

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：32206

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K17934

研究課題名（和文）新規アッセイ法を利用した炭素環ヌクレオシドによる抗アデノウイルス剤の創製

研究課題名（英文）Development of anti-adenovirus agents with carbocyclic nucleosides via a novel assay

研究代表者

紺野 奇重 (Konno, Kiju)

国際医療福祉大学・薬学部・助教

研究者番号：50807493

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：アデノウイルス感染症治療薬の創製を目的として、本研究では、先行研究で見出した2'-デオキシ炭素環グアノシンをリード化合物とした核酸塩基部の構造活性相関研究を行った。次に、より効率的にヒット化合物を見出すために、細胞内に幅広い化学構造の核酸アナログをリン酸化するHSV-TKを発現させた細胞を作製し、これを抗アデノウイルス活性評価系として利用した。残念ながら合成した9化合物に顕著な抗アデノウイルス活性は認められなかった。一方、HSV-TK陽性細胞を用いた抗アデノウイルス活性評価で研究室の化合物ライブラリーを評価したところ、新たに1化合物のヒット化合物を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で新たに抗アデノウイルス活性を有するヒット化合物を見出すことができた。アデノウイルス感染症に有効な治療薬はないため、2'-デオキシ炭素環グアノシンを軸とした創薬研究を展開することで、抗アデノウイルス剤の開発につなげたい。また、本研究で作製した、核酸アナログのリン酸化代謝に着目したアッセイ系は、他ウイルス感染症治療薬の創製研究に応用が可能であると考えられる。本研究で得られた知見を基に、水平展開が期待される。

研究成果の概要（英文）：To develop antiviral agents against adenovirus infections, we investigated the structure-activity relationship of nucleobase moieties using 2'-deoxy-carbocyclic guanosine as the lead compound, based on prior research. Subsequently, to efficiently identify lead compounds, we generated cells expressing HSV-TK, which phosphorylates a variety of nucleic acid analogs. These cells were then employed as an antiviral activity evaluation system against adenovirus. Unfortunately, no significant antiviral activity against adenovirus was observed for the nine synthesized compounds. However, laboratory evaluation of nucleic acid analogs using HSV-TK-positive cells has led to the discovery of a new hit compound.

研究分野：医薬品化学

キーワード：核酸化学 医薬品化学 抗ウイルス剤 アデノウイルス

1. 研究開始当初の背景

アデノウイルスは喉頭結膜熱(プール熱)などの原因ウイルスとして知られる一方、臓器移植後の免疫不全状態の患者に対しては多臓器不全を引き起こし、致命的なダメージを与える。臓器移植患者のうち6~45%はAdVに感染していることが確認されており、国内外での対策が急務である。しかしながら現在の治療法は対処療法に留まり、AdV感染症に対する有効な治療薬はない。このような背景から国内外で抗AdV剤の開発が望まれている。

抗AdV活性を示す代表的な核酸アナログとして、Cidofovir ($IC_{50} = 11 \mu M$)とそのプロドラッグ誘導体 Brincidofovir ($IC_{50} = 0.025 \mu M$)が挙げられる(図1)。リード化合物であるCidofovirは腎毒性が強く、長期服用では気管支壊死を引き起こす。BrincidofovirはウイルスDNA polymerase 阻害剤としてPhase まで進んだが、Cidofovirと同様の副作用と不十分な効果から、再度用量設定が行われているため、有用な薬剤は存在していない。

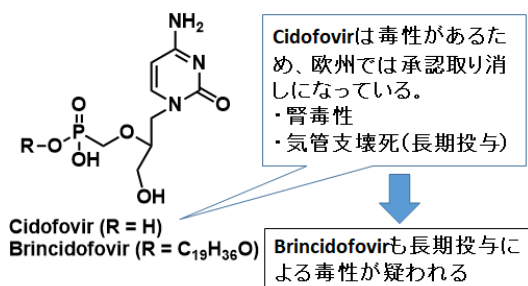


図1 Cidofovir と Brincidofovir の構造

2. 研究の目的

申請者は研究背景をもとに、本研究では、新規の抗アデノウイルス活性を有する化合物の探索を目的とした。また、スクリーニングにおいて、効率的かつ新規性のある化合物を見出すために、従来とは異なる細胞系を用いた評価系を立ち上げることとした。

