【解説】

宿主因子を標的とする C 型肝炎治療薬

新規抗 C 型肝炎ウイルス剤 NA255 の発見とその誘導体合成法の開発

川崎健一，坂本 洋，須藤正幸，青木雅弘，佃 拓夫

C型肝炎ウイルス (HCV) の感染は、重篤な肝臓疾患の主要な原因である。ウイルス除去の標準治療方法であるインターフェロン (IFN)/リバビリン併用療法のさらなる治療成績の向上を目指して、現在多くの新規薬剤が臨床開発段階にある。ここでは、その中でも新たな治療戦略として注目される、宿主因子を標的とした薬剤について、Cell-based スクリーニングによって見いだした天然由来抗 HCV 剤、NA255 を中心に紹介する。

慢性 C 型肝炎は C 型肝炎ウイルス (HCV) の持続感染による疾病で、世界で 1 億 7 千万人、我が国でも約 200 万人の感染者がいると推計されている。また HCV 感染は、慢性肝炎を経て肝硬変、肝臓がんに至る深刻な疾病であり、肝細胞がんの多くは、20 年から 40 年にわたる長期 HCV 感染が原因であるといわれている。現在 C 型肝炎に対する標準治療法は、ペグインターフェロン (ポリエチレングリコール修飾したインターフェロン製剤) と、ヌクレオシド誘導体であるリバビリンの併用療法であり⁽¹⁾、この方法は C 型肝炎に対する抗ウイルス効果を

飛躍的に向上させ、我が国の臨床試験においても難治といわれる遺伝子型 1b 型高ウイルス症例*で約 50% の高い著効率が得られている。しかし一方では、約半数でウイルス排除効果が得られず、感染が持続している現状があり、さらなる治療効果の向上のために新規薬剤の開発が強く望まれている。

新たな抗 HCV 剤開発の現状

HCV 遺伝子クローニングによる、各ウイルスタンパク質機能の分子生物学的解析の急速な進展を背景として、HCV 選択的抗ウイルス薬の開発が進んでいる (表 1)。中でも NS3/4a プロテアーゼ阻害薬、ポリメラーゼ阻害薬の開発が現在最も進んでおり、プロテアーゼ阻害薬は上述の標準療法との併用により高い効果が確認されつつあり、新たな薬剤の治療現場への導入に大きな期待が寄せられている。一方で、宿主因子を標的として抗ウイルス効果を示す薬剤は、免疫賦活作用の増強を狙った各種薬剤が開発中であるものの、今のところ明確な効果を示すには至っていない。

Host Targeting Anti-HCV Agents for the Treatment of Hepatitis C Virus Infection: Discovery NA255, and Development of Its Efficient Synthetic Method

Kenichi KAWASAKI, Hiroshi SAKAMOTO, Masayuki SUDOH, Masahiro AOKI, Takuo TSUKUDA, 中外製薬(株)研究本部

