

平成 25 年度

博士 学位 論文

内容の要旨
および
審査結果の要旨

(平成 26 年 3 月)

近畿大学大学院
農学 研究 科

農 学 研 究 科

平 成 25 年 度

(論 文 提 出 に よ る)

(平 成 26 年 3 月)

倉 田 道 雄

小 宮 正 文

城 智 也

菊 田 幸 雄

学位論文審査結果の報告書

氏 名 城 智也

生 年 月 日 (昭和)・平成 53年 5月 15日

本 籍 (国籍) 滋賀県

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 **192** 号

学位授与の条件 学位規程第5条2項該当
(博士の学位)

論 文 題 目 mPGES-1阻害作用を有する抗炎症薬を指向した
イミダゾキノリン誘導体の合成と構造活性相関研究

審 査 委 員

(主 査) 飯田 彰 教授



(副主査) 松田 一彦 教授



(副主査) 米谷 俊 教授



(副 査)



(副 査)



論文内容の要旨

抗炎症薬（消炎鎮痛薬）として古くから使用されているNSAIDsは、COX-1とCOX-2を非選択的に阻害することでPGE2の産生を抑制し抗炎症作用を発揮するが、まれに潰瘍などの重篤な消化管障害を惹起することが知られている。この副作用を回避するために、消化管での粘膜保護作用を担うCOX-1を阻害せずPGE2産生の中心的な役割を担うCOX-2を選択的に阻害する薬剤の開発が行われてきた。上市されたCOX-2選択的阻害剤にはNSAIDsで見られた副作用は観察されず、次世代のNSAIDsとして期待された。しかし、COX-2選択的阻害剤は、COX-1阻害作用を示さないために血小板において血小板凝集作用を持つTXA2の生合成を阻害しない一方で、強力なCOX-2阻害作用を示すために血管内皮において血小板凝集抑制作用を持つPGI2の生合成を阻害する結果、TXA2とPGI2の不均衡が生じ、血栓などの重篤な心血管系イベントの発生リスクを高めることが判明した。これによって、COX-2選択的阻害剤は市場からの撤退や厳しい規制下での使用を余儀なくされ、抗炎症薬市場に大きなアンメットメディカルニーズが生じ、再び副作用の少ない抗炎症薬が市場から切望されるようになった。

このような背景のもと、著者は安全性の高い次世代型のNSAIDsを創製するために、COXよりも下流においてPGH2からPGE2の産生を担うPGE合成酵素（PGES）に着目した。PGESには、mPGES-1、mPGES-2、cPGESの3つのアイソフォームが存在する。これらの中で、mPGES-1は炎症性刺激により発現する誘導型酵素であり、マウスを用いたmPGES-1のノックアウト研究によって抗炎症作用効果のみならずNSAIDsやCOX-2選択的阻害剤にみられる副作用が起こらないことが報告された。一方で、mPGES-1は魅力的な創薬ターゲットであるにもかかわらず、mPGES-1阻害剤の報告例はわずかかなかった。そこで著者は、COX-1,2に阻害作用を示さない選択的なmPGES-1阻害剤の開発に着手することとした。

本研究では、経口吸収性を示す選択的mPGES-1阻害剤の創製を目的として、まず既知のmPGES-1阻害剤の構造情報から新規なリード化合物の探索合成を行った。得られたリード化合物のmPGES-1阻害活性と薬物動態プロファイルを改善することを目的に、構造活性相関研究を展開した。これら誘導体合成の中で、構造活性相関研究を効率的に展開できるような新規合成反応の開発を行った。合成した誘導体の中から選抜された代表化合物のラットPK試験を行い、経口投与後の血中濃度値とPGE2産生阻害活性値からin vivoモデルへの有効投与量を検証した。

