

審査の結果の要旨

氏名 奈良 洋

奈良洋は「X線共結晶解析に基づく高活性かつ高選択的な非亜鉛結合型 MMP-13 阻害薬の分子設計と合成」と題し、沢山のアイソザイムが存在することが知られているマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) の中で、変形性関節症 (osteoarthritis: OA) に大きく関与する MMP-13 に高選択的かつ非常に強い活性を示す新規阻害剤の開発に成功した。

関節軟骨の摩耗と破壊を主徴とする疾患である OA は、日本における 40 歳以上の推定患者数が 2,530 万人と言われており、安全性が高く有効な薬剤の開発が急務である。OA では軟骨欠損を補うために増加し肥大した活性化軟骨細胞から分泌されるプロテアーゼによって軟骨基質の変性が進行し、可動域が制限され、起立や歩行に大きな影響を与える。さらに進行すると軟骨下骨が露出し、骨棘 (こつきょく) と言われる骨変性を生じ、大きな痛みを伴う。

軟骨は骨の表面を覆うように存在しており、軟骨全体の 7 割程度を占める水を除いては、軟骨細胞と、コラーゲンやアグリカンからなる細胞外基質 (extracellular matrix: ECM) により構成されている。ECM の主な成分はコラーゲンで、その多くの部分はタイプ II コラーゲンである。ECM は軟骨細胞により制御されており、OA では関節軟骨の機械的負荷によって、軟骨の形成よりも分解が優位となり、ECM の減少をきたす。タイプ II コラーゲンやアグリカンなどの ECM は、2 価金属イオンを必要とする MMP やアグリカナーゼにより分解される。MMPs は、現在までに哺乳類で 20 種類以上が発見されており、中でも MMP-13 は、

1. OA 患者の軟骨に高発現している
2. MMP 酵素群の中でタイプ II コラーゲンに高い分解活性を示す
3. MMP-13 高発現マウスは OA の病態の進行に密接に関与している
4. MMP-13 ノックアウトマウスで OA モデルを作成しても軟骨変性・破壊が惹起されにくい

等の報告から、OA にとって重要な役割を担うことが示唆されている。

MMP-2、9 など、特定の MMP 類はがんに関与していることが知られており、がん治療を指向した MMP 阻害薬の開発研究が盛んに行われたが、初期の MMP 阻害薬のデザインは、酵素の活性中心に存在する亜鉛を補足するためのヒドロキサム酸などの亜鉛結合基 (zinc binding group: ZBG) の近傍に、コラーゲン等の基質の被切断部位付近のアミノ酸側鎖を模倣した置換基 (P1') を結合した偽基質を合成するというアプローチを基本としており、RS-

130,830 を含む、これらの非選択的 MMP 阻害薬の多くは関節痛や筋肉痛を代表とする musculoskeletal syndrome (MSS) と称される一連の副作用により臨床開発がことごとく中断された。この副作用の理由としては、低い酵素選択性に起因すると考えられた。そこで、軟骨の主成分であるタイプ II コラーゲンの分解活性の高い MMP-13 に着目し、酵素サブファミリー間で高度に構造が保存されている活性中心から離れた部分構造を利用した選択的 MMP-13 阻害薬を創出する新たな戦略を立案した。具体的には、MMP-13 との共結晶解析像に基づき、精密な structure-based drug design (SBDD) を行うことで、活性中心の亜鉛との相互作用が無くても、それを補完し得る新たな相互作用を探索し、デザイン・合成することとした。

武田薬品工業株式会社の化合物ライブラリーから MMP-13 阻害活性を指標としたハイスクリーンスクリーニングにより、キナゾリン **1** が発見された。他の多くのヒットケモタイプとは異なり、キナゾリン **1** の構造には、ヒドロキサム酸や、チオール、カルボン酸などの典型的な亜鉛結合基が見られなかったため、キナゾリン **1** と MMP-13 の触媒ドメインとの共結晶構造解析を行ったところ、MMP 活性中心の亜鉛とは結合していないことが判明した。また、X 線解析像から、酵素の主鎖との水素結合を介した相互作用に、ピリミジンカルボキサミド構造が重要であることが確認された (Figure 1)。続いて、解析像を基に仮説を立て、以下の阻害薬デザインを行うこととした。即ち、

