

論文の内容の要旨

論文題目 新規脳神経選択的電位依存性カルシウムチャネル
阻害剤の分子設計・構造活性相関と合成研究

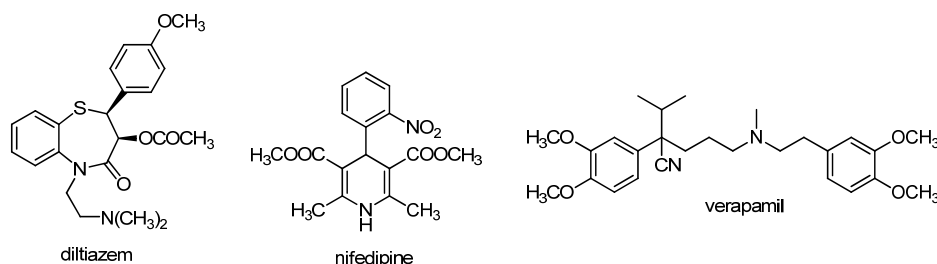
氏名 鈴木 裕一

脳梗塞（虚血による神経細胞死）のメカニズムとして最も重要視されている仮説の1つに「グルタミン酸-カルシウム仮説」がある。脳血流量が低下すると嫌気性解糖が行われ脳組織の ATP が枯渇し、その結果、細胞内外のイオン濃度勾配が維持できなくなり、脱分極が発生する。プレシナプスでは、脱分極により電位依存性カルシウムチャネル（VDCC）が活性化しグルタミン酸の過剰放出が誘発される。ポストシナプスにおいては、脱分極により VDCC が活性化し細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させると共に、過剰に放出されたグルタミン酸がグルタミン酸受容体を刺激して細胞内 Ca^{2+} 濃度を上昇させる。これらの結果、カルパイン、ホスホリパーゼなど Ca^{2+} 濃度に依存する種々の酵素が過度に活性化され、神経細胞死を誘導される。上記仮説では、細胞内 Ca^{2+} の濃度上昇が神経細胞死への一連のカスケードの引き金となる。VDCC は細胞膜上に存在し、膜の脱分極により活性化され、細胞外から細胞内に Ca^{2+} を流入させる。VDCC は更に、L, N, P/Q, R, T 型というサブタイプに分類される。脳神経特異的な P/Q 及び N 型 VDCC のペプチド阻害剤の研究から、筆者らは、これら阻害剤の神経細胞保護効果の知見を得ていたことから、低分子 VDCC 阻害剤が神経細胞死に至る一連のカスケードを遮断する新規脳梗塞治療薬としての可能性があると考え、本研究に着手した。

当時、脳神経特異的な P/Q 型、N 型の電位依存性カルシウムチャネル（VDCC）阻害剤としてペプチド化合物が報告されていたが、これらは薬剤として、代謝安定性、注射剤としての水溶性、脳内移行性等に大きな課題を有していた。一方、十数年に渡りサブタイプ選択的カルシウムチャネル阻害剤の研究も精力的に取り組まれていたが、水溶性や脳内移行性を有する低分子阻害剤の成功例は報告されていなかった。このように低分子阻害剤の創出は非常に困難であると考えられたが、筆者らは以下に述べる戦略により低分子阻害剤の創出に向けて検討を行った。

