

STUDIES ON INTERMOLECULAR INTERACTIONS OF NOVEL SPIROSUCCINIMIDE TYPE ALDOSE
 REDUCTASE INHIBITORS (新規スピロスクシンイミド型アルドース還元酵素阻害剤の分子間相互作用に関
 する研究)

氏名 黒野 益夫

序論

糖尿病は現代の代表的な生活習慣病で、その合併症の治療は対症療法が主体となっている。近年、グルコース代謝の副経路であるポリオール経路の亢進が合併症の成因の一つとして注目されている。細胞内に取り込まれたグルコースの多くはリン酸化を受け解糖系に入るが、高血糖下では一部ポリオール経路を通り、アルドース還元酵素 (AR) と NADPH によりソルビトールへ変換され、さらにソルビトール脱水素酵素と NAD⁺ によってフルクトースへと変換される (Fig.1)。その結果、ソルビトールの細胞内蓄積に伴う浸透圧の上昇、NADPH 消費に伴う NO 合成酵素やグルタチオン還元酵素の活性低下と NADH 増加に起因するプロテインキナーゼ C 活性上昇による酸化ストレスの亢進、さらにフルクトースによる糖化蛋白産生を生じ、神経障害などの合併症が起これとされている。そこで、ポリオール経路の律速酵素である AR の活性を制御することが新たな治療薬に繋がると期待され AR 阻害剤 (ARI) の開発研究が行われてきた。しかし、これまで開発されたカルボン酸型をはじめとする ARI の多くは臨床において効力不足あるいは副作用によりその開発が中止されている。

SX-3030 は、大日本住友製薬において、新規 ARI の創製過程で見いだされたスピロスクシンイミド構造をもつ化合物であり、1 組の光学異性体 (*R* 体および *S* 体) が存在する (Fig.2)。これまでスピロスクシンイミド型 ARI に関しては、立体特異性が認められる場合と認められない場合があり、当該スピロスクシンイミド型 ARI でも、光学異性体間の相互変換や加水分解による薬効低下の懸念が持たれ

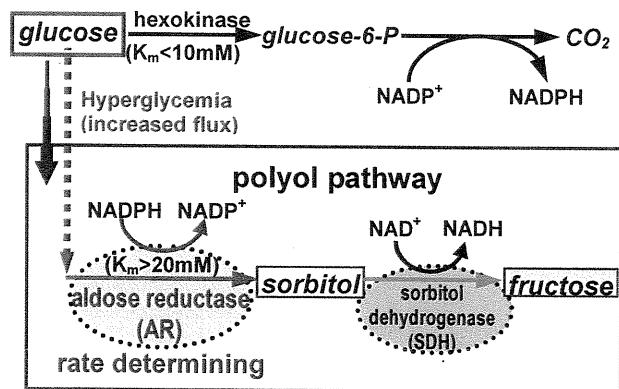


Fig.1: ポリオール経路と律速酵素アルドース還元酵素 (AR).

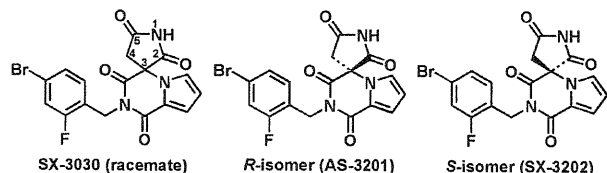


Fig.2: SX-3030 およびその光学異性体.

