

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博士論文審査報告書

論 文 題 目

Determination of crystal structure
and absolute configuration of
thalidomide enantiomers

サリドマイド対掌体の結晶構造および
絶対配置の決定

申 請 者

Toshiya Suzuki

鈴木 俊哉

生命医科学専攻 生物物性科学研究

2010年 12月

結晶構造解析は、物理学、化学、生物学など様々な学問分野において、分子や結晶の構造およびその機能や性質との相関を調べるための有力な研究手法の一つである。これら構造解析に資する結晶の作製は単純かつ容易ではない。ある化合物が結晶化する際、その育成方法や育成条件により結晶多型または溶媒和物を形成する場合があります、多様な結晶構造を取り得る可能性があるのが一因である。これら結晶多型や溶媒和物はそれぞれ物理化学的な性質が異なるために、それらの形成を制御することは今日の結晶工学における重要な課題である。

対象分子がキラリティを有する場合、対掌体間で機能が異なる場合が見出されている。とくに、核酸やタンパク質・アミノ酸など生体分子もキラリティを有するため、これらに作用する医薬品分子のキラリティは薬理活性に顕著な影響を及ぼすことも多く、そのため、キラル医薬品を構成するキラル化合物の絶対配置を決定することは重要な課題となる。

3'-(N-フタルイミド)グルタルイミド、以下、サリドマイド、はフタルイミド環とグルタルイミド環から成るキラル化合物である。サリドマイドは胎児への催奇形性が問題となった一方で、近年、多発性骨髄腫などへの治療薬として承認されており、その薬理活性が見直されている。しかし、サリドマイドは、キラル反転により容易にラセミ化することが知られており、それぞれのエナンチオマーの構造ならびに機能との相関を十分に明らかにすることが望まれていた。このため、各対掌体およびラセミ体の結晶構造の詳細な解析は、重要な意義をもっている。また、通常、キラル化合物の対掌体とラセミ体の結晶構造は本質的に異なる。よって、両結晶構造を比較することは、対掌体とラセミ体の融点や溶解度など物理化学的性質の違いの要因を明らかにする上でも有意義かつ不可欠である。

これまで、ラセミ体の結晶構造について α 型と β 型の多型が報告されているが、対掌体の結晶構造とその絶対配置が決定されたとの報告はなかった。これは、サリドマイドの対掌体結晶化においては、結晶化の過程でキラル反転を伴うことが多く、結晶成長中にキラル反転で生じた他方の異性体は絶対配置の決定を困難にさせる不純物でしかなかったためである。よって、対掌体の結晶作製条件を最適化し、良質かつ単一分域結晶を作製できるか否かがサリドマイドの絶対配置の決定の課題となっていた。

このような背景のもと、本研究は、サリドマイドの対掌体結晶作製について様々な手法や条件を網羅的に検討し、キラル反転を抑制した有効な対掌体結晶作製手法を確立した。また、双晶が生じやすい結晶から偏光顕微鏡を用いて適切な単一分域試料を選別するなどの工夫を加えながら、重原子置換法などタンパク質結晶で有効な結晶構造解析手法が適用できない低分子のサリドマイドの結晶に対して、測定パラメーターを検討することにより結晶構造及び絶対配置を決定した。さらに、サリドマイドの結晶構造と物理化学的性質との相関を考察した。本論文は全5章で構成され、以下に各章の審査概要を述べる。

第1章では、本研究の導入として結晶工学、キラリティ、サリドマイドの研究の重要性について概説し、本研究の意義を述べている。

第2章では、結晶多型や溶媒和物形成の可能性について考察し、さらに対掌体についてはキラル反転の影響という観点から、サリドマイドの結晶作製条件の検討及び得られた結晶を評価している。溶液からの結晶作製において、溶媒の極性は結晶成長に大きく影響する。極性の大きく異なる溶媒を用いた結晶作製においては、結晶多型または異なった溶媒和物を形成する可能性が高い。まず、結晶育成法としては汎用性の高い溶媒蒸発法を採用している。極性溶媒として、水及びメタノールに着目している。しかし、水はサリドマイドの溶解度が極めて低く、他方、メタノールは水よりも溶解度が高いが蒸発速度の調節が困難という問題があり、それぞれの溶液から良質な対掌体結晶は得られなかった。それら困難を克服するため、対掌体結晶の作製に適切なメタノール-水混合溶媒比を求めている。一方、サリドマイドがクロロホルム中で結合位置の異なる三種の二量体が動的平衡状態にあることが報告されており、この挙動が結晶化に与える影響は興味深いため、低極性溶媒としてクロロホルムを用いて結晶化も試みている。さらに、クロロホルム溶液を用いた結晶化では、ジエチルエーテルが(1)揮発性が高い、(2)サリドマイドの溶解度が低い、(3)クロロホルムと混和するという点に着目し、それを用いた蒸気拡散法による結晶化も試みている。このような考察及び予備実験に基づき、メタノール-水混合溶液からの溶媒蒸発法、クロロホルム溶液からの溶媒蒸発法、及びクロロホルム溶液からのジエチルエーテルによる蒸気拡散法という三種の結晶育成法を用いて、サリドマイドの単結晶の育成に成功していることは特筆すべきことである。特に、対掌体結晶の育成ではキラル反転が障害となるため、キラル反転の進行を円二色性測定により評価し、その影響を抑える結晶育成条件を求めることに成功している。さらに、X線構造解析への導入として、熱重量示差熱分析により結晶多型または溶媒和物の可能性も評価しており、これら綿密かつ多角的な実験の実施とその結果の考察は本研究の卓越性を示している。

