

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 11 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460158

研究課題名(和文)ヘマグルチンを標的とする新規抗インフルエンザウイルス薬の合理的開発

研究課題名(英文)Rational Development of Novel Hemagglutinin-based Influenza Virus Inhibitors

研究代表者

津吹 政可 (TSUBUKI, Masayoshi)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90163865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ムメフラール(MF)は、ノイラミニダーゼ及びヘマグルチンを阻害することでインフルエンザウイルスに対して増殖抑制を示すことから、新たな作用機序をもつ薬剤候補化合物への展開が期待される。

本研究では、MFの合成法を確立するとともに、数多くのMF誘導体を調製した。また、MFの両鏡像体の合成も達成した。これらMF及びその誘導体の阻害活性を検討した結果、ヒドロキシジカルボン酸単位が活性発現に必須であること、エステル部は代替が可能であり、アダマンチルメチルに置き換えることで約10倍の活性の向上が見られた。さらに、MFの両鏡像体を比較することでS配置の立体化学が活性発現に適していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Influenza A virus infects cells by the action of hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA). Mumefural (MF), isolated from Japanese apricot extract, is the first compound which shows inhibitory effect against both HA and NA activities of H1N1 influenza virus (A/Narita/1/2009). For the development of new anti-influenza drugs, total synthesis of (±)-MF was achieved in 6 steps and 80 derivatives of MF were prepared. Their structure-activity relationship studies have revealed hydroxy dicarboxylic acid moiety was important for expression of the inhibition activity. The derivatives with bulky ester moiety improved the activity. A new compound 10 having adamantane framework on the ester part was synthesized, and its activity was 10 times more potent than that of MF. In addition, a 7-step asymmetric synthesis was developed, and both enantiomers were synthesized starting from (S) and (R)-malic acids. We have confirmed (S)-MF has an inhibitory activity 2 times stronger than that of (R)-MF.

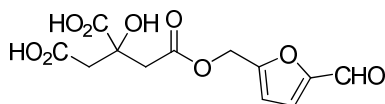
研究分野：有機化学

キーワード：インフルエンザ ヘマグルチン ムメフラール 不斉合成 キラル分割 共結晶 構造活性相関

1. 研究開始当初の背景

(1) 現在、インフルエンザの治療には、ワクチン療法に加えて、化学療法としてオセルタミビルや ザナミビルなどのノイラミニダーゼ (NA) 阻害薬が臨床応用されている。細胞内で増殖したインフルエンザウイルスは NA によって切り出されることで細胞から放出される。この NA を阻害することでウイルスは細胞から放出されず、結果として増殖が食い止められる。これらの NA 阻害薬は、2009 年に出現してパンデミックを引き起こした新型 H1N1 インフルエンザウイルスの治療の際にも用いられた。近年、上記のインフルエンザウイルス株 (A/Narita/1/2009) においても、オセルタミビル耐性株の出現が報告されている。そのため、これらの薬物耐性ウイルスに効果のある新規抗インフルエンザ薬の開発が期待されている。

(2) 近年、鈴木らによって、梅エキス抽出物から単離されたムメフラール (MF) が特徴的な抗インフルエンザウイルス活性を有することが見出された¹。上記インフルエンザウイルス (A/Narita/1/2009) を用いた活性試験において、既存の治療薬ほどの効果は持たないが、オセルタミビルなどが阻害する NA のシアリダーゼ阻害だけでなく、ヘマグルチニン (HA) の吸着阻害を有することが明らかになった。また MF は、2009 年にパンデミックを引き起こしたインフルエンザウイルス (H1N1 pdm09) のうち、オセルタミビルが効きにくいとされるウイルス株に対しても有効であることが報告された。



NA : IC₅₀ = 0.21 mM
 HA : MIC = 3.1 mM
 ムメフラール (MF)

2. 研究の目的

(1) 本研究では、インフルエンザウイルスが宿主細胞への侵入の際に利用する HA に対して阻害作用を有する MF に着目し、MF 類と HA との共結晶化を行い、高精度 FMO 計算による理論的相互作用解析を利用して新規な抗インフルエンザウイルス剤の開発を進めたい。

(2) MF 誘導体の HA における阻害作用発現機序の解明とその構造活性相関研究を通してリード化合物の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) フラン誘導体である MF のラセミ合成法を確立するとともに、キラルカラムを用いてラセミ体の光学分割を行い、それぞれの鏡像異性体に関して HA との共結晶化を試みる。

