

201318071A

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

リレンザ純化学合成技術を基盤とした
薬剤耐性新型インフルエンザウイルス出現に対応する
新規抗ウイルス薬の開発に関する研究

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 熊谷 直哉

平成26(2014)年 5月

厚生労働科学研究費補助金

新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

リレンザ純化学合成技術を基盤とした
薬剤耐性新型インフルエンザウイルス出現に対応する
新規抗ウイルス薬の開発に関する研究

平成25年度 総括研究報告書

研究代表者 熊谷 直哉

平成26（2014）年 5月

目 次

- I. 総括研究報告書
リレンザ純化学合成技術の要となる触媒的不斉ニトロアルドール反応
を促進する新規固相触媒の創製と
リレンザ耐性インフルエンザウイルスの分離 -----P. 1

熊谷直哉・滝沢直己・藤原俊伸・野本明男・高田礼人・
高木智久・河野憲司
- II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----P. 16
- III. 研究成果の刊行物・別刷 -----P. 17

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金
(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)
総括研究報告書

リレンザ純化学合成技術を基盤とした薬剤耐性新型インフルエンザ
ウイルス出現に対応する新規抗ウイルス薬の開発に関する研究

研究代表者：熊谷直哉
公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・主席研究員

研究要旨

数十年に一度新型ウイルスが出現し世界的大流行を起こすインフルエンザウイルスは、全世界的な監視・感染制御が必須である。現在、インフルエンザに対する主要な予防、治療薬はリレンザ・タミフルといったノイラミニダーゼ (NA) 阻害剤であるが、タミフル耐性ウイルスの出現によりタミフルを中心としたインフルエンザ対策の脆弱性が問題となっている。本研究はタミフル耐性ウイルスに著効を示すリレンザを軸に据え、合成・医薬化学者による安価な大量製造法の確立・誘導體創出、その誘導體を用いたウイルス学者・臨床医による臨床分離株も含めた徹底的スクリーニング、また同時に企業研究者による迅速診断キットの開発を展開し、リレンザ耐性・新型ウイルスの流行を先回りした対策を打ち出す。異分野の技術を密接に連携させ強力な研究推進を図る。

滝沢 直己
公益財団法人微生物化学研究会・
微生物化学研究所・研究員

高田 礼人
北海道大学・人獣共通感染症リサーチ
センター・教授

藤原 俊伸
名古屋市立大学・
大学院薬学研究科・教授

高木 智久
京都府立医科大学・消化器内科・
准教授

野本 明男
公益財団法人微生物化学研究会・
微生物化学研究所・所長

河野 憲司
長瀬産業株式会社・
研究開発センター・研究員

A. 研究目的

現在、インフルエンザウイルスに対する主要な治療薬はリレンザ・タミフル等のノイラミニダーゼ (NA) 阻害剤である。しかし、近年タミフル耐性ウイルスが同定され、タミフル依存型治療の脆弱性が問題となっている。本研究では、リレンザ純化学合成技術、保有する全 NA サブタイプを基盤として、リレンザの大量製造法の確立・誘導體創出、臨床分離株も含めた徹底的スクリーニング、迅速診断キットの開発を展開する。新型・耐性ウイルスの流行を先回りした研究展開により強力なインフルエンザ対策を構築する。

合成化学者・ウイルス学者・臨床医・企業研究者からなるヘテロな専門集団がそれぞれの研究分野の垣根を越えて、有機的かつ生産的に分野融合を図り、シームレスな研究推進が可能な研究グループを組織している (図表 1)。リレンザはそのピラン環中心骨格に極性官能基が密に不斉配置されており、その立体選択的な合成は困難を極める。そのため、リレンザの現行法の合成は高価なシアル酸からの半合成法に頼っている。シアル酸の分子構造はリレンザのそれと非常に似通っており、シアル酸からの半合成法は必

然的に誘導體合成には不向きである。一方で、我々が最近達成した世界初のリレンザ純化学合成技術は半合成法とは一線を画し、安価かつ大量入手可能な石油原料からのリレンザ大規模合成に直結するとともに、原理上あらゆる誘導體の合成が可能になる。半合成法と比べて圧倒的に多様な誘導體ライブラリーを創出可能で、耐性ウイルス駆逐のための誘導體化において威力を発揮する。

上記のリレンザ純化学合成技術と種々の NA サブタイプのウイルスを利用して、リレンザ耐性ウイルスに有効な誘導體のスクリーニングを行う。すべての NA サブタイプに対してリレンザ耐性ウイルスを単離し、変異部位の同定を行う。得られた情報を基にリレンザ耐性ウイルスにも有効なリレンザ誘導體を設計し、スクリーニングを行う。同時に、流行中の臨床分離株や将来の新型インフルエンザウイルスの候補となるトリインフルエンザウイルスに対する誘導體の活性評価を行い、リレンザ耐性ウイルスや新型インフルエンザウイルス流行時に迅速な治療薬選択を可能な状態とする。また、得られた誘導體に対して更に耐性となるウイルスを単離、変異部位の同定を行うことで、NA の薬剤耐性機構

