

氏名	かたおか ひろき 片岡 裕樹
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	博士甲第 4615 号
学位授与の日付	平成 29 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	HCV 関連疾患治療薬を指向した多標的型フラレン誘導体の創製
論文審査委員	(主査) 増野 匡彦 (薬学博士) (副査) 須貝 威 (農学博士) 木内 文之 (薬学博士)

論文内容の要旨

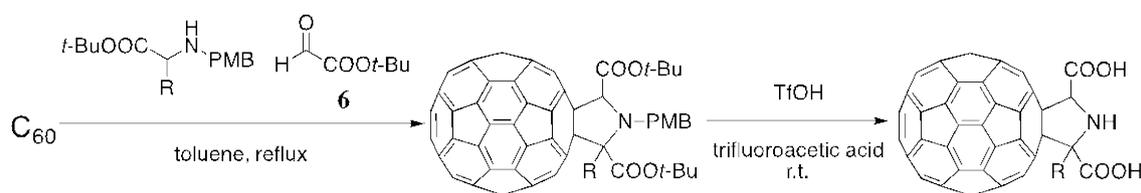
【背景】

C 型肝炎ウイルス(HCV)関連疾患は、罹患者が全世界で 1 億 5 千万人に上り、毎年 70 万人が死亡する原因となっていることから公衆衛生上重要な問題である。HCV 関連疾患治療の主流は、インターフェロンをベースとした治療法からウイルスの非構造(NS)タンパクを標的とした抗 HCV 薬による経口療法に大きく遷移した。新規抗 HCV 薬は NS3/4A プロテアーゼ(NS3/4A)、NS5A タンパク、NS5B ポリメラーゼ(NS5B)を標的としている。これらを単剤で使用すると薬剤耐性変異体が出現するため、多くが併用療法として、あるいは合剤として用いられているが複数の NS タンパクを阻害する抗 HCV 薬はまだない。また、HCV に感染し慢性肝炎を発症すると肝臓の線維化は徐々に進行し最終的に肝がんに至る。HCV は宿主の酸化ストレスを増大するため、これによる持続炎症や DNA 傷害が肝がん移行に関連すると考えられている。近年の経口抗 HCV 療法は高い著効率を誇るが、疾患の早期段階から酸化ストレスを抑制して肝臓を保護するという視点はない。

フラレンは球状の炭素同素体であり、酵素の疎水性ポケットに結合しうる独特な構造、高度に縮退した π 電子系に基づく酸化還元特性が着目され、医薬品としての応用が期待されてきた。当研究室では種々の水溶性フラレン誘導体 **1a**、**2-4** を合成し、それらが NS5B 阻害活性を有することを見出した。また修士課程研究では、これらが酸化ストレス抑制活性の指標となる *in vitro* における抗酸化活性を持つことを見出した。これより NS5B を阻害してウイルス複製を抑制するだけでなく、酸化ストレスも抑制して肝がん移行をも停止する **1a**、**2-4** の多標的型 HCV 関連疾患治療薬としての可能性を提唱してきた。多標的型医薬品には多くの長所があり、毒性や代謝等の検討が単剤に対してのみで済み、薬物間相互作用の懸念も無い。またがん治療におけるキナーゼ二重阻害薬に例を見るように、2 つの作用が相乗効果を示すことも期待できる。一方で短所として、複数の作用点に対してそれぞれ化合物をデザインし、活性の強さのバランスを取る必要があるため創薬の難度が高いことが挙げられる。

【研究目的】

塩化銅(I)を触媒として、*tert*-ブチルアルコールと *N,N*-ジイソプロピルカルボジイミドから生成する *O-tert*-ブチルイソ尿素誘導体により酒石酸を *tert*-ブチルエステル化した後、ヨードベンゼンジアセタートによる 1,2-ジオール酸化開裂反応により、アルデヒド **6** を得た。次にアミノ酸の *tert*-ブチルエステルと **6** から生成するアゾメチンイリドを、フラレンに作用させる 1,3-双極子付加環化反応によりフラレンコア上にピロリジン環を導入し、**7a-j** を得た。この反応では *cis* 体と *trans* 体が生成するが、それらの立体配置は NOESY を測定して決定した。最後にトリフルオロメタンスルホン酸で脱保護することにより **1a-j** を得た(Scheme 1)。誘導体 **7a-j** を得る反応では *cis* 体が優先して生成したが、系中で生成する *N*-置換アゾメチンイリドの安定性に着目し、*trans* 体が優先して生成する反応として *p*-メトキシベンジル(PMB)基を利用した方法を開発した。この合成法に基づき、PMB 基で保護した第二級アミンと **6** から生成するアゾメチンイリドをフラレンに作用させて *trans*-**8**、**9** を優先的に得た後、酸で脱保護することで *trans*-**1a**、**1b** を得た(Scheme 2)。