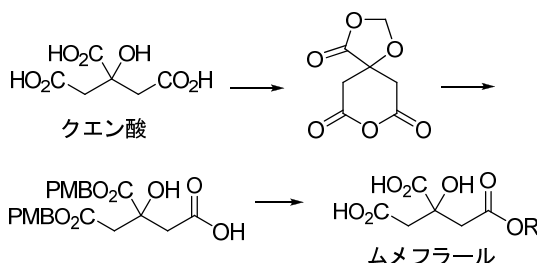
楠見法等を利用して両鏡像体の立体化学を決定する。

(2) HA との共結晶化で得られる構造情報を基に、FMO 計算を用いて MF と HA との複合体の理論的相互解析を行い、作用部位と結合様式を明らかにする。これらの情報を基に HA 阻害活性を有する抗インフルエンザ阻害剤の候補化合物を合理的に設計、合成を行う。

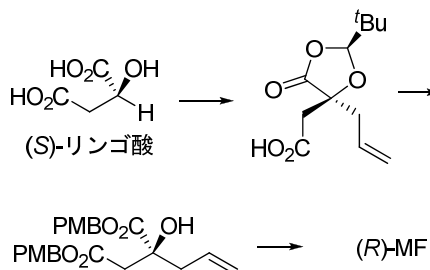
(3) 阻害剤候補化合物のインフルエンザウイルス増殖抑制に関しては、イヌ腎臓 (MDCK) 細胞、赤血球凝集阻止効果はモルモット赤血球を用いて評価する。FMO 計算を用いて阻害機序の定量的解析を実施することで抗インフルエンザ阻害剤のリード化合物の創製に取り組む。

4. 研究成果

(1) クエン酸を原料に用いて末端のカルボン酸部にモノエステル化が可能となるように 2 つのカルボキシ基を選択的に保護した²。ついで、ホルミル基をもつフルフリルアルコールとの間でエステル化し、保護基を除去することで MF のラセミ合成法を確立した。上記で合成した MF をキラルカラムを用いて光学分割することで両鏡像体を調製した。

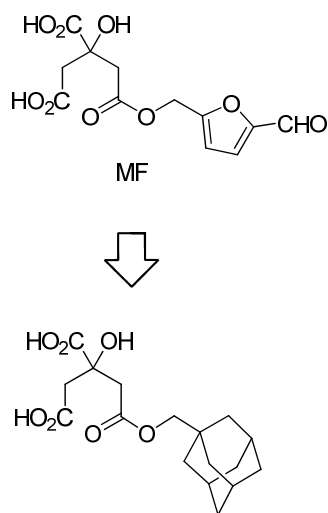


(2) キラルプール法を用いた MF の不斉合成法を確立した。即ち、(S)-リンゴ酸から 2 工程で誘導される既知のジオキサニル酢酸である 2-アリル-2-ヒドロキシコハク酸エステル³を経由して 2 つのカルボキシル基が保護された光学活性なクエン酸に導いた。さらに、5-ホルミルフルフリルアルコールとの縮合により (R)-MF を得た。(S)-MF に関しても、(R)-リンゴ酸から合成を行った。



(3) 上記(1)で確立したクエン酸からのMFの合成法における鍵中間体を利用して約80のMF誘導体を調製した。

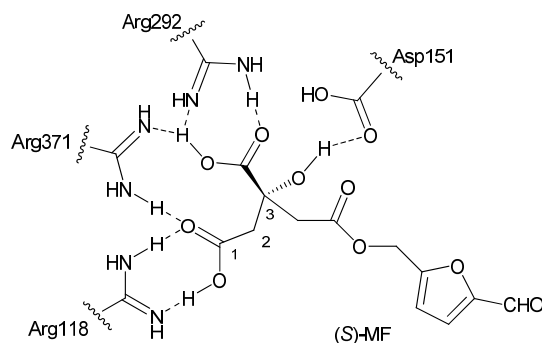
(4) 構築した化合物ライブラリーのNA阻害活性値から、MF誘導体の構造活性相関を検討した。H1N1 A型インフルエンザウイルス(A/Narita/1/2009)を用いて試験を行い、IC50値を求めた。まず、ヒドロキシジカルボン酸部分の構造活性相関を検討したところ、ヒドロキシジカルボン酸単位は活性発現に重要であることが明らかとなった。次に、ヒドロキシジカルボン酸単位を有する誘導体のエステル部分に、ベンゼン環を導入した誘導体で検討を行ったところ、m-ホルミルフェニル基でホルミルフリル基を置き換えることが分かった。また、ベンゼン環のm位に種々の官能基等を導入したところ、ピナコールポロネートやフェニル基を導入したMF誘導体で活性の向上が見られた。これらのことからベンゼン環上のm位の置換基の高さが活性発現に影響していることが推定された。そこで、いくつかの環式炭化水素を導入したところ、アダマンチル基を導入したMF誘導体において活性の向上が見られた。



