植物由来グルコシルセラミド中のスフィンゴイドジエンの構造特性と皮膚改善機能

神戸大学大学院農学研究科

水 野　雅 史、久 世　雅 樹

We have reported that a glycosylceramide (GlcCer) showed improvement in skin barrier function in mice. Only the GlcCer from pineapple (P-GlcCer) showed the activity among other plant-derived GlcCers. We supposed the specific activity would be originated from the chemical structure of P-GlcCer, especially the moiety of sphingadienine (SD) would have the responsibility for the specificity. Here, we reported the investigation of the structure-activity relationships between the cis/trans geometries of sphingadienines (SD-1~4) and their biological activities. The challenge was initiated to establish the stereoselective synthesis of sphingadienines (SD-1~4). The stereoselective hydrogenolysis of ene–yne was employed to construct the diene moiety. The ene–yne units were prepared by stereoselective addition of acetylide ions of ene–yne units to Garner's aldehyde. Wittig reaction and Johnson–Claisen reaction afforded the required starting ene–ynes. Lindlar catalyst reduced alkyne to afford cis olefin, on the other hand, Red-Al reduction afforded trans olefin. By combination of Wittig/Johonson–Claisen reactions and Lindlar/Red-Al reductions, stereoselective syntheses of SD-1~4 were achieved. Cytotoxicity of SD-1~4 was checked by MTT assay. These compounds showed no cytotoxicity against RBL-2H3 cells at the concentration of 4.71 μg/ml. To confirm the anti-allergic activity of SD-1~4, RBL-2H3 cells were preincubated with each geometric SDs before sensitization of anti-DNP IgE and challenge of DNP-albumin. β-Hexosaminidase released into supernatant was measured as an index of its degradation. It was demonstrated that 4*cis*, 8*cis*-SD possessed the highest activity compared with the other three ones.

1．緒　言

スフィンゴ脂質の一種であるセラミドは、皮膚角質層の主要な細胞間脂質として約50％を占めており、高い保湿効果とバリア機能で肌トラブルを防ぎ、うるおいを保ち健康な肌を維持することから、美肌成分として多くの基礎化粧品に配合されている。また最近になり、これらを経口摂取した際にも抗腫瘍や抗炎症効果を示すなど、食品機能成分として注目を集めている。我々の研究グループでは、植物由来のセラミド成分に着目し、その皮膚炎症状の改善効果における作用機序を解明することで、皮膚バリア機能の改善・向上を可能にするコスメとして将来的に利用するための学術基盤の形成を目指している。

皮膚に乾燥症状を引きおこす特殊飼料HR-ADを食餌として与えられたマウスに、パイナップル由来グルコシルセラミド（P-GlcCer）を経口投与すると皮膚炎症状の改善がおこることを報告している[1]。さらにその作用機序は、HR-ADによって引きおこされる血中TGF（Transforming Growth Factor）-β量の減少をP-GleCerが元の状態まで回復されるためであることを明らかにした。またその作用は、我々の研究室で新たに構築した培養細胞を用いた共培養系腸管疑似モデル[2]を用いることで、グルコシルセラミドが直接作用しているのではなく、腸上皮細胞から吸収される際に生成された脱グルコース化したセラミドそのものが機能していること、および小腸でのインターロイキン（IL）-23mRNA発現が間接的に関与していることも明らかにしている。そこで各種植物由来グルコシルセラミドにも、同様の機能があるかをこのモデル系を用いて確かめたところ、P-GlcCerでのみ活性が認められた。一般に植物由来グルコシルセラミドは構造上スフィンゴイド塩基部分が多様であり、スフィンガジエニン中にシス体とトランス体が存在することが知られている。このことを加味すると、P-GlcCerのみに活性が認められた要因がスフィンゴイド塩基部の構造に起因していると考えられた。そこで我々はP-GlcCerの代謝物が皮膚炎の回復に寄与しているのではないかという仮説を立て、セラミド中のスフィンゴイド塩基部分、特に4,8-スフィンガジエニンの二重結合が*cis:cis, cis:trans, trans:cis, trans:trans*の四種異性体を合成し、共培養系腸管疑似モデルを用いてIL-23mRNA発現を指標に、食品成分であるグルコシルセラミドのうちどのような立体構造を有していれば皮膚改善能をもたらすのかを明らかにすることを目的とした。

2．方　法

2．1．スフィンガジエニン異性体の完全化学合成

スフィンガジエニンの異性体が四種合成できれば、P-GlcCerの異性体は既知の手法で合成できる。このスフィンゴイド塩基部分を効


*


Structural Property and Improvement Activity of Skin Barrier Function by Sphingoid Diene in Plant-Derived Glucosylceramide

Masashi Mizuno*, Masaki Kuse

Graduate School of Agricultural, Kobe University

率よく化学合成するために収束的な合成経路を立案した。一般にアルキンを還元する際、①水素化アルミニウムリチウムではトランス還元が、②Lindlar触媒ではシス還元が選択的に進行するので、目的とする異性体を選択的に合成できる。そこで、あらかじめ選択的オレフィン化反応により合成した末端アルキンと、セリンから誘導したGarner's aldehydeとを結合し、*cis*あるいは*trans*のオレフィンを持つ末端アルキンをそれぞれ用意し、それらを①および②の方法を用いて選択的に還元することでスフィンゴイド塩基の異性体四種を合成することにした。4-5位炭素と8-9位炭素がcis/trnasで作り分けられた4種の4,8-sphingadienineをそれぞれをSD-1~4と呼ぶ(Figure 1)。

