

学位論文内容要旨

氏名： 梶田 雄一 印

題目：3-(1-ピペリジニル)ピリジン構造を有する新規コレステロール 24 ヒドロキシラーゼ (CH24H) 阻害剤の創製

要旨：脳は、全身のわずか2%の重量を占めるに過ぎないが、体内で最も豊富にコレステロールを含む臓器であり、体内コレステロール総量の約4分の1が脳内に存在する。コレステロールの輸送は血液脳関門によって隔てられており、脳は末梢とは異なるコレステロール恒常性維持の仕組みを有している。コレステロール 24 ヒドロキシラーゼ (cholesterol 24-hydroxylase: CH24H) は、この恒常性調節に関与している脳特異的に発現する酵素であり、シトクロム P450 酵素群の一つ (CYP46A1) である。CH24H は、コレステロールの 24 位を水酸化し、24S-ヒドロキシコレステロール (24S-hydroxycholesterol: 24HC) に変換する (Figure 1)。生成した 24HC は血液脳関門を通過し、抹消循環血にのって排泄の過程をたどる。

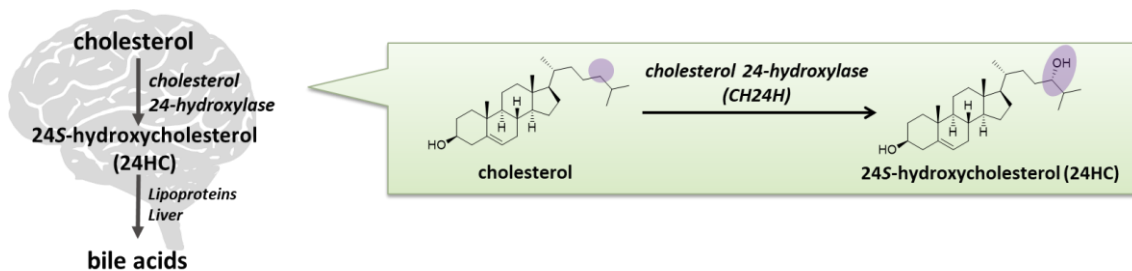


Figure 1. Brain cholesterol and CH24H.

近年、CH24H と疾患の関連が明らかとなりつつあり、特に神経過興奮との関連が示唆されている。CH24H の発現量は活性化アストロサイトで亢進し、興奮性神経伝達物質として知られるグルタミン酸の取り込みを担うグルタミン酸トランスポーター (excitatory amino acid transporter 2: EAAT2) の機能不全を引き起こす。また、CH24H によって産生される 24HC は、N-メチル-D-アスパラギン酸

受容体 (*N*-methyl-D-aspartate receptor : NMDAR) のポジティブアロステリックモジュレーターであり、グルタミン酸によって引き起こされる興奮性伝達に関与していると考えられる。これらのことから、CH24H 阻害剤は、グルタミン酸作動性シグナル伝達を減少させ、てんかん患者の発作コントロールを改善させる可能性がある。

このような背景から、CH24H を強力かつ選択的に阻害する化合物を用いた詳細な検証が求められるが、それに資する化合物の報告例は、西や小池らによって報告されたソチクレスタット (あるいは TAK-935) に限定される。脳内コレステロールの恒常性や CH24H の生理機能をさらに検証するためには、ソチクレスタットと構造の異なる、強力かつ選択的な CH24H 阻害剤を見出すことが重要な課題であることから、新規 CH24H 阻害剤の創製を目的として研究を開始した。

第一章では、X 線共結晶構造解析をもとに、新規 CH24H 阻害剤を設計した。CH24H との共結晶構造が報告されているソチクレスタットは、ヘム鉄へ直接配位することが知られている (Figure 2a)。また、ヘリックス F 下方の脂溶性ポケットを占有し、Gly369 など活性中心内のアミノ酸残基との水素結合や「steroidal cavity」と呼ばれるコレステロール分子が結合する脂溶性ポケットを効率的に占有することで強い阻害活性を示していると考えられる。他にも、ヒスタミン H3 受容体遮断薬として知られるチオペラミドが、その副次的薬理作用として CH24H 阻害作用を有することが報告されている ($IC_{50} = 430$ nM)。チオペラミドは、そのイミダゾール窒素原子で CH24H のヘム鉄に直接配位するとともに、steroidal cavity に Arg226 の側鎖を引き込み、チオウレア部位と水素結合を形成する、というソチクレスタットとは異なる特徴的な結合様式を示す (Figure 2b)。一方で、その阻害活性は中程度にとどまっていることから、活性向上を目的として、X 線共結晶構造解析を用いた Structure-Based Drug Design (SBDD) による新たな分子設計を計画した (Figure 3)。