を網羅的に解明する。リレンザ耐性ウイルス、新型ウイルスに著効示すリレンザ誘導体については、大量合成法を確立し、純化学合成法を駆使して迅速な化合物供給法の提供を目指す。

B. 研究方法

タミフル耐性ウイルスが爆発的に蔓延した際の第一選択薬がリレンザとなるが、現行法のシアル酸からの安価・安定供給には限界がある。一方で、我々の純化学合成技術では安価・大量入手可能なアルデヒドとニトロブテンを原料に、独自に開発したNd/Na 2核金属不斉触媒を用いる*anti*-選択的不斉ニトロアルドール反応により、合成鍵中間体を光学活性体として供給可能である。本反応は廃棄物を一切副生せず、特許出願済であることから大量合成・誘導体合成法の基盤技術として展開可能である（図表 2）。また、Nd/Na触媒は不斉触媒としては非常に希な不均一触媒として機能するため、将来的に連続フロー合成による効率的な大規模合成への応用が期待できる。またごく最近、カーボンナノチューブ固定型触媒の創製における萌芽的な実験結果が得られ、触媒の高活性化・

再利用化の目処が立っている。合成鍵中間体からのリレンザへの各合成ステップの徹底的最適化を行い、安価な大量供給法として確立させる。同時に、リレンザ誘導体の合成検討を開始する。現行法では高コストもさることながらシアル酸類似誘導体しか得ることができない。一方で、我々の純化学合成法では原理上あらゆる構造特性を有する多様な誘導体が創出可能であり、現行法に比べて圧倒的な優位性がある。大量合成法の検討過程で得られた反応最適化の知見を活用し、極めて迅速に多種多様な化学構造を有するリレンザ誘導体ライブラリーの構築が可能となる。リレンザ誘導体の活性評価で得られた系統的データは、その構造特性と絡めて考察し、合理的デザインにより目的誘導体の創出を迅速化する。

合成研究と併行し、リバースジェネティクスの手法を用いてN1からN9までのNAサブタイプのインフルエンザウイルスをそれぞれ作製する。NA以外のウイルスタンパク質の影響を排除するためにNAをコードする分節以外はA/WSN/33の分節を使用する。作製したそれぞれのウイルスについて低濃度リレンザ存在下で継代を繰り返し、リレンザ耐性株の単離を行い、変異部

位の決定を行う。変異部位の立体構造から耐性ウイルスに対して幅広く効果が期待できるリレンザ誘導体の構造予測を行う。

(倫理面への配慮)

申請者ならびに分担者は、それぞれが所属する研究施設において定められた生命倫理委員会規定、実験動物取り扱い規定に従う。ヒト採取サンプルを用いる場合、インフォームドコンセントを得て本研究に参加するものであり、生命倫理への配慮は十分なされている。

C. 研究成果

リレンザの純化学合成技術に関する研究では、その基本根幹技術である *anti*-選択的不斉ニトロアルドール反応の抜本的改良を行った。一般に、低分子化合物合成において難易度・コスト共に上昇させる要因は、不斉炭素の構築である。本研究計画における合成計画では、合成経路の第一ステップに独自の不斉触媒反応を組み込むことで一挙に二つの不斉炭素を導入し、その二つの不斉点が残りの不斉点を誘導的に構築していく効率的な合成経

路を立案している。故に、この第一反応ステップの効率が全体の合成効率を規定するため、触媒の高性能化を行うこととした。*anti*-選択的不斉ニトロアルドール反応は、アルデヒドとニトロアルカンの原子効率100%の不斉炭素-炭素結合形成反応であり、生成しうる4つの立体異性体のうち望みの1つのみを高い選択性で与える反応である。我々が独自に開発した Nd/Na 2核金属不斉触媒により促進され、リレンザのピラン環中心骨格の二つの不斉点を一挙に構築する強力な触媒的不斉炭素-炭素結合形成反応である。光学活性化合物の大量合成における触媒的不斉炭素-炭素結合形成反応の利用は、技術的・コスト的な面で未だ限られており、その解決がリレンザ合成法の刷新に直結する。本触媒が不斉触媒としては希な自己組織化する不均一系触媒を形成する点に注目し、安価なバルク用多層カーボンナノチューブ (MWNT) を非反応性固相担持体として触媒を高分散担持させ、極めて活性の高い再利用可能型触媒として機能させる事に成功した (図表 3, catalyst B) (*Angew. Chem. Int. Ed.* 2013, 52, 6196. 日経バイオテク・時事ドットコム・化学工業日報・日刊工業・日本経済・日経産業・毎日)。