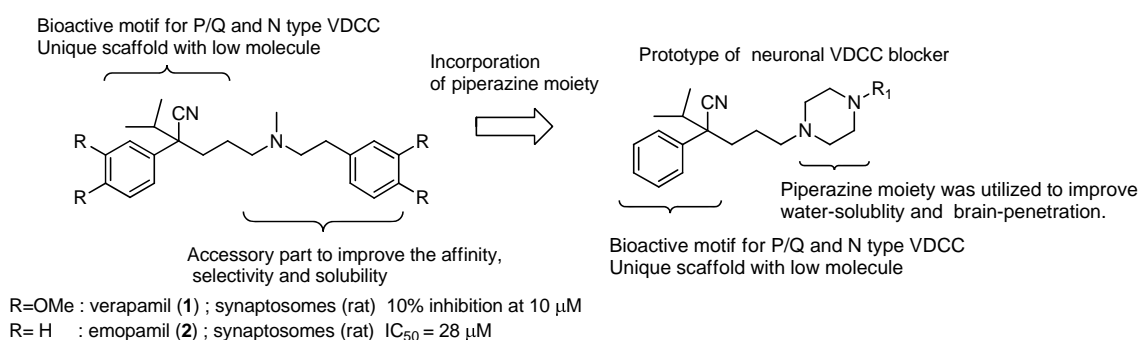
研究の開始当初、脳神経のカルシウムチャンネルを選択的に阻害する低分子化合物は報告されていなかったが L 型阻害剤であるニフェジピンの誘導体アムロジピンが N 型阻害作用も有することが報告されており、ニフェジピン (L 型) からアムロジピン (N 型) への変換のように側鎖変換により L 型から P/Q 型、N 型などの脳神経の VDCC へ阻害作用をシフトすることが可能であると仮定して、リード化合物獲得の創薬手法として、既存の L 型阻害剤の化学構造修飾から P/Q 型、N 型などの脳神経選択的な VDCC 阻害作用を獲得するアプローチを検討することとした。

図1. 異なるスキヤフォールドを有する代表的なL型カルシウムチャンネル阻害剤



L 型阻害剤にはジヒドロピリジン、ジルチアゼム、ベラパミルの異なる scaffold が存在するが、この中でベラパミルの特徴的構造であるフェニル、イソプロピル、シアノ部位の分子量は 200 以下であり、筆者が目指す下記①～③ (①脳梗塞治療薬として、静注剤となりうる水溶性を確保していること、②中枢薬として適切な分子量であること (構造修飾後も分子量 500 以下となるような低分子量の scaffold であること)、③フォーカスライブラリー化が可能である scaffold であること) を満足する合成展開が可能な scaffold と判断した。そして、以下の分子設計・作業仮説(1)-(2)((1)ベラパミルの構造的特徴である 2-Phenyl-3-methylbutyronitrile moiety が脳神経の VDCC の bioactive motif の役割を担える。(2) 前記の目指す化合物像①、②を満たすため、経験的に水溶性や脳内移行性向上に寄与すると推定されるピペラジンを予め導入したものを基本骨格とし、その側鎖 R₁ の変換により活性を向上させ、更に各パーツにおいて最適化を図る) に基づき、L 型阻害剤ベラパミルの側鎖変換の合成展開を行い、脳神経選択的な VDCC 阻害剤創出の可能性を検討することとした。

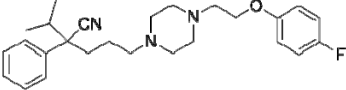
図2. 脳神経選択的なN型、P/Q型Ca²⁺チャンネル阻害剤を志向したフォーカスライブラリーデザイン



構築した FL から以下の構造活性相関を得た。R₁ では、ある程度の鎖長を有するスペーサーを介したフェニル基の存在が活性向上に重要である。一方、中央部の塩基性アミンであるピペラジンの位置は厳密な規定は受けない。各パーツにおいて、*in vitro* の活性向上には、適度な脂溶性が不可欠であり、極性基の導入はほぼ許容されない。このことは、静注剤の溶解性確保には不都合な SAR であったが、基本骨格にピペラジンを予め導入していたことが溶解性確保に奏功した。そして、FL 構築を通じて、化合物 **4c** が *in vitro* 活性、適度な水溶性を有し、更に脳内移行性の 1 つの指標と

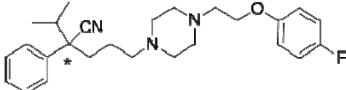
していた音誘発痙攣モデルにおいて、抗痙攣作用を 10 mg/kg (i.v.)で示す最初の化合物として見出された。*in vitro* 活性、抗痙攣作用及び適度な水溶性を有するラセミ体化合物 **4c** を代表化合物として光学分割し、光学活性な **E2050 (34a)** として更に詳細に評価した。ラット脳シナプトゾームの細胞内カルシウム濃度の上昇、及びラット大脳皮質スライスからのグルタミン酸遊離を **E2050** は濃度依存的に抑制し、その IC₅₀ はそれぞれ 3.0 μM と 3.7 μM であった。