*現在までに 10 種類以上の遺伝子型が発見されており、日本ではそのうち遺伝子型 1b 型が 70% と多い。

表 1 ■ 現在臨床開発中の新たな C 型肝炎治療薬（各社プレスリリースを基に作成）

開発メーカー	薬剤	作用機序	カテゴリー	ステージ
Tibotec/J&J/Vertex	Telaprevir	NS3/4a プロテアーゼ阻害剤	HCV 選択的抗ウイルス剤	P3
Merck	Boceprevir	NS3/4a プロテアーゼ阻害剤	HCV 選択的抗ウイルス剤	P3
Human Genome Sciences	Albuferon	IFN alpha 持続製剤	新しい IFN 製剤	P3
InterMune/Roche	Danoprevir (RG7227)	NS3/4a プロテアーゼ阻害剤	HCV 選択的抗ウイルス剤	P2b
Pharmasset/Roche	RG7128	RNA ポリメラーゼ阻害剤	HCV 選択的抗ウイルス剤	P2b
Biolex	Locteron	controlled-release IFN alpha	新しい IFN 製剤	P2b
GlobeImmune	GI-5005	ワクチン	免疫賦活作用増強	P2b
Pharmasset	PSI-7977	RNA ポリメラーゼ阻害剤	HCV 選択的抗ウイルス剤	P2a
ANADYS	ANA598	RNA ポリメラーゼ阻害剤	HCV 選択的抗ウイルス剤	P2
BMS	BMS-790052	NS5A 阻害剤	HCV 選択的抗ウイルス剤	P2
Zymogenetics/BMS	PEG-INF lambda	interferon family	新しい IFN 製剤	P2
Intercell	IC41	Hepatitis C vaccine	免疫賦活作用増強	P2
Medivir & Tibotec	TMC435350	NS3/4a プロテアーゼ阻害剤	HCV 選択的抗ウイルス剤	P2
Achillion	ACH-1625	NS3/4a プロテアーゼ阻害剤	HCV 選択的抗ウイルス剤	P1b
Boehringer Ingelheim	BI201335	NS3/4a プロテアーゼ阻害剤	HCV 選択的抗ウイルス剤	P1
Idenix	IDX184	RNA ポリメラーゼ阻害剤	HCV 選択的抗ウイルス剤	P1
Presidio Pharmaceuticals	PPI-461	NS5A 阻害剤	HCV 選択的抗ウイルス剤	P1
Ligand/Roche	RG7348	RNA ポリメラーゼ阻害剤	HCV 選択的抗ウイルス剤	P1
ANADYS	ANA773	TLR7 アゴニスト	免疫賦活作用増強	P1
Tacere/Pfizer	TT-033	RNAi against HCV	HCV 選択的抗ウイルス剤	前臨床

Target-based スクリーニングと Cell-based スクリーニング

新規抗 HCV 剤の探索研究（スクリーニング）は、ウイルス自身のもっている NS3 プロテアーゼおよび RNA 依存性 RNA ポリメラーゼである NS5B などのウイルスの増殖に必須な酵素を標的因子とした Target-based スクリーニングと、宿主因子や未知の因子を標的とした Cell-based スクリーニングに大別される。Target-based スクリーニングによって見いだされる阻害剤はその標的が明確であること、三次元構造情報が利用できることが利点であり、合理的に分子レベルから創薬を進めることができると言える。しかし、一本鎖 RNA を遺伝子にもつ HCV は非常に高い頻度 ($10^{-3} \sim 10^{-4}$) で遺伝子に変異が入り、速やかに薬剤耐性を獲得するために、長期間の使用が難しいという側面がある⁽²⁾。一方、Cell-based スクリーニングから見いだされる宿主因子を標的とした阻害剤の場合、宿主因子はほとんど変異が起らないため、ウイルスを完全に排除するまで長期間の使用が可能と考えられる。しかし、医薬品として開発するためにはその標的分子を解明する必要がある（図 1）。

また、スクリーニングの対象化合物としては、一般的に合成化合物ライブラリーと天然物ライブラリーが用いられる。合成化合物ライブラリーから見いだされるリード化合物は、一般的に低活性（ $1 \sim 10 \mu\text{M}$ 程度）である場合が多く、化学構造がシンプルなことからの後の構造最適化が比較的容易である。一方で、天然物ライブラリーから見いだされるリード化合物は複雑な化学構造を有す

図 1 ■ ウイルスまたは宿主因子を標的にした抗 HCV 剤のスクリーニングカスケードと、その強みと弱み

るものが多く、最適化研究による活性増強や物性改善が難しいなどの点はあるものの、天然物または天然物由来の多くの医薬品の例から明らかなように、優秀な創薬化学者でさえ考えられないような多彩でユニークな構造と強い活性を伴ったドラッグライクな化合物が得られるという魅力がある。

筆者らは、“天然物ライブラリーを対象とした Cell-based スクリーニング”というユニークな新規抗 HCV 剤開発戦略を基に、創薬プロジェクトを展開し、NA255という新たな抗 HCV 薬剤のリード発見に至った。本稿では、この天然由来新規抗 HCV 剤について、その発見の経緯とその標的分子解明について概説するとともに、

その構造最適化研究、ならびに工業的生産を視野に入れた効率的合成方法の確立についても触れる。

新たな作用機序をもつ抗 HCV 剤のリード探索

宿主細胞因子を標的にした抗 HCV 剤の探索は、想像を超えた未知のメカニズムをもつ新規薬剤の発見が期待できるものの、これまで簡便な細胞評価系が確立していなかったため、その進展はウイルス性タンパク質を標的にした薬剤開発に比べ立ち遅れていた。しかし、近年 HCV レプリコン保持細胞と呼ばれる簡便な *in vitro* の評価系が報告されたことにより、新たな研究展開が可能となってきた。

