

氏名	よねやま ひろき 米山 弘樹
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	論博薬科第71号
学位授与の日付	平成27年11月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	S-アルキル-N-アルキルイソチオウレアの新規合成法の開発とヒスタミンH <sub>3</sub> 受容体アンタゴニストの創製に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 浦田 秀仁 (副査) 教授 春沢 信哉 (副査) 准教授 宇佐美 吉英

## 論文内容の要旨

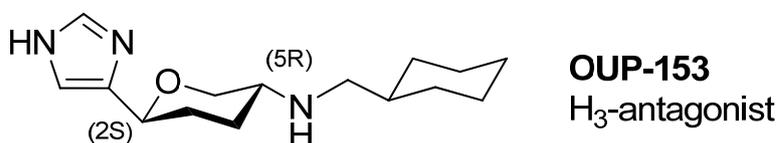
ヒスタミン受容体は、7回膜貫通型のGタンパク共役型受容体に属し、1983年に新たに見つかったヒスタミンH<sub>3</sub>受容体(H<sub>3</sub>R)と2000年に確認されたヒスタミンH<sub>4</sub>受容体(H<sub>4</sub>R)を含め、現在H<sub>1</sub>、H<sub>2</sub>、H<sub>3</sub>、H<sub>4</sub>の4つのサブタイプが知られている。H<sub>3</sub>Rは、ヒスタミン遊離を調節するオートレセプターとして、中枢に高密度で局在している。さらに、アミン作動性神経伝達物質の遊離調節にもヘテロレセプターとして関与しており、中枢性疾患治療薬の標的として開発が進んでいる。H<sub>4</sub>Rは末梢血白血球や骨髄に強く発現し、造血や免疫機能への関与が示唆され、新しい抗炎症、抗アレルギー薬として期待されている。

H<sub>3</sub>RとH<sub>4</sub>Rのアミノ酸配列は相同性が高く全体で約40%、膜貫通部では60%以上の相同性を有しているため、H<sub>3</sub>Rに作用するリガンドのほとんどはH<sub>4</sub>Rにも作用する。そのため、いかに高い選択性を示すヒスタミンリガンドを開発するかが重要な問題となる。また、ヒトH<sub>3</sub>R(hH<sub>3</sub>R)、ラットH<sub>3</sub>R(rH<sub>3</sub>R)のアミノ酸配列は非常に高い相同性を持ち、ヒトとラットの膜貫通部においてアミノ酸配列の異なる部位は、119番目(Thr-Ala)と122番目(Ala-Val)のたった二か所のみである。そのため、これまでH<sub>3</sub>Rに

おける動物間種差はほとんどないものとされていた。

これまでに、 $H_3R$  及び  $H_4R$  リガンドの開発について合成化学的研究を進める中で、1999年に新規  $H_3R$  アゴニストのイミフラミンを発表し、さらに2003年には、世界初の  $H_4R$  選択的アゴニストとして、イミフラミンのメチルシアノグアニジン誘導体 **OUP-16** 及び異性体の **OUP-13** を発表した。

そこで、キラル  $H_3R$  アゴニストのイミフラミンの自由度の高いテトラヒドロフラン環を、立体配座固定型の6員環テトラヒドロピラン誘導体とし、アミン末端部位に疎水性基を導入した OUP 化合物を種々合成したところ、それらの中から(2*S*,5*R*)配位の **OUP-153** に高い  $H_3R$  アンタゴニスト活性を見出した。



しかし、**OUP-153** は、イミダゾール基を含むため、シトクロム P450 に対して高い親和性を示し、血液-脳関門の透過性が低いうえ、経口バイオアベイラビリティの減少など、臨床応用への展開が難しい問題点があった。

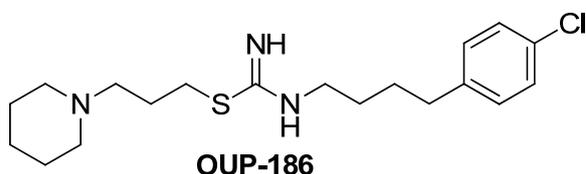
近年、イミダゾールを環状アミンに置き換えた第二世代の非イミダゾール系  $H_3R$  アンタゴニストの開発に注目が集まっており、特に、今年フランスで承認された BF 2649(ピトリサント)は、 $H_3R$  に基づく世界初のナルコレプシー治療薬として、 $H_3R$  アンタゴニスト治療薬の先駆けとなった。そこで、プロトタイプとして最も強い  $H_3R$  アンタゴニストであるクロベンプロピットを基盤とした *S*-アルキル-*N*-アルキルイソチオウレア構造を持つ非イミダゾール系  $H_3R$  アンタゴニスト候補化合物のデザインを行った。