3. 研究の方法

(1) 既存のアッセイ方法の問題点とその解決案

核酸アナログが抗ウイルス活性を示すためには生体内でトリリン酸化される必要があるが、リン酸化修飾は一般的に1段階目のモノリン酸化工程が律速になりやすく、また化学修飾された核酸アナログはものリン酸化代謝を受けにくいとされているため、スクリーニングでの偽陰性につながる。これを回避するため、多彩な構造を有する核酸アナログであってもリン酸化というヘルペスウイルス由来のキナーゼを発現する細胞を用いたアッセイ系を構築し、その抗ウイルス評価を行うこととした。

(2) ヒット化合物を基にした構造活性相関研究

先行研究により、(1)で挙げた、抗アデノウイルス活性を示す可能性はあるが、生体内のリン酸化代謝を受けづらい化合物として、2'-デオキシ炭素環グアノシンを見出している。この化合物をリード化合物として、誘導体合成を行う。一般に、核酸アナログの生物活性は核酸塩基の構造によって大きな影響を受ける。このことから、リード化合物の核酸塩基部の構造活性相関研究に着手した。

4. 研究成果

(1)(2)ともに、研究開始時に立案した計画から状況が変化したため、計画変更を行い、研究を実行せざるを得なくなった。

(1) HSV-TKを発現させた細胞の作製と抗ウイルス活性評価系の構築

東北大学医学部の研究グループと共同研究する予定であったが、権利の都合上共同研究が中止となってしまった。そのため、自分たちでアッセイ系を構築するべく、評価系の樹立を行った。

まず、論文条件に従い、A549細胞に対してアデノウイルスを感染させて、抗アデノウイルス活性の評価を行った。次に、HSV-TK遺伝子を購入し、A549細胞に対してプラスミドを用いた遺伝子導入を行い、HSV-TKを発現させた細胞を作製した(図2)。その後、アデノウイルスを感染させて、抗アデノウイルス活性評価を行った。これらの実験より、抗ウイルス活性評価系の構築を行うことができた判断した。

