

機関番号：34414
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20790106
 研究課題名（和文） 5´位修飾型新規ヌクレオシド類縁体によるC型肝炎治療薬の創薬研究
 研究課題名（英文） Design, synthesis, and evaluation of novel 5´-modified nucleoside analogs as anti-HCV agents
 研究代表者
 池尻 昌宏（MASAHIRO IKEJIRI）
 大阪大谷大学・薬学部・講師
 研究者番号：00412396

研究成果の概要（和文）：

C型肝炎はウイルス性の肝疾患であり、本国にも数多くの感染者が報告されている。現在用いられている治療薬はある程度の効果は示すものの著効率は十分ではない。そこで新たな治療薬の創製を目指し、独自のアイデアのもと有機低分子を設計し、その合成ならびに抗ウイルス活性の評価・検討を行った。その結果、抗ウイルス効果は十分ではないものの、従来の抗ウイルス薬とは異なった新たな作用メカニズムに基づくと期待できる新規な化合物の創製に成功した。

研究成果の概要（英文）：

Hepatitis C is an infectious disease affecting the liver, caused by the hepatitis C virus. In Japan, there are many patients suffering from the disease. Common medicines are effective to some extent, but not enough. Thus, I planned to study on the synthesis of novel compounds designed originally aiming to produce a new medicine. Unfortunately, the chemicals obtained were not so effective to the virus. However, interestingly, I found that they are likely to operate via a new type of mechanism that is different from that of the common antiviral drugs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬品化学

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)は、慢性肝炎、肝硬変、肝臓ガン等の慢性肝疾患を引き起こす主因であると言われており、本国に於いてもC型肝炎に苦しむ患者は100～150万人にも及ぶと推定されている。現在その治療法として、インターフェロンの単独投与、或はヌクレオ

シド類縁体であるリバビリンとの併用投与が行われているが、著効率は3～5割と低く決して満足のいく値ではない。その為、この現状を改善すべく世界中で盛んに抗HCV薬の創薬研究が行われているが、未だ特効薬は見つかっていない。

2. 研究の目的

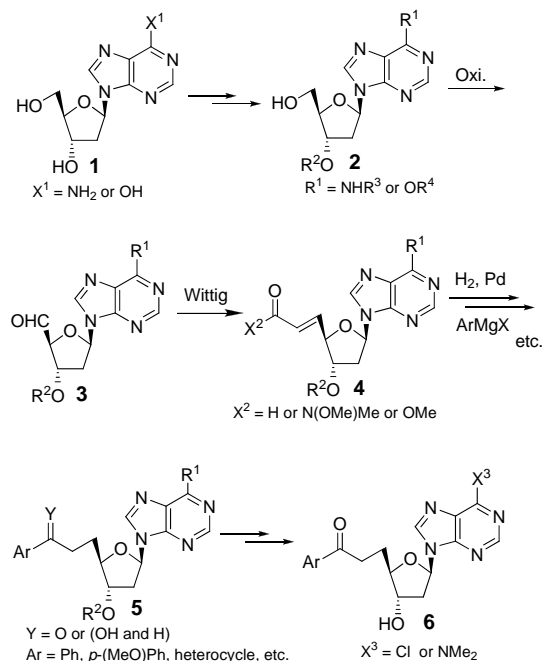
効果的な抗 HCV 薬の創薬研究（特にヌクレオシド類縁体によるもの）を全体構想として掲げ、特に下記の内容を具体的な目的とし、本研究に従事した。

具体的目的：申請者はこれまでも抗 HCV 薬の創薬研究に従事しており、そこで得られた知見から、ヌクレオシド類縁体の C5'位上の化学修飾が新規抗 HCV 薬の開発のヒントになるのではと考えている。そこで今回の研究は、新規な C5'位修飾型ヌクレオシド類縁体の効率的化学合成、並びにそれら類縁体の抗 HCV 活性の評価を具体的な目的とする。

具体的な候補化合物として、5'-デオキシ-5'-炭素鎖置換型ヌクレオシド類縁体、並びに 5'-炭素鎖導入型ヌクレオシド類縁体を設計し、その合成・評価を検討することにした。また、ヌクレオシド 5'位に導入すべく、新規複素環化合物の独創的な合成法の開発検討も併せて行うことにした。

