

氏名（本籍） <sup>わき</sup> <sup>やま</sup> <sup>よし</sup> <sup>なり</sup> 脇山佳也（東京都）  
学位の種類 博士（薬科学）  
学位記番号 乙第21号  
学位授与の日付 2018年3月19日  
学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当  
学位論文題目 **Synthesis and structure-activity relationship analysis of novel lincomycin (LCM) derivatives possessing significantly potent antibacterial activities against resistant *Streptococcus pneumoniae***  
(耐性肺炎球菌に強力な抗菌活性を有する新規リンコマイシン誘導体の合成と構造活性相関研究)

論文審査委員 (主査) 教授 青木 伸  
教授 内呂 拓実 教授 早川 洋一  
教授 羽田 紀康 教授 鎌倉 高志

## 論文内容の要旨

マクロライド系抗生物質は、肺炎球菌、A群溶血性連鎖球菌、インフルエンザ菌、淋菌、マイコプラズマ、モラクセラカタラリス等の種々の細菌感染症に効果を示し、かつ安全性も高いことから、古くより臨床現場で使用されてきた。しかし、近年、肺炎球菌等グラム陽性菌に対して耐性菌の増加が著しく、特に小児科領域を中心とした臨床現場では問題となっている。マクロライド系抗生物質の耐性菌は種々知られているが、主として *erm* 遺伝子によるメチラーゼ産生型や *mef* 遺伝子による薬剤排出型がある。クラリスロマイシン (CAM) やアジスロマイシン (AZM) は、*erm* 遺伝子を有する耐性菌に無効であり、また、*mef* 遺伝子を有する耐性菌に影響を受け、低感受性である。一方、テリスロマイシン (TEL) は、これらの耐性菌に抗菌活性を有するが、意識障害、肝障害等の副作用の懸念から日本では発売中止となった。さらに化学構造が複雑なことから合成コストは高くなることが想定される。その後アボット社により創製されたセスロマイシン、エナンタ社のモジスロマ

イシン、さらにセンプラ社のケトライドであるソリスロマイシンが開発されたが有効性や安全性に問題があり日本では上市に至っていない。このため臨床現場では、耐性菌に有効で安全性が高く低コストの経口抗菌剤の開発が強く望まれている。

リンコマイシン (LCM) 系抗生物質はマクロライド系抗生物質と異なる構造を持つが、細菌のタンパク合成を同様に阻害することが知られている。それはクリンダマイシン (CLDM) の細菌の 23S *rRNA* に対する結合部位がマクロライドの近傍に位置していることも理由の一つと考えられる。

CLDM は培養により安価に得られる LCM の半合成により容易に得ることができる。本物質は、*mef* 遺伝子を有する耐性菌に対し効果を示すが、*erm* 遺伝子を有する耐性菌に対して主要なマクロライド系抗生物質と同様に無効である。これまでに多くの研究者により LCM 誘導体の合成展開が行われた。その知見として、以下の 1) から 4) が挙げられる。

- 1) (7S) の立体化学を有する誘導体は、(7R) の立体異性体よりも概して活性が強い。
- 2) (7S)-7-アルキルチオ-7-デオキシ LCM は、LCM よりも活性が強い。
- 3) (7R)-7-デオキシ-7-イミダゾリルチオ LCM は、LCM と同等の抗菌活性を示す。
- 4) CLDM—50S リボソームとの複合体の X 線結晶構造解析によると、CLDM 7 位置換基周辺に 3 次元的空間が存在する。

そこで著者は、上記 4) の空間を(7S)の立体配置で硫黄原子を介したヘテロ環で占有することで上記耐性菌に対し抗菌活性が向上すると仮説を立てた。LCM より 2 工程で得られる 2,3,4-トリ-O-トリメチルシリル LCM (7-OH 体) に対して光延反応を用いることで(7S)の立体化学を有する様々な LCM 誘導体を合成した結果、6-アミノベンゾチアゾール-2-イルチオ基、4-(メトキシカルボニル)フェニルチオ基及び 5-フェニル-1,3,4-チアジアゾール-2-イルチオ基を有する誘導体が、CLDM が無効である *erm* 遺伝子保有の耐性肺炎球菌及び耐性 A 群溶血性連鎖球菌に対して、LCM 誘導体で初めて明確な抗菌活性を示した。一方、(7R)異性体は今迄の知見と同様に活性は減弱した。

次に、7 位 S-Ph 基上に NHCO 基または CONH 基を有する誘導体を合成した。その結果、4-モルホリノカルボニル基、2-(メトキシメチル)ピロリジノカルボニル基及びジメチルアミノメチルピロリジノカルボニル基を有する誘導体が、*erm* 遺伝子を有する耐性肺炎球菌や耐性 A 群溶血性連鎖球菌に対してさらに強い抗菌活性を有することがわかった。(7S)-7-デオキシ-4-モルホリノカルボニルフェニルチオ LCM を用い 23S *rRNA* とのドッキングをシミュレーション解析した結果、4-モルホリノカルボニル基の酸素原子が *Haloarcula marismortui* における *rRNA* の U2620 と水素結合すると共に、モルホリンのエチレン部分が U2621 と CH- $\pi$  結合し、活性向上に寄与していることが示唆された。