HCV は約 9,600 塩基のプラス一本鎖 RNA をゲノムにもつウイルスで、RNA ゲノムは図 2 に示すように 1 つのタンパク質をコードする翻訳領域と、その両端の非翻訳領域からなり、mRNA として働く。非翻訳領域には IRES (internal ribosome entry site) と呼ばれるリボソームでのタンパク質合成開始に必要な部位があり、翻訳領域にある情報からウイルス複製に必要なタンパク質の合成が行なわれる。翻訳領域は構造領域と非構造領域に分けられ、それぞれウイルスの粒子形成に関わる構造

タンパク質と、ウイルス複製のための酵素であるヘリカーゼ、プロテアーゼ、そして RNA 依存性ポリメラーゼなどがコードされている。HCV ゲノムが翻訳されると、約 3,010 アミノ酸からなる一本の前駆体タンパク質を生じ、宿主由来のシグナルペプチダーゼとウイルス自身がもつプロテアーゼ (NS2 や NS3) によって切断され、成熟したウイルスタンパク質を生成する。この後、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B は複合体を形成し HCV の RNA ゲノム複製を行なう。

HCV レプリコン (レプリコンは遺伝子の複製が行なわれる単位) は、HCV ゲノムからウイルス粒子を形成する構造タンパク質領域を取り除き、非構造タンパク質が効率よく翻訳されるように設計されたものである⁽³⁾。これに加え、筆者らは、HCV レプリコンにホタルルシフェラーゼ遺伝子 (*luc*) を組み込んだレプリコン RNA を作製し、Huh-7 細胞 (ヒト肝ガン由来の細胞株) に導入することにより、そのレプリコン発現量をルシフェラーゼ活性で簡便に測定できる HCV レプリコン保持細胞を構築した。

図2 ■ HCV の遺伝子構造とポリプロテインプロセッシングによるウイルスタンパク質の生成

図3 ■ NA255 の構造と HCV レプリコン細胞に作用させたときのレプリコン複製阻害効果

リード化合物・NA255 の発見

この細胞の luc 活性変化を指標に天然物ライブラリーのスクリーニングを行なったところ、カビの一種である *Fusarium incarnatum* F1476 株の培養液に強い HCV レプリコン阻害活性を見いだした。活性物質の単離・構造決定を行なった結果、IC₅₀ (50% 阻害濃度) が 2 nM という非常に低濃度でレプリコン複製阻害を示す化合物、NA255 を発見した⁽⁴⁾。NA255 はアルキル長鎖を有するクエン酸骨格にプレニル化されたチロシンが縮合したユニークな構造を有する。この化合物自体は、弱い抗カビ活性が報告されている既知化合物 (TKR2449) であったが⁽⁵⁾、抗 HCV 活性に関する知見は今回が初めてであった。NA255 は用量依存的にレプリコン増殖を阻害し、しかも細胞毒性は示さなかった (図 3)。

NA255 の作用機序解明

NA255 の HCV レプリコン阻害活性の作用機序を解明するため、まず HCV レプリコンの複製に必須である各ウイルス酵素に対する阻害効果を検証した。その結果、プロテアーゼ、ヘリカーゼ、ポリメラーゼに対し、有意な阻害効果は認められなかった。次に、抗 HCV 活性が知られているインターフェロン (IFN) との類似作用の有無を確認するため、IFN が誘導する抗ウイルス遺伝子として知られる PKR (RNA-dependent protein kinase)⁽⁶⁾、2',5'-OAS (2',5'-oligoadenylate synthase)⁽⁷⁾、

RNase L⁽⁸⁾ の発現レベルを観察したが、いずれも有意な発現誘導は認められなかった。以上の結果から、NA255 は新規の作用機序をもつ抗 HCV 化合物であると考え、さらなる解析を実施した。

筆者らは、化学構造検索から、NA255 の化学構造がセリンパルミトイル転移酵素 (SPT) 阻害剤として知られていたミリオシン⁽⁹⁾ に類似していることに着目した。SPT は、パルミトイル CoA とセリンとの縮合反応からスタートするスフィンゴ脂質合成経路の初発酵素である (図 4)⁽¹⁰⁾。

