

新規 CCR2/CCR5 アンタゴニスト：
ヘテロアロイルフェニルウレア誘導体に関する探索研究

2013年3月

奈良先端科学技術大学院大学
物質創成科学研究科

岡本昌之

目次

第 1 章	緒言	P. 1
第 2 章	CCL2 誘導細胞遊走に対するヘテロアロイルフェニルウレア誘導体の阻害活性	
	序論	P. 9
	第 1 節	CCR2 アンタゴニストの探索
	第 2 節	ヘテロアロイルフェニルウレア誘導体の構造活性相関
	第 3 節	作用機序検討 1
	第 4 節	作用機序検討 2
	第 5 節	まとめ
第 3 章	炎症性疾患モデルにおける作用	
	序論	P. 47
	第 1 節	糖尿病性腎症モデルにおける TLK-19705 の効果
	第 2 節	動脈硬化モデルにおける TLK-19705 の効果
	第 3 節	代謝抑制のための構造展開
	第 4 節	関節炎モデルにおける SKL-02886 の効果
	第 5 節	まとめ
第 4 章	ヘテロアロイルフェニルウレア誘導体の安全性課題の解決	
	序論	P. 85
	第 1 節	中枢作用と肝障害の回避
	第 2 節	アジュバント関節炎における TLK-48462 の効果
	第 3 節	疼痛モデルにおける TLK-48462 の効果
	第 4 節	まとめ
第 5 章	結語	P. 117
	謝辞	P. 121
	研究業績リスト	P. 122

略語表

ACE 阻害剤: アンジオテンシン変換酵素阻害剤

AGE: 終末糖化産物

AngII: アンジオテンシン II

AUC: 血漿中総薬物濃度

AUC_{i.v.}: 静脈投与時の血漿中総薬物濃度

AUC_{p.o.}: 経口投与時の血漿中総薬物濃度

BA: バイオアベイラビリティ

b.i.d: 一日 2 回投与

CALDAG-GEFs: Ca- and DAG-regulated GEFs

Cap: カプトプリル

CC50 値: 50%細胞毒性を示す被験物質の濃度

CCL2: C-C Chemokine Ligand 2

CCL3: C-C Chemokine Ligand 3

CCL4: C-C Chemokine Ligand 4

CCL5: C-C Chemokine Ligand 5

CCL7: C-C Chemokine Ligand 7

CCL11: C-C Chemokine Ligand 11

CCL17: C-C Chemokine Ligand 17

CCL18: C-C Chemokine Ligand 18

CCR1: C-C Chemokine Receptor 1

CCR2: C-C Chemokine Receptor 2

CCR3: C-C Chemokine Receptor 3

CCR4: C-C Chemokine Receptor 4

CCR5: C-C Chemokine Receptor 5

CRP: C 反応性タンパク

CXCL8: C-X-C Chemokine Ligand 8

CX3CL1: C-X3-C Chemokine Ligand 1

CXCR1: C-X-C Chemokine Receptor 1

CXCR2: C-X-C Chemokine Receptor 2

CXCR3: C-X-C Chemokine Receptor 3

CXCR4: C-X-C Chemokine Receptor 4

Di.v.: 静脈投与時の投与量

Dp.o.: 経口投与時の投与量
DMF: ジメチルホルムアミド
DMSO: ジメチルスルホキシド
DOCK2: dedicator of cytokinesis 2
GOT: グルタミン酸・オキサロアセティック・トランスアミナーゼ
GPCR: Gタンパク質結合受容体
GPT: グルタミン酸・ピルビク・アミナーゼ
IC50 値: 細胞遊走に対し 50%阻害を示す被験物質の濃度
IL-6: インターロイキン-6
IL-1 β : インターロイキン-1 ベータ
iNOS: 誘導型一酸化窒素合成酵素
KO: ノックアウト
LC: 液体クロマトグラフィー
LC/MS/MS 法: 液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法
LogD: pH を考慮したオクタノール水分配係数
MRT: 平均滞留時間
MS: 質量分析計
MTX: メトトレキサート
NMDA 受容体: N-methyl-D-aspartate 受容体
oxLDL: 酸化低密度リポタンパク質
PBMC: ヒト末梢血単核細胞
PMN: ヒト末梢血多核細胞
PG: セロシオン(プロパゲルマニウムを成分とする製剤)
PI3K: phosphatidylinositol-3-kinase
PKC: プロテインキナーゼ C
Rac-GEF: グアニンヌクレオチド交換因子
ROCK: Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase
TGF- β : ベータ型トランスフォーミング増殖因子
THF: テトラヒドロフラン
TM: トランスメンブレン
TNF- α : 腫瘍壊死因子
TPSA: 化合物の極性表面積
TRAP: Target-Related Affinity Profiling
UUO: 一側尿管結紮

VCAM-1: vascular adhesion molecule-1

Vdss: 分布容積

x3d/wk: 1日1回の隔日投与

第1章 緒言

ケモカインとその受容体は白血球の遊走を制御するだけでなく、慢性炎症にも関与している(1,2)。今日までに約 50 種のケモカインと 20 種のそれらの受容体が同定され(3, 4)、動脈硬化、糖尿病性腎症、関節リウマチ、多発性硬化症、慢性閉塞性肺疾患などの慢性炎症疾患の病態進行に関与する重要な因子として報告されてきた(5-11)。

C-C Chemokine Ligand 2 (CCL2)はケモカイン・スーパーファミリーのなかで最も研究が行われているケモカインである(12-14)。CCL2 は、2 つのシステイン残基が連続する CC ケモカインに属し、細胞膜 7 回膜貫通型レセプターに属する C-C Chemokine Receptor 2 (CCR2)を受容体とする。CCL2 は内皮細胞、繊維芽細胞、平滑筋細胞、単球、および脂肪細胞などの多くの細胞から分泌され(15)、単球・マクロファージの炎症部位への遊走を促す(16) (Figure 1-1)。

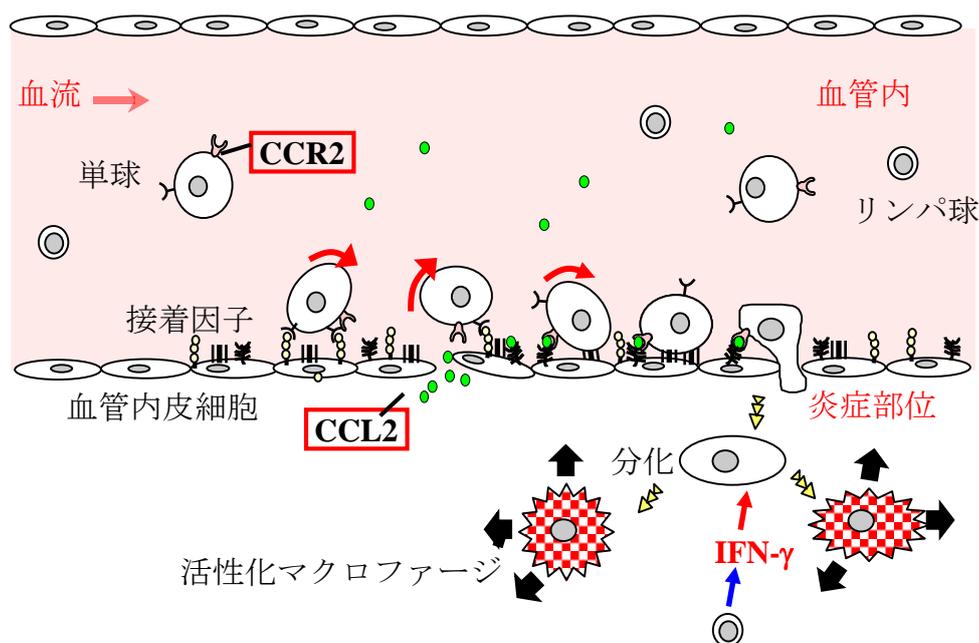


Figure 1-1. CCL2/CCR2 は炎症部位への単球・マクロファージの遊走を促す

ケモカインによるシグナルは、殆どの場合、百日咳毒素(pertussis toxin)で抑制されることから、主に Gi クラスの三量体 G 蛋白質と共役すると考えられている(17)。ケモカインが受容体に結合すると、活性化した G 蛋白質サブユニットが複数のシグナル伝達に働き、細胞誘導を制御することが報告されている(18, 19)(Figure 1-2)。一般的には、細胞遊走の進行方向では

phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)や dedicator of cytokinesis 2 (DOCK2)がグアニンヌクレオチド交換因子 (Rac-GEF)を介してRacを活性化して先端端形成をし、細胞後方では RhoA が Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase (ROCK)を通じて内皮細胞からの剥離を促進し、Ca- and DAG-regulated GEFs (CALDAG-GEFs)が Rap を介して細胞極性に関与することで、細胞遊走を可能にする細胞骨格の再構成が行われると考えられている (18, 19)。最近、これらの制御因子以外に CCR2 および C-C Chemokine Receptor 5 (CCR5)では、細胞内 C 末端領域に結合する FROUNT の存在が報告された (20)。FROUNT は、CCR2 および CCR5 の C 末端領域に選択的に結合し、G 蛋白質とともに、シグナル伝達を制御することが提唱されている(20)。

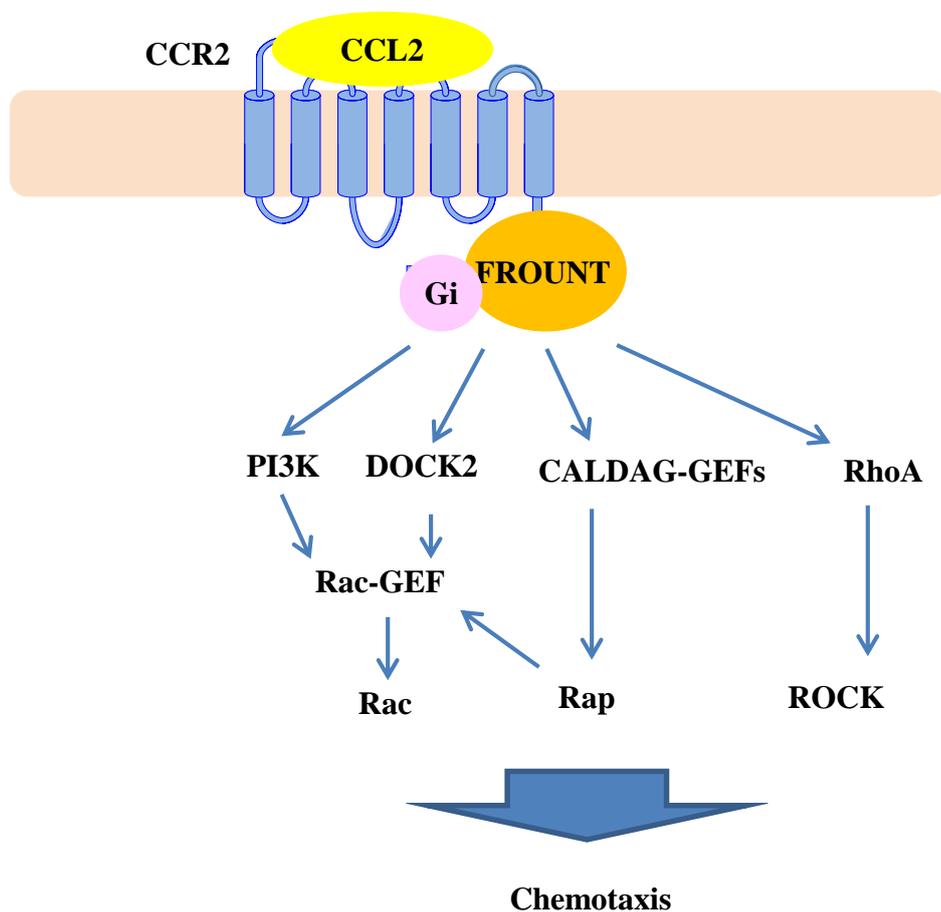


Figure 1-2. 細胞遊走に関するシグナル伝達経路

現在、いくつかの CCR2 アンタゴニストが肝線維化、糖尿病性腎症および多発性硬化症などで開発が進められているが(14)、多くの動物病態モデルや

臨床試験が行われているのにも関わらず CCR2 アンタゴニストの有用性については結論が出ていない状態である。例えばヒト CCL2 抗体(ABN912)(21)や CCR2 抗体(MLN-1202)(22)は関節リウマチ患者に対して有意な改善効果を示すことができなかった。一方、MLN-1202 は多発性硬化症を対象とした Phase II 試験では成功を収め(23)、さらに動脈硬化患者のリスクファクターである C 反応性タンパク (CRP) レベルを減少させたことが報告されている(24)。

プロパゲルマニウムを成分とするセロシオン (PG) は B 型慢性肝炎の治療剤であり、CCR2 アンタゴニストとしても生体内で作用することが分かっている。その安全性と利便性により、PG は CCR2 アンタゴニストの治療剤としての有効性を評価するツールとしても使用され、脂肪肝(25)、動脈硬化(26-28)、腎線維化(29)、腎虚血再灌流障害(30)、および糖尿病性糸球体硬化症(31)の病態モデルで効果を示すことが報告されてきている (Figure 1-3)。

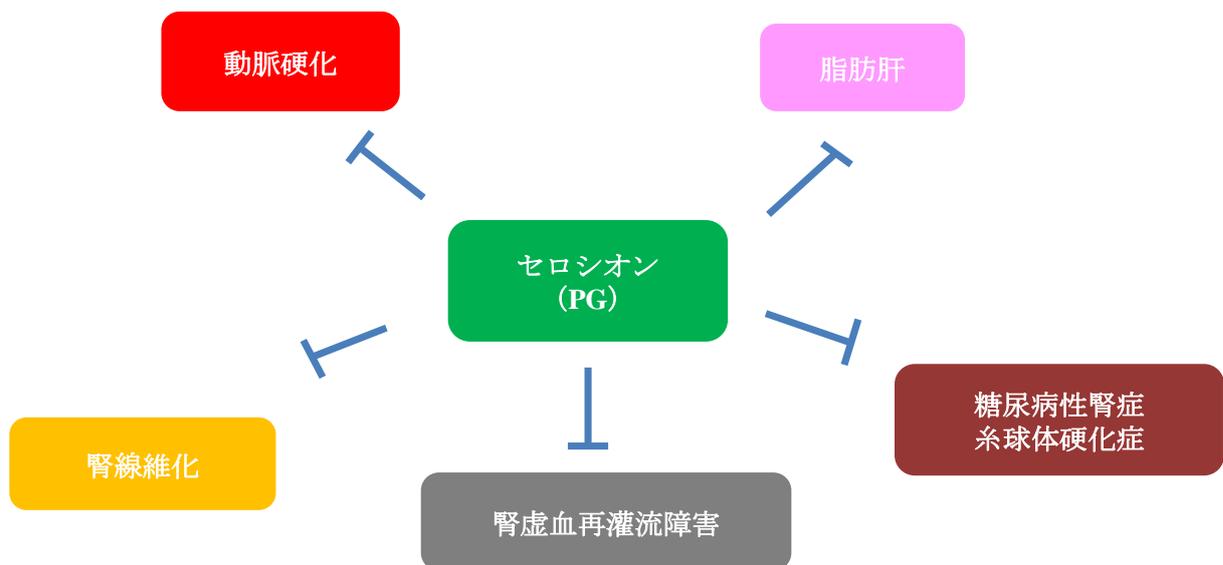


Figure 1-3. PG で有用性を示されている炎症性疾患モデル

また PG は、リガンドである CCL2 の CCR2 への結合や、CCL2 が介する細胞内カルシウム流入に作用することなく、単球の遊走を選択的に阻害するユニークな CCR2 アンタゴニスト活性を示す薬剤であることも知られている(32)。CCR2 が属する class A G タンパク質結合受容体(GPCR) は、リガンド結合部位とは異なるアロステリックな制御に関する報告が多くなされ、GPCR の制御方法として以前から応用されている(33-35)。ムスカリン性アセチルコリン受容体の研究分野では、アロステリック・サイトにはサブタイプ

特異的なアミノ酸が存在していることが報告されている。このことから、アロステリックな制御は、サブタイプ間で保存される領域の多いアミノ酸配列に結合するオルソステリックな制御よりも、選択性が高く副作用の少ない薬剤となる可能性が高いと期待されている(36)。PG も CCL2 の CCR2 への結合を阻害しないことから、アロステリックな制御により単球の遊走を選択的に阻害することが示唆される。

PG は化学名が 3-oxygermylpropionic acid polymer と示されるようにポリマー構造をとる製剤である (Figure 1-4)。この構造の不均一性のため、プロパゲルマニウムメカニズム解析は十分に進んでいないが、本研究では医薬として必要な要件は、PG のような阻害様式を持つことであるという考えを基に、低分子 CCR2 アンタゴニストを探索することとした。更に、その探索ツールとしてテリック社の TRAP (Target-Related Affinity Profiling) 技術を活用し、アロステリックな制御をする低分子 CCR2 アンタゴニストの探索研究を開始した。

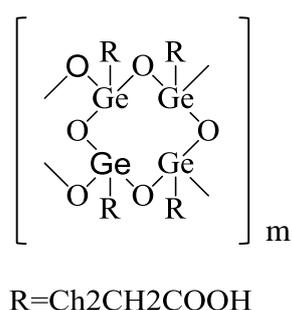


Figure 1-4. セロシオン (PG)の構造

本論文は、第1から第5章までの構成とする。本章では本研究の背景となる事項について紹介した。第2章では、ヘテロアロイルフェニルウレア誘導体の CCR2/CCR5 アンタゴニスト活性およびその作用機序について論ずる。第3章では各種炎症性疾患における新規 CCR2/CCR5 アンタゴニストの病態進行抑制効果と代謝安定性獲得のための展開について述べる。第4章では安全性課題の解決と疼痛モデルにおける CCR2/CCR5 アンタゴニストの効果を検討した結果を述べ、第5章で本研究の結語を述べることにする。

参考文献

1. D'Ambrosio D., Panina-Bordignon P., and Sinigaglia F., Chemokine receptors in inflammation: an overview. *Journal of Immunological Methods* 273, 3-13 (2003)
2. Lukacs N.W., Role of chemokines in the pathogenesis of asthma. *Nature reviews Immunology* 1, 108-116 (2001)
3. Zlotnik A., and Yoshie O., Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12, 121-127 (2000)
4. Moser B., Wolf M., Walz A., and Loetscher P., Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends in Immunology* 25, 75-84 (2004)
5. Haringman J.J., Ludikhuize J., and Tak P.P., Chemokines in joint disease: the key to inflammation? *Annals of the Rheumatic Diseases* 63, 1186-1194 (2004)
6. Charo I.F., and Ransohoff R.M., The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *The New England Journal of Medicine* 354, 610-621 (2006)
7. Bracke K.R., Demedts I.K., Joos G.F., and Brusselle G.G., CC-chemokine receptors in chronic obstructive pulmonary disease. *Inflammation Allergy-Drug Targets* 6, 75-79 (2007)
8. Barlic J., and Murphy P.M., Chemokine regulation of atherosclerosis. *Journal of Leukocyte Biology* 82, 226-236 (2007)
9. Hamann I., Zipp F., and Infante-Duarte C., Therapeutic targeting of chemokine signaling in Multiple Sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences* 274, 31-38 (2008)
10. Koenen R.R., and Weber C., Therapeutic targeting of Chemokine interactions in atherosclerosis. *Nature Reviews Drug Discovery* 9, 141-153 (2010)
11. Navarro-González J.F., Mora-Fernández C., Muros de Fuentes M., and García-Pérez J., Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nature Reviews Nephrology* 7, 327-340 (2011)
12. Dawson J., Miltz W., Mir A.K., and Wiessner C., Targeting monocyte chemoattractant protein-1 signaling in disease. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 7, 35-48 (2003)
13. Deshmane S.L., Kremlev S., Amini S., and Sawaya B.E., Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 29, 313-326 (2009)

14. Kang Y.S., Cha J.J., Hyun Y.Y., and Cha D.R., Novel C-C chemokine receptor 2 antagonists in metabolic disease: a review of recent developments. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 20, 745-756 (2011)
15. Cushing S.D., Berliner J.A., Valente A.J., Territo M.C., Navab M., Parhami F., Gerrity R., Schwartz C.J., and Fogelman A.M., Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 5134-5138 (1990)
16. Carr M.W., Roth S.J., Luther E., Rose S.S., and Springer T.A., Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 3652-3656 (1994)
17. Casarosa P., Bakker R.A., Verzijl D., Navis M., Timmerman H., Leurs R., and Smit M.J., Constitutive signaling of the human cytomegalovirus-encoded chemokine receptor US28. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 1133-1137 (2001)
18. Thelen M., and Stein J.V., How chemokines invite leukocytes to dance. *Nature Immunology* 9, 953-959 (2008)
19. Kinashi T., Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nature Reviews Immunology* 5, 546-559 (2005)
20. Toda E., Terashima Y., Sato T., Hirose K., Kanegasaki S., and Matsushima K., FROUNT is a common regulator of CCR2 and CCR5 signaling to control directional migration. *The Journal of Immunology* 183, 6387-6394 (2009)
21. Haringman J.J., Gerlag D.M., Smeets T.J., Baeten D., van den Bosch F., Bresnihan B., Breedveld F.C., Dinant H.J., Legay F., Gram H., Loetscher P., Schmouder R., Woodworth T., and Tak P.P., A randomized controlled trial with an anti-CCL2 (anti-monocyte chemotactic protein 1) monoclonal antibody in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 54, 2387-2392 (2006)
22. Vergunst C.E., Gerlag D.M., Lopatinskaya L., Klareskog L., Smith M.D., van den Bosch F., Dinant H.J., Lee Y., Wyant T., Jacobson E.W., Baeten D., and Tak P.P., Modulation of CCR2 in rheumatoid arthritis: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Arthritis & Rheumatism* 58, 1931-1939 (2008)
23. Xia M., and Sui Z., Recent developments in CCR2 antagonists. *Expert Opinion*

- on Therapeutic Patents* 19, 295-303 (2009)
24. Gilbert J., Lekstrom-Himes J., Donaldson D., Lee Y., Hu M., Xu J., Wyant T., and Davidson M; MLN1202 Study Group. Effect of CC chemokine receptor 2 CCR2 blockade on serum C-reactive protein in individuals at atherosclerotic risk and with a single nucleotide polymorphism of the monocyte chemoattractant protein-1 promoter region. *American Journal of Cardiology* 107, 906-911 (2011)
 25. Tamura Y., Sugimoto M., Murayama T., Ueda Y., Kanamori H., Ono K., Ariyasu H., Akamizu T., Kita T., Yokode M., and Arai H., Inhibition of CCR2 ameliorates insulin resistance and hepatic steatosis in db/db mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 28, 2195-2201 (2008)
 26. Yamashita T., Kawashima S., Ozaki M., Namiki M., Inoue N., Hirata K., and Yokoyama M., Propagermanium reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice via inhibition of macrophage infiltration. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22, 969-974 (2002)
 27. Eto Y., Shimokawa H., Tanaka E., Morishige K., Fuchigami M., Ishiwata Y., Matsushima K., and Takeshita A., Long-term treatment with propagermanium suppresses atherosclerosis in WHHL rabbits. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 41, 171-177 (2003)
 28. Shimokawa H., Eto Y., Miyata K., Morishige K., Kandabashi T., Matsushima K., and Takeshita A., Propagermanium suppresses macrophage-mediated formation of coronary arteriosclerotic lesions in pigs in vivo. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 41, 372-380 (2003)
 29. Kitagawa K., Wada T., Furuichi K., Hashimoto H., Ishiwata Y., Asano M., Tekeya M., Kuziel W.A., Matsushima K., Mukaida N., and Yokoyama H., Blockage of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney. *The American Journal of Pathology* 165, 237-246 (2004)
 30. Furuichi K., Wada T., Iwata Y., Kitagawa K., Kobayashi K., Hashimoto H., Ishiwata Y., Asano M., Wang H., Matsushima K., Takeya M., Kuziel W.A., Mukaida N., and Yokoyama H., CCR2 signaling contributes to ischemia-reperfusion injury in kidney. *Journal of the American Society of Nephrology* 14, 2503-2515 (2003)
 31. Kanamori H., Matsubara T., Mima A., Sumi E., Nagai K., Takahashi T., Abe H., Iehara N., Fukatsu A., Okamoto H., Kita T., Doi T., and Arai H., Inhibition of

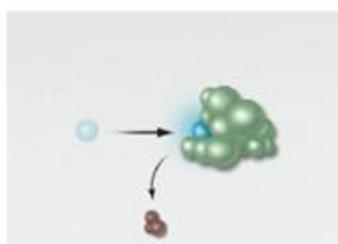
- MCP-1/CCR2 pathway ameliorates the development of diabetic nephropathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 360, 772-777 (2007)
32. Yokochi S., Hashimoto H., Ishiwata Y., Shimokawa H., Haino M., Terashima Y., and Matsushima K., An anti-inflammatory drug, propagermanium, may target GPI-anchored proteins associated with an MCP-1 receptor, CCR2. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 21, 389-398 (2001)
33. Bruns R.F., and Fergus J.H., Allosteric enhancement of adenosine A1 receptor binding and function by 2-amino-3-benzoylthiophenes. *Molecular Pharmacology* 38, 939-949 (1990)
34. Bhattacharya S., and Linden J., Effects of long-term treatment with the allosteric enhancer, PD81,723, on Chinese hamster ovary cells expressing recombinant human A1 adenosine receptors. *Molecular Pharmacology* 50, 104-111 (1996)
35. Gregory K.J., Sexton P.M., and Christopoulos A., Allosteric modulation of muscarinic acetylcholine receptors. *Current Neuropharmacology* 5, 157-167 (2007)
36. Haga K., Kruse A.C., Asada H., Yurugi-Kobayashi T., Shiroishi M., Zhang C., Weis W.I., Okada T., Kobilka B.K., Haga T., and Kobayashi T., Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist. *Nature* 482, 547-551 (2012)

第2章 CCL2 誘導細胞遊走に対するヘテロアロイルフェニルウレア誘導体の阻害活性

序論

テリック社の TRAP 技術は、化学構造由来の分子記述子の代わりにタンパクへの結合嗜好性を示す affinity fingerprints を使用したコンピューショナル・ドラッグ・ディスカバリー技術である(1)。TRAP 技術では、酵素、受容体を含む 15 から 20 種のタンパクへの結合親和性を測定し、化合物ごとに affinity fingerprints を作成し、更にその affinity fingerprints 類似性をもとにテリック社の保有する化合物ライブラリーをクラスター分類している(Figure 2-1)。

1) 標的タンパクへの結合親和性を測定



2) 複数のタンパクに対する結合親和性を測定



*: タンパクへの結合定数

3) affinity fingerprints の作成およびデータベース構築

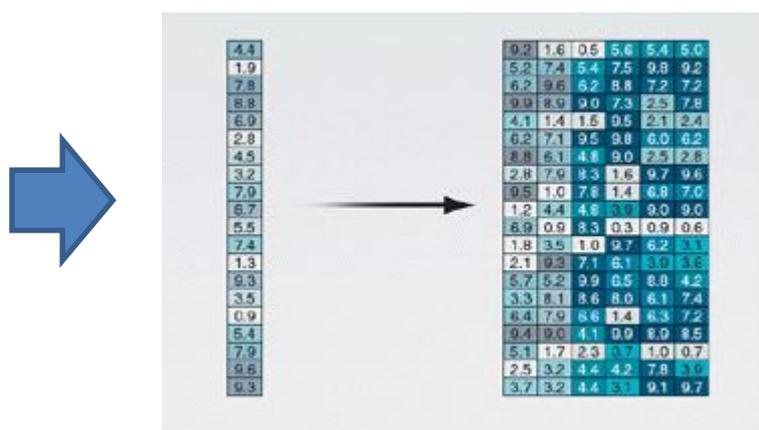


Figure 2-1. 低分子化合物の Affinity fingerprint の作成とデータベース構築

即ち化合物の構造的な特徴ではなく、タンパクへの結合親和性という化合物の生物学的特徴で分類しているところが、TRAP技術の特徴である。テリック社のホームページ上(<http://www.telik.com>)では、異なる骨格をもつ化合物が類似する affinity fingerprints を示す一例が紹介されている(Figure 2-2)。

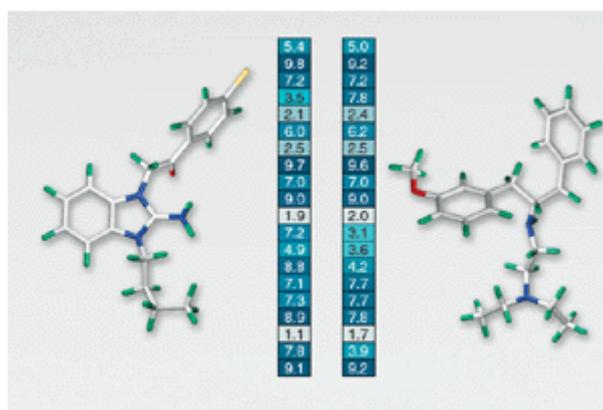


Figure 2-2. 異なる化合物が類似した affinity fingerprints を示す例

このことは、スクリーニングでヒットした化合物の affinity fingerprints を調べることで、類似した affinity fingerprints を持つ低分子化合物をデータベースから複数選択することができることを示している。本研究では、アロステリックな制御をする低分子 CCR2 アンタゴニストの探索が研究目的であることから、リガンドの受容体への結合を評価するバインディング・アッセイをスクリーニング評価には使用しないことを決めていた。一方で、本研究のスクリーニング試験として使用する細胞遊走に対する阻害活性の評価は、一度に処理できる化合物数が限定されるデメリットを抱えていた。この点を克服するためには、TRAP技術のように効率的に化合物を絞り込むことができる手法が本研究には適している判断し、テリック社の TRAP 技術を使用して CCR2 アンタゴニストの探索を行うことにした。

第1節 CCR2 アンタゴニストの探索

第1項 実験方法

1-1) ケモタキシス・アッセイ

CCR2 アンタゴニストのスクリーニング試験は、ヒト単球系細胞株である THP-1 細胞を用い、CCL2 が誘導する細胞遊走に対する阻害活性を評価することで行った。2.5 nM に調製した human CCL2 (ペプロテック社) を含むアッセイ培地(25mM HEPES/NaOH, RPMI1640 + 0.1% BSA)を 48 穴マイクロケモタキシスチャンバーの lower chamber に 26 μ L 加え、5 μ M pore size PVP free membrane filter およびシリコンゴムガasket をセットした後、upper chamber をセットした。目的の濃度に調製した被験物質を処理した THP-1 細胞 (2×10^6 cells/mL)を upper chamber の各ウェルに 50 μ L 加えた。37°C で 2 時間インキュベートした後に membrane filter を取り外し、非遊走細胞を除去した。Membrane filter はその後、メタノールで固定し、Diff-Quick (国際試薬) を用いて遊走細胞を染色し、顕微鏡下で細胞数をカウントした。CCL2 非存在下で遊走する細胞数を差し引いたものを遊走細胞数とし、被験物質非処理の条件で CCL2 により遊走する細胞数に対して比率を算出することで細胞遊走阻害作用を評価した。

1-2) 細胞毒性

THP-1 細胞 (2×10^6 cells/mL) 0.1 mL を 96 穴 プレートに播種し、目的の濃度に調製した被験物質を添加した後、24 時間培養した。培養後、WST-1 試薬を添加し 2 時間培養後に生じたホルマザン色素を吸光度 450 nm/690 nm で測定した。

1-3) ヒット化合物の選択

ケモタキシス・アッセイにより細胞遊走阻害作用の認められた化合物をテリック社に報告し、テリック社が保有する化合物ライブラリーのデータベースより affinity fingerprints の類似した化合物群を選択し、再度ケモタキシス・アッセイにより細胞遊走阻害作用を評価した(第1項、1-1)に準じて行った)。この工程を複数繰り返すことでヒット化合物を同定した。

第2項 実験結果

TRAP 技術により選択された代表的な化合物セットを用い、細胞遊走阻害活性を評価した結果、ヘテロアロイルフェニルウレア構造を有する化合物群に CCL2 誘導の細胞遊走を阻害するものが存在することを確認した。スクリーニング試験によりヒットした compound 1 は、CCL2 誘導のケモタキシスを 3.9 μM の濃度で 50%抑制した（以下 50%抑制を示す濃度を IC50 値として表記する）。一方細胞毒性の指標として用いる 50%細胞毒性濃度（以下 CC50 値と表記する）は、50 μM 以上であった(Figure 2-3)。

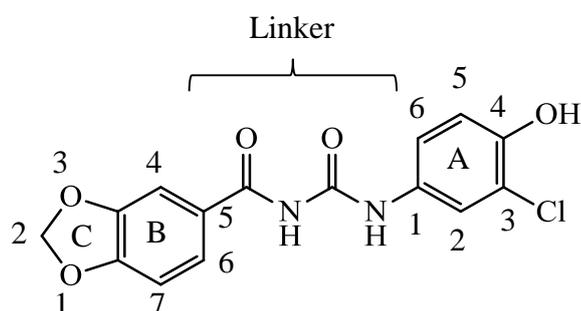


Figure 2-3. Compound 1: IC50= 3.9 μM , CC50 > 50 μM

第3項 考察

スクリーニング試験の結果、ヘテロアロイルフェニルウレア構造を有する compound1 が、CCL2 誘導の THP-1 細胞の遊走を阻害することが明らかとなった。このケモタキシスの阻害活性は、細胞障害の結果によるものではないことを確認している。Compound 1 はアシルウレアを介して A 環、B 環および C 環の 3 つの環構造を有する化合物である。そこでこれらの 3 つの環構造の置換あるいは修飾を行うことで最適化を進めることにした。

第2節 ヘテロアロイルフェニルウレア誘導体の構造活性相関

序論

スクリーニング試験によりヘテロアロイルフェニルウレア構造を有する化合物に CCR2 アンタゴニスト活性が認められたことから、ヘテロアロイルフェニルウレア誘導体を合成し、構造活性相関を実施した。

第1項 実験方法

1-1) ヘテロアロイルフェニルウレア誘導体の合成

Compound 1

N-((3-クロロ-4-ヒドロキシフェニル)カルバモイル)ベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボキサミド

塩化ピペロニロイル (3.02g, 16.36 mmol)を氷浴で冷却し、28-30%水性アンモニア (30 mL)を滴下して加えた。氷浴を取り去り、混合液を室温にて1時間攪拌した。生成した固体をろ過により集め、水で洗浄し、高真空乾燥することでベンゾ[d]1,3-ジオキサレン-5-カルボキサミドを白色粉末として得た。この物質の一部 (0.199 g, 1.20 mmol)を無水ジクロロメタン(6 mL)に懸濁し、ジクロロメタンにて調製した2 Mの塩化オキサリル溶液 (0.91 mL, 1.82 mmol)で処理した。混合液を穏やかに16時間加熱還流した後、室温に冷却した。溶媒を減圧除去し、残渣として得たベンゾ[d][1,3]-ジオキサール-5-カルボニル イソシアネートは直ちに無水テトラヒドロフラン (THF)に溶解した。その後、4-アミノ-2-クロロフェノール (0.174 g, 1.21 mmol)の無水 THF 溶液 (2 mL)を氷冷下加えた。氷浴を取り去り、混合液を室温で2時間攪拌した。生成した固体をろ過により集め、ジクロロメタンで洗浄し、高真空乾燥することで compound 1 の白色粉末 0.183 g (46 % yield)を得た。HPLC: $t_R = 14.6$ min (純度 97%), MS ESI⁽⁺⁾ = 333 (M-H). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ : 6.15 (s, 2H), 6.94 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.06 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.23 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz), 7.64 (m, 2H), 10.02 (s, 1H), 10.68 (s, 1H), 10.82 (s, 1H).

