

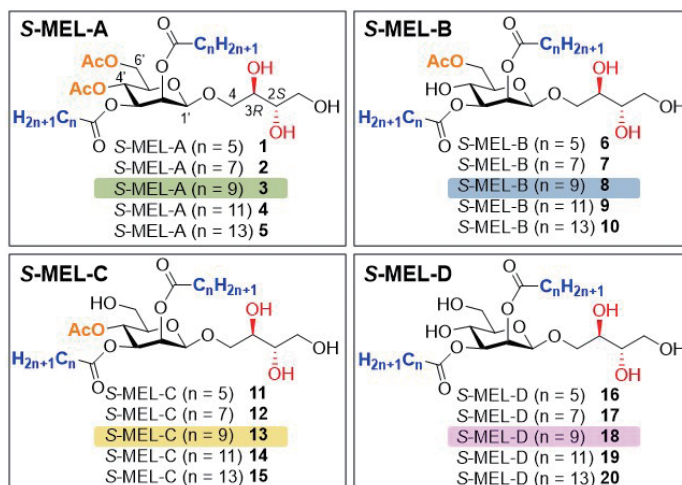
糖脂質型バイオサーファクタントの 精密化学合成と構造機能相関による 新規高機能性化粧品素材の創製

慶應義塾大学理工学部 高橋 大介

1. 緒言

マンノシルエリスリトールリピッド (MEL) は、*Pseudozyma* 属酵母より生産される糖脂質型バイオサーファクタントである¹⁾。MELの構造的特徴として、①マンノース2位および3位に2本の脂肪鎖 (鎖長: $n=5-17$) を有する点、②立体選択的な構築が困難な1,2-*cis*- β -グリコシドである β -マンノシド構造を有する点、③マンノースの4位および6位のアセチル (Ac) 基の位置と数により MEL-A、B、C および D の4種類の構造を有する点およびエリスリトール部位の水酸基の立体化学によって、S-MEL ([2S, 3R]-erythritol型) と R-MEL ([2R, 3S]-erythritol型) に分類される点が挙げられる (図1)。一方、MELの生物活性として、がん細胞の増殖抑制活性などの生物活性のみならず、優れた界面活性および保湿効果を有することから近年、医薬品および化粧品分野などで注目を集めており、とりわけ MEL-B は化粧品素材として実用化されている²⁾。現在 MEL は、酵母培養法により脂肪鎖長の不均一な混合物として供給されているが、脂肪鎖長が均一な化合物として単離・精製することが困難であり、詳細な構造機能相関研究が進んでいないのが現状である。そのため、新たな高機能性サーファクタントを創出するためにも、構造が明確かつ単一構造を有す

る MEL およびその類縁体の合成的供給が強く求められている。しかし、MELの化学合成例は、これまでに MEL-A の1例のみであり³⁾、MEL-B、C および D の全合成は、未だ達成されていなかった。このような背景の中、著者は、独自に開発した立体選択的1,2-*cis*グリコシル化反応⁴⁻⁶⁾を駆使して、S-MEL-A-Dの種類 (4種類) と脂肪鎖長 (5種類) ($n=4, 6, 8, 10$ および 12) が異なる計20種類の S-MEL 1-20 の全合成と抗菌活性および肌荒れ改善活性に関する構造機能相関研究を行ってきた (図1)。その結果、脂肪鎖長および Ac 化様式のわずかな違いが MEL の活性発現に大きな影響を与えることを初めて見出し、特に、S-MEL-D 18 ($n=8$) のみが、バンコマイシン耐性菌に対して抗菌活性を発現すること、および $n=8$ の脂肪鎖を有する S-MEL-A ($n=8$) 3、S-MEL-B ($n=8$) 8、S-MEL-C ($n=8$) 13、および S-MEL-D ($n=8$) 18 が表皮に浸透することで顕著な肌荒れ改善活性を示すことを明らかにしている⁷⁻⁹⁾。そこで次に、著者らは、MEL のがん細胞に対する細胞毒性に着目し、次の仮説を立てた。すなわち、ある種の MEL が、肌荒れ改善活性だけでなく、上皮がん細胞選択毒性を有するのであれば、スキンケアとがん予防を同時に可能にする新たな機能性化粧品 (コスメシューティカル) 素材になるのではないかと着想した。そこで本研究では、MEL を基本構造とし、