Scheme 1 フラレン誘導体 **1a-j** の合成

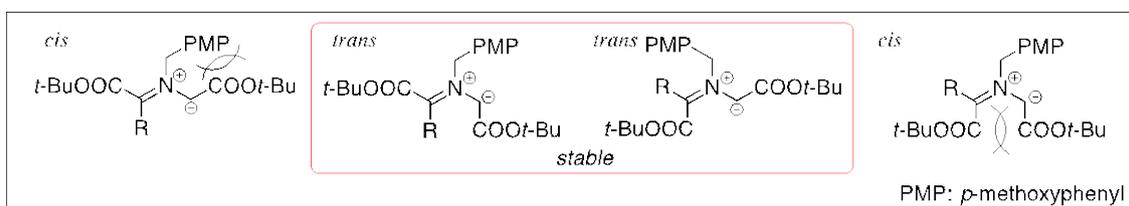
8: R=H
9: R=Me

trans-**1a**, **b**

trans-**1a**: R=H

trans-**1b**: R=Me

PMB: *p*-methoxybenzyl



Scheme 2 フラレン誘導体 *trans*-**1a**、**1b** の合成

NS5B 阻害や酸化ストレス抑制を含め、フラレン誘導体の各活性発現に際してフラレンコアを要するか明らかにするため、**1a** の置換基部位に相当する化合物 **5** を合成した。化合物 **5** は既知の合成法を参考に、2,5-ジブromoアジピン酸ジエチルに *p*-メトキシベンジルアミンを作用させてピロリジン環を構築し、DDQ で PMB 基を脱保護後、水中でエチルエステルを加水分解することにより得た。

【抗 HCV 活性の検討】

NS3/4A 阻害活性試験: NS3/4A(100 ng/mL)を含む反応液に 20 残基からなる NS5A-NS5B 接合部を模した基質ペプチド(60 μg/mL)を加えてペプチドを切断した。1 時間後、生成したペプチド断片を LC-MS の SIM モードで得られるクロマトグラムにおけるピーク面積から定量することで NS3/4A 阻害活性を測定した。ポジティブコント

ロールには第一世代 NS3/4A 阻害薬であるテラプレビルを用いた。

NS5B 阻害活性試験: 多くの化合物の活性を測定するため、ビオチンとストレプトアビジンの結合を利用したスループットと精度の高い実験系を確立した。NS5B はプラスミドにより大腸菌にタンパクを発現させて精製した。RNA の鋳型としてポリアデニル酸 (10 µg/mL)、プライマーとして 5'位をビオチン化したオリゴウリジル酸(0.2 µg/mL)を含む反応液に精製した NS5B(32 µg/mL)、放射性標識した UTP(1.2 MBq/mL)及び阻害剤を加え、RNA を伸長した。2 時間後、反応液をストレプトアビジンプレートに移し、生成した RNA を結合させて(0.5 時間)よく洗浄した後、放射活性を測定することで NS5B 阻害活性を測定した。ポジティブコントロールには既知の非核酸型 NS5B 阻害剤である VX-222 を用いた。

細胞内 HCV 複製抑制活性試験: 岡山大学との共同研究として、被検化合物を送付し細胞内 HCV 複製抑制活性を測定した。ルシフェラーゼ活性を付与した HCV ゲノムが自律的に複製増殖する OR6 細胞にフラレン誘導体を添加し、72 時間後にルシフェラーゼ活性を測定することで HCV 複製抑制活性を評価した。

細胞毒性試験: OR6 細胞の起源細胞である HuH-7 細胞を播種し、フラレン誘導体 (30 µM) 添加して 24 時間後にトリパンブルー色素排除法により生細胞を計数することで毒性を評価した。

