

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19076

研究課題名(和文)大環状天然物の立体配座制御による高選択的な抗HIVシーズの開発

研究課題名(英文) Synthetic studies of macrocyclic terpenoids toward development of highly selective anti-HIV seeds by controlling stereoconformation

研究代表者

塚野 千尋 (Tsukano, Chihiro)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：70524255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、望ましくない生物活性を抑えた新規PKCリガンドを創出することを目的として、lathyrane型大環状テルペノイド 3,12-di-O-acetyl-8-O-tigloylingol (ELAC)の合成について検討した。具体的には、二つのフラグメントを連結する収束的合成法を計画し、右側フラグメントについては、ビニログスアルドール反応を鍵として連続した立体中心を構築した。また、左側フラグメントについては、種々検討の結果、分子内アルドール反応により望みの位置に置換基を有する重要中間体を合成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ELACの合成経路を確立することにより構造活性相関研究が可能となる。この構造活性相関の知見に基づき、Shock and Kill療法のための新規治療薬シーズを指向した高選択的な生物活性を有する化合物を創出できる可能性がある。また、これまでにlathyrane型骨格の天然物の合成研究はほとんど報告がなく、本研究によりELACの全合成を達成した時には有機合成化学的観点からも大きなインパクトが期待できる。本研究では、特にPKCを活性化するジテルペノイド天然物の中から、立体配座の制御が可能な大環状化合物に着目している点も特徴である。

研究成果の概要(英文)：Toward development of a new PKC ligand without undesired side effects, synthesis of a macrocyclic diterpenoid 3,12-di-O-acetyl-8-O-tigloylingol (ELAC) that activate PKC was investigated. To synthesize this terpenoid, we planned a convergent synthetic route via coupling of two fragments. For the right fragment, we constructed contiguous stereocenters by using the vinylogous aldol reaction. For the left fragment, a five-membered intermediate with a substituent at the desired position was synthesized by an intramolecular aldol reaction.

研究分野：生物有機化学

キーワード：合成化学 有機化学 構造活性相関 全合成 生理活性 HIV

1. 研究開始当初の背景

(1) HIV 治療に関する現状

HIV は後天性免疫不全症候群 (AIDS) を引き起こすウイルスであり、2016 年末時点で、全世界で 3670 万人以上の HIV 感染者がおり、毎年約 180 万人の新規感染者と 100 万人の AIDS による死亡者が発生している。近年、HIV 治療に関する研究が進み、安全性の高い新規抗 HIV 薬が開発されており、これらを多剤併用療法 (ART) で使用することで、HIV は治療可能な慢性感染症に変わりつつある。しかし、現在の治療法では体内のウイルスの増殖を抑えることはできるが、細胞内に潜伏している HIV プロウイルスを完全に除去することはできない¹。したがって、感染者は生涯にわたって ART を継続する必要がある。この治療のために費用や長期間の服薬の問題があり、さらに長期治療による未知の副作用のリスクもある。したがって、罹患者の体内から完全に HIV ウイルスを除去することが可能な新規 HIV 治療法の開発が急務とされている。

(2) HIV の Shock and Kill 治療法について

現行の抗 HIV 薬では潜伏感染細胞を除去することができないため、注目されているのが、潜伏感染細胞を再活性化させて排除する「Shock and Kill」と呼ばれる治療アプローチである²。このアプローチでは、潜伏感染細胞を再活性化させる薬剤 (潜伏感染再活性化剤) を使用し、「Shock」を引き起こし、その後、再活性化された細胞を ART の併用によって「Kill」することで、HIV を根治することを目指すものである (図 1)。現在、研究が進められている潜伏感染再活性化剤としては、HDAC 阻害剤、BRD4 阻害剤、protein kinase C (PKC) 活性化剤などの低分子化合物が挙げられる。特に PKC 活性化剤は強力な LRA 活性を持つことが報告されており、既存の抗癌薬やホルボールエステルなども LRA としての効果が報告されている。しかし、これらの薬剤は臨床開発段階にはまだ至っていない³。PKC 活性化剤は LRA シード化合物として有望であり、世界的に研究が進められている。現在、「Shock and Kill」治療戦略に向けた新たな LRA シード化合物の探索、開発は重要な研究課題となっている。

