.** カルボニルアナログの評価

GPU-No.	R	IC <sub>50</sub> of Transactivation (μM)		IC <sub>50</sub> of Cytotoxicity (μM) <sup>c</sup>		$pK_a^d$	$c \log D$ (pH 7.4) <sup>e</sup>
		HIF-1 <sup>a</sup>	GRP78 <sup>b</sup>	Glc (+)	Glc (-)		
Phenformin		27.4 ± 6.1	107.8 ± 9.4	976.2 ± 95.0	46.2 ± 9.2	12.2	-6.64
220		> 100	> 100	> 100	> 100	-0.2	0.81
221		> 100	> 100	> 100	> 100	3.7	0.23
222		> 100	> 100	> 100	> 100	1.2	-1.81
299		> 100	> 100	> 100	> 100	8.6	0.16
256		> 100	> 100	> 100	> 100	9.1	-0.97
231		23.3 ± 8.0	46.1 ± 7.3	> 1000	87.6 ± 4.2	13.1	-2.23
219		> 100	> 100	> 100	> 100	0.6	0.55
293		> 100	> 100	> 100	> 100	-2.1	1.33

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values for inhibition of HIF-1 activity were obtained using HEK293 p2.1 #3 cells under hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 24 h with test compounds.

<sup>b</sup> IC<sub>50</sub> values for inhibition of GRP78 promoter activity were obtained using HEK293 GRP78 #85 cells treated with 0.3 mM 2-DG and test compounds for 24 h.

<sup>c</sup> IC<sub>50</sub> values from MTT assay using HT29 cells treated with test compounds incubated in normal or glucose-free medium for 48 h.

Values are the mean ± SD of triplicate experiments.

<sup>d</sup> The  $pK_a$  values of neutral-monocation equilibria were calculated by ACD/ $pK_a$  DB Product version 12.5.

<sup>e</sup> The  $c \log D$  values were calculated by DS Accord for Excel ver. 7.1.5.

## 第五項 芳香環における置換基効果の評価

塩基性部位をビグアニドに固定して、ベンゼン環への OH 基や OMe 基などの電子供与性基、アルキル基やハロゲンの導入を行い、HIF-1 及び UPR の活性化抑制作用とグルコース欠乏条件における選択的な細胞毒性への置換基効果について検討した。また、ベンゼン環の重要性についても検討するため、イソプロピル基及びピリジル基へ変換した化合物を合成し、評価を行った。

### ベンゼン環への置換基効果

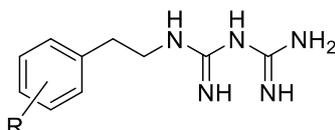
ベンゼン環のパラ位に OH 基を導入した **GPU-252** とパラ位とメタ位に OMe 基を1つずつ導入した **GPU-470** においては、いずれの活性及び毒性は消失した。パラ位に OMe 基を1つ導入した **GPU-301** では HIF-1 阻害活性は示した ( $IC_{50 \text{ HIF-1}}$ :  $35.3 \pm 8.0 \mu\text{M}$ ) が、 $100 \mu\text{M}$  において UPR 抑制作用は見られなかった。また、強い細胞毒性を示したが、通常培地とグルコース欠乏培地処理での選択性はほぼ失われた ( $IC_{50 \text{ normal}}$ :  $25.3 \pm 0.9 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50 \text{ GF}}$ :  $19.6 \pm 0.4 \mu\text{M}$ )。

ベンゼン環にアルキル基を導入した化合物 (**GPU-529, 476, 475, 528, 531, 471**) では、Me 基及び Et 基を導入した化合物が phenformin よりも強い HIF-1 及び UPR の活性化抑制作用を示した。さらに、グルコース欠乏条件選択的な細胞毒性も示し、中でもオルト位に Me 基を導入した **GPU-529** では 56 倍もの選択性を示した ( $IC_{50 \text{ normal}}$ :  $403.1 \pm 31.2 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50 \text{ GF}}$ :  $7.2 \pm 3.5 \mu\text{M}$ )。一方で、より嵩高い置換基である *t*-Bu 基を導入した **GPU-531** は、HIF-1 阻害活性は示したが、 $100 \mu\text{M}$  において UPR 抑制作用は見られなかった。また、細胞毒性を示したが、選択性は 3.8 倍と非常に小さかった。さらに嵩高い置換基を導入した **GPU-471** はいずれの活性も示さなかった。アルキル基の導入の結果、特にグルコース欠乏条件における細胞毒性の選択性は、アルキル基が嵩高くなるにつれ失われることが分かった (Me > Et > *t*-Bu)。また、**GPU-252** 及び **GPU-471** はいずれの活性も示さなかったことから、極性の高い置換基の導入が活性消失の原因であることが示唆された。

ハロゲンを導入した化合物 (**GPU-469, 474, 473, 485, 527, 530**) は、いずれも phenformin よりも強い HIF-1 及び UPR の活性化抑制作用を示した。さらに、グルコース欠乏条件選択的な細胞毒性も示し、中でもオルト位に Cl 基を導入した **GPU-469** では 67 倍もの選択性を示した ( $IC_{50 \text{ normal}}$ :  $350.4 \pm 11.9 \mu\text{M}$ ,  $IC_{50 \text{ GF}}$ :  $5.2 \pm 0.7 \mu\text{M}$ )。一方で、メタ位、パラ位に Cl 基を導入した場合には、選択性は大きく減少した。また、オルト位に

Cl 基を 2 つ導入した **GPU-485** の活性及び、グルコース欠乏条件における細胞毒性は **GPU-469** と比較すると弱いものであった。さらに、オルト位においてより嵩高く、電子求引性の高い Br 基、CF<sub>3</sub> 基を導入した **GPU-527** 及び **GPU-530** の選択性も **GPU-469** には及ばなかった。これらの結果から、ベンゼン環への置換基としてはオルト位への Me 基及び Cl 基の導入が、HIF-1 及び UPR の活性化抑制作用、グルコース欠乏条件における細胞毒性の選択性において最も有効であることがわかった。さらに、Me 基が電子供与性、Cl 基が電子求引性であることを考慮すると、置換基効果としては電子的な影響よりも、立体的な影響が、特に細胞毒性の選択性に影響すると考えられる。charton らによって定義された置換基のファンデルワールス半径に相当するパラメーターである  $\upsilon$  値 (H: 0, Me: 0.52, Et: 0.56, *t*-Bu: 1.24, Cl: 0.55, Br: 0.65, CF<sub>3</sub>: 0.91)<sup>69</sup> において Me 基と Cl 基がほぼ同じ値であることや、それらと比較して Br 基、CF<sub>3</sub> 基と値が大きくなるにつれ細胞毒性の選択性が低下していることも、立体的効果が活性に影響することを支持するものである。また、*c logD* 値から、脂溶性と活性との相関は見られなかった。

**Table 5.** ベンゼン環への置換基効果



GPU-No.	R	IC <sub>50</sub> of Transactivation (µM)		Cytotoxicity IC <sub>50</sub> (µM) <sup>c</sup>		Selectivity <sup>d</sup> Glc (+)/Glc (-)	<i>c logD</i> (pH 7.4) <sup>e</sup>
		HIF-1 <sup>a</sup>	GRP78 <sup>b</sup>	Glc (+)	Glc (-)		
Phenformin	H	27.4 ± 6.1	107.8 ± 9.4	976.2 ± 95.0	46.2 ± 9.2	21.1	-6.64
252	4-OH	> 100	> 100	> 100	> 100	-	-6.90
301	4-OMe	35.3 ± 8.0	> 100	25.3 ± 0.9	19.6 ± 0.4	1.3	-6.78
470	3,4-di-OMe	> 100	> 100	> 100	> 100	-	-6.66
529	2-Me	6.0 ± 0.1	87.9 ± 4.9	403.1 ± 31.2	7.2 ± 3.5	56	-6.50
476	3-Me	4.9 ± 0.6	57.0 ± 3.9	314.1 ± 12.0	9.3 ± 1.5	34	-6.49
475	4-Me	5.2 ± 0.4	60.4 ± 2.4	346.0 ± 3.5	8.2 ± 1.1	42	-6.59
528	4-Et	3.0 ± 0.3	41.3 ± 6.8	80.3 ± 4.4	6.1 ± 1.1	13	-6.52
531	4- <i>t</i> -Bu	14.4 ± 0.7	> 100	87.8 ± 1.7	23.4 ± 4.1	3.8	-5.79
471	4-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NHAc	> 100	> 100	> 1000	> 1000	-	-6.51
469	2-Cl	5.8 ± 0.3	37.4 ± 3.1	350.4 ± 11.9	5.2 ± 0.7	67	-6.39
474	3-Cl	3.6 ± 0.2	61.5 ± 4.2	157.5 ± 8.5	8.9 ± 1.2	18	-6.36
473	4-Cl	5.2 ± 0.9	88.2 ± 2.7	170.6 ± 22.3	18.9 ± 4.3	9.0	-6.35
485	2,6-di-Cl	15.6 ± 1.0	67.9 ± 7.4	334.1 ± 14.2	15.2 ± 3.7	22	-5.99
527	2-Br	3.1 ± 0.4	29.9 ± 9.4	217.6 ± 11.2	7.3 ± 0.5	30	-6.32
530	2-CF <sub>3</sub>	5.0 ± 0.3	89.2 ± 4.5	316.6 ± 10.6	15.8 ± 0.7	20	-6.02

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values for inhibition of HIF-1 activity was obtained using HEK293 p2.1 #3 cells under hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 24 h with test compounds.

<sup>b</sup> IC<sub>50</sub> values for inhibition of GRP78 promoter activity was obtained using HEK293 GRP78 #85 cells treated with 0.3 mM 2-DG and test compounds for 24 h.

<sup>c</sup> IC<sub>50</sub> values from MTT assay using HT29 cells treated with test compounds incubated in normal or glucose-free medium for 48 h.

Values are the mean ± SD of triplicate experiments.

<sup>d</sup> Selectivity was obtained from IC<sub>50</sub> in normal medium/IC<sub>50</sub> in glucose-free medium.

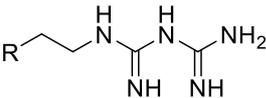
<sup>e</sup> The *c logD* values were calculated by Accord for Excel ver. 7.1.5.

### ベンゼン環の重要性についての検討

ベンゼン環をイソプロピル基に変換した **GPU-477** は、phenformin より若干弱いながらも HIF-1 転写活性化抑制作用及びグルコース欠乏条件における選択的細胞毒性を示し、ベンゼン環が必須ではないことを示唆した。この結果は富田らのグループが報告した buformin の作用とほぼ同様の傾向を示した。<sup>21</sup>

ベンゼン環をピリジル基への変換した場合には、いずれの活性もほぼ消失した。また、窒素が 2 位の **GPU-488** は高濃度ではあるが、グルコース欠乏条件における細胞毒性を示した (IC<sub>50</sub><sup>GF</sup>: 245.0 ± 16.7 μM)。一方で、窒素が 4 位の **GPU-489** では、1000 μM まで毒性は現れなかった。この結果は、極性の高いものが 4 位にある場合の方が、より顕著に活性を消失することを示唆している。

**Table 6.** ベンゼン環の重要性の検討



GPU-No.	R	IC <sub>50</sub> of Transactivation (μM)		Cytotoxicity IC <sub>50</sub> (μM) <sup>c</sup>		Selectivity <sup>d</sup> Glc (+)/Glc (-)	<i>c logD</i> (pH 7.4) <sup>e</sup>
		HIF-1 <sup>a</sup>	GRP78 <sup>b</sup>	Glc (+)	Glc (-)		
Phenformin		27.4 ± 6.1	107.8 ± 9.4	976.2 ± 95.0	46.2 ± 9.2	21.1	-6.64
477		33.5 ± 1.1	> 100	> 1000	70.7 ± 5.3	> 14	-6.89
488		> 100	> 100	> 1000	245.0 ± 16.7	> 4.1	-7.02
489		> 100	> 100	> 1000	> 1000	-	-6.93

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values for inhibition of HIF-1 activity was obtained using HEK293 p2.1 #3 cells under hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 24 h with test compounds.

<sup>b</sup> IC<sub>50</sub> values for inhibition of GRP78 promoter activity was obtained using HEK293 GRP78 #85 cells treated with 0.3 mM 2-DG and test compounds for 24 h.

<sup>c</sup> IC<sub>50</sub> values from MTT assay using HT29 cells treated with test compounds incubated in normal or glucose-free medium for 48 h.

Values are the mean ± SD of triplicate experiments.

<sup>d</sup> Selectivity was obtained from IC<sub>50</sub> in normal medium/IC<sub>50</sub> in glucose-free medium.

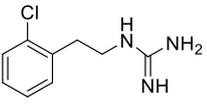
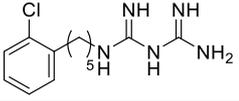
<sup>e</sup> The *c logD* values were calculated by Accord for Excel ver. 7.1.5.

### GPU-486 および GPU-539 の評価

これまでの結果より、ビグアニドをグアニジンに変換した **GPU-231** が、ビグアニドに匹敵する活性を示したこと、また、ベンゼン環における置換基効果の検討では、オルト位に Cl 基を導入した **GPU-469** が HIF-1 転写活性化抑制作用及び UPR 活性化抑制作用の増強に加え、最も優れたグルコース欠乏条件選択的な細胞毒性を示したこと、それらの特徴を有する **GPU-486** を合成・評価した。さらに、アルキレンリンカー鎖長の検討結果から、鎖長の延長により細胞毒性のグルコース欠乏条件選択性はあまり変化しないものの、活性が増強したことから、*n* = 5 のアルキレンリンカーを有する **GPU-539** を合成・評価した。

結果として、**GPU-486** は、Cl 基のないグアニジン誘導体である **GPU-231** (Table 4) と比較して、より強い HIF-1 転写活性化抑制作用及び UPR 活性化抑制作用、グルコース欠乏条件における細胞毒性を示した。一方で、通常培地においても細胞毒性が現れ、選択性は 14 倍に留まった。**GPU-469** の最も優れたグルコース欠乏条件選択的な細胞毒性を保持しつつ、さらに活性の増強を目指して合成した **GPU-539** は、非常に強い HIF-1 転写活性化抑制作用及び UPR 活性化抑制作用、グルコース欠乏条件における細胞毒性を示した。しかしながら、通常培地においても細胞毒性が強く現れ、選択性は 13 倍であった。この結果から、グルコース欠乏条件における細胞毒性の選択性に関しては、リンカーを伸ばしたことにより Cl 基の置換基効果が弱まったと考えられ、Cl 基の置換位置に加え、ベンゼン環とビグアニド部位の距離が細胞毒性の選択性にとって重要であることが示唆された。

**Table 7. GPU-486 および GPU-539 の評価**

GPU-No.	Structure	IC <sub>50</sub> of Transactivation (μM)		Cytotoxicity IC <sub>50</sub> (μM) <sup>c</sup>			c logD (pH 7.4) <sup>e</sup>
		HIF-1 <sup>a</sup>	GRP78 <sup>b</sup>	Glc (+)	Glc (-)	Glc (+)/Glc (-)	
486		12.9 ± 0.5	33.4 ± 2.2	189.9 ± 17.0	14.0 ± 2.5	14	-1.77
539		1.0 ± 0.1	7.5 ± 0.1	24.0 ± 1.4	1.9 ± 0.1	13	-6.05

<sup>a</sup> IC<sub>50</sub> values for inhibition of HIF-1 activity was obtained using HEK293 p2.1 #3 cells under hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 24 h with test compounds.

<sup>b</sup> IC<sub>50</sub> values for inhibition of GRP78 promoter activity was obtained using HEK293 GRP78 #85 cells treated with 0.3 mM 2-DG and test compounds for 24 h.

<sup>c</sup> IC<sub>50</sub> values from MTT assay using HT29 cells treated with test compounds incubated in normal or glucose-free medium for 48 h.

Values are the mean ± SD of triplicate experiments.

<sup>d</sup> Selectivity was obtained from IC<sub>50</sub> in normal medium/IC<sub>50</sub> in glucose-free medium.

<sup>e</sup> The *c logD* values were calculated by Accord for Excel ver. 7.1.5.

## 小括及び考察

UPR 活性化阻害作用およびグルコース欠乏条件選択的な細胞毒性が報告された、ビグアニド系抗糖尿病薬の phenformin の構造をリードとし、biguanide 部位、ベンゼン環部位、ならびにこれらの部位を結ぶ alkylene linker に分けて誘導体合成を行い、39 種の誘導体を合成した。さらに、それらの HIF-1 転写活性化および UPR 活性化抑制作用、並びに低栄養ストレス条件における選択的な細胞毒性について評価した結果、以下の知見を得た。

- 1) alkylene linker が長鎖であるほど活性は向上するものの、通常環境下での細胞毒性も増大し選択性はほぼ変化しなかった。
- 2) biguanide 部位の変換では、guanidino 基に変換した GPU-231 のみが phenformin に匹敵する活性を示したことから、生理的条件においてカチオン化することが重要であることが示唆された。
- 3) ベンゼン環部位への置換基導入効果を検討した結果、*o*-Me 基あるいは *o*-Cl 基を導入した場合 (GPU-469 および GPU-529) に特に優れた低栄養選択的な細胞毒性を示したが、一方で嵩高い置換基や極性の高い置換基の導入により、活性が減弱もしくは消失することがわかった。
- 4) オルト位への置換が電子供与性の Me 基および電子求引性の Cl 基のどちらにおいてもレポーター活性の強い抑制作用とグルコース欠乏条件における優れた選択的な細胞毒性を示したことから、置換基の活性、特に選択毒性に対する影響は電子的な効果よりも立体的な効果の影響が大きいと考えられる。
- 5) GPU-539 の結果から、ベンゼン環部位と biguanide 部位の距離が、特にグルコース欠乏条件における細胞毒性の選択性に影響することが示唆された。

以上の候補化合物群は、生理的条件下でカチオン性を有し、非常に低い脂溶性を示すことから、特殊な細胞内取り込み機構を経ることが予想されたことから、以下にビグアニド系化合物の取り込みに関する最近の知見を述べ、考察する。

薬物の物性の重要性を提唱した例として、優れた経口吸収性・膜透過性を示す薬物に関する経験則であるリピンスキーの rule of five がある。<sup>70</sup> これによると、分子量が 500 以下、pH 7.4 における  $\log D$  が 5 以下であり、薬物の構造に水素結合供与体が 5 個以下、水素結合受容体が 10 個以下である場合に、経口吸収性および膜透過性に優れよいとされる。また、アストラゼネカの報告によると、 $\log D$  が 1-3 となる化合物が溶解度と膜透過性のバランス、代謝安定性の観点から理想的とされている。<sup>71</sup> 今回リードとした phenformin は分子量が 205、pH 7.4 における  $\log D$  が -6.64、水素結合供与体が 6 個、水素結合受容体が 5 個である。今回合成した、ビグアニド部位を有する誘導体もビグアニ

ド部位の極性が非常に高いため、ほとんどの化合物において、pH 7.4 における  $\log D$  は -6 から -7 となっており、特に  $\log D$  がリピンスキーの rule of five から大きく外れている。また、グアニジン誘導体の GPU-231、GPU-486 においても、pH 7.4 における  $\log D$  は、それぞれ、-2.33、-1.77 であり、これらもリピンスキーの rule of five から大きく外れており、ビグアニドおよびグアニジンを有する化合物は、単純に細胞膜を透過しているとは考え難い。一方で、ビグアニド部位を各種変換した化合物の中には、生理的な条件において中性で、pH 7.4 における  $\log D$  が大きな値となると考えられるものがいくつかあるが、いずれも HIF-1/UPR 阻害活性や細胞毒性を示さなかった。

ビグアニド系化合物は生理的条件下でカチオン性を帯びており、細胞内取り込み・排出に関しては、有機カチオントランスポーター (OCT1-3) の重要性が知られている。<sup>65-68</sup> 特に metformin において多くの報告があり、中でも有機カチオントランスポーターの遺伝子多型が薬物動態に与える影響についても研究が進んでいる。<sup>72</sup> また、最近では、multidrug and toxin extrusion transporters (MATE1 及び MATE2/2K) や酸性条件下で活性化される有機カチオントランスポーターである plasma membrane monoamine transporter (PMAT) の metformin の取り込み・排出における寄与も報告されている。<sup>72,73</sup> 特に Zhou らにより、pH 6.6 における PMAT からの metformin の取り込みが生理的条件下における取り込みの 4 倍以上になることが報告されており、<sup>74</sup> がん微小環境での取り込みにおける重要性が推測される。一方、芳香環を有する phenformin の取り込みに関して、最近の Segal らが興味深い知見を報告しており、OCT1 ノックダウン細胞を用いた実験において、metformin では AMPK のリン酸化は見られず、細胞毒性の減弱が示された。一方 phenformin では、OCT1 ノックダウンによる影響がほぼ現れなかった。すなわち、metformin の取り込みは OCT1 に大きく依存しているのに対して、phenformin は OCT1 を介さない取り込み機構が存在し、OCT1 の影響が小さいことが示唆された。<sup>67</sup> また、有機カチオン/カルニチントランスポーター1 (OCTN1) を介した、ミトコンドリアへの取り込みも明らかとなっており、OCTN1 ノックダウンによる呼吸鎖阻害の減弱や乳酸産生の減少も報告されている。<sup>75</sup> さらに、metformin と同様に phenformin の抗がん効果についても現在研究が進んでいる。<sup>68,73,76,77</sup>

以上の知見より、今回活性を示したビグアニドおよびグアニジン類は、 $pK_a$  値から、生理的条件下においてカチオン性を示すと考えられるが、芳香環を有する誘導体が強い活性を示していることから、phenformin と同様に、有機カチオントランスポーターとは異なる何らかのルートによって細胞内に取りこまれ、未知の標的タンパク質と相互作用することで活性を発現していると予想される。今後、本化合物をリードとする創薬へと展開するためには、細胞内取り込みの機構および細胞内動態の解析と標的分子の同定の観点から、研究を進める必要があると考えられる。

