

氏名	かたぎし だいき 片岸 大紀
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	博士甲第 号
学位授与の日付	令和5年3月10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	COVID-19 治療薬としてのフラーレン誘導体の開発
論文審査委員	(主査) 教授 熊谷 直哉 (博士(薬学)) (副査) 教授 須貝 威 (農学博士) 教授 花岡 健二郎 (博士(薬学))
慶應義塾大学学位規程第11条に基づく審査委員会実施日：令和5年2月8日	

論文内容の要旨

【背景】

新型コロナウイルス感染症 (Coronavirus disease 2019: COVID-19) は、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: SARS-CoV-2) を原因ウイルスとする急性呼吸器疾患である。2019年12月に中華人民共和国湖北省武漢市で最初の発生が報告されて以来、世界中に感染が拡大しており、2023年2月現在でもパンデミックは終息していない。

COVID-19 治療薬として、SARS-CoV-2 の生活環の様々な点を標的とした抗ウイルス薬の開発が世界中で進められているが、抗ヒト免疫不全ウイルス (HIV) 薬や抗 C 型肝炎ウイルス (HCV) 薬の転用例の報告も多い。中でも SARS-CoV-2 のメインプロテアーゼ (M^{pro}) は、Cys145 と His41 からなる触媒 2 残基を持つシステインプロテアーゼである。この 2 つのアミノ酸は、ウイルスのポリタンパク質から機能性タンパク質への変換過程において、His41 のイミダゾール基が Cys145 のチオール基を活性化することで加水分解反応を促進する重要な役割を担っており、抗ウイルス薬の標的として有望であると考えられている。実際に日本でも M^{pro} を標的とした治療薬が既に承認されている。

一方、フラーレンは、Kroto らにより発見されたサッカーボール型の C₆₀ に代表される第 3 の炭素同素体である。その球状の縮合芳香環構造に由来する酸化還元特性、光依存活性酸素生成能、内包化合物生成能などの特異な物理化学的性質を持ち、様々な分野で応用研究が行われている。創薬分野においても、既存の医薬品にはない新奇の骨格であるフラーレンを医薬品として応用することを目指し、その水溶性の低さを化学的誘導体化により改善した多くの水溶性 C₆₀ 誘導体が合成され、その生物活性が調べられてきた。慶應義塾大学薬学部医薬品化学講座でもこれまでに、様々な C₆₀ 誘導体が、HIV や HCV に対する抗ウイルス活性を有することを明らかにしてきた。

【目的】

抗 HIV 薬や抗 HCV 薬が COVID-19 治療に転用できることが報告されていることから、抗 HIV 活性や抗 HCV 活性を示す C₆₀ 誘導体も、COVID-19 の治療薬候補となる可能性があると考えた。

本研究では、新規に合成した誘導体を含む様々なタイプの置換基を有する C₆₀ 誘導体の COVID-19 治療薬としての応用の可能性を、SARS-CoV-2 M^{pro} に対する阻害作用を指標として検討した。

【新規 C₆₀ 誘導体の合成】

最初に様々なタイプの置換基を有する C₆₀ 誘導体の SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害作用をスクリーニング的に評価した結果、いくつかの C₆₀ 誘導体が阻害作用を示すことが明らかとなった。そこで、さらなる構造展開によりその構造活性相関の探索を行うこととし、新規 C₆₀ 誘導体を合成した。

複素環を有する新規 C₆₀ 誘導体の合成

SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害作用を示した C₆₀ 誘導体の中でも Fig. 1 に示す *cis*-7 (Fig. 1) は、これまで医薬品化学講座において HIV の複製に関わる様々な酵素を阻害することが示され、細胞系でも抗 HIV 活性を示したことから、抗ウイルス薬として有望であると考えられている。そこで、周辺の構造活性相関を探ることを目的とし、他の複素環を導入した **9-11** を新たにデザイン・合成した (Scheme 1, 2)。