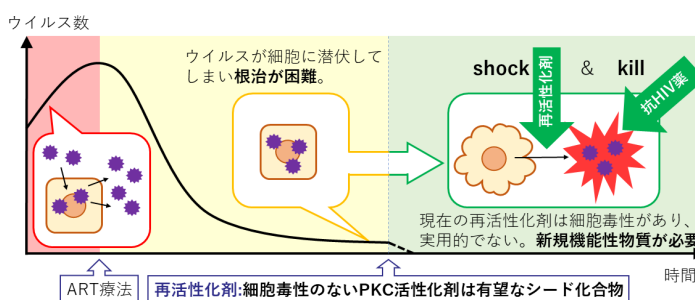


図1. 現在の HIV 治療法の限界と shock & kill 療法

(3) 3,12-Di-O-acetyl-8-O-tigloylingol (ELAC) について

3,12-Di-O-acetyl-8-O-tigloylingol (ELAC, **1**) は 1975 年にトウダイグサ科の植物 *Euphorbia lactea* のラテックスから単離された 11 員環を含むジテルペノイドである⁴ (図 2)。相対立体配置は 2 次元 NMR を含む各種 NMR スペクトル解析により 1999 年に Ahmed らによって決定された⁵。ELAC は 5/11/3 員環からなる lathyrane 型骨格が、高度に酸素官能基化された 3 環性化合物であり、10 個の不斉中心、およびエポキシドを有する。2010 年には Echeverri らによって PKC 活性化を介した潜伏 HIV 再活性化作用 ($EC_{50} = 0.5 \mu\text{g/mL}$) を有すること、また、同濃度では細胞毒性を示さなかったことが報告された⁶。また、2017 年には Castro らによって PKC β の活性化を介した神経前駆細胞の増殖作用を有することが報告されている⁷。しかし、これらの活性発現機構は解明されておらず、PKC 活性化能と潜伏 HIV 再活性化作用の直接の関係性は不明である。また、このような興味深い生理活性を有するにも関わらず、全合成や構造活性相関に関する研究は報告されていない。ELAC は柔軟に制御可能な 11 員環を有していることから、立体配座を適切に制御した構造活性相関研究を展開することにより、既存の LRA シード候補化合物を凌駕する高活性を有し、かつ、望ましくない副作用を抑えた新規 HIV 治療薬シードの開発につながる可能性がある。

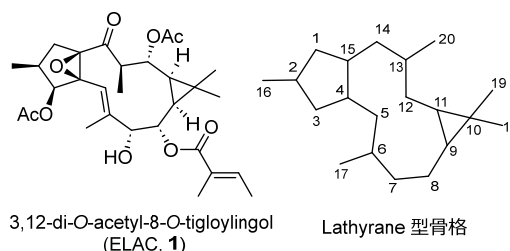


図 2. Lathyrane 型ジテルペノイド ELAC

2. 研究の目的

本研究では以下の理由から ELAC の合成法の確立を目指した。

- 比較的高い潜伏 HIV 再活性化作用を有している点
- 柔軟性のある 11 員環を有しており立体配座の制御が可能である点
- これまでに十分な構造活性相関研究がなされていない点

ELAC の合成経路を確立することにより構造活性相関研究が可能となる。さらに Shock and Kill 療法のための新規治療薬シーズを目指し、高選択的な生物活性を有する化合物を創出できる可能性がある。そこで、本研究では ELAC の構造活性相関研究の基盤となる ELAC の全合成に着手することとした。これまでに lathyrane 型骨格の天然物の合成研究はほとんど報告がなく、本研究により ELAC の全合成を達成した時には有機合成化学的観点からも大きなインパクトが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 合成計画

