

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651254

研究課題名(和文)非可逆的酵素阻害反応によるトリパノソーマ症治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of new therapeutic reagents for trypanosoma disease based on the irreversible enzyme inhibition mechanism

研究代表者

西村 紳一郎(Nishimura, Shinichiro)

北海道大学・先端生命科学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00183898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：リパノソーマ症(シャーガス病)は中南米諸国で猛威を奮う深刻な感染症で既に2000万人以上が感染しており、毎年約2万人が本感染症により死亡している。現在、nifurtimoxとbenznidazoleのみが治療薬として承認されているが、その効果は満足できるものではないため新規な医薬品の開発が強く望まれている。

我々は新たなシアリダーゼの自殺基質型誘導体がシャーガス病に対する感染症治療薬の有望なリード化合物である事を発見した。そこで、本研究課題ではこの自殺基質型誘導体のナノ微粒子表面への集積法を確立することを第一の目的とし、ナノ医薬品としての治療薬候補の創製に繋げることを期間内の目標とした。

研究成果の概要(英文)：Cardiopathy caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease, is the main cause of death in endemic regions of Latin America. Since nifurtimox and benznidazole are approved as therapeutic reagents for this disease, the efficacy is limited and serious side effects and toxicity were reported. Therefore, advent of novel therapeutic reagents has been strongly required.

We have discovered by collaborative research with a team at University of Rio de Janeiro that some suicide substrate-based derivatives of sialidases become a new class of leads toward drugs for the treatment of infectious diseases related to the Chagas' disease. In the present study, we aimed to establish for the general protocol for the assembling suicide substrate-based derivatives on the surface of nanoparticles that it can convert into practically promising level of therapeutic reagents candidates as "nanomedicine".

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：Chagas' disease *Trypanosoma cruzi* sialyase inhibitor suicide substrate nanoparticle nanomedicine

### 1. 研究開始当初の背景

トリパノソーマ症(シャーガス病)は中南米諸国を中心に猛威を奮う深刻な感染症でありワクチンや特効薬も存在しないため、現在もその感染被害が拡大している。治療薬として承認されている nifurtimox と benznidazole の治療効果は満足できるものではなく、また副作用が深刻であるため新規な医薬品の開発が強く望まれている。この病気は *Trypanosoma cruzi* (T. cruzi) という原虫による感染症で、ブラジルサシガメなどのカメムシがヒトに媒介することが知られている。T. cruzi の膜タンパク質であるトランスシアリダーゼ (*Trypanosoma cruzi* trans-sialidase, TcTs) は宿主のシアル酸を自身のムチンへ転移する反応を触媒する酵素であり、これにより宿主からの排除機構を免れていると言われるが、加えて宿主の血液中においても T 細胞表面の CD43 分子への特異的  $\alpha 2,3$  シアル酸転移反応によりアポトーシスを誘導して宿主の免疫システムそのものをも崩壊させていることが報告されている。従って、TcTs はトリパノソーマ感染症の治療薬開発における有望な標的分子とみなすことができるため本酵素に対する有効な阻害剤の研究開発が期待されてきた。しかし、インフルエンザウイルスの治療薬であるタミフルやリレンザ等の優れたシアリダーゼ阻害剤は TcTs には全く効果が無いため新しい阻害剤設計のコンセプトが必要とされていた。また、インフルエンザのシアリダーゼ同様酵素の活性中心近傍におけるアミノ酸のミューテーションによる薬剤耐性の獲得も予想される。そこで新たに自殺基質型誘導体による非可逆的の反応機構に基づく阻害剤の分子設計を企図することとした(基本原理は J. Biol. Chem. 2004 および Biochemistry 2005 に発表)。2006年から継続中のブラジルの研究チームとの共同研究により、この感染症治療薬の有望なリード化合物を発見した(Glycobiology 2010 に共同発表)。

