

# Structure Based Drug Design (SBDD)を活用した分子設計による種差克服を目指した新規キマーゼ阻害剤の創製

犬 飼 隆 之

大阪医科薬科大学大学院医学研究科創薬医学教室

**要旨:** キマーゼは、幅広いペプチド分解活性を示し様々な機能に関与しているが、そのアミノ酸配列には動物種差が存在する。各種動物モデルにてキマーゼ阻害剤の適応疾患を探索するには、ヒトを含む様々な動物種で同等のキマーゼ阻害活性を有する阻害剤の使用が望ましい。しかし、多くの既知キマーゼ阻害剤は動物種による阻害活性差を有する。本研究の目的は、動物種差なくキマーゼ阻害活性を示す低分子化合物を創製し、それを用いて大動脈瘤に対する阻害剤の効果を評価することである。新規キマーゼ阻害剤の探索は、ヒトキマーゼ阻害活性スクリーニングから見出したヒット化合物1を起点とした。ヒトキマーゼのX線結晶構造とヒトキマーゼとアミノ酸配列の相同性が低いマウスキマーゼのホモロジーモデルによる3次元タンパク構造可視化アプローチにより化合物デザインを行った。合成展開により、ヒトおよび様々な動物種のキマーゼを強力かつ同等に阻害する化合物6を創製した。エラストーゼ誘発ハムスター腹部大動脈瘤モデルにおいて、化合物6は大動脈瘤組織中のキマーゼ活性を抑制し、腹部大動脈瘤の増大を有意に低下させた。化合物6は、動物種差の少ないキマーゼ阻害剤であり、キマーゼ阻害剤の適応疾患解析に有用なツール化合物と考えられる。

**Key words:** キマーゼ, 複合体X線結晶構造解析, SBDD, 動物種差, ハムスター腹部大動脈瘤モデル

## 緒 言

キマーゼは、主に肥満細胞の顆粒中に存在するキモトリプシン様セリンプロテアーゼであり、ヒスタミンなどと同様に脱顆粒にともなって細胞外に遊離される。キマーゼは、アンジオテンシンIからアンジオテンシンIIへの変換、トランスフォーミング増殖因子(TGF)- $\beta$ の活性化、あるいはマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-9の前駆体から活性体への変換など、種々の生理機能を有することが知られている<sup>1)-4)</sup>。従って、キマーゼ阻害剤は、アトピー性皮膚炎、動脈瘤、心不全、肺線維症などの疾患治療薬として期待されている<sup>5)6)</sup>。キマーゼ阻害剤を用いた各種動物モデルによる適応疾患探索を行うには、ヒトと様々な動物種由来キマーゼで同程度の阻害活性を有することが望ましいが、動物種によりキマーゼのアミノ酸配列や基質特異性が異なる<sup>7)8)</sup>。動物モデル実験によく利用されるマウスのキマーゼは、

ヒトキマーゼとアミノ酸配列の相同性が低い。そのため、阻害剤が結合するのに重要なキマーゼの活性中心に存在するポケット部位(S1)の形状がヒトとマウスでは異なる。これまでに報告されている既知キマーゼ阻害剤の多くは、ヒトキマーゼからデザインされたため、動物種間によるキマーゼに対する結合親和性の違いが原因で阻害活性に差がある<sup>9)</sup>。化合物にヒトキマーゼ阻害活性があっても、動物種による阻害活性の差により薬効にも差が出る可能性が予想され、臨床へ外挿するトランスレーショナル研究を難しくしてきた。動物種差の少ないキマーゼ阻害活性を示す化合物が創製できれば、動物種に限定されないモデル実験を可能にし、新たな適応疾患探索に繋げられるかもしれない。

本研究では、動物種差なくキマーゼ阻害活性を示す低分子ツール化合物を創製することを目的とした。標的とするターゲットタンパク質へ薬理活性を有する新規化合

物を取得するには、ハイスループットスクリーニング (HTS) 技術を利用して、数千から数百万から成る低分子化合物ライブラリ群を探索し、阻害活性を示すヒット化合物を取得する方法が一般的である。しかし、それで行われるヒット化合物は、標的検証実験に用いるには活性が弱いことが多いため、ヒット化合物から有機合成化学技術を駆使した合成展開で構造最適化を行い、よりターゲットタンパクを強く制御する化合物を探索する。この過程で、変換された構造と活性の動きの関係を捉えて活性向上を狙う分子設計に繋げることが理想だが、通常多大な時間を費やす。一方、見いだされた化合物とタンパク質との複合体構造を可視化することで合理的な分子設計が可能となる。例えば、化合物とターゲットタンパクの結合した立体構造のすき間を埋めるような側鎖を設計して元のヒット化合物に付加することができる。このような化合物の構造最適化方法をStructure Based Drug Design (SBDD) と呼ぶ<sup>10) 11)</sup>。本研究では、化合物とヒトキマーゼの複合体X線結晶構造ならびにヒトキマーゼX線結晶構造を鋳型に計算シミュレーションで作製したマウスキマーゼのホモロジーモデル構造情報を活用したSBDDの手法を採用した。これにより、『強力なヒトキマーゼ阻害剤』を効率的に創製することを目指した。また、マウスおよびハムスターの腹部大動脈瘤モデルを用いて、創製される新規キマーゼ化合物の薬効評価を行うこととした。

### 材料と方法

#### (1) ヒトキマーゼ酵素阻害活性の測定

ヒトキマーゼは、Human Chymase Pure (East Coast Biologics社) を用い、キマーゼ用のペプチド基質として N-Succinyl-Ala-Pro-Phe-p-nitroaniline (シグマアルドリッチ社) を用いた。96ウェルマイクロプレートに、50%ジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解した新規合成化合物10  $\mu$ L とアッセイ用緩衝液 (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 50 units/mL heparin, pH7.6) で希釈したペプチド基質溶液 (最終濃度2.5 mM) を80  $\mu$ L 加え、37  $^{\circ}$ C で10分間インキュベートした。これに対して、最終濃度0.1  $\mu$ g/L のヒトキマーゼを10  $\mu$ L 加え、酵素反応を開始した。405 nm における吸光度を30秒間隔で5分間モニターし、反応速度 ( $\Delta$ mO. D. /分) を測定した。コントロールウェルには、新規合成化合物溶液の代わりに50% DMSO を10  $\mu$ L 添加し、ブランクウェルにはキマーゼの代わりに蒸留水を10  $\mu$ L 添加した。コントロールウェルの反応速度からブランクウェルの反応速度を差し引いた値を100%とし、新規合成化合物の阻害率を算出した。

