

氏名 (本籍)	うだ じゅんいちろう 雨田 淳一郎 (神奈川県)
学位の種類	博士 (薬学)
学位記番号	論博第 381 号
学位授与の日付	令和 5 年 7 月 12 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	新規尿酸排泄促進剤の創薬研究
論文審査委員	(主査) 教授 松本 隆司 教授 宮岡 宏明 教授 林 良雄 教授 高木 教夫

## 論文内容の要旨

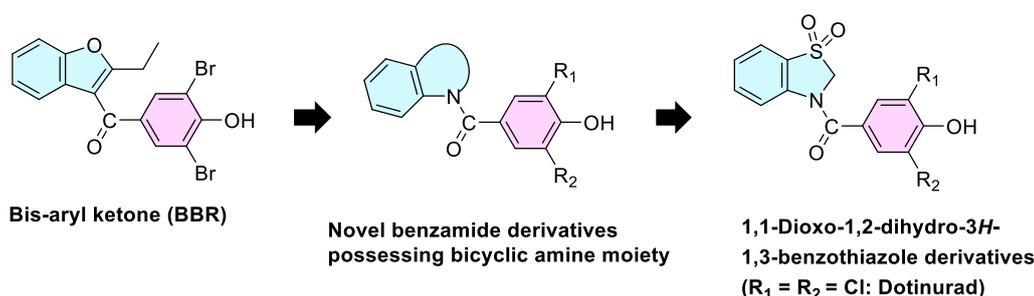
本論文は高尿酸血症の治療に用いる尿酸排泄促進剤の開発を目指した創薬研究に関するものである。

高尿酸血症は痛風関節炎の原因となるだけでなく、腎機能や循環器系の障害にも関与する。日本の「高尿酸血症・痛風治療のガイドライン」では高尿酸血症を「血清尿酸値  $> 7.0$  mg/dL」と定義しており、治療にあたっては高尿酸血症のタイプに即した作用メカニズムの薬物（尿酸降下薬）の使用を推奨している。尿酸産生過剰型にはキサンチン酸化還元酵素阻害剤 (XOI) を、尿酸排泄低下型には尿酸排泄促進剤を使用する。尿酸排泄促進剤は血中の尿酸を尿中に排泄することを促進し、XOI と比較して早く作用し強力な薬効（血中尿酸値の低下）を示す。尿酸は腎糸球体によりろ過されたのち、その約 90% が尿細管で再吸収される。腎の近位尿細管上皮細胞 (renal proximal tubule epithelial cells; RPTECs) には尿酸を輸送するトランスポーターが多数発現している。特に尿酸再吸収における URAT1 の関与は大きく、URAT1 遺伝子の欠損により腎性低尿酸血症（血清尿酸値  $\leq 2.0$  mg/dL）を生じる。尿酸排泄促進剤にはプロベネシド、ベンズブロマロン (BBR) などがある。プロベネシドは非選択的なアニオントランスポーター阻害剤であり、尿酸の排泄を促進するだけでなく、他の薬物の排泄にも関与し薬物相互作用をひきおこす。BBR は日本、ヨーロッパ、ブラジルなどの一部の国で使用されていたが、致死性の劇症肝炎が報告されたのち、日本では規制当局の警告によりその使用が制限され、ヨーロッパでは販売中止となった。このような背景から、臨床上のデメリットが少なく、標準的に使用される新たな薬物の開発が望まれていた。

BBR は前述のデメリットを有するが、URAT1 を阻害し強い薬理活性を示す点では魅力的である。そこで著者は BBR の毒性が構造的な特徴に起因する可能性に着目し、構造を変換することにより、安全性が高く、かつ薬理活性が強い新たな薬物の創製をおこなうこととした。

本論第一章では、新規な尿酸排泄促進剤ドチヌラドの創出について述べた。まず、BBR の構造的な特徴を解析し、薬効発現には尿酸と共通する特徴（平面性および適度な酸性度）が必要であること、および肝毒性の発現は、ミトコンドリア毒性が原因であり、ラジカルを安定化し得るビスアリアルケトン構造に起因すると仮定した。そこで、BBR を基本構造として、そのビスアリアルケトン型構造 [Ar-(CO)-Ar] を、アリアル基とケトンとの共役を部分的に回避したアミド型構造 [N-(CO)-Ar] へと代えることをこころみた。具体的には、

