

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19072

研究課題名(和文) シアリダーゼ阻害を作用機序とする特発性肺線維症治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of sialidase inhibitors for treatment of idiopathic pulmonary fibrosis

研究代表者

今村 彰宏 (Imamura, Akihiro)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：30610951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、国の指定難病であるヒト特発性肺線維症(IPF)の新規治療薬の開発に向け、ヒトシアリダーゼNEU1の選択的阻害剤の創製を目的とした。我々は、先行研究においてNEU1を高酵素選択的かつ高度に阻害できるリード化合物を見出しており、本研究では、より高い阻害活性を有する化合物の創出を目指した。

四種の新規化合物を分子設計し、それらを有機化学的手法により合成した。得られた化合物のNEU1阻害活性を評価したところ、リード化合物と同等の活性を示したものの、リード化合物を超える化合物の創出には至らなかった。一方、本研究において、リード化合物の新規合成経路を確立し、大量合成化を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国指定難病である特発性肺線維症(IPF)の治療薬は限られており、有効性の高い新規治療薬の開発が強く望まれている。本研究では、従来の治療薬とは異なり、シアリダーゼNEU1の機能阻害を作用機序とする新規IPF治療薬の開発を目指した。本研究では、NEU1を酵素選択的かつ高度に阻害する化合物の大量合成法を確立するとともに、阻害活性に重要となる分子構造を見出した。今後、さらなる阻害活性の向上に向け、分子構造の精査および合成法の確立を行うことで、IPFに対する新規阻害薬の開発につながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop a potent inhibitor of human sialidase NEU1 as a new therapeutic agent for human idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), a nationally designated intractable disease. In our previous research, we found a lead compound capable of inhibiting NEU1 with high enzyme-selectivity and to a high degree. This study focused on creating compounds with higher inhibitory activity.

In this study, we designed four new compounds and chemically synthesized them. Though the NEU1 inhibitory activity of some compounds obtained showed activities equivalent to that of the lead compound, we could not get any compounds that surpassed the lead one. On the other hand, we successfully established a new synthetic route for the lead compound and realized large-scale synthesis.

研究分野：応用糖質化学

キーワード：特発性肺線維症 IPF シアリダーゼ NEU1 シアル酸 有機合成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生理活性を有する糖鎖の多くには、シアル酸と呼ばれる特殊な酸性糖が含まれている。シアル酸は、その特徴的な構造やカルボキシ基由来の酸性の性質から、生体分子による細胞認識の鍵分子として知られている。一方、生体内には、糖鎖からシアル酸を切断する酵素シアリダーゼ (Sialidase = Neuraminidase) が存在し、複合糖質の糖鎖末端からシアル酸残基を切断する。動物を起源とするシアリダーゼとして、これまでに NEU1、NEU2、NEU3、NEU4 の4種が同定されている。これらは細胞内局在や基質特異性が異なり、各々に特異的な標的分子からシアル酸を脱離させることにより、細胞機能に重要な影響を及ぼしている。一方、シアリダーゼの発現異常は、シアロ複合糖質蓄積症や、がん、糖尿病などを引き起こす。すなわち、シアリダーゼによる細胞機能の制御およびその破綻機構を明らかにすることは、生体内シアル酸の生理機能を始め、がんや糖尿病等の病態の解明につながる。

近年我々は、NEU1 がヒト特発性肺線維症 (IPF) の発症に関わっていることを見出した。IPF は、何らかの原因で肺胞が傷ついた際、その修復過程において大量のコラーゲン線維が肺胞の壁 (間質) に蓄積され、厚く硬化 (線維化) する疾患である。現在、IPF に対する根治療法は存在せず、国の指定難病となっている。自覚症状が認められてからの生存期間は一般的に3~5年と短く、故に IPF の有効な治療法の開発が強く望まれている。