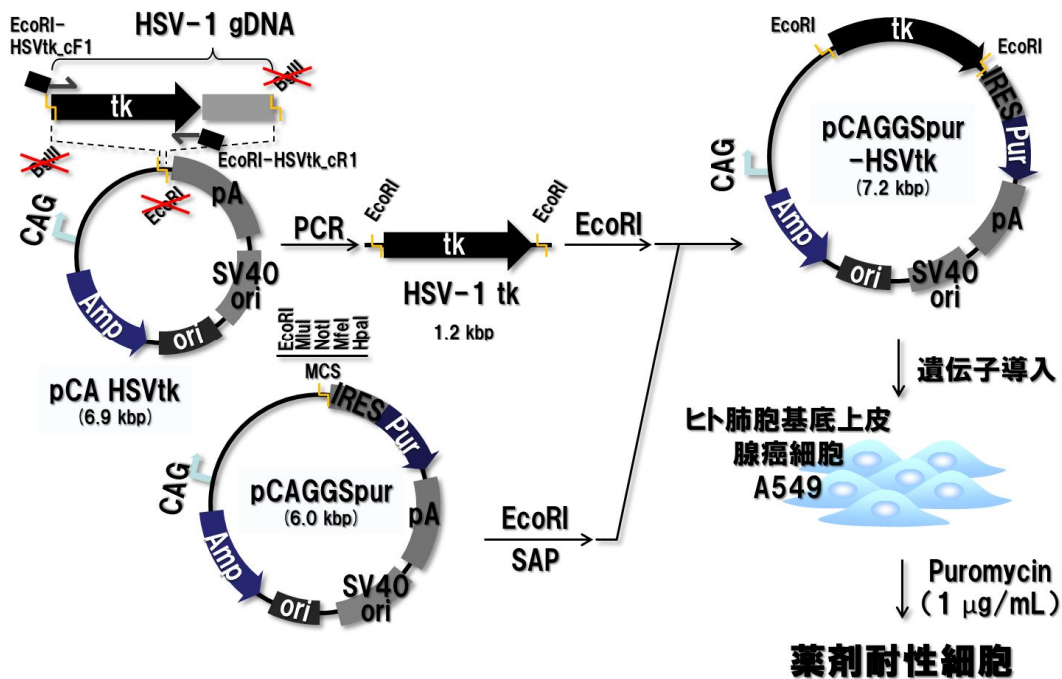


図2 HSV-1 TK 発現細胞の樹立

(2) 2'-デオキシ炭素環グアノシン誘導体の核酸塩基部の構造活性相関研究

2'-デオキシ炭素環グアノシンをリード化合物とした、核酸塩基の構造活性相関研究を行った。合成結果を Scheme 1 に示す。光学活性体である化合物 1 を出発物質として、7 工程で炭素環ヌクレオシドの炭素糖部となる中間体 8 を合成した。得られた中間体 8 と様々な核酸塩基を縮合し、その後 Barton-Maccombie 脱酸素化反応を用いて化合物 11 を合成した。最後に、三塩化ホウ素を用いた脱保護反応を行い、非天然塩基を導入した化合物を含む、9 種類の 2'-デオキシ炭素環ヌクレオシド (12) を合成した。

しかしながら、2020 年度に発生した COVID-19 の影響により、出発物質としていた化合物 1 が安価に入手できなくなってしまった。このため、合成法を見直すこととした。COVID-19 後の合成法を Scheme 2 に示す。安価かつ安定的に供給されるシクロペンタジエン (13) を出発物質として、文献既知の方法を用いて化合物 (±)-17 を合成した。得られた化合物 (±)-17 はラセミ体であるため、リパーゼを用いた光学分割を行い、化合物 17 を得た。得られた化合物 17 から 3 工程で化合物 1 を合成することができた。