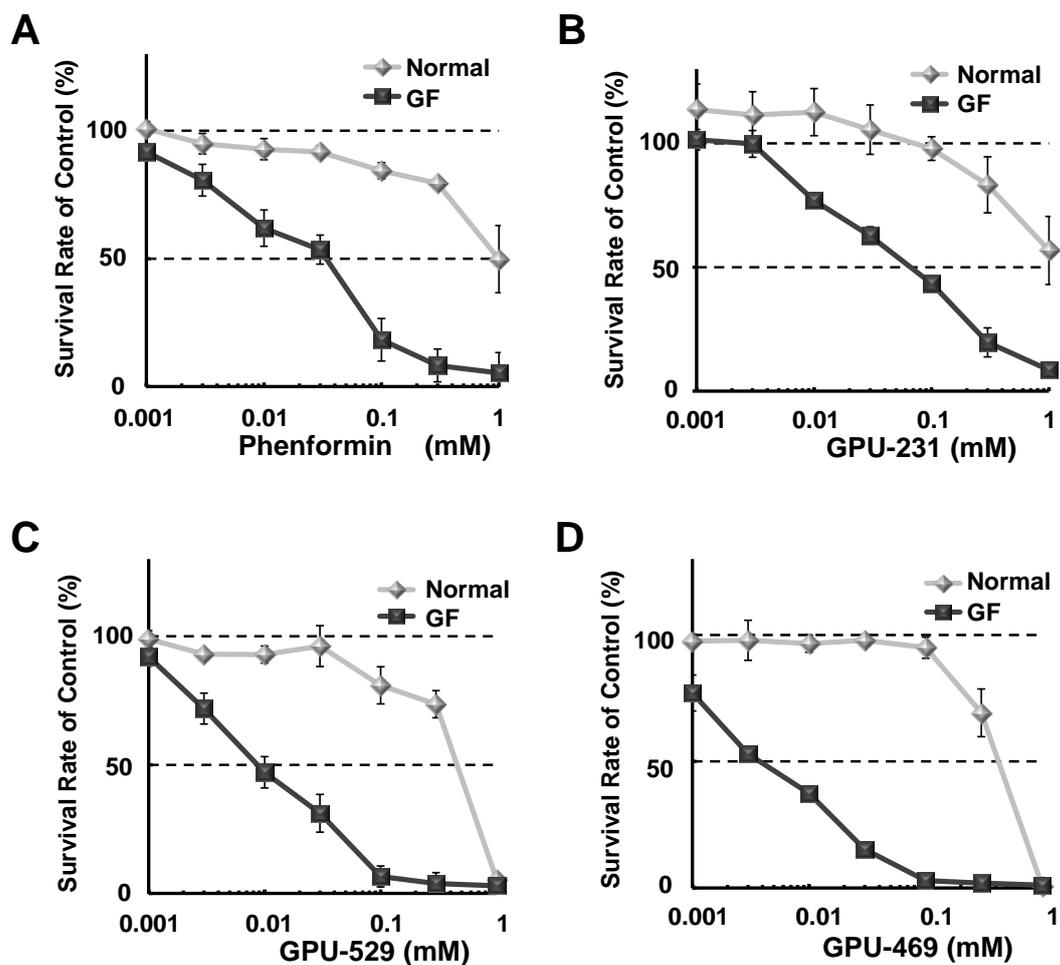
## 第二章

### ビグアニド誘導体の生物活性

#### 第一節 低栄養選択的細胞毒性

##### 第一項 低栄養および低酸素選択的細胞毒性

第一章第三節第三～五項にて行ったスクリーニングの結果得られた化合物について、通常条件およびグルコース欠乏条件における細胞毒性を  $1\ \mu\text{M}$ – $1\ \text{mM}$  の範囲で検討した。Figure 13 に示すように、いずれの化合物も優れた低栄養選択性を示しており、特に Figure 13C および 13D に示す **GPU-529** および **GPU-469** では、低栄養において非常に強い毒性を示した ( $\text{IC}_{50\ \text{GF}}$ :  $7.2 \pm 3.5\ \mu\text{M}$ ,  $5.2 \pm 0.7\ \mu\text{M}$ )、一方で、通常条件においては  $300\ \mu\text{M}$  までほぼ毒性を示さず、どちらも phenformin と比較して、より優れた低栄養選択毒性を示した。



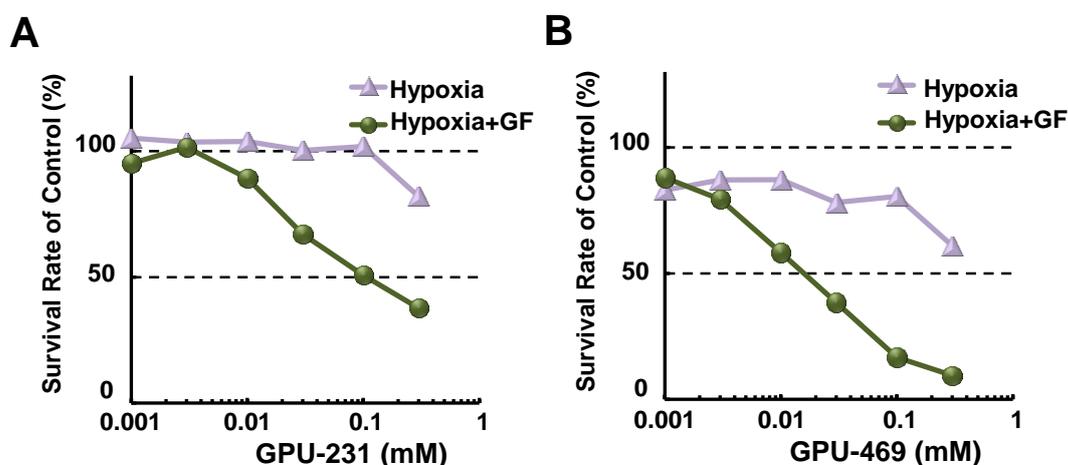
**Figure 13.** HT29 細胞を用いたグルコース欠乏条件における濃度依存的細胞毒性  
 Cell viability was determined by MTT assay using HT29 cells treated with phenformin (A), GPU-231 (B), GPU-529 (C), and GPU-469 (D) under normal or glucose deprived condition (GF) for 48 h. Each point represents mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

### 低酸素および低酸素・低栄養毒性

第一章第三節第二項において phenformin の低酸素毒性が認められなかったことから、スクリーニング評価における細胞毒性は通常条件およびグルコース欠乏条件で行った。しかしながら、実際のがん微小環境は、低酸素及び低グルコースストレスが同時に生じていると考えられるため、GPU-231 および GPU-469 を用い、低酸素ストレスおよび、低酸素・グルコース欠乏の W ストレス条件下における HT29 細胞に対する毒性を評価した。

結果として、Figure 14 に示すように低酸素ストレス条件のみの場合では、GPU-231 および GPU-469 は 300  $\mu$ M までほぼ毒性を示さず、どちらも通常条件における結果とほ

ば同様であった。一方、低酸素・グルコース欠乏 W ストレス条件下においては、どちらも強い毒性を示すが、これらの毒性はグルコース欠乏条件のみの場合と比較して若干弱いものであり、phenformin と同じ傾向を示した。結果として、phenformin、GPU-231、GPU-469 はいずれも強い HIF-1 阻害作用を有すが、低酸素条件下における選択的な毒性を示さないことから、HIF-1 阻害作用と細胞毒性には相関関係がないことが示唆された。その一方で、グルコース欠乏条件および低酸素+グルコース欠乏条件下においては選択的な毒性が現れたことから、これらの化合物の毒性はグルコース欠乏条件においてのみ特異的に現れるものであることが示唆された。



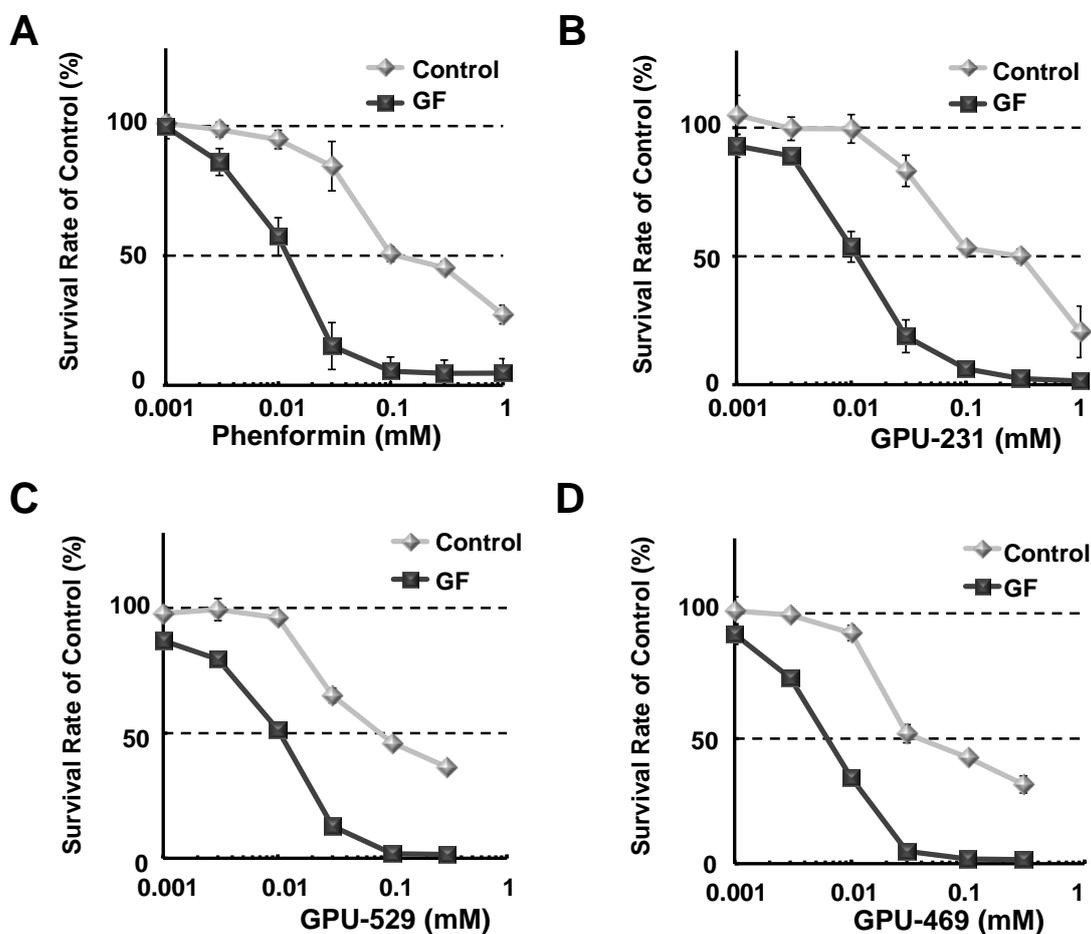
**Figure 14.** 低酸素・低栄養条件下における GPU-231 および GPU-469 の細胞毒性  
Cell viability was determined by MTT assay using HT29 cells treated with GPU-231 (A) and GPU-469 (B) under hypoxia (1% O<sub>2</sub>), glucose-free medium under hypoxia (1% O<sub>2</sub>) for 48 h

## 第二項 p53 発現の影響

1989 年に Bert らによって、ヒトの大腸がんには p53 遺伝子の変異・欠失が高頻度に認められることが明らかとなったことをきっかけに、p53 はがん抑制遺伝子として非常に有名となった。<sup>78</sup>p53 遺伝子の変異・欠失したがん細胞ではアポトーシス誘導能が障害されており、化学療法耐性の原因の一つであると考えられている。<sup>79</sup>さらに近年、がんのエネルギー代謝、とりわけ糖代謝が注目されるなかで、p53 の糖・エネルギー代謝に及ぼす様々な役割が報告されている。<sup>80, 81</sup>biguanide には、呼吸鎖阻害作用や AMPK 活性化作用が報告されていることから、今回得られた候補化合物群は、がんのエネルギー代謝に関与している可能性があると考えられる。そこで、これまで細胞毒性に用いている HT29 細胞は、p53 mutant であることから、さらに p53 wild (HCT116)、p53 null

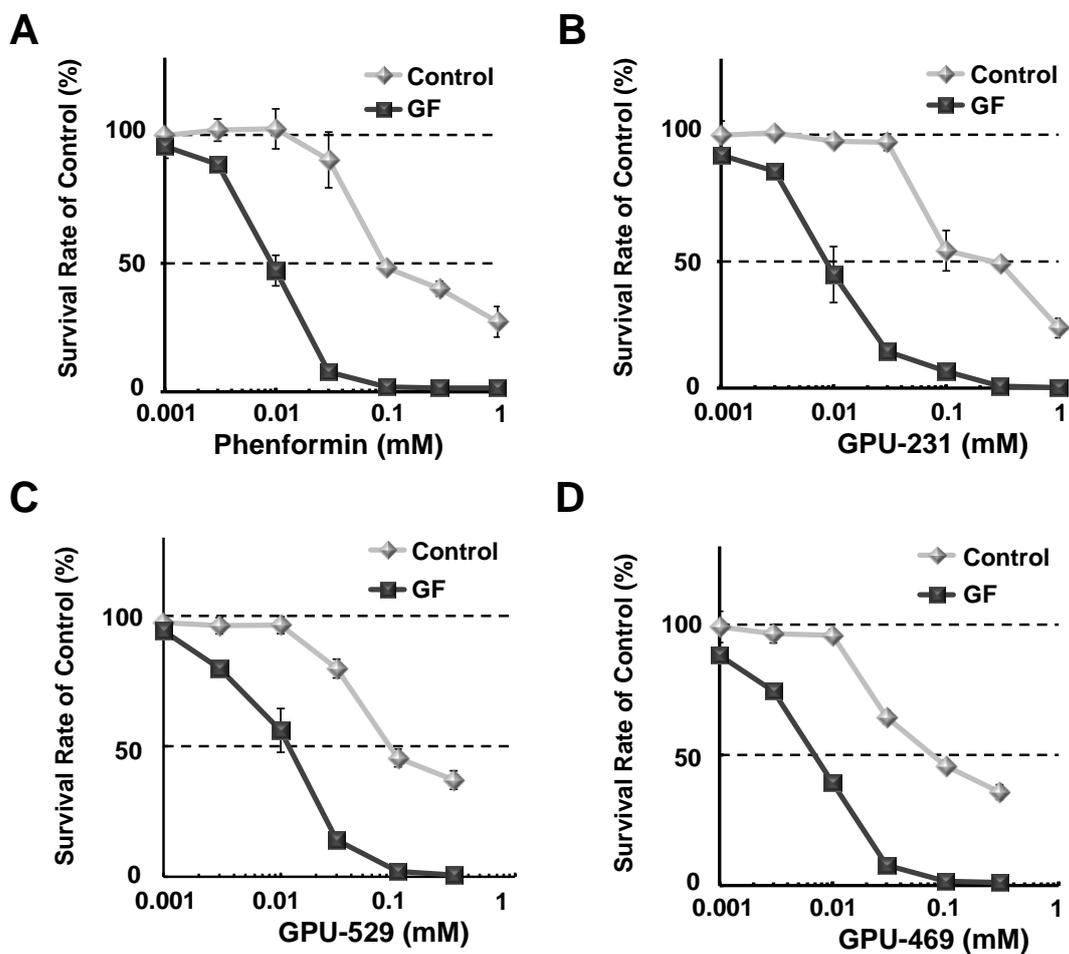
(HCT116p53<sup>-/-</sup>)<sup>82</sup>であるがん細胞に対する、phenformin と候補化合物群の細胞毒性をそれぞれ検討した。

結果として、phenformin と候補化合物群は、p53 遺伝子の変異・欠失に依らず、グルコース欠乏条件選択的な細胞毒性を示したことから、これらの化合物の細胞毒性は p53 遺伝子の変異・欠失の影響を受けないことが示唆された。最も優れた選択性を示したのは、HT29 を用いた時であったが、これは実験プロトコルを定める際の条件検討を、phenformin と HT29 を用いて行い、そのプロトコルを HCT116 及び HCT116p53<sup>-/-</sup>を用いた実験にそのまま適応したためだと考えられる。



**Figure 15.** HCT116 細胞 (p53 wild) 細胞を用いたグルコース欠乏条件における濃度依存的細胞毒性

Cell viability was determined by MTT assay using HCT116 cells treated with phenformin (A), GPU-231 (B), GPU-529 (C), and GPU-469 (D) under normal or glucose deprived condition (GF) for 48 h. Each point represents mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.



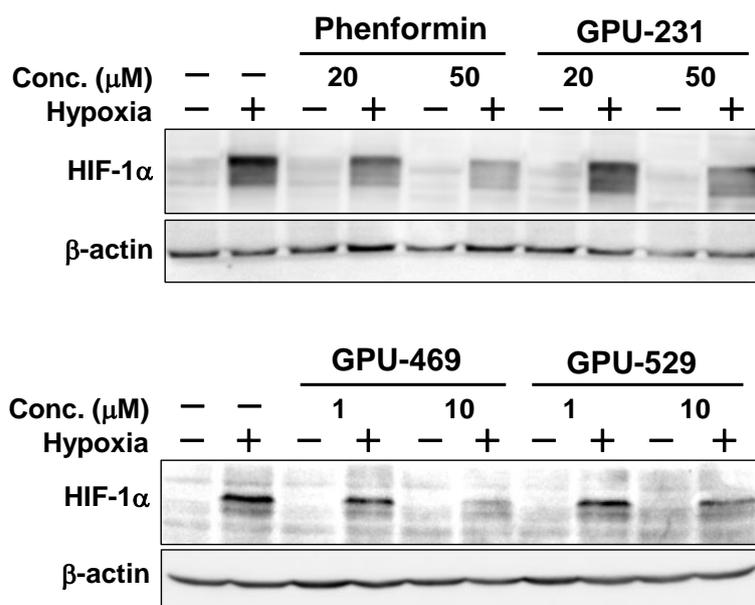
**Figure 16.** HCT116p53<sup>-/-</sup>細胞 (p53 null) 細胞を用いたグルコース欠乏条件における濃度依存的細胞毒性

Cell viability was determined by MTT assay using HCT116p53<sup>-/-</sup> cells treated with phenformin (A), GPU-231 (B), GPU-529 (C), and GPU-469 (D) under normal or glucose deprived condition (GF) for 48 h. Each point represents mean  $\pm$  SD of triplicate experiments.

## 第二節 HIF-1 $\alpha$ タンパク質発現阻害

HIF-1 は  $\alpha$  と  $\beta$  の異なる 2 つのサブユニットからなる。正常な組織において  $\beta$  サブユニット (HIF-1 $\beta$ ) は恒常的に発現しているが、 $\alpha$  サブユニット (HIF-1 $\alpha$ ) の安定性と発現量は、翻訳後修飾と転写調節で厳密に制御されている。<sup>83</sup> したがって、HIF-1 の活性は HIF-1 $\beta$  に結合できる HIF-1 $\alpha$  の量によって決まる。そこで phenformin と候補化合物群の HIF-1 $\alpha$  タンパク質の発現に対する影響を、HT29 細胞を用いたウェスタンブロット法によって評価した。

Figure 17 の結果から、phenformin 及び GPU-231 は 20、50  $\mu\text{M}$  において、低酸素ストレスによって亢進した HIF-1 $\alpha$  タンパク質発現を濃度依存的に抑制した。さらに、GPU-469 及び GPU-529 は、より低い濃度である 1、10  $\mu\text{M}$  において、濃度依存的に低酸素ストレスによって亢進した HIF-1 $\alpha$  タンパク質発現を濃度依存的に抑制した。この結果は、第三章に示した低酸素応答ルシフェラーゼアッセイの結果と一致するものであった。



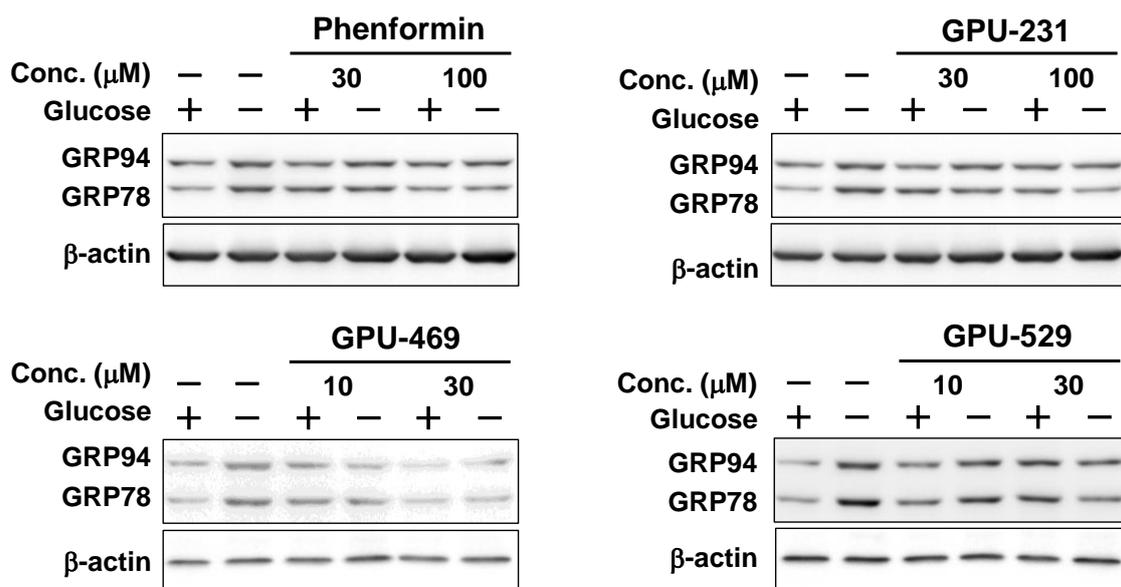
**Figure 17.** HIF-1 $\alpha$  タンパク質の発現に対する影響

HT29 cells were incubated with phenformin, GPU-231, GPU-469, and GPU-529 for 4 h under normoxic (20% O<sub>2</sub>) (-) or hypoxic (1% O<sub>2</sub>) (+) condition.

### 第三節 GRP78 タンパク質発現阻害

phenformin と候補化合物群について、UPR における折り畳み不全タンパクの正常化に重要な役割を果たす、分子シャペロンタンパク GRP78 のタンパク発現に対する影響を、HT29 細胞を用いたウエスタンブロット法によって評価した。

Figure 18 の結果から、phenformin 及び GPU-231 は 30、100  $\mu\text{M}$  において、濃度依存的にグルコース欠乏ストレスによって亢進した GRP78 タンパク質発現を濃度依存的に抑制した。さらに、GPU-469 及び GPU-529 は、より低い濃度である 10、30  $\mu\text{M}$  において、濃度依存的にグルコース欠乏ストレスによって亢進した GRP78 タンパク質発現を濃度依存的に抑制した。この結果は、UPR 応答ルシフェラーゼアッセイの結果と一致、もしくは、より強い抑制作用を示すものであった。また、これらの化合物は小胞体分子シャペロンタンパク GRP94 タンパク質発現についても阻害作用を示したが、GRP78 への作用と比較すると影響は小さいものであった。



**Figure 18.** GRP78 タンパク質の発現に対する影響

HT29 cells were treated with phenformin, GPU-231, GPU-469, and GPU-529 for 24 h in normal (2 g/L glucose) (+) or glucose-free (-) medium.