第1章 mPGES-1阻害作用を有するイミダゾキノリン誘導体の合成と構造活性相関研究

新規なリード化合物を創出するために既知のmPGES-1阻害剤の構造情報からファーマコフォアを予測し、新規なナフトイミダゾール誘導体7をデザインし合成したところ、化合物7は濃度10 μ Mで85%のmPGES-1阻害活性を示した。さらに、自社ライブラリーを用いたHTS試験により、化合物7と類似の骨格と置換基を有するイミダゾキノリン誘導体8がヒット化合物として得られた(60%阻害活性@10 μ M)。ナフトイミダゾール骨格よりイミダゾキノリン骨格のほうが母骨格へ効率的に置換基を導入できることから、化合物8をリード化合物として採用した。リード化合物8を基にした構造活性相関を明らかにするために、まず化合物8 (IC₅₀ = 9500 nM)の2位の置換基効果を検証した。2位フェニル基をアルキル基やシクロアルキル基などの様々な置換基に変換した結果、フェニル基が最も好ましい置換基であることが明らかとなったため、次に2位フェニル基上の置換基効果を検証した。その結果、オルト位に置換基を導入することで阻害活性が向上し、クロロ基(21)が最も高い阻害活性(IC₅₀ = 251 nM)を示したことから、次に化合物21の4位の置換基効果を検証した。4位に酸素、窒素、硫黄原子を介した置換基導入や、4位へのカルボニル基、チオカルボニル基、アミノ基の導入を行った結果、カルボニル基を有するイミダゾキノリン-4-オン誘導体52が最も高い阻害活性値(IC₅₀ = 9.1 nM)を示し、リード化合物8からmPGES-1阻害活性を約1000倍向上させることに成功した。化合物52はCOX-1,2いずれに対しても阻害活性を示さず、CYP2C9に対する阻害作用を示すものの優れた膜透過性と代謝安定性を示した。

第2章 N-アルキルイミダゾキノリン-4-オン誘導体の効率的合成法の開発とその構造活性相関研究

第1章で見出した化合物52の2つの水素原子供与性基の阻害活性に対する重要性を検証するために、それぞれの窒素原子をアルキル化した誘導体を合成し、それらの阻害活性を評価することとした。しかし、N(1), N(3), もしくはN(5)-アルキルイミダゾキノリン-4-オン誘導体の既知の合成方法を参考にした合成ルートは、多段階の合成工程を要することから非常に効率性の悪い合成方法であった。そこで、モノアルキルイミダゾキノリン-4-オン誘導体の簡便かつ効率的な合成を可能にする新規な合成ルートの開発を行うこととした。まず、化合物52に対してNaHを用いた直接的メチル化反応を検討したところ、新たな生成物としてモノメチル体とジメチル体の2つのみしか与えない興味深い結果が得られた。これらの構造解析の結果、モノメチル体はイミダゾール環がメチル化された化合物であり、ジメチル体はイミダゾール環と5位窒素原子がメチル化された化合物であることが推察された。しかし、イミダゾール環へのメチル化が1位か3位のどちらに選択的に進行しているか同定できなかったため、別ルートから1位メチル体と3位メチル体を合成することとした。4-クロロ体37に同様の条件でメチル化を行ったところ、構造決定可能な1位メチル体と3位メチル体が生成し、本反応は3位メチル体を主生成物として与えることが明らかとなった。この3-メチル体の4位クロロ基を加水分解したところ、化合物52の直接的メチル化反応で得られたモノメチル体の機器分析データと一致したことから、化合物52への直接的メチル化反応は3位選択的に進行することが明らかとなった。NaHを用いた化合物52へのメチル化反応はジメチル体が主生成物として得られることから、3位選択的メチル化反応を開発するために種々の塩基や反応条件を検討した結果、*i*-Pr₂EtNを用いて加熱条件下でメチル化を行うことで、3位選択的にメチル化反応が進行することを見出した。さらにこの反応は他のアルキルハライドにも適応可能であり、種々の3位アルキル体を簡便に合成できることが明らかとなった。5位アルキル体の合成は、3位選択的にBoc基やSEM基を導入した後に選択的に5位をアルキル化する方法を見出した。さらに、5位アルキル化反応とBoc基の脱保護反応をワンポットで収率よく進行させる条件を見出した。合成したN-アルキル誘導体のmPGES-1阻害活性を評価したところ、5位アルキル体の阻害活性は10倍以上減弱し、1位および3位アルキル体の阻害活性はさらに大幅に減弱した。これらの結果から、化合物52の2つの水素原子供与性基は阻害活性に必須であることが明らかとなった。