た。医薬品候補化合物の安定性、さらにその光学異性体間の効力の差異や相互変換の有無を明らかにする事は、薬効評価だけでなく、有効性と安全性を高める上で重要な課題である。本研究では、*in vitro* profiling における構造・物性研究の一環として、SX-3030 およびその光学異性体が関与する分子間相互作用を構造化学的に明らかにする目的で、以下の3つの観点

1. 水溶液中での安定性と加水分解機構
2. 血漿タンパクとの相互作用と安定化
3. 標的酵素 AR に対する阻害様式と立体特異性・選択性

について、速度論的・分光学的手法および分子モデリングなどを相補的に活用し、分子レベルまでの解明を進めた。

1. 安定性の速度論的解析と加水分解機構

水溶液中で当該 ARI は擬一次反応に従って加水分解され、*R* 体と *S* 体のいずれからもスクシンイミドが開環した分解物 (Compound 1, ラセミ体) が生成し、*R* 体と *S* 体間の相互変換は起こらないことが明らかとなった。一方、得られた擬一次反応速度定数 (k_{obs}) は大きな pH 依存性を示し (Fig.3), この pH- k_{obs} プロファイル (25°C) からは、(i) 酸性側 (pH ≤ 2.4) では最安定 (半減期 270 h) であり、pH に依存しない水分子との反応、(ii) pH 7 以上では傾き +1 に近づき OH⁻ イオンとの反応、そして (iii) pH 2-7 領域 (半減期 12 h 以上) では、親化合物の pK 値より 2pH unit 低い pK 値 3.7 の酸性官能基を有する中間体の存在、が示唆された。

これらの結果から、分解機構は水分子または OH⁻ イオンがスクシンイミド環に求核的に付加して開環し、スクシンアミド酸を生成した後、さらに脱炭酸してケト-エノール互変異性化を経るラセミ化と推察された (Fig.4)。スクシンイミド環が開環するとその後の脱炭酸が優先して起こり、再開環

による *R* 体 *S* 体間の相互変換は起こりにくいことが、この機構上からも強く示唆された。

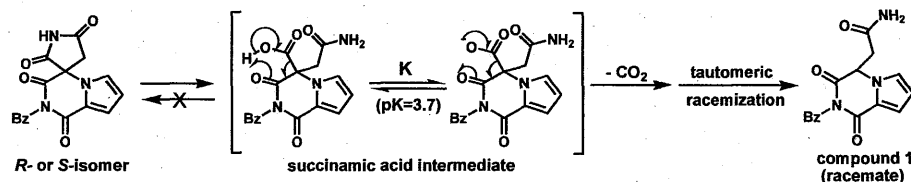


Fig.4: SX-3030 及びその光学異性体の加水分解経路。Bz=CH₂C₆H₃Br(p)F(o)。

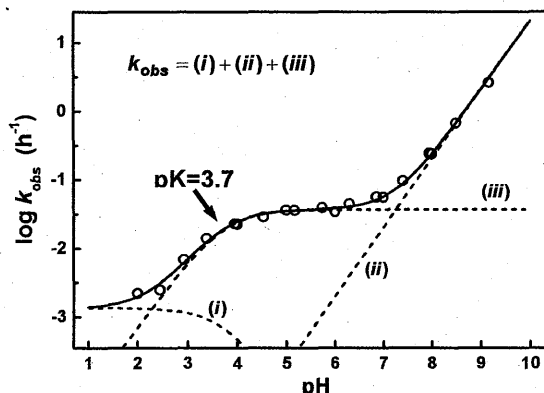


Fig.3: 擬一次反応速度定数 k_{obs} の pH 依存性 (25°C)。

2. 血漿タンパクとの相互作用と安定化

蛍光消光法により、当該ARIと血漿タンパクとの相互作用を調べたところ、事実上HSAとの結合であった。*R* 体および *S* 体の HSA 結合特性を遊離型濃度と結合型濃度の Langmuir 解析から検討したところ、非特異的結合において *S* 体の親和性が約 1.5 倍高かったが、臨床上重要な特異的結合の親和性は

R体が4.6倍高かった (Table 1). 両者はHSA上の主要な薬物結合部位であるサイトIとサイトIIの両方に結合し、加水分解速度が遊離時に比べてR体で1/40, S体で1/20に抑えられた. 次にスクシンイミド環の5位カルボニル炭素の¹³C標識体を用いた¹³C-NMR法から, S体およびサイトIIに結合したR体が脱プロトン化に近い状態で結合しているのに対して, サイトIIに結合したR体のみ一部プロトン化した状態で結合していることが示唆され, サイトIIにおける結合様式の違いが立体特異性の一因と考えられた.