SD-1~4は、中間体(**1**, **2**)における4-5位炭素であるアルキン部分を、*cis*もしくは*trans*選択的に半還元（アルキンをアルケンに還元）することで合成できると考えた。そして、中間体(**1**, **2**)はGarner'sアルデヒド(**3**)への末端アルキン(**4**, **5**)のアセチリドイオンのジアステレオ選択的な付加反応により得られると考えた。末端アルキン(**4**, **5**)は、目的物において8-9位炭素に該当する二重結合が*cis*もしくは*trans*として選択的に合成されている(Scheme 1)。

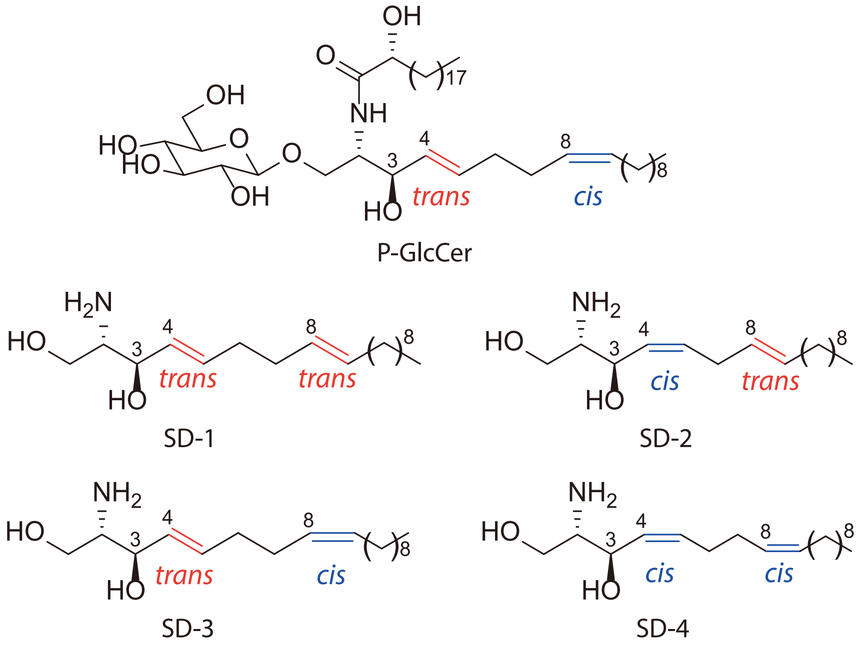
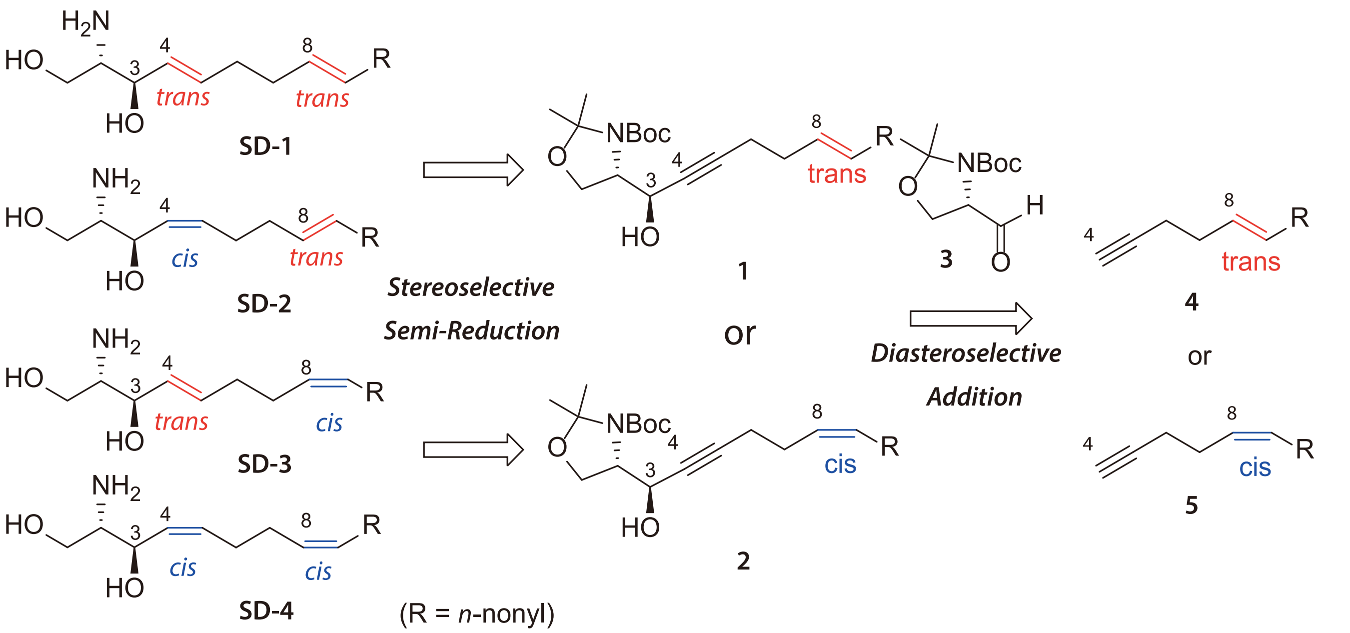


Figure 1　P-GlcCerと4種類の4,8-sphingadienineの異性体(SD-1~4)



Scheme 1　4種類の4,8-Sphingadienineの幾何異性体の逆合成解析

２．２．各異性体の細胞毒性

４種のSDの細胞毒性は、MTTアッセイにより評価した。RBL-2H3細胞を2.0×10^5 cells/wellで24穴プレートに播種し、RPMI 1640培地中にてオーバーナイトでインキュベートした。培地を除去し、試験試料を含む培地を添加して37℃で6時間インキュベートした。培地を除去し、MTT溶液（1.21 mM in RPMI 1640, 110 µL）を細胞に添加し２時間後、MTT溶液を除去し、DMSO（200 µL）を添加した。マイクロプレートリーダーで570 nmの吸光度を測定した。細胞生存率はコントロール群と比較して算出した。

