

バンコマイシン耐性の克服を目指した合理的分子設計の研究

Molecular design of novel glycopeptide derivatives against vancomycin-resistant bacteria

代表研究者 東北大学 有本博一 Tohoku University Hirokazu ARIMOTO

The emergence of vancomycin-resistant bacteria (VRE: vancomycin-resistant *enterococci*; VRSA: vancomycin-resistant *S. aureus*) is of particular concern, because vancomycin is the last resort for the treatment nosocomial infections by multi-resistant gram-positive bacteria. Currently, Zyvox (Linezolid), Synercid etc. are available for VRE infections, but have problems such as side effects and drug resistance. Here we describe the synthesis of novel vancomycin dimers with excellent antibacterial activity both *in vitro* and *in vivo*. A novel and efficient avenue for preparation of vancomycin derivatives via cross-coupling reaction is also described.

研究目的

ペニシリンの発見を契機に化学療法が進歩し、感染症の恐怖を感じない「幸せな時代」がもたらされた。しかしながら、個々の抗生物質に対する耐性は短期間で出現し、臨床現場の大きな脅威となっている。特に多剤耐性のMRSA（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌）は、院内感染症の主たる原因として深刻である。新しい抗生物質は近年ほとんど実用化されておらず、主要抗生物質が20世紀半ばに発見され尽くされた感が強い。

バンコマイシンは、多剤耐性グラム陽性菌感染症を治療する切り札である。1958年に認可された古い抗生物質であるが、耐性菌は1986年まで発見されなかった希有の例である。しかしながら、現在ではVRE（バンコマイシン耐性腸球菌：1986-）、VRSA（バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌：2002年- 米国）が欧米で一般化した。バンコマイシンが将来「切り札」の地位を失う危険がある。耐性の性質は、プラスミドを通じて他のグラム陽性細菌に水平伝播する可能性も危険されている。

バンコマイシンは、細菌の細胞壁合成を阻害する。ペプチドグリカン中間体のD-Ala-D-Ala部分を分子認識し、結合することが抗菌活性に必須とされている。耐性菌は変異したD-Ala-D-Lac型中間体を有しており、バンコマイシンが結合できないために耐性となっている。

バンコマイシン耐性菌に対抗する明確な指針は未だ確立されていない。バンコマイシンが結晶格子中で会合2量体を形成することから、バンコマイシンの作用（細菌細胞壁中間体認識）に、2量体形成が果たす役割が議論されている。これまでに、複数の合成化学者が、バンコマイシン2分子をリンカーで結んだ2量体を合成した。また、私達はバンコマイシンを重合したポリマーを合成した。これらのなかには、バンコマイシン耐性菌に対しても*in vitro*レベルで抗菌活性を示すものが見つかっている。

研究経過

バンコマイシンの2量化をベースにした従来の研究では、*in vivo* 試験に於いて治療効果を示す誘導体が見出されていなかった。私達は、まず新規な2量化反応の探索に着手した。リンカーの構造や長さが、生物活性に影響することが判っていたからである。バンコマイシンには多くの官能基が存在するので、保護基の使用を避ける為には反応の化学選択性について、特に注意を払う必要があった。

最終的に選択したのは、3環性のフェノキサゾン骨格を含むリンカーであった。抗生物質アクチノマイシンの部分構造にヒントを得たものである。アクチノマイシンはデプシペプチドを部分構造に含むため、グリコペプチド抗生物質であるバンコマイシンも保護基なしに2量化できるのではないかと考えた。また、アクチノマイシンが抗癌剤として臨床で用いられていることから、フェノキサゾン環部分は、生体内で安定であると期待した。合成した2量体の一部を Fig 1 に示す。

