

論文内容要旨

(題名) 心房性ナトリウム利尿ペプチド様作用を有する新規ナトリウム利尿ペプチド受容体 A アゴニストの創製研究

(氏名) 岩城 竹彦

1. 研究背景

心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) はナトリウム利尿ペプチド (NP) の 1 種であり、28 のアミノ酸から構成されている。ANP は膜結合型グアニル酸シクラーゼであるグアニル酸シクラーゼ A (NPR-A) に結合し、グアニル酸シクラーゼを活性化して細胞内の環状グアノシンーリン酸 (cGMP) を増加させることにより、動・静脈血管拡張作用、尿量及び尿中ナトリウム排泄増加作用を発現する。また、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン(RAA)系やバゾプレッシン系、交感神経系に拮抗する作用を有する。これらの作用は、総合的に血圧の低下や体液量の低減などの心臓の負担を軽減する方向に働くことから、ヒト型 ANP は急性心不全の治療薬として既に臨床で用いられている (Figure 1)。

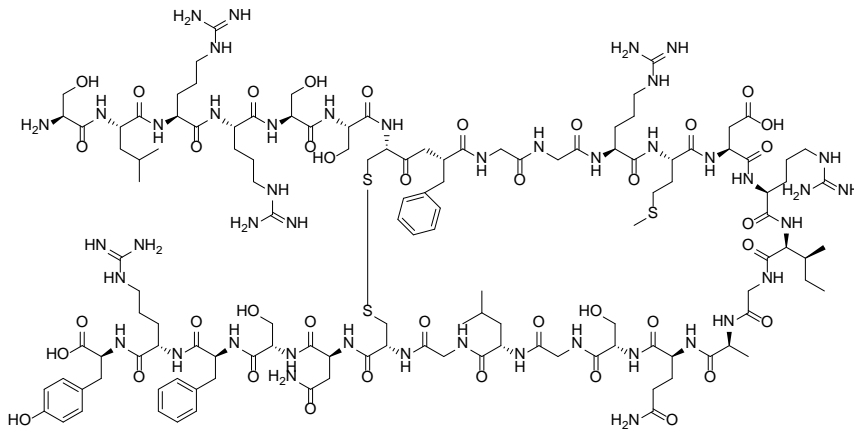


Figure 1. ヒト型 ANP の構造

しかしながら、ANP は内因性ペプチドであり、医薬品として用いた場合には注射剤に限定されること、また、生体内での分解が速く作用持続時間が短いため、急性期の適応に留まっているという課題がある。そのため、ANP 受容体に作用する低分子化合物が強く望まれているものの、これまでに低分子の NPR-A アゴニストは報告されていない。唯一の報告例としては、非ペプチド系のグアニル酸シクラーゼ受容体に作用する物質としてオーレオバシディウム属に属する微生物の培養物中から発見された、高分子多糖類の **HS-142-1** が見出されているが、NPR-A 及び NPR-B に対するアンタゴニストである (Figure 2)。本研究の目的は、NPR-A を活性化し、ANP に類似したアゴニスト効果を示す非ペプチド性の低分子化合物を見出し、NPR-A の活性化による慢性心不全をはじめとした慢性疾患治療への適応の検証に有用な化合物を創製することである。

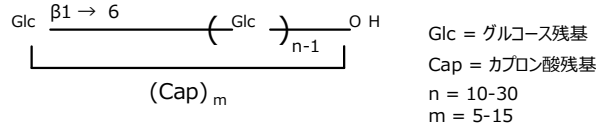


Figure 2. HS-142-1 の構造

2. NPR-A アゴニスト作用を有する新規トリアジンダイマーの発見

NPR-A アゴニスト活性を有する新規非ペプチド性低分子を見出す事を目的に、*in vitro* アッセイ系を構築して社内でランダムスクリーニングを実施した。見出した新規トリアジン誘導体 **I-1** のアゴニスト活性は EC₅₀値 4.0 μM であったため、ダイマー化を活性向上に向けた戦略として合成展開を行い、EC₅₀値 8.1 nM と高活性な **I-13** を獲得した (Figure 3)。