２．３．抗アレルギー活性測定[3]

RBL-2H3細胞を2.0×10^5 cells/wellで24穴プレートに播種し、RPMI 1640培地中にて一昼夜培養した。試験試料を含む培地を添加して37℃で２時間インキュベートした。終濃度200 ng/mLの抗TNP IgE抗体を添加し、4時間培養した。すべての培地をシラガニアン緩衝液（SB；119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM $MgCl_2$, 1 mM $CaCl_2$, 40 mM NaOH, 25 mM PIPES, 5.6 mM glucose, 0.1% BSA, pH 7.2）に置き換えた後、終濃度20 ng/mLのTNP-BSAを添加し、37℃で１時間反応させた後、プレートを氷上に10分間静置し脱顆粒反応を停止させた。上清50 µLを96穴プレートに移し、等量の基質（0.2 Mクエン酸緩衝液中に*p*-nitrophenyl-*N*-acetyl-β-D-glucosaminideを終濃度1 mMで溶解，pH4.5）と混合して37℃で１時間反応させた。停止液（0.2 M glycine-NaOH溶液，pH13.0）を100 µL/wellで添加し、反応を終了させた。マイクロプレートリーダーで405 nmの吸光度を測定することで、酵素反応生成物である*p*-nitrophenolを定量し、これをβ-ヘキソサミニダーゼ遊離量の指標とした。上清中のβ-ヘキソサミニダーゼ遊離率は、脱顆粒誘導群の遊離量に対する百分率として算出した。

３．考　察

３．１．Garner's aldehydeの合成

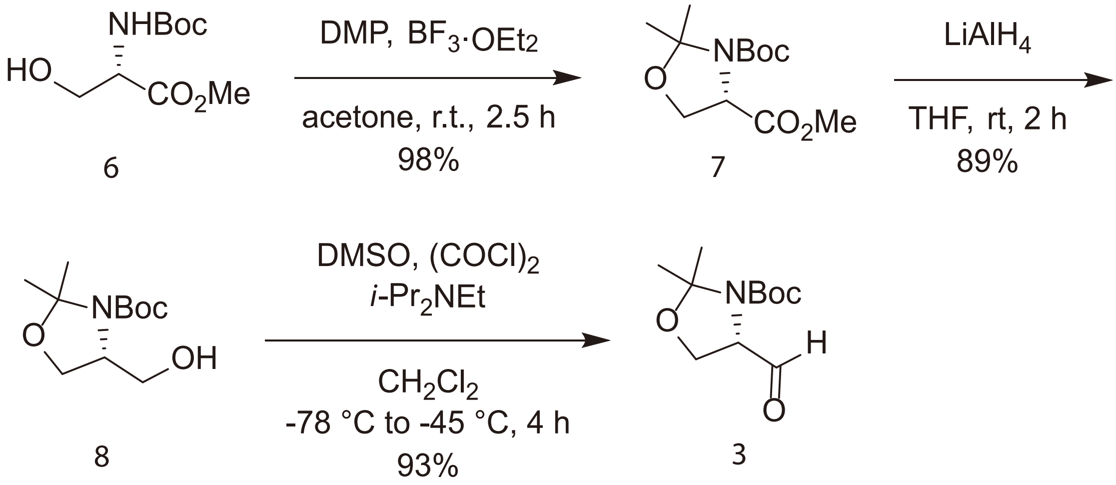
報告されている方法に基づいてGarner's aldehyde（**3**）の合成に取り組んだ[4, 5]。*N*-Boc-L-セリンメチルエステル（**6**）（Boc: *t*-Butoxycarbonyl）を出発原料とし、ジメトキシプロパン、三フッ化ホウ素ジエチルエーテル錯体（$BF_3 \cdot OEt_2$）と反応させ、環状アミナール（**7**）を収率98％で得た。得られた環状アミナール（**7**）を水素化アルミニウムリチウム（$LiAlH_4$）で還元することでアルコール（**8**）を収率89％で得た。このアルコール（**8**）を種々の条件下でPCC（ピリジニウムクロロクロメート）と反応させたが、副反応が起きてしまい、精製を行っても純粋な目的物を得ることは難しかった。そこで、Swern酸化での酸化を試みたところ、反応が良好に進行し、収率93％でGarner's aldehyde（**3**）を得た（Scheme 2）。

３．２．Garner's aldehydeへの立体選択的なアルキンの求核付加反応

得られたGarner's aldehyde（**3**）に対して、1-ペンタデシン（**9**）をモデルアルキンとして用いて、立体選択的な求核付加反応の条件検討を行った（Scheme 3）[6]。その結果、LamとMendezらが報告している条件[7]であるエントリー４で最も良い選択性が得られた（Table 1）。

３．３．アルキン（10）の４位炭素の*cis/trans*選択的な半還元反応

得られたアルキン（**10**）を用いて幾何選択的に還元を行い、4位炭素の幾何制御に取り組んだ。まず、*trans*体の合成から取り組んだ。アルキン（**10**）をRed-Alで還元したが[8, 9]、反応は進行せず原料回収という結果であった。Boc基が大きいためにRed-Alが反応点に近づくことができないために、反応



