

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08028

研究課題名(和文) 新規ヌクレオシド誘導体の開発を基盤とした核酸医薬研究の展開

研究課題名(英文) Development of Nucleic Acid Medicines Based on Synthetic Study of Novel Nucleoside Derivatives

研究代表者

吉村 祐一 (YOSHIMURA, Yuichi)

東北医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00230813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヌクレアーゼに対する抵抗性と二重鎖の安定性に優れた核酸医薬の開発を目指し、新規ヌクレオシド誘導体のデザインと合成を検討した。標的分子として、1) 3'-デオキシ-4'-チオヌクレオシド、2) 4'-ヒドロキシメチル-4'-チオヌクレオシド誘導体、3) 4'-ヒドロキシメチルスタブジン誘導体の3種について合成を検討した。

研究成果の概要(英文)：To develop nucleic acid medicines resistant to nuclease with good duplex stability, three new nucleoside derivatives to be used as a synthetic unit for oligonucleotides were designed and synthesized.

研究分野：医薬品化学

キーワード：ヌクレオシド オリゴヌクレオチド 抗HIV薬

1. 研究開始当初の背景

抗体医薬が、医薬品市場で大きな売り上げを記録するブロックバスターとなっているのに比べ、核酸医薬は、臨床での承認例が数例存在するのみである。このことは、核酸医薬に次世代の治療薬として大きな期待が寄せられている一方で、克服すべき多くの課題が残されていることを如実に表している。その際、しばしば議論の対象となるのが、1) ターゲット DNA や RNA への特異的結合と二重鎖の形成、2) オフターゲット効果の抑制、3) ヌクレアーゼなどの核酸代謝酵素に対する抵抗性の獲得、4) 核酸医薬の組織・細胞移行性の改善、5) インターフェロン応答による自然免疫活性化の回避などである。これらの問題解決策のひとつとして、修飾ヌクレオチドを含む核酸医薬の利用がある。このような修飾ヌクレオチドユニットの導入は、核酸医薬の安定性で大きな障害となる、血液中のヌクレアーゼによる鎖切断に対する抵抗性の獲得について特に有効と考えられる。実際、アプタマー医薬であるマクジェン[®]の分子中には 2'位にフッ素や 2'-O-メチル基で修飾されたヌクレオチドユニットが含まれている。また、糖部以外にもリン酸残基をホスホロチオエートとした誘導体や、2'-O-メトキシエチル基で修飾したヌクレオシド誘導体などが、古くからアンチセンスオリゴヌクレオチドで利用されている。

一方で、ヌクレオシド誘導体は、これまで抗腫瘍剤や抗ウイルス剤の開発にとって格好の標的分子であった。医薬品承認例も数多く存在し、臨床でも幅広く利用されるが、これに伴った深刻な問題も存在する。例えば、後者の抗ウイルス剤については、抗 HIV 薬に対する耐性株の拡大がこれに該当する。このように、低分子医薬品としてのヌクレオシド誘導体についても、その医薬品ニーズは現在の創薬研究において高い緊急性を要するものとなっている。

2. 研究の目的

本研究では、第一に、一本鎖でも十分なヌクレアーゼ抵抗性を有し、DNA・RNA に対し安定な二重鎖形成能を有するオリゴヌクレオチドの開発を目的とした。このような目的を達するために、オリゴヌクレオチドの構成単位であるヌクレオチドユニットについて、掲げた目標に合致した新規ヌクレオシド誘導体のデザインと合成が必要となる。そこでデザインにあたっては、ヌクレオシド糖部のコンホメーションに注目し、高分子中でのコンホメーションフィッティングを重視し分子設計を行った。また前述のように、ヌクレオシド誘導体は抗腫瘍剤や抗ウイルス剤の開発にとって重要な標的分子となっている。特に緊急性が高いのが、抗ウイルス剤である。抗 HIV 薬に対する耐性株の拡大、エボラ出血熱の感染拡大、高毒性インフルエンザウイルスによるパンデミックリスクの拡