#### (2) マウスキマーゼ酵素阻害活性の測定

マウスキマーゼは、マウス皮膚からの抽出液をマウスキマーゼ酵素として用いた。雄性BALB/cマウスの皮膚重量 (g) の10倍量 (mL) の洗浄用緩衝液 (20 mM リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.4) を加え、ホモジナイズを行った。4  $^{\circ}$ C, 8,000回転, 15分間遠心し、上清を除去した後、洗浄用緩衝液を用いて洗浄操作を2回行った。遠心して上清を除去した後、皮膚湿重量 (g) の5倍量 (mL) の抽出用緩衝液 (10 mM リン酸ナトリウム緩衝液, 2 M KCl, pH 7.4) を加え、ローテーターを用いて4  $^{\circ}$ C で一晩抽出操作を行った。4  $^{\circ}$ C, 8,000回転, 30分間遠心後、上清をマウスキマーゼ酵素として用いて、上述のヒトキマーゼ阻害活性と同様の評価方法でマウスキマーゼ酵素に対する阻害活性を算出した。

#### (3) ハムスターキマーゼ酵素阻害活性の測定

ハムスターキマーゼは、雌性ハムスターの頬袋からの抽出液をハムスターキマーゼ酵素として用いた。上述のマウスキマーゼ酵素阻害活性と同様の評価の方法でハムスターキマーゼ酵素に対する阻害活性を算出した。

#### (4) マウス腹部大動脈瘤モデル

10週齢、雄性、C57BL6/Nマウスを日本SLCより購入し、プラセボ (0.1% Carboxymethyl cellulose (以下CMCと略す)) または化合物6 (0.1% CMCで懸濁) を1日2回 (100 mg/kg x 2回)、2日間経口投与したのち、3日目の1回目経口投与後1時間の時点で麻酔下、腹部大動脈の周囲に幅0.5 cmのガーゼを巻き、20  $\mu$ L のブタエラストラーゼ (188 mU/mg protein: 6.6 mg protein/mL) を20分間毎にガーゼに浸潤させ (計3回)、1時間処置した<sup>12)</sup>。その10時間後に同用量のプラセボまたは化合物6を経口投与した。エラストラーゼ処置後13日までの間、プラセボまたは化合物6を1日2回経口投与し、14日目に腹部大動脈瘤に対する化合物6の効果を評価した。本実験計画は大阪医科大学動物実験委員会の審査会にて承認を得た上で実験を行った (承認番号: 2020-037)。

#### (5) ハムスター腹部大動脈瘤モデル

8週齢、雄性、シリアンハムスターを日本SLCより購入し、プラセボ (0.1% CMC) または化合物6 (0.1% CMCで懸濁) を1日2回 (30 mg/kg x 2回)、2日間経口投与したのち、3日目の1回目経口投与後1時間の時点で麻酔下、腹部大動脈の周囲に幅1 cmのガーゼを巻き、30  $\mu$ L のブタエラストラーゼ (188 mU/mg protein: 6.6 mg protein/mL) を20分間毎にガーゼに浸潤させ (計3回)、1時間処置した<sup>12)</sup>。その10時間後に同用量のプラセボま

たは化合物 6 を経口投薬した。エラストラーゼ処置後13日までの間、プラセボまたは化合物 6 を 1 日 2 回経口投与し、14日目に腹部大動脈瘤に対する化合物 6 の効果を評価した。本実験計画は大阪医科大学動物実験委員会の審査会にて承認を得た上で実験を行った(承認番号: 2019-108)。

#### (6) エコー検査および組織摘出

マウス腹部大動脈瘤モデルの正常群(n=6)、プラセボ群(n=10)、化合物 6 群(n=10)において、エラストラーゼ処置前、エラストラーゼ処置後1時間および14日後の時点でエコーにて腹部大動脈最大内腔径を測定した。また、ハムスター腹部大動脈瘤モデルも同様に正常群(n=6)、プラセボ群(n=12)、化合物 6 群(n=12)において、エラストラーゼ処置前、エラストラーゼ処置後1時間および14日後の時点でエコーにて腹部大動脈最大内腔径を測定した。ハムスター腹部大動脈瘤モデルでは、更にエラストラーゼ処置14日後、プラセボ群および化合物 6 群の半数のハムスター(各群: n=6)の腹部大動脈を組織標本作製のためにカルノア固定し、両群の残りの半数(各群: n=6)の腹部大動脈は、酵素活性等の生化学的解析のために液体窒素にて急速凍結した。一方、正常群(n=6)は、ハムスター全例(n=6)の腹部大動脈を半分に分け、組織標本作製と生化学的解析のために他群と同様の処置を行った。エラストラーゼ処置した2群を1個体分の腹部大動脈を組織標本作製または生化学的解析に使用したのに対し、正常群は1個体分の腹部大動脈を半分にして組織標本作製または生化学的解析に使用した理由は、エラストラーゼ処置2群ではエラストラーゼ処置した部分が腹部大動脈の一部で、その部分のみを摘出したのでその領域は腹部大動脈の約半分であったのに対し、正常群の腹部大動脈は全領域を使用できたので半分に分けて解析が可能であったからである。

#### (7) 組織解析

カルノア固定した組織は、パラフィン包埋したのち、5  $\mu$ mに薄切して組織標本作製した。ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色とエラスチカ・ワンギーソン(EVG)染色を行い、腹部大動脈の内腔直径を定量した<sup>12)</sup>。

#### (8) 組織中キマーゼ活性測定

液体窒素で凍結した組織の半分は、酵素活性およびタンパク質レベルの解析のため、500  $\mu$ Lの洗浄用緩衝液(0.2 M KCl含有20 mM Tris-HCl緩衝液)にてホモジネートした。ホモジネート液を4  $^{\circ}$ C、8,000回転で20分間遠心し、その上清液を廃棄したのち、沈殿物を200  $\mu$ Lの抽出

用緩衝液(2 M KClおよび0.1% Triton X-100含有20 mM Tris-HCl緩衝液)にて再度ホモジネートした。ホモジネート液を4  $^{\circ}$ Cにて1晩放置後、4  $^{\circ}$ C、8,000回転で20分間遠心し、その上清液を酵素活性測定用の抽出液とした<sup>12)</sup>。キマーゼ活性は、アンジオテンシン I を基質にして抽出液原液と反応させ、アンジオテンシン II が産生される際に産生されるHis-Leuを定量した<sup>12)</sup>。MMP-9タンパク質レベルは、抽出液を2倍希釈した後、R&D社のHuman Total MMP-9測定キットにて定量した<sup>13)</sup>。タンパク質濃度は、抽出液を10倍希釈した後、BCAタンパクアッセイキット(Pierce社)を用いて定量した。

#### (9) 遺伝子発現量

遺伝子発現量の解析は、組織よりトリゾールを用いてmRNAを抽出したのち、cDNAに変換してReal-Time PCRを行った。キマーゼ、MMP-9、 $\alpha$ -SMA、TNF- $\alpha$ の遺伝子発現量は、GAPDHの遺伝子発現量で補正して定量した<sup>14)</sup>。

