

201420058A

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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

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26年度 総括研究報告書

研究代表者 熊谷 直哉

平成27(2015)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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

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26年度 総括研究報告書

研究代表者 熊谷 直哉

平成27(2015)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
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)

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・誘導体創出、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

然的に誘導体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体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体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体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体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体を設計し、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体の活性評価を行い、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、得られた誘導体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を担当している。前年度にリレンザ合成の基本根幹技術である *anti*-選択的触媒的不斉ニトロアルドール反応の抜本的改良に成功し、触媒の調製効率を大幅に増大させた。本触媒は安価なバルク用カーボンナノチューブ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ている (図表 3)。本反応はリレンザ合成の第一段階であり、本段階の触媒効

率が全体の合成効率に直結するため、本年度は連続フロー合成系の構築に着手した。連続フロー合成は現在医薬品のプロセス合成で注目されている技術で、古典的な大型反応釜での反応と後処理に伴う技術的な難点・廃棄物の発生・潜在的危険性を回避する 21 世紀型合成反応として注目されている (図表 4)。不斉炭素を触媒的に構築できる不斉触媒反応を連座奥フロー合成で実施している例は世界的にも極めて少なく、我々のカーボンナノチューブ担持型 Nd/Na 触媒による連続フロー合成はリレンザ合成法の刷新と合成化学的インパクトの両面で価値が高い。触媒カラムの調製を種々検討した結果、反応原料を連続的に触媒カラムに通液させ、流出液の濃縮のみで生成物を与える工業的に極めて有用な反応形式での本反応の実現に成功した (図表 5)。

ニトロアルドール反応の改良は完了し、リレンザ誘導体合成を本格的に開始した。我々が以前開発したリレンザ合成法経路は、多数の反応ステップを要するため、新しい合成経路の開発と、過去の合成経路を踏襲した誘導体合成の両面で誘導体合成を進め、今冬よりリレンザ耐性ウイルスに対する NA 阻害活性のアッセイに供し始めて

いる。

N1-9を有する12種のNA置換組換えインフルエンザウイルスを作製し、リレンザ存在化におけるそれぞれのウイルスの増殖能を細胞アッセイにより検定した結果、リレンザ非感受性のウイルスが多数存在することがわかった。NAと同時にHAも組換えたウイルスで同様の細胞アッセイを行ったところ、リレンザ感受性を示す株が多く見受けられたことから、HAとNAの活性のバランスがリレンザ感受性に影響与えていることが示唆された(図表6,7)。また、リレンザ存在化におけるインフルエンザウイルスの継代によるリレンザ耐性の獲得を検証した結果、D198Vの文献既知の変異が見られることがわかった。現在までに合成されたリレンザ誘導体のリレンザ耐性ウイルス株に対する有効性を精査した結果、著効は確認されていないが、継続的に活性評価の上耐性獲得機構を解明していく。また、迅速変異同定系をウイルスRNAの抽出、LAMP法による増幅、増幅DNAの検出の3つの段階に分け、それぞれの段階について条件検討を行っている。ウイルス感染細胞培養上清からのRNA抽出で条件検討を行い、10分でウイルスRNA抽出が完了する条件を確立

した。今後、抽出効率、時間について検討を進めていく。

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、工業的反応実施に有利なフロー合成化も達成し、触媒の最適化は完了した。現在本反応を用いて種々誘導体合成して活性評価グループにサンプル提供を開始している。

E. 結論

3年計画の2年目後半において、リレンザ合成ルートの第一ステップである触媒的不斉ニトロアルドール反応の高効率な連続フロー合成を達成した。3年目は本方法論を駆使して様々な誘導体を合成し、同時進行しているリレンザ耐性を獲得した変異ウイルスに対する活性評価を進めていく。

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) Kazuki Hashimoto, **Naoya Kumagai**,*
Masakatsu Shibasaki*
“Self-Assembled Asymmetric Catalyst Engaged in a Continuous-Flow Platform: An *anti*-Selective Catalytic Asymmetric Nitroaldol Reaction”

Org. Lett. **2014**, 16(13), 3496–3499.