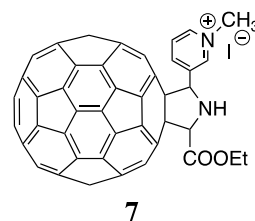
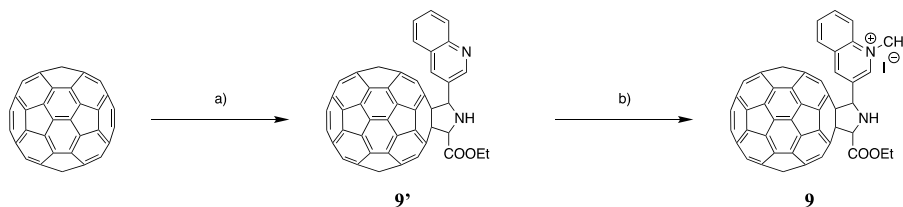
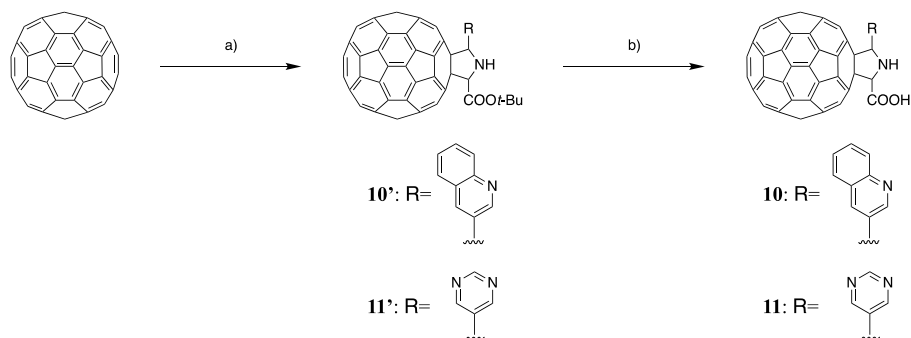


Fig. 1 C₆₀ 誘導体 7

1,3-双極子付加環化反応 (Prato 反応) により C₆₀ 上にピロリジン環を構築した後、**9** は iodomethane によるキノリン環窒素のメチル化、**10, 11** は trifluoromethanesulfonic acid による *tert*-ブチルエステルの脱保護により目的物を得た (Scheme 1, 2)。



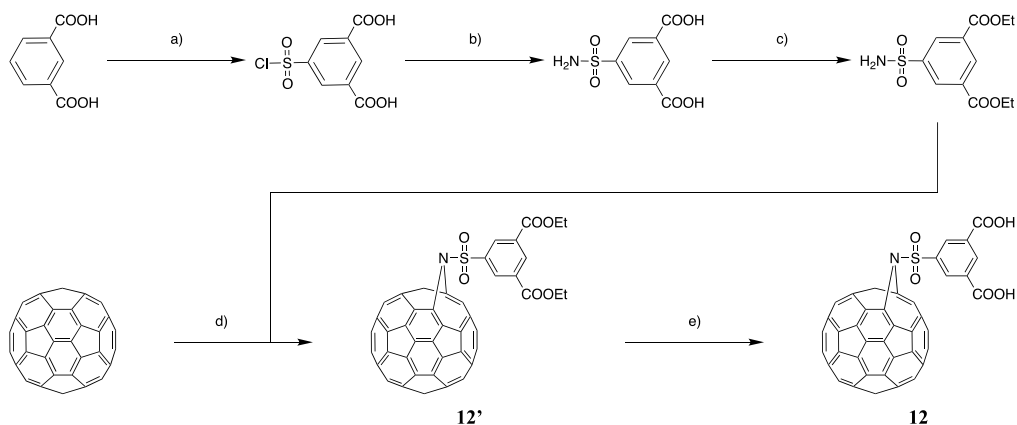
Scheme 1 **9** の合成 a) Quinoline-3-carboxaldehyde, glycine ethyl ester hydrochloride, diisopropylethylamine, toluene, reflux, b) Iodomethane, r.t., dark



Scheme 2 **10**, **11** の合成 a) Corresponding aldehyde, glycine *tert*-butyl ester hydrochloride, diisopropylethylamine, toluene, reflux b) Trifluoromethanesulfonic acid, dry toluene, r.t.

