

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06552

研究課題名(和文) 薬剤耐性の克服を目指した新規抗HIV性ヌクレオシドの合成と核酸医薬への展開

研究課題名(英文) Synthesis of novel anti-HIV nucleosides aiming at overcoming drug resistance and its application to nucleic acid medicines

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：核酸医薬に適応可能なヌクレオチドユニットの創製と抗ウイルス薬の開発を同時に満たすには、通常のヌクレオシドと同様、1級及び2級ヒドロキシ基を分子内に有する誘導体を基本骨格としてデザインを行う必要がある。本研究では、この条件を満たす誘導体として、4'-置換4'-チオヌクレオシドとジヒドロチオピラノヌクレオシドをデザインし、その合成を検討した。特に、4'-置換4'-チオヌクレオシドについては、核酸医薬用モノマーに特化した誘導体として4'-チオLNA/BNAを別途デザインし、その合成を達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体医薬については多くの医薬品が上市されているのに比べ、核酸医薬はまだ大きく遅れを取っている。その理由として、核酸医薬が抱えている問題点があり、1) ターゲットDNAやRNAへの特異的結合と二重鎖の形成並びにオフターゲット効果の抑制、2) 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、3) 核酸医薬の組織・細胞移行性の改善、4) 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が挙げられる。報告者が開発した4'-チオLNA/BNAモノマーはRNAに対する親和性を維持しつつ、導入したオリゴマーのヌクレアーゼに対する抵抗性の改善が期待され、血中でより安定な核酸医薬の開発へとつながるものである。

研究成果の概要(英文)：In order to satisfy both the creation of nucleoside units applicable to nucleic acid medicines and the development of antiviral drugs, it is necessary to design based on an ordinary nucleoside skeleton having primary and secondary hydroxy groups in appropriate positions in its molecule. In this study, we designed 4'-substituted 4'-thionucleosides and dihydrothiopyrano-nucleosides as derivatives that satisfy this condition, and studied their synthesis. In particular, 4'-thio LNA/BNA was also designed as a promising nucleoside monomer unit for nucleic acid medicines, and its synthesis was achieved.

研究分野：医薬品化学

キーワード：ヌクレオシド 核酸医薬 4'-チオヌクレオシド

1. 研究開始当初の背景

癌やウイルス性疾患の治療薬として、ヌクレオシド(ヌクレオチド)に対する基質認識や代謝速度のわずかな差を利用し、選択毒性を発揮するものがヌクレオシド系代謝拮抗薬であり、既に多くの代謝拮抗薬が臨床の場で使用されている。癌治療薬のゲムシタビン(1)やC型肝炎治療薬ソホスブビル(2)等がこれに該当する。特に後者のソホスブビルは従来のC型肝炎治療薬に比べ高い治療効果を示し、C型肝炎治療に革命的变化をもたらしたと言っても過言ではない。我々もこれまでヌクレオシド糖部の環内酸素原子を硫黄原子で置換した4'-チオヌクレオシド誘導体を中心に研究を重ね、新規抗癌剤候補として4'-thioFAC(3: FF-10502)の創製に成功し、現在、米国を中心にPhase I/IIが進行中である。しかし、これらヌクレオシド系代謝拮抗薬には常に薬剤耐性の問題が存在する。抗ウイルス薬の場合、薬剤耐性の問題は医薬品の適正使用を徹底することにより耐性出現を抑制することが第一であるが、既に耐性を獲得したウイルスに効果を示す新規薬剤の開発が緊急の課題となっているのも事実である。一方、核酸医薬は、抗体医薬とともに21世紀の治療薬として大きな期待が寄せられている。しかし、抗体医薬については多くの医薬品が上市されているのに比べ、核酸医薬は、数例の上市例を除き実用化の面で大きく遅れている。その理由として、核酸医薬が抱えている問題点があり、1)ターゲットDNAやRNA