二環性のアミン（インドリン等）とフェノールをカルボニル基で結合させた誘導体を種々合成することとした。薬効試験では、ヒト腎において尿酸の排泄や再吸収を担っている近位尿細管上皮細胞（RPTECs）を用いた尿酸取り込み阻害活性（UII）、および尿酸の再吸収において主な役割を担っている尿酸トランスポーター（URAT1）の阻害活性を指標とした。また、同時に肝障害の指標としてミトコンドリア呼吸鎖阻害活性（MIA）を評価した。結果として、強い *in vitro* の薬効の発現と、低いミトコンドリア毒性を両立するインドリン誘導体を得た。また、構造をアミド型へ代えること、および脂溶性を下げることでミトコンドリア毒性を弱くする上で重要であることを見出した。しかし、これら誘導体の薬物動態（PK）の特性（ $C_{max}$  および尿中排泄量）は十分ではなかった。そこで、アミン部位をより代謝安定性の高い構造に代え、フェノール部位の置換基を変換した誘導体を種々合成することとした。その結果、*in vitro* 活性および PK の特性のバランスに優れた 1,1-ジオキソ-1,2-ジヒドロ-3H-1,3-ベンゾチアゾール誘導体を見出すことができた（Figure 1）。



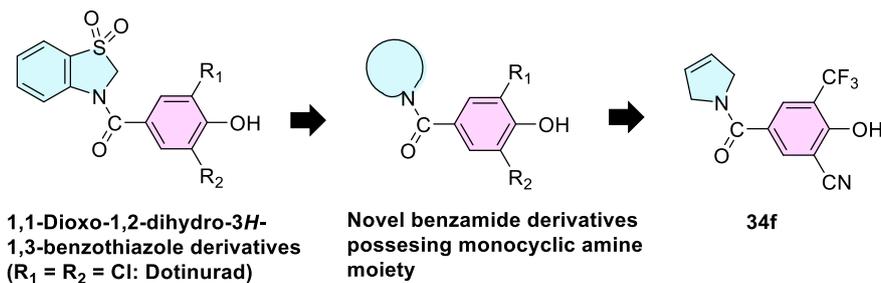
**Figure 1.** Strategy and results of the novel benzamide derivatives possessing bicyclic amine moiety.

選択した代表化合物（Dotinurad）は、ヒトの薬理作用に外挿できるフサオマキザル（*Cebus apella*）を用いた *in vivo* 試験において、BBR よりも強く血中尿酸値を低下させる作用が確認された。この化合物を医薬品の候補化合物として選択し、臨床開発を進めた結果、日本国内で医薬品として承認されるに至った。現在海外での開発も進められている。

第一章で述べたとおり、肝毒性が問題となっていた BBR に代わる医薬品を開発するという目標は Dotinurad の開発をもって達成された。また、その過程で分子の脂溶性（LogP）とミトコンドリア呼吸鎖阻害（MIA）が相関することが見出されていた。そこで、著者はミトコンドリア毒性をさらに抑えその懸念を完全に払しょくするような化合物を創出するべく研究を続けた。第二章では、その結果について述べた。

結果として、アミン部位の構造を二環性から単環性の脂環式アミン（3-ピロリン、ピロリジン、アゼチジン、チアゾリジン）に変更すると期待したとおり弱い MIA を示した（Figure 2）。

また、脂溶性を低下させたことで、*in vitro* 薬効（URAT1 阻害および UII）も低下したが、未変化体の尿中への排泄率が高まり、*in vivo* では薬理活性の低下をおぎなうことが期待された。特に 3-ピロリンやチアゾリジンをアミン部位とする 4-ヒドロキシベンズアミド誘導体は活性のバランスが良く、中でも化合物 **34f** は、フサオマキザル（*Cebus apella*）による薬理試験において、300 mg/kg（p.o.）で血漿中尿酸値を有意に低下させた。**34f** はミトコンドリア毒性のない、尿酸排泄促進作用を有する新しい化合物である。



