抗敗血症薬として LPS アンタゴニストを指向したピランカルボン酸誘導体の合成と生物活性

望月 隆
渡辺由紀子
蔵方 慎一
汐崎 正生*

Synthesis and Biological Activities of Pyranicarboxylic Acid Derivatives toward LPS-antagonists as Antisepsicemia Drugs

Takashi Mochizuki*, Yukiko Watanabe, Shin-ichi Kurakata, and Masao Shiozaki*

LPS-antagonists are promising candidates for *anti*-septicemia drugs. The lipid A molecule, the core component of LPS for its endotoxic activity, was used as a lead compound to search for stable compounds having LPS-antagonistic activity. From our investigation of lipid A-type pyranicarboxylic acid derivatives, the following were revealed: 1) the 1- α -phosphate group of the lipid A molecule was exchangeable to an α -oriented carboxy group without loss of activity; 2) the number of fatty acid chains in the molecule is critical for whether it shows LPS-agonistic or -antagonistic activity; and 3) conversion of the ester bonds to ether bonds in lipid A-type LPS-antagonists did not affect their LPS-antagonistic activity. We also found several LPS-antagonistic pyranicarboxylic acid derivatives composed of monosaccharides.

Key words: lipopolysaccharide, LPS-antagonist, endotoxin, sepsis, lipid A, glycosylation, C-glycosylation

はじめに

敗血症は、感染症による全身性炎症反応症候群 (SIRS) と定義されている疾患である。具体的には、細菌あるいは真菌による感染症の末期における重篤な症状で、異常体温、頻拍、頻呼吸、血圧低下、臓器の機能不全などを呈する。その米国における症例は、年間約 50 万人を数え、死亡率は 35% に上るとされている¹⁾。また細菌感染症による敗血症症例のおよそ 50–60% がグラム陰性菌に由来するものとされている。グラム陰性菌由来敗血症の治療薬の潜在的需要は大きいものと考えられる²⁾。

敗血症の機構は次に述べるように考えられている (図 1)。生体 (宿主) に感染したグラム陰性菌により細胞外膜成分のリポ多糖体 (lipopolysaccharide, LPS) が血中に放出されると、これが血中の LPS 結合蛋白質 (LBP) と複合体を形成し、さらにマクロファージと呼ばれる宿主自然免疫細胞上の膜レセプター CD 14 と結合する³⁾。生成する複合体は、さらにマクロファージ上の膜貫通型 LPS レセプターの 1 つである Toll-like receptor 4 (TLR 4) と結合し、これを契機にマクロファージ細胞内

でのシグナル伝達が始まる⁴⁾。マクロファージの活性化によって、tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8 などの炎症性サイトカインや一酸化窒素などの生理活性物質の放出が促され、これによって種々の細胞においてプロスタグランジン類、血小板活性化因子 (PAF)、活性酸素などの 2 次的伝達物質が産生される²⁾。生体レベルでは、発熱、補体第二経路の活性化、炎症反応の拡大、血圧低下などが引き起こされ、さらに症状が進展すると、全身性の血栓形成 (DIC) が引き起こされ、組織の壊死と臓器の機能不全 (MOF) を呈し、ショック死へと至る (図 1)。

Fig.1 敗血症の機構

上記のような重症疾患である敗血症の治療薬として、炎症性サイトカイン遮断薬や抗 CD 14 抗体など多くの

* 三共株式会社創薬化学研究所

* Exploratory Chemistry Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd.

開発研究がなされてきたものの、現在までのところ臨床的に有効なものが見いだされるには至っていない。つい最近、イーライ・リリー社により開発された血液凝固抑制作用を有するたんぱく質である活性化プロテインCが、FDA(米国食品医薬局)より承認され発売が開始された。

これらに対してLPSアンタゴニストは、一連の作用カスケード中の初期のステップである宿主中のLPSレセプターへのLPSによる結合を阻害する薬剤である。LPS様活性を持たず、LPSによるマクロファージ活性化を抑制する薬剤があれば、引き続き敗血症性疾患に至るすべての作用を抑制することができると考えられる(図1)。

LPSは、O抗原部位、コア部位と呼ばれる多糖部位と、リピドAと呼ばれるリン酸化糖脂質により構成される。そのマクロファージ活性化の本体は、リピドA部位が担っていることがわかっている(図2)。1980年に芝、楠本ら⁵⁾や阿知波ら⁶⁾によって大腸菌のリピドA(*E. coli* lipid A, 1)の全合成が達成され、その構造が明らかになるとともに、構造と活性の相関に関する研究が進んだ。

Fig.2 *E. coli* LPS. Kdo : 3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid; Hep : L-glycero-D-manno-heptose; Glc : glucose; Gal : galactose; GlcNAc : N-acetyl-glucosamine.

リピドA分子は、1',6-β結合型グルコサミン2糖を基本骨格とし、1,4'位にリン酸残基を有し、さらに2,3,2',3'位にそれぞれ長鎖脂肪酸が縮合した構造を有している(図2)。大腸菌リピドAを含む大部分のリピドA分

子は、LPS様マクロファージ活性化能を示す。しかしその中で、大腸菌リピドAの生合成前駆体であるリピドIVa(2)が、ヒト細胞においてLPSによるマクロファージの活性化を抑制するLPSアンタゴニスト活性を示すことが知られており(図3)⁷⁾、さらにまた、*Rhodobacter capsulatus*⁸⁾、*R. sphaeroides*⁹⁾といった菌由来のリピドA(3,4)も、ヒトおよびマウス細胞においてLPSアンタゴニスト活性を示すことが明らかにされている(図3)。