アザフレロイド誘導体の合成

C_{60} の 5 員環と 6 員環の接合部 ([5,6]-結合) の炭素-炭素結合が開裂し窒素で架橋されたアザフレロイドと呼ばれる化合物群は C_{60} 本来の 60π 電子共役系を維持しており、生物活性の点でも興味深い誘導体群であると言える。そこで、スルホンアミド構造を有し水溶性向上のためにカルボキシ基を 2 つ持つアザフレロイド **12** を合成した (Scheme 3)。置換基部分の合成を行った後に、*N*-iodosuccinimide を用いたラジカル反応により C_{60} 上に付加、エチルエステルの脱保護により目的物を得た。



Scheme 3 **12** の合成 a) Chlorosulfuric acid, reflux b) 2 mol/L ammonia methanol solution, r.t. c) Thionyl chloride, dry ethanol, 60 °C d) *N*-iodosuccinimide, *o*-dichlorobenzene, 80 °C e) 1. Sodium hydride, 2. methanol, 3. 2 M HCl, dry toluene, r.t.

【SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害作用の評価】

市販の SARS-CoV-2 M^{pro} 活性測定キットは、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の原理を利用するものである。 C_{60} 誘導体が蛍光を消光する可能性を考慮し、プロテアーゼ

反応により生成したペプチド断片を LC-MS を用いて定量する新たな評価系を新たに確立して、Fig. 2 に示す種々の C₆₀ 誘導体の M^{pro} 阻害作用を評価した。

SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害作用試験

SARS-CoV-2 M^{pro} (100 ng/mL) を含む反応液に NSP4-NSP5 接合部を模した基質ペプチド(50 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 M^{pro} 阻害作用を測定した。ポジティブコントロールには HCV プロテアーゼ阻害薬であり、SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害作用を示すことが報告されているボセプレビルを用いた。

各化合物 1.0 μM 添加時の酵素残存活性を Fig. 3 に示す。

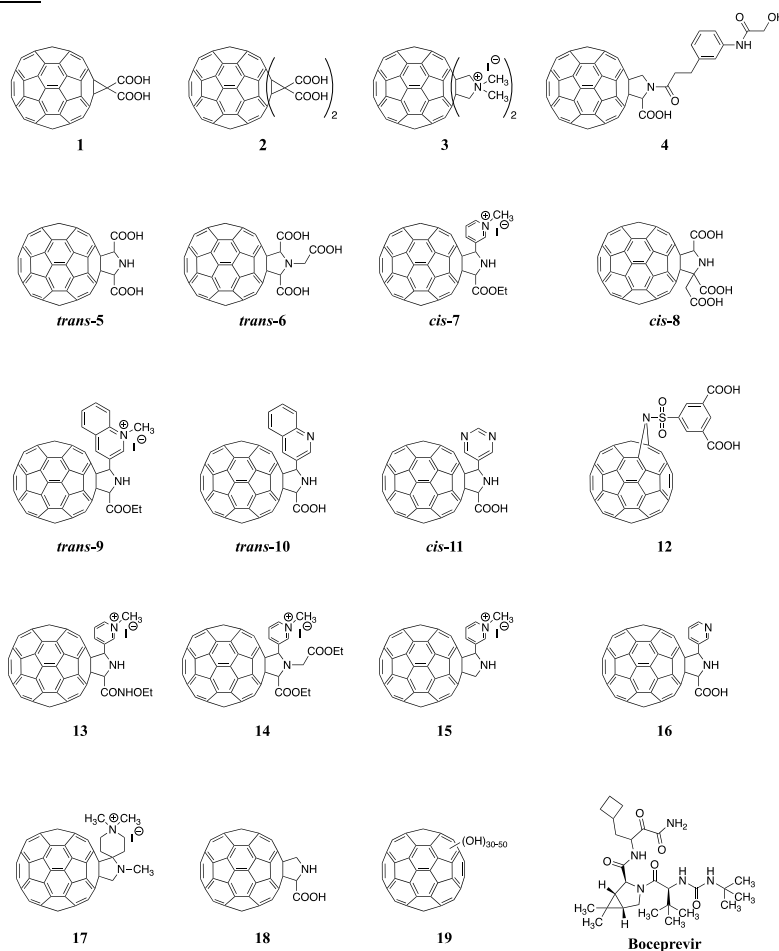


Fig. 2 被験化合物

19 種の誘導体の中でマロン酸型 (1, 2) が特に強い阻害作用を示した。他の数種の誘導体も阻害作用を示し、カルボキシ基の数がその強さに関係している可能性が示唆された。