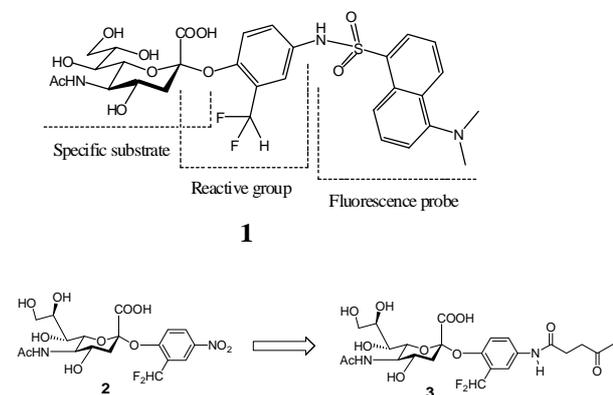
### 2. 研究の目的

自殺基質型誘導体(リード化合物)は TcTs による加水分解反応で生じる活性型アグリコン部(非シアル酸部分)が再び TcTs の求核性アミノ酸残基からの攻撃を受けて新たな共有結合を形成することで本酵素のシアリダーゼ活性そのものが失われるという非可逆的の反応機構に基づいている。最近の動物実験による初歩的な評価結果によるとこの化合物は benznidazole との併用による治療法の有効性が示唆されたものの(未発表データ)実際に治療薬候補とするためには TcTs との親和性をさらに増強すること、および、ヒトへの感染を媒介するトリパノソーマ原虫への取り込みを促進することが必要であると判断した。そこで本研究課題では金ナノ微粒子表面等への自殺基質型誘導体の集積

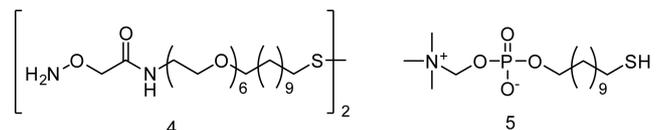
法を確立してヒトに投与できるレベルの新たなナノ医薬品としてのトリパノソーマ症治療薬の実現に挑戦することを最終目標とした。

### 3. 研究の方法

非可逆的のシアリダーゼ阻害剤が TcTs の活性部位において必須の求核性アミノ酸残基である Asp247 の機能を共有結合形成により完全にブロックできるというメカニズムに基づき、その効果を最大化するために金ナノ微粒子表面への配向制御した集積提示法を開発する。具体的には既に阻害剤としての有効性が示されている化合物 1 を様々な分子との複合化が可能となる化合物 3 への変換を、中間体 2 を経由して合成する。



さらに、ナノ微粒子表面への分子提示用リンカーとして既に当研究グループで開発済みの、末端にアミノオキシ基を有するチオール化合物 4 ならびにナノ微粒子表面での非特異的吸着反応の制御に有効なホスホリルコリン(PC)型表面被覆リンカー 5 で被覆されたナノ微粒子表面へ化合物 3 をその密度を変えて提示する。リコンビナント TcTs による *in vitro* での阻害効果のスクリーニングを行うと同時に、治療効果のモニタリングを可能とするため生細胞や小動物での蛍光イメージングが可能な名の微粒子である量子ドットへの提示技術についても検討して動物実験による POC (proof of concept) の獲得と安全性試験へと進展させる。



### 4. 研究成果

図 1 に示す合成スキームに従い、目的とする新規化合物 3 を高収率にて調製した。目的物の構造と純度などは NMR 並びに質量分析法などにより確認した。また、本合成スキームはキログラム単位での大量合成にも対応できる理想的な製造工程となり得る。

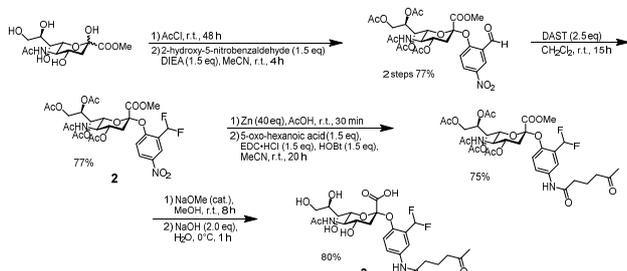


図1 化合物3の合成スキーム

化合物3のスペクトルデータについては以下の通り。<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 500 MHz): □ 7.56 (d, 1 H, J = 2.0 Hz), 7.33 (dd, 1 H, J = 8.8 Hz, J = 2.3 Hz), 7.25 (d, 1 H, J = 8.9 Hz), 6.98 (t, 1 H, J = 55.1 Hz), 3.82–3.71 (m, 4 H), 3.65 (ddd, 1 H, J = 11.6 Hz, J = 9.4 Hz, J = 4.8 Hz), 3.53–3.48 (m, 2 H), 3.09 (q, 6 H, J = 7.4 Hz), 2.79 (dd, 1 H, J = 12.6 Hz, J = 4.7 Hz), 2.53 (t, 2 H, J = 7.4 Hz), 2.29 (t, 2 H, J = 7.4 Hz), 2.08 (s, 3 H), 1.92 (s, 3 H), 1.86–1.77 (m, 3 H), 1.17 (t, J = 7.2 Hz, 8 H). <sup>13</sup>C NMR (D<sub>2</sub>O, 125 MHz): □ 215.52, 175.01, 174.81, 172.05, 133.14, 125.16, 121.89, 119.32, 111.66, 103.03, 73.47, 71.65, 68.10, 67.98, 62.58, 51.64, 46.60, 42.01, 40.36, 35.27, 29.21, 21.97, 19.36, 8.16; ESIMS (m/z) calcd for C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub> [M – H] – 561.19, found 561.19; HR-ESIMS (m/z) calcd for [M – H] – C<sub>24</sub>H<sub>31</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub> 561.1901, found 561.1912.