Table 1: HSA 結合のパラメーター (pH 7.4, 25°C)

	n_1	K_{d1} (μM)	$(K_d/n)^*$ (μM)
R-isomer	2.22 ± 0.08	1.61 ± 0.10	36.3 ± 2.7
S-isomer	1.95 ± 0.19	7.32 ± 1.00	24.5 ± 1.8

n_1 , 特異的結合部位数; K_{d1} , 特異的結合の解離定数; $(K_d/n)^*$, 非特異的結合の解離定数.

一方, 高血糖時に生じる遊離脂肪酸や糖化の増大に対して, 当該ARIはHSA上の複数部位に結合するため結合率はほとんど変化しなかった. また当該ARIは, その推定臨床濃度がHSAの体内濃度 (0.6 mM) に比べて十分低いため他剤のHSA結合に及ぼす影響は小さいことが推測された. このように血漿中でのHSAとの結合が, 当該ARIの安定化と持続的な薬理効果に寄与することが明らかとなり, 特にR体の場合でより顕著であることが推察された.

3. AR阻害の立体特異性と選択性

標的酵素AR存在下でのR体およびS体の加水分解を調べたところ, HSA存在時に比べてより低いAR濃度から安定化され, AR結合時には最大120-130倍安定化された.

次に, AR阻害について検討した. ARは二基質反応のordered Bi-Bi機構に従うが, グルコース還元反応 (正反応) では補酵素NADPHを, ソルビトール酸化反応 (逆反応) ではNADP⁺をそれぞれ過剰にしてARを飽和させ, グルコースまたはソルビトールの一基質反応として解析した (Fig.5).

正逆いずれの反応でもR体およびS体の阻害は基質濃度の影響を受けARへの結合は可逆的であったが, 正反応ではグルコース濃度が高くなると阻害が強くなる

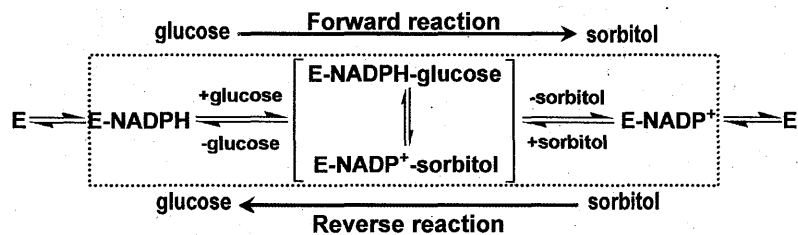


Fig.5: ARの反応機構. 二基質反応 (ordered Bi-Bi機構) であるが, 補酵素 (NADPH or NADP⁺) 側を飽和濃度にするので一基質反応として解析.

不拮抗型の阻害を示し, 逆反応ではソルビトール濃度が高くなると阻害が弱くなる拮抗型の阻害を示した. このことから, 両者はいずれも酵素反応サイクル中では主にAR-NADP⁺複合体に作用すると考えられた. 一方, R体の阻害剤定数は $3 \sim 4 \times 10^{-10} \text{M}$ でありS体より約2000倍強かった. 阻害剤定数のvan't Hoff解析により結合の熱力学的パラメーターを算出したところ, S体の結合はエンタルピー・エントロピー駆動であるのに対し, R体の結合はエンタルピー駆動であり水素結合の寄与がより大きいことが示唆された. 一方で, N-プロモスクシンイミドを用いた化学修飾によるARの活性低下に対して, 活性部位に結合するカルボン酸型ARIと同じく保護効果を有したことや, 阻害剤定数のpH依存性において活性残基のpK値に対応するpK値7.7-7.8を反映したことから, R体とS体はいずれも活性 (基質結合) 部位に結

