

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16553

研究課題名(和文) 原虫感染症治療薬を目指した鍵化合物BNTXの作用機序解明、及び、構造活性相関研究

研究課題名(英文) Elucidation of an action mechanism of BNTX toward anti-protozoan drugs and its structure activity relationship

研究代表者

沓村 憲樹 (KUTSUMURA, Noriki)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・准教授

研究者番号：00439241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は過去に、オピオイド受容体(DOR)拮抗薬BNTXが、熱帯熱マラリアに対し強力なクロロキン耐性解除活性を示す事を見出した。このBNTXの活性発現機序を解明し、より効果的なリード化合物を開発する為、改良したKnoevenagelタイプの合成法によって約30個のBNTX誘導体を効率的に合成した。マラリア研究の1次スクリーニングとして抗トリコモナス活性試験を採用し検討した結果、それらは全て20～80μMのMICで抗トリコモナス活性を示した。また、オピオイド受容体結合試験の結果、それらの化合物はオピオイド受容体と高い親和性を有する事も分かった。また、構造中の二重結合も活性発現には重要であった。

研究成果の概要(英文)：In our past research, opioid receptor (DOR) antagonist BNTX exhibited a potent chloroquine-resistance reversing effect in plasmodium falciparum. In order to elucidate the action mechanism of BNTX and develop more effective lead compound, we synthesized about 30 BNTX derivatives by using improved "the Knoevenagel-type" synthetic method. We adopted antitrichomonal assay against *Trichomonas vaginalis* as a first screening of the malaria research. As a result, all BNTX derivatives showed inhibitory effects toward the growth of *T. vaginalis* with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 20-80 μM. We also examined opioid receptor binding assay for those compounds. The results of the binding assay showed that all compounds possessed relatively higher affinity. In addition, the double bond in the structure of BNTX derivatives was important factor for antitrichomonal activity.

研究分野：有機合成化学

キーワード：構造活性相関 抗トリコモナス活性 オピオイド 原虫感染症治療薬 BNTX 耐性マラリア 耐性解除活性 チオール捕捉能

1. 研究開始当初の背景

マラリアは、ハマダラカ属の蚊によって媒介される原虫感染症であり、WHO の調査報告によれば、毎年2億人以上がマラリアに罹患し、死者は200万人を超えとも言われる。20世紀半ばにはクロロキン(CQ)等の開発と共に制圧の兆しも見えたが、近年登場した薬物耐性マラリアによってまた感染が拡大しつつある。その上、地球の温暖化に伴う蚊の生息域の北上も感染拡大を助長しており、近い将来、2014年に約70年ぶりに国内感染が確認されたデング熱の様に、日本においても薬物耐性マラリアが蔓延する危険性が指摘されている。それ故、この耐性マラリアに対する有効な薬物を開発することは、人類の健康問題において非常に重要な研究課題の一つであると言っても過言では無い。

マラリアの治療方法は種類や重症度によって異なるが、既存のキニン系抗マラリア薬の多くは、酸化ストレスを付与することによって原虫の増殖を抑制する作用機序が支持されている。それに対し原虫自身は、赤血球内で酸化ストレスに耐性のあるリング体に変態することで過度の酸化ストレスから身を守り、更にはグルタチオンのSH基を利用して生体内の活性酸素種(ROS)を還元し、常時酸化ストレスを抑制すると報告されている。つまり、ただ外部から酸化ストレスを与えるだけでは、根本的なマラリア治療は困難である。また、WHOより推奨されているエンドペルオキシド系抗マラリア薬アルテミシニン類を基本とした多剤併用療法も、半減期が短く、再燃が起こりやすいという問題点がある上、これに対する耐性マラリアの出現も近年報告されている。

以上の様なマラリア治療における薬物耐性問題を背景として、我々の研究グループでは主に、薬理的に感染症や免疫抑制に関与することが報告されているオピオイド受容体と相互作用する薬物の中から、マラリア治療の為に新しいリード化合物の探索を始めた。その研究過程で近年、7-ベンジリデンナルトレキソン(BNTX、1、Fig. 1)がCQ耐性マラリアに対して耐性解除活性を示す、すなわち、CQ耐性マラリアに感染したマウスに対してBNTXとCQを併用投与するとマラリア原虫が死滅することを見出した。そしてこの活性発現には、BNTX(1)の持つ δ オピオイド受容体(DOR)拮抗作用と生体内チオール捕捉作用(Michael acceptorの存在)の両方が鍵であるという仮説を報告した。

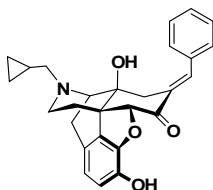


Fig. 1 BNTX (1)

