

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）  
研究期間：2007～2008  
課題番号：19590099  
研究課題名（和文） 新規インフルエンザ治療薬開発を目指したフラン融合多環系化合物の設計と合成  
研究課題名（英文） Design and Synthesis of Furan-fused Polycyclic Compounds for Development of New Anti-influenza Agents  
研究代表者  
根本 英雄（NEMOTO HIDEO）  
富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・教授  
研究者番号：60006351

研究成果の概要：新しいインフルエンザ治療薬の開発を目指し、従来にない化学構造を有するフラン融合4環系化合物の構造活性相関を検討した。その結果、顕著なインフルエンザウイルス増殖抑制作用を示す新規誘導体を見出した。本薬剤は、現在汎用されているノイラミニダーゼ阻害剤（タミフルなど）とは作用機序が異なることが判り、新規な抗インフルエンザ薬の有望なシーズとなることが期待される。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：有機化学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：インフルエンザ、抗ウイルス作用、構造活性相関

## 1. 研究開始当初の背景

最近の世界における新型ウイルス性疾患、すなわち、新型肺炎ウイルスや鳥インフルエンザウイルスなどの脅威から、新しい抗ウイルス剤、特に薬剤耐性ウイルスの出現という観点からは、全く新規な化学構造や作用メカニズムを含む新型の抗ウイルス剤の開発研究が重要視され、これら医薬品開発に対する社会的需要は大きなものがある。その中でも、特にインフルエンザウイルス感染は、日本のみならずアメリカ、ヨーロッパを含む世界の広範囲にわたり、毎年人類の健康に多大な被害を及ぼしている感染症であり、常に新しい

治療薬の開発研究が求められてきている。インフルエンザ治療薬をはじめとする抗ウイルス剤の開発研究は日本を含めた世界中で精力的に展開されているが、既存薬や天然抽出物の改良、作用機構解明を中心とした研究が大きな位置を占めている。抗ウイルス性医薬品には常に構造上および作用様式の新規性や作用標的の多元化が求められるにもかかわらず、現実にはここ数十年の間に開発されてきた抗ウイルス剤に完全な新規性が伴った事例は極めて少ない。実際、現在臨床の場で用いられているこれらの薬剤は、特定の酵素系にのみ単一に作用するものが大部分であるというのが現状である。

インフルエンザ治療薬に関して、現在広く用いられている amantadine は M2 プロテイン中のイオンチャンネルを阻害することで活性を発現するが、このメカニズムは本薬剤の適用範囲をインフルエンザ A ウイルスのみに限定している。最近では、endonuclease や neuraminidase 阻害作用を有する薬剤 (oseltamivir, zanamivir など) も注目されてきている。事実上極めて多数の潜在的ターゲットが病原性ウイルスに見出されてきている中、これからの抗ウイルス性医薬品開発には生化学的に全く新しい標的群に複次的に作用する新薬の探索が最も重要視されている。

本研究の対象となるフラン融合縮環系化合物群は、当研究グループの開発した方法により初めて合成が可能となった人工化合物であり、これまでの抗ウイルス剤には見られない斬新な化学構造を有している。従って従来の抗インフルエンザ薬とは異なる作用機序と独特な性質を持つ事が期待される。それゆえ、本化合物を新しい医薬品開発に結びつける事ができれば、世界に通用する新型医薬品となる可能性が高いと考えられる。

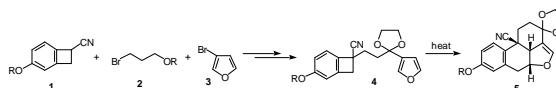
## 2. 研究の目的

これまでに当研究グループでは、ハレナキノール等の抗ウイルス活性を有する天然ポリケタイド類の合成研究を展開してきており、その過程において、合成中間化合物である 4 環系化合物群が顕著な抗ウイルス活性を発現するという新しい知見を見出した。本研究では、これらフラン融合縮環系化合物の有する抗ウイルス活性に着目し、これをリード化合物 (ポジティブコントロール) とした合成研究、ドラッグデザイン、および構造活性相関研究を進める事により、臨床利用可能な新規抗インフルエンザ薬を開発する事を主たる目的とした。これらフラン融合縮環系化合物は、当研究グループにより開発された化学的手法、すなわち、ベンゾシクロブテン誘導体の熱開裂-再閉環反応 (後述) を応用することで一般性高く供給可能であることが期待される。このような利点を最大限に活用しながら、実用的抗ウイルス剤開発という観点から克服すべき問題点として、(1) 標的化合物の安定かつ大量供給、(2) 構造的な多様性に対応できる合成経路の確立、(3) 迅速かつ再現性の高い活性評価システムの構築、これらの点を達成する事が第一目標となる。更に、これらの成果を踏まえた構造活性相関の解明、適正な分子デザインと合成、作用機序の解明などへと展開し、実用に供しうる新規抗インフルエンザ薬の候補化合物を見出すことを本研究の最終的な目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 標的化合物の安定かつ大量供給法の確立