本研究で新規に合成した複素環導入型 (*trans-9*, *trans-10*, *cis-11*) はそれほど強い阻害作用を示さなかった。一方、アザフレロイド 12 は比較的強い阻害作用を示した。C₆₀ の 60π 電子共役系を維持しているアザフレロイドの生物活性の報告はほとんどないため、本結果は重要な知見と言える。

以上の結果により、様々なフラーレン誘導体が SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害作用を示し、その強さは誘導体により異なることが示された。

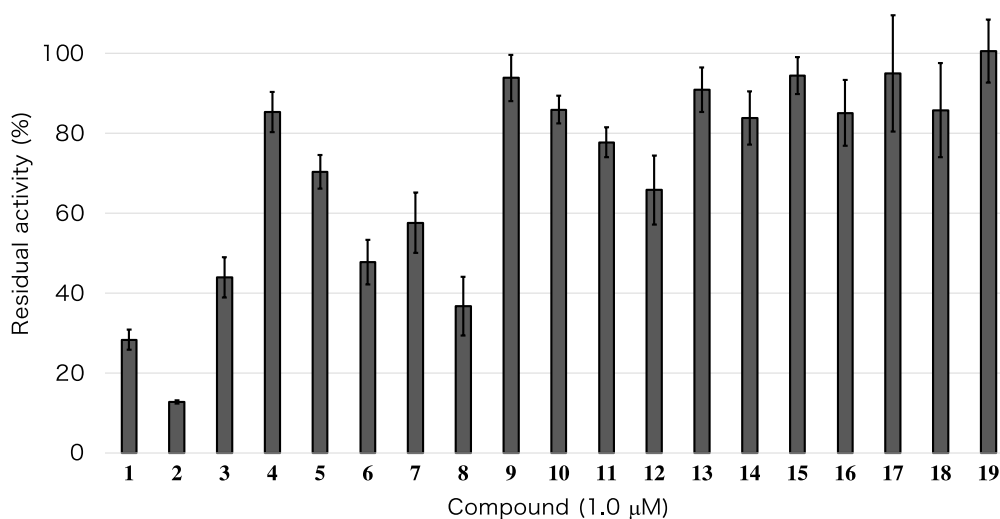


Fig. 3 各化合物 1.0 μM 添加時の SARS-CoV-2 M^{pro} 残存活性

1.0 μM 添加時に阻害作用を示した誘導体に関しては、IC₅₀ 値の算出も行った。

強力な阻害作用を示すマロン酸型誘導体 **1** および **2**、カルボン酸型誘導体 *trans*-**6**、複素環型誘導体 *cis*-**7**、アザフレロイド **12** の IC₅₀ 値は、それぞれ 0.53、0.20、0.98、1.2、1.6 μM であった。ボセプレビルの IC₅₀ 値は 28 μM であり、評価した C₆₀ 誘導体はボセプレビルに比べて強い阻害作用を有することが示された。特にマロン酸型誘導体 **2** は、IC₅₀ 値がボセプレビルより 2 オーダー低い極めて強い阻害作用を示した。

【細胞毒性の評価】

正常細胞モデル細胞として汎用されているマウス胎児線維芽細胞 NIH3T3 細胞を用いて、強い SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害作用を示した **1**、**2**、*trans*-**6**、*cis*-**7**、**12** に関して、細胞毒性を評価した結果、いずれも 30 μM までは細胞毒性を示さないことが確認された。

【立体異性体間における活性の比較】

筆者の修士課程研究において、C₆₀ 誘導体の HIV プロテアーゼや HCV RNA ポリメラーゼに対する阻害作用に立体異性体間で差がある可能性が示された。そこで、SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害作用に関しても、阻害作用が比較的強い **7** を用いて立体異性体間で差があるかを検討することとした。まずは不斉触媒を用いて **7** の立体選択的の合成を行ったが、良好な鏡像体過剰率で目的物を得ることができなかつたため、キラル固定相を有する HPLC を用いて光学分割を行い、得られた 4 種の立体異性体に関して、鏡像体過剰率を算出した。