3. 研究の方法

まず 5'-デオキシ-5'-炭素鎖置換型ヌクレオシド類縁体の合成については（図 1）、デオキシアデノシン或はデオキシイノシン 1 を原料とし、アルデヒド 3 との Wittig 反応により 4 とする。続いて、炭素-炭素二重結合の還元の後、Grignard 反応により 5 とし、核酸塩基部分の変換、脱保護等を経て目的の 6 とする。Ar および X³ に関しては、これまでの知見を参考にまずは、Ar = Ph, X³ = Cl にて合成を行う。

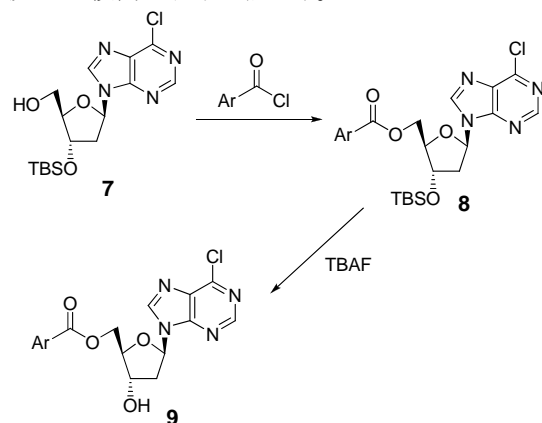


(図 1)

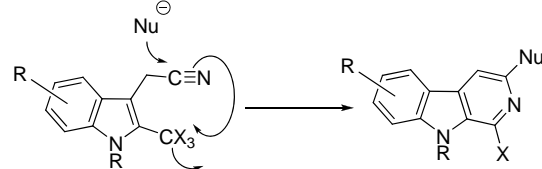
また、ヌクレオシド 5'位の芳香族性置換基の

検討が十分には行われていないので、Ar 部に入手容易な芳香族化合物を用いた類縁体の合成も行う。本類縁体においては、5'-デオキシ-5'-炭素鎖置換型のタイプでは合成工程が長くなるので、まずは 5'-O-エステル型にて検討を行う（図 2）。本合成法は極めてシンプルであり、既知化合物 7 をアシル化した後、8 に対して TBS 基の脱保護を行うことにて目的の 9 とする。

次に、他の芳香族複素環として、単独でも抗ウイルス活性の報告がされている β-カルボリン類についてその新規な合成法の検討を行う。まずは β-カルボリン類単独の合成を検討し、将来的にはヌクレオシド 5'位への導入、すなわちハイブリッド型類縁体の合成へと展開する。カルボリン環の合成法の候補として、インドールアセトニトリルのシアノ基への求核付加-環化タンデム型による新規な反応の検討を行う（図 3）。



(図 2)



(図 3)

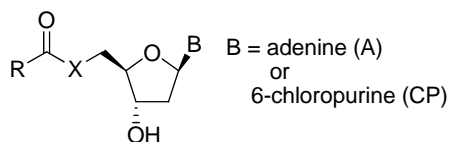
合成した類縁体の抗ウイルス活性の測定は、HCV サブゲノムレプリコン細胞 Huh7 (LucNeo#2, 京大ウイルス研より提供: *KUMBL Ref: 05MT184p*) を用いたルシフェラーゼ（レポーター遺伝子）アッセイ法、およびリアルタイム RT-PCR によるウイルス RNA 量の定量にて行う。詳細な検討が必要な際にはウエスタンブロット法にてウイルスタンパク質の検出も行う予定である。なお、これらの手法は京大ウイルス研の下遠野先生らのグループにより確立されているので、それに従い評価を行う (Shimotohno, K. et al. *Virology* 2005, 331, 407. 等)。また、各類縁体の細胞