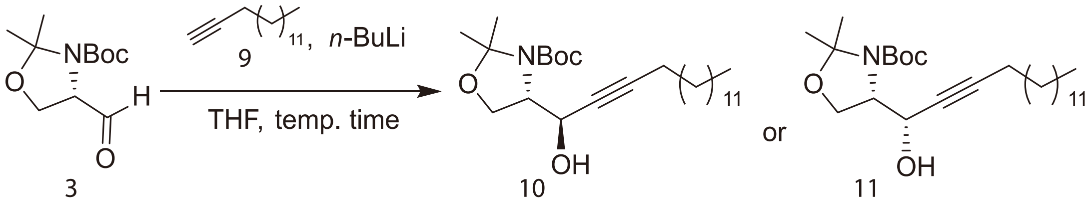
Scheme 2　Garner's aldehyde の合成

が進行しなかったと考えた。そこで脱保護の後に還元を試みた。まずアルキン(**10**)を*p*-トルエンスルホン酸(TsOH)で処理し、その後トリフルオロ酢酸で処理することでアルキン(**13**)を2段階収率34％で得た。得られたアルキン(**13**)をRed-Alと反応させると、収率45％で目的の*trans*アルケン(**14**)が得られた(Scheme 4)。

次は*cis*アルケンの合成に取り組んだ。アルキン（**10**）を水素雰囲気下、リンドラー触媒存在下[10]、メタノール溶媒中で撹拌すると、定量的に目的の*cis*アルケン（**15**）を得た。続いて*trans*アルケンを合成した時と同様に脱保護を行い、モデル体であるアルケン（**16**）を2段階収率25％で得た（Scheme 5)。以上により4位炭素の幾何制御の方法が確立できた。

3．4．(5*E*)-5-Pentadecen-1-yne (4)の合成

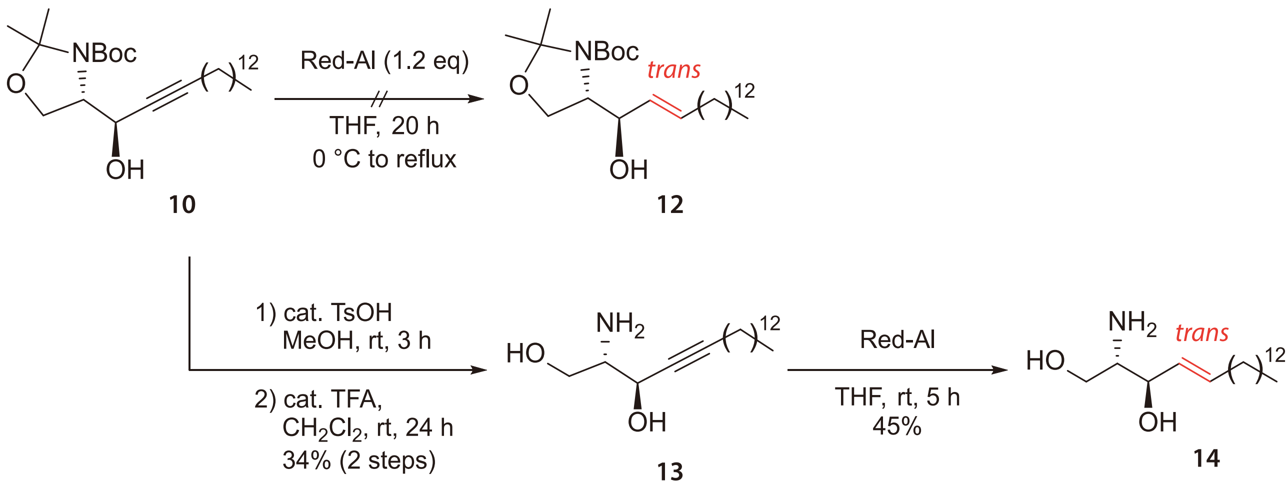
次に、8位炭素の*cis*/*trans*幾何制御の方法を確立する研究に取り組んだ。市販のdecanal（**17**）を出発原料とし、ビニルマグネシウムブロミドと反応させ、アルコール(**18**)を収率96％で得た。得られたアルコール（**18**）を過剰のオルト酢酸トリエチル中、プロピオン酸存在下で加熱する



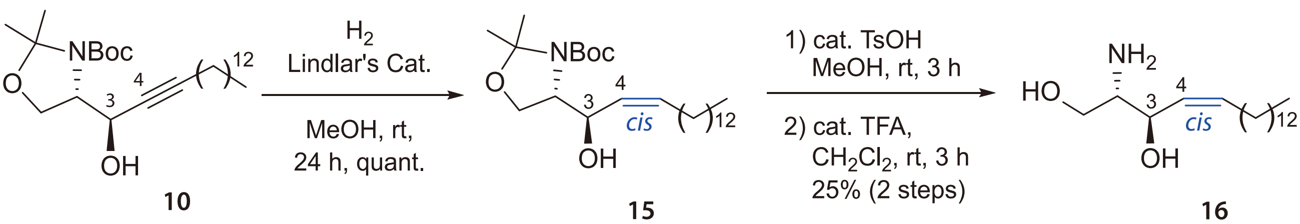
Scheme 3　Garner's aldehyde へのアセチリドイオンの付加

Table 1　立体選択的な求核付加反応の条件検討 .

Entry	Reagent (eq)	Temp. (℃)	Yield %	*anti* (6) : *syn* (13)
1	1.2	−78	61	71 : 29
2	1.5	−78	73	5 : 95
3	1.0	−78	46	87 : 13
4	1.0	−40	48	93 : 7
5	1.0	−78 to rt	59	56 : 44



Scheme 4　4-5位アルキン部における *trans* 選択駅な半還元



Scheme 5　4-5位アルキン部における *cis* 選択駅な半還元

ことで、Johnson-Claisen転位反応を引きおこし、アルケン（**19**）を*trans*選択的に収率84％で得た。得られた*E*-アルケン（**19**）を$LiAlH_4$と反応させて、収率96％でアルコール（**20**）を得た。続いて得られたアルコールとPCCを反応させ、収率80％でアルデヒド（**21**）を得た。このアルデヒド（**21**）とトリフェニルフォスフィン、亜鉛、四臭化炭素との反応により収率13％でジブロモアルケン（**22**）を得た。さらにこのジブロモアルケン（**22**）を*n*-BuLiで処理するCorey-Fuchsアルキン化反応により収率56％で（5*E*）-5-pentadecen-1-yne（**4**）を得た（Scheme 6）。