### 2. 研究の目的

先行研究において我々は、IPF 患者の肺では NEU1 の発現が優位に増加していることを見出した。NEU1 は、健常時にも気道上皮細胞や肺の毛細血管内皮細胞 (HPMEC) で発現しているが、IPF の発症により異常に発現すると、細胞表面糖鎖の構造変化をもたらす免疫細胞による細胞障害を誘発する。加えて、肺の創傷修繕過程において、HPMEC による血管新生を阻害する。したがって、NEU1 の機能を阻害することは IPF の治療につながると期待される。しかし、4種のヒトシアリダーゼは多くの細胞において共発現しており、それぞれが重要な生体機能を有している。そのため、副作用を減らすためには、NEU1 の活性のみを選択的に阻害する必要がある。そこで本研究では、IPF の新規治療薬の開発を目指し、NEU1 活性を高選択的に阻害可能な低分子化合物の創出を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 既知の阻害剤候補化合物の効率的合成経路の確立と量的確保

我々は先行研究において、Fig.1 に示すシアル酸誘導体 (C9-BA-DANA) が NEU1 に対して高い阻害活性を示すことを見出している。C9-BA-DANA は、他のシアリダーゼと比較して、NEU1 に対してのみ強力な阻害活性 ( $IC_{50} = 10 \mu M$ ) を示し、かつ極めて高い基質選択性を示した。そのため現時点では、C9-BA-DANA が阻害剤候補として最も有力であるが、再現性に乏しい反応段階を含むなど、大量合成が難しいという課題があった。創薬を指向した場合、より効率的な合成法の確立が求められることから、本研究では、迅速かつ大量合成を可能にする反応経路の確立を目指すこととした。

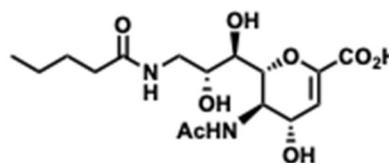


Fig.1. C9-BA-DANA の分子構造

#### (2) C9-BA-DANA を超える高活性・高選択性分子の探索と創製

先行研究の結果から、C9-BA-DANA は阻害剤開発のリード化合物と言えるが、その阻害活性

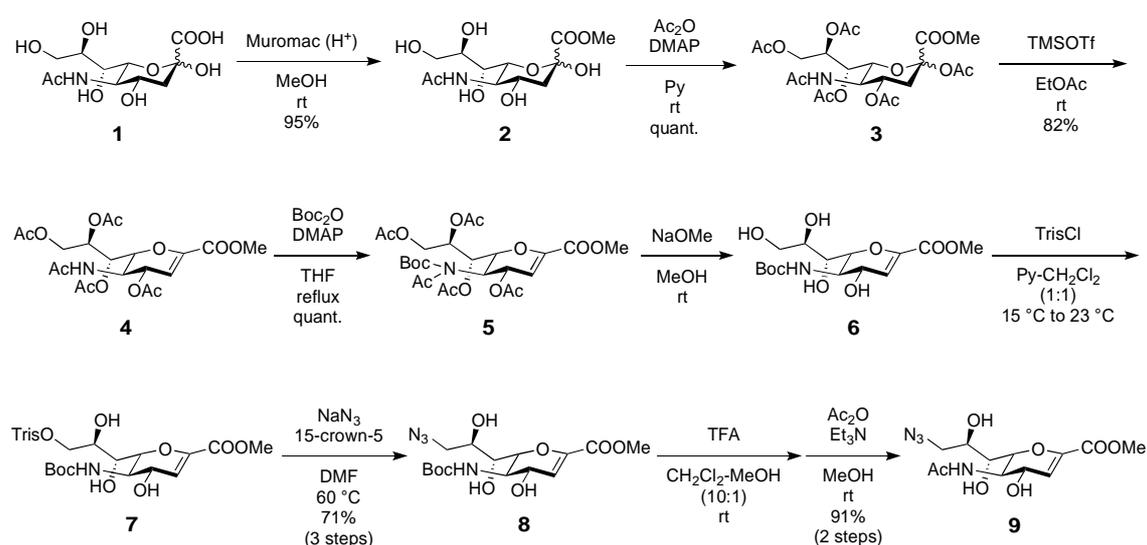
は薬の域には程遠い。そのため、基質選択性を維持しつつ高度な阻害活性を有する新規化合物の創製が求められる。本研究では、当該有用化合物を探索するため、先行研究で得たシアリダーゼのホモロジーモデリングデータ（結晶構造が解かれている NEU2 のデータから作成）を基にして、新規阻害剤候補分子を設計・合成する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 既知リード化合物の効率的合成経路の確立と大量合成