Compound 2-7 は compound 1 と同様の方法で合成した。

Compound 2

N-((3-クロロフェニル)カルバモイル)ベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボキサミド

白色粉末 (38 % yield), HPLC: $t_R = 17.4$ min (純度 95%), MS ESI⁽⁻⁾ = 317 (M-H). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ : 6.16 (s, 2H), 7.06 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.15 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.35 (t, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.44 (d, 1H, $J = 8.3$ Hz), 7.59 (d, 1H, $J = 1.6$ Hz), 7.67 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.83 (d, 1H, $J = 2.0$ Hz), 10.93 (s, 1H), 10.95 (s, 1H).

Compound 3

N-((3,4-ジクロロフェニル)カルバモイル)ベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボキサミド

白色固体 (41 % yield), HPLC: $t_R = 18.5$ min (純度 96%), MS ESI⁽⁻⁾ = 351 (M-H). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ : 6.16 (s, 2H), 7.07 (d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.59 (t, 3H, $J = 8.1$ Hz), 7.68 (d, 1H, $J = 7.9$ Hz), 8.01 (s, 1H), 10.96 (s, 1H), 10.97 (s, 1H).

Compound 4

N-((3-(トリフルオロメチル)フェニル)カルバモイル)ベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボキサミド

白色固体 (88 % yield), HPLC: $t_R = 16.3$ min (純度 98%), MS ESI⁽⁺⁾ = 353 (M-H). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ : 6.15 (s, 2H), 7.06 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.44 (d, 1H, $J = 7.3$ Hz), 7.59 (m, 2H), 7.69 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.78 (d, 1H, $J = 7.7$ Hz), 8.01 (s, 1H), 10.94 (s, 1H), 11.05 (s, 1H).

Compound 5

N-((3-イソプロポキシフェニル)カルバモイル)ベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボキサミド

白色固体 (64 % yield), HPLC: $t_R = 16.7$ min (純度 99%), MS ESI⁽⁻⁾ = 341 (M-H). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ : 1.27 (d, 6H, $J = 6.0$ Hz), 4.60 (q, 1H, $J = 6.0$ Hz), 6.16 (s, 2H), 6.66 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.05 (m, 2H), 7.22 (m, 2H), 7.59 (s, 1H), 7.68 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 10.82 (s, 2H).

Compound 6

N-([1,1'-ビフェニル]-3-イルカルバモイル)ベンゾ[d][1,3]ジオキサール-5-カルボキサミド

白色固体 (39 % yield), HPLC: $t_R = 17.6$ min (純度 98%), MS ESI⁽⁻⁾ = 359 (M-H). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ : 6.16 (s, 2H), 7.07 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.14 (m, 2H),

7.49 (m, 3H), 7.61 (s, 2H), 7.68 (m, 3H), 7.85 (s, 1H), 10.86 (s, 1H), 10.96 (s, 1H).

Compound 7

N-([1,1'-ビフェニル]-4-イルカルバモイル)ベンゾ[*d*][1,3]ジオキソール-5-カルボキサミド

白色固体 (80 % yield), HPLC: $t_R = 18.2$ min (純度 96%), MS ESI⁽⁻⁾ = 359 (M-H). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 6.16 (s, 2H), 7.07 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.34 (t, 1H, $J = 7.3$ Hz), 7.46 (t, 2H, $J = 7.8$ Hz), 7.61 (s, 2H), 7.68 (m, 6H), 10.89 (s, 1H), 10.94 (s, 1H).

Compound 8

N-((3-クロロフェニル)カルバモイル)-*N*-メチルベンゾ[*d*][1,3]ジオキソール-5-カルボキサミド

リチウムビス(トリメチルシリル)アミド (1 M の THF 溶液 0.38 mL) を compound 2 (0.10g, 0.31 mmol) のジメチルホルムアミド (DMF) 溶液 (5 mL) に加え 30 分間攪拌した。ヨウ化メチル (69 μ L, 1.1 mmol) を加え、溶液を更に 4 時間室温にて攪拌した。その後 15 mL の水を加え、ろ過により固体を除去し、ろ液を回収し、溶媒を減圧除去した。生成した個体を 30 mL の水で洗浄し、ろ過により回収し、減圧乾燥することで compound 8 (16 mg, 16 % yield) を得た。HPLC: $t_R = 17.0$ min (純度 85%), MS ESI⁽⁻⁾ = 331 (M-H). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 3.32 (s, 3H), 6.07 (s, 2H), 6.90 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 7.01 (s, 1H), 7.09 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 7.24 (m, 2H), 7.32 (m, 1H), 7.73 (s, 1H), 11.41 (s, 1H).

Compound 9

N-((3-クロロフェニル)(メチル)カルバモイル)-*N*-メチルベンゾ[*d*][1,3]ジオキソール-5-カルボキサミド

Compound 2 (0.098 g, 0.307 mmol) を加えた DMF 溶液 (5 mL) に水酸化ナトリウム (0.025 g, 0.625 mmol) を加え、混合液を室温で 30 分間攪拌した。ヨウ化メチル (39 μ L, 0.626 mmol) を加え、溶液を更に 3 時間攪拌した。50 mL の水を加えることで反応を停止させ、ジクロロメタン (3x50 mL) で抽出した。回収した有機層を合わせ、水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムを加え乾燥し、ろ過後、減圧下で濃縮した。残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (1:1 酢酸エチル/ヘキサン) にて精製し compound 9 を透明なオイルとして得た (13 mg)。HPLC: $t_R = 14.9$ min (純度 97%), MS ESI⁽⁺⁾ = 347 (M-H). ¹H NMR

(DMSO- d_6) δ : 3.20 (s, 3H), 3.30 (s, 3H), 6.04 (s, 2H), 6.41 (s, 1H), 6.64(d, 1H, $J = 7.5$ Hz), 6.69 (s, 1H), 6.77(d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 6.89(d, 1H, $J = 7.8$ Hz), 7.22 (m, 2H).

Compound 10

N-(*N*-(3-クロロフェニル)カルバミミドイル)ベンゾ[*d*][1,3]ジオキソール-5-カルボキサミド

シアンアミド (100 mg, 2.38 mmol)を 1 mL の水に溶解し、塩化ピペロニロイル(440 mg, 2.38 mmol)で処理した。12.5 N の水酸化ナトリウム溶液 (190 μ L)を加え、混合液を 2 時間攪拌した。3-クロロアニリン (288 mg, 2.40 mmol)を加え、濃塩酸を用いて溶液の pH を 3 とした。混合液を 5 mL の水で希釈し 1 時間還流した後、室温まで放冷した。生成した固体をろ過により回収し、30%の水酸化ナトリウム溶液 1 mL で溶解させた後、50 mL の水で希釈した。沈殿した固体をろ過により回収し、高真空乾燥することで compound 10 の白色固体を得た (106 mg, 14 % yield)を得た。HPLC: $t_R = 3.04$ min (純度 90%), MS ESI⁽⁻⁾ = 316 (M-H). ¹H NMR (DMSO- d_6) δ : 6.09 (s, 2H), 6.95 (d, 1H, $J = 8.1$ Hz), 7.14 (d, 1H, $J = 7.2$ Hz), 7.36 (m, 2H), 7.53 (s, 1H), 7.69 (d, 1H, $J = 8.2$ Hz), 7.91 (s, 1H), 9.31 (s, 1H).

Compound 11

5-(ベンゾ[*d*][1,3]ジオキソール-5-イル)-*N*-(3,4-ジクロロフェニル)-1,2,4-オキサジアゾール-3-アミン

シアンアミド (82 mg, 1.95 mmol)を 1 mL の水に溶解し、塩化ピペロニロイル(369 mg, 1.95 mmol)を処理した。12.5 N の水酸化ナトリウム溶液 (160 μ L)を加え、混合液を 2 時間攪拌した。3, 4-ジクロロアニリン (290 mg, 1.79 mmol)を加え、濃塩酸を用いて溶液の pH を 3 にあわせた。混合液を 5 mL の水で希釈し 1 時間還流した後、室温まで放冷した。生成した固体をろ過により回収し、30%の水酸化ナトリウム溶液 1 mL で溶解させた後、50 mL の水で希釈した。沈殿した固体をろ過により回収し、高真空乾燥した。乾燥後の固体は 3:1 の割合のジクロロメタン/メタノール溶液 (4 mL) に溶解し、13%の次亜塩素酸ナトリウム (4 mL)で処理した。溶液を室温で 2 時間攪拌した後、水層を廃棄し、有機層を亜硫酸ナトリウム溶液 (亜硫酸ナトリウム 50 mg を水 2ml に加え調製)とメタノール (5 mL)を処理し、16 時間還流した。溶媒を減圧除去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (1:1 酢酸エチル/ヘキ

サン)にて精製し白色固体として compound 11 (16 mg) を得た。HPLC: t_R = 9.25 min (純度 97%), MS ESI⁽⁻⁾ = 348 (M-H). ¹H NMR (DMSO-d₆): δ : 6.20 (s, 2H), 7.17 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 7.45 (d, 1H, J = 8.8 Hz), 7.50 (s, 1H), 7.58 (d, 1H, J = 8.9 Hz), 7.66 (d, 1H, J = 8.2 Hz), 7.75 (s, 1H), 10.40 (s, 1H).

Compound 12

N-(ベンゾ[*d*][1,3]ジオキサール-5-イルカルバモイル)-3-クロロベンズアミド 3,4-(メチレン) ジオキシアニリン (82.6 mg, 0.60 mmol) を THF (2 mL) に溶解させるために、3-クロロベンゾイルイソシアネート溶液 (0.06 M の THF 溶液として 1 mL) を加えた。溶液を室温で 1 時間攪拌した後、ろ過にて生成した固体を回収し、ジクロロメタンで洗浄し、減圧乾燥することで compound 12 の白色固体 (85.0 mg, 44 % yield) を得た。HPLC: t_R = 16.5 min (純度 88%), MS ESI⁽⁻⁾ = 317 (M-H). ¹H NMR (DMSO-d₆) δ : 6.02 (s, 2H), 6.98 (m, 2H), 7.28 (s, 1H), 7.57 (t, 1H, J = 7.9 Hz), 7.73 (d, 1H, J = 9.0 Hz), 7.95 (d, 1H, J = 7.8 Hz), 8.05 (s, 1H), 10.56 (s, 1H), 11.08 (s, 1H).

Compound 13

6-クロロ-*N*-((4-フルオロ-3-(トリフルオロメチル)フェニル)カルバモイル)ベンゾ[*d*][1, 3]ジオキサール-5-カルボキサミド

6-クロロベンゾ[*d*][1, 3]ジオキサール-5-カルボニルクロライド (3.60 g) を氷浴で冷却し、28-30% 水性アンモニア (30 mL) で処理した。氷浴を取り去り、混合液を室温にて 1 時間攪拌した。固体をろ過により回収し、水で洗浄した後、高真空下で乾燥させることで 6-クロロベンゾ[*d*][1, 3]ジオキサール-5-カルボキサミドを得た。この試料の一部 (0.40 g) を窒素下で無水ジクロロメタン (6 mL) に懸濁し、塩化オキサリル (1.8 mL の 2 M ジクロロメタン溶液) で処理した。混合液を穏やかに 16 時間加熱した後、室温に冷却した。溶媒を減圧除去した後、残渣を無水 THF (7.5 mL) に溶解した。この溶液の一部 (2.5 mL) に 4-フルオロ-3-(トリフルオロメチル)アニリン (0.804 mmol) 無水 THF 溶液 (1 mL) を氷冷下加えた。氷浴を取り去り、混合液を室温にて 2 時間攪拌した。沈殿した固体をろ過により集め、ジクロロメタンで洗浄し、減圧乾燥することで compound 13 を得た。MS(m/z) 403, calcd. 404.70.

Compound 14

N-((4-フルオロ-3-(トリフルオロメチル)フェニル)カルバモイル)-1-メチル

-1*H*-インドール-6-カルボキサミド

水酸化ナトリウム (0.77 g の 60% ミネラルオイル懸濁液) を窒素下で、無水ヘキサン (2 x 10 mL) にて洗浄した後、無水 N, N-DMF (30 mL) で懸濁した。DMF (20 mL) に溶解したインドール-6-カルボン酸 (1.01 g) を 5 分かけて加え、室温にてさらに 30 分間攪拌した。ヨウ化メタン (1.2 mL) を加え、混合液を 1 時間攪拌した。溶液を氷水にあけ、その混合物を室温まで戻した。得られた固体をろ過にて回収し、水で洗浄し、減圧乾燥させ 1-メチルインドール-6-カルボン酸メチルを得た。この試料の一部 (0.33 g) をメタノール (7 mL) および DMF (1 mL) に溶解し、5 N 水酸化ナトリウム水溶液 (2 mL) で処理した。混合液を 22 時間加熱還流し、その後室温まで冷却した。溶媒を減圧濃縮させ、残渣を水 (15 mL) で溶解した。溶液は氷浴で冷却し、濃塩酸で pH 4 とした。沈殿した固体をろ過により集め、水で洗浄し、減圧乾燥させることで 1-メチルインドール-6-カルボン酸を得た。この試料の一部 (0.27 g) を DMF (4 mL) に溶解し、窒素ガス下でジイソプロピルエチルアミン (1.6 mL) およびアンモニア (12 mL の 0.5 M ジオキサン溶液) で処理した。O-ベンゾトリアゾール-N, N, N', N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロリン酸 (0.64 g) を加え、混合物を室温にて 20 時間攪拌した。溶媒を減圧除去し、残渣を酢酸エチル (50 mL) に溶解し、溶液を水、1 M 炭酸ナトリウム溶液および塩水で洗浄し、硫酸マグネシウムを加え乾燥させた。溶媒を減圧蒸発させ 1-メチルインドール-6-カルボンキサミドを灰色固体で得た。この試料の一部 (0.04 g) を窒素ガス下で無水トルエン (1.0 mL) に懸濁し、1-フルオロ-4-イソシアネート-2-(トリフルオロメチル)ベンゼン (0.243 mmol) で処理した。混合物を 2 時間加熱還流し、その後室温まで冷却した。固体をろ過により集め、石油エーテル、ジクロロメタンおよびメタノールで洗浄し、減圧乾燥させ、compound 14 を得た。MS(m/z)379, calcd.378.28.

Compound 15

N-((4-フルオロ-3-(トリフルオロメチル)フェニル)カルバモイル)-2,3-ジヒドロベンゾ[b][1,4]ジオキシン-6-カルボキサミド

水 (100 mL) 中の過マンガン酸カリウム (3.31 g) の溶液を、水 (40 mL) を用いて調製した 1,4-ベンゾジオキサン-6-カルボキサリデヒド (2.50 g) の攪拌溶液に 90°C にて 30 分にわたって加えた。90°C にてさらに 45 分間攪拌を継続した後、周囲温度にまで冷却した。混合液は 1 M 水酸化カリウム水溶液を用いて pH 10 とし、ろ過し、ろ液を氷浴で冷却し、濃塩酸にて pH 3.0 に酸性化し

た。沈殿した固体をろ過により回収し、水で洗浄し、乾燥させた。固体をジクロロメタンに溶解し、飽和塩化ナトリウム溶液で洗浄し、硫酸マグネシウムを加え乾燥させた。溶媒を減圧蒸発させ 2*H*, 3*H*-ベンゾ[e]1,4-ジオキサン-6-カルボン酸を白色粉末で得た。試料の一部 (1.05 g) を塩化チオニル (10 mL) に溶解し、混合液を窒素ガス下で 50°C、7 時間攪拌した。室温まで冷却した後、過剰の塩化チオニルを減圧除去し、残渣を 1 時間減圧乾燥した。その固体を氷浴で冷却し、水酸化アンモニウム溶液 (10 mL, 28-30 % アンモニア) で処理した。混合液を 0°C にて 5 分間攪拌し、室温にて更に 1 時間攪拌した。生成物をろ過により集め、水で洗浄し、減圧乾燥して、2*H*, 3*H*-ベンゾ[e]1,4-ジオキサン-6-カルボキサミドを白色粉末で得た。この試料の一部 (0.90 g) を窒素ガス下で無水ジクロロメタンに加え懸濁し、塩化オキサリル (3.8 mL, 2 M ジクロロメタン溶液) で処理した。混合物を 15 時間加熱還流し、室温に冷却し、減圧濃縮した。残渣を無水 THF (10 mL) に溶解し、氷浴で冷却し、4-フルオロ-3-(トリフルオロメチル)アニリン (5.0 mmol) で処理した。氷浴を除去し、反応混合液を周囲温度にて 45 分間攪拌した。生成した固体をろ過し、ジクロロメタンおよびメタノールで洗浄し、減圧乾燥し、compound 15 を得た。MS(m/z)383, calcd.384.28.

Compound 16

N-((4-フルオロ-3-(トリフルオロメチル)フェニル)カルバモイル)キノキサリン-6-カルボキサミド

メタノール (7.0 mL) および 28-30 % アンモニア (14 mL) 中のキノキサリン-6-カルボン酸メチル (2.0 g) の懸濁液を密封した管の中で、室温にて 16 時間攪拌した。沈殿した固体をろ過にて回収し、水で洗浄し、高真空下で乾燥させることでキノキサリン-6-カルボキサミドを白色粉末として得た。この試料の一部 (0.10 g) を無水ジクロロメタンにて懸濁し、窒素下で塩化オキサリル (1.0 mL の 2 M ジクロロメタン溶液) で処理した。混合液を 16 時間加熱還流し、減圧濃縮した。残渣を無水 THF (1 mL) に溶解し、無水 THF (1 mL) 中の 4-フルオロ-3-(トリフルオロメチル)アニリン (1.0 g) の氷冷溶液に加えた。混合液を室温にて 2 時間攪拌し、溶媒を蒸発させ、残渣にメタノールを加え、ろ過することで compound 16 を得た。MS(m/z)379, calcd.378.28.

Compound 17 (TLK-19705)

N-((4-フルオロ-3-(トリフルオロメチル)フェニル)カルバモイル-1,3-ジメチ

ル-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド

4-クロロ-1,3-ジメチルピラゾロ[5,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド (3.5 g, 18.4 mmol)を加熱したトルエン (30 mL)に溶解し、1時間共沸した。溶液を室温まで放冷し、4-フルオロ-3-(トリフルオロメチル)フェニルイソシアネート(4.6 g, 22.1 mmol)で処理した。混合液を16時間還流した後、室温まで放冷した。沈殿した固体をろ過により回収し、メタノールで洗浄し、減圧乾燥することで TLK-19705 の白色固体 (3.6 g, 49 % yield)を得た。HPLC: $t_R = 16.2$ min (純度 99%), MS ESI⁽⁻⁾ = 394 (M-H). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 2.55 (s, 3H), 4.01 (s, 3H), 7.51 (t, 1H, $J = 9.7$ Hz), 7.90 (m, 1H), 8.12 (d, 1H, $J = 6.3$ Hz), 8.90 (s, 1H), 9.08 (s, 1H), 10.93 (s, 1H), 11.25 (s, 1H).

1 - 2) ケモタキシス・アッセイ

第2章、第1節、第1項、1 - 1) に準じて行った。

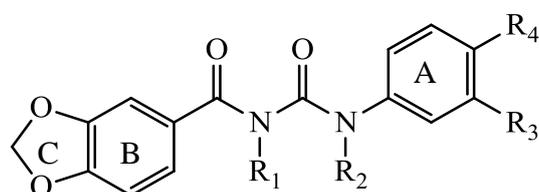
1 - 2) 細胞毒性

第2章、第1節、第1項、1 - 2) に準じて行った。

第2項 実験結果および考察

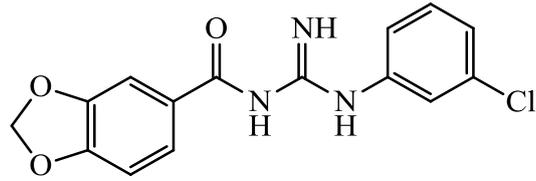
Cl、CF₃、O-*i*Pr のような低分子疎水性置換基を A 環の 3 位および 4 位に導入した場合は活性に忍容性がみられ、細胞遊走に対する阻害活性は 2 倍から 4 倍増強した (Table 2-1、compound 2~5)。一方、フェニル基のような高分子が A 環の 3 位あるいは 4 位に導入された場合は細胞遊走に対する阻害活性は消失する結果となった (Table 2-1、compound 6、7)。またアシルウレア構造の尿素窒素をアルキレーションすることによっても、阻害活性が消失することが明らかとなった (Table 2-1、compound 8、9)。

Table 2-1. ヘテロアロイルフェニルウレア誘導体の構造活性相関



化合物番号	R1	R2	R3	R4	細胞遊走阻害活性 IC50 値 (μM)
1	H	H	Cl	OH	3.9
2	H	H	Cl	H	1.6
3	H	H	Cl	Cl	1.5
4	H	H	CF ₃	H	1.5
5	H	H	O ^{<i>i</i>} Pr	H	1.0
6	H	H	Ph	H	>10
7	H	H	H	Ph	>10
8	Me	H	Cl	H	>10
9	Me	Me	Cl	H	>10

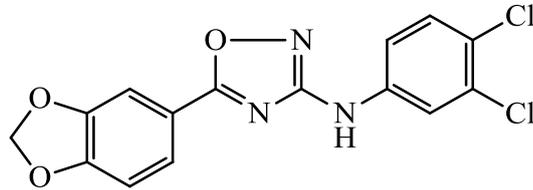
リンカー部分の検討では、A 環と B 環および C 環をつなぐリンカーをアシルウレアからアシルグアニジンへと変換した場合、細胞遊走に対する阻害活性は消失した (Figure 2-4)。



Compound 10 : IC₅₀ > 10 μM

Figure 2-4. アシルウレアからアシルグアジンへの変換

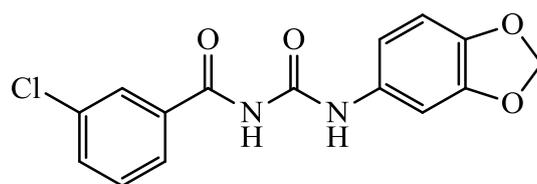
またより強固な立体構造をとる 1, 2, 4-オキサジアゾールへとリンカーを変換した場合も阻害活性は消失する結果となり (Figure 2-5)、全体構造にはある程度のフレキシビリティーが必要なことが示唆された。



Compound 11 : IC₅₀ > 10 μM

Figure 2-5. 1, 2, 4-オキサジアゾールへの置換

更に A 環と B 環および C 環の位置を入れ替えた場合もケモタキシスに対する阻害活性は消失し (Figure 2-6)、アシルウレア・リンカーを有する誘導体の CCR2 への結合には A 環および B 環 C 環の位置がそれぞれ重要であることが示唆された。

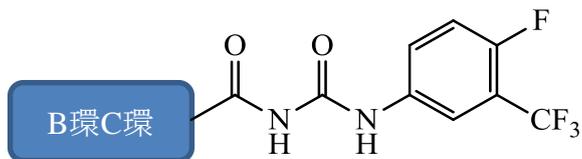


Compound 12 : IC₅₀ > 10 μM

Figure 2-6. A 環と B 環および C 環の位置の置換

次に、B 環 C 環構造変換の検討結果を Table2-2 に示す。B 環への Cl の導入により CCL2 誘導の細胞遊走に対する阻害活性は低下することが明らかとなった (compound 13)。B 環 C 環を 1-メチル-1*H*-インドール (compound 14) または、2,3-ジヒドロベンゾ[*b*][1,4]ジオキシンへと置換した場合も細胞遊走に対する阻害活性は低下する結果となった (compound 15)。キノキサリン骨格を B 環 C 環に導入した場合は、細胞遊走に対する阻害活性、および細胞毒性がともに増強する結果となった (compound 16)。一方、B 環 C 環を 1,3-ジメチルピラゾロ[3,4-*b*]ピリジンへ置換した場合は、CCL2 誘導の細胞遊走に対して IC₅₀ 値で 0.7 μM と阻害活性が増強し、細胞毒性の指標である CC₅₀ 値は 50 μM 以上であった (compound 17)。この活性が増強された compound 17 を TLK-19705 と名称し以降の実験に使用した (Figure 2-7)。

Table 2-2. ヘテロアロイルウレア誘導体の B 環 C 環構造活性相関



化合物 番号	B 環 C 環	細胞遊走 阻害活性 IC50 値 (μM)	細胞毒性 CC50 値 (μM)
13		17.8	>50
14		>4	>50
15		11.6	47
16		0.8	2.5
17		0.7	>50

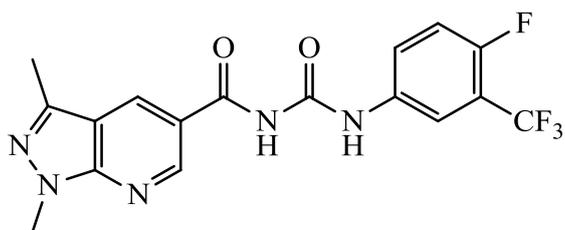


Figure 2-7. TLK-19705: IC50= 0.7 μM, CC50 > 50 μM

第3節 作用機序検討1

序論

構造活性相関の検討により、活性の増強された TLK-19705 を用いて新規 CCR2 アンタゴニストの作用機序検討試験を行った。

第1項 実験方法

1-1) バインディング・アッセイ

アッセイ用チューブに 50 μL の THP-1 細胞溶液 (5×10^5 cells) および 25 μL のアッセイ・バッファー、被験物質、CCL2 あるいは anti CCL2 antibody を加え、攪拌後 25°C で 10 分間インキュベートした。次に 25 μL の I^{125} 標識 CCL2 を加え攪拌した後、25°C で 90 分間インキュベートした。その後 750 μL の冷却した wash buffer (50 mM HEPES/NaOH (pH=7.2), 5 mM MgCl_2 , 1 mM CaCl_2 , 0.15 M NaCl, 0.5% BSA) を加えて 4°C、1,000 rpm で 3 分間遠心し上清を除去し、細胞に結合していない I^{125} 標識 CCL2 を分離した。再度 750 μL の wash buffer を加え攪拌した後、4°C、1,000 rpm で 3 分間遠心し上清を除去した。その後、細胞に結合した I^{125} 標識 CCL2 の放射活性は γ 線カウンターを用いて測定した。

1-2) Ca^{2+} mobilization

THP-1 細胞を Ca^{2+} Flux Buffer (HBSS + 0.1% BSA) を用いて 2.5×10^6 cells/mL に調製した。Fluo-3AM および Fura Red AM の混合液 (各 300 μM : Molecular Probes) を 10 $\mu\text{L}/10^6$ cells で添加し、37°C で 30 分間インキュベートして蛍光物質を細胞内に取り込ませた後、 1×10^6 cells/mL に調製し、1 サンプル当たり 300 $\mu\text{L} \times 2$ 本分注した。それぞれに目的濃度の被験物質もしくはジメチルスルホキシド(DMSO)を 3 μL 添加し、37°C で 30 分間インキュベートした。2 本のうちの 1 本をフローサイトメータにセットし、無刺激状態での蛍光強度を測定した。30 秒後に他の 1 本に 1 μM CCL2 を 3 μL 添加 (最終濃度 10 nM) し、直ちにフローサイトメータにセットして 120 秒後までの蛍光強度を測定した。細胞内レベルの変化は 5 秒ごとの LogFL1/LogFL4 の平均値を EXPO2 ソフトウェア (BECKMAN COULTER) を用いて算出した。

1-3) 各種ケモカインによる細胞遊走への阻害活性評価 (選択性評価)

human C-C Chemokine Ligand 3 (CCL3) (ペプロテック社) または human C-C

Chemokine Ligand 4 (CCL4) (ペプロテック社) により誘導されるヒト末梢血単核細胞(PBMC)の細胞遊走には、3 μ M pore size PVP free membrane filter を使用し、その他は、第 2 章、第 1 節、第 1 項、1 - 1) に準じて行った。

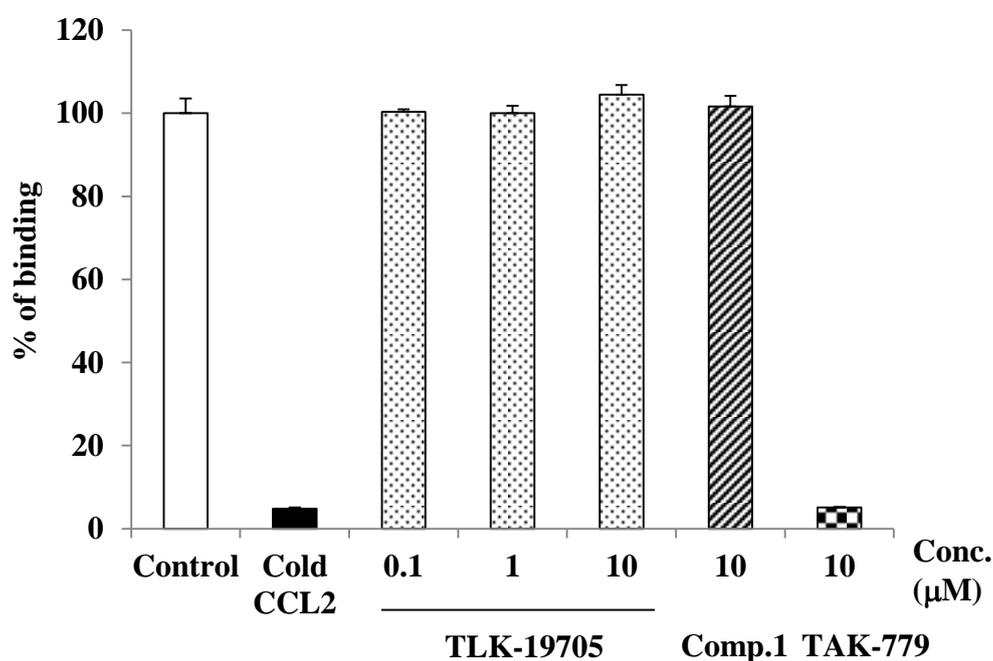
human C-C Chemokine Ligand 17 (CCL17) (ペプロテック社) により誘導される CCR4-transfected THP-1 細胞の細胞遊走は、第 2 章、第 1 節、第 1 項、1 - 1) に準じて行った。

human C-X-C Chemokine Ligand 8 (CXCL8) (ペプロテック社) により誘導されるヒト末梢血多核細胞(PMN)の細胞遊走には、3 μ M pore size PVP free membrane filter を使用し、その他は、第 2 章、第 1 節、第 1 項、1 - 1) に準じて行った。

第2項 実験結果

2-1) バインディング・アッセイ

TLK-19705 が CCL2 誘導の細胞遊走を阻害したことから、CCL2 の CCR2 への結合能に対する TLK-19705 の阻害活性を評価した。¹²⁵I で放射ラベルされた CCL2 を用いて、CCR2 への結合阻害試験を実施した結果、compound 1 および TLK-19705 は、10 μ M の濃度においても CCL2 の CCR2 への結合を阻害しないことを確認した(Figure 2-8)。なお本試験では、競合的な CCR2/CCR5 アンタゴニストである TAK-779 (Figure 2-9)が ¹²⁵I ラベルされた CCL2 の結合を阻害することも確認している。



Comp1: Compound 1,

TAK-779: 競合的 CCR2/CCR5 アンタゴニスト

Figure 2-8. CCL2 の CCR2 への結合に対する TLK-19705 の作用

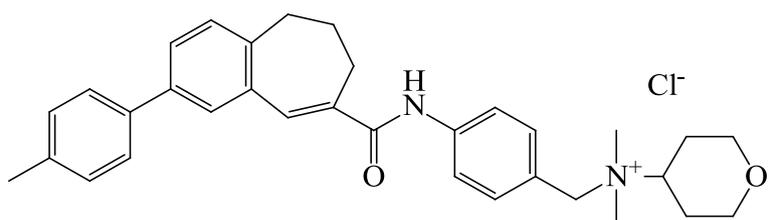


Figure 2-9. TAK-779 : CCR2/CCR5 アンタゴニストの構造

2-2) 細胞内へのカルシウム流入

ケモカインは、その受容体に結合することで細胞内へのカルシウム流入を起こすことが知られている(2)。次に、THP-1 細胞を CCL2 で刺激した際におきる細胞内へのカルシウム流入に対する影響を検討した。Figure 2-10 に示すように、10 nM の CCL2 で THP-1 細胞を処理すると細胞内へのカルシウム流入が起きていることが観察された。また CCL2 と CCR2 の結合を阻害することが報告されている RS-504393 が(3)(Figure 2-11)、本試験系でカルシウムの流入を抑制することを確認した。一方 TLK-19705 は、細胞遊走を阻害する 10 μ M の濃度においても CCL2 誘導のカルシウム流入に影響しないことが明らかとなった。以上の結果は、TLK-19705 が細胞内カルシウム流入を誘導する経路以外に作用することで、THP-1 細胞の細胞遊走を抑制していることを示している。

