

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08006

研究課題名(和文) 抗ピロリ菌活性物VDP1の効率的合成研究

研究課題名(英文) Synthesis of an Antibacterial Compound for Helicobacter pylori

研究代表者

鰐淵 清史 (kiyofumi, wanibuchi)

横浜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：00613663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌の感染は、慢性萎縮性胃炎および消化性潰瘍の原因であり、長期間に渡るピロリ菌保菌者では、胃癌を発症するリスクが顕著に高まる。本菌の除菌は、これら消化器病を予防・治療する上で重要であるが、副作用や耐性菌による除菌率低下の問題を抱えている。ピロリ菌を選択的に殺菌し、他の一般細菌に対しては作用しない新規抗ピロリ菌化合物VDP1の発見に至った。本課題ではVDP1の誘導化を考慮した効率的な大量生産である。これまでビタミンD3の酸化分解により調整していたが、水溶性の高い安定なビタミンD3誘導体を得て、非常に簡便かつ高収率でVDP1を得ることに成功した。誘導体より高ピロリ菌活性を示す化合物を得た。

研究成果の概要(英文)：VDP1 is a selective antibacterial compound that targets Helicobacter pylori and does not act on other typical bacteria. Herein, we provide a straightforward and mild one-pot method for the synthesis of VDP1 from vitamin D3. The yield of VDP1 synthesized by the ruthenium-periodate oxidation of the compound generated from the aza-Diels-Alder reaction of vitamin D3 and 4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione was greater than that produced via direct ruthenium-periodate catalytic oxidation of vitamin D3.

研究分野：天然物化学

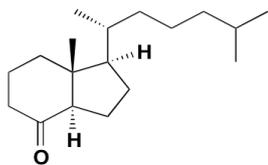
キーワード：Helicobacter pylori

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori (ピロリ菌) は慢性萎縮性胃炎、消化性潰瘍、胃 MALT リンパ腫や胃癌などと密接な関係のあることが知られている。本菌の除菌は、これら消化器病を予防・治療する上で重要であるが、副作用や耐性菌による除菌率低下の問題を抱えている。現行の治療薬はアモキシシリンおよびクラリスロマイシンなどの広域スペクトルの抗菌薬を服用するが、軟便や下痢、口内炎、味覚異常といった症状が現れることがあり、発疹、発熱、強い腹痛、血便など重篤な副作用も起きている。加えて、ピロリ菌においても他の細菌と同様に薬剤耐性の問題があり、その除菌成功率も年々低下の一途を辿っている。これまでに抗ピロリ菌活性物質の探索として、糖鎖 (Kawakubo *et al.*, *Science*, 305, 1003, 2004) やプロポリス (Hashimoto *et al.*, *Nat. Med.*, 52, 518, 1998) など様々な研究が行なわれている。こうした中、ピロリ菌のみ作用し、一般細菌には作用しない、ピロリ菌選択的に作用する抗菌薬の開発は急務である。

2. 研究の目的

ピロリ菌は細胞膜構成脂質中の炭素数 14 のミリスチン酸を脂肪側鎖として持つホスファチジルエタノールアミン (PE) を介して、種々のステロイド化合物をその細胞膜に積極的に取り込み、取り込んだステロイド化合物を自身の膜構成脂質として利用する非常にユニークな性質を持っている。本菌のステロイド取り込み機能を障害すれば、ピロリ菌に対して選択的に作用する抗菌薬となり得る。そこでステロイド系化合物から抗ピロリ菌活性を示す化合物の探索が行なわれ、今回、新たにビタミン D₃ 分解物に抗ピロリ菌活性があることが判明した。詳細な検討の結果、非常に強い抗ピロリ菌活性を示す化合物が単離された。ビタミン D₃ から化学合成した化合物と単離化合物との NMR など各種測定データを比較検討し、合成化合物を用い抗ピロリ菌活性の検討した結果、合成化合物も単離化合物と同様に抗菌活性を示した。VDP1 と名付けた本合成



