

〈研究ノート〉

構造活性相関とドラッグデザイン —尿酸アナログの合成と抗酸化活性—

高橋恭子*

Structure and Activity Relationships of medicine
—Synthesis of Uric Acid analogues and Antioxidant Activity—

Kyoko TAKAHASHI*

1. はじめに

古来、人は天然に広く存在する低分子有機化合物に多様な価値を見出し、強心薬ウワバインや麻酔薬キニーネや鎮痛剤サリチル酸などを基盤として新たに薬物を合成してきた。有機化合物の化学構造と活性には明確な相関があり、例えばコレステロール生合成経路を持たない蚕はたった1つメチル基を挿入した14 α -メチルコレステロールを摂取することで脱皮変態が出来ずに若齢で死に至る¹⁾。サリチル酸はヒドロキシ基をアセチル化することでアスピリンとなるが、現在に至るまで全世界で使用される解熱鎮痛薬となっている。多くの人のQOL (quality of life) を高めるために、我々は常により良い薬物の創製を目指す必要がある。そのためには、化学構造と薬理活性の相関を解明すること、それを基に活性あるいは副作用発現部位を同定し体内動態を制御することは、創薬研究において最も重要である。本稿では尿酸を題材にとり、低分子有機化合物の1つ1つの原子が薬理活性に与える影響の大きさを示す例として著者らのこれまでの抗酸化化合物合成に関する研究成果²⁾を紹介する。

* 日本医科大学化学教室 Department of Chemistry, Nippon Medical School

2. 活性酸素種と抗酸化剤

一般に活性酸素種（ROS: Reactive Oxygen Species）は悪者として喧伝されており、実際、老化・血液疾患・皮膚疾患・疼痛など人体に様々な悪影響をもたらす。健康食品や化粧品類、医薬部外品類などでは、ROSを除去する効能を暗に示唆して購買意欲をあおるものもある。ROSを除去する化学物質である抗酸化物質は、食品やサプリメントでも過剰に重要視されている場合がある。しかし必要以上にROSを恐れ、常識的に食品として摂取される以上の大量の抗酸化物質を服用することは生体内での絶妙なバランスを崩す可能性もあり、慢性の副作用が懸念される。また、アスコルビン酸やカテキン、ポリフェノールに代表される天然型抗酸化活性化合物のほとんどは複数のヒドロキシ基を有し、その水溶性の高さから医薬品としての使用に耐えうるものではない。

一方で一部の活性酸素種や活性窒素種は生体に必須の化合物であり、生体防御における炎症作用を制御し、またケミカルメディエーターとしてシグナル伝達に関与している。活性酸素のもたらす病態の多くは部分的にROS過剰状態になることに由来する。ROSは生体にとって両刃の剣であり、ただ消去すれば良いものではなく、時間と場所を制御する必要があるのである。実際にROS消去活性を持つ化合物は枚挙にいとまがなく、天然物を中心に多くの活性化合物の報告が日々なされているが、医薬品となり得る高活性のものは少ない。ROS消去活性をもつ医薬品の一つとしては、脳梗塞虚血再環流時に発生するROSから脳組織を保護するエダラボン³⁾がある。この薬は近年ALS治療効果も認められ、新たに承認されている。すなわち神経変性疾患の治療においては、神経細胞近傍での活性酸素種の生成と消去を制御し、神経細胞を機能不全から保護することが必要となる。

多くの疾病の発症と増悪に関与するROS消去化合物は数多く、関連する研究が多いにも関わらず医薬品としては用いられることは少ない。これはROS消去化合物の取り扱いが難しいためと考えられる。その理由として、1) ROS消去後に自らがラジカルとなるためその後の挙動を管理する必要がある、2) 主に水溶性の低分子化合物なので動態を制御しにくい、3) 一過性に発生するROSをタイミング良く消去できるような戦略をとることが難しいなどが挙げられ、一般に薬として用いるには障壁が高い。本稿では抗酸化医薬品の創製を目指し、新規骨格を有する活性化合物の合成と評価を行った研究に関して以下紹介する。

抗酸化活性の評価にはラジカル消去活性の指標として汎用される2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル (DPPH) を利用し、各化合物添加による消去速度の速さを比較した (Fig. 1)。以下本稿で「活性」とはこの DPPH ラジカル消去活性を指すものとした。