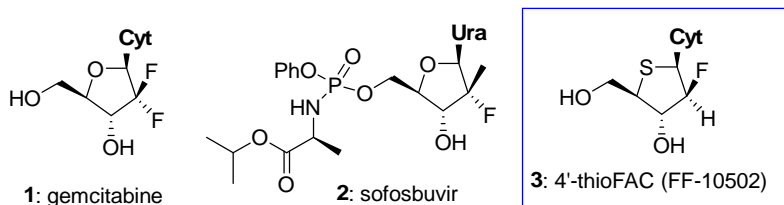


Fig 1

への特異的結合と二重鎖の形成並びにオフターゲット効果の抑制、2)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、3)核酸医薬の組織・細胞移行性の改善、4)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が挙げられる。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。

2. 研究の目的

新規抗ウイルス薬の開発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。加えて、核酸医薬の実用化に向けた修飾ヌクレオチドの開発についても同様に高いニーズが存在する。これらの問題に対する取り組みとしては、構造的新規性を有するヌクレオシド(ヌクレオチド)誘導体の合成と評価を伴った基礎的取組が必要不可欠である。報告者は新規ヌクレオシド誘導体のデザインと合成を通じ、これらの問題解決に取り組むこととした。

3. 研究の方法

標的分子のデザインと合成を行うにあたり、核酸医薬に適応可能なヌクレオチドユニットの創製と抗ウイルス薬の開発を同時に行える戦略が必要と考えた。そこで、オリゴヌクレオチド化が可能となるよう、通常のヌクレオシドと同様、1級及び2級ヒドロキシル基を分子内に有する誘導体をデザインし、はじめにその合成を検討する。その後、得られた誘導体の化学的変換を行い、より抗ウイルス剤に適した誘導体への変換を試みることを計画した。この戦略に従い、4'-チオLNA/BNAヌクレオシドユニット4並びにジヒドロチオピラノヌクレオシド5をデザインし、これら誘導体の合成を検討した。

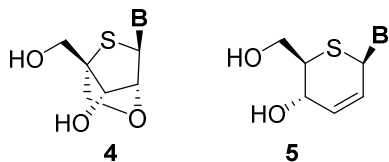
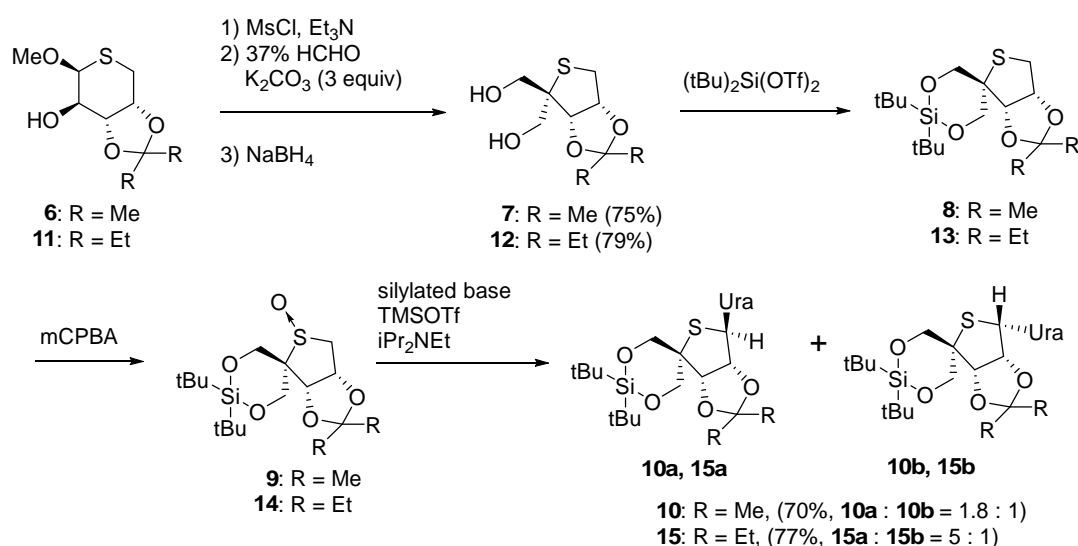