透過型電子顕微鏡像において、多層カーボンナノチューブ (MWNT) の高次網目状ネットワーク中に触媒が担持されていることが観測され、EDSマッピングによりNdと不斉配位子中のフッ素原子が同位置に存在していることが明らかとなった (図表 4)。また、本研究の過程で、多層カーボンナノチューブ (MWNT) 存在下において自己組織化能の増幅が見られた。従来の触媒調製法ではNdに比して過剰量の不斉配位子が必要であったが、多層カーボンナノチューブ (MWNT) 存在化の触媒調製で不斉配位子当量の低減化を検討したところ、Ndと等モル量の不斉配位子で円滑な触媒の自己組織化が見られ、非共有結合性固相触媒としては非常に高い85%以上の触媒固定化率を実現することができた (図表 5) (*J. Org. Chem.* 2013, 78, 11494)。さらに、現在固定化触媒をカラムにパッキングすることで大量合成に最も好ましい反応形式であるフロー系での連続合成の検討を行っている (図表 6)。ニトロアルドール反応の欠点として、低温反応条件による電力コストの問題が挙げられるが、連続フロー合成での実施が可能になれば、低温制御が必要な容積は必要最小限に抑えることが可能となり、リレンザ重要中間

体の大量合成における基幹技術としての確立へ大きな前進となる。

併行して、2年目以降に必要となるウイルス株の単離を進めている。リレンザ誘導体のNA阻害効果検討時にNA以外のウイルスタンパク質の影響を排除するために、NAをコードする第6分節のみを各種ウイルス由来の分節に入れ替え、他の分節はWSN株由来のウイルス株の構築を行った。ヒトN1、N2、トリN1~N9を持つ組換えウイルス20種をリバーシジェネティクスの方法で作製し、リレンザ感受性について確認を行った。確認の結果、すべての組換えウイルスでリレンザ感受性が確認できた。現在、今回作製した各種ウイルスについてリレンザ耐性株の単離を行っている (図表 7)。

D. 考察

リレンザ合成に必須な光学活性中間体を効率的に合成する固相触媒の創製に成功した。不斉触媒反応が工業的スケールでの大規模合成に利用される事例は未だに希であり、その要因は厳密な反応制御の必要性和不斉触媒のコストに由来する。今回開発した固相触媒は、共有結合を使わずに不斉

触媒を固相担持することが可能なため、従来の固相担持触媒と比較して極めて簡単に触媒調製を実施できる。また、得られる固相担持触媒は再利用が可能であり、工業的に好ましいフロー系での反応実施も可能であることから、上記問題を解決する実践的有用性の高い触媒と言える。自己組織化で調製する本触媒は学術的にもインパクトが高く、二年目以降の誘導体合成を大幅に加速すると期待される。

E. 結論

3年計画の1年目として、光学活性中間体合成の為に不斉触媒の大幅な改良に成功した。また、リレンザ耐性インフルエンザウイルス株の単離を進めており、リレンザ誘導体のスクリーニングを開始する準備が整いつつある。

F. 健康危険情報

インフルエンザウイルスの扱いはP2対応の研究室で行っており、研究者及び施設の安全は十分に確保された状態で行っている。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Takanori Ogawa, **Naoya Kumagai**,*
Masakatsu Shibasaki*

“Self-Assembling Neodymium/Sodium Heterobimetallic Asymmetric Catalyst Confined in Carbon Nanotube Network”
Angew. Chem., Int. Ed. **2013**, 52(24), 6196-6201.

2) Devarajulu Sureshkumar, Kazuki Hashimoto, **Naoya Kumagai**,*
Masakatsu Shibasaki *

“A Modified Preparation Procedure for Carbon Nanotube-Confined Nd/Na Heterobimetallic Catalyst for *anti*-Selective Catalytic Asymmetric Nitroaldol Reactions”
J. Org. Chem. **2013**, 78(22), 11494–11500.