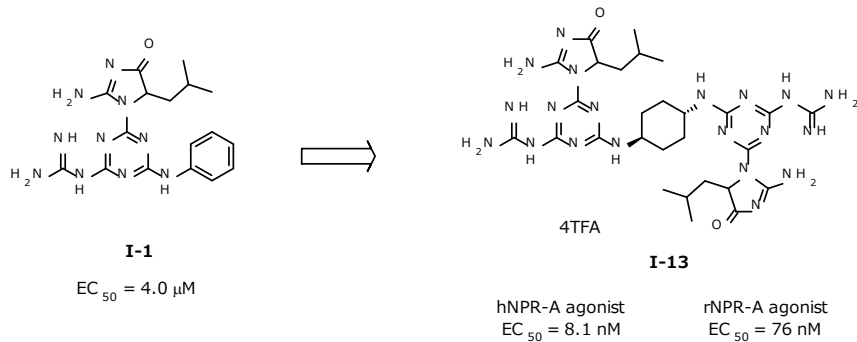
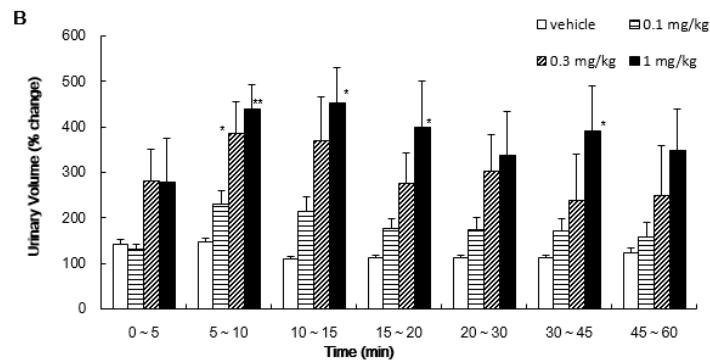


Figure 3. 新規トリアジン誘導体 **I-13** の創製

この **I-13** はラット NPR-A に対しても EC₅₀値 76 nM と高活性を示したことから、ラットを用いた *in vivo* 試験を実施した。評価の結果、麻酔ラットの 1.0 mg/kg の静脈内持続投与で有意に尿量を増加させた (Figure 4)。また、**I-13** はラットの腎臓における cGMP 産生量を有意に亢進し、NPR-A アゴニスト作用を示す新規なトリアジン構造を持った非ペプチド性低分子化合物を世界で初めて発見した。



*, **: P < 0.05 or 0.01 vs. vehicle by Dunnett multiple comparison test.

Figure 4. 麻酔ラットに対する **I-13** の利尿効果

3. 新規キナゾリン誘導体の発見

獲得した高活性トリアジン誘導体は分子量が 700 近くと大きく、窒素原子も 20 個有しており、臨床適用には難しい化合物である。より低分子量の化合物を探索するため、第一三共（株）のライブラリーを用いて HTS を実施し、新たなヒット化合物としてチエピリミジン誘導体 **II-2** を獲得した（**Figure 5**）。活性向上のための合成展開を実施し、骨格やリンカー部、キナゾリン 6 位のフェニル基の最適化によって EC₅₀ 値 0.073 μM と強いアゴニスト活性を示す **II-47** を獲得した。この **II-47** は、ヒット化合物と比較して 350 倍の活性向上を達成し、**II-47** は分子量が 518 g/mol と小さく、窒素原子の数も 6 と大幅な削減に成功した。

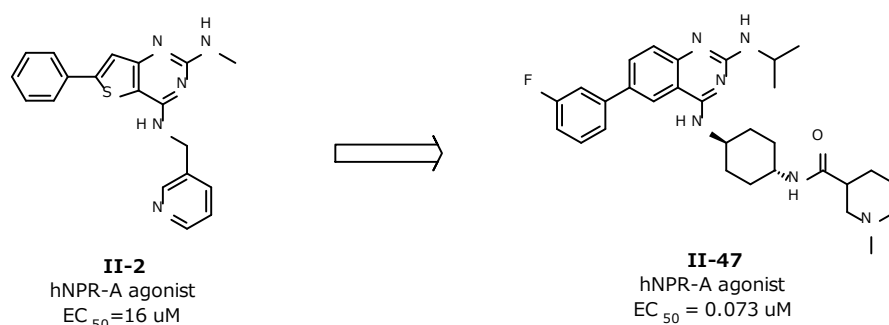


Figure 5. 新規トリアジン誘導体 **II-47** の創製

4. ヒトとラットの活性種差の改善に向けたキナゾリン、ピリドピリミジン誘導体の獲得

獲得したキナゾリン誘導体 **II-47** は、ヒト NPR-A に対して EC₅₀ 値 0.073 μM の非常に強いアゴニスト活性を示したが、ラット NPR-A に対するアゴニスト活性は EC₅₀ 値 0.65 μM とヒト NPR-A に対するアゴニスト活性に比べて 10 倍程度低下する事が明らかとなった。ラットを用いた薬理試験に向けて、ラット NPR-A に対するアゴニスト活性の向上を目指し合成展開を実施した結果、新たにキナゾリン誘導体 **III-60** とピリドピリミジン誘導体 **III-54b** を獲得し、いずれの誘導体もラット NPR-A に対して、EC₅₀ 値は二桁 nM のアゴニスト活性を示した（**Figure 6**）。