NA255 の *in vitro* での SPT 阻害活性を調べたところ、予想されたように IC₅₀ 値が 10 nM と強い阻害活性を示した。また、細胞内での SPT 阻害に伴い、*de novo* 合成されたセラミドやスフィンゴミエリン量の減少も認められた。siRNA を用いて、HCV レプリコン保持細胞の SPT 発現を抑制したところ、抗 HCV レプリコン効果が観察された。さらに、既知の SPT 阻害剤のミリオシンや、セラミド合成阻害剤フモニシン B1⁽⁹⁾ も抗 HCV レプリコン阻害活性を示すこと、またスフィンゴ脂質合成経路中間体スフィンガニンなどを培養細胞系に加えることにより、NA255 の抗 HCV レプリコン効果が減弱することが確認された。これらの結果から、スフィンゴ脂質の *de novo* 合成が HCV 複製に深く関与しており、スフィンゴ脂質合成経路を遮断することは、新たな HCV 治療薬のアプローチになりうることが示唆された。

哺乳類細胞において、小胞体で合成されたセラミドは

図 4 ■ スフィンゴ脂質合成経路と HCV 複製阻害

SPT 阻害剤 (NA255 やミリオシン)、セラミド合成阻害剤 (フモニシン B1) およびセラミド輸送阻害剤 (HPA-12) による HCV 複製阻害

図5 ■ NA255 による HCV 複製阻害メカニズム

光学活性三置換エポキシドの位置選択的開環反応を鍵とする NA255 誘導体合成経路

アルドール反応を鍵とする効率的 NA255 誘導体合成経路の開発

図6 ■ 様々な NA255 誘導体合成のための合成経路と、工業的生産に向けた効率的合成方法の開発

ゴルジ体に輸送され、その場でスフィンゴミエリンに変換される⁽¹¹⁾。変換されたスフィンゴミエリンは、コレステロールなどとともに HCV 複製の足場となる脂質ラフト (ラフトは“いかだ”の意) と呼ばれる構造を形成する^(12, 13)。筆者らは、培養細胞系において、小胞体からゴルジ体へのセラミドの輸送阻害剤として知られている

HPA-12⁽¹¹⁾ や、コレステロール合成阻害剤であるロバタスタチンも抗 HCV レプリコン阻害活性を示すことを見いだした。さらなる HCV 複製と脂質ラフトの関係を明らかにする目的で、NA255 で処理した細胞抽出物を用いて、脂質ラフトを分画したところ、HCV 複製に参与するウイルスタンパク質のひとつである HCV RNA ポリ

メラゼタンパク質 (NS5B) の著しい減少を認めた。このように、NA255 は脂質ラフトの主要構成成分であるスフィンゴミエリンの生合成を阻害し、HCV 複製複合体の重要な足場を失わせることで抗ウイルス効果を発揮する新規作用機序を有する抗 HCV 剤であることを明らかにした (図 5)。

リード化合物から医薬候補品へ

筆者らは NA255 の構造最適化研究を実施するにあたり、NA255 からの直接誘導化を行なう一方で、その簡便な全合成法の確立も同時に行なった。研究開始当初、カビの二次代謝産物である NA255 の醗酵法による供給量には限りがあった。全合成ルートを確認することにより、量的供給を可能にするとともに、天然物の半誘導化では得難い詳細な構造活性相関の解明も期待し全合成に取り組んだ。

当時畠山らにより報告されていた Viridifungin trimethyl ester の全合成 (27 工程) を基に⁽¹⁴⁾、側鎖 *E*-アルケニル基の導入に末端アセチレンのヒドロジルコニウム化の利用、2 つの一級水酸基の同時酸化、またカルボン酸の保護基に *t*-ブチルエステルを用いることで、光学活性三置換オレフィンの位置選択的開環を鍵反応とした最長直線工程数 17 段階、総収率約 3% の簡便な NA255 誘導体の不斉合成法を確立した (図 6, 上段 1)⁽¹⁵⁾。この合成ルートにより誘導体合成を展開し、構造活性相関を明らかにするとともに、レプリコン阻害活性と細胞毒性を指標にした構造最適化を行なった。延べ 300 を超える誘導体合成を行ない、最終的に活性と安全性に優れた NA808 を開発化合物として選択した。

