

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：35413

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590155

研究課題名(和文) 多重感染予防のための分子設計に基づくパラインフルエンザウイルス治療薬の合成研究

研究課題名(英文) Synthesis and Biological Evaluations as Inhibitors of Human Parainfluenza Virus-1 based on the Computational Design for Prevention of Multi-infectious Diseases

研究代表者

池田 潔 (Ikeda, Kiyoshi)

広島国際大学・薬学部・教授

研究者番号：40168125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトパラインフルエンザウイルス(hPIV-1)は幼児にしばしば気管支疾患を引き起こす病原性ウイルスの一つであるが現在有効な治療薬はない。Zanamivirは2,3-不飽和シアル酸誘導体であることから、3,4-不飽和シアル酸誘導体の抗ウイルス活性に興味を持たれる。これまでシアル酸にFerrierグリコシル化反応を適用した例はなく、その反応動向および生成物の生物活性も興味深い。hPIV-1シアリダーゼ阻害剤の開発研究の一環として、Ferrierグリコシル化反応を利用した新規3,4-不飽和シアル酸誘導体の合成と阻害活性の検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Human parainfluenza virus type 1 (hPIV-1) is a serious pathogen causing upper and lower respiratory disease in infants and young children; however, there are no known effective inhibitors of hPIV-1 infection. We report herein the synthesis of 3,4-unsaturated sialic acid derivatives promoted by Bi(OTf)₃-montmorillonite K-10 and their evaluation of their inhibitory activities against hPIV-1 sialidase. Among synthesized compounds, cyclohexyl derivative showed the most inhibitory activity against hPIV-1 sialidase (IC₅₀ = 1.7 mM). However, the degree of its inhibition was much weaker than that of DANA (IC₅₀ = 0.2 mM). It is suggested that the expression of inhibitory activity of sialic acid derivatives against hPIV-1 requires the structural feature of a 2,3-double bond of sialic acid. The present findings should provide useful information for the development of anti-human parainfluenza virus compounds.

研究分野：薬学・創薬化学・生物活性物質

キーワード：シアル酸 パラインフルエンザウイルス シアリダーゼ阻害剤

1. 研究開始当初の背景

世界的な温暖化は感染症のリスクを高めている。病原性ウイルスの一つであるヒト病原パラインフルエンザ (hPIV) は 1 型から 4 型が知られており、特に 3 型ウイルス (hPIV-3) は免疫力の弱い小児の初期感染において気管支炎や肺炎などの重篤な症状を引き起こす呼吸器系病原ウイルスであり臨床的に重要である。最近、hPIV が高齢者、妊婦、慢性肺疾患、心疾患、腎疾患、免疫不全症などの免疫力の低下したハイリスク群患者に日和見感染から多重感染を引き起こす危険性が指摘されている。しかし hPIV の感染機構や病原性の原因は解明されておらず、hPIV 感染症の診断法、予防するワクチンや治療薬も皆無である。

2. 研究の目的

このような現状を踏まえ、ウイルスの変異を克服し宿主細胞への侵入と細胞からの遊離 (発芽) の前者または両者を阻止できる画期的な次世代 (第 3 世代) の抗ウイルス薬の開発が切望されている。申請者はこれまでのシアル酸研究の実績をもとに効率よく新規シアル酸誘導体の合成を行い、臨床応用可能なパラインフルエンザ治療薬の開発を計画した。申請者が開発しリード化合物としているシアリダーゼ阻害剤は、現在、世界で最も活性が高く、実用的な hPIV-1 型治療薬への最短距離に位置すると考えられる。本研究はシアル酸誘導体を用いた化学的アプローチによるウイルス受容体の解明により、これを模倣した分子をデザイン、構築するものであり、オーファン薬の開発として学術的に極めて意義高く、社会的、経済的効果を期待できるものである。

3. 研究の方法

申請者は 3,4-不飽和シアル酸誘導体の抗ウイルス活性に興味を持たれる。これまでシアル酸に Ferrier グリコシル化反応を適用した例はなく、その反応動向および生成物の生物活性も興味深い。hPIV-1 シアリダーゼ阻害剤の開発研究の一環として、申請者が見出した Ferrier グリコシル化反応を利用した新規 3,4-不飽和シアル酸誘導体の合成と阻害活性の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 3,4-不飽和シアル酸誘導体としては 2-メトキシ-3,4-不飽和シアル酸誘体の合成例しかない。我々は BIT-K10 触媒存在下、Neu5Ac から 3 段階 (76%) で合成したオキサゾリン誘導体とアルコール体との Ferrier 反応により 2-アルコキシ-3,4-不飽和シアル酸誘体 (32-95%) が好収率で得られることを見出した。