3．5．（5*Z*）-5-Pentadecen-1-yne（5）の合成

次に*cis*体の合成に取り組んだ。アルコール（**23**）からPCC酸化によりアルデヒド（**24**）を収率72％で得た。次にブロモデカン（**25**）をアセトン溶媒中でNaIと反応させることで収率95％でヨードデカン（**26**）を得た。得られたヨードデカン（**26**）をトリフェニルホスフィンとトルエン溶媒中、還流条件下で24時間反応させることで、ホスホニウムヨージド（**27**）を収率99％で得た。ホスホニウムヨージド（**27**）をNaHで処理し、アルデヒド（**24**）とWittig反応させたところ[11]、収率47％でオレフィン（**5**）を得た（Scheme 7）。以上により8位炭素の*cis*/*trans*幾何制御を達成した。

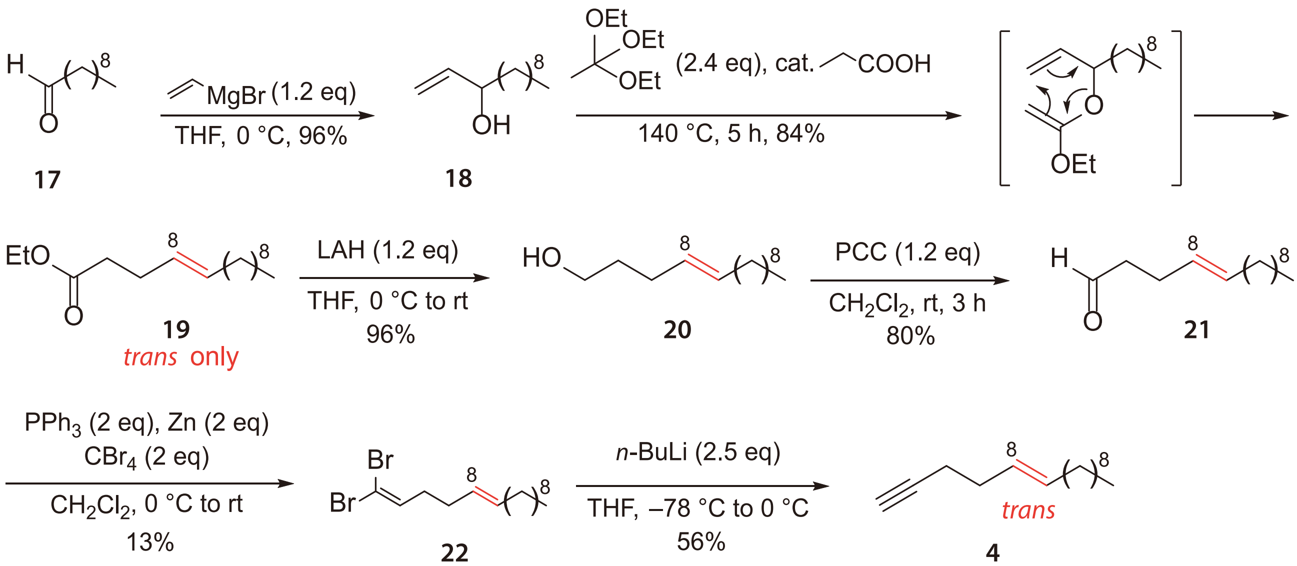
3．6． スフィンガジエニンの4種異性体（SD-1～4）の合成

すべての合成単位の選択的な合成経路が確立できたので、SD-1～4の合成に取り組んだ。

3．6．1．（*E*）-4,8-スフィンガジエニン（SD-1,2）の合成

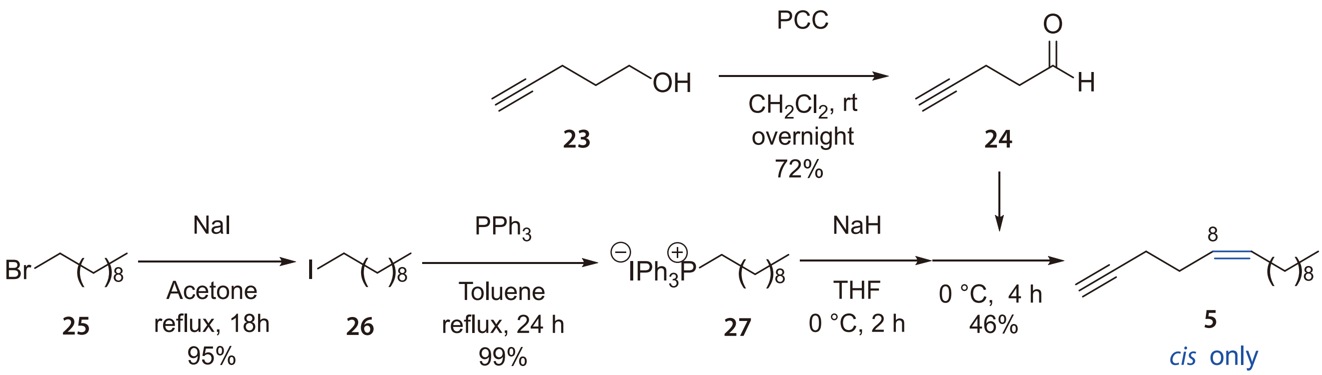
Garnaer'sアルデヒド（**3**）に対して、アルキン（**4**）のアセチリドイオンを付加させて、化合物**28**を得た。脱保護して化合物**29**へと誘導したのち、Red-Alで還元することで、*trans*/*trans*のスフィンガジエニン（**SD-1**）の合成を達成した（Scheme 8）。