毒性については、常法に従い MTT (或は XTT) 法により検査を行う。

4. 研究成果

2008年度：

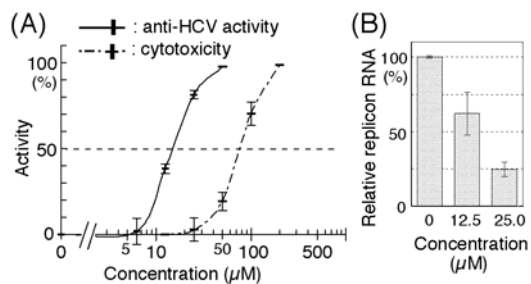
5'位修飾型新規ヌクレオシド類縁体 **6** の合成を図1に従い検討した。その結果、アリルシランを用いたラジカル反応を活用した合成法は失敗に終わったが、5'位アルデヒド体に対して one-pot 法にて Wittig 反応を行い、生じたアルケン部をインジウム触媒下、シラン還元・あるいは接触還元に付すことで、そのメチレン部の導入に成功した。なおこの際、Wittig 試薬にフェナシル基を有するものを用いることで、**3** から **5** への直接的な変換が可能であった。この合成法を用いて、6 種類のメチレン型類縁体を合成し、その抗HCV活性 (レポーター遺伝子アッセイ、リアルタイムRT-PCR)、並びに細胞毒性試験を行った (図4)。



entry	R	X	B	EC ₅₀ ^a (μM)	CC ₅₀ ^a (μM)
1	Ph	CH ₂	CP	15.1 ± 0.4	76.3 ± 5.2
2	Ph	CH ₂	A	>200	—
3	MeO	CH ₂	CP	32.9 ± 1.6	>200
4	MeO	CH ₂	A	>200	—
5	Me(MeO)N	CH ₂	CP	40.4 ± 1.4	>200
6	Me(MeO)N	CH ₂	A	>200	—
7	Ph	O	CP	6.1	111

^aEC₅₀: 50% effective concentration; CC₅₀: 50% cytotoxic concentration

(図4)



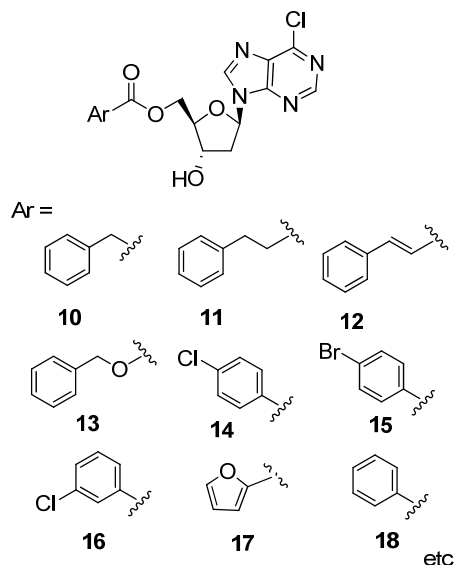
(図5)

その結果、5'位にフェナシル基を導入した類縁体においても効果的な抗HCV活性を示すことが明らかとなった (図4 entry 1 & 図5)。この知見は、5'位にヒドロキシ基を持たないヌクレオシド類縁体においても抗HCV活性を示し、即ちそれは既知のチェーンターミネーションによる抗ウイルス活性の作用機序とは異なる、新しい機序であることを

支持するものである。これは、抗HCV薬の創薬研究を行う上で興味深い知見であり、また、耐性出現の激しいウイルスを標的とした創薬研究においては、このような新たな作用機序の可能性は重要な情報になり得ると思われる。本研究に関しては、医薬化学系学術誌 (Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters) にて論文発表を行った。一方、メチレン部をより酸素原子に近づけるため、ジフルオロメチレンを用いた類縁体の合成法も検討したが、残念ながら未だ合成の成功には至っておらず大幅な進展は見られなかった。

2009年度：

2008年度の研究成果から、5'位酸素原子をメチレン鎖に置換したヌクレオシド類縁体においても抗HCV活性を示すことが明らかとなったが、その値は酸素原子を有するものよりは低かった。また、芳香族環部分においても十分な検討は為されていなかった。そこで09年度は、5'位修飾型ヌクレオシド類縁体のうち、6-クロロプリン-2'-デオキシリボシドの5'位酸素原子はそのまま維持し、その酸素上に様々な置換基 (特に共役系化合物) を導入した類縁体の合成 (図2に従い合成)、ならびにその抗ウイルス活性について検討した。その結果、5'位水酸基をベンジルオキシカルボニル基でマスクしたもの **13** や、ケイ皮酸エステル化したもの **12** が、従来型の安息香酸エステル体 **18** よりも高い抗HCV活性を示した (図6)。また、芳香族上に塩素や臭素等のハロゲン原子を導入したもの **14** - **16** も効果的な抗HCV活性を示した。その他、フラン等の芳香族複素環の導入も検討した。



