

氏名（本籍）	<small>こうら　みのる</small> 小浦　稔（東京都）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	論博第 355 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	動脈硬化治療薬の開発を目的とした Liver X Receptor β 選択的アゴニストの創薬研究
論文審査委員	（主査） 教授 松本 隆司 教授 三浦 剛 教授 林 良雄 教授 高木 教夫

論文内容の要旨

本論文は、新規動脈硬化治療薬の開発を目的とした核内受容体 Liver X Receptor (LXR) β 選択的アゴニストの創薬研究に関するものである。

動脈硬化とは、動脈にコレステロールや中性脂肪などが蓄積し、閉塞または硬化することで血管本来の弾力性や柔軟性を失った状態をいう。このような状態が継続すると、脳梗塞や脳卒中などの脳血管系疾患や心筋梗塞などの心血管系疾患につながり、近年、それらは悪性腫瘍に次いで死亡要因の第 2 位、第 3 位となっている。心血管系疾患に対する薬物療法としては、コレステロール産生を阻害する 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) 還元酵素阻害剤（いわゆるスタチン製剤）の使用が推奨されているが、心血管イベント抑制率は約 30% 程度にとどまる。昨今、より強力な LDL-C 低下作用のあるストロングスタチンが出現し、Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9 (PCSK9) 阻害剤などとの併用投与によって心血管イベント抑制率は改善されてはいるが未だ十分とは言えない。また、PCSK9 阻害剤は皮下注射を要する抗体医薬であるため、より利便性の高い新規動脈硬化治療薬が望まれている。

LXR は核内受容体の一つであり、2 種類のサブタイプ (α , β) がある。LXR α は主に肝臓、脂肪組織、小腸、マクロファージなどに特異的に発現し、一方、LXR β は普遍的に発現している。LXR は、リガンドが結合する前は、主に co-repressor により不活化されているが、リガンドが結合すると主に co-activator により活性化状態となり構造変化を生じる。それに伴いレチノイド X 受容体とヘテロダイマーを形成し、DNA 上の LXR 応答配列に結合して標的遺伝子の転写を誘導する。LXR の活性化は、

小腸においては ATP-binding cassette transporter G5 (ABCG5) および ABCG8 発現の上昇によるコレステロール排泄促進作用を示し，末梢血管においては ABCA1, ABCG1 発現の上昇によりコレステロール逆転送系 (reverse cholesterol transport; RCT) を亢進し抗動脈硬化作用を示す．しかし，肝臓においては sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) や脂肪酸合成酵素 (Fatty acid synthase; FAS) などの脂肪酸合成に関与する酵素を転写促進し，トリグリセリド (TG) を増加させる．この SREBP-1c や FAS などによる脂肪酸合成の亢進は，主に肝臓に分布している LXR α の活性化作用に起因するものである．したがって，肝臓での LXR α への作用を回避できれば TG の増加を抑制でき，新規動脈硬化治療薬に繋がると期待される．

本論第一章では，ハイスループットスクリーニング (HTS) によって得られた化合物 **1** からリード化合物 **4** を見出した経緯，その構造活性相関および *in vivo* 薬理評価について述べた．すなわち，まず，タンパク質構造データベース (PDB) に登録された LXR アゴニスト/LXR β 複合体結晶の X 線構造情報，および，ヒット化合物 **1** と他社化合物の構造情報を活用して，独自の ‘head-to-tail デザイン’ を展開することによって，head 部分に 2-オキソクロメン構造を，tail 部分にヒダントイン構造をもつ LXR β 選択的アゴニスト **2** を見出した．この化合物 **2** は，動脈硬化モデル (ハムスター) を用いた *in vivo* 薬理評価において，300 mg/kg の経口投与にて脂質沈着抑制作用を示し，これは HDL-C の上昇作用により末消血中で RCT が亢進したことによる直接的な作用の結果であると推察された．しかし，化合物 **2** は，代謝安定性および血中濃度推移に問題があった．そこで，head 部分を 1,4-ジヒドロイソベンゾ