これまで lathyrane 型骨格を有する天然物の全合成は、A. B. Smith らの(-)-bertyadionol の合成のみである⁸。本合成ではキラルプール法を用いているが、(-)-bertyadionol に比べて ELAC は不斉点や酸素官能基が多いため、本合成をそのまま応用することはできない。特に ELAC の合成ではジメチルシクロプロパン骨格の構築、エポキシドの導入、4 つの連続した不斉中心を制御した 5 員環部分の構築、及び 6 つの連続した不斉中心を有する 11 員環の形成が課題である。そこで、ELAC (1) とその類縁体を効率よく合成するフラグメント連結による収束的合成法を立案した (図 3)。まず、lathyrane 型に特徴的な 11 員環炭素環は化合物 2 から閉環メタセシス反応 (RCM) により構築することを計画した。得られた閉環体より保護基を変換して ELAC (1) へと導く。環化前駆体 2 は左側フラグメントのエポキシケトン 3 と右側フラグメントのアルデヒド 4 をジアステレオ選択的アルドール反応により連結して合成する。本合成法の利点は、フラグメント 3、4 の組み合わせを工夫することで一挙に化学構造に多様性を付与できる点である。この際、11 員環上の置換基の立体配置を系統的に除去あるいは反転させることにより配座の微調整も可能となる。この合成経路を確立すれば、シード化合物候補を合成する過程で、構造の簡略化も迅速に実現できることが期待された。

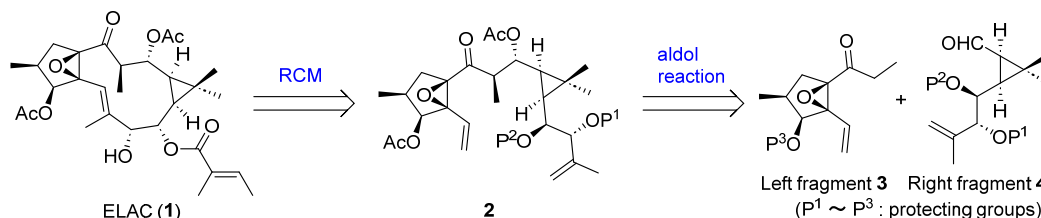


図 3. ELAC の逆合成解析

4. 研究成果

(1) 右側フラグメントの合成

連続する不斉中心を構築するために市販の methyl 2-hydroxyisobutyrate (5) から数工程で合成したアルデヒド 6 と 2-(trimethylsilyloxy)furan (7) のビニロガスアルドール反応を検討した (図 4)。種々検討した結果、水酸基の保護基にベンジル (Bn) 基を用いた基質を、BF₃·OEt₂ で処理すると反応はジアステレオ選択的に進行し、望みの付加体 8a を 86% とそのジアステレオマー 8b を 6% 与えた。本反応はグラムスケールでも良好な収率と高い選択性で進行したため、大量合成にふさわしい手法である。

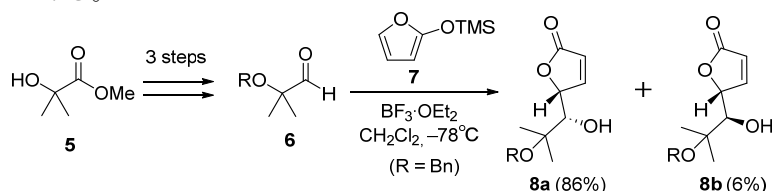


図 4. ジアステレオ選択的ビニロガスアルドール反応

化合物 **8a** の水酸基をメトキシシメチルエーテル(MOM)として保護して化合物 **9** へ変換した後、Charette らの方法⁹によるピラズリン環の形成と続く光化学反応によりジアステロ選択的に *gem*-ジメチルシクロプロパン環を構築し、シクロプロパン体 **10** を得ることに成功した (図5)。加水素分解によりベンジル基を除去した後、脱水を含む3工程でアルコール **11** をオレフィン **12** とした。ラクトン環の還元と保護基の変換で化合物 **13** として、シリル基を除去して酸化することにより右側フラグメントに相当するアルデヒド **4a** を合成した。アルデヒド **4a** の三員環に隣接する MOM エーテルのつけ根の炭素の立体化学が望みとは逆であるため、フラグメント連結後に立体反転する必要がある。一方で、炭素の立体化学の異なる類縁体は配座が異なり、生物活性を調整する上では重要であることが予想され、様々な類縁体を合成する上では有用な中間体となることが期待される。