はじめに、ヘリックス F 下方の脂溶性ポケットを脂溶性置換基で占有することを検討した。チオペラミドの 5 員環イミダゾール上への置換基導入では、角度が悪く、適切に占有することが困難と考えられた。そこで 6 員環ピリジンをヘムバインダーとして選択し、ヘリックス F 下方の脂溶性ポケットを占有する構造として 4-フェニルピリジン構造を設計した。次に、ピリジン環 3 位から適切なリンカーを介してウレア構造を配置すれば、Arg226 と相互作用を形成できると考え、リンカーを探索した。この際、チオウレア硫黄原子を、より電気陰性度の高い酸素原子に置き換えることで、より強固な水素結合形成を期待した。また、チオペラミドの X 線共結晶構造解析では、チオウレア構造がシクロヘキサン環のアキシアル位にあり、環構造とチオウレア構造が折れ曲がった配

置になっている。しかし、このような構造はエネルギー的に不利である。そこで、環構造とウレア構造が折れ曲がった配置しかとれないシクロプロパン環に変更した。

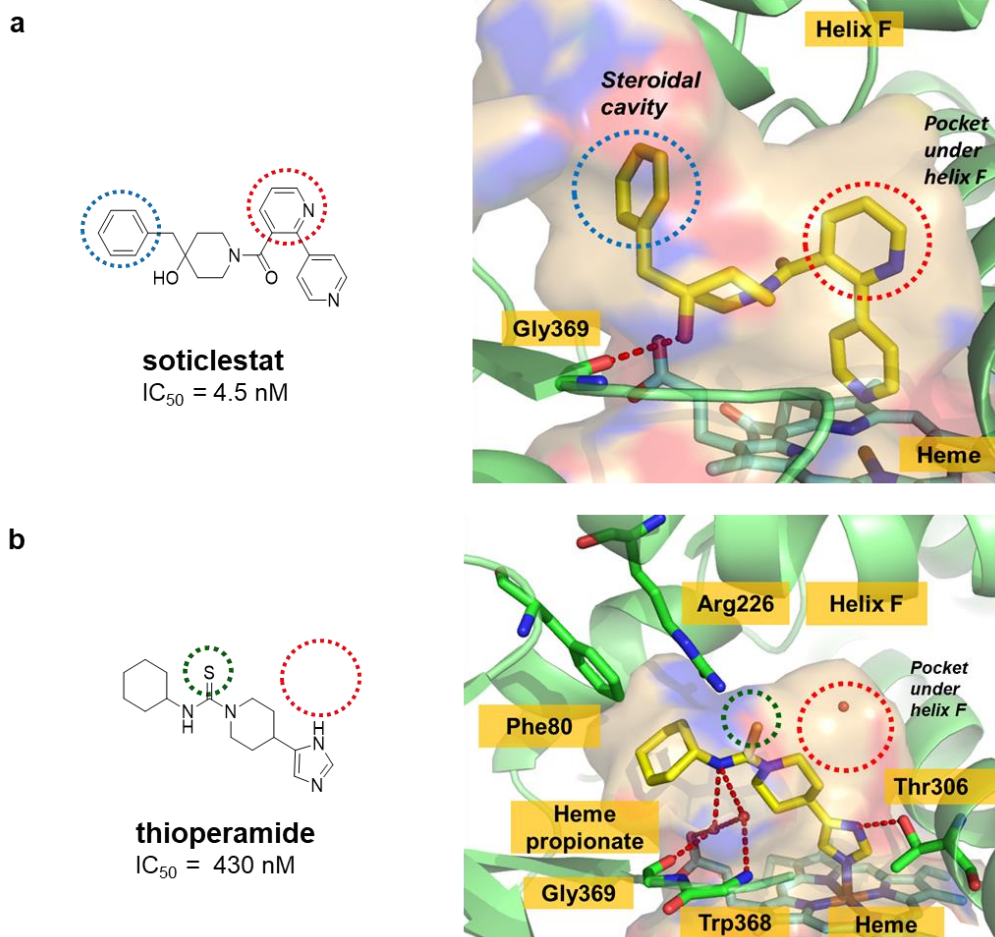


Figure 2. X-ray crystal structures of CH24H in complex with (a) soticlestat (PDB: 7LRL) and (b) thioperamide (PDB: 3MDM).

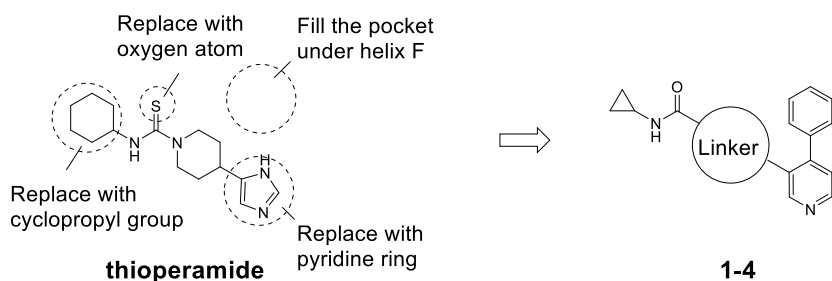
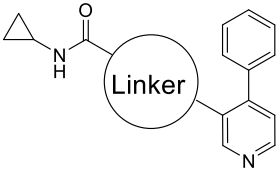
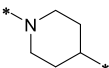
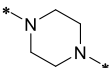
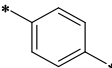