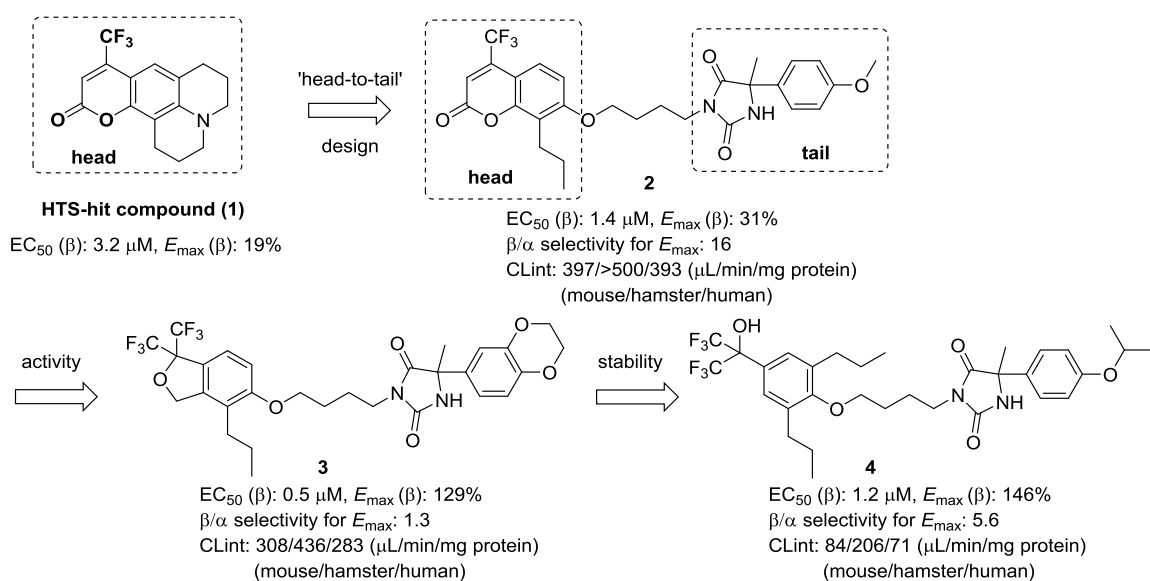


Figure 1

フラン構造 (3), さらに, 1,1-ビス(トリフルオロメチル)カルビノール構造 (4) へと代えたところ, 代謝安定性および血中濃度の改善だけでなく, LXR β 活性化作用も向上させることができた. この LXR β 選択的アゴニスト 4 は 100 mg/kg の経口投与で脂質沈着抑制作用を示し, かつ, LXR アゴニストの副作用として懸念される TG の増加を抑制できることが判明したため, これをリード化合物として位置付けた.

本論第二章では, リード化合物 4 の各鏡像異性体の活性化作用, 絶対立体配置の決定, 合成中間体となる光学活性ヒダントイン 5 の製造法, さらに, 化合物 4 の代謝物の同定について述べた. すなわち, まず, 化合物 4 を光学分割して, 各々の鏡像異性体の活性を評価した結果, (+)-4 に所望の活性化作用があることが判明した. そこで, tail 部分に相当するヒダントイン中間体 5 を光学分割し, 各々の鏡像異性体を, その絶対配置を明らかにした後に化合物 4 へと誘導した. その結果, (+)-4 の絶対立体配置を *S* と決定することができた. また, (*S*)-(+)-4 の合成に必要な光学活性ヒダントイン (+)-5 を, 光学分割によって大量かつ効率的に製造する方法を確立した. さらに, 化合物 4 がリンカー部位で酸化的代謝を受け, カルボン酸 6 を生成することを明らかにした (Figure 3). 化合物 4 の血中濃度は, 化合物 2 と比べて改善されてはいるものの決して十分ではないことの原因が, この代謝にあることが明らかになった.

