

報告番号	甲 乙 第	号	氏 名	安田 大輔
------	-------	---	-----	-------

主 論 文 題 名 :

尿酸のラジカル消去機構を規範とした新規抗酸化活性医薬品リード化合物の創製研究

(内容の要旨)

**【背景】** 活性酸素種 (ROS) は生体の恒常性維持において重要な役割を担うことが示されている。その一方で、ROS の過剰生成は癌をはじめとする種々の疾病に関与することも知られている。抗酸化剤は各種疾患に対する新薬候補として有用であると考えられるが、既存の抗酸化剤は有効性や安全性の観点から医薬品にまで発展した例はわずかである。安全性に関する抗酸化剤特有の問題点としてプロオキシダント効果が挙げられる。また、ROS との反応後に生じる抗酸化剤由来の生成物が毒性を発現する場合もある。新規抗酸化活性医薬品の創製にあたっては、これらの問題点を回避し得る抗酸化剤を見出す必要があると考えられる。また抗酸化物質を医薬品として応用する場合、ROS との化学的な反応性に加え、体内動態や毒性を左右する物性も重要な評価項目となる。物性の調節には各種置換基の導入による誘導体化が行われるが、その際には主作用である ROS 消去活性への影響を低く抑えることが望ましい。

当研究室では、新規抗酸化活性医薬品リード化合物の創製研究の一環として、内因性の抗酸化剤である尿酸の構造に着目した。先行研究において、尿酸の抗酸化活性発現に必要と考えられる部分構造を残し、構造を順次単純化した類縁体としてデザインした化合物 **A**、**B**、**C** 及び **1** (Fig. 1) は、尿酸よりも強い DPPH ラジカル消去活性を示し、また低細胞毒性であることを明らかとした。これらの結果より、化合物 **A**、**B**、**C**、**1** は医薬品リード化合物として有望であることが示唆された。

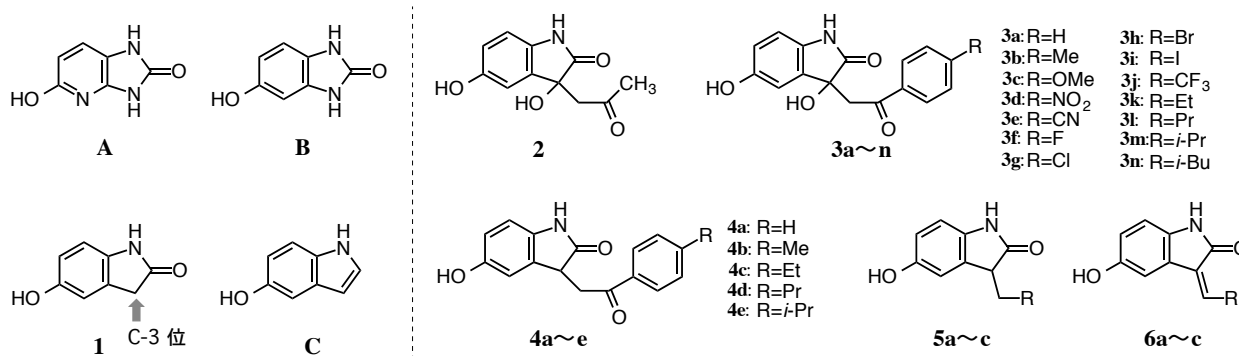


Fig. 1 当研究室の先行研究で見出した尿酸類縁体

Fig. 2 新規にデザイン・合成した誘導体

【研究目的】本研究では、高いラジカル消去活性を示した尿酸類縁体 **A**、**B**、**C**、**1** の構造を規範とし、臨床応用を指向した新規抗酸化活性医薬品リード化合物を創製することを目的とした。初めに、尿酸類縁体のラジカル消去活性における構造活性相関について更なる検討を行い、そこで見出した有望な尿酸類縁体の構造を基盤として創薬化学的なアプローチから修飾法の検討と抗酸化活性を向上した改良型誘導体の創製を試みた。

【方法と結果】尿酸類縁体のラジカル消去活性における、六員環部位の水酸基の位置及び五員環部位のアミド構造の有無の影響を、各種新規類縁体をデザイン・合成して検討した結果、六員環上の水酸基が五員環上の窒素原子のパラ位に位置し、かつ五員環部位にアミド構造を持つ化合物 **A**、**B**、**1** が、他の化合物よりも強いラジカル消去活性を有することが示された。これらの中から、物性を考慮した改良型誘導体の創製を行うための基本構造として **1** を選択した。化合物 **1** の C-3 位 (Fig. 1) は  $sp^3$  炭素であり、ラジカル消去に直接関与する共鳴系から外れていることから、この部位への置換基導入は抗酸化活性を維持しつつ修飾を行う方法として有効であると予想した。今回、C-3 位への置換基の導入による物性の調節と、それに伴う抗酸化活性への影響を評価するため、抗酸化活性部位と独立した物性調節部位として C-3 位にアセトニル基を持つ誘導体 **2**、またフェナシル基を持ち、そのパラ位に様々な物性パラメータを持つ置換基を有する誘導体 **3a**～**n** (Fig. 2) をデザイン・合成した。さらに、その中で良好な抗酸化活性を示した化合物を基盤とし **4a**～**e**、**5a**～**c**、**6a**～**c** (Fig. 2) をデザイン・合成し、抗酸化活性を比較した。

