

Title	Designs and Syntheses of Peptide Based Matrix Metalloproteinases Inhibitors : In Vitro Structure-Activity Relationship Studies and Their Biological Evaluation on the Rat Adjuvant-Induced Arthritis Model
Author(s)	藤沢, 哲則
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44506
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	藤 沢 哲 則
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 7 4 3 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 2 月 14 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Designs and Syntheses of Peptide Based Matrix Metalloproteinases Inhibitors : In Vitro Structure-Activity Relationship Studies and Their Biological Evaluation on the Rat Adjuvant-Induced Arthritis Model (ペプチドをベースとしたマトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤のデザインと合成：インビトロでの構造活性相関とラット・アジュバント誘発関節炎モデルでの生物学的評価)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 小 林 祐 次 (副査) 教 授 田 中 徹 明 教 授 北 泰 行 教 授 田 中 慶 一

論 文 内 容 の 要 旨

マトリックスメタロプロテイナーゼ群 (MMPs) は、コラーゲン、プロテオグリカン、糖タンパク質等の細胞外基質の代謝、分解に関与する金属酵素であり、正常な条件下においては、その活性は多段階で緻密に制御されている。しかし、それらの調節機構が破綻し MMPs が過剰産生されると、例えば、関節では軟骨組織および骨組織の破壊が進行し変形性関節症あるいは慢性関節リュウマチ等の疾病を発症する。

本研究は関節症の治療薬探索に焦点を置き、酵素基質をベースとした MMPs 阻害剤のデザイン、合成を実施し、阻害活性の *in vitro* での評価および一部化合物に関して慢性関節炎モデルでの有効性を評価したものである。阻害剤デザインの一手法として、報告されている X 線構造解析の結果やそれらを基にしたコンピューターモデリングを活用した。既に MMP-1 阻害剤として Bz-Gly-Pro-Leu-Gly-NHOH(1) が報告されていたが、ヒドロキシルアミン遊離による変異原性の可能性を回避すること、及び阻害活性を向上させる目的で新たな MMP-1 阻害剤が必要であった。第一部では MMP-1 および Pro-Leu-Gly-NHOH:MMP-8 複合体の X-線構造解析結果からコンピューターモデリングを行い、カルボン酸を有する新規 MMP-1 阻害剤、Bz-Gly-Pro-Leu-NH-CH₂-CH(CO₂H)·R¹(2) を見だし、これら周辺化合物の構造活性相関を調査した結果を述べた。その中で、R¹ に *tert*ブチル基、ベンジル基等の嵩高い置換基を有するウレタン骨格と *p*-トルイル基を有するスルホンアミド骨格に、リード化合物(1)と比較して同等 (10⁻⁶ M オーダー) の MMP-1 阻害活性が見られた。一方、R¹ がアルキル基、アミド基である化合物は置換基の種類に関係なく全く阻害活性を示さなかった。さらに、コンピューター上で Bz-Gly-Pro-Leu-NH-CH₂-CH(CO₂H)·NH-Ts : MMP-1 複合体を構築し、阻害活性を裏付ける相互作用、すなわち、トシル基が S₁' ポケット方向に位置していること、及びカルボン酸が亜鉛イオンにキレートしていることを確認した。第二部では、さらなる阻害活性向上を目的として、ヒドロキサム酸型 MMP 阻害剤と MMP の複合体 X-線構造解析の結果を踏まえて、ヒドロキサム酸と同様の配位環境を構築する目的で α -メルカプトカルボニル骨格を導入した結果を述べた。初めに、この骨格が MMP-1 阻害に有効であるか確認する目的で、酵素認識部位として Gly-Pro-Leu-Ala ペプチドを有する Bz-Gly-Pro-Leu-Ala-CH₂-SH(3) およびその類縁体 3 種を合成した。その結果、 α -メルカプトカルボニル骨格を有する化合物(3)はリード化合物(1)と同等の