#### (10) 化合物 1 とヒトキマーゼとの複合体X線結晶構造解析

ヒトキマーゼは昆虫細胞(Sf9細胞)を用いて細胞内に発現させた。回収した昆虫細胞を超音波破碎し、遠心分離にて上清を回収した後、Niアフィニティカラムクロマトグラフィ(His Trap HP; Cytiva, 5 mL)および陰イオン交換カラムクロマトグラフィ(Resource Q; Cytiva, 6 ml)にて精製を行った。ヒトキマーゼが含まれる分画を分取し、7 mg/mlまで濃縮し結晶化に用いた。アポ体の結晶化はヒトキマーゼ溶液と結晶化溶媒(0.1 M Trisodium citrate pH 5.6, 20% iPrOH, 20%(w/v)PEG4000, 200 mM Ammonium Sulfate)を1:1で混合し、ハンギングドロップ蒸気拡散法にて行った。得られた結晶は長さが200  $\mu$ mを超える針状であり、このアポ体の結晶が含まれるドロップに化合物 1 をソーキングすることにより、化合物 1 との複合体結晶を得た。回折実験はX線発生装置RIGAKU MicroMax 007HとRAXIS IV++検出器を用いて行った。データ収集は100Kで行い、Crystal Clearにてデータ処理し、モデル構築、化合物フィッティングならびに精密化はDiscovery StudioとCNX(Crystallography and NMR Explorer)を用いた。回折データは表 1 に示す。

表1 化合物1とヒトキマーゼとのX線結晶構造解析の回折データ

Statistics	hChymase_化合物1
<b>Diffraction Data</b>	
Space group	<i>P</i> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Unit cell dimensions	56.75, 65, 08, 69.21
Wavelength(Å)	1.54
Resolution range(Å)	32.54- 2.43
Unique no. of reflections	7842
Completeness (%)	77.6 (82.3) <sup>a</sup>
Rmerge <sup>b</sup> (%)	0.113 (0.401) <sup>a</sup>
<b>Refinement Data</b>	
Resolution limits(Å)	32.54- 2.43
<i>R</i> <sub>factor</sub> (%) <sup>c</sup>	25.5
<i>R</i> <sub>free</sub> (%) <sup>d</sup>	28.6
Deviations	
Bond length(Å)	0.007722
Bond Angle(°)	1.568681
Mean B factors <sup>e</sup>	
Main chain atoms (Å <sup>2</sup> )	41.044
Side chain atoms (Å <sup>2</sup> )	44.525
Water atoms (Å <sup>2</sup> )	45.878
Ramachandran plot <sup>f</sup> (%)	93.3, 5.8, 0.9
<sup>a</sup> The values in parentheses are for the highest-resolution shells; 2.52-2.43 Å <sup>b</sup> $R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i  I_{hkl,i} - \langle I_{hkl} \rangle }{\sum_{hkl} \sum_i I_{hkl,i}}$ , where $I_{hkl,i}$ is the $i$ th observation of the reflection $hkl$ and $\langle I_{hkl} \rangle$ is the mean intensity of the reflection $hkl$ . <sup>c</sup> $R_{\text{factor}} = \frac{\sum   F_{\text{obs}}  -  F_{\text{calc}}  }{\sum  F_{\text{obs}} }$ . <sup>d</sup> $R_{\text{free}}$ is calculated in the same manner as $R_{\text{factor}}$ , except that the $F_{\text{obs}}$ corresponds to the 5% of reflections not used in the refinement. <sup>e</sup> Mean B factor is the average value of thermal factors of all the main-chain atoms. <sup>f</sup> Percentages of residues in the most favored, allowed, and disallowed regions, respectively, of a Ramachandran plot	

## (11) 化合物2, 3, 4, 5および6

化合物2, 3, はいずれも一般的な有機化学反応を駆使して化学合成にて供給した。化合物2および3は2-トリフルオロメタンスルホニルオキシ-1-ナフトエート及び各種置換インドール誘導体より4工程を要し, 化合物6は9工程を要しそれぞれ合成した。化合物4および5は2-アセチル安息香酸より8工程を要し合成した。

化合物1: 1H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) ppm 3.91 - 4.21 (m, 2 H), 6.61 - 6.79 (m, 3 H), 6.80 - 6.87 (m, 1 H), 7.08 - 7.17 (m, 1 H), 7.19 - 7.27 (m, 1 H), 7.27 - 7.40 (m, 3 H), 7.48 (d, *J*=8.4 Hz, 1 H), 7.56 - 7.70 (m, 2 H), 7.92 (d, *J*=7.5 Hz, 1 H), 8.02 (d, *J*=7.9 Hz, 2 H), 13.35 (s, 1 H).

HRMS (FAB, Pos.) calcd for C<sub>25</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 379.1441. Found: 379.1497 (M + H)<sup>+</sup>.

化合物2: 1H NMR (300 MHz, CHLOROFORM-*D*) ppm 4.94 (d, *J*=16.5 Hz, 1 H), 5.03 (d, *J*=16.5 Hz, 1 H), 6.33 (d, *J*=3.3 Hz, 1 H), 6.55 - 6.65 (m, 1 H), 6.67 - 6.78 (m, 2 H), 6.84 (d, *J*=3.3 Hz, 1 H), 6.98 - 7.11 (m, 2 H), 7.12 - 7.20 (m, 2 H), 7.30 - 7.39 (m, 1 H), 7.39 - 7.53 (m, 2 H), 7.76 - 7.95 (m, 3 H). HRMS (FAB, Pos.) calcd for C<sub>26</sub>H<sub>18</sub>FNO<sub>2</sub>: 396.1394. Found: 396.1387 (M + H)<sup>+</sup>.

化合物3: 1H NMR (300 MHz, CHLOROFORM-*D*) ppm 2.32 (d, *J*=1.6 Hz, 3 H), 5.30 (d, *J*=17.9 Hz, 1 H), 5.39 (d, *J*=17.9 Hz, 1 H), 6.42 - 6.51 (m, 2 H), 6.84 (dd, *J*=10.2,

8.6 Hz, 1 H), 6.93 (d, J=2.7 Hz, 1 H), 7.17 - 7.43 (m, 5 H), 7.56 - 7.71 (m, 2 H), 7.92 - 7.98 (m, 1 H), 8.00 (d, J=8.6 Hz, 1 H), 8.11 (d, J=8.4 Hz, 1 H). HRMS (FAB, Pos.) calcd for C<sub>27</sub>H<sub>20</sub>FNO<sub>2</sub>: 410.1551. Found: 410.1545 (M + H)<sup>+</sup>.

化合物 4: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CHLOROFORM-D) ppm 5.54 (s, 2 H), 6.48 (d, J=3.3 Hz, 1 H), 6.83 (d, J=3.3 Hz, 1 H), 6.85 - 6.90 (m, 1 H), 6.92 - 7.00 (m, 1 H), 7.08 - 7.16 (m, 1 H), 7.35 - 7.45 (m, 2 H), 7.49 - 7.63 (m, 4 H), 7.78 (d, J=8.4 Hz, 1 H), 8.26 (dd, J=7.1, 2.2 Hz, 1 H). HRMS (FAB, Pos.) calcd for C<sub>23</sub>H<sub>16</sub>FN<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: 386.1299. Found: 386.1294 (M + H)<sup>+</sup>.