本化合物3を既報 (J. Am. Chem. Soc. 2011 133, 12507-12517) に発表済みのプロトコルに従って代表的なナノ微粒子である量子ドットに提示した (図2)。

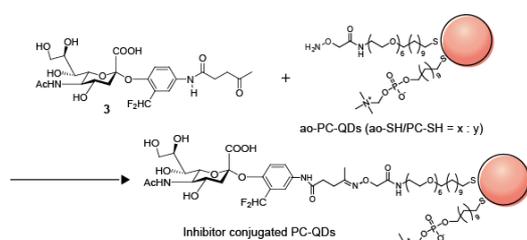


図2 自殺基質を提示した量子ドット

その結果、これまでに報告した糖鎖、糖ペプチドあるいはグリコシド化合物等と同様に化合物3はナノ微粒子表面に効果的に提示できることが確認できており、ひろい pH 領域においても自己凝集などによる沈殿物の形成は確認されなかったため、細胞や動物への投与等においても特に問題はないものと判断した。

リコンビナント TcTs (Bioorg. Med. Chem. 2010 18, 1633-11640) を用いた *in vitro* の酵素阻害活性反応の評価とナノ微粒子表面における本化合物3によるクラスター効

果の評価については現在、生物活性の発現に最適な密度を設定することを目的として鋭意実験を継続中である。また、本プロトコルの有効性についてはインフルエンザウイルスの感染阻止効果を指標とした実験結果について関連する研究成果として報告した (発表論文等を参照)。また、本化合物並びにこれを提示したナノ微粒子についての動物試験については研究資金の確保を含めてブラジルの研究チームとの連携研究を継続進展中であるが、本研究課題の実施期間内での成果はまだ得られていない。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

(1) Ishida J., Hinou H., Naruchi K., Nishimura S-I., “Synthesis of neoglycosphingolipid from nethoxyamino-functionalized ceramide”, Bioorg. Med. Chem. Lett., 査読有, 24 巻, 2014, 1197-1200  
DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.12.091

(2) Kumar R., Naruchi K., Miyoshi R., Hinou H., Nishimura S-I., “A New Approach for the Synthesis of Hyper-Branched N-Glycan Core Structures from Locust Bean Gum” Org. Lett., 査読有, 15 巻, 2013, 6278-6281  
DOI: 10.1021/ol403140h

(3) Hideshima S., Hinou H., Ebiyara D., Sato R., Kuroiwa S., Nakanishi T., Nishimura S-I., Osaka T., “Attomolar Detection of Influenza A Virus Hemagglutinin Human H1 and Avian H5 Using Glycan-blotted Field Effect Transistor Biosensor”, Anal. Chem., 査読有, 85 巻, 2013, 5641-5644  
DOI: 10.1021/ac401085c

(4) Okamoto M., Feng F., Ohyanagi T., Nagahori N., Someya K., Sakoda Y., Miura N., Nishimura S-I., Kida H., “Fluorescence polarization-based assay using N-glycan-conjugated quantum dots for screening in hemagglutinin blockers for influenza A viruses”, J. Virol. Methods, 査読有, 187 巻, 2013, 390-394  
DOI: 10.1016/j.jviromet.2012.11.004

(5) Kai H., Hinou H., Naruchi K., Matsushita T., Nishimura S-I., “Macrocyclic Mechanism-based Inhibitor for Neuraminidases”, Chem. Eur. J., 査読有, 19 巻, 2013, 1364-1372  
DOI: 10.1002/chem.201200859

(6) Kai H., Hinou H., Nishimura S-I.,

“ Aglycone-focused randomization of 2-difluoromethylphenylsialoside-type suicide substrates for neuraminidases ” ,  
Bioorgan. Med. Chem., 査読有, 20 卷, 2012,  
3729-2746  
DOI: 10.1016/j.bmc.2012.02.001

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

西村 紳一郎 (NISHIMURA Shin-Ichiro)  
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・  
教授

研究者番号：00183898