化合物 (右図) によりピロリ菌 (5 株) に対する有効殺菌濃度が調査され、1.5~2.5 $\mu\text{g/ml}$ であることが確認された。一方、VDP1 は、黄色ブドウ球菌、大腸菌、サルモネラ、肺炎桿菌、プロテウス、セラチアおよび緑膿菌に対しては 50 μg 以上でも活性を示さず、ピロリ菌特異的であることが証明された。抗菌薬として利用するためには、この化合物の安定性や安全性に加えてビタミン D 活性を持っていないかどうか非常に重要となってくる。

る。VDP1 を用いた動物実験等を視野に入れた場合グラムスケールでも供給量面で大きな問題があるため効率的に VDP1 を調製する必要がある。種々の低分子化合物を用いて抗ピロリ菌活性化合物の探索を行い、ピロリ菌を選択的に殺菌する化合物を見出した。本課題ではこの発見された抗ピロリ菌化合物を提供するための手法の開発と行なう。

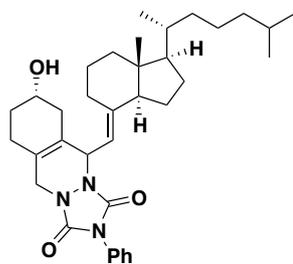
3. 研究の方法

VDP1 の合成はルテニウムを用いた酸化分解 (B. Plietker and M. Niggemann, *J. Org. Chem.*, 70, 2402-2405 2005) をビタミン D₃ に適応し調製しているが、収率 15%程度とかなり低いことが問題になっている。その原因の一つにビタミン D₃ は、紫外線により容易に様々な化合物に構造変改していることが上げられる (Takahashi., *Chem. Commun.*, 46, 8722, 2010; *Org. Biomol. Chem.*, 10, 5205, 2012)。この形体変化が収量の低下を招いている原因ともなっているため、VDP1 の調製にビタミン D₃ をから効率的に誘導する手法、もしくはビタミン D₃ に頼らない合成手法の開発が必須である。VDP1 を用いた動物実験等を視野に入れた場合グラムスケールでも供給量面で大きな問題があるため効率的に VDP1 を調製する必要がある。

4. 研究成果

これまでにビタミン D₃ の酸化分解により VDP1 を調整していたが、ビタミン D₃ の熱、光への安定性の問題やトリエン構造による望まない部位での酸化反応の進行などが起き、精製ステップが煩雑となり低収率となってしまう問題があった。まず適応している酸化反応は溶媒組成や濃度に鋭敏に変化することが知られているため反応条件の検討を試みた。酸化条件の検討結果より、当初の 15% 収率から 32%へと改善された。しかし別の二重結合で切断された副生成物も同容量確認されたことから、ビタミン D₃ のトリエン構造を根本的に改善しなければならない。トリエン構造の A 環部位のジエンが副反応を起こす原因であることから、これを解決するため Diels-Alder 反応によってジエンをマスクすることを計画した。もともとビタミン D₃ は、光に不安定であるため、加熱による Diels-Alder 反応は望ましい反応ではない。しかし、Diels-Alder 反応はルイス酸存在下、極低温で進行することが知られていたため、検討を行った。無水マレイン酸やマレイミドなどを AlCl₃ 存在下、-40 $^{\circ}\text{C}$ ~0 $^{\circ}\text{C}$ への反応を行ったが、ビタミン D₃ が持つトリエン構造で自己縮合した化合物が得られた。そこでより、効率かつ温和な条件を追い求めた結果、aza-Diels-Alder 反応にたどり着いた。遮光室温で、アセトニトリルに溶解したビタミン

ン D3 に対して、4-Phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione をゆっくりと滴下することで、98%と良好な収率で光や熱に安定であり、ビタミン D3 よりも水溶性の高い



