

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14356

研究課題名（和文）標的酵素で活性化される共有結合医薬の開発

研究課題名（英文）Development of covalent drugs activatable by the target enzymes

研究代表者

木村 康明（Kimura, Yasuaki）

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：80769977

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：共有結合医薬は、標的酵素と共有結合を形成してその機能を阻害する医薬分子で、高い阻害活性を有する。この特性から、近年様々な酵素を標的とした共有結合阻害薬が開発されている。しかし、共有結合医薬は標的以外のタンパク質と共有結合を形成する 경우가多く、それに由来する副作用が、共有結合医薬開発における大きな課題となっている。

本研究では、そうした副作用の問題を回避する戦略として、標的酵素で活性化される共有結合医薬を設定し、核酸アナログをその具現例として抗ウイルス薬の開発を行った。開発した核酸アナログは、HIVに対して良好な薬理活性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昨今のコロナウイルス感染症拡大でも明らかになった通り、新規の作用機序と強力な薬理活性を有する抗ウイルス薬の開発は、社会的にも重要な課題である。本研究では一般的に強力な活性を有する共有結合医薬の範疇で、新規の作用機序を有する抗ウイルス薬の開発を行った。医薬開発戦略の特徴は、医薬分子が標的とする酵素に作用した際に初めて、共有結合医薬としての反応性を獲得する点にある。開発した核酸アナログはエイズウイルス（HIV）に対して良好な薬理活性を示した。今後さらなる分子最適化を通じ、さまざま抗ウイルス薬開発に適用可能な方法論としての確立を目指す。

研究成果の概要（英文）：A covalent drug is a drug molecule that forms a covalent bond with a target enzyme to inhibit its function, and has high inhibitory activity. Due to this property, covalent drugs targeting various enzymes have been developed in recent years. However, covalent drugs often form covalent bonds with non-targeting proteins, and side effects derived from them are a major issue in the development of covalent drugs. In this research, as a strategy to avoid such side effect problems, we developed a covalent drug that is activated by a target enzyme and developed an antiviral drug by using a nucleoside analog as an example. The developed nucleoside analog showed good pharmacological activity against HIV.

研究分野：生体関連化学

キーワード：共有結合医薬 標的選択制 抗ウイルス薬 抗ガン薬 核酸誘導体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

共有結合医薬は、標的酵素と共有結合を形成してその機能を阻害する医薬分子で、高い阻害活性を有する。また阻害効果が不可逆的であり、持続性の高い阻害が期待できる。これらの優れた特性から、近年様々な酵素を標的とした共有結合阻害薬が開発されており、実際上市にまで至っている例も少なくない (図1, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2016**, *55*, 13408.)。

しかし、共有結合医薬は標的以外のタンパク質と共有結合を形成する 경우가多く、それに由来する副作用が、共有結合医薬開発における大きな課題となっている。

共有結合医薬の反応性官能基の求電子性を構造的にチューニングすることで選択性の問題を緩和する研究も行われているが、最適な反応性官能基を開発に至る例は限られており、必ずしも有効なアプローチとは言えない。

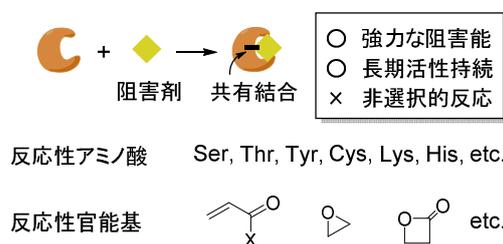


図1 従来の共有結合医薬の特徴

2. 研究の目的

このような背景を踏まえて、新たな戦略により共有結合医薬の標的選択性の問題を解決するアプローチを考えた。すなわち、「標的酵素により活性化され反応性を獲得するような阻害剤を開発できれば、共有結合医薬の反応選択性の問題を解決できるのではないか」と考えた (図2)。

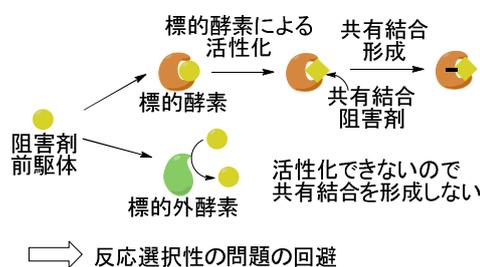
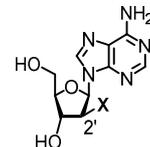


図2 本提案の共有結合医薬のメカニズム

具体的には、抗ウイルス薬あるいは抗ガン剤としての活性が期待されるポリメラーゼ阻害剤として、図3に示したような核酸の2'-β誘導体を考えた。これはポリメラーゼによりオリゴ核酸に組み込まれると、2'-β位の求核性官能基の求核反応により、カチオン性活性種を形成すると推測される。この活性種は求電子剤として機能し、ポリメラーゼ活性中心のチロシン、リジン等の求核的アミノ酸残基と共有結合を形成すると考えられる。



X = SR, SeR etc.