## 第四節 血管新生阻害作用

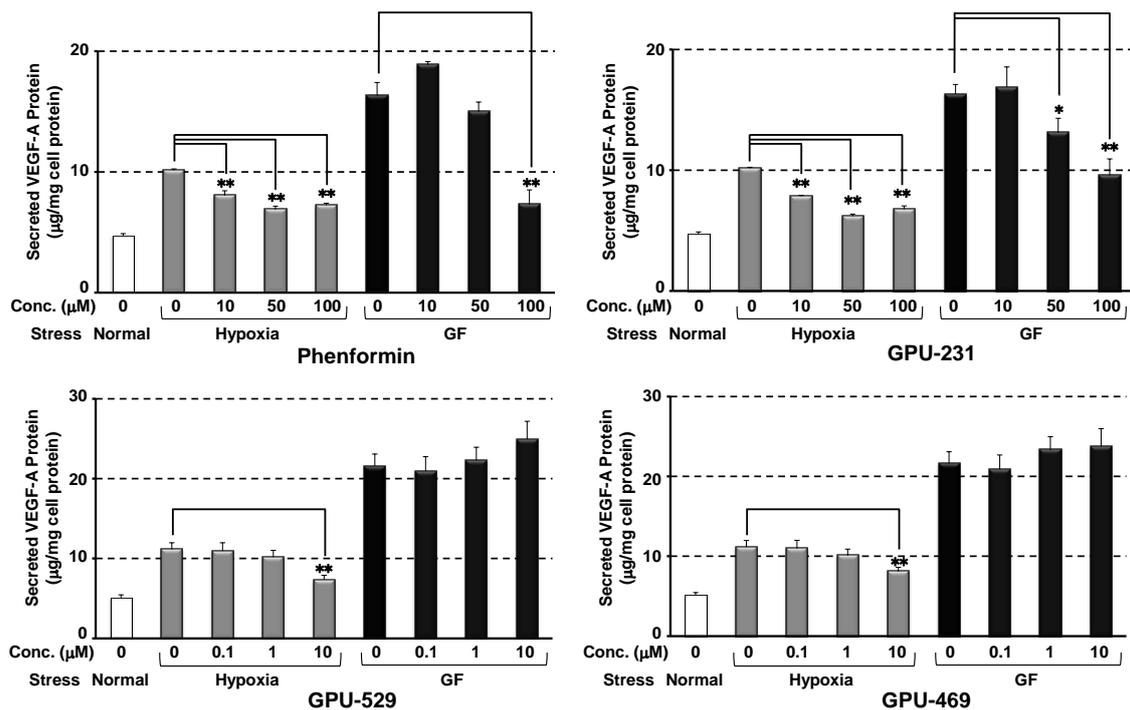
血管新生誘導はがん微小環境における組織レベルでの適応応答反応として重要である。固形がんの増大には栄養や酸素の供給が必要なため、がん細胞は局所的な血管の伸長を誘導することが近年、急速に解明されつつある。1970年代初頭に J. Folkman によって「血管を標的とするがん治療」という概念が提唱されたが、<sup>84,85</sup>有効性については長い間疑問視されてきた。近年の血管新生の分子メカニズムの解明により、Folkman の理論が再認識されるようになった。その結果、進行性大腸がんに対する血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) 中和抗体ベバシズマブが開発され、日本においても 2007 年に承認された。この成果により、固形がんにおける血管新生阻害剤の有用性が支持され、現在、抗体のみならず低分子等次世代型医薬品の開発が加速している。<sup>86-88</sup>このような背景より血管新生阻害効果の評価は微小環境モジュレーターにおいて重要であると考えられる。

近年、metformin が一部 AMPK 依存的に血管内皮細胞の転移、VEGF 発現や血管新生阻害作用を示すことが報告されていること、<sup>33</sup>さらに、分子シャペロンタンパク GRP78 が、がんの血管新生において重要な役割を果たしていることを示唆する報告を受け、<sup>61,89</sup>今回得られた候補化合物の血管新生阻害作用について検討した。

### 第一項 VEGF タンパク質分泌阻害

HIF-1 の下流遺伝子として、がんのエネルギー代謝、血管新生、転移や浸潤に関わる遺伝子が存在し、がんを悪性化に導いていくと考えられている。<sup>2,11</sup>そこで、phenformin、と候補化合物群について、血管新生に関わる遺伝子である VEGF-A の分泌タンパク発現に対する影響を ELISA によって評価した。

Figure 19 に示すように、1%O<sub>2</sub>による低酸素ストレス及びグルコース欠乏ストレスによって、HT29 細胞における VEGF-A タンパク分泌はそれぞれ 2 倍、3-4 倍程度まで亢進した。phenformin 及び GPU-231 は低酸素ストレスによって亢進した VEGF-A タンパク分泌を、10-100 μM において有意に抑制した。一方、グルコース欠乏ストレスによって亢進した VEGF-A タンパク分泌を有意に抑制するには、より高い濃度 (phenformin; 100 μM, GPU-231; 50-100 μM) が必要であった。また、GPU-469 及び GPU-529 は低酸素ストレスによって亢進した VEGF-A タンパク分泌を、10 μM において有意に抑制したが、グルコース欠乏ストレスによって亢進した VEGF-A タンパク分泌は抑制しなかった (0.1-10 μM)。これらの結果は、phenformin、GPU-231、GPU-469 及び GPU-529 が血管新生阻害作用を有することを示唆した。



**Figure 19.** VEGF-A 分泌タンパク質発現に対する影響

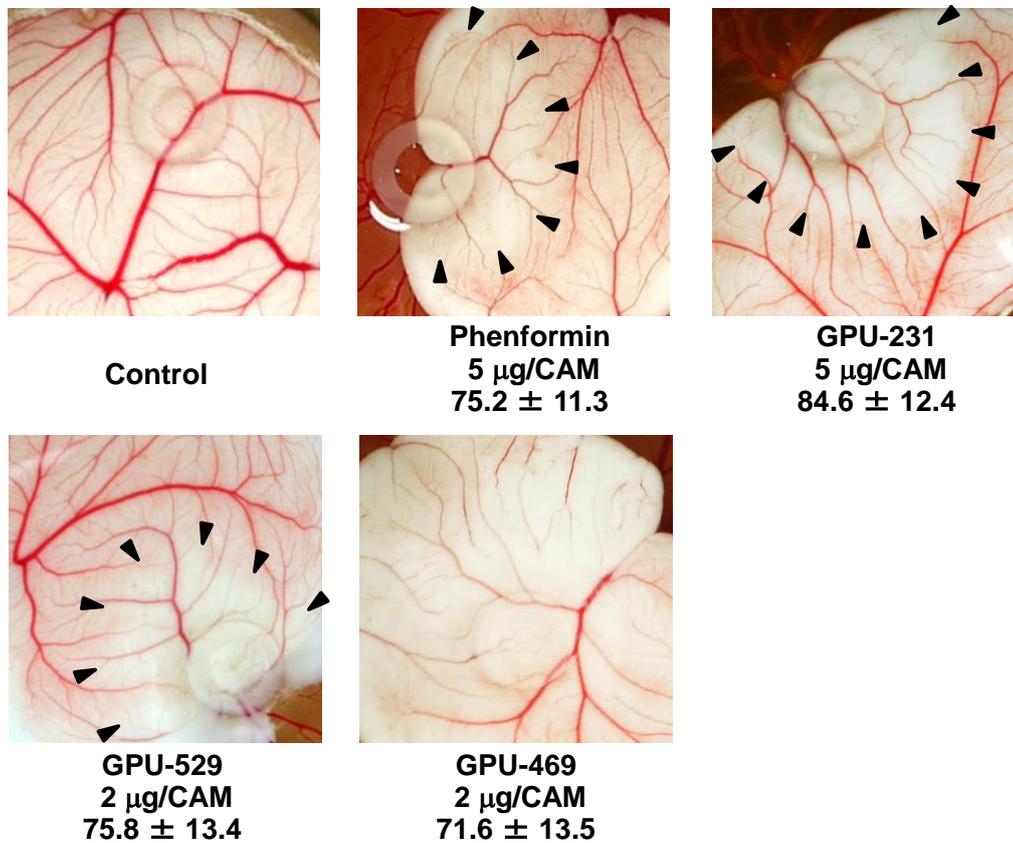
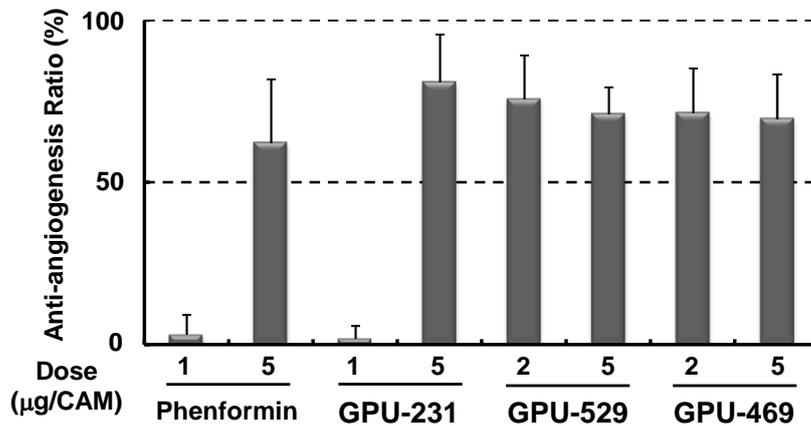
In ELISA of VEGF-A secretion, HT29 cells were treated with test compounds for 24 h in normal medium under 20% O<sub>2</sub> (Normal), 1% O<sub>2</sub> (Hypoxia), or in glucose-free medium (GF).

Data are the mean ± SD of triplicate experiments. The differences between each control and the compound-treated samples were statically significant (\**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01).

## 第二項 鶏卵漿尿膜 (CAM) 法による血管新生阻害能の評価

現在、血管新生の評価系としては *in vitro* における正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いた管形成の評価系や *in vivo* におけるウサギの角膜を用いた評価系<sup>90</sup> またはマウス背部皮下法<sup>91</sup> などがあげられる。これらの評価系は血管新生阻害能を評価する上で優れた方法であるが、実験コストが高価であるため頻用できないことが問題である。Folkman によって導入された鶏卵漿尿膜 (CAM) 法<sup>92</sup> は非常に安価な鶏卵を用い、さらにマウスの系と比較して検体化合物の量が少量で評価できるため、これらの評価系の中で多量の検体を評価する上でさらに優れていると考えられる。そこで今回得られた候補化合物の *in vivo* における血管新生阻害効果を CAM 法にて評価した。

Figure 20 に示すように、phenformin 及び GPU-231 は投与量 5 µg/CAM において強い血管新生阻害作用を示した。さらに、GPU-469 及び GPU-529 はより強い効果を示し、2 µg/CAM において顕著な血管新生阻害作用を示した。

**A****B**

**Figure 20.** CAM アッセイによる血管新生阻害作用の検討

The CAMs of 4-day-old chick embryos were treated with test compounds for 2 days.

(A) Pictures of test compounds show avascular zone around the silicon ring where the test compounds were administrated. Applied dose (µg/CAM) and antiangiogenesis ratio (%; mean ± SD) is shown under pictures. (B) Antiangiogenesis ratios of compounds calculated from the following formula; Antiangiogenesis ratio (%) = [1 - (control point/drug point)] × 100. Eight to ten eggs were used in total for each condition.

## 小括

第一章におけるがん微小環境モジュレーターのスクリーニング評価によって選ばれた候補化合物、**GPU-231**、**GPU-469**、**GPU-529** に phenformin を加え、各種生物活性について検討した結果、以下の知見を得た。

- 1) phenformin および **GPU-469** は低酸素ストレス条件 (1%O<sub>2</sub>) 下における HT29 細胞に対して選択的な細胞毒性を示さなかった。
- 2) グルコース欠乏条件における選択的細胞毒性について、p53 mutant の HT29 細胞に加え、HCT116 p53 wild、HCT116 p53 null をそれぞれ用いて毒性を検討した結果、p53 の発現は候補化合物の毒性・選択性に影響しないことが示唆された。
- 3) 候補化合物群は HIF-1 $\alpha$  および GRP78 タンパク質発現を抑制した。特に **GPU-469** および **GPU-529** は phenformin および **GPU-231** よりも強い抑制作用を示した。
- 4) 候補化合物群は低酸素ストレス下で亢進される VEGF-A タンパク質分泌を抑制した。また、phenformin および **GPU-231** は高濃度においてグルコース欠乏ストレス下で亢進される VEGF-A タンパク質分泌を抑制した。
- 5) CAM 法にて血管新生阻害作用を評価した結果、phenformin および **GPU-231** は 5  $\mu$ g/CAM において強い血管新生阻害作用を示し、さらに、**GPU-469** および **GPU-529** はより強い効果を示し、2  $\mu$ g/CAM において顕著な血管新生阻害作用を示した。

## 総括および結論

がん罹患率の上昇と患者の高齢化に伴い、腫瘍選択性が高く、副作用を抑え、予後の改善や再発予防を考慮した治療戦略が強く求められている。著者は、固形がんの過酷な微小環境ストレス下におけるがん細胞の適応応答を阻害することによって、がんの悪性化や治療抵抗性、転移・再発などを改善することが可能であると考えた。そこで、がん微小環境を標的とする治療薬の開発を目指して、UPR 阻害作用が報告された抗糖尿病薬の biguanide 系化合物に着目し、誘導体合成及びセルベーススクリーニング評価による構造活性相関研究を行った。さらに優れた候補化合物については関連遺伝子タンパク発現に対する影響や *in vivo* での血管新生阻害作用について検討した。

以下に得られた知見をまとめる。

- 1) リード化合物の phenformin の構造を、biguanide 部位、ベンゼン環部位、ならびにこれらの部位を結ぶ alkylene linker に分け、誘導体合成を行い 39 種の誘導体を合成した。HIF-1 転写活性化及び UPR 活性化抑制作用、並びに低栄養ストレス条件下における選択的な細胞毒性について評価した結果、alkylene linker が長鎖であるほど活性は向上するものの、通常環境下での細胞毒性も増大し選択性はほぼ変化しなかった。biguanide 部位の変換では、guanidino 基に変換した GPU-231 のみが phenformin に匹敵する活性を示したことから、生理的条件においてカチオン化することが重要であることが示唆された。ベンゼン環部位への置換基導入効果を検討した結果、*o*-Me 基あるいは *o*-Cl 基を導入した場合 (GPU-469 および GPU-529) に特に優れた低栄養選択的な細胞毒性を示したが、一方で嵩高い置換基や極性の高い置換基の導入により、活性が減弱もしくは消失することがわかった。さらに、GPU-539 の結果から、ベンゼン環部位と biguanide 部位の距離が、特にグルコース欠乏条件下における細胞毒性の選択性に影響することが示唆された。

以下、phenformin、GPU-231、GPU-469 および GPU-529 を用いた生物活性評価の結果について述べる。

- 2) phenformin、GPU-231 および GPU-469 は低酸素ストレス条件 (1%O<sub>2</sub>) 下における HT29 細胞に対して選択的な細胞毒性を示さなかった。
- 3) グルコース欠乏条件下における選択的な細胞毒性について、p53 mutant の HT29 細胞に加え、HCT116 p53 wild、HCT116 p53 null をそれぞれ用いて毒性を検討した結果、どちらの細胞においても選択性を示したことから、p53 発現は候補化合物の毒性・選択性に影響しないことが示唆された。
- 4) これらの化合物は HIF-1 $\alpha$  および GRP78 タンパク質発現を抑制した。特に GPU-469

および **GPU-529** は phenformin および **GPU-231** よりも強い抑制作用を示した。さらにこれらの化合物は低酸素ストレス下で亢進される VEGF-A タンパク質分泌を抑制した。また、phenformin および **GPU-231** は高濃度において低栄養ストレス下で亢進される VEGF-A タンパク質分泌を抑制した。

- 5) CAM 法にて血管新生阻害作用を評価した結果、phenformin および **GPU-231** は 5  $\mu\text{g}/\text{CAM}$  において強い血管新生阻害作用を示し、さらに、**GPU-469** および **GPU-529** はより強い効果を示し、2  $\mu\text{g}/\text{CAM}$  において顕著な血管新生阻害作用を示した。

本研究において著者は、低酸素応答と UPR に対する抑制効果を指標にスクリーニング評価を行った結果、HIF-1 阻害作用と UPR 阻害作用にほとんどの場合において相関を認めた。しかしながら、それぞれの適応応答間にどのような関連があるかは明らかになっていない。がん微小環境では HIF-1 シグナル系、UPR シグナル系に加えて mTOR のシグナル伝達が、低酸素・低栄養ストレスに応答して活性化または抑制されていることから、それらの複雑なクロストークにより、エネルギー代謝、タンパク質合成、血管新生などがコントロールされ、がん細胞は劣悪な微小環境に適応し生存していると考えられる。<sup>1</sup>

以上、本研究において、固形がんの微小環境をにおける適応応答を阻害するがん微小環境モジュレーターとして、biguanide 誘導体 **GPU-469** および **GPU-529** の開発に成功した。本化合物はがん微小環境において活性化される、HIF-1 および UPR に対して優れた阻害活性を示し、かつ低栄養条件においてのみ特異的に細胞毒性を示すものである。さらに、がん微小環境ストレスによって亢進される VEGF-A タンパク質分泌を阻害し、*in vivo* での血管新生阻害作用を有することから、新たながん治療薬のリード化合物として有用であると期待され、さらなる構造最適化と作用機構の解明を行う価値があると考えられる。また、biguanide 誘導体の構造活性相関研究より得られた知見は、今後の構造最適化と標的タンパク質を解明するためのプローブ開発にとって有用なものであると考えられる。

## 謝辞

p2.1 plasmid vector を御供与していただきましたジョーンズ・ホプキンス大学 Gregg L. Semenza 教授、並びに pGRP78pro160luc plasmid vector を御供与していただきました財団法人癌研究会化学療法センター富田 章弘博士、並びに HCT116p53<sup>+/+</sup> を御供与していただきましたジョーンズ・ホプキンス大学 Bert Vogelstein 博士に感謝致します。

終わりに臨み、本研究において終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました恩師岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室、永澤秀子教授に深甚たる謝辞を表します。本研究の実施にあたり直接御指導、御鞭撻、並びに御激励を賜りました岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室、奥田健介准教授、平山祐助教、上田聡博士に感謝いたします。マススペクトル及び元素分析の測定をしていただきました岐阜薬科大学機器センター、林雅子副手、堀田美春氏に感謝致します。本研究の推進にあたりご協力いただきました岐阜薬科大学創薬化学大講座薬化学研究室、因幡栄美先生に感謝致します。実験に際して御協力いただきました、榎本幸浩修士、境崇行氏、及び研究室諸氏に感謝致します。

## 実験の部

## 実験の部

有機系試薬は Sigma-Aldrich、和光純薬工業、東京化成工業、関東化学、ナカライテクス、キシダ化学、国産化学、Cambridge Isotope Laboratories から購入した。カラムクロマトグラフィー用シリカゲルは AP-300 (大興商事) を、アミンシリカゲルは Chromatorex<sup>®</sup> 100-200 mesh (富士シリシア化学) を用いた。マイクロウェーブ反応には Initiator 2.0 (Biotage AB) を用いた。

<sup>1</sup>H-NMR は JEOL JNM EX-400 (400 MHz)、JEOL JNM AL-400 (400 MHz)、または JEOL JNM ECA-500 (500 MHz) (JEOL Ltd.) を用いて測定した。<sup>13</sup>C-NMR は JEOL JNM EX-400 (100 MHz)、JEOL JNM AL-400 (100 MHz)、または JEOL JNM ECA-500 (125 MHz) (JEOL Ltd.) を用いて測定した。<sup>1</sup>H-NMR の化学シフト値は tetramethylsilane (0.00 ppm) を内部標準として ppm 単位で表示した。<sup>13</sup>C-NMR の化学シフト値は溶媒のスペクトル (CDCl<sub>3</sub>: 77.2 ppm, CD<sub>3</sub>OD: 49.0 ppm, DMSO-*d*<sub>6</sub>: 39.5 ppm) を内部標準として ppm 単位で表示した。低分解能および高分解能 EI マススペクトル、FAB マススペクトルには JMS-SX 102 (JEOL Ltd.) を用いた。低分解能および高分解能 DART マススペクトルは JMS-T100TD (JEOL Ltd.) を用いた。融点測定には柳本製作所微量融点測定装置を使用し、全て未補正である。IR スペクトルは FT/IR-230 (JASCO) および Spectrum 100 FT-IR (PerkinElmer) を使用して測定した。元素分析には Micro Corder JM10 (J-SCIENCE LAB Co., Ltd) を用いた。薄層クロマトグラフィーには Art. 7749 Kieselgel 60 PF254 (Merck) を用い、254 nm の UV ライトで可視化した。*pK<sub>a</sub>* と *c log D* は DS Accord for Excel 7.1.5 (Accelrys software Inc.) および ACD/*pK<sub>a</sub>* DB Product version 12.5 (Fujitsu Limited) を使用して算出した。

生物学的評価には以下に示す試薬、機器を使用した。

### 細胞培養

ハンクス液「ニッスイ」(日水製薬)、メイロン(大塚製薬工場)、Trypsin-EDTA (GIBCO<sup>®</sup>, Life Technologies Inc.)、EDTA (Sigma-Aldrich)、EMEM (和光純薬工業)、RPMI1640 (和光純薬工業)、MEM NEAA (GIBCO<sup>®</sup>, Life Technologies Inc.)、fetal bovine serum Lot. No. S. 6M0030 (Nichirei)、Lot. No. JBS-5145 (Japan Bioserum)、硫酸ストレプトマイシン (Meiji Seika Pharma Co., Ltd.)、硫酸カナマイシン (Meiji Seika Pharma Co., Ltd.)、ベンジルペニシリンカリウム (Meiji Seika Pharma Co., Ltd.)

### 遺伝子導入

p2.1 プラスミドは Gregg L. Semenza 博士 (School of Medicine, Johns Hopkins University) よりご供与いただいた。pGRP78luc160 プラスミドは富田章弘博士 (財団法人癌研究会 癌化学療法センター) よりご供与いただいた。pcDNA3.1 (Life Technologies Inc.)、

FuGENE® HD Transfection Reagent (Roche Applied Science)、Opti-MEM (Life Technologies Inc.)

#### ルシフェラーゼアッセイ

Luciferase Reporter Gene Assay, high sensitivity (Roche Applied Science)、DMSO (和光純薬工業)、FB12 Luminometer (Berthold detection systems)

#### BCA アッセイ

Bovine Serum Albumin (PIERCE)、Working Reagent A, B (PIERCE)、MULTISKAN JX plate reader (Thermo Fisher Scientific)

#### 細胞毒性試験

HCT116p53<sup>-/-</sup>は Bert Vogelstein 博士 (School of Medicine, Johns Hopkins University) よりご供与いただいた。Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT 試薬、和光純薬工業)、RPMI1640 glucose (-) (GIBCO®, Life Technologies Inc.)