大等からもその重要性は明らかである。そこで、上記の核酸医薬用ヌクレオシド誘導体の開発に加え、第2の目標として、新規ヌクレオシド系抗ウイルス剤の開発にも展開可能な誘導体のデザインを行いその合成を検討することとした。

3. 研究の方法

当研究室では、これまで主に抗腫瘍性・抗ウイルス性ヌクレオシドの創製を目的に合成研究を展開して来たが、その過程で高い抗腫瘍活性を有する誘導体 4'-thioFAC **1** の開発に成功している (*J. Org. Chem.* **1998**, *63*, 6891; *Oncol. Report* **2002**, *9*, 1319)。また、同誘導体の類縁体の多くは、強力な抗ヘルペスウイルス活性を有することも報告している (*J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 2177; *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *8*, 1545)。前項に記載した2つの目的を同時に達成するためには、ヌクレオシド系代謝拮抗剤候補となるばかりでなく、通常のリン酸ジエステル結合により高分子化が可能な誘導体設計が必要になる。そこで天然物でもあるコルジセピン(**2**)に注目した。コルジセピン(**2**)は 3'-デオキシアデノシンに相当し、抗腫瘍作用や抗ウイルス作用を有することが知られている。その作用機構については、他のヌクレオシド誘導体同様に複製阻害や RNA 合成阻害が考えられている。前述の当研究室での成果中に抗腫瘍性及び抗ウイルス性 4'-チオヌクレオシド類の開発があり、この知見を元に 3'-デオキシ-4'-チオヌクレオシド **3** をデザインし、その合成を検討することとした。同誘導体には、コルジセピン同様、抗ウイルス効果などの生物活性が期待されるばかりでなく、チオフラノース環上に1級水酸基と2級水酸基を有することから通常のデオキシヌクレオシドと同じくアミダイト法によるオリゴマー合成も可能である。

一方、核酸医薬に最適化したヌクレオシド誘導体であるが、DNA・RNA に対し安定な二重鎖を形成するように、高分子を構成するヌクレオチドユニットレベルでの制御が必要となる。小比賀らによって開発された、ヌクレオシドの 2'-4' 位間をメチレン架橋で固定した LNA/BNA は、架橋構造の導入によりその糖部コンホメーションが、RNA 中でヌクレオシド糖部がとる N 型配座に固定化されている。この結果、同ヌクレオシドユニットを含むオリゴヌクレオチドはより安定な A 型構造を有し、RNA と極めて安定な二重鎖を形成することが明らかとなっている (*Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 5401)。この架橋ヌクレオシドの導入はヌクレアーゼ抵抗性も示すことから、核酸医薬をデザインする上で効果的な戦略といえる。一方、南川らは 2'位を修飾した 4'-チオヌクレオシドを構成ユニットとしたオリゴヌクレオチドがアンチ miRNA 分子として機能することを報告している (*Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*,

5292)。このような背景から、第2の標的ヌクレオシド誘導体として4'-チオLNA/BNAヌクレオシドユニットの前駆体となる4'-ヒドロキシメチル-4'-チオヌクレオシド**4**の合成を検討する。さらにオリゴマー化が可能な誘導体として4'-ヒドロキシメチルスタブジン**5**についても検討を行う。同誘導体については、ラセミ体ではあるが新規合成法の開発に既に成功している(未発表データ)。4'-ヒドロキシメチルスタブジン**5**は、前述の核酸医薬ターゲットとは異なり、構造的な自由度が大きく、二重鎖安定性の観点からは不利に働くことが予想される。その一方で、その構造の自由度の大きさからRNAのみならず、アプタマー等の様々な形態の核酸医薬への応用も考えられ、さらにはヌクレアーゼ抵抗性についても十分に期待できることから、**5**の光学活性体の合成について検討を行うこととした(Fig. 1)。