また、それぞれに関して円偏光二色性 (CD) 分析を行い、指紋領域である 430 nm 付近に観察されたコットン効果の正負から、Martin らにより提唱されたセクタールールに従い絶対配置を決定した (Table 1)。

Table 1 分取した各異性体の鏡像体過剰率と絶対配置

<i>cis/trans</i>	溶出順	鏡像体過剰率 (%)	絶対配置
<i>cis</i>	1	>99	2 <i>S</i> ,5 <i>S</i>
<i>cis</i>	2	94.0	2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>
<i>trans</i>	1	>99	2 <i>S</i> ,5 <i>R</i>
<i>trans</i>	2	95.6	2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>

分取した各立体異性体の DMSO 溶液の濃度を、別途ラセミ体を用いて濃度既知の DMSO 溶液を調製して作成した検量線をもとに算出し、希釈を行い、SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害作用を評価した。その結果、7 の立体異性体間で強さの差はほぼ見られなかった。

【結論】

C₆₀ 誘導体の COVID-19 治療薬としての応用の可能性を、SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害作用を指標として検討するため、評価系を新たに確立し、既存の誘導体に加え、7 の構造をもとに他の複素環を導入した 9-11 および C₆₀ 本来の 60π 電子共役系を維持するアザフレロイド 12 をデザイン・合成し、1-19 の SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害作用を評価した。

マロン酸型 (1, 2) が 19 種の誘導体の中で特に強い阻害作用を示した。他の数種の誘導体も阻害作用を示し、カルボキシル基の数がその強さに関係している可能性が示唆された。本研究で新規に合成した複素環導入型 (9-11) はそれほど強い阻害作用を示さなかった。一方、アザフレロイド 12 は比較的強い阻害作用を示した。60π 電子共役系を維持するアザフレロイドの生物活性の報告はほぼないため、本結果は重要な知見と言える。

また、阻害作用が比較的強い 7 に関して、キラル固定相を有する HPLC による光学分割を行い、M^{pro} 阻害作用を評価したが、立体異性体間で強さの差はほぼ見られなかった。

以上のことから、2 は細胞毒性を示さず、SARS-CoV-2 M^{pro} に対して強い阻害作用を示し、COVID-19 の治療薬候補となる可能性がある。しかし、この化合物は複数の位置異性体の混合物であり、それぞれの異性体を単離し、個別の阻害作用を評価する必要がある。また、C₆₀ 誘導体によって阻害作用の強さに顕著な差があることも明らかとなり、より詳細な構造活性相関を明らかにするためには、さらなる検討が必要である。

論文審査結果の要旨

炭素同素体であるフラーレン (C₆₀) は 60 個の炭素原子から構成されるサッカーボール型の炭素クラスターである。一般の平面状の縮合芳香環とは異なり球状で端がない構造的特徴を有するため、電子デバイス、化粧品など広範な分野において産業化が進んでいる。創薬化学の観点からは、空間的に広がりを持つ脂溶性スペースの確保や 3 次元的に固定された置換基の配置を可能にするという点で有機物質としては唯一無二の骨格であり、これを母核とした画期的な医薬品の創製を目指した研究も行われている。申請者の片岸大紀君が所属していた医薬品化学講座では、これまでに高脂溶性の C₆₀ に置換基を導入することでさまざまな水溶性誘導体を合成し、それらが HIV や HCV に対する抗ウイルス活性を有することを明らかにしてきた。

一方、COVID-19 は 2019 年 12 月に最初の発生が報告されて以来、世界中に感染が拡大し、現在でも公衆衛生上の大きな課題である。その治療薬開発は全世界で進められているが、今後ウイルスの変異により薬剤耐性が生じる可能性等もあり、既存の治療薬とは異なるタイプの新たな治療薬の創製は極めて重要と考えられる。申請者の博士研究が開始された 2020 年当初、抗 HIV 薬や抗 HCV 薬の COVID-19 治療への転用が進められていた状況もあり、HIV や HCV に対する抗ウイルス活性を有する C₆₀ 誘導体は、COVID-19 の治療薬候補となる可能性があると考え、申請者は本研究に取り組んだ。