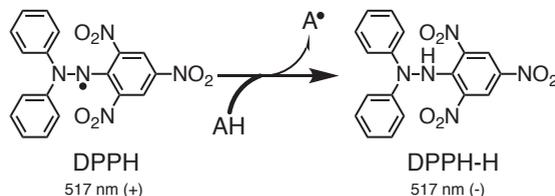


Fig. 1 ラジカル消去活性評価：DPPH ラジカルが活性化化合物 (AH) により還元される際に減衰する UV 吸収 (517 nm) の速度を活性の指標とする

3. 尿酸とラジカル消去活性

尿酸 (Fig. 2) は医療において悪玉とされることが多い。内因性の尿酸はその難溶性から結晶化して痛風発症の原因物質となり、高尿酸血症として多くの患者を悩ませてきた。一方で尿酸は最強の抗酸化剤であるアスコルビン酸に匹敵する高い活性酸素消去活性を有し、疾病の予防に寄与する

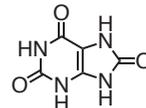


Fig. 2 尿酸

ことも知られている。生体内の ROS 過剰により DNA 鎖切断や塩基の酸化的修飾が誘発されると、変異して多様な疾病の原因となる。この非常事態に内因性抗酸化物質の1つとして尿酸が重要な役割を担うと考えられる。その抗酸化活性はヒドロキシラジカル (HO•)、脂質ペルオキシラジカル (LOO•) や一重項酸素 ($^1\text{O}_2$)、ペルオキシナイトライト (ONOO⁻) の消去作用に由来する。神経変性疾患であるパーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、多発性硬化症患者の血清尿酸値は健常者より有意に低いとの疫学的報告もあり、血中の活性酸素種、なかでも特に生体内分子障害性の高いラジカル種を消去することで結果的に神経細胞保護効果を示すものと推定される。

尿酸の難溶性の原因は、複数のアミドあるいはイミド構造を持つため、すなわち高度に官能基化されているためと考えられる。一方でそのラジカル消去活性に

必須な部位は明らかにされていなかった。痛風の原因となるほどの難溶性を改善し、抗酸化活性発現に必須な部分構造を残すことで新たな医薬品シーズを見出すことが出来ると考え、尿酸の構造を単純化した尿酸アナログの合成に着手した。

尿酸そのものは有意な活性を示し、尿酸1分子で2分子の DPPH を消去した。このことから尿酸は2分子の水素ラジカル ($H\cdot$) を DPPH ラジカルに供与して2度の一電子還元により活性を示し、自らは酸化されて比較的安定な化合物に変換すると推定した (Fig. 3)。ここでは尿酸構造のアミドカルボニル基をケト-エノール互変異性によりエノール型 (ヒドロキシ型) を取りうるものとして表記した。

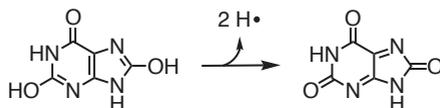


Fig. 3 尿酸 (互変異性体) の推定ラジカル消去機構

この推定機構が確かならば、尿酸の NH をメチル基で置換したもの、あるいは遊離可能な2つの水素原子を持たないものは不活性となるはずである。そこでこれらに相当する化合物の活性を評価した。

4. 尿酸の構造単純化

尿酸の活性発現部位解明の第一段階として、尿酸の類縁化合物として構造的に近く、かつアミド NH のメチル置換体であるアロプリノール、カフェイン、テオフィリンの活性を評価したところいずれも不活性であったことから、少なくとも尿酸に含まれるアミド NH あるいは5員環カルボニル基は必須であるとみなされた。また2つの水素を持たない環状イミド化合物も不活性であった。このことから、水素ラジカルを遊離しやすいイミドの NH ならば水素1つでも活性を示すという可能性は否定された (Fig. 4)。

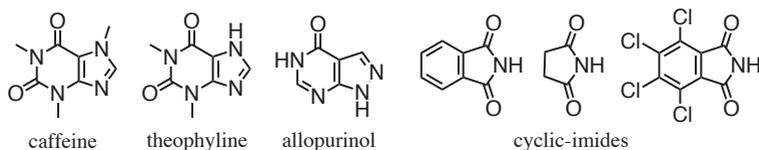


Fig. 4 尿酸類縁化合物 (inactive)

尿酸の推定機構 (Fig. 3) を追認する成果を得て、次に尿酸構造を単純化することとした。6員環のカルボニル基とNHを炭素に置き換え、1つのヒドロキシ基を残した5-hydroxy-1,3-dihydro-2*H*-benzo[*d*]imidazol-2-one (Fig. 5左) から順次カルボニル酸素やNHを除いた一連の化合物 (Fig. 5, 6) を評価したところ、Fig. 5に示した3化合物は順に尿酸の約100倍、15倍、3倍の活性を示した。一方、Fig. 6の5化合物および開環類縁体に相当するアセトアミノフェンは不活性であった。すなわち活性発現には遊離可能な水素2つを持つことが必須であり、尿酸の官能基の多くは不要であることが示された。

