

多様な大環状化合物の効率的合性反応の開発

著者	住吉 孝明
雑誌名	理工学と技術 : 関西大学理工学会誌 = Engineering & technology
巻	21
ページ	41-44
発行年	2014-11-20
その他のタイトル	Development of the Diversity-Oriented Synthesis of Macrocyclic Compounds
URL	http://hdl.handle.net/10112/9472

多様な大環状化合物の効率的合成反応の開発

住吉 孝明*

Development of the Diversity-Oriented Synthesis of Macrocyclic Compounds

Takaaki SUMIYOSHI*

1. はじめに

疾病を治療することができる「薬」を創り出す創薬研究は、20世紀まで合成化合物や天然物等を中心とした分子量500以下の低分子化合物が主役であった。しかし、21世紀に入って抗体を中心とする分子量数万の高分子が低分子に取って代わり、現在では世界の医薬品売上げのトップ10のほとんどが抗体を中心とする生物製剤で占められている。このような状況下、近年生物製剤の次に主役になりうるものとして「中分子」という言葉をよく耳にするようになった。これら「中分子」創薬は、何故今注目を浴びているのだろうか？その理由を、新薬承認数が世界的に減少して厳しさを増す創薬研究を基に考察し、近年注目されている新技術を紹介する。

2. 創薬研究の流れ

18世紀頃までは薬といえば薬草や樹木等であり、これらの薬効は現在の医薬品に比べると弱かった。19世紀に入り化学技術の向上に伴ってこれらの薬草等から主活性成分を単離できるようになり、マラリア治療薬である quinine や鎮痛薬である morphine といった天然物がより効果が高い薬として用いられるようになった(図1)。世界初の合成医薬品は、ヤナギの樹皮から抗炎症成分として単離された salicin の分解物である、サリチル酸(salicylic acid)のフェノール性水酸基をアセチル化してプロドラッグにした acetylsalicylic acid (商品名: アスピリン)である(図1)。アスピリンはプロドラッグ化によってサリチ

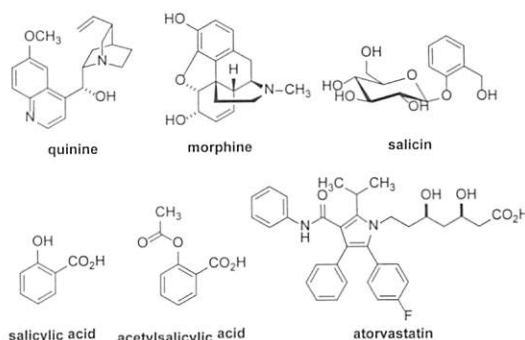


図1 低分子医薬品

ル酸で問題とされていた胃痛の副作用が低減され、1899年にアスピリンがバイエル社から発売されると爆発的に売り上げを伸ばした。アスピリンに続いて20世紀には数多くの低分子医薬品が登場し、感染症、アレルギー、高血圧、高脂血症や糖尿病等の治療を可能にした。

高脂血症の治療薬である atorvastatin (商品名: リピトール)等の年間1000億円以上を売り上げる医薬品は「ブロックバスター」と呼ばれる。これらのブロックバスターの創出には莫大な研究開発費が必要なため、日本を含む世界中で製薬会社の買収・合併が数多く起こった。このように低分子創薬は多くの優れた医薬品を生み出し、製薬産業を巨大化させる役割を果たしたものの、疾病の治療満足度が向上した結果、感染症や生活習慣病等では優れた既存薬に新薬が取って代わるのが難しくなるというジレンマに陥った。そこで各製薬会社は低分子化合物で治療薬を創出することが困難で、かつ治療満足度が低い難病へと標的疾患を変更することとなった。

低分子に代わり新しい薬の「タネ」になったのは抗

体を中心とする生物製剤（高分子）である^[1]。1998年に最初の抗体医薬品である infliximab（商品名：レミケード）が登場し、当時満足な治療法が存在しなかった難病であるクローン病に劇的な治療効果をもたらした。生物製剤の創薬研究を活性化させた。レミケードはさらにリウマチ、乾癬、潰瘍性大腸炎等の自己免疫疾患でも画期的な治療薬となり、ブロックバスターとなった。これらの成果は患者数が少ないために商売にならないものとして研究対象から外されていた難病の治療に製薬会社が積極的に注力することに繋がった。