このような天然物をリード化合物として、より良いLPSアンタゴニストを探索するための合成的な展開がなされてきた。Christ, 岸らは、LPSアンタゴニスト活性を示す*R. capsulatus* lipid A(3)をリードとして、主にエステル結合のエーテル結合への変換を行い、ヒトおよびマウス両方についてLPSアンタゴニスト作用を有する化合物E-5531(5)を開発した¹⁰⁾。さらに彼らは、*R. sphaeroides* lipid A(4)をリードとして、より合成の容易なLPSアンタゴニスト化合物としてE-5564(6)を開発した¹¹⁾。これらの化合物は、現在米国で臨床試験が進められており、これまでのところE-5564が最も有望な化合物と考えられている¹¹⁾(図4)。

Fig.4

さて一方、リピドA誘導体の1位リン酸エステル基は、その活性発現には必須なものの、化合物の水溶液中での不安定性の要因になっていると思われる。そこでこれまでも、その1位α配置のリン酸エステル基を様々な酸性残基に変換する試みがなされてきた。草間ら¹²⁾は、*E. coli* lipid A(1)の1位をα配置のホスホノエチルオキシ基に変換した誘導体7を合成し、これが元の1と同等のLPS様エンドトキシン活性を持つことを示した。また彼らは、1位を1,3-ジカルボキシイソプロピルオキシ基¹³⁾とした化合物DT-5461(8)が、エンドトキシン活性を示すことを報告している。また楠本ら¹⁴⁾は、*E. coli* lipid Aの1位リン酸エステル基をカルボキシメチルオキシ基に変換して化合物9としても、エンドトキシン活性は保持されることを明らかにしている(図5)。

Fig.3

以上のようにリピドAの1位リン酸エステル基は、エンドトキシン活性発現にとって α 配置の他の酸性残基で代替可能なことがわかっている。

Fig.5

以上のような背景のもと、筆者らは抗敗血症薬の開発を目的に、LPS アンタゴニスト活性を有する化学的に安定なリピドA類縁体の合成探索研究を行ってきた。その中で、リピドA類縁体の化学的に安定な1位官能基として、 α 配置のカルボキシル基を導入した誘導体を合成し、これが元のリピドAと同様な生物活性を示すこと、すなわち1位官能基として α -カルボキシル基がリン酸エステル基に対して代替可能であることを見いだした。また、そのリピドA型ピランカルボン酸誘導体について、脂肪酸鎖の置換様式を変えることによって、LPS アンタゴニスト活性を有する誘導体を見いだすに至った。また、加水分解が懸念される脂肪酸鎖とのエステル結合をエーテル結合に変換した誘導体の合成手法を確立し、これらもまたLPS アンタゴニスト活性を有することを見いだした。以下その詳細を述べたい。

1. 単糖 (GLA-60) 型ピランカルボン酸誘導体の合成と生物活性

1.1 GLA-60 型ピランカルボン酸誘導体の合成¹⁵⁾

長谷川、木曾らは、単糖についてリピドA(1)をモチーフにして様々な誘導体を合成し、LPS アゴニスト (エンドトキシン) 活性を有する単糖からなる化合物 GLA-60(10)を見いだした¹⁶⁾。GLA-60(10)は、LPS アゴニスト活性を有し、顕著な抗腫瘍効果を発現する4-O-ホスホノグルコサミン誘導体である。リピドA(1)の図中左側の非還元末端糖部分に対応しており、2位にアミド結合を介して脂肪酸鎖を、3位にエステル結合を介して2つに分岐した脂肪酸鎖を有しており、長鎖脂肪酸鎖が合計3本存在する化合物である(図6)。

Fig.6 GLA-60 (10).

まず筆者らは、GLA-60(10)の顕著なLPS アゴニスト活性に着目し、化合物中1位がフリーの水酸基であることから、この部分の官能基変換による生物活性の挙動に興味を持った。2糖誘導体リピドA(1)の還元末端糖部分の1位は α 配置のリン酸エステル基であることを参考にして、より安定な酸性残基を導入することを考え、そのアノマー位に α 配置でカルボキシル基を有するピランカルボン酸誘導体11aを合成することとした。またその際、11aの3位(GLA-60では2位に相当)アミド結合長鎖脂肪酸中3位の水酸基を除去した化合物11b、さらに11bの7位水酸基をフッ素原子に変換した化合物11cもそれぞれ合成し、3位脂肪酸鎖中の水酸基ならびに7位置換基の生物活性への影響を調べることに

Fig.7

した(図7)。

まず、 α 配置のピランカルボン酸を得るために α 選択的1炭素ユニットの導入反応を検討した。Schmidt¹⁷⁾らの方法を用いて、2-アジド-2-デオキシグルコース誘導体に対する α 配置選択的なC-シアノグリコシル化を試みることにした。グルコサミン塩酸塩(12)を出発原料にして、Vasella¹⁸⁾の方法に従ってトリフルオロメタンスルホニルアジド(TfN₃)を用いるジアゾトランスファー、引き続き4つの水酸基のアセチル化を順次行い、アジド体13を得た。これに対しヒドラジンアセテートを作用させてアノマー位を選択的に脱保護し¹⁹⁾、さらにトリクロロアセトニトリルを塩基存在下作用させて、イミデート14を1位の立体異性体混合物($\alpha/\beta=7$)として得た。混合物のまま14に対して、塩化メチレン中TMSOTf存在下、トリメチルシリルシアニド(TMSCN)を作用させた¹⁷⁾。その結果、 α -選択的なC-グリコシル化反応が進行し、 α -シアノノ体15が高収率で得られた。(スキーム1)

Scheme 1

次に、化合物15の保護基の変換を行いアセトニド16とし、これにトリフェニルホスフィンを用いて、3位アジド基をアミンに還元した。引き続き、(R)-3-(ベンジルオキシ)テトラデカン酸(17)、またはテトラデカン酸とのDCC縮合を3位アミノ基選択的にを行い、アミド18aおよび18bとした。化合物18a, bの1位ニトリル基を酸性条件下加水分解してカルボン酸とし、同時に5,7-アセトニド基が脱保護された。引き続き、ジフェニルジアゾメタンを作用させ、カルボキシル基をジフェニルメチルエステルとして保護してトリオール19a, bをそれぞれ得た。トリオール19a, bに対し、再度5,7-ア