#### ウエスタンブロット

Sodium chloride (和光純薬工業)、Potassium chloride (Sigma-Aldrich)、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (ナカライテスク)、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich)、SDS (和光純薬工業)、Tergitol Solution (Sigma-Aldrich)、Sodium deoxycholate (和光純薬工業)、2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris, キシダ化学)、DTT (和光純薬工業)、PMSF (和光純薬工業)、Sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich)、Sodium fluoride (ナカライテスク)、Complete EDTA free (Roche)、Glycerol (ナカライテスク)、BPB (Sigma-Aldrich Japan)、2-Mercaptoethanol (キシダ化学)、PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Fermentas)、Acrylamide (和光純薬工業)、N,N'-methylene-bis(acrylamide) (和光純薬工業)、APS (ナカライテスク)、TEMED (和光純薬工業)、Glycine (Sigma-Aldrich)、Ponseau-S (Sigma-Aldrich)、Acetic acid (和光純薬工業)、Methanol (和光純薬工業)、Skim milk (和光純薬工業)、Tween 20 (和光純薬工業)、Nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences)、PVDF membrane (Bio Rad)、Mouse monoclonal anti-HIF-1 $\alpha$  (Novus)、Actin (Santa Cruz Biotechnology)、Anti-mouse IgG Peroxidase conjugate (Sigma)、Anti-goat IgG Peroxidase conjugate (Sigma)、KDEL monoclonal antibody (Stressgen)、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)、Pierce Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific)、LAS 3000 mini imager and Multi Gauge software Science Lab version 2005 version 3.0 (Fuji Photo)

#### ELISA

Human VEGF-A Platinum ELISA (eBioscience)

#### CAM アッセイ

Methyl cellulose (ナカライテスク)、Opsite Flexifix (smith & nephew)、イントラリポス(大塚製薬工場)、P-008 (A) (Showa Furanki)

## 有機合成における General Procedure

### General Procedure 1<sup>38</sup> (ビグアニド合成におけるマイクロウェーブ反応)

: 2-5 mL microwave vial にスターラーバーを封入し、基質のアミン (0.80–2.40 mmol)、dicyandiamide (1.0 eq.)、TMSCl (1.1 eq.)、dry CH<sub>3</sub>CN (2.4–3.6 mL) を加えた。懸濁液を攪拌した後に容器を密封し、マイクロ波を 10–30 min、130–150 °C で照射した (0–400 W)。冷却後、*i*PrOH (3.0 eq.) を加えて懸濁液を攪拌した後、容器を密封してさらにマイクロ波を 1 min、125 °C で照射した。得られたビグアニド塩酸塩の沈澱をフィルター濾取し CH<sub>3</sub>CN で二回洗浄した。

### General Procedure 2<sup>41</sup> (ニトリルの還元と Boc 保護)

: 基質のニトリル (**46–51**, 2.50–4.00 mmol)、(Boc)<sub>2</sub>O (2.0 eq.)、NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (5 mol%) を dry MeOH (30–40 mL) に溶解し、氷冷下で NaBH<sub>4</sub> (7.0–10.0 eq.) を 30 分以上かけて加え、室温で 4–25 h 攪拌した後、diethyltri-amine (1.0 eq.) を加えて室温で 30 min 攪拌した。溶媒を減圧留去、EtOAc で抽出した後、集めた有機層を NaHCO<sub>3</sub> 飽和水溶液で 3 回、飽和食塩水で 1 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーにて精製した。

### General procedure 3 (Boc の脱保護と HCl の脱塩)

: Boc 保護体 (**52–57**, 1.50–3.60 mmol) を少量の EtOAc に溶解し、さらに 4 M HCl/EtOAc (4 mL) を加えて 6–7 h 室温で攪拌した。溶媒を減圧留去してアミン塩酸塩を得た。さらにアミンシリカゲルを用いたショートカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>/methanol = 1 : 1) により脱塩を行い、溶媒を減圧留去して目的のフリーモノアミン (**58–63**) を得た。

## 第一章第二節第一項に関する研究

### Scheme 1 の実験

#### Phenylbiguanide hydrochloride (**8**: GPU-232) の合成<sup>93</sup>

General Procedure 1 に従って、aniline (**1**, 168 mg, 1.80 mmol) を用いて 150 °C, 15 min, CH<sub>3</sub>CN (2.40 mL) の条件で反応を行い、**8** (320 mg, 83%) を得た。分析及び生物活性試験用サンプルは再結晶 (MeOH) を行って得た。colorless needles; Mp 246–249 °C (lit. 244–247 °C); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 7.04–7.08 (m, 3H), 7.30–7.35 (m, 8H), 9.79 (s, 1H); FABMS: *m/z* calcd for [M-Cl]<sup>+</sup>: 178, found 178. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルおよび融点が一致したことにより構造を決定した。

### Benzylbiguanide hydrochloride (**9**: GPU-239) の合成<sup>94</sup>

**General Procedure 1** に従って、benzylamine (**2**, 193 mg, 1.80 mmol) を用いて 150 °C, 15 min, CH<sub>3</sub>CN (2.40 mL) の条件で反応を行い、**9** (245 mg, 60%) を得た。分析及び生物活性試験用サンプルは再結晶 (*i*PrOH) を行って得た。colorless needles. Mp 197–199 °C (lit. 196–197 °C); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 4.35 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 7.09 (s, 4H), 7.22–7.48 (m, 7H), 7.95 (br s, 1H); FABMS: *m/z* calcd for [M-Cl]<sup>+</sup>: 192, found 192. *Anal.* Calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>Cl: C, 47.47; H, 6.20; N, 30.76. Found: C, 47.44; H, 6.12; N, 30.69. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルおよび融点が一一致したことにより構造を決定した。

### 2-Phenethylbiguanide hydrochloride (**10**, Phenformin) の合成<sup>94</sup>

**General Procedure 1** に従って、phenylethylamine (**3**, 255 mg, 2.10 mmol) を用いて 150 °C, 15 min, CH<sub>3</sub>CN (3.70 mL) の条件で反応を行い、**10** (307 mg, 73%) を得た。分析及び生物活性試験用サンプルは再結晶 (*i*PrOH) を行って得た。white powder. Mp 175–177 °C (lit. 175–178 °C); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 2.77 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.33 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.23–7.43 (m, 12H); FABMS: *m/z* calcd for [M-Cl]<sup>+</sup>: 206, found 206. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルおよび融点が一一致したことにより構造を決定した。

### 3-Phenylpropylbiguanide dihydrochloride (**11**: GPU-240) の合成<sup>95</sup>

**General Procedure 1** に従って、3-phenylpropylamine (**4**, 243 mg, 1.80 mmol) を用いて 150 °C, 15 min, CH<sub>3</sub>CN (2.40 mL) の条件で反応を行い、**11** の一塩酸塩 (137 mg, 30%) を得た。分析及び生物活性試験用に再結晶 (EtOH+*i*PrOH) を行ったところ、二塩酸塩である **11** を得た。colorless solid. Mp 197–200 °C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.84 (br s, 2H), 2.65 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 3.24 (br s, 2H) 7.18–7.48 (m, 5H), 8.44, 9.04, 9.51 (br s, total 6H); FABMS: *m/z* calcd for [M-2Cl-H]<sup>+</sup>: 220, found 220. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一一致したことにより構造を決定した。

### 4-Phenylbutylbiguanide dihydrochloride (**12**: GPU-484) の合成<sup>95</sup>

**General Procedure 1** に従って、4-phenylbutylamine (**5**, 149 mg, 1.00 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH<sub>3</sub>CN (3.00 mL) の条件で反応を行い、**12** の一塩酸塩 (264 mg, 98%) を得た。分析及び生物活性試験用に再結晶 (EtOH) を行ったところ、二塩酸塩である **12** を得た。colorless powder. Mp 158–160 °C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 1.70 (br, 4H), 2.68 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.33 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.15–7.28 (m, 5H); DARTMS: *m/z* calcd for [M-2Cl-H]<sup>+</sup>: 234, found 234; *Anal.* Calcd. for C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>: C, 47.06; H, 6.91; N, 22.87. Found: C, 47.02; H, 6.86; N, 23.10. 本化合物は文献既知上記スペクトルが一一致したことにより構造を決定した。

### 5-Phenylpentylbiguanide dihydrochloride (**13**: GPU-532) の合成

**General Procedure 1** に従って、5-phenylpentylamine (**6**, 163 mg, 1.00 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH<sub>3</sub>CN (3.00 mL) の条件で反応を行い、**13** の一塩酸塩 (209 mg, 74%) を得た。分析及び生物活性試験用に再結晶 (EtOH) を行ったところ、二塩酸塩である **13** を得た。colorless powder. Mp 164–165 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.31–1.37 (m, 2H), 1.56–1.61 (m, 4H), 2.58 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 3.23 (q, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.15–7.30 (m, 5H), 7.88, 8.55, 9.09, 9.52 (br s, total 6H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 25.8, 27.2, 30.6, 35.1, 42.3, 125.7, 128.3, 128.3, 142.1, 151.8, 155.0; DARTMS: *m/z* calcd for [M-2Cl-H]<sup>+</sup>: 248, found 248; *Anal.* Calcd. for C<sub>13</sub>H<sub>23</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>: C, 48.75; H, 7.24; N, 21.87. Found: C, 48.50; H, 7.19; N, 21.93. 本化合物は新規化合物である。

### 6-Phenylheptylbiguanide dihydrochloride (**14**: GPU-533) の合成

**General Procedure 1** に従って、6-phenylhexylamine (**7**, 177 mg, 1.00 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH<sub>3</sub>CN (3.00 mL) の条件で反応を行い、**14** の一塩酸塩 (261 mg, 88%) を得た。分析及び生物活性試験用に再結晶 (EtOH) を行ったところ、二塩酸塩である **14** を得た。colorless powder. Mp 168–169 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.27–1.37 (m, 4H), 1.52–1.58 (m, 4H), 2.56–2.59 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.23 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.15–7.29 (m, 5H), 7.94, 8.56, 9.11, 9.51 (br s, total 6H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 25.9, 27.3, 28.2, 30.9, 35.1, 42.4, 125.6, 128.2, 128.3, 142.2, 151.8, 155.0; DARTMS: *m/z* calcd for [M-2Cl-H]<sup>+</sup>: 262, found 262; *Anal.* Calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>: C, 50.30; H, 7.54; N, 20.95. Found: C, 50.15; H, 7.52; N, 21.02. 本化合物は新規化合物である。

## Scheme 2 の実験

### 4-Phenylbutyl tosylate (**17**) の合成<sup>96</sup>

文献の方法に従って、<sup>39</sup>tosyl chloride (1.14 g, 6.00 mmol) を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 mL) に溶解し、氷冷下撹拌しながら、4-phenylbutyl alcohol (**15**, 750 mg, 5.00 mmol) と pyridine (403 μL, 5 mmol) を加えた後、室温にて 24 h 撹拌した。反応溶液を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> で希釈し、0.1 M 塩酸で 2 回、NaHCO<sub>3</sub> 飽和水溶液で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/CHCl<sub>3</sub> = 2 : 1) にて精製し、**17** (707 mg, 47%) を得た。pale yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.66 (br, 4H), 2.44 (s, 3H), 2.56 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.03 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.10 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.18 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.78 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H). 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

### 5-Phenylpentyl tosylate (18) の合成<sup>97</sup>

文献の方法に従って、<sup>39</sup>tosyl chloride (1.14 g, 6.00 mmol) を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 mL) に溶解し、氷冷下撹拌しながら、5-phenylpentyl alcohol (**16**, 821 mg, 5.00 mmol) と pyridine (403  $\mu$ L, 5 mmol) を加えたのち、室温にて 48 h 撹拌した。反応溶液を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> で希釈し、0.1 M 塩酸で 2 回、NaHCO<sub>3</sub> 飽和水溶液で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/CHCl<sub>3</sub> = 2 : 1) にて精製し、**18** (1.43 g, 78%) を得た。pale yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.31–1.38 (m, 2H), 1.52–1.60 (m, 2H), 1.63–1.70 (m, 2H), 2.45 (s, 3H), 2.56 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.01 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.12 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.18 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.27 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.34 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.78 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H). 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

### 5-Phenylpentyl nitrile (19) の合成<sup>98</sup>

文献の方法に従って、<sup>40</sup>**17** (625 mg, 2.10 mmol) を DMSO (5 mL) に溶解し、KCN (668 mg, 10.3 mmol) を加え、120 °C で 5 h 撹拌した。反応溶液を室温まで冷却した後、H<sub>2</sub>O を加え、EtOAc で抽出した。集めた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/CHCl<sub>3</sub> = 2 : 1) にて精製し、**19** (291 mg, 89%) を得た。colorless oil. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.67–1.72 (m, 2H), 1.76–1.82 (m, 2H), 2.35 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.66 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.17–7.31 (m, 5H). 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

### 6-Phenylhexyl nitrile (20) の合成<sup>99</sup>

文献の方法に従って、<sup>40</sup>**18** (1.91 g, 6.00 mmol) を DMSO (15 mL) に溶解し、KCN (1.95 g, 30.0 mmol) を加え、120 °C で 5 h 撹拌した。反応溶液を室温まで冷却した後、H<sub>2</sub>O を加え、EtOAc で抽出した。集めた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/CHCl<sub>3</sub> = 2 : 1) にて精製し、**20** (935 mg, 90%) を得た。colorless oil. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  = 1.44–1.56 (m, 2H), 1.62–1.72 (m, 4H), 2.33 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.63 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.16–7.30 (m, 5H). 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

### 1-*tert*-Butoxycarbonylamino-5-phenylpentane (21) の合成

**General Procedure 2** に従って、**19** (478 mg, 3.00 mmol) を用いて行い、得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>/*n*-hexane = 2 : 1) にて精製し、**21** (543 mg, 69%) を得た。yellow oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.33–1.39 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.48–1.52 (m, 2H), 1.59–1.67 (m, 2H), 2.61 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H), 3.11 (q, *J* = 7.3 Hz, 2H), 4.50 (s, 1H), 7.16–7.29 (m, 5H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 26.4, 28.4, 29.9, 31.1, 35.8, 40.5, 79.0, 125.7, 128.3, 128.4, 142.5, 155.9; DARTMS: *m/z* calcd for [2M+H]<sup>+</sup>: 527, found 527; *Anal.* Calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>2</sub>: C, 72.96; H, 9.57; N, 5.32. Found: C, 72.93; H, 9.59; N, 5.28. 本化合物は新規化合物である。

### 1-*tert*-Butoxycarbonylamino-6-phenyl hexane (22) の合成

**General Procedure 2** に従って、**20** (693 mg, 4.00 mmol) を用いて行い、得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>/*n*-hexane = 2 : 1) にて精製し、**22** (694 mg, 63%) を得た。yellow oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.33–1.35 (m, 4H), 1.44 (s, 11H), 1.62 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.60 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.11 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.16–7.30 (m, 5H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 26.6, 28.4, 28.9, 30.0, 31.3, 35.8, 40.5, 79.0, 125.6, 128.2, 128.3, 142.6, 155.9; DARTMS: *m/z* calcd for [2M+H]<sup>+</sup>: 555, found 555; *Anal.* Calcd. for C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>2</sub>: C, 73.61; H, 9.81; N, 5.05, Found: C, 73.51; H, 9.86; N, 4.85. 本化合物は新規化合物である。

### Phenylpentyl amine (6) の合成<sup>100</sup>

**General Procedure 3** に従って、**21** (481 mg, 1.80 mmol) を用いて行い、**6** (296 mg, quant.) を得た。pale yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.33–1.39 (m, 2H), 1.48–1.54 (m, 2H), 1.60–1.66 (m, 2H), 2.61 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.71 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.16–7.29 (m, 5H). 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

### Phenylhexyl amine (7) の合成<sup>100</sup>

**General Procedure 3** に従って、**22** (460 mg, 1.70 mmol) を用いて行い、**7** (295 mg, quant.) を得た。pale yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.34 (br, 4H), 1.48 (br, 2H), 1.61 (br, 2H), 2.59 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.69 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 7.16–7.28 (m, 5H). 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

## 第一章第二節第二項に関する研究

### Scheme 3 の実験

#### ***N*-2-Phenethylamino-*N*'-cyano-*S*-methylisothiourea (23) の合成<sup>42</sup>**

文献の方法に従って、<sup>42</sup>iPrOH (1.6 mL) に phenethylamine (**3**) (96.0 mg, 0.79 mmol) と *N*-cyanodithiocarbonimidate (129 mg, 0.79 mmol) を加え、室温で 2 h 攪拌した。残渣をフィルター濾取、乾燥し、**23** (182 mg, quant.) を得た。<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2.44 (s, 3H), 2.92 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.63 (br s, 2H), 7.19–7.35 (m, 5H); FABMS: *m/z* calcd for [M+H]<sup>+</sup>: 220, found 220. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

#### **3-Amino-5-(2-phenethylamino)-1,2,4-triazole (24: GPU-218) の合成<sup>42</sup>**

文献の方法に従って、<sup>42</sup>EtOH (3.5 mL) に **23** (500 mg, 2.28 mmol) を加えた懸濁液に hydrazine hydrate (0.22 mL, 4.56 mmol) を滴下し、3 h 還流した。溶媒と脱離した methanethiol を減圧留去し、得られた残渣を H<sub>2</sub>O で洗浄、乾燥して **24** (373 mg, 80%) を得た。分析及び生物活性試験用サンプルは再結晶 (H<sub>2</sub>O) を行って得た。colorless powder. Mp 118–120 °C (lit. 118–119 °C). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 2.78 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.23 (br s, 2H), 5.16 (br s, 1H), 5.61 (br s, 1H), 7.20–7.28 (m, 5H), 10.69 (br s, 1H); FABMS: *m/z* calcd for [M+H]<sup>+</sup>: 204, found 204. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルおよび融点が一一致したことにより構造を決定した。

#### **2-(2-Phenethylamino)-5,7-diamino-[1,2,4]triazolo[1,5-*a*][1,3,5]triazine (25: GPU-247) の合成<sup>42</sup>**

文献の方法に従って、<sup>42</sup>H<sub>2</sub>O (4 mL) に **24** (370 mg, 1.82 mmol) と cyanoguanidine (184 mg, 2.19 mmol) を加えた懸濁液に濃塩酸 (0.18 ml, 1.82 mmol) を加え、21.5 h 加熱還流した。室温まで冷却した後、残渣をフィルター濾取、H<sub>2</sub>O を用いた洗浄、乾燥を行い **25** (86.8 mg, 18%) を得た。分析および生物活性試験用サンプルは再結晶 (H<sub>2</sub>O+DMF) を行って得た。colorless powder. Mp 294–295 °C (lit. 298 °C); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 2.85 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.38 (q, *J* = 7.2 Hz, 2H), 6.42 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H), 6.57 (s, 2H), 7.20–7.28 (m, 5H); FABMS: *m/z* calcd for [M+H]<sup>+</sup>: 271, found 271. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルおよび融点が一一致したことにより構造を決定した。

## Scheme 4 の実験

### ***N*-Phenethyl-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine (26: GPU-223) の合成<sup>101</sup>**

文献の方法に従って、<sup>43</sup>2-chloro-4,6-diamino-1,3,5-triazine (200 mg, 1.37 mmol)、phenethylamine (**3**) (175 mg, 1.44 mmol)、NaOH (66.0 mg, 1.65 mmol) を H<sub>2</sub>O (4 mL) に溶解し、9 h 加熱還流した。室温まで冷却した後、残渣をフィルター濾取、H<sub>2</sub>O と MeOH をそれぞれ用いた洗浄を行い、乾燥して **26** (231 mg, 80%) を得た。分析及び生物活性試験用サンプルは再結晶 (H<sub>2</sub>O+EtOH) を行って得た。colorless powder. Mp 167–169°C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2.86 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.63 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.94 (br s, 4H), 5.09 (s, 1H), 7.22–7.29 (m, 5H); FABMS: *m/z* calcd for [M+H]<sup>+</sup>: 231, found 231; HRFABMS: *m/z* calcd for [M+H]<sup>+</sup>: 231.1358, found 231.1349. *Anal.* Calcd for C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>N<sub>6</sub>: C, 57.38; H, 6.13; N, 36.50. Found: C, 57.45; H, 6.08; N, 35.72. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

### ***N*-Phenethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine (27: GPU-224) の合成<sup>102</sup>**

文献の方法に従って、<sup>44</sup>phenformin hydrochloride (**10**) (375 mg, 1.56 mmol) と sodium methoxide (25%, 0.46 mL, 2.02 mmol) を MeOH (30 mL) に溶解し、室温で 15 min 攪拌した後、ethyl formate (0.38 mL, 4.67 mmol) を加え、17 h 加熱還流した。反応溶液を室温まで冷却した後 H<sub>2</sub>O を加え、EtOAc で抽出した。集めた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 80 : 1) にて精製し、**27** (158 mg, 47%) を得た。分析及び生物活性試験用サンプルは再結晶 (EtOH) を行って得た。colorless powder. Mp 156–158 °C (lit. 159–161 °C); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.63 (br s, 2H), 5.28 (br s, 2H), 5.72 (s, 1H), 7.20–7.32 (m, 5H), 8.00 (s, 1H); FABMS: *m/z* calcd for [M+H]<sup>+</sup>: 216, found 216. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルおよび融点が一貫したことにより構造を決定した。

## Scheme 5 の実験

### **1-(2-Phenethyl)urea (28: GPU-220) の合成<sup>103</sup>**

文献の方法に従って、<sup>45</sup>toluene (7 mL) に ethyl carbamate (1.06 g, 11.9 mmol)、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (1.06 g, 10.4 mmol)、phenethylamine (**3**) (2.88 g, 23.8 mmol) を加え 48 h 加熱還流した。反応溶液を室温まで冷却し、セライト濾過を行った後に溶媒を減圧留去した。得られた残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 40 : 1) にて精製し **28** (603 mg, 31%) を得た。分析及び生物活性試験用サンプルは再結晶 (H<sub>2</sub>O) を行って得た。colorless

powder. Mp 110–111 °C (lit. 110–111 °C); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2.80 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.40 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.49 (s, 2H), 4.91 (s, 1H), 7.21–7.29 (m, 5H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 36.2, 41.7, 126.4, 128.6, 128.8, 139.0, 158.9; EIMS: *m/z* calcd for [M<sup>+</sup>]: 164, found 164. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルおよび融点が一致したことにより構造を決定した。

#### 1-(2-Phenethyl)thiourea (**30**: GPU-222) の合成<sup>104</sup>

文献の方法に従って、<sup>46</sup>bromobenzene (3.5 mL) に phenethylamine hydrochloride (2.00 g, 12.7 mmol) と ammonium isothiocyanate (1.01 g, 13.4 mmol) を加え、窒素雰囲気下 1.5 h 加熱還流した。0 °C まで冷却し、H<sub>2</sub>O を加え、フィルター濾取を行い、*n*-hexane で洗浄、乾燥し、**30** (966 mg, 42%) を得た。分析および生物活性試験用サンプルは再結晶 (EtOH) を行って得た。colorless powder. Mp 136–137 °C (lit. 137 °C). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 2.79 (br s, 2H), 3.57 (br s, 2H), 7.19–7.32 (m, 5H), 6.99, 7.56, 7.70 (br s, total 3H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 34.9, 45.2, 126.0, 128.2, 128.7, 139.3, 183.2; EIMS : *m/z* calcd for [M]<sup>+</sup>: 180, found 180. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルおよび融点が一致したことにより構造を決定した。

