

氏 名	犬飼 隆之
(ふりがな)	(いぬかい たかゆき)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第36号
学位審査年月日	令和4年7月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	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  ( Development of novel chymase inhibitors through drug design based on Structure Based Drug Design (SBDD) for overcoming animal species differences)
論文審査委員	(主) 教授 朝日 通雄 教授 矢野 貴人 教授 林 秀行

## 学位論文内容の要旨

### 《目的》

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- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、あるいはマトリックスメタロプロテアーゼ-9 (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可能性が示唆されている。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が異なる。化合物にヒトキマーゼ阻害活性があっても実験動物種のキマーゼ阻害活性が弱ければ、薬効を示すことはできない。幅広い動物種の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、あらたな適応疾患探索に

有用と考えられる。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。

## 《方 法》

低分子化合物ライブラリ（約 4 万化合物）のヒトキマーゼ阻害活性スクリーニングを実施し、得られた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、よりキマーゼを強く阻害する化合物を探索した。この際に、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化合物デザインに活用した。

マウスおよびハムスターの腹部大動脈瘤モデルは、腹部大動脈の周囲にガーゼを巻き、ブタエラスターゼを 20 分毎にガーゼに浸潤させ（計 3 回）、1 時間処置した。プラセボまたは化合物は、エラスターゼ処置の 2 日前より 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の効果を評価した。また、ハムスターにおいては、大動脈のキマーゼ活性と MMP-9 レベル、 $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) の遺伝子発現レベルの測定と組織切片を用いたエラスチカ・ワンギーソン (EVG) 染色を実施した。

## 《結 果》

ヒトキマーゼ阻害活性スクリーニングより化合物 1 (ヒトキマーゼ IC<sub>50</sub>: 13  $\mu$ M) 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 線結晶構造を解析した。これらの情報を基に構造最適化を行った結果、約 1000 倍ヒトキマーゼ阻害活性が向上した化合物 3 (ヒトキマーゼ IC<sub>50</sub>: 0.012  $\mu$ M、マウスキマーゼ IC<sub>50</sub>: 13  $\mu$ M) を見出した。次に、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 の構造変換を行い、動物種差が小さい化合物 6 (ヒトキマーゼ IC<sub>50</sub>: 0.0018  $\mu$ M、マウスキマーゼ IC<sub>50</sub>: 0.089  $\mu$ M、ハムスターキマーゼ IC<sub>50</sub>: 0.038  $\mu$ M) を創製した。

マウスおよびハムスターの腹部大動脈瘤モデルで評価した結果、エコー評価による腹部

大動脈最大内腔径は、エラスターゼ処置後 14 日のプラセボ群でエラスターゼ処置 1 時間後に比べて有意に増加したが、化合物 6 群で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。ハムスターにおける組織切片解析より、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拡大したが、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。プラセボ群の腹部大動脈では正常群に比べてキマーゼおよび MMP-9 が有意に上昇したが、化合物 6 群ではそれらを有意に低下させた。また、血管平滑筋に発現する  $\alpha$ -SMA は、プラセボ群で正常群に比べて有意に減少したが、化合物 6 群では増加傾向を認め、正常群との間に有意差はなかった。

#### 《考 察》

化合物とヒトキマーゼタンパク質との複合体構造を解析することで合理的な分子設計を可能にし、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 より、少ない合成化合物数で約 1000 倍のヒトキマーゼ阻害活性の向上に成功した。さらに、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のホモロジーモデルを活用し、動物種間で保存されているアミノ酸残基との相互作用獲得を指向した構造変換で活性種差を軽減した化合物 6 を創製した。

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において、腹部大動脈にエラスターゼを 1 時間処置した直後では、プラセボ群および化合物 6 群は共に腹部大動脈内径を有意に拡大し、エコー評価で両群間に有意差を認めなかった。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、プラセボ群の大動脈ではキマーゼの有意な増加が見られたが、化合物 6 群はプラセボ群に比べて有意な低下を認めたことより、化合物 6 の経口投与でマウスおよびハムスターの組織中のキマーゼを阻害できることが示された。また、キマーゼにより活性化される MMP-9 がプラセボ群で有意に増加していたが、化合物 6 群により有意に低下した。このことは大動脈瘤組織中に増加する MMP-9 の活性化にキマーゼが深く寄与することを示唆する。

従って、化合物 6 はキマーゼを阻害することを介して MMP-9 を抑制し、腹部大動脈瘤の進展を予防したと考えられる。

#### 《結 論》

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ならびに合成展開で、動物種差の小さ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 はマウスおよびハムスター腹部大動脈瘤モデルで効果を示したことより、各種動物を用いたキマーゼ阻害薬の幅広い適応疾患探索に有用なツール化合物になると考えられる。

(様式 甲 6)

## 論文審査結果の要旨

キマーゼは肥満細胞に発現するプロテアーゼであり、アンジオテンシン II やマトリックスメタロプロテアーゼ-9 などの産生を介して心血管疾患や線維性病変など様々な病態発現に関与している可能性が示唆されている。従って、キマーゼ阻害薬は、これらに対する疾患治療薬となることが期待されている。しかしながら、キマーゼのアミノ酸配列に動物種差があるため、キマーゼ阻害薬の効果にヒトと実験動物で差が生じることが知られており、各種動物モデルでその適応疾患を探索するには、種差なくキマーゼ阻害活性を示すような阻害薬の開発が求められている。

そこで申請者は、ヒトと実験動物としてよく用いられるマウスにおいて同等に効く阻害薬の創製を目的として研究を行った。まず、ヒトキマーゼ阻害活性スクリーニングより得た化合物 1 とヒトキマーゼとの複合体 X 線結晶構造解析を基に構造最適化を行って化合物 3 を見出し、さらにマウスキマーゼの立体構造モデルを用いて、ヒトとマウス由来のキマーゼの両方を低濃度で阻害する化合物 6 を創製した。その化合物 6 を用いて、マウスおよびハムスターの腹部大動脈瘤モデルにおける薬効を評価した結果、キマーゼ阻害活性に起因する大動脈瘤の進展予防効果があることが確認された。

本研究で創製された化合物 6 は、マウスやハムスターのようなげっ歯類動物で適応疾患を探索し、その結果を検証するのに貢献すると思われる。また、創製された化合物 6 は、経口投与で効果が発揮されたことから、今後、臨床においても幅広い適応疾患に対する治療薬となることが期待される。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

大阪医科薬科大学医学会雑誌 第 81 巻 第 1・2 号、2022 年 9 月 30 日掲載予定