まず、*S*-アルキル-*N*-アルキルイソチオウレア化合物の合成法を調べたところ、いずれも効率の低い合成法であったため、新たな候補化合物を合成するにあたり、新規合成法の開発から行った。

種々検討を重ねた結果、新規アシルイソチオシアネイト試薬を用いる2通りの *S*-アルキル-*N*-アルキルイソチオウレア合成法の開発に成功した。一つは、フェニルプロピオニルイソチオシアネイト(**PPI**)から誘導した、*S*-アルキル-*N*-アシル-*N'*-アルキルイソチオウレア中間体に対して1当量のヒドラジン水和物を直接反応させることで、分子間で脱アシル化が進行し、*N*-CO結合が切断されてイソチオウレアを得る方法である。

もう一方は、ニトロフェニルアセチルイソチオシアネイト(**NPAI**)から合成したニトロ基導入 *S*-アルキル-*N*-アシル-*N'*-アルキルイソチオウレア中間体を、水素ガス雰囲気下、Pd/C 触媒による緩和な還元を行う事で、ニトロ基が選択的にヒドロキシルアミンに変換され、分子内環化反応と *N*-CO 結合切断反応が同時に起こり、イソチオウレアを生成する方法である。これらの合成法は、*S*-アルキル-*N*-アルキルイソチオウレア化合物を効率よく合成できる新しい合成法である。

次に、これらの合成法を用い、多数の非イミダゾール系  $H_3R$  リガンド候補化合物を合成し、それらの薬理活性を調べた。中でも **OUP-186** は、 $hH_3R$  に対して、アンタゴニストとしての親和性 (affinity)  $pA_2=9.6$ 、アゴニストとの競合阻害活性の指標 (potency)  $pIC_{50}=8.2$  と非常に強力なアンタゴニスト活性を示した。また、**OUP-186** は、 $hH_3R$  と相同性が高い  $hH_4R$  に対して全く活性を示さない受容体サブタイプ選択的  $hH_3R$  アンタゴニストであることが分かった。さらに、これまで動物間種差が問題とされなかった  $H_3R$  リガンド研究の中で **OUP-186** は、 $rH_3R$  に対しても全く作用を示さない動物種間選択性も合わせ持つ事が分かった。この動物種間選択性の要因は、MOE を用いた *in silico* 結合研究により、ヒトとラットの  $H_3R$  の 122 番目のアミノ酸残基の差異に起因する事を明らかとした。



$hH_3R$ : antagonist;  $pA_2 = 9.6$ ;  $IC_{50} = 8.2$   
 $rH_3R$ : non-active  
 $hH_4R$ : non-active

申請者は、*S*-アルキル-*N*-アルキルイソチオウレアの新規合成法の開発に成功し、この合成法を用いて、多数の非イミダゾール系  $H_3R$  リガンド候補化合物の合成を行った。さらに、それらの中に、強力な  $hH_3R$  アンタゴニスト活性を持つ一方で、 $hH_4R$  に対しても  $rH_3R$  に対しても作用を示さない、特異な  $hH_3R$  アンタゴニスト **OUP-186** を発見した。

## 論文審査の結果の要旨

ヒスタミン受容体は、 $H_1$ 、 $H_2$ 、 $H_3$ および $H_4$ の4つのサブタイプが存在し、ヒスタミン $H_1$ および $H_2$ 受容体 ( $H_1R$ および $H_2R$ )は、それぞれ抗アレルギー薬および消化性潰瘍治療薬の標的となっている。 $H_3$ 受容体 ( $H_3R$ ) は、ヒスタミン遊離を調節するオートレセプターとして脳内に高密度に存在し、睡眠、摂食、記憶など多くの生理機能に関与し、さらにヘテロレセプターとしてアミン作動性神経伝達物質の遊離調節にも関与しており、様々な中枢神経系疾患治療薬の標的となっている。また、 $H_4$ 受容体 ( $H_4R$ )は末梢血白血球や骨髄に強く発現し、造血や免疫機能への関与が示唆され、抗炎症、抗アレルギー薬の新たな標的として期待されている。しかし、 $H_3R$ と $H_4R$ のアミノ酸配列は高い相同性を有するため、創薬の観点ではそれぞれに高選択的に作用するヒスタミンリガンドの開発が強く求められている。