表1. 化合物**4c**の*in vitro*活性と抗痙攣作用



Compound	synaptosomes IC ₅₀ (μM)	anticonvulsant effect (%) on audiogenic seizures in DBA/2 mice iv (n = 5 mice/dose tested)
4c	5.9	100% at 10 mg/kg

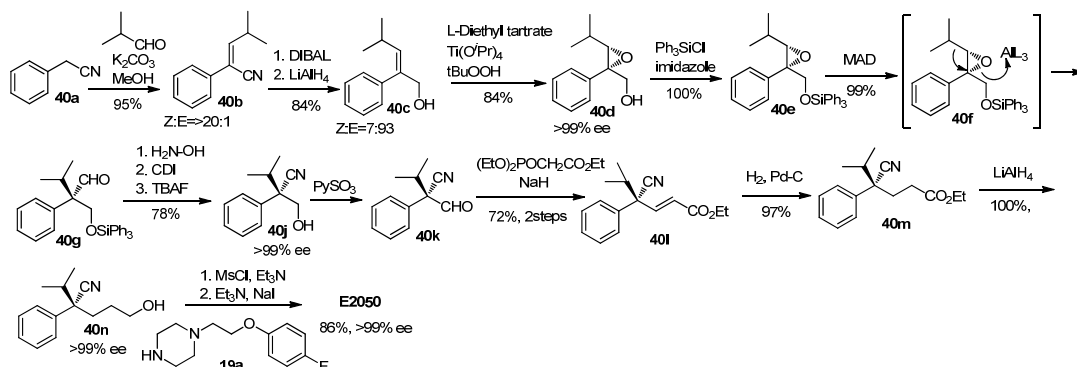
表2. **E2050 (34a)**とそのエナンチオマー(**34b**)の*in vitro*活性評価



Biological assays (in vitro or in vivo)	Cmpd (chirality)	
	E2050 (34a) (S)	<i>ent</i> - E2050 (34b) (R)
Synaptosomes IC ₅₀ (μM)	3.0	9.4
Glutamate release IC ₅₀ (μM)	3.7	—

脳内移行性を確認する 1st *in vivo* モデルとして用いた音誘発痙攣モデルにおいて、**E2050** は 10 mg/kg, i.v.にて 100%抑制した。脳梗塞モデルの一つである中大脳動脈閉塞モデルにおいて、**E2050** は6時間持続投与により用量依存的に脳虚血性神経細胞死により生じる梗塞巣を有意に抑制し脳梗塞治療薬としての可能性を示した。**E2050** は L 型 VDCC 阻害剤ベラパミルを一種のプロトタイプ化合物としていたため、L 型 VDCC 阻害作用に由来する心血管系への副作用が懸念されたが、麻酔犬を用いた心行動態試験において **E2050** は殆んど心臓への影響を示さず、脳神経の VDCC 阻害作用と L 型 VDCC 阻害作用間の乖離を *in vivo* において確認した。このように筆者が当初目論んだように L 型阻害作用を減弱しつつ、脳神経の VDCC 阻害作用を向上させることにより L 型 VDCC 阻害作用と脳神経の VDCC 阻害作用の間に十分な乖離を有する化合物へ変換できたことが *in vivo* 試験において確認された。

以上のように脳梗塞治療薬候補化合物 **E2050** を見出すことに成功したが、薬剤としての可能性を追求するには更に様々な試験を行うために数十から数百グラムスケールで化合物を供給するためのルート構築が必要であった。そこで、筆者らは、スケールアップ合成に耐えうる **E2050** の新規な不斉四級炭素構築の検討を行った。



Scheme 1. Chiral synthesis of **E2050**

まず、不斉合成の検討では、鍵反応として、アリルアルコールの Sharpless 不斉エポキシ化とエポキシシリルエーテルの不斉転移反応を用いた。フェニルアセトニトリル **40a** から合成した不飽和