第3章 経口吸収性を示すイミダゾキノリン-4-オン誘導体の合成と構造活性相関研究

第1章で見出した有望な化合物52を*in vivo*試験に進めるために、課題であったCYP2C9に対する強い阻害作用の改善と更なる阻害活性と代謝安定性の向上を目的として、化合物52の置換基変換を行った。化合物52の7位ブロモ基を変換することでCYP2C9の阻害作用は消失したがmPGES-1阻害活性が大幅に減弱したことから、7位ブロモ基に代替可能な置換基を探索した。mPGES-1阻害活性に対するブロモ基の脂溶性の重要性を検証するためにメチル基からヘキシル基までの種々のアルキル鎖を評価したところ、*n*-ブチル基(80)が最も高い阻害活性(IC₅₀ = 17 nM)を示したことから、7位置換基には高い脂溶性だけでなく適切な嵩高さが重要であることが明らかとなった。7位*n*-ブチル体80はヒトミクロソームにおける代謝安定性が十分ではなかったため、代謝に安定な他の脂溶性置換基を検討したところ、フェニル基(86)はブロモ基よりも強い阻害活性(IC₅₀ = 7.9 nM)を示し大幅な代謝安定性の改善が見られた。次に、既知のmPGES-1阻害剤であるMF-63の構造活性相関データ情報を参考に、化合物86の2位クロロフェニル基上の6位に種々の置換基を導入し、mPGES-1阻害活性に対する効果を検証した結果、6位にフルオロ基を導入することで阻害活性が約2倍向上することが明らかとなった(112: IC₅₀ = 4.1 nM)。最後に、化合物112の7位フェニル基上の置換基効果を検証したところ、メタ位とパラ位にクロロ基を導入

入することでさらに阻害活性が向上することが明らかとなり、いずれもMF-63よりも高いmPGES-1阻害活性を示した。メタ位にクロロ基を持つ化合物96は最も強力なmPGES-1阻害活性 (IC₅₀ = 2.5 nM)を示したが、化合物112に比べ固体溶解度が低下した。次に、置換基タイプの異なる7位ブチル体80と7位フェニル体112の細胞系でのPGE₂産生阻害活性とmPGES-1に対する選択性を評価した。その結果、両化合物ともに高いPGE₂の産生阻害活性を示した。選択性については、COX-1,2だけでなくプロスタグランジン合成経路に属する複数の酵素に対して阻害活性を示さなかったことから、両化合物ともに高い選択性を有することが示された。両化合物のうち、より優れた代謝安定性と高い阻害活性を示す化合物112を候補化合物に選定しin vivo試験へと進めた。化合物112のラットへの静脈投与試験により、化合物112は血中での高い安定性と蓄積性の懸念が極めて少ないことが示された。経口投与試験においては、良好な体内動態挙動と良好なバイオアベイラビリティ (BA: 19.2%)を示した。次に、化合物112のPKデータと細胞系での阻害活性データからPK/PDを考察した結果、化合物112は経口投与後6時間後でもPGE₂産生阻害活性濃度 (IC₅₀ = 12.8 ng/mL)を十分に越える血中濃度を維持することが明らかとなり、動物モデルでの薬効評価試験が実施可能であることが示唆された。

結論

本研究では、既知のmPGES-1阻害剤の構造情報を基にした骨格デザインや自社ライブラリーを用いたHTS試験により、新規なリード化合物(7, 8)を見出した。リード化合物のmPGES-1阻害活性や薬物動態プロファイルの改善を目的として構造活性相関研究を行った結果、リード化合物8よりも約4000倍も高いmPGES-1阻害活性と良好な薬物動態プロファイルを有するイミダゾキノリン-4-オン誘導体を見出すことに成功した。これら誘導体合成において、イミダゾキノリン-4-オン誘導体のN-アルキル体を効率的に合成可能な新規合成反応を開発した。mPGES-1に対する高い選択性と細胞系において高いPGE₂産生阻害活性を示す代表化合物(112)は、ラットPK試験において良好な経口吸収性を示し、経口投与後6時間後でもPGE₂産生阻害活性を十分に示す血中濃度を維持することが明らかとなった。本研究によって、これまでに報告例の少ない動物モデルでの薬効評価試験が実施可能なmPGES-1阻害剤を提供することが可能となり、見出された化合物(112)に代表されるイミダゾキノリン-4-オン誘導体はmPGES-1に関連する貴重な研究材料となることが考えられる。それゆえ、本研究は、将来的にはNSAIDsやCOX-2選択的阻害剤の副作用を回避した新規な抗炎症剤の開発に発展することが期待される。また、本研究で開発された新規合成反応は、医薬のみならず、ヘテロ環含有生理活性天然物の合成研究や農薬の開発研究など多くの科学分野に広く応用可能な価値ある基礎技術であると考えられる。さらに、mPGES-1阻害活性試験法は、独自に構築された汎用性に優れた評価系であり、天然物化学における探索研究に活用すれば、今までは発見できなかった、COX-IIに対して選択的阻害を示す生物活性天然物の発見をも可能にする非常に有益な手法あるといえる。