Fig 2

4. 研究成果

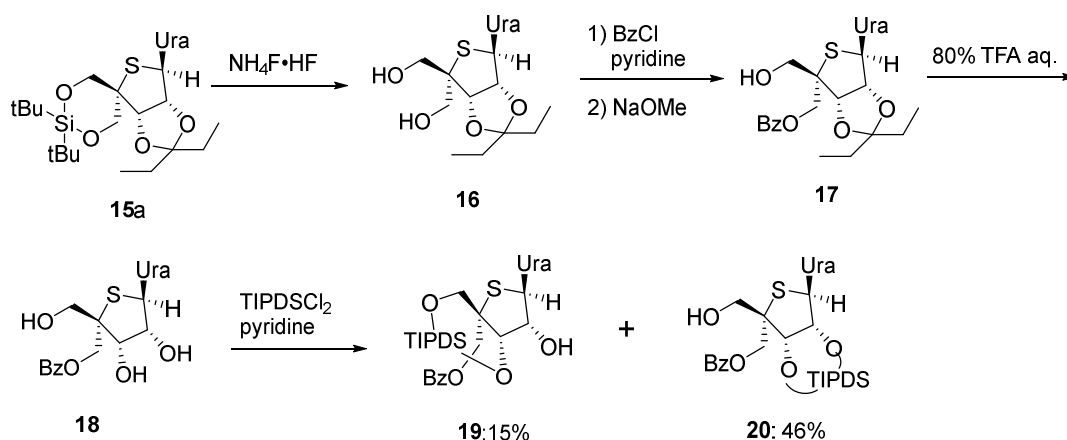
(1) 4'-チオ LNA/BNA ヌクレオシドユニットのデザインと合成

はじめに、4'-置換 4'-チオヌクレオシド合成について検討を行った。L-アラビノースを出発原料とし、5-チオピラノシド誘導体を合成し、3,4位をアセタールで保護し、アセタール体 **6** を得た。得られたアセタール体 **6** の 2 位をメシル化後、ホルムアルデヒドと炭酸カリウムと処理することで縮環とアルドール反応を同時に行った。同反応終了後、さらに水素化ホウ素ナトリウムで処理し、目的とする 4-ヒドロキシメチル-4-チオリボース誘導体 **7** を得た。縮環/アルドール反応の再現性が乏しかった点については、条件の最適化を行い、最終的に加える炭酸カリウムの量を 3 等量に増やし、反応時間を延長することによりアセタール体 **6** から 75% の収率で目的物を得ることが出来た。生じたジオール部を保護し酸化によりスルホキシド体へ誘導した後、当研究室で開発した 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 **10a** を良好な収率で得ることができ、そのアノマー生成比は $\beta:\alpha = 1.8:1$ であった。Pummerer 型チオグリコシル化反応の立体選択性の改善を目指し、2,3 位のアセタール保護をイソプロピリデンからペンチリデンに変更したスルホキシド誘導体 **14** を合成した。同誘導体の Pummerer 型チオグリコシル化反応により、目的とする 4'-チオヌクレオシド誘導体 **15a** が収率 77%、 $\beta:\alpha = 5:1$ で得られ、立体選択性の改善に成功した (Scheme 1)。