■図1 S-MEL 1-20の化学構造

肌荒れ改善活性とがん細胞選択毒性の両方の機能を併せ持つ次世代型コスメシューティカル素材の創製を目的とした。

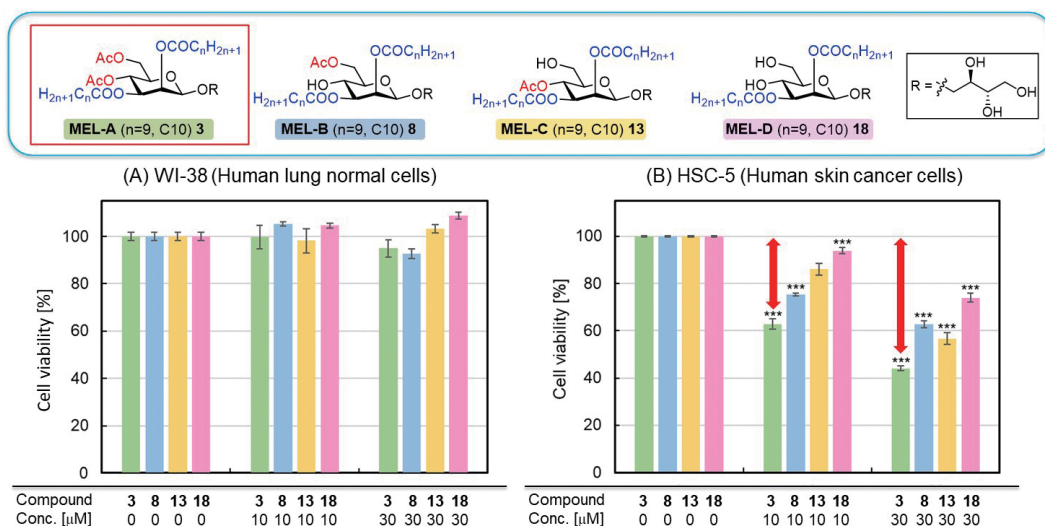
2. 方法・結果・考察

2.1. S-MEL-A-D (n=8) のがん細胞選択毒性評価

高い肌荒れ改善活性を示したS-MEL-A-D (n=8) **3**、**8**、**13**、および**18**のがん細胞選択毒性を評価するに際し、正常細胞としてヒト肺線維芽細胞WI-38を、上皮がん細胞としてHSC-5を選択し、MTTアッセイにより細胞増殖抑制活性を評価した。その結果、正常細胞WI-38に対しては、いずれの化合物も30 mMまでの濃度において細胞増殖抑制活性を発現しなかったのに対し、上皮がん細胞HSC-5の細胞増殖を濃度依存的に抑制することを見出し、がん細胞選択毒性を発現することを明らかにした。特に、S-MEL-A (n=8) **3**が、最も高いがん細胞選択毒性を発現したことから、**3**がコスメシューティカル素材開発のためのリード化合物であることを見出した(図2)。

2.2. 新規MEL類縁体21-24のデザイン・合成

次に、より優れた素材の開発を志向し、S-MEL-A (n=8) **3**のエリスリトール部位とアノマー位の立体化学を変更した4種類の新規類縁体をデザイン・合成し、構造活性相関研究を行うこととした。すなわち、エリスリトールの立体化学が異なるR-MEL-A (n=8) **21**、エリスリトール部位をスレイトールに変更したS-mannosylthreitol lipid (MTL) -A (n=8) **22**、その立体反転型のR-MTL-A (n=8) **23**、およびアノマー位の立体化学を変更した α -S-MEL-A (n=8) **24**をデザインし、合成に着手した。まず、**21**の合成を検討した(図3A)。すなわち、ポリン酸触媒**27**を用いて、1,2-アンヒドロ糖**25**とラセミ体のエリスリトール保護体**26**とのBMAD反応を検討した結果、望む β -マンノシド**28**およびその異性体**29**を、それぞれ高収率かつ単一異性体として得た。その後、**28**から5工程を経て目的の**21**を合成した。次に、**22**および**23**の合成を同様に検討した。すなわち、BMAD反応のアクセプターとして、それぞれスレイトール保護体**30**および**32**を用いて β -