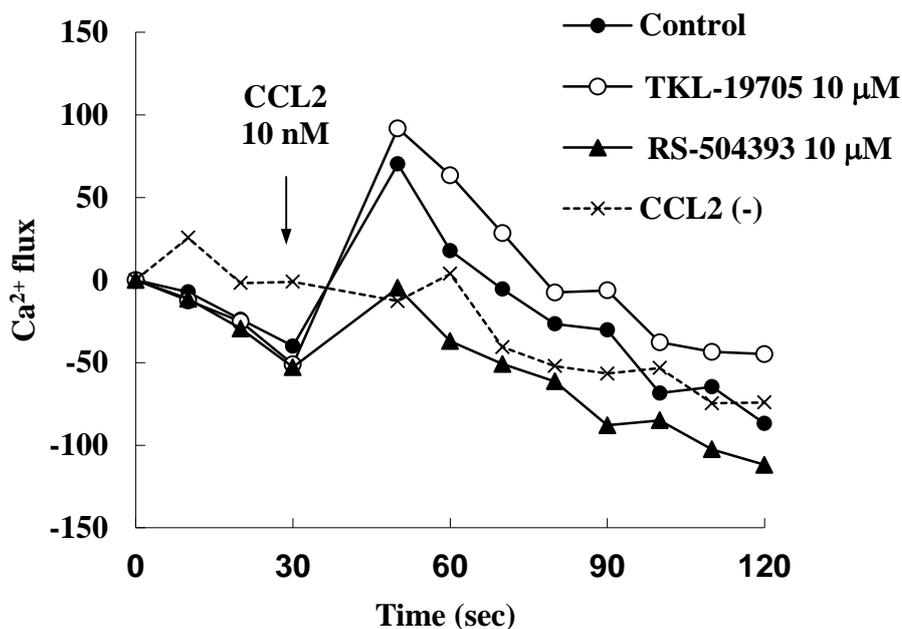


Figure 2-10. 細胞内カルシウム流入に対する TLK-19705 の作用

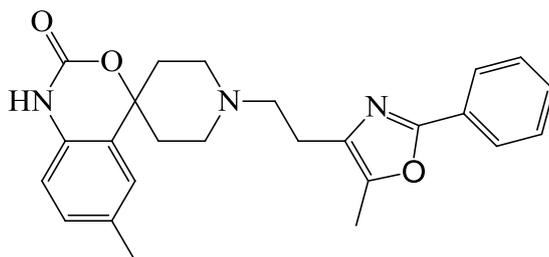


Figure 2-11. 競合的 CCR2 アンタゴニスト : RS-504393 の構造

2-3) 各種ケモカインによる細胞遊走への阻害活性評価 (選択性試験)
 次にケモカインの種類および使用する細胞を変え、TKL-19705 の細胞遊走阻害活性の選択性を評価した。その結果を、Table 2-3 にまとめた。ケモカインの項目に使用したケモカインを表記し、受容体の項目には使用したケモカインの結合する受容体を表記した。TKL-19705 は、CCR5 を介しておこる CCL4 誘導の PBMC の細胞遊走に対しては IC₅₀ 値で 2.9 nM と比較的強い阻害活性を示した。その一方で、主に C-C Chemokine Receptor 1 (CCR1) を介して起こる CCL3 誘導の PBMC の細胞遊走や、C-C Chemokine Receptor 4 (CCR4) を介して起こる CCL17 誘導の CCR4 transfected THP-1 細胞の細胞遊走、および C-X-C Chemokine Receptor 1 (CXCR1) や C-X-C Chemokine Receptor 2

(CXCR2)を介しておこる CXCL8 誘導の PMN の細胞遊走に対しては阻害活性を示さないことを確認した。以上の結果より、TLK-19705 は、CCR2 と CCR5 の二つの受容体に対してアンタゴニスト活性を示す化合物であることが明らかとなった。

Table2-3. 各種ケモカイン誘導の細胞遊走に対する TLK-19705 の阻害活性比較

ケモカイン	ケモカイン受容体	細胞種	ケモタキシス IC50 (μ M)
CCL2	CCR2	THP-1	0.7
CCL3	CCR1, CCR5	PBMC	>10
CCL4	CCR5	PBMC	2.9
CCL17	CCR4	CCR4-transfected THP-1	>10
CXCL8	CXCR1, CXCR2	PMN	>10

第3項 考察

TLK-19705がCCR2およびCCR5に対してアンタゴニスト活性を示すことが明らかとなったことから、その作用部位はCCR2およびCCR5で共通に保存される領域に作用していることが示唆された(Figure 2-12)。

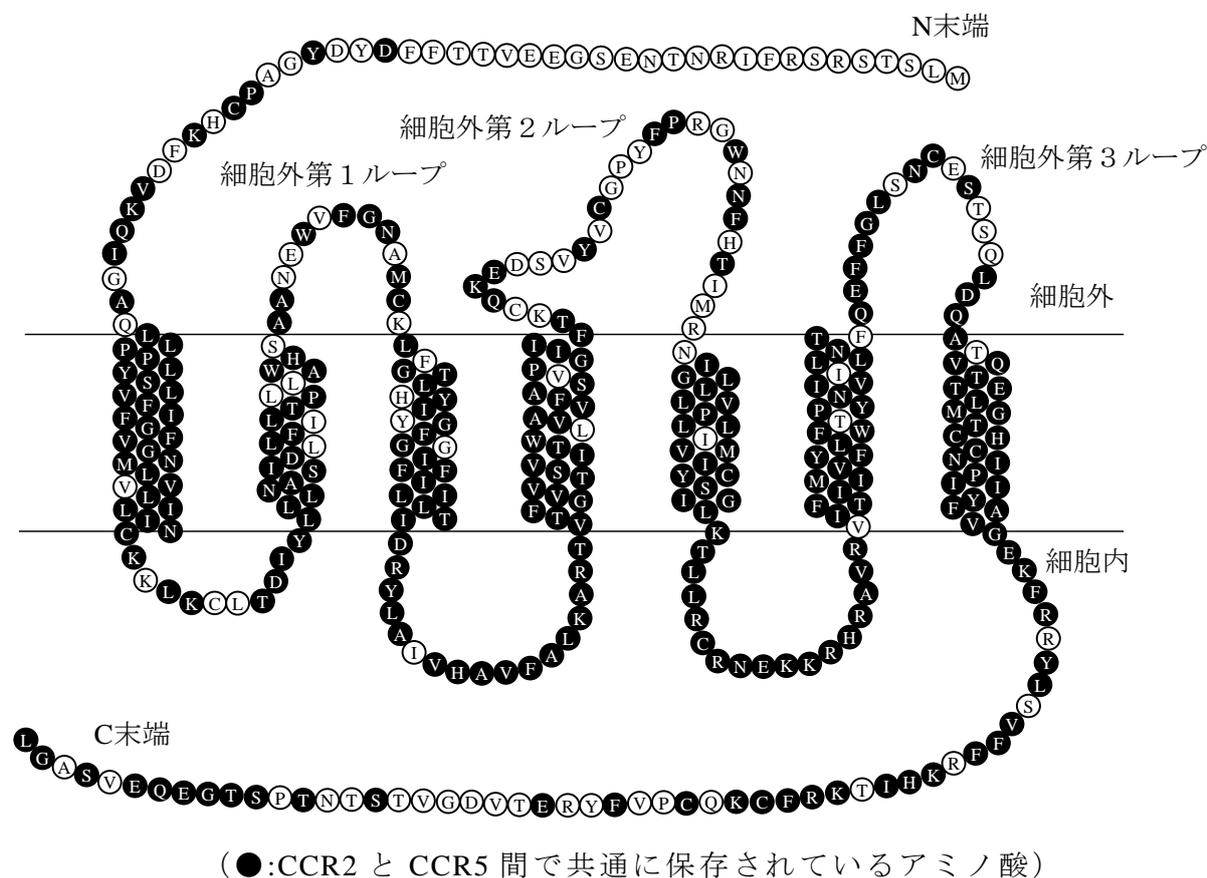


Figure 2-12. CCR2 アミノ酸配列図

Table 2-4 から Table 2-6 には CCR2 の細胞外領域のアミノ酸配列(4)を、CCR5(5)、CCR1 (6)、および C-C Chemokine Receptor 3 (CCR3) (7)と比較したものを示す。3つの細胞外ループ領域のうち、N末端側に位置する細胞外第1ループは、CCR5ではCCR2と62%の相同性を示す。またCCR1およびCCR3の第1ループの領域もCCR2のアミノ酸配列に対してそれぞれ62%と54%の相同性を示し3つの受容体で比較的保存されるアミノ酸が多いことがわかる (Table 2-4)。細胞外第2ループでも同様にCCR2の第2ループ領域に対しての相同性を調べるとCCR5で38%、CCR1で25%、CCR3で19%の相同性であり、数値上3つの受容体間で大きな違いはない (Table 2-5)。一方、細胞

外第3ループ領域は、CCR5が71%と高い相同性を示すのに対して、CCR1およびCCR3ではCCR2に対して35%の相同性であった (Table 2-6)。相同性の数値比較では、CCR2は、CCR1やCCR3よりも、CCR5の細胞外第3ループと相同性が高いことがわかる。TLK-19705は、この細胞外第3ループのCCR2およびCCR5間で保存されている領域に結合することでCCR2/CCR5アンタゴニストとして作用する可能性も考えられたことから、この第3ループ領域のペプチドを合成してTLK-19705の細胞遊走阻害活性に対する影響を検討することにした。

Table 2-4. 細胞外第1ループ領域のアミノ酸比較

受容体 タイプ	アミノ酸配列	CCR2に対する 相同性 (%)
CCR2	A A N E W V F G N A M C K	100
CCR5	A A A Q W D F G N T M C Q	62
CCR1	L K D D W V F G D A M C K	62
CCR3	R G H N W V F G H G M C K	54

CCR2と同じアミノ酸配列の箇所を太字（赤）で表記

Table 2-5. 細胞外第2ループ領域のアミノ酸比較

受容体 タイプ	アミノ酸配列	CCR2に対する 相同性 (%)
CCR2	TKCQKEDSVYVCGPYFPRG ---- WNNFHTIMR	100
CCR5	TRSQKEGLHYTCSHF PYSQYQF WKNFQ TLKI	38
CCR1	SKTQW EFTHHT CSLHF PHESLRE WKL FQALKL	25
CCR3	YETEELFEETL CSALY PEDTVVS WRHF TLR	19

CCR2と同じアミノ酸配列の箇所を太字（赤）で表記

Table 2-6. 細胞外第3ループ領域のアミノ酸比較

受容体 タイプ	アミノ酸配列	CCR2 に対する 相同性 (%)
CCR2	Q E F F G L S N C E S T S Q L D Q	100
CCR5	Q E F F G L N N C S S S N R L D Q	71
CCR1	Q D F L F T H E C E Q S R H L D L	35
CCR3	Q S I L F G N D C E R T K H L D L	35

CCR2 と同じアミノ酸配列の箇所を太字（赤）で表記

第4節 作用機序検討2

第1項 実験方法

1-1) ペプチドの合成

CCR2 細胞外第3ループ領域のペプチド(QEFFGLSNCESTSQLDQAT)は株式会社バイオロジカで合成したものを使用した。

1-2) 細胞遊走阻害活性に対する CCR2 細胞外第3ループペプチドの影響

2.5 nM に調製した human CCL2 (ペプロテック社) を含むアッセイ培地 (25mM HEPES/NaOH, RPMI1640 + 0.1% BSA) を 48 穴マイクロケモタキシスチャンバーの lower chamber に 26 μ L 加え、5 μ M pore size, PVP free membrane filter およびシリコンゴムガasket をセットした後、upper chamber をセットした。目的の濃度の CCR2 細胞外第3ループペプチドと 4 μ M の TLK-19705 を予め 37°C で 30 分インキュベートした後、等量の THP-1 細胞 (4×10^6 cells/mL) を加え、更に 30 分インキュベートした後、upper chamber の各ウェルに 50 μ L ずつ加えた。37°C で 2 時間インキュベートした後に membrane filter を取り外し、非遊走細胞を除去した。Membrane filter はその後、メタノールで固定し、Diff-Quick (国際試薬) を用いて遊走細胞を染色し、顕微鏡下で細胞数をカウントした。

1-3) 実験結果の検定

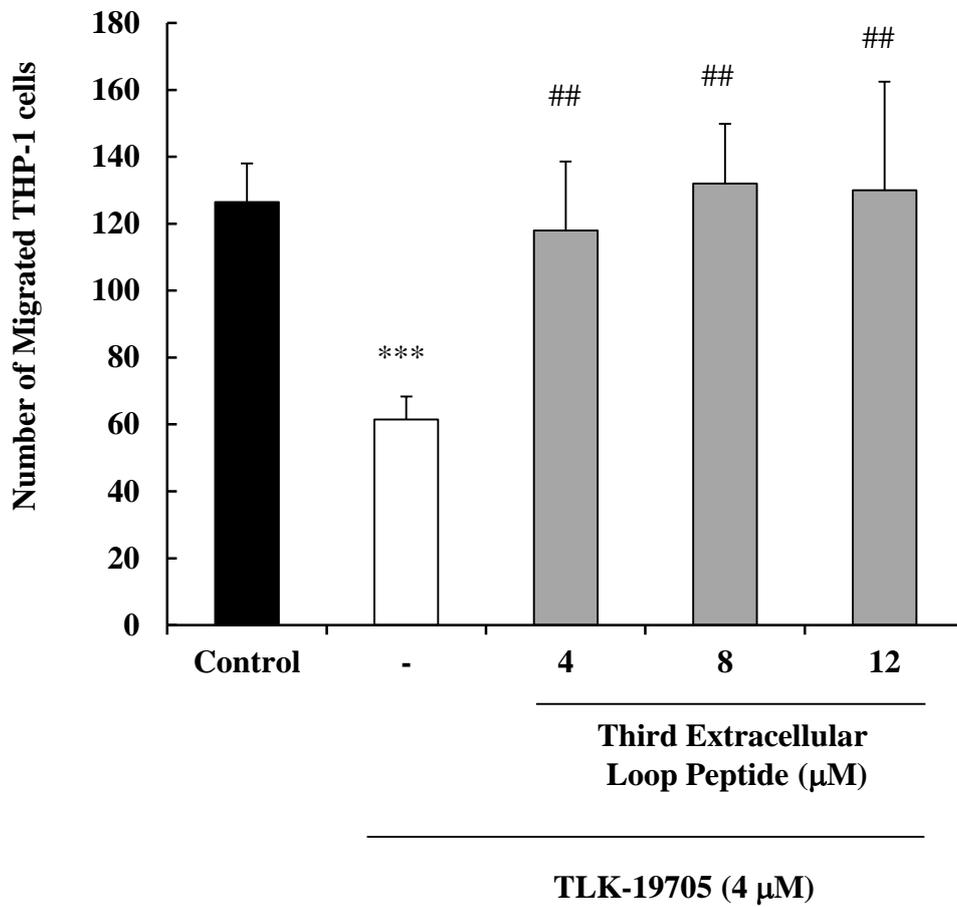
実験結果は平均値±標準誤差にて表示した。有意差検定を 2 群間の比較で実施する際は、等分散の場合は student's t-test で行い、非等分散の場合は Aspin-Welch t 検定を行った。多群間比較で実施する際は、等分散の場合は Dunnett 検定を行い、非等分散の場合は Steel 検定を行った。P 値が 0.05 以下の場合を統計上有意と判定した。

第2項 実験結果

細胞遊走阻害活性に対する細胞外第3ループペプチドの影響

CCR2の細胞外第3ループペプチドによる影響を検討するために、この第3ループ領域のペプチドを合成した。合成した第3ループペプチドを目的の濃度に調製し、TLK-19705と事前処理した後に、CCL2により誘導されるTHP-1細胞の細胞遊走数を評価した結果をFigure 2-13に示した。TLK-19705は細胞遊走を阻害するのに十分な量の4 μ M (IC50値の約6倍)を使用し、細胞遊走阻害活性に対する第3ループ領域の影響を検討した。その結果、TLK-19705の細胞遊走阻害活性は細胞外第3ループと事前処理することで阻害されることが明らかとなった。なお本試験では、細胞外第3ループペプチドの影響を評価するための群構成としたため、CCL2非存在下で遊走する細胞群を評価していない。通常THP-1細胞は30から40前後の細胞でCCL2に依存しない細胞遊走がおきる。細胞遊走に対する阻害強度を評価する際は、このCCL2非依存の細胞遊走を差し引いたものをCCL2により誘導される細胞遊走とし、被験物質の阻害強度を算出するが、本試験では、TLK-19705の阻害作用に対する細胞外第3ループの影響を評価することが目的であったため、CCL2非存在下でおきる細胞遊走を同時に評価しなくても細胞外第3ループペプチドの影響は確認できると判断した。

TLK-19705以外にも、compound 1でも同様にTHP-1細胞の細胞遊走に対する阻害作用が、細胞外第3ループにより阻害されることを確認している(data not shown)。一方、ランダムな19残基のアミノ酸から構成されるペプチド (ISCSCPTVQASKLCLGLWLV: 株式会社バイオロジカで合成)を80 μ Mまで処理した際には、compound 1の細胞遊走阻害活性には影響しないことを確認しており(data not shown)、CCR2細胞外第3ループのペプチド配列が新規CCR2アントゴニストの作用に重要な役割を担っていると考えられた。



*** P < 0.001: control 群に比し(student's test)

P < 0.01: control 群に比し(Dunnett 検定)

Figure 2-13. TLK-19705 の CCR2 アンタゴニスト作用に対する細胞外第3ループペプチドの影響

な活性制御をされると考えられた。CCR2 の細胞外第 3 ループのペプチドが TLK-19705 のアンタゴニスト活性を抑制することから、アロステリックな活性制御にはこの第 3 ループが関与することが示唆された。

CCR2 が属する GPCR ではアロステリックな活性制御に関する報告が多く存在するが、class A GPCR に属するムスカリン受容体では細胞外第 2 ループ、第 3 ループ、およびその近傍のアミノ酸残基がアロステリックな活性制御に関与することが報告されている(12-14)。

CCR2 と CCR5 の細胞外ループ領域のアミノ酸配列は、細胞外第 3 ループのアミノ酸配列が 71% と最も保存されている。一方 CCR1 および CCR3 に対する第 3 ループの相同性は 35% であった。なおケモカイン・スーパーファミリーで唯一結晶構造解析がされている C-X-C Chemokine Receptor 4 (CXCR4)(15)の第 3 ループとは 13% の相同性を示すが、CCR2, CCR5 および CXCR4 で共通して保存されているアミノ酸はシステイン残基一つのみであり、CXCR のケモカイン受容体とは第 3 ループの相同性が更に低下している (Table 2-7)。

Table 2-7. 細胞外第 3 ループ領域のアミノ酸比較

受容体 タイプ	アミノ酸配列	CCR2 に対する 相同性 (%)
CCR2	Q E F F G L S N C E S T S Q L D Q	100
CCR5	Q E F F G L N N C S S N R L D Q	71
CCR1	Q D F L F T H E C E Q S R H L D L	35
CCR3	Q S I L F G N D C E R T K H L D L	35
CXCR4	I L L E I I K Q C E F E N T V H	13

CCR2 と同じアミノ酸配列の箇所を太字（赤）で表記

TLK-19705 は、CCR2 と CCR5 で保存されるアミノ酸配列に結合することが考えられるが、第 3 ループの保存領域は大きく N 末側と中心領域および C 末側に分けられる。このうち、N 末側で保存される 6 つの連続するアミノ酸配列中には二つの連続するフェニルアラニンが存在し疎水性の相互作用が関与している可能性も考えられる。

この他に同じく class A GPCR に属するロドプシン様受容体では、細胞外側のアミノ酸残基も細胞質側の G タンパク質の結合に関与することが示唆されている。細胞外第 3 ループ上では 279 番目のグルタミンが、Gi の結合に影響

響する可能性が考えられている(16)。これはアミノ酸置換によりおきた受容体構造の変化が、細胞質側の Gi の結合親和性に影響したものと考えられる。以上の知見を含め、本研究結果を考察すると、TLK-19705 は細胞外第 3 ループ領域に作用し、CCR2 の構造変化を限定することで Gi の結合親和性に影響をあたえ、CCR2 アンタゴニスト活性を示すことが推察される (Figure 2-16)。

しかしながら、作用機序検討試験には残された課題が存在することも事実である。本研究では、細胞外での制御に着目し研究を進めてきたが、細胞内側での制御の可能性については未着手のままである。また TLK-19705 は、CCL2 誘導の Ca^{2+} 流入を阻害しないが、その機序は不明のままである。細胞内側での制御因子としては、例えば、CCR2、および CCR5 では、二つの受容体の C 末端領域に特異的に結合する FROUNT の存在が報告されている(17)。この FROUNT は Gi とともに細胞遊走に関与する因子の活性化を担うことが考えられていることから、今後は FROUNT を含む細胞内因子に対する検討も含め新規 CCR2/CCR5 アンタゴニストの作用機序解明を進めていく必要があると考える。

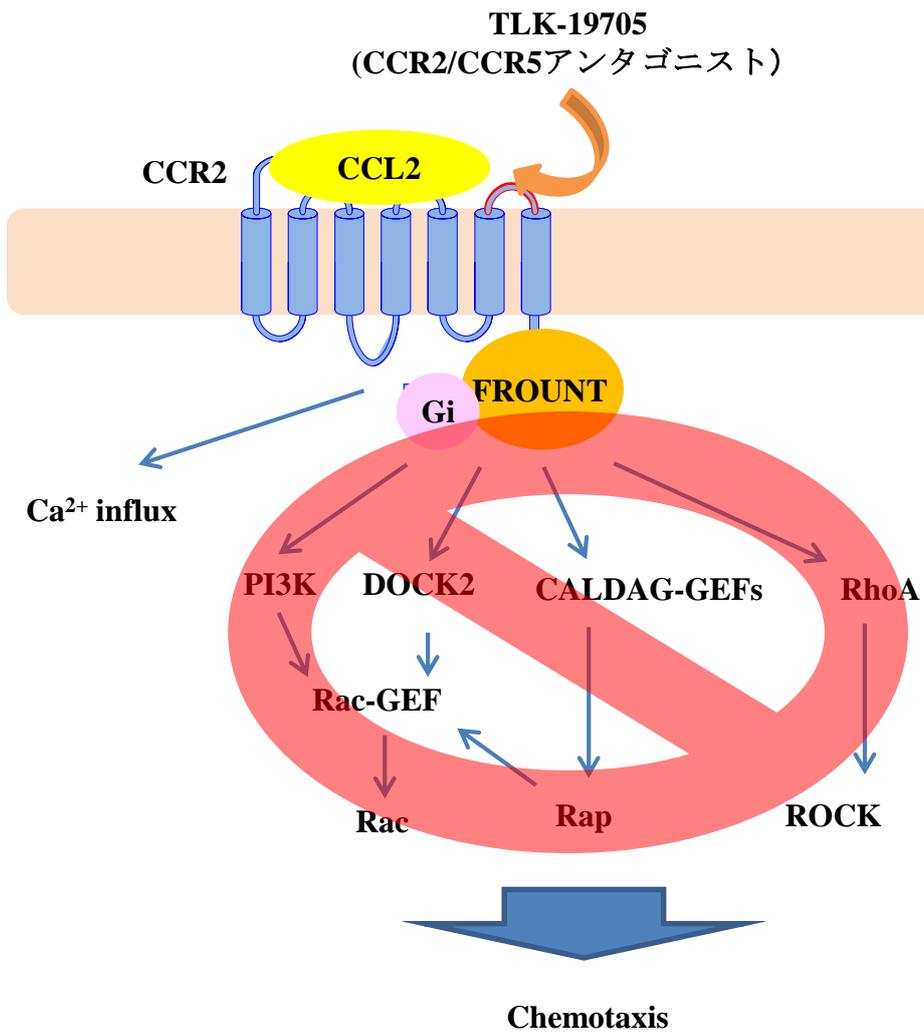


Figure 2-16. TLK-19705 (CCR2/CCR5 アンタゴニスト)作用機序予想図

第5節 まとめ

TRAP 技術により化合物ライブラリーをクラスター分類し、その代表セットをスクリーニングすることでヘテロアロイルフェニルウレア誘導体の中に、CCR2 アンタゴニスト活性を示すものが存在することを確認した。構造最適化を進める中で得た TLK-19705 は、CCR2 アンタゴニスト活性の他に、CCR5 に対するアンタゴニスト活性も併せ持つことが明らかとなった。作用機序の解析では TLK-19705 が CCL2 の CCR2 への結合を阻害せず、CCL2 が誘導する Ca^{2+} 流入にも影響しないことを確認した。更に TLK-19705 の CCR2 アンタゴニスト活性は CCR2 の細胞外第3ループペプチドによりアンタゴナイズされることが明らかとなり、TLK-19705 は、CCR2 の細胞外第3ループに作用することで、アロステリックなアンタゴニスト活性を示すことが推察された。

また本研究では、TRAP 技術による化合物ライブラリーの絞り込みを行った後、スクリーニング試験にファンクショナル・アッセイを採用しヒット化合物を得てきた。結果としてアロステリックな活性制御をする化合物を獲得できたことから、この TRAP 技術はファンクショナル・アッセイと組み合わせることでアロステリックな活性制御をする低分子化合物の探索に今後も有効な手段となることが確認できた。

参考文献

1. Beroza P., Damodaran K., and Lum R.T., Target-related affinity profiling: Telik's lead discovery technology. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 5, 371–381 (2005)
2. Ono S.J., Nakamura T., Miyazaki D., Ohbayashi M., Dawson M., and Toda M., Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111, 1185-1199 (2003)
3. Mirzadegan T., Diehl F., Ebi B., Bhakta S., Polsky I., McCarley D., Mulkins M., Weatherhead G. S., Lapierre J. M., Dankwardt J., Morgans D. Jr., Wilhelm R., and Jarnagin K., Identification of the binding site for a novel class of CCR2b chemokine receptor antagonists: binding to a common chemokine receptor motif within the helical bundle. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 25562-25571 (2000)
4. Gavrillin M.A., Gulina I.V., Kawano T., Dragan S., Chakravarti L., and Kolattukudy P.E., Site-directed mutagenesis of CCR2 identified amino acid residues in transmembrane helices 1, 2, and 7 important for MCP-1 binding and biological functions. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 327, 533-540 (2005)
5. Garcia-Perez J., Rueda P., Alcamí J., Rognan D., Arenzana-Seisdedos F., Lagane B., and Kellenberger E., Allosteric model of maraviroc binding to CC chemokine receptor 5 (CCR5). *The Journal of Biological Chemistry* 286, 33409-33421 (2011)
6. Zoffmann S., Chollet A., and Galzi J.L., Identification of the extracellular loop 2 as the point of interaction between the N terminus of the chemokine MIP-1 α and its CCR1 receptor. *Molecular Pharmacology* 62, 729-736 (2002)
7. Sabroe I., Conroy D.M., Gerard N.P., Li Y., Collins P.D., Post T.W., Jose P.J., Williams T.J., Gerard C.J., and Ponath P.D., Cloning and characterization of the guinea pig eosinophil eotaxin receptor, C-C chemokine receptor-3: blockade using a monoclonal antibody in vivo. *The Journal of Immunology* 161, 6139-6147 (1998)
8. Baba M., Nishimura O., Kanzaki N., Okamoto M., Sawada H., Iizawa Y., Shiraishi M., Aramaki Y., Okonogi K., Ogawa Y., Meguro K., and Fujino M., A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective

- anti-HIV-1 activity. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 5698-5703 (1999)
9. Pasternak A., Goble S.D., Struthers M., Vicario P.P., Ayala J.M., Di Salvo J., Kilburn R., Wisniewski T., DeMartino J.A., Mills S.G., and Yang L., Discovery of a Potent and Orally Bioavailable CCR2 and CCR5 Dual Antagonist. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 1, 14-18 (2010)
 10. Zheng C., Cao G., Xia M., Feng H., Glenn J., Anand R., Zhang K., Huang T., Wang A., Kong L., Li M., Galya L., Hughes R.O., Devrai R., Morton P.A., Rogier D.J., Covington M., Baribaud F., Shin N., Scherle P., Diamond S., Yeleswaram S., Vaddi K., Newton R., Hollis G., Friedman S., Metcalf B., and Xue C.B., Discovery of INCB10820/PF-4178903, a potent, selective, and orally bioavailable dual CCR2 and CCR5 antagonist. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 21, 1442-1446 (2011)
 11. Hall S.E., Mao A., Nicolaidou V., Finelli M., Wise E.L., Nedjai B., Kanjanapangka J., Harirchian P., Chen D., Selchau V., Ribeiro S., Schiyler S., Pease J.E., Horuk R., and Vaidehi N., Elucidation of binding sites of dual antagonists in the human chemokine receptors CCR2 and CCR5. *Molecular Pharmacology* 75, 1325-1336 (2009)
 12. Ellis J., Seidenberg M., and Brann M.R., Use of chimeric muscarinic receptors to investigate epitopes involved in allosteric interactions. *Molecular Pharmacology* 44, 583-588 (1993)
 13. Leppik R.A., Miller R.C., Eck M., and Paquet J.L., Role of acidic amino acids in the allosteric modulation by gallamine of antagonist binding at the m2 muscarinic acetylcholine receptor. *Molecular Pharmacology* 45, 983-990 (1994)
 14. Avlani V.A., Gregory K.J., Morton C.J., Parker M.W., Sexton P.M., and Christopoulos A., Critical role for the second extracellular loop in the binding of both orthosteric and allosteric G protein-coupled receptor ligands. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 25677-25686 (2007)
 15. Wu B., Chien E.Y., Mol C.D., Fenalti G., Liu W., Katritch V., Abagyan R., Brooun A., Wells P., Bi F.C., Hamel D.J., Kuhn P., Handel T.M., Cherezov V., and Stevens R.C., Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 330, 1066-1071 (2010)
 16. Muramatsu T., and Suwa M., Statistical analysis and prediction of functional

residues effective for GPCR-G-protein coupling selectivity. *Protein Engineering, Design & Selection* 19, 277-283 (2006)

17. Toda E., Terashima Y., Sato T., Hirose K., Kanegasaki S., and Matsushima K., FROUNT is a common regulator of CCR2 and CCR5 signaling to control directional migration. *The Journal of Immunology* 183, 6387-6394 (2009)

第3章 炎症性疾患モデルにおける作用

序論

糖尿病性腎症は、高血糖により引き起こされるポリオール経路の亢進、プロテインキナーゼ C(PKC)経路の活性化、終末糖化産物 (AGE)、酸化ストレス亢進などの細胞内代謝異常の他にも、糸球体高血圧など多くの因子が関与し、腎臓の機能的および構造的変化を引き起こし発症・進展すると考えられている(1) (Figure 3-1)。

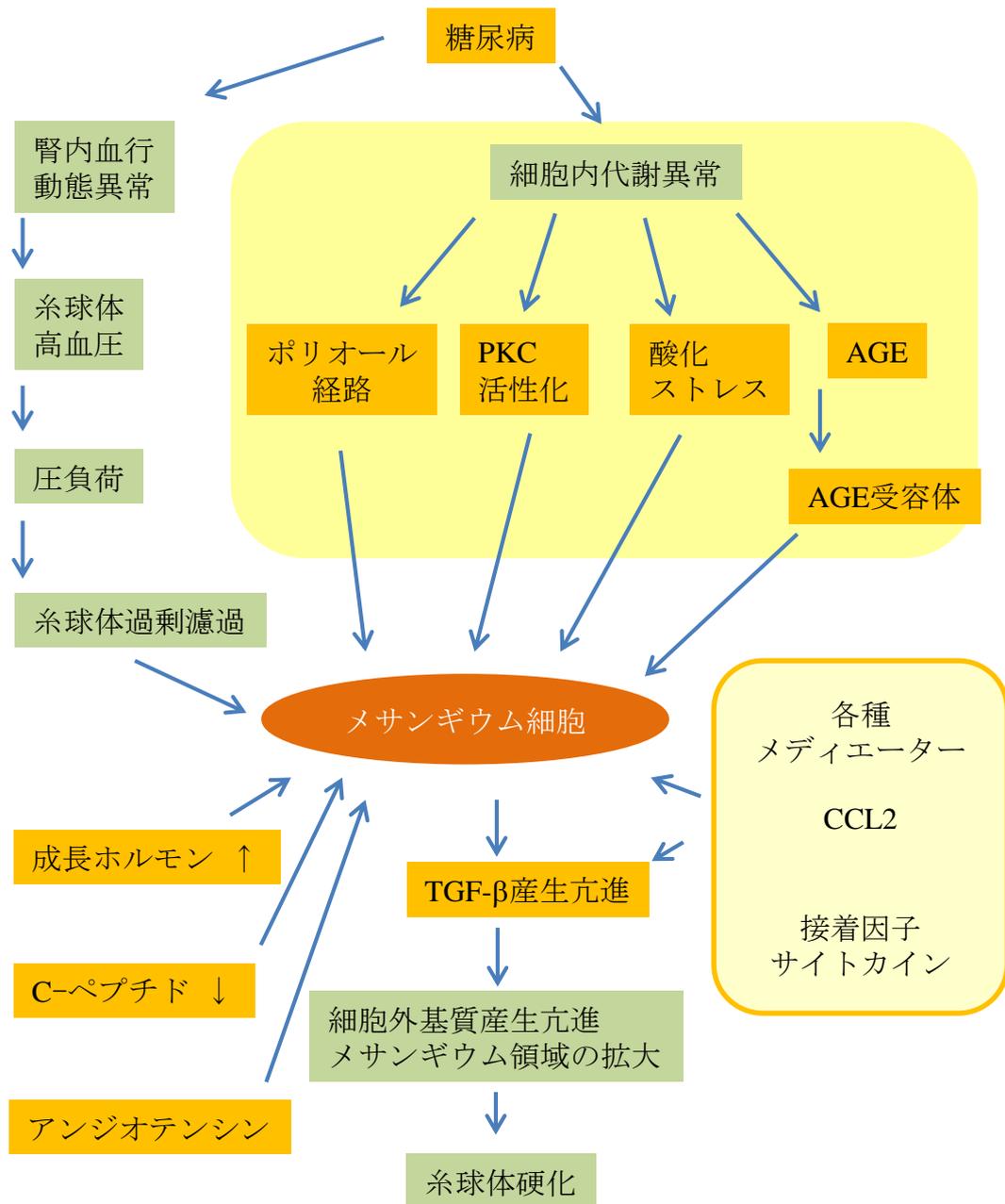


Figure 3-1. 糖尿病性腎症の進展に関与する因子

これらの細胞内代謝異常は、CCL2の産生を増加させることが報告されており、細胞内代謝異常の結果、誘導されるCCL2が単球・マクロファージの集積を促すことが示唆されている(2)。実際、糖尿病性腎症の病理所見では、糸球体および間質の細胞外基質の蓄積とともに、単球・マクロファージの集積が認められることが報告されており(3, 4)、間質におけるマクロファージと尿中CCL2濃度が相関することも報告されている(5)。

病態モデル動物の研究においては、CCL2ノックアウトマウス(KO)のステレプトゾトシン誘発性糖尿病モデルで、組織障害やアルブミン尿の改善とともに、腎における単球・マクロファージの集積が減少していることが報告されている(2)。その他に腎障害におけるセロシオン(PG)の効果も以下の動物モデルにおいて報告されている。一側尿管結紮(UUO)モデルでは、3 mg/kgのPG処置により腎間質のベータ型トランスフォーミング増殖因子(TGF- β)、およびタイプ1コラーゲンの発現が減少し、腎間質線維化の程度はCCR2 KOマウスと同程度にまで抑制されることが報告されている(6)。また誘導型一酸化窒素合成酵素(iNOS)-トランスジェニック糖尿病マウスにおいて、PGはマクロファージの浸潤、および糸球体間質の拡張を抑制し、糸球体でのタイプ4コラーゲンやTGF- β の発現を減少させたとの報告もある(7)。