MMP-1 阻害活性 ($IC_{50}=3.5 \mu M$) を示し、類縁体 3 種はいずれもこれより低い阻害活性を示した。これより、活性部位の亜鉛をキレートする環境としてチオールおよびカルボニル基の両官能基の存在とその距離が重要な因子であることを確認した。また、酵素認識部位として各種 P_1' - P_2' ペプチドを有する α -メルカプトカルボニル化合物(4)は、殆どの化合物において $10^{-8} M$ オーダー以下の強い阻害活性を示し、酵素認識部位として Gly-Pro-Leu-Ala ペプチドよりも優れていることを見いだした。さらに、 P_2' 部位の欠損した化合物では完全に MMP-1 阻害活性は消失しており、 P_2' 部位は酵素が認識する部位として必須であると考えられた。化合物(4)は、メルカプト基の結合する炭素においてジアステレオアイソマーの混合物として合成してきたが、各光学活性体を別途合成し、阻害活性を比較した結果、(S)-体は(R)-体のほぼ 100 倍の阻害活性を示し、活性部位亜鉛とのキレートには(S)-体が好ましいことを見出した。これら α -メルカプトカルボニル化合物(4)は、室温で非常に安定であり、ジスルフィド結合生成に抵抗する物性であったが、慢性関節リュウマチ患者の関節液中では予想外に分解が速く、また水溶性にも乏しく、以降の展開が困難であるとの結論に至った。化合物(4)と同等の阻害活性を有する化合物としてコハク酸骨格をベースとした化合物(5)が報告されており、MMP-3 との X-線構造解析の結果が既知であった。その結果では、 P_1 に位置するヒドロキサム酸 α -位の置換基および P_2' に位置するアミノ酸側鎖は酵素側ではなく、溶媒方向に位置していることが報告されていた。第 3 部では、 P_2' 部位の側鎖に親水性官能基を導入することにより、酵素との相互作用には影響せず、化合物自体の水溶性を向上させる研究に関して述べた。試験的に合成した硫酸エステル化合物は無置換のものと比較し飛躍的に水溶性が向上し、且つ阻害活性は無置換のものと同様であった。また、ラット肝とのホモジネートによりヒドロキシルアミンの遊離が観察されなかったことより、変異原性の危険性は回避できると判断し、フェニルアラニン 4' 位に各種親水性官能基を導入した化合物(6)を合成した。酸性官能基 (硫酸エステル基、スルホン酸基、リン酸エステル基) および塩基性官能基 (アミノ基、アミノメチル基、アミジノ基、グアニジノ基、アセトイミドイルイミノメチル基) を導入したいずれの化合物においても無置換化合物と比較して、少なくとも 10 倍以上の高い水溶性を示した (10-240 mg/ml)。一方、MMP-1、MMP-3 に対する阻害活性を比較しても、ほぼその値を維持しており、X-線構造解析からの推論通り、親水性官能基は溶媒方向に位置していると考えられた。これら化合物群からプラズマ中の血中半減期が最も長いグアニジノ化合物(7)を選択してラットアジュバント関節炎モデルによる評価を行った結果、化合物(7)は生理食塩水を投与した群に比較して有意に、且つ用量依存的に足蹠浮腫および骨破壊を抑制した。よって慢性関節リュウマチ疾患において MMP-1 および MMP-3 活性を阻害することにより症状を改善する可能性を見出した。

論文審査の結果の要旨

変形性関節症や慢性関節リュウマチ等の疾病における軟骨組織や骨組織の破壊は、コラゲナーゼやプロテオグリカンなどを基質とする金属酵素の一群であるマトリックスメタロプロテイナーゼ群 (MMPs) が過剰に産出され、これら細胞外基質の代謝、分解の調節機構が破綻したことに起因する場合が多い。本研究では関節症の治療薬の創出をめざし、この MMPs の構造に基づく阻害剤のデザインを試みた。金属酵素であることに留意し活性中心の亜鉛とのキレート能と酵素との親和性に注目して本研究者が既に見出しているヒドロキサム酸をキレータとする阻害剤から出発し、キレータを種々のカルボン酸およびメルカプトカルボニル基に変換してその阻害能を検討した。その際、PDB に登録された MMP の酵素-阻害剤複合体の X 線結晶解析のデータを基にして類似物の複合体をコンピュータ上でシミュレートしエネルギーの極小化を行った。以上から得られ情報のみでは動物モデルへの投与が可能な水溶性の候補化合物が得られるとは限らないことから、次にヒドロキサム酸を有する候補物質の誘導体から高水溶性の誘導体をデザインし、それらを合成して、ラット関節炎モデルを用いて評価した。その結果、関節症治療薬として有望な化合物を見出した。以上のように藤沢君の本研究は X 線結晶構造解析データに基づく酵素阻害剤の探索法を提示し、合理的薬物設計の開発に貢献するものであり、博士論文として価値あるものと認める。