2. 学会発表

1) **Naoya Kumagai**

“Cooperative Asymmetric Catalysis and Its Application to Efficient Synthesis of Therapeutics”

ETH Zürich 講演会

2013年5月3日(Zürich/Switzerland)

2) **Naoya Kumagai**

“Cooperative Asymmetric Catalysis and Its Application to Efficient Synthesis of Therapeutics”

University of Geneva 講演会

2013年5月9日 (Geneva/Switzerland)

3) **Naoya Kumagai**, Takanori Ogawa and Masakatsu Shibasaki

“Self-Assembling Nd/Na Heterobimetallic Asymmetric Catalyst Confined in Carbon Nanotube Network”

23rd French-Japan Symposium on Medicinal and Fine Chemistry

2013年5月13日 (長崎)

2) **熊谷直哉**

“協奏機能型不斉触媒の開発と医薬品合成への応用”

九州大学薬学部講演会

2013年5月16日 (福岡)

3) **Naoya Kumagai**

“Cooperative Asymmetric Catalysis and Its Application to Efficient Synthesis of Therapeutics”

University of Berlin 講演会

2013年6月21日 (Berlin/Germany)

4) **Naoya Kumagai**

“Cooperative Asymmetric Catalysis and Its Application to Efficient Synthesis of Therapeutics”

University of Freiburg 講演会

2013年6月24日 (Freiburg/Germany)

5) **Naoya Kumagai**, Takanori Ogawa and Masakatsu Shibasaki

“Enantioselective Synthesis of Anacetrapib via Nd/Na Heterobimetallic Catalyst”

14th Tetrahedron Symposium

2013年6月26日 (Vienna/Austria)

6) **熊谷直哉**

“Cooperative Asymmetric Catalysis and Its Application to Efficient Synthesis of Therapeutics”

第24回新薬創製談話会

2013年9月25日 (沼津)

7) 橋本和樹, Devarajulu Sureshkumar, 小川貴徳, **熊谷直哉**, 柴崎正勝

“再利用可能なカーボンナノチューブ固定型 Nd/Na 異種二核金属触媒を用いた *anti* 選択的ニトロアルドール反応”

第104回有機合成シンポジウム

2013年11月7日 (早稲田大学)

8) Naoya Kumagai

“Cooperative Asymmetric Catalysis and Its Application to Efficient Synthesis of Therapeutics”

4th Symposium for Young Chemists on Molecular Activation

2013年11月14日 (鹿児島)

9) 熊谷直哉

“カーボンナノチューブに絡まる再利用可能型触媒”

新学術領域研究 反応集積化の合成化学 公開シンポジウム

2014年1月24日 (早稲田大学)

10) 橋本和樹, Devarajulu Sureshkumar, 熊谷直哉, 柴崎正勝

“再利用可能なカーボンナノチューブ固定型Nd/Na異種2核金属触媒を用いた *anti* 選択的不斉ニトロアルドール反応”

日本薬学会第134年会

2014年3月28日 (熊本大学)

研究分担者

1) 滝沢直己, 野本明男

“インフルエンザウイルス RNA ゲノムの子孫粒子内取り込み機構の解析”

第15回日本RNA学会年会

2013年7月26日 (愛媛)

2) 滝沢直己, 百瀬文隆, 原口日和, 野本明男

“HA欠損ウイルスにおけるインフルエンザウイルスゲノムの子孫粒子内取り込み機構の解析”

第61回日本ウイルス学会学術集会

2013年11月10日 (神戸)

3) 滝沢直己, 野本明男

“インフルエンザウイルス分節化RNA ゲノムの子孫粒子内取り込み機構の解析”