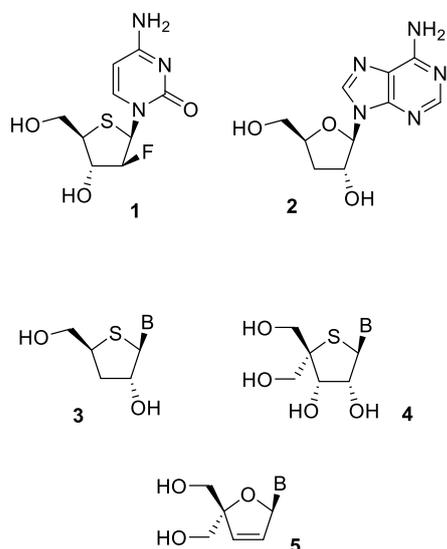
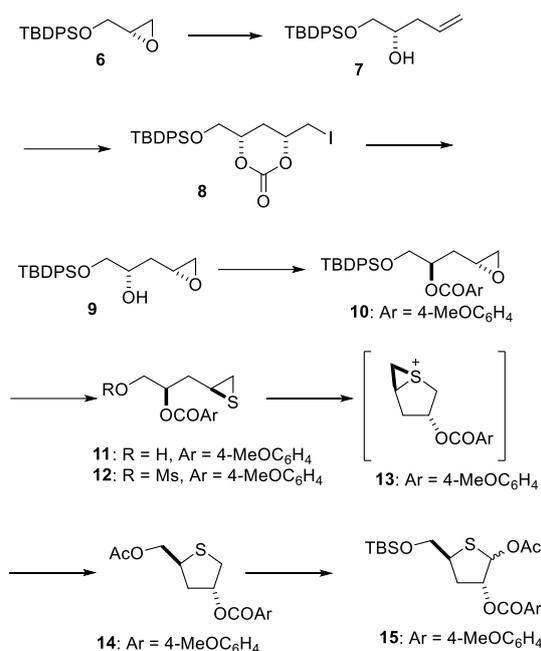


Fig. 1

4. 研究成果

1) 3'-デオキシ-4'-チオヌクレオシドの合成

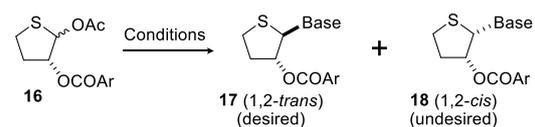
新規抗ウイルス性ヌクレオシドとしてデザインした3'-デオキシ-4'-チオヌクレオシドについてラセミ体での合成を検討した。アリルアルコールから文献記載の方法に従いエポキシ体**6**を合成し、光延反応、チオエポキシ化を含む数工程の官能基変換を行い、環化前駆体であるメシラート**12**を合成した。得られたメシラートに対し、DMF中、フッ化セシウム存在下、酢酸との反応を行ったところ、チオエポキシド部のメシラートへの分子内求核攻撃を経由した環化反応により3'-デオキシ-4'-チオフラノース誘導体**14**を得た。同誘導体に対しPummerer転位を行いグリコシル化反応の基質となる1-アセトキシ-3'-デオキシ-4'-チオリボース誘導体**15**を合成した(Scheme 1)。



Scheme 1

以前の研究では、同誘導体に対するVorbrüggen法によるグリコシル化反応の立体選択性(α/β 選択性)が低く、望みとする β 体が高収率で得られないこと、および、 α 体と β 体の分離が困難であることが課題であった。この課題を克服すべく1-アセトキシ-3'-デオキシ-4'-チオリボース誘導体**15**のグリコシル化反応を検討する前に、市販のテトラヒドロチオフェン-3-オンから容易に調整可能なモデル基質**16**を使用して、グリコシル化反応の検討を行った(Table 1)。