以上の臨床および病態モデルを用いた検討結果から、糖尿病性腎症の進展には、CCL2およびその受容体であるCCR2が重要な役割を果たすことが強く示唆されている。

一方、動脈硬化巣は、血管内皮細胞が障害され、活性化することから発生する。障害された内皮細胞ではvascular adhesion molecule-1 (VCAM-1)等の接着因子の発現が誘導され(8, 9)、その表面に血液中の単球やリンパ球が接着し、CCL2などの働きにより血管内皮細胞の間隙から血管壁内へ浸潤していく(10-12)。浸潤した単球は、マクロファージへと分化し、更に脂肪物質を取り込むことで泡沫細胞となり、動脈硬化巣を大きくし、不安定化させる(13)(Figure 3-2)。

PGを用いた病態モデルの検討では、3つの異なる動物モデルにおいて動脈硬化の進展に対する抑制効果がこれまでに報告されている。例えばアテローム形成を促す高脂肪食を負荷したapoE-KOマウス(14)や遺伝性高コレステロール血漿ウサギ(watanabe heritable hyperlipidemic rabbit) (15)そしてCCL2/酸化低密度リポタンパク質(oxLDL)処理したブタのモデルでPGの抑制効果が報告されている(16)。

以上の知見から、CCL2/CCR2シグナル・パスウェイは動脈硬化治療にお

いて最も有望な標的の一つとして認知されている(17,18)。

そこで、本研究で新たに見出した新規 CCR2/CCR5 アンタゴニストである TLK-19705 が、糖尿病性腎症および動脈硬化モデルにおいて PG 同様の抗炎症性作用を示すことができるかを確認することとした。

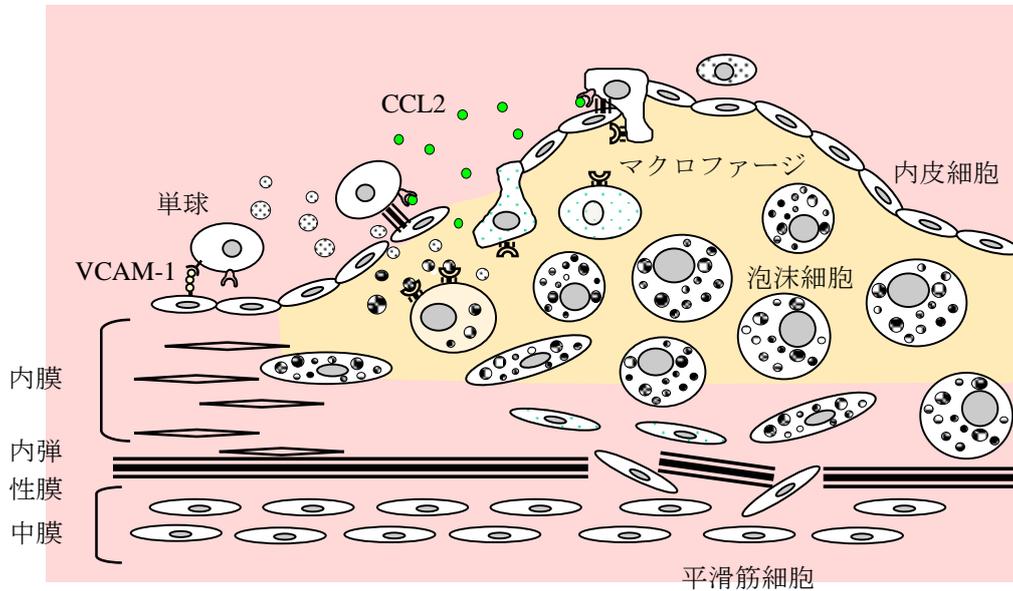


Figure 3-2. 動脈硬化巣形成における単球・マクロファージの関わり

第1節 糖尿病性腎症モデルにおける TLK-19705 の効果

第1項 実験方法

1-1) 糖尿病性腎症モデルにおける TLK-19705 の効果

日本チャールス・リバー株式会社より購入した糖尿病性腎症モデルマウスである雄性 db/db マウス 9 週齢を 1 群 5-10 匹で使用した。TLK-19705 および PG は目的の用量が接種できるように実験動物用飼料(CRF-1: 日本チャールス・リバー株式会社)に混合して経口投与した。陽性対照であるアンジオテンシン変換酵素阻害剤(ACE 阻害剤)であるカプトプリル(Cap)(Figure 3-3)は目的の用量が摂取できるように飲料水に溶解し、自由給水によって経口投与した。腎機能の評価は、8 週間の投与期間終了後に 24 時間尿の蓄尿を使用してアルブミン、クレアチニンを測定し、アルブミン/クレアチニン値を指標として行った。また同週齢の db/m マウスを正常マウスとして使用した。

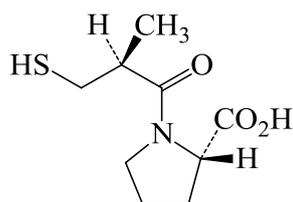


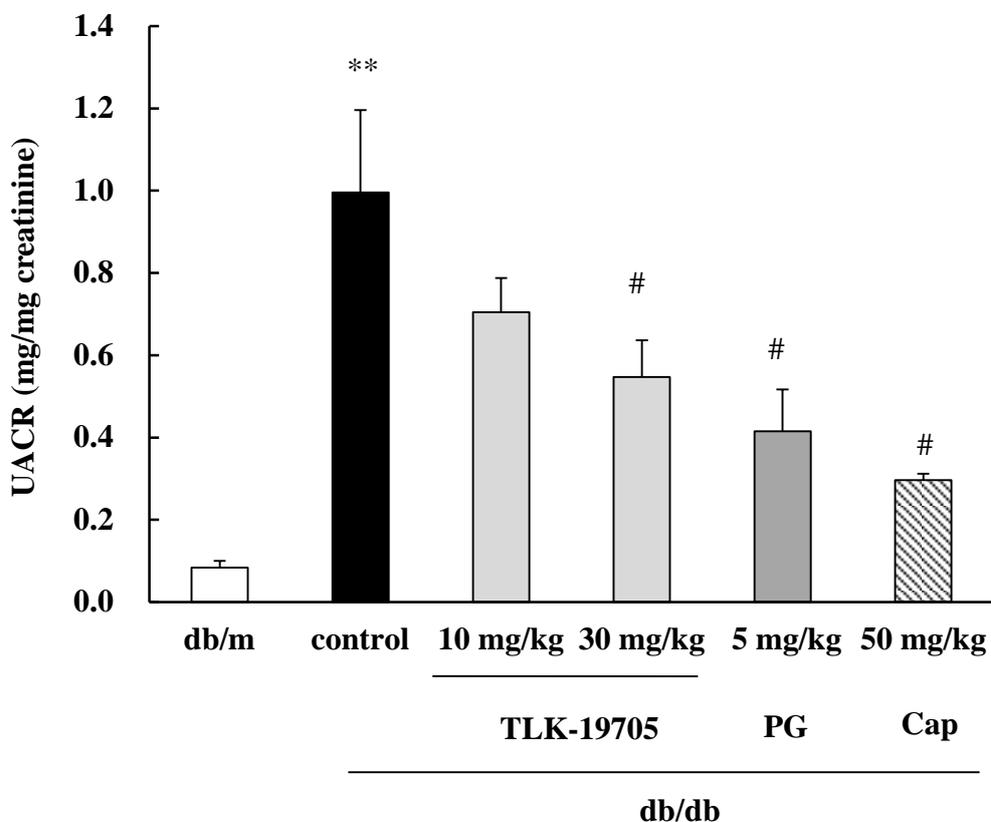
Figure3-3. カプトプリルの構造

1-2) 実験結果の検定

第2章、第4節、第1項、1-3) に準じて行った。

第2項 実験結果

試験結果を Figure 3-4 に示す。db/db マウスでは、正常マウスである db/m と比較してアルブミン/クレアチン値が有意に上昇している。TLK-19705 は、アルブミン/クレアチン値の上昇を用量依存的に抑制し、30 mg/kg の投与によりコントロール群の 55%までアルブミン/クレアチン値を有意に減少させた。同様に PG では 5 mg/kg で 42%までアルブミン/クレアチン値を抑制した。なお Cap 投与群では、50 mg/kg の投与でコントロール群の 30%までアルブミン/クレアチン値が減少していた。



** $P < 0.01$: db/m 群に比し(student's t-test)

$P < 0.05$: control 群に比し(Steel 検定)

Figure 3-4. 糖尿病性腎症モデルにおける TLK-19705 の効果

第3項 考察

糖尿病性腎症は、高血糖により引き起こされる細胞内代謝異常の他にも、糸球体高血圧など多くの因子が関与し、腎臓の機能的および構造的変化を引き起こし発症・進展すると考えられている(1)。

本研究では、PGやCCR2/CCR5アンタゴニストであるTLK-19705がdb/dbマウスのアルブミン/クレアチニン値を有意に減少させ、糖尿病性腎症モデルの病態進行に対して抑制効果を示すことを確認した。本研究以外にも、PGや競合的なCCR2アンタゴニストであるRS-504393では、糸球体におけるマクロファージの量、TGF- β 、およびタイプ4コラーゲンの発現量を減少させ、有意にアルブミン尿を改善した等の報告がある(7, 19)。これらの研究結果から、TLK-19705を含むCCR2アンタゴニストは、高血糖により誘導される細胞内代謝異常によって産生されるCCL2の作用を阻害し、腎糸球体へのマクロファージの浸潤を減少させることで、TGF- β 等の線維化誘導因子の発現量を減少させ、腎障害の進展を抑制するものと考察される (Figure 3-5)。一方、糖尿病性腎症での有効性が認められているACE阻害剤であるCapは、昇圧活性の高いアンジオテンシン II (AngII)の産生を抑制することで糸球体高血圧を改善する他、AngIIによるメサンギウム領域の拡大も抑制することで腎機能の低下を抑制すると考えられている(20,21)。

本研究において確認されたアルブミン/クレアチニン値の抑制効果をCapと比較した場合、PGおよびTLK-19705の効果はやや劣る結果であったことから、CCR2アンタゴニスト単剤での使用ではACE阻害剤の抑制効果には及ばない可能性が示唆される。しかしながら作用機序が異なる点を考慮するとACE阻害剤との併用使用により、各製剤の単剤での治療よりもより厳格に糖尿病性腎症の病態進展を制御できる可能性が考えられる。以上より、CCR2/CCR5アンタゴニストは、糖尿病性腎症に対し新たな治療オプションを提供できる手段となる可能性を秘めていると考えている。

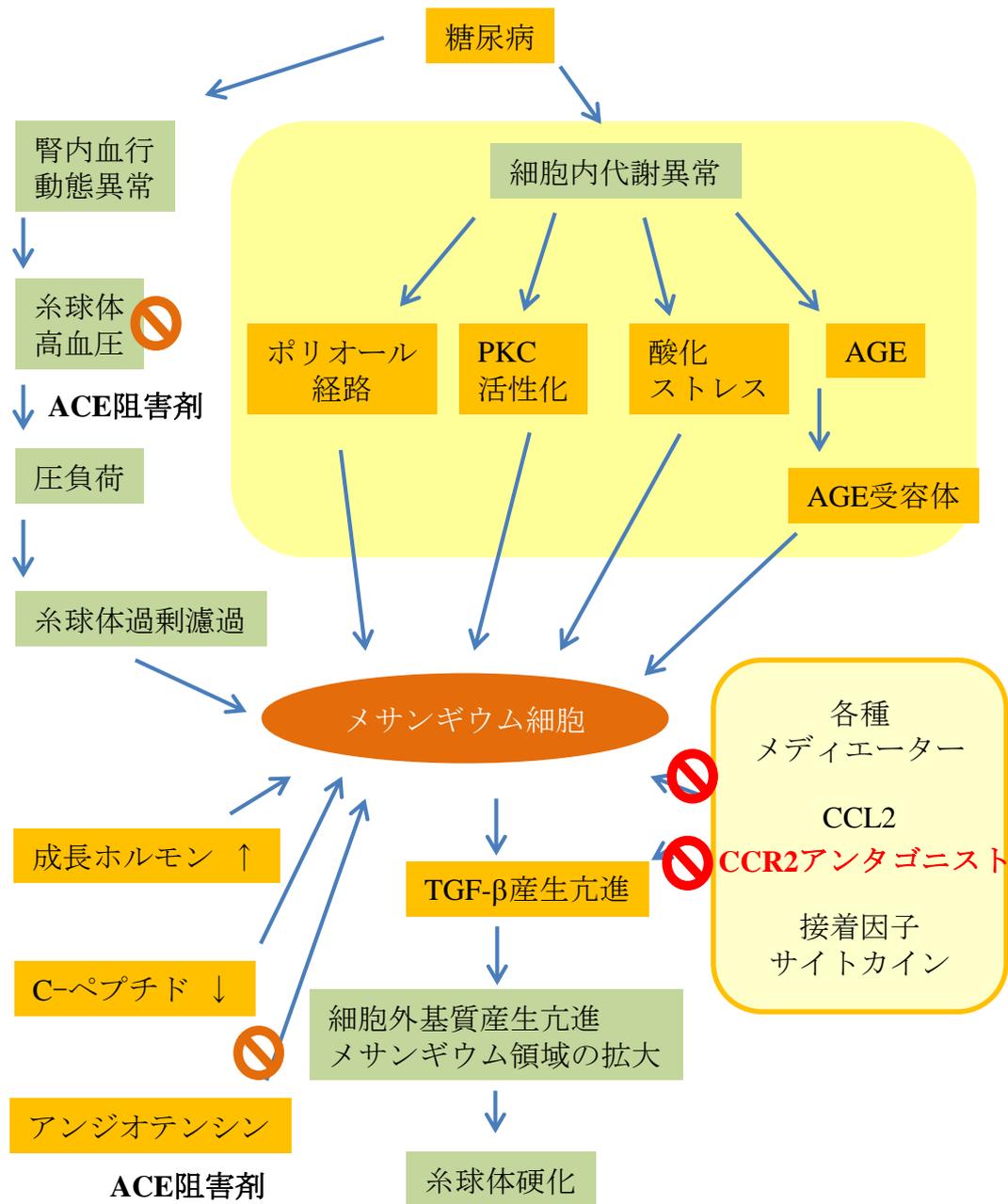


Figure 3-5. 糖尿病性腎症の進展に関与する因子と CCR2 アンタゴニストの制御ポイント

第2節 動脈硬化モデルにおける TLK-19705 の効果

TLK-19705 は、糖尿病性腎症モデルにおいて、アルブミン尿改善作用を示したことから、次に動脈硬化モデルにおいても病態進行に対する抑制効果を検証することとした。

第1項 実験方法

1-1) 動脈硬化モデルにおける TLK-19705 の効果

動脈硬化モデルは、日本チャールス・リバー株式会社より購入した4週齢の雄性 ApoE KO マウスに、1.25% コレステロール含有高脂肪食 (15%) を8週間負荷することで作成し、1群 8-10 匹で試験した。TLK-19705 投与群は、10 mg/kg の用量を摂取できるように高脂肪食との混餌飼料を作成し、経口投与した。動脈硬化は、大動脈弁直上の 500 μm の部分を 100 μm おきに切片を作成し、脂肪染色 (Oil Red O) を行うことで、各個体 5 切片の硬化巣面積の総和で評価した。

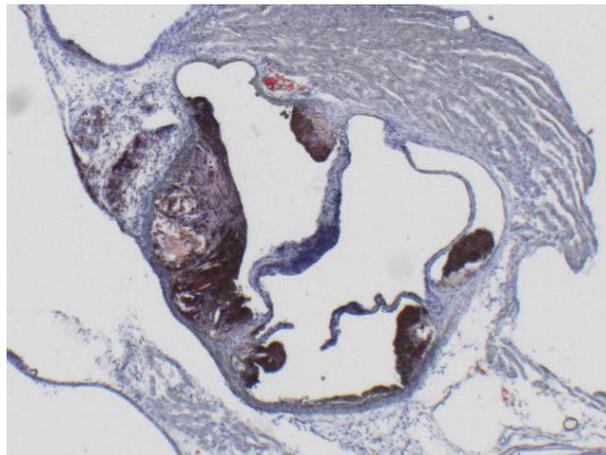
1-2) 実験結果の検定

第2章、第4節、第1項、1-3) に準じて行った。

第2項 実験結果

Oil Red O で脂肪染色した病理像の代表例を Figure 3-6 に、動脈硬化病変の面積率を測定した結果を Figure 3-7 に示す。コントロール群では明らかな動脈硬化巣の進展が認められる。これに対して TLK-19705 は、血漿のトータル・コレステロールレベルに影響することなく有意に脂肪沈着を抑制した (Figure 3-7, Table 3-1)。

A Control



B TLK-19705 10 mg/kg

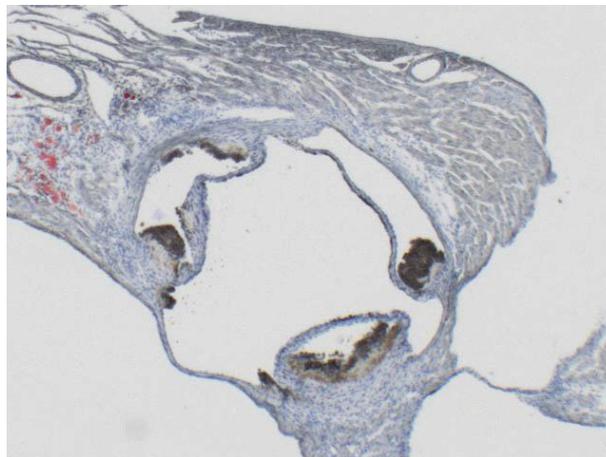
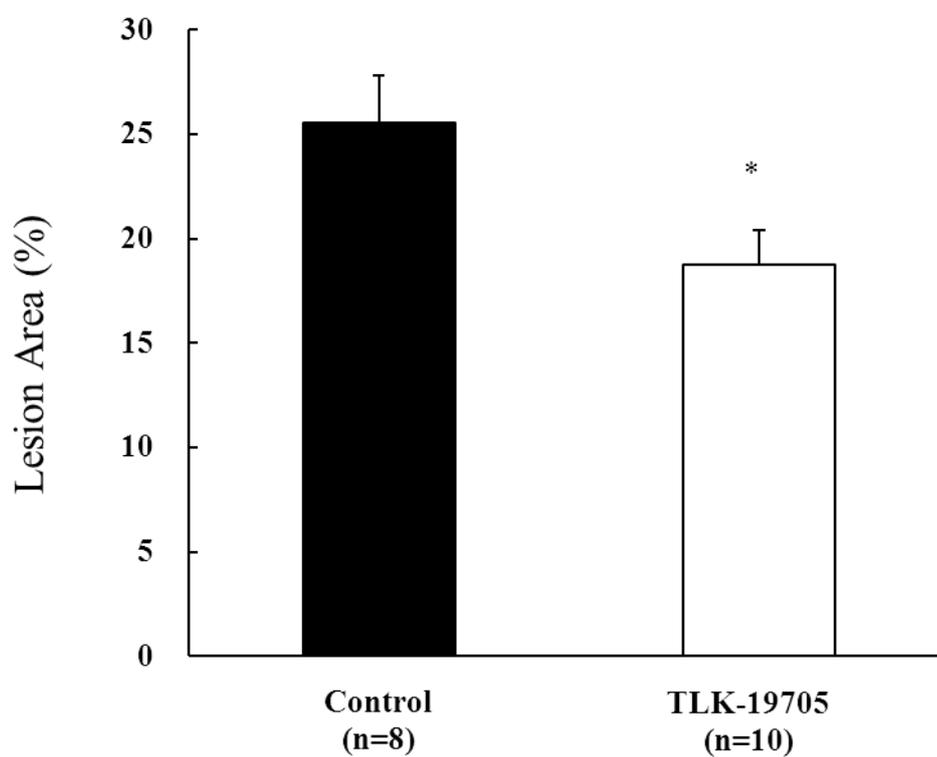


Figure 3-6. 脂肪染色(Oil Red O)した病理像代表例



* $P < 0.01$: control 群に比し (student's t-test)

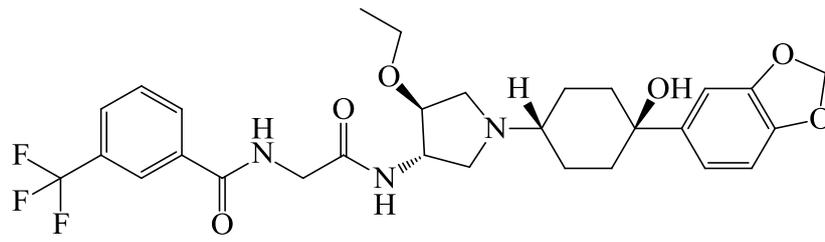
Figure 3-7. 動脈硬化病変の面積率の比較

Table 3-1. 血漿中トータル・コレステロール値の比較

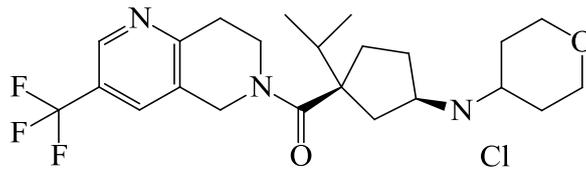
Group	血漿トータル・コレステロール濃度 (mg/dL)
Control	1843 ± 100
TLK-19705 10 mg/kg	1999 ± 56

第3項 考察

動脈硬化モデルにおいて認められた TLK-19705 の病態進展抑制効果は、PG で報告されている結果と一致するものである。一方、ApoE KO マウスや、huCCR2 ki/ApoE KO マウスにウェスタンダイエットと AngII を負荷することで動脈硬化形成を促した系において、選択的な CCR2 アンタゴニストである INCB-3344 や GSK1344386B(Figure 3-8)は、病態進展抑制効果を示さなかったとの報告が存在する(22, 23)。INCB-3344 および GSK1344386B を、PG および TLK-19705 と比較した場合、ケモカインに対する選択性の違いが挙げられる。PG では、CCL2 の他に C-C Chemokine Ligand 7 (CCL7)によるマクロファージ遊走に対する阻害作用が報告されており(24)、TLK-19705 は、本研究により CCR2 の他に CCR5 が介する細胞遊走を抑制することが明らかとなっている。最近、動脈硬化巣形成を防ぐためには複数のケモカイン・シグナリング・パスウェイを抑制することが重要であることが、CCR2 と CCR5 の他に C-X-C Chemokine Receptor 3 (CXCR3)に対するアンタゴニスト作用をもつ TAK-779 で示された(25)。動脈硬化形成において複数のシグナルを抑制することの重要性は、CCR5 アンタゴニストが動脈硬化進展抑制作用を示すことや(26)、C-C Chemokine Ligand 5 (CCL5)、C-C Chemokine Ligand 18 (CCL18)、C-X3-C Chemokine Ligand 1 (CX3CL1)のような他のケモカインの関与(22,27,28)が報告されていることから示唆される。以上より本研究で認められた TLK-19705 の動脈硬化における抑制効果は、CCR2 アンタゴニスト作用および CCR5 アンタゴニスト作用の相加効果により単球の病変部位への細胞遊走が減少し、動脈硬化巣形成が抑制されたものとする (Figure 3-9)。



INCB-3344



GSK1344386B

Figure 3-8. INCB-3344 および GSK1344386B の構造

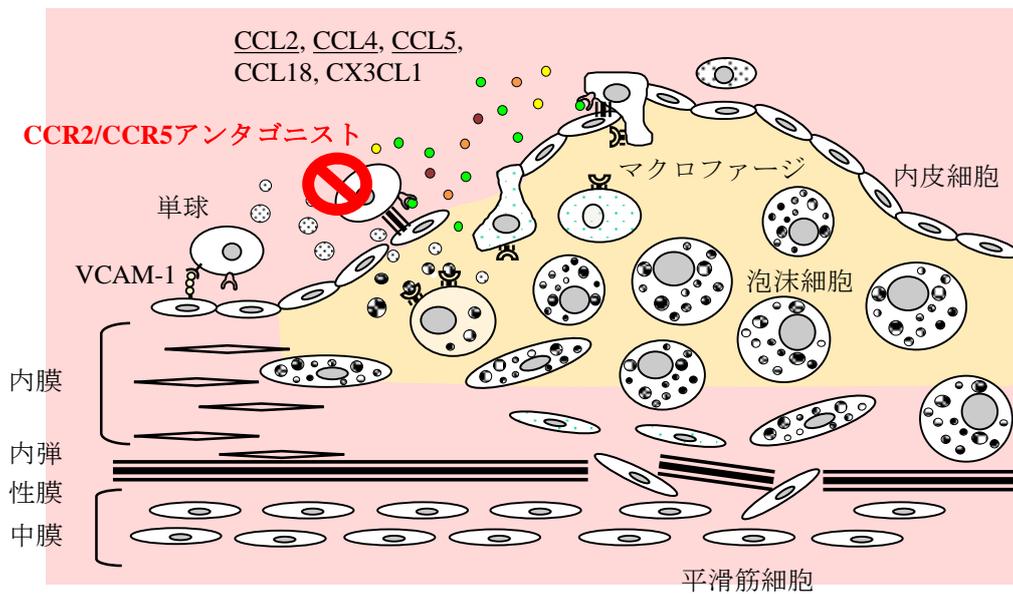


Figure 3-9. 動脈硬化巣への単球細胞の遊走を抑制

第3節 代謝抑制のための構造展開

第1項 実験方法

1-1) 血漿および尿中の代謝物測定

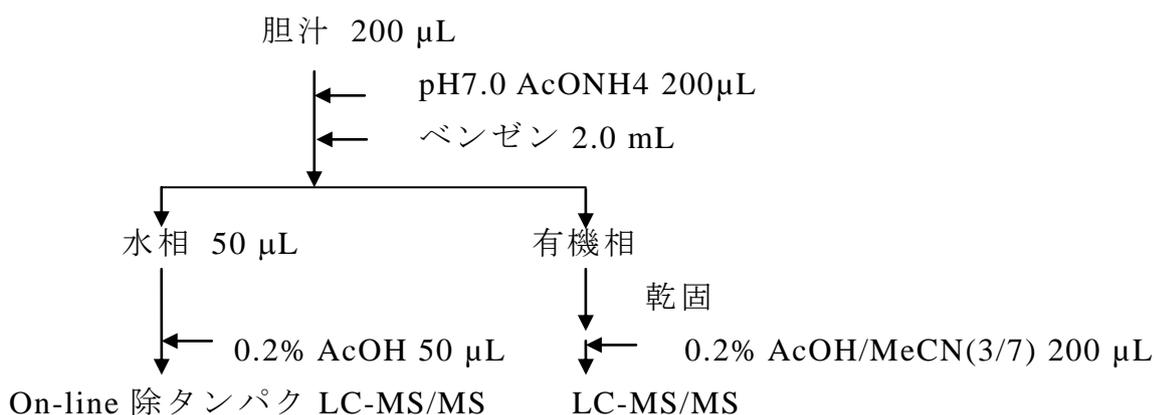
TLK-19705 の代謝物分析

TLK-19705 をラット (SD 系)雄、7 週齢に 20 mg/kg の TLK-19705 を投与した後に回収した血漿、尿、胆汁を使用して代謝物解析を行った。

OASIS 除タンパクカートリッジカラム(Waters)と分析カラム(Inertsil C8 4.6 x 150 mm、GL-Science)をスイッチングバルブを介して連結させ、On-line 除タンパク LC システムを構築した。スイッチングバルブはサンプル注入後 1.5 min にて切り替え、血漿および尿中の除タンパク処理をしたサンプルを分析カラムに導入した。液体クロマトグラフィー (LC)は、2690 alliance (Waters)を使用し、流速 ; 0.7 mL/min 、HPLC 移動相 A ; 0.2% AcOH/MeCN = 98/2、B; 0.2% AcOH/MeCN = 2/98 の条件でグラジエント分析(分析時間 15min)を行った。質量分析計 (MS)には LCQ Deca XP Plus (Thermofisher Scientific)を使用した。

1-2) 胆汁中の代謝物測定

下記フローによりベンゼン抽出を行い、水相は上記の On-line 除タンパク LC システムで、有機相は分析カラムに直接注入した。



使用機器および測定条件は、血漿および尿サンプル測定の項に準じて行った。

質量分析は、m/z 200-1000 の範囲で scan し、m/z より構造を推定した。更に MS/MS 分析により水酸化等の修飾部位を推定した。

1-3) SKL-02886 の合成方法

6-((2-(ジメチルアミノ)エチル)(メチル)アミノ)-*N*-((3-イソプロポキシフェニル)カルバモイル)-1,3-ジメチル-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド塩酸塩

5-アミノ-1,3-ジメチルピラゾール-4-カルバルデヒド (6.15 g) をシアノ酢酸エチル (10 mL) に加え 185°C で 3 時間攪拌した。混合液を室温まで放冷した後、沈殿した固体をろ過にて回収し、酢酸エチルにて洗浄し、高真空乾燥することで 6-ヒドロキシ-1,3-ジメチルピラゾロ [5,4-*b*]ピリジン-5-カルボニトリルを白色沈殿として得た。この試料の一部 (2.18 g) をフェニルホスホン酸ジクロリド (10 mL) に加え溶解し、150°C で 17 時間攪拌した。溶液を室温にまで放冷した後、水を加えた。混合液を酢酸エチルで抽出し、有機相をデカントし、飽和炭酸水素ナトリウム溶液で洗浄し、無水硫酸ナトリウムを加え乾燥し、ろ過した。溶媒は減圧除去し、白色固体を得た。この試料の一部 (2.16 g) を THF (50 mL) に溶解し、*N, N, N'*-トリメチルエタン-1, 2-ジアミン (10.6 mL) を処理した。混合液を 20 時間加熱還流し、室温にまで放冷し、酢酸エチルで抽出した。有機層に無水硫酸ナトリウムを加え乾燥させ、ろ過し、減圧下で溶媒を除去して 6-{{2-(ジメチルアミノ)エチル}メチルアミノ}-1, 3-ジメチルピラゾロ[5,4-*b*]ピリジン-5-カルボニトリルを褐色油状物として得た。この試料 (2.96 g) を濃硫酸 (10 mL) に溶解し、溶液を 60°C で 15 時間攪拌した。混合液をその後、飽和炭酸水素ナトリウム溶液で中和し、ジクロロメタンで抽出した。その抽出液は塩化ナトリウム溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムを加え乾燥させ、ろ過し、減圧濃縮した。残渣を酢酸エチル-ヘキサンを用いて再結晶させることで精製し、6-{{2-(ジメチルアミノ)エチル}メチルアミノ}-1,3-ジメチルピラゾロ[5,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミドを白色固体として得た。この試料の一部 (2.0 g, 6.8 mmol) を加熱したトルエン (20 mL) に溶解させ、2 時間共沸した。溶液は室温まで放冷し、3-イソプロポキシフェニルイソシアネート (1.7 g, 9.6 mmol) を処理した。混合液を 16 時間還流し、その後室温まで放冷した。溶媒は減圧除去した。残渣は THF (100 mL) で溶解し、塩酸 (4 N デイオキサン溶液, 7 mL) を処理した。生成した固体をろ過し、減圧乾燥させ、アセトニトリルから再結晶させることで SKL-02886 を白色固体 (2.55 g, 74% yield) として得た。HPLC: $t_R = 10.5$ min (純度 99%), MS ESI⁽⁺⁾ = 466 (M-H). ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ : 1.27 (d, 6H, $J = 6.0$ Hz), 2.41 (s, 3H), 2.53 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 2.83 (s, 6H), 2.98 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 3.92 (t, 2H, $J = 6.4$ Hz), 4.60 (q, 1H, $J = 6.0$ Hz), 6.68 (m, 1H), 7.05 (m, 1H), 7.22 (m, 2H), 8.24

(s, 1H), 10.58(s, 1H), 11.09 (s, 1H).