(2) Ferrier グリコシル化反応の適用範囲を拡大するために、イミダートを脱離基として用いる Schmidt 法を検討した。オキサ

ゾリン誘導体から BIT-K10 を用いた Ferrier 反応により OH 体とし、さらにイミダート体を高収率 (96%) で得た。イミダート体とアルコール体との反応はルイス酸として AgOTf および Pd 触媒 (5-20 mol%) を用いて比較検討した。その結果、Pd 触媒では AgOTf に比べて反応が短時間 (20 min) で完了し 3,4-不飽和シアル酸誘導体 (26-69%) を与えた。また OH 体を TTBP 存在下、Ph₂S₂O/Tf₂O との Crich 法により 2-シアリルオキソスルホニウム体とし、続けて系内にアルコール体を加えることで one-pot で簡単に 3,4-不飽和シアル酸誘導体 (26-53%) を得ることができた。Pd 触媒を用いる Schmidt 法では反応時間が大幅に短縮され、体の比率が増大した。また Schmidt 法は求核性が低く、立体障害が大きなアルコールにも有効であった。次に 3,4-不飽和シアル酸誘導体を脱保護し hPIV-1 シアリダーゼ阻害活性を調べた結果、シクロヘキシル基を含む 3,4-不飽和シアル酸誘導体が最も強い阻害活性 (IC₅₀ 1.7 mM) を示した。その阻害作用は DANA に比べて弱かった。シアリダーゼ阻害活性発現には 2,3-不飽和シアル酸構造の存在が重要であることが示唆された。

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 11 件)

1. Ferrier glycosylation reaction catalyzed by Bi(OTf)₃-MONTMORILLONITE K-10: efficient synthesis of 3,4-unsaturated sialic acid derivatives: synthesis and biological evaluation as inhibitors of human parainfluenza virus type 1, Mai Oba, Yayoi Ueno, Satoru Kitani, Takuya Hayakawa, Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki, Masayuki Sato, Kiyoshi Ikeda, *Heterocycles*, **89**, 69-81 (2014). (査読有) DOI: 10.3987/COM-13-12861
2. Visualization of sialidase activity in mammalian tissues and cancer detection with a novel fluorescent sialidase substrate, Akira Minami, Tadamune Otsubo, Daisuke Ieno, Kiyoshi Ikeda, Hiroaki Kanazawa, Kosuke Shimizu, Ko Ohata, Tsunehiro Yokochi, Yuuki Horii, Hokuto Fukumoto, Risa Taguchi, Tadanobu Takahashi, Naoto Oku, Takashi Suzuki, *PLoS ONE*, 9, e8194 (2014). (査読有) PLOS ONE/www.plosone.org
3. Histochemical imaging of alkaline phosphatase using a novel fluorescent substrate, Tadanobu Takahashi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Akira Minami, Takashi Suzuki, *Biol. Pharm. Bull.*, **37**, 1668-1673 (2014). (査読有) <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2014.04.005>
4. N-Glycolylneuraminic acid on human