申請者は、所属研究室で開発された $H_3R$ アゴニスト(2*R*、5*R*)-イミフラミンの構造活性相関の一環で、イミフラミンのテトラヒドロフラン環をテトラヒドロピラン環へと置き換えたOUP-153を始めとする関連化合物を合成し、OUP-153に高い $H_3R$ アンタゴニスト活性を見出した。しかし、イミダゾール環を有する $H_3R$ アンタゴニストはCYP-450に高い親和性を示し、また血液-脳関門の透過性に問題があることから、経口バイオアベイラビリティが低く創薬上の課題となっている。このようにイミダゾール環を持たない第二世代の $H_3R$ アンタゴニストの開発に注目が集まる中、BF2649 (ピトリサント) が $H_3R$ アンタゴニストとしてナルコレプシー治療薬としてフランスで承認されるに至っている。

本論文は、このような背景の中、強力なイミダゾール系 $H_3R$ アンタゴニストであるクロベンプロピットをリードとし、その構造中従来法では効率、一般性の点で構築が困難であった*S*-アルキル-*N*-アルキルイソチオウレア構造の新規合成法を考案し、本法を用いることで様々な非イミダゾール系*S*-アルキル-*N*-アルキルイソチオウレア誘導体を合成し、その構造活性相関を可能にした。さらにその結果として、新規 $H_3R$ アンタゴニストとして有望なOUP-186を見出すことに成功したものである。

申請者は、新規*S*-アルキル-*N*-アルキルイソチオウレアの合成法として、*N*-アシルイソチオシアネート誘導体と各種アミンとの反応で*N*-アシルチオウレア誘導体とし、引き続き*S*-アルキル化を行い*S*-アルキル-*N*-アシルイソチオウレアとし、最終段階で*N*-アシル基を脱離させる合成経路を考案した。この方法は、最終段階で目的の*N*-アシ

ル基の脱離と、S-C結合の切断によるアルキルチオ基の脱離が競合して起こるため、アシル基に脂肪族アシル基を用い、求核剤としてヒドラジンを用いることで実用レベルの脱アシル化に成功している。しかし、この脱アシル化は一般性の点で問題が残ったため、N-ニトロフェニルアセチル基を導入したS-アルキル-N-アシルイソチオウレアの緩和な還元条件による分子内環化反応を経由する選択的脱アシル化を行い、S-C結合の切断を伴うことなく脱アシル化に成功し、より一般性の高いS-アルキル-N-アルキルイソチオウレアの合成法を確立している。

さらに本合成法により種々の非イミダゾール系H<sub>3</sub>Rリガンド候補化合物を合成し、ヒトH<sub>3</sub>受容体(hH<sub>3</sub>R)を強制発現させたCHO-K1細胞を用いて、hH<sub>3</sub>Rアゴニスト活性およびアンタゴニスト活性を調べ、OUP-186は非イミダゾール系hH<sub>3</sub>Rアンタゴニストとしてクロベンプロピットに匹敵する非常に強力な活性を示すことを見出した。このOUP-186は、hH<sub>3</sub>Rと膜貫通部のアミノ酸配列が約60%の相同性をもつhH<sub>4</sub>Rに対しては全く活性を示さず、受容体サブタイプ選択的hH<sub>3</sub>Rアンタゴニストであることを明らかにしている。さらにOUP-186は、*in vivo*ラット脳マイクロダイアリス法によりラット脳内のヒスタミン遊離動態を調べたところ、基礎遊離量から有意な変化はなく、ラットH<sub>3</sub>受容体(rH<sub>3</sub>R)に対して全く作用を示さない動物種間選択性を示すことが明らかにされた。これは、H<sub>1</sub>Rの構造を基にホモロジー解析により構築したヒトおよびラットH<sub>3</sub>Rと、OUP-186を始めとする幾つかの関連化合物の*in silico*ドッキングシミュレーションにより合理的に説明されている。ヒトおよびラットH<sub>3</sub>Rは膜貫通領域にわずかに二カ所のアミノ酸配列の違い(119番目と122番目)しかなく、特に122番目のアミノ酸はAla (hH<sub>3</sub>R)とVal (rH<sub>3</sub>R)であり、その側鎖のかさ高さの違いによりリガンドが結合する受容体ポケットの深さが決定され、OUP-186の動物種間選択的アンタゴニスト活性が発現していることが示唆された。

以上のように本論文は、最近のH<sub>3</sub>Rリガンドの開発コンセプトである“非イミダゾール系”リガンドのより一般的な合成法を開発し、これにより合成したOUP-186に強力、かつサブタイプ選択的、動物種間選択的なアンタゴニスト活性を見出し、今後のH<sub>3</sub>Rアンタゴニスト開発の指標となる結果を示したものとする。

上記の論文は、博士(薬科学)論文として適当と判断する。