■ 図2 S-MEL 3、8、13、および18のがん細胞選択毒性

マンノシドを得た後、5工程を経て**22**および**23**の合成を達成した(図3B, C)。最後に、**24**の合成を図3Dに示す。すなわち、**34**を出発原料とし、8工程で**35**⁹⁾を合成後、マンノースC4'およびC6'位水酸基のAc化、続くアセトニド基とトブチルジフェニルシリル(TBDPS)基の脱保護により、**24**の合成を達成した。

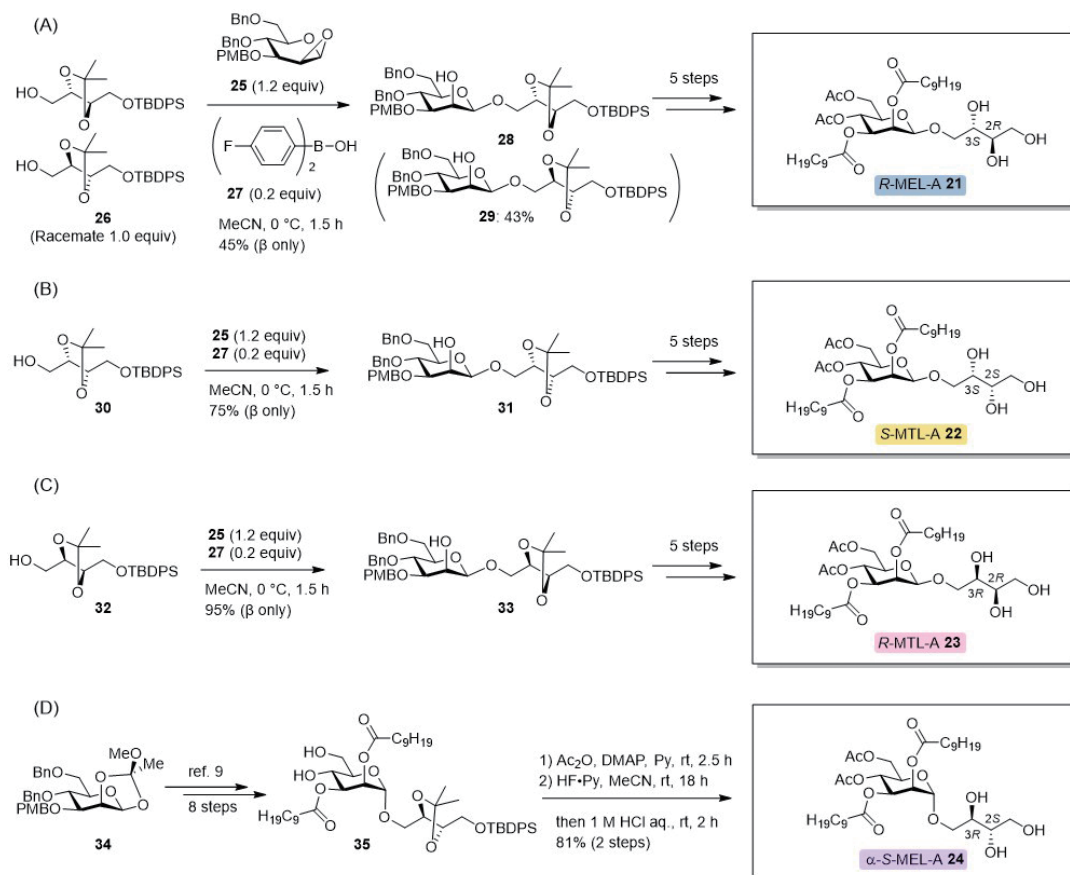
2.3. MEL類縁体21-24のがん細胞選択毒性評価

次に、合成したMEL類縁体**21-24**のがん細胞選択毒性を、先ほどと同様、WI-38細胞およびHSC-5細胞を用いてMTTアッセイにより評価した(図4)。なお、この際、ポジティブコントロールには**3**を用いた。その結果、 β -マンノシド構造を有する**24**が、正常細胞に対して毒性を発現したのに対し、 β -マンノシド構造を有する**21-23**は、正常細胞に対して毒性を発現せず、良好から高いがん細胞選択毒性を発現することを見出した。さらに、[2R, 3R]-スレイトール構造を有する**23**が、**3**を上回る選択毒性を発現することを見出した。

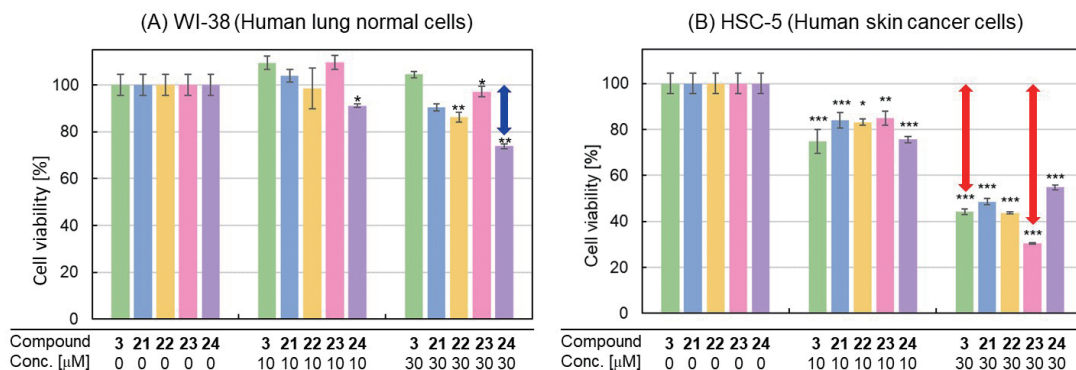