2. 研究の目的

BNTX(1)のCQ耐性マラリアに対する耐性解除活性発現には、DOR拮抗作用と生体内チオール捕捉作用(Michael acceptorの存在)の両方が重要であると仮説を立てたが、これを裏付ける為にはより多くの実験的証拠を積み重ねる必要がある。そこで、1の誘導体および様々な関連化合物を合成し活性評価を行うことで、耐性解除活性についての十分な構造活性相関の知見を得る。そして1の耐性解除活性の機序を解明し、さらにより強力な抗マラリア活性を有するリード化合物の開発へと繋げることを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 効率的な BNTX (1) 誘導体合成法の開発

1の合成法としてはこれまでに、市販のナルトレキソンと種々のベンズアルデヒド誘導体とを水酸化ナトリウム水溶液を塩基として用いたアルドール縮合により合成する方法(Portoghese *et al*)と、反応系内に安息香酸を加えて塩基性を弱めた改良アルドール縮合により合成する方法(Nagase *et al*)が知られていた。しかし、どちらの方法も収率が低い、反応時間がかかる、二量体等の副生成物が多量に生成するといった問題点があった為、様々なサンプルを効率的にアッセイ試験へ供給する為にも新たな合成法を検討する必要があった。そこで、溶媒や塩基等を中心に反応条件の再検討を行い、より効率的な合成法の開発を行った。

(2) マラリア研究を行う上で、適切な1次スクリーニングとして利用できるアッセイ系の検討

当初は当グループの過去の研究報告に従って、CQ耐性マラリアの*in vivo*アッセイ系を利用する計画であった。しかし、活性試験の検体数を稼ぐことを優先する為、マラリア研究を行う上で適切な*in vitro*アッセイ系を選択し、それを1次スクリーニングとして利用することとした。様々な文献を調べ、またその分野の有識者と意見交換も行い、その結果、*in vitro*での抗トリコモナス活性試験を利用することとした。その理由としては、性感染の原因であるトリコモナス原虫の生活環はマラリア原虫とよく似ている部分があり、生体内酸化ストレスに対する防御機構(生体内チオールの利用)を有していることが挙げられる。また、比較的、*in vitro*アッセイを安価で容易に行えることも利点である。

(3) BNTX (1) の誘導体および関連化合物の構造活性相関研究(抗トリコモナス活性試験およびオピオイド各受容体との結合試験)

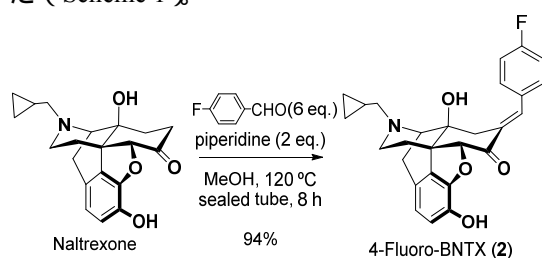
前述の通り、マラリアに対する耐性解除活性の鍵は「DOR拮抗作用」と「SH基捕捉能

を有する Michael acceptor の反応性」にあると考へて本研究に着手した。「SH 基が捕捉される共役二重結合の反応性」については、分子構造から有機化学的にある程度推定できる為、「DOR 拮抗作用」に関係する活性試験、すなわち、 μ 、 δ 、 κ の各種オピオイド受容体との結合試験を慎重に行うこととした。すなわち、まず 1 の誘導体、および関連化合物を合成し、マラリア研究の為の 1 次スクリーニングと位置付けた *in vitro* の抗トリコモナス活性試験を行った。次に、ある程度以上(後述するが、基準として MIC = 40 μ M 以上)の活性を示した化合物については、各種オピオイド受容体との結合試験を行った。また、共役二重結合部分の電子が豊富な誘導体、電子が欠乏した誘導体、さらには二重結合を還元して SH 基捕捉能を低下させた誘導体等についても抗トリコモナス活性試験、オピオイド受容体結合試験の両方を検討した。

4. 研究成果

(1) 効率的な BNTX (1) 誘導体合成法の開発

前述の安息香酸を系内に添加する改良合成法では、電子求引性ベンズアルデヒドが特に低収率になる傾向があった為、4-フルオロベンズアルデヒドとナルトレキソンを用いて反応条件の検討を行った(既存の合成法では 2 の単離収率は 30% 以下)。種々の条件検討の結果、塩基としてピペリジン、溶媒としてメタノールを用いた Knoevenagel 縮合条件で比較的良好な収率で目的物 2 が得られた。さらにシールドチューブを用いて 120 $^{\circ}$ C で加熱することで反応時間の短縮にも成功した (Scheme 1)。



Scheme 1 Improved synthetic method of the BNTX derivatives

本反応はベンズアルデヒド誘導体だけではなく、チオフエン誘導体やフラン誘導体、キノリン誘導体等、様々なアリールアルデヒドに適用することが出来た。本合成法を利用して、約 30 種の BNTX 誘導体を合成した。