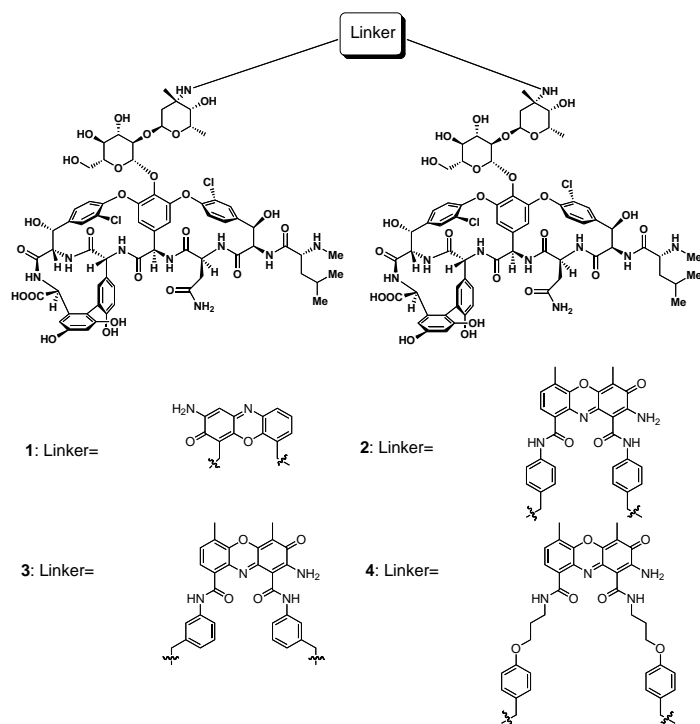


Fig. 1 Structures of vancomycin dimers with actinocin-based linkers

アルコキシニトロベンズアルデヒドとバンコマイシンを反応させ、生じたイミン中間体をナトリウムシアノボロヒドリドで還元した。バンコマイシンには、2箇所のアミノ基が存在するが、本反応条件ではバンコサミン糖部位が選択的にアルキル化された。得られた化合物 5 (Fig 2.) を接触還元によって、ベンジルエーテルの除去とニトロ基の還元を行なった。アミノフェノール中間体は、空气中で不安定であったので、そのままベンゾキノンで酸化して2量体を得た。

合成した2量体の抗菌活性を評価したところ、VREに優れた抗菌活性を示した (Table 1)。

| | 1 | 3 | Vancomycin |
|--|--------------------|-----------|------------|
| <i>S. aureus</i> VRSA-2 (VCM-resistant) | 8 (4) | 32 (1) | >64 |
| <i>E. faecium</i> SR7940 (VRE: VanA) | 8 (4) | 8 (4) | >64 |
| <i>S. aureus</i> Smith | 16 (4) | 16 (2) | 1 |
| <i>S. pneumoniae</i> Type1 | 0.125 (≤0.063) | 1 (0.25) | 0.5 |
| <i>S. pneumoniae</i> SR23928 (PRSP) | ≤0.063 (≤0.063) | 1 (0.5) | 0.5 |
| <i>S. pneumoniae</i> tupelo (VTSP) | 0.125 (≤0.063) | 1 (0.125) | 0.25 |

Table 1 in vitro evaluations of antibacterial activity.^a

^a Minimum inhibitory concentration in micrograms per milliliter as determined by microdilution broth assay *in vitro*. The TFA salts and HCl salts of dimers **1** and **3** were employed for the evaluation. Antibacterial activities of the HCl salts are shown in parentheses

特に優れた活性を示した化合物 **1** と **3** を選び、*in vivo* でも治療効果が得られるか検討した。*in vivo* 試験では、薬物の動態や毒性などがハードルとなる。ペニシリン耐性肺炎球菌による肺感染モデルマウスを用いたところ、化合物 **1** がリネゾリドを上回る治療効果を示した。

これまでに述べた化合物においては、バンコサミン糖部分のアミノ基同士をリンクしている (V-V dimer)。次に、カルボン酸末端同士をリンクした 2 量体 (C-C dimer) を合成した。

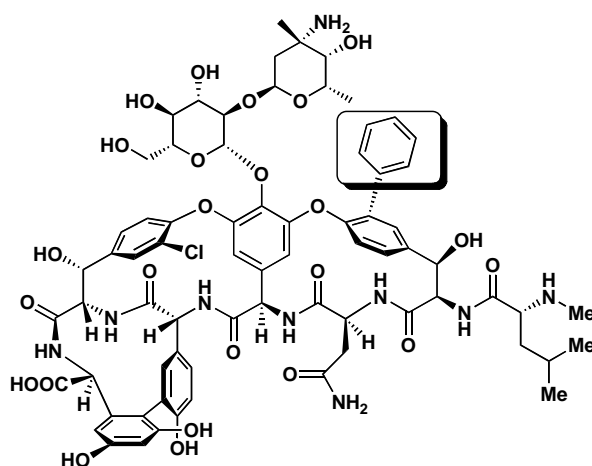
In vitro の抗菌活性を評価したところ、C-C dimer 誘導体は VRE (*E. faecium*) に抗菌活性を有していたが、他の菌種 (VISA や MRSA) に対する活性は低かった。V-V dimer と C-C dimer は MIC のプロフィールが異なることから、バンコマイシン 2 量体の間でも作用機序には違いがあることが示唆された。

合成した誘導体の細胞壁生合成阻害能を詳しく調べるため、黄色ブドウ球菌の細胞膜画分を用いて実験を行なった (TLC アッセイ)。本画分には、細胞壁生合成の後段に必要な酵素群が含まれている。外部から放射ラベルした基質を添加して、合成されるペプチドグリカン量を半定量的に評価した。バンコマイシン感受性のグラム陽性菌に対応した基質を使用したところ、「C-C dimer の細胞壁合成阻害能は、V-V dimer よりも優れている」ことが明らかとなった。

C-C dimer はバンコマイシン感受性菌に対して抗菌活性が弱いという特徴をもつ。したがって、今回観察された酵素反応レベルでの高い細胞壁合成阻害能が、菌体レベルでの抗菌活性 (MIC) に直接反映していないことが判った。この不可解な解離の原因として、今回のアッセイ系には含まれていない細胞壁画分の影響があるものと推察し、今後の検討を行う予定である。

ここからは、バンコマイシン単量体における化学修飾法について述べる。10年余りの研究の過程で、筆者はバンコマイシン化学修飾に関する過去の研究例を徹底的に調査した。その結果、膨大な数の創薬化学研究が、実際には少数の反応に依存している事に気づいた。バンコマ