合することが明らかとなった。

これらの実験結果を考慮してR体およびS体とAR活性(基質結合)部位との分子モデリングを行った。 鑄型に用いたAR-NADPH-カルボン酸型ARIであるzopolrestatの三者複合体(PDBコード: 1MAR)のAR側はC_α原子のみの座標データであるため、この複合体の構造を再構築後、ドッキングスタディを実施した。 R体のAR結合(Fig.6a)ではスクシンイミド環がAR側活性残基(Tyr48, His110およびTrp111)と相補的な水素結合の形成が可能であった。 一方、ベンジル基部分でもR体では疎水性残基(Leu300)や芳香環側鎖(Trp111およびPhe122)と強く相互作用しており、実際¹⁹F-NMR測定よりR体の2位フッ素原子シグナルが芳香環により高磁場シフトするのが観測され、モデルを傍証できた。 さらに興味深いことにはこのR体の2位フッ素原子とARに特異的に保存されているLeu300の主鎖NHとの水素結合が示唆された。 ARIの多くは近縁酵素であるアルデヒド還元酵素(ALR)を阻害し、それが副作用発現の一因とされるが、ALRにはARのLeu300の位置に主鎖NHプロトンのないProが存在する。 そこでALRに対する阻害を調べたところ、S体ではARとALR間で阻害選択性がなかったが、R体ではARに対してALRの約800倍の選択性を示し、上記水素結合の有無がAR阻害選択性に影響することを明らかにした。

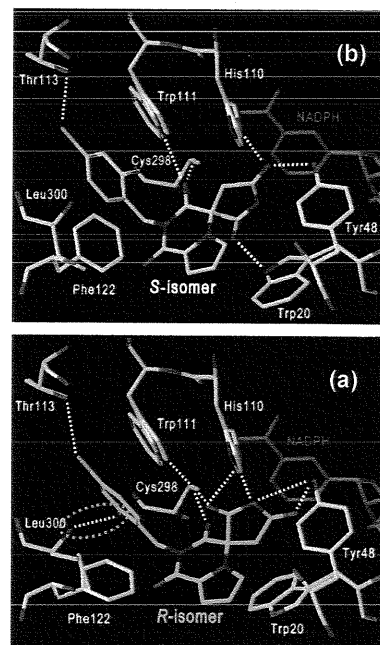


Fig.6: AR 活性部位への (a) R 体 (green) 及び (b) S 体 (gray) のドッキングと形成される水素結合。

総括

1. 当該 ARI の加水分解の速度論的解析から安定化と安定性予測に繋がる分解機構を考察し、経口剤として開発可能な安定性を持ち、R 体 S 体間の相互変換が起こらないことを示した。
2. 当該 ARI の血漿タンパク結合は HSA 上のサイト I およびサイト II への結合であり、HSA と R 体との相互作用が、より高い親和性と加水分解に対する安定化をもたらした。 また、サイト II での結合様式の違いが立体特異性の一因であることを見いだした。
3. 当該 ARI は、AR 結合時には 100 倍以上安定化され、また、酵素反応中では AR-NADP⁺複合体に作用するが、R 体の阻害剤定数は 10⁻¹⁰M で S 体より 2000 倍も親和性が高かった。 R 体は AR 活性部位残基と相補的に水素結合すると考えられ、その中の AR に特異的な残基との水素結合の形成がさらに AR と近縁酵素 ALR との阻害選択性の向上に寄与することを明らかにした。

本研究の知見は薬効および処方設計面での構造化学的基盤情報となり、強力かつ高選択的な R 体を開発化合物として選定することに寄与し、同時に AR 阻害機構および AR や HSA による分子認識の理解促進にも繋がった。 また、用いた手法およびその組合せは、他の標的タンパク-候補化合物間の相互作用研究に適用可能と考えられる。