**Figure 2.** Strategy and results of the novel benzamide derivatives possessing monocyclic amine moiety.

第一章、第二章の研究結果は、分子構造についての深い考察と適切な構造改変によって既存薬物の毒性低減が果たされた事例であり、企業における創薬戦略の一つとして示唆に富むものである。

本論第三章では、ヒト腎細胞を用いた尿酸取り込み阻害試験法の確立について述べた。本評価系は上記第一章及び第二章における化合物評価に用いるため、あらたに構築したものである。また、本研究で得られた、ヒト RPTECs に対するインスリンの影響についても考察した。

一般的に、尿酸排泄促進剤の *in vitro* 評価は、URAT1 を過剰発現した細胞への尿酸取り込み阻害を指標とする。しかし、生体では複数のトランスポーターが尿酸の輸送に関与していることから、実際の活性を正しく評価するためには、複数のトランスポーターの関与を含めて評価する必要がある。そこで、ヒトの腎において尿酸の再吸収を担っている RPTECs を用いて、尿酸の取り込み阻害を評価する系の構築をこころみた。当初、試験系の緩衝液として Transport buffer を選択することで、細胞への尿酸の取り込みを確認した。しかし、阻害活性を評価するためには取り込み量が不十分であったことから、ラット腎尿管上皮細胞にて URAT1 の発現をたかめるインスリンを添加した。その結果、細胞への尿酸の取り込みは有意に増加し、URAT1 阻害剤である BBR によって濃度依存的に阻害された。これにより、この試験系は化合物の尿酸取り込み阻害活性 (UII) を評価する方法として機能することが確認された。さらに、化合物によって URAT1 阻害活性に対する UII 活性の比 (UII/URAT1 阻害) が異なることから、UII の評価では URAT1 以外のトランスポーターの阻害が活性値に影響する。すなわち、化合物によるトランスポーター阻害の選択性が活性値に影響すると推測される。これらの結果から、本評価系は、一般的な URAT1 阻害活性評価系と比較して、より生体に近い尿酸取込みを反映している。また、本研究により得られたインスリンの添加による RPTECs への作用は、インスリンが血中の尿酸濃度の恒常性に関与することを示唆している。

以上、新たな尿酸排泄促進剤の開発を目指した研究を進めた結果、新規な尿酸排泄促進剤 Dotinurad を得ることに成功した。また、ミトコンドリア毒性をさらに抑えその懸念を完全に払しょくするような化合物を創出するべく研究を続けた結果、アミン部位の構造を 3-ピロリンに改変した化合物 (34f) を見出した。今回おこなった、毒性を低減するための創薬手法は、新たな医薬品開発にも応用可能なものである。

また、本研究を行うにあたり、ヒト RPTECs を用いた尿酸取り込み阻害活性を評価する系をあらたに構築した。本評価系は一般的な URAT1 阻害活性評価系と比較して、より生体に近い尿酸取込みを反映している。確認された RPTECs へのインスリンの効果は、インス

リンが血中の尿酸濃度の恒常性に関与することを示唆している。本評価系において URAT1 および他のトランスポーターの発現と機能変化をさらに研究することにより、尿酸代謝におけるインスリンの生理的な意義を解明することにつながる。

#### 【研究結果の掲載誌】

1. Uda J.; Kobashi S.; Miyata S.; Ashizawa N.; Matsumoto K.; Iwanaga T. Discovery of Dotinurad (FYU-981), a New Phenol Derivative with Highly Potent Uric Acid Lowering Activity. *ACS Med. Chem. Lett.*, **2020**, *11*, 2017–2023.
2. Uda J.; Kobashi S.; Ashizawa N.; Matsumoto K.; Iwanaga, T. Novel Monocyclic Amide-Linked Phenol Derivatives without Mitochondrial Toxicity Have Potent Uric Acid-Lowering Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2021**, *40*, 127900.
3. Uda J.; Ashizawa N.; Iwanaga T. An Evaluation Method for Uric Acid Uptake Inhibition Using Primary Human Proximal Tubule Epithelial Cells Treated with Insulin. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **2022**, *41*, 724–735.

