

専攻名 化学
 学籍番号 201630086
 学生氏名 小山 恭章
 学位名 博士 (理学)
 指導教員 長瀬 博

博士論文題目 Study of antitrichomonal activity of BNTX derivatives and Favorskii-type rearrangement of the 4,5-epoxymorphinan skeleton
 (7-ベンジリデンナルトレキソン誘導体の抗トリコモナス活性発現機序の検討、及び、新奇 Favorskii 型転位反応に関する研究)

第1章 序論

オピオイド受容体には3つのタイプ (μ , δ , κ) が存在し、それぞれ鎮痛作用に関与しているが、モルヒネに代表される μ 受容体作動薬は依存性などの重篤な副作用が問題とされている。一方で δ , κ 受容体選択的化合物は依存性のない鎮痛薬として有望である。当研究室ではモルヒナン骨格を有する μ 受容体拮抗薬である市販のナルトレキソン (**1**; Figure 1) を分子基盤としたリガンド合成を行うことで、これまでに様々なオピオイド受容体タイプ選択的化合物を創出してきた。

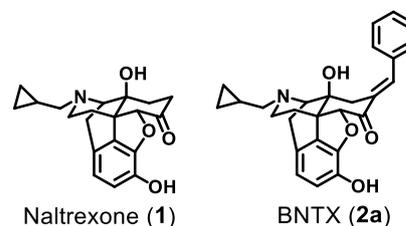


Figure 1

7-ベンジリデンナルトレキソン (BNTX, **2a**; Figure 1) は1991年に長瀬らによって見出されたモルヒナン誘導体であり、 δ 受容体拮抗薬として知られている。近年、当研究室では、BNTX がクロロキン耐性マラリアに対して耐性解除活性を示すことを見出した。また、各種オピオイドリガンドを用いて検討を行った結果、① BNTX の有するオピオイド δ 受容体拮抗作用、及び、② α , β -不飽和ケトン部位による生体内チオール基トラップ作用の2つの相乗効果によって、抗原虫活性が発現していると考えた。そこで筆者は、マラリアと類似した生活環を有するトリコモナス原虫にも BNTX を適用できるのではないかと推察した。本博士論文の第2章では、各種オピオイドリガンドを用いた抗トリコモナス活性の評価、及び、BNTX 誘導体合成を用いた作用機序の検討について述べる。また第3章では、BNTX 誘導体合成の過程で発見した新奇転位反応の詳細な反応機構の解明に向けた検討について述べる。

第2章 BNTX 誘導体の抗トリコモナス活性に関する研究

2.1. 原虫感染症の背景、及び、BNTX の抗トリコモナス活性の発見

トリコモナス症は *T. vaginalis* という原虫によって引き起こされる性感染症であり、感染すると尿道炎、膣炎、子宮頸管炎を発症させる。更に、HIV などの重篤な感染症や前立腺がんを誘発することが知られている。近年の陽性率調査の結果によると、国内では約700万人ものトリコモナス症患者の存在が示唆されており、特に50歳以上の高齢者の陽性率が高いことが問題となっている。そして近年は、既存薬であるメトロニダゾールに対する耐性株が増加しており、新規作用機序を有する薬物の開発が望まれている。筆者は、トリコモナス原虫がマラリアと類似した抗酸化機構によって宿主内での生存を可能にしている事に着目し、マラリア研究の際と同様に δ 受容体拮抗薬を用いて抗トリコモナス活性試験を行った。また、この時に拮抗薬だけでなく δ 受容体作動薬も併せて検討した。その結果、期待通り δ 受容体拮抗薬の NTI と BNTX が良好な活性を示した (Figure 2)。そこで筆者は、トリコモナス原虫に対しても、① オピオイド δ 受容体拮抗作用、及び、② チオール基トラップ作用の両方が抗原虫活性の発現に重要

であるという作業仮説を立てた。そこで、最も高い活性を示した BNTX のベンジリデン部位を中心とした構造変換とその活性評価を行うことで、抗トリコモナス活性発現の作用機序の解明、及び、さらなる活性の向上に繋がると考え、種々の BNTX 誘導体の合成に着手した。