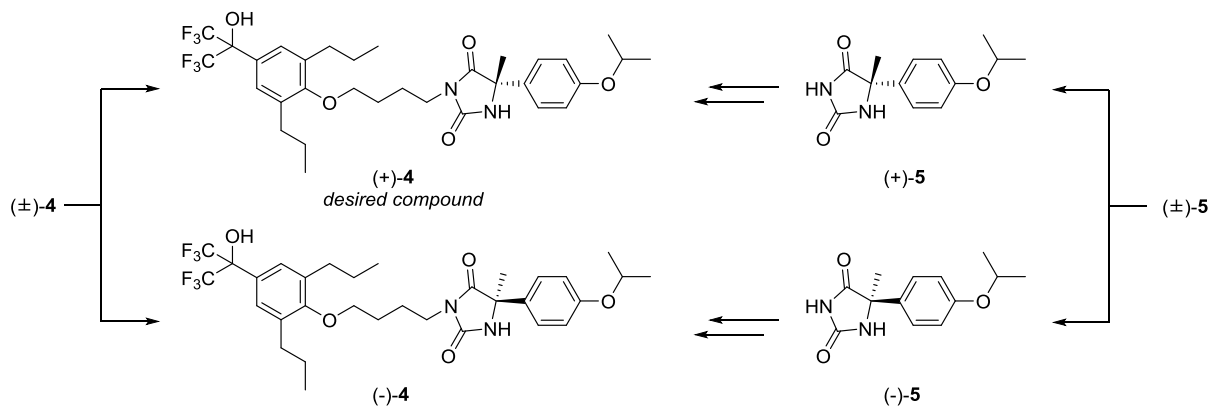


Figure 2

本論第三章では, カルビノール構造 (head 部分) とヒダントイン構造 (tail 部分) を結ぶリンカー部分の構造を検討し, 2-ヒドロキシアセトフェノン構造を有する化合物 7 を見出した経緯, およびその構造活性相関について述べた. 化合物 7 の鏡像異性体のうち (-)-7 は, 動脈硬化モデルとして LDL 受容体欠損マウスを用いた薬効試験において, 良好な脂質沈着抑制作用を示した. 血中 ABCA1 mRNA の発現