セトニド保護を行い20a, bとし、4位水酸基に(R)-3-(テトラデカノイルオキシ)テトラデカン酸(21)をDMAP存在下DCC縮合した後、5,7-アセトニド基を85%酢酸水溶液によって脱保護して、ジオール22a, bとした(スキーム2)。

Scheme 2

ジオール22a, bの7位を選択的にベンジルオキシカルボニル化して、これにクロロリン酸ジフェニルをDMAP存在下作用させ、5位リン酸エステル化して、23a, bとした。続いて、2段階の脱保護反応によって、GLA-60型ピランカルボン酸11a, bを合成した。すなわち、化合物23a, bをパラジウム-炭素触媒を用いて加水素分解して、1位ジフェニルメチルエステル基、7位ベンジルオキシカルボニル基、および23aについては3位アミド脂肪酸鎖の3位ベンジル基を一挙に脱保護し、最後に酸化白金存在下加水素分解反応によって、5位リン酸エステルの2つのフェニル基を脱保護してピランカルボン酸11a, bを調製した(スキーム3)。

7-フッ化ピランカルボン酸11cは、23bより誘導した。23bの1,7位をパラジウム-炭素触媒下加水素分解により脱保護し、引き続きジフェニルジアゾメタンを作用させて、1位を再度保護し直して、アルコール24を定量的に得た。アルコール24に対して三フッ化ジエチルアミノ硫黄(DAST)を作用させることにより、フッ化物25を得た。パラジウムおよび白金による2段階の加

i, ClCO_2Bn , Py., CH_2Cl_2 , 97% (R = OBn), 97% (R = H);
 ii, $\text{ClP}(\text{O})(\text{OPh})_2$, DMAP, CH_2Cl_2 , 91% (23a), 87% (23b);
 iii, H_2 , Pd / C, THF, 75% (R = OH), 89% (R = H);
 iv, H_2 , PtO_2 , THF, 96% (11a), 92% (11b).

Scheme 3

水素分解反応により、目的の7-フッ化ピランカルボン酸 11c を定量的に合成することができた(スキーム 4)。

i, H_2 , Pd / C, THF; ii, Ph_2CN_2 , THF, quant. (2 steps); iii, DAST, CH_2Cl_2 , 87%; iv, H_2 , Pd / C, THF, 66%; v, H_2 , PtO_2 , THF, quant.

Scheme 4

1.2 エーテル結合 GLA-60 型ピランカルボン酸誘導体の合成²⁰⁾

上述したピランカルボン酸誘導体 11a-c は、化合物中にエステル結合を2つ有している。生体中ではエステル結合は、エステラーゼを介した加水分解反応などによって分解されてしまうことが懸念される。そこで、我々の初期の研究で合成したリポド A 3 位エーテル化合物²¹⁾のように、4 位脂肪酸鎖がエーテル結合よりなる誘導体を合成することとした。その際に、3 位アミノ基上の脂肪酸鎖および 7 位官能基についても検討を加えた。すなわち、3 位アミノ基上の脂肪酸鎖として、テトラデカノイル基(26a, b)、3-ヒドロキシテトラデカノイル基(27a-c)に加え、2,2-ジフルオロテトラデカノイル基(28a-c)を、7 位官能基として、水酸基(26a, 27a, 28a)、メトキシ基(26b, 27b, 28b)およびフルオロ基(27c, 28c)

Fig. 8

を持つものを合成することとした(図 8)。

まず、ピランカルボン酸の 4 位に導入するエーテル結合長鎖炭化水素を合成した。(R)-3-ヒドロキシテトラデカン酸を LAH 還元して得られる (R)-1,3-テトラデカンジオール(29)²²⁾に対して、*n*-ドデカノール(30)を *p*-TsOH 存在下作用させ、アセタール 31 とした。引き続き、DIBAL を作用させ 1 級アルコール 32 を選択的に得、その水酸基をメタンスルホン化してメシラート 33 を調製した(スキーム 5)。

i, *n*-C₁₁H₂₃CHO (30), *p*-TsOH, toluene, 60 °C, 96%;
 ii, DIBAL, CH_2Cl_2 , 89%; iii, MsCl, Et₃N, CH_2Cl_2 , 98%

Scheme 5

得られたメシラート 33 を用いてエーテル結合 GLA-60 型ピランカルボン酸の合成を行った。グルコサミンから数工程を経て得られるアミン 34 を出発原料とし、Vasella¹⁸⁾の方法によるジアゾトランスファー反応によってアジド 35 へと変換した。このアジド 35 に、メシラート 33 を水素化ナトリウム存在下作用させ、エーテル 36 を合成した。36 の 1 位アリル基を二酸化セレンにより脱保護し、前述の Schmidt ら¹⁷⁾の方法による C-グリコシル化反応を行い、 α -シアノ糖 38 を得た。化合物 38 の 3-アジド基を還元してアミノ基へと変換し、続いて (R)-3-ベンジルオキシテトラデカン酸(17)との縮合反応を行ってアミド 39 とした。化合物 39 に対して塩酸を作用させて、1 位シアノ基のカルボキシル基への加水分解とともに 5,7 位アセトニド基を脱保護し、続いてジフェニルジアゾメタンを作用させてジフェニルメチルエステル体 40 とした。7 位水酸基のシリル化、5 位リン酸エステル化、7 位シリル基脱保護を順次行って、アルコール 41a を得た。41a は、 Me_3BOF_4 を作用させることにより 7 位をメチルエーテル化し 41b へと変換し、また DAST を作用させることにより 7 位をフルオロ化