#### *N*-(2-Phenylethyl)carbamimidothioic acid methyl ester hydroiodide (**31**: GPU-256) の合成<sup>105</sup>

文献の方法に従って、<sup>48</sup>EtOH (4 mL) に **30** (966 mg, 5.36 mmol) と MeI (0.40 mL, 5.90 mmol) を加え、2 h 加熱還流した。反応溶液を 0 °C まで冷却し、Et<sub>2</sub>O を加え、析出した沈殿をフィルター濾取、乾燥し、**31** (1.42 g, 83%) を得た。分析および生物活性試験用サンプルは再結晶 (MeOH+Et<sub>2</sub>O) を行って得た。colorless powder. Mp 124–125 °C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 2.99 (s, 3H), 2.87 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.56 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.23–7.35 (m, 5H), 9.08 (s, 1H), 9.50 (s, 1H); FABMS: *m/z* calcd for [M+H]<sup>+</sup>: 195, found 195. *Anal.* Calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>IN<sub>2</sub>S: C, 37.28; H, 4.69; N, 8.69. Found: C, 37.03; H, 4.65; N, 8.76. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルおよび融点が一致したことにより構造を決定した。

#### Phenyl 2-phenethylcarbamate (**32**) の合成<sup>106</sup>

文献の方法に従って、<sup>47</sup>CHCl<sub>3</sub> (3 mL) に phenethylamine (**3**) (480 mg, 3.96 mmol) と triethylamine (0.55 mL, 3.96 mmol) を溶解し、氷冷下、phenyl chloroformate (620 mg, 3.96 mmol) を加えた後、室温で 4 h 攪拌した。反応溶液の溶媒を 2/3 程度減圧留去し、*n*-hexane を加え、残渣をフィルター濾取、H<sub>2</sub>O で洗浄、乾燥し **32** (982 mg, quant.) を得た。分析用サンプルは再結晶 (*n*-hexane+EtOAc) を行って得た。colorless powder. Mp 88–89 °C (lit. 89–90 °C); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.53 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H),

5.05 (s, 1H), 7.09–7.36 (m, 10H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 35.9, 42.3, 121.6, 125.3, 126.6, 128.7, 128.8, 129.2, 138.5, 151.0, 154.5$ ; EIMS:  $m/z$  calcd for  $[\text{M}]^+$ : 241, found 241. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルおよび融点が一致したことにより構造を決定した。

#### ***N*-2-Phenethylhydrazinecarboxamide (33: GPU-221) の合成<sup>107</sup>**

文献の方法に従って、 $^{47}\text{EtOH}$  (3 mL) に **32** (300 mg, 1.24 mmol) と hydrazine monohydrate (0.12 mL, 2.49 mmol) を加え、6 h 加熱還流した。溶媒を減圧留去して得た残渣を  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  と *n*-hexane で洗浄、乾燥し **33** (194 mg, 87%) を得た。分析および生物活性試験用サンプルは再結晶 ( $\text{H}_2\text{O}$ ) を行って得た。colorless powder. Mp 113–114 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 2.83$  (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 3.50 (q,  $J = 6.8$  Hz, 2H), 3.60 (s, 2H), 6.09 (s, 1H), 6.26 (s, 1H), 7.23–7.30 (m, 5H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta = 36.2, 40.5, 125.9, 128.3, 128.6, 139.7, 160.1$ ; FABMS:  $m/z$  calcd for  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 180, found 180. Anal. Calcd. for  $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_3\text{O}$ : C, 60.32; H, 7.31; N, 23.45. Found: C, 60.05; H, 7.39; N, 23.33. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

#### **Scheme 6 の実験**

#### ***S*-Methylisothiourea iodide (35) の合成<sup>48</sup>**

文献の方法に従って、 $\text{EtOH}$  (10 mL) に thiourea (**34**) (5.00 g, 65.7 mmol) と  $\text{MeI}$  (4.74 mL, 72.3 mmol) を加え、2 h 加熱還流した。0 °C まで冷却した後、 $\text{Et}_2\text{O}$  を加え、残渣をフィルター濾取、乾燥し、**35** (13.3 g, 93%) を得た。pale brown solid.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta = 2.49$  (s, 3H), 8.79 (s, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta = 13.4, 171.1$ . 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

#### ***N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)-*S*-methylisothiourea (36) の合成<sup>48</sup>**

文献の方法に従って、 $\text{H}_2\text{O}$  (50 mL)、1,4-dioxane (50 mL) の混合溶媒に、**35** (5.00 g, 22.9 mmol) を溶解し、1 M  $\text{NaOH}$  水溶液 (23 mL, 23 mmol) と  $(\text{Boc})_2\text{O}$  (12.5 g, 57.4 mmol) を加え、室温で 9 h 攪拌した。残渣をフィルター濾取し、少量の  $\text{H}_2\text{O}$  で洗浄した。また、濾液の溶媒を半分ほど減圧留去し、現れた残渣をフィルター濾取した。得られた残渣を合わせ、 $\text{H}_2\text{O}$  (150 mL) で懸濁、約 50 °C で振盪した後、フィルター濾取、乾燥し、**36** (5.30 g, 79%) を得た。white powder.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta = 1.52$  (s, 9H), 1.53 (s, 9H), 2.40 (s, 3H), 11.60 (s, 1H); EIMS:  $m/z$  calcd for  $[\text{M}]^+$ : 290, found 290. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

### ***N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)-*N''*-2-phenethylguanidine (37)** の合成:

文献の方法に従って、 $^{48}\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (8 mL) に **36** (1.16 g, 4.00 mmol) を溶解し、phenethylamine (**3**) (969 mg, 8 mmol) を加え、室温で 14 h 攪拌した。溶媒を減圧留去、残渣を EtOAc (50 mL) に溶解し、飽和クエン酸水溶液 (5 回)、飽和  $\text{NaHCO}_3$  水溶液 (3 回)、 $\text{H}_2\text{O}$  (3 回) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取、溶媒を減圧留去し、**37** (1.25 g, 86%) を得た。分析用サンプルは再結晶 (*n*-hexane+EtOAc) を行って得た。colorless powder. mp 128–129 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.48 (s, 9H), 1.50 (s, 9H), 2.87 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 3.67 (q,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 7.21–7.28 (m, 5H), 8.36 (s, 1H), 11.46 (s, 1H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  = 28.0, 28.3, 35.3, 42.2, 79.2, 83.0, 126.5, 128.5, 128.8, 138.5, 153.2, 156.1, 163.6; DARTMS:  $m/z$  calcd for  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 364, found 364. Anal. Calcd. for  $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_4$ : C, 62.79; H, 8.04; N, 11.56. Found: C, 62.84; H, 8.10; N, 11.58. 本化合物は新規化合物である。

### **2-Phenethylguanidine hydrochloride (38: GPU-231)** の合成<sup>108</sup>

4 M HCl-1,4-dioxane (4 mL) に **37** (500 mg, 1.38 mmol) を加え、室温で 15 h 攪拌した。溶媒を減圧留去し、 $\text{Et}_2\text{O}$  を加えさらに減圧留去する操作を 3 回繰り返した。EtOAc を加えて析出した固体をフィルター濾取、乾燥し、**38** (271 mg, 99%) を得た。分析および生物活性試験用サンプルは再結晶 (EtOAc+EtOH) を行って得た。colorless powder. Mp 133–134 °C (lit. 135–138 °C);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 2.88 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 3.46 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H), 7.20–7.36 (m, 5H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ ):  $\delta$  = 36.7, 44.5, 80.0, 128.6, 130.5, 130.6, 140.1, 159.4; DARTMS:  $m/z$  calcd for  $[\text{M}-\text{Cl}]^+$ : 164, found 164. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルおよび融点が一致したことにより構造を決定した。

### Scheme 7 の実験

### ***N*-2-Phenethyldicyandiamide (39: GPU-219)** の合成<sup>109</sup>

文献の方法に従って、 $^{44}\text{phenethylimine}$  (**3**) (1.21 g, 10.0 mmol) に 1 M 塩酸 (10 mL, 10 mmol) をゆっくり加え、室温で 15 min 攪拌した後、さらに sodium dicyanamide (989 mg, 10.0 mmol) を加え、2 h 加熱還流した。反応溶液を室温まで冷却、EtOAc にて抽出し、集めた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  = 40 : 1) にて精製し、**39** (413 mg, 22%) を得た。分析および生物活性試験用サンプルは再結晶 (EtOAc+*n*-hexane) を行って得た。colorless powder. Mp 115–117 °C (lit. 114–115 °C);  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 2.87 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 3.48 (q,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 5.16 (s, 2H), 5.27 (s, 1H), 7.19–7.35 (m, 5H); FABMS:  $m/z$  calcd for  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 189, found 189. 本化合物は

文献既知であり、上記スペクトルおよび融点が一致したことにより構造を決定した。

#### ***N*-2-Phenethyl-*N'*-nitroguanidine (40: GPU-293) の合成<sup>110</sup>**

文献の方法に従って、<sup>49</sup>Et<sub>2</sub>O/H<sub>2</sub>O (3:1, 2 mL) に phenethylamine (**3**: 107 mg, 0.87 mmol) を加え、氷冷下攪拌しながら、*N*-methyl-*N*-nitroso-*N'*-nitroguanidine (200 mg, 0.68 mmol) をゆっくりと加え、20 °C 以下で 45 min 攪拌した。析出した沈殿をフィルター濾取、Et<sub>2</sub>O にて洗浄、乾燥し、**40** (142 mg, 99%) を得た。分析および生物活性試験用サンプルは再結晶 (EtOH) を行って得た。colorless powder. Mp 162–163 °C (lit. 162 °C); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 2.82 (br s, 2H), 3.41 (br s, 2H), 7.20–7.33 (m, 5H), 7.88 (br s, 2H), 8.68 (br s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 34.1, 42.1, 126.4, 128.4, 128.8, 138.6, 159.3; FABMS: *m/z* calcd for [M+H]<sup>+</sup>: 209, found 209. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルおよび融点が一致したことにより構造を決定した。

#### **Carbamimidothioic acid 2-phenylethyl ester hydrobromide (42: GPU-299) の合成<sup>111</sup>**

文献の方法に従って、<sup>48</sup>EtOH (0.5 mL) に phenethylbromide (**41**) (612 mg, 3.30 mmol) と thiourea (**34**) (228 mg, 3.0 mmol) を加え、3 h 加熱還流した。反応溶液を室温まで冷却し、Et<sub>2</sub>O を加えて個体を析出、フィルター濾取を行い **42** (716 mg, 92%) を得た。分析および生物活性試験用サンプルは再結晶 (EtOH) を行って得た。colorless powder. Mp 185–187 °C (lit. 186 °C). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 2.93 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 3.47 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 7.22–7.35 (m, 5H), 9.01 (br s, 2H), 9.12 (br s, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 31.3, 33.9, 126.7, 128.4, 128.7, 138.7, 169.6; FABMS: *m/z* calcd for [M+H]<sup>+</sup>: 181, found 181; HRMS (FAB, NBA): *m/z* calcd for C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>S [M+H]<sup>+</sup>: 181.0807, found 181.0800. *Anal.* Calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>BrN<sub>2</sub>S: C, 41.39; H, 5.02; N, 10.73. Found: C, 41.16; H, 4.82; N, 10.63. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルおよび融点が一致したことにより構造を決定した。

## 第一章第二節第三項に関する研究

### Scheme 8 の実験

#### 2-(4-Hydroxyphenyl)ethylbiguanide hydrochloride (**58**: GPU-252) の合成<sup>112</sup>

**General Procedure 1** に従って、2-(4-hydroxy-phenyl)ethylamine (**43**) (329 mg, 2.40 mmol) を用いて 150 °C, 10 min, CH<sub>3</sub>CN (3.20 mL) の条件で反応を行い、**58** (496 mg, 80%) を得た。分析及び生物活性試験用サンプルは再結晶 (H<sub>2</sub>O+MeCN) を行って得た。colorless powder. Mp 185–189 °C (lit. 182–184 °C); <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 2.77 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 2.92 (br, 2H), 6.73 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.04 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 7.13–7.26 (m, 4H), 8.08, 9.38 (br s, total 4H); DARTMS: *m/z* calcd for [M-Cl]<sup>+</sup>: 222, found 222. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルおよび融点が一一致したことにより構造を決定した。

#### 2-(4-Methoxyphenyl)ethylbiguanide hydrochloride (**59**: GPU-301) の合成<sup>113</sup>

**General Procedure 1** に従って、2-(4-methoxy-phenyl)ethylamine (**44**) (363 mg, 2.40 mmol) を用いて 150 °C, 15 min, CH<sub>3</sub>CN (3.60 mL) の条件で反応を行い、**59** (210 mg, 30%) を得た。分析及び生物活性試験用サンプルは再結晶 (*i*PrOH) を行って得た。colorless powder. Mp 173–175 °C (lit. 171–172 °C); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 2.78 (br, 2H), 3.43 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 3.76 (s, 3H), 6.85 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.15 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H); DARTMS: *m/z* calcd for [M-Cl]<sup>+</sup>: 236, found 236. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルおよび融点が一一致したことにより構造を決定した。

#### 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)ethylbiguanide dihydrochloride (**60**: GPU-470) の合成<sup>38</sup>

**General Procedure 1** に従って、2-(3,4-dimethoxy-phenyl)ethylamine (**45**) (181 mg, 1.00 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH<sub>3</sub>CN (3.00 mL) の条件で反応を行い、**60** の一塩酸塩 (269 mg, 89%) を得た。分析及び生物活性試験用に再結晶 (EtOH) を行ったところ、二塩酸塩である **60** を得た。colorless powder. Mp 154 °C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 2.92 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.58 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.84 (s, 3H), 6.82–6.92 (m, 3H); DARTMS: *m/z* calcd for [M-2Cl-H]<sup>+</sup>: 266, found 266. HRDARTMS: *m/z* calcd for [M-2Cl-H]<sup>+</sup>: 266.1617, calcd for C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>: 266.1617. *Anal.* Calcd. for C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>: C, 42.61; H, 6.26; N, 20.71. Found: C, 42.78; H, 6.22; N, 20.67. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一一致したことにより構造を決定した。

### 2-(2-Methylphenyl)ethylbiguanide dihydrochloride (**61: GPU-529**) の合成

**General Procedure 1** に従って、2-(2-methyl-phenyl)ethylamine (**46**) (135 mg, 1.00 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH<sub>3</sub>CN (3.00 mL) の条件で反応を行い、**61** の一塩酸塩 (217 mg, 85%) を得た。分析及び生物活性試験用に再結晶 (EtOH) を行ったところ、二塩酸塩である **61** を得た。colorless powder. Mp 173–174 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 2.31 (s, 3H), 2.87 (br s, 2H), 3.45 (br s, 2H), 7.13–7.26 (m, 4H), 7.76, 8.56, 9.14, 9.68 (br s, total 6H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 19.0, 30.7, 42.6, 126.0, 126.6, 129.1, 130.1, 136.0, 136.3, 151.9, 155.1. DARTMS: *m/z* calcd for [M-2Cl-H]<sup>+</sup>: 220, found 220. *Anal.* Calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>: C, 45.21; H, 6.55; N, 23.97. Found: C, 45.04; H, 6.45; N, 23.93. 本化合物は新規化合物である。

### 2-(3-Methylphenyl)ethylbiguanide dihydrochloride (**62: GPU-476**) の合成

**General Procedure 1** に従って、2-(3-methyl-phenyl)ethylamine (**47**) (135 mg, 1.00 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH<sub>3</sub>CN (3.00 mL) の条件で反応を行い、**62** の一塩酸塩 (241 mg, 94%) を得た。分析及び生物活性試験用に再結晶 (EtOH) を行ったところ、二塩酸塩である **62** を得た。colorless powder. Mp 162–163 °C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 2.33 (s, 3H), 2.95 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.60 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.05–7.23 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 21.5, 34.7, 45.4, 126.8, 128.6, 129.7, 130.5, 138.5, 139.5, 153.8, 156.4; DARTMS: *m/z* calcd for [M-2Cl-H]<sup>+</sup>: 220, found 220. *Anal.* Calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>: C, 45.21; H, 6.55; N, 23.97. Found: C, 45.04; H, 6.50; N, 23.98. 本化合物は新規化合物である。

### 2-(4-Methylphenyl)ethylbiguanide dihydrochloride (**63: GPU-475**) の合成<sup>113</sup>

**General Procedure 1** に従って、2-(4-methyl-phenyl)ethylamine (**48**) (135 mg, 1.00 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH<sub>3</sub>CN (3.00 mL) の条件で反応を行い、**63** の一塩酸塩 (241 mg, 94%) を得た。分析及び生物活性試験用に再結晶 (EtOH) を行ったところ、二塩酸塩である **63** を得た。colorless powder. Mp 162–163 °C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 2.30 (s, 3H), 2.94 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 3.58 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H), 7.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H), 7.29 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 21.1, 34.4, 45.4, 129.7, 130.4, 135.5, 137.6, 153.7, 156.4; DARTMS: *m/z* calcd for [M-2Cl-H]<sup>+</sup>: 220, found 220. *Anal.* Calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>: C, 45.21; H, 6.55; N, 23.97. Found: C, 45.03; H, 6.50; N, 23.84. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

### 2-(4-Ethylphenyl)ethylbiguanide dihydrochloride (**64: GPU-528**) の合成

**General Procedure 1** に従って、2-(4-ethyl-phenyl)ethylamine (**49**) (149 mg, 1.00 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH<sub>3</sub>CN (3.00 mL) の条件で反応を行い、**64** の一塩酸塩 (250 mg, 93%) を得た。分析及び生物活性試験用に再結晶 (EtOH) を行ったところ、二塩酸塩で

ある **64** を得た。colorless powder. Mp 178–179 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.16 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H), 2.57 (q, *J* = 7.6 Hz, 2H), 2.84 (br s, 2H), 3.47 (br s, 2H), 7.15 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.23 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.79, 8.55, 9.15, 9.63 (br s, total 6H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 15.7, 27.8, 33.0, 43.8, 127.8, 128.7, 135.3, 141.9, 152.0, 155.1; DARTMS: *m/z* calcd for [M-2Cl-H]<sup>+</sup>: 234, found 234; *Anal.* Calcd. for C<sub>12</sub>H<sub>21</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>: C, 47.06; H, 6.91; N, 22.87. Found: C, 47.24; H, 6.90; N, 22.61. 本化合物は新規化合物である。

#### 2-(4-*tert*-Butylphenyl)ethylbiguanide dihydrochloride (**65**: GPU-528) の合成

**General Procedure 1** に従って、2-(4-*tert*-butyl-phenyl)ethylamine (**50**) (177 mg, 1.00 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH<sub>3</sub>CN (3.00 mL) の条件で反応を行い、**65** の一塩酸塩 (263 mg, 88%) を得た。分析及び生物活性試験用に再結晶 (EtOH) を行ったところ、二塩酸塩である **65** を得た。colorless powder. Mp 178–179 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.27 (s, 9H), 2.84 (br s, 2H), 3.47 (br s, 2H), 7.24 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H), 7.80, 8.55, 9.16, 9.64 (br s, total 6H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 31.1, 32.8, 34.0, 43.7, 125.0, 128.3, 134.9, 148.7, 151.8, 154.9; DARTMS: *m/z* calcd for [M-2Cl-H]<sup>+</sup>: 261, found 261; *Anal.* Calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>25</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>: C, 50.30; H, 7.54; N, 20.95. Found: C, 50.08; H, 7.46; N, 20.87. 本化合物は新規化合物である。

#### 2-(4-Acetylaminoethylphenyl)ethylbiguanide dihydrochloride (**66**: GPU-471) の合成

**General Procedure 1** に従って、2-(4-acetylaminoethyl-phenyl)ethylamine (**51**) (200 mg, 0.82 mmol) を用いて 150 °C, 10 min, CH<sub>3</sub>CN (2.40 mL) の条件で反応を行い、**66** の一塩酸塩 (261 mg, 97%) を得た。分析及び生物活性試験用に再結晶 (EtOH) を行ったところ、二塩酸塩である **66** を得た。colorless powder. Mp 151–152 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.77 (s, 3H), 2.65 (br, 2H), 2.82 (br, 2H), 3.20 (br, 2H), 3.45 (br, 2H), 7.14 (br, 2H), 7.21 (br, 2H), 8.03, 8.53, 9.13, 9.61 (br s, total 6H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 22.6, 33.0, 34.8, 40.2, 43.7, 128.7, 128.8, 135.7, 137.7, 152.0, 155.0, 169.1; DARTMS: *m/z* calcd for [M-2Cl-H]<sup>+</sup>: 291, found 291. *Anal.* Calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>24</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>6</sub>O: C, 46.29; H, 6.66; N, 23.13. Found: C, 45.93; H, 6.66; N, 22.90. 本化合物は新規化合物である。

#### 2-(2-Chlorophenyl)ethylbiguanide dihydrochloride (**67**: GPU-469) の合成

**General Procedure 1** に従って、2-(2-chloro-phenyl)ethylamine (**52**) (156 mg, 1.00 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH<sub>3</sub>CN (3.00 mL) の条件で反応を行い、**67** の一塩酸塩 (244 mg, 88%) を得た。分析及び生物活性試験用に再結晶 (EtOH) を行ったところ、二塩酸塩である **67** を得た。colorless powder. Mp 159–161 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.02 (br s, 2H), 3.50 (br s, 2H), 7.28–7.51 (m, 4H), 7.65, 8.54, 9.18, 9.68 (br s, total 6H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 32.5, 43.7, 128.6, 129.9, 130.8, 132.7, 135.1, 136.3, 154.0, 156.5;

DARTMS:  $m/z$  calcd for  $[M-2Cl-H]^+$ : 240, found 240. *Anal.* Calcd. for  $C_{10}H_{16}Cl_3N_5$ : C, 38.42; H, 5.16; N, 22.40. Found: C, 38.27; H, 5.05; N, 22.48. 本化合物は新規化合物である。