図3 設計したヌクレオシドアナログの構造

本研究の目的は、標的酵素により活性化され反応性を獲得する共有結合医薬の概念の確立である。この目的の実現により、従来から問題となっていた共有結合医薬の選択性の問題を解決する有効なアプローチを提示する。具体的な実験系として、2'-β位に求核的官能基を組み込んだ核酸誘導体を合成し、ポリメラーゼに対する共有結合医薬として最適化を行い、その強力な阻害効果と高い標的選択性を確認し、本戦略の有効性を実証する。

3. 研究の方法

まず候補化合物の合成を行った。2'-アルファ位を脱離基に変換したヌクレオシド誘導体を中間体として、チオール・セレンオールなどの様々な求核性官能基を導入した (図4)。核酸塩基については第一候補としてアデニンを選択したが、その他の塩基誘導体も同様のルートで合成を行った。

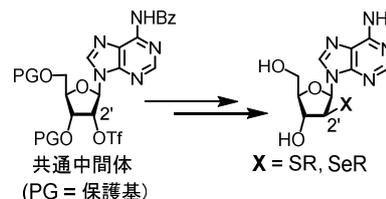


図4 設計誘導体の簡略合成スキーム

得られた誘導体を用いて、各種ポリメラーゼ反応によりオリゴ核酸鎖伸長反応の基質となるか、また阻害剤で前処理した後、阻害剤除去後の伸長反応の効率を測定することで不可逆阻害活性の評価を行った。

また、研究協力者の村上優子教授(順天堂医科大学、東京工科大学)、鈴木哲朗教授(浜松医科大学)、村上努博士(国立感染症研究所)の協力のもと、阻害剤の活性評価を行った。

4. 研究成果

まず設計した核酸アナログの合成と、予備的な活性評価を行った。アデノシンを出発原料として、2'水酸基の脱離基への変換、求核性官能基の導入等を経て、標的核酸アナログの合成を行った。以降はセレノメチル基を導入した誘導体 A'について結果を述べる。

A'に対応するトリリン酸体 (dA'TP) の合成を行い、ウイルス性逆転写酵素への取り込み評価を行った。図 5A に示した鋳型 RNA 及び蛍光修飾 DNA プライマーを基質として、プライマー伸長反応を行った。その結果 dA'TP は、通常の dATP と同様に伸長反応を引き起こし、逆転写反応の基質として認識されることが明らかとなった。dA'TP の他に dATP 以外の dNTP を含む系では DNA 伸長が確認され、さらに反応混合物の MS 解析から、DNA 伸長に伴う反応活性種の生成を示唆するデータも得られた。

以上のように逆転写酵素への取り込みを確認した後、不可逆阻害の検証も行った(図 5B)。上記のようなプライマー伸長反応を、天然基質である dATP、可逆阻害剤であるジデオキシアデノシンのトリリン酸体 (ddATP)、あるいは dA'TP で行った。続いて限外濾過によりこれら低分子を除去し、回収した酵素で2回目のプライマー伸長反応を、dNTP を基質として行い、その収率に基づき不可逆阻害活性を評価した。その結果、ATP あるいは ddATP で処理した場合は活性が回復したのに対し、dA'TP の場合は活性が回復せず、開発した A'での不可逆阻害活性を確認できた。

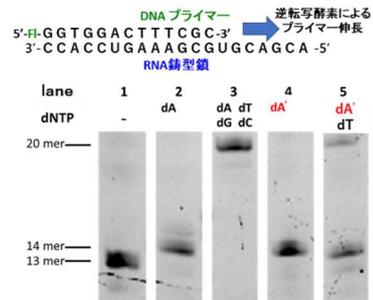
続いて各種ガン細胞・ウイルス感染細胞における活性評価を行った。抗ガン活性の評価においては、有望な活性を発揮するガン細胞系は存在しなかった。また B 型肝炎感染細胞における評価では、EC₅₀ 0.9 μM で活性が観測されたものの、既存の抗 HBV 薬であるエンテカビルに活性が及ばず、現在までに有望な結果を見出していない。

一方 HIV 感染細胞系における評価では有望な結果が見いだされた。HIV 感染細胞に化合物を投与する本実験では A'のプロドラッグ体(A*)を使用した。天然型の HIV に対しては、既存薬の AZT には及ばない活性であったが、代表的な変異型ウイルス (M41L/T69SSG/T215Y) に対しては、AZT を 10 倍程度上回る活性が観測された(図 6)。

またメカニズム解析実験においては、共有結合を形成した標的タンパクを回収するための分子プローブを種々設計・合成し、それらを用いて affinity pull down を行い、候補化合物が共有結合を介して標的タンパクと結合している予備的なデータを得た。今後結合形成位置を含めた詳細なタンパク質の解析を行う予定である。

また同時並行で塩基部位および求核性反応基の構造を種々合成・活性評価し、隣ガン細胞にて良好な抗ガン活性を有する誘導体を見出した。今後は塩基部位・求核部位の更なる誘導化を通じて、高活性・高標的選択性を有する抗ウイルス・抗ガン薬の開発を行っていく予定である。

