九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

COX-2を標的とした新規イメージング剤の開発 NSAIDs誘導体の合成および評価

山本, 由美

https://doi.org/10.15017/1789444

出版情報：九州大学, 2016, 博士（創薬科学）, 論文博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

COX-2 を標的とした新規イメージング剤の開発　NSAIDs 誘導体の合成および評価

山本 由美

【緒論】

シクロオキシゲナーゼ(Cyclooxygenase; COX)はアラキドン酸からプロスタグランジン類を生合成するアラキドン酸カスケードをつかさどる酵素であり、少なくとも 2 つのアイソザイム(COX-1, COX-2)が存在する。このうち COX-2 は炎症時に誘導されるだけでなく、脳や腎臓に発現しているほか、癌や中枢神経系疾患などの各種病態においても高発現することが知られている一方で、COX-2 の生体における発現や分布、疾患との関連や病態時に果たす役割など未だ不明な点も多い。これらの課題を解明するため、COX-2 の発現や分布を *in vivo* において非侵襲的に画像化可能なイメージング剤の開発がこれまで多く試みられてきた。特に脳に存在する COX-2 の発現や分布の解析は、生体組織検査できない部位という理由だけでなく、中枢神経系疾患との関連も深いという意味でも重要であると考えられる。しかしながら、脳に存在する COX-2 の機能は未だ十分に解明されていない。

インドメタシンは広く用いられている non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)のひとつであり、そのカルボキシ基の存在ゆえに脳移行性は低い。しかしそのカルボキシ基にエステルあるいはアミド結合により側鎖を導入することで良好な生体内分布を示す可能性が示唆されただけでなく、COX-2 阻害活性が格段に増加し、高い COX-2 選択性を有するようになるという報告がなされた。さらにインドメタシン構造中 5 位のメトキシ基は ^{11}C 標識が可能であると予想され、PET イメージング剤として発展し得ると期待できる。

ニメスリドは広く用いられている COX-2 選択的阻害薬のひとつであり、経口投与後速やかに吸収され全身分布し、脳へも良好に移行することが薬物動態学試験において明らかにされた。また、ニメスリドの解熱作用は脳に存在する COX-2 の阻害に基づくとされている。脳移行という観点で見ると、ニメスリドは脳移行に適した脂溶性を有するうえに、*in vitro* 評価によって、薬物の静脈内投与後の脳への取り込みを制限しうる排出トランスポーターである P-糖タンパク質(P-gp)の基質ではないことが示された。このことからニメスリドの挙動は脳を標的としたイメージング剤として大いに期待できる。ニメスリドおよびその誘導体の構造学的解析から、ニメスリドのフェノキシ基への修飾は COX-2 阻害活性および選択性に直接的な影響はないと予想され、ここに放射性同位元素標識可能な官能基を導入することで有用な COX-2 イメージング剤として期待できると考えられる。

以上の背景を基に、本研究では脳に存在する COX-2 を標的とした新規イメージング剤の開発を目的として、COX-2 阻害剤である NSAIDs を母体骨格とした 12 化合物を設計し、合成および評価を行った(**Figure 1**)。

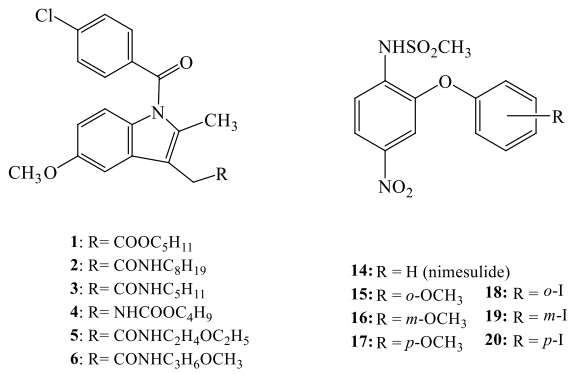


Figure 1 structure of target compounds **1-6, 14-20**

【方法・結果・考察】

第１章　COX-2 を標的としたインドメタシン誘導体の合成および *in vitro*/*in vivo* 評価

１．非標識体および標識前駆体の合成

標品、および標識前駆体の原料とすることを目的に、非標識体 6 化合物の合成を行った。

既知化合物である **1** および **2** は既報に従い合成した。アミド誘導体 **3**,**5**,**6** は化合物 **2** の合成法に従い、各種アミンの導入により得た。カルバメート誘導体 **4** はインドメタシンを diphenyl-phosphoryl azide によって酸アジド体とし、続くクルチウス転移反応によりイソシアネート体へと変換させ、これを 1-butanol と反応させることで得た。いずれの化合物も十分な量、収率(46-89%)にて得られた。