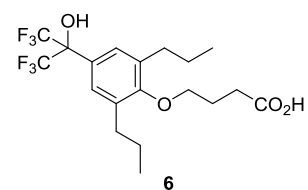


Figure 3

が上昇し HDL-C が増加していることから、RCT の亢進による抗動脈硬化作用に繋がる可能性が示唆された。

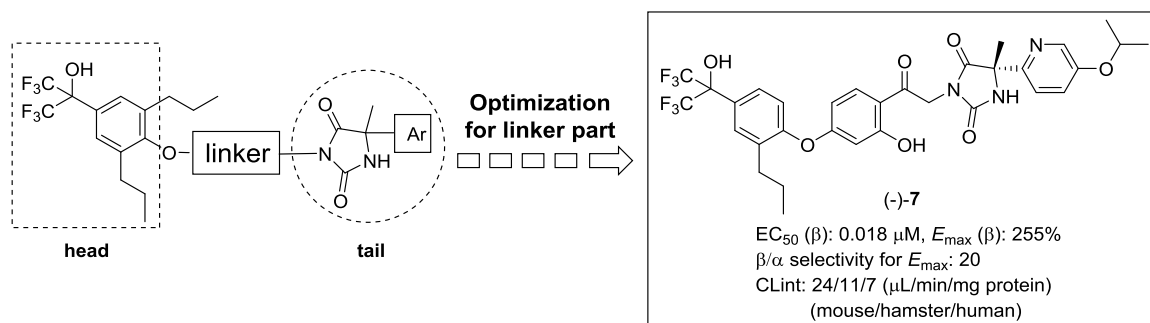


Figure 4

本論第四章では、LXR β 選択的アゴニスト (-)-**7** の絶対立体配置の決定、(-)-**7** を合成するための中間体となる光学活性ヒダントイン (S)-(+)-**9** の大量合成法および化合物 (S)-(-)-**7** の効率的な合成法の確立について述べた。すなわち、D-(-)-マンデル酸を用いた光学分割を経て α -アミノ酸エステル (+)-**8** を高い鏡像体過剰率で大量に供給する方法を確立し、それにより (S)-(+)-**9** の大量合成が可能になった。さらに、この光学活性ヒダントインと合成容易なアニリン誘導体 **10** およびアセトフェノン誘導体 **12** を利用して、(S)-(-)-**7** を安定に供給できる合成経路を確立した。

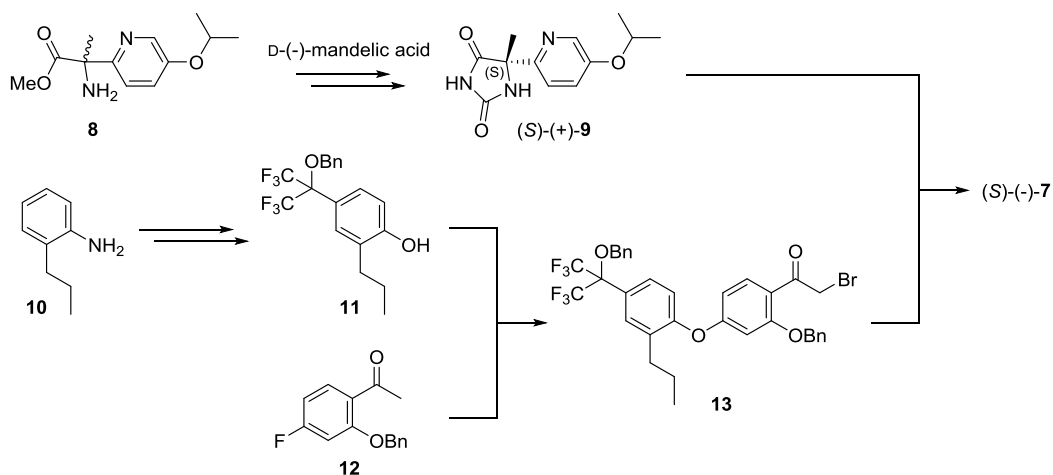


Figure 5

以上、HTS ヒット化合物の構造最適化によって、*in vitro* および *in vivo* での活性、代謝安定性および血中濃度を改善し、新規 LXR β アゴニスト (S)-(-)-**7** を創出した。この (S)-(-)-**7** は世界でも稀に見る高い LXR β 選択性および高活性を示し、LDL 受容体欠損マウスにおいて 1 mg/kg から脂質沈着抑制効果を示す。これらの成果は、今後の LXR アゴニストの創薬研究に有用な情報を提供するものと期待される。

【研究成果の掲載誌】

1. Matsuda, T.; Okuda, A.; Watanabe, Y.; Miura, T.; Ozawa, H.; Tosaka, A.; Yamazaki, K.; Yamaguchi, Y.; Kurobuchi, S.; Koura, M.; Shibuya, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 1274–1278.
2. Koura, M.; Matsuda, T.; Okuda, A.; Watanabe, Y.; Yamaguchi, Y.; Kurobuchi, S.; Matsumoto, Y.; Shibuya, K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25*, 2668–2674.
3. Koura, M.; Sumida, H.; Yamazaki, Y.; Shibuya, K. *Tetrahedron: Asymmetry* **2016**, *27*, 63–68.
4. Koura, M.; Yamaguchi, Y.; Kurobuchi, S.; Sumida, H.; Watanabe, Y.; Enomoto, T.; Matsuda, T.; Okuda, A.; Koshizawa, T.; Matsumoto, Y.; Shibuya, K. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 3436–3446.
5. Koura, M.; Sumida, H.; Shibuya, K.; Ohba, S. *Synthesis* **2017**, *49*, 2074–2080.