Scheme 1

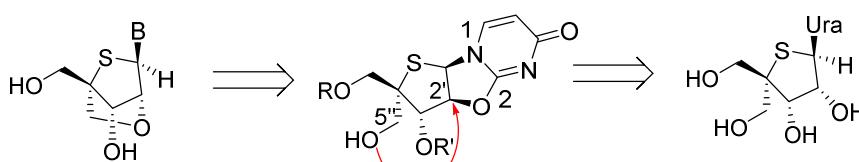
次に、合成に成功した 4'-ヒドロキシメチル-4'-チオウリジンから 4'-チオ LNA/BNA 誘導体への変換を検討した。Pummerer 型チオグリコシル化反応により得られた 4'-ヒドロキシメチル-4'-チオウリジン誘導体 **15a** の 1 級ジオール部を脱保護した後、2 つあるジオール部の一方を選択的に保護することを検討した。はじめにベンジル化の検討を行ったが、目的とするモノ-O-ベンジル体は全く得られず、ウラシル N3 位がベンジル化された誘導体を得られた。



Scheme 2

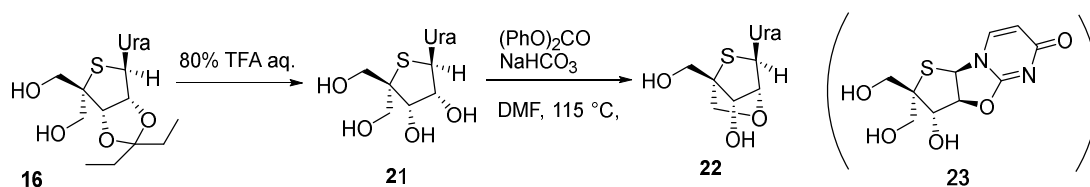
保護基をベンゾイル基に切り替え、条件検討を行ったところ、ジオール部を一旦ジベンゾエートとした後、メトキシド処理により中程度の収率ではあるがモノベンゾエート **17** に変換できることを見出した。得られたモノベンゾエート体 **17** の 2 級ジオール部のアセタール保護基を除去し、4 つあるヒドロキシ基のうち、所望の 1 級ヒドロキシ基のみをベンゾイル基で保護した 4'-チオウリジン誘導体 **18** の合成を達成した。2'位以外のヒドロキシ基を保護するため、同誘導体に対し、1,1,3,3-テトライソプロピルジシロキシル (TIPDS) 基で 3'位と 5'位を同時に保護することを試みた。しかし、目的とする 3',5'-TIPDS 体 **19** は低収率で得られ、2',3'-TIPDS 体 **20** が主生成物として得られるのみであった (Scheme 2)。

前述のように 4'-ヒドロキシメチル-4'-チオウリジン誘導体の糖部選択的保護の検討は不調であったことから、合成ルートの見直しを行った。これまでは、従来の LNA/BNA の合成例にならい、環化反応を行う際、5''側に脱離基を導入し、2'-ヒドロキシ基を求核剤として反応を行うことを考えていた。新たな合成計画では求核剤と脱離基を入れ替え、2'位を反転させるため、2,2'-O-シクロヌクレオシドへ導いた後、5''-ヒドロキシ基の求核攻撃により 4'-チオ LNA/BNA の合成を達成することを考えた (Scheme 3)。