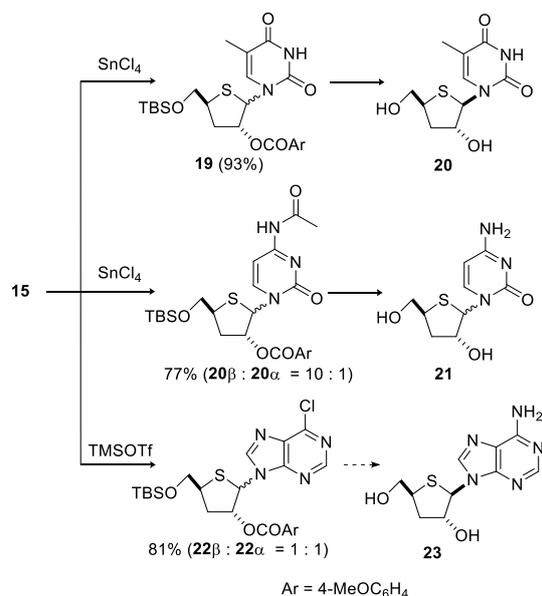
Table 1



Entry	Base	Conditions	Yield (%)	17 : 18
1		O,O'-bis(TMS)thymine SnCl ₄ CH ₂ Cl ₂ , r.t., 48 h	61	99 : 1
2		N ⁴ -Acetylcytosine (NH ₄) ₂ SO ₄ , HMDS SnCl ₄ CH ₂ Cl ₂ , r.t., 4 h	93	6.7 : 1
3		6-Chloropurine, BSA TMSOTf Toluene, 95 °C, 15 h	86	2.5 : 1
4		2,6-Dichloropurine, BSA TMSOTf (0.5 eq.) Toluene, 95 °C, 15 h	82	2.9 : 1

初めにチミンについて、モデル基質を用いたグリコシル化を検討した。Lewis酸として塩化スズ(IV)を用いたVorbrüggen法を試みたところ、高い立体選択性で化合物**17**を得ることができた(Table 1, entry 1)。次に、N⁴-

アセチルシトシンを用いた場合でも、塩化スズ(IV)を用いた反応により高い立体選択性で目的化合物を得ることができた (Table 1, entry 2)。プリン塩基については、塩化スズ(IV)を用いた反応では目的物 **17** を得ることができなかったが、TMSOTf による反応で収率良く目的物を得ることが出来た。しかし、6-クロロプリン、2,6-ジクロロプリン共に立体選択性に課題を残す結果となった (Table 1, entry 3,4)。



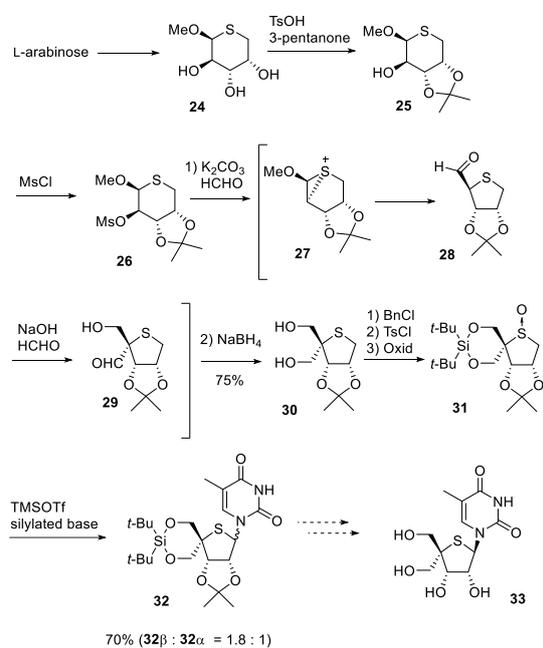
Scheme 2

さらに、実際の基質である 1-アセトキシ-3-デオキシ-4-チオリボース誘導体 **15** との反応でも、塩化スズ(IV)とシリル化したチミンを用い、同様の条件でグリコシル化反応を行うことで、目的とする β 体 **19** が立体選択的に得られることを確認した。得られた生成物 **19** の保護基の除去を経て、3'-デオキシ-4'-チオリボシルチミン (**20**) の立体選択的合成を達成した。同様にシチジン誘導体 **21** の合成にも成功した。アデノシン誘導体 **23** については、現在、その合成を検討中である (Scheme 2)。