抗体による治療概念は19世紀に Behring がジフテリア感染ウサギの血清に抗ジフテリア効果を見出したことに始まる。しかしながら、血清には抗体が含まれるものの大量かつ安定して供給することが難しく、医薬品への応用が難しかった。その後、細胞を融合するハイブリドーマの技術によって抗体を産生するB細胞とガン細胞であるミエローマとを融合させて抗体を大量生産することが可能となり^[2]、その治療効果が動物レベルで証明された。ところが、マウスの細胞を用いて作り出された抗体をヒトに応用したところ、マウス抗体に対する抗体（中和抗体）が産生してしまい、ヒトでの治療効果は認められなかった。その結果、多くのバイオベンチャーが撤退してしまい、抗体医薬品の研究は下火になった。しかし、その後の遺伝子工学の発展によってマウス抗体タンパクの定常部を組み換えてヒト化タンパクにすることができるようになった。Centocor社はキメラ化技術を用いてマウス抗体をヒトタンパク化すればヒト生体内で異物認識されにくくなり中和抗体生成の問題を克服できると考え、自己免疫疾患発症に重要な役割を果たすサイトカインである腫瘍壊死因子（Tumor Necrosis Factor, TNF）- α のキメラ抗体を作成した。臨床試験の結果、中和抗体生成による薬効消失はみられず、画期的な治療薬が存在しなかったクローン病で劇的な治療効果を示した^[3]。現在では可変部もヒト化した抗体が作成可能になっており、複数の抗体医薬品が上市されている。

3. 低分子医薬品と抗体医薬品の特徴

低分子と抗体の主な違いとして、標的タンパクの性質の違いが挙げられる。低分子化合物の標的は生体内の低分子リガンドが結合するタンパク内部の脂溶性ポケットである。例えば拮抗薬の場合、アドレナリン、ヒスタミン、アデノシン三リン酸等の受容体のリガンド結合ポケットに低分子が結合してリガンドの結合をブロックし、シグナル伝達を止めることで作用を発現する。すなわち、低分子はタンパク-低分子相互作用を阻害する。一方、抗体はその大きな分子量を活かし、

低分子に比べて非常に大きな分子量を有するタンパク同士の結合、すなわちタンパク-タンパク相互作用（Protein Protein Interaction, PPI）を阻害することができる。低分子と抗体の別の相違点として、物性由来する違いがある。一般的に低分子は脂質二重膜を通過できるため細胞内のタンパクに結合できるが、抗体は分子量が約数万と巨大で細胞膜を通過することができない。従って抗体による治療は細胞外のPPIを阻害が効果を発揮する疾病に限られる（表1）。

表1 分子量とPPI阻害能および細胞膜透過性との相関

	低分子	中分子	高分子
分子量	< 500	1000程度	> 10000
PPI 阻害能	×	○	○
細胞膜透過性	○	○	×

では、抗体医薬品の立場は今後も安泰だろうか？興味深いことに抗体医薬品も低分子医薬品と同様に標的タンパクが枯渇して徐々に新薬が減少する可能性がある。新規創薬標的の発見が目的の一つであったヒトゲノム解読計画の結果、「①低分子創薬が応用できる低分子リガンドを有するタンパク」や「②抗体創薬でアプローチできる細胞外PPIに関与するタンパク」（すなわち現状の技術で研究できる「druggable」なタンパク）は生理活性タンパク全体の約20%程度しか存在しなかった^[4]。しかもその多くはすでに研究されており、新たな創薬標的はさほど多くはないことが明らかとなった。すなわち、将来の薬のタネになることが期待できる残り80%の「undruggable」タンパクにアプローチするには、低分子でも抗体でも阻害することが難しい細胞内PPIを阻害する物質を見出さなければならない。現在、そのような物質として、分子量が1000~数千程度の「中分子」が注目されている。そして、数多くのバイオベンチャーが意のままに中分子を合成する技術の開発に取りくんでいる。今回は、将来の中分子創薬の中核を担うことが期待される大環状化合物の合成技術を紹介する。

4.1 Stapled Peptide

ペプチドはタンパクに比べて分子量が小さく、インスリン等の生理活性を有するものが多く知られている。しかし、ペプチドは生体内で酵素によって容易に分解されてしまうため、臨床応用は限られている。Harvard大学のVerdineらはペプチドのヘリックス構造を化学的に架橋することによって安定化する技術を見出した^[5]。ペプチドのヘリックス構造は「生理活

性の発現」および「生体内の安定性」の双方に重要である。ヘリックス構造が何らかの原因で崩れると容易に酵素に分解される。そこでヘリックス構造を保持するために化学修飾を加えて固定する“staple”（ホットキスで固定するの意）技術が注目されている。ペプチドの α -ヘリックス構造において、らせんはアミノ酸3.4残基ごとに一周する。従来はアミド構造やジスルフィド構造によって架橋する手法が知られていたが、膜透過性や安定性には課題が残されていた。そこで Verdine らは脂溶性側鎖が PPI において重要であることに着目し、脂溶性を保持したまま架橋する方法論を考案した。すなわち、オレフィンメタセシス反応に続く水素添加反応を行って鎖状炭化水素で化学的に架橋すると、脂溶性側鎖同士の相互作用の保持と生体内安定性とを両立できる（図2）。Verdine らは細胞死を抑制する Bcl-2 の阻害ペプチドである Bax のイソロイシンを側鎖にアリル基を有するアミノ酸に変換し、オレフィンメタセシス反応とそれに続く水素添加反応によって炭化水素で架橋した。合成された“Stapled Peptide”は *in vivo* においても抗腫瘍活性を示すとともに生体内安定性を有することを明らかにした^[6]。Verdine らはこの技術を基に Aileron 社を立ち上げている。