## 【論文審査の結果の要旨】

雨田淳一郎氏の博士学位申請論文は「新規尿酸排泄促進剤の創薬研究」と題し、序論、本論三章および実験項とから成る。

序論では、高尿酸血症の治療に資する新たな尿酸排泄促進剤の開発意義について述べている。高尿酸血症は痛風関節炎の原因となるだけでなく、腎機能や循環器系の障害にも関与する。高尿酸血症の中でも、尿酸産生過剰型の治療にはキサンチン酸化還元酵素阻害剤 (XOI) が、尿酸排泄低下型には尿酸排泄促進剤が使用される。尿酸排泄促進剤は血中の尿酸を尿中に排泄することを促進する薬剤で、プロベネシド、ベンズブロマロン (BBR) などがあり、XOIと比較して早く作用し強力な薬効を示す。しかし、プロベネシドは非選択的なアニオントランスポーター阻害剤であり、尿酸以外の排泄にも関与して薬物相互作用をひきおこす。一方、BBRはヒト尿酸トランスポーター1 (URAT1) を阻害して強力な薬理活性を示し、日本、ヨーロッパなどで使用されていたが、致死性の劇症肝炎が報告されたのち、ヨーロッパでは販売中止となり、日本でも使用が制限されるようになった。そのため、標準的に使用される新たな薬物の開発が望まれていた。

第一章では、新規な尿酸排泄促進剤ドチヌラドの創出について述べている。著者は、まず、BBRの構造的特徴を解析し、薬効発現には尿酸同等の適度な酸性度と平面性が必要であること、また、肝毒性発現の原因はミトコンドリア毒性にあり、電子の授受に関与しやすいビスアリアルケトン構造に起因するとの仮定を立てた。この仮説のもと、BBRのジアリアルケトン型構造 [Ar-(CO)-Ar'] をアミド型構造 [N-(CO)-Ar'] へと置き換え、2個のアリアル基のうちの1個とケトンとの共役を回避することを基本コンセプトとして構造展開を行った。薬効評価においては、URAT1の阻害活性に加えて、ヒト腎において尿酸の排泄や再吸収を担っている近位尿細管上皮細胞を用いた尿酸取り込み阻害活性を指標とした。同時に、肝障害の指標としてミトコンドリア呼吸鎖阻害活性を評価した。その結果、*in vitro*活性および薬物動態特性に優れた1,1-ジオキソ-1,2-ジヒドロ-3H-1,3-ベンゾチアゾール誘導体ドチヌラドを見出すことに成功した。この化合物は、ヒトの薬理作用に外挿できるフサオマキザルを用いた試験において、BBRよりも強く血中尿酸値を低下させる作用が確認され、臨床開発をすすめた結果、日本国内で医薬品として承認されるに至った。

第二章では、ミトコンドリア毒性がドチヌラドよりもさらに低く、その懸念を完全に払拭する化合物の創出について述べている。ドチヌラドの創出過程で得た知見をもとに、そのアミン部位を二環性から単環性の脂環式アミンに変更した結果、ミトコンドリア呼吸鎖阻害が顕著に低下することが判明した。また、*in vitro*活性は低下したが、未変化体の尿中への排泄率が高まり、*in vivo*では活性の低下を十分に補った。特に、3-ピロリンをアミン部位とする4-ヒドロキシベンズアミド誘導

体は活性のバランスが良く、ミトコンドリア毒性のない、新たな尿酸排泄促進化合物として期待できる。

第三章では、尿酸取り込み阻害活性の新たな評価法について述べている。一般に尿酸排泄促進剤の *in vitro* 評価においては、URAT1を過剰発現させた細胞への尿酸取り込み阻害を指標とする。本研究で開発した方法は、ヒト腎細胞そのものを用いるものであり、複数のトランスポーターが関与する生体における尿酸取り込みをより反映させることができる。このことが第一章、第二章の成果にも繋がっている。

以上、本論文は、新規な尿酸排泄促進剤として上市されたドチヌラドの創出、および、その過程で見出した種々の重要知見をまとめたものであり、薬学への学術的貢献は大きい。よって、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。