

## 論文の内容の要旨

論文題目 選択的 P2Y アゴニスト及びアンタゴニストの探索研究

氏名 丸 岡 博

### 1. 緒言

P2Y はプリン受容体ファミリーの GPCR で体内に広く分布しており、多くの領域への医薬応用が期待されている。P2Y には 8 種のサブタイプが知られており、内因性リガンドは ATP、ADP、UTP、UDP、UDP-グルコースといったヌクレオチドである。受容体によるこれらの内因性リガンドの認識には重複性があることや、化学的あるいは代謝的に分解されて他のサブタイプに作用する可能性があることから、各サブタイプの生理的機能の解明には安定でかつ選択的なリガンドが必要とされている。また病態に関連した P2Y 受容体の役割を明らかにするために P2Y 発現細胞の分布を評価するためのツールも求められている。

今回、P2Y<sub>6</sub> および P2Y<sub>2</sub>/P2Y<sub>4</sub> アゴニストについて構造活性相関情報を得ながら、これまでに報告されたアゴニストの活性、選択性、安定性の課題解決に向けて合成展開を行った。

一方、受容体の生理的機能解明のために、近年 dendrimer を用いた研究が報告されるようになってきた。Dendrimer とは中心から規則的に分岐した構造を持つ樹状高分子であるが、その末端に受容体のリガンドと共に標識化を行うことにより、細胞あるいは組織への分布を検出できる。今回、標識化等を見据えた第一歩として、選択的 P2Y<sub>1</sub> アンタゴニストの dendrimer 結合体の探索研究を行った。

### 2. P2Y<sub>6</sub> アゴニストの探索研究

これまでに P2Y<sub>6</sub> 選択的アゴニストとして 5-I-UDP や 3-Phenacyl-UDP が報告されていたが、これらのリン酸基末端がフリーである誘導体は安定性が低い。リン酸基末端が修飾されている誘

導体は一般に安定性が高いと言われており、これまでに臨床試験が行われている P2Y アゴニストがいずれもジヌクレオチドであることから、十分な安定性を示すためにはリン酸基末端の修飾が必要であると思われた。そこで、活性、選択性、安定性の高い誘導体を取得することを目的として合成展開を実施した。

M<sup>4</sup>-methoxy-CDP が高い活性を示すことは既に報告されていたので、4 位に大きさの異なる数種の置換基の導入を検討した。モデリング構造からはメトキシ基の先に疎水的空間が広がっていることが推測された。P2Y<sub>6</sub> アゴニスト活性評価の結果、エチル基や t-ブチル基では徐々に活性が低下するものの、ベンジル基まで大きくすると逆に活性が向上することがわかった。

内因性リガンド UDP の三リン酸ジヌクレオチドへの等価変換は、安定性を向上すると言われてきた。このようなジヌクレオチドの一方のヌクレオチドを他の置換基に変換した誘導体でも十分に安定性向上に寄与するのではないかと考えから、これまでに種々の変換が他のサブタイプについては報告されてきた。しかし P2Y<sub>6</sub> アゴニストではそういった変換は行われておらず、また他のサブタイプの場合でも安定性は評価されていなかった。

そこで各種誘導体の合成を行い、活性、安定性の評価を行った。その結果、ジヌクレオチドや置換フェニル誘導体では、日本薬局方第一液及び Astrocytoma 細胞膜画分中での安定性が向上することが明らかとなった。一方、1-グルコシル誘導体では逆に安定性が低下した。

溶液中安定性の高いジヌクレオチドの 4 位を変換した MRS2957 が 12 nM と高い活性を示し、P2Y<sub>2</sub> 及び P2Y<sub>4</sub> に対してそれぞれ 10 倍以上の選択性を示すことがわかった。MRS2957 は、これまでで最も高い活性を有する選択的 P2Y<sub>6</sub> アゴニストである。

### 3. P2Y<sub>2</sub> および P2Y<sub>4</sub> アゴニストの探索研究

これまでに報告例のある複数の P2Y<sub>2</sub> 選択的アゴニストの中で活性の高い誘導体は、リン酸基末端がフリーであることから安定性に課題があり、末端が修飾されている誘導体は活性が十分ではないことから、双方を兼ね備えた誘導体が求められていた。また P2Y<sub>4</sub> アゴニスト活性を示す誘導体としては 2'-アジド UDP が知られているが、P2Y<sub>2</sub> アゴニスト活性との比は 5 倍程度で、P2Y<sub>4</sub> アゴニスト活性も 1.1 μM と弱い。従ってこれまでに報告されている選択的 P2Y<sub>4</sub> アゴニストは実質的にないという状況であった。P2Y<sub>2</sub> と P2Y<sub>4</sub> は共通の内因性リガンド UTP に対して作用することから、選択性の向上には困難が予想された。

近年、分子設計に受容体の結晶構造を用いることが盛んに行われているが、GPCR は一般的に結晶化が難しく、これまでに数種の結晶構造しか解かれていない。P2Y ファミリーの結晶構造は報告例がないため、分子設計にはロドプシンの結晶構造をテンプレートにしたホモロジーモデリングの構造を用いた。モデリング構造から 4 位に疎水的な置換基を導入することによる活性の向上が期待された。実際、4 位にアルコキシイミノ基を導入した誘導体を合成し評価を行った結果、内因性リガンド UTP よりも活性の高い P2Y<sub>2</sub> アゴニストを得ることに成功した。その後、この誘導体が P2Y<sub>4</sub> アゴニストとしての活性も向上していることを見出した。さらに合成展開を進め、構造活性相関情報を得ると同時に、高い活性と選択性を示す P2Y<sub>4</sub> アゴニストを得ることに成功した。これは実質的に世界初の選択的 P2Y<sub>4</sub> アゴニストであると言える。