最初に、新規 C₆₀ 誘導体として、C₆₀ 本来の 60 π 電子共役系を維持し生物活性の点でも興味深いアザフレロイドを含む 4 化合物を合成した。次に、LC-MS を用いた SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害作用の評価系を新たに確立した。その後、上述の新規誘導体を含むさまざまなタイプの C₆₀ 誘導体の活性評価を行った結果、マロン酸型誘導体が特に強い活性を示し、その IC₅₀ はポジティブコントロールとして用いたボセプレビルの 100 分の 1 以下だった。他の数種の誘導体も活性を示し、カルボキシ基の数が活性に関係している可能性が示唆された。また、強い SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害作用を示した誘導体に関しては、正常細胞を用いて細胞毒性を評価した結果、いずれの誘導体も細胞毒性を示さないことが確認され、COVID-19 の治療薬候補となる可能性があると考えられる。

さらに、活性が比較的強く不斉中心を持つ誘導体を用いて、立体異性体間で SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害作用に差があるかを検討した。まず、不斉触媒を用いて立体選択的合成を行ったが、良好な鏡像体過剰率で目的物を得ることができなかつたため、キラル固定相を有する HPLC により光学分割を行った。分割した各立体異性体に関して SARS-CoV-2 M^{pro} 阻害作用を評価した結果、活性の差はほぼ見られなかつた。

以上の研究内容をまとめた博士論文を提出後、博士学位審査委員会 (2023 年 2 月 8 日 15:00~16:30) を開催し、副査 2 名に対して発表を行った。発表後の質疑応答の場では、発表や論文の内容についての指摘ならびに改善に関する指導が行われた。

審査委員会において、副査の須貝威教授より、主論文に対する原著論文の申請者の

貢献度を問われ、片岸君は、化合物の合成から活性評価に至るまですべての実験を自ら行った旨を説明した。研究内容に関しては、まず絶対配置を決める Martín らのセクターールの信頼性を質問された。これに対し、片岸君は、C₆₀ 誘導体の結晶化は極めて難しいため X 線構造解析の例は少なく、1 つの X 線構造解析のデータから構築されたセクターールに対する検証は十分ではないことを認めつつ、現時点ではこれ以外の方法がないことを説明した。次に、合成した誘導体は茶色のことが多く、この色は不純物由来ではないかという指摘があった。片岸君は、一般的に C₆₀ 誘導体は高波長側に吸収を持つ色を呈する化合物であること、また立体異性体の検討をした誘導体を含めいくつかの誘導体については HPLC にて純度の確認をしていることを回答した。また、「阻害作用が強かったマロン酸型は昔からある誘導体であるが、収率良く簡単に作れるのか。問題点はないのか。」という質問がされた。その質問に対し、「阻害が最も強かったビスマロン酸型誘導体は収率 30%前後で比較的容易に合成できる一方で、複数の位置異性体の存在により単一の化合物に精製するのが難しい。」との見解を示し、この置換位置の制御ができればより強い誘導体の創製に繋がる可能性に言及した。次に、「発表中に示されたドッキングシミュレーションでは、C₆₀ はどのアミノ酸と相互作用していると考えられるか」という質問があった。片岸君はシミュレーションの図を示しつつ、主に His 残基が C₆₀ と相互作用していることを回答した。最後に、立体異性体間で活性の差がなかったことは決してネガティブなことではなく、立体配置に依存しない阻害作用という観点からは創薬研究にとってポジティブな面もあるのではないかというコメントを頂いた。その他の口頭試問にも概ね的確な応答がなされた。