第36回日本分子生物学会年会

2013年12月4日 (神戸)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし。

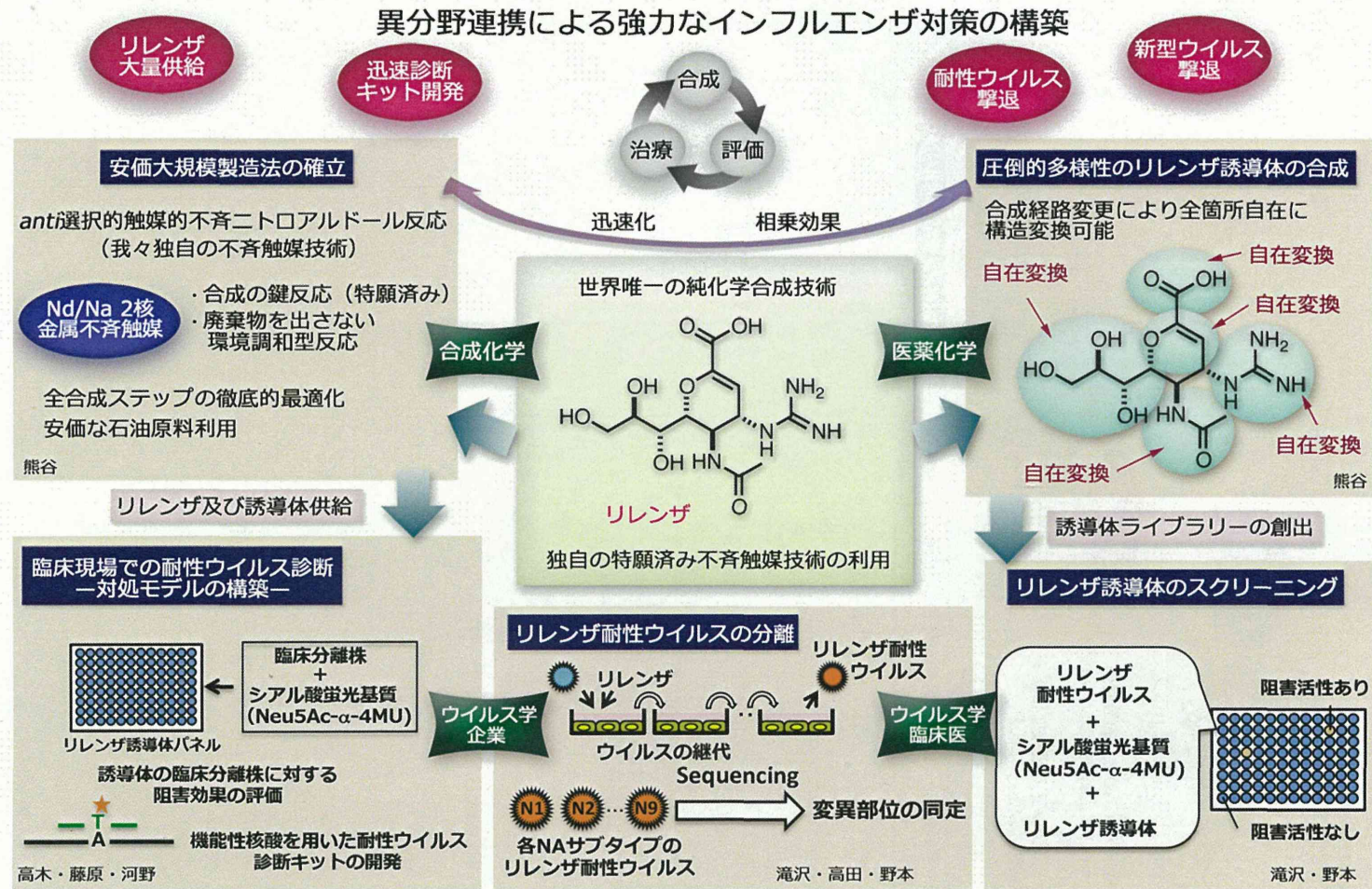
2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

図表 1.



図表 2.

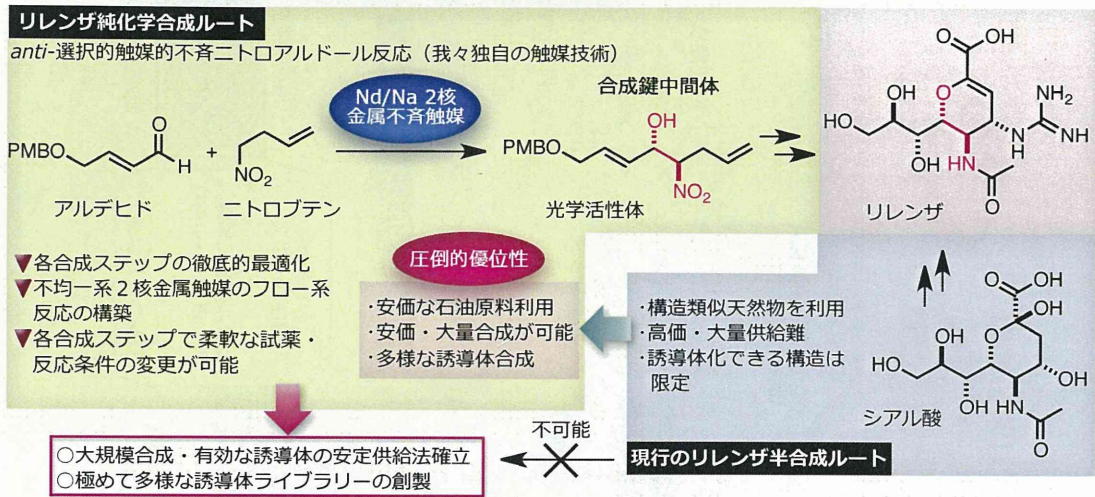
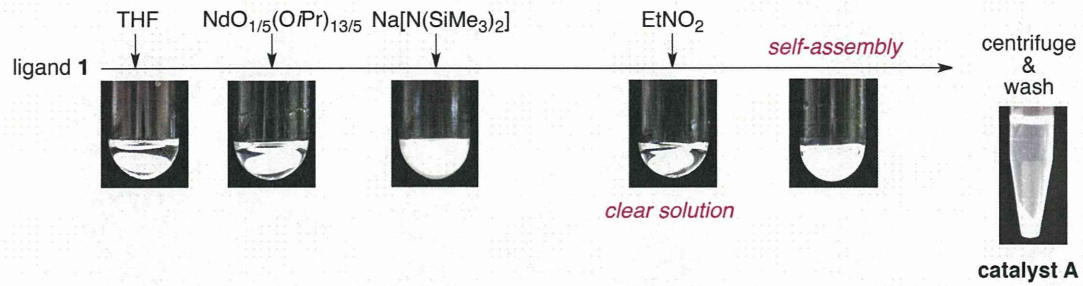
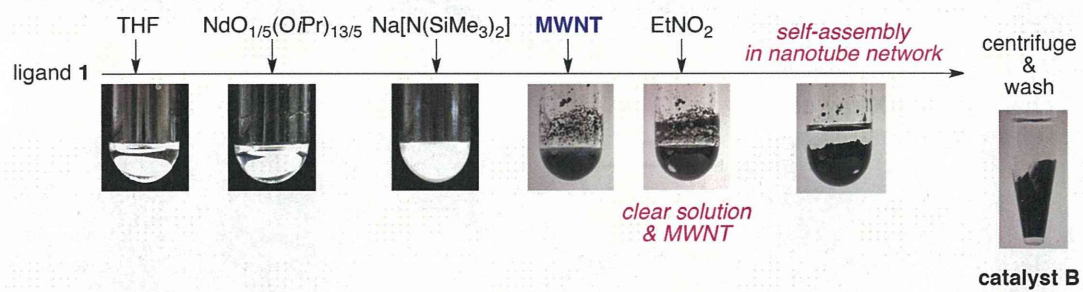