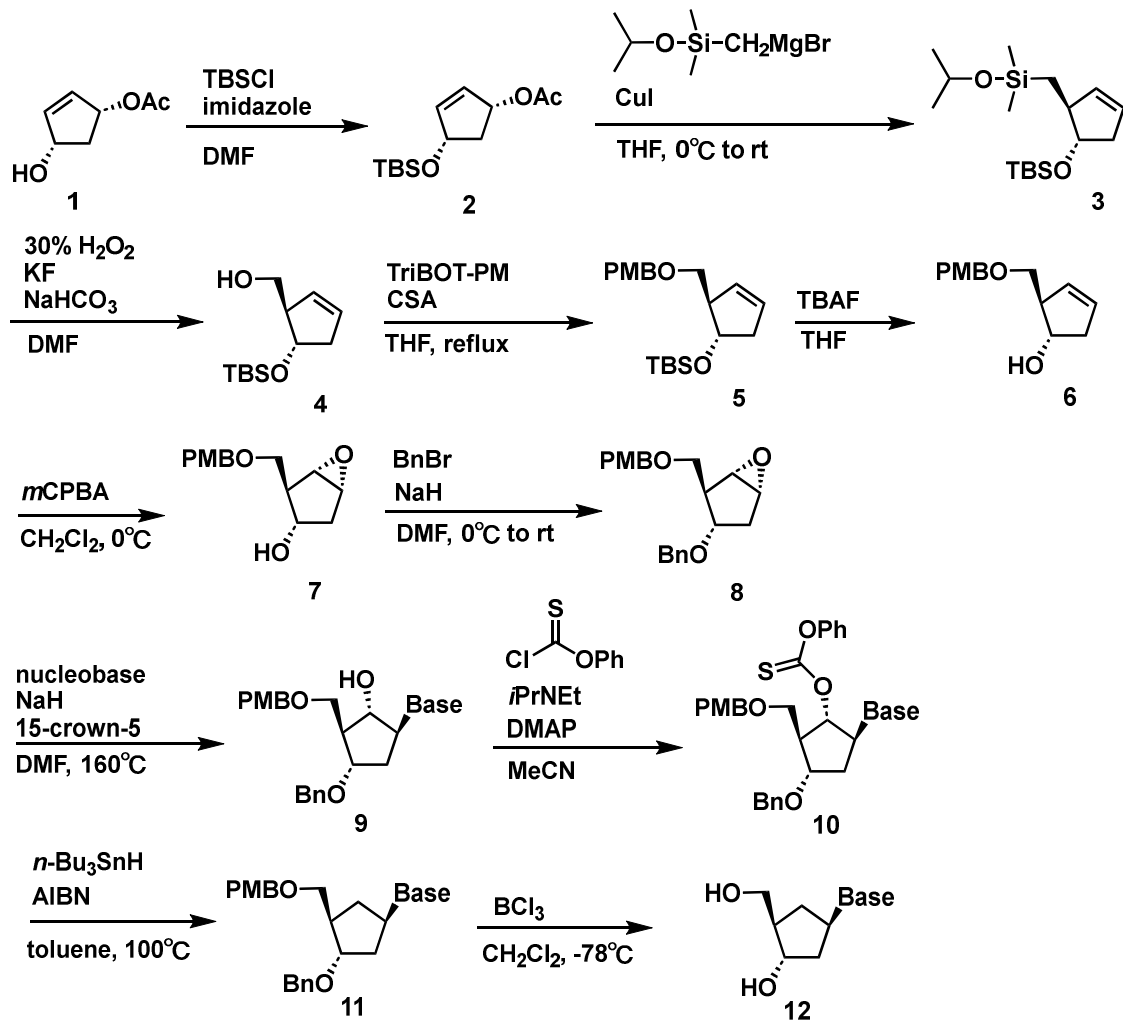
これら結果により、2'-デオキシ炭素環ヌクレオシドの合成法を確立することができた。

(3) 合成した化合物の抗アデノウイルス活性評価結果

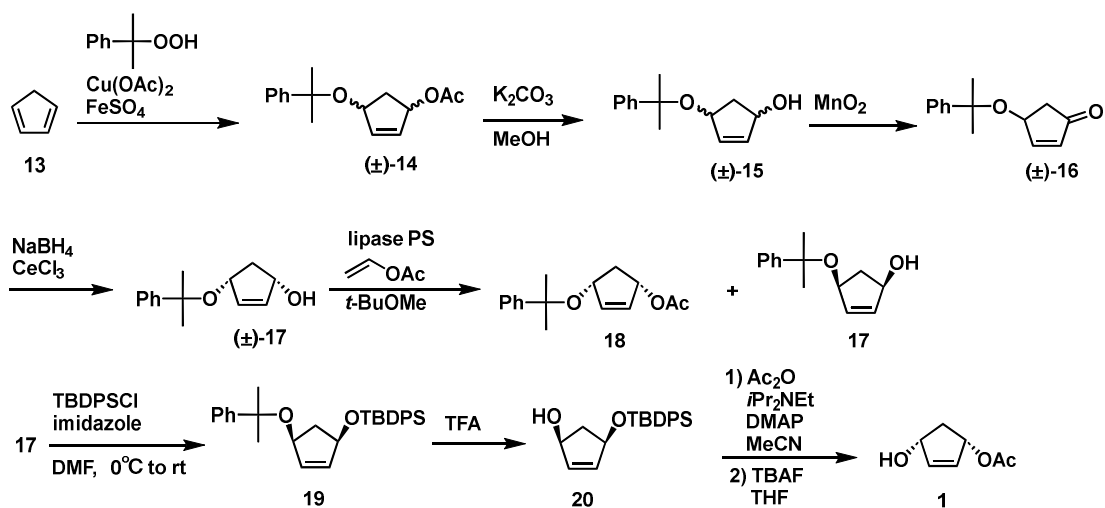
合成した化合物について、抗アデノウイルス活性評価を行った。残念ながら、いずれの化合物も顕著な抗アデノウイルス活性は認められなかった。これらの結果より、核酸塩基はグアニン構造が最も良いことが示唆された。