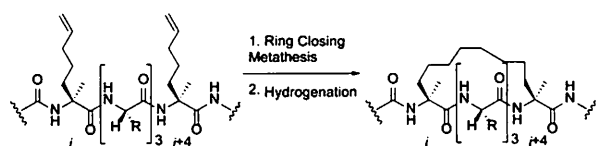


図2 Stapled Peptide の合成法

4.2 DNA テンプレート有機合成法

大環状化合物は細胞内 PPI 阻害の有力なツールになると期待されている。大環状化合物は天然物にも数多く存在し、なかでも大環状エステルであるマクロライド化合物は erythromycin や tacrolimus といった画期的な医薬品になったものもある^[7]。マクロライドはエステラーゼで加水分解されてその生理活性を失うことから、例えばラクトン（環状エステル）をラクタム（環状アミド）へと変換することで加水分解を避け、生体内安定性を増す合成展開が考えられる。しかしながら、大環状化合物の化学合成には分子内反応と分子間反応の競争が生じるという合成上の課題があった。一般に、6 員環以下の場合には分子内環化反応が分子間反応よりもエントロピー的に有利であるため高収率で環化化合物が得られる。一方、7 員環を超える化合物では分子の自由度が高いため同一分子内の反応点同士が出会うよりも多分子の反応点と出会う確率の方が高

く、多量化ししやすい。従って、大環状化合物の合成には、分子同士が出会う確率を下げるために数 mM 以下の希薄濃度が必要とされる^[8]。医薬品を臨床開発する場合には数十 kg 以上の大量の化合物を安定して提供する必要がある、医薬品となった大環状化合物は発酵法で化合物を供給可能な天然物が多い。

Harvard 大学の Liu らは相補的な二本の DNA 鎖が水素結合によって二重らせんを形成する現象をテンプレートとすることを基盤とした大環状化合物の環化反応を開発した^[9]。その原理は1960年代後半に見出された「DNA テンプレートによるホスホジエステル結合形成反応の促進効果」の応用である^[10]。ある一本鎖 DNA テンプレートの相補的な DNA 断片をハイブリダイズすると、各々の相補性 DNA 断片の 3' 末端と 5' 末端のリン酸が縮合剤存在下でホスホジエステル結合を形成するが、テンプレート DNA と相補性がない断片同士では反応は進行しない。Liu らの研究の秀逸な点は、本反応を核酸主鎖とは異なる化学構造同士の反応に応用したことである。Liu らは本技術を分子内還元反応へ応用することにより、1 万化合物以上の大環状化合物ライブラリーを構築し^[11]、Ensemble Therapeutics 社を設立した。本技術のさらに優れた点は、合成されたライブラリー化合物はそれぞれ合成に用いたテンプレート DNA が結合しているが、それらをタグとして利用することができる点である。例えば、炭酸脱水素酵素をビーズで固定してライブラリー化合物と混合した後に、洗浄により炭酸脱水素酵素に結合しない化合物を除去し、その後 PCR によって増幅させて実際に結合能を有する化合物構造を容易に明らかにできた^[9]。本バリデーションによって、ライブラリー化合物はハイスループットスクリーニングで問題となる偽陽性（false positive）を避けることができる。Ensemble Therapeutics 社は大環状化合物ライブラリーより PPI であるインターロイキン（IL）-17 と IL-17 受容体との相互作用阻害剤を見出すことに成功しており、本手法は PPI 阻害剤創出に有用なプラットフォームであることが示された。これまでに、Novartis 社等のメガファーマが資金を提供して共同研究を行っていることも本技術の注目度の高さを示唆している。

4.3 特殊ペプチド

東京大学の Suga らは非天然型アミノ酸を組み込んだ環状ペプチドの合成技術を基に Peptidream 社を立ち上げた。特殊ペプチドは、生体内でタンパク合成に使用される20種類のアミノ酸以外の特殊アミノ酸を含むペプチドである。通常のペプチドは生体内で酵素に