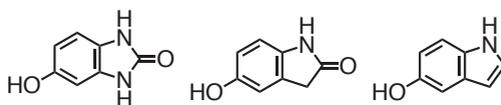


Fig. 5 単純化尿酸誘導体 (active)

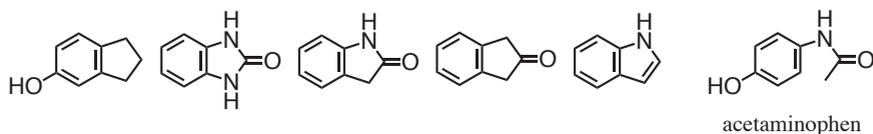


Fig. 6 単純化尿酸誘導体とアセトアミノフェン (inactive)

水素2つを持つアセトアミノフェンはこのルールに則しているものの不活性であることから、これら活性尿酸アナログは、二環式であることを必要とする消去機構で水素ラジカルを供与していると考えた。2分子の水素ラジカルが遊離するためには、酸化生成体がエネルギー的に安定であることも必須である。この安定化に、二環式化合物の平面性と、連続する二重結合による電子の非局在化が有利に働くためと推定した。これらを元に Fig. 5に示した活性化合物の消去機構を尿酸に倣って Fig. 7に示す。この機構は、容易に水素ラジカル2つを遊離してキノンに酸化されるヒドロキノンと同様ともいえる。このメカニズムが正しければ化合物の活性は遊離する水素と酸素の結合解離エネルギー (BDE) に依存するはずである。しかし本稿にあげた化合物群のBDEを計算 (密度汎関数法: DFT, B3LYP/6-31G*, Sptan18[®]) により予測したところ活性とは相関しなかった。これはおそらく、化合物によって解離定数 pK_a が異なり、実験系中でアニオン型の存在比に差が生じるためと考えている。

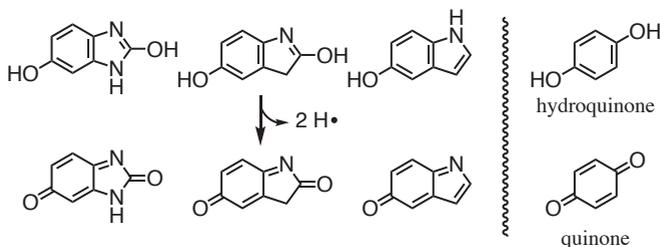


Fig. 7 尿酸アナログの推定消去機構とヒドロキノン

5. 尿酸アナログの構造展開

尿酸の15倍の活性を示した1*H*-indol-5-ol (Fig. 8左)を基盤として、次にベンゼン環上のヒドロキシ基の位置異性体3種 (Fig. 8)を合成して活性を比較したところ、左から順に0.2倍、1.5倍、0.4倍と有意な活性は示すものの中央のものを除いて低活性であった。このことからパラ置換体であるヒドロキノンとの等価構造が活性発現に有利であると示された。

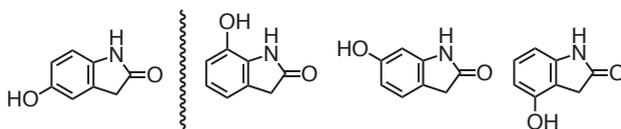


Fig. 8 ヒドロキシ基位置異性体

詳細は別稿に譲るが、1*H*-indol-5-ol (Fig. 8左)を基盤として多様な置換基を導入した一連の化合物群を合成し、多様な抗酸化活性を付与することが可能であることも見出した。さらに高活性の化合物を創製する研究の過程で、前駆体として得られた化合物の活性も評価したところ、Fig. 9に示した4化合物のなかで左の5-methoxy-1,3-dihydro-2*H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-oneのみ、弱い活性を示すという結果を得た。我々の想定消去機構が確かであれば、ベンゼン環上のヒドロキシ基は活性発現に必須のはずである。ヒドロキシ基をメトキシ基とした化合物が活性を示すことは意外であった。

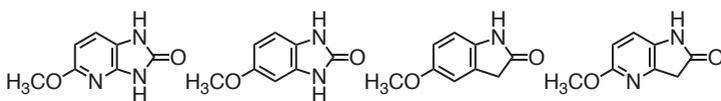


Fig. 9 尿酸アナログの合成中間体 (左の1化合物のみ活性)