(5) MFはラセミ体であることから、上記(2)に示すように両鏡像体を合成し、それぞれの阻害活性を検討したところ、(S)体の方が(R)体より約2倍強い阻害活性を有していることが判明した。

(6) 活性試験に用いられたウイルス株(H1N1, A/Narita/2009)におけるNAのX線結晶構造がPCSB Protein Data Bank(PDB)に登録されていないことから、このNAと相同性が100%であるウイルス株(A/California/04/2009 code: 3NSS)のX線結晶構造を用いて、NAと光学活性なMFとの詳細なドッキング解析を行った。その結果、(S)体のMFのクエン酸部分の2つのカル

ボキシ基が、周辺残基のアルギニン残基Arg118、Arg292、および、Arg371と相互作用をしており、3位のヒドロキシ基が近傍のアスパラギン酸残基Asp151と相互作用をしていることが示唆された。これは、ヒドロキシジカルボン酸単位的重要性を示すものであり、先に示した活性評価の結果に合致している。



<引用文献>

- Y. Suzuki *et al.* *Food Chem.* **2011**, *127*, 1-9.
 Y. Takeuchi *et al.* *Chem. Pharm. Bull.* **1999**, *47*, 1284-1287.
 D. Seebach *et al.* *Tetrahedron* **1984**, *40*, 1313-1324.

5. 主な発表論文等

[学会発表](計12件)

第9回糖転移酵素に関する国際シンポジウム
 2014年6月18-21日 Porto, Portugal
 Development of Novel Multitarget Inhibitor for Glycoproteins of Influenza Virus

Part I: Organic Synthesis and Optical Resolution

Takumi Hosozawa¹, Erika Ishitsubo¹, Karl N. Kirshner², Nongluk Sriwilaijaroen^{3,4}, Hiromasa Yokoe⁵, Masayoshi Tubuki⁵, Yasuo Suzuki⁴, Hiroaki Tokiwa^{1,6}

(¹Rikkyo Univ.,²Fraunhofer Institute SCAI,³Thammasat Univ.,⁴Chubu Univ.,⁵Hoshi Univ.,⁶RCS, Rikkyo Univ.)

第9回糖転移酵素に関する国際シンポジウム
 2014年6月18-21日 Porto, Portugal
 Development of Novel Multitarget Inhibitor for Glycoproteins of Influenza Virus

Part II: Rational Design and in silico Analysis

Erika Ishitsubo¹, Takumi Hosozawa¹, Karl N. Kirshner², Nongluk Sriwilaijaroen^{3,4}, Hiromasa Yokoe⁵, Masayoshi Tubuki⁵, Yasuo Suzuki⁴, Hiroaki Tokiwa^{1,6}

(¹Rikkyo Univ.,²Fraunhofer Institute

SCAI,³Thammasat Univ.,⁴Chubu Univ.,⁵Hoshi Univ.,⁶RCS, Rikkyo Univ.)

創薬懇話会 2014 in 岐阜 2014年7月10-11日 岐阜

新規マルチターゲット抗インフルエンザ阻害剤の開発 Part :化学合成と光学分割
細沢拓未¹、石坪江梨花¹、五十嵐学²、Karl N. Kirshner³、Nongluk Sriwilaijaroen^{4,5}、横江弘雅⁶、津吹政可⁶、鈴木康夫⁴、常盤広明^{1,7}

(¹立教大理、²北大人獣セ、³Fraunhofer SCAI、⁴中部大生命健康、⁵Thammasat Univ.、⁶星薬大医薬研、⁷立教大未来分子セ)

創薬懇話会 2014 in 岐阜 2014年7月10-11日 岐阜新規マルチターゲット抗インフルエンザ阻害剤の開発 Part :合理的設計と理論解析

石坪江梨花¹、細沢拓未¹、五十嵐学²、Karl N. Kirshner³、Nongluk Sriwilaijaroen^{4,5}、横江弘雅⁶、津吹政可⁶、鈴木康夫⁴、常盤広明^{1,7}

(¹立教大理、²北大人獣セ、³Fraunhofer SCAI、⁴中部大生命健康、⁵Thammasat Univ.、⁶星薬大医薬研、⁷立教大未来分子セ)

第33回日本糖質学会年会

2014年8月10-12日 名古屋大学

第一原理計算によるムメフラールとインフルエンザウイルス表面糖タンパク質との理論的相互作用解析

石坪江梨花¹、五十嵐学²、Karl N. Kirshner³、Nongluk Sriwilaijaroen^{4,5}、細沢拓未¹、横江弘雅⁶、津吹政可⁶、鈴木康夫⁴、常盤広明^{1,7}