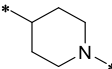


Figure 3. Design of compounds **1-4** based on thioperamide by structure-based drug design approach.

リンカー部位にチオペラミドの部分構造である4-ピペリジニル基を導入した化合物**1** ($IC_{50} = 950$ nM) は、中程度のCH24H阻害活性を示した (Table 1)。さらにリンカーを検討した結果、3-(1-ピペリジニル)ピリジン構造を有する化合物**4** ($IC_{50} = 8.1$ nM) が、強力なCH24H阻害活性を示した。化合物**4**とCH24Hとの共結晶構造を解析したところ、期待通り1) ヘム鉄への直接的配位、2) ヘリックスF下方脂溶性ポケットを占有した疎水性相互作用、3) Arg226との水素結合、が観測された (Figure 4)。

これらの結果から、上述の分子設計の妥当性が示されたとともに、強力な阻害活性を有する新規CH24H阻害剤を見出すに至った。

Table 1. CH24H inhibitory activities of 3-substituted-4-phenylpyridine derivatives

<div>  </div>		
ID	Linker	CH24H
		IC ₅₀ (nM)
thioperamide		430
1		950
2		52
3		74
4		8.1

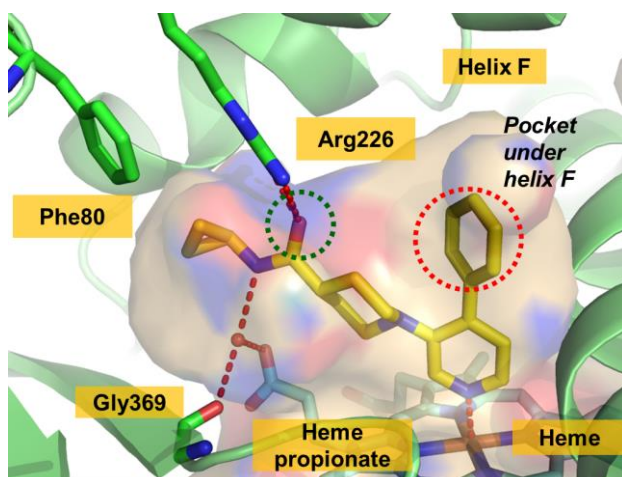


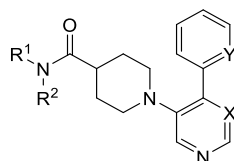
Figure 4. X-ray crystal structure of CH24H in complex with compound **4** (PDB: 7N3L).