1. 新たに認められた脂溶性 S1'' ポケットを志向した脂溶性 P1'' の導入
2. S1'' ポケットの奥に存在する Lys 残基との水素結合の獲得
3. S1' ポケットに収まる、P1' に相当するキナゾリンの部分構造であるベンゼン環の生物学的等価体として、チオフエン環を選択し、別骨格での合成展開も行うことにした。

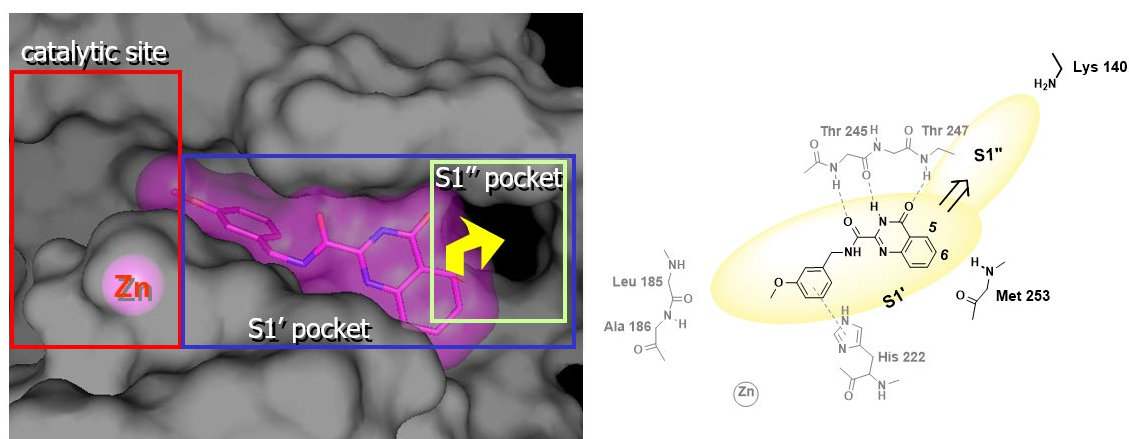


Figure 1. ヒットキナゾリン化合物 **1** と MMP-13 (PDB コード : 3WV2) の複合体の結晶構造。(A) MMP-13 の surface model。(B) 化合物 **1** および MMP-13 の結合モードの概略図。

キナゾリン P1'' 部分 (S1'' バインダー) 誘導体の MMP-13 阻害活性の結果から、X 線解析情報より予測し、行ったデザイン通り、適切な鎖長のリンカーを介して脂溶性基を導入する

ことにより活性が向上することが確認された。合成の難易度や、化合物の物性、ラットの経口吸収性や動態パラメーターなどを勘案してフェネチルオキシ基を選択し、フェネチルオキシ基のベンゼン環上の置換基として、S1'' ポケットの奥に存在する塩基性 Lys 残基との相互作用を指向しての置換基を探索したところ、カルボキシル基を導入したキナゾリン **38k** が極めて高い活性 ($IC_{50} = 0.0039 \text{ nM}$) を示した。また、キナゾリン環にフッ素原子を導入すると、活性が向上することも判明した。一方、ベンゼン環に代わってチオフェン環も活性を維持することから、キナゾリン誘導体と同様に S1'' バインダーとして、側鎖の導入をチオフェン環 5 位に行い、キナゾリン誘導体と同様、種々のリンカーを介して側鎖を導入したところ、ベンジルオキシメチル基の末端にカルボン酸を有するチエノピリミジン **64c** が高い阻害活性 ($IC_{50} = 0.0069 \text{ nM}$) を示すことが判明した。キナゾリン **38k** は、他の 8 種の主要な MMP サブファミリーや、副作用 (MSS) の一因と考えられている、亜鉛金属を有する tumor necrosis factor- α converting enzyme (TACE) に対して 41,000 倍以上の選択性を示した。また、別骨格のチエノピリミジン **64c** は同様の酵素群に対して、2,600 倍以上の選択性を示した。対照化合物としては、MSS で臨床開発が中止された亜鉛結合基を有する MMP 阻害薬 RS-130,830 (**82**: ロッシュ社) を合成し、その非選択的な阻害作用を確認した。また、キナゾリン **38k**、チエノピリミジン **64c** 両化合物ともにラットにおいて良好な経口吸収性および薬物動態プロファイルを示した。これらのうち、MMP-13 との共結晶 X 線構造像が得られたキナゾリン **38k** の解析を行ったところ、1. ヒット化合物と同様の結合様式を維持しており、2. 亜鉛との相互作用は見られず、3. 指向した脂溶性 S1'' ポケットを脂溶性のフェネチル基で効果的に充填しており、4. S1'' ポケットの奥の Lys 残基と阻害薬の側鎖カルボキシル基が相互作用していること、が確認された。また、MMP-13 の主鎖アミド結合と水素結合を 6 点形成するなど、非常に効率的に相互作用していることがわかった。即ち、現在臨床で用い