Table 1 フラレン誘導体の抗 HCV 活性

(1) NS3/4A 阻害活性

NS3/4A 阻害活性を測定したフラレン誘導体の IC₅₀ は概ね 1 µM 以下であり、**2** の活性が最も強く、**3** の活性が弱かった(Table 1)。誘導体 **1a-j** について、わずかに差があるようにも見えるが構造活性相関が認められないことから、NS3/4A 阻害活性にほぼ差はないといえる。また **5** は 100 µM においても NS3/4A を阻害しなかったことから、阻害活性発現におけるフラレンコアの必要性が示された(data not shown)。

(2) NS5B 阻害活性

NS5B 阻害活性を測定したすべてのフラレン誘導体の IC₅₀ は 1 µM 以下であった(Table 1)。誘導体 **1a-j** について構造活性相関は認められなかった。また **5** は 100 µM においても NS5B を阻害しなかったことから、NS3/4A 阻害活性発現と同様にフラレンコアの必要性が示された(data not shown)。

Compound	IC ₅₀ or EC ₅₀ (µM)		
	NS3/4A	NS5B	Cellular HCV replication
<i>cis-1a</i>	0.15, 0.73, 0.71*	0.29	1.8
<i>trans-1a</i>	0.85	0.23	1.8
<i>cis-1b</i>	0.37	0.48	2.5
<i>trans-1b</i>	0.49	0.41	2.3
<i>cis-1c</i>	0.87	0.40	4.7
<i>cis-1d</i>	0.43	0.26	2.1
<i>trans-1d</i>	0.46	0.48	>50
<i>cis-1e</i>	0.87	0.28	19
<i>cis-1f</i>	0.38	0.24	2.8
<i>cis-1g</i>	0.95	0.58	5.5
<i>trans-1g</i>	0.23	0.23	1.8
<i>cis-1h</i>	1.5	0.40	3.2
<i>trans-1h</i>	0.99	0.24	3.4
<i>cis-1i</i>	0.22	0.28	1.5
<i>cis-1j</i>	0.52	0.38	0.89
2	0.050	0.20	1.9
3	>30	0.34	1.4
4	0.30	0.89	2.9
Telaprevir	0.019	N.T.	0.17
VX-222	N.T.	0.052	N.T.

N.T.: not tested

* : IC₅₀s obtained from three individual experiments

以上より、**1a** のメチン部位への置換基導入は NS3/4A や NS5B に対する阻害活性を変化させずに、水溶性や細胞内移行性といった物性や抗酸化活性の調節に利用できる可能性がある。

(3)細胞内 HCV 複製抑制活性

細胞内 HCV 複製に対しては *cis-1j* が最も有効であった (Table 1)。誘導体 **3** の複製抑制活性が強いのは顕著な細胞毒性によると考えられる。誘導体 *trans-1d*、*cis-1e* の HCV 複製阻害活性は低かったが、これらは酵素アッセイでは同等の阻害活性を示しているため、細胞アッセイの結果は HCV 酵素に対する抑制活性のみでは説明できない。側鎖置換基により細胞内移行性が変化したこと等が考えられ、この仮説に基づけば *cis-1j* は良い細胞内移行性を持つことにより、細胞内 HCV 複製抑制活性が高く表れた可能性がある。

(4)細胞毒性

フラレン誘導体 (30 μ M) は **3** を除いて有意な毒性を示さなかったことから、HCV 複製抑制活性が細胞毒性によらないことが示された (data not shown)。

【酸化ストレス抑制活性の検討】

ヒドロキシルラジカル消去活性試験:

ヒドロキシルラジカルは Fenton 反応により発生させた。硫酸鉄(II)(23 μ M)、大過剰のスピントラップ剤 DMPO(113 mM)、被検化合物(20 μ M)を含む反応液に過酸化水素(23 μ M)を加えてよく混和し、1分後に ESR を測定した。得られたスペクトルにおける DMPO-OH アダクトのシグナル強度からヒドロキシルラジカル消去活性を求めた。ポジティブコントロールには α -トコフェロールの水溶性類縁体であるトロロックスを用いた。