第一章で見いだされた化合物 **4** は、強力な CH24H 阻害活性を示したが、代表的な生体異物の代謝酵素である CYP3A4 に対しても強い阻害活性を示した (83% 阻害 at 10 μ M)。化合物 **4** は非選択的な CYP 阻害活性を有する可能性が示唆されたことから、第二章では CH24H 選択的な阻害剤を探索した。

CYP3A4 の活性中心は CH24H に比べてヘリックス F が短く、ヘム鉄上部には柔軟性が高く脂溶性に富んだループに囲まれた空間があることが知られている。一方で、CH24H は、活性中心のポケットの形状が大きく変わらない剛直な構造をとることが示唆されている。これらのことから、分子の適切な位置に極性基を導入し分子全体の脂溶性を下げながら、CH24H との特異的相互作用を獲得することができれば、CYP3A4 との選択性が得られるのではないかと考えた。

化合物 **4** のフェニル基を 2-ピリジル基に変換した化合物 **13** (IC_{50} = 160 nM)、ヘムバインダーのピリジン部位をピリミジンに変換した化合物 **14** (IC_{50} = 44 nM) では、期待通り、脂溶性の指標である実測 LogD (pH = 7.4) 値がさがり、CYP 3A4 阻害活性は減弱した (Table 2)。一方で CH24H 阻害活性も減弱した。次に、4-フェニルピリミジン誘導体を鋳型に、アミド側鎖を探索したところ、第二級ウレア誘導体 (化合物 **14–17**) では LogD 依存的な CYP3A4 阻害活性の変化が認められたが、CH24H 阻害活性には大きな影響はなかった。一方で、ジメチルアミド誘導体 **18** は良好な選択性を示した (CH24H: IC_{50} = 16 nM、CYP3A4: 28%阻害 at 10 μ M)。分子全体の脂溶性を低減させながら、適切な位置に置換基を導入することが CH24H との相互作用形成に有利に働き、選択性改善につながったと考えられる。

Table 2. CH24H and CYP3A4 inhibitory activities and LogD value for 3-(1-piperidiny)pyridine/pyrimidine derivatives



ID	X	Y	R ¹	R ²	CH24H	CYP3A4	LogD (measured)
					IC ₅₀ (nM)	% inhibition (at 10 μM)	
4	CH	CH	cPr	H	8.1	83	2.5
13	CH	N	cPr	H	160	29	1.3
14	N	CH	cPr	H	44	50	1.8
15	N	CH	Me	H	72	31	1.4
16	N	CH	Et	H	58	42	1.8
17	N	CH	Ph	H	28	84	2.7
18	N	CH	Me	Me	16	28	1.7
19	N	CH	Et	Me	14	35	2.1

良好なプロファイルを有する化合物**18**が見いだされたことから、さらなるビ
アリール構造を検討した (Table 3)。脂溶性とCYP3A4阻害との相関が観測され
たことから、最適化の指標にはligand–lipophilicity efficiency (LLE) 値を用いた。
LLE値は $LLE = pIC_{50} \text{ (or } pKi) - \text{LogD (or } CLogP)$ で記述されるドラッグライクネ
ス（薬らしさ）を評価する指標の一つであり、高値であるほど脂溶性に頼らず
に活性を発現していることを意味する。基準となる化合物**18**は $LLE = 6.1$ と求め
られた。

ピリジン誘導体**21** ($IC_{50} = 68 \text{ nM}$, $LLE = 6.0$) やピラゾール誘導体**22** ($IC_{50} = 48 \text{ nM}$, $LLE = 6.1$) はCH24H阻害活性は減弱したものの、LLE値を維持した。周辺
誘導体を合成したところ、4-メチル-1-ピラゾリル基を有する化合物**23**が良好な
選択性 (CH24H: $IC_{50} = 8.5 \text{ nM}$, CYP3A4: 21%阻害 at 10 μM) を示した。LLE値は
6.5であり、最も高値であったことから、より詳細に置換基を検討した (Table 4)。
その結果、ブロモ基を有する化合物**26** ($IC_{50} = 9.5 \text{ nM}$) が化合物**23**と同等の強い
活性を示した。一方でLLE値は5.9と低値にとどまった。クロロ基 (化合物**25**)、