にした。以上の結果より、アノマー位の立体化学およびエリスリトール部位の水酸基の立体化学の違いが、HSC-5細胞に対する選択毒性に大きな影響を及ぼすことを見出した。

2.4. MEL類縁体23の肌荒れ改善活性

次に、高いがん細胞選択毒性を発現した**23**の肌荒れ改善活性を、ヒト三次元培養表皮を用いて評価した。すなわち、はじめにヒト三次元培養表皮を、乾燥誘引剤である1wt%のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)で処理することで、細胞間脂質が脱脂された乾燥肌荒れ表皮を作成した。続いて、ポジティブコントロールとして選択した**3**または**23**を表皮に塗布し、24時間後の細胞生存率をMTTアッセイにより評価した。その結果、SDSのみを添加した表皮細胞は、バリア機能崩壊に伴う乾燥により、細胞生存率が約10%まで低下したのに対し、**3**および**23**が、SDSによる乾燥状態から回復効果を示し、細胞生存率がそれぞれ約50%および75%まで上昇することを見出した。



■ 図3 MEL類縁体21-24の合成



■ 図4 S-MEL-A 3およびMEL類縁体21-24のがん細胞選択毒性

(図5)。以上の結果より、新たにデザイン、合成したMEL類縁体**23**が、**3**よりも優れた肌荒れ改善活性を発現することを明らかにし、肌荒れ改善活性と上皮がん細胞選択毒性を発現する新たなコスメシューティカル素材として有望であることを見出した。