既報のリード化合物 (C9-BA-DANA) の合成では、9 位アミド構造の形成において大きな課題が二つ存在した。(1) アミドの前駆体であるアジド体の合成に際し、水酸基への Ts 基導入、続いて  $N_3$  基への変換という段階を経るが、遊離水酸基が豊富に存在し、かつ 5 位にアセトアミド基が存在することで化合物の有機溶媒への溶解性が下がり、収率および再現性が低い、(2) アミド形成反応の収率が低い、という二点である。また、これらの課題は目的物の量的確保を困難なものにしていた。

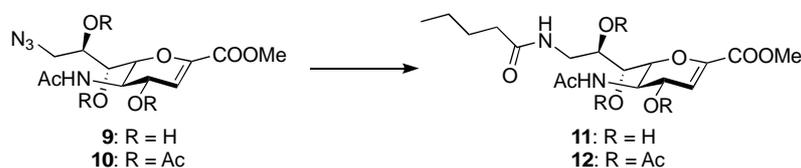
そこで本研究では、当該課題の克服に向け、反応経路の再検討を試みた (Scheme 1)。まず、市販の *N*-アセチルノイラミン酸 **1** を出発物質とし、既法に従って 2,3-ene 体 **4** を合成した。次に、従前の課題であった化合物の溶解性向上に向け、低溶解性の一因である 5 位アセトアミドを Boc アミドへと替えることとした。そこで、まず化合物 **4** の 5 位に Boc 基を導入することでイミド体 **5** とし、続いてアセチル基を除去することで、Boc アミド体 **6** を合成した。当初の狙い通り、化合物 **6** はアセトアミド体と比較して、次反応で用いるピリジン-ジクロロメタン混合溶媒への溶解性が顕著に向上した。しかし、続く 9 位スルホニル化において、Ts 化の位置選択性が悪かった。これは既報においても観察されており、本研究では当該課題に対する改善策を講じることとした。すなわち、スルホニル基の種類を Ts (*p*-toluenesulfonyl) 基から、より高い Tris (2,4,6-triisopropylbenzenesulfonyl) 基へ変更することで、スルホニル化の位置選択性の向上を図った。その結果、狙い通り良好な位置選択性で 9 位 Tris 化に成功し、化合物 **7** を得た。続いて、 $NaN_3$  を作用させ、9 位アジド体 **8** へ導いた。結果として、アセチル基の除去、9 位 Tris 化、アジド化の三段階を総収率 71% で達成した。続いて、Boc 基の除去、*N*-アセチル化により、化合物 **9** へ良好な収率で導いた。



Scheme 1. 9 位アジド誘導体 **9** の合成

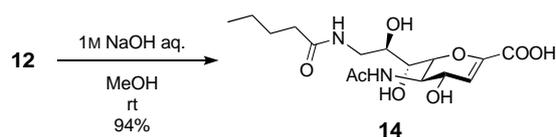
次に、9位アミド化の検討を行った (Table 1)。まず、Staudinger 反応によりアジドを遊離のアミンへと変換後、各種カルボン酸誘導体との反応に供しアミド化を試みた (Entry 1~3)。Entry 1では、トリオール体 **9** をアミンへ変換後、酸塩化物 (Valeryl chloride) との反応を試みたが、目的のアミド体 **11** は5%しか得られなかった。続いて Entry 2 では、カルボン酸 (Valeric acid) との脱水縮合反応を試みたが、目的物はほとんど得られなかった。次に、Valeric acid から調製した活性エステル (Valeric acid succinimidyl ester) を用いて反応を行ったが、収率は14%に留まった。ここまでの結果を受けて反応系を見直すこととし、Entry 4 では、aza-Wittig 反応を経由した one-pot アミド化反応を試みることにした。まず、4,7,8 位に水酸基を有するアジド体 **9** に対して、1,2-Bis(diphenylphosphino)ethane (DPPE) と Valeryl chloride を作用させ、aza-Wittig 反応を経由してイミンを形成後、これをアルカリ加水分解することでアミドへ導くことにした。しかし、構造不明の生成物が多数でき、目的物の生成は確認できなかった。この結果は、化合物中に存在する水酸基の存在によるものと考えられたため、Entry 5 では水酸基をアセチル基でマスクした化合物 **10** を用いて同様の反応を試みた。その結果、目的とする化合物 **12** を収率72%で得ることに成功した。