花岡健二郎教授からは、まず、全体的に見て、創薬化学の観点からは検討すべき項目として不十分なところもあるが、フラーレンの化学としては興味深く、また医薬品を目指す意味で立体配置をしっかりと決める試みは評価できるというコメントを頂いた。その後、新規の誘導体を複数合成している一方で、合成の手法として新しいものはないのかとの質問があった。これに対し片岸君は、基本的に既存の方法に倣って合成したが、後半の立体選択的合成については、成功には至らなかったものの C₆₀ 誘導体の立体配置の制御を目指した、C₆₀ 誘導体合成の分野にとっては新規性が高い試みだったという認識を示した。次に、「C₆₀ 誘導体の不斉合成は面白い。C₆₀ 誘導体は創薬化学だけでなく材料化学としての利用の可能性も考えられるので、この辺の検討をもう少し行っても良かったのではないか。金属や配位子も含め条件検討を行ったのか。」と質問された。片岸君は「Martín らの報告を参考にいろいろ行ったが満足する鏡像体過剰率をもつ誘導体を得ることはできなかった。触媒などの組み合わせの検討は今後行っていきたい。」と回答した。次に、カルボキシ基の数のみで活性が強くなること、C₆₀ 骨格に特徴的な広い脂溶性領域、立体異性体間で活性の差がほとんど見られなかった今回の結果などを考えると、非特異的にタンパク質に結合して阻害作用を示している可能性もあるのではという指摘があった。これに対しては、これまでの先行研究にお

いて、1つの酵素に対し阻害を示す誘導体もあれば全く阻害しない誘導体もあること、また、ある誘導体について注目しても阻害する酵素と阻害しない酵素があることなどを鑑みると、置換基部分も各酵素の結合に関与しており、C₆₀ 誘導体と酵素は非特異的に結合しているのではないという見解を示した。また、「今回 C₆₀ 誘導体は細胞毒性を示さなかったが、これは単に膜透過性が悪く細胞内に入らなかっただけではないか。」という質問に対しては、先行研究で細胞を使った評価でも生物活性を示したこと、今回の細胞毒性試験においても細胞が誘導体由来の茶色に染色されていたことが顕微鏡で観察されたことなどを挙げ、細胞内に移行している可能性が高いことを説明した。その他合成過程の反応機構や 60π 系に関する質問などがされたが、スライドを用い概ね的確な応答がなされた。

審査委員会後、主査および副査の間で本研究論文に関する討議が行われ、提出論文および発表内容に対して副査2名からは以下の見解が示された。

須貝威教授: 博士論文の前半部分に関してはすでに学術論文として公刊されており、その筆頭著者である申請者の貢献を確認できた。化合物の合成から活性評価に至るまで、全てを申請者が実施したことは明らかである。後半部分の立体異性体の検討についてはまだ投稿論文としてまとめられていないが、立体異性体を選択的に合成しようとする新しい取り組みや立体配置の決定に向けたさまざまな努力は評価できる。また、事前に博士論文に対するコメントや修正箇所の指摘を行ったが、それに対応した発表内容となっていた。以上より、当該博士論文は学位授与に値すると考える。

花岡健二郎教授: フラーレンの化学として非常に興味深く、自らアッセイ系を立ち上げ実際に活性のある化合物を見出した点において、メディシナルケミストリーの観点からも、本研究は博士の学位に値する研究と評価できる。

また、提出された論文に対する両副査からのコメントにも適切に修正がなされたことを主査が確認した。

さらに、申請者は、2023年2月21日に実施された公聴会において、ドッキングシミュレーションでの議論の必要性、評価系で使用した基質ペプチドの濃度などアッセイ条件の妥当性、酵素に対する IC₅₀ と細胞毒性における CC₅₀ を用いた safety margin の妥当性、CD スペクトルを使った絶対立体配置推定の妥当性、新規化合物のデザインの意図、covalent drug の可能性、本研究における 60π電子共役系の重要性などに関する質問を受けたが、概ね適切な回答を行った。

以上の経緯を踏まえ、片岸大紀君提出の学位論文の内容は博士（薬科学）の学位に値するものであると評価された。

論文目録

Daiiki Katagishi, Daisuke Yasuda, Kyoko Takahashi, Shigeo Nakamura, Tadahiko Mashino, Tomoyuki Ohe, Fullerene derivatives as inhibitors of the SARS-CoV-2 main protease, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2023**, 80, 129121.