論文審査の結果の要旨

本論文は、新規動脈硬化治療薬の開発を目的とした核内受容体 Liver X Receptor β 選択的アゴニストの創薬研究について述べたものである。

Liver X Receptor (LXR) には2種のサブタイプ (α , β) があり, LXR α は幾つかの組織に特異的に発現し, LXR β は普遍的に発現している. LXR の活性化は, 小腸においてコレステロール排泄促進作用を示し, 末梢血管においてコレステロール逆転送系 (reverse cholesterol transport; RCT) を亢進して抗動脈硬化作用を示す. しかし, 肝臓においては sterol regulatory element-binding protein 1c (SREBP-1c) や脂肪酸合成酵素などの脂肪酸合成に関与する酵素を転写促進し, トリグリセリド (TG) を増加させる. これらの脂肪酸合成亢進は, 主に肝臓に分布している LXR α の活性化作用に起因するものである. したがって, 肝臓での LXR α への作用を回避できれば TG の増加を抑制でき, 動脈硬化治療に繋がることが期待される.

第一章では, 独自の 'head-to-tail デザイン' の展開によって, head 部分に 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-(3,5-dipropylphenyl)propan-2-ol 構造, tail 部分に 5-(4-isopropoxyphenyl)-5-methylimidazolidine-2,4-dione 構造をもつ LXR アゴニストを見出した経緯を述べている. この化合物は濃度 10 μM における LXR β 活性化能が, Tularik 社の開発した LXR α/β 非選択的アゴニスト T0901317 の 1.5 倍, LXR α 活性化能の 5.6 倍であり, 動脈硬化モデルを用いた *in vivo* 薬理評価において, 100 mg/kg の経口投与で脂質沈着抑制作用を示した. さらに, LXR アゴニストの副作用として懸念される TG の増加を抑制できることが判明したため, 著者は, これをリード化合物として位置付けている.

第二章では, 合成化学の手法を駆使して, 上記リード化合物の鏡像異性体のうち S 体に所望の活性化作用があることを明らかにしている. また, 代謝物の解析により, このリード化合物は head 部と tail 部の間のリンカー部位において酸化的開裂を受けることを見出し, それが原因となり血中濃度が十分にならないことを明らかにしている.

第三章では, 第二章の結果を受けて更なる構造最適化を行い, リンカー部を直鎖アルキル構造から 2-hydroxyacetophenone 構造に, tail 部の 4-isopropoxyphenyl 基を 6-isopropoxy-pyridin-3-yl 基に替えた新たなアゴニストを創出している. この化合物の LXR β 活性は濃度 0.1 μM で最大に達し ($\text{EC}_{50} = 0.018 \mu\text{M}$), T0901317 ($\text{EC}_{50} = 0.41 \mu\text{M}$) の最大活性の 24 倍であるのに対して, その濃度における LXR α 活性は T0901317 の最大活性の 0.11 倍であった. また, 動脈硬化モデルとして LDL 受容体欠損マウスを用いた薬効試験において 1 mg/kg から脂質沈着抑制作用を示した. 血中の ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) の発現が上昇し, HDL-C が増加しているため, RCT の亢進による効果であることが示唆された.

第四章では, まず, 上記 LXR β 選択的アゴニストの絶対立体配置を決定した後, 鍵合成中間体である光学活性ヒダントイン誘導体を光学分割によって大量に供給する方法を開発し, それを利用して上記アゴニストを大量合成するための経路を確立している.

以上, 本研究では, これまでにない高いサブタイプ選択性および高活性を示す新規 LXR β 選択的アゴニストの創出に成功し, この化合物が LDL 受容体欠損マウスにおいて良好な脂質沈着抑制

効果を示すことを明らかにした。これらの成果は、今後のLXR β 選択的アゴニストの創薬研究に有用な多くの新知見をもたらすものであり、また、合成化学分野における学術的貢献に加えて応用面での有用性も多大である。よって、本論文は博士（薬学）の学位を授与するに十分値するものと判断する。