大量入手容易なベンゾシクロブテン誘導体 **1**、適当な炭素鎖 **2**、およびフランユニット **3** を順次連結させて化合物 **4** へと導き、これを熱反応に付すことで一挙に 4 環系骨格を有する標的化合物 **5** を立体選択的に得る (Scheme 1)。この際、各段階の反応条件を精査し、スキーム全体を大量供給に対応できるよう確立する。



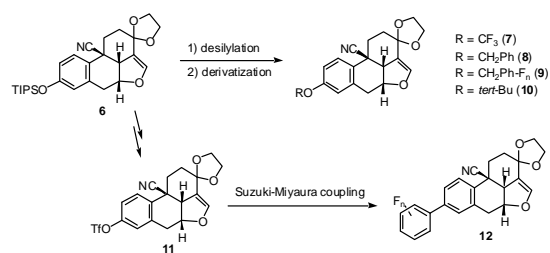
Scheme 1

### (2) C 環 (ベンゼン環) 上の置換基修飾

これまでの検討結果より、C 環上に TIPSO (triisopropylsilyloxy) 基を有する化合物 **6** が、特に強力な活性を示すことが明らかとなっている。そこで TIPS 基がどのような効果を及ぼしているのかを調査する目的で、同部位の置換基に変化をもたせたいいくつかの誘導体のデザインと合成を行うこととする。

まず、TIPS 基と類似した効果が期待される誘導体、例えばトリフルオロメチル体 **7**、ベンジルエーテル体 **8**、フルオロ置換ベンジルエーテル体 **9** などの合成を行う。これらの化合物は、TIPS 体 **6** の脱シリル化により得られるフェノール体を用いた誘導体化により合成する。更に、エーテル性酸素を取り除いた誘導体合成として、化合物 **6** より調製可能と考えられるトリプレート体 **11** を基質とした Suzuki-Miyaura カップリングの検討を行う。特に脂溶性という観点から、フェニル置換体とそのフッ素置換誘導体 **12** の合成を検討する。芳香環を有するホウ酸誘導体は入手が容易であり、非常に多種類の誘導体合成が可能になるものと考えられる。

また、TIPS 基のもう 1 つの側面として、立体的な高さ高さが活性に大きな影響を与えている可能性も考えられる。そこで類似して立体的に大きな排除体積を占める炭素置換基、*tert*-Bu 基を導入した誘導体 **10** の合成も行い、比較検討を行う (Scheme 2)。



Scheme 2

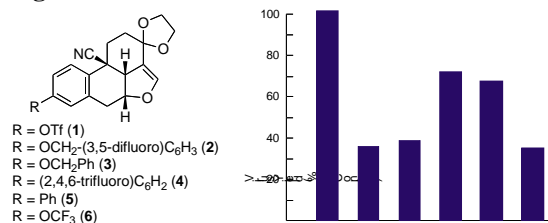
### (3) 合成誘導体の生物活性試験

合成された誘導体群について、インフルエンザウイルスに対する増殖抑制活性をはじめとする各種生物活性評価を行う。まずは、インフルエンザ A/Aichi 株の MDCK 細胞中での増殖に対する阻害効果を、Plaque assay 法にて定量する。ウイルスの増殖には、多段階増殖法を用いることとし、阻害効果の差を明確に表示できるようにする。このような1次スクリーニングで比較的優れた効果を示した化合物については、更に濃度依存性や種々のウイルス株に対する増殖阻害活性などについて精査を行う。これらの生物試験で得られた結果は、引き続き新たな分子デザイン、化学合成へとフィードバックし、より有効性の高い新規インフルエンザ治療薬の探索を進めていく。

### 4. 研究成果

フラン融合縮環系化合物の骨格構築については、Scheme 1 に従って効率良く達成することができた。特に鍵反応となるベンゾシクロブテン誘導体の連続的電子環状反応は、180°C の加熱条件下、立体選択的に収率 80% 前後で進行し、4 環系骨格構築のための強力な手法となることを確認できた。次いで、本合成法により得られた化合物のベンゼン環上置換基の修飾を検討した。まずは Figure 2 に示す 6 種の誘導体の合成を行った。化合物 2, 3 については、Williamson エーテル合成法にて、また化合物 4, 5 については、化合物 1 を基質とする Miyaura-Suzuki カップリング法にて、いずれも高収率で合成できた。これらの化合物について、インフルエンザ A ウイルスに対する増殖抑制活性を評価したところ、Figure 1 のグラフに示す通り、化合物 2, 3、および 6 において顕著な抑制活性が観察された。ポジティブコントロールとなる化合物 (R = OTIPS) では同条件下の抑制率が約 20% であり、大幅な活性の増強が認められた。しかしながらアマンタジンの活性 (抑制率約 80%) には及んでいない。