また、Michael acceptor の有無が活性に関与するかを確認する為、BNTX (1) を接触水素添加により還元して化合物 3 を合成した。3 は 体のみ得られたが、これは原料である 1 の C 環(シクロヘキサノン環)が疑似イヌ型配座を取っている為、下方に位置するエポキシ環の立体障害を避けるように上方から還元が進行した為と考へている。さらにモルヒナン化合物において 3 位フェノール性水酸基

をブロックすると、オピオイド受容体との親和性が大きく減弱することが知られている。そこで構造活性相関の知見を得る為、オピオイド受容体との親和性を低下させた化合物 4 も合成した。また、SH 基捕捉能とオピオイド受容体との親和性との両方を低下させた化合物 5 も合成した (Fig. 2)。

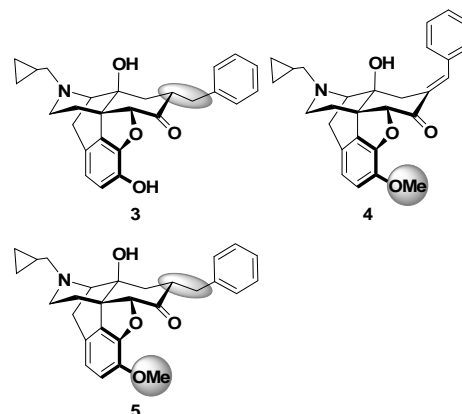


Fig. 2 BNTX derivatives 3-5

(2) マラリア研究を行う上で、適切な 1 次スクリーニングとして利用できるアッセイ系の検討

マラリア原虫は生体内で酸化ストレスを回避するために、グルタチオンやグルタチオンレダクターゼの SH 基を利用するという報告がある。一方、トリコモナス原虫は、生体内フェレドキシンのシステイン残基 (SH 基) を利用すると報告例がある。そこで、両原虫とも酸化ストレスに対する防御機構としてチオールを利用するという共通点に着目し、マラリア研究の 1 次スクリーニングとして *in vitro* の抗トリコモナス活性試験を採用することとした。抗トリコモナス活性試験については、*T. vaginalis* (腔トリコモナス) とそれぞれの被験化合物を 37 $^{\circ}$ C で 48 時間培養したトリコモナス培地を用い、それぞれについて最小発育阻止濃度 (MIC) と IC₅₀ 値を算出した。なお、本研究を本格的に開始する前に、BNTX (1) が確かに抗トリコモナス活性を有していることを予備的な実験により確認した (MIC = 40 μ M、IC₅₀ = 21.7 μ M)。

(3) BNTX (1) の誘導体および関連化合物の構造活性相関研究 (抗トリコモナス活性試験およびオピオイド各受容体との結合試験)

(1) で合成したサンプルについて (2) の方法で抗トリコモナス活性試験を行った。今回合成した約 30 種の BNTX 誘導体は、いずれも 20 ~ 80 μ M の MIC であった。最も活性の強かった化合物は 4-Iodo-BNTX であり、MIC = 20 μ M、IC₅₀ = 10.5 μ M を示した。なお、ほぼ唯一の既存薬として広く使われているメトロニダゾールは、本アッセイ系で活性試験を行ったところ、MIC = 10 μ M、IC₅₀ = 5.2 μ M であった。既存薬には及ばないものの、*in vitro* の抗トリコモナス活性試験において

既存薬の半分程度の活性化化合物を見出す事が出来たと言える。

また、これら全ての化合物についてはオピオイド受容体結合試験も行った。オピオイド受容体結合試験は、ヒトオピオイド受容体発現細胞を用いた *in vitro* での結合試験において、結合阻害定数 K_i 値を求めた。約 30 種の被験化合物は、全て BNTX (1) のベンジリデン部位を変換した誘導体であり、1 と同様にそのほとんどは DOR との強い親和性を示した。しかし、元々 1 の DOR と μ オピオイド受容体 (MOR) との選択性は低く、約 30 種の誘導体の中には DOR よりも MOR との親和性を強く示す化合物もあった。現時点では抗トリコモナス活性と DOR 親和性との相関を顕著に示す結果は得られておらず、今後、より詳細な構造活性相関研究の結果が必要と考えている。

一方、1 の二重結合を還元した化合物 3 の抗トリコモナス活性はやや減弱し (MIC: 40 μ M - 80 μ M) オピオイド受容体との親和性を低下させた化合物 4 の抗トリコモナス活性もやや減弱した (MIC: 40 μ M - 80 μ M)。さらに、チオール捕捉能とオピオイド受容体との親和性の両方を低下させた化合物 5 は、大きく抗トリコモナス活性が低下した (MIC \geq 320 μ M)。この結果は、1 およびその誘導体の抗トリコモナス活性には共役二重結合 (Michael acceptor) が関与していることを示すものであり、またそれと同時にオピオイド受容体と結合していることも重要であるという可能性を示唆するものである。