ニトリル **40b** は還元してアリルアルコール **40c** へと導いた。アリルアルコール **40c** の Sharpless 不斉エポキシ化は高収率で光学活性なアルコール **40d** を与えた。**40d** の水酸基をトリフェニルシリル基で保護し化合物 **40e** とした。更に MAD (methylaluminum bis(2,6-di-*t*-butyl-4-methylphenoxide)) を用いて不斉転移を行い、光学活性なアルデヒド **40g** を得た。アルデヒド **40g** をニトリルに変換した後、後処理を行わずに脱シリル化を行うことで、ラセミ化の制御に成功し、>99% ee のアルコール **40j** を得た。アルコール **40j** は酸化してアルデヒド **40k** とした後、Horner-Emmons 反応、更に 2 重結合とエチルエステルを順に還元しアルコール **40n** に変換した。アルコール **40n** からメタンスルホニル化、更にピペラジン誘導体 **19a** とのカップリング反応を行い高収率、高光学純度で **E2050** を得た。この不斉合成における精製工程は、蒸留・結晶化・ショートカラムのみにより行われており、大量合成という観点からも非常に効率的な合成法となった。

次に酵素による速度論的分割を用いた **E2050** の合成検討を行った。ラセミ体アセテート **41 h** の固定化リパーゼを用いた加水分解において、目的のアルコール **43a** の光学純度を 85% ee まで向上させることに成功し、更に緩衝液から有機溶媒に変更することでアルコール **43a** の光学純度が向上し、反応速度も速くなることを見出した。加えて、トランスエステル化の検討においても固定化リパーゼは優れた選択性と反応性を示すことを見出し、35 g の基質を用いた場合においても、高い光学純度と収率を得ることに成功した (光学純度 94.7% ee、回収率 32%)。この際の反応条件は、反応基質 **41g** (1 g) に対して、酵素(2 mg)、ビニルアセテート(1 mL)であり、通常の実験室レベルで反応基質を更に数百グラムまでスケールアップできる可能性を示した。

表3. 有機溶媒中での酵素加水分解

Entry	R	Solvent	Reaction Time (h)	Yield of (S)-43a		Yield of (R)-43b	
				c.y.%	% ee ^a	c.y.%	% ee ^a
1	Me	t-BuOMe	24	22	95	66	35
2	Et	t-BuOMe	144	20	94	74	---

a) Enantiomeric excess (% ee) was determined by HPLC (CHIRALCEL OJ, hexane/PA:EtOH= 85:15:5)

表4. スケールアップ条件下でのトランスエステル化反応

Entry	Substrate	Reaction Time (h)	Yield of (S)-44a		Yield of (R)-43b	
			c.y.%	% ee	c.y.%	% ee
1	18 g	3.7	38	97	67	23
2	35 g	7.2	32	94.7	68	38

固定化リパーゼを用いたトランスエステル化では反応時間が短縮し、また、カラムクロマトグラフィーを用いた精製においても、未反応のアルコールとアセチル化体 **44a** は短いカラムを用いることで極めて容易に精製することが可能となり、新たな大量合成ルート構築にも成功した。

以上、本研究から以下の成果を得た。まず、既知の L 型電位依存性カルシウムチャネル阻害剤ベラパミルの特徴的構造である 2-Phenyl-3-methylbutyronitrile moiety を scaffold としたフォーカスライブラリー構築を基軸とした創薬手法を用いて、*in vivo* において L 型カルシウムチャネル阻害作用と十分な乖離幅を有する新規脳神経選択的低分子電位依存性カルシウムチャネル阻害剤 **E2050** の創出に成功した。また、脳梗塞モデルの一つである中大脳動脈閉塞モデルにおいて、**E2050** は 6 時間持続投与により用量依存的に脳虚血性神経細胞死により生じる梗塞巣を有意に抑制し、脳神経選択的低分子電位依存性カルシウムチャネル阻害剤の脳梗塞治療薬としての可能性を示した。次に Sharpless 不斉エポキシ化とエポキシシリルエーテルの不斉転移を基軸とした不斉合成ルートを構築し、**E2050** のスケールアップ合成法を確立した。更に固定化リパーゼを用いた実用的な光学分割条件を見出すことで **E2050** のスケールアップ合成法を別途確立した。本研究を通じて見出された新規四級炭素構築法は、本合成研究以外への適用も可能な汎用性の高い経路となることが期待される。