6. フェノール性ヒドロキシ基を持たない尿酸アナログの構造展開

天然に存在する抗酸化活性化合物の多くはポリフェノール体でありフェノール性のヒドロキシ基を有する。また安定化剤として多用される合成抗酸化剤もフェノール誘導体である。例えば溶媒の安定化剤として用いられるビスヒドロキソトルエン (BHT) などは、酸素と室内光により発生した ROS による分解・劣化を防ぐために添加されるが、培養細胞に添加すると細胞死を招く結果も得られている。一般にフェノール構造の反応性は高く、条件によってはむしろ活性酸素を発生するいわゆるプロオキシダント効果を示し、毒性を発現することが示唆されている。生体内では P450 による代謝を受けて活性代謝物を生成する可能性も示唆されている。本稿で述べた合成抗酸化剤は細胞毒性を示さなかったが、リスクの大きいフェノール性ヒドロキシ基を持たずに活性を示すことが出来れば、医薬品としてより適切な化合物となり得ると考えた。そこで活性を示すと期待される化合物群を新たに合成し、活性を比較した結果を簡潔に Fig. 10 に示す。

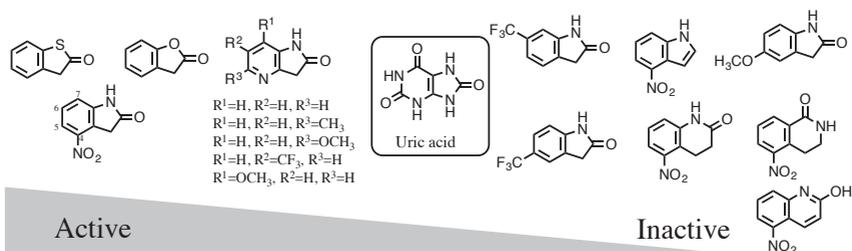


Fig. 10 ヒドロキシ基を持たない尿酸アナログと活性

尿酸より左に示した化合物群は尿酸よりも高い活性を示した。当初は4位のニトロ基の影響が大きいと考えており、ニトロベンゼン類の毒性を考慮すると医薬品としての展開は困難とみなしていた。しかしさらに構造展開を進めたところ、ベンゾチオラクトンあるいはベンゾラクトン (Fig. 10 左上の2化合物) まで単純化しても尿酸よりも高い活性を示すことは驚きであった。その類縁体であるベンゾラクタムは Fig. 6 において前述したとおり、研究の初期段階で不活性と示されて対象から外した化合物である。各化合物の活性の強さを消去速度定数 k により比較すると、ベンゾラクタム (NH) は不活性にも関わらず、ベンゾチオラクトン (S)、ベンゾチオラクトン (O) は高い活性を示した (Fig. 11)。さらにベンゾチオラクトンの5位に置換基を導入すると、電子求引性の高いハロゲン置換

が有利であることも示された。結果として最強の活性を示したプロモ化体は、そもその尿酸の700倍以上の活性を示した。

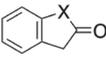
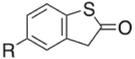
			
R	k ($S^{-1} \cdot mM^{-1}$)	R	k ($S^{-1} \cdot mM^{-1}$)
S	298	CH ₃	190
O	6.33	Br	799
NH	0	F	589
		Uric acid	0.762

Fig. 11 ベンゾラクタム類および置換ベンゾチオラクトン類のラジカル消去速度定数のラジカル消去速度定数

7. ベンゾラクトン類の構造活性相関

合成と活性評価を行うべき化合物はまだ多く残るものの、現段階でのベンゾラクトン類の構造活性相関をまとめて Fig. 12 に示した。いずれも重要な知見ではあるが、なかでもカルボニル隣接位の CH₂ に注目している。この位置を NH とすると失活すること、アミド型 (X=NH) であるベンゾラクタムも不活性であることから、ケト・エノール互変異性によりエノール型を取り得ることが活性発現に必須であると推定している。一方で消去メカニズムは未だ明らかではないものの、この CH₂ の水素2つが水素ラジカル (H•) としてラジカルの還元に寄与すると考えられ、ラジカル消去活性発現後に生成する酸化生成体の構造を明らかにすることが直近の課題である。