引き続き7位 *S*-Ph 基に窒素原子を含むアルキル基または芳香族ヘテロ環等を有する誘導体の合成展開を行った。その結果、Ph 基上のパラ位にピリジン-3-イル基、ピリミジン-5-イル基、ピペリジン-3-イル基、*N*-メチルピペリジン-3-イル基および1-メチル-1,2,5,6-テトラヒドロピリジン-3-イル基を有する LCM 誘導体が、CLDM のみならず CAM や AZM が無効である耐性肺炎球菌や耐性 A 群溶血性連鎖球菌に対して強い抗菌活性を示した。即ち、耐性肺炎球菌に対する抗菌力は TEL に近づきつつあり、耐性 A 群溶血性連鎖球菌に対しては、TEL を凌ぐ抗菌活性を示した。

さらに、LCM の 6 位と 7 位の変換を組み合わせた新規誘導体を合成した。7 位を 7(*S*)-ヘテロアリアルチオ基に固定し、6 位プロリル基の 1'位を変換した結果、1'位は水素原子または Me 基を除いて抗菌活性の増強は困難であった。次に 7 位に 5-(2-ニトロフェニル)-1,3,4-チアジアゾール-2-イル基を、6 位プロリル基の 4'位に *n*-ペンチル基を導入したところ、抗菌活性が増強された。本誘導体の特徴として、*erm* 遺伝子を有する耐性肺炎球菌に対する抗菌力は TEL に近づき、*mef* 遺伝子を有する耐性肺炎球菌や *erm* 遺伝子を持った耐性 A 群溶血性連鎖球菌に対しては、TEL を凌ぐ抗菌活性を示した。

上記において、LCM の 7 位に(7*S*)-4-(ピリミジン-5-イル)フェニルチオ基を導入した結果、*erm* 遺伝子を有する耐性肺炎球菌に対し、さらに強い活性を有する LCM 誘導体を見出した。そこで LCM の 7 位を、上記した 7-*S*-4-(ピリミジン-5-イル)フェニルチオ基に固定し、6 位部分を天然型のピロリジン環からピペリジン環またはホモピペリジン環に変換した。6 位がピペリジン環の場合は、その 4'位に種々の側鎖を導入し、6 位がホモピペリジン環の時は、5'位に *n*-プロピル基を導入した。その結果、ピペリジン環の 4'位にシクロプロピルメチル基を導入した LCM 誘導体が耐性肺炎球菌に対し最も強い抗菌活性を示した。そこで、LCM の 6 位側鎖のピペリジン部分の 4'位をシクロプロピルメチル基に固定し、7 位を変換した結果、7 位に *S* の立体配置で硫黄原子を介してフェニル基上のパラ位に 1-メチル-1,2,5,6-テトラヒドロピリジン-3-イル基、ピリジン-3-イル基、ピリミジン-5-イル基、1,2,3-チアジアゾール-4-イル基を導入した誘導体の活性が、TEL の耐性肺炎球菌活性や耐性 A 群溶血性連鎖球菌活性を有意に凌ぐことが明らかとなり、*in vivo* 実験等の高次評価結果が期待された。

そこで臨床で分離された肺炎球菌 60 菌株（感受性菌、*erm* 遺伝子保有株、*mef* 遺伝子保有株含む）を用い抗菌活性の強い化合物の感受性分布を評価した。ピリジン-3-イル基とピリミジン-5-イル基を有する誘導体は MIC<sub>90</sub> において TEL を十分上回る高い感受性分布を示した。しかし、前者は弱い溶血活性があることから *in vivo* 評価の対象にはならず、溶血活性が弱く抗菌活性の強いピリミジン-5-イル基を有する誘導体 (1'-NH 体) とその Me 体

(1'-NMe) を *erm+mef* 遺伝子と、*mef* 遺伝子保有の耐性肺炎球菌を用いたラット肺感染モデルにて、それぞれ皮下投与で評価した。上記 1'-NH 体は、*erm+mef* 遺伝子および *mef* 遺伝子保有の耐性肺炎球菌の両試験において TEL を上回る有効性を示した。また、1'-NMe 体は、*erm+mef* 遺伝子保有の耐性肺炎球菌に対して TEL と同等の有効性を示し、*mef* 遺伝子保有の耐性肺炎球菌に対しては、TEL や 1'-NH 体を上回る *in vivo* 有効性を示した。以上の結果より、*in vitro* 並びに *in vivo* 抗菌活性の観点から、1'-NH 体と 1'-NMe 体は開発候補化合物としての力量があると考えられた。即ち著者は、CLDM の X 線結晶構造解析から立てた仮説を基に、LCM 誘導体を合成展開し、開発候補化合物を創出した。