图 3.

(a) Self-assembling catalyst without MWNT



(b) Self-assembling catalyst confined in MWNT



(c) Self-assembling catalyst and MWNT mixture

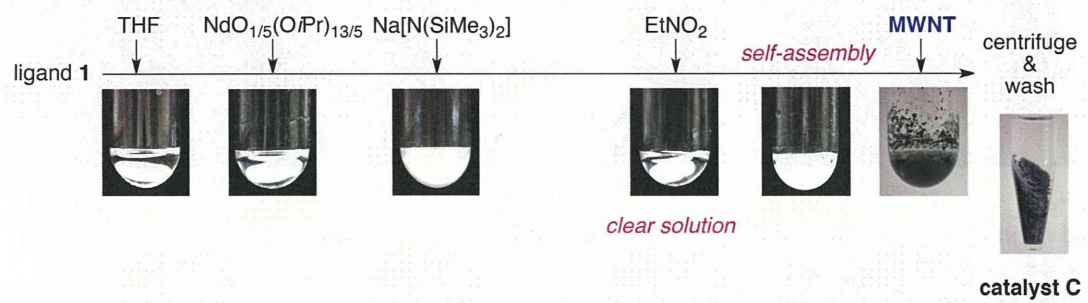
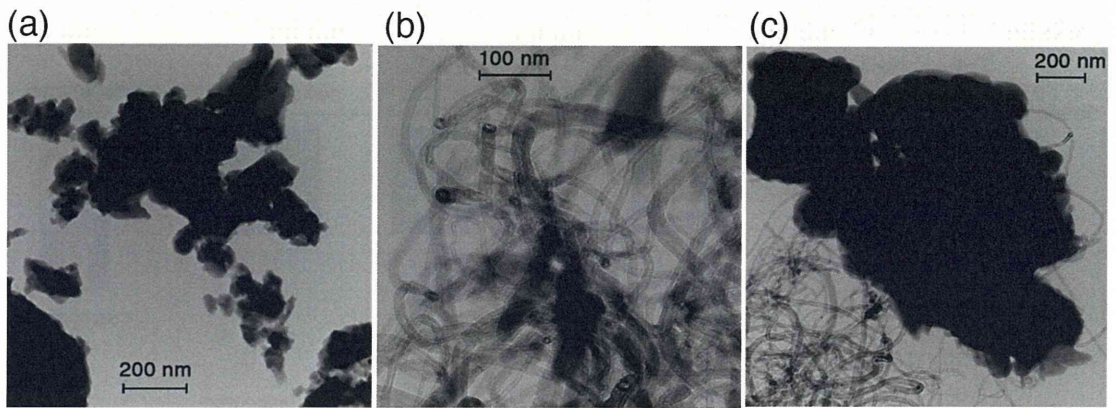
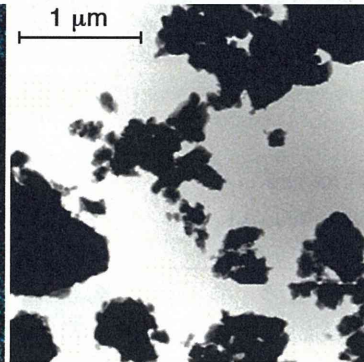
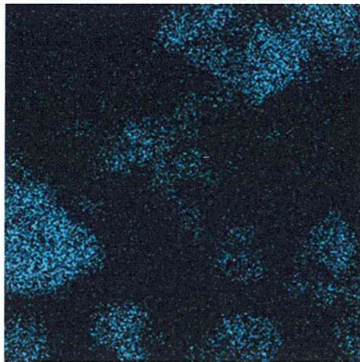