(図6)

今回の実験結果から、5'位近傍には、共役系、特に芳香族環やヘテロ原子の導入が効果的であることが明らかとなり、それは、HCVのRNAポリメラーゼ中の脂溶性ポケットへの相互作用が効果的に働いているものと考えられる。これは、Youhoon ChongらがBioorganic & Medicinal Chemistry Letters紙(18巻、4661頁～)にて報告しているdiketoacid(ADK)類縁体の作用部位と関連している可能性も示唆され、興味深い知見である。そのため、このADK類縁体とのハイブリッド化合物への展開は、新規作用メカニズムを示すヌクレオシド類縁体の新たな発展へと繋がるのが期待される。よって、次の展開として、5'位修飾基としての芳香族複素環にさらに着目し、その合成および抗HCV活性について検討していくことにした。

2010年度：

09年度の結果から、10年度はヌクレオシドの5'位修飾部位に用いる芳香族複素環の合成を中心に検討した。特に、抗ウイルス活性の期待できるβカルボリン類に焦点を置き、その効率的な合成法を検討したところ、トリフルオロメチル体(図3：X=F)に対しての水素化ジイソブチルアルミニウム(DIBAL)による還元環化反応がカルボリン合成に効果的であり、Red-Alやトリエチルシラン、MPV還元等の他の還元条件を用いては再現できないことを見出した。さらにDIBALによる反応条件について、添加剤や反応温度の検討を加えたところ、還元後の環化には高温が必要であることや塩基の添加も効果的であることを見出した。また、他の求核試薬として、グリニャール試薬や有機アルミニウム試薬等の有機金属試薬を用いてのアルキル化を経る環化反応への応用を検討したところ、予想に反して、2量体と思われるカルボリン類の生成を確認した。この詳細については未だ不明な点も多いが、新規反応へとつながる興味深い知見である。次に、種々の置換基Rを有するインドール類を用いての環化反応、つまり種々の置換基を有するカルボリン類の合成へと展開したところ、4位にメチル基やベンジル基だけでなく、アリル基の導入も可能であることを見出した。今回得た種々の知見は、残念ながら収率が十分な値では無く、その量的供給の問題からヌクレオシドへの導入・応用には至らなかった。収率の改善、ならびにヌクレオシドへの導入は今後の課題である。しかしながら今回の成果は、芳香族化合物の新たな合成法、特にフッ素原子を足掛かりとするユニークな方法の新規な例であり、医薬品化学の分野だけでなく、有機合成化学の分野においても興味深く意義のある成果であると思われる。

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2件)

- ① Synthesis and anti-HCV activity of 2',5'-deoxy-5'-phenacyl adenosine analogs
Ikejiri, M.; Ohshima, T.; Fukushima, A.; Shimotohno, K.; Maruyama, T.
Nucleic Acids Symp. Ser. **2009**, *53*, 103-104. (査読無)
- ② Synthesis and evaluation of 5'-modified 2'-deoxyadenosine analogues as anti-hepatitis C virus agents
Ikejiri, M.; Ohshima, T.; Fukushima, A.; Shimotohno, K.; Maruyama, T.
Bioorg. Med. Chem. Lett. **2008**, *18*, 4638-4641. (査読有)

[学会発表] (計1件)

- ① Ikejiri, M.; Ohshima, T.; Fukushima, A.; Shimotohno, K.; Maruyama, T.
Synthesis and anti-HCV activity of 2',5'-deoxy-5'-phenacyl adenosine analogs
The 6th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry
Sep. 2009. Takayama, Gifu, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池尻 昌宏 (MASAHIRO IKEJIRI)
大阪大谷大学薬学部・講師
研究者番号：00412396

(2) 研究協力者

大島 隆幸 (TAKAYUKI OHSHIMA)
徳島文理大学香川薬学部・准教授

丸山 徳見 (TOKUMI MARUYAMA)
徳島文理大学香川薬学部・教授