

[別紙 2]

## 審査の結果の要旨

氏名 丸岡 博

丸岡博は、「選択的 P2Y アゴニスト及びアンタゴニストの探索研究」のタイトルで、以下の研究を展開した。

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り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。

丸岡はまず、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ると共に、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。

さらに、丸岡は、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 dendrimer 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することを視野に入れ、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。

### 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問題があった。丸岡は、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。その際、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いう仮説を立てた。

まず丸岡は、高い活性を示すことは既に報告されていた *N*<sup>4</sup>-methoxy-CDP の 4 位に大きさの異なる数種の置換基の導入を検討した。その際、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を推測した。実際に、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。

続いて丸岡は、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とを考慮し、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との仮説を立てた。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が、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。

そこで丸岡は、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。丸岡が発見した 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。

## 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低いことから、活性と安定性の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。このような中、丸岡は、P2Y<sub>2</sub>およびP2Y<sub>4</sub>アゴニストの探索研究を標的タンパク質のモデリングを積極的に用いて推進した。

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、丸岡は、P2Y<sub>2</sub>アゴニストの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。そこで、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、丸岡は、この誘導体がP2Y<sub>4</sub>アゴニストとしての活性も有することを見出した。さらなる合成展開と構造活性相関情報を進めることで、高い活性を示す世界初の選択的P2Y<sub>4</sub>アゴニストを得ることに成功した。

ヌクレオシ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。これを基に丸岡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、元のグルコース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した。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た。

一方、これら誘導体で観測された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。そこで丸岡は、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π-π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。このような考察から、初めて、P2Y<sub>4</sub>/P2Y<sub>2</sub>選択性を説明できるようになった。

## 選択的P2Y<sub>1</sub>アンタゴニストのデンドリマー結合体の創製

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か報告されている。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。丸岡は、P2Y<sub>1</sub>アンタゴニストを PAMAM デンドリマーに結合する検討を行った。

丸岡は、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デンドリマーに対して、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。

このモデル実験の結果を考慮にいれ、末端にアジド基を有する PAMAM デンドリマー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デンドリマー 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 μM 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。

以上のように、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 P2Y<sub>6</sub>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、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。さらに、P2Y<sub>1</sub>アンタゴニストを初めて PAMAM デンドリマー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重要な成果である。本研究は、薬学研究に寄与するところ大であり、博士(薬学)の学位を授与するに値するものと認めた。