Osaka University Knowledge Archive

Title	多発性硬化症治療薬を志向した新規糖脂質の研究
Author(s)	鳥羽, 哲也
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/60076
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

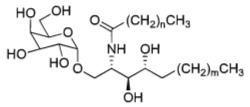
【31】

氏　　名	鳥　羽　哲　也（とばてつや）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬学）
学　位　記　番　号	第　２５７２７　号
学位授与年月日	平成 24 年 12 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第２項該当
学　位　論　文　名	**多発性硬化症治療薬を志向した新規糖脂質の研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　藤岡　弘道 （副査） 教　授　小林　資正　　教　授　宇野　公之　　教　授　小比賀　聡

論　文　内　容　の　要　旨

NKT細胞はNK細胞とT細胞の性質を併せ持つ第4のリンパ球として注目されている。種を超えて単一の抗原受容体を発現し、唯一CD1d分子に提示された糖脂質を認識して活性化される。CD1dは非古典的主要組織適合遺伝子複合体（major histocompatibility complex：MHC）クラスI分子と構造的・機能的に類似する糖タンパク質である。

抗腫瘍活性を指標とした海洋天然物のスクリーニングから見出されたagelasphin類をもとに構造最適化された合成糖脂質リガンドKRN7000（Figure 1）は、強力にNKT細胞を活性化して種々サイトカインを産生誘導する化合物として広く知られている。KRN7000は炎症誘発性のTh1サイトカインであるインターフェロン-γ（IFN-γ）や、免疫調節性のTh2サイトカインであるインターロイキン-4（IL-4）など相反する作用を持つサイトカインを誘導することから、サイトカイン選択性向上に向けた研究が今なお広く行われている。



KRN7000 : m = 12, n = 24
OCH : m = 3, n = 22

Figure 1.　Structures of KRN7000 and OCH

KRN7000の誘導体であるOCH（Figure 1）は短縮されたフィトスフィンゴシン鎖を有し、Th2偏倚の応答を選択的に引き起こす改変糖脂質リガンドとしてYamamuraらにより見出された。免疫応答にはTh1／Th2細胞のバランスが重要であり、その乱れが疾患発症の引き金となると考えられているが、Th1偏倚型の自己免疫疾患である多発性硬化症の動物モデル（マウスEAEモデル）においてKRN7000の効果は弱く、OCHのみが著効を示したことからOCHは自己免疫疾患治療薬としての有望なリード化合物と考えられた。

著者らはOCHの免疫調節作用に着目し、多発性硬化症治療薬としての開発可能性を検証すべくYamamuraらと共同研究を開始した。当研究において著者は、種々誘導体を合成して構造活性相関情報を取得し、開発候補化合物を選出したのちに、臨床開発を見越して大量合成に適した合成法を開発することを目的とした。そのためには、まず各種薬理試験を行うためにOCHを効率的に合成し、さらに開発に最も適した誘導体を合成展開により選出するため、多種類の誘導体を効率的に合成することが必要となる。

研究開始当時いくつか報告されていたKRN7000の合成法の中で、効率の良いものはいずれもフィトスフィンゴシン部分の立体構造を初めから持つ糖類を出発物質とし、鍵反応としてアノマー位のWittig反応でアルキル鎖を導入しているため、合成可能な誘導体はリンイリド試薬を得られるものに限定される。そこで、我々が求める薬効に深く関与するフィトスフィンゴシン部分を幅広く合成展開できる合成法を新たに構築した。すなわちD-アラビトールから誘導できるエポキシドを鍵中間体として設定し、求核付加反応により種々置換基を導入するルートである。この鍵中間体に

Gilman試薬を作用させて*n*-ブチル基を導入し、以下保護基の変換を行いながらアミノ基の導入、グリコシル化、アシル化を経てOCHの合成を13工程、総収率19%で達成した。

短鎖1級アルキル基以外にも、長鎖1級アルキル基、環状2級アルキル基、アリール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、チオ基、アミノ基を鍵中間体に対して導入できることを示し、上記合成法を用いて各種誘導体を合成した。フィトスフィンゴシン部に環状構造、エーテル結合、芳香環を持つ誘導体は世界に先駆けて合成したものであり、特に芳香族誘導体は従来のWittig反応を経るルートでは合成できない化合物である。

KRN7000の*C*-グリコシドによるin vivo動物モデルでの作用増強が研究の進行中に報告されたため、OCHの*C*-グリコシド（*C*-OCH）の活性を検証するべくその効率的な収束的合成法を構築した。これまでのスフィンゴ糖脂質の*C*-グリコシド合成法はいずれも立体配置の確定した部分構造をそれぞれ合成し、影響の少ない位置で結合させるものであったが、著者は結合形成位置を変更することで、一つの不斉炭素の構築を含む短工程の収束的合成を実現した。すなわち、L-アラビノースから誘導されるアルデヒドに対して、市販の保護糖から導かれるアセチレン誘導体を付加させ、目的とする立体配置を持つジアステレオマーを優先的に得た。新たに生成した2級水酸基の立体構造は改良Mosher法により決定した。三重結合をジイミド還元したのち、立体反転を伴うアジド基導入、還元、アシル化、脱保護を経て*C*-OCHに導いた。L-アラビノースから12工程、総収率7.3%での合成を達成した。