2. 学会発表

1) **Naoya Kumagai**

“Exploration of Cooperative Asymmetric Catalysis Toward Efficient Synthesis of Therapeutics”

University of Toronto 講演会

2014年7月4日(Toronto/Canada)

2) **Naoya Kumagai**

“Exploration of Cooperative Asymmetric Catalysis Toward Efficient Synthesis of Therapeutics”

Montreal University 講演会

2014年7月14日 (Montreal/Canada)

3) Kazuki Hashimoto, **Naoya Kumagai**, Masakatsu Shibasaki

“Nd/Na Heterobimetallic Catalyst Confined in Carbon Nanotube Network for *anti*-Selective Catalytic Asymmetric Nitroaldol Reaction”

19th International Symposium on Homogeneous Catalysis

2014年7月10日 (Ottawa/Canada)

4) **Naoya Kumagai**

“Exploration of Cooperative Asymmetric Catalysis Toward Efficient Synthesis of

Therapeutics”

McGill University 講演会

2014年7月15日(Montreal/Canada)

5) **Naoya Kumagai**

“Exploration of Cooperative Asymmetric Catalysis Toward Efficient Synthesis of Therapeutics”

KTH Royal Institute of Technology 講演会

2014年9月4日 (Stockholm/ Sweden)

6) Kazuki Hashimoto, **Naoya Kumagai**, Masakatsu Shibasaki

“Anti-Selective Catalytic Asymmetric Nitroaldol Reaction in a Continuous-Flow Platform”

8th Asian European Symposium on Metal-Mediated Efficient Organic Synthesis

2014年9月8日 (Izmir/Turkey)

7) **Naoya Kumagai**

“Exploration of Cooperative Asymmetric Catalysis Toward Efficient Synthesis of Therapeutics”

ESPCI ParisTech 講演会

2014年9月12日 (Paris/ France)

8) **Naoya Kumagai**,

“Exploration of Cooperative Asymmetric Catalysis Toward Efficient Synthesis of Therapeutics”

Max Planck Institute 講演会

2014年9月16日(Düsseldorf/Germany)

9) **熊谷直哉**

“Development of Cooperative Asymmetric Catalysts and their Application to the Streamlined Enantioselective Synthesis of Pharmaceuticals”

三井化学特別企画 触媒科学フォーラム 触媒科学最前線 触媒科学奨励賞受賞講演

2014年10月14日 (東京)

10) **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”

中央大学理工学部 第20回有機元素化学セミナー

2015年3月7日 (東京)

11) 橋本和樹, **熊谷直哉**, 柴崎正勝

“カーボンナノチューブ固定型不斉固相触媒の開発と連続フロー合成への応用”

日本薬学会第135年会

2015年3月28日 (神戸)

12) 熊谷直哉

“医薬品の効率的な不斉合成を志向した協奏機能型不斉触媒の開発”

日本化学会第 95 春期年会 特別企画
分子空間化学に基づいた精密有機合成と機能性材料の創製

2015 年 3 月 29 日 (千葉)

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分節化ゲノム RNA 集合および子孫ウイルス出芽におけるウイルス膜タンパク質の機能解析”

第 16 回日本 RNA 学会年会

2014 年 7 月 23 日 (愛知)

2) Naoki Takizawa, Fumitaka Momose, Hiyori Haraguchi, Yuko Morikawa, Akio Nomoto

“Influenza A virus HA and M2 proteins are required for normal budding and genome packaging but not for normal segmented genome assembly”

4th international influenza meeting

2014 年 9 月 22 日 (Münster/ Germany)

3) 山崎 学, 五十嵐 雅之, 澤 竜一, 野坂 千里, 梅北 まや, 滝沢 直己,

加藤 平, 水本 清久, 野本 明男

“インフルエンザウイルスのキャップ依存エンドヌクレアーゼを阻害する微生物由来天然化合物の探索”