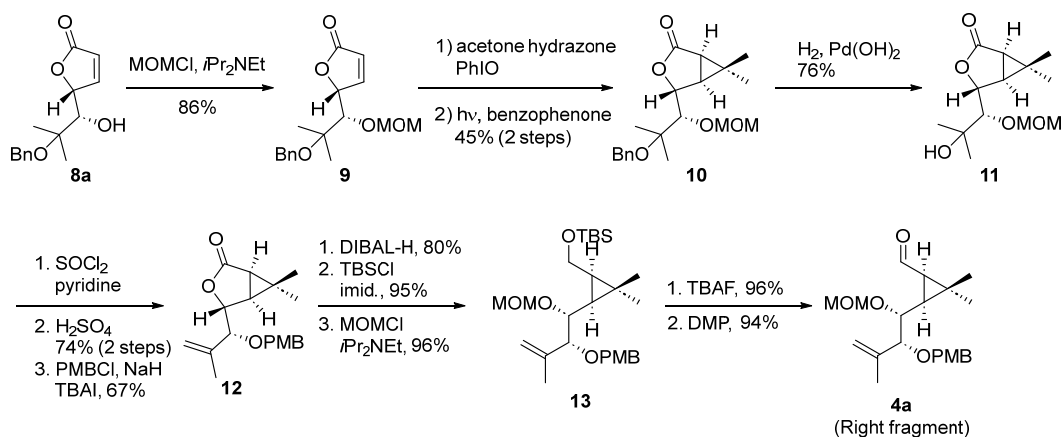


図5. 右側フラグメント **4a** の合成

(2) 左側フラグメントの5員環部の構築

左側フラグメントの5員環構築法について種々検討した。最終的に市販の methyl acrylate (**14**) と propionaldehyde (**15**) から7工程での合成経路を確立した (図6)。具体的には、**14** と **15** の森田-Baylis-Hillman 反応を含む4工程で合成した臭化アリル **16** と、methyl 3-oxovalerate (**17**) を脱プロトン化して得たジアニオンを連結してケトエステル **18** とした。二重結合をオゾン分解して生じたトリケトンを経塩基性条件で処理すると分子内アルドール縮合が進行し、目的の位置に置換基を有する5員環 **19** の構築に成功した。不飽和ケトンとエステルをそれぞれエポキシケトンとビニル基へ誘導することで右側フラグメント **3a** の合成が期待できる。