TBHP 誘発性酸化ストレスに対する

HuH-7 細胞保護効果: HuH-7 細胞を播種し被検化合物を添加して 24 時間インキュベートし、*tert*-ブチルヒドロペルオキシド (TBHP, 100 μ M) に 2 時間曝露後トリパンブルー色素排除法により生細胞数を計数して細胞保護効果を測定した。ポジティブコントロールには α -トコフェロールを用いた。

Compound	OH radical quenching activity (% at 20 μ M)	Cell viability* (% at 30 μ M)
<i>cis-1a</i>	52.1 \pm 0.9	42.8 \pm 4.8
<i>trans-1a</i>	58.9 \pm 6.3	38.5 \pm 9.1
<i>cis-1b</i>	55.5 \pm 4.1	40.8 \pm 10.0
<i>trans-1b</i>	39.2 \pm 8.1	34.7 \pm 16.3
<i>cis-1c</i>	31.4 \pm 8.0	42.9 \pm 7.6
<i>cis-1d</i>	25.9 \pm 0.9	16.6 \pm 2.5
<i>trans-1d</i>	34.2 \pm 3.3	8.6 \pm 3.1
<i>cis-1e</i>	76.2 \pm 1.0	30.3 \pm 0.0
<i>cis-1f</i>	70.8 \pm 2.1	52.4 \pm 7.8
<i>cis-1g</i>	58.2 \pm 2.2	55.3 \pm 9.5
<i>trans-1g</i>	31.5 \pm 4.7	46.5 \pm 13.5
<i>cis-1h</i>	68.0 \pm 3.4	71.5 \pm 4.0
<i>trans-1h</i>	52.4 \pm 2.6	33.9 \pm 3.8
<i>cis-1i</i>	77.0 \pm 6.2	17.8 \pm 3.2
<i>cis-1j</i>	58.1 \pm 4.4	23.3 \pm 7.0
2	65.6 \pm 7.0	28.7 \pm 2.7
3	21.1 \pm 2.0	N.T.
4	N.T.	33.9 \pm 5.4
5	56.3 \pm 1.3	9.0 \pm 6.1
Trolox	42.2 \pm 8.7	N.T.
α -Tocopherol	N.T.	92.7 \pm 15.7
Telaprevir	N.T.	48.2 \pm 11.9
VX-222	N.T.	14.6 \pm 2.8

N.T.: not tested

*: TBHP (100 μ M) reduced cell viability to 12.8 \pm 4.8% of control

Table 2 フラレン誘導体の酸化ストレス抑制活

(5) ヒドロキシルラジカル消去活性

多くの誘導体は一般的な抗酸化剤であるトロロックスと同等以上の強いヒドロキシルラジカル消去活性を示した(Table 2)。これらは親水性の高い誘導体の活性が高く、疎水性の高い誘導体の活性が低いことが示唆されたが、**3**の活性が低かったことからカチオンの存在が活性に不利である可能性がある。誘導体 **1a-j**の活性は水溶性置換基により分散性が変化したことによると考え、極性表面積(PSA)を計算してヒドロキシルラジカル消去活性との相関を求めたところ、中程度の相関を示した($R^2=0.37$)。化合物 **5**も消去活性を示したが、フラレンコアの消去活性は既知であるため、**1a**の消去活性は置換基部位のみに由来するわけではない。

(6) TBHP 惹起性酸化ストレスに対する細胞保護効果

芳香族アミノ酸由来の置換基を持つ **1d**、*cis-1i*、*cis-1j*の保護効果が弱かった(Table 2)。他の誘導体は30–50%程度まで細胞生存率を回復させたのに対し、*cis-1h*の保護効果が最も高く70%まで回復させた。ヒドロキシルラジカル消去活性が比較的高く細胞内HCV複製に対して最も有効であった*cis-1j*の細胞保護効果は弱かったことから、保護効果の差がヒドロキシルラジカル消去活性や細胞内移行性と相関するとは考えにくい。そのため*cis-1h*の保護効果が強いのは細胞内に存在するラジカル種が異なること、抗酸化酵素を誘導したこと等が要因として考えられる。一方で化合物**5**は保護効果を全く示さなかった。以上の結果から**1a**のメチン部位への置換基導入は酸化ストレス抑制活性調節に有用な変換であり、最も保護効果の高い*cis-1h*を見出した。