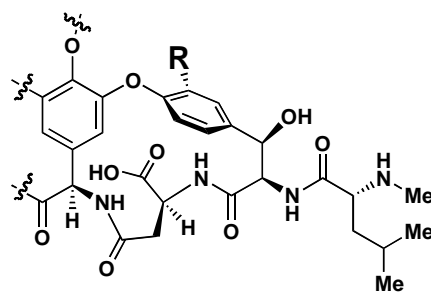
イシンは多官能基性分子であり、現代化学反応の化学選択性に関する力量をそのまま反映している。



目的カップリング生成物

Fig 2. Structures of cross-coupling reaction of vancomycin with phenylboronic acid

新規化学修飾法を開発できれば、我が国独自の全く新しい創薬展開が可能となる。そこで、筆者は不活性基とされてきた塩化アリール部の変換に挑戦した。不活性基を選択的に活性化すれば、保護基を用いずに修飾を行うことができる。本研究ではパラジウム触媒を用い、バンコマイシンの塩化アリール位において鈴木・宮浦カップリング反応を試みた。Buchwaldらの水溶性配位子を用いた、フェニルボロン酸とバンコマイシンのカップリング反応では、Fig 2の目的化合物が生成した。しかしながら、単離収率が当初1%以下であり、全く実用的なレベルになかった。低収率の一因は、生成物のペプチド骨格が転位反応を起こす為である(Fig 3)。



骨格転位生成物

Fig 3. The rearranged product in cross-coupling reaction of vancomycin

骨格転位は、酸、塩基条件や高温で促進される。そこで、触媒や塩基の選択を見直し、さらに、マイクロ波照射を用いた反応加熱を取り入れるなど反応条件の検討を行った。最適化した条件では収率55%で目的生成物を得ることができた。反応収率、選択性の更なる改善を目指して、種々の反応条件の検討を現在継続中である。あわせて生物活性を評価中である。

考察

バンコマイシン耐性菌感染症の治療に現在使用できる薬剤は、リネゾリドなど少数しかない。今回報告したバンコマイシン2量体は、バンコマイシン耐性菌の細胞壁合成を阻害するもので、

細菌のタンパク質合成を阻害するリネゾリドとは作用機序が異なっている。新しい解決の糸口と言えよう。

そもそも、バンコマイシン耐性は、細菌の細胞壁中間体構造が変化し、薬剤とのアフィニティーが低下することによって生じる。しかし、バンコマイシン2量体が、「耐性菌の細胞壁中間体と強く結合」し、VREに対して効力を示すと推論するのは早計である。今回の研究報告では、細菌の細胞膜面分を粗酵素として用いるアッセイ系を確立し、半定量的な評価について述べた。薬剤は確かに阻害活性を示したが、このアッセイ系は複数の膜酵素が協同して働いていることを忘れてはならない。薬剤の真の標的を割り出す検討を継続する必要がある。

個々の酵素の発現と精製をおこない、それら酵素の基質となる生合成中間体を全合成的手法で供給することが、分子レベルでの抗菌活性機序の理解には欠かせない。両者は、細菌学、有機合成化学の最先端の知見を要求する課題である。長期間の継続的な努力によってのみ達成されることであり、私達も努力を続けている。

本報告の後半では、クロスカップリング反応を用いたバンコマイシンの化学修飾について述べた。バンコマイシンの創薬化学については、「欧米企業、大学が検討し尽くしている」との先入観が強く、重要性と現状が十分に認識されていないと感じる。アリアルクロリドを用いるクロスカップリングは、バンコマイシン類縁体の薬効、薬物動態、安全性改善に新たな足掛かりを与えるものである。

研究発表

口頭発表

1. 有本博一；「Synthesis of novel vancomycin derivatives with excellent antibacterial activity against vancomycin-resistant bacteria」 & “Synthesis of aza-spirocyclic natural products」(中華人民共和国済南市 山東大学薬学院、2006)
2. 有本博一；「バンコマイシン耐性菌克服のための化学的アプローチ」、東北大学学際科学国際高等研究センターフォーラム (仙台、2007)
3. 有本博一；「Synthesis of Novel Vancomycin Derivatives with Excellent Antibacterial Activities Against Resistant Bacteria」、10th International Conference on the Chemistry of Antibiotics & other Bioactive Compounds (アメリカ合衆国 ナッシュビル市、2007)
4. 有本博一；「抗生物質が効かなくなる？バンコマイシン耐性菌との闘い」、お茶の水女子大学糖鎖科学研究教育センター公開シンポジウム (東京、2007)
5. 有本博一；「バンコマイシンの化学：創薬を目指して」
グローバルCOEプログラム「分子系高次構造体化学国際教育研究拠点」シンポジウム (仙台、2008)
6. 有本博一；「天然物集積型分子の合成と機能」、日本化学会第88春季年会 (東京、2008)

誌上発表

1. J. Lu, O. Yoshida, S. Hayashi, H. Arimoto, *Chem. Commun.*, **2007**, 251-253.