1 - 4) 各種ケモカインによる細胞遊走への阻害活性評価 (選択性評価)

human C-C Chemokine Ligand 11 (CCL11) (R&D システム社) により誘導される好酸球(eosinophil)の細胞遊走は、第 2 章、第 1 節、第 1 項、1 - 1) に準じて行った。その他のケモカインによる各種細胞の細胞遊走は、第 2 章、第 3 節、第 1 項、1 - 3) に準じて行った。

第2項 実験結果および考察

TLK-19705 は、糖尿病性腎症および動脈硬化モデルにおいて病態進行を抑制する効果を示したが、*in vivo* の解析を進めていく中で、水酸化による代謝を受けることが示唆されてきた。ラットを用いた評価では、LC-MS 法により A 環あるいは B 環がヒドロキシル化を受けることで3種類の代謝をうけることが示唆された (Figure 3-10)。安定性を獲得した化合物を得ることができれば、CCR2/CCR5 アンタゴニストの生体内で効果を示すのに必要な量を減少させることができる可能性も考えられるため、TLK-19705 の代謝物形成を防ぐための構造展開を新たに開始した。

A 環のフェニル基の代謝を防ぐために3位と4位あるいは4位への置換基導入を検討した。もっとも効果的な手段は、4位へのフッ素の導入をやめ、更に電子求引基である CF₃ の3位への導入の代わりに、親油性であり電子供与基でもあるイソプロポキシ基を導入することであった。次にピラゾロピリジン基の6位へのヒドロキシレーションを防ぐために、塩を形成する残基を導入し、併せて溶解度向上を目指した。その結果得た SKL-02886 は溶解度が向上し、CCL2 誘導の THP-1 細胞の細胞遊走に対する阻害活性も IC₅₀ 値が 80 nM と向上した (Figure 3-11)。なお各種ケモカイン誘導の細胞遊走に対する阻害活性を評価した結果、SKL-02886 も CCR5 アンタゴニスト活性を有することを確認している (Table 3-2)。

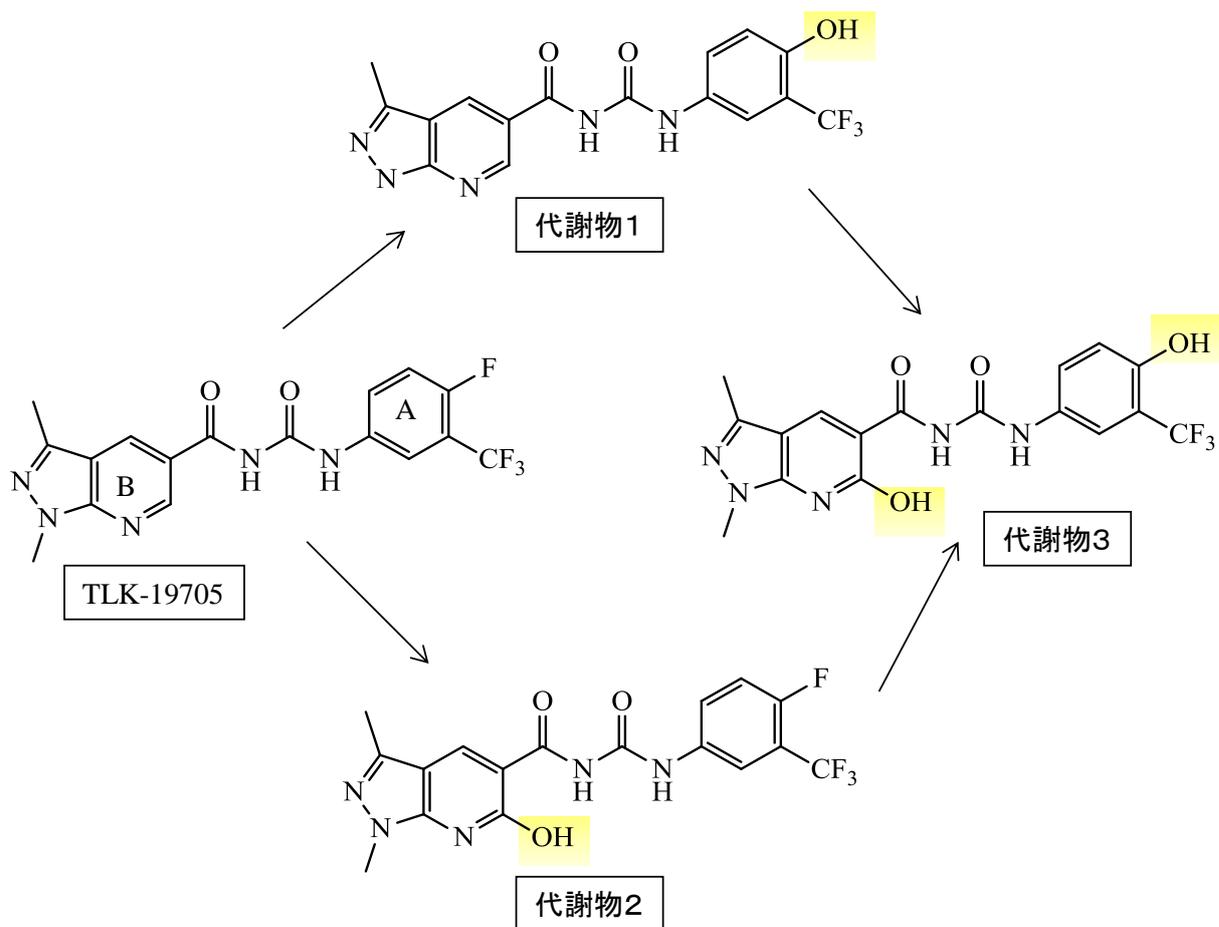
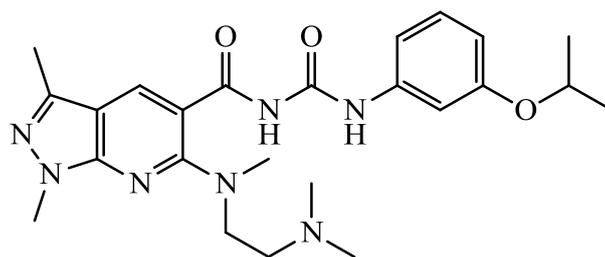


Figure 3-10. TLK-19705 の生体内代謝物



SKL-02886: IC₅₀= 0.08 μM, CC₅₀= 16.5 μM

Figure 3-11. SKL-02886 の化学構造

Table 3-2. 各種ケモカイン誘導の細胞遊走に対する SKL-02886 の阻害活性比較

ケモカイン	ケモカイン受容体	細胞種	ケモタキシス IC50 (μ M)
CCL2	CCR2	THP-1	0.08
CCL2	CCR2	PBMC	0.2
CCL3	CCR1, CCR5	PBMC	>10
CCL4	CCR5	PBMC	0.4
CCL11	CCR1, CCR3	eosinophil	>10
CCL17	CCR4	CCR4-transfected THP-1	>10
CXCL8	CXCR1, CXCR2	PMN	>10

第4節 関節炎モデルにおける SKL-02886 の効果 序論

関節リウマチは自己免疫疾患の一つで、関節滑膜を主病変とした全身性炎症疾患である。その病態の中心は関節滑膜における炎症反応と滑膜細胞の異常増殖（パンヌス形成）であり、その罹患関節組織ではマクロファージ、T細胞、B細胞や樹状細胞などの炎症細胞が浸潤していることが明らかとなっている(29-31)。これらの炎症細胞は病変部位の血管より浸潤し滑膜の炎症を起こし、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、インターロイキン-6 (IL-6)、そしてインターロイキン-1 ベータ (IL-1 β)などのサイトカインを産生し破骨細胞の分化・増殖を亢進し骨破壊を起こす(29, 32, 33)(Figure 3-12)。

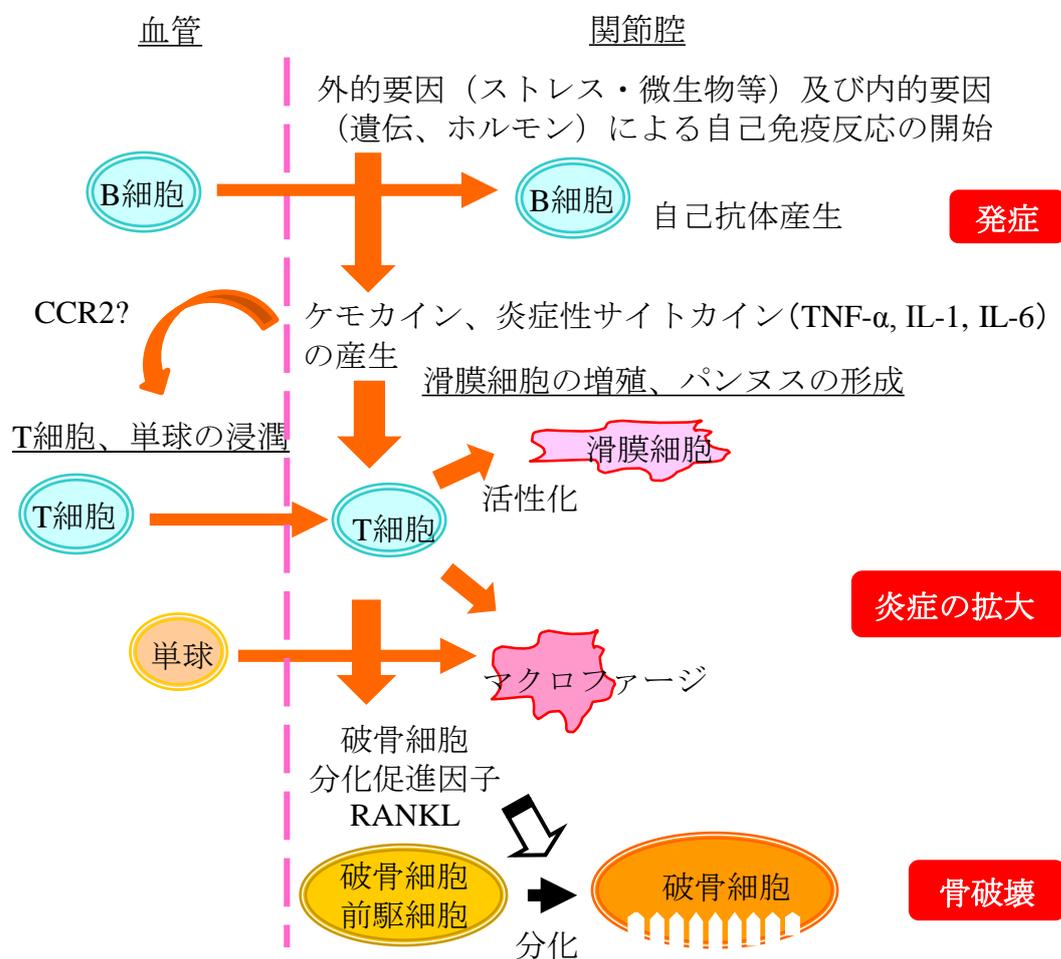


Figure 3-12. 関節リウマチの発症・進展に関与する因子

炎症細胞の病変部位への浸潤にはケモカインが関与することが考えられることから、本研究では糖尿病性腎症モデルおよび動脈硬化モデルでの評価

に続き、コラーゲン関節炎ラットおよびアジュバント関節炎ラットを用いて CCR2/CCR5 アンタゴニストの関節炎モデルに対する作用を評価することとした。

コラーゲン関節炎モデルは、病態発症の原因や抗関節炎因子の評価などに広く使用されているモデルである(34)。関節炎は通常、マウスやラットに同種あるいは異種のタイプ 2 コラーゲンをアジュバントとともに接種し、感作させることで惹起させる。また関節リウマチと同様に、コラーゲン関節炎モデルのマウスおよびラットの関節炎を起こした部位では TNF- α や IL-1 β のような炎症性サイトカインが高度に発現している(34)。ラットコラーゲン関節炎モデルでは、関節部位の洗浄液中の CCL2 や、関節部位での CCL2 mRNA レベルは、感作後約 2 週間でピークに達することが報告され、ラット CCL2 中和抗体の処理により障害部位の浸出液のマクロファージ数は有意に減少し、足蹠部の膨張は 30%減少したとの報告がある(35)。これらの結果は、CCL2 がコラーゲン関節炎のモデルにおいて単球の浸潤や病態進行に重要な役割を担っていることを示唆している。

アジュバント関節炎は慢性関節炎を形成するモデルである。その病態は、T 細胞の調節する自己免疫性関節炎であり、関節リウマチの免疫学的側面の研究や、抗炎症薬を評価するためのモデルとして用いられている(36)。アジュバント関節炎の膝関節では CCL2 と CCR2 の発現が増加していることから、CCL2 および CCR2 はアジュバント関節炎の病態発症に関与していることが示唆されている(37, 38)。また 8 位のプロリンをアラニン置換した CCL2 阻害剤の P8A-CCL2 を処理することにより病変部位へのマクロファージの浸潤や、骨破壊などが改善したとの報告がなされている(39)。

第1項 実験方法

1-1) コラーゲン関節炎ラットに対する作用

日本チャールス・リバー株式会社より購入した Lewis ラット雌性 6 週齢を 1 群 8 匹で使用した。コラーゲンはウシ関節由来のタイプ 2 コラーゲン（コラーゲン技術研修会より購入）を使用し、アジュバントには Adjuvant Complete Freund H37Ra (Difco 社製)を用いた。コラーゲン/アジュバント 0.4 mL (0.6 mg/body)を尾根から後背部にかけて接種(皮内投与)し、7 日後に再び半量のコラーゲン/アジュバントを同様に接種（0.2 mL, 0.3 mg/body）して関節炎を惹起した。予防効果においては感作後、直ちに薬物投与を開始し、治療効果では後肢足蹠部の 2 次炎症を確認した感作 14 日目より投与開始し、初回感作 28 日後まで連日投与した。SKL-02886 は 1 日 2 回連日経口投与し、陽性対象コントロールであるメトトレキサート(MTX)は 1 日 1 回の隔日投与で実施した。予め設定した日時に後肢足蹠部の容積を足跡容積測定装置（PLETHYSMOMETER：ユニコム社製）を用いて測定した。

関節炎による後肢足蹠部の腫脹は、水置換法（足蹠浮腫法）にて測定し以下の計算式により算出し浮腫率（%）(Increase in footpad volume)として表した。

$$\text{浮腫率 (\%)} = (\text{各測定値} - \text{接種前測定値}) / (\text{接種前測定値}) \times 100$$

感作 29 日目において摘出した後肢の軟 X 線撮影を行い、以下に示す基準に従ってブラインドで骨破壊の程度を評価した(代表的なレントゲン像を Figure 3-13 に示す)。

- 0：境界面が明瞭
- 1：境界面が不明瞭（1ヶ所）
- 2：境界面が不明瞭（2カ所）
- 3：境界面の判断が困難
- 4：境界面の判断が更に困難

スコア 0:境界面が明瞭



スコア 1:境界面が不明瞭 (1ヶ所)



スコア 2:境界面が不明瞭 (2カ所)



スコア 3:境界面の判断が困難



スコア 4:境界面の判断が更に困難



Figure 3-13. 代表的なレントゲン写真像

1-2) アジュバント関節炎ラットに対する作用

日本チャールス・リバー株式会社より購入した Lewis ラット雌性 6 週齢を 1 群 8 匹で使用した。Mycobacterium butyricum/ Incomplete Freund adjuvant 0.3 ml (1 mg/body)をラットの右足足蹠部に皮下注射することで感作した。被験物質は、感作 10 日目より投与を開始した。SKL-02886 は 1 日 2 回、連日経口投与し、陽性コントロールとして使用した MTX は 1 日 1 回の隔日投与で実施した。非処置足の容積を足跡容積測定装置 (PLETHYSMOMETER: ユニコム社製) を用いて設定した日時で測定した。

関節炎による後肢足蹠部の腫脹は、水置換法 (足蹠浮腫法) にて測定し以下の計算式により算出し浮腫率 (%) (Increase in footpad volume)として表示

た。

$$\text{浮腫率 (\%)} = (\text{各測定値} - \text{接種前測定値}) / (\text{接種前測定値}) \times 100$$

1 - 3) 実験結果の検定

第2章、第4節、第1項、1 - 3) に準じて行った。

第2項 実験結果

2-1) コラーゲン関節炎モデルにおける SKL-02886 の予防効果

コラーゲン関節炎モデルにおける SKL-02886 の予防効果を検証した際の後肢足蹠部の浮腫率の推移を Figure 3-14 に示し、初回感作 28 日後の浮腫率を各群で比較した結果を Figure 3-15 に示す。タイプ 2 コラーゲンを接種することによりコントロール群の後肢足蹠部の浮腫率は、タイプ 2 コラーゲン非処置群(NT)と比較して 14 日目以降急激に増加していく(Figure 3-14)。これに対し SKL-02886 投与群では、用量依存的に後肢足蹠部の浮腫を抑制した。浮腫率評価最終日においても 10 mg/kg 以上の投与群で有意な抑制効果が確認された(Figure 3-15)。Day 29 に動物を麻酔下で安楽死させた後、後肢のレントゲン写真を撮影し、骨破壊の程度を評価した。その結果を Figure 3-16 に示した。30 mg/kg の SKL-02886 投与により、骨破壊は有意に抑制されていた。

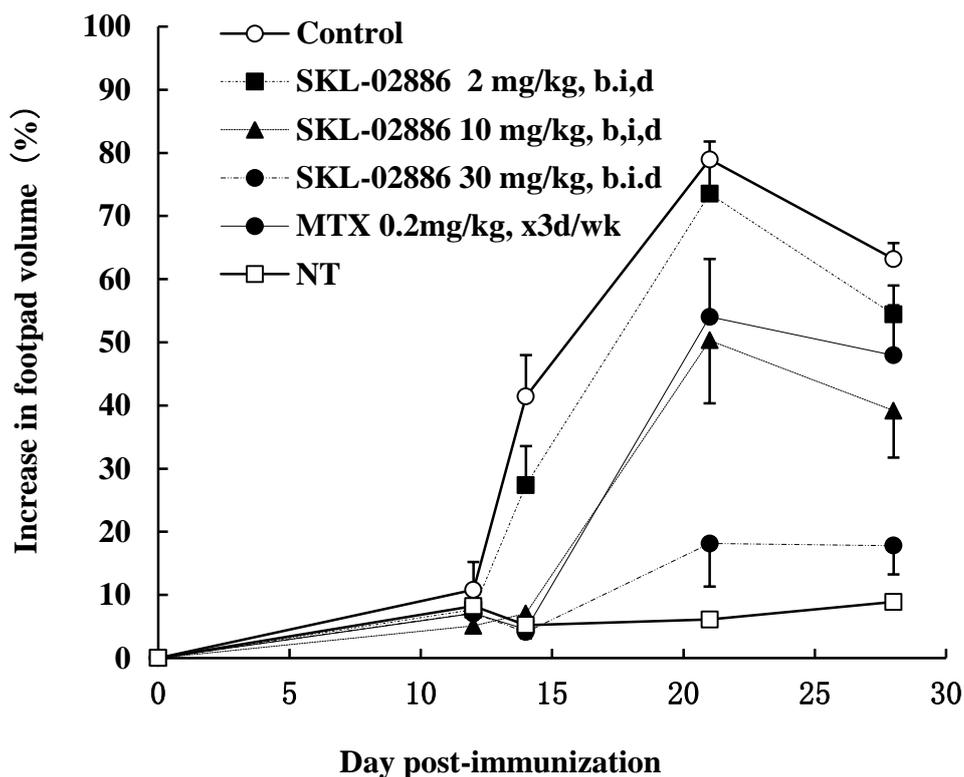
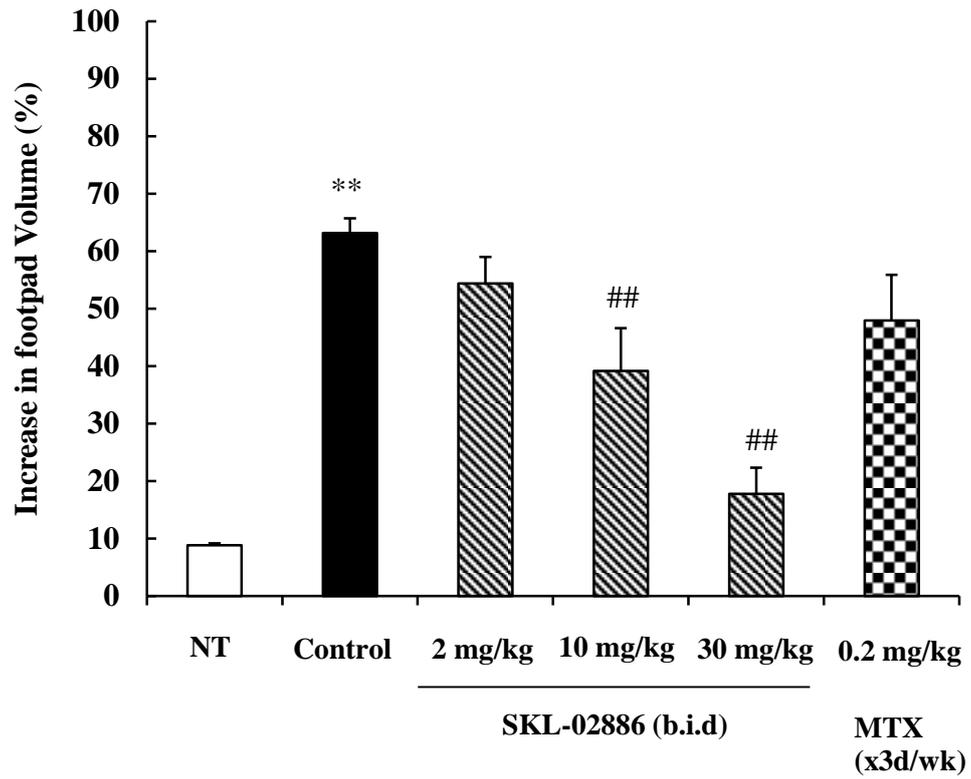


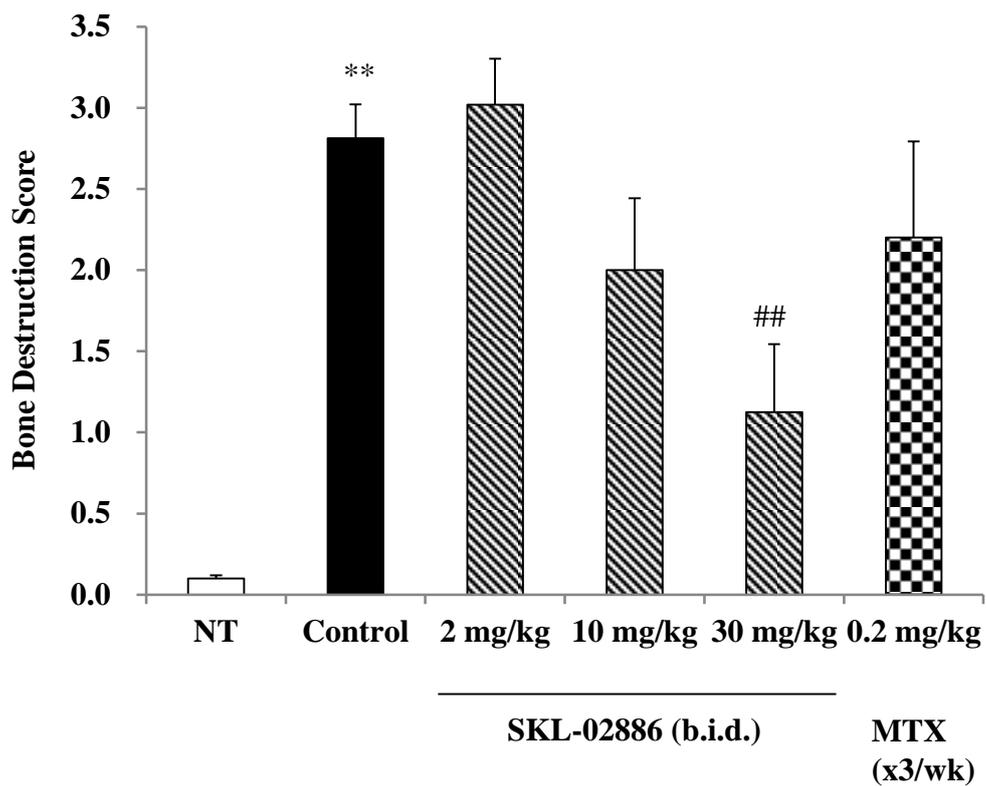
Figure 3-14. 後肢足蹠部の浮腫の推移 (予防効果)



** $P < 0.01$: NT 群に比し (student's t-test)

$P < 0.01$: control 群に比し (Dunnett 検定)

Figure 3-15. Day28 における後肢足蹠部の浮腫率の比較 (予防効果)



** $P < 0.01$: NT 群に比し(student's t-test)

$P < 0.01$: Control 群に比し(student's test)

Figure 3-16. 後肢足蹠部の骨破壊に対する作用（予防効果）

2-2) アジュバント関節炎モデルにおける SKL-02886 の治療効果

アジュバント関節炎における SKL-02886 の治療効果は、非処置足に浮腫が認められ始めた感作 10 日目より薬物投与を開始し、18 日間投与を継続し評価した。後肢足蹠部の浮腫の推移を Figure 3-17 に示し、Figure 3-18 には、浮腫率評価最終日である Day 28 での浮腫率を各群で比較したものを示す。SKL-02886 はアジュバント投与により誘導される非処置足の浮腫を用量に依存して抑制する傾向を示したが、有意な作用としては確認できなかった。

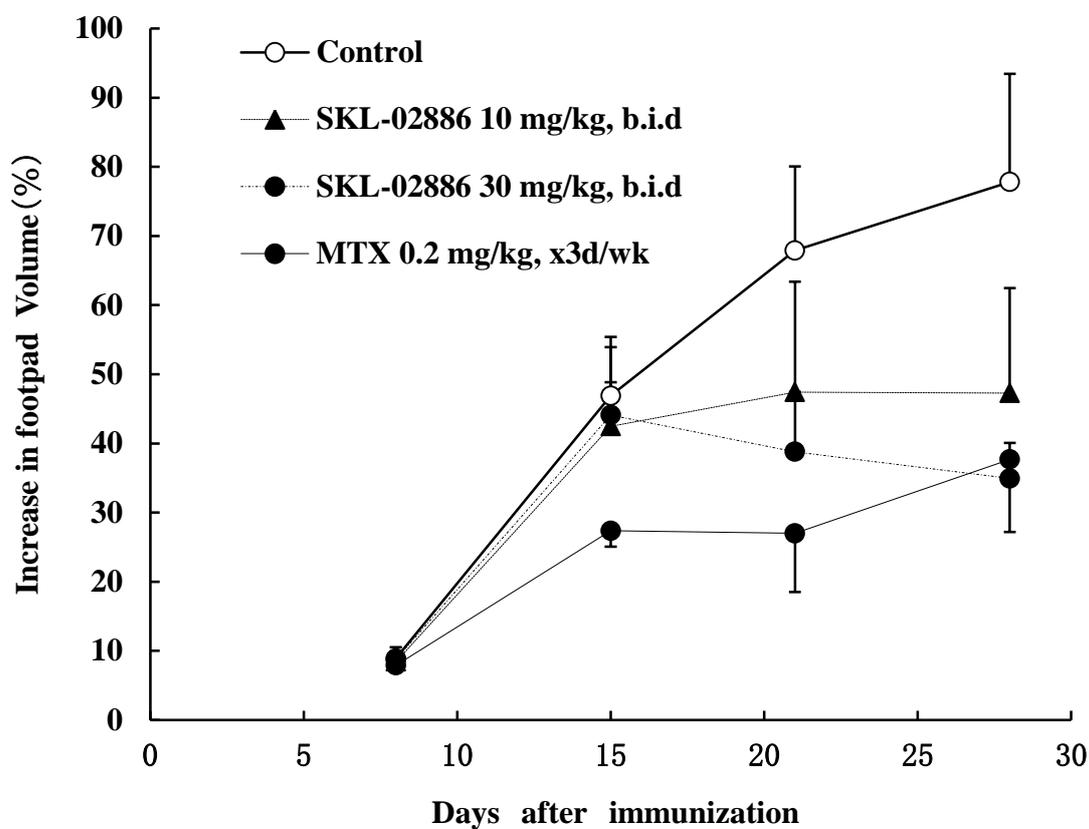


Figure 3-17. 後肢足蹠部の浮腫の推移 (治療効果)

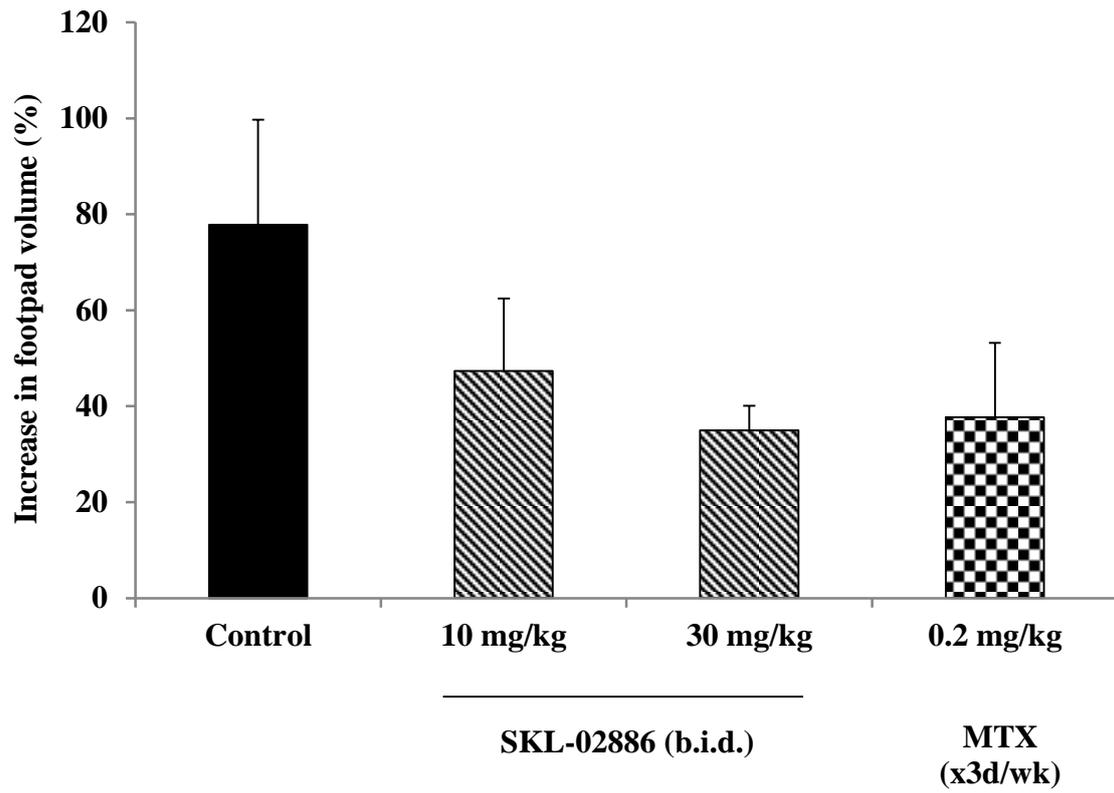


Figure 3-18. Day28 における後肢足蹠部の浮腫率の比較 (治療効果)

2-3) コラーゲン関節炎モデルにおける SKL-02886 の治療効果

コラーゲン関節炎モデルにおける治療効果の評価は、後肢足蹠部に浮腫が発生する感作 14 日目より SKL-02886 の投与を開始し 14 日間の連投により行った。評価結果を Figure 3-19 に示す。予防効果での試験結果と異なり、30 mg/kg の投与においても後肢足蹠部の浮腫の改善は認められなかった。

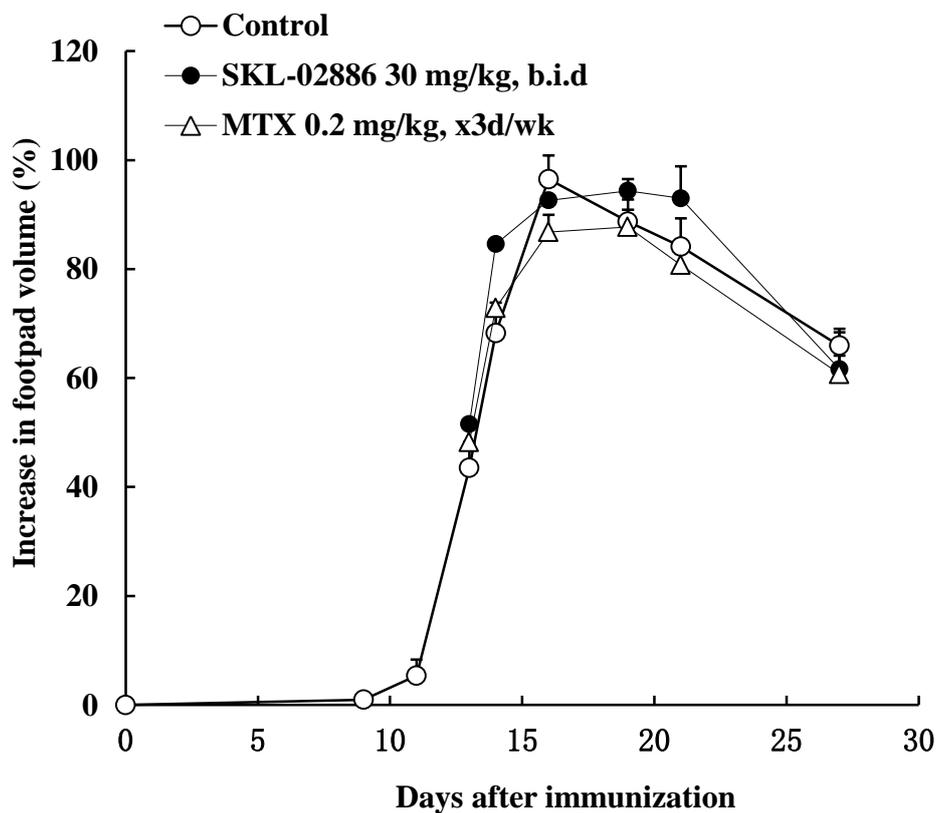


Figure 3-19. 後肢足蹠部の浮腫の推移（治療効果）

第3項 考察

SKL-02886 は、コラーゲン関節炎モデル用いた予防効果の検証においては、有意な病態進展の抑制効果を示した。一方、アジュバント関節炎モデルおよびコラーゲン関節炎モデルを用いた治療効果の検証においては、予防効果の検証試験において病態進展の抑制を示した 30 mg/kg の投与においても有意な治療効果を示すことはなかった。

関節リウマチ患者を対象とした臨床試験では、CCR2 抗体に続き、CCR5 アンタゴニストも十分な治療効果を示すことができなかったことが報告されている(40, 41)。更に最近、関節リウマチ患者から採取した滑液により誘導される単球の細胞遊走が、CCR2 および CCR5 の中和抗体で抑制されないことが報告された(42)。この報告では抗 CCR1 抗体がより有効な手段として報告されているが、その効果も滑液により誘導される単球の細胞遊走の一部を抑制するのみである。これらの報告はヒト滑液中には、CCR2, CCR5 および CCR1 を含む複数の因子が存在し、病変部位への炎症細胞の遊走を促していること示している。以上より、複数の細胞遊走因子を同時に阻害しなければ病巣への単球の遊走を抑制することはできないことが推察される (Figure 3-20)。また、関節リウマチの進展には、単球・マクロファージの他に T 細胞や B 細胞などの複数の免疫細胞が関与しており、これらの要因も臨床試験で抗 CCR2 抗体や CCR5 アンタゴニストの効果が確認できなかった理由と考えられる。

以上のことから、CCR2/CCR5 アンタゴニストは病態の初期または再燃を防ぐための予防的な役割としては有効な手段となる可能性は考えられるが、病態が進行した状態においては、滑膜の病変部位への炎症細胞浸潤を一部しか抑制できないことが強く示唆され、関節リウマチの治療手段としての単剤だけの応用は難しいと考える。

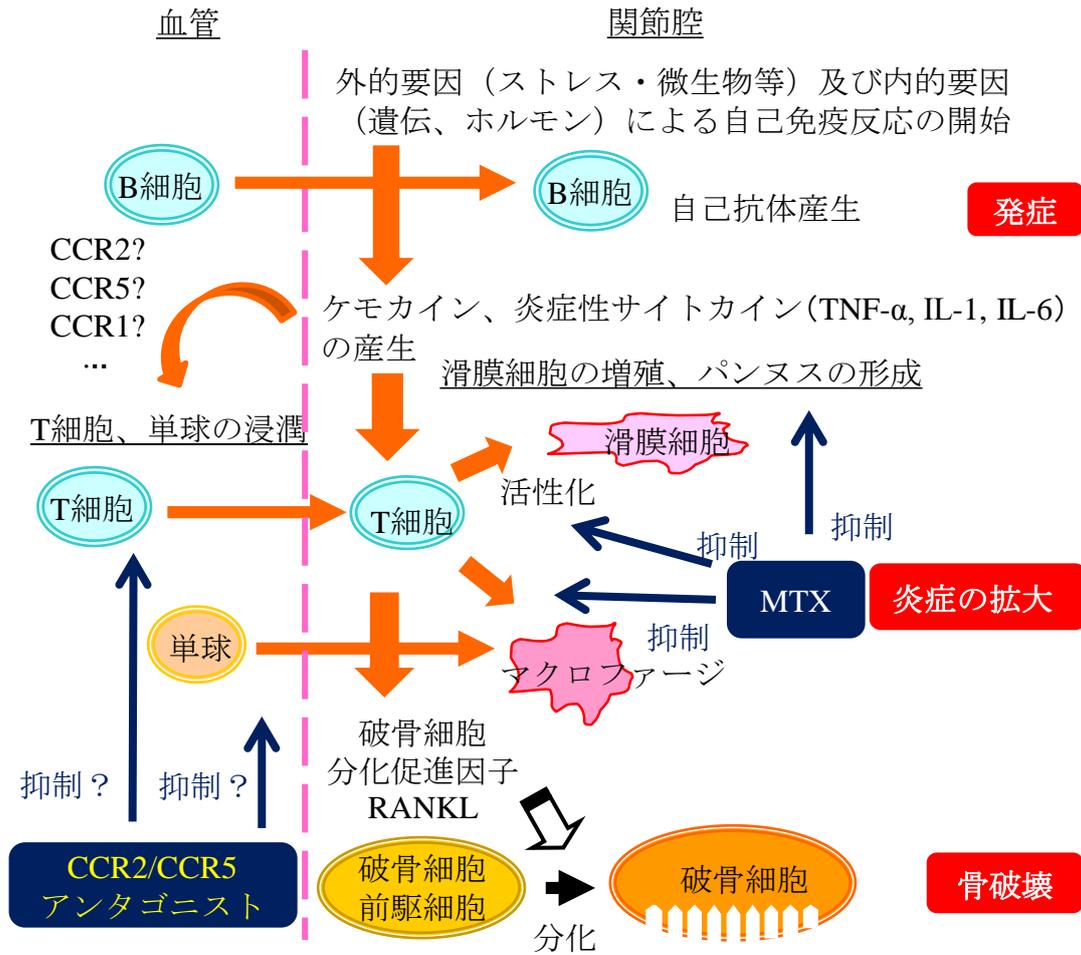


Figure 3-20. 関節リウマチの病態進展の制御

第5節 まとめ

各種炎症疾患モデルにおいて CCR2/CCR5 アンタゴニストの効果を検証した結果、TLK-19705 は糖尿病性腎症モデルおよび動脈硬化モデルにおいて病態進行を抑制する効果を示した。その一方で、TLK-19705 は生体内で代謝を受けやすい構造であることが示唆されたため、代謝改善を目指した構造展開を実施し、新たに SKL-02886 を得た。SKL-02886 は、コラーゲン関節炎モデルおよびアジュバント関節炎モデルにおいて病態進行を抑制する結果を示したが、病態発症後の治療効果については改善効果を確認できなかった。以上より CCR2/CCR5 アンタゴニストは糖尿病性腎症および動脈硬化を標的とした開発が有用と考えられた。