次に、アルキン（**4**）のアセチリドイオンをGarner'sアルデヒド（**3**）に付加させ、化合物**28**を合成した。これをLindlar触媒下、加水素分解により**30**を合成した。最後に脱保護することで、*cis*/*trans*スフィンガジエニン（SD-2）の合成を達成した（Scheme 9）。



17 18 19 20 21 22 4

Scheme 6 （5*E*）-5-Pentadecen-1-yne（**4**）の合成



23 24 25 26 27 5

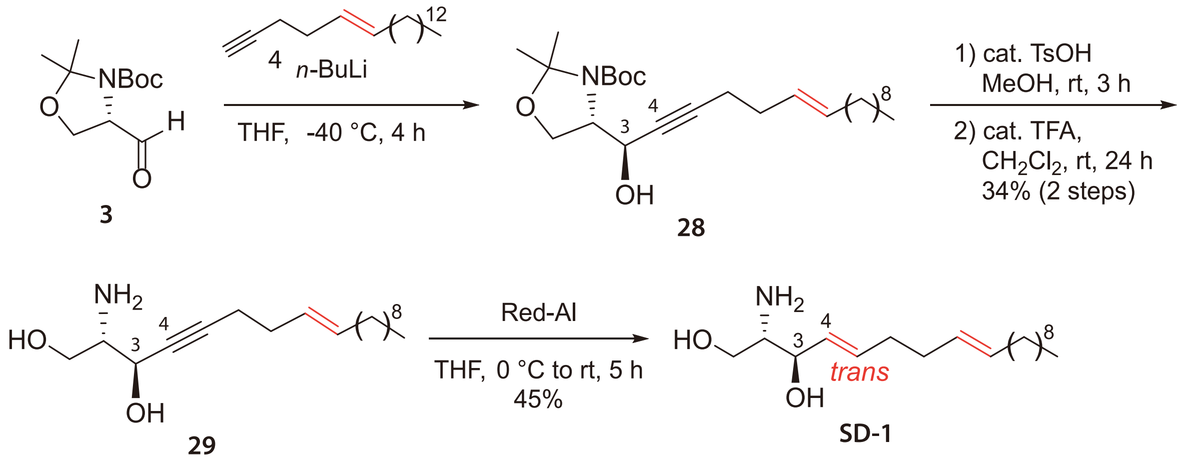
Scheme 7 1-Bromodecane からのビルディングブロック（**5**）の合成

3.6.2. (*Z*)-4,8-スフィンガジエニン(SD-3,4)の合成

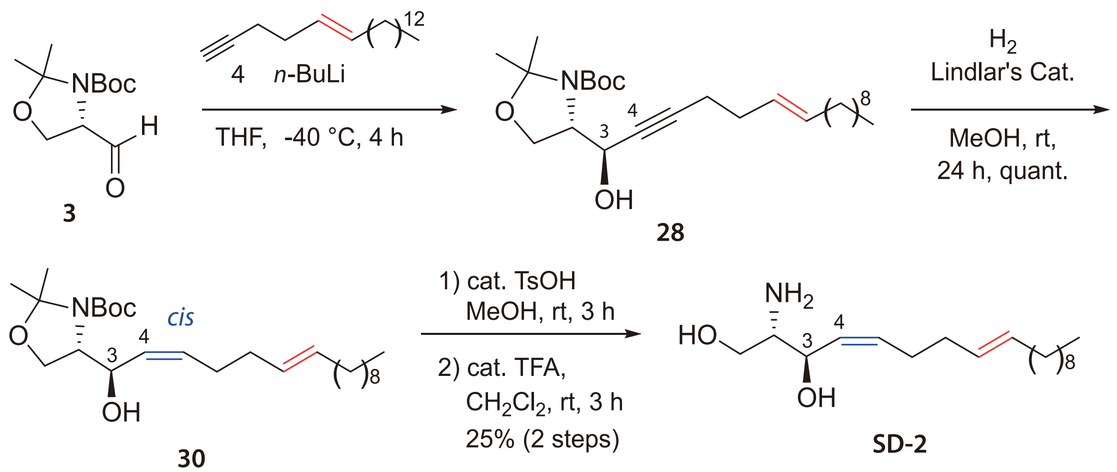
Garnaer'sアルデヒド(**3**)に対して、アルキン(**5**)のアセチリドイオンを付加させて、化合物**31**を得た。脱保護して化合物**32**へと誘導したのち、Red-Alで還元することで、*trans*/*cis*のスフィンガジエニン(**SD-3**)の合成を達成した(Scheme 10)。

最後に、アルキン(**5**)のアセチリドイオンをGarner'sアルデヒド(**3**)に付加させ、化合物**31**を合成した。これをLindlar触媒下、加水素分解により**33**を合成した。最後に脱保護することで、*cis*/*cis*スフィンガジエニン(**SD-4**)の合成を達成した(Scheme 11)。