(¹立教大理、²北大人獣セ、³Fraunhofer SCAI、⁴中部大生命健康、⁵Thammasat Univ.、⁶星薬大医薬研、⁷立教大未来分子セ)

第58回日本薬学会関東支部大会

2014年10月4日 昭和薬科大学

新規マルチターゲット抗インフルエンザ阻害剤の合成研究

加藤裕也¹、細沢拓未¹、石坪江梨花¹、五十嵐学²、Karl N. Kirshner³、Nongluk Sriwilaijaroen⁴、横江弘雅⁵、鈴木康夫⁶、常盤広明^{1,7}、津吹政可⁵

(¹立教大理、²北大人獣セ、³Fraunhofer SCAI、⁴Thammasat Univ.、⁵星薬大医薬研、⁶中部大生命健康、⁷立教大未来分子セ)

第32回メディシナルケミストリーシンポジウム

2014年11月26-28日 神戸

食品由来の天然物を先導化合物とした新規マルチターゲット抗インフルエンザ薬の合理的設計開発

石坪江梨花¹、細沢拓未¹、Karl N. Kirshner²、Nongluk Sriwilaijaroen^{3,4}、横江弘雅⁶、津吹政可⁶、鈴木康夫⁴、常盤広明^{1,5}

(¹立教大理、²Fraunhofer SCAI、³Thammasat Univ.、⁴中部大生命健康、⁵星薬大医薬研、⁶立教大未来分子セ)

第135年会日本薬学会年会

2015年3月26-28日 神戸

梅エキス抽出物をリードとした新規マルチターゲット抗インフルエンザ薬の合理的設計開発

石坪江梨花¹、細沢拓未¹、五十嵐学²、Karl N. Kirshner³、Nongluk Sriwilaijaroen^{4,5}、横江弘雅⁷、津吹政可⁷、鈴木康夫⁵、常盤広明^{1,6}

(¹立教大理、²北大人獣感染セ、³Fraunhofer SCAI、⁴Thammasat Univ.、⁵中部大生命健康、⁶立教大未来分子セ、⁷星薬大)

第135年会日本薬学会年会

2015年3月26-28日 神戸

新規マルチターゲット抗インフルエンザ阻害薬の構造活性相関研究(2)

加藤裕也¹、細沢拓未¹、石坪江梨花¹、横田智洋²、五十嵐学³、Karl N. Kirshner⁴、Nongluk Sriwilaijaroen⁵、横江弘雅²、鈴木康夫⁶、常盤広明^{1,7}、津吹政可²

(¹立教大理、²星薬大医薬研、³北大人獣感染セ、⁴Fraunhofer SCAI、⁵Thammasat Univ.、⁶中部大生命健康、⁷立教大未来分子研究セ)

第59回日本薬学会関東支部大会

2015年9月12日 千葉

梅エキスを先導化合物とした抗インフルエンザ阻害薬の構造活性相関研究

加藤裕也¹、横田智洋²、Nongluk Sriwilaijaroen³、横江弘雅²、鈴木康夫⁴、常盤広明^{1,5}、津吹政可²

(¹立教大理、²星薬大医薬研、³Thammasat Univ.、⁴中部大生命健康、⁵立教大未来分子研究セ)

第136年会日本薬学会年会

2016年3月26-29日 横浜

梅エキス抽出物を先導化合物とした新規作用機序を示す抗インフルエンザ薬の開発

加藤裕也¹、横田智洋²、Nongluk Sriwilaijaroen³、横江弘雅²、鈴木康夫⁴、常盤広明^{1,5}、津吹政可²

(¹立教大理、²星薬大医薬研、³Thammasat Univ.、⁴中部大生命健康、⁵立教大未来分子研究セ)

第137年会日本薬学会年会

2017年3月24-27日 仙台

抗インフルエンザウイルス活性を有するmumefural誘導体の構造活性相関研究

加藤裕也¹、横田智洋²、Nongluk Sriwilaijaroen³、横江弘雅²、鈴木康夫⁴、常盤広明^{1,5}、津吹政可²

(¹立教大理、²星薬大医薬研、³Thammasat Univ.、⁴中部大生命健康、⁵立教大未来分子研

究セ)

〔その他〕

ホームページ等

<http://polaris.hoshi.ac.jp/kyoshitsu/seitaiyuki/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

津吹 政可 (TSUBUKI, Masayoshi)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90163865