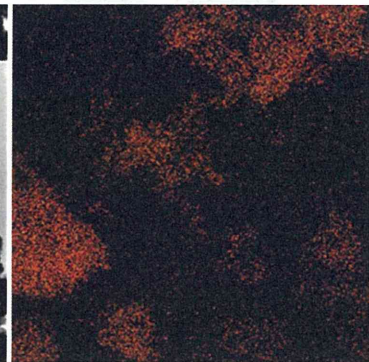
图 4.



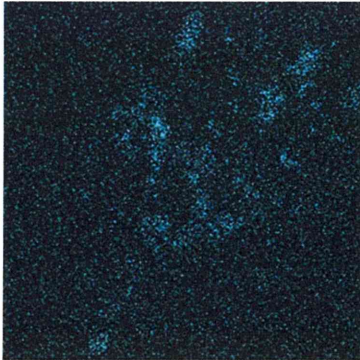
(a-2)
Nd characteristic X-ray count



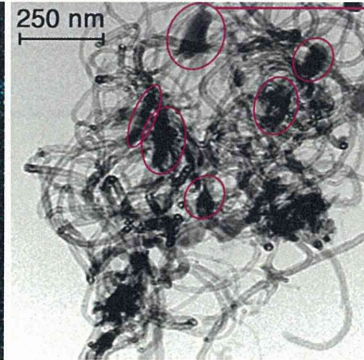
F characteristic X-ray count



(b-2)
Nd characteristic X-ray count



○ self-assembled catalyst clusters



magnified TEM image

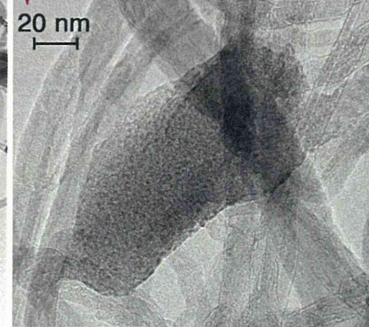
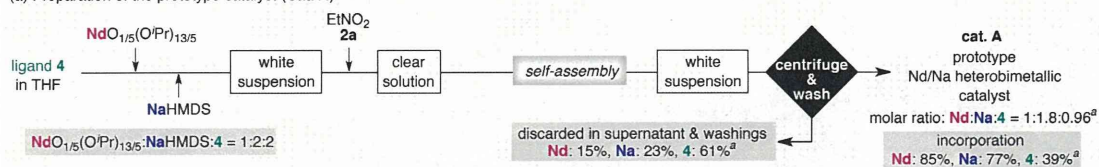
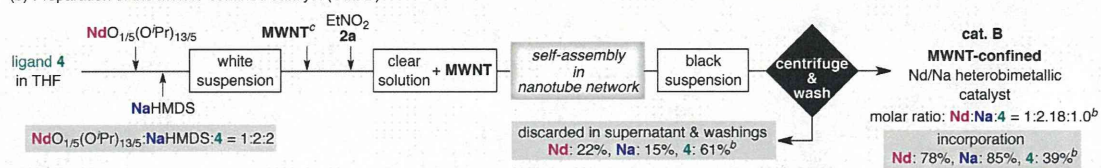


图 表 5.

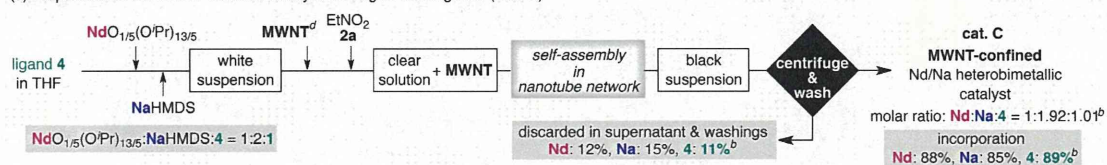
(a) Preparation of the prototype catalyst (Cat. A)