2) 4'-ヒドロキシメチル 4'-チオヌクレオシドの合成

新規核酸医薬合成用のヌクレオシドユニットの合成前駆体として 4'-ヒドロキシメチル 4'-チオヌクレオシドを設定し、その合成を検討した。既に当研究室では、4-チオリボース誘導体の合成法の開発に成功しているが、この鍵段階の一つであるチオピラノースの還元的縮環反応の改良により、4'-置換 4'-チオヌクレオシドの糖部となる 4'-置換 4'-チオフラノースの合成を目指す。L-アラビノースを出発原料とし、当研究室で開発した方法により、5-チオピラノース誘導体 **25** を得た。同誘導体の 2 位をメシル化後、還元的縮環反応では、還元剤である水素化ホウ素ナトリウム

を使用するが、これをホルムアルデヒドに変更し、縮環と連続したアルドール反応により 1 行程でヒドロキシメチル基の導入を行うことを検討した。前述の 2-O-メシル-チオピラノース誘導体 **26** に対して、塩基と 37%ホルムアルデヒド水溶液を使用した連続的縮環-アルドール反応を試みた結果、4 位にジヒドロキシメチル基、または、ホルミル基をもつ 4-チオフラノース誘導体と考えられる化合物が得られた。そこで、粗生成物を還元剤で処理し、4-ヒドロキシメチル-4-チオフラノース誘導体 **30** として得ることができた。しかし、本反応には再現性に問題があったことから、反応に使用する塩基および還元剤について詳細に検討を行った。最終的には、目的の 4-チオフラノース誘導体を最高 75%の収率で得ることができ、グラムスケールでの反応でも再現性良く目的物を得ることが可能であった。



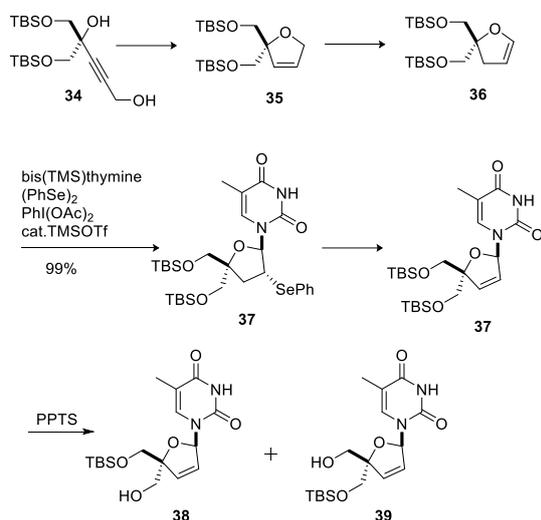
Scheme 3

続いて、得られた **3** のジオール部を (t-Bu)₂Si 基を用いて保護し、さらに酸化により Pummerer 型チオグリコシル化反応の基質となるスルホキシド **31** を合成した。得られた **31** を Pummerer 型チオグリコシル化反応に付したところ、目的とする 4'-チオヌクレオシド誘導体 **32** を 70%の収率 ($\beta : \alpha = 1.8 : 1$) で得ることが出来た (Scheme 3)。

3) 4'-ヒドロキシメチルスタブジンの合成

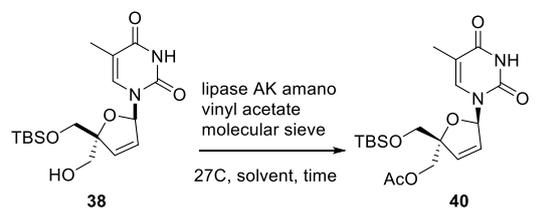
HIV に対する抗ウイルス剤として Zidovudine (AZT), Stavudine (d4T) が見出されて以来、ヌクレオシド誘導体は抗 HIV 薬開発の重要な標的化合物となっている。近年、4'-エチニルスタブジンに抗 HIV 活性が見出されたことから、4'-置換スタブジン誘導体の構造活性相関は特に興味を持たれる研究課題となっている。また、研究方法のここ