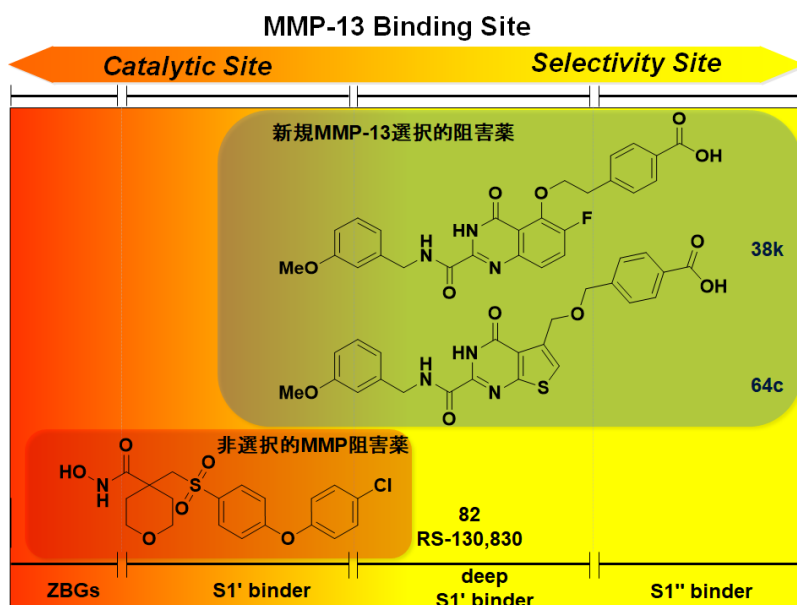


Figure 2. MMP 阻害薬の MMP-13 への結合様式の模式図。

られているプロテアーゼ阻害薬が活性中心の金属やアミノ酸をターゲットとし、基質認識サイトを広く使うのに対し、活性中心から離れた特異的な S1” ポケットを最大限活用することで、高い選択的を持つ MMP-13 阻害薬の創製が可能であることを実証するに至った (Figure 2)。

酵素阻害アッセイの高次のアッセイとして、*in vitro* 組織培養系における軟骨コラーゲンの分解抑制作用を検討した。ウシ由来の鼻軟骨に対し、サイトカインを添加後、被験化合物がコラーゲン分解をどの程度抑制できるかを、遊離したタイプ II コラーゲンの分解物である、ヒドロキシプロリン量を定量することにより測定した。結果、被験化合物 1 μ M 添加での阻害率は、非選択的 MMP 阻害薬 RS-130,830 (**82**) で 100%、キナゾリン **38k** で 73%、チエノピリミジン **64c** で 100%となることがわかった。次に、オリジナルの *in vivo* OA モデルを樹立し、被験化合物を経口投与し、関節軟骨の分解抑制率を測定した。即ち、ラットの後肢の膝関節にモノヨード酢酸を投与し、軟骨細胞の糖代謝を阻害することで死滅させ OA 様の症状を発症させた動物モデルに、MMP-13 阻害薬を経口投与 (10 mg/kg) し、軟骨のタイプ II コラーゲンの分解産物である type II collagen C-terminal telopeptide (CTX-II) をマーカーとして関節内の軟骨破壊抑制率を調べたところ、非選択的亜鉛結合型 MMP 阻害薬 RS-130,830 (**82**) は 87%、キナゾリン **38k** の一ナトリウム塩 (**54**) は 69%、チエノピリミジン **64c** の二ナトリウム塩 (**81**) は 31%の抑制効果を見せた (Figure 3)。