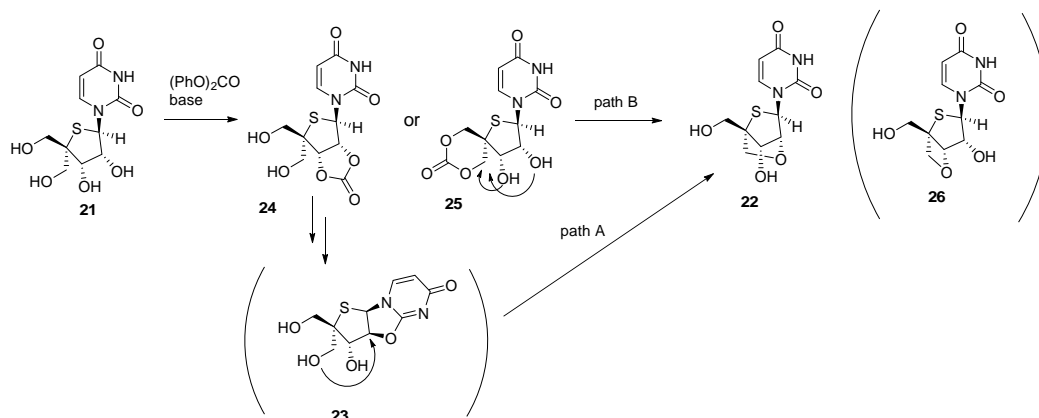
Scheme 3

先に得られた化合物 **16** のペンチリデン基を酸処理により除去し、4'-ヒドロキシメチル-4'-チオウリジン **21** を得た。同誘導体を定法に従い、2,2'-O-シクロヌクレオシドへの変換を試みたところ、目的とする 4'-チオ-2,2'-O-シクロウリジン **23** は得られず、代わりに最終目的物である 4'-チオ LNA/BNA ウリジンモノマー **22** が生成することを見出した (Scheme 4)。



Scheme 4

考えられる 4'-チオ LNA/BNA ウリジンモノマー生成の反応機構を Scheme 5 に示す。

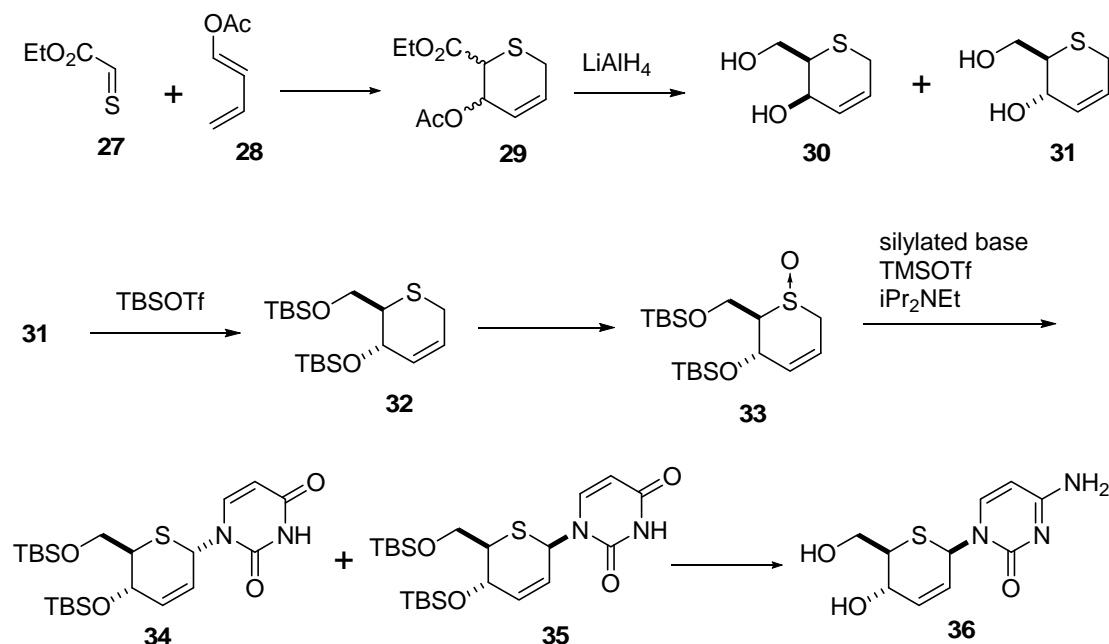


Scheme 5

考え得る反応機構のひとつは、当初の期待通り **4'**-チオ-**2,2'**-**O**-シクロウリジン **23** を経由し、**5''** 位のヒドロキシ基が、**2'**位を求核攻撃し環化が進行するルート (**path A**) である。もう一方は、**2,2'**-**O**-シクロを形成する途中の中間体である **5', 5''**-環状カーボネート **25** において、**2'**位ヒドロキシ基が **5''**位へ分子内 **S_N2** 反応する経路 (**path B**) である。しかし、**path A** で進行した場合、中間体である **4'**-チオ-**2,2'**-**O**-シクロウリジン **23** が副生するはずであるが、反応混合物中から **23** は全く見つかっていない。同様に、**path B** で反応が進行したとすると、ビスシクロオキセタン体 **26** が副生する可能性があるが、やはりこちらも反応生成物からは全く見つかっていない。現時点ではいずれのルートで進行しているかは不明と言わざるを得ず、反応機構解明のためにはさらなる検討が必要と考える。

