

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21249

研究課題名（和文）共有結合医薬の副作用回避を可能とする分子設計戦略

研究課題名（英文）Molecular design strategy to avoid side effects of covalent drugs

研究代表者

木村 康明（Kimura, Yasuaki）

名古屋大学・理学研究科・講師

研究者番号：80769977

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：新規の作用機序を有する逆転写酵素阻害剤のメカニズム解析と構造活性相関研究を行った。メカニズム解析では本阻害剤に特有の酵素反応に伴う活性種放出とそれに基づく阻害効果を検証した。また構造活性相関研究では、更なる高活性化に向けた分子設計指針を見出すとともに、新規化学構造をベースとした有効性に優れたリン酸プロドラッグの創出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規作用機序を有する核酸アナログ系ポリメラーゼ阻害剤の開発において、阻害機構の解明で得られた反応性の知見、および反応性活性種の構造と阻害活性の相関情報は、類似メカニズムを有する活性型共有結合性阻害剤の開発に有用な知見を与えるものである。また新規構造に基づくリン酸プロドラッグの創出についても、核酸アナログに留まらず幅広い応用展開の可能性を有し、リン酸基含有の医薬開発に有用な手法を提示したと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Mechanistic analysis and structure-activity relationship studies of a reverse transcriptase inhibitor with a novel mechanism of action were conducted. In the mechanistic analysis, we verified the release of reactive species associated with the enzymatic reaction unique to this inhibitor and the inhibitory effect based on the release of reactive species. In the structure-activity relationship study, we found a molecular design guideline for further enhancement of activity and succeeded in developing a highly effective prodrug of phosphate-based on a novel chemical structure

研究分野：医薬化学

キーワード：共有結合医薬 核酸アナログ ポリメラーゼ 阻害剤 リン酸プロドラッグ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

標的酵素と共有結合を形成により酵素機能を阻害する共有結合医薬は、不可逆的な阻害作用に基づく高阻害活性・長期持続性が期待できる。一方で標的酵素以外のタンパク質との共有結合形成に起因する副作用が臨床応用における大きな課題となっている。医薬分子に導入した反応性官能基の求電子性を構造誘導化で最適化することで標的選択性の問題を解決するアプローチが幅広く検討されているが、最適な反応性官能基を開発に至る例は限られており、必ずしも有効な手法とは言えない。

このような背景を踏まえ、本研究では「標的酵素によって活性化される共有結合医薬」の分子設計戦略を提唱し、本アプローチを核酸アナログに適用することを計画した。本戦略では、阻害剤は標的酵素が行う酵素反応によって活性化されて初めて反応性を獲得するため、標的外との共有結合形成は起こらず、共有結合医薬の標的選択性の問題を解決する有力なアプローチとなりうる。

具体的には、レトロウイルスに対する逆転写酵素阻害剤として、2'-β セレノ核酸アナログ (Seleno A, 2'-β 位セレノメチル基を導入したアデノシン誘導体)の開発を進める。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 位のセレン部位の求核攻撃により求電子性の活性種を生成し、ポリメラーゼ活性中心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。

2. 研究の目的

これまでに開発を進めてきた SelenoA について、レトロウイルス逆転写酵素に対する不可逆阻害と抗 HIV 活性を確認しており、本分子設計戦略の有効性を確認済みである。本研究では Seleno A の詳細な作用機序の解明と、構造最適化による高活性化の検討を行い、優れた阻害活性を有する抗 HIV 薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 阻害の分子メカニズム解析

Seleno A について標的酵素であるウイルス逆転写酵素に対する共有結合形成と、その形成位置の同定を行う。反応性官能基部位にアルキングを導入した阻害剤骨格を有するプローブ分子を合成し、それを逆転写酵素に作用させ共有結合を形成したタンパク質を、ヒュスゲン環化付加反応でピオチンラベル化し、アビジンビーズにより回収したタンパク質について LC/MS/MS 解析を行うことで上記項目の検証を行う。

(2) 抗 HIV リード化合物の構造活性相関研究

Seleno A について高活性化に向けて構造活性相関研究を行う。各種核酸塩基、セレノ部位置換基の誘導化、および新規に開発を進めているフルオロリン酸アミデート型プロドラッグも含めて各種リン酸プロドラッグ構造についても検討を行う。

4. 研究成果

(1) メカニズム解析

SelenoA の逆転写酵素に対する阻害メカニズム解明のため、SelenoA 構造を母核とする pulldown 用プローブの設計・合成を行った。それまでの検討で SelenoA のセレノ基先端のメチル基あるいは

は、セレノメチル基自身が求電子的に酵素に転位することで不可逆阻害が誘起されることが示唆されたため、その部位にリンカーを介してアルキン部位を導入した低分子プローブ、およびその構造をプライマー-DNA に組み込んだオリゴ DNA プローブを合成した。前者の低分子プローブで逆転写酵素による基質認識が確認できたため、取り込み効率も含めてプライマー伸長条件の最適化を行った。最適条件下で伸長反応を行った後に、デスチオピオチン アジドプローブを用いたヒュスゲン環化付加反応を経て pulldown を行ったが、LC/MS/MS 解析では該当タンパクは検出されなかった。プローブ分子をトリリン酸型 SelenoA として、ヒュスゲン環化付加反応を介したセレノメチル基の直接修飾体の検出に基づくアプローチについて検討を進めている。