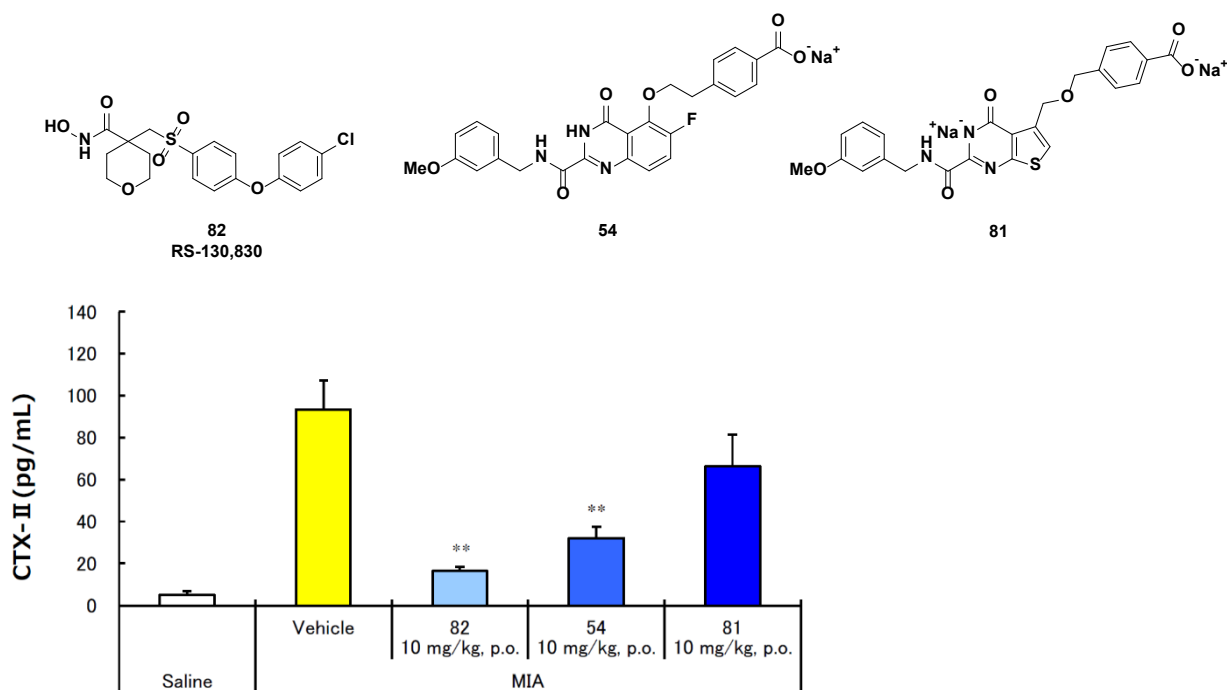


Figure 3. モノヨード酢酸 (MIA) 誘発 OA のラットモデルにおける軟骨分解に対する MMP 阻害薬の分解抑制効果。II 型コラーゲン由来の C 末端テロペプチド (CTX-II) レベルは、MIA の関節内注射の 4 時間後に測定した。データは平均 \pm SEM ($n = 6$) として表示した。**, $P < 0.01$ vs vehicle 群 (Dunnett's test を使用した二元配置分散分析)

以上、副作用の無い変形性関節症（OA）治療薬の創製を目指し、従来の亜鉛結合型非選択的阻害薬とは異なり、活性中心の亜鉛と結合しない MMP-13 選択的阻害薬のデザイン戦略を立案した。X線共結晶解析像に基づき S1” ポケットとの相互作用を活用して SBDD と合成を行った結果、強力な MMP-13 阻害活性と極めて高い選択性を有する化合物の創出に成功し、立案したデザイン戦略の妥当性を示した。

創出した高活性・高選択的 MMP-13 阻害薬の高次評価の結果、組織培養系活性および in vivo OA モデルの活性と、酵素阻害活性との乖離が共に大きく、その有効性を十分に実証するには至らなかったが、これら高次評価系では、OA 治療への適用可否判断は困難であると考えられたため、より病態を反映した、適切な in vitro、in vivo 評価系の開発は必須と考えられ、これらの研究の進展が待たれる。一方、優れた活性・物性・経口吸収性と、ラットの 2 週反復投与毒性試験より確認された高い安全性を示す MMP-13 高選択的阻害薬チエノピリミジン **64c** は現在、非営利組織 The Structural Genomics Consortium (SGC) を通じ、創薬および機能解析のツールとして、全世界の研究者が入手し医薬品開発研究に活用出来るように公開・配布されている。

以上の業績は、ターゲット酵素の高選択的、高活性阻害剤開発を SBDD によって達成した極めて優れた例であり、博士（薬科学）の授与にふさわしいものと判断した。