#### 2-(3-Chlorophenyl)ethylbiguanide dihydrochloride (**68: GPU-474**) の合成

**General Procedure 1** に従って、2-(3-chloro-phenyl)ethylamine (**53**) (156 mg, 1.00 mmol) を用いて 130 °C, 10 min,  $CH_3CN$  (3.00 mL) の条件で反応を行い、**68** の一塩酸塩 (244 mg, 88%) を得た。分析及び生物活性試験用に再結晶 (EtOH) を行ったところ、二塩酸塩である **68** を得た。colorless powder. Mp 154 °C;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  = 2.99 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 3.61 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 7.25–7.37 (m, 4H);  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  = 34.4, 45.0, 128.1, 128.3, 129.9, 131.3, 135.5, 141.1, 153.9, 156.4; DARTMS:  $m/z$  calcd for  $[M-2Cl-H]^+$ : 240, found 240. *Anal.* Calcd. for  $C_{10}H_{16}Cl_3N_5$ : C, 38.42; H, 5.16; N, 22.40. Found: C, 38.37; H, 5.07; N, 22.27. 本化合物は新規化合物である。

#### 2-(4-Chlorophenyl)ethylbiguanide dihydrochloride (**69: GPU-473**) の合成<sup>94</sup>

**General Procedure 1** に従って、2-(4-chloro-phenyl)ethylamine (**54**) (156 mg, 1.0 mmol) を用いて 130 °C, 10 min,  $CH_3CN$  (3.00 mL) の条件で反応を行い、**69** の一塩酸塩 (231 mg, 84%) を得た。分析及び生物活性試験用に再結晶 (EtOH) を行ったところ、二塩酸塩である **69** を得た。colorless powder. Mp 153 °C;  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  = 2.98 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 3.60 (t,  $J$  = 7.6 Hz, 2H), 7.21 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H), 7.34 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 2H);  $^{13}C$  NMR (100 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  = 34.1, 45.1, 129.8, 131.5, 133.8, 137.5, 153.9, 156.4; DARTMS:  $m/z$  calcd for  $[M-2Cl-H]^+$ : 240, found 240. *Anal.* Calcd. for  $C_{10}H_{16}Cl_3N_5$ : C, 38.42; H, 5.16; N, 22.40. Found: C, 38.24; H, 5.05; N, 22.42. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

#### 2-(2,6-Dichlorophenyl)ethylbiguanide dihydrochloride (**70: GPU-485**) の合成

**General Procedure 1** に従って、2-(2,6-dichloro-phenyl)ethylamine (**55**) (190 mg, 1.00 mmol) を用いて 130 °C, 10 min,  $CH_3CN$  (3.00 mL) の条件で反応を行い、**70** の一塩酸塩 (237 mg, 76%) を得た。分析及び生物活性試験用に再結晶 (EtOH) を行ったところ、二塩酸塩である **70** を得た。colorless needles. Mp 217–218 °C;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  = 3.20 (br s, 2H), 3.46 (br s, 2H), 7.34 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 1H), 7.50 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 2H), 7.66, 8.57, 9.22, 9.69 (br s, total 6H);  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $DMSO-d_6$ ):  $\delta$  = 29.2, 40.6, 128.7, 129.6, 133.5, 135.0, 152.3, 155.1; DARTMS:  $m/z$  calcd for  $[M-2Cl-H]^+$ : 274, found 274; *Anal.* Calcd. for  $C_{10}H_{15}Cl_4N_5$ : C, 34.61; H, 4.36; N, 20.18. Found: C, 34.40; H, 4.27; N, 20.35. 本化合物は新規化合物である。

### 2-(2-Bromophenyl)ethylbiguanide dihydrochloride (**71**: GPU-527) の合成

**General Procedure 1** に従って、2-(2-bromo-phenyl)ethylamine (**56**) (200 mg, 1.00 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH<sub>3</sub>CN (3.00 mL) の条件で反応を行い、**71** の一塩酸塩 (256 mg, 80%) を得た。分析及び生物活性試験用に再結晶 (EtOH) を行ったところ、二塩酸塩である **71** を得た。colorless powder. Mp 173–175 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 3.02 (br s, 2H), 3.50 (br s, 2H), 7.21 (t, *J* = 6.9 Hz, 1H), 7.37 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.51 (br d, 1H), 7.62 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.74, 8.58, 9.22, 9.72 (br s, total 6H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 33.5, 42.1, 123.9, 128.0, 128.9, 131.1, 132.6, 137.2, 152.1, 155.1; DARTMS: *m/z* calcd for [M-2Cl-H]<sup>+</sup>: 284, found 284; *Anal.* Calcd. for C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>BrCl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>: C, 33.64; H, 4.52; N, 19.61., Found: C, 33.61; H, 4.50; N, 19.60. 本化合物は新規化合物である。

### 2-(2-Trifluoromethylphenyl)ethylbiguanide dihydrochloride (**72**: GPU-530) の合成

**General Procedure 1** に従って、2-(2-trifluoromethyl)phenylethylamine (**57**) (151 mg, 0.80 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH<sub>3</sub>CN (2.40 mL) の条件で反応を行い、**72** の一塩酸塩 (218 mg, 88%) を得た。分析及び生物活性試験用に再結晶 (EtOH) を行ったところ、二塩酸塩である **72** を得た。colorless powder. Mp 146–147 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 1.03 (s, 3H), 3.08 (br s, 2H), 3.52 (br s, 2H), 7.47–7.73 (m, 4H), 8.57, 9.22, 9.71 (br s, total 6H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 31.5, 44.9, 126.1 (q, *J* = 277.3 Hz), 127.2, 127.3, 128.6, 129.7 (q, *J* = 29.6 Hz), 132.8, 133.7, 154.3, 156.7; DARTMS: *m/z* calcd for [M-2Cl-H]<sup>+</sup>: 274, found 274. *Anal.* Calcd. for C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>F<sub>3</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>: C, 38.16; H, 4.66; N, 20.23., Found: C, 37.99; H, 4.53; N, 20.22. 本化合物は新規化合物である。

## Scheme 9 の実験

### 3-Methylbutylbiguanide dihydrochloride (**76**: GPU-477)<sup>94</sup> の合成

**General Procedure 1** に従って、3-methylbutylamine (**73**: 87.2 mg, 1.00 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH<sub>3</sub>CN (3.00 mL) の条件で反応を行い、**76** の一塩酸塩 (198 mg, 95%) を得た。分析及び生物活性試験用に再結晶 (EtOH) を行ったところ、二塩酸塩である **76** を得た。colorless powder. Mp 158–159 °C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 0.98 (d, *J* = 7.0 Hz, 6H), 1.58 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 1.72 (sep, *J* = 7.0 Hz, 1H), 3.35 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 22.6, 26.9, 37.3, 42.6, 153.6, 156.4; DARTMS: *m/z* calcd for [M-2Cl-H]<sup>+</sup>: 172, found 172. *Anal.* Calcd. for C<sub>7</sub>H<sub>19</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>5</sub>: C, 34.43; H, 7.84; N, 28.68. Found: C, 34.43; H, 7.82; N, 28.70. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

## 2-(2-Pyridyl)ethylbiguanide hydrochloride (**77**: GPU-488) の合成

**General Procedure 1** に従って、2-(2-pyridyl)ethylamine (**74**) (122 mg, 1.00 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH<sub>3</sub>CN (3.00 mL) の条件で反応を行った。得られた残渣をフィルター濾取、乾燥した後、アミンシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 20 : 1–5 : 1–MeOH のみ) にて精製し、**77** (166 mg, 68%) を得た。分析および生物活性試験用サンプルは再結晶 (*i*PrOH) を行って得た。colorless powder. Mp 177–178 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 2.94 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.48 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.05, 7.56 (br s, total 6H), 7.24 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 7.32 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.73 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 8.49 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 37.0, 40.6, 121.6, 123.4, 136.6, 149.0, 158.6, 158.8, 160.1; DARTMS: *m/z* calcd for [M-Cl]<sup>+</sup>: 207, found 207; *Anal.* Calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>6</sub>: C, 44.54; H, 6.23; N, 34.63. Found: C, 44.31; H, 6.21; N, 34.46. 本化合物は新規化合物である。

## 2-(4-Pyridyl)ethylbiguanide hydrochloride (**78**: GPU-489)<sup>94</sup> の合成

**General Procedure 1** に従って、2-(4-pyridyl)ethylamine (**75**) (122 mg, 1.00 mmol) を用いて 130 °C, 10 min, CH<sub>3</sub>CN (3.00 mL) の条件で反応を行った。得られた残渣をフィルター濾取、乾燥した後、アミンシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 20 : 1–5 : 1–MeOH のみ) にて精製し、**78** (186 mg, 77%) を得た。分析および生物活性試験用サンプルは再結晶 (*i*PrOH) を行って得た。colorless powder. Mp 159–160 °C; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 2.80 (br s, 2H), 3.38 (br s, 2H), 7.07, 7.57 (br s, total 6H), 7.30 (br s, 2H), 8.48 (br s, 2H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 34.2, 41.2, 124.3, 148.1, 149.5, 158.5, 160.1; DARTMS: *m/z* calcd for [M-Cl]<sup>+</sup>: 207, found 207; *Anal.* Calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>15</sub>ClN<sub>6</sub>: C, 44.54; H, 6.23; N, 34.63. Found: C, 44.31; H, 6.18; N, 34.47. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

## Scheme 10 の実験

### 4-*tert*-Butylbenzyl chloride (**80**) の合成<sup>114</sup>

文献に従って、<sup>39</sup>tosyl chloride (1.14 g, 6.00 mmol) を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 mL) に溶解し、氷冷下攪拌しながら、4-*tert*-butyl-benzyl alcohol (**79**: 821 mg, 5.00 mmol) と pyridine (237 μL, 3.00 mmol) を加えたのち、室温にて 36 h 攪拌した。反応溶液を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> で希釈し、0.1 M 塩酸で 2 回、NaHCO<sub>3</sub> 飽和水溶液で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/CHCl<sub>3</sub> = 6 : 1) にて精製し、**80** (390 mg, 43%) を得た。colorless oil. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.32 (s, 9H), 4.58 (s, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.39 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H). 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したこ

とにより構造を決定した。

#### 4-*tert*-Butylbenzyl nitirile (**81**) の合成<sup>115</sup>

文献に従って、<sup>40</sup>**80** (548 mg, 3 mmol) を DMSO (6 mL) に溶解し、KCN (977 mg, 15 mmol) を加え、120 °C で 20 h 攪拌した。反応溶液を室温まで冷却した後、H<sub>2</sub>O を加え、EtOAc で抽出した。集めた有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>) にて精製し、**48** (454 mg, 87%) を得た。brown oil. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.32 (s, 9H), 3.72 (s, 2H), 7.26 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.40 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H). 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

#### 1-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-(4-*tert*-butyl)phenyl ethane (**84**) の合成

**General Procedure 2** に従って、**81** (433 mg, 2.50 mmol) を用いて反応を行い、得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>/*n*-hexane = 2 : 1) にて精製し、**84** (447 mg, 64%) を得た。pale yellow solid. Mp 66–68 °C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.31 (s, 9H), 1.44 (s, 9H), 2.76 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 3.38 (q, *J* = 6.8 Hz, 2H), 4.56 (s, 1H), 7.13 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H), 7.33 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz CDCl<sub>3</sub>): δ = 28.4, 31.4, 34.4, 35.7, 41.7, 79.2, 125.5, 128.5, 135.9, 149.2, 155.9; DARTMS: *m/z* calcd for [2M+H]<sup>+</sup>: 555, found 555; *Anal.* Calcd. for C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>NO<sub>2</sub>: C, 73.61; H, 9.81; N, 5.05., Found: C, 73.36; H, 9.86; N, 4.99. 本化合物は新規化合物である。

#### 1-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-(2-methyl)phenylethane (**85**) の合成<sup>116</sup>

**General Procedure 2** に従って、2-methylbenzyl nitirile (**82**) (525 mg, 4.00 mmol) を用いて反応を行い、得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>/*n*-hexane = 1 : 1) にて精製し、**85** (889 mg, 94%) を得た。yellow oil; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.44 (s, 9H), 2.33 (s, 3H), 2.81 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.34 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.64 (s, 1H), 7.13–7.26 (m, 4H). 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

#### 1-*tert*-Butoxycarbonylamino-2-(2-trifluoromethyl)-phenyl ethane (**86**) の合成

**General Procedure 2** に従って、2-trifluoromethylbenzyl nitirile (**83**) (741 mg, 4.00 mmol) を用いて反応を行い、得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>/*n*-hexane = 1 : 1) にて精製し、**86** (948 mg, 82%) を得た。pale yellow solid. Mp 60–61 °C.; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.44 (s, 9H), 2.99 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.38 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.63 (s, 1H), 7.31–7.38 (m, 2H), 7.31–7.65 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz CDCl<sub>3</sub>): δ = 28.4, 33.1, 41.6, 79.3, 124.5 (q, *J* = 273.9 Hz), 126.1 (q, *J* = 5.6 Hz), 126.5, 128.9 (q, *J* = 29.6 Hz), 131.6, 131.8, 137.6, 155.8; DARTMS: *m/z* calcd for [M+H]<sup>+</sup>: 579, found 579; *Anal.* Calcd.

for C<sub>14</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>2</sub>: C, 58.12; H, 6.27; N, 4.84, found: C, 58.12; H, 6.21; N, 4.72. 本化合物は新規化合物である。

#### 4-*tert*-Butylphenetylamine (50) の合成<sup>117</sup>

**General Procedure 3** に従って、**84** (420 mg, 1.50 mmol) を用いて脱保護を行い、**50** (265 mg, 99%) を得た。pale yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.31 (s, 9H), 2.72 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 2.96 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H), 7.13 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H), 7.32 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H). 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

#### 2-Methylphenetylamine (46) の合成<sup>118</sup>

**General Procedure 3** に従って、**85** (843 mg, 3.60 mmol) を用いて脱保護を行い、**46** の一塩酸塩を得た (617 mg, quant.)。得られた一塩酸塩 (298 mg, 1.70 mmol) を用いて脱塩を行い、**46** (229 mg, 98%) を得た。pale yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ = 2.26 (s, 3H), 2.63 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 2.70 (t, *J* = 6.8 Hz, 2H), 7.07–7.11 (m, 4H). 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

#### 2-Trifluoromethylphenetylamine (57) の合成<sup>119</sup>

**General Procedure 3** に従って、**86** (902 mg, 3.10 mmol) を用いて脱保護を行い、**57** の一塩酸塩を得た (705 mg, quant.)。得られた一塩酸塩 (461 mg, 2.00 mmol) を用いて脱塩を行い、**57** (353 mg, 92%) を得た。pale yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2.94 (br, 2H), 2.98 (br, 2H), 7.31 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.35 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.48 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.64 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H). 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

### Scheme 11 の実験

#### 1,4-bis(2-*tert*-Butoxycarbonylaminoethyl)benzene (88) の合成

文献に従って、<sup>41</sup>氷冷下、dry MeOH (200 mL) に 1,4-phenylenediacetonitrile (**87**) (4.69 g, 30.0 mmol)、(Boc)<sub>2</sub>O (26.2 g, 120 mmol)、NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O (713 mg, 10 mol%) を加えた。さらに NaBH<sub>4</sub> (15.9 g, 280 mmol) を 30 min 以上かけてゆっくり加えた後、室温で 19 h 攪拌した。diethylentriamine (6.5 mL, 60 mmol) を加え、さらに室温で 30 min 攪拌した後に溶媒を減圧留去し、EtOAc で抽出した。NaHCO<sub>3</sub> 飽和水溶液で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取し、溶媒を減圧留去した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー(CHCl<sub>3</sub>/MeOH = 10 : 1) にて精製し、**88** (7.02g, 64%) を得た。分析用サンプルは再結晶 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>+*n*-hexane) を行って得た。pale

yellow needle. Mp 154–155 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.44 (s, 18H), 2.77 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 4H), 3.36 (br, 4H), 4.55 (s, 2H), 7.13 (br, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 28.4, 35.8, 41.7, 79.2, 129.0, 137.0, 155.8; DARTMS:  $m/z$  calcd for  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 365, found 365; *Anal.* Calcd. for  $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_4$ : C, 65.91; H, 8.85; N, 7.69. Found: C, 65.67; H, 8.57; N, 7.95. 本化合物は新規化合物である。

#### 1,4-Di(aminoethyl)benzene dihydrochloride (**89**) の合成<sup>120</sup>

**88** (3.98 g, 10.9 mmol) を少量の MeOH に溶解し、さらに 5% HCl/MeOH (70 mL) を加え、室温で 13 h 攪拌した後、溶媒を減圧留去して **89** (2.61 g, quant.) を得た。white solid.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = 2.97 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 4H), 3.15 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 4H), 7.28 (br, 4H). 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

#### 1-(*tert*-Butoxycarbonylaminoethyl)-4-(aminoethyl)-benzene (**90**) の合成<sup>121</sup>

文献に従って、<sup>50</sup> 氷冷下、**89** (1.00 g, 4.20 mmol) を MeOH (1.5 mL) に溶解し、34% NaOH aq (0.9 mL, 5.9 mmol) をゆっくり加え、室温で 1 h 攪拌した。再度氷冷下で、MeOH (2 mL) に溶解した  $(\text{Boc})_2\text{O}$  (1.29 g, 5.90 mmol) を 30 min かけてゆっくり加え、室温で 66 h 攪拌した。溶媒を減圧留去し、10% クエン酸水溶液 (5 mL) を加え、diethyl ether (8 × 30 mL) を用いて副生成物の **88** (885 mg) を除いた。NaOH (1.0 g) を加えて中和し、 $\text{CHCl}_3$  で抽出した。飽和食塩水 (1 回) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取、溶媒を減圧留去し、**90** (384 mg, 34%) を得た。yellow oil.  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.44 (s, 9H), 2.71–2.77 (m, 4H), 2.96 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 3.36 (br, 2H), 4.56 (s, 1H), 7.13 (br, 4H). 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

#### 1-(Acetylaminoethyl)-4-(*tert*-butoxycarbonylaminoethyl)-benzene (**91**) の合成

文献に従って、<sup>51</sup> 氷冷下、dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1.2 mL) に **90** (384 mg, 1.45 mmol)、DMAP (18.0 mg, 0.15 mmol)、 $\text{NEt}_3$  (0.73 mL) を加えた後、acetic anhydride (0.20 mL, 2.20 mmol) をゆっくり加え、室温で 4 h 攪拌した。 $\text{H}_2\text{O}$  (1 回)、飽和クエン酸 (1 回)、飽和  $\text{NaHCO}_3$  水溶液 (2 回)、飽和食塩水 (1 回) で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取、溶媒を減圧留去した。得られた残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー ( $\text{EtOAc}/n\text{-hexane} = 3 : 1$ ) にて精製し、**91** (268 mg, 60%) を得た。white powder. Mp 117–118 °C;  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 1.44 (s, 9H), 1.95 (s, 3H), 2.79 (m, 4H), 3.36 (br, 2H), 3.50 (q,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 4.55 (s, 1H), 5.47 (s, 1H), 7.14 (br, 4H);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  = 23.3, 28.4, 35.2, 35.8, 40.6, 41.8, 79.2, 128.9, 129.0, 136.9, 137.2, 155.8, 170.0; DARTMS:  $m/z$  calcd for  $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 307, found 307; *Anal.* Calcd. for  $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3$ : C, 66.64; H, 8.55; N, 9.14. Found: C, 66.45; H, 8.55; N, 9.03. 本化合物は新規化合物である。

### 1-(Acetylaminoethyl)-4-(aminoethyl)benzene (**51**) の合成<sup>122</sup>

**91** (263 mg, 0.86 mmol) を少量の MeOH に溶解し、さらに 5% HCl/MeOH (2.5 mL) を加え、室温で 22 h 攪拌した。溶媒を減圧留去して **51** の一塩酸塩を得た。得られた白色固体を飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液 (5 mL) に溶解し、CHCl<sub>3</sub> を用いて抽出した。集めた有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥、フィルター濾取、溶媒を減圧留去し、**51** (166 mg, 94%) を得た。yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.94 (s, 3H), 2.72 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.79 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 2.95 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.49 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 5.74 (s, 1H), 7.11–7.16 (m, 4H). 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

### Scheme 12 の実験

#### *N,N'*-Bis(*tert*-butoxycarbonyl)-*N''*-[2-(2-chlorophenyl)ethyl]-guanidine (**92**) の合成

文献を参考にして、<sup>48</sup>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (6 mL) に **36** (464 mg, 1.60 mmol) を溶解し、2-(2-chlorophenyl)ethylamine (**52**) (374 mg, 2.40 mmol) を加え、室温で 84 h 攪拌した。溶媒を減圧留去し、得られた残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/EtOAc = 100 : 3) にて精製し、**92** (569 mg, 89%) を得た。分析用サンプルは再結晶 (EtOAc+EtOH) を行って得た。colorless powder. Mp 134–135 °C; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.48 (s, 9H), 1.51 (s, 9H), 3.02 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.69 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.19–7.36 (m, 4H), 8.37 (s, 1H), 11.48 (s, 1H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 28.1, 28.3, 33.0, 40.5, 79.3, 83.1, 126.9, 128.1, 129.6, 131.0, 134.2, 136.2, 153.2, 156.2, 163.6; DARTMS: *m/z* calcd for [M+H]<sup>+</sup>: 398, found 398; *Anal.* Calcd. for C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: C, 57.35; H, 7.09; N, 10.56. Found: C, 57.14; H, 7.04; N, 10.45. 本化合物は新規化合物である。

#### *N*-guanidine hydrochloride (**93**: GPU-486) の合成<sup>123</sup>

4 M HCl/EtOAc (5 mL) に **92** (564 mg, 1.42 mmol) を加え、室温で 20 h 攪拌した。溶媒を減圧留去し、EtOAc を加えさらに減圧留去する操作を 3 回繰り返して、**93** (334 mg, quant.) を得た。分析および生物活性試験用サンプルは再結晶 (EtOAc+EtOH) を行って得た。colorless powder. Mp: 157 °C. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ = 1.48 (s, 9H), 1.51 (s, 9H), 3.02 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 3.69 (q, *J* = 7.0 Hz, 2H), 7.19–7.36 (m, 4H), 8.37 (s, 1H), 11.48 (s, 1H); DARTMS: *m/z* calcd for [M-Cl]<sup>+</sup>: 198, found 198; *Anal.* Calcd. for C<sub>9</sub>H<sub>13</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>3</sub>: C, 46.17; H, 5.60; N, 17.95, found: C, 46.08; H, 5.57; N, 17.85. 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

### 3-Cyanopropyl triphenylphosphonium bromide (**95**) の合成<sup>52</sup>

文献を参考にして、toluene (30 mL) に triphenylphosphine (5.30 g, 20.2 mmol) と 4-bromobutronitrile (**94**) (2.49 g, 16.8 mmol) を加え、窒素雰囲気下 18 h 加熱還流した。反応溶液を室温まで冷却、フィルター濾取、ジエチルエーテルで洗浄した後乾燥して、**95** (6.07 g, 88%) を得た。white powder; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz CDCl<sub>3</sub>): δ = 2.01–2.06 (m, 2H), 3.12 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H), 4.13–4.19 (m, 2H), 7.71–7.89 (m, 15H). 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