トリフルオロメチル基（化合物**27**）、シクロプロピル基（化合物**28**）への変換においてもLLE値は向上しなかったことから、化合物**23**の4-メチル-1-ピラゾリル基がCH24Hに強く認識されていることが示唆された。最もLLE値が高い化合物**23**を本ケミカルシリーズの代表化合物として選定した。

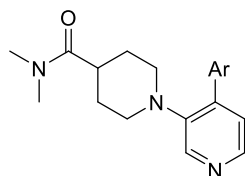
選択的CH24H阻害剤を設計する際にはLLE値を指標にすることが有効である可能性が示されたとともに、本手法により、強力かつCYP3A4に対して選択性を有するCH24H阻害剤**23**を見いだすことができた。

Table 3. CH24H and CYP3A4 inhibitory activities, CLogP, LogD and LLE values for 4-aryl 3-(1-piperidinyl)pyridine/pyrimidine derivatives

ID	X	Ar	CH24H	CYP3A4	CLogP	LogD (measured)	LLE ^a
			IC ₅₀ (nM)	% inhibition (at 10 μM)			
18	N		16	28	1.2	1.7	6.1
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>							
20	N		7.3	37	1.4	1.9	6.2
21	CH		68	11	0.7	1.2	6.0
22	CH		48	1	0.4	1.1	6.1
23	CH		8.5	21	0.6	1.6	6.5
24	CH		1,100	5	0.6	1.5	4.5

^aLLE = pIC₅₀ – LogD.

Table 4. CH24H and CYP3A4 inhibitory activities, CLogP, LogD and LLE values for 4-aryl 3-(1-piperidinyl)pyridine derivatives



ID	Ar	CH24H	CYP3A4	CLogP	LogD (measured)	LLE ^a
		IC ₅₀ (nM)	% inhibition (at 10 μM)			
23		8.5	21	0.6	1.6	6.5
<hr style="border-top: 1px dashed black;"/>						
25		24	19	1.1	2.0	5.6
26		9.5	31	1.3	2.1	5.9
27		65	47	1.3	2.1	5.1
28		12	56	1.1	2.1	5.8
29		12	32	1.0	2.0	5.9

^aLLE = pIC₅₀ – logD.

第三章では、第二章で見いだされた化合物 **23** が薬理試験に適切なツール化合物であるかを *in vitro* と *in vivo* の観点から検証した。*in vitro* 試験として、X 線共結晶構造解析を用いた CH24H との結合様式、および CYP3A4 以外の CYP 酵素に対する阻害活性を確認した。また、*in vivo* 試験として、マウスにおける薬物動態と脳内 24HC 低下作用を評価した。

X 線共結晶構造解析の結果、化合物 **23** は化合物 **4** と同様に、1) ヘム鉄への直接的配位、2) ヘリックス F 下方脂溶性ポケットにおける疎水性相互作用、3)

Arg226 との水素結合、を形成しており、ソチクレスタットと構造、および結合様式の異なる CH24H 阻害剤であることが示された (Figure 5)。化合物 **23** は、水を介して Ala474 と水素結合ネットワークを形成しており、これが高 LLE に寄与している可能性が考えられた。

