

学位論文の内容の要旨

論文申請者氏名	今井 穰
論文審査担当者	主 査 細谷 孝充 副 査 岸田 晶夫 副 査 野村 渉
論 文 題 目	Development of 3-Acylaminopyrrolidines as Novel CCR2 Inhibitors with Properties of Drug-likeness

(論文内容の要旨)

<要旨>

種々の炎症性疾患の治療薬として期待される新規 CCR2 阻害剤の創製にあたり、医薬品らしさを備えた化合物の取得を目指し、先行研究で実施した *in vitro* 有効性評価に加え、代謝安定性評価と代謝酵素 CYP 2D6 に対する阻害活性評価を実施した。

その結果、*in vitro* 有効性が高く、代謝安定性が高く、CYP 2D6 阻害活性が低い化合物 **111** の取得に成功した。さらに化合物 **111** は膜透過性が高く、経口投与薬物として優れた特性を有すると考えられ、また *in vitro* 変異原性評価も陰性であったことから、非臨床試験を経て、将来的には高い抗炎症作用を有する医薬品としての応用が期待されるところと考えた。

(化合物 111 図)

<緒言>

ケモカインは白血球細胞の遊走因子として知られるタンパク質ファミリーで、GPCR (G タンパク共役受容体) に属するケモカイン受容体に結合することにより、炎症性疾患における細胞集積、活性化、及び炎症性因子の産生促進に関与している。系統的な名称としては CCL2 と呼称される MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) は、ケモカインの種類のうちシステイン (C) 残基が隣接する CC ケモカインに属し、マクロファージ、平滑筋細胞、繊維芽細胞、血管内皮細胞などから産生され、ケモカイン受容体である CCR2 (chemokine (C-C motif) receptor-2) を発現する単核球、ナチュラルキラー細胞などの細胞遊走や細胞接着を促したり、好塩基球からのヒスタミン遊離を惹起したりすることが知られている。MCP-1 や CCR2 の過剰発現動物やノックアウト動物などの研究により、MCP-1 は関節リウマチ、粥状動脈硬化、糸球体腎症、及び多発性硬化症などの炎症性疾患の維持、進展に関与していると考えられている。

以上の知見から、CCR2 阻害剤は上記炎症性疾患に対する高い治療効果を示すと考え、筆者らを含む様々な研究グループによりその取得を目指して研究が行われた。既報のとおり、筆者らは(*R*)-3-アシルアミノピロリジン構造を中心母核とする一連の化合物群を探索し、下図に示す化合物 **58**、**61**、及び **71** を高活性な CCR2 阻害剤として同定した。

(化合物 58,61,71 図)

これらの高活性化合物を医薬品候補として開発を進めて行くにあたり、病態動物を用いた非臨床薬理試験での活性発現に加え、その化合物自身が良好な「医薬品らしさ (drug-likeness)」、すなわち「良好な薬剤特性」を備えていることも重要な要素である。多くの医薬品は経口投与され、有効成分が胃又は腸から血液循環へ吸収され、患部へ到達して薬効を発現する。そのため、吸収性に優れ、血液循環中で代謝に対し一定の安定性を示し、高い選択性及び特異性をもって標的分子 (受容体、酵素、トランスポーターなど) に結合し作用を発揮する事が求められる。筆者は、既報の研究によって得られた化合物の構造活性相関に基づき高活性化を推進した。さらに drug-likeness の観点から、Lipinski's Rule of Five を参考に設定した分子量 500 以下、水素結合供与基 5 以下、等の制限に加え、代謝安定性、及び CYP 酵素阻害活性の低減を指標として (*R*)-3-アシルアミノピロリジン誘導体をさらに絞り込み、開発候補化合物を取得した。これらの検討結果を以下に詳述する。

<LHS がベンジル誘導体の drug-likeness 評価>

ここまでで得られた化合物 **58**、**61**、及び **71** 等の高活性化合物は、分子の左側構造 (left-hand substructure、LHS) が 1~2 カ所置換されたベンジル基の誘導体である。これら LHS ベンジル誘導体の代謝酵素 CYP に対する安定性を検討することを目的として、マウスとヒトの肝マイクロソームを用いた評価系を確立した。なお、代謝安定性を判断する閾値は 0.1 nmol/mL/mg protein とし、これを下回る化合物を代謝安定性が高いと判断した。新たに合成した化合物群のうち、高い CCR2 拮抗活性 (ヒト CCR2 結合阻害及び細胞遊走阻害) を示した化合物 **65**~**68**、及び化合物 **73** を、マウス及びヒトの肝マイクロソームを用いた代謝速度を評価した結果とともに表 1 に示した。

(表 1)

構造展開の元となった **58** と比較して、CCR2 結合阻害活性は向上し、**71** と遜色のない化合物を得ることができた。一方、細胞遊走阻害活性の観点では **58** を上回る化合物が得られなかった。また、ベンジル基に疎水性基と極性基を共存させることにより、代謝安定性が向上することを示唆する結果を得た。なお、化合物 **68** は結合阻害活性、細胞遊走阻害活性とも 10 nM 台の活性であり、他の化合物と比較すると有効性が低いと考えられたことから、これ以降の探索から除外した。

さらに、病態動物評価の候補化合物を選別するために、薬物相互作用のリスクを排除する目的で代謝酵素 CYP の阻害活性を検討した。

(表 2)

CYP 2D6 阻害活性評価において、化合物 **58** が非常に高い阻害活性を示し、**66**、**73** も **58** よりはやや弱いながら CYP 2D6 阻害活性を示すことがわかった。なお、これらの CYP 2C9、2C19、3A4 の阻害活性はいずれも弱かった (10 μ M で 50%未満の阻害活性)。