化合物 5: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CHLOROFORM-D) ppm 2.79 (s, 3 H), 3.62 (s, 3 H), 4.62 - 4.85 (m, 2 H), 6.26 (s, 1 H), 6.86 - 6.97 (m, 2 H), 7.16 - 7.22 (m, 2 H), 7.34 - 7.56 (m, 4 H), 7.69 - 7.79 (m, 1 H), 7.89 - 8.00 (m, 1 H), 8.28 - 8.37 (m, 1 H). HRMS (FAB, Pos.) calcd for C<sub>25</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: 396.1707. Found: 396.1699 (M + H)<sup>+</sup>.

化合物 6: <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CHLOROFORM-D) ppm 2.46 - 2.59 (m, 4 H), 2.68 (s, 3 H), 2.79 (t, J=6.1 Hz, 2 H), 3.60 - 3.72 (m, 4 H), 4.11 (t, J=6.1 Hz, 2 H), 4.52 (s,

2 H), 6.40 (s, 1 H), 6.74 - 6.87 (m, 2 H), 7.03 - 7.15 (m, 2 H), 7.22 - 7.51 (m, 4 H), 7.71 - 7.90 (m, 4 H), 8.17 (d, J=8.8 Hz, 1 H). HRMS (FAB, Pos.) calcd for C<sub>34</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>: 545.2547. Found: 545.2536 (M + H)<sup>+</sup>.

## 結果

低分子化合物ライブラリー(約4万化合物)のヒトキマーゼ阻害活性スクリーニングより、カルボン酸化合物 1 (IC<sub>50</sub>: 13 μM) がヒット化合物として得られ、さらに、化合物 1 とヒトキマーゼとの複合体X線結晶構造解析が取得された。本研究では、これらの情報をもとに、ヒトキマーゼ阻害活性の向上を目指した構造最適化を行った。化合物 1 のナフチルカルボン酸部位はキマーゼ活性中心に位置する触媒活性セリン残基(Ser195)と相互作用していた(図1)。また、3-シアノアニリン部分はS1ポケットに位置しており、この部分の変換でS1ポケットとの相互作用が増強できるのではないかと推察し各種変換を試みた。その結果、インドール誘導体である化合物 2 (IC<sub>50</sub>: 0.083 μM) は約150倍阻害活性が向上した(図1)。インドール環上の置換基の最適化を行い、さらに活性が向上した化合物 3 (IC<sub>50</sub>: 0.012 μM) を見出した(図1)。

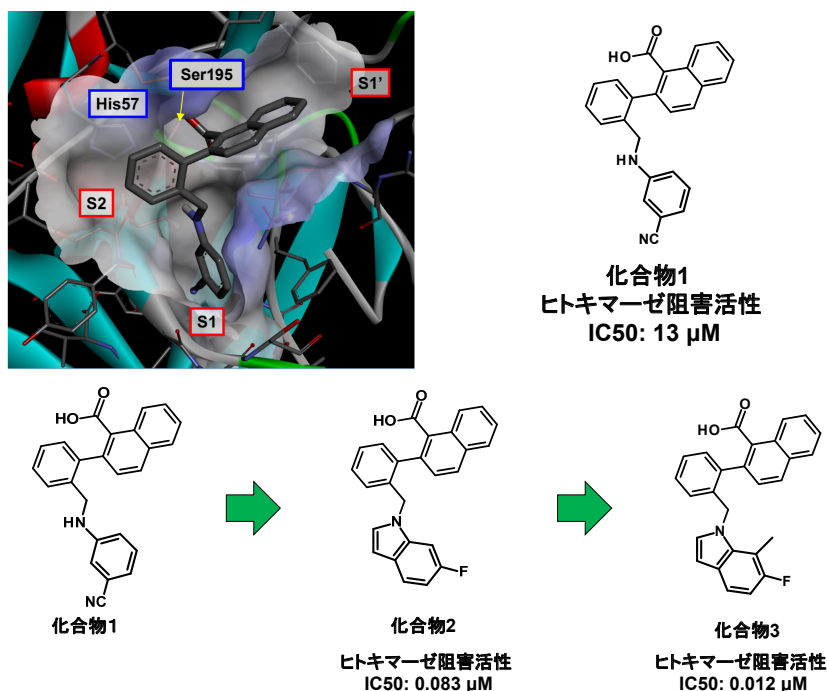


図1 化合物 1, 2, 3 の化学構造およびヒトキマーゼX線結晶構造  
化合物 1 とヒトキマーゼとの複合体X線結晶構造を示す(上段左画像)。化合物 1 の化学構造およびヒトキマーゼ阻害活性値を示す(上段右図)。化合物 2 及び化合物 3 の化学構造およびヒトキマーゼ阻害活性値を示す(下段図)。

化合物3はHTSヒット化合物1に比べて、約1,000倍ヒトキマーゼ阻害活性が強い化合物であったが、化合物3のマウスキマーゼ様酵素に対する $IC_{50}$ 値は $13\mu M$ であり、ヒトキマーゼ阻害活性に比べて1000倍弱いことが判明した。化合物3は、そのナフタレン部分とヒトキマーゼのLys40とのファンデルワールス力(VDW)相互作用により強い親和性を有していると考えられる(図2)。次にヒトキマーゼとアミノ酸配列の相同性の低いマウスキマーゼ(mMCP-4)のモデリングを作製し、ヒトキマーゼのX線結晶構造と重ね合わせた(モデリングにはDiscovery Studioを使用)。その結果、この位置のアミノ酸残基は

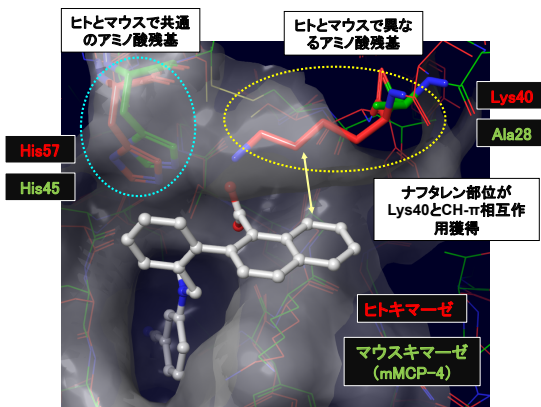


図2 ヒトキマーゼとマウスキマーゼの活性中心のアミノ酸残基比較  
化合物1とヒトキマーゼとの複合体X線結晶構造ならびにマウスキマーゼ(mMCP-4)のホモロジーモデルの重ね合わせを示す。

mMCP-4ではAla28でありLys40のようなVDW相互作用は期待できないことが判明し、この点がヒトとマウスの種差の大きな原因のひとつであると推測した(図2)。