^{11}C 標識前駆体として、各化合物のフェノール体(脱メチル体)の合成を行った。化合物 **1-4** の標識前駆体 **7-10** は、三臭化ホウ素を用いた脱メチル化反応により得た。一方、側鎖中にエーテル結合を持つ化合物 **5**,**6** の標識前駆体 **12**,**13** は、インドメタシンを脱メチル化した化合物 **11** を合成の中間体として、各種アミンをアミド結合させることで得た。いずれの化合物も十分な量、収率(34-92%)にて得られた。

２．COX 阻害活性評価

各化合物の *in vitro* COX 阻害活性およびアイソザイム選択性を評価した(**Table 1**)。

合成、評価した 5 化合物のうち、炭素鎖が 5 のアミド化合物 **3** の COX-2 阻害活性・選択性が最も高く、臨床使用されているセレコキシブより COX-2 阻害活性・選択性が高い結果となった。また一方で、カルバメート誘導体である化合物 **4** は COX-1, COX-2 いずれに対しても阻害活性は認められなかった。

Table 1 COX inhibitory activity of **2-6**, and reference

Compound	IC_{50} (μM)[a]		Selectivity[b]
	COX-1	COX-2	
2	> 100	0.21	> 476
3	> 100	0.039	> 2564
4	> 100	> 100	―
5	> 100	2.35	> 42
6	> 100	2.10	> 47
Celecoxib	> 100	0.56	> 178
Indomethacin	0.79	11.8	0.067

[a] Data derived from colorimetric inhibition screening assay. [b] Ratio of $IC_{50(COX-1)}$:$IC_{50(COX-2)}$.

３．^{11}C 標識合成

合成した 6 化合物のうち、COX-2 阻害活性・選択性を示した 5 化合物 **1-3**,**5**,**6** の ^{11}C 標識合成を行った。^{11}C 標識合成はアセトン中、標識前駆体としての脱メチル体 **7-9**,**12**,**13** に対し、室温条件、塩基として NaOH 存在下で[^{11}C]メチルトリフレートを吹き込むことにより行い、[^{11}C]-*O*-メチル化体を得た。精製は HPLC により行い、いずれの ^{11}C 標識体も十分な量、比放射能、純度にて得られた。

４．脂溶性評価

脂溶性評価として、^{11}C 標識化合物 5 種の 1-オクタノール－生理的リン酸緩衝液分配係数(log$P_{7.4}$)を求めた。log$P_{7.4}$ 値はそれぞれ 1.98-3.94 の範囲であり、いずれも各々の構造に応じた脂溶性を示した。

５．生体内分布評価

^{11}C 標識インドメタシン誘導体の *in vivo* における挙動を評価するため、雄性 ddY マウスを用いた生体内分布実験を行った。各化合物の全脳への取り込み量は低く、投与後 1 分において[^{11}C]**2** で最も低く 0.18% injected dose (ID)/g であり、最も高い[^{11}C]**6** でも 1.84%ID/g であった。これらの値は各化合物の脂溶性(log$P_{7.4}$)との間に逆相関(r^2 = 0.90, p = 0.01)が認められ(**Figure 2**)、血液から脳への初回分布を反映しているものと考えられる。

各種 COX-2 阻害剤を用いた阻害実験では、いずれの阻害剤においても[^{11}C]**1**,**2**,**5**,**6** の全脳への集積および脳血液比に対する有意な阻害は認められなかった。その一方で、[^{11}C]**3** のセレコキシブあるいは NS-398 による阻害においておよそ 15%の減少と、わずかながら有意な阻害が認められ、COX-2 由来の特異結合を示唆する結果となった(**Figure 3**)。

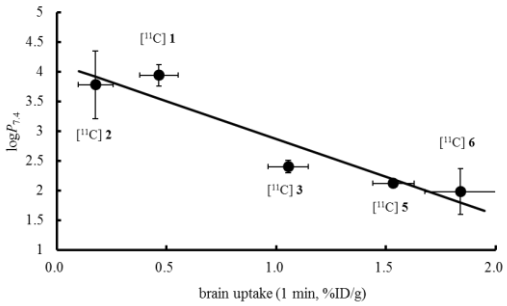


Figure 2 relationship between lipophilicity (log$P_{7.4}$) and mouse brain uptake (%ID/g) at 1 min after injection of the ^{11}C-COX inhibitors