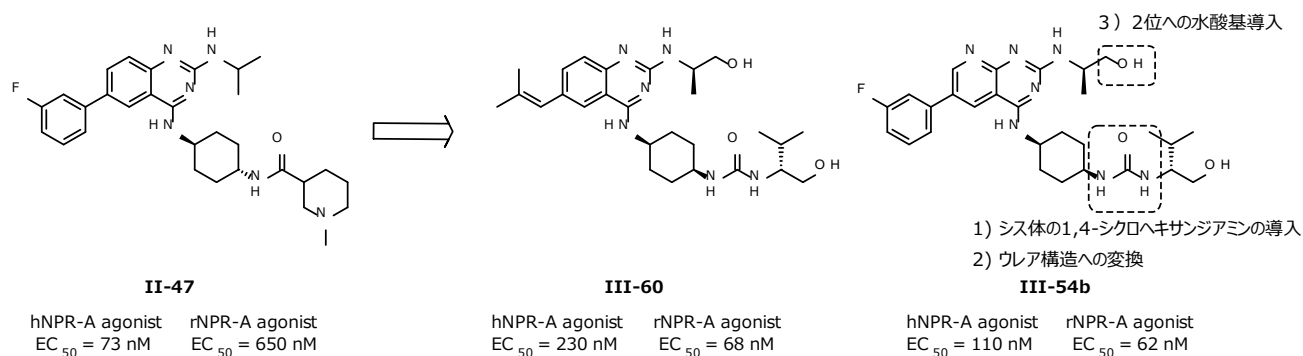
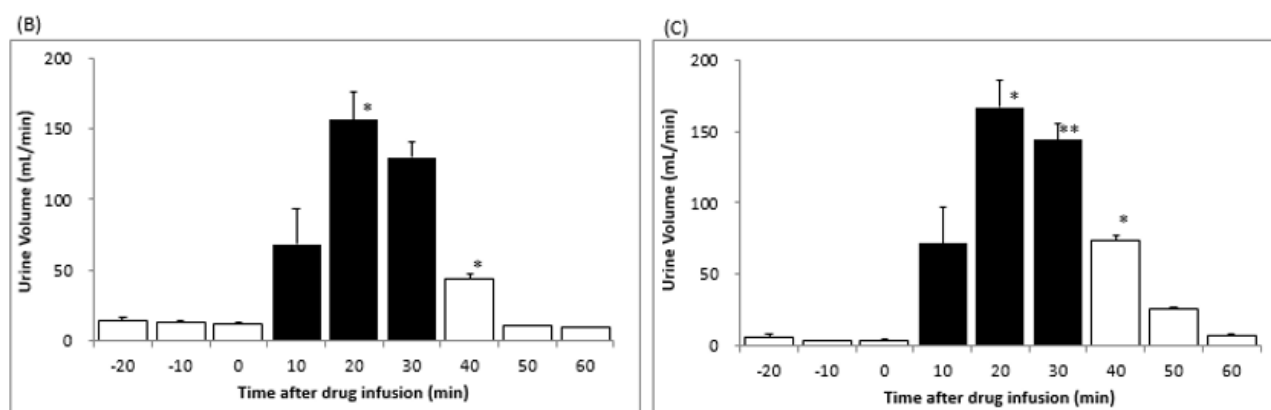


Figure 6. 新規トリアジン誘導体 **III-60** とピリドピリミジン誘導体 **III-54b** の創製

ヒトとラット NPR-A に対するアゴニスト活性の種差改善には、1) 4 位へのシス体の 1,4-シクロヘキサンジアミンの導入、2) ウレア構造への変換、3) キナゾリン誘導体の 2 位のイソプロピル基への水酸基の導入がラット NPR-A に対する活性向上には重要であった。

ラットを用いた静脈内持続投与による cGMP 産生亢進作用評価で、新たに見出した **III-60** と **III-54b** は血漿中 cGMP 産生亢進作用を示した。また、**III-60** と **III-54b** は、ラットを用いた利尿作用評価を実施した結果、**III-60** は 0.3 mg/kg/min で、**III-54b** は 1.0 mg/kg/min の 30 分持続投与で尿量の増加を有意に認め、いずれの化合物も NPR-A アゴニスト作用を示した (Figure 7)。



*, **: P < 0.05 or 0.01 vs. vehicle by Dunnett multiple comparison test.