ヒトとマウスで保存されている活性中心のヒスチジン残基との相互作用を増強する目的で、化合物3の構造変換を行った。合成した化合物4(ヒトキマーゼに対する $IC_{50}$ :  $0.41\mu M$ , マウスキマーゼに対する $IC_{50}$ :  $3.5\mu M$ )は、ナフチル基を有していないため、化合物3に比べてヒトキマーゼ阻害活性は減弱したが、マウス阻害活性との乖離が小さくなった(図3)。化合物4から周辺構造探索を行い、ヒト及びマウスのキマーゼ阻害活性が向上した化合物5(ヒトキマーゼ $IC_{50}$ :  $0.022\mu M$ , マウスキマーゼ $IC_{50}$ :  $0.20\mu M$ , ハムスターキマーゼ $IC_{50}$ :  $0.18\mu M$ )を見出し、さらに、構造最適化することで化合物6(ヒトキマーゼ $IC_{50}$ :  $0.0018\mu M$ , マウスキマーゼ $IC_{50}$ :  $0.089\mu M$ , ハムスターキマーゼ $IC_{50}$ :  $0.038\mu M$ )を創製した(図3)。

化合物6をマウス腹部大動脈瘤モデルに用いた。本モデルのエコー評価による腹部大動脈最大内腔径について、エラストラーゼ処置前に比してエラストラーゼ処置1時間後のプラセボ群および化合物6群は、それぞれの処置前の値に比して1.95倍と1.98倍に増加したが、両群の大動脈径の間に有意差を認めなかった(図4右)。一方、エラストラーゼ処置後14日のプラセボ群は、エラストラーゼ処置1時間後に比べて有意に増加したが、化合物6群は有意な増加を認めず、プラセボ群に比して化合物6群で大動脈最大内腔径を有意に低下させた(図4右)。

化合物6をハムスター腹部大動脈瘤モデルに用いた。本モデルのエコー評価による腹部大動脈最大内腔径について、エラストラーゼ処置前に比してエラストラーゼ処置1

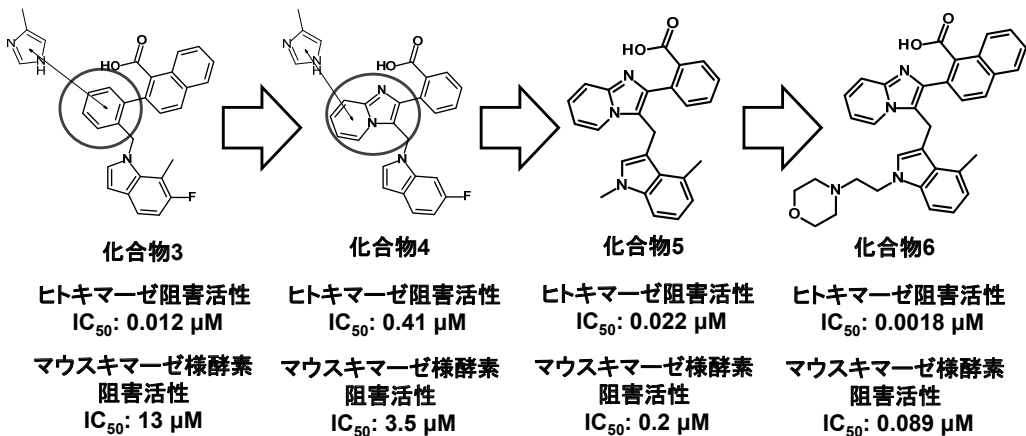


図3 動物種差軽減へ向けた構造最適化の変遷  
化合物3-化合物4-化合物5-化合物6の構造変換の変遷、ならびに各化合物のヒトキマーゼ阻害活性値及びマウスキマーゼ阻害活性値を示す。

時間後のプラセボ群および化合物6群は、それぞれの処置前の値に比して1.43倍と1.40倍に増加したが、両群の腹部大動脈径の間に有意差を認めなかった(図5右)。一方、エラスターゼ処置後14日のプラセボ群は、エラスターゼ処置1時間後に比べて有意に増加したが、化合物6群は有意な増加を認めず、プラセボ群に比して化合物6群で腹部大動脈最大内腔径を有意に低下させた(図5右)。

EVG染色した組織切片解析より、血管周囲長から計算した血管内腔直径は、プラセボ群および化合物6群が正常群に比して1.90倍と1.63倍に増加したが、化合物6群

は、プラセボ群に比して有意な拡大低下を認めた(図6)。

キマーゼ活性およびMMP-9タンパク質レベルは、プラセボ群で正常群に比して有意に高値であったが、化合物6群では、プラセボ群に比して有意に低値であった(図7)。

遺伝子発現レベルは、キマーゼ、MMP-9、TNF- $\alpha$ のすべてが正常群に比してプラセボ群で有意な高値を示し、化合物6群ではプラセボ群に比してこれらすべてが有意に低下していた(図8)。一方、 $\alpha$ -SMAは、プラセボ群で有意な低値を示し、化合物6群では、プラセボ群より高値を示す傾向を示した(図8)。

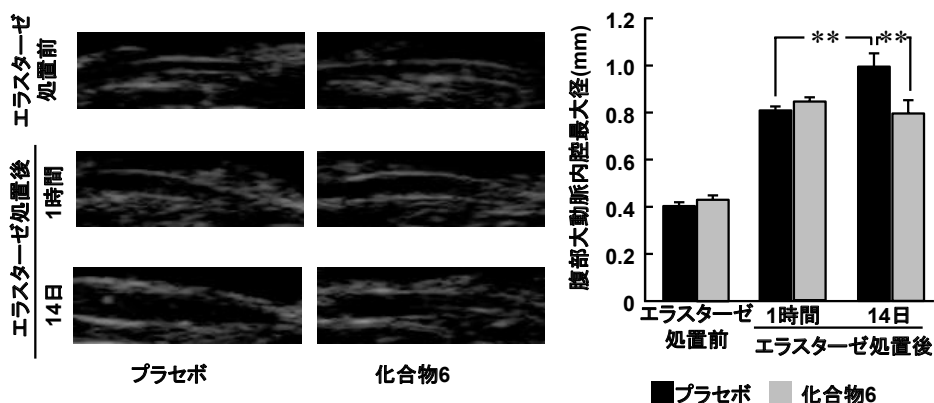


図4 マウス腹部大動脈瘤モデルのエコー測定による腹部大動脈内腔最大径 エラスターゼ処置前、エラスターゼ処置直後(1時間)、エラスターゼ処置後14日のプラセボ投与マウス、化合物6投与マウスの腹部大動脈のエコーによる代表的画像を示す(左側画像)。エラスターゼ処置したプラセボ群およびキマーゼ阻害剤群のエラスターゼ処置前、処置直後、14日後の腹部大動脈最大径の結果を示す(右側グラフ)。\*\*P<0.01。