し 41c へと変換した。化合物 41a-c について、1 位、5 位および 3 位に存在する保護基を 2 段階の加水素分解反応によって脱保護し、目的化合物 27a-c を合成した (スキーム 6)。同様な方法によって、3 位アミノ基と縮合する脂肪酸としてテトラデカン酸または 2,2-ジフルオロテトラデカン酸を用いることにより、化合物 26a, b および 28a-c を合成した。

i, TiN_3 , DMAP, MeOH, 91%; ii, **33**, NaH, DMF, 73%; iii, SeO_2 , AcOH, dioxane, reflux, 70%; iv, Cl_3CCN , DBU, CH_2Cl_2 , 91%; v, TMSOTf, CH_2Cl_2 , 75%; vi, PPh_3 , then NH_4OH , THF; vii, (R)-3-(benzyloxy)tetradecanoic acid (**17**), DCC, DMAP, CH_2Cl_2 , 79% (2 steps); viii, 4 M HCl, dioxane- H_2O , 60°C; ix, Ph_2CN_2 , DMF, 60°C, 50% (2 steps); x, $t\text{-BuMe}_2\text{SiCl}$, DMAP, CH_2Cl_2 , 87%; xi, $(\text{PhO})_2\text{P}(\text{O})\text{Cl}$, DMAP, CH_2Cl_2 , 95%; xii, 3 M aq. HCl, THF, 93%; xiii, Me_3OBF_4 , 2,6-di(*tert*-butyl)-4-methylpyridine, CH_2Cl_2 , 92%; xiv, DAST, DME, 52%; xv, H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, EtOH, 82% (R = OH), 83% (R = OMe), 72% (R = F); xvi, H_2 , PtO_2 , THF, 74% (**27a**), 92% (**27b**), 69% (**27c**).

Scheme 6

1.3 GLA-60 型ピランカルボン酸誘導体の生物活性^{15,20)}

合成したピランカルボン酸誘導体の生物活性を、ヒト単球系細胞 U937 を用いて、それが LPS や合成化合物の刺激により産生する $\text{TNF}\alpha$ の量を測定することによって見積もった。すなわち U937 細胞に対して、合成化合物のみを作用させることにより、 $\text{TNF}\alpha$ の産生が促されれば LPS アゴニストであるし、LPS を刺激した際に産生される $\text{TNF}\alpha$ の量を合成化合物により抑制したら LPS アンタゴニスト活性を有することになる。

これまでに得た一連のピランカルボン酸誘導体は、単独では U937 細胞での $\text{TNF}\alpha$ の産生を全く誘導しな

かった。すなわち、LPS アゴニスト活性を持たないことがわかった。また一連の化合物はすべて、LPS 刺激により誘発される $\text{TNF}\alpha$ の産生を濃度依存的に抑制すること、すなわち LPS アンタゴニスト活性を有することがわかった。その 50% 阻害濃度 (IC_{50}) を表 1 に示す。

Table 1 Biological activities of GLA-60-type pyranocarboxylic acid derivatives.

Compound	agonist	antagonist (IC_{50} , nM)
11a	-	+ (70)
11b	-	+ (8)
11c	-	+ (6)
26a	-	+ (12)
26b	-	+ (360)
27a	-	+ (32)
27b	-	+ (70)
27c	-	+ (21)
28a	-	+ (3.6)
28b	-	+ (1.5)
28c	-	+ (5.7)

LPS アンタゴニスト活性について **11a-c** を比べると、7 位官能基は水酸基とフルオロ基では大きな差異はないことがわかった。また 3 位アミノ基上の脂肪酸鎖としては、3 位に水酸基を有するものよりも官能基のないテトラデカン酸を有するものの方が強い活性を示すことがわかった。またこれらの化合物中のエステル結合をエーテル結合に変換した **26a, b**, **27a-c**, **28a-c** では、エステル結合誘導体と対応するエーテル結合誘導体の LPS アンタゴニスト活性にほとんど差異はないことがわかった。またエーテル結合誘導体の中で、3 位アミノ基上の脂肪酸鎖として、電気陰性度の最も強いフッ素基を有する 2,2-ジフルオロテトラデカン酸が最も強い LPS アンタゴニスト活性を発現することが明らかとなった。

以上の生物活性試験の結果より、単糖 (GLA-60) 型ピランカルボン酸誘導体について次に述べるのがいえる。まず、LPS アゴニストである GLA-60(10) に対して、その 1 位水酸基を α 配置のカルボキシル基に変換すると、LPS アゴニストから LPS アンタゴニストへの活性の転換が起こることがわかった。また、化合物中のエステル官能基をエーテル基に変換しても、生物活性に影響を与えないことがわかった。さらに 3 位アミノ基に結合する脂肪酸の構造が LPS アンタゴニスト活性の強さに影響を及ぼすことを見いだした。

2. リピド A 型ピランカルボン酸誘導体の合成と生物活性²³⁾

2.1 リピド A 型ピランカルボン酸誘導体の合成

前述したように単糖の GLA-60 型ピランカルボン酸誘導体では、GLA-60(10) の 1 位水酸基を α 配置のカル

ボキシル基に変換することで、LPS アゴニストから LPS アンタゴニストへの活性の転換が観測された。そこで、強力な LPS アゴニストである *E. coli* lipid A (1) について、1 位リン酸エステル基をカルボキシル基に変換したリポド A 型ピランカルボン酸誘導体の生物活性に興味を持った。すなわち、1 の 1 位のみをリン酸エステル基からカルボキシル基に換え、他の官能基は同様な化合物 **42b** を合成し、その生物活性を調べることによって、1 位(ピランカルボン酸誘導体では 2 位に相当)カルボキシル基の導入による LPS アゴニストから LPS アンタゴニストへの活性の転換が起こるか否かを調べることにした。また、リポド A と同様の 2 糖誘導体の方が単糖の GLA-60 誘導体よりも強い LPS アンタゴニスト活性を示すことを期待した。