誘導体 **1** は尿酸の約 15 倍のラジカル消去活性を示したが、誘導体 **2** の活性は **1** より低下し、尿酸と同等であった。一方で、誘導体 **3a**～**n** は **1** より弱いながらも尿酸や **2** より強いラジカル消去活性を示した。また、**4a**～**e** 及び **5a**～**c** の活性は **3a**～**n** よりも強く、一部は **1** と同等の活性を示した。さらに、C-3 位に二重結合を有する **6a**～**c** は **1** よりもわずかに高い活性を示した。誘導体 **3a**～**n** をそれぞれ比較すると、置換基 R の種類による活性への影響はほとんど見られなかった。この結果は **4a**～**e**、**5a**～**c**、**6a**～**c** についても同様であった。これらの結果は、当初の予想通り、**1** の C-3 位への置換基導入がラジカル消去活性を維持しつつ構造変換を行う手法として有効であることを示唆している。次に脂質過酸化抑制効果を評価した。まず誘導体 **1**、**2**、**3a**～**j**、尿酸、エダラボンについて比較したところ、誘導体 **1**、**2**、**3a**、**3b**、**3c**、**3e** は尿酸よりも強く、エダラボンと同等の脂質過酸化抑制効果を示した。また誘導体 **3d** 及び **3f**～**j** は **1** やエダラボンよりも強い効果を示し、その強弱は置換基の種類によって異なった。脂質過酸化抑制効果の強弱は DPPH ラジカル消去活性の強弱とは一致しなかった。フェナシル基パラ位にニトロ基を有する **3d** は、評価した誘導体の中で最も高活性であった。次いでヨウ素を有する **3i** が強い活性を示し、同様に塩素、臭素を有する **3g**、**3h** も比較的高活性であった。**3g**、

**3h**、**3i** の抑制効果の強弱と脂溶性の大小には相関が見られた。そこで、置換基部分の差異をアルキル基の長さのみとし、脂溶性以外の物性の違いを極力排除した **3k~n**、また同様にアルキル置換基を中心に C-3 位周辺の環境を変化させた **4a~e**、**5a~c**、**6a~c** について脂質過酸化抑制効果を評価したところ、やはり脂溶性の大きい誘導体が強い効果を示した。次に抗酸化剤の問題点となるプロオキシダント効果を評価したところ、尿酸、**1**、**4c**、**5a** はほとんどプロオキシダント効果を示さなかった。一方で誘導体 **3k** は弱いプロオキシダント効果を示し、誘導体 **6a** はポジティブコントロールのアスコルビン酸に匹敵する強いプロオキシダント効果を示した。次いで、より生体に近い系での抗酸化活性検討を行うため、細胞内での酸化ストレスを評価した。まず、誘導体 **1**、**2**、**3a~j** 及び尿酸を比較したところ、誘導体 **1**、**3a~j** は  $10\ \mu\text{M}$  の添加で細胞内酸化ストレス抑制効果を示した。一方、**2** 及び尿酸は効果を示さなかった。強い脂質過酸化抑制効果を示した化合物は、細胞内酸化ストレス抑制効果においても強い効果を示す傾向にあった。脂溶性の高い化合物は、細胞膜の透過性に加えて、主要な酸化ストレス発生部位と考えられる膜脂質への集積性が高いため、ラジカル消去活性が同等であっても強い抑制効果を示したものと考えられる。次いで誘導体 **1**、**3b**、**3k~n**、**4a~e**、**5a~c**、**6a~c** について比較したところ、**6a~c** を除く全ての被検化合物が酸化ストレス抑制効果を示した。その強さは  $\text{ClogP}$  値が大きいほど強い傾向にあった。誘導体 **6a~c** は  $\text{H}_2\text{O}_2$  単独曝露時よりも細胞内酸化ストレスを増強した。この結果には **6a~c** のプロオキシダント効果が関与したと考えられる。また、一連の誘導体 **1**、**2**、**3a**、**3b**、**3c** は HL60 に対し  $100\ \mu\text{M}$  まで有意な細胞毒性を示さず、また **3d~n**、**4a~c**、**5a**、**5c** の細胞毒性は弱かった。一方で、誘導体 **4d**、**4e**、**5b**、**6a~c** は一連の誘導体の中で比較的強い毒性を示した。

尿酸類縁体のラジカル消去活性の構造活性相関と、創薬化学的な利便性・発展性の観点から、化合物 **1** を新規抗酸化物質の基本構造として選択した。誘導体 **2~6c** はすべて尿酸以上のラジカル消去活性を示したことから、化合物 **1** の C-3 位への置換基導入は、抗酸化物質としての機能を喪失させずに誘導体化を行う方法として有効であることが示された。さらに、一部の誘導体は脂質過酸化抑制効果や細胞内酸化ストレス抑制効果など、主に生体成分への酸化ストレスに対し **1** やエダラボンよりも強力な抗酸化作用を示した。細かな脂溶性の調節であっても脂質や細胞などの生体成分に対する有効性を向上し得たことは、ROS との反応性の高さに焦点が置かれがちな抗酸化剤の開発研究に一石を投じる重要な知見となる。一連の誘導体では、**4c** が脂質過酸化抑制効果、細胞内酸化ストレス抑制効果ともに強く、プロオキシダント効果や細胞毒性は弱かったことから、新規抗酸化活性医薬品のリード化合物として有望であると考えられる。