次に、工業的生産を視野に入れた効率的合成法の開発を行なった。すなわち、隣接する 2 つの立体中心構築にアルドール反応を適用した収斂型の合成経路を設計した。このような α -ケトエステルを用いた立体選択的アルドール反応例は知られていなかったが、種々検討した結果、Seebach らにより報告された改良型 Evans 不斉補助基⁽¹⁶⁾を用いると、望みの立体化学でアルドール反応が進行することを見いだした。一方、Evans 不斉補助基を用いた場合には 3 位と 4 位の相対立体配置の逆転が観測されており、不斉補助基の 5 位フェニル基が反応立体制御に重要な役割をもつものと推測している。また、塩化リチウムの添加は反応転化率の向上、ならびに高立体選択性の達成に必須であった。得られたアルドール付加体は、4 工程で最終物の NA808 に高い収率で導くことができた (最長直線工程数 12 段階、総収率 7%)。また、

本合成ルートは工業的生産において実施が困難であるカラム精製を一切必要とせず、晶析による精製のみで高純度 (98%) の最終物を得ることに成功している⁽¹⁷⁾。

おわりに

21 世紀に入り天然物創薬から撤退する企業が増加しているが、1970 年代より日本において醗酵技術とともに培われ、ノウハウが蓄積された天然物創薬技術ならびにライブラリーは未だ創薬リード化合物の宝庫であることは間違いない。ならば、如何にして個々の天然物に秘められた、薬としての可能性を引き出すのかという問いへの答えに今後の天然物創薬の方向性があると思われる。中外製薬では Cell-based スクリーニングとその後の標的分子探索を可能にするケミカルバイオロジー技術、そして細胞内を詳細に観察する HCS (ハイコンテンツスクリーニング) 技術を組み合わせることによって、新規作用機序を有する創薬リード化合物の創出を目指している。そして、そこに有機化学の技術が加わることにより、これらのユニークな天然物由来リードのもつ医薬品としてのポテンシャルをさらにひろげることが可能である。今回、このような創薬の例として、NA255 という新たな抗 HCV 薬の発見とその機序の解明、そして全合成による構造最適化研究と効率的合成法の一部について概説した。現在、NA808 の第一相臨床試験が進行中であり、宿主因子を標的とする新しいクラスの抗ウイルス薬として、その効果が期待される。また本研究により HCV ゲノム複製に関わる新たな宿主因子が明らかになったが、今後もこれらの手法によってウイルス複製に重要な宿主因子の発見と、それに基づく創薬が期待される。

文献

- 1) D. B. Strader *et al.* : *Hepatology*, **39**, 1147 (2004).
- 2) C. Sarrazin *et al.* : *Gastroenterology*, **132**, 1767 (2007).
- 3) V. Lohman *et al.* : *Science*, **285**, 110 (1999).
- 4) H. Sakamoto *et al.* : *Nature Chem. Biol.*, **1**, 333 (2005).
- 5) T. Kazutoh *et al.* : WO98/56755.
- 6) M. Gale Jr. *et al.* : *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 5208 (1998).
- 7) B. A. Hassel *et al.* : *EMBO J.*, **12**, 3297 (1993).
- 8) X. L. Li *et al.* : *J. Virol.*, **72**, 2752 (1998).
- 9) Y. Miyake *et al.* : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **211**, 396 (1995).
- 10) P. E. Braun *et al.* : *J. Biol. Chem.*, **243**, 3775 (1968).
- 11) S. Yasuda *et al.* : *J. Biol. Chem.*, **276**, 43994 (2001).
- 12) H. Aizaki *et al.* : *J. Virol.*, **324**, 450 (2004).
- 13) S. T. Shi *et al.* : *J. Virol.*, **77**, 4160 (2003).
- 14) S. Hatakeyama *et al.* : *Tetrahedron Lett.*, **39**, 877 (1998).
- 15) A. Masahiro *et al.* : WO2004071503.
- 16) D. Seebach *et al.* : *Helv. Chim. Acta*, **81**, 2093 (1998).
- 17) T. Kato *et al.* : WO2006088071.