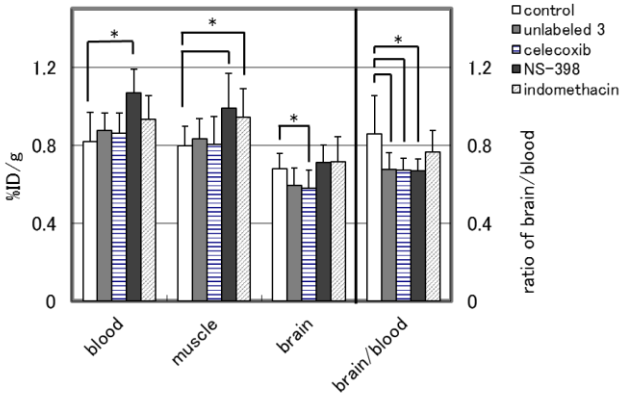


Figure 3 Effects of co-injection of the COX inhibitors on the tissue distribution of radioactivity at 30 minutes after intravenous injection of [^{11}C] **3** into ddY mice.(n=5, *P<0.05)

６．血漿中および脳中での代謝

^{11}C 標識インドメタシン誘導体の *in vivo* における代謝について、マウスを用いて評価した。

血漿中の[^{11}C]**1** を HPLC 分析した結果、未変化体の存在は認められず、1 つの極性分子由来のピークが確認された。このピークの HPLC 保持時間はインドメタシンのものと一致していることから、血漿中で加水分解を受けている可能性が高いと考えられる。他 4 化合物の血漿中では、14-32%の放射能が未変化体として確認されたほか[^{11}C]インドメタシンを含む複数の代謝体の存在が認められた。

脳を用いた評価では、9-26%の放射能が未変化体として確認されたほか、[^{11}C]インドメタシンおよび未知の代謝体の 2 種類が放射能を持つ代謝体として検出された。^{11}C 標識インドメタシン誘導体の脳取り込みの低さは、血漿中や脳中での著しい代謝による可能性が高いためと考えられる。

７．P 糖タンパク質の寄与

^{11}C 標識インドメタシンアミド誘導体[^{11}C]**2**,**3**,**5**,**6** に対する P-gp の寄与を調べるため、P-gp 阻害剤である Cyclosporine A(CysA)を用いた *in vivo* 生体内分布評価を行った(**Table 2**)。いずれの化合物も CysA の影響が認められる結果となり、^{11}C 標識インドメタシン誘導体の脳への移行は、P-gp が関係する何らかの影響を受けているものと推測される。

Table 2 CysA-to-control ratio of compounds

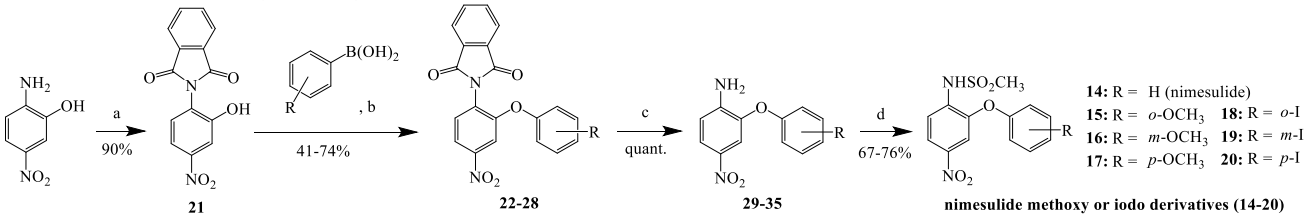
Compound	Brain uptake	Brain-to-blood ratio
[^{11}C]**2**	3.88*	2.76*
[^{11}C]**3**	1.46**	1.05
[^{11}C]**5**	1.52	1.39
[^{11}C]**6**	2.13**	1.94**

*p<0.05 and **p<0.01 (Student's t-test)

第２章　COX-2 を標的とした新規ニメスリド誘導体の合成及び *in vitro* 評価

１．合成

ニメスリドの合成法は米国特許として既に報告されているが、本研究では誘導体化を目的として新規合成経路を確立した(**Scheme**)。いずれの化合物も十分な量、収率にて得られた。



Scheme synthesis scheme for nimesulide derivatives **14-20**

Reagents and conditions: (a) phthalic anhydride, AcOH, reflux, 6 h; (b) $Cu(OAc)_2$, dry pyridine, pyridine *N*-oxide, MS4Å, dry CH_2Cl_2, O_2, rt, 72 h; (c) hydrazine monohydrate, MeOH, reflux, 6 h; (d) (1) CH_3SO_2Cl, dry Et_3N, dry CH_2Cl_2, rt, 23 h, (2) 3 M NaOHaq, 90°C, 16 h.