論文審査結果の要旨

抗炎症薬（消炎鎮痛薬）として古くから使用されているNSAIDsは、COX-1とCOX-2を非選択的に阻害することでPGE2の産生を抑制し抗炎症作用を発揮するが、まれに潰瘍などの重篤な消化管障害を惹起することが知られている。この副作用を回避するために、消化管での粘膜保護作用を担うCOX-1を阻害せずPGE2産生の中心的な役割を担うCOX-2を選択的に阻害する薬剤の開発が行われてきた。上市されたCOX-2選択的阻害剤にはNSAIDsで見られた副作用は観察されず、次世代のNSAIDsとして期待された。しかし、COX-2選択的阻害剤は、COX-1阻害作用を示さないために血小板において血小板凝集作用を持つTXA2の生合成を阻害しない一方で、強力なCOX-2阻害作用を示すために血管内皮において血小板凝集抑制作用を持つPGI2の生合成を阻害する結果、TXA2とPGI2の不均衡が生じ、血栓などの重篤な心血管系イベントの発生リスクを高めることが判明した。これによって、COX-2選択的阻害剤は市場からの撤退や厳しい規制下での使用を余儀なくされ、抗炎症薬市場に大きなアンメットメディカルニーズが生じ、再び副作用の少ない抗炎症薬が市場から切望されるようになった。このような背景のもと、申請者は安全性の高い次世代型のNSAIDsを創製するために、COXよりも下流においてPGH2からPGE2の産生を担うPGE合成酵素（PGES）に着目した。PGESには、mPGES-1、mPGES-2、cPGESの3つのアイソフォームが存在する。これらの中で、mPGES-1は炎症性刺激により発現する誘導型酵素であり、マウスを用いたmPGES-1のノックアウト研究によって抗炎症作用効果のみならずNSAIDsやCOX-2選択的阻害剤にみられる副作用が起こらないことが報告された。一方で、mPGES-1は魅力的な創薬ターゲットであるにもかかわらず、mPGES-1阻害剤の報告例はわずかしかなかった。そこで申請者は、COX-1, 2に阻害作用を示さない選択的なmPGES-1阻害剤の開発に着手した。

申請者はまず、新規なリード化合物を創出するために既知のmPGES-1阻害剤の構造情報からファーマコフォアを予測し、新規なナフトイミダゾール誘導体7をデザインし合成した。その結果、化合物7が濃度10 μ Mで85%のmPGES-1阻害活性を示した。さらに、自社ライブラリーを用いたHTS試験により、化合物7と類似の骨格と置換基を有するイミダゾキノリン誘導体8がヒット化合物として得られた(60%阻害活性@10 μ M)。ナフトイミダゾール骨格よりイミダゾキノリン骨格のほうが母骨格へ効率的に置換基を導入できることから、化合物8をリード化合物として採用した。リード化合物8を基にした構造活性相関を明らかにするために、まず化合物8 (IC₅₀ = 9500 nM)の2位の置換基効果を検証した。2位フェニル基をアルキル基やシクロアルキル基などの様々な置換基に変換した結果、フェニル基が最も好ましい置換基であることが明らかとなったため、次に2位フェニル基上の置換基効果を検証した。その結果、オルト位に置換基を導入することで阻害活性が向上し、クロロ基(21)が最も高い阻害活性(IC₅₀ = 251 nM)を示したことから、次に化合物21の4位の置換基効果を検証した。4位に酸素、窒素、硫黄原子を介した置換基導入や、4位へのカルボニル基、チオカルボニル基、アミノ基の導入を行った結果、カルボニル基を有するイミダゾキノリン-4-オン誘導体52が最も高い阻害活性値(IC₅₀ = 9.1 nM)を示し、リード化合物8からmPGES-1阻害活性を約1000倍向上させることに成功した。化合物52はCOX-1, 2いずれに対しても阻害活性を示さず、CYP2C9に対する阻害作用を示すものの優れた膜透過性と代謝安定性を示した。