(A) 逆転写酵素によるプライマー伸長反応



(B) 逆転写酵素の不可逆阻害

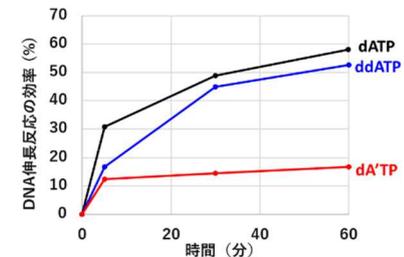


図 5 開発誘導体の酵素阻害活性

EC ₅₀ for HIV	(μM)	
Virus Types	AZT	A*(prodrug)
WT	0.042	0.98
M41L/T69SSG/T215Y	18	1.4

図 6 開発誘導体の抗 HIV 活性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shishido Yuko, Tomoike Fumiaki, Kuwata Keiko, Fujikawa Haruka, Sekido Yoshitaka, Murakami Tonami Yuko, Kameda Tomoshi, Abe Naoko, Kimura Yasuaki, Shuto Satoshi, Abe Hiroshi	4. 巻 20
2. 論文標題 A Covalent Inhibitor for Glutathione S Transferase Pi (GSTP1 1) in Human Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 900 ~ 905
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.201800671	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 新美結士, 片倉秀雄, 鈴木哲郎, 高田礼人, 村上努, 木村康明, 阿部洋
2. 発表標題 抗ウイルス活性を指向した2'-位修飾ヌクレオシドの合成と評価
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第13回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yushi Niimi, Hideo Katakura, Tetsuro Suzuki, Akito Takato, Tsutomu Murakami, Yasuaki Kimura, Hiroshi Abe
2. 発表標題 Development of 2'-modified nucleosides for irreversible viral polymerase inhibitor
3. 学会等名 日本ウイルス学会 第66回
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuaki Kimura, Yushi Niimi, Hideo Katakura, Tetsuro Suzuki, Tsutomu Murakami, Eiichi, Kodama, Hiroshi Abe
2. 発表標題 Development of 2'- Seleno Nucleoside Analogs as Irreversible Inhibitors for Viral Polymerases
3. 学会等名 日本ウイルス学会 第66回
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuaki Kimura, Yushi Niimi, Hideo Katakura, Fumiaki Tomoike, Tetsuro Suzuki, Tsutomu Murakami, Eiichi, Kodama, Hiroshi Abe
2. 発表標題 Development of 2' - Seleno Nucleoside Analogs as Irreversible Inhibitors for Viral
3. 学会等名 The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 木村 康明・新美 結土・片倉 秀雄・友池 史明・鈴木 哲朗・村上 努・児玉 栄一・阿部 洋
2. 発表標題 Development of 2' - Seleno Nucleoside Analogs as Irreversible Inhibitors for Viral Reverse Transcriptase
3. 学会等名 日本化学会 第99回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Daichi Fushihara, Yushi Nimi, Hideo Katakura, Tetsuro Suzuki, Tsutomu Murakami, Eichi Kodama, Yasuaki Kimura, Hiroshi Abe
2. 発表標題 Synthesis of Anti-viral Selenium Modified Nucleoside Analogues
3. 学会等名 Commemorative International Symposium of the Japan Society of Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirotaka Murase, Chang Jun Shi, Ti Zheng, Fumitaka Hashiya, Yasuaki Kimura, Hiroshi Abe
2. 発表標題 Development of 2' - -Thio or Seleno modified Nucleoside Analogs
3. 学会等名 The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉田祐希, Zheng Ti, 伏原大地, 新美結土, 中本航介, 橋谷文貴, 木村康明, 日吉貴子, 齋木由利子, 堀井明, 鈴木哲朗, 村上優子, 阿部 洋
2. 発表標題 Development of phosphorofluoridate prodrugs
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計2件

産業財産権の名称 修飾リン酸化合物前駆体、修飾リン酸化合物、反応阻害剤及びこれを含む医薬並びに反応阻害方法	発明者 阿部洋 木村康明	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-043329	取得年 2018年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 -MODIFIED PHOSPHORIC ACID COMPOUND PRECURSOR, -MODIFIED PHOSPHORIC ACID COMPOUND, REACTION INHIBITOR, AND MEDICINE INCLUDING SAME, AND REACTION INHIBITION METHOD	発明者 Hiroshi Abe, Yausaki Kimura	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/9213	取得年 2019年	国内・外国の別 外国

〔その他〕

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
研究協力者	村上 努 (Murakami Tsutomu) (50336385)	国立感染症研究所・エイズ研究センター・主任研究官 (82603)	
研究協力者	鈴木 哲朗 (Suzuki Tetsuro) (00250184)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	
研究協力者	村上 優子 (Murakami Yuko) (70405174)	東京工科大学・応用生物学部・教授 (32692)	