

報告番号	甲 乙 第 号	氏 名	片岡 裕樹
<p>主論文題名： 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</p>			
<p>(内容の要旨)</p> <p>[背景と研究目的]</p> <p>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。</p> <p>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注目され、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 <i>in vitro</i> 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。</p> <p>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。さらに酸化ストレスを抑制して肝臓を保護するという視点、二重阻害を含む多標的型医薬品というコンセプトにより、既存の抗 HCV 薬と差別化できると考えた。そこで本研究では既存の抗 HCV 薬の標的となっている NS3/4A に着目し、NS5B と酸化ストレスだけでなく、NS3/4A をも阻害するフラレン誘導体の創製し、新規多標的型 HCV 関連疾患治療薬リードとなる誘導体を見出すことを目的とした。</p> <p>[フラレン誘導体のデザインと合成]</p> <p>まず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 <i>cis-1a</i> と NS3/4A のドッキングシミュレーションを実施したところ、フラレンコアが触媒部位近傍の疎水性ポケットに結合し、キモトリプシン様の触媒部位を形成するヒスチジンとのπ-πスタッキングが認められ、かつ既存の阻害剤が持つアシルスルホンアミド部位と 1a のカルボキシ基が重なることが予想された。これらの結果から <i>cis-1a</i> が NS3/4A を阻害する可能性が考えられたことから、阻害活性の高い誘導体を創出</p>			

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** をデザインした。

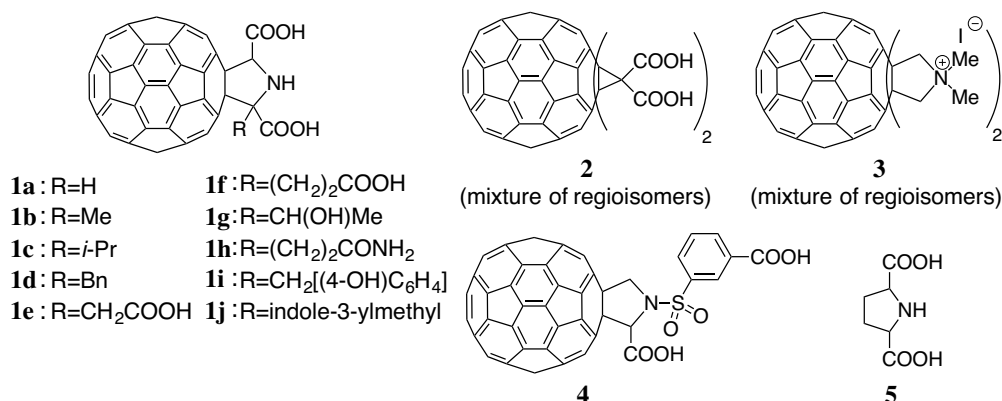


Fig. 研究対象としたフラレン誘導体及び関連化合物

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 L-(+)-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、グリオキシル酸 *tert*-ブチルを得た。次にアミノ酸の *tert*-ブチルエステルとグリオキシル酸 *tert*-ブチル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。1,3-双極子付加環化反応では *cis* 体が優先して生成したが、系中で生成する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 基で保護した二級アミンとグリオキシル酸 *tert*-ブチル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* 体を優先的に得た後、酸で脱保護することで *trans*-**1a**、**1b** を得た。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。誘導体 **1a-j** について構造活性相関が認められないことから、NS3/4A 阻害活性にはば差はないといえる。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。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 NS3/4A と NS5B のいずれも阻害しなかったことから、フラレンコアの必要性が示された。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。細胞内 HCV 複製に対しては *cis*-**1j** が最も有効であった(EC₅₀=0.89 μM)。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。フラレン誘導体(30 μM)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。

[酸化ストレス抑制活性の検討]

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。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。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(TBHP)誘発性細胞死に対する HuH-7 細胞保護効果を測定した。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。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]

本研究では誘導体 **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 関連疾患治療薬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。