２．物理化学的性質

ニメスリド誘導体の物理化学的性質として、log$P_{7.4}$ および酸解離定数(pK_a)を求めた。メトキシ誘導体 **15-17** は log$P_{7.4}$ = 1.26-1.65、pK_a = 6.87-7.07、ヨウ素誘導体 **18-20** は log$P_{7.4}$ = 2.11-2.77、pK_a = 6.57-6.89 と位置異性体それぞれで類似した値を示し、**18-20** は脂溶性の点で、**15-17** は酸性度の点でニメスリドと多少の違いは認められるものの、いずれの化合物も良好な脳移行が期待できる結果が得られた。

３．COX 阻害活性評価

ニメスリド誘導体の COX 阻害活性およびアイソザイム選択性を評価した(**Table 3**)。

メトキシ誘導体およびヨウ素誘導体いずれにおいても、パラ位に置換基を導入した化合物 **17** および **20** に COX-2 阻害活性及び選択性が認められた。特に **20** の COX-2 に対する IC_{50} は 0.47 μM であり、セレコキシブと同等の COX-2 阻害活性を示した。その一方でオルト、メタ位に置換基を導入した **15**,**16**,**18**,**19** では 100 μM 以上の濃度においてさえ、COX-1 および COX-2 いずれに対しても阻害活性が認められなかった。

Table 3 COX inhibitory activity of **14**,**17**,**20**

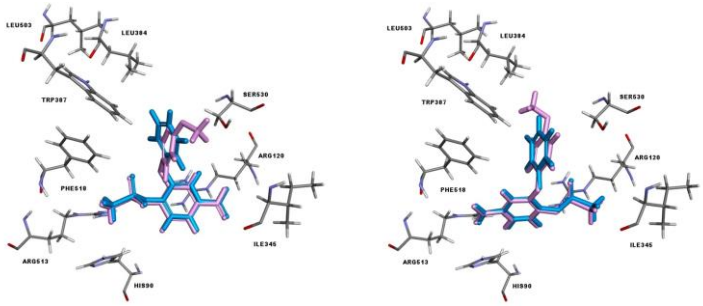
Compound	IC_{50} (μM)[a]		Selectivity[b]
	COX-1	COX-2	
14 (nimesulide)	> 100	1.92	> 52
17	> 100	2.31	> 43
20	> 100	0.47	> 213

[a] Data derived from colorimetric inhibition screening assay. [b] Ratio of $IC_{50(COX-1)}$:$IC_{50(COX-2)}$.

４．COX-2 結合シミュレーション

ニメスリド誘導体の COX-2 活性部位における構造活性相関を評価するため、Discovery Studio 4.0 を用いて化合物の COX-2 に対する結合シミュレーションを行った。

COX-2 阻害活性を有する **17** もまた、ニメスリド同様に 2 つの pose を示し、かついずれの配置もニメスリドと重なる結果となった。そのため **17** がニメスリドと同等の阻害活性を有するのは、COX-2 に対しニメスリドと同じ pose を取り得るからだと考えられる。



lateral mode　　inverse mode

Figure 4 depiction of two modes of nimesulide and **17**

その一方で **20** の COX-2 に対する適切な pose は得られておらず断定できないが、多くのタンパクーリガンド結合において報告されるハロゲン結合の影響により結合エネルギーが安定化し、高い COX-2 親和性を示した可能性が考えられる。

５．*In vitro* 単層膜輸送評価

ニメスリド誘導体の脳移行に対する P-gp の寄与を調べるため、Caco-2 細胞を用いた *in vitro* 単層膜輸送評価を行った。評価に使用した Caco-2 細胞培養条件において、RT-PCR により P-gp の mRNA 発現量を求めたところ、培養開始時に比べ約 3.4 倍の mRNA 発現が確認された。

ニメスリド誘導体の 1 μM および 10 μM における apical および basolateral 相互の透過係数($P_{app\ A\to B}$、$P_{app\ B\to A}$)および移行の比(efflux ratio)を求めたところ effux ratio がいずれも１以下となった。