次に申請者は、第1章で見出した化合物52の2つの水素原子供与性基の阻害活性に対する重要性を検証するために、それぞれの窒素原子をアルキル化した誘導体を合成し、それらの阻害活性を評価することとした。しかし、N(1), N(3), もしくはN(5)-アルキルイミダゾキノリン-4-オン誘導体の既知の合成方法を参考にした合成ルートは、多段階の合成工程を要することから非常に効率性の悪い合成方法であった。そこで、モノアルキルイミダゾキノリン-4-オン誘導体の簡便かつ効率的な合成を可能にする新規な合成ルートの開発を行うこととした。まず、化合物52に対してNaHを用いた直接的メチル化反応を検討したところ、新たな生成物としてモノメチル体とジメチル体の2つのみしか与えない興味深い結果が得られた。これらの構造解析の結果、モノメチル体はイミダゾール環がメチル化された化合物であり、ジメチル体はイミダゾール環と5位窒素原子がメチル化された化合物であることが推察された。しかし、イミダゾール環へのメチル化が1位か3位のどちらに選択的に進行しているか同定できなかつたため、別ルートから1位メチル体と3位メチル体を合成することとした。4-クロロ体37に同様の条件でメチル化を行ったところ、構造決定可能な1位メチル体と3位メチル体が生成し、本反応は3位メチル体を主生成物として与えることが明らかとなった。この3-メチル体の4位クロロ基を加水分解したところ、化合物52の直接的メチル化反応で得られたモノメチル体の機器分析データと一致したことから、化合物52への直接的メチル化反応は3位選択的に進行することが明らかとなった。NaHを用いた化合物52へのメチル化反応はジメチル体が主生成物として得られることから、3位選択的メチル化反応を開発するために種々の塩基や反応条件を検討した結果、i-Pr₂EtNを用いて加熱条件下でメチル化を行うことで、3位選択的にメチル化反応が進行することを見出した。さらにこの反応は他のアルキルハライドにも適応可能であり、種々の3位アルキル体を簡便に合成できることが明らかとなった。5位アルキル体の合成は、3位選択的にBoc基やSEM基を導入した後に選択的に5位をアルキル化する方法を見出した。さらに、5位アルキル化反応とBoc基の脱保護反応をワンポットで収率よく進行させる条件を見出した。合成したN-アルキル誘導体のmPGES-1阻害活性を評価したところ、5位アルキル体の阻害活性は10倍以上減弱し、1位および3位アルキル体の阻害活性はさらに大幅に減弱した。これらの結果から、化合物52の2つの水素原子供与性基は阻害活性に必須であることが明らかとなった。

最後に申請者は、第1章で見出した有望な化合物52をin vivo試験に進めるために、課題であったCYP2C9に対する強い阻害作用の改善と更なる阻害活性と代謝安定性の向上を目的として、化合物52の置換基変換を行った。化合物52の7位プロモ基を変換することでCYP2C9の阻害作用は消失したがmPGES-1阻害活性が大幅に減弱したことから、7位プロモ基に代替可能な置換基を探索した。mPGES-1阻害活性に対するプロモ基の脂溶性の重要性を検証するためにメチル基からヘキシル基までの種々のアルキル鎖を評価したところ、n-ブチル基(80)が最も高い阻害活性(IC₅₀ = 17 nM)を示したことから、7位置換基には高い脂溶性だけでなく適切な嵩高さが重要であることが明らかとなった。7位n-ブチル体80はヒトミクロソームにおける代謝安定性が十分ではなかつたため、代謝に安定な他の脂溶性置換基を検討したところ、フェニル基(86)はプロモ基よりも強い阻害活性