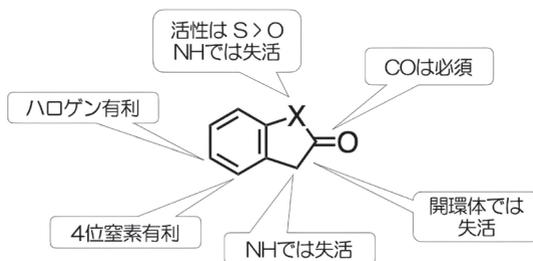


Fig. 12 ベンゾラクトン類の構造活性相関

8. 終わりに

ここではラジカル消去活性に絞ってその構造活性相関をまとめたが、ここに挙げたラジカル消去活性化合物の一部は、細胞に対してはほぼ無毒性で、酸化ストレスからの細胞保護効果を示す。例えばヒト白血病細胞株 HL-60 に過酸化水素 (H_2O_2) を添加すると細胞内酸化ストレスの惹起により細胞数は2割以下に減少するが、エダラボンおよび一部の化合物は5-6割まで回復することが出来る。化合物添加により細胞内 ROS 量が減少することも実験により確かめられたことから、細胞の酸化的損傷を抑制して細胞死からの保護効果を示したと推定している。

筆者の研究では他にも抗酸化能の評価系として UV 誘発細胞死の保護効果、A β 誘発細胞死の保護効果、ONOO⁻ 誘発酸化ストレスからの細胞保護、細胞内 NO ラジカル産生抑制効果、放射線照射による細胞死の保護効果などを評価しており⁴⁾、ラジカル消去以外の活性評価により広く抗酸化活性化合物として有効であるものを見出すことも可能と考えている。

本稿では化合物の抗酸化活性はシンプルにラジカル消去反応を指標として評価可能なこと、必要な部分構造さえ維持あるいは導入すれば活性の増減を制御できること、その構造活性相関と推定反応機構を基に新たな活性化合物をデザインできることを示してきた。尿酸は難溶性で容易に結晶化して痛風発症の危険性を持つため抗酸化剤として利用することは出来ない。しかしその難溶性は高度に官能基化された構造にあり、実際にほとんどの酸素と窒素は抗酸化活性には不要であった。尿酸の構造単純化の結果としてベンゾチオラクトンを見出し、その5位ハロゲン化体は尿酸の700倍以上の高いラジカル消去活性を示した。抗酸化剤としては十分に高活性ではあるものの、このまま医薬品とするには低分子過ぎる。そこでこれを部分構造として新たに抗酸化剤をデザインするにあたり、薬理活性を持つ化合物とのハイブリッドも進めている。

本稿の研究は主に慶應義塾大学薬学部においてなされたものであり、増野匡彦教授、中村成夫教授、大江知之准教授のご指導ご鞭撻に衷心より深謝申し上げます。また柿木智宏修士、安田大輔博士を初めとする学生研究員の努力の賜として、心より感謝申し上げます。尿酸を基盤として尿酸とは全く異なる構造に到達したアナログがいつか医薬品として上市される日が来ることを願って本稿の結語とする。

参考文献

- [1] Takahashi K, Usami K, Takahashi T, Okada T, Morisaki M. Synthesis of 14 α -methylcholesterol, *Chem Pharm Bull*, 35(8), 3467-3469 (1987).
- [2] Yasuda D, Ohe T, Takahashi K, Nakamura S, Mashino T, Preparation and antioxidant/pro-oxidant activities of 3-monosubstituted 5-hydroxyoxindole derivatives. *J Clin Biochem Nutr*. 59/3, 165-173 (2016); Yasuda D, Takahashi K, Ohe T, Nakamura S, Mashino T, Antioxidant activities of 5-hydroxyoxindole and its 3-hydroxy-3-phenacyl derivatives: The suppression of lipid peroxidation and intracellular oxidative stress, *Bioorg Med Chem*, 21, 7709-7714 (2013); Yasuda D, Takahashi K, Kakinoki T, Tanaka Y, Ohe T, Nakamura S, Mashino T, Synthesis, radical scavenging activity and structure-activity relationship of uric acid analogs. *Med Chem Comm*, 4, 527-529 (2013) ; references cited by these manuscript and unpublished data.
- [3] 田辺三菱製薬株式会社；ラジカット®添付文書等
- [4] Hatanaka M, Takahashi K, Nakamura S, Mashino T, 2,2'-Pyridoin Derivatives Protect HL-60 Cells against Oxidative Stress. *Bioorg Med Chem*, 18, 5290-5293 (2008); Hatanaka M, Takahashi K, Nakamura S, Mashino T, Preparation and antioxidant activity of α -pyridoin and its derivatives, *Bioorg Med Chem*, 13(24), 6763-6770 (2005); unpublished data.

(受付日 2021年12月28日)

(受理日 2022年 1月31日)