【結論】

誘導体 **1a**のメチン部位に様々な置換基を導入した新規誘導体 **1b-j**を合成した。また *N*-置換アゾメチンイリドの安定性に着目し、*cis*体を優先的に生成する反応を *trans*体優先へと転換した反応を開発した。誘導体 **1a-j**の他、**2-4**のNS3/4A阻害活性を測定し、**3**以外の誘導体が高い活性を持つことを明らかにした。誘導体 **1b-j**はNS5B阻害活性も示し、これらの活性はNS3/4Aに対する IC_{50} と同等であった。以上より、有用な二重阻害剤リードとしてNS3/4AとNS5Bに対する IC_{50} のバランスが良い**1a-j**、**4**を見出した。化合物**5**の酵素阻害活性検討から、フラレンコアの必要性が示された。細胞内HCV複製に対してもフラレン誘導体は有効であり、中でも高い活性を持つ*cis-1j*を見出した。*In vitro*における抗酸化活性の指標としたヒドロキシルラジカル消去活性はPSAの計算から、**3**を除く親水性の高い誘導体ほど活性が高いことが示唆された。TBHP誘発性酸化ストレスに対するHuH-7細胞保護効果は、芳香族アミノ酸側鎖を持つ誘導体が低く、その他の誘導体が中程度だったが、*cis-1h*が高い保護効果を示した。以上の結果から細胞内HCV複製に有効で、かつTBHP誘発性酸化ストレスに対する細胞保護効果が高かった*cis-1h*を多標的型HCV関連疾患治療リードとして見出した。誘導体*cis-1h*、**1j**の構造を基にすれば細胞内HCV複製阻害活性と酸化ストレス抑制効果の双方がより高い誘導体が創製できる可能性がある。

論文審査結果の要旨

博士論文提出後、副査 2 名による個人面談（試問）を行い、論文内容に関しての指摘並びに改善に関する指導が行われた。それを踏まえた博士論文発表は平成 29 年 2 月 23 日（金）10 時 20 分から研究科委員会のメンバーなどの出席のもと、学内公開で実施された。

発表会では、以下に示す研究の背景から、多標的型 HCV 関連疾患治療薬創製に関する研究内容が発表された。その後の 15 分間の口頭試問では、副査ならびに他の教員からの質問があり、概ね的確な応答がなされた。

C 型肝炎関連疾患は公衆衛生上重要な問題であり、治療の主流はウイルスの非構造(NS)タンパクを標的として効果を上げている。しかし、単剤で使用すると薬剤耐性が出現するため併用療法、あるいは合剤として用いられている。また、HCV に感染し慢性肝炎を発症すると肝臓の線維化を経て肝がんに至る。HCV は宿主の酸化ストレスを増大し、これが持続炎症や肝がん移行に関連すると考えられている。

フラレンは球状の炭素同素体であり、医薬品としての応用を目指した研究を医薬品化学講座では進めてきた。その中で片岡君は修士課程で HCV の非構造タンパクである NS5B を阻害してウイルス複製を抑制するだけでなく、酸化ストレスも抑制して肝がん移行をも停止する可能性のあるフラレン誘導体を創製した。

片岡君は上記研究をさらに発展させるべく NS5B と酸化ストレスの双方を抑制するフラレン誘導体がもう 1 つの HCV 酵素を阻害できれば多標的型 HCV 関連疾患治療薬の有用なリード化合物となると考え、NS3/4A に着目し、これも阻害する新規多標的型 HCV 関連疾患治療薬リードを見出すことを目的とした。多標的型医薬品には多くの長所があり、C 型肝炎治療では複数の薬を併用する必要が無く、耐性克服も期待できる。短所として、複数の作用点に対して化合物をデザインし、活性の強さのバランスを取る必要があるため創薬の難度が高いことが挙げられる。現行の C 型肝炎治療法では複数の NS タンパクを阻害するものはなく、また、酸化ストレスを抑制して肝臓を保護するという視点もない。片岡君の研究は、これらを一つの化合物で達成させる独創的で、かつ挑戦的なものである。