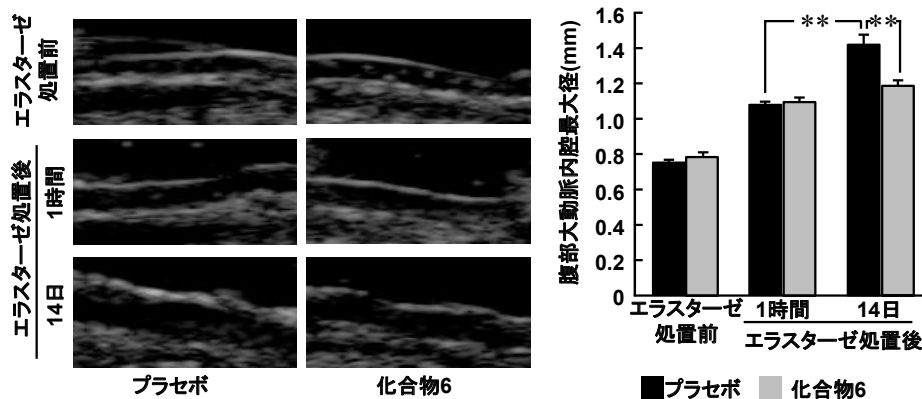


図5 ハムスター腹部大動脈瘤モデルのエコー測定による腹部大動脈内腔最大径 エラスターゼ処置前、エラスターゼ処置直後(1時間)、エラスターゼ処置後14日のプラセボ投与ハムスター、化合物6投与ハムスターの腹部大動脈のエコーによる代表的画像を示す(左側画像)。エラスターゼ処置したプラセボ群およびキマーゼ阻害剤群のエラスターゼ処置前、処置直後、14日後の腹部大動脈最大径の結果を示す(右側グラフ)。\*\*P<0.01。

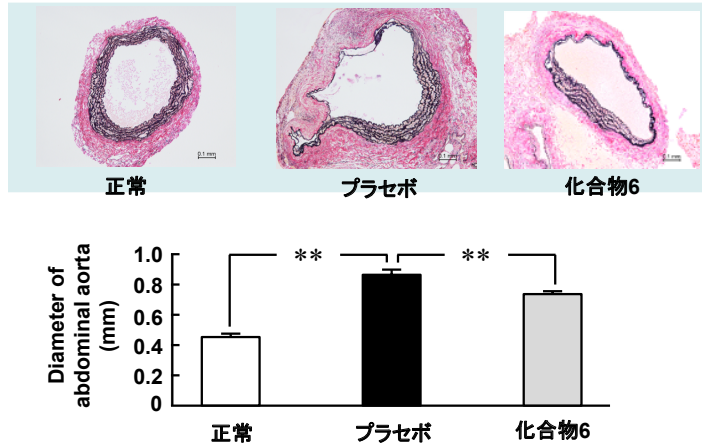


図6 ハムスター腹部大動脈瘤モデルのEVG染色による腹部大動脈径  
 エラスターゼ無処置(正常), プラセボ群, およびキマーゼ阻害剤群におけるエラスターゼ処置後14日の腹部組織切片をEVG染色した代表的写真を示す(上段画像)。正常群, プラセボ群, キマーゼ阻害剤群の腹部大動脈の血管内腔直径を示す(下段)。\*\*P<0.01。

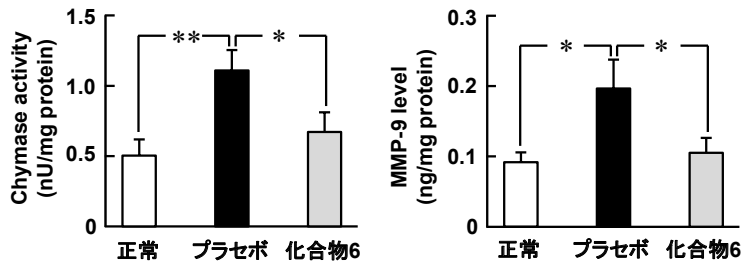


図7 ハムスター腹部大動脈瘤モデルの腹部大動脈組織中のキマーゼ活性とMMP-9レベル  
 エラスターゼ処置後14日の腹部大動脈抽出液中のキマーゼ活性(左グラフ)とMMP-9レベル(右グラフ)を示す。  
 \*P<0.05, \*\*P<0.01。

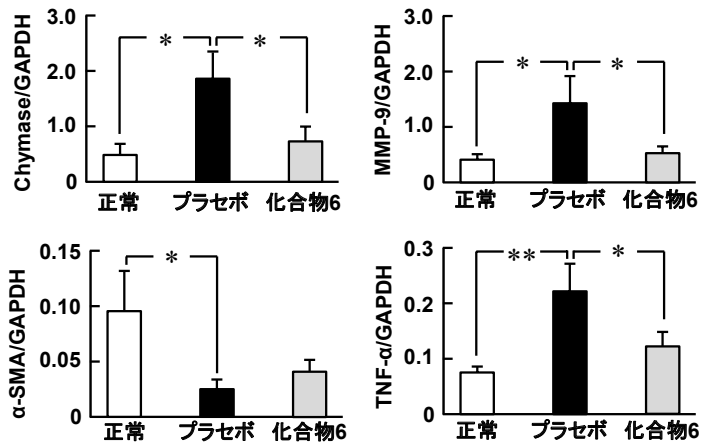


図8 ハムスター腹部大動脈瘤モデルの腹部大動脈組織中の遺伝子発現レベル  
 エラスターゼ処置後14日の腹部大動脈抽出液中のキマーゼ(上段左), MMP-9(上段右), α-SMA(下段左),  
 TNF-α(下段右)の遺伝子発現レベルを示す。\*P<0.05, \*\*P<0.01。



## 考 察

キマーゼはアミノ酸配列や基質特異性の観点で動物種差が存在する。そのことがキマーゼ阻害剤の創薬研究を困難にしている一因であり、各種動物を用いて適応疾患を探索するには、阻害剤はヒトキマーゼ阻害活性とともに、様々な動物種のキマーゼに対して同程度の阻害活性を有することが望ましい。本研究では、ヒトキマーゼX線結晶構造情報を基に作製したマウスキマーゼ(mMCP-4)のホモロジーモデルを活用し、ヒトキマーゼとmMCP-4に共通するアミノ酸残基との相互作用の獲得を目指す合成展開を行うことで、種差が軽減した化合物を効率的に見出すことができた。

ヒトキマーゼ阻害活性スクリーニングより得られたヒット化合物1は、ヒトキマーゼとの複合体X線結晶構造より、アンジオテンシンIなどのペプチド基質が結合し加水分解を受けるヒトキマーゼ触媒活性中心に結合し阻害活性を示していることがわかった。化合物1の活性向上を狙った合成展開を行う上で、触媒活性セリン残基(Ser195)と相互作用しているナフチルカルボン酸は構造維持させることとした。一方、化合物1の3-シアノ-アニリン部分が結合しているヒトキマーゼのSIポケットの空間に隙間が存在するため、この部分の構造変換で活性向上が図れると考えた。実際にこの部位の構造最適化で、阻害活性が1000倍向上した化合物3を創製した。