ろでも述べたように、4'-ヒドロキシメチルスタブジン誘導体は核酸医薬合成ユニットとしての期待もある。このように研究目的で述べた抗ウイルス剤探索と核酸医薬合成の双方へ展開できる化合物として4'-ヒドロキシメチルスタブジン誘導体を設定し、その光学活性体の合成を検討した。同誘導体については、既にラセミ体での合成法を確立しており、これに従い合成を行った。プロパルギルアルコール誘導体 **34** に対し、Lindlar 触媒による cis 還元、光延反応によるジヒドロフラン環の構築を行い、ジヒドロフラン **35** を得た。さらに二重結合の異性化を行うことによりグリカル誘導体 **36** を合成した。グリカル誘導体 **36** に対し bis (TMS) thymine を用いて、当研究室で開発した酸化的グリコシル化反応を行い、チミジン誘導体 **37** を定量的に得ることが出来た。引き続き **37** に対し MeOH 中 PPTS を作用させ、一方の TBS 基が脱保護された **38** と異性体 **39** へと導いた (Scheme 4)。



Scheme 4

Table 2



entry	solvent	time	40(%)	40(%ee)	38(%)
1	MTBE	2 days	49	78	50
2	MTBE	27 h	39	86	50
3	THF	66 h	43	90	55
4	CPME	2 days	51	86	48

得られた **38** について Lipase 触媒による光学分割の検討を行った。始めに各種リパーゼのスクリーニングを行い、Lipase AK amano

を最適酵素と決定した。次に、反応温度と時間を検討した。MTBE 中、27 °C で 39 時間反応させたとこ、**40** が高い収率および良好な選択性で得られた (Table 2, entry 2)。次に、溶媒を THF に変更したところ、反応の進行が若干遅いものの、高い収率および光学収率で **40** を得ることが出来た (Table 2, entry 3)。CPME を用いた場合でも同様に良好な結果であった (Table 2, entry 4)。現在、酵素反応条件のさらなる最適化を検討中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Yoshimura, Y.
Development of a Glycosylation Reaction: a Key to Accessing Structurally Unique Nucleosides Heterocycles, **2017**, *94*, 1625-1651.
- ② Wakamatsu, H.; Nitta, K.; Shoji, N.; Natori, Y.; Saito, Y.; Yoshimura, Y.
Practical Synthesis of 4'-Thioribonucleosides from L-Arabinose via Novel Reductive Ring-contraction Reaction and the Pummerer-type Thioglycosylation *Current Protocols in Nucleic Acids Chemistry*, **2017**, *71*, 1.43.1-1.43.12. doi: 10.1002/cpnc.45.
- ③ Yoshimura, Y.; Saito, Y.; Natori, Y.; Wakamatsu, H.
Synthesis of 4'-Thionucleosides as Antitumor and Antiviral agents *Chem. Pharm. Bull.*, **2018**, *66*, 139-146.

[学会発表] (計 11 件)

- ① スタブジン誘導体の合成研究
伊藤 恭平, 菅野 裕也, 齋藤 華子, 若松 秀章, 名取 良浩, 齋藤 有香子, 吉村 祐一
第 54 回日本薬学会東北支部大会, 盛岡, 2015 年 9 月 26 日
- ② 4'位に硫黄が置換した 3'-デオキシヌクレオシドの合成研究
安達 桃子, 伊藤 文, 名取 良浩, 若松 秀章, 吉村 祐一
第 54 回日本薬学会東北支部大会, 盛岡, 2015 年 9 月 26 日
- ③ 2'-5'連結型環状ジヌクレオチドの合成研究