まず、誘導体として位置異性体と光学異性体がなく構造修飾が比較的容易なプロリン型 *cis*-**1a** を選択し NS3/4A とのドッキングシミュレーションを行った。そして阻害活性を有する誘導体を創出するため **1a** のメチン部位に種々の置換基を導入した誘導体 **1b-j** をデザイン、合成した。この際にアゾメチンイリドの安定性に着目し、*cis* 体を優先的に生成する反応を *trans* 体優先へと転換した反応も開発している。

NS3/4A 阻害活性を測定したプロリン型誘導体の IC₅₀ は概ね 1 μM 以下であり、誘導体 **1a-j** についてほぼ差はなかった。NS5B は酵素の精製から行い、阻害活性を測定したがプロリン型誘導体の IC₅₀ は 1 μM 以下で、NS3/4A 阻害活性と同等であった。本結果よりプロリン型誘導体は多標的型医薬品の条件を満たすことを明らかにした。共同研究先で得られた細胞内 HCV 複製に対する効果では *cis*-**1j** が最も有効であった。細胞アッセイの結果は HCV 酵素に対する抑制活性では説明できず、側鎖置換基により細胞内移行性が変化したこと等が考えられた。また、プロリン型フラレン誘導体は有意な細胞毒性を示さなかった。

酸化ストレス抑制活性の指標として、*in vitro*におけるヒドロキシルラジカル消去活性を測定した。多くの誘導体はトコフェロール誘導体であるトロロックスと同等以上の強いヒドロキシルラジカル消去活性を示した。これらは親水性の高い誘導体の活性が高く、極性表面積と中程度の相関を示した。さらに、酸化ストレス抑制効果の指標として、*tert*-ブチルヒドロペルオキシド誘発性細胞死に対する保護効果を測定した。本結果から **1a** のメチン部位への置換基導入は酸化ストレス抑制活性調節に有用な変換であり、最も保護効果の高い **cis-1h** を見出した。

片岡君はプロリン型誘導体のメチン部位に様々な置換基を導入した新規誘導体 **1b-j** を合成した。これら誘導体の NS3/4A ならびに NS5B 阻害活性を測定したところ多標的型医薬品の条件を満たしていることが確認できた。さらにこれらの抗酸化活性を評価し **cis-1h** などを多標的型 HCV 関連疾患治療薬リードとして見出している。

以上、本論文の内容は博士（薬学）の学位に値する業績であると判定した。さらに、申請者の博士論文発表会での発表、試問に対する応答も妥当で、周辺の知識も十分であり、これらに関しても博士（薬学）も学位に十分値するものとする。

提出論文並びに論文発表に対し、2名の副査からは以下のような見解が示された。

木内教授：学位申請者は、自身が見出した C 型肝炎ウイルス(HCV)の NS5B ポリメラーゼ阻害活性と酸化ストレス抑制作用を有するフラレン誘導体を基に、これらの活性に加えて HCV の別の酵素であり既存の抗 HCV 薬の標的となっている NS3/4A に対しても阻害作用を有する多標的型 HCV 関連疾患治療薬リードの創出を目指した。ピロリジン環を有するフラレン誘導体をデザイン・合成し、それらの抗 HCV 活性並びに酸化ストレス抑制活性を検討した結果、二つの酵素をともに阻害し細胞内 HCV 複製に対しても有効であり、細胞レベルで酸化ストレスに対する保護作用も示す化合物を見出した。これらの成果は、薬学領域の発展に寄与するものであり、学位論文並びに審査の段階で示された学位申請者の見識とともに博士の学位を授与するに価するものである。

須貝教授：多岐にわたる化合物を合理的に設計、合成、新規な活性探索に供し、多標的型薬物の研究概念進展に大きく貢献した。特に、それまで cis 体が優先して生成する反応について中間体の安定性等を理論的に考察し、窒素原子に脱保護容易な置換基を導入した新しい化合物で trans 体優先に転じさせ、有用化合物の効率的合成を達成した点が高く評価される。

以上の経緯を踏まえ、博士論文発表会後に行われた薬学研究科委員会の合否判定会議で本研究論文に関する討議が行われ、片岡 裕樹 君提出の学位論文の内容は博士の学位を授与するに値するものであると評価され、学位を授与することが決定した。

論文目録

【主論文に関する原著論文】

H. Kataoka, T. Ohe, K. Takahashi, S. Nakamura, T. Mashino, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2016**, *26*, *19*, 4565-4567.

【参考論文】

なし