

氏名(本籍地)	加藤祐子(茨城県)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第6810号		
学位授与年月日	平成26年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	数理物質科学研究科		
学位論文題目	STUDIES ON STRUCTURE-ACTIVITY RELATIONSHIPS AND PREPARATION OF PHYSIOLOGICALLY ACTIVE SPIROCYCLIC DIAMINE-BASED UREAS (生理活性を有するジアザスピロウレア誘導体の構造活性相関と合成)		
主査	筑波大学教授	理学博士	木越英夫
副査	筑波大学教授	理学博士	関口章
副査	筑波大学教授	Ph.D.	山本泰彦
副査	筑波大学教授	工学博士	鍋島達弥

論 文 の 要 旨

エポキシエイコサトリエン酸(epoxyeicosatrienoic acids; 以下、EETs)は、アラキドン酸がチトクロームP450(CYP)エポキシゲナーゼによる代謝を受けることにより産生する。EETsは、血管内皮保護作用、血圧上昇抑制作用、抗炎症作用など、種々の生理活性を併せ持つが、生体内では可溶性エポキシド加水分解酵素(soluble epoxide hydrolase; 以下、sEH)によって、生理活性のないジヒドロキシエイコサトリエン酸へと変換される。sEHは、肝臓や腎臓などに発現しているが、アンジオテンシンII誘発性高血圧動物モデルや自然発症型高血圧ラット(spontaneously hypertensive rat; 以下、SHR)の腎臓における発現が亢進し、sEHノックアウトマウスでは平均血圧が正常動物に比べて低いため、sEHの酵素活性と高血圧との関連が示唆されている。よって、sEH阻害活性を有する化合物は、正常な血圧には影響を及ぼさず、病的な高血圧のみに血圧降下作用を示す治療薬、すなわち、過剰な血圧低下の副作用を示さない安全性の高い高血圧治療薬になると考えられる。一方、慢性腎臓病患者の近位尿細管細胞においてsEHが発現亢進しており、sEH阻害活性を有する化合物が腎疾患モデルマウスに治療効果を示すことが報告されている。sEHによるEETsの分解は、EETsのエポキシドがsEH酵素活性中心のTyr381、Tyr465およびAsp333と水素結合することにより活性化されることで起こる。そのため、これらのアミノ酸残基と水素結合しうる化合物は、sEHによるEETsの分解を抑制すると考えられる。このような水素結合を介してsEHと結合し阻害する置換基としてはアミド基やウレア基があり、sEH阻害剤としてアミドやウレアを有する化合物が報告されている。以上の背景に基づき、経口投与可能で過剰な血圧低下の副作用リスクが小さい高血圧治療薬、または慢性腎臓病治療薬の創出を目的としてsEH阻害薬の探索を開始した。

ジアザスピロ骨格は構造の剛直さから創薬研究において注目されており、その構造活性相関や合成法の研究が行われている。このジアザスピロ骨格がsEHの酵素活性中心の近くに存在する空間に適合でき

れば、その剛直さによって、この骨格を有するウレア誘導体は高い sEH 阻害活性を示すと推察し、ジアザスピロウレア誘導体の探索合成研究を開始した。化合物探索の方法としては、ジアザスピロ骨格、ウレアの置換基およびアミドの置換基に分けて構造変換を行う方法を取ることにした。はじめにジアザスピロ骨格の検討を行った結果、2,8-ジアザスピロ[4.5]デカンを有する化合物において最も高いヒト sEH 阻害活性を示した。次に 2,8-ジアザスピロ[4.5]デカンを中心骨格としてウレアの置換基の検討を行った。フェニルウレアである誘導体においてフェニル基のパラ位の置換基がヒト sEH 阻害活性に大きく影響することがわかった。このパラ位の置換基をさらに検討した結果、*p*-CF₃ フェニルウレアとすることで高いヒト sEH 阻害活性を示すことを見出した。しかしながら、マウス sEH 阻害活性が低く、病態モデルマウスへの薬理評価試験を行う上で課題となった。マウス sEH の X 線結晶座標を用いた化合物のドッキングスタディーから、この化合物の CF₃ 基とマウス sEH の酵素活性中心の立体反発により、高い活性発現に必要な相互作用が形成されないことが低活性の原因と推測された。そこで、この立体反発を回避することを指向し、酸素リンカーを導入、すなわち CF₃ 基を OCF₃ 基に変換した化合物を設計した。その結果、マウス sEH 阻害活性が向上した化合物を見出した。さらにアミドの置換基の検討を行った結果、アルキル基、ヘテロ環など多様な置換基で高い sEH 阻害活性を示し、溶解性の向上も可能であった。見出した誘導体の経口投与は、SHR モデルに対して血圧上昇抑制作用を示す一方、正常血圧ラットに対しては血圧低下作用を示さなかった。これらの結果から、見出した誘導体は過剰な血圧低下の副作用の少ない高血圧治療薬になると考えられた。