参考文献

1. Brownlee M., The pathobiology of diabetic complications. A unifying mechanism. *Diabetes* 54, 1615-1625 (2005)
2. Navarro-González J.F., Mora-Fernández C., Muros de Fuentes M., and García-Pérez J., Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nature Reviews Nephrology* 7, 327-340 (2011)
3. Wada T., Yokoyama H., Matsushima K., and Kobayashi K., Monocyte chemoattractant protein-1: does it play a role in diabetic nephropathy? *Nephrology Dialysis Transplantation* 18, 457-459 (2003)
4. Furuichi K., Hisada Y., Shimizu M., Okumura T., Kitagawa K., Yoshimoto K., Iwata Y., Yokoyama H., Kaneko S., and Wada T., Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and membrane-type I MMP (MT1-MMP) affect the remodeling of glomerulosclerosis in diabetic OLETF rats. *Nephrology Dialysis Transplantation* 26, 3124-3131 (2011)
5. Wada T., Furuichi K., Sakai N., Iwata Y., Yoshimoto K., Shimizu M., Takeda S.I., Takasawa K., Yoshimura M., Kida H., Kobayashi K.I., Mukaida N., Naito T., Matsushima K., and Yokoyama H., Up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy. *Kidney International* 58, 1492-1499 (2000)
6. Kitagawa K., Wada T., Furuichi K., Hashimoto H., Ishiwata Y., Asano M., Tekeya M., Kuziel W.A., Matsushima K., Mukaida N., and Yokoyama H., Blockage of CCR2 ameliorates progressive fibrosis in kidney. *The American Journal of Pathology* 165, 237-246 (2004)
7. Kanamori H., Matsubara T., Mima A., Sumi E., Nagai K., Takahashi T., Abe H., Iehara N., Fukatsu A., Okamoto H., Kita T., Doi T., and Arai H., Inhibition of MCP-1/CCR2 pathway ameliorates the development of diabetic nephropathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 360, 772-777 (2007)
8. Blankenberg S., Barbaux S., and Tiret L., Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 170, 191-203 (2003)
9. Cybulsky M.I., Liyama K., Li H., Zhu S., Chen M., Liyama M., Davis V., Gutierrez-Ramos J.C., Connelly P.W., and Milstone D.S., A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *The Journal of Clinical Investigation* 107, 1255-1262 (2001)
10. Boisvert W.A., Modulation of atherogenesis by chemokines. *Trends in*

Cardiovascular Medicine 14, 161-165 (2004)

11. Charo I.F., and Taubman M.B., Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circulation Research* 95, 858-866 (2004)
12. Boring L., Gosling J., Cleary M., and Charo I.F., Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394, 894-897 (1998)
13. Van der Wal A.C., Becker A.E., van der Loos C.M., and Das P.K., Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 89, 36-44 (1994)
14. Yamashita T., Kawashima S., Ozaki M., Namiki M., Inoue N., Hirata K., and Yokoyama M., Propagermanium reduces atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice via inhibition of macrophage infiltration. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22, 969-974 (2002)
15. Eto Y., Shimokawa H., Tanaka E., Morishige K., Fuchigami M., Ishiwata Y., Matsushima K., and Takeshita A., Long-term treatment with propagermanium suppresses atherosclerosis in WHHL rabbits. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 41, 171-177 (2003)
16. Shimokawa H., Eto Y., Miyata K., Morishige K., Kandabashi T., Matsushima K., and Takeshita A., Propagermanium suppresses macrophage-mediated formation of coronary arteriosclerotic lesions in pigs in vivo. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 41, 372-380 (2003)
17. Barlic J., and Murphy P.M., Chemokine regulation of atherosclerosis. *Journal of Leukocyte Biology* 82, 226-236 (2007)
18. Koenen R.R., and Weber C., Therapeutic targeting of chemokine interactions in atherosclerosis. *Nature Reviews Drug Discovery* 9, 141-153 (2010)
19. Kang Y.S., Lee M.H., Song H.K., Ko G.J., Kwon O.S., Lim T.K., Kim S.H., Han S.Y., Han K.H., Lee J.E., Han J.Y., Kim H.K., and Cha D.R., CCR2 antagonism improves insulin resistance, lipid metabolism, and diabetic nephropathy in type 2 diabetic mice. *Kidney International* 78, 883-894 (2010)
20. Taguma Y., Kitamoto Y., Futaki G., Ueda H., Monma H., Ishizaki M., Takahashi H., Sekino H., and Sasaki Y., Effect of captopril on heavy proteinuria in azotemic diabetics. *The New England Journal of Medicine* 313, 1617-1620 (1985)

21. Lewis E.J., Hunsicker L.G., Bain R.P., and Rohde R.D., The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on diabetic nephropathy. The collaborative Study Group. *The New England Journal of Medicine* 329, 1456-1462 (1993)
22. Aiello R.J., Perry B.D., Bourassa P.A., Robertson A., Weng W., Knight D.R., Smith A.H., Frederick K.S., Kalgutkar A., and Gladue R.P., CCR2 receptor blockade alters blood monocyte subpopulations but does not affect atherosclerotic lesions in apoE(-/-) mice. *Atherosclerosis* 208, 370-375 (2010)
23. Olzinski A.R., Turner G.H., Bernard R.E., Karr H., Cornejo C.A., Aravindhan K., Hoang B., Ringenberg M.A., Qin P., Goodman K.B., Willette R.N., Macphee C.H., Jucker B.M., Schon C.A., and Gough P.J., Pharmacological inhibition of C-C chemokine receptor 2 decreases macrophage infiltration in the aortic root of the human C-C chemokine receptor 2/apolipoprotein E-/- mouse: magnetic resonance imaging assessment. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 30, 253-259 (2010)
24. Yokochi S., Hashimoto H., Ishiwata Y., Shimokawa H., Haino M., Terashima Y., and Matsushima K., An anti-inflammatory drug, propagermanium, may target GPI-anchored proteins associated with an MCP-1 receptor, CCR2. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 21, 389-398 (2001)
25. Major T.C., Olszewski B., and Rosebury-Smith W.S., A CCR2/CCR5 antagonist attenuates an increase in angiotensin II-induced CD11b+ monocytes from atherogenic ApoE-/- mice. *Cardiovascular Drugs and Therapy* 23, 113-120 (2009)
26. Veillard NR, Kwak B., Pelli G., Mulhaupt F., James R.W., Proudfoot A.E., and Mach F., Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice. *Circulation Research* 94, 253-261 (2004)
27. Hägg D.A., Olson F.J., Kjelldahl J., Jernås M., Thelle D.S., Carlsson L.M., Fagerberg B., and Svensson P.A., Expression of chemokine (C-C motif) ligand 18 in human macrophages and atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 204, e15-e20 (2009)
28. Zhao Q., Dual targeting of CCR2 and CCR5: therapeutic potential for immunologic and cardiovascular diseases. *Journal of Leukocyte Biology* 88, 41-55 (2010)
29. Harris E.D. Jr., Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for

- therapy. *The New England Journal of Medicine* 322, 1277-1289 (1990)
30. Benoist C., and Mathis D., A revival of the B cell paradigm for rheumatoid arthritis pathogenesis? *Arthritis Research* 2, 90-94 (2000)
31. Wang Q., Ma Y., Liu D., Zhang L., and Wei W., The role of B cells and their interactions with fibroblast-like synoviocytes in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *International Archives of Allergy and Immunology* 155, 205-211 (2011)
32. Feldmann M., and Maini S.R., Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics. *Immunological Reviews* 223, 7-19 (2008)
33. Rasheed Z., and Haqqi T.M., Update on Targets of Biologic Therapies for Rheumatoid Arthritis. *Current Rheumatology Reviews* 4, 246 (2008)
34. Williams R.O., Collagen-induced arthritis as a model for rheumatoid arthritis. *Methods in Molecular Medicine* 98, 207-216 (2004)
35. Ogata H., Takeya M., Yoshimura T., Takagi K., and Takahashi K., The role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the pathogenesis of collagen-induced arthritis in rats. *The Journal of Pathology* 182, 106-114 (1997)
36. van Eden W., Wagenaar-Hilbers J.P., and Wauben M.H.M., Adjuvant arthritis in the rat. *Current Protocols in Immunology Unit* 15.4, DOI: 10.1002/0471142735.im1504s19 (2001)
37. Shahrara S., Amin M.A., Woods J.M., Haines G.K., and Koch A.E., Chemokine receptor expression and in vivo signaling pathways in the joints of rats with adjuvant-induced arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 48, 3568-3583 (2003)
38. Liu S.H., Wong C.S., and Chang D.M., Increased monocyte chemoattractant protein-1 in knee joints of rats with adjuvant-induced arthritis: in vivo microdialysis. *The Journal of Rheumatology* 32, 2205-2211 (2005)
39. Shahrara S., Proudfoot A.E., Park C.C., Volin M.V., Haines G.K., Woods J.M., Aikens C.H., Handel T.M., and Pope R.M., Inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 ameliorates rat adjuvant-induced arthritis. *The Journal of Immunology* 180, 3447-3456 (2008)
40. Gerlag D.M., Hollis S., Layton M., Vencovský J, Szekanecz Z, Braddock M., and Tak P.P., ESCAPE Study Group. Preclinical and clinical investigation of a CCR5 antagonist, AZD5672, in patients with rheumatoid arthritis receiving

methotrexate. *Arthritis & Rheumatism* 62, 3154-3160 (2010)

41. van Kuijk A.W., Vergunst C.E., Gerlag D.M., Bresnihan B., Gomez-Reino J.J., Rouzier R., Verschueren P.C., van de Leij C., Maas M., Kraan M.C., and Tak P.P., CCR5 blockade in rheumatoid arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Annals of the Rheumatic Diseases* 69, 2013-2016 (2010)
42. Lebre M.C., Vergunst C.E., Choi I.Y., Aarrass S., Oliveira A.S., Wyant T., Horuk R., Reedquist K.A., and Tak P.P., Why CCR2 and CCR5 blockade failed and why CCR1 blockade might still be effective in the treatment of rheumatoid arthritis. *Plos One* 6, e21772 (2011)

第4章 ヘテロアロイルフェニルウレア誘導体の安全性課題の解決

第1節 中枢作用と肝障害の回避

第1項 実験方法

1-1) SKL-02886 類縁構造化合物の合成

Compound 18-20 は、第3章、第3節、第1項、1-3) SKL-02886 の合成方法と同様の方法で合成した。

Compound 18

6-((2-(ジメチルアミノ)エチル)(メチル)アミノ)-*N*-((3-メトキシフェニル)カルバモイル)-1,3-ジメチル-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド塩酸塩

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.17 (s, 6H), 2.40 (s, 3H), 2.52 (m, 2H), 2.98 (s, 3H), 3.62 (t, 2H, $J = 4.0$ Hz), 3.78 (s, 3H), 3.82 (s, 3H), 6.66 (dd, 1H, $J = 2.0, 8.0$ Hz), 7.03 (dd, 1H, $J = 2.0, 8.0$ Hz), 7.20-7.24 (m, 2H), 8.26 (s, 1H), 10.7 (s, 1H). MS: m/z 440 (M+1)

Compound 19

6-((2-(ジメチルアミノ)エチル)(メチル)アミノ)-1,3-ジメチル-*N*-((3-フェノキシフェニル)カルバモイル)-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド塩酸塩

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 2.40 (s, 3H), 2.77 (s, 6H), 2.92 (s, 3H), 3.11-3.41 (m, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.90 (t, 2H, $J = 6.8$ Hz), 6.74 (ddd, 1H, $J = 8.2, 2.4, 0.9$ Hz), 7.00-7.08 (m, 2H), 7.16 (m, 1H), 7.25 (ddd, 1H, $J = 8.2, 2.0, 0.9$ Hz), 7.32-7.46 (m, 4H), 8.27 (m, 1H), 10.39 (brs, 1H), 10.65 (s, 1H), 11.06 (s, 1H). MS m/z 502 (M+1)

Compound 20

N-((3-イソプロポキシフェニル)カルバモイル)-1,3-ジメチル-6-(4-(ピロロリジン-1-イル)ペペリジン-1-イル)-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド塩酸塩

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.27 (d, 6H, $J = 7.8$ Hz), 1.50-1.70 (m, 6H), 1.90-2.00 (m, 2H), 2.21 (m, 1H), 2.40-2.55 (m, 4H), 3.00 (brt, 2H, $J = 11$ Hz), 3.64 (brd, 2H, $J = 4.8$ Hz), 3.87 (s, 3H), 4.59 (seq, 1H, $J = 7.8$ Hz), 6.68 (dd, 1H, $J =$

2.0, 8.0 Hz), 7.04 (brd, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.20-7.24 (m, 2H), 8.42 (s, 1H), 10.6 (s, 1H), 11.1 (brs, 1H). MS: m/z 520 (M+1)

Compound 21

N-((3-イソプロポキシフェニル)カルバモイル)-1,3-ジメチル-6-(2-(ピロロリジン-1-イル)エチル)-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド塩酸塩 6-クロロ-1,3-ジメチル-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボニトリル (2.71 g, 13.1 mmol)をトルエン (45 mL)に溶解した。ビニルトリブチルチン(5 g, 15.8 mmol)とトリフェニルフォスフィン (103 mg, 3.93 mmol)を加え、その後テトラキス (トリフェニルフォスミン) パラジウム (151 mg, 0.13 mmol)を加えた。その反応混合液は2時間加熱還流した後、室温まで冷却し、飽和フッ素カリウム溶液で30分間処理した。沈殿した固体 (トリブチルチンフルオライド)をろ過により取り除き、水相を分離し、酢酸エチルで抽出した。回収した有機層を合わせ、硫酸ナトリウムで乾燥し、減圧濃縮した。残渣はヘキサンで洗浄し、1,3-ジメチル-6-ビニル-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボニトリル (2.50 g, 96 %)を淡黄色粉末として得た。

1,3-ジメチル-6-ビニル-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボニトリル (2.20 g, 11.1 mmol)をメタノール(110 mL)に溶解し、酢酸 (635 μ L, 11.1 mmol)およびピロロリジン (4.59 mL, 55.5 mmol)を処理した。その混合液を室温で3時間攪拌した後、溶媒を減圧下で除去した。残渣を水で懸濁し、酢酸エチルで抽出した。回収した有機層をあわせ、硫酸ナトリウムで乾燥し、濃縮して1,3-ジメチル-6-[2-(ピロロリジン-1-イル)エチル]-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボニトリルを茶褐色個体として得た。

1,3-ジメチル-6-[2-(ピロロリジン-1-イル)エチル]-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボニトリルを濃硫酸 (55 mL)に溶解し、60°Cで2日間攪拌した。混合液を0°Cに冷却し、6Nの水酸化ナトリウムを用いてpH 14とし、酢酸エチルで抽出した。抽出した有機層は減圧蒸発させ、残渣をエーテルで洗浄し、1,3-ジメチル-6-[2-(ピロロリジン-1-イル)エチル]-1*H*-ピラゾロ [3,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド (2.5 g)を得た。

1,3-ジメチル-6-[2-(ピロロリジン-1-イル)エチル]-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド (120 mg)をトルエン (20 mL)に懸濁した。3-イソプロポキシフェニルイソシアネート (92.7 mg)を加え、溶液を窒素ガス下で18時間還流した。反応液を冷却後に、ろ過し、ろ液を濃縮することで粗生成物 *N*-((3-イソプロポキシフェニル)カルバモイル)-1,3-ジメチル-6-(2-(ピロロリ

ジン-1-イル)エチル)-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド塩酸塩を得て、高速液体クロマトグラフィーにより精製し最終産物を塩酸塩 (3.3 mg)として得た。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.28 (d, 6H, *J* = 6.0 Hz), 1.90 (m, 2H), 2.04 (m, 2H), 2.49 (s, 3H), 2.51 (s, 3H), 3.12 (m, 2H), 3.49-3.75 (m, 6H), 4.01 (s, 3H), 4.60 (m, 2H), 6.68 (dd, 1H, *J* = 8.0, 2.1 Hz), 7.06 (m, 1H), 7.25 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 7.27 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 8.62 (s, 1H), 10.59 (s, 1H), 11.18 (s, 1H). MS *m/z* 465 (M+1)

Compound 22

Compound 22 は Compound 21 と同様の方法で合成した。

6-(2-(ジメチルアミノ)エチル-N-((3-イソプロポキシフェニル)カルバモイル)-1,3-ジメチル-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド塩酸塩

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 1.28 (d, 6H, *J* = 6.0 Hz), 2.49 (s, 3H), 2.51 (s, 3H), 3.43 (s, 3H), 3.58 (m, 2H), 4.02 (s, 3H), 4.60 (m, 2H), 6.68 (ddd, 1H, *J* = 8.3, 2.4, 0.7 Hz), 7.05 (ddd, 1H, *J* = 8.1, 1.9, 0.8 Hz), 7.18-7.31 (m, 2H), 8.63 (s, 1H), 10.15 (s, 1H), 11.18 (s, 1H). MS *m/z* 439 (M+1)

Compound 23

N-((3-イソプロポキシフェニル)カルバモイル)-1,3-ジメチル-6-(2-ピロロリジン-1-イル)エトキシ)-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド塩酸塩

6-ヒドロキシ-1,3-ジメチルピラゾロ[5,4-*b*]ピリジン-5-カルボニトリル (0.91 g)を濃硫酸 (3 mL)に溶解し、40°Cで24時間攪拌した。溶液に氷冷した水を加え、沈殿した固体をろ過し、水で洗浄し、減圧乾燥し、6-ヒドロキシ-1,3-ジメチルピラゾロ[5,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミドを白色固体として得た。この試料の一部 (0.12 g)をDMF (2 mL)に溶解し、1-(2-クロロエチル)ピリジン塩酸塩 (0.12 g)と炭酸カリウム (0.30 g)を処理した。反応液を60°Cで18時間攪拌した後、水を加え、酢酸エチルで抽出した。抽出物は飽和炭酸水素ナトリウム溶液と飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムを用いて乾燥させ、減圧濃縮し1,3-ジメチル-6-[2-(ピロロリジン-1-イル)エトキシ]-1*H*ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミドを得た。この試料の一部 (0.06 g)をトルエンに溶解し、3-イソプロポキシフェニルイソシアネート (0.1 g)を処理した。反応液は23時間加熱還流した後、室温に放冷し、溶媒を減圧蒸発させ、残渣をカラムクロマトグラフィー (メタノール/酢酸エチル)にて精製した。この試料の一部をTHFで溶解し、4 Mの塩酸/ジオキサンので処理した。

アセトニトリルを用いて再結晶させることで compound 23 を白色固体として得た。¹H NMR (DMSO-d₆) δ : 1.28 (d, 6H, *J* = 7.8 Hz), 1.80-2.10 (m, 4H), 2.50 (s, 3H), 3.00 (brt, 2H, *J* = 11 Hz), 3.15 (m, 2H), 3.68 (m, 4H), 3.93 (s, 3H), 4.59 (seq, 1H, *J* = 7.8 Hz), 4.87 (m, 2H), 6.67 (dd, 1H, *J* = 2.0, 8.0 Hz), 7.03 (brd, 1H, *J* = 8.0 Hz), 7.20-7.24 (m, 2H), 8.53 (s, 1H), 10.6 (s, 1H), 10.7 (s, 1H).

Compound 24

1, 3-ジメチル-*N*-((4-(4-メチルピペラジン-1-カルボニル)フェニル)カルバモイル)-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド塩酸塩

酢酸 (40 mL)中に 4-クロロ-1,3-ジメチルピラゾロ[5,4-*b*]ピリジン-5-カルボン酸 (2.00 g)および亜鉛末 (1.74 g)を加えた懸濁液を 80°Cにて 1.5 時間加熱した。混合液を室温にまで冷却し、5 N の水酸化ナトリウムの氷冷溶液(160 mL)をゆっくりと注ぎ入れた後、ろ過した。ろ液を氷浴で冷却し、濃塩酸で pH 4.0 とした。沈殿をろ過し、水で洗浄し、減圧乾燥させた。固体を無水ジクロロメタン (20 mL)で再懸濁し、塩化オキサニル (3.6 mL, 2M ジクロロメタン溶液)、次いで無水 DMF (0.1 mL)で処理した。混合液を室温で 1 時間攪拌し、ろ過し、ろ液を減圧濃縮させた。残渣を氷浴で冷却し、28%水酸化アンモニウム溶液でゆっくりと処理した。氷浴を取り去り、懸濁液を室温にて 1 時間攪拌し、ろ過した。回収した固体を水で洗浄し、減圧乾燥して、1,3-ジメチルピラゾロ[5,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミドを灰色固体として得た。このカルボキサミド (0.13 g)を無水ジクロロメタン (5 mL)に加え懸濁液とし、塩化オキサリル (0.5 mL, 2 M ジクロロメタン溶液) で処理した。混合液を緩やかに 15 時間加熱還流した後、溶媒を減圧除去し、残渣を無水 THF (1.2 mL)に溶解した。この溶液の一部(0.4 mL)を、(4-アミノフェニル)(4-メチルピペラジン-1-イル)メタノン (48.7 mg)を加えて氷冷した無水 THF 溶液 (0.7 mL)に加えた。氷浴を取り去り、混合液を室温にて 1 時間攪拌した。沈殿した固体をろ過により回収し、ジクロロメタンおよびメタノールで洗浄し、減圧乾燥させ compound 24 を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ : 11.26 (d, 1H, *J* = 13.1 Hz), 11.02 (d, 1H, *J* = 37.6 Hz), 9.10 (1H, *J* = 2.1, 0.7 Hz), 9.02 (dd, 1H, *J* = 2.1, 0.9 Hz), 7.95 (d, 1H, *J* = 8.7 Hz), 7.72 (t, 2H, *J* = 8.9 Hz), 7.47 (d, 1H, *J* = 8.5 Hz), 4.02 (s, 3H), 3.08 (br, 3H), 2.56 (s, 3H). MS *m/z* 435 (M⁺)

Compound 25

Compound 25 は compound 24 と同様の方法で合成した。

N-((4-((2-(ジメチルアミノ)エチル)カルバモイル)フェニル)カルバモイル)-1,3-ジメチル-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ: 2.37 (s, 6H), 2.56 (s, 3H), 2.65 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz), 3.41 (t, 2H, *J* = 6.4 Hz), 4.02 (s, 3H), 7.70 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 7.87 (d, 2H, *J* = 8.7 Hz), 8.41 (t, 1H, *J* = 5.5 Hz), 9.00 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 9.09 (d, 1H, *J* = 2.1 Hz), 11.02 (s, 1H), 11.23 (s, 1H). MS *m/z* 424 (M+1)

Compound 26 (TLK-48462)

N-((3-クロロ-4-(モルホリン-4-カルボニル)フェニル)カルバモイル)-1,3-ジメチル-4-(4-メチルピペラジン-1-イル)-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド

無水ジクロロメタン(14 mL)中に4-クロロ-1,3-ジメチル-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボン酸 (0.98 g)を加えた懸濁液に、塩化オキサニル (4.5 mL, 2 M ジクロロメタン溶液)、次いで4滴の *N,N*-DMF を滴下した。ガスの発生が収まった後、更に4滴の DMF を加え、この操作を3回繰り返した。混合液を室温にて45分間攪拌し、ろ過して痕跡量の不溶物質を除去し、溶媒を減圧蒸発させた。残渣を1時間減圧乾燥し、氷浴で冷却し、水酸化アンモニウム(28% NH₃ 水溶液, 20 mL)で処理した(発熱反応に注意すること)。混合液を0°Cにて30分間、室温にてさらに1時間攪拌した。ろ過により固体を集め、水で洗浄し、減圧乾燥によりカルボキサミドを白色粉末として得た。

4-クロロ-1,3-ジメチル-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド (0.1 g)を加熱したトルエン (30 mL)に溶解し、1時間共沸した。溶液を室温まで冷却し、(2-クロロ-4-イソシアネートフェニル)(モルホリノ)メタノン (0.13 g)と反応させた。混合液を16時間還流し、次いで室温に冷却した。沈殿した固体をろ過し、メタノールで洗浄し、減圧乾燥して4-クロロ-*N*-((3-クロロ-4-(モルホリン-4-カルボニル)フェニル)カルバモイル)-1,3-ジメチル-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミドを得た。この試料の一部 (0.057 g)を THF (10 mL)に溶解し、1-メチルピペラジン(0.114 g)と反応させた。混合液を室温にて5時間攪拌し、次いで減圧濃縮した。残渣を水 (10 mL)で処理し、得られた固体をろ過し、水で洗浄し、減圧乾燥させた。この試料の一部を水 (5 mL)に懸濁し、1 N の塩酸溶液 (100 μL)で処理した。混合液を超音波処理し、ろ過し、ろ液を凍結乾燥して compound 26 を得た。¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 2.65 (s, 3H), 2.85 (s, 3H), 3.10-3.20 (m, 2H), 3.22-3.39 (m,

2H), 3.45-3.90 (m, 12H), 3.95 (s, 3H), 7.36 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.55 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.82 (s, 1H), 8.43 (s, 1H), 10.72 (brs, 1H), 10.90 (brs, 1H), 11.36 (brs, 1H).

Compound 27

Compound 26 と同様の方法で合成した。

N-((3-クロロ-4-(4-メチルピペラジン-1-カルボニル)フェニル)カルバモイル)-1,3-ジメチル-4-(4-メチルピペラジン-1-イル)-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド 2 塩酸塩

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6) δ : 2.49 (s, 3H), 2.51 (s, 3H), 2.66 (s, 3H), 3.19-3.81 (m, 16H), 3.93 (s, 3H), 7.43 (t, 1H, $J = 7.2$ Hz), 7.49 (m, 1H), 7.91 (d, 1H, $J = 3.7$ Hz), 8.55 (s, 1H), 9.75 (brs, 1H), 10.93 (s, 1H), 12.82 (s, 1H). MS m/z 570 (M+1)

Compound 28

Compound 26 と同様の方法で合成した。

N-((3-イソプロポキシフェニル)カルバモイル)-1,3-ジメチル-4-(2-ピロロリジン 1-イル)エトキシ)-1*H*-ピラゾロ[3,4-*b*]ピリジン-5-カルボキサミド塩酸塩

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.26 (d, 6H, $J = 7.8$ Hz), 1.80-2.10 (m, 4H), 2.50 (s, 3H), 3.24 (m, 2H), 3.50-3.80 (m, 2H), 4.17 (s, 3H), 4.59 (seq, 1H, $J = 7.8$ Hz), 4.92 (m, 2H), 6.66 (dd, 1H, $J = 2.0, 8.0$ Hz), 6.96 (brd, 1H, $J = 8.0$ Hz), 7.20-7.24 (m, 2H), 8.79 (s, 1H), 10.7 (s, 1H), 12.5 (s, 1H)

1 - 2) 単回急性毒性評価

日本チャールス・リバー株式会社より購入した 6 週もしくは 7 週齢の ICR 雄性マウスを正常マウスとして使用し、被験物質を単回経口投与し、投与後の一般症状変化を観察した。被験物質投与 24 時間後に麻酔下で回収した血液をヘパリン処理することで得た血漿サンプルを用い、肝毒性の指標として用いるグルタミンク・オキサロアセティック・トランスアミナーゼ(GOT)およびグルタミンク・ピルビック・アミナーゼ(GPT)の活性値の変化をトランスアミナーゼ CII-テストワコー (和光純薬工業株式会社) を使用して測定した。

1 - 3) 2 週間反復投与による安全性評価

日本チャールス・リバー株式会社より購入した 6 週もしくは 7 週齢の ICR

雄性マウスに、1日1回被験物質を2週間反復経口投与し、一般症状変化を観察した。投与期間終了後、麻酔下で回収した血液をヘパリン処理することで得た血漿サンプルを用い GOT および GPT の活性値の変化をトランスアミナーゼ CII-テストワコー（和光純薬工業株式会社）を使用して測定した。また肝湿重量を測定し被験物質投与による組織重量の変化を評価した。

1-4) 薬物動態プロファイル

被験物質の血漿濃度測定は、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法(LC/MS/MS法)を用いて行った。採取した血漿 20 µL をメタノール 20 µL、内標準物質標準液 (1000 ng/mL) 10 µL および 5 mM 酢酸アンモニウム/アセトニトリル(3/7)溶液 50 µL で前処理し、混和後に遠心分離した上清を LC/MS/MS 用試料とした。LC は、2690 alliance (Waters 社)を使用し、カラムは Cadenza CD-C18 4.6 x 50 mm (Imtakt 社)を用いて流速 0.7 mL/min で測定した。また MS には LCQ Deca XP Plus (ThermoFisher Scientific 社)を使用した。LC/MS/MS のデータは質量分析計内蔵ソフト (Xcalibur 社)により得られた内標準物質ピーク面積に対する測定対象物質ピーク面積比と設定濃度より直線式を求め検量線を作成し、血漿中濃度を算出した。

投与後 24 時間までの血漿濃度推移より、血漿中総薬物濃度 (AUC)を算出し、静脈内投与時の AUC と経口投与した際の AUC よりバイオアベイラビリティを以下の式より算出した。

$$F = (\text{AUC}_{\text{p.o.}}/\text{AUC}_{\text{i.v.}}) \times (\text{Di.v.}/\text{Dp.o.})$$

AUC p.o.: 経口投与時の血漿中総薬物濃度、AUC i.v.: 静脈投与時の血漿中総薬物濃度、Di.v.: 静脈投与時の投与量、Dp.o.: 経口投与時の投与量

定常状態における分布容積 (Vdss) は、ノンコンパートメント解析法により以下の式で算出した。

$$V_{\text{dss}} = \text{MRT} \times \text{Di.v.}/\text{AUC}_{\text{i.v.}}$$

MRT: 平均滞留時間

1-5) TPSA 値の算出

TPSA は、Ertl P.らが提唱している原理(1)に基づき、Daylight SMILES Toolkit (Daylight Chemical Information System 社製) を使用して化合物構造情報を入

力し算出した。なお TPSA 値は、分子の表面にある極性基の面積の総和を示しており、構造内に含まれる[NH₂]-や[OH]-等の極性フラグメントに割り当てられたパラメーター値の総和に基づいて算出される。

1-6) LogD 値の算出

イオン化可能な官能基を持つ化合物のイオン化フォーム混合率は、pH に依存しており、カルボン酸やアミンのようなイオン性官能基を持つ場合は、水相の pH によってオクタノール/水分配係数(LogP)は大きく変化する。各々の pH に応じた LogP の値を示したものが pH 依存オクタノール/水分配係数(LogD)である。LogD は、ACD/Labs 社の ACD/Physchem History を使用して化合物情報を入力することで、pH7.4 の LogD 値を計算した。なお LogD 値は、Hansch C. らが提唱している原理(2)に基づき算出されている。

1-7) 各種ケモカインによる細胞遊走への阻害活性評価 (選択性評価)

各種ケモカインによる細胞遊走に対する阻害活性の評価は、第3章、第3節、第1項、1-4) に準じて行った。

ラットおよびマウス脾細胞を用いて、rat CCL2 および mouse CCL2 (ペプロテック社)により誘導される細胞遊走に対する阻害作用を評価した。方法は、第2章、第1節、第1項、1-1) に準じて行った。

1-8) 細胞毒性

第2章、第1節、第1項、1-2) に準じて行った。

1-9) バインディング・アッセイ

第2章、第3節、第1項、1-1) に準じて行った。

1-10) Ca²⁺ mobilization

第2章、第3節、第1項、1-2) に準じて行った。

第2項 結果および考察

SKL-02886 は、コラーゲン関節炎において予防効果を示したが、安全性評価の結果、マウス急性毒性評価試験によって、500 mg/kg の単回経口投与で自発運動の低下が認められた。SKL-02886 を 1000 mg/kg と増量して投与量をあげた場合にも、痙攣や挙尾反応が生じ、用量依存的な中枢性作用を示すことが明らかとなった。更に血液生化学検査の結果では、GOT および GPT の上昇が 500 mg/kg の経口投与から認められ肝機能への影響が懸念された (Table 4-1)。

Table 4-1. SKL-02886 単回急性毒性結果(各投与量 1 匹使用)

投与量	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	一般症状の変化
Control	37	29	-
500 mg/kg	298	102	自発運動の低下
1000 mg/kg	444	209	痙攣、挙尾反応

実際にその後にマウスで実施した 2 週間反復安全性評価試験では、更に低用量の 300 mg/kg から GOT および GPT 値の有意な上昇が認められた他、肝重量の増加が見られた (Table 4-2)。関節炎モデルでの SKL-02886 の薬効用量は 30 mg/kg であることから安全域は 10 倍以下となり、安全性の改善が必要となった。

Table 4-2. SKL-02886 の 2 週間反復投与による安全性評価

投与量 (mg/kg)	使用 引数	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	肝湿重量 (g/100 g body weight)
Control	5	43.2 ± 4.9	30.8 ± 5.3	4.16 ± 0.29
100	5	56.4 ± 12.1	43.8 ± 6.9	5.08 ± 0.45
300	5	235.0 ± 87.3**	396.8 ± 251.2**	7.66 ± 0.34**