Figure 7. 麻酔ラットに対する **III-60** と **III-54b** の利尿効果 : (B) **III-60** ; 0.3 mg/kg/min, (C) **III-54b** ; 1.0 mg/kg/min.

5. まとめ

NPR-A アゴニスト活性を有する非ペプチド性低分子を見出す事を目的に、社内スクリーニングや HTS を実施してヒット化合物を複数獲得した。得られたヒット化合物の構造最適化を行った結果、高活性なトリアジン誘導体 **I-13** やキナゾリン誘導体 **III-60**、ピリドピリミジン誘導体 **III-54b** を新たに創出した。これら誘導体は、*in vivo* 試験で cGMP 産生亢進作用を示すと共に、ラットを用いた利尿作用試験で尿量の有意な増加を認めた。これらの結果、獲得したトリアジン誘導体やキナゾリン誘導体、ピリドピリミジン誘導体に ANP 様作用を有する事が明らかとなり、これら誘導体が NPR-A アゴニストとして作用している事が示された。これら誘導体は、今後トリアジン誘導体と併せて慢性心不全等の研究に有用なツール化合物になる事が期待され、うっ血性心不全をはじめとする心疾患の新しい治療法研究に革新的なツールになると考えている。

以上

論文提出者: 岩城 竹彦

論文審査委員 (主査): 根東 義則

論文題目: 心房性ナトリウム利尿ペプチド様作用を有する新規ナトリウム利尿ペプチド受容体Aアゴニストの創製研究

本論文は、膜結合型グアニル酸シクラーゼであるグアニル酸シクラーゼAを活性化し心房性ナトリウム利尿ペプチドに類似したアゴニスト効果を示す非ペプチド性の低分子化合物を見出し、グアニル酸シクラーゼAの活性化による慢性心不全をはじめとした慢性疾患治療への適応の検証に有用な化合物を創製するものである。

まず岩城氏はグアニル酸シクラーゼAアゴニスト活性を有する新規非ペプチド性低分子を見出すことを目的に *in vitro* アッセイ系を構築してランダムスクリーニングを行い、活性を有する新規トリアジン誘導体を発見した。さらに活性向上を目指しダイマー化を主とした合成展開を行いより高活性なトリアジンダイマー誘導体を見出した。この化合物を用いてラットを用いた *in vivo* 試験を実施し、麻酔ラットの静脈内持続投与で有意に尿量を増加させる結果を得た。さらにラットの腎臓における cGMP 産生量を有意に亢進することが明らかとなり、グアニル酸シクラーゼAアゴニスト作用を示す新規なトリアジン構造を持つ非ペプチド性低分子化合物を世界で初めて見出すに至った。

見出した高活性トリアジン誘導体は分子量が 700 近くと大きく、また窒素元素も 20 個有しており臨床適用には困難が予想されたため、より低分子量の化合物を探索するため再びライブラリーを用いてスクリーニングを実施しより強いアゴニスト活性を有するチエノピリミジン誘導体を見出し、さらに活性向上のための合成展開を行うことにより新規キナゾリン誘導体を見出した。活性は 350 倍向上し、また分子量も 518 と小さくなり窒素原子も 6 個と大きく改善することに成功した。またヒトとラットのグアニル酸シクラーゼ活性の種差を改善する検討を行い、4 位へのシス体の 1,4-シクロヘキサンジアミンの導入、ウレア構造への変換、キナゾリン誘導体の 2 位のイソプロピル基への水酸基の導入がラットグアニル酸シクラーゼAに対する活性向上に重要であることも見出している。新たに見出された化合物は cGMP 産生亢進作用評価で血漿中 cGMP 産生亢進作用を示し、利尿作用評価においても尿量の増加が有意に認められた。見出された化合物は今後慢性心不全等の研究に有用なツール化合物になることが期待されており、またうつ血性心不全をはじめとする心疾患の新しい治療法研究に寄与するものと期待される。

以上、論文提出者は心房性ナトリウム利尿ペプチドに類似したアゴニスト効果を示す非ペプチド性低分子化合物を見出し慢性心不全の治療への新たな可能性を示したことにより、今後の社会の発展に寄与し得るものと考えられる。よって本論文は博士 (薬科学) の学位論文として合格と認める。