(2) ジヒドロチオピラノヌクレオシドのデザインと合成

5'-チオピラノヌクレオシドの合成について、糖部となるジヒドロピラン誘導体の合成に着手した。チオ酢酸エチル (**27**) とアセトキシブタジエン (**28**) のヘテロ **Diels-Alder** 反応と引き続き還元反応によりジオール体 **30** および **31** を得た。カラムクロマトによる分離精製後、**31** のヒドロキシ基を **TBS** 基で保護し、目的とするジヒドロピラン誘導体 **32** を合成した。得られたジヒドロチオピラン誘導体 **32** を対応するスルホキシド **33** に導いた後、当研究室で開発した **Pummerer** 型チオグリコシル化反応を適応した。ビス(**TMS**)ウラシルとの **Pummerer** 型チオグリコシル化反応を行い目的とするウラシル誘導体 **34** を良好な収率で得た。生成したアノマーをカラムクロマトにより分離し、得られた体 **34** の塩基部をシトシンに変換した後、脱保護を行い、最終目的物であるジヒドロチオピラノシトシン誘導体 **36** の合成を達成した。



Scheme 6

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wakamatsu, Hideaki, Itoh, Moeko, Natori Yoshihiro, Yoshimura Yuichi	4. 巻 39
2. 論文標題 Synthesis of 2'-aminouridine derivatives as an organocatalyst for Diels-Alder reaction	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 365-383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15257770.2019.1646917	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yoshimura, Y.; Wakamatsu, H.; Natori, Y.; Saito, Y.; Minakawa, N.	4. 巻 14
2. 論文標題 Glycosylation Reactions Mediated by Hypervalent Iodine: Application to the Synthesis of Nucleosides and Carbohydrates	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Beilstein J. Org. Chem.	6. 最初と最後の頁 1595-1618
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3762/bjoc.14.137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 遠藤袖季乃, 若松秀章, 伊藤恭平, 斎藤有香子, 名取良浩, 吉村祐一
2. 発表標題 4'-置換ヌクレオシド誘導体の合成と光学分割の検討
3. 学会等名 令和元年度東北医科薬科大学創薬研究センターシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤袖季乃, 若松秀章, 伊藤恭平, 斎藤有香子, 名取良浩, 吉村祐一
2. 発表標題 4'-置換ヌクレオシド誘導体の光学分割
3. 学会等名 第58回日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 遠藤 柚季乃、若松 秀章、伊藤 恭平、斎藤 有香子、名取 良浩、吉村 祐一
2. 発表標題 4'-置換ヌクレオシド誘導体の光学分割
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前田 璃音、若松 秀章、庄子 希望、名取 良浩、吉村 祐一
2. 発表標題 4'-置換 4'-チオリボシルチミン誘導体の合成
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前田璃音、若松秀章、庄子希望、名取良浩、吉村祐一
2. 発表標題 4'-置換4'-チオリボヌクレオシド誘導体の合成研究
3. 学会等名 平成30年度 東北医科薬科大学 創薬研究センターシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 斎藤有香子、山崎佳子、高橋江里佳、名取良浩、若松秀章、吉村祐一
2. 発表標題 ジヒドロチオピラン環ヌクレオシド誘導体の合成研究
3. 学会等名 第57回日本薬学会 東北支部大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田 璃音, 若松 秀章, 庄子 希望, 名取 良浩, 吉村 祐一
2. 発表標題 縮環/ アルドールタンデム反応を利用した4' - 置換4' - チオヌクレオシドの合成
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関