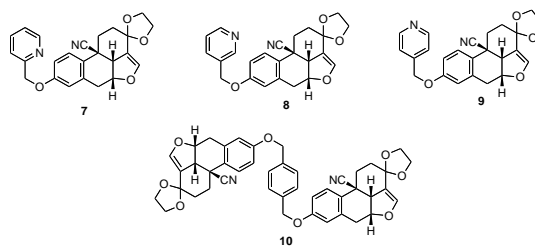
Figure 1



このように、エーテル結合型誘導体において、TIPS 誘導体やトリフルオロメチル誘導体に匹敵する活性が認められた。フェニル基など

炭素-炭素結合で直接連結した誘導体は、活性が低下することが明らかとなった。母核上にベンジルオキシ置換基を導入した誘導体が最も有効なリードとなるという知見を基にして、ベンジル置換基のバリエーションとして、ピリジン環を有する誘導体 7、8、および 9、およびベンジルオキシで架橋された二量体型誘導体 10 の設計と合成、生物活性評価を行った (Figure 2)。

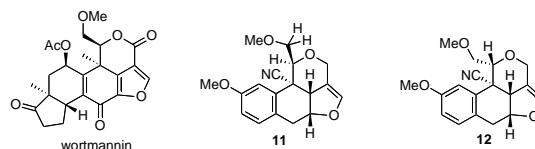
Figure 2



これらの合成については、先と同様に、対応するフェノール体に対して Williamson エーテル合成法を適用することで、効率良く達成できた。これらのフラン融合 4 環系化合物群について、抗インフルエンザウイルス活性の評価を行った。アッセイにはインフルエンザ A/Aichi 株を用いた。その結果、いずれの誘導体もポジティブコントロールとなるベンジルオキシ体に匹敵するウイルス増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。

また、生理活性天然物である Wortmannin の置換様式をフラン融合 4 環系に組み込んだ新規化合物 11 および 12 を設計し、その合成研究に取り組んだ (Figure 3)。これについても、ベンゾシクロブテン誘導体の連続的電子環状反応を応用することで、目的を達成することに成功した。なおこの際、フラン環上の保護基の種類によって、環化付加のエキソ/エンド選択性が逆転するという興味深い知見も得ている。これらの化合物についても抗インフルエンザウイルス活性評価を行い、顕著な活性を確認することができた (ウイルス増殖抑制率約 50%)。

Figure 3



また、化合物 6 について、作用メカニズム解明のための実験をいくつか行った。増殖抑制活性の時間依存性、ウイルスの mRNA 合成に及ぼす薬剤の効果等を調査した結果、本薬剤群はインフルエンザウイルス増殖サイクル

の初期段階で作用していることが示唆された。すなわち、現在汎用されているノイラミニダーゼ阻害剤（タミフル等）とは機序が異なるものと考えられる。また、細胞に対する直接的な毒性を評価したところ、200 $\mu$ M という高濃度においても顕著な毒性は観察されなかった。

本研究期間での成果から、ベンジル基を有する誘導体、トリフルオロメチル基を有する誘導体が抗インフルエンザウイルス薬として有望であることが示唆された。しかしながら、新規医薬品としての実用性という点では、更なる活性の向上が求められる。長期的には、十分に低い濃度で活性を示す誘導体の探索と共に、実用的医薬品としてクリアすべき要件（毒性、安定性、合成コスト等）についても検討を加えていきたいと考えている。

#### 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) Studies toward Intramolecular Cycloaddition of *o*-Quinodimethane with an Oxazole Moiety. Matsuya, Y.; Qin, H.; Nemoto, H. *Heterocycles*, 2009, 79, Prepress. (査読有)

(2) Approach to a New Dihydrofuran-Fused Cyclic System by a Remarkable Switching of endo/exo Selectivity of a [4+2] Cycloaddition Reaction. Matsuya, Y.; Imamura, Y.; Miyahara, T.; Ochiai, H.; Nemoto, H. *Eur. J. Org. Chem.* 2008, 1426-1430. (査読有)

〔学会発表〕（計2件）

(1) Matsuya Y., Sasaki K., Ohsawa N., Yu D.-Y., Zhao Q.-L., Ahmed K., Wei Z.-L., Kondo T., and Nemoto H. : Chemistry and Biology of Benzocyclobutenes: Facile *o*-Quinodimethane Formation and Transformation to New Bioactive Compounds. XXth International Symposium on Medicinal Chemistry, 2008. 8. 31 - 9.4, Vienna, Austria.

(2) 小林真也、佐々木和重、鈴木望美、松谷裕二、落合 宏、根本英雄：フラン融合縮環系の効率的構築と誘導体化、および抗インフルエンザ活性評価。第37回複素環化学討論会、2007、10、長野。

〔その他〕

Nemoto H. : “Benzocyclobutene” Synthetic Organic Chemistry and Medicinal Chemistry. The 20<sup>th</sup> French-Japanese Symposium on Medicinal and Fine Chemistry, 2008. 9. 7-9, Bordeaux, France. (招待講演)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

根本 英雄 (NEMOTO HIDEO)  
富山大学・大学院医学薬学研究部・教授  
研究者番号：60006351

##### (2) 研究分担者

松谷 裕二 (MATSUYA YUJI)  
富山大学・大学院医学薬学研究部・助教  
研究者番号：50255858

##### (3) 連携研究者

落合 宏 (OCHIAI HIROSHI)  
富山大学・大学院医学薬学研究部・教授  
研究者番号：30018692