- | | |
|--|--|
| <p>若生 有未, 名取 良浩, 若松 秀章,
<u>吉村 祐二</u>
日本薬学会第 136 年会, 横浜, 2016 年
3 月 26~29 日</p> | <p>安達桃子, 若松秀章, 伊藤 文, 齋藤有
香子, 名取良浩, <u>吉村祐二</u>
平成 29 年度 東北医科薬科大学 創薬研
究センターシンポジウム, 仙台, 2017
年 6 月 17 日</p> |
| <p>④ 超原子価ヨウ素とジフェニルジセレニ
ドを用いた分子内エーテル環化反応
須玉 夏海, 齋藤 有香子, 名取 良浩,
<u>吉村 祐二</u>
日本薬学会第 136 年会, 横浜, 2016 年
3 月 26~29 日</p> | <p>[図書] (計 1 件)</p> <p>中分子創薬に資するペプチド・核酸・糖鎖の
合成技術
千葉一裕 (監修)
シーエムシー出版, 2018 年 2 月, P.1-371
若松秀章, 名取良浩, 齋藤有香子, 吉村祐一
(分担執筆)
新規グリコシル化反応の開発
—Pummerer 型チオグリコシル化反応の開発
と展開— P.181-188.</p> |
| <p>⑤ 3'-デオキシ-4'-チオヌクレオシドの立体
選択的合成
安達 桃子, 伊藤 文, 名取 良浩, 若
松 秀章, <u>吉村 祐二</u>
平成 28 年度 東北医科薬科大学 創薬研
究センターシンポジウム, 仙台, 2016
年 6 月 18 日</p> | <p>[産業財産権]</p> <p>○出願状況 (計 0 件)</p> <p>○取得状況 (計 0 件)</p> |
| <p>⑥ スタブジン誘導体の合成研究
伊藤 恭平, 菅野 裕也, 齋藤 華子,
若松 秀章, 名取 良浩, 齋藤 有香子,
<u>吉村 祐二</u>
平成 28 年度 東北医科薬科大学 創薬研
究センターシンポジウム, 仙台, 2016
年 6 月 18 日</p> | <p>[その他]</p> <p>なし</p> |
| <p>⑦ 4'-置換スタブジンの合成研究
伊藤 恭平, 菅野 裕也, 齋藤 華子,
若松 秀章, 名取 良浩, 齋藤 有香子,
<u>吉村 祐二</u>
第 33 回有機合成セミナー, 2016 年 9 月
6~8 日, 北海道ニセコ町</p> | <p>6. 研究組織</p> <p>(1) 研究代表者</p> <p>吉村 祐一 (YOSHIMURA, Yuichi)
東北医科薬科大学・薬学部・教授
研究者番号: 00230813</p> |
| <p>⑧ 立体選択的な 3'-デオキシ-4'-チオヌクレ
オシド誘導体の合成
安達 桃子, 伊藤 文, 名取 良浩, 若
松 秀章, <u>吉村 祐二</u>
第 33 回有機合成セミナー, 2016 年 9 月
6~8 日, 北海道ニセコ町</p> | <p>(2) 研究分担者</p> <p>なし</p> |
| <p>⑨ 4'-フルオロメチルスタブジンの合成研
究
伊藤 恭平, 名取 良浩, 菅野 裕也,
齋藤 華子, 若松 秀章, 齋藤 有香子,
<u>吉村 祐二</u>
第 34 回メディシナルケミストリーシン
ポジウム, 茨城つくば, 2016 年 11 月
30 日~12 月 2 日</p> | <p>(3) 連携研究者</p> <p>なし</p> |
| <p>⑩ 2'-5'結合を有する環状ジヌクレオチドの
合成研究
若生 有未, 名取 良浩, 若松 秀章,
<u>吉村 祐二</u>
日本薬学会第 137 年会, 仙台, 2017 年
3 月 24~27 日</p> | <p>(4) 研究協力者</p> <p>なし</p> |
| <p>⑪ 3'-デオキシ-4'-チオヌクレオシド誘導体
の合成</p> | |