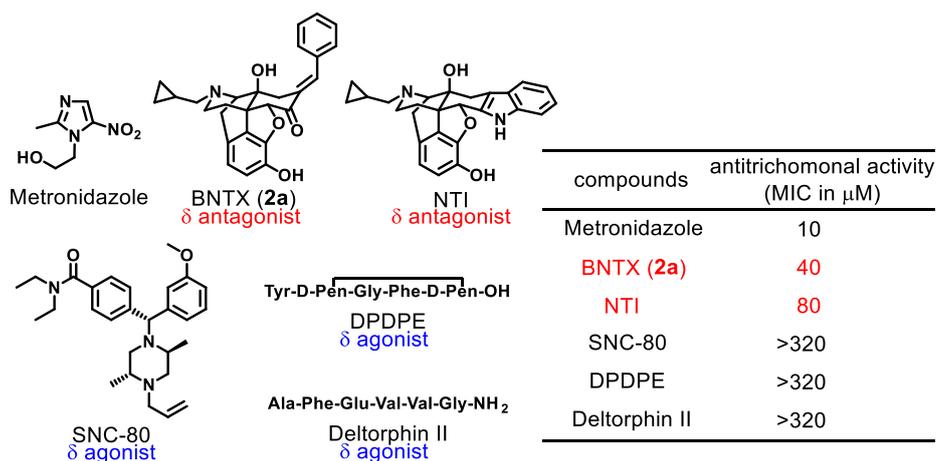
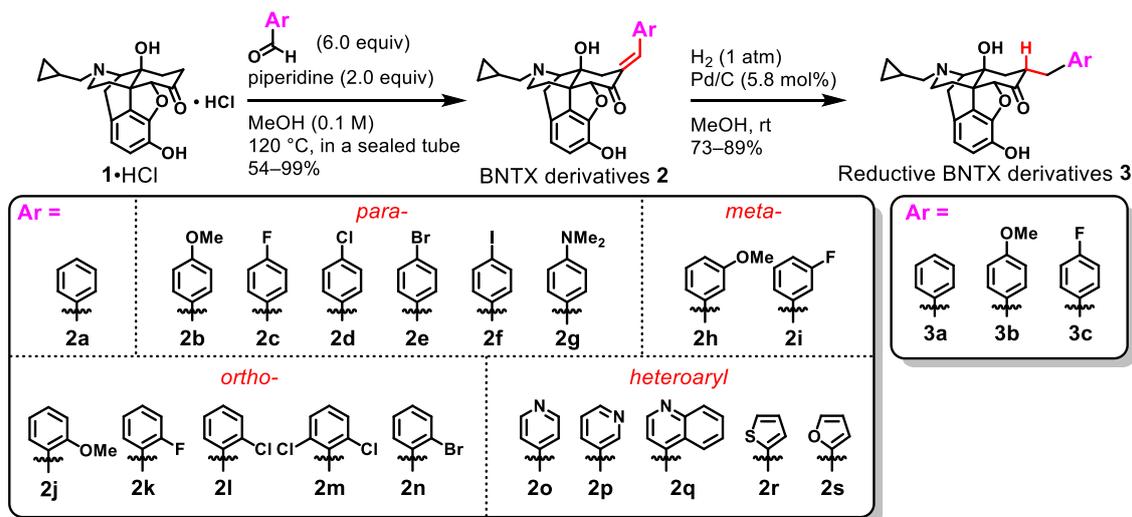


Figure 2

2.2. BNTX 誘導体の設計と合成

BNTX のベンジリデン部位に様々な置換基を導入した誘導体の合成を行うにあたり、既存の BNTX 合成法ではジヒドロピラン骨格を有する二量体の副生や、反応時間が長く系内が複雑化しやすいなどの問題点があった。そこでより効率的な BNTX 誘導体合成法を見出すべく条件の検討を行ったところ、ピペリジン塩基として用いたアルドール縮合反応の条件を用いることで大幅に収率を改善することができた。次に、本反応条件を用いて様々な BNTX 誘導体 **2** を合成した (Scheme 1)。また、 α,β -不飽和ケトン部位が活性に影響している可能性を考慮し、二重結合を還元した誘導体 **3** を合成した。