また一方、1 の生合成前駆体であるリポド IVa (2) は、前述の通りヒト細胞において LPS アンタゴニスト活性を示すことが知られている。1 が脂肪酸鎖を 6 本有するのに対し、2 は脂肪酸鎖を 4 本しか有していない。この脂肪酸鎖の数が生物活性に及ぼす影響についても興味を持たれた。そこで、リポド A 型ピランカルボン酸誘導体について、脂肪酸を 4 本有する化合物として 2'-アセチル体 **43b** を合成することとした。またそれぞれの化合物について、その 6' 位置換基の影響を調べる目的でメトキシ体 **42a**, **43a**, フルオロ体 **42c**, **43c** についても合成することとした(図 9)。

Fig.9

化合物 **42a-c**, **43a-c** は、図中右側の還元末端糖部分と、左側の非還元末端糖部分とのグリコシル化反応により合成することとした。還元末端糖部分については、スキーム 1, 2 に示した方法と同様にしてジオール **44** を合成した(図 10)。

Fig.10

非還元末端糖部分は、2 位がトリクロロエトキシカルボニル (Troc) 基で保護されたアミノグリコシド **45** を出

発原料とした^{5,13,14})。45 の 3 位水酸基に (*R*)-3-(テトラデカノイルオキシ)テトラデカン酸 (**21**) を DCC-DMAP 縮合し、酸性条件による 4,6 位アセトニド基の脱保護を行い、ジオール **46** とした。46 に対して、6 位ベンジルオキシカルボニル化、4 位リン酸エステル化を順次行なって、アリルグリコシド **47** を調製した。47 に対して、イリジウム (I) 錯体 ($[\text{Ir}(\text{cod})(\text{PMePh}_2)_2]\text{PF}_6$) 触媒によるビニルエーテルへの異性化、引き続きヨウ素と水的作用による加水分解によって 1 位アリル基の脱保護を行って、糖供与体 **48b** を調製した²⁴) (スキーム 7)。

i, (*R*)-3-(Tetradecanoyloxy)tetradecanoic acid (**21**), DCC, DMAP, THF;
ii, *p*-TsOH, MeOH, 67% (2 steps); iii, ClCO_2Bn , Py, THF, 60%;
iv, $(\text{PhO})_2\text{P}(\text{O})\text{Cl}$, DMAP, CH_2Cl_2 , 98%; v, $[\text{Ir}(\text{cod})(\text{PMePh}_2)_2]\text{PF}_6$, THF;
vi, I_2 , H_2O , THF, 73% (2 steps).

Scheme 7

同様な手法とスキーム 6 に示した 6 位の官能基変換を経て、6-メトキシ型糖供与体 **48a** と 6-フルオロ型糖供与体 **48c** を調製し、これらと糖受容体 **44** とのグリコシル化反応を行った。グリコシル化反応は、イミデート法²⁵)を用いることによって、まずまずの収率で位置および立体選択的に目的とする 2 糖化合物が得られることがわかった。

すなわち、まずヘミアセタール **48a-c** に対して、DBU 存在下トリクロロアセトニトリルを作用させ、イミデート **49a-c** を調製した。引き続いてこれらに対して、塩化メチレン中糖受容体 **44** およびモレキュラーシーブス 4A 存在下、TMSOTf を低温下作用させると、1',7-β-グリコシド **50a-c** のみが、それぞれ選択的に得られた(スキーム 8)。

得られたグリコシド **50a-c** から、2' 位に結合する脂肪酸鎖として 2 つのタイプのリポド A 型ピランカルボン酸に誘導した。まず 2' 位アミノ基上の Troc 基を亜鉛-酢酸により脱保護し、(*R*)-3-(ドデカノイルオキシ)テトラデカン酸 (**51**) または酢酸を縮合させてそれぞれ化合物 **52a-c**, **53a-c** とした。これらの化合物に対して、水酸化パラジウム-炭素触媒下の加水素分解反応により、1 位、3 位脂肪酸鎖、4 位脂肪酸鎖、6' 位中のベンジル系

Scheme 8

保護基を一挙に脱保護し、続いて酸化白金触媒下の加水素分解反応により、残りの4'位リン酸エステル上の2つのフェニル基を脱保護して、目的とするリポドA型ピランカルボン酸 **42a-c**, **43a-c** を合成した(スキーム9)。

Scheme 9

2.2 リポドA型ピランカルボン酸誘導体の生物活性

合成したリポドA型ピランカルボン酸 **42a-c**, **43a-c** について、U937細胞における $\text{TNF}\alpha$ 産生活性およびLPS誘導による $\text{TNF}\alpha$ 産生抑制活性を測定した(表2)。

表2に示したように、まず *E. coli* lipid A(1)と同様に脂肪酸を6本有する誘導体 **42a-c** は、単独でU937細胞からの $\text{TNF}\alpha$ の産生を促進するLPSアゴニスト活性を有していることがわかった。これに対して脂肪酸を4本有している誘導体 **43a-c** は、 $\text{TNF}\alpha$ の産生を全く誘導しないこと、すなわちLPSアゴニスト活性は持たないことがわかった。

Table 2 Biological activities of lipid A-type pyranocarboxylic acid derivatives.