以上より、本研究成果においては、抗トリコモナス活性と DOR 親和性との相関について強く示唆する結果は得られなかったものの、オピオイド受容体自体との親和性、およびチオール (SH 基) 捕捉能を有する Michael acceptor の存在が重要であることを示す結果を得ることが出来た。これは過去の我々のマラリア研究における報告に極めて類似する結果であり、後にマラリア研究にフィードバック出来る成果であると考えている。今後は更なる構造活性相関の結果を蓄積し、より詳細な活性発現機序について研究を重ねていく計画である。

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 1 件)

- (1) Kutsumura, N.; Nakajima, R.; Koyama, Y.; Miyata, Y.; Saitoh, T.; Yamamoto, N.; Iwata, S.; Fujii, H.; Nagase, H.
“Investigation of 7-benzylidenenaltrexone derivatives as a novel structural antitrichomonal lead compound”
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **2015**, 25, 4890–4892.
DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.06.002(査読有)

〔学会発表〕(計 9 件)

- (1) 小山恭章、杓村憲樹、鈴木優子、中嶋龍、南雲康行、斉藤毅、山本直司、宮田善之、長瀬博
“BNTX 誘導体の抗トリコモナス活性の発見とその薬理作用”、第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2016 年 12 月 1 日、つくば国際会議場 (茨城県つくば市)
- (2) 鈴木優子、杓村憲樹、小山恭章、南雲康行、斉藤毅、山本直司、長瀬博
“BNTX 誘導体合成における新奇転位反応の発見とその反応機構の解明”、第 72 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム (新潟シンポジウム)、2016 年 11 月 26 日、新潟薬科大学新津駅東キャンパス (新潟県新潟市)
- (3) 小山恭章、杓村憲樹、鈴木優子、中嶋龍、南雲康行、斉藤毅、山本直司、長瀬博
“BNTX 誘導体の新奇転位反応の発見とその反応機構の解明”、第 42 回反応と合成の進歩シンポジウム、2016 年 11 月 7 日、清水文化会館マリナート (静岡県静岡市)
- (4) Yasuaki Koyama, Noriki Kutsumura, Ryo Nakajima, Yasuyuki Nagumo, Tsuyoshi Saitoh, Yoshiyuki Miyata, Hiroshi Nagase
“Investigation of 7-benzylidenenaltrexone derivatives as a novel structural antitrichomonal lead compound”, The International Narcotics Research Conference 2016, Jul. 11th 2016, Bath Assembly Rooms (Bath, UK) (国際学会)
- (5) Yasuaki, Koyama, Noriki Kutsumura, Ryo Nakajima, Yasuyuki Nagumo, Tsuyoshi Saitoh, Yoshiyuki Miyata, Hiroshi Nagase
“Development of efficient synthesis of antitrichomonal BNTX derivatives and discovery of new rearrangement reaction”, The 25th French–Japanese Symposium on Medicinal and Fine Chemistry, May 16th 2016, Keio Plaza Hotel Tama (Tama, Tokyo) (国際学会)
- (6) 杓村憲樹
“抗トリコモナス活性を有する BNTX 誘導体の構造活性相関”、島根大学大学院理工学研究科物質科学領域内 依頼講演、2015 年 11 月 27 日、島根大学大学院理工学研究科 (島根県松江市)
- (7) 小山恭章、杓村憲樹、中嶋龍、南雲康行、斉藤毅、宮田善之、藤井秀明、長瀬博
“抗トリコモナス活性を有する BNTX 誘導体の効率的合成法、及び、新規転位反応の発見”、第 45 回複素環化学討論会、2015 年 11 月 20 日、早稲田大学国際会議場 (東京都新宿区)
- (8) 小山恭章、杓村憲樹、中嶋龍、南雲康行、平山重人、斉藤毅、宮田善之、藤井秀明、長瀬博

“抗トリコモナス活性を有する BNTX 誘導体の構造活性相関”、第 35 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、2015 年 9 月 17 日、和歌山県立情報交流センター Big.U (和歌山県田辺市)

- (9) 小山恭章、杓村憲樹、中嶋龍、南雲康行、斉藤毅、宮田善之、藤井秀明、長瀬博
“抗トリコモナス活性を有する BNTX 誘導体の研究”、第 59 回日本薬学会関東支部大会、2015 年 9 月 12 日、日本大学薬学部 (千葉県船橋市)

〔その他〕

ホームページ等

筑波大学国際統合睡眠医科学研究機構

長瀬研究室 (創薬化学)

<http://nagase.wpi-iiis.tsukuba.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杓村 憲樹 (KUTSUMURA Noriki)

筑波大学・国際統合睡眠医科学研究機構・

准教授

研究者番号：00439241