第 62 回日本ウイルス学会学術集会

2014 年 11 月 11 日 (横浜)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

なし。

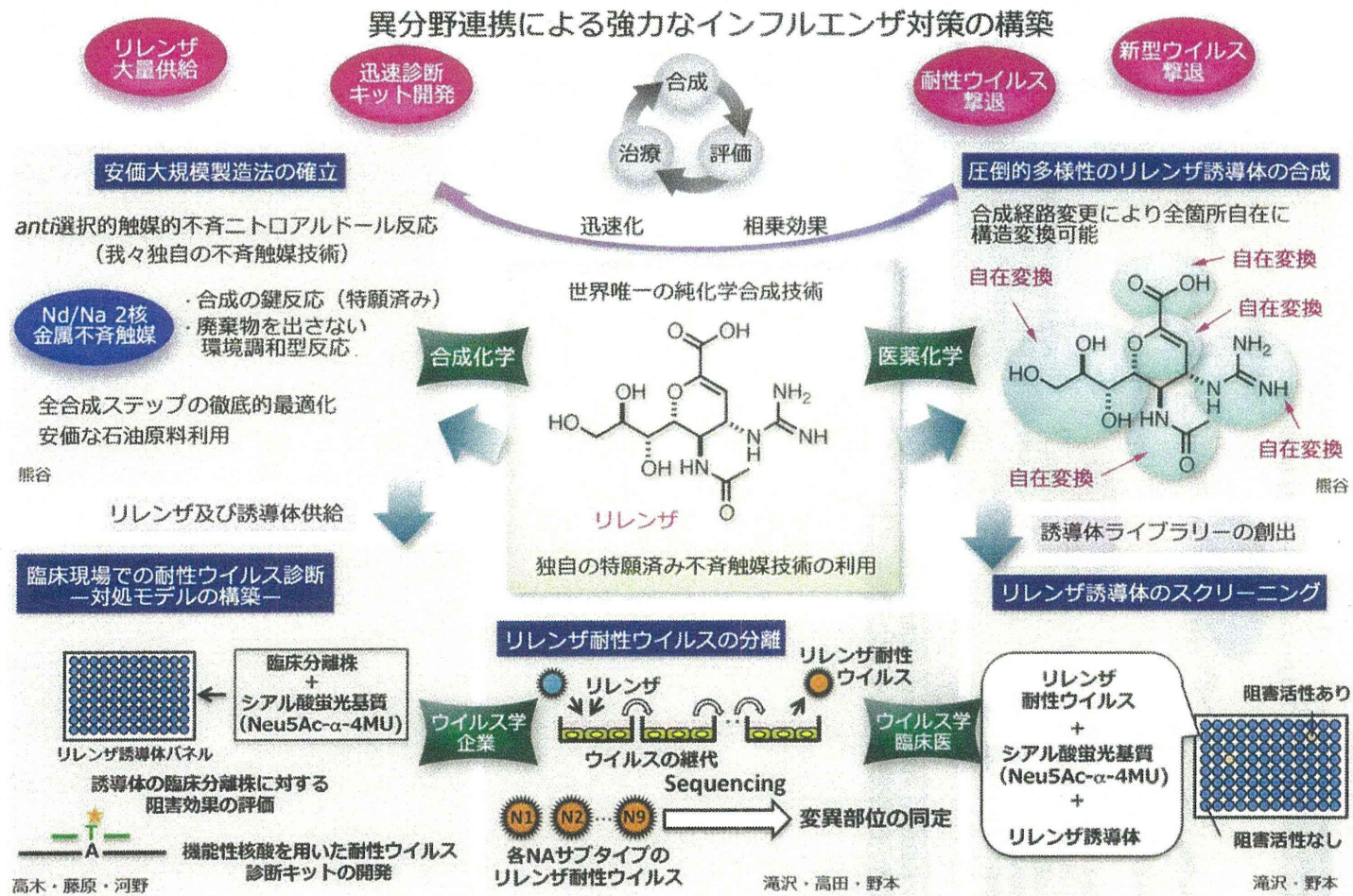