Table 1. 9位アミド化の検討



Entry	Compd.	Conditions (Step 1)	Conditions (Step 2)	Product	%Yield
1	<b>9</b>	PPh <sub>3</sub> THF-H <sub>2</sub> O (1:1), 40 °C	Valeryl chloride, Et <sub>3</sub> N MeOH, rt	<b>11</b>	5
2	<b>9</b>	PPh <sub>3</sub> THF-H <sub>2</sub> O (1:1), 40 °C	EDC·HCl, Valeric acid DMF, rt	<b>11</b>	trace
3	<b>9</b>	PPh <sub>3</sub> THF-H <sub>2</sub> O (1:1), 40 °C	Valeric acid succinimidyl ester, THF, rt	<b>11</b>	14
4	<b>9</b>	Valeryl chloride, DPPE THF, rt	NaHCO <sub>3</sub> aq. THF, rt 55 °C	<b>11</b>	0
5	<b>10</b>	Valeryl chloride, DPPE THF, rt	NaHCO <sub>3</sub> aq. THF, rt	<b>12</b>	72

最後に、得られた化合物 **12** を鹸化することで、化合物 **14** (C9-BA-DANA)の合成を達成した (Scheme 2)。上述したように、各反応条件を精査した結果、従前難しかったリード化合物 C9-BA-DANA のグラムスケールでの合成が可能となった。



Scheme 2. 脱保護

## (2) C9-BA-DANA を超える高活性・高選択性分子の探索と創製

先行研究の結果から、C9-BA-DANA は阻害剤開発のリード化合物と言えるが、その阻害活性は薬の域には程遠い。そのため、基質選択性を維持しつつ高度な阻害活性を有する化合物の創製が求められる。本研究では、当該有用化合物を探索するため、先行研究で得たシアリダーゼのホモロジーモデリングデータ(結晶構造が解かれている NEU2 のデータから作成)を基にして、新規阻害剤候補分子を設計・合成することとした。ホモロジーモデリングから得られた NEU1 モデルを見ると、NEU1 の選択的基質認識にはシアル酸側鎖の周囲に位置するアミノ酸が重要であると考えられる。ここには、極性アミノ酸である Asp、Asn、Gln および疎水的な Leu が存在している。このことから、NEU1 による分子認識をより高めるためには、疎水性相互作用のみならず、水素結合、誘起双極子相互作用等の別の分子間力も考慮した分子設計が望ましいと考えた。そして本研究では、新たに4種の化合物(A~D)を新規阻害剤候補化合物として案出し、それらを化学合成により創出した。

## (3) 合成化合物の NEU1 阻害活性評価

合成した阻害剤候補化合物の NEU1 阻害活性を評価するため、ヒト肺毛細血管内皮細胞 (HPMEC)、ヒト肺線維芽細胞 (HLF)、ヒト小気道上皮細胞 (HSAEC)を用いた *in vitro* 阻害活性評価実験を実施した。

その結果、本研究で設計・合成した化合物4種のうち3種にはリード化合物である C9-BA-DANA とほぼ同等の NEU1 阻害活性があり、残りの1種はやや阻害活性が劣る結果であった。

## (4) まとめ

本研究では、国指定難病である IPF の治療に向け、ヒトシアリダーゼ NEU1 の活性阻害を作用機序とする新規治療薬の開発を目的とした。本研究で注力した点は、先行研究で見出したリード化合物を基にして、NEU1 を高選択的かつ高度に阻害可能な新規阻害剤候補分子を創出することであった。独自に保有するシアリダーゼホモロジーモデリングデータを基にして、4種の新規阻害剤候補分子を設計し、それらを化学合成により創出した。そして、合成化合物の NEU1 阻害活性を評価するため、ヒト肺毛細血管内皮細胞、ヒト肺線維芽細胞、ヒト小気道上皮細胞を用いた *in vitro* 阻害活性評価実験を実施した。その結果、合成化合物4種のうち3種はリード化合物とほぼ同等の阻害活性を有することが判ったが、リード化合物を超える阻害活性を与えるものは見出せなかった。しかし、本研究により、阻害活性に与える官能基に関する重要な知見が得られたことから、今後、さらなる構造展開を実施することで、高度な NEU1 阻害活性を有する化合物の創出につながると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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		
米国	University of Maryland	School of Medicine	