Scheme 1

2.3. BNTX 誘導体の抗トリコモナス活性、及び、オピオイド受容体親和性

BNTX 誘導体を用いて抗トリコモナス活性を評価した結果、*para* 位に置換基を有する BNTX 誘導体 **2b–2g** では、無置換体 **2a** よりも活性が向上する傾向にあることが分かった (MIC = 20 μM)。一方で、*ortho* 位置間体 **2j–2n** では活性の消失した誘導体も観測された (MIC = > 320 μM)。この理由は、 α,β -不飽和ケトン部位周辺の立体障害によってチオール基トラップ作用が低下してしまったためと考えられる (Figure 3)。また、二重結合を還元した誘導体 **3** では一部で活性の著しい低下が観測されたため、抗トリコモナス活性の発現には α,β -不飽和ケトン部位が重要である事が示唆された。

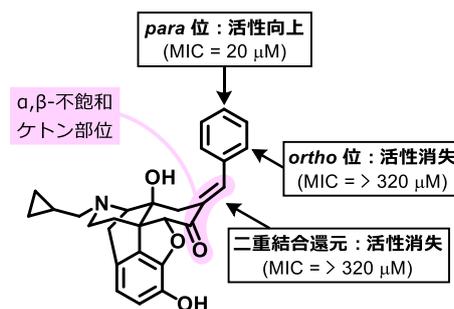
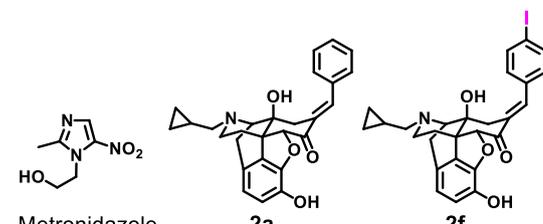


Figure 3

一方で、合成した BNTX 誘導体を用いてオピオイド受容体結合試験を行った結果、抗トリコモナス活性とオピオイド δ 受容体親和性との間に顕著な相関は見られなかった。そこで次に、様々なオピオイド受容体タイプ選択的リガンドを用いて抗トリコモナス活性試験を行った。その結果、 δ 受容体拮抗薬以外のリガンドにおいても MIC = 80 μM で活性を示すことが分かった。また活性を示した化合物の構造に着目して考察した結果、単一のモルヒナン骨格を有する事が活性発現に重要である可能性が示唆された。

2.4. トリコモナスモビレンシスに対する BNTX 誘導体の薬理活性

次に筆者は、今まで評価系に用いていた *T. vaginalis* と類似の種であり、リスザルの腸内寄生虫である *T. mobilensis* を対象に抗トリコモナス活性試験を行った。その結果、既存薬であるメトロニダゾールは両方の原虫で抗トリコモナス活性を示したが、BNTX 誘導体 **2a**, **2f** は *T. mobilensis* に対して全く活性を示さなかった (Figure 4)。本結果は、既存薬であるメトロニダゾールと BNTX 誘導体とは抗トリコモナス活性の作用機序が全く異なる可能性を示唆している。



	antitrichomonal activity (MIC in μM)		
<i>T. vaginalis</i>	10	40	20
<i>T. mobilensis</i>	2.5	>320	>320