** $P < 0.01$: Control 群に比し(student's test)

そこで SKL-02886 の類縁構造をもつ 1 2 化合物のマウス急性毒性試験を実施し化合物の極性表面積(TPSA)、pH を考慮したオクタノール水分配係数である LogD、および分布容積(Vdss)等の薬物動態プロファイルと GPT 値との関係性を調べた(TPSA は化合物の腸管からの吸収性の指標として使用さ

れ、LogD 値は化合物の脂溶性の指標として用いられる。また Vdss は組織移行性の高い化合物ほど高い数値を示す)。

なお化合物ごとでバイオアベイラビリティ(BA)が異なるため、GPT 値は BA で除した数値を使用して比較することとした。その結果を Table 4-3 と Figure 4-1, 4-2, 4-3 に示した。

Table4-3. GOT と TPSA, LogD, および Vdss との関係

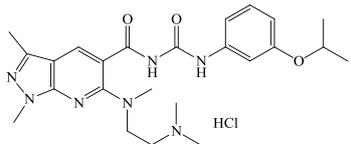
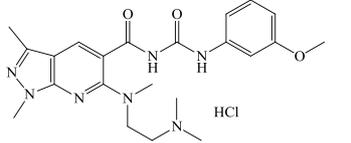
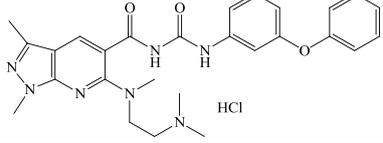
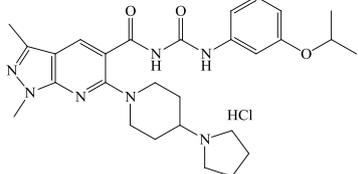
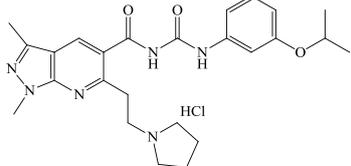
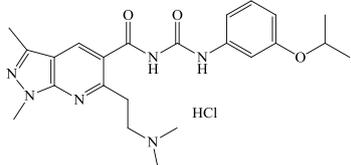
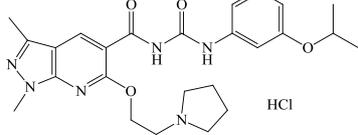
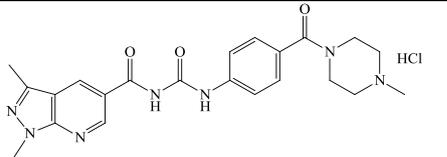
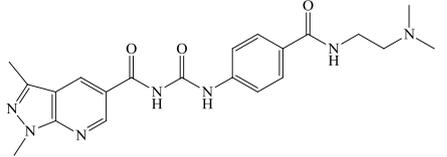
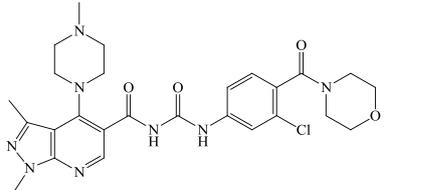
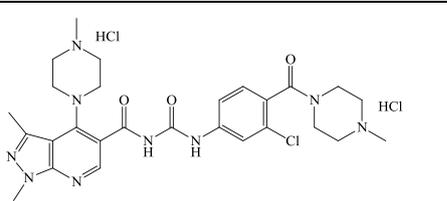
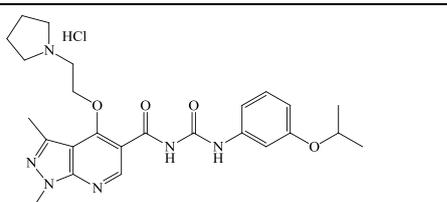
化合物名	構造式	TPSA	LogD	Vdss	GOT/BA
SKL-02886		105	1.21	9.93	15.0
18		105	0.33	12.8	12.0
19		105	2.4	16.2	45.8
20		104.6	-0.06	8.5	4.0
21		101.8	2.03	7.68	28.4
22		101	2.86	6.77	48.4
23		111	2.44	5.5	4.0

Table4-3. (続き) GOT と TPSA, LogD, および Vdss との関係

化合物名	構造式	TPSA	LogD	Vdss	GOT/BA
24		112.5	1.134	2.26	5.9
25		121.3	0.36	0.782	3.6
26 (TLK-48462)		125	0.09	2.26	5.9
27		119	0.52	5.26	2.0
28		110.6	2.44	7.48	7.9

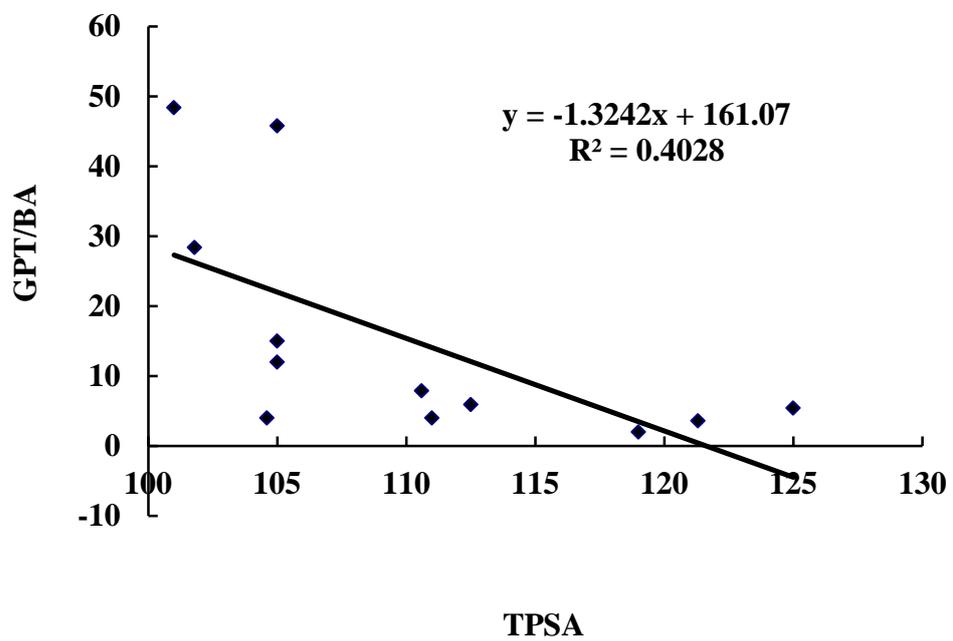


Figure 4-1. GPT と TPSA の関係

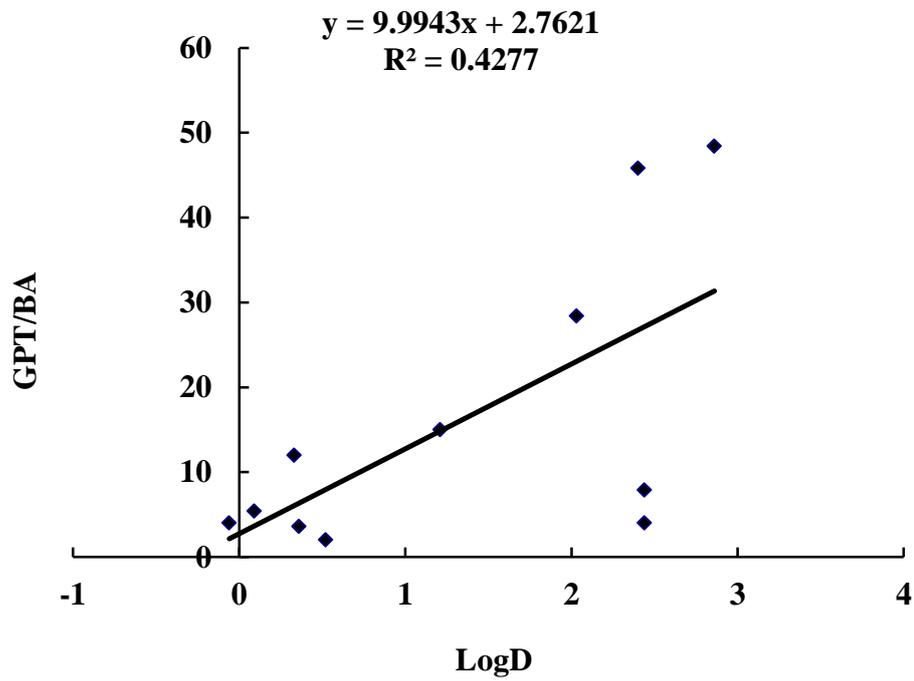


Figure 4-2. GPT と LogD の関係

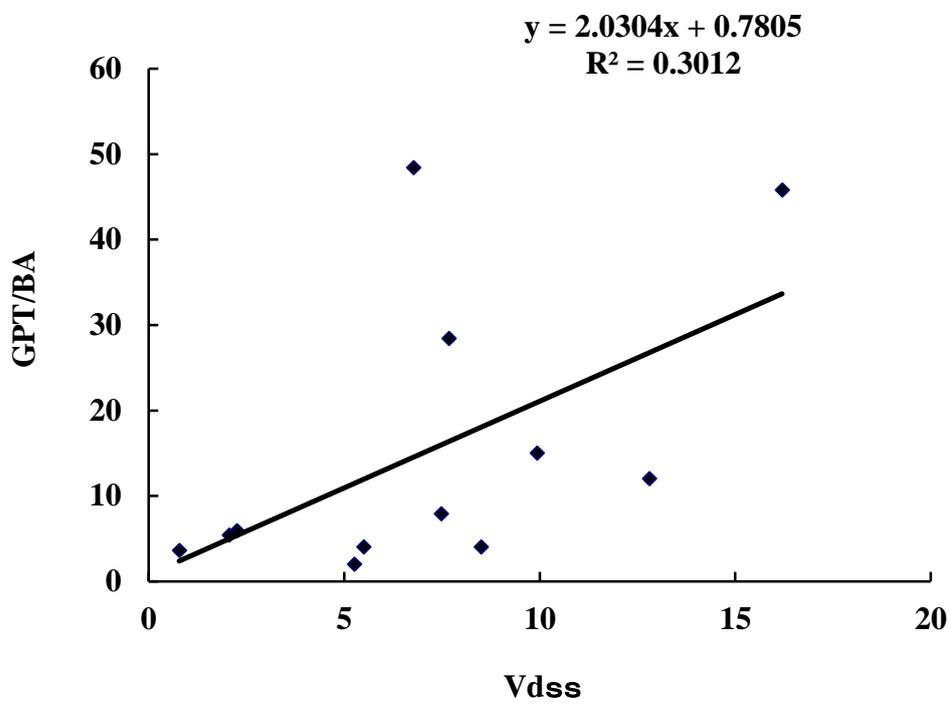
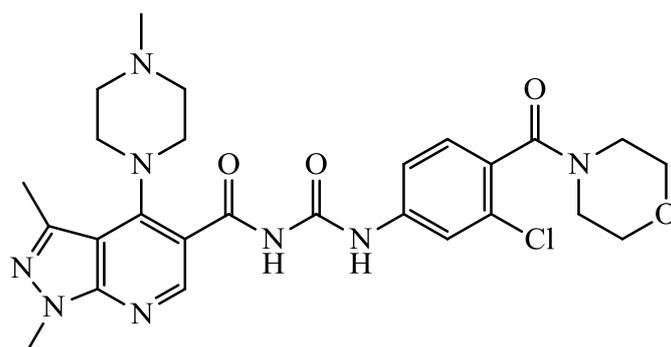


Figure 4-3. GPT と Vdss の関係

結果として、いずれも高い相関性は示していないものの TPSA が 110 以下で、logD 値が 2 以上の数値を示す化合物では GPT 値が高くなる傾向が認められた。この解析結果をもとに、SKL-02886 の類縁構造の中から LogD 値の低い化合物を選択し安全性評価を実施することにした。なお TPSA が高い数値になるほど、腸管からの化合物の吸収は低下する傾向があることから、TPSA の上限は 125 として化合物を選択した。この条件を満たす化合物として選択されたものが TLK-48462 (Compound 26) である (Figure 4-4.)。



TLK-48462: IC₅₀= 1.2 μM, CC₅₀> 50 μM
TPSA: 125, logD: 0.10

Figure 4-4. TLK-48462 の構造式と CCR2 アントゴニスト活性

TLK-48462 は LogD 値が 0.10 であり、SKL-02886 の LogD 値と比較すると 10 分の 1 以下となる化合物である。この化合物を用いて 2 週間反復投与による安全性評価試験を実施した。その結果、TLK-48462 は 500 m/kg の投与量まで、GOT 値、および GPT 値の上昇は認められず、SKL-02886 で見られた肝湿重量の増加も認められないことから、肝毒性を回避していることを確認した (Table 4-4)。また一般症状観察においても、500 mg/kg の投与量まで痙攣や挙尾反応は認められず、行動量の低下もみられないことから、中枢作用も回避できたことを確認した。

Table 4-4. TLK-48462 の 2 週間反復投与による安全性評価

投与量 (mg/kg)	使用 回数	GOT (IU/L)	GPT (IU/L)	肝湿重量 (g/100 g body weight)
Control	5	55.8 ± 21.0	27.4 ± 5.7	4.90 ± 0.11
50	5	50.2 ± 6.0	26.6 ± 3.8	4.58 ± 0.35
150	5	52.6 ± 24.9	31.2 ± 17.4	4.78 ± 0.27
500	5	51.0 ± 11.6	27.4 ± 6.6	4.69 ± 0.35

SKL-02886 および TLK-48462 の薬物動態プロファイルを Table 4-5 に示す。TLK-48462 は、SKL-02886 と比較して、BA はやや低下するものの組織移行性が SKL-02886 と比較して低い特徴を示す。この結果、脳移行性の指標として使用している脳中薬物濃度と血中薬物濃度の比(B/P ratio)は SKL-02886 よりも低くなっている。この組織移行性が改善された結果、組織局所での薬物濃度が減少し中枢毒性や肝毒性回避を回避できたと考察された。

Table 4-5. SKL-02886 および TLK-48462 の薬物動態プロファイル

Compound	LogD	TPSA	Vdss	BA (%)	B/P ratio
SKL-02886	1.21	105	9.93	60.5	0.956
TLK-48462	0.10	125	2.01	21	0.2

次に TLK-48462 の各種ケモカイン誘導の細胞遊走に対する阻害活性の結果を Table 4-6 に示す。TLK-48462 は、CCL2 誘導の THP-1 細胞の細胞遊走に対する阻害活性が IC50 値で 1.2 μM であり、CCR5 が介する細胞遊走に対してもアンタゴニスト活性を示す(IC50 値 1.8 μM)。SKL-02886 と比較した場合、活性強度は劣るものの安全性に優れた CCR2/CCR5 アンタゴニストである。

Table 4-6. 各種ケモカイン誘導の細胞遊走に対する TLK-48462 の阻害活性比較

ケモカイン	ケモカイン受容体	細胞種	ケモタキシス IC50 (μM)
CCL2	CCR2	THP-1	1.2
CCL2	CCR2	PBMC	1.0
CCL3	CCR1, CCR5	PBMC	>10
CCL4	CCR5	PBMC	1.8
CCL17	CCR4	CCR4-transfected THP-1	>10
CXCL8	CXCR1, CXCR2	PMN	>10

なおバインディング・アッセイおよび細胞内カルシウム流入を評価した結果からは、TLK-48462 は TLK-19705 と同様に CCL2 の CCR2 への結合を阻害せず(Figure 4-5)、CCL2 誘導のカルシウム流入も阻害しないことを確認している(Figure 4-6)。

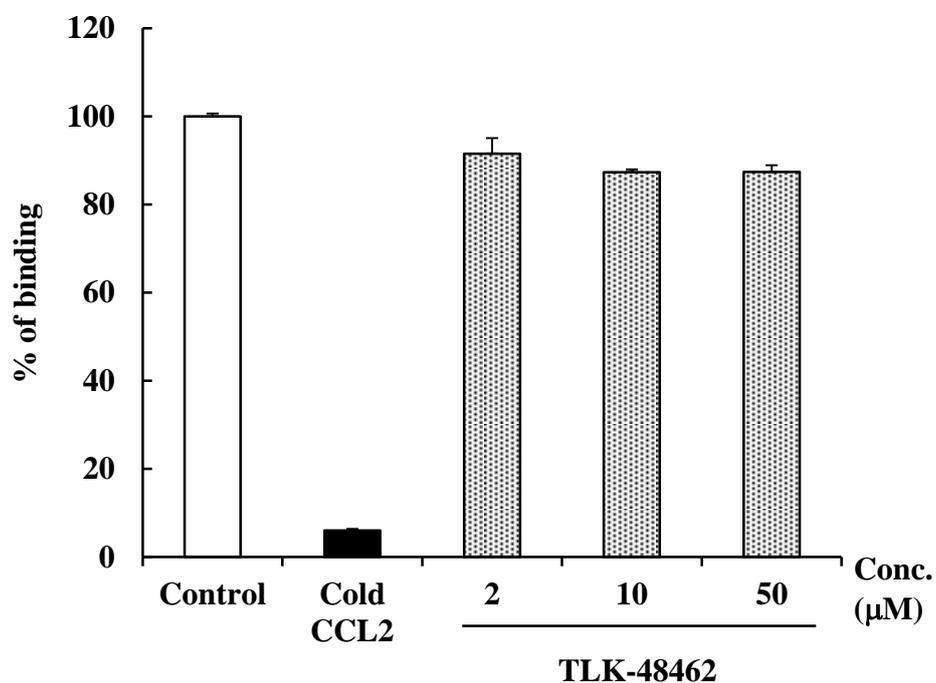


Figure 4-5. ¹²⁵I ラベル CCL2 結合能に対する TLK-48462 の作用

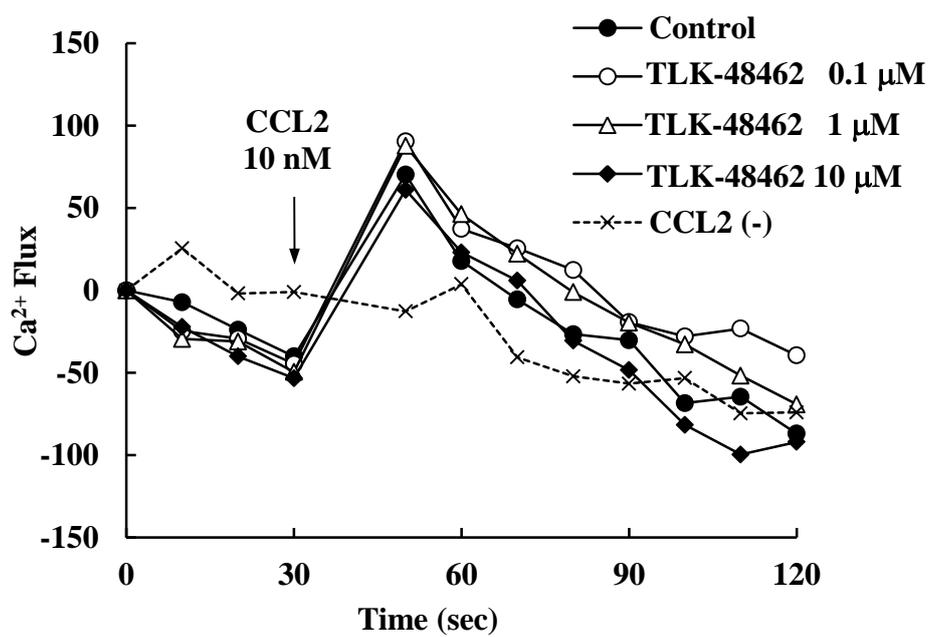


Figure 4-6. CCL2 誘導のカルシウム流入に対する TLK-48462 の作用

第2節 アジュバント関節炎における TLK-48462 の効果

第1項 実験方法

1-1) アジュバント関節炎ラットに対する作用

日本チャールス・リバー株式会社より購入した Lewis ラット雌性 6 週齢を 1 群 8 匹で使用した。Mycobacterium butyricum/ Incomplete Freund adjuvant 0.3 ml (1 mg/body)をラットの右足足蹠皮下に注射し感作した。予防効果検証試験では、被験物質は投与初日から開始し、治療効果検証試験では感作 10 日目より被験物質の投与を開始した。TLK-48462 は 1 日 2 回、連日経口投与し、陽性コントロールとして使用した MTX は 1 日 1 回の隔日投与で実施した。非処置足の容積を足跡容積測定装置 PLETHYSMOMETER を用いて設定した日時で測定した。

関節炎による後肢足蹠部の腫脹は、水置換法（足蹠浮腫法）にて測定し以下の計算式により算出し浮腫率 (%) (Increase in footpad volume)として表した。

$$\text{浮腫率 (\%)} = (\text{各測定値} - \text{接種前測定値}) / (\text{接種前測定値}) \times 100$$

1-2) 実験結果の検定

第2章、第4節、第1項、1-3) に準じて行った。

第2項 実験結果および考察

アジュバント関節炎における TLK-48462 の予防効果を検証した際の後肢足蹠部の浮腫の推移を Figure 4-7 に、試験最終日における後肢足蹠部の浮腫率を各群で比較した結果を Figure 4-8 に示した。TLK-48462 は用量依存的にアジュバント関節炎の病態進行を抑制した。投与最終日における浮腫率の評価においても 2 mg/kg の投与において有意な病態進行の抑制効果が確認できる。一方、MTX は 0.2 mg/kg の投与においてほぼ完全にアジュバントにより誘発される関節炎の発症を抑制する結果となった。

TLK-48462 は、SKL-02886 と比較すると BA は 3 分の 1 に低下しているのにも関わらず (Table 4-5)、本評価において 2 mg/kg の投与量で有意な病態進展抑制効果を示した。試験間ごとで使用した病態モデルの進行度が異なるため、効果を示すのに必要な用量が変化することも考えられるが、その他の原因として、ラットおよびヒト間で阻害活性に種差がある可能性も考えられた。そこで SKL-02886 と TLK-48462 のヒトおよびラット間での阻害作用を比較した。その結果を Table 4-7 に示す。rat CCL2 によるラット脾細胞の細胞遊走に対する TLK-48462 の阻害活性は、IC₅₀ 値で 0.4 μM であることから、rat/human の阻害強度の比は 0.333 となり、ほぼ同等の阻害活性を示すことを確認した。一方、rat CCL2 によるラット脾細胞の細胞遊走に対する SKL-02886 の阻害活性は IC₅₀ 値で 10.0 μM であり、rat/human の阻害強度の比は 125 倍と阻害作用に種差があることが明らかとなった。また SKL-02886 は、mouse CCL2 によるマウス脾細胞の細胞遊走に対する阻害活性も IC₅₀ 値で 12.0 μM であり、ラットでの結果と同様、マウスにおいても種差が存在することが明らかとなった。一方、Compound 1 および TLK-19705 は、マウス脾細胞の細胞遊走に対する阻害活性は IC₅₀ 値でそれぞれ、8.7 μM (rat/human の阻害強度の比：2.23)、1.4 μM (rat/human の阻害強度の比：2.00) となりヒト/マウス間でほぼ同等の阻害活性を示すことを確認している。

SKL-02886 でのみ、細胞遊走阻害作用の強度に種差が生じる理由については不明であるが、関節炎モデルにおいて有効な効果を発揮するのに TLK-48462 よりも多くの投与量が必要であった理由には阻害活性の種差の問題が影響したものと考えている。

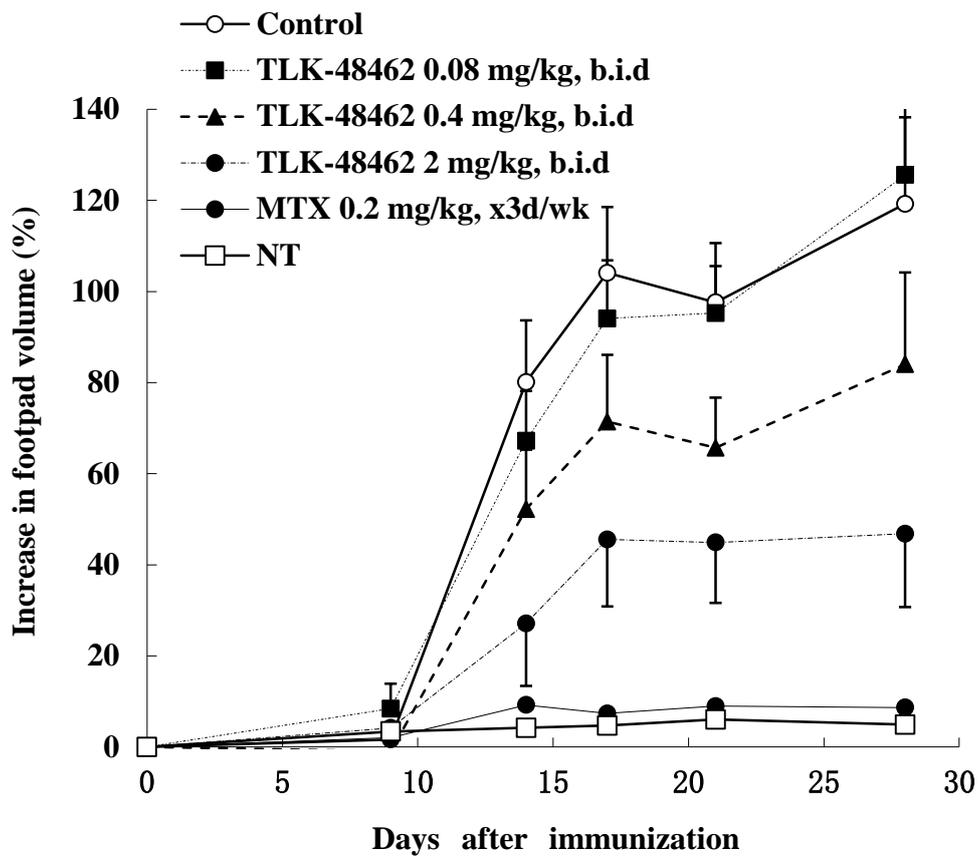
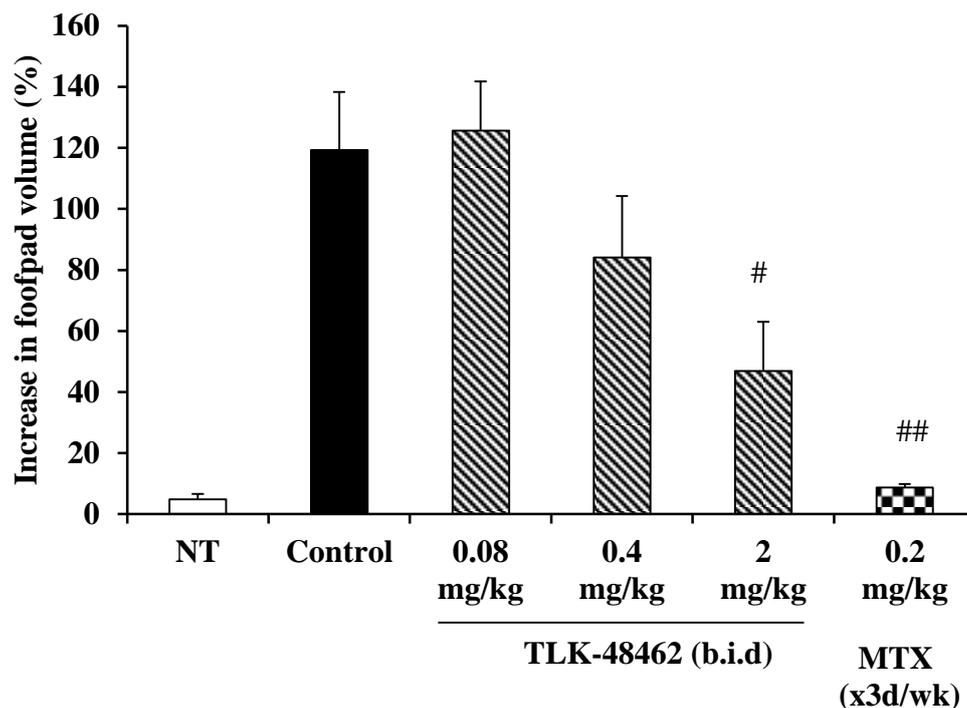


Figure 4-7. 後肢足蹠部の浮腫の推移（予防効果）



$P < 0.05$: control 群に比し (Dunnett 検定)
 ## $P < 0.01$: control 群に比し (Aspin-Welch t 検定)

Figure 4-8. Day28 における後肢足蹠部の浮腫率の比較 (予防効果)

Table 4-7. ラットおよびヒト CCL2 誘導の細胞遊走に対する阻害活性比較

化合物名	IC50 (μM)		Ratio rat/human
	human CCL2/CCR2 (THP-1)	rat CCL2/CCR2 (ラット脾細胞)	
SKL-02886	0.08	10.0	125
TLK-48462	1.2	0.4	0.333

TLK-48462 の治療効果を検証した際の後肢足蹠部の浮腫の推移は Figure 4-9 に示し、試験最終日における浮腫率は、Figure 4-10 に示した。

TLK-48462 および MTX とともに、アジュバント投与により誘発される浮腫を抑制する傾向を示したが、いずれも有意な差としては認められなかった。先の SKL-02886 を用いた治療効果同様に、病態発症後の治療効果は関節リウマチ治療薬として使用される MTX でも効果を確認することが難しいと考えられるが、予防効果での検証結果を含め考えると、TLK-48462 で認められる病態発症初期における抑制効果も、MTX が著効していることを

考えれば、単独使用で MTX 以上の効果を示すことは難しいと思われる。

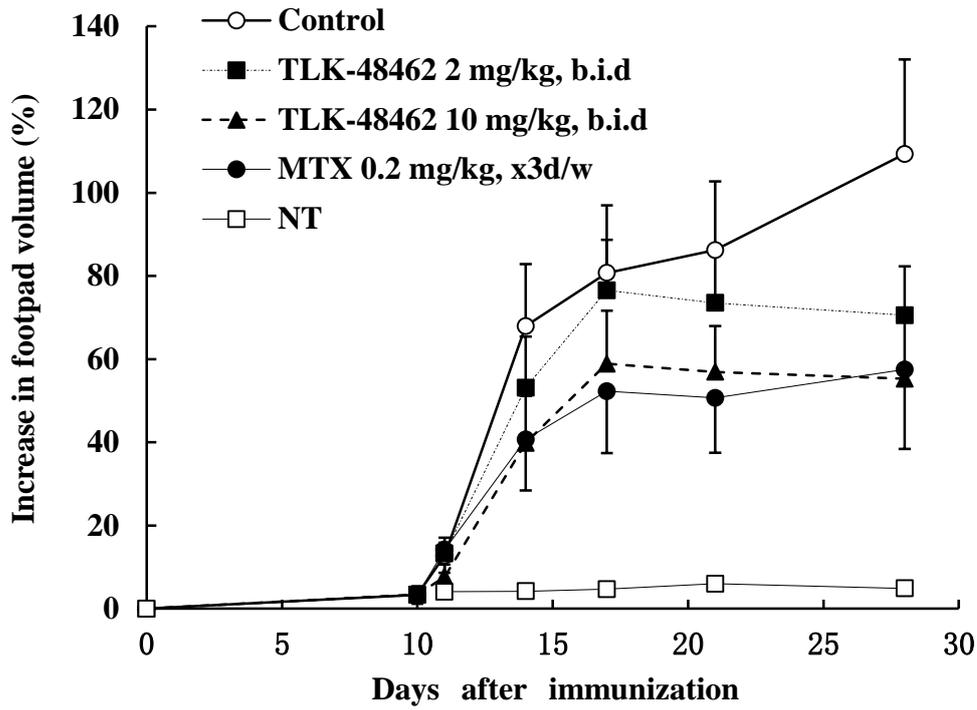


Figure 4-9. 後肢足蹠部の浮腫の推移（治療効果）

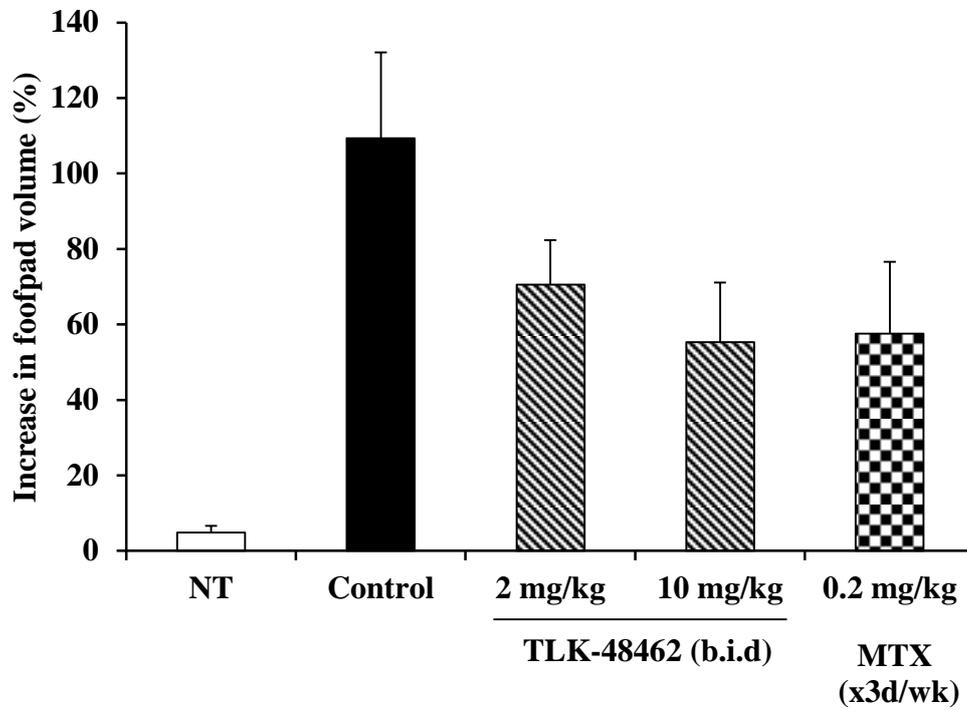


Figure 4-10. Day28 における後肢足蹠部の浮腫率の比較（治療効果）

第3節 疼痛モデルにおける TLK-48462 の効果

序論

慢性疼痛である炎症性疼痛では、炎症局所により産生されるヒスタミンやブラジキニン、サブスタンス P により血管透過性が亢進することで炎症性の浮腫が生じるとともに、痛覚過敏反応などが惹起される。更に慢性炎症組織における疼痛発生部位には、マクロファージの他、メモリーT細胞の浸潤も認められている。これらの浸潤細胞には、CCR2 が発現していることから、CCL2 が疼痛発生に関与することが推測されている。

実際に CCR2 KO マウスでは、ホルマリンを起炎物質とした炎症性疼痛モデルにおいて、痛覚過敏反応が減少することが報告されている(3)。この他にも、慢性疼痛の後根神経節では CCR2 の発現が上昇しており、マクロファージの浸潤が観察されていることから、CCL2/CCR2 シグナル・パスウェイを抑制することで、炎症性疼痛を改善できる可能性が考えられる。