(IC50 = 7.9 nM) を示し大幅な代謝安定性の改善が見られた。次に、既知のmPGES-1阻害剤であるMF-63の構造活性相関データ情報を参考に、化合物86の2位クロロフェニル基上の6位に種々の置換基を導入し、mPGES-1阻害活性に対する効果を検証した結果、6位にフルオロ基を導入することで阻害活性が約2倍向上することが明らかとなった (112 : IC50 = 4.1 nM) 。最後に、化合物112の7位フェニル基上の置換基効果を検証したところ、メタ位とパラ位にクロロ基を導入することでさらに阻害活性が向上することが明らかとなり、いずれもMF-63よりも高いmPGES-1阻害活性を示した。メタ位にクロロ基を持つ化合物96は最も強力なmPGES-1阻害活性 (IC50 = 2.5 nM) を示したが、化合物112に比べ固体溶解度が低下した。次に、置換基タイプの異なる7位ブチル体80と7位フェニル体112の細胞系でのPGE2産生阻害活性とmPGES-1に対する選択性を評価した。その結果、両化合物ともに高いPGE2の産生阻害活性を示した。選択性については、COX-1,2だけでなくプロスタグランジン合成経路に属する複数の酵素に対して阻害活性を示さなかったことから、両化合物ともに高い選択性を有することが示された。両化合物のうち、より優れた代謝安定性と高い阻害活性を示す化合物112を候補化合物に選定しin vivo試験へと進めた。化合物112のラットへの静脈投与試験により、化合物112は血中での高い安定性と蓄積性の懸念が極めて少ないことが示された。経口投与試験においては、良好な体内動態挙動と良好なバイオアベイラビリティ (BA: 19.2%) を示した。次に、化合物112のPKデータと細胞系での阻害活性データからPK/PDを考察した結果、化合物112は経口投与後6時間後でもPGE2産生阻害活性濃度 (IC50 = 12.8 ng/mL) を十分に越える血中濃度を維持することが明らかとなり、動物モデルでの薬効評価試験が実施可能であることが示唆された。

本研究の結論を、申請者は次のように要約した。本研究では、既知のmPGES-1阻害剤の構造情報を基にした骨格デザインや自社ライブラリーを用いたHTS試験により、新規なリード化合物(7, 8)を見出した。リード化合物のmPGES-1阻害活性や薬物動態プロファイルの改善を目的として構造活性相関研究を行った結果、リード化合物8よりも約4000倍も高いmPGES-1阻害活性と良好な薬物動態プロファイルを有するイミダゾキノリン-4-オン誘導体を見出すことに成功した。これら誘導体合成において、イミダゾキノリン-4-オン誘導体のN-アルキル体を効率的に合成可能な新規合成反応を開発した。mPGES-1に対する高い選択性と細胞系において高いPGE2産生阻害活性を示す代表化合物(112)は、ラットPK試験において良好な経口吸収性を示し、経口投与後6時間後でもPGE2産生阻害活性を十分に示す血中濃度を維持することが明らかとなった。

そして申請者は、本研究により、これまでに報告例の少ない動物モデルでの薬効評価試験が実施可能なmPGES-1阻害剤を提供することが可能となり、見出された化合物(112)に代表されるイミダゾキノリン-4-オン誘導体はmPGES-1に関連する貴重な研究材料となること、それゆえ、本研究成果はNSAIDsやCOX-2選択的阻害剤の副作用を回避した新規な抗炎症剤の開発に発展することが期待されるべきものであると結論付けた。また、申請者は、本研究で開発された新規合成反応が医薬のみならず、ヘテロ環含有生理活性天然物の合成研究や農薬の開発研究など多くの科学分野に広く応用可能な価値ある基礎技術であると考えている。さらに、mPGES-1阻害活性試験法は独自に構築された汎用性に優れた評価系であり、天然物化学における探索研究に活用すれば、今までは発見できなかった、COX-IIに対して選択的阻害を示す生物天然物の発見をも可能にする非常に有益な手法であるといえる。

よって、本論文は、博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会などの所定の手続きを経たうえ、平成26年2月7日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。