2. 実用新案登録

なし。

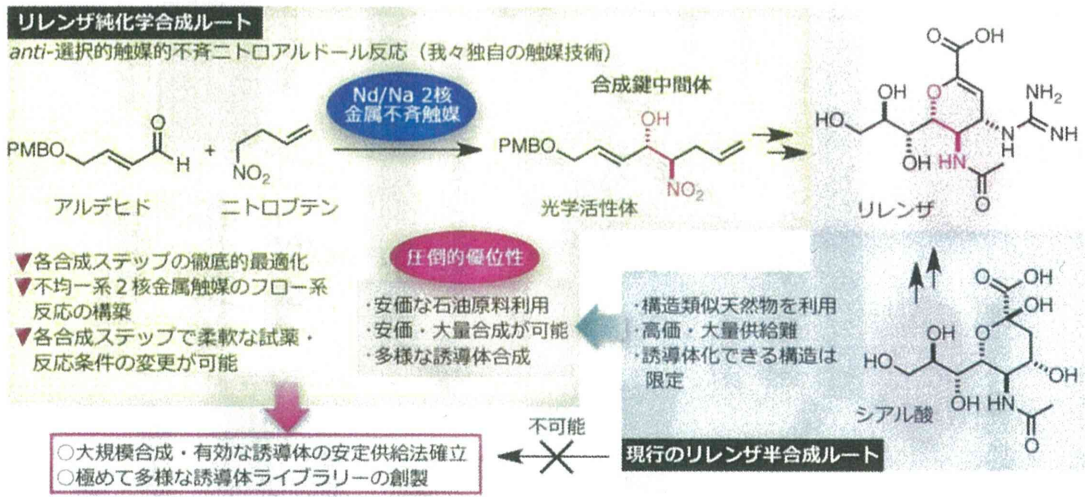
3. その他

なし。

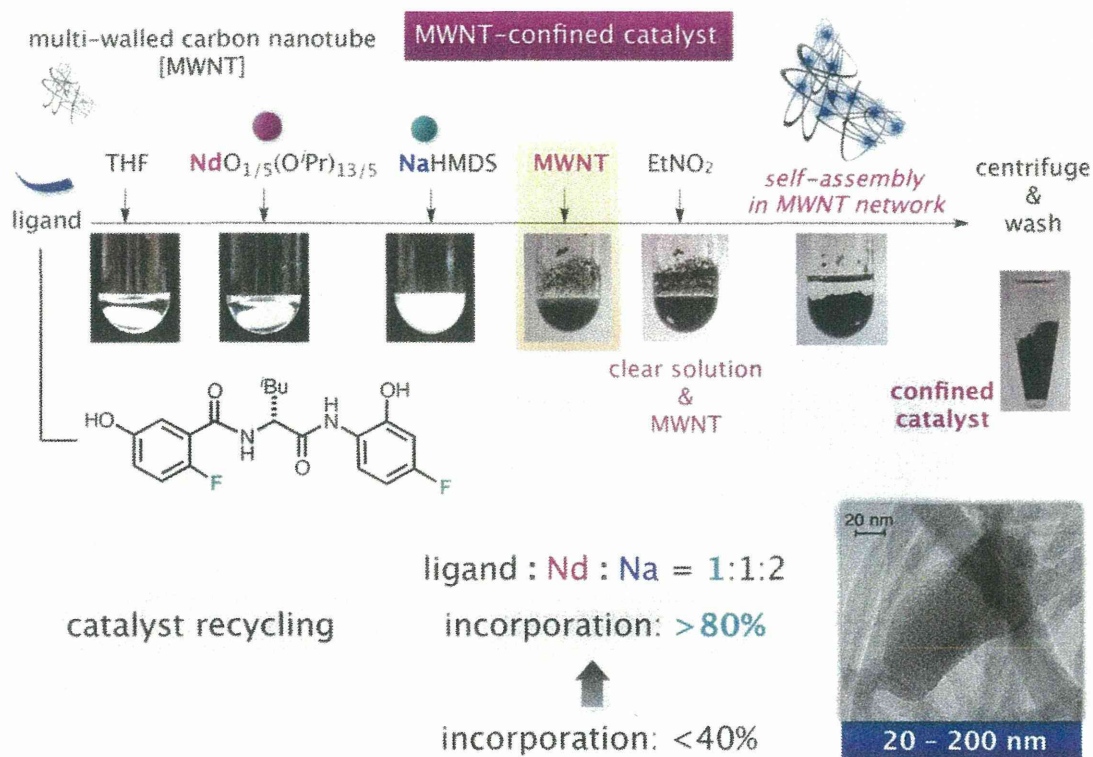
図表 1.



図表 2.



图表 3.



図表 4.