ヌクレオチド四リン酸のリン酸基末端に糖やベンゼン環を導入することで選択性が向上すると

いう知見は既に知られていた。これを基に筆者は各種の糖あるいはフェニル誘導体を合成したが、P2Y<sub>2</sub>アゴニストとしては3-クロロフェニル誘導体で3倍程度活性が向上する程度であった。しかしながら、糖置換体ではグルコースの3'位をフッ素に置換した誘導体が高いP2Y<sub>4</sub>活性と選択性を示した。同じく3'位水酸基を反転した誘導体でも活性が向上したことから、元の3'位水酸基はP2Y<sub>4</sub>との結合に対して立体的あるいは静電的に不利な位置にあったものと推察された。また2'位水酸基を同様にフッ素に置換したり反転したりすると活性が大幅に低下することから、この2'位水酸基はいずれのサブタイプに対しても水素結合ドナーとして重要な役割を担うものと考えられた。

一方、これら誘導体のP2Y<sub>4</sub>/P2Y<sub>2</sub>選択性はロドプシンをテンプレートにしたモデリング構造からは説明できなかった。P2Y<sub>2</sub>とP2Y<sub>4</sub>とでリガンドの4位置換基が結合するポケットを構成するアミノ酸残基に違いが見られなかったからである。これまでに結晶構造が報告されたGPCRの中で最もP2Yとの相同性が高く、構造上の共通性も見られるCXCR4の結晶構造を用いてモデリング構造を再構築した。得られたCXCR4ベースの構造は、ロドプシンベースのものとは大きな違いが見られた。活性発現に必須のPhe<sup>3.32</sup>のベンゼン環が、ロドプシンベースの構造では細胞膜に対して垂直で、リガンドのピリミジン環と $\pi$ - $\pi$ スタッキングしていたが、CXCR4ベースの構造では細胞膜に平行となってポケットの底を塞ぐように位置するため、リガンドの位置が大きく細胞外の方へずれた構造が得られた。このときP2Y<sub>2</sub>とP2Y<sub>4</sub>の選択性を担う4位置換基末端のベンゼン環は、P2Y<sub>4</sub>のEL2のThr182を含むアミノ酸残基によって形成された疎水ポケットに結合した。この2つのアミノ酸残基はP2Y<sub>2</sub>ではArg180に相当し、この嵩高いArgがポケットを塞ぐことから、P2Y<sub>4</sub>/P2Y<sub>2</sub>選択性を説明できるようになった。この周辺にはこの選択性を説明できるポケットは他にないことから、4位末端のベンゼン環の結合位置は正しいものと思われる。

#### 4. 選択的P2Y<sub>1</sub>アンタゴニストの dendroliamer 結合体の創製

近年P2Y<sub>1</sub>は抗血小板薬の標的として興味を集めており、P2Y<sub>1</sub>アンタゴニストがこれまでにいくつ報告されている。これまでに、高い活性、選択性を示すMRS2500等、複数のP2Y<sub>1</sub>アンタゴニストが報告されている。今回、P2Y<sub>1</sub>アンタゴニストをPAMAM dendroliamer に結合する検討を行った。

これまでに得られていた構造活性相関情報から、プリン環2位からのリンカー伸長が活性低下を最低限に抑制できると考え、2位へのアルキル鎖の導入を検討した。末端にアジド基を有する dendroliamer に対して、リンカー末端にアルキンを有するアンタゴニストを結合することを想定し、モデル化合物を合成した。その結果、リンカーの長さによって活性は変化し、比較的短いアルキル鎖の場合に高い活性を維持できることがわかった。

末端にアジド基を有するPAMAM dendroliamer にクリック反応を用いてP2Y<sub>1</sub>アンタゴニストを結合し、7つのアンタゴニストを末端に結合した dendroliamer-MRS2966 を合成した。これを用いて血小板凝集作用を評価したところ、4  $\mu$ M と高濃度ではあるものの、期待通りにMRS2966の血小板凝集阻害作用を確認することができた。今後、さらに活性を向上することにより各種医薬への応用が期待できる。

## 5. 結語

上記の研究の結果、P2Y<sub>6</sub>では新たに4位置換基の構造活性相関情報を取得し、これまでで最も活性が高くかつ選択的で安定性の高いアゴニストの創製に成功した。またP2Y<sub>2</sub>アゴニストの合成展開を行った中から新たにP2Y<sub>4</sub>選択性の高い誘導体を見出し、さらにその最適化を行った結果、世界初の選択的P2Y<sub>4</sub>アゴニストの取得に成功した。またP2Y<sub>1</sub>アンタゴニストを初めてPAMAM dendrimerに結合することに成功し、血小板凝集抑制活性を有することを確認した。

これらの研究の成果は、生物学の分野での新たなP2Yの生理機能解明に役立つと同時に、将来の医薬への応用が期待できる。