また、合成した化合物のうち COX-2 阻害能を示した **14**,**17**,**20** に関して、P-gp の阻害剤であるベラパミル(500 μM)存在下で同様の評価を行った。Positive control として用いた rhodamine123 (5 μM)では、ベラパミル非存在下では 17.16 であった efflux ratio が 500 μM ベラパミル存在下において 0.71 まで有意に減少した。その一方で、**14**,**17**,**20** はいずれもベラパミル存在下において有意な変化が認められなかった。

これらの結果から、ニメスリド誘導体は P-gp による排出の影響を受けず、そのうえ高い膜透過性を示すことが期待できた。これは脳を標的としたイメージング剤の開発にとって朗報である。

６．*In vitro* 安定性評価

ニメスリド誘導体の *in vitro* における安定性について、マウス血漿を用いて評価した。37°C にて 1, 10, 30, 60, 120 分間のインキュベーション後の未変化体量を HPLC の UV 検出によって求め、内標準物質であるチオウレアの検出ピーク強度によって補正した。評価した化合物はいずれも安定で、120 分間のインキュベーション後においても 95%以上の未変化体が確認され、その他代謝物の存在は認められなかった(**Figure 5**)。放射標識体を用いたさらなる評価が必要ではあるが、*in vivo* においても十分な安定性を有することが期待される。

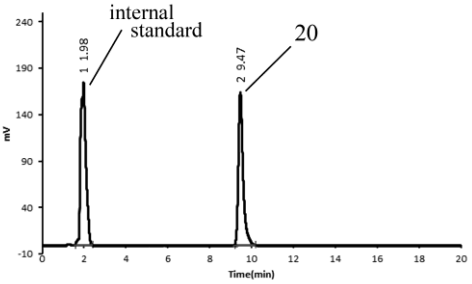


Figure 5 representative HPLC spectrograms of **20** and the internal standard (120-min)

【結論】

本研究では脳に存在する COX-2 を標的とした新規イメージング剤の開発を目指して、NSAIDs のうちインドメタシンおよびニメスリドに着目し、誘導体化し評価を行ってきた。インドメタシン誘導体に関しては、導入する側鎖長や結合様式により COX-2 阻害活性が大幅に異なることを明らかとした。いずれも ^{11}C 標識に成功し、インドメタシンは PET イメージング剤として発展させられ得る母体骨格だということが分かる。^{11}C 標識体を用いたマウス *in vivo* 生体内分布では、いずれも脳取り込み量は低いという結果であったが、投与 1 分後の脳取り込み量と化合物の脂溶性との間に逆相関が認められたことから、脂溶性を基に BBB 透過性を推測し得る可能性を見出した。脳における[^{11}C]標識インドメタシン誘導体の挙動には COX-2 分布を反映するような特異結合は認められなかったが、比較的低い脂溶性を示しかつ高い COX-2 阻害活性および選択性を示す[^{11}C]**3** に関してはわずかながら有意な阻害が見られた。有用な COX-2 イメージング剤開発には脳取り込み量および代謝安定性の向上が今後の課題だと考えられる。

インドメタシン誘導体の研究結果を受け、脳取り込み量および代謝安定性の向上を期待した新規ニメスリド誘導体 **15-20** を設計し、新規合成経路の確立に成功した。**15-20** の物理化学的性質はいずれもニメスリド自身と類似しており、**15-20** もまたニメスリド同様良好な生体内分布を示すことが期待される。パラ位に置換基を有する **17** および **20** において COX-2 阻害活性及び選択性が認められ、計算化学によりその構造活性相関に一定の考察を得た。*In vitro* 単層膜輸送評価において **14-20** は高い膜透過性を示したうえ、P-gp による影響は否定された。さらに **14-20** のマウス血漿中での *in vitro* 安定性は良好であり、代謝安定性についても期待できる。本研究ではニメスリド誘導体 **15-20** の標識合成には至っていないが、今後放射性同位元素で標識することでさらなる評価を重ねてゆきたい。

【発表論文】

Yamamoto, Y.; Toyohara, J.; Ishiwata, K.; Sano, K.; Yamamoto, F.; Mukai, T.*; Maeda, M.* *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* **2011**, *59*, 938–946.

Yamamoto, Y.*; Hisa, T.; Arai, J.; Saito, Y.; Yamamoto, F.; Mukai, T.; Ohshima, T.; Maeda, M.; Ohkubo, Y. *Bioorg. Med. Chem.* **2015**, *23*, 6807–14.

Yamamoto, Y.*; Arai, J.; Hisa, T.; Saito, Y.; Mukai, T.; Ohshima, T.; Maeda, M. ; Yamamoto, F. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 3727–33.