一方、高活性を保ちながら、既存の構造と比べて新規性を高める目的で、右側部分構造 (right-hand substructure、RHS) のアントラニル酸の置換基としてトリフルオロメトキシ (OCF₃) 基を採用した。化合物 **58** に対応する誘導体 **57** の CCR2 結合阻害活性は **58** より若干減弱したものの (IC₅₀ = 0.088 μ M)、ヒト肝マイクロソームを用いた代謝速度が約半分まで低下し (**58** は 0.045 nmol/mL/mg protein に対して **57** は 0.027 nmol/mL/mgprotein)、代謝安定性の向上に寄与する可能性が示唆されるデータを得た。今後は、RHS として 5-トリフルオロメトキシアントラニル酸を中心に展開することとした。

(化合物 **57** 図)

<5-トリフルオロメトキシアントラニル酸を RHS に導入した LHS ベンジル誘導体>

これまでに 5-トリフルオロメチルアントラニル酸で構造展開を実施し、CCR2 結合阻害評価で高活性であった LHS 構造に対し、RHS を 5-トリフルオロメトキシアントラニル酸に変換した誘導体 74~81 を合成し、その CCR2 結合阻害活性、代謝速度、及び CYP2D6 阻害活性を評価した。結果を表 3 に示した。

(表 3)

興味深いことに、アントラニル酸の 5 位置換基をトリフルオロメチルからトリフルオロメトキシに変換することにより、CCR2 阻害活性はおおむね減弱したが、CCR2 発現細胞の遊走阻害評価では活性が増強した。また、5-トリフルオロメチル誘導体では IC₅₀ 値で結合阻害活性が遊走阻害活性を上回っていたが、5-トリフルオロメトキシ誘導体では結合阻害活性より 2~6 倍、遊走阻害活性の方が上回った。当研究で扱う化合物群の CCR2 への結合様式は不明であるが、5 位の置換基の変化により RHS の 2-アミノ基と CCR2 結合部位との相互作用が変化したことにより、細胞遊走を惹起するシグナル伝達の阻害が増強されたのではないかと考えられた。

なお、代謝安定性の点ではアントラニル酸の 5 位置換基を変更した影響は認められず、おおむね高い代謝安定性を示した。

既報の研究で最もヒト CCR2 結合阻害活性が高かった化合物 71 の 5-トリフルオロメトキシ誘導体 80 は、著しく活性が減弱した。また化合物 74 のベンジル基上の 3-NH₂ を 2 位へ移動させた化合物 81 も結合阻害活性、遊走阻害活性ともに著しく減弱したため、アミノ基の至適位置は 3 位であると推察された。

以上の評価結果から、RHS が 5-トリフルオロメトキシアントラニル酸誘導体の中で LHS がベンジル構造を有する化合物では、臨床候補化合物となる化合物を見いだすことはできなかった。

<インドール骨格を LHS 構造に持つ化合物への展開と drug-likeness 評価>

化合物 1 をはじめとする LHS-ベンジル誘導体の多くが CYP 2D6 を強く阻害し、薬物相互作用が懸念されることがわかった。RHS 構造での構造変換による活性を維持しながら CYP 2D6 阻害活性を減弱させることは困難であったことから、これまでに基本活性であるヒト CCR2 結合阻害活性の面で化合物 1 などに及ばず更なる構造展開のターゲットから外してきた部分構造を中心に、LHS 構造にベンジル基を持たない化合物からリード候補化合物を探索した。その選定基準は、まず結合阻害活性は IC₅₀ 値で 0.01 μM 程度まで範囲を広げた。そのうち、CYP 2D6 阻害活性が減弱する LHS 構造として、6-メトキシカルボニルインドール-3-メチル構造を有する化合物 17 が、ヒト CCR2 結合阻害活性で IC₅₀ = 0.016 μM、CYP 2D6 阻害活性は IC₅₀ > 10 μM とこれまでの化合物に比べ CYP 2D6 阻害活性が弱かった。

(化合物 104 図)

そこで LHS 構造としてインドール骨格を有する化合物 105~113 を合成した。なお RHS は前述の通り、構造新規性の確保と細胞遊走阻害活性の増強効果を期待して、5-トリフルオロメトキシアントラニル酸に固定した。

学位論文の審査の要旨

論文提出者氏名	今井 穰 （甲 第 4836 号）
論文審査担当者	主査：細谷 孝充 副査：岸田 晶夫 副査：野村 渉
論 文 題 目	Development of 3-Acylaminopyrrolidines as Novel CCR2 Inhibitors with Properties of Drug-likeness
（論文審査の要旨） 本論文は、様々な炎症性疾患に関わっていることが示唆されている MCP-1 タンパク質とケモカイン受容体 CCR2 の結合を創薬標的とした低分子 CCR2 阻害剤開発に関連し、申請者らの研究グループが以前に取得したリード候補化合物をもとに、とくに代謝安定性が向上し、CYP 酵素阻害活性の低い、医薬品らしい特性を示す臨床開発候補化合物の取得を目指した研究について述べられたものである。 申請者は、網羅的な合成アプローチにより数多くの類縁体を合成し、その結果、in viro 有効性が高く、代謝安定性が高く、さらに CYP 2D6 阻害活性が低い3つの化合物の取得に成功した。とくにその中の1つは、膜透過性が高いことから経口投与に適していると期待され、製剤化に有利な高融点化合物であり、さらに in vitro 変異原性評価も陰性である、有望な化合物であった。今後、本研究成果をもとに、非臨床試験を経ることで、多岐にわたる炎症性疾患に対する治療薬が開発されると期待される。 以上を踏まえ、本論文の内容は、博士（理学）の学位授与に値するものと判定した。	