Figure 4

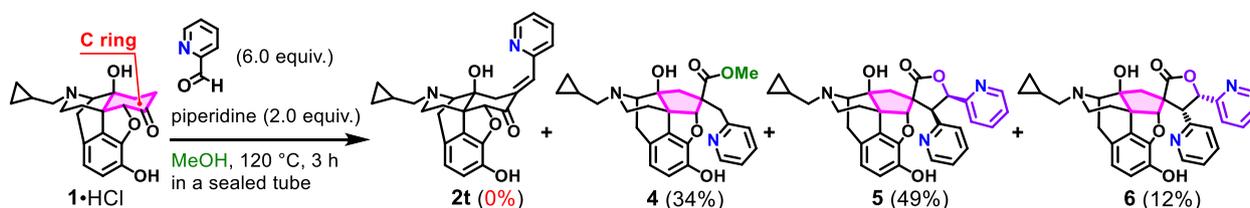
2.5. 小括

筆者は、BNTX のマラリアに対する推定作用機序を参考に、新たにトリコモナス原虫に対して BNTX の適応を検討した結果、BNTX が抗トリコモナス活性を示すことを確認した。そこで、①オピオイド δ 受容体拮抗作用、及び、②チオール基トラップ作用が活性発現に重要であるという作業仮説を立て、その検討を目的として種々の BNTX 誘導体を合成し、その活性を評価した。その結果、抗トリコモナス活性の発現には、①ではなく②のチオール基トラップ作用と、新たに③単一のモルヒナン骨格を有する事が重要であると考えられた。また既存薬とは別の作用機序を有していることが支持された。以上の事により、BNTX 誘導体が薬物耐性トリコモナスに対しても有用なリガンドとなり得る事が示された。

第 3 章 新奇転位反応の発見と反応機構の解明、及び、C 環縮小モルヒナン化合物の薬理活性

3.1. 新奇転位反応の発見

当初、ピリジリデン部位を有する **2t** の合成を目的として、市販原料 **1** に対して 2-pyridinecarboxaldehyde を反応させた。しかし、**2t** の生成は確認されず、興味深いことにモルヒナン骨格の C 環が 5 員環へ環縮小したメチルエステル体 **4** とスピロ γ ラクトン体 **5**, **6** が生成することを発見した (Scheme 2)。



Scheme 2

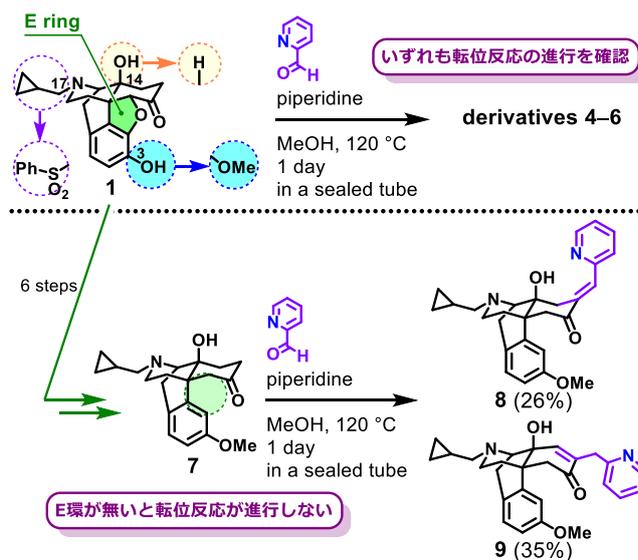
転位反応生成物は IR、MS、NMR スペクトルにて構造決定を行い、特に化合物 **5** においては X 線結晶構造解析により絶対立体配置を確定した。筆者の知る限りにおいて、C 環縮小モルヒナン化合物を一挙に構築する転位反応はこれまでに報告されていない。そこで筆者は、本反応が進行した要因、及び、反応機構や基質適用範囲に興味を持ち、機構の解明に向けて種々の条件検討を行った。

3.2. 反応条件の検討

まず本反応における塩基と当量の検討を行った。その結果、ピペリジン以外の塩基でも転位反応が進行することを確認した。また、アルデヒドの当量を多くすると **5, 6** の収率が向上したが、大過剰量を用いた際には当初目的としていた **2t** を主生成物として単離することに成功した。更に **2t** を同条件に付すと **4-6** が得られたことから、**2t** は転位反応前の中間体であることを確認した。

次に、基質検討として出発物質 **1** の 3 位、14 位、17 位の官能基を変換したが、いずれの基質を用いても転位反応が進行することを確認した。一方、E 環を除去した基質 **7** では転位反応が進行せず、不飽和ケトン **8** とその異性体 **9** が得られた