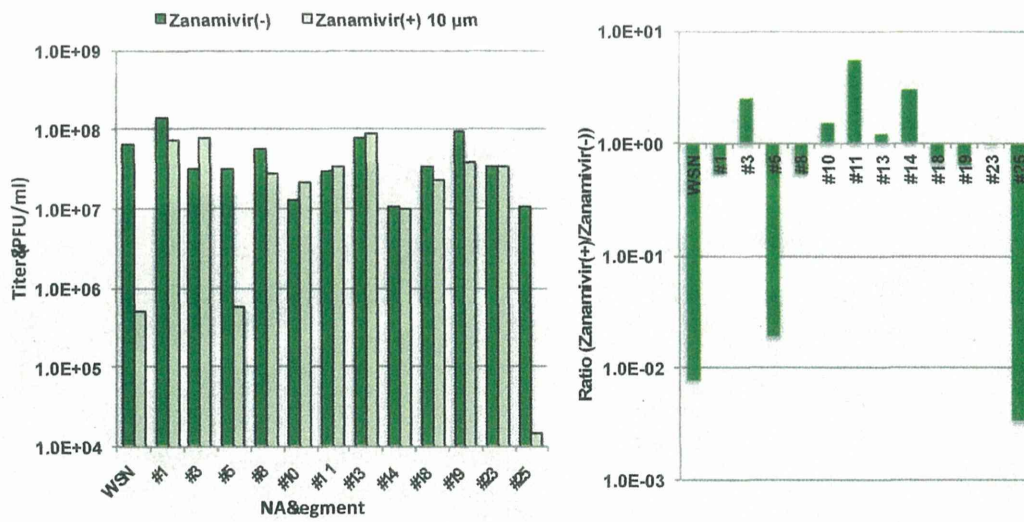
Nd/Na₂核金属不斉触媒の改良



図表 6.

組換えウイルス増殖に対するZanamivir感受性（細胞アッセイ）

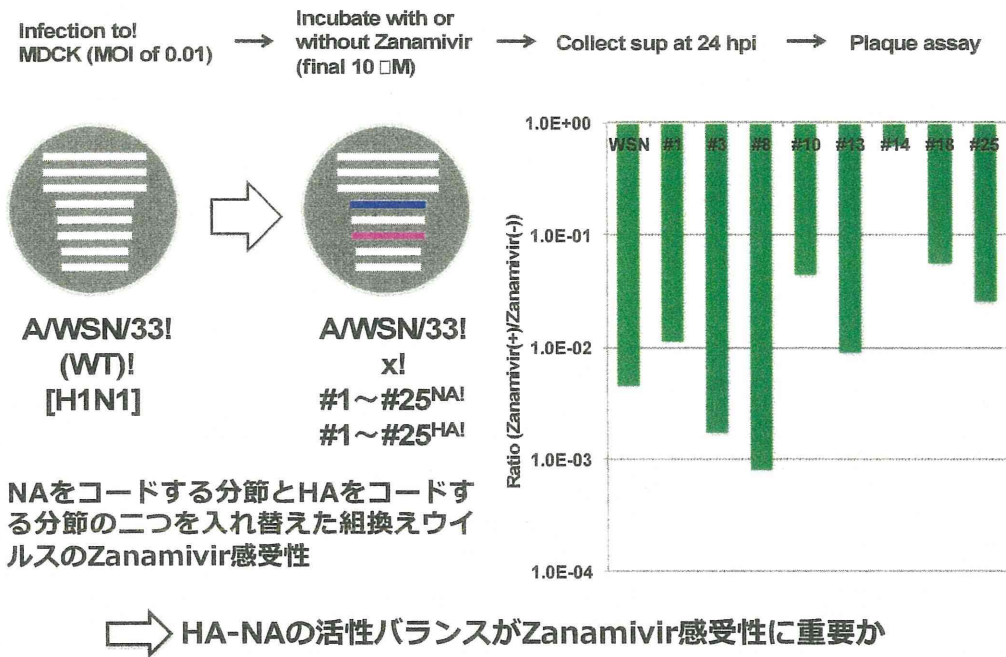
Infection to MDCK (MOI of 0.01) → Incubate with or without Zanamivir (final 10 μM) → Collect sup at 24 hpi → Plaque assay



⇒ Zanamivir非感受性の株が多数

図表 7.

HA、NAを置換した組換えウイルス株におけるZanamivir感受性



Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表