Compound	agonist	antagonist (IC_{50} , nM)
42a	+	-
42b	+	-
42c	+	+(300)
43a	-	+(10)
43b	-	+(7)
43c	-	+(9)

また、LPS刺激によるU937細胞より誘導される $\text{TNF}\alpha$ の産生を、**42c** が高濃度において若干抑制している。すなわち弱いLPSアンタゴニスト活性を示した。**42a, b** には $\text{TNF}\alpha$ 産生抑制活性は観測されず、LPSアンタゴニスト活性はないことがわかった。一方、脂肪酸鎖を4本有する誘導体 **43a-c** は、いずれも低濃度において $\text{TNF}\alpha$ の産生抑制活性が観測され、その IC_{50} 値は、10, 7, 9 nMであった。すなわち、これらの化合物は、非常に強いLPSアンタゴニスト活性を示すことがわかった。

以上のリポドA型ピランカルボン酸誘導体の生物活性の結果をまとめると、次の3点に集約される。まず第一に、*E. coli* lipid Aと同様な脂肪酸の置換様式を持つリポドA型ピランカルボン酸誘導体 **42a-c** がLPSアゴニスト活性を有することから、リポドA分子の1位リン酸エステル基を α 配置のカルボキシル基に変換しても、活性の転換および消失は起こらないことがわかった。このことは、当初、活性の転換が起こるものとした予想は当てはまらなかったものの、リポドA関連化合物を研究する上で有用な知見を与えたものと考えられる。つまり、リポドA分子において1位リン酸エステル基の不安定性が、分子全体の不安定性に影響していることが懸念されるが、この部分を化学的に安定なカルボキシル基に、生物活性に影響を与えることなく変換できることが明らかとなった。

また第二に、リポドA型化合物においてその分子中の長鎖脂肪酸鎖の数が、その分子がLPSアゴニストかLPSアンタゴニストかのいずれかの活性を示すかについて、重要な役割を果たしていることがわかった。すなわち、*E. coli* lipid A(1)と同様の6本の脂肪酸鎖を有するリポドA型ピランカルボン酸誘導体 **42a-c** が、LPSアゴニスト活性を示すのに対して、脂肪酸鎖を4本有する誘導体 **43a-c** は、顕著なLPSアンタゴニスト活性を示した。ヒト細胞においてLPSアンタゴニスト活性を示すことが知られているリポドIVa(2)⁷⁾も、分子中に脂肪酸鎖を合計4本有していることから、脂肪酸の数が生物活性に大きな影響を及ぼしていることは明らかである。また、LPSアンタゴニスト活性を示すリポドA型

分子の新規な置換様式として、ここに得られた誘導体 43a-c の脂肪酸置換様式が有効であることがわかった。

また第三に、一連のリピド A 型ピランカルボン酸誘導体における 6' 位の置換基効果はほとんど観測されなかった。42c が、若干の LPS アンタゴニスト活性を示したものの、6' 位の置換基のみが異なる 42 a-c はすべて同程度の LPS アゴニスト活性を示した。また同様に、6' 位のみ異なる 43 a-c も一様に LPS アンタゴニスト活性を示した。6' 位置換基として、少なくともここに示した水酸基、メトキシ基、フルオロ基に関しては、生物活性にあまり大きな影響を与えないことがわかった。

3. エーテル結合リピド A 型ピランカルボン酸誘導体の合成と生物活性²⁶⁾

3.1 エーテル結合リピド A 型ピランカルボン酸誘導体の合成

前述した LPS アンタゴニスト活性を示すリピド A 型ピランカルボン酸 43a-c は、分子中に 3 箇所のエステル結合を有している。生体中においては、エステル結合が加水分解されて脂肪酸鎖が遊離してしまう可能性が懸念される。実際 Christ, 岸ら^{10, 11)} は、*R. capsulatus* lipid A (3), *R. sphaeroides* lipid A (4) 中のエステル結合をエーテル結合に変換することによって、それぞれ E-5531 (5), E-5564 (6) という臨床的に有望な LPS アンタゴニスト活性を示す化合物を創出している (図 3, 4)。

そこで筆者らは、加水分解反応に抵抗性のある独自の LPS アンタゴニストを創出することを目的に、化合物 43a-c 中のエステル結合をエーテル結合に変換した化合物を合成することとした。その際に、6' 位置換基の生物活性に及ぼす影響についても再度調べるために、同様の 3 種の誘導体を合成することとした。すなわち、化合物 43a-c 中の 4, 3' 位、および 3' 位側鎖中 3 位に存在するエステル結合をすべてエーテル結合に変換した化合物 54a-c の合成を試みた。(図 11)

Fig.11

化合物 54a-c は、図中右側の還元末端糖部分と、左側の非還元末端糖部分とのグリコシル化反応により合成することとした。還元末端糖部分については、スキーム

5 に示した方法と同様にしてメシラート 55 を調製し、これを用いてスキーム 6 に示した方法と同様にしてジオール 56 を合成した (図 12)。

Fig.12

非還元末端糖部分は、2 位がトリフルオロアセチル基で保護されたアミノグリコシド 57²²⁾ を出発原料とした。57 の 3 位水酸基へのアルキルメシラート 33 によるアルキル化を行い、化合物 58 とした。2 位アミノ基上のトリフルオロアセチル基を Troc 基に変換した後、酸性条件下で 4, 6 位アセトニド基を脱保護して、ジオール 59 を調製した。スキーム 7 と同様に 59 に対して、6 位ベンジルオキシカルボニル化、4 位リン酸エステル化、1 位アリル基の脱保護を順次行って、糖供与体 60b を調製した (スキーム 10)。

i, 33, NaH, DMF, 75%; ii, 1 M aq. NaOH, EtOH, 80 °C; iii, ClCO₂CH₂CCl₃, sat. aq. NaHCO₃, CH₂Cl₂, 87% (2 steps); iv, 80% aq. AcOH, 60 °C, 95%; v, ClCO₂Bn, Py, CH₂Cl₂, 94%; vi, (PhO)₂P(O)Cl, DMAP, CH₂Cl₂, 96%; vii, [Ir(cod)(PMePh₂)₂]PF₆, THF; viii, I₂, H₂O, THF, 71% (2 steps).