## 論文審査の結果の要旨

マクロライド系抗生物質は、肺炎球菌、A 群溶血性連鎖球菌、インフルエンザ菌、淋菌等の細菌感染症に効果を示し、安全性も高いことから臨床現場で使用されている。しかし近年、肺炎球菌等グラム陽性菌において耐性菌の増加が著しく、特に小児科領域などの臨床現場で問題となっている。マクロライド系抗生物質の耐性菌には、主として *erm* 遺伝子によるメチラーゼ産生型や *mef* 遺伝子による薬剤排出型がある。クラリスロマイシン (CAM) やアジスロマイシン (AZM) は、*erm* 遺伝子を有する耐性菌に無効であり、また *mef* 遺伝子を有する耐性菌には低感受性である。一方テリスロマイシン (TEL) は、これらの耐性菌に抗菌活性を有するが、副作用の懸念から日本では発売中止となった。このため臨床現場では、耐性菌に有効で安全性が高く低コストの経口抗菌剤の開発が強く望まれている。

リンコマイシン (LCM) 系抗生物質はマクロライド系抗生物質と異なる構造を持つが、細菌のタンパク合成を同様に阻害する。それはクリンダマイシン (CLDM) の細菌の 23S rRNA に対する結合部位がマクロライドの近傍に位置しているためであると考えられる。CLDM は LCM の半合成により容易に得られ、*mef* 遺伝子を有する耐性菌に対し効果を示すが、*erm* 遺伝子をもつ耐性菌に対して無効である。

そこで申請者は、これまでの知見を利用して上記耐性菌に対し抗菌活性が向上する LCM 系薬剤設計を行った。LCM より 2 工程で得られる 2,3,4-トリ-O-トリメチルシリル LCM (7-OH 体) から様々な LCM 誘導体を合成した結果、6-アミノベンゾチアゾール-2-イルチオ基、4-(メトキシカルボニル)フェニルチオ基及び 5-フェニル-1,3,4-チアジアゾール-2-イルチオ基を有する誘導体が、CLDM が無効である *erm* 遺伝子保有の耐性肺炎球菌及び耐性 A 群溶血性連鎖球菌に対して、LCM 誘導体で初めて明確な抗菌活性を示した。

次に 7 位 S-Ph 基上に NHCO 基または CONH 基を有する誘導体を合成した結果、4-ホルホリノカルボニル基、2-(メトキシメチル)ピロリジノカルボニル基及びジメチルアミノメチルピロリジノカルボニル基を有する誘導体が、*erm* 遺伝子を有する耐性肺炎球菌や耐性 A

群溶血性連鎖球菌に対して強い抗菌活性を示した。23S rRNA とのドッキングシミュレーションの結果、4-ホルホルノカルボニル基の酸素原子が *Haloarcula marismortui* における rRNA の U2620 と水素結合し、ホルホルリンのエチレン部分が U2621 と CH- $\pi$  結合し、活性向上に寄与していることが示唆された。

そこで7位 S-Ph 基に窒素原子を含むアルキル基または芳香族ヘテロ環等を有する誘導体の合成展開を行い、Ph 基上のパラ位にピリジン-3-イル基、ピリミジン-5-イル基などを有する LCM 誘導体が、CLDM、CAM、AZM が効かない耐性肺炎球菌や耐性 A 群溶血性連鎖球菌に対して強い活性を示した。

さらに、LCM の7位を7(S)-ヘテロアリアルチオ基に固定し、6位プロリル基の1'位を変換したが、1'位に関して水素原子または Me 基を除いて抗菌活性の増強は困難であった。7位に5-(2-ニトロフェニル)-1,3,4-チアジアゾール-2-イル基を、6位プロリル基の4'位に *n*-ペンチル基を導入したところ、抗菌活性が増強され、*erm* 遺伝子を有する耐性肺炎球菌に対する抗菌力は TEL に近づき、*mef* 遺伝子を有する耐性肺炎球菌や *erm* 遺伝子を持った耐性 A 群溶血性連鎖球菌に対しては、TEL を凌ぐ抗菌活性を示した。

そこで LCM の7位を7-S-4-(ピリミジン-5-イル)フェニルチオ基に固定し、6位部分をピペリジン環またはホモピペリジン環に変換した結果、ピペリジン環の4'位にシクロプロピルメチル基を導入した誘導体が耐性肺炎球菌に対し最も強い抗菌活性を示した。LCM の6位側鎖のピペリジン部分の4'位をシクロプロピルメチル基に固定し、7位に S の立体配置で硫黄原子を介してフェニル基上のパラ位に1-メチル-1,2,5,6-テトラヒドロピリジン-3-イル基、ピリジン-3-イル基、ピリミジン-5-イル基、1,2,3-チアジアゾール-4-イル基を導入した誘導体の活性が、TEL の耐性肺炎球菌活性や耐性 A 群溶血性連鎖球菌活性を有意に凌いだ。

臨床で分離された肺炎球菌 60 菌株（感受性菌、*erm* 遺伝子保有株、*mef* 遺伝子保有株含む）を用いた *in vitro* 並びに *in vivo* 抗菌活性測定の結果、1'-NH 体と 1'-NMe 体は開発候補化合物となった。即ち申請者は、CLDM の X 線結晶構造解析から立てた仮説を基に、LCM 誘導体を合成展開し、開発候補化合物を創出した。

以上の成果は、博士論文として十分な内容であると判断された。