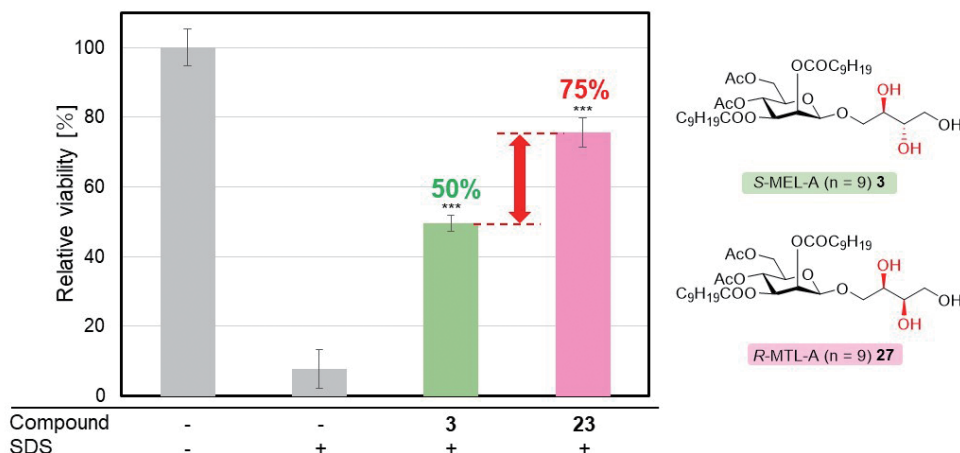
3. 総括

本研究では、まず、先行研究で高い肌荒れ改善活性を有することを見出していた*S*-MEL **3**、**8**、**13**、および**18**のがん細胞選択毒性について、正常細胞WI-38およびがん細胞HSC-5を用いて評価を行った。その結果、すべてのMELが、がん細胞選択毒性を示し、特に*S*-MEL-A **3**が最も高い活性を有することを明らかにした。次に、MELのエリスリトール部位およびアノマー位の立体化学が異なる4種類の新規MEL類縁体 (*R*-MEL-A **21**、*S*-MTL-A **22**、*R*-MTL-A **23**、 α -*S*-MEL-A **24**) をデザイン・合成し、それらのがん細胞選択毒性を評価した。その結果、**23**が**3**よりも優れたがん細胞選択毒性を示し、MELのアノマー位とエリ

スリトール部位のわずかな立体化学の違いが、がん細胞選択毒性の発現に影響を及ぼすことを初めて見出した。最後に、**3**および**23**の肌荒れ改善活性を評価したところ、人工的に合成されたMEL類縁体**23**が、天然型のMEL **3**よりも高い肌荒れ改善活性を示すことを明らかにした。以上の結果から、**23**は上皮がん細胞選択毒性と肌荒れ改善活性の両方を兼ね備えた、新たなコスメシューティカル素材の有望な候補化合物であることが示された^{10) 11)}。