### 5-(2-Chlorophenyl)pentnitrile (**97**) の合成<sup>124</sup>

文献を参考にして、<sup>52</sup>氷冷下、dry THF (60 mL) に sodium hydride (576 mg, 24 mmol) を加えた後、**95** (5.91 g, 14.4 mmol) をゆっくり加え、窒素雰囲気下、室温で 15 min 攪拌した。dry DMSO (6 mL) を加え、室温で 2 h 攪拌した後、2-chlorobenzaldehyde (1.69 g, 12.0 mmol) をゆっくり滴下し、さらに室温で 4 h 攪拌した。反応溶液に飽和 NH<sub>4</sub>Cl 水溶液 (50 mL) を加え、EtOAc で抽出した。得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/EtOAc = 10 : 1) による精製を行い、EZ 混合物である 5-(2-chlorophenyl)pent-4-enitrile (**96**) (1.95 g, 85%, *E* : *Z* = 1 : 4) を得た。colorless oil; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 2.42 (t, *J* = 7.4 Hz, 1.6H), 2.53 (q, *J* = 7.1 Hz, triplet of *E* form was overlapped completely, 2H), 2.62 (q, *J* = 6.9 Hz, 0.4H), 5.80 (dt, *J* = 5.7 Hz, 13.7 Hz, 0.8H), 6.19 (dt, *J* = 6.9 Hz, 16.0 Hz, 0.2H), 6.68 (d, *J* = 11.5 Hz, 0.8H), 6.91 (d, *J* = 16.0 Hz, 0.2H), 7.19–7.51 (m, 4H) 本化合物は新規化合物であり、上記スペクトルより構造及び *E* 体と *Z* 体の比率を決定した。

続いて、文献を参考にして、<sup>125</sup>混合溶媒 (EtOAc : 1,4-dioxane = 4 : 1, 25 mL) に EZ 混合物の **96** (958 mg, 5.00 mmol)、Pd/C (26.6 mg, 5 mol%) を加え、脱気後、水素風船で系内を水素で置換し、室温で 8 h 攪拌した。セライト濾過を行った後に溶媒を減圧留去し、得られた残渣はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-hexane/CHCl<sub>3</sub> = 1 : 1) にて精製し **97** (971 mg, quant.) を得た。colorless oil. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.71–1.81 (m, 4H), 2.38 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 2.78 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H), 7.14–7.35 (m, 4H). 本化合物は文献既知であり、上記スペクトルが一致したことにより構造を決定した。

### 1-tert-Butoxycarbonylamino-5-(2-chloro)-phenyl pentan (**98**) の合成

**General Procedure 2** に従って、**97** (775 mg, 4.00 mmol) を用いて反応を行い、得られた混合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>/*n*-hexane = 3 : 2) にて精製し、**98** (860 mg, 72%) を得た。pale yellow oil. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ = 1.36–1.42 (m, 2H), 1.44 (s, 9H), 1.49–1.55 (m, 2H), 1.60–1.66 (m, 2H), 2.72 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 3.12 (br, 2H), 4.51 (s, 1H), 7.11–7.33 (m, 4H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz CDCl<sub>3</sub>): δ = 26.5, 28.4, 29.4, 29.9, 33.4, 40.5, 79.0, 126.7, 127.1, 129.4, 130.3, 133.8, 140.0, 155.9; DARTMS: *m/z* calcd for [2M+H]<sup>+</sup>: 595,

found 595; *Anal.* Calcd. for  $C_{16}H_{24}ClNO_2$ : C, 64.53; H, 8.12; N, 4.70. Found: C, 64.53; H, 8.12; N, 4.70. 本化合物は新規化合物である。

### 2-Chlororophenylpentylamine (99) の合成

**General Procedure 3** に従って、**98** (351 mg, 1.20 mmol) を用いて脱保護と脱塩を行い、**99** (218 mg, 94%) を得た。pale yellow oil.  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 1.37–1.43 (m, 2H), 1.46–1.52 (m, 2H), 1.60–1.66 (m, 2H), 2.69 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 2.73 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 7.11–7.33 (m, 4H);  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  = 26.6, 29.6, 33.5, 33.5, 42.1, 126.6, 127.1, 129.4, 130.2, 133.8, 140.1; DARTMS:  $m/z$  calcd for  $[2M+H]^+$ : 395, found 395; 元素分析用に再結晶 (*i*PrOH) を行ったところ、一塩酸塩 1/3 水和物を得た。 *Anal.* Calcd. for  $C_{11}H_{17}Cl_2N \cdot 1/3H_2O$ : C, 55.01; H, 7.41; N, 5.83, found: C, 55.07; H, 7.41; N 5.93. 本化合物は新規化合物である。

### 5-(2-Chlorophenyl)pentylbiguanide dihydrochloride (100) の合成

**General Procedure 1** に従って、**99** (198 mg, 1.00 mmol) を用いて 130 °C, 10 min,  $CH_3CN$  (3.00 mL) の条件で反応を行い、**100** の一塩酸塩 (220 mg, 69%) を得た。分析及び生物活性試験用に再結晶 (EtOH) を行ったところ、二塩酸塩である **100** を得た。Mp 153–155 °C;  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  = 1.46–1.52 (m, 2H), 1.66–1.77 (m, 4H), 2.78 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 3.34 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H), 7.14–7.34 (m, 4H);  $^{13}C$  NMR (125 MHz  $CD_3OD$ ):  $\delta$  = 27.5, 28.7, 30.6, 34.3, 44.2, 128.1, 128.6, 130.4, 131.7, 134.8, 141.0, 153.7, 156.5; DARTMS:  $m/z$  calcd for  $[M-2Cl-H]^+$ : 282, found 282; *Anal.* Calcd. for  $C_{13}H_{22}Cl_3N_5$ : C, 44.02; H, 6.25; N, 19.74., Found: C, 43.75; H, 6.19; N, 19.70. 本化合物は新規化合物である。

## 生物学的評価における General Procedure

### 細胞培養

HEK293 細胞は 1% [v/v] NEAA、10% [v/v] FBS、50 units/mL ペニシリン、50 µg/mL ストレプトマイシン、および 50 µg/mL カナマイシンを含む EMEM を用いて 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。HT29 細胞、HCT116 細胞および HCT116p53<sup>-/-</sup> は 10% [v/v] FBS、50 units/mL ペニシリン、50 µg/mL ストレプトマイシン、および 50 µg/mL カナマイシンを含む RPMI1640 を用いて 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

### 化合物の調整

*in vitro* アッセイに用いた検定化合物は 100 mM の DMSO 溶液として -20 °C に保存し、DMSO 最終濃度が細胞毒性試験は 1.0% [v/v]、それ以外は 0.25% [v/v] になるように調製しアッセイを行った。CAM アッセイに用いた検定化合物は用時調整とした。2-deoxyglucose (2-DG) は 2 M の SDW 溶液として -20 °C に保存した。

### ストレス処理

低酸素処理はチャンバー内を低酸素ガス (94% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 1% O<sub>2</sub>) に置換することで低酸素の暴露を行った。化合物処理を行う場合は、化合物添加 1 h 後に低酸素処理を行うこととした。低栄養処理は 2-DG 含有通常培地、もしくはグルコース欠乏培地を用いることで行った。低酸素・低栄養同時処理は、2-DG 含有通常培地、もしくはグルコース欠乏培地で培養している細胞を、さらにチャンバーに入れて、中を低酸素ガス (94% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 1% O<sub>2</sub>) に置換することで低酸素の暴露を行った。

### ルシフェラーゼアッセイ

ストレスや化合物処理を行って培養した後、PBS (500 µL) にて洗浄し Lysis buffer (100 µL) にて溶解、-80 °C にて凍結させ細胞を完全に破碎した。さらに遠心分離 (15,000 rpm、4 °C、1 min) した後、上清 (10 µL) を基質 (100 µL) と反応させその発光 (測定波長 570 nm) を測定した。また、上清のタンパク質量は牛血清アルブミンのスタンダードで 0.1-1.0 mg/mL の濃度における検量線を作成後、BCA アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) の調製した試薬を 200 µL 加え 37 °C で 30 分放置し、その後 570 nm の吸光度を測定し、作成した検量線より算出した。ルシフェラーゼ活性データは測定した RLU 値を上清のタンパク質濃度で除することで算出した。

### MTT アッセイ

ストレスや化合物処理を行って培養した後、MTT 試薬を添加し、さらに 4 h 培養した。培地を全て取り除き、DMSO にて生成したホルマザン産物を完全に溶解した後、

MULTISKAN JX plate reader にて 570 nm の吸光度を測定した。

## 第一章第三節第二項に関する研究

### 遺伝子導入・セレクション

HEK293 細胞を 24 well plate に播種 ( $12.5 \times 10^4$  cells/well) し、一晩培養した。Opti-MEM に DNA を添加し、よく攪拌した後に HuGENE HD transfection reagent を加え、約 15 min 室温にてインキュベートして complex を作製した。complex は DNA 溶液 (pGRP78pro160-luc : pcDNA3.1 = 10 : 1)、FuGENE : DNA = 7 : 2、complex 中の DNA 総量が  $2 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$  となるように調製し、complex を各 well に添加、穏やかに振盪し、一晩培養した。細胞を新しい培養容器に移し一晩通常培地で培養した後、G418 入りの培地 (終濃度:  $800 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) に交換、クローン細胞のタイトレーションを行い、10–14 日間コロニー形成した後、コロニーピックアップを行った。ピックアップしたクローンは、G418 入りの培地 (終濃度:  $800 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) を用いて培養を続け、最終的に  $\phi 10$  シャーレ 1 枚分にまで増やし、それぞれ凍結保存した。

### クローン細胞の UPR 応答ルシフェラーゼ活性の確認

各クローンを 24 well plate に播種 ( $8.0 \times 10^4$  cells/well) し、一晩培養後、通常培地もしくは 2-DG 含有 (20 mM) 通常培地処理を 24 h 行った後、ルシフェラーゼアッセイを行い、通常培地処理と 2-DG 含有培地処理時のルシフェラーゼ活性を比較した。

### HEK293 GRP78 #85 を用いた 2-DG 濃度の最適化

ルシフェラーゼ活性: HEK293 GRP78 #85 細胞を 24 well plate に播種 ( $8.0 \times 10^4$  cells/well) し、一晩培養後、通常培地もしくは 2-DG 含有 (0.1–1.0 mM) 通常培地処理を 24 h 行った後、ルシフェラーゼアッセイを行い、通常培地処理と 2-DG 含有培地処理時のルシフェラーゼ活性比を算出した (Fold Index)。

細胞毒性: HEK293 GRP78 #85 細胞を 96 well プレートに播種 ( $1.0 \times 10^4$  cells/well) し、一晩培養後、2-DG (0.1–1.0 mM) 処理を 24 h 行った後、MTT アッセイを行った。

以上 2 種類の評価により最適な 2-DG 濃度を求めた。

### HEK293 GRP78 #85 を用いたストレスの検討

HEK293 GRP78 #85 を 24 well plate に播種 ( $8.0 \times 10^4$  cells/well) し、一晩培養後、グルコース欠乏培地 (GF)、1% $\text{O}_2$  低酸素処理 (Hypoxia)、グルコース欠乏培地+1% $\text{O}_2$  低酸素処理 (GF+Hypoxia) の 3 通りのストレス条件下、24 h 処理し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

### ストレス負荷条件における細胞毒性試験の検討

HT29 細胞を 96 well plate に播種 ( $3.0 \times 10^3$  cells/well) し、一晚培養後、通常培地、グルコース欠乏培地、低酸素 (Hypoxia: 1%O<sub>2</sub>) もしくは低酸素+グルコース欠乏培地 (Hypoxia+GF) 条件下 phenformin を 48 h 処理した後、通常培地に交換し、16 h 培養後 MTT アッセイを行った。

## 第一章第三節第三～五項に関する研究

### 低酸素応答ルシフェラーゼアッセイ

HEK293 p2.1 #3 細胞を 24 well plate に播種 ( $8.0 \times 10^4$  cells/well) し、一晚培養後、調製した種々の検定化合物を含有した培地にて培地交換を行った。低酸素処理を行った後 24 h 培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

### UPR 応答ルシフェラーゼアッセイ

HEK293 GRP78 #85 を 24 well plate に播種 ( $8.0 \times 10^4$  cells/well) し、一晚培養後、調製した種々の検定化合物を含有した 2-DG 含有 (0.3 mM) 培地にて培地交換を行った後、24 h 培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

### グルコース欠乏条件における細胞毒性試験

HT29 細胞を 96 well plate に播種 ( $3.0 \times 10^3$  cells/well) し、一晚培養後、通常培地もしくはグルコース欠乏培地にて培地交換を行った。調製した種々の検定化合物を添加後 48 h 培養した後、通常培地に交換し、16 h 培養後 MTT アッセイを行った。

## 第二章第一節に関する研究

HT29 細胞、HCT116 細胞もしくは HCT116p53<sup>-/-</sup> を 96 well plate に播種 ( $3.0 \times 10^3$  cells/well) し、一晚培養後、第一章第三節第二項に関する研究の低酸素・低栄養ストレス下における phenformin の細胞毒性の検討と同様のストレス条件下、調製した種々の検定化合物を添加後 48 h 培養した後、通常培地に交換し、16 h 培養後 MTT アッセイを行った。

## 第二章第二節に関する研究

### Western Blot (for HIF-1 $\alpha$ )

HT29 細胞を 10 cm dish に播種 ( $6.0 \times 10^6$  cells) し、一晚培養後、調製した種々の検定化合物入り培地にて培地交換を行った。低酸素処理を行い 4 h 培養した後、氷冷した PBS にて細胞を 2 回洗浄し、10 mL の PBS を加え、セルスクレーパーを用いて細胞をハーベストした。遠心分離 (1,000 rpm、4 °C、5 min) した後、上清を取り除き RIPA buffer [50 mM Tris-HCl, pH 8; 150 mM sodium chloride; 0.1% [v/v] SDS; 1% [v/v] Tergitol solution; 5 mM EDTA; 0.5% [w/v] sodium deoxycholate; 0.1 mM DTT; 1 mM PMSF; 1 mM Sodium orthovanadate; 10 mM sodium fluoride; one-half of tablet Complete<sup>®</sup>] にて細胞を完全に溶解した。遠心分離 (100,000 rpm、4 °C、20 min) 後、得られた細胞抽出液を BCA アッセイにてタンパク定量し、120  $\mu$ g となるよう 50% [v/v] glycerol、8% [w/v] SDS、1% [w/v] BPB、5% [v/v] 2-mercaptethanol を含む 0.25 M Tris-HCl buffer (pH 6.8) で調製し、5 min 煮沸した後、7% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離、ニトロセルロース膜にブロッキングした。ニトロセルロース膜を 0.1% Ponceau-S で染色、70 kD 付近でカットし、5% skim milk を含む TBST (0.1% Tween 20 を含む 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5) で 1 h から終夜 (4 °C) ブロッキングした後、mouse anti-human antibody against HIF-1 $\alpha$  (1000 倍希釈) および goat anti-human antibody  $\beta$ -actin (3000 倍希釈) を用いて 1 h から終夜 (4 °C) 反応させた。その後、TBST にて 3 回洗浄し、ニトロセルロース膜を Anti-mouse IgG Peroxidase conjugate secondary antibody (1000 倍希釈) および Anti-goat IgG Peroxidase conjugate secondary antibody (3000 倍希釈) を用いて室温で 1 h 処理した。処理後、TBST で 2 回 TBS にて 1 回洗浄し HIF-1 $\alpha$  は Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate、 $\beta$ -actin は Pierce Western Blotting Substrate を用いてそれぞれ検出した。画像解析は LAS 3000 mini imager and Multi Gauge software Science Lab version 2005 version 3.0 にて行った。

## 第二章第三節に関する研究

### Western Blot (for GRP78)

HT29 細胞を 10 cm dish に播種 ( $6.0 \times 10^6$  cells) し、一晚培養後、調製した種々の検定化合物入り通常培地もしくはグルコース欠乏培地にて培地交換を行い、低栄養処理 24 h 行った。タンパク質抽出およびタンパク質定量は第三章第二節と同様の方法で行った。タンパク質定量を行い 20  $\mu$ g となるよう 50% [v/v] glycerol、8% [w/v] SDS、1% [w/v] BPB、5% [v/v] 2-mercaptethanol を含む 0.25 M Tris-HCl buffer (pH 6.8) で調製し 5 min 煮沸した後、7% SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離し、PVDF 膜にブロッキングした。PVDF 膜を 0.1% Ponceau-S で染色し、転写を確認した後、60 kD 付近でカットし、1% BSA を含む TBST (0.1% Tween 20 を含む 20 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5) で 1 h から終夜 (4 °C)

ブロッキングした後、KDEL monoclonal antibody (1000 倍希釈) および goat anti-human antibody  $\beta$ -actin (3000 倍希釈) を用いて室温にて 90 min 反応させた。その後、TBST にて 3 回洗浄し、PVDF 膜を Anti-mouse IgG Peroxidase conjugate secondary antibody (1000 倍希釈) および Anti-goat IgG Peroxidase conjugate secondary antibody (3000 倍希釈) を用いて室温で 1 h 処理した。処理後、TBST で 2 回、TBS にて 1 回洗浄し Pierce Western Blotting Substrate を用いてそれぞれ検出した。画像解析は LAS 3000 mini imager and Multi Gauge software Science Lab version 2005 version 3.0 にて行った。

## 第二章第四節第一項に関する研究

### ELISA

HT29 細胞を 24-well plate に播種 ( $8 \times 10^4$  cells) し、24 h 後調製した種々の検定化合物入り常培地もしくはグルコース欠乏培地にて培地交換を行い、通常のインキュベートもしくは低酸素条件下で 24 h 培養した。培養後、培地 100  $\mu$ L を分注し、そのうち 50  $\mu$ L を試料として使用した。Microwell Plate coated with polyclonal antibody to human VEGF-A を wash buffer (200  $\mu$ L) にて 15 sec 浸した。Wash buffer を除去後、blank、検量線として作成した standard および検定用試料を 50  $\mu$ L ずつ各 well に添加し、assay buffer を 50  $\mu$ L ずつ加え 2 h 振とうした後、wash buffer にて 3 回洗浄後 Biotin-Conjugate anti-human VEGF-A polyclonal antibody を 100  $\mu$ L 加え 1 h 振とうした。さらに wash buffer にて 3 回洗浄後 Streptavidin-HRP を 100  $\mu$ L 加え、1 h 振とうした後、wash buffer にて 3 回洗浄後 Substrate solution (tetramethyl-benzidine) を 100  $\mu$ L 加え遮光し室温にて 30 min 静置した。MULTISKAN JX plate reader にて 620 nm の吸光度を測定し、Standard (1,000 pg/mL) の値が 0.9 付近になったことを確認した後、Stop solution を 100  $\mu$ L 加え、同様の機器にて 450 および 620 nm の吸光度を測定し、検量線より検体化合物の VEGFA の分泌量を算出した。さらに、ルシフェラーゼアッセイと同様に BCA アッセイによる細胞のタンパク質定量を行い、VEGFA の分泌量データは測定した VEGFA 値をタンパク質濃度で除することで算出した。

### 統計学的解析

データ解析は、Student's *t* test にて行い、 $p < 0.05$  の場合に統計学的に有意であると判断した。

## 第二章第四節第二項に関する研究

### CAM アッセイ

学術用有精卵（後藤孵卵場、モミジ；0日）を、37.5 °C の転卵機にて 1 h 毎に転卵しながら、3 日間インキュベートした。3 日目に、卵の鋭端を下にして鈍端の先端部分に錐で穴を開けた。次いで、卵を斜めに寝かせた状態で卵の赤道よりやや鋭端側にも錐で穴を開け、シリンジを用いて卵の側面の穴から卵白を約 3 mL 吸い取った。卵の鈍端の頂点付近の穴を、2 mL ニップルで塞ぎ、卵殻膜が剥がれる程度に吸引した。卵の側面の穴を *opposite film* で塞いで鈍端の穴周辺の殻を取り除き、直径 1 cm 程度の穴を開けた。続けて、卵殻膜を取り除き、キャップを被せて 39.0–39.5 °C のインキュベーターにて 24 h インキュベートした。4 日目に、CAM の中央にシリコンリング（内径 3 mm、外径 5 mm、厚さ 1 mm）をのせた。検定化合物を DMSO 最終濃度が 2% になるよう生理食塩水溶液で調製した。次に、生理食塩水にて調製した 2% メチルセルロース溶液を調製した検定化合物溶液に投与直前に等量、氷冷しながら加え、混和した後、リング内に 10  $\mu$ L 添加した。その後、再び 39.0–39.5 °C のインキュベーターにて 48 h インキュベートした。6 日目に、上部の卵の殻および卵殻膜を取り除き、シリンジを用いてイントラリポス約 1 mL を CAM に適量注入し、新生血管を明瞭に見えるようにした。目視で血管新生阻害効果を判定し、写真を撮映した。判定は、Table 8 に示す判定基準を用いて行った。また、コントロールおよび検定化合物のポイントの平均値を算出し、以下に示す式を用いて血管新生阻害率を求めた。

$$\text{血管新生阻害率 (\%)} = [1 - (\text{control point} / \text{drug point})] \times 100$$

**Table 8.** CAM アッセイにおける血管新生阻害作用の判断基準

Evaluation	Criteria	Point
-	血管新生阻害効果が認められない	0
±	若干の血管新生阻害効果が認められる	1
+	リングの周囲3 mm程度に血管新生阻害効果が認められる	2
++	CAM全体の1/3程度に血管新生阻害効果が認められる	3
+++	CAM全体の1/2程度に血管新生阻害効果が認められる	4

## Abbreviation list

HIF-1: hypoxia inducible factor 1  
UPR: unfolded protein response  
CAM: chick chorioallantoic membrane  
PANC: human pancreatic cancer  
AMPK: adenosine monophosphate-activated protein kinase  
HRE: hypoxia-response element  
HEK: human embryonic kidney  
ER: endoplasmic reticulum  
ERSE: endoplasmic reticulum stress responsive element  
ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay  
TMSCl: trimethylsilyl chloride  
Boc: *t*-butoxycarbonyl  
TsCl: *p*-toluenesulfonyl chloride  
rt: room temperature  
DMAP: *N, N*-dimethyl-4-aminopyridine  
NEt<sub>3</sub>: triethylamine  
*t*-Bu: tertiary butyl  
Ac: acetyl  
Ph: phenyl  
PPh<sub>3</sub>: triphenylphosphine  
THF: tetrahydrofuran  
Pd/C: palladium on carbon  
PHD: prolyl hydroxylase  
ARD1: arrest-defective protein 1  
VHL: von Hippel-Lindau  
IRE1: inositol-require protein 1  
PERK: protein kinase RNA (PKR)-like ER kinase  
ATF6: activating transcription factor 6  
GRP78: 78 kD glucose-related protein  
XBP1: X-box binding protein 1  
eIF2 $\alpha$ : eukaryotic initiation factor-2 $\alpha$   
ERAD: ER associated degradation  
2-DG: 2-deoxy glucose  
GF: glucose-free