第3章では、(S)-サリドマイドの結晶構造及び絶対配置を決定している。第2章の各条件で作製した結晶に対するX線構造解析の結果、極性のメタノール-水混合溶媒により作製した結晶は溶媒を取り込んでいない非溶媒和物であるのに対し、低極性のクロロホルム及びそのジエチルエーテルとの混合溶媒により作製した結晶は溶媒和物を形成するという差異が見られた。本研究は、これら非溶媒和物、溶媒和物の結晶構造及び絶対配置の決定に成功し、どちらの結晶もそれぞれ二種の配座異性体により構成されていることが明らかとなった。非溶媒和物中ではこの一組の配座異性体が水素結合によりホモキラル二量体を形成しているのに対し、溶媒和物中では配座異性体が交互に配列してホスト骨格を形成しており、そのチャンネル空間に溶媒分子が不規則に取り込まれていることを解明している。この構造はホスト骨格を維持したままの溶媒置換が可能となると期待され、水蒸

気雰囲気中での加熱等で水分子への置換が達成されれば、新しい手法によるサリドマイドのキラル医薬品の作製法の開発に繋がる可能性を秘めている。

第4章では、サリドマイドの対掌体とラセミ体における物理化学的性質の差の起因を調べるため、第2章で作製したサリドマイドのラセミ体の結晶構造を決定し、(S)-サリドマイドの結晶構造と詳細に比較している。X線構造解析の結果、三種の異なる条件で作製したラセミ体の結晶は全て α 型の非溶媒和物であった。とくに、クロロホルム溶液からの結晶化については、対掌体とラセミ体間で溶媒和物形成に差異が生じることが明らかとなった。ラセミ体の非溶媒和物中では、鏡像関係にある(R)-サリドマイドと(S)-サリドマイドが水素結合によりヘテロキラル二量体を形成している。このヘテロキラル二量体と、第3章にて解明された(S)-サリドマイド非溶媒和物中のホモキラル二量体との構造的な比較により、非対称なホモキラル二量体間の水素結合の方が対称なヘテロキラル二量体のそれより長いことが明らかとなった。ホモキラル二量体の分子間に働く斥力はヘテロキラル二量体のそれに比べ大きくなるとの仮説に基づいて、その分子間の結合エネルギーを密度汎関数法による量子化学計算を用いて評価したところ、ヘテロキラル二量体の方がホモキラル二量体よりも大きいということが明らかとなった。通常、水素結合はファンデルワールス力よりはるかに強いため、サリドマイドの結晶中において分子間に働く力は水素結合が支配的であると考えられる。対掌体とラセミ体間の融点などの物理化学的性質の差異は、それぞれの結晶中におけるホモキラル二量体とヘテロキラル二量体の水素結合の強さの差が起因となって現われてくることが本計算結果により示唆された。

第5章では、本研究の総括及び今後の展望を述べている。

以上、本論文では、結晶多型や溶媒和物形成の可能性及びキラル反転の影響を適切に考慮することで、サリドマイド対掌体の結晶を作製する有効な手法を確立した。これら結晶により、サリドマイドの結晶構造及び絶対配置の決定が世界で初めて達成された。また、対掌体とラセミ体との結晶構造の比較から、両者の物理化学的性質の差異の要因について理解を深めることに寄与した。さらに、同一の結晶化条件においても、対掌体とラセミ体の結晶では溶媒和物形成に差異が生じたことを見出し、キラル化合物について、対掌体とラセミ体間で結晶多型や溶媒和物形成が異なる可能性があるとの、結晶工学上の重要な知見をもたらした。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

2010年11月

審査員 (主査) 早稲田大学教授 博士(理学) 早稲田大学 朝日 透
早稲田大学教授 理学博士(東京大学) 仙波 憲太郎
早稲田大学准教授 博士(工学) 東京大学 武田 直也