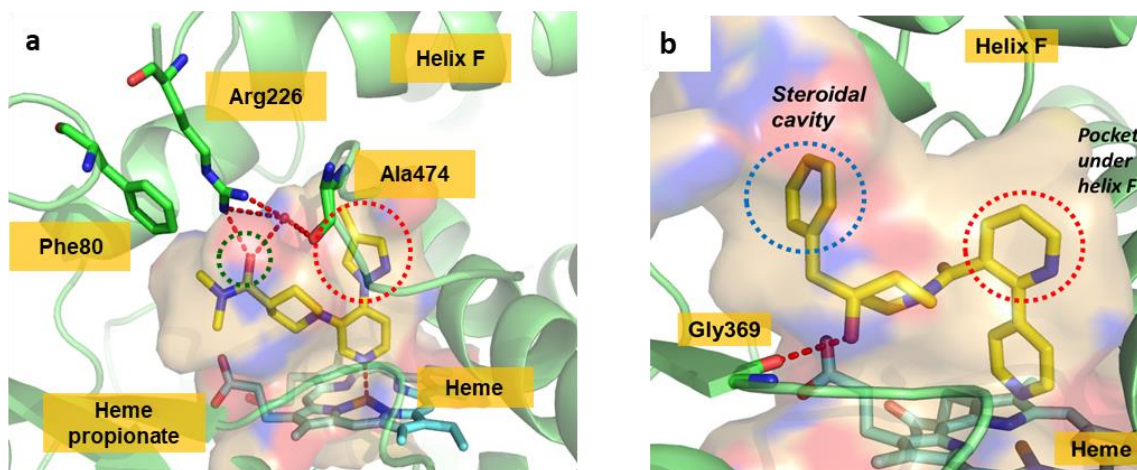


Figure 5. X-ray crystal structures of CH24H in complex with (a) compound **23** (PDB: 7N3M) and (b) soticlestat (PDB: 7LRL).

化合物 **23** は、CYP3A4 と同様に代表的な薬物代謝型 CYP 酵素である CYP2C8 や 2C9、2D6 に対しても高い選択性を示した (Table 5)。この結果から、化合物 **23** は種々の CYP に対して選択性のある CH24H 阻害剤であることが示唆された。

Table 5. CYP selectivity of compound **23**

ID	CH24H	CYPs % inhibition (at 10 μ M)			
	IC ₅₀ (nM)	3A4	2C8	2C9	2D6
23	8.5	21	2	19	3

化合物 **23** はマウスへの経口投与 (30 mg/kg) において、経口吸収性と良好な中枢移行性を示した (投与 1 時間後において、C_{plasma} = 0.179 μ M, C_{brain} = 0.102 μ M)。また、投与 8 時間後も脳内での残留が認められた。同用量で脳内 24HC の低下作用を確認したところ、有意な脳内 24HC の低下 (26%低下) が認められた (Figure 6)。

化合物 **23** は CH24H の活性中心に結合する強力かつ選択的 CH24H 阻害剤であり、マウスにおいて脳内 24HC の低下作用を示す新規ツール化合物として有望なプロファイルを示した。

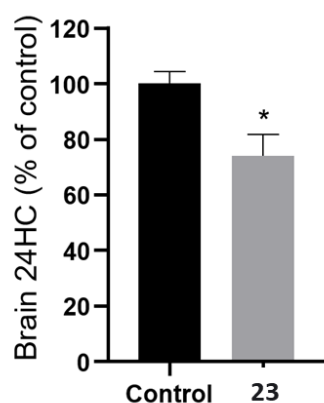


Figure 6. 24HC lowering effects of **23** in the brain following 3-day repetitive treatments in mice (30 mg/kg, once daily orally). Data are mean + SEM. * $p < 0.05$ vs Control (Student's t-test).

今回筆者はソチクレスタットと構造の異なる、新規な選択的 CH24H 阻害剤の創出を目的として合成研究を行い、以下の結論を得た。すなわち、1) CH24H の X 線共結晶構造を起点とした SBDD アプローチによって、化合物 **4** を代表化合物とする、強力な CH24H 阻害活性を有する 3-(1-ピペリジニル)ピリジン誘導体が見出されたこと、2) LLE 値を指標とする化合物最適化方針が選択的 CH24H 阻害剤創出のアプローチとなりうること、3) マウス経口投与において脳内 24HC を有意に低下させる、強力かつ選択的 CH24H 阻害剤 **23** (CH24H: $IC_{50} = 8.5$ nM, CYP3A4: 21%阻害 at 10 μ M) が 3-(1-ピペリジニル)ピリジン誘導体から見出されたこと、である。今後、CH24H 阻害による薬理作用検証および、脳内コレステロールの恒常性研究のためのツール化合物として発展することが期待される。さらに、本ケミカルシリーズから複数の CH24H 選択的 PET トレーサーの開発が報告されている。池田らは、CH24H のイメージングツールとして [^{18}F]T-008 を同定し現在臨床で開発中であることを、Haider らは、ヒトにおける脳内コレステロール代謝の性差などを評価している。今後の発展を注視したい。

以上