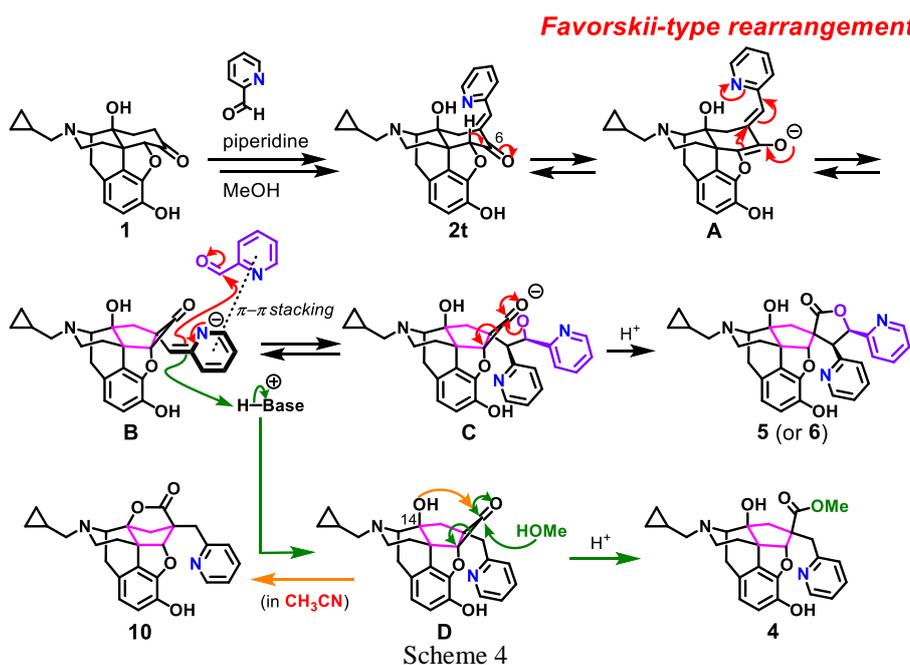
(Scheme 3)。この結果より、本転位反応には E 環が必要、即ち、E 環により誘起される C 環の立体平面性の固定が必須であると考察した。



Scheme 3

3.3. 新奇転位反応の推定反応機構

上記の実験結果に基づき、筆者は本転位反応の推定反応機構を提唱した (Scheme 4)。即ち原料 **1** のアルドール縮合にて BNTX 誘導体 **2t** が生成した後、6 位ケトンのエノール化が進行して中間体 **A** が生成する。次に Favorskii 型の転位反応が進行することで、ピリジリデン部位の窒素原子により安定化されたシクロプロパノン中間体 **B** が生成する。ここで **B** のピリジリデン部位と、もう一分子のアルデヒドが反応することで中間体 **10** が生成する。



C を経由して **5** または **6** が生成すると考えた。一方で、**B** に対してプロトンが反応した場合は、中間体 **D** が生成した後、溶媒であるメタノールが反応することで **4** が生成するものと考えた。

また、本反応をメタノールではなくアセトニトリル中で行った場合、14 位の水酸基による分子内求核攻撃によって生じたと思われるラクトン体 **10** の生成が確認された。この実験結果は本推定反応機構を支持する結果であると考えている。

3.4. 反応機構の検証実験 (ReactIR)

もし本反応が Favorskii 型の反応機構で進行していた場合は、Figure 5 に示す中間体 **D** のようなひずんだシクロプロパノン中間体が反応系中で生成していると考えられる。そこで、ひずんだシクロプロパノン由来の IR 吸収を確認するために、ReactIR による *in situ* での IR 測定を行った。その結果、原料の消費と生成物の増加の観測に加えて、小さいながらも 1830–1870 cm^{-1} 付近に吸収が確認できた。この値

はモデル構造の計算値に概ね当てはまることから、これがひずんだシクロプロパノン中間体の生成を示唆する結果であると考えられた (Figure 5)。即ち、本反応が Favorskii 型の転位反応で進行していることを示唆するデータが得られたことになる。