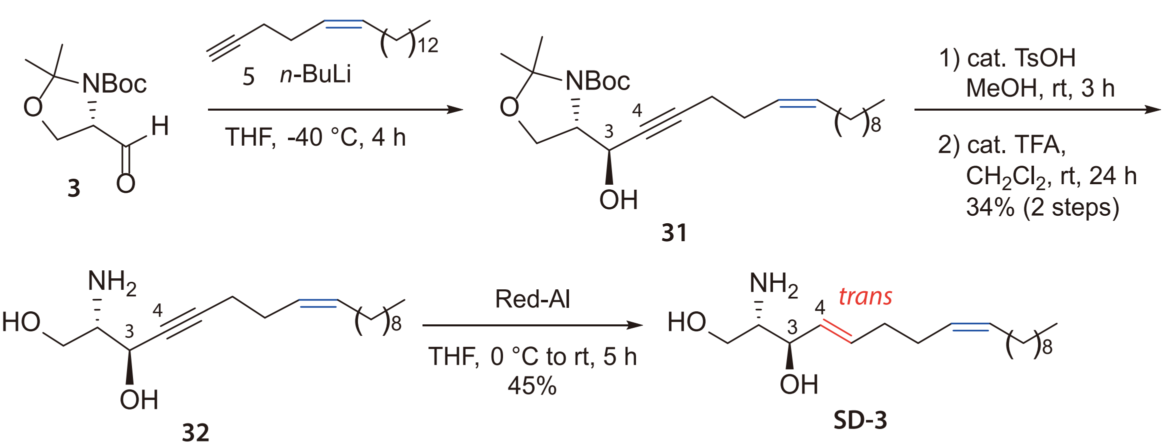
以上、4-5位炭素と8-9位炭素が*cis*/*trans*で作り分けられた4種の4,8-sphingadienine(**SD-1**~**4**)の完全化学合成を達成した。



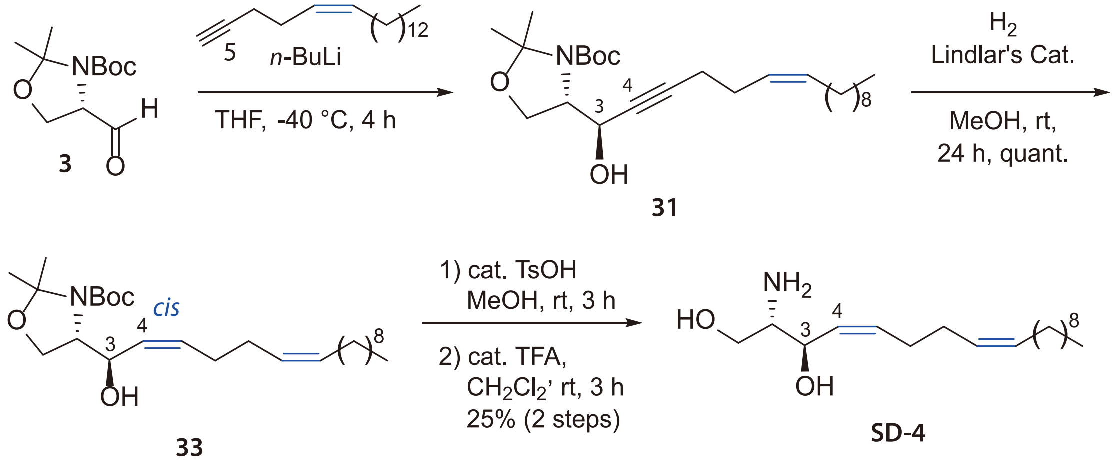
Scheme 8 SD-1 の合成



Scheme 9 SD-2 の合成



Scheme 10 SD-3 の合成



Scheme 11　SD-4 の合成

3. 7. 異性体四種の抗アレルギー効果

P-GlcCerの代謝物が皮膚炎の回復に寄与しているのではないかという仮説を立て、セラミド中のスフィンゴイド塩基部分、特に4,8-スフィンガジエニンの二重結合が*cis:cis, cis:trans, trans:cis, trans:trans*の四種異性体を合成し、共培養系腸管疑似モデルを用いてIL-23mRNA発現を指標に、食品成分であるグルコシルセラミドのうちどのような立体構造を有していれば皮膚改善能をもたらすのかを明らかにすることを目的とした。しかしながら、実際共培養系を用いて管腔側から試料を添加した際、Caco-2細胞によって代謝されるため、IL-23mRNA発現を指標にすることができないことが分かった。そこで合成した異性体四種の生理活性を明らかにするため、感作された肥満細胞RBL-2H3に対する合成した4種のスフィンゴイド塩基の抗アレルギー効果を検討した。

桑田ら[1]の報告では、P-GlcCerをCaco-2細胞に添加した際、54.8%が代謝されると報告している。したがって、本実験では、グルコシルセラミド80μg/mLの濃度でCaco-2細胞に添加した場合に、代謝産物がすべて4,8-スフィンガジエニン（SD）に変換されたと仮定して、その濃度（4.71μg/mL）におけるRBL-2H3細胞の脱顆粒に与える影響を評価した。4,8-SDのRBL-2H3細胞活性化抑制効果の評価を行うにあたり、まずは四種SDが4.71μg/mLで細胞毒性を示すかどうかを確認した。その結果、Figure 2に示すとおり所定濃度では細胞毒性は認められなかった。次に、四種SDの立体異性体によるRBL-2H3細胞のβ-ヘキソサミニダーゼ放出率を評価した。抗原抗体添加群（Positive control）でβ-ヘキソサミニダーゼ放出率は有意に増加し、4*cis*, 8*trans*-SD、4*cis*, 8*cis*-SDを添加したところβ-ヘキソサミニダーゼ放出率は有意に抑制され、特に4*cis*, 8*cis*-SDにおいて最も抑制率が高く約10%であった(Figure 3)。