Scheme 10

同様な手法とスキーム 6 に示した 6 位官能基の変換を経て、6-メトキシ体 60a, 6-フルオロ体 60c を調製し、これらと糖受容体 56 とのグリコシル化反応を行った。スキーム 8 と同様に、イミデート法によって位置および立体選択的にグリコシル化反応を行って、ジサッカリド 61a-c を得た (スキーム 11)。

グリコシド 61a-c の 2' 位 Troc 基の亜鉛-酢酸処理による脱保護、引き続きアセチル化によって、アセトアミド 62a-c とした。水酸化パラジウムと酸化白金による 2 段階の加水素分解反応によりすべての保護基を脱保護して、目的とするエーテル結合リピド A 型ピランカルボン酸誘導体 54a-c の合成を達成した (スキーム 12)。

Scheme 11

Scheme 12

3.2 エーテル結合リピドA型ピランカルボン酸誘導体の生物活性

合成したエーテル結合リピドA型ピランカルボン酸 54a-c について、U937 細胞における LPS 誘導 TNF α 産生抑制活性を測定して、LPS アンタゴニスト活性を調べた(表3)。

Table 3 Biological activities of ether linked lipid A-type pyranocarboxylic acid derivatives.

Compound	antagonist (IC ₅₀ , nM)
54a	+ (6)
54b	+ (11)
54c	+ (10)

表3に示したように化合物 54a-c は、一様に LPS アンタゴニスト活性を有しており、その IC₅₀ 値は、6, 11, 10 nM であった。すなわち、強力な LPS アンタゴニスト活性を示す長鎖脂肪酸鎖を4本有するリピドA型ピランカルボン酸 43a-c のすべてのエステル結合をエーテル結合に変換しても、その生物活性は保持されることが明らかとなった。エステル結合の加水分解が懸念されるエステル結合リピドA型ピランカルボン酸誘導体に対して、エーテル結合リピドA型ピランカルボン酸誘導体は、加水分解に抵抗性のある化学的に安定な化合物とい

える。

以上述べてきたヒト U937 細胞において LPS アンタゴニスト活性を示す化合物は、マウス細胞においては必ずしも LPS アンタゴニスト活性を示さず、またマウス細胞において LPS アンタゴニスト活性を示す化合物でもその活性は弱いものであった。実際に臨床的に有用な薬剤を開発するには、動物実験は避けて通れないステップである。その意味で、マウス細胞においてもある程度強力な LPS アンタゴニスト活性を示す化合物を見いだしていくことが、今後さらに研究を重ねるべき課題であると考えている。

おわりに

以上述べてきたように、リピドAの1位のリン酸エステル基を α 配置のカルボキシル基に変換することにより、生物活性を損なうことなく安定なリピドA型化合物が得られることが明らかとなった。また、リピドA関連化合物の生物活性は、その分子中の脂肪酸鎖の数に大きく影響されることを改めて示した。また、脂肪酸鎖と糖骨格とのエステル結合部位をエーテル結合に変換した化合物の一般的な合成法も確立することができた。最近、LPS と LPS レセプターである CD14 や TLR4 との相互作用を契機とするシグナル伝達経路に関して多くの研究がなされ、徐々にその作用機作がひもとかれていくように思う。ここに得られた知見および技術を活かして、化学的に安定なリピドA型化合物を種々合成していくことによって、生化学的に様々なプロファイルを持ったリピドA化合物が得られるのではないかと考えている。そしてその中から、ヒトにとって有用な薬剤となりうる化合物が見いだされるものと期待している。

本研究は、ヒューマンサイエンス(HS)財団による三共株式会社および国立感染症研究所との共同研究の中で行われた。生物活性を測定していただいた三共株式会社第2生物研究所龍田融博士、金井さおり氏に深く感謝いたします。また、貴重なご助言を賜りました国立感染症研究所細胞化学部長西島正弘先生に厚くお礼申し上げます。

(2002年1月31日受理)

文 献

- 1) 平松和史, 那須勝, 医療ジャーナル, 34, 1475 (1995)
- 2) R. Chaby, *DDT*, 4, 209 (1999)
- 3) 西島正弘, 蛋白質 核酸 酵素, 40, 359 (1995)
- 4) (a) R. Medzhitov, P. Preston-Hurlburt, C. A. Janeway Jr., *Nature*, 388, 394 (1997); (b) R.-B. Yang, M. R. Mark, A. Gray, A. Huang, M. H. Xie, M. Zhang, A. Goddard, W. I. Wood, A. L. Gurney, P. J. Godowski, *Nature*, 395, 284 (1998)
- 5) M. Imoto, H. Yoshimura, N. Sakaguchi, S. Kusumoto, T. Shiba, *Tetrahedron Lett.*, 26, 1545 (1985)
- 6) T. Takahashi, S. Nakamoto, K. Ikeda, K. Achiwa, *Tetrahe-*