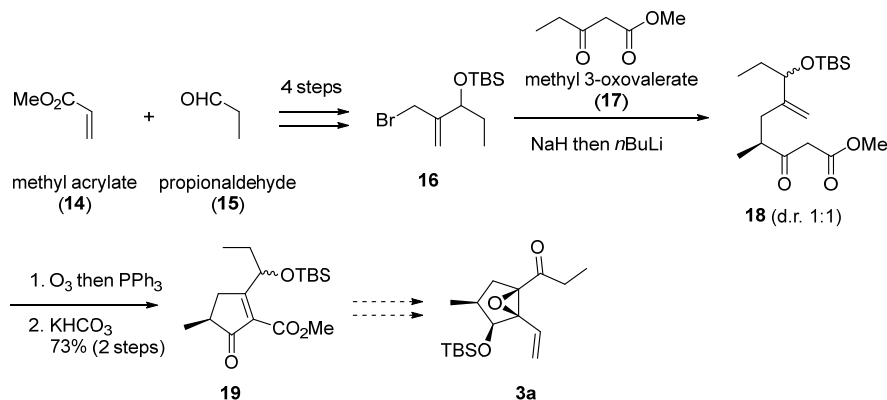


図6. 左側フラグメントの5員環部の構築

<引用文献>

1. Strain, M. C., Günthard, H. F., Havlir, D. V., Ignacio, C. C., Smith, D. M., Leigh-Brown, A. J., Macaranas, T. R., Lam, R. Y., Daly, O. A., Fischer, M., Opravil, M., Levine, H., Bacheler, L., Spina, C. A., Richman, D. D., & Wong, J. K. "Heterogeneous clearance rates of long-lived lymphocytes infected with HIV: Intrinsic stability predicts lifelong persistence." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*,

4819–4824.

2. Thorlund, K., Horwitz, M. S., Fife, B. T., Lester, R., & Cameron, D. W. “Landscape review of current HIV “kick and kill” cure research - some kicking, not enough killing.” *BMC Infect. Dis.* **2017**, *17*, 1–12.
3. Mbonye, U., & Karn, J. “Transcriptional control of HIV latency: Cellular signaling pathways, epigenetics, happenstance and the hope for a cure.” *Virology* **2014**, *454-455*, 328–339.
4. Upadhyay, R. R., & Hecker, E. “Diterpene esters of the irritant and cocarcinogenic latex of *Euphorbia lactea*.” *Phytochemistry* **1975**, *14*, 2514-2516.
5. Ahmed, A. A., Couladis, M., Mahmoud, A. A., De Adams, A., & Mabry, T. J. “Ingol diterpene ester from the latex of *Euphorbia lactea*.” *Fitoterapia* **1999**, *70*, 140-143.
6. Avila, L., Perez, M., Sanchez-Duffhues, G., Hernández-Galán, R., Muñoz, E., Cabezas, F., Quiñones, W., Torres, F., & Echeverri, F. “Effects of diterpenes from latex of *Euphorbia lactea* and *Euphorbia laurifolia* on human immunodeficiency virus type 1 reactivation.” *Phytochemistry* **2010**, *71*, 243-248.
7. Murillo-Carretero, M., Geribaldi-Doldán, N., Flores-Giubi, E., García-Bernal, F., Navarro-Quiroz, E. A., Carrasco, M., Macías-Sánchez, A. J., Herrero-Foncubierta, P., Delgado-Ariza, A., Verástegui, C., Domínguez-Riscart, J., Daoubi, M., Hernández-Galán, R., & Castro, C. “ELAC (3,12-di-*O*-acetyl-8-*O*-tigloilingol), a plant-derived lathyrane diterpene, induces subventricular zone neural progenitor cell proliferation through PKC β activation.” *Br. J. Pharmacol.* **2017**, *174* (14), 2373–2392.
8. Smith, A. B., Dorsey, B. D., Visnick, M., Maeda, T., & Malamas, M. S. “Synthesis of (-)-bertyadionol.” *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3110–3112.
9. Allouche, E. M. D., & Charette, A. B. “Non-stabilized diazoalkane synthesis *via* the oxidation of free hydrazones by iodosylbenzene and application in *in situ* MIRC cyclopropanation.” *Chem. Sci.* **2019**, *10*, 3802–3806.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 土井貴裕, 塚野千尋, 入江一浩
2. 発表標題 ラテラン型ジテルペン3,12-di-0-acetyl-8-0-tigloyl ingolの全合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会大会（広島）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学 教育研究活動データベース http://kyouindb.iimc.kyoto-u.ac.jp/j/rk9xV ORCID ID https://orcid.org/0000-0002-9361-0857 researchmap URL https://researchmap.jp/tsukano_chihiro

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
研究 分 担 者	明里 宏文 (Akari Hirofumi) (20294671)	京都大学・ヒト行動進化研究センター・教授 (14301)	

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
---------	---------