謝辞

本研究の遂行にあたり、ご支援を賜りました公益財団法人コーセーコスメトロジー研究財団に心より感謝申し上げます。



■図5 *S*-MEL-A **3**およびMEL類縁体**23**の肌荒れ改善活性

参考文献・他

- 1) Morita, T.; Fukuoka, T.; Imura, T.; Kitamoto, D. Mannosylerythritol lipids: production and applications. *J. Oleo Sci.* 64, 133-141 (2015).
- 2) Kitamoto, D.; Isoda, H.; Nakahara, T. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants -from energy-saving materials to gene delivery carriers-. *J. Biosci. Bioeng.* 94, 187-201 (2002).
- 3) Crich, D.; de la Mora, M. A.; Cruz, R. Synthesis of the mannosyl erythritol lipid MEL A; confirmation of the configuration of the *meso*-erythritol moiety. *Tetrahedron* 58, 35-44 (2002).
- 4) 高橋大介, ボロン酸触媒を用いた1,2-*cis*-立体選択的グリコシル化反応の開発と天然物合成への応用, 有機合成化学協会誌 76, 470-473 (2018).
- 5) 高橋大介, ボロン酸触媒を活用した位置および1,2-*cis*-立体選択的グリコシル化反応の開発と応用, 有機合成化学協会誌 78, 221-231 (2020).
- 6) Takahashi, D.; Toshima, K. Boron-mediated aglycon delivery (BMAD) for the stereoselective synthesis of 1,2-*cis* glycosides. *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 82, 79-105 (2022).
- 7) Nashida, J.; Nishi, N.; Takahashi, Y.; Hayashi, C.; Igarashi, M.; Takahashi, D.; Toshima, K. Systematic and Stereoselective Total Synthesis of Mannosylerythritol Lipids and Evaluation of their Antibacterial Activity. *J. Org. Chem.* 83, 7281-7289 (2018).
- 8) Kondo, T.; Yasui, C.; Banno, T.; Asakura, K.; Fukuoka, T.; Ushimatsu, K.; Koga, M.; Minakawa, H.; Saika, A.; Morita, T.; Takahashi, D.; Toshima, K. Self-Assembling Properties and Recovery Effects on Damaged Skin Cells of Chemically Synthesized Mannosylerythritol Lipids. *ChemBioChem* 23, e202100631 (2022).
- 9) Kondo, T.; Yasui, C.; Miyajima, I.; Banno, T.; Asakura, K.; Fukuoka, T.; Ushimaru, K.; Koga, M.; Saika, A.; Morita, T.; Takahashi, Y.; Hayashi, C.; Igarashi, M.; Takahashi, D.; Toshima, K. Synthesis of Mannosylerythritol Lipid Analogues and their Self-Assembling Properties, Recovery Effects on Damaged Skin Cells, and Antibacterial Activity. *Chem. Eur. J.* 28, e202201733 (2022).
- 10) Meng, J.; Yasui, T.; Shida, M.; Toshima, K.; Takahashi, D. Designed Mannosylerythritol Lipid Analogues Exhibiting both Selective Cytotoxicity against Human Skin Cancer Cells and Recovery Effects on Damaged Skin Cells. *Chem. Eur. J.* 30, e202401319 (2024).
- 11) 孟繼坤, 戸嶋一敦, 高橋大介, 高機能性化粧品素材の創製を指向したマンノシルエリスリトールリピッド(MEL)類縁体の合成と構造活性相関研究, オレオサイエンス, 24, 475-481 (2024).

Title : Precise chemical synthesis of glycolipid biosurfactants and structure-function relationships for the creation of novel highly functional cosmetic materials

Author : Daisuke TAKAHASHI

Faculty of Science and Technology, Keio University

Abstract : Mannosylerythritol lipids (MELs) are a group of amphipathic molecules consisting of a hydrophilic 4-*O*- β -D-mannopyranosyl-erythritol core and two hydrophobic fatty acyl chains. Our group has systematically and stereoselectively synthesized 20 variants of S-MEL-A-D (C6, C8, C10, C12, C14) with different fatty acid chain lengths and varying acetylation patterns at C4' and C6' of the mannose unit. In addition, we conducted a structure-activity relationship (SAR) study to evaluate their recovery effects on damaged skin cells. The findings revealed that S-MELs with a C10 fatty chain length demonstrated the most significant recovery effects. Here, to create potential candidates for new cosmeceuticals, we designed and synthesized four MEL analogues—*R*-MEL-A, *S*-mannosylthreitol lipid (MTL)-A, *R*-MTL-A, and α -*S*-MEL-A—using our previously established boron-mediated aglycon delivery (BMAD) method along with a neighboring group-assisted glycosylation method. Among these, *R*-MTL-A exhibited the highest selective cytotoxicity against human skin squamous carcinoma cells while also exhibiting an efficient recovery effect on damaged skin cells. These results indicate that *R*-MTL-A holds promise as a lead compound for next-generation cosmeceuticals.

※本論文は、(公財)コーセーカスタムロジック研究財団(改称前)の公益事業として執筆されたものであり、論文掲載にあたり(公財)コーセー小林財団のご承諾を得ております。また、財団HPでも無償公開しています。
<https://kose-kobayashi-foundation.or.jp/>