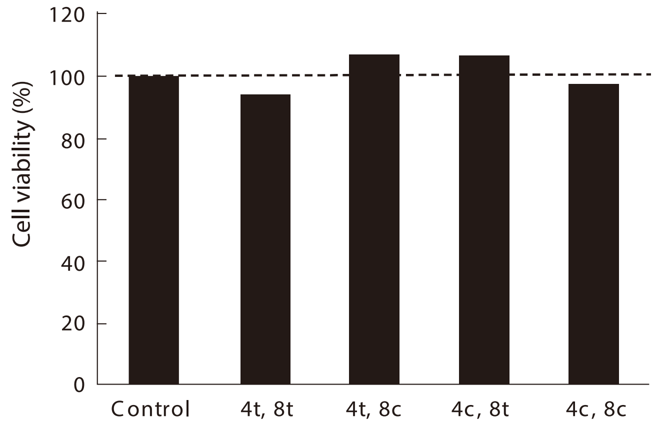


Figure 2　スフィンガジエニンによる細胞毒性

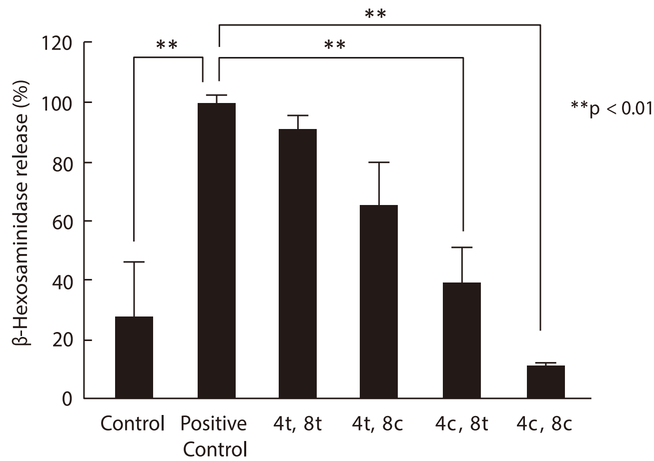


Figure 3　スフィンガジエニンによる肥満細胞活性化抑制効果

4. 考　察

本研究では、収束的な合成経路によるスフィンゴイド塩基の異性体四種（SD-1～4）の化学合成経路の確立を目指した。4-5位アルキン部分の還元では、モデル化合物を用いて条件検討を重ねた結果、トランス還元ではRed-Alに

よる還元が最適条件であった。この際、出発物質の保護基はすべて脱保護しておくことが必須であった。それは、立体障害によるRed-Alの接近を妨げないことが重要であったと考えられた。シス還元では、Lindlar触媒による水素化反応が有効であった。アルカンまでの過剰な還元反応を防ぎつつ、シス選択的に還元することができた。SD-1～4の前駆体は、Garnerアルデヒドへのene-yneのアセチリドイオンの付加反応が効果的に進行した。反応条件について精査した結果、－40℃の低温で反応を行うと高選択的に付加反応が進行し、前駆体を得ることができた。アセチリドイオンの原料となるene-yneの合成では、Johnson Claisen反応を利用するとtransのene-yneが選択的に合成できた。Wittig反応を利用したcisのene-yne合成が最も難しい段階であった。種々の反応条件と出発物質を精査することで、cisのene-yne合成手法が確立できた。こうして、cis/transの４種類立体異性体であるSD-1～４の合成経路を確立することができた。また、肥満細胞由来の培養細胞RBL-2H3を用いた４種類立体異性体の抗アレルギー活性を測定した結果、4*cis*, 8*cis*-SDに最も高い活性が見られた。

（引用文献）

1）T. Kuwata, T. Hashimoto, N. Ohto, H. Kuwahara, J. W. Lee, T. Bamba, M, Mizuno, A metabolite of dietary glucosylceramide from pineapples improves the skin barrier function in hairless mice, *J. Funct. Foods*, 30, 228-236, 2017.

2）T. Tanoue, Y. Nishitani, K. Kanazawa, T. Hashimoto, M. Mizuno, In vitro model to estimate gut inflammation using co-cultured Caco-2 and RAW264.7 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 374, 565-569, 2008.

3）S. Yamashita, Y. Yokoyama, T. Hashimoto, M. Mizuno, A novel in vitro co-culture model comprised of Coco-2/RBL-2H3 cells to evaluate anti-allergic effects of food factors through the intestine. *J. Immunol. Meth.*, 435, 1-6, 2016.

4）P. Garner, J. M. Park, E. Malecki, A stereodivergent synthesis of D-erythro-sphingosine and D-threo-sphingosine from L-serine, *J. Org. Chem.*, 53, 4395-4398, 1988.

5）P. Herold, Synthesis of D-Erythro- and D-Threo-Sphingosine Derivatives From L-Serine, *Helvetica Chimica Acta*, 71, 354-362, 1988.

6）M. Passiniemi, A.M. P. Koskinen, Garner's aldehyde as a versatile intermediate in the synthesis of enantiopure natural products, Beilstein *J. Org. Chem.*, 9, 2641-2659, 2013.

7）L. Wong, Sheryl S. L. Tan, Y. Lam, A. J. Mendez, Synthesis and Evaluation of Sphingosine Analogues as Inhibitors of Sphingosine Kinases, *J. Med. Chem.*, 52, 3618-3626, 2009.

8）I. V. Overmeire, S. A. Boldin, F. Dumont. S. V. Calenberrgh, G. Slegers. D. D. Keukeleire, A. H. Futerman, P. Herdewijin, Effect of Aromatic Short-Chain Analogues of Ceramide on Axonal Growth in Hippocampal Neurons, *J. Med. Chem.*, 42, 2697-2705, 1999.

9）M. Moreno, C. Murruzzu, A. Riera, Enantioselective Synthesis of Sphingadienines and Aromatic Ceramide Analogs, *Org. Lett.*, 13, 5184-5187, 2011.

10）M. L. Fanani, J. V. Busta, J. Sot, J. L. Abad, G. Fabrias, L, SAiz, J. M. G. Vilar, F. M. Goni, B. Maggio, A. Alonso, *Langmuir*, 34, 11749-11758, 2018.

11）T. Kawate, N. Fukuta, A. Nishida, M. Nakagawa, Synthesis of Sphingosine Analogues: Stereoselective Synthesis of 3-Deoxysphingosine and cis-Isomers, *Chem. Pharm. Bull.*, 45, 2116-2118, 1997.