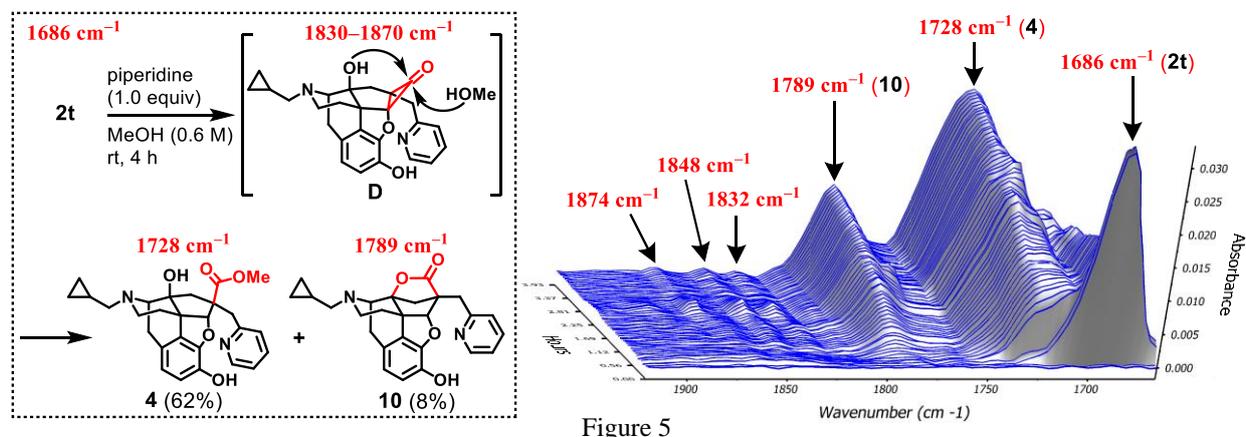


Figure 5

3.5. 転位反応生成物のオピオイド受容体親和性

本反応によって生じた新規モルヒナン化合物のオピオイド受容体親和性を評価した結果、化合物 **4**, **5** はそれぞれオピオイド κ , δ 受容体に対して高い親和性、選択性を有していることが分かった (Figure 6)。

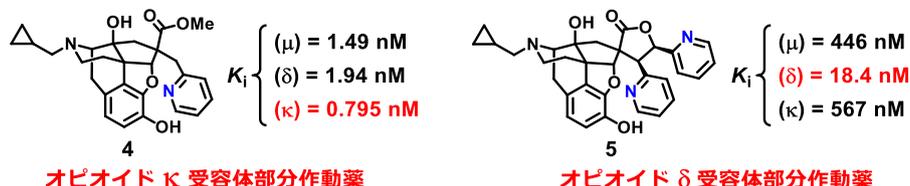


Figure 6

本結果より、転位反応によって生じた一連の化合物群は、有用なオピオイドリガンドの創出に役立つものと考えられる。

3.6. 小括

筆者は 4,5-エポキシモルヒナン骨格における 2-pyridinecarboxaldehyde を用いた新奇 Favorskii 型転位反応を見出した。その推定反応機構は、転位反応前駆体 **2t** の単離、及び、シクロプロパノン中間体の分光学的手法による確認によってサポートされた。また、本反応によって生じる転位反応生成物は、オピオイドリガンドとして有望であることが分かった。

第 4 章 総括

筆者は BNTX の持つ抗マラリア活性の推定作用機序に注目し、類似した抗酸化機構を有するトリコモナス原虫への応用を試みた。その結果、BNTX がトリコモナス原虫に対しても抗原虫活性を示す事を見出した。更に、様々な BNTX 誘導体の設計、合成、活性評価を通して、抗トリコモナス活性の発現に重要な因子を見出した。一方で筆者は、BNTX 誘導体合成の過程で、C 環の環縮小を伴う新奇な転位反応を発見した。反応条件の詳細な検討を行った結果、中間体の単離、及び、転位反応の必須構造の同定に成功した。また反応機構の検証実験を行った結果、本反応が Favorskii 型の転位反応で進行している事が支持された。

発表論文リスト

1. Kutsumura, N.; Nakajima, R.; Koyama, Y.; Miyata, Y.; Saitoh, T.; Yamamoto, N.; Iwata, S.; Fujii, H.; Nagase, H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 4890–4892.
2. Kutsumura, N.; Koyama, Y.; Nagumo, Y.; Nakajima, R.; Miyata, Y.; Yamamoto, N.; Saitoh, T.; Yoshida, N.; Iwata, S.; Nagase, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2017**, *25*, 4375–4383.
3. Kutsumura, N.; Koyama, Y.; Suzuki, Y.; Tominaga, K.; Yamamoto, N.; Saitoh, T.; Nagumo, Y.; Nagase, H. *Org. Lett.* **2018**, *20*, 1559–1562.