化合物3はヒトキマーゼとマウスキマーゼの阻害活性に種差があったが、キマーゼのアミノ酸配列が動物種間で保存されている部位との相互作用獲得を狙う構造変換で活性種差の軽減が図れると考えた。化合物5および化合物6は、化合物3に比べて動物種間差が軽減しているが、その理由は以下のように考える。セリンプロテアーゼ活性発現に必須であり、動物種間で保存されている触媒三残基(アスパラギン酸、ヒスチジン、セリン)のヒスチジン残基と、化合物5および化合物6が有する縮環構造(イミダゾピリジン構造)部位が、化合物3が有するフェニル部位に比べて近接したことで、強い結合活性獲得を達成できていると推察される。

本研究では、新規キマーゼ阻害作用を有する化合物6の*in vivo*における薬効評価にマウスおよびハムスターのエラスターゼ誘発腹部大動脈瘤モデルを使用することにした<sup>12)</sup>。なお、マウス腹部大動脈瘤モデルにおいては、エコーによる腹部大動脈最大内腔径の解析以外は、サンプルが少なすぎて解析ができなかったため、詳細な解析はハムスター腹部大動脈瘤モデルで実施した。本エラスターゼ誘発腹部大動脈瘤の発症機序は以下のように考えられている: エラスターゼにより弾性板に存在するエラスチンが分解され、血管平滑筋細胞にマクロファージや

好中球などの炎症細胞が浸潤し、さらに炎症細胞から分泌されるMMP-9などの酵素により細胞間マトリックスが分解されることで平滑筋細胞および線維芽細胞の脱落が起こり、大動脈瘤が拡大する<sup>12)</sup>。これまでに腹部大動脈瘤患者の患部において、キマーゼとMMP-9が隣接した部分で強く発現し、キマーゼ活性とMMP-9活性が著明に増加していることが報告されている<sup>15)</sup>。また、本研究で詳細な解析を実施したハムスター腹部大動脈瘤モデルの報告では、大動脈瘤形成部位キマーゼ活性およびMMP-9活性が正常の大動脈に比べて増加することが示され、既知キマーゼ阻害剤であるNK3201(日本化薬)によりキマーゼ活性のみならずMMP-9活性が抑制され、大動脈瘤の拡大が有意に抑制されたと報告されている<sup>12)</sup>。また、様々な大動脈瘤モデルでMMP阻害剤によりMMP-9の抑制により大動脈瘤の拡大抑制も確認されている<sup>16)</sup>。キマーゼは、MMP-9の前駆物質であるProMMP-9をMMP-9へ活性化するため<sup>4)</sup>、キマーゼ阻害剤による大動脈瘤拡大抑制の機序は、キマーゼ阻害によるMMP-9の作用抑制が深く関与する可能性が高く、同様の現象が見られるかを化合物6で評価した。

本研究の解析においても既報と同様にマウスおよびハムスターの腹部大動脈にエラスターゼを処置する前に比べて1時間処置した後ではプラセボ群および化合物6群は共にエコーによる腹部大動脈内径を有意に拡大したが、両群間に有意差を認めなかった<sup>12)</sup>。このことは、本研究で使用した化合物6にエラスターゼを直接阻害する作用がないことを示唆する。一方、マウスおよびハムスターの腹部大動脈瘤モデルのエラスターゼ処置後14日において、化合物6群はプラセボ群に比してエコーによる腹部大動脈内径を有意に低下させた。また、ハムスター腹部大動脈瘤モデルの組織解析による腹部大動脈内腔直径も化合物6群はプラセボ群に比して有意に低下させた。腹部大動脈中の $\alpha$ -SMAの遺伝子発現量が正常群に比べてプラセボ群で有意に低下した。このことは、血管中膜の平滑筋細胞で $\alpha$ -SMAの発現が多いことより、腹部大動脈瘤の発症および進展に従い、中膜の血管平滑筋細胞が減少したことに起因すると考えられる。一方、有意差はなかったが、化合物6群ではプラセボ群に比べて $\alpha$ -SMAが増加する傾向であった。このことは、化合物6群では、 $\alpha$ -SMAの発現が多い血管中膜(平滑筋)の減少が一部軽減された結果と考えられた。以上の結果より、化合物6はエラスターゼ処置後に拡大する腹部大動脈瘤の拡大予防に有効であることが確認できた。

ハムスター腹部大動脈瘤モデル作製後14日の時点のプラセボ群の腹部大動脈瘤部位のキマーゼ活性は、正常群の腹部大動脈に比して有意に上昇したが、化合物6群で

はその上昇が有意に抑制された。また、腹部大動脈瘤部位のプラセボ群のキマーゼの遺伝子発現も正常群の腹部大動脈に比して有意に増加したが、化合物6ではその増加が抑制されていた。キマーゼはアンジオテンシンIIやMMP-9の産生以外に未分化の肥満細胞を肥満細胞に分化させるstem cell factor (SCF)の前駆物質をSCFへ活性化する酵素機能も有する<sup>17)</sup>。したがって、化合物6はキマーゼ活性を阻害することによりSCFの産生を抑制することでキマーゼの発現細胞である肥満細胞の増殖を抑制し、結果としてキマーゼの遺伝子発現も減少したと考えられる。そのため、化合物6による*in vivo*のキマーゼ阻害作用には、キマーゼに直接的に結合して阻害した作用に加え、肥満細胞の増殖抑制によるキマーゼ遺伝子の発現抑制を介した間接的なキマーゼの低下作用も含まれると考えられる。化合物6は、その分子量(MW: 544.64)および脂溶性パラメーター(clogP: 4.11, logD(計算値): 2.88)より、膜透過性は良好と予想される。また、化合物6は細胞内に豊富に含まれるエステラーゼの基質となるエステル構造のような化学的不安定な部分構造を有していないため、病態組織細胞内での安定性は高いと推察される。以上より、化合物6は細胞系でも十分なキマーゼ阻害活性を有すると予想し、*in vivo*における薬効評価に用いた。本研究結果より、化合物6は十分な細胞膜透過性を有し細胞内でキマーゼ阻害活性を示すことが確認できたと考えられる。

本研究では、MMP-9もプラセボ群で正常群に比して有意に増加したが、化合物6群で有意に抑制された。また、キマーゼ同様、MMP-9の遺伝子発現レベルも抑制された。MMP-9は、単球や好中球などの炎症細胞よりproMMP-9として分泌されるが、プラスミン、トリプシン、キマーゼなどのセリンプロテアーゼにより切断されることが*in vitro*の実験で示されている<sup>18)</sup>。腹部大動脈瘤患者より採取した腹部大動脈瘤部位の組織抽出液では、キマーゼ阻害剤によりproMMP-9からMMP-9への変換が50%以上抑制されることより、腹部大動脈瘤部位のproMMP-9からMMP-9への変換にキマーゼが深く関与することが指摘されている<sup>15)</sup>。また、MMP-9は、細胞間マトリックスの分解により腹部大動脈瘤部位への炎症細胞浸潤を促進することで更にMMP-9活性が増加すると考えられている<sup>19)</sup>。実際、本研究において、炎症細胞で発現するTNF- $\alpha$ の遺伝子発現がプラセボ群でMMP-9の増加と共に増加し、化合物6群でMMP-9が抑制されるとTNF- $\alpha$ の遺伝子発現も有意に抑制された。化合物6によるハムスター腹部大動脈瘤の拡大抑制機序には、キマーゼおよびMMP-9の抑制に加え、種々の炎症細胞集積抑制が関与した可能性がある。