- epithelial cells prevents entry of influenza A viruses that possess *N*-glycolylneuraminic acid binding ability, Tadanobu Takahashi, Maiko Takano, Yuuki Kurebayashi, Midori Masuda, Sawako Kawagishi, Masahiro Takaguchi, Takashi Yamanaka, Akira Minami, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Takashi Suzuki, *J. Virol.* 2014, 88(15) 8445. (査読有) DOI: 10.1128/JVI.00716-14
5. Imaging of influenza virus sialidase activity in living cells, Yuuki Kurebayashi, Tadanobu Takahashi, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Shunsaku Takahashi, Maiko Takano, Takashi Agarikuchi, Tsubasa Sato, Yukino Matsuda, Akira Minami, Hiroaki Kanazawa, Yuko Uchida, Takehiko Saito, Yoshihiro Kawaoka, Toshihiro Yamada, Fumihiko Kawamori, Robin Thomson, Mark von Itzstein, Takashi Suzuki, *Sci. Rep.*, 4, 4877 (2014). (査読有) DOI: 10.1038/srep04877
 6. Histochemical fluorescent staining of Sendai virus-infected cells with a novel sialidase substrate, Maiko Takano; Tadanobu Takahashi, Takashi Agarikuchi, Yuuki Kurebayashi, Akira Minami, Tadamune Otsubo, Kiyoshi Ikeda, Hiroaki Kanazawa, Takashi Suzuki, *Virology*, 464-465, 206-212 (2014). (査読有) <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2014.04.005>
 7. Syntheses of 2-deoxy-2,3-didehydro-*N*-acetylneuraminic acid analogues modified by α -acylaminoamido groups at the C-4 position using isocyanide-based four-component coupling and biological evaluation as inhibitors of human parainfluenza virus type 1, Reiko Nishino, Takuya Hayakawa, Tadanobu Takahashi, Takashi Suzuki, Masayuki Sato, Kiyoshi Ikeda, *Chem. Pharm. Bull.*, **61**, 69-74 (2013). 査読有 DOI: 10.1016/j.bmc.2011.02.010
 8. 2-(Benzothiazol-2-yl)-phenyl- β -D-galactopyranoside derivatives as fluorescent pigment dyeing substrates and their application for the assay of β -D-galactosidase activities, Tadamune Otsubo, Akira Minami, Haruna Fujii, Risa Taguchi, Takanobu Takahashi, Takashi Suzuki, Fumiteru Teraoka, Kiyoshi Ikeda, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **23** (2013) 2245-2249. (査読有) <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.01.043>
 9. Catalytic preference of *Salmonella typhimurium* sialidase for *N*-acetylneuraminic acid residues over *N*-glycolylneuraminic acid residues, Akira Minami, Sayaka Ishibashi, Kiyoshi Ikeda, Erika Ishitsubo, Takanori Hori, Hiroaki Tokiwa, Risa Taguchi, Daisuke Ieno, Tadamune Otsubo, Yukino Matsuda, Saki Sai, Mari Inada, Takashi Suzuki, *FEBS Open Bio* 3 (2013) 231-236. (査読有) <http://dx.doi.org/10.1016/j.fob.2013.05.002>
 10. 3-*O*-sulfated glucuronide derivative as a potential anti-dengue virus agent. Kazuya I. P. J. Hidari, Kiyoshi Ikeda, Ippei Watanabe, Tomoko Abe, Ayumi Sando, Yuji Itoh, Hiroaki Tokiwa, Kouichi Morita, Takashi Suzuki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **424** (2012) 573-578. (査読有) <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.002>
 11. Origin of the inhibitory activity of 4-*O*-substituted sialic derivatives of humanparainfluenza virus, Yuji Itoh, Ayumi Sando, Kiyoshi Ikeda, Takashi Suzuki, Hiroaki Tokiwa, *Glycoconj J.* **29** (2012) 231-237. (査読有) DOI:10.1007/s10719-012-9384-3
- [学会発表](計12件)
1. 大坪忠宗他、蛍光性顔料色素を用いた新規蛍光シアリダーゼ基質の合成に関する研究、日本薬学会第134年会(熊本) 2014年3月29日.
 2. 紅林佑希他、インフルエンザウイルス感染細胞を迅速に検出する新規シアリダーゼ基質の開発、日本薬学会第134年会(熊本) 2014年3月30日.
 3. 高橋忠伸他、シアリダーゼを有するウイルスの感染細胞を簡便・迅速に視覚化する蛍光プローブの開発、第78回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム(名古屋) 2014年5月24日.
 4. 紅林佑希他、シアル酸蛍光プローブを用いたインフルエンザウイルス検出法の確立、第33日本糖質学会(名古屋) 2014年8月10日.
 5. 松本莉穂他、フルオラス・タグを用いた新規シアリル化反応、日本薬学会第134年会(熊本) 2014年3月29日.
 6. 寺岡文照他、新規 Dengue ウイルス感染阻害剤の合成、日本薬学会第134年会(熊本) 2014年3月29日.
 7. 池田潔他、新規 Dengue ウイルス感染阻害剤の合成研究() 第32回メディシナルケミストリーシンポジウム(神戸) 2014年11月27日.
 8. 高橋忠伸他、新規シアリダーゼの蛍光基質を利用したウイルス感染部位の局所染色、第32日本糖質学会(大阪) 2013年8月5日.
 9. 南彰他、新規蛍光基質プローブを利用したシアリダーゼ活性の可視化、第32日本糖質学会(大阪) 2013年8月6日.
 10. 常盤広明他、糖置換基導入による水溶性フォトクロミック分子の合成と評価、第32日本糖質学会(大阪) 2013年8月7日.
 11. 山藤歩、新規 Dengue ウイルス感染治療薬の理論的設計・開発、第31回メディシナルケミストリーシンポジウム(広島) 2013年11月20日.

12. 寺岡文照他、新規デングウイルス感染
阻害剤の合成研究、第31回メディスナ
ルケミストリーシンポジウム（広島）
2013年11月21日.

〔産業財産権〕

出願状況（計 1件）

名称：水溶性フォトクロミック分子
発明者：常盤 広明、入江 正浩、池田 潔、
大坪 忠宗
権利者：学校法人立教学園、学校法人常翔学
園
種類：特許権
番号：特願 2012-199292
出願年月日：2012年9月11日
国内外の別： 国内

取得状況（計 1件）

名称：抗デングウイルス剤
発明者：鈴木 隆、左 一八、池田 潔
権利者：静岡県公立大学法人、学校法人常翔
学園
種類：特許権
番号：特開 2010-97054
出願年月日：2010年11月5日
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 潔（IKEDA KIYOSHI）
広島国際大学・薬学部・教授

研究者番号：40168125