(2) 誘導体開発

SelenoA についてセレノ部位および核酸塩基の誘導体合成および活性評価を行った。セレノ部位の置換基の検討ではアシル系などの電子吸引性官能基を導入した誘導体で優れた活性を示す傾向が観測された。一方、核酸塩基誘導体においては、ピリミジン塩基よりプリン塩基の方が優れた抗 HIV 活性を示すことが明らかとなった。またピリミジン塩基誘導体では宿主細胞側のポリメラーゼへの作用が推察される結果が得られた。これは塩基の種類によって阻害対象酵素が区別されることを示唆するものであり、今後の誘導体展開において有用な構造活性相関情報が得られた。

(3) リン酸プロドラッグの開発

SelenoA のようにヌクレオシド糖部に比較的大きな構造修飾を有する核酸アナログでは、細胞内キナーゼによるリン酸化が阻害され、活性体であるトリリン酸体の生成効率が低下し、ひいては阻害活性の発現抑制につながる。このような課題に対しリン酸プロドラッグ構造は有用なアプローチである。核酸アナログの医薬応用では ProTide と呼ばれるリン酸プロドラッグが幅広く用いられており、SelenoA においても有用性を示すことが明らかとなったが、より優れた活性体放出効率を有する新規のリン酸プロドラッグ開発は重要な研究トピックである。そこで核酸アナログに有効な新規のリン酸プロドラッグとしてフルオロリン酸アミデート基の開発を行った。この官能基はリン酸中心にフッ素とアミノ基を有する新規化学構造であり、初期検討においてアミノ基の級数によってリン-フッ素結合の加水分解耐性が大きく異なることを見出した。この特異な反応性に基づき、細胞内環境で 2 級アミノ体から 1 級アミノ体に変換される置換基を持ったプロドラッグ体を種々設計・合成し、ジェムシタピン（膵臓癌に有効な核酸アナログ系抗癌剤）に適用し活性評価を行った。その結果、上市薬で幅広く用いられている ProTide 型リン酸プロドラッグを活性面で大きく上回る誘導体を見出し、新規構造であるフルオロリン酸アミデート型プロドラッグの創出に成功した。(Y. Yoshida *et al*, *ChemMedChem*, 2022)。また詳細なメカニズム解析から想定する細胞内活性化メカニズムで、ジェムシタピンの活性体が細胞内で放出されていることを確認し、本新規化学構造のリン酸プロドラッグとしての有用性を実証した。

(4) 他のウイルス標的での活性評価

SelenoA については同じく逆転写系酵素を有する B 型肝炎ウイルスについても抗ウイルス活性の評価を行った。この SelenoA の ProTide 型プロドラッグは、濃度依存的に抗 HBV 活性を示し、核酸アナログのプロドラッグで課題となる細胞毒性を示さなかった。この結果を足掛かりに更なる分子デザインの最適化を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Yoshida Yuki, Honma Masakazu, Kimura Yasuaki, Abe Hiroshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Structure, Synthesis and Inhibition Mechanism of Nucleoside Analogues as HIV 1 Reverse Transcriptase Inhibitors (NRTIs)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemMedChem	6. 最初と最後の頁 743 ~ 766
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cmdc.202000695	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 -

1. 著者名 Yoshida Yuki, Zheng Ti, Tanabe Wataru, Tomoike Fumiaki, Hashiya Fumitaka, Suzuki Tetsuro, Hirota Shuto, Saiki Yuriko, Horii Akira, Hirayama Akiyoshi, Soga Tomoyosi, Kimura Yasuaki, Abe Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Development of Fluorophosphoramidate as a Biocompatibly Transformable Functional Group and its Application as a Phosphate Prodrug for Nucleoside Analogs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ChemMedChem	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cmdc.202200188	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木村 康明・田辺 航・Zheng Ti・吉田 祐希・橋谷 文貴・阿部 洋
2. 発表標題 フルオロリン酸アミデート基の化学的性質の評価と医薬応用に向けた検討
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田 祐希・新美 結士・伏原 大地・村瀬 裕貴・木村 康明・阿部 洋
2. 発表標題 抗ウイルス性2 - -セレン修飾ヌクレオシドアナログの開発
3. 学会等名 第14回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田祐希・Zheng Ti・田辺航・友池史明・橋谷文貴・鈴木哲朗・廣田嵩人・齋木由利子・堀井明・平山明由・曾我朋義・木村康明・阿部洋
2. 発表標題 フルオロリン酸アミデート基を用いた新規リン酸プロドラッグの開発
3. 学会等名 第15回ケミカルバイオロジー学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木村康明, 吉田祐希, 友池史明,, 橋谷文貴, 鈴木哲朗, 廣田嵩人, 齋木由利子, 堀井明, 平山明由, 曾我朋義, 阿部洋
2. 発表標題 フルオロリン酸アミデート基の開発と核酸アナログのプロドラッグへの応用
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田祐希・新美結士・伏原大地・村瀬裕貴・木村康明・阿部洋
2. 発表標題 2'- β -プロパルギルセレノヌクレオシド用いた逆転写酵素不可逆阻害の機構解析
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉田 祐希・Ti Zheng・田辺 航・友池 史明・橋谷 文貴・廣田 嵩人・齋木 由利子・堀井 明・木村 康明・阿部 洋
2. 発表標題 フルオロリン酸アミデート基を用いた新規リン酸プロドラッグの開発
3. 学会等名 日本化学会第102春季年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木村 康明・吉田 祐希・友池 史明,・橋谷 文貴・廣田 嵩人・齋木 由利子・堀井 明・平山 明由・曾我 朋義・阿部 洋
2. 発表標題 フルオロリン酸アミデート基の開発と核酸アナログのプロドラッグへの応用
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 プロドラッグ化合物	発明者 阿部洋 木村康明	権利者 名古屋大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-013946	取得年 2021年	国内・外国の別 国内

〔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
研究分担者	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)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------