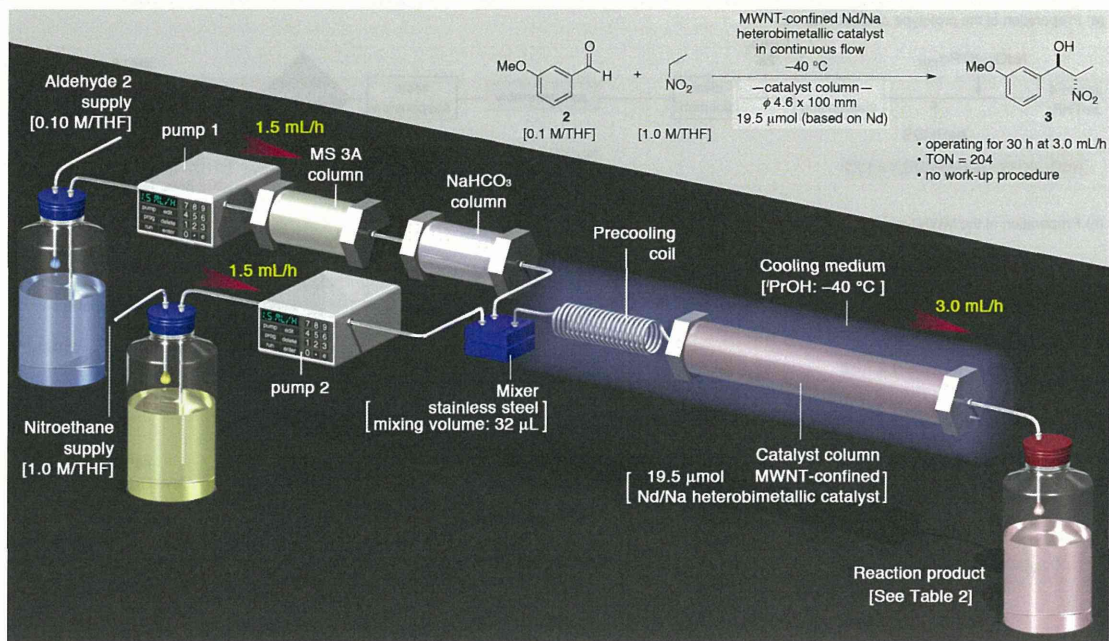
(b) Preparation of the MWNT-confined catalyst (Cat. B)



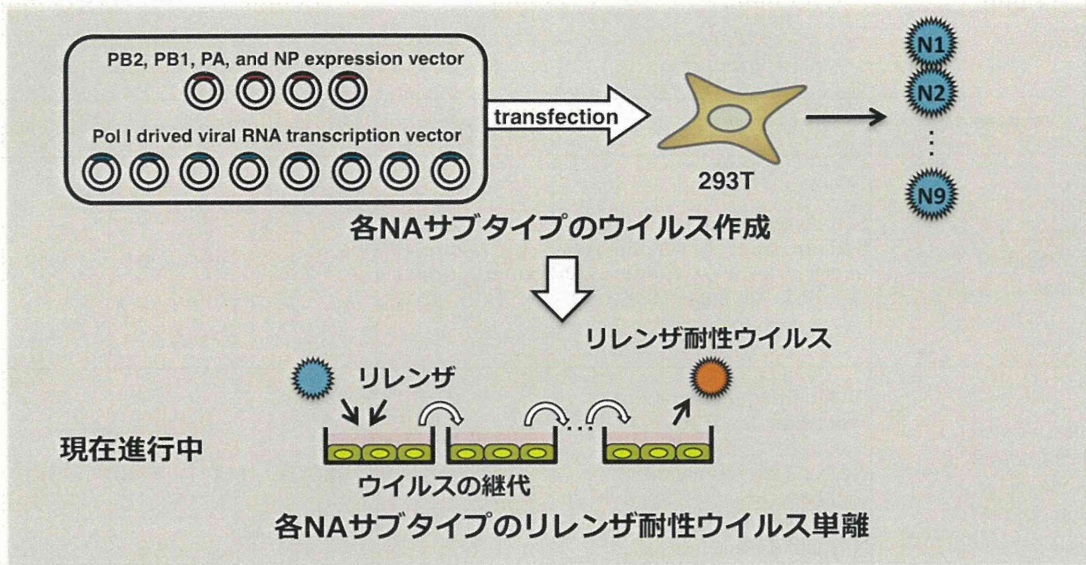
(c) Preparation of the MWNT-confined catalyst with higher loading ratio (Cat. C)



図表 6.



図表 7.



研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ogawa, T., Kumagai N.,* Shibasaki M.*	Self-Assembling Neodymium/ Sodium Heterobimetallic Asy mmetric Catalyst Confined in Carbon Nanotube Network	<i>Angewandte Chemie International Edition</i>	52(24)	6196-6201	2013
Sureshkumar D., Hashimoto K., Kumagai N.,* Shibasaki M.*	A Modified Preparation Procedure for Carbon Nanotube-Confined Nd/Na Heterobimetallic Catalyst for <i>anti</i> -SelectiveCat alytic Asymmetric Nitroaldol Reactions	<i>The Journal of Organic Chemistry</i>	78(22)	11494-11500	2013