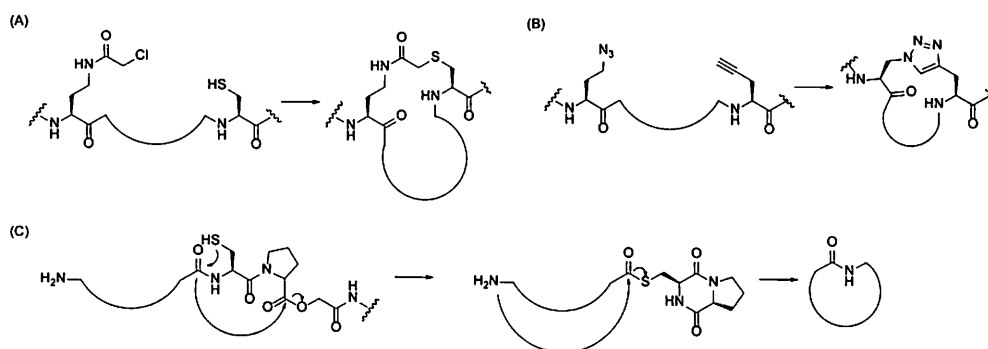


図3 特殊環状ペプチドの合成法

より容易に分解され、生体内半減期が短い。一方、特殊ペプチドは酵素に認識されにくく、生体内安定性が高い。免疫抑制剤として臨床応用されている cyclosporin をはじめとする特殊ペプチドの多くは天然物で酵素により生合成されるため、基質特異性の問題があって多様な構造を有する化合物群への合成展開は不可能であった。Suga らは DNA からタンパクが翻訳される系を利用すれば特殊ペプチドが簡便に合成できると考え、非タンパク質性アミノ酸を認識して生合成できる「フレキシザイム」という人工アミノアシル化 RNA 触媒を創製した^[12]。さらに、側鎖にクロロアセチル基、アジド基、アルキニル基を有するアミノ酸を組み込むことによって、システインとのチオエーテル結合形成 (図3A) やクリック反応によるトリアゾール環形成 (図3B)、ジケトピペラジン形成を介する主鎖環化 (図3C) による特殊大環状ペプチド化合物の合成反応へと展開した (図3)。本技術を用いると1本のチューブ内で 10^{13} 個におよぶ多様な特殊ペプチドライブラリーが構成でき、活性ペプチドの探索を容易に行うことができる。Suga らが設立した Peptidream 社に国内外の製薬会社が多数共同研究を申し込んでいることから、その注目度の高さがわかる。

5. 終わりに

上述の技術以外にも、現在多くのバイオベンチャーが画期的な大環状化合物の合成技術開発に鎬を削っており、さらなる革新的な技術が登場することが期待される。2020年頃にはおそらく、低分子や抗体で創薬可能な「druggable」とされる創薬標的タンパクが枯渇してくることが想定され、現状「undruggable」な標的である細胞内PPI阻害剤を創出できる技術や化合物を有する製薬会社のみが生き残る可能性が高い。アカデミアから医薬品を創出する場合、多様な安全性試験が求められることに加え、莫大な臨床開発費が必要とされることが障壁となる。しかしながら、新たな大

環状化合物の簡便合成法の確立はあくまで合成技術の開発であり、アカデミアで十分に取り組むことができる課題である。産官学一体となり、日本発の画期的な大環状化合物の合成技術を開発することができれば、低分子、抗体に続く「中分子」による創薬が活性化され、現在の創薬研究の閉塞状況を打破することが期待される。その結果、治療選択肢が無く難病に苦しむ患者への福音になるような画期的な治療薬が創出され、日本製薬企業の発展につながることを期待する。

参考文献

- [1] Wake, H. 岡山医学会雑誌 **2009**, *121*, 119-121.
- [2] Köhler, G.; Milstein, C. *Nature* **1975**, *256*, 495-497.
- [3] 杉田尚久, 日本薬理学雑誌 **2003**, *121*, 57-64.
- [4] Verdine, G. L.; Walensky, L. D. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 7264-7270.
- [5] Verdine, G. L.; Hilinski, G. J. *Methods in Enzymology* **2012**, *503*, 3-33.
- [6] Walensky, L. D. et al *Science* **2004**, *305*, 1466-1470.
- [7] Driggers, E. M.; Hale, S. P.; Lee, J.; Terrett, N. K. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2008**, *7*, 608-624.
- [8] Inanaga, J. et al; Hirata, K.; Saeki, H.; Katsuki, T.; Yamaguchi, M. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1979**, *52*, 1989-1993.
- [9] Sakurai, K.; Liu, D. R. 有機合成化学協会誌 **2008**, *66*, 590-604.
- [10] Naylor, R.; Gilham, P. T. *Biochemistry* **1966**, *5*, 2722-2728.
- [11] Tse, B. N.; Snyder, T. M.; Shen, Y.; Liu, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15611-15626.
- [12] Hayashi, G.; Ohshiro, Y.; Suga, H. 生化学 **2010**, *82*, 505-514.