合成した各種新規糖脂質誘導体のサイトカイン産生誘導能をin vitroで評価し構造活性相関情報を取得した。その中でOCH様のTh2偏倚作用を示す構造要件を明らかにするとともに、環状構造やエーテル結合など新規なフィトスフィンゴシン部分構造の有用性を示した。また当該部分におけるCD1dとの芳香族相互作用の可能性を明らかにした。これらの構造活性相関情報をもとに、OCHを開発候補化合物として決定した。

臨床開発の対象化合物が一つに絞られた段階で、これに特化した効率的合成法を検討した。最終的にOCHが効率的に大量合成されることが目的であり、総収率はもとより製造コスト、生産工程数、各工程における操作性なども踏まえた総合的な判断となる。確立しているラボスケールの探索合成ルートに対し、製造特性を考慮したスケールアップ検討を実施してプラントスケールでの製造法となり得るかを判断すると同時に、リスクヘッジおよび知財戦略の観点から別合成法の実施可能性もラボスケールで検証する。著者はプロセス検討の一環としてOCHの別合成法を構築した。まず、D-リキソースを出発物質として11工程、総収率17%でOCHを合成するルートを構築した。ここでは探索合成ルートと比べ2工程短縮し、銅試薬やスズ試薬の使用を回避している。また、Garner'sアルデヒドを出発物質とし、7工程、総収率17%でOCHを合成するルートを構築した。ここでは探索合成ルートと遜色の無い収率で、工程数を約半分に大幅削減することに成功した。

探索合成ルートのスケールアップ検討は大量合成を担当する共同研究者によって実施され、ここで大量合成に向けた改良が行われた。中間体を固化させる必要から一部工程の順序が変更となったものの、探索合成で設計した合成法を踏襲して最終的にOCHの前臨床試験用原薬が3.6 kg合成され、著者が構築した合成法が大量合成にも適用できることが実証された。

本研究の中で、新規糖脂質誘導体の取得とTh2偏倚の免疫調整に関する新たな知見の取得を可能とする汎用性の高い合成法が開発された。本研究で示されたスフィンゴ糖脂質の構造変換に対する可能性とその方法論は、今後薬理学的／物理化学的に改良された誘導体を取得するのに有用であると考える。

論文審査の結果の要旨

NKT細胞はNK細胞とT細胞の性質を併せ持つ第4のリンパ球として注目され、種を超えて単一の抗原受容体を発現し、唯一CD1d分子に提示された糖脂質を認識して活性化される。一方、抗腫瘍活性を指標として海洋天然物から見出されたagelasphin類を構造最適化した合成糖脂質リガンドKRN7000は、強力にNKT細胞を活性化して、炎症誘発性のTh1サイトカインであるインターフェロン-γ（IFN-γ）や、免疫調節性のTh2 サイトカインであるインターロイキン-4（IL-4）など相反する作用を持つサイトカインを誘導する。そこでサイトカイン選択性向上に向けた研究が今なお広く行われているが、その中でYamamuraらはKRN7000の誘導体である短縮されたフィトスフィンゴシン鎖を有するOCHが、Th2偏倚の応答を選択的に引き起こす改変糖脂質リガンドであることを明らかにしている。また、自己免疫疾患である多発性硬化症の動物モデル（マウスEAEモデル）においてOCHのみが著効を示したことからOCHは自己免疫疾患治療薬としての有望なリード化合物と考えられた。

このような背景下、鳥羽氏は、OCHの種々誘導体を合成して構造活性相関情報を取得し、開発候補化合物を選出したのちに、臨床開発を見越して大量合成に適した合成法を開発することを目的に研究を行い、以下の成果を得た。

まず各種誘導体にも適用可能なOCHの効率的合成法を構築し、OCHの合成を13工程、総収率19%で達成した。またエポキシドに対する求核付加反応を利用して同合成法により種々置換基を導入し、アルキル鎖長を変換した各種誘導体を合成すると共に、フィトスフィンゴシン部に環状構造／芳香環／エーテル結合を持つ誘導体を世界に先駆けて合成した。

またC-グリコシド（C-OCH）の生物活性を評価するべく、一つの不斉炭素の構築を含む短工程の収束的合成法を構築し、L-アラビノースから12工程、総収率7.3%でC-OCHの合成を達成した。骨格形成反応はキレーション制御によりジアステレオ選択的に進行し、新たに生成した2級水酸基の立体構造は改良Mosher法 により決定した。

次いで前述の合成研究で得た各誘導体のサイトカインバランスに着目した構造活性相関を取得し、OCH様のTh2偏倚作用を示す構造要件を明らかにすると共に、環状構造やエーテル結合など新規なフィトスフィンゴシン部分構造の有用性を示した。また当該部分におけるCD1dとの芳香族相互作用の可能性を明らかにし、これらの構造活性相関情報を基に、OCHを開発候補化合物として決定した。

最後に、プロセス検討の一環としてOCHに特化した別合成法を構築した。D-リキソースおよびGarner'sアルデヒドをそれぞれ出発物質とする新たに構築した合成法は、重金属試薬使用の回避や工程数の大幅削減を可能とした。また、探索合成ルートのスケールアップ検討の結果、キログラムスケールでの前臨床試験原薬が合成され、鳥羽氏が構築したルートが大量合成にも応用できる合成法であることが実証された。

以上の成果は、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。