一方、構築したアッセイ系を利用して、当研究室にある化合物の抗アデノウイルス活性評価を行ったところ、新たに 1 化合物の抗アデノウイルス活性を有する化合物を見出すことができた。今後、2'-デオキシ炭素環グアノシンの糖部構造の化学修飾を行うことで、抗ウイルス活性の向上を目指す。また、本研究で作製した細胞を用いたアッセイ系を利用して見出された化合物の構造活性相関研究も展開する。

本アッセイ系での抗ウイルス活性評価は、他ウイルス感染症治療薬の創製において有用な手法となることが示唆された。今後、他ウイルス感染症治療薬の創製にも応用できるよう、研究を継続していく。



Scheme 1



Scheme 2

5. 主な発表論文等

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

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Haraguchi Kazuhiro, Kumamoto Hiroki, Konno Kiju, Yagi Hideki, Tatano Yutaka, Odanaka Yuki, Shimbara Matsubayashi Satoko, Snoeck Robert, Andrei Graciela | 4. 巻 75 |
| 2. 論文標題 Synthesis of 4 -substituted 2 -deoxy-4 -thiocytidines and its evaluation for antineoplastic and antiviral activities | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Tetrahedron | 6. 最初と最後の頁 4542 ~ 4555 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tet.2019.06.044 | 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 - |

〔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 高山彩光、服部真一朗、六本木誠、満屋裕明、紺野奇重 |
| 2. 発表標題 SARS-CoV-2 RNApolymeraseを標的とした4'-フルオロ炭素環アデノシンの合成 |
| 3. 学会等名 第143回日本薬学会年会 |
| 4. 発表年 2022年～2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 石島花穂、石綱遥、服部真一朗、満屋裕明、六本木誠、紺野奇重 |
| 2. 発表標題 SARS-CoV-2 RNApolymeraseを標的とした4'-フルオロ炭素環ウリジンの合成 |
| 3. 学会等名 第143回日本薬学会年会 |
| 4. 発表年 2022年～2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 石綱遥、斎藤智亜季、紺野奇重、三澤隆史、出水庸介、栗原正明、藤井幹雄 |
| 2. 発表標題 抗アデノウイルス活性を期待した炭素環2 -デオキシ炭素環ピリミジンヌクレオシドの合成 |
| 3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 今田敦之, 水石彩菜, 紺野奇重, 三澤隆史, 出水庸介, 栗原正明, 藤井幹雄 |
| 2. 発表標題 抗アデノウイルス活性を期待した炭素環2'-デオキシ7-デアザアデノシンの合成 |
| 3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 荒井慎之介, 齋藤智亜季, 水石彩菜, 三澤隆史, 出水庸介, 栗原正明, 紺野奇重 |
| 2. 発表標題 抗アデノウイルス活性を期待した2'-デオキシ炭素環ヌクレオシドの合成 |
| 3. 学会等名 日本薬学会 第141回年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 水石 彩菜, 齋藤 智亜季, 目黒 公太郎, 植松 明星, 原島 利彰, 林 宏典, 児玉 栄一, 三澤 隆史, 出水 庸介, 栗原 正明, 紺野 奇重 |
| 2. 発表標題 Carbocyclic-2'-deoxynucleosideの合成研究 -carbocyclic-2'-deoxy-7-deazaadenosine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 齋藤 智亜季, 水石 彩菜, 目黒 公太郎, 植松 明星, 原島 利彰, 林 宏典, 児玉 栄一, 三澤 隆史, 出水 庸介, 栗原 正明, 紺野 奇重 |
| 2. 発表標題 Carbocyclic-2'-deoxynucleosideの合成研究 -carbocyclic-2'-deoxyuridineの合成- |
| 3. 学会等名 日本薬学会 第140年会 |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------|---------|
|---------|---------|