上で見出した誘導体は慢性腎不全モデルラットに対して薬効を示さなかったため、異なるジアザスピロ骨格を有する誘導体の探索を行った。Chapter 2 の 2,8-ジアザスピロ[4.5]デカン骨格を有する誘導体において特に高い阻害活性を有したことから、ウレアとアミドが Chapter 2 の誘導体と同様の位置に配置されるような分子設計を行った。設計した 1-オキサ-4,9-ジアザスピロ[5.5]ウンデカン骨格を有する化合物は、ドッキングスタディーの結果から Chapter 2 の誘導体と同様に sEH と高い結合能を有することが示唆された。実際に 1-オキサ-4,9-ジアザスピロ[5.5]ウンデカン骨格を有する化合物を合成したところ、高い sEH 阻害活性を示した。さらに、この新規化合物は、水溶性が Chapter 2 の誘導体と比較して良好であった。1-オキサ-4,9-ジアザスピロ[5.5]ウンデカン骨格の酸素原子を炭素原子に変えた骨格を有する化合物においても高い阻害活性を示したものの、水溶性や代謝安定性が低かった。1-オキサ-4,9-ジアザスピロ[5.5]ウンデカンを中心骨格としてアミドの置換基の検討を行い、その結果得られた *p*-OCF₃ フェニルウレア基および 2-フルオロベンゾイル基を有する化合物は、ラット sEH 阻害活性、代謝安定性、水溶性が良好であり、良好な薬物動態プロファイルを示した。この化合物の経口投与は、腎不全モデルラットに対して血清クレアチニン上昇抑制作用を示した。この結果からこの化合物は、慢性腎疾患治療薬になると考えられた。

上で見出した 1-オキサ-4,9-ジアザスピロ[5.5]ウンデカン骨格を有する化合物群に腎不全モデルラットに対する血清クレアチニン上昇抑制作用が観測されたため、これら化合物群でさらに薬効試験を行うこととした。この薬効試験を行うためにこれら化合物群の合成を行う必要があり、収率が高く、副生成物が少ない合成法を確立する必要があった。1-オキサ-4,9-ジアザスピロ[5.5]ウンデカン化合物群の前駆体の合成における分子内環化反応において副生成物 2 種が生成した。そこで、この副生成物の低減化を目的として反応条件の検討を行った。検討の結果、反応温度-78°Cで行うことで副生成物の低減化が可能であった。この条件で反応を行った結果、72%の収率で目的物を合成することができた。

sEH 阻害薬の探索を行い、高い阻害活性を有するジアザスピロウレア誘導体を見出した。マウス sEH の X 線結晶構造解析に基づく化合物のドッキングスタディーから設計を行い、マウス sEH 阻害活性の向上した 2,8-ジアザスピロ[4.5]デカン骨格を有する化合物を見出した。この化合物は SHR モデルに対して 血圧上昇抑制作用を示す一方、正常血圧のラットに対しては血圧低下作用を示さず、過剰な血圧低下の副作用の少ない高血圧治療薬になると考えられた。一方で、この 2,8-ジアザスピロ[4.5]デカン骨格を有する化合物は腎不全モデルラットに対して治療効果が確認できなかった。そこで、1-オキサ-4,9-ジアザスピロ[5.5]ウンデカン骨格を有する化合物を設計した。この化合物は、高い sEH 阻害活性を有し、かつ、腎不全モデルラットに対して血清クレアチニン上昇抑制作用を示し、慢性腎臓病治療薬になると考えられた。

審 査 の 要 旨

〔批評〕

著者は、血圧降下に対する重要な標的分子である可溶性エポキシド加水分解酵素の活性部位の立体構造考察と種々の誘導体の合成と活性評価により、その活性を阻害する新分子を開発した。開発した分子は、高血圧モデルマウスに対して選択的に血圧降下作用を示すため、降圧剤開発のための重要な分子である。また、さらに開発を進め、腎障害を抑制する類縁体も開発した。これらの成果は、国際学術雑誌に掲載されており、創薬化学分野で高く評価される。

〔最終試験結果〕

平成 26 年 2 月 17 日、数理物質科学研究科学学位論文審査委員会において審査委員の全員出席のもと、著者に論文について説明を求め、関連事項につき質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって、合格と判定された。

〔結論〕

上記の論文審査ならびに最終試験の結果に基づき、著者は博士(理学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。