## 結 論

低分子化合物ライブラリのHTSから見出されたヒット化合物を鑄型に合成展開を開始し、ヒトキマーゼX線結晶構造ならびにマウスキマーゼのホモロジーモデリングを活用した分子設計を行った結果、動物種差の少ない強力なヒトキマーゼ阻害活性を有する化合物6を見出した。化合物6は*in vivo*のマウスおよびハムスター腹部大動脈瘤モデルでも有効であったことより、各種動物を用いた幅広い適応疾患探索に有用なツール化合物と考えられる。今後、化合物6を利用することにより、キマーゼ阻害剤の有力な適応症が見出されることが期待される。

## 文 献

- 1) Okunishi H, Miyazaki M, Toda, N. Evidence for a putatively new angiotensin II-generating enzyme in the vascular wall. *J Hypertens* 1984;2(3):277-284.
- 2) Takai S, Shiota N, Yamamoto D, Okunishi H, Miyazaki M. Purification and characterization of angiotensin II-generating chymase from hamster cheek pouch. *Life Sci* 1996;58(7):591-597.
- 3) Takai S, Jin D, Sakaguchi M, et al. A novel chymase inhibitor, 4-[1-([bis-(4-methyl-phenyl)-methyl]-carbamoyl)3-(2-ethoxy-benzyl)-4-oxo-azetidine-2-yl]oxy]-benzoic acid (BCEAB), suppressed cardiac fibrosis in cardiomyopathic hamsters. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;305(1):17-23.
- 4) Tchougounova E, Lundquist A, Fajardo I, Winberg JO, Abrink M, Pejler G. A key role for mast cell chymase in the activation of pro-matrix metalloprotease-9 and pro-matrix metalloprotease-2. *J Biol Chem* 2005;280(10):9291-9296.
- 5) Takai S, Jin D, Miyazaki M. Targets of chymase inhibitors. *Expert Opin Ther Targets* 2011;15(4): 519-527.
- 6) Pejler G. Novel insight into the *in vivo* function of mast cell chymase: lessons from knockouts and inhibitors. *J Innate Immun* 2020;12(5):357-372.
- 7) Yamamoto D, Shiota N, Takai S, Ishida T, Okunishi H, Miyazaki M. Three-dimensional molecular modeling explains why catalytic function for angiotensin-I is different between human and rat chymases. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 242(1):158-163.
- 8) Miyazaki M, Takai S, Jin D, Muramatsu M. Pathological roles of angiotensin II produced by

- mast cell chymase and the effects of chymase inhibition in animal models. *Pharmacol Ther* 2006; 112(3):668-676.
- 9) Doggrell SA. Therapeutic potential of non-peptide chymase inhibitors: *Expert Opin Ther Patents* 2008;18(5):485-499.
  - 10) Anderson AC. Structure-based functional design of drugs: from target to lead compound. *Methods Mol Biol* 2012;823:359-366.
  - 11) Anighoro A. Deep Learning in Structure-Based Drug Design. *Methods Mol Biol* 2022;2390:261-271.
  - 12) Tsunemi K, Takai S, Nishimoto M, et al. A specific chymase inhibitor, 2-(5-formylamino-6-oxo-2-phenyl-1,6-dihydropyrimidine-1-yl)-N-[[3,4-dioxo-1-phenyl-7-(2-pyridyloxy)]-2-heptyl]acetamide (NK3201), suppresses development of abdominal aortic aneurysm in hamsters. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;309(3):879-83.
  - 13) Kuramoto T, Jin D, Komeda, et al. Chymase as a novel therapeutic target in acute pancreatitis. *Int J Mol Sci* 2021;22(22):12313.
  - 14) Terai K, Jin D, Watase K, Imagawa A, Takai S. Mechanism of albuminuria reduction by chymase inhibition in diabetic mice. *Int J Mol Sci* 2020; 21(20):7495.
  - 15) Nishimoto M, Takai S, Fukumoto H, et al. Increased local angiotensin II formation in aneurysmal aorta. *Life Sci* 2002;71(18):2195-2205.
  - 16) Holmes DR, Petrincic D, Wester W, Thompson RW, Reilly JM. Indomethacin prevents elastase-induced abdominal aortic aneurysms in the rat. *J Surg Res* 1996;63(1):305-309.
  - 17) Longley BJ, Tyrrell L, Ma Y, et al. Chymase cleavage of stem cell factor yields a bioactive, soluble product. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94(17): 9017-9021.
  - 18) Furubayashi K, Takai S, Jin D, et al. Chymase activates promatrix metalloproteinase-9 in human abdominal aortic aneurysm. *Clin Chim Acta*. 2008; 388(1-2):214-216.
  - 19) Inoue N, Muramatsu M, Jin D, et al. Effects of chymase inhibitor on angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm development in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis*. 2009;204(2):359-364.

## Development of novel chymase inhibitors through drug design based on Structure Based Drug Design (SBDD) for overcoming animal species differences

Takayuki Inukai

*Department of Innovative Medicine, Graduate School of Medicine,  
Osaka Medical College, Takatsuki, Osaka, Japan*

Chymase exhibits a wide range of peptide cleavage activities and is involved in various functions. On the other hand, there are differences in the amino acid sequence of chymase from animal species. The discovery of inhibitors with comparable chymase inhibitory activity in various animal species, including humans, is desirable to explore diseases to which chymase inhibitors are applicable in various animal models. However, most of the known chymase inhibitors have animal species differences in the inhibitory activity. The aim of this research is to discover a small molecule compound that exhibits chymase inhibitory activity without animal species differences and to use it to evaluate the effects of the novel chymase inhibitor on aortic aneurysms. The hit compound 1 was found through the high throughput screen for human chymase inhibitory activity. The development of chemical synthesis from compound 1 was carried out with the approach utilizing visualization of the three-dimensional protein structure by X-ray crystallography of human chymase and homology model of mouse chymase which has a low homology in amino acid sequence to human chymase. Consequently, we have discovered compound 6 that potently and equivalently inhibits chymase among various animals, including humans. In an elastase-induced hamster aortic aneurysm model, compound 6 suppressed chymase activity in aortic aneurysm tissue and significantly reduced the augmentation of abdominal aortic aneurysms. Compound 6 is the chymase inhibitor with little animal species differences and may be useful tool compound for the exploratory research of disease to which chymase inhibitors are applicable.