OCT: cation transporter  
HT: human colon tumor  
HCT: human colon tumor  
VEGF: vascular endothelial growth factor  
mTOR: mammalian target of rapamycin  
<sup>1</sup>H-NMR: <sup>1</sup>H nuclear magnetic resonance  
<sup>13</sup>C-NMR: <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance  
EI: electron impact  
FAB: fast atom bombardment  
DART: direct analysis real time  
IR: infrared  
UV: ultra violet  
EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid  
EMEM: Eagle's minimal essential medium  
RPMI: Roswell Park Memorial Institute  
NEAA: non-essential amino acid  
SDS: sodium dodecyl sulfate  
DTT: dithiothreitol  
PMSF: phenylmethylsulfonylfluoride  
BPB: bromophenol blue  
APS: ammonium persulfate  
TEMED: *N,N,N,N'*-tetramethylethylenediamine  
Mp: melting point  
MS: mass spectrum  
HR: high resolution  
DMSO: dimethyl sulfoxide  
DMF: dimethylformamide  
PBS: phosphate buffered saline  
RLU: relative light unit  
BCA: bicinchoninic acid  
RIPA: radio-immunoprecipitation assay  
TBS: tris buffered saline  
BSA: bovine serum albumin

## 引用文献

1. Wouters, B. G.; Koritzinsky, M. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 851-864.
2. Semenza, G. L. *Cell* **2012**, *148*, 399-408.
3. Brown, J. M.; Wilson, W. R. *Nature reviews. Cancer* **2004**, *4*, 437-447.
4. Tennant, D. A.; Duran, R. V.; Gottlieb, E. *Nat. Rev. Cancer* **2010**, *10*, 267-277.
5. Shackelford, D. B.; Shaw, R. J. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 563-575.
6. Cairns, R. A.; Harris, I. S.; Mak, T. W. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 85-95.
7. Philip, B.; Ito, K.; Moreno-Sanchez, R.; Ralph, S. J. *Carcinogenesis* **2013**, *34*, 1699-1707.
8. Borovski, T.; De Sousa, E. M. F.; Vermeulen, L.; Medema, J. P. *Cancer research* **2011**, *71*, 634-639.
9. Burness, M. L.; Sipkins, D. A. *Semin. cancer Biol.* **2010**, *20*, 107-115.
10. Boral, D.; Nie, D. *Front Biosci.* **2012**, *4*, 2502-2514.
11. Semenza, G. L. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2010**, *20*, 51-56.
12. Nagasawa, H. *J. Pharmacol. Sci.* **2011**, *115*, 446-452.
13. Koh, M. Y.; Spivak-Kroizman, T.; Venturini, S.; Welsh, S.; Williams, R. R.; Kirkpatrick, D. L.; Powis, G. *Mol. Cancer Ther.* **2008**, *7*, 90-100.
14. Wilson, W. R.; Hay, M. P. *Nat. Rev. Cancer* **2011**, *11*, 393-410.
15. Staab, A.; Loeffler, J.; Said, H. M.; Diehlmann, D.; Katzer, A.; Beyer, M.; Fleischer, M.; Schwab, F.; Baier, K.; Einsele, H.; Flentje, M.; Vordermark, D. *BMC cancer* **2007**, *7*, 213-219.
16. Patterson, A. V.; Ferry, D. M.; Edmunds, S. J.; Gu, Y.; Singleton, R. S.; Patel, K.; Pullen, S. M.; Hicks, K. O.; Syddall, S. P.; Atwell, G. J.; Yang, S.; Denny, W. A.; Wilson, W. R. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 3922-3932.
17. Portwood, S.; Lal, D.; Hsu, Y. C.; Vargas, R.; Johnson, M. K.; Wetzler, M.; Hart, C. P.; Wang, E. *S. Clin. Cancer Res.* **2013**, *19*, 6506-6519.
18. Matsuo, J.; Tsukumo, Y.; Saito, S.; Tsukahara, S.; Sakurai, J.; Sato, S.; Kondo, H.; Ushijima, M.; Matsuura, M.; Watanabe, T.; Tomida, A. In *Mol. Cancer Ther.*, 2012; Vol. 11, 1082-1091.
19. Haga, N.; Saito, S.; Tsukumo, Y.; Sakurai, J.; Furuno, A.; Tsuruo, T.; Tomida, A. *Cancer Sci.* **2010**, *101*, 1125-1132.
20. Park, H. R.; Tomida, A.; Sato, S.; Tsukumo, Y.; Yun, J.; Yamori, T.; Hayakawa, Y.; Tsuruo, T.; Shin-ya, K. *J. Natl. Cancer. Inst.* **2004**, *96*, 1300-1310.
21. Saito, S.; Furuno, A.; Sakurai, J.; Sakamoto, A.; Park, H. R.; Shin-Ya, K.; Tsuruo, T.; Tomida, A. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 4225-4234.
22. Lu, J.; Kunitomo, S.; Yamazaki, Y.; Kaminishi, M.; Esumi, H. *Cancer Sci.* **2004**, *95*, 547-552.
23. Ishii, I.; Harada, Y.; Kasahara, T. *Front. Oncol.* **2012**, *2*, 137-140.
24. Awale, S.; Lu, J.; Kalauni, S. K.; Kurashima, Y.; Tezuka, Y.; Kadota, S.; Esumi, H. *Cancer Res.*

- 2006, 66, 1751-1757.
25. Tomitsuka, E.; Kita, K.; Esumi, H. *J. Biochem.* **2012**, 152, 171-183.
  26. Esumi, H.; Lu, J.; Kurashima, Y.; Hanaoka, T. *Cancer Sci.* **2004**, 95, 685-690.
  27. Kim, J.-Y.; Hwang, J.-H.; Cha, M.-R.; Yoon, M.-Y.; Son, E.-S.; Tomida, A.; Ko, B.; Song, S.-W.; Shin-ya, K.; Hwang, Y.-i.; Park, H.-R. *J. Cell.Physiol.* **2010**, 224, 33-40.
  28. Dowling, R. J.; Goodwin, P. J.; Stambolic, V. *BMC Med.* **2011**, 9, 33-38.
  29. Libby, G.; Donnelly, L. A.; Donnan, P. T.; Alessi, D. R.; Morris, A. D.; Evans, J. M. *Diabetes care* **2009**, 32, 1620-1625.
  30. Noto, H.; Goto, A.; Tsujimoto, T.; Noda, M. *PloS one* **2012**, 7, e33411.
  31. Pierotti, M. A.; Berrino, F.; Gariboldi, M.; Melani, C.; Mogavero, A.; Negri, T.; Pasanisi, P.; Pilotti, S. *Oncogene* **2013**, 32, 1475-87.
  32. Kourelis, T. V.; Siegel, R. D. *Med. Oncol.* **2012**, 29, 1314-1327.
  33. Soraya, H.; Esfahanian, N.; Shakiba, Y.; Ghazi-Khansari, M.; Nikbin, B.; Hafezzadeh, H.; Maleki Dizaji, N.; Garjani, A. *Iran. J. Basic Med Sci.* **2012**, 15, 1202-1209.
  34. Miller, R. A.; Chu, Q.; Xie, J.; Foretz, M.; Viollet, B.; Birnbaum, M. J. *Nature* **2013**, 494, 256-260.
  35. Luo, Z.; Zang, M.; Guo, W. *Future Oncol.* **2010**, 6, 457-470.
  36. Semenza, G. L.; Jiang, B. H.; Leung, S. W.; Passantino, R.; Concordet, J. P.; Maire, P.; Giallongo, A. *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 32529-32537.
  37. Osawa, T.; Shibuya, M. *Cell cycle* **2013**, 12, 2519-2520.
  38. Mayer, S.; Daigle, D. M.; Brown, E. D.; Khatri, J.; Organ, M. G. *J. Comb. Chem.* **2004**, 6, 776-782.
  39. Moussa, I. A.; Banister, S. D.; Beinat, C.; Giboureau, N.; Reynolds, A. J.; Kassiou, M. *J. Med. Chem.* **2010**, 53, 6228-6239.
  41. Butini, S.; Campiani, G.; Borriello, M.; Gemma, S.; Panico, A.; Persico, M.; Catalanotti, B.; Ros, S.; Brindisi, M.; Agnusdei, M.; Fiorini, I.; Nacci, V.; Novellino, E.; Belinskaya, T.; Saxena, A.; Fattorusso, C. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 3154-3170.
  42. Dolzhenko, A. V.; Dolzhenko, A. V.; Chui, W.-K. ECSOC-10, Nov. 1-30, **2006**, c010/1-c010/8.
  43. Ma, M.; Paredes, A.; Bong, D. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 14456-14458.
  44. Lebel, O.; Maris, T.; Perron, M.-E.; Demers, E.; Wuest, J. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10372-10373.
  45. Vauthey, I.; Valot, F.; Gozzi, C.; Fache, F.; Lemaire, M. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 6347-6350.
  46. Muccioli, G. G.; Martin, D.; Scriba, G. K. E.; Poppitz, W.; Poupaert, J. H.; Wouters, J.; Lambert, D. M. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 2509-2517.
  47. Yogeewari, P.; Sriram, D.; Thirumurugan, R.; Raghavendran, J. V.; Sudhan, K.; Pavana, R. K.; Stables, J. *J. Med. Chem.* **2005**, 48, 6202-6211.

48. Gers, T.; Kunce, D.; Markowski, P.; Izdebski, J. *Synthesis* **2004**, 37-42.
49. Makovec, F.; Artusi, R.; Zanzola, S.; Rovati, L. C. US20050049312A1; **2005**.
50. Lee, D. W.; Ha, H.-J.; Lee, W. K. *Synth. Commun.* **2007**, 37, 737-742.
51. Nadres, E. T.; Daugulis, O. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 7-10.
52. Leach, C. A.; Smith, S. A. WO2003042206A1; **2003**.
53. Wang, G. L.; Semenza, G. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, 90, 4304-4308.
54. Semenza, G. L. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, 3, 721-732.
55. Semenza, G. L. *Genes & development* **2000**, 14, 1983-1991.
56. Semenza, G. L. *Oncogene* **2010**, 29, 625-634.
57. Nagasawa, H.; Uto, Y.; Kirk, K. L.; Hori, H. *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, 29, 2335-2342.
58. Hetz, C. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, 13, 89-102.
59. Lee, A. S. *Cancer Res.* **2007**, 67, 3496-3499.
60. Delie, F.; Petignat, P.; Cohen, M. *J. Oncol.* **2012**, 2012, 468615-468619.
61. Dong, D.; Stapleton, C.; Luo, B.; Xiong, S.; Ye, W.; Zhang, Y.; Jhaveri, N.; Zhu, G.; Ye, R.; Liu, Z.; Bruhn, K. W.; Craft, N.; Groshen, S.; Hofman, F. M.; Lee, A. S. *Cancer Res.* **2011**, 71, 2848-2857.
62. Ranganathan, A. C.; Zhang, L.; Adam, A. P.; Aguirre-Ghiso, J. A. *Cancer Res.* **2006**, 66, 1702-1711.
63. Hattori, H.; Okuda, K.; Murase, T.; Shigetsura, Y.; Narise, K.; Semenza, G. L.; Nagasawa, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 5392-5401.
64. Feldman, D. E.; Chauhan, V.; Koong, A. C. *Mol. Cancer Res.* **2005**, 3, 597-605.
65. Viollet, B.; Guigas, B.; Sanz Garcia, N.; Leclerc, J.; Foretz, M.; Andreelli, F. *Clin.Sci.* **2012**, 122, 253-270.
66. Sogame, Y.; Kitamura, A.; Yabuki, M.; Komuro, S. *Biopharm. Drug Dispos.* **2009**, 30, 476-484.
67. Segal, E. D.; Yasmeen, A.; Beauchamp, M. C.; Rosenblatt, J.; Pollak, M.; Gotlieb, W. H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2011**, 414, 694-699.
68. Yuan, P.; Ito, K.; Perez-Lorenzo, R.; Del Guzzo, C.; Lee, J. H.; Shen, C. H.; Bosenberg, M. W.; McMahon, M.; Cantley, L. C.; Zheng, B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2013**, 110, 18226-18231.
69. Charton, M. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 1552-1556.
70. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1997**, 23, 3-25.
71. Waring, M. J. *Expert. Opin. Drug Discov.* **2010**, 5, 235-248.
72. Emami Riedmaier, A.; Fisel, P.; Nies, A. T.; Schaeffeler, E.; Schwab, M. *Trends Pharmacol. Sci.* **2013**, 34, 126-135.

73. Parks, S. K.; Chiche, J.; Pouyssegur, J. *Nat. Rev. Cancer* **2013**, *13*, 611-623.
74. Zhou, M.; Xia, L.; Wang, J. *Drug Metab. Dispos.* **2007**, *35*, 1956-1962.
75. Shitara, Y.; Nakamichi, N.; Norioka, M.; Shima, H.; Kato, Y.; Horie, T. *Toxicol. Sci.* **2013**, *132*, 32-42.
76. Wang, S. S.; Hsiao, R.; Limpar, M. M.; Lomahan, S.; Tran, T. A.; Maloney, N. J.; Ikegaki, N.; Tang, X. X. *Int. J. Mol. Med.* **2014**, *33*, 35-42.
77. Shackelford, D. B.; Abt, E.; Gerken, L.; Vasquez, D. S.; Seki, A.; Leblanc, M.; Wei, L.; Fishbein, M. C.; Czernin, J.; Mischel, P. S.; Shaw, R. J. *Cancer cell* **2013**, *23*, 143-158.
78. Nigro, J. M.; Baker, S. J.; Preisinger, A. C.; Jessup, J. M.; Hostetter, R.; Cleary, K.; Bigner, S. H.; Davidson, N.; Baylin, S.; Devilee, P.; et al. *Nature* **1989**, *342*, 705-708.
79. Brown, C. J.; Lain, S.; Verma, C. S.; Fersht, A. R.; Lane, D. P. *Nat. Rev. Cancer* **2009**, *9*, 862-873.
80. Jiang, P.; Du, W.; Yang, X. *J. Carcinog.* **2013**, *12*, 21.
81. Soga, T. *Cancer Sci.* **2013**, *104*, 275-281.
82. Ravi, R.; Mookerjee, B.; Bhujwalla, Z. M.; Sutter, C. H.; Artemov, D.; Zeng, Q.; Dillehay, L. E.; Madan, A.; Semenza, G. L.; Bedi, A. *Genes Dev.* **2000**, *14*, 34-44.
83. Maxwell, P. H.; Wiesener, M. S.; Chang, G. W.; Clifford, S. C.; Vaux, E. C.; Cockman, M. E.; Wykoff, C. C.; Pugh, C. W.; Maher, E. R.; Ratcliffe, P. J. *Nature* **1999**, *399*, 271-275.
84. Folkman, J. *J. Invest. Dermatol.* **1972**, *59*, 40-43.
85. Folkman, J. *Ann. Surg.* **1972**, *175*, 409-416.
86. Jung, H. J.; Kim, K. H.; Kim, N. D.; Han, G.; Kwon, H. J. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 1052-1056.
87. Chen, Y.-J.; Tsai, Y.-M.; Kuo, C.-D.; Ku, K.-L.; Shie, H.-S.; Liao, H.-F. *Life Sci.* **2009**, *85*, 642-651.
88. Afzal, A.; Caballero, S.; Pali, S. S.; Jurczyk, S.; Pardue, M.; Geroski, D.; Edelhauser, H.; Hochhaus, G.; Kim, M.; Franklin, A.; Shapiro, G.; Grant, M. B. *Brain Res. Bull.* **2010**, *81*, 320-326.
89. Dong, D.; Ni, M.; Li, J.; Xiong, S.; Ye, W.; Virrey, J. J.; Mao, C.; Ye, R.; Wang, M.; Pen, L.; Dubeau, L.; Groshen, S.; Hofman, F. M.; Lee, A. S. *Cancer Res.* **2008**, *68*, 498-505.
90. Fons, P.; Chabot, S.; Cartwright, J. E.; Lenfant, F.; L'Faqihi, F.; Giustiniani, J.; Herault, J.-P.; Gueguen, G.; Bono, F.; Savi, P.; Aguerre-Girr, M.; Fournel, S.; Malecaze, F.; Bensussan, A.; Plouet, J.; Le, B. P. *Blood* **2006**, *108*, 2608-2615.
91. Matsumoto, K.; Obara, N.; Ema, M.; Horie, M.; Naka, A.; Takahashi, S.; Imagawa, S. *Cancer Sci.* **2009**, *100*, 1639-1647.
92. Shing, Y.; Folkman, J.; Haudenschild, C.; Lund, D.; Crum, R.; Klagsbrun, M. *J. Cell. Biochem.* **1985**, *29*, 275-287.

93. Hughes, J. L.; Liu, R. C.; Enkoji, T.; Smith, C. M.; Bastian, J. W.; Luna, P. D. *J. Med. Chem.* **1975**, *18*, 1077-1088.
94. Shapiro, S. L.; Parrino, V. A.; Freedman, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 3728-3736.
95. Baker, B. R.; Ho, B.-T. *J. Heterocycl. Chem.* **1965**, *2*, 72-79.
96. Subbarao, K. V.; Damodaran, N. P.; Dev, S. *Tetrahedron* **1987**, *43*, 2543-2548.
97. Lai, G.; Tan, P.-Z.; Ghoshal, P. *Synth. Commun.* **2003**, *33*, 1727-1732.
98. Vechorkin, O.; Proust, V. r.; Hu, X. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 9756-9766.
99. Lee, J.-Y.; Fu, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 5616-5617.
100. Butini, S.; Brindisi, M.; Gemma, S.; Minetti, P.; Cabri, W.; Gallo, G.; Vincenti, S.; Talamonti, E.; Borsini, F.; Caprioli, A.; Stasi, M. A.; Di Serio, S.; Ros, S.; Borrelli, G.; Maramai, S.; Fezza, F.; Campiani, G.; Maccarrone, M. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6898-6915.
101. Roque, A. C. A.; Taipa, M. A.; Lowe, C. R. *J. Mol. Recognit.* **2005**, *18*, 213-224.
102. Shapiro, S. L.; Parrino, V. A.; Geiger, K.; Kobrin, S.; Freedman, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, *79*, 5064-5071.
103. Shapiro, S. L.; Parrino, V. A.; Freedman, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 2220-2225.
104. v, B. J.; Deutsch, H. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1912**, *45*, 2188-2198.
105. D'Sidocky, N. R.; Harris, R. L., III; Hegde, S. G.; Hilgraf, R.; McCarrick, M. A.; McKie, J. A.; Mortensen, D. S.; Nadolny, L.; Perin-Ninkovic, S. M.; Sapienza, J. J.; Wright, J. L. WO2008036308A2; **2008**.
106. Kita, Y.; Haruta, J.; Tagawa, H.; Tamura, Y. *J. Org. Chem.* **1980**, *45*, 4519-4522.
107. Perkovic, I.; Trsinar, S.; Zanetic, J.; Kralj, M.; Martin-Kleiner, I.; Balzarini, J.; Hadjipavlou-Litina, D.; Katsori, A. M.; Zorc, B. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2013**, *28*, 601-610.
108. Cragoe, E. J., Jr. US3313813; **1967**.
109. Shapiro, S. L.; Parrino, V. A.; Freedman, L. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81*, 4635-4639.
110. Scott, F. L.; Kennedy, M. T.; Reilly, J. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, *75*, 1294-1297.
111. El, H. Z. *Chem. Ber.* **1953**, *86*, 781-784.
112. Wick, A. N.; Murphy, P. J. FR5540; **1967**.
113. Alkalay, D.; Volk, J.; Bartlett, M. F. *J. Pharm. Sci.* **1976**, *65*, 525-529.
114. Lednicer, D.; Von, V. P. F.; Emmert, D. E. *J. Med. Chem.* **1980**, *23*, 424-430.
115. Culkin, D. A.; Hartwig, J. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9330-9331.
116. Leftheris, K.; Ahmed, G.; Chan, R.; Dyckman, A. J.; Hussain, Z.; Ho, K.; Hynes, J.; Letourneau, J.; Li, W.; Lin, S.; Metzger, A.; Moriarty, K. J.; Riviello, C.; Shimshock, Y.; Wen, J.; Wityak, J.; Wroblewski, S. T.; Wu, H.; Wu, J.; Desai, M.; Gillooly, K. M.; Lin, T. H.; Loo, D.; McIntyre, K. W.; Pitt, S.; Shen, D. R.; Shuster, D. J.; Zhang, R.; Diller, D.; Doweiko, A.; Sack, J.; Baldwin, J.; Barrish, J.; Dodd, J.; Henderson, I.; Kanner, S.; Schieven, G. L.; Webb, M. J.

- Med. Chem.* **2004**, *47*, 6283-6291.
117. Jiao, R.; Goble, S. D.; Mills, S. G.; Morriello, G.; Pasternak, A.; Yang, L.; Zhou, C.; Butora, G.; Kothandaraman, S.; Guiadeen, D.; Moyes, C. WO2003093231A2; **2003**.
118. Liu, M.-C.; Lin, T.-S.; Penketh, P.; Sartorelli, A. C. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4234-4243.
119. Bock, M. G.; Gaul, C.; Gummadi, V. R.; Moebitz, H.; Sengupta, S. WO2012035078A1; **2012**.
120. Mercer, S. M.; Robert, T.; Dixon, D. V.; Chen, C.-S.; Ghoshouni, Z.; Harjani, J. R.; Jahangiri, S.; Peslherbe, G. H.; Jessop, P. G. *Green Chem.* **2012**, *14*, 832-839.
121. Callahan, J. F.; Moore, M. L.; Yim, N. C. F. EP195673A2; **1986**.
122. Kato, H.; Sakaguchi, O.; Aoyama, M.; Tsubouchi, K. JP11080156A; **1999**.
123. Dukat, M.; Abdel-Rahman, A. A.; Ismaiel, A. M.; Ingher, S.; Teitler, M.; Gyermek, L.; Glennon, R. A. *J. Med. Chem.* **1996**, *39*, 4017-4026.
124. Bunnett, J. F.; Skorcz, J. A. *J. Org. Chem.* **1962**, *27*, 3836-3843.
125. Lamattina, J. L. EP138464A2; **1985**.

#### 主論文の基礎となる公表論文

- 1) Kosuke Narise, Kensuke Okuda, Yukihiro Enomoto, Tasuku Hirayama and Hideko Nagasawa, "Optimization of biguanide derivatives as selective antitumor agents blocking adaptive stress responses in the tumor microenvironment", *Drug Design, Development and Therapy*, in press.