更に脊髄ミクログリアには CCR2 が発現していることも報告されており、障害時に誘導される CCL2 がミクログリアを活性化することで痛覚過敏を引き起こす可能性も示唆されている。実際、CCR2 KO マウスでは坐骨神経部分結紮によるアロディニアの発症を有意に抑制することが報告されている(3)。このモデルは神経因性疼痛モデルの一つと考えられていることから、CCR2 アンタゴニストが神経因性疼痛に対しても有効な治療手段となる可能性が示唆されている。そこで本研究では二つの疼痛モデルを用いて TLK-48462 の抗疼痛作用を検証することにした。

第1項 実験方法

1-1) ホルマリンモデルに対する抑制作用

6週齢のICR雄性マウス(日本クレア)を用いてホルマリン疼痛に対する作用を評価した。マウス左足蹠部に1%ホルマリン25 μ Lを注射し、lickingとliftingの時間(秒)を5分毎に測定した。被験物質は、設定した用量をホルマリン投与前日、および実験当日の2回経口投与した。ホルマリン投与による疼痛は二相性の痛みを誘導することが知られていることから(4)、ホルマリン投与後0分から10分までに起きる疼痛反応を第1相とし、ホルマリン投与後15分から45分の間におきる疼痛反応を第2相として定義した。被験物質の効果は、0分から10分までに生じるlickingとlifting時間の総和(第1相疼痛反応)と、15分から45分の間におきるlickingとlifting時間の総和(第2相疼痛反応)をコントロール群と比較し統計解析処理を行うことで評価した。

1-2) カラゲニンモデルに対する抑制作用

10週齢のWistar雄性ラットを用いてカラゲニン疼痛に対する作用を評価した。左の後肢足蹠部に1%カラゲニン0.1 mLを注射し、2時間および4時間後にRandall-Selito法(5)により疼痛閾値(g)を測定した。被験物質は設定した用量を、カラゲニン投与前日、および実験当日の2回経口投与した。

1-3) 実験結果の検定

第2章、第4節、第1項、1-3)に準じて行った。

第2項 試験結果

2-1) ホルマリンモデルに対する TLK-48462 の効果

ホルマリンモデルは、ホルマリンの足底面への投与により二相性の痛みを誘導することが知られている(4)。第1相の反応はホルマリンによる知覚神経終末への直接的刺激によるものと考えられ、第2相は、ホルマリンによる組織侵害の結果おこる炎症が知覚神経を刺激することでおこると考えられている。試験結果を Figure 4-11 および Figure 4-12 に示す。コントロール群では、ホルマリン投与により第1相の疼痛行動が10分以内に置き、第2相の疼痛行動がホルマリン注射後15分から開始していることが確認できる(Figure 4-11)。TLK-48462は、10 mg/kgの投与によりホルマリン投与により誘発される第1相および第2相の疼痛反応を有意に抑制した(Figure 4-12)。一方陽性対照として用いた非ステロイド性抗炎症薬であるインドメタシン(IDM) (Figure 4-13)は、第2相の疼痛行動を有意に抑制するが、第1相の疼痛行動に対しては抑制効果を示さなかった。

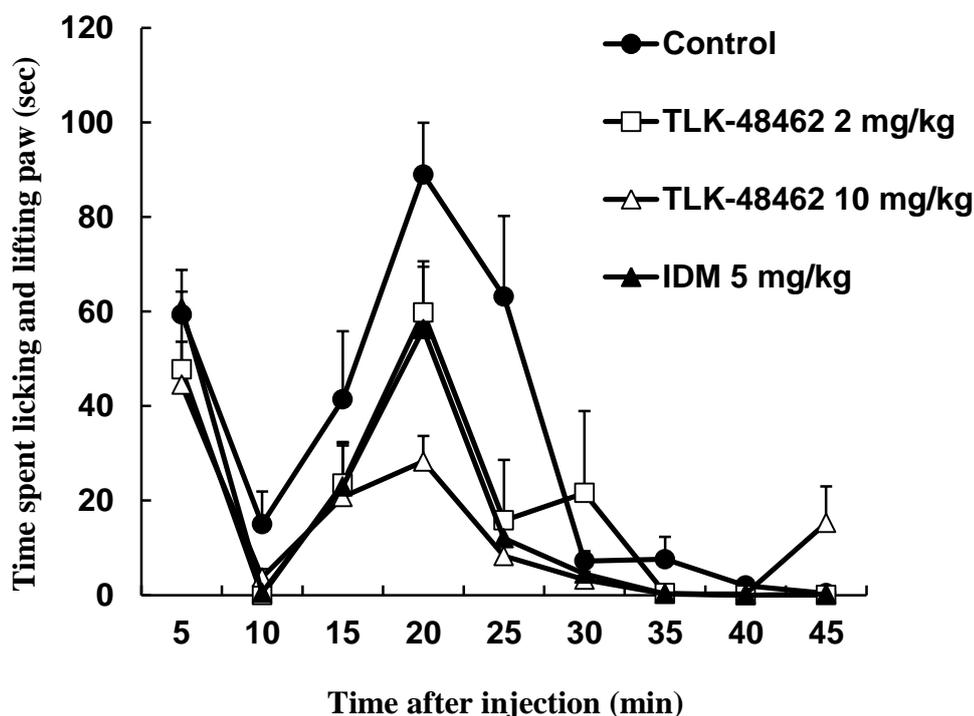
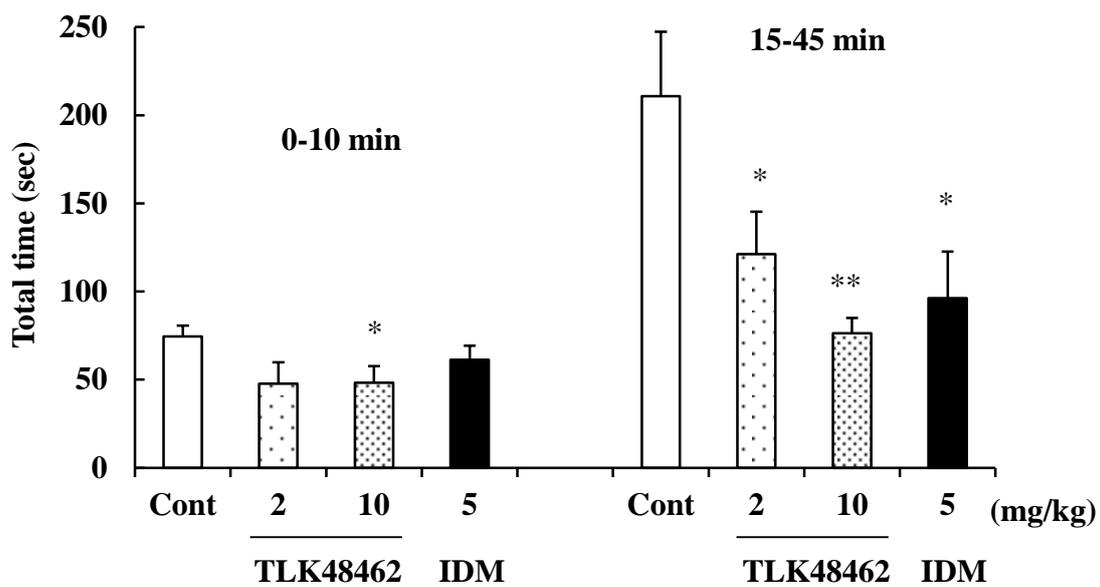


Figure 4-11. ホルマリン疼痛に対する TLK-48462 の効果



* $P < 0.05$: Control 群に比し(student's test)

** $P < 0.01$: Control 群に比し(student's test)

Figure 4-12. ホルマリン疼痛第 1 相および第 2 相に対する TLK-48462 の効果

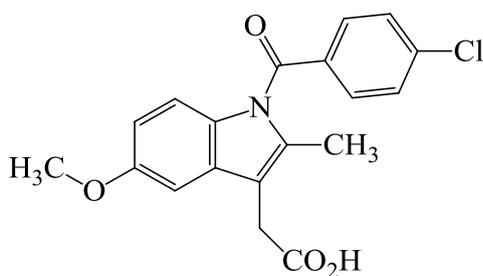
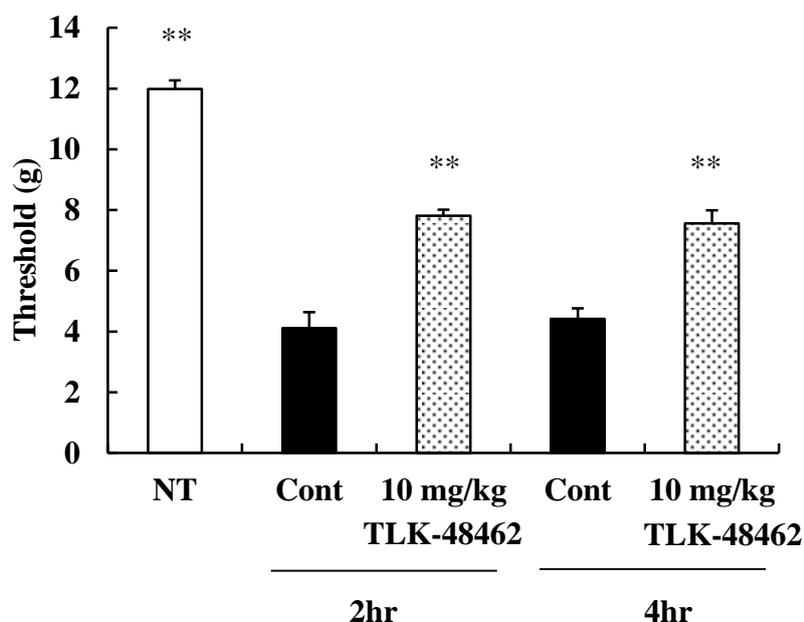


Figure 4-13. インドメタシンの構造

2-2) カラゲニンモデルにおける TLK-48462 の効果

TLK-48462 がホルマリンモデルで抗疼痛作用を示したことから、他の炎症性疼痛モデルでも TLK-48462 の効果を検証することにした。カラゲニンモデルは、カラゲニンを後肢足蹠部に皮下注して作製するが、ホルマリンと異なり、カラゲニン自体には刺激作用はなく炎症反応が進行することで疼痛が生じるモデルである。またその炎症反応は数時間にわたり持続することも知られていることから(4)、評価はカラゲニン投与後、2時間および4時間の2回疼痛閾値の変化を測定した。試験結果を Figure 4-14 に示す。TLK-48462 は、カラゲニン投与後2時間および4時間のいずれにおいても有意に痛みを感じる閾値を増加させ、カラゲニン投与により生じる疼痛反応に対して抑制効果を示した。



* * $P < 0.01$: Control 群に比し(student's test)

Figure 4-14. カラゲニン疼痛に対する TLK-48462 の効果

第3項 考察

本研究により、TLK-48462 がホルマリンモデルおよびカラゲニンモデルにおける疼痛作用に対して抑制効果を示すことが明らかとなった。二つのモデルは炎症性疼痛モデルとして使用されているが、ホルマリンモデルはカラゲニンと異なり二相性の疼痛行動を起こすことが知られている(4)。ホルマリン投与により起きる第1相の疼痛反応は、炎症反応により起こる第2相の疼痛と異なりホルマリンの知覚神経終末への直接的刺激により起こると考えられている(6)。このため第1相における疼痛反応に炎症細胞の遊走が関与する可能性は低いと思われる。興味深いことに TLK-48462 は、ホルマリンによる第1相の疼痛反応に対しても抑制効果を示した。このことは TLK-48462 の疼痛抑制作用に単球・マクロファージの浸潤抑制作用以外の作用が存在することを示唆している。

最近、アストロサイトや神経において CCR2 が発現していることが報告された(7,8)。また脊髄後角神経を用いた研究では、中枢神経系における興奮性シナプス伝達に関与する N-methyl-D-aspartate (NMDA)受容体を CCL2 が数分以内で活性化することも報告されていることから(8)、神経とミクログリア、神経とアストロサイト間およびシナプス伝達のシグナリングに CCR2 が関与する可能性が示唆されている(3,7,8)。この他に、CCR1 や CCR5 のリガンドである CCL5 が、痛みの伝達を抑制する μ オピオイド受容体の作用を阻害することも報告されている(9)。以上の報告を考えると TLK-48462 は、CCL2 あるいは CCL5 が介する神経間のシグナリング伝達を抑制することで、ホルマリン疼痛モデルの第1相の疼痛反応を抑制した可能性が考えられる(Figure 4-15)。今後、神経因性疼痛モデルでの詳細な検討が必要ではあるが、CCR2/CCR5 アンタゴニストの神経因性疼痛治療剤としての開発の可能性が本研究で、示唆されたものと考えている。

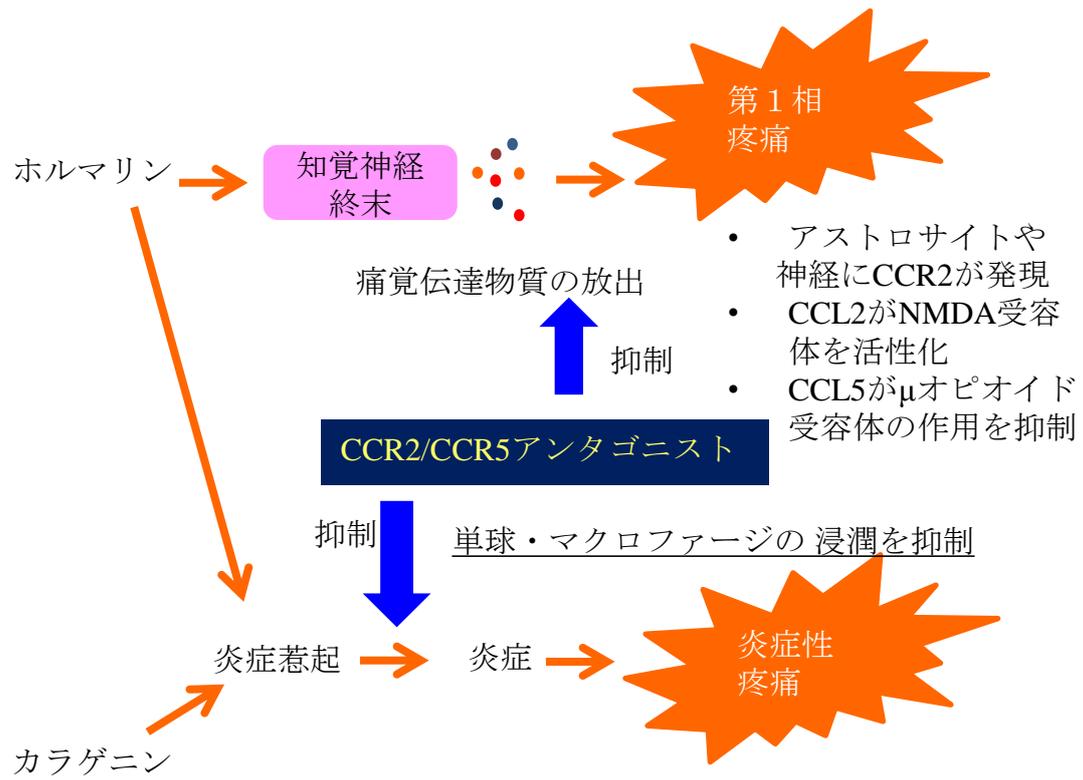


Figure 4-15. 疼痛反応に対する CCR2/CCR5 アンタゴニストの制御部位予想

第4節 まとめ

安全性評価の結果、SKL-02886が中枢作用および肝障害作用を示すことが明らかとなったことから、これらの作用を回避する化合物探索を行った結果、新たにTLK-48462を創出した。TLK-48462はアジュバント関節炎モデルにおいて病態進展を抑制する効果を示す他、ホルマリン疼痛およびカラゲニン疼痛モデルにおいて抗疼痛作用を示すことを新たに明らかとした。

参考文献

1. Ertl P., Rohde B., and Selzer P., Fast calculation of molecular polar surface area as a sum of fragment-based contributions and its application to the prediction of drug transport properties. *Journal of Medicinal Chemistry* 43, 3714-3717 (2000)
2. Hansch C., and Leo A.J., Exploring QSAR. Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology. ACS, Washington, DC (1995)
3. Abbadie C., Lindia J.A., Cumiskey A.M., Peterson L.B., Mudgett J.S., Bayne E.K., DeMartino J.A., MacIntyre D.E., and Forrest M.J., Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 7947-7952 (2003)
4. Narita M., and Suzuki T., Evaluation method for a pain-like action. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 130, 124-127 (2007)
5. Randall L.O., and Selitto J.J., A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Archives Internationales de pharmacodynamie et de Therapie* 111, 409-419 (1957)
6. Honda K., and Takano Y., Experimental methods in pain using neuropathic and inflammatory animal models. *Nihon Yakurigaku Zasshi* 130, 39-44 (2007)
7. Knerlich-Lukoschus F., Juraschek M., Blömer U., Mehdorn H.M., and Held-Feindt J., Force-dependent development of neuropathic central pain and time-related CCL2/CCR2 expression after graded spinal cord contusion injuries of the rat. *Journal of Neurotrauma* 25, 427-448 (2008)
8. Gao Y.J., Zhang L., Samad O.A., Suter M.R., Yasuhiko K., Xu Z.Z., Park J.Y., Lind A.L., Ma Q., and Ji R.P., JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. *The Journal of Neuroscience* 29, 4096-4108 (2009)
9. Szabo I., Chen X.H., Xin L., Adler M.W., Howard O.M., Oppenheim J.J., and Rogers T.J., Heterologous desensitization of opioid receptors by chemokines inhibits chemotaxis and enhances the perception of pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 10276-10281 (2002)

第5章 結語

ケモカインは、白血球の遊走活性を有するポリペプチドの総称である。CCL2は、2つのシステイン残基が連続するCCケモカインに属し、細胞膜7回膜貫通型レセプターに属するCCR2を受容体とする。CCL2は内皮細胞、線維芽細胞、平滑筋、単球および脂肪細胞等から分泌され、炎症病変部位への単球及びマクロファージの集積を促進する。現在いくつかのCCR2アンタゴニストが、肝線維症、糖尿病性腎症、多発性硬化症などの炎症性疾患の治療剤として開発が試みられているが、いまだ臨床応用に至っていない。

プロパゲルマニウムを成分とするPGは、B肝慢性肝炎の治療剤であり、CCR2アンタゴニストとしても生体内で作用することが分かっている。その安全性と利便性より、PGはCCR2アンタゴニストの治療剤としての有効性を評価するためのツールとしても使用され、脂肪肝、動脈硬化、腎線維症、腎虚血再灌流障害、および糖尿病性糸球体硬化症のモデルで効果を示すことが報告されてきている。またPGは、CCL2のCCR2への結合を阻害せず、CCL2が介する細胞内カルシウム流入に作用することなく単球の遊走を選択的に阻害するユニークなCCR2アンタゴニスト活性を示す薬剤であることも知られている。

CCR2が属するclass A GPCRは、リガンド結合部位とは異なるアロステリックな制御に関する報告が多くなされ、GPCRの制御方法として以前から応用されている。PGもCCL2のCCR2への結合を阻害しないことから、アロステリックな制御により単球の遊走を選択的に阻害するものと考えている。

本研究では、医薬として必要な要件はPGのような阻害様式を持つことであるという考えを基に、低分子CCR2アンタゴニストを探索した。更に、その探索ツールとしてテリック社のTRAP技術を活用し研究を開始した。以下本研究の成果を統括する。

<新規低分子CCR2アンタゴニストの探索>

本研究では、TRAP技術を用いた探索研究によりヘテロアロイルフェニルウレアを基本構造とする新規CCR2アンタゴニストを見出した。一群の化合物群の中で、ヒト単球由来細胞であるTHP-1細胞を用いたCCL2誘導のケモタキシス・アッセイにおいてTLK-19705は、遊走阻害活性がIC₅₀値で0.70 μMと高活性を示す化合物であり、選択性試験からはCCR5にもアンタゴニスト活性を示すことが明らかとなった。更に初期の目的に合致したPGと同様にユニークな阻害様式を示した。即ち、これらの化合物が、CCL2のCCR2への結合を阻害せず、かつCCL2誘導のカルシウム流入にも影響しないこと

を確認した。Class A に属する GPCR のアロステリック・サイトには、第 2 および第 3 ループ近傍の細胞外ドメインが寄与することが報告されている。またロドプシン様受容体では、細胞外側のアミノ酸残基も G タンパク質の結合に関与することが示唆され、特に第 3 ループ上の 279 番目のグルタミンは、Gi の結合に影響する可能性が考えられている。ケモカインによる細胞遊走は、Gi を介して起こるとされていること、更に CCR2 と CCR5 の第 3 ループは約 70% のホモロジーを持つことから、この第 3 ループ領域がアロステリックな制御に関与する可能性が考えられた。そこで遊走阻害メカニズムの検討試験として第 3 ループの影響を検討した結果、第 3 ループの部分ペプチド構造が TLK-19705 の遊走阻害活性を抑制することが明らかとなった。以上より本研究で見出した新規 CCR2 アンタゴニストは、第 3 ループ領域と相互作用することでアロステリックな活性制御を示すことが示唆された。

また本研究では、TRAP 技術による化合物ライブラリーの絞り込みを行った後、スクリーニング試験にファンクショナル・アッセイを採用しヒット化合物を得てきた。結果としてアロステリックな活性制御をする化合物を獲得できたことから、この TARP 技術はファンクショナル・アッセイと組み合わせることでアロステリックな活性制御をする低分子化合物の探索に今後も有効な手段となることが確認できた。

<代謝抑制と安全性の改善>

糖尿病性腎症および動脈硬化の病態モデルにおいて、TLK-19705 は、病態進展を抑制する効果を示したが、その後の研究により生体内での安定性が悪いことが明らかとなった。TKL-19705 は、アシルウレアをリンカーとしてピラゾロピリジン基とフェノール基を持つ化合物であるが、それぞれにヒドロキシル化がおきていたことから、最適化を進める上でヒドロキシル化を防ぐことが重要と考えて更なる展開を進めた。その結果、新たに得た化合物が SKL-02886 である。SKL-02886 は、ケモタキシスの阻害活性の指標である IC50 値が 0.08 μM と TLK-19705 に対して 8.8 倍活性が向上し、かつピラゾロピリジン基のヒドロキシル化を防ぐために塩を形成する残基を導入することで 10 倍近く溶解度が改善した化合物である。しかしながら、SKL-02886 は中枢毒性や肝毒性など安全性の課題をもつことが新たに明らかとなり、安全性を改善する必要が生じた。そこで SKL-02886 の類縁構造の急性毒性試験を実施し薬物動態プロファイルと肝毒性の関連を調べたところ、脂溶性の指標である logD 値が 2 以上の数値を示す化合物で、肝毒性の指標である GPT 値が高くなる傾向が示された。この解析結果を基に類縁構造の中から logD

値の低い TLK-48462 を選択し安全性の評価を実施し、TLK-48462 は肝毒性および中枢毒性を生じないことを確認した。TKL-48462 は SKL-02886 と比較すると logD 値が低く、中枢および肝への組織移行性が改善されたことで安全性が確保されたものと考察された。

TLK-48462 は、アジュバント誘発関節炎モデルで病態進展抑制効果を示すことから、安全性を改善しつつ炎症性疾患モデルで効果を示す化合物である。本研究で新たに得た化合物は、炎症性疾患の病態進行を抑制する手段として有用であること、更には炎症疾患における CCR2 および CCR5 を介したシグナル・パスウェイの重要性を証明している。その一方で病態が進行したステージにおける治療の際は、単球・マクロファージの浸潤抑制が CCR2/CCR5 アンタゴニストの単独での使用では十分抑制できないことも示唆された。

しかし、TLK-48462 の抗疼痛効果の検証においては、CCR2/CCR5 アンタゴニストが細胞遊走抑制作用以外の機序も有することが示唆されている。CCR2 KO マウスでの報告や本研究以外にも CCR2 が炎症性疼痛の他に神経因性疼痛において重要な役割を担っていることが示唆されており(1-3)、今後中枢神経系における CCR2 および CCR5 を介したシグナル・パスウェイの役割が更に明らかとなってくること、CCR2/CCR5 アンタゴニストの疼痛治療剤として新たな可能性が検証されることを望む。

本研究の発端となった PG の詳細なメカニズム解析は、その構造の不均一性から十分進んでいないが、本研究で得たヘテロアロイルフェニルウレア誘導体はアロステリックな制御をする低分子 CCR2/CCR5 アンタゴニストであり、作用機序検討に有用なツールとして使用できると考える。本研究結果からは、細胞外第3ループを介したアロステリックな制御が示唆されるが、今後は細胞内因子への作用も含め作用機序検討が進むことで、CCR2 および CCR5 が介するシグナル伝達の機構が更に解明されていくことを望む。

参考文献

1. White F.A., Jung H., and Miller R.J., Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 20151-20158 (2007)
2. Gosselin R.D., Dansereau M.A., Pohl M., Kitabgi P., Beaudet N., Sarret P., and Mélik Parsadaniantz S., Chemokine network in the nervous system: a new target for pain relief. *Current Medicinal Chemistry* 15, 2866-2875 (2008)
3. White F.A., and Miller R.J., Insights into the regulation of chemokine receptors by molecular signaling pathways: functional roles in neuropathic pain. *Brain, Behavior, and Immunity* 24, 859-865 (2010)

謝辞

本論文をまとめるに当たり終始ご懇意なるご指導、ご鞭撻を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 反応制御科学研究室 垣内喜代三教授に深く感謝し、心からお礼を申し上げます。

また、本論文を作成するにあたり、有益なご助言を賜りました奈良先端科学技術大学院大学 物質創成科学研究科 谷原正夫教授、青野浩之教授、上久保裕生准教授に心から感謝申し上げます。

本研究は、Telik, Inc.と株式会社三和化学研究所において行われました。本研究の機会を与えてくださり、終始懇切なご指導、ご激励を賜りました、松本幸治博士に心から感謝申し上げます。

本研究に関する論文投稿および本論文の作成の機会を作ってください、終始懇切なご指導、ご助言、ご激励を賜りました、渡邊信英博士に心から感謝申し上げます。

本研究の推進、論文投稿にあたり、ご指導、ご助言、ご激励を賜りました、鈴木猛志博士に心から感謝申し上げます。

本研究の推進に当たり、化合物の分析についてご協力くださいました加藤憲泰氏に感謝申し上げます。

化合物合成、薬物動態評価、薬理学的評価にご協力くださいました Steve R. Schow 博士をはじめとする Telik, inc.の方々と、城森孝仁博士、石渡義郎博士、宮地敦氏、横地祥司氏、渕上昌弘氏、馬場邦尚氏、稲垣英晃氏、橋本洋幸氏、中村敬志氏に心より感謝申し上げます。

最後に、本論文を作成するにあたり、温かく見守ってくれた、妻 奈津子、息子 怜士に心から感謝します。

研究業績リスト

学位論文の主たる部分を公表した論文

1. Edgardo Laborde, Robert W. Macsata, Fanying Meng, Brian T. Peterson, Louise Robinson, Steve R. Schow, Reyna J. Simon, Hua Xu, Kunihisa Baba, Hideaki Inagaki, Yoshiro Ishiwata, Takahito Jomori, Yukiharu Matsumoto, Atsushi Miyachi, Takashi Nakamura, Masayuki Okamoto, Tracy M. Handel, and Claude C. A. Bernard, Discovery, optimization, and pharmacological characterization of novel heteroaroylphenyl- ureas antagonists of C-C chemokine ligand 2 function. *Journal of Medicinal Chemistry* 54, 1667-1681 (2011)
2. Masayuki Okamoto, Masashiro Fuchigami, Takeshi Suzuki, and Nobuhide Watanabe, A novel C-C chemokine receptor 2 antagonist prevents progression of albuminuria and atherosclerosis in mouse models. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 35, 2069-2074 (2012)
3. Masayuki Okamoto, Takeshi Suzuki, Nobuhide Watanabe, Modulation of inflammatory pain in response to a CCR2/CCR5 antagonist in rodent model
Modulation of inflammatory pain in response to a CCR2/CCR5 antagonist in rodent model. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, accepted.

参考論文

1. Masayuki Okamoto, Norikazu Hiratani, Kunizo Arai, Shoji Ohkuma, Properties of H(+)-ATPase from rat liver lysosomes as revealed by reconstitution into proteoliposomes. *The Journal of Biochemistry* 120, 608-615 (1996)
2. Masatoshi Fujiwara, Noriyuki Ashida, Masayuki Okamoto, Tadashi Mizuta, Teruhiko Ide, Yasuaki Hanasaki, Kimio Katsuura, Hideo Sawada, Shiro Shigeta, Kenji Konno, Tomoyuki Yokota, Masanori Baba, RD6-2198, a novel betain-type fluoroalkylated oligomer, inhibits the replications of human immunodeficiency virus type 1 and other enveloped wiruses. *Antiviral Research* 38, 141-149 (1998)
3. Masayuki Okamoto, Masatoshi Fujiwara, Eiichi Kodama, Osamu Yamamoto, Shiro Shigeta, Hiroaki Mitsuya, Kenji Konno, Tomoyuki Yokota, Masanori Baba, Inhibition of human immunodeficiency virus replication by RD6-Y664, a novel benzylhydroxylamine derivative. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*

10, 71-77 (1999)

4. Masatoshi Fujiwara, Eiichi N Kodama, Masayuki Okamoto, Kenji Tokuhisa, Teruhiko Ide, Yasuaki Hanasaki, Kimio Katsuura, Hiromitsu Takayama, Norio Aimi, Hiroaki Mitsuya, Shiro Shigeta, Kenji Konno, Tomoyuki Yokota, Masanori Baba, Characterization of human immunodeficiency virus type 1 strains resistant to the non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor RD4-2217. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy* 10, 315-320 (1999)
5. Masatoshi Fujiwara, Mika Okamoto, Masayuki Okamoto, Mitsuaki Watanabe, Haruhiko Machida, Shiro Shigeta, Kenji Konno, Tomoyuki Yokota, Masanori Baba, Acridone derivatives are selective inhibitors of HIV-1 replication in chronically infected cells. *Antiviral Research*, 43, 179-189 (1999)
6. Yoshiro Ishiwata, Masayuki Okamoto, Shoji Yokochi, Hiroyuki Hashimoto, Takashi Nakamura, Atsushi Miyachi, Yuji Naito, Toshikazu Yoshikawa, Non-steroidal anti-inflammatory drug, nabumetone, prevents indometacin-induced gastric damage via inhibition of neutrophil functions. *Journal Pharmacy and Pharmacology* 55, 229-237 (2003)
7. Masayuki Okamoto, Mica Ohara-Imaizumi, Naoto Kubota, Shinji Hashimoto, Kazuhiro Eto, Takahiro Kanno, Tetsuya Kubota, Makoto Wakui, Ryoza Nagai, Mitsuhiko Noda, Shinya Nagamatsu, Takashi Kadowaki, Adiponectin induces insulin secretion in vitro and in vivo at a low glucose concentration. *Diabetologia* 51, 827-835 (2008)
8. Yukiko Okazaki, Kazuhiro Eto, Tokuyuki Yamashita, Masayuki Okamoto, Mitsuru Ohsugi, Mitsuhiko Noda, Yasuo Terauchi, Kohjiro Ueki, Takashi Kadowaki, Decreased insulin secretion and accumulation of triglyceride in beta cellsoverexpressing a dominant-negative form of AMP-activated protein kinase. *Endocrine Journal* 57, 141-152 (2010)
9. Kazuma Kaneko, Kohjiro Ueki, Noriko Takahashi, Shinji Hashimoto, Masayuki Okamoto, Motoharu Awazawa, Yukiko Okazaki, Mitsuru Ohsugi, Kazunori Inabe, Toshihiro Umehara, Masashi Yoshida, Masafumi Kakei, Tadahiro Kitamura, Ji Luo, Rohit N. Kulkarni, C. Ronald Kahn, Haruo Kasai, Lewis C. Cantley, Takashi Kadowaki, Class IA phosphatidylinositol 3-kinase in pancreatic cells controls insulin secretion by multiple mechanisms. *Cell Metabolism* 12, 619-632 (2010)

学会発表

1. 岡本昌之、藤原将寿、山本治、茂田士郎、紺野謙治、横田智之、馬場昌範、「ベンジルヒドロキシルアミン誘導体の抗 HIV 活性」、第 11 回日本エイズ学会総会、1997 年 12 月。
2. Masayuki Okamoto, Masatoshi Fujiwara, Osamu Yamamoto, Shiro Shigeta, Kenji Konno, Tomoyuki Yokota, Masanori Baba, Benzylhydroxylamine derivatives inhibit the replication of human immunodeficiency virus. *11th International Conference on Antiviral Research (54)*, 1998 年 4 月。
3. 岡本昌之、窪田直人、寺内康夫、岡崎由希子、大山敦、江藤一弘、今泉美佳、永松信哉、菅野隆治、泉井亮、野田光彦、門脇孝、「アディポネクチンのインスリン分泌機構への影響」、第 47 回日本糖尿病学会年次学術集会、(I-G510-4)、2004 年 5 月。
4. Masayuki Okamoto, Mica Ohara-Imaizumi, Kazuhiro Eto, Toshimasa Yamauchi, Naoto Kubota, Yasuo Terauchi, Takahiro Kanno, Mitsuhiko Noda, Yukiko Okazaki, Makoto Wakui, Shinya Nagamatsu, Takashi Kadowaki, Adiponectin increases insulin secretion via stimulation of exocytosis of insulin secretory granules. 64th scientific sessions American Diabetes Association, (166-OR), 2004 年 6 月。
5. 岡本昌之、今泉美佳、江藤一弘、菅野隆治、山内敏正、窪田直人、矢野互、高木偉碩、岡崎由希子、大山敦、寺内康夫、植木浩二郎、泉井亮、野田光彦、赤沼安夫、永松信哉、門脇孝、「Adiponectin はインスリン分泌を促進する」、第 48 回日本糖尿病学会年次学術集会、(II-2-8)、2005 年 5 月。
6. Masayuki Okamoto, Ryuji Okamoto, Hiroshi Kinoshita, Takayo Murase, Miyuki Tamura, Mitsuaki Takeuchi, Katsura Tsukamoto, A New Class of GLP-1 Analog, SKL-18287; Pharmacological Profiles. 70th scientific sessions American Diabetes Association, (586-P), 2010 年 6 月。

特許

1. 渡辺三明、藤原将寿、岡本昌之、馬場昌範、「アクリドン誘導体を含有する医薬組成物」、出願番号：特願平 9-281884、出願日：1997 年 10 月 15 日、特開平 11-116480、公開日 1999 年 4 月 27 日
2. 門脇孝、発明者：門脇孝、岡本昌之、「インスリン分泌促進剤およびそのスクリーニング方法」、特願 2004-119125、出願日：2004 年 4 月 14 日、特

開 2005-300413、公開日：2005 年 10 月 27 日