ビタミン D3 誘導体を得ることに成功した。これを酸化分解することで 71%と非常に高収率で VDP1 を得ることに成功した。また、本反応の結果から、他に得られる副産物が全て高極性となり VDP1 と容易に分割可能であることも明らかとなった。この大量生産から誘導体を合成し、VDP1 を超えるピロリ菌活性を示す化合物も得ることができた。

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 3 件)

① Kiyofumi Wanibuchi, Kouichi Hosoda, Masato Ihara, Kentaro Tajiri, Yuki Sakai, Hisashi Masui, Takashi Takahashi, Yoshikazu Hirai, Hirofumi Shimomura, " Indene compounds synthetically derived from vitamin D have selective antibacterial action on *Helicobacter pylori*", *Lipids*, **53**, 393–401 (2018)

② Tsuyoshi Yamamoto, Hirofumi Nakano, Kazuro Shiomi, Kiyofumi Wanibuchi, Hisashi Masui, Takashi Takahashi, Yasuteru Urano, Tohru Kamata, " Identification and characterization of a novel NADPH oxidase1(Nox1) inhibitor that suppresses proliferation of colon and stomach cancer cells", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **14**, 3, 419-426 (2018)

③ Hisashi Masui, Eri Ohkawa, Rika Kitahara, Kiyofumi Wanibuchi, Takashi Takahashi, " One-Pot, Diversity-Oriented Synthesis of Aryl-Substituted Benzoxacycles Including Benzofuran, Coumarin, and Benzoxazepine", *Heterocycles*, **14**, 12, 2273-2290 (2017)

[学会発表] (計 6 件)

ポスター発表

① 鰐淵 清史, 伊原 聖人, 下村 裕史, 庄司 満, 高橋 孝志, C14PE ベシクル崩壊活性を指標とした抗ピロリ菌化合物のケミカルハイスループット法の構築, 日本薬学会第 138 年会, 3 月, 石川 (2018).

② 鰐淵 清史, 間瀬 文音, 下村 裕史, 高橋 孝志, 胃がん細胞障害活性を指向とした化合物のコンビナトリアル合成, 日本薬学会第 137 年会, 3 月, 宮城 (2017).

③ 鰐淵清史, 黒田有理奈, 下村裕史, 高橋 孝志, 抗ピロリ菌物質のハイスループット探索法の構築, 第 60 回日本薬学会関東支部大会, 9 月, 東京 (2016).

口頭発表

① 鰐淵 清史, 下村 裕史, 庄司 満, 高橋 孝志, 選択的抗ピロリ菌化合物の構造活性相関研究, 日本薬学会第 138 年会, 3 月, 石川 (2018).

② 鰐淵 清史, 小泉 ユキ, 下村 裕史, 高橋 孝志, 抗ピロリ菌化合物と相互作用示す phosphatidylethanolamine 類の合成, 日本薬学会第 137 年会, 3 月, 宮城 (2017).

③ 鰐淵清史, 酒井佑宜, 下村裕史, 高橋 孝志, 抗ピロリ菌化合物 VDP1 の効率合成, 日本薬学会第 136 年会, 3 月, 横浜 (2016).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 抗ピロリ菌剤
発明者: 下村裕史、細田浩一、平井義一、高橋孝志、鰐淵清史
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特開 2016-044156
出願年月日: 2014 年 8 月 25 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

<http://tennenc31.wixsite.com/hamaten>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鰐淵 清史 (WANIBUCHI, Kiyofumi)

横浜薬科大学・薬学部薬科学科・講師

研究者番号：00613663

(2) 研究分担者

高橋 孝志 (TAKAHASHI, Takashi)

横浜薬科大学・薬学部創薬研究センター・特任教授

研究者番号：80110724

(3) 連携研究者

増井 悠 (MASUI, Hisashi)

横浜薬科大学・薬学部薬科学科・講師

研究者番号：70714377

(4) 研究協力者

()