- dron Lett.*, 27, 1819 (1986)
- 7) E. T. Rietschel, T. Kirikae, F. U. Schade, A. J. Ulmer, O. Holst, H. Brade, G. Schmidt, U. Mamat, H.-D. Grimmecke, S. Kusumoto, U. Zähringer, *Immunobiol.*, 187, 169 (1993)
 - 8) (a) J. H. Krauss, U. Seydel, J. Weckesser, H. Mayer, *Eur. J. Biochem.*, 180, 519 (1989); (b) H. Loppnow, P. Libby, M. Freudenberg, J. H. Krauss, J. Weckesser, H. Mayer, *Infect. Immun.*, 58, 3743 (1990)
 - 9) (a) P. V. Salimath, J. Weckesser, W. Strittmatter, H. Mayer, *Eur. J. Biochem.*, 136, 195 (1983); (b) N. Qureshi, J. P. Honovich, H. Hara, R. J. Cotter, K. Takayama, *J. Biol. Chem.*, 263, 5502 (1988); (c) K. Takayama, N. Qureshi, B. Beutler, T. N. Kirkland, *Infect. Immun.*, 263, 5502 (1988); (d) N. Qureshi, K. Takayama, R. Kurtz, *Infect. Immun.*, 59, 441 (1991); (e) W. J. Christ, P. D. McGuinness, O. Asano, Y. Wang, M. Y. Mullarkey, M. Perez, L. D. Hawkins, T. A. Blythe, G. R. Dubuc, A. L. Robidoux, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 3637 (1994)
 - 10) W. J. Christ, O. Asano, A. L. C. Robidoux, M. Perez, Y. Wang, G. R. Dubuc, W. E. Gavin, L. D. Hawkins, P. D. McGuinness, M. A. Mullarkey, M. D. Lewis, Y. Kishi, T. Kawata, J. R. Bristol, J. R. Rose, D. P. Rossignol, S. Kobayashi, I. Hishinuma, A. Kimura, N. Asakawa, K. Katayama, I. Yamatsu, *Science*, 268, 80 (1995)
 - 11) (a) D. P. Rossignol, L. D. Hawkins, W. J. Christ, S. Kobayashi, T. Kawata, M. Lynn, I. Yamatsu, Y. Kishi, "Endotoxin in Health and Diseases" eds. by H. Brade, S. M. Opal, S. N. Vogel, D. C. Morrison, Marcel Dekker, Inc., New York-Basel, 1999, p699; (b) *New Current*, 10, 42 (1999)
 - 12) (a) T. Kusama, T. Soga, Y. Ono, *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 1994 (1991); (b) H. Heine, H. Brade, S. Kusumoto, T. Kusama, E. T. Rietschel, H.-D. Flad, A. J. Ulmer, *J. Endotoxin Res.*, 1, 14 (1994)
 - 13) T. Kusama, T. Soga, Y. Ono, E. Kumazawa, E. Shioya, K. Nakayama, K. Uoto, Y. Osada, *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 3244 (1991)
 - 14) W.-C. Liu, M. Oikawa, K. Fukase, Y. Suda, S. Kusumoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 72, 1377 (1999)
 - 15) (a) M. Shiozaki, T. Mochizuki, T. Wakabayashi, S. Kurakata, T. Tatsuta, M. Nishijima, *Tetrahedron Lett.*, 37, 7271 (1996); (b) M. Shiozaki, S. Kurakata, T. Tatsuta, H. Maeda, M. Nishijima, *Tetrahedron*, 53, 16041 (1997)
 - 16) (a) M. Matsuura, Y. Kojima, J. Y. Homma, Y. Kubota, A. Yamamoto, M. Kiso, A. Hasegawa, *FEBS Lett.*, 167, 226 (1984); (b) M. Kiso, Y. Ogawa, Y. Fujishima, M. Fujita, S. Tanaka, A. Hasegawa, *J. Carbohydr. Chem.*, 6, 625 (1987)
 - 17) H. G. Hoffmann, R. R. Schmidt, *Liebigs Ann. Chem.*, 1985, 2403
 - 18) A. Vasella, C. Witzig, J.-L. Chiara, M. Martin-Romas, *Helv. Chim. Acta*, 74, 2073 (1991)
 - 19) G. Excoffier, D. Gagnaire, J.-P. Utille, *Carbohydr. Res.*, 39, 368 (1975)
 - 20) Y. Watanabe, K. Miura, M. Shiozaki, S. Kanai, S. Kurakata, M. Nishijima, *Carbohydr. Res.*, 332, 257 (2001)
 - 21) M. Shiozaki, Y. Kobayashi, M. Arai, N. Ishida, T. Hiraoka, M. Nishijima, S. Kuge, T. Otsuka, Y. Akamatsu, *Carbohydr. Res.*, 222, 69 (1991)
 - 22) M. Shiozaki, Y. Kobayashi, N. Ishida, M. Arai, T. Hiraoka, M. Nishijima, S. Kuge, T. Otsuka, Y. Akamatsu, *Carbohydr. Res.*, 222, 57 (1991)
 - 23) (a) T. Mochizuki, Y. Iwano, M. Shiozaki, S. Kurakata, S. Kanai, M. Nishijima, *Carbohydr. Res.*, 324, 225 (2000); (b) T. Mochizuki, Y. Iwano, M. Shiozaki, S. Kurakata, S. Kanai, M. Nishijima, *Tetrahedron*, 56, 7691 (2000)
 - 24) (a) L. M. Haines, E. Singleton, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1972, 1891; (b) J. J. Oltvoort, C. A. A. van Boeckel, J. H. de Koning, J. H. van Boom, *Synthesis*, 1981, 305
 - 25) R. R. Schmidt, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 25, 212 (1986)
 - 26) Y. Watanabe, T. Mochizuki, M. Shiozaki, S. Kanai, S. Kurakata, M. Nishijima, *Carbohydr. Res.*, 333, 203 (2001)

PROFILE

望月 隆 三共(株)創薬化学研究所 専門研究員 博士(薬学)

〔経歴〕1993年東京大学理学部卒、1995年東京大学大学院理学系研究科修士課程修了、同年三共(株)入社、1997-98年相模中央化学研究所派遣研究員。〔専門〕有機合成化学、医薬品化学〔連絡先〕e-mail: [redacted]

渡辺由紀子 三共(株)創薬化学研究所 研究員

〔経歴〕1997年慶応義塾大学理工学部応用化学科卒業。同年三共(株)入社。〔専門〕有機合成化学。〔連絡先〕e-mail: [redacted]

蔵方慎一 三共(株)第二生物研究所 所次長 薬学博士

〔経歴〕1976年東京大学薬学部卒業、1978年東京大学大学院薬学系研究科修士課程修了。同年三共(株)入社。1987-89年スウェーデンカロリンスカ研究所博士研究員(George Klein教授)。〔専門〕腫瘍生物学、腫瘍免疫。〔連絡先〕e-mail: [redacted]

汐崎正生 株式会社ケムテックラボ 化学部 主席研究員

〔経歴〕1966年東京大学農学部農芸化学科卒業。1971年同大学大学院農学系研究科農芸化学専門課程博士課程修了。農学博士 同年三共株式会社入社。1984-85年米国デューク大学博士研究員。2001年三共株式会社定年退職、同年株式会社ケムテックラボへ移籍。〔専門〕有機合成化学。〔連絡先〕[redacted] Tel. [redacted]