

学位論文要旨

脳内移行性のあるメラニン凝集ホルモン 1 受容体拮抗薬の開発研究

岸野 博之

近年のライフスタイルの変化により、日本や欧米の先進国では肥満は増加傾向にある。肥満に加えて、高血圧、脂質異常及び糖尿病のうちいずれか2つ以上を持つとメタボリックシンドロームと診断され、心血管疾患や脳血管疾患の発症リスクが高くなることが報告されている。肥満の改善には運動療法や食事療法が第一であるが十分な効果が得られないこともある。こうした背景のもと、肥満を治療・予防する抗肥満薬の開発が創薬ターゲットの1つとして注目されている。

メラニン凝集ホルモン (Melanin-Concentrating Hormone: MCH) は19残基のアミノ酸からなる環状の神経ペプチドであり、哺乳類では視床下部外側野及び不確帯に局在しており摂食やエネルギー消費に関与していると考えられている。MCH 受容体に関しては、哺乳類では1型受容体 (MCH1R) 及び2型受容体 (MCH2R)、げっ歯類では MCH1R のみが脳内に存在している。MCH2R の機能は明らかになっていないものの、哺乳類では MCH1R は摂食に関与する視床下部に多く発現しているのに対して、MCH2R は海馬や扁桃に発現しており視床下部での発現が低いため摂食に関与している可能性は低いことが示唆されている。MCH をラット脳室内に急性投与すると摂食の亢進が観察され、慢性投与すると過食を伴って肥満を呈する。一方 MCH1R 欠損マウスは、野生型マウスに比べて代謝が亢進し体脂肪が減少しており、高脂肪食を与えても肥満を呈しないことが観察されている。さらに MCH1R 欠損マウスの脳室内に MCH を慢性投与しても過食や肥満を呈しないことが報告されている。高脂肪食摂取により食事性肥満を呈したマウス又はラットの脳室内にペプチド性又は非ペプチド性 MCH1R 拮抗薬を慢性投与すると、摂食が抑制され体重が減少することが報告されている。これらの非臨床試験の結果から、MCH は MCH1R を介して摂食及びエネルギー代謝を調節していることが示唆され、MCH 及び MCH1R は肥満に深く関与していると考えられることから、新たな抗肥満薬の開発を目的として MCH1R 拮抗薬の開発研究を開始した。

ハイスループットスクリーニングにより、ユニークな構造を持つスピロピペリジンウレア化合物が MCH1R に対する阻害活性を示すことが発見された。本化合物はアドレナリン α_{1A} 受容体に対しても阻害活性を有していたため、MCH1R 選択的な化合物の誘導化を行った。その結果、ウレア結合からアミド結合へ、側鎖の置換基をフェニル基から5員環複素環へ変換することにより、MCH1R に対する阻害活性及び選択性が改善された化合物を見出すことができた。さらにアミド結合部位の置換基及びスピロピペリジン骨格の誘導化を行うことにより、ヒトの P-gp の基質ではなく、かつ MCH1R に対する非常に高い阻害活性及び選択性を示す化合物を見出すことができた。しかしながら、スピロピペリジン化合物は代謝安定性が低いため、ラットでの *in vivo* 薬効評価を実施することができなかった。

代謝安定性の改善を目的として新たなリード化合物の探索を行った結果、2-アミノベンズイミダゾール化合物が MCH1R に対する阻害活性を示し、かつ脂溶性及び代謝安定性が改善されることが明らかになった。2-アミノベンズイミダゾール化合物はスピロピペリジン化合物と同様に塩基性を有しており、MCH1R に対して親和性を示すためには塩基性が必須であることが示唆された。ベンズイミダゾールの2位の誘導化を行った結果、メチルイソプロピルアミンのような分枝鎖アミンが MCH1R に対する高い阻害活性を示すことを見出した。2-アミノベンズイミダゾール化合物のジヒドロシナミル基をビアリール基へ変換することにより代謝安定性が改善し、ビアリール基の内部フェニル基をピラジン環へ変換することにより MCH1R に対する高い阻害活性と良好な代謝安定性を示し、かつ良好な薬物動態及び脳内移行性を示す化合物を見出すことができた。2-アミノベンズイミダゾール化合物を用いた *in vivo* 薬効評価試験の結果、MCH による摂食促進作用を抑制することが認められ、MCH1R 拮抗薬の Proof of Concept を立証することができた。

さらに高い脳内移行性を示す化合物の探索を目指して、リピンスキーの rule of five の概念を参考にして化合物の誘導化を行った結果、MCH1R に対する阻害活性を示すイミダゾ [1,2-*a*] ピリジン化合物を見出すことができた。イミダゾ [1,2-*a*] ピリジン化合物は、2-アミノベンズイミダゾールと同程度の塩基性を有しており、2-アミノベンズイミダゾールに比べてドナー数 (NH 数) が1つ少ないため脳内移行性の改善が期待できると考えられた。イミダゾ [1,2-*a*] ピリジンの2位の誘導化を行った結果、低級アルキル基が MCH1R に対する阻害活性を示すことを見出した。3位の誘導化の結果、置換基の立体構造を大きくするにつれて MCH1R に対する阻害活性が低下し、唯一メチル基が MCH1R に対する阻害活性を示した。2又は3位に低級アルキル基を有するイミダゾ [1,2-*a*] ピリジン化合物は脂溶性が高いため、ビアリール部位を親水性の複素環へ変換することにより化合物全体の脂溶性低下を検討した。その結果、ビアリール部位の脂溶性を低下すると、3位無置換のイミダゾ [1,2-*a*] ピリジン化合物では MCH1R に対する阻害活性も低下した。しかしながら、イミダゾ [1,2-*a*] ピリジン化合物の3位にメチル基を置換すると、ビアリール部位の脂溶性を低下しても MCH1R に対する阻害活性を維持することが明らかになった。中でもフェニルピリジン基を有する化合物は、MCH1R に対する高い阻害活性と良好な代謝安定性を示し、かつ良好な薬物動態と脳内移行性を示すことが明らかになった。イミダゾ [1,2-*a*] ピリジン化合物を用いたラットの *in vivo* 薬効評価試験を実施した結果、2-アミノベンズイミダゾール化合物と同様に MCH による摂食促進作用の抑制が認められ、10 mg/kg の低用量でも有意に摂食が抑制されることが明らかになった。さらに肥満マウスモデルを用いた自発的な摂食抑制試験の結果、10 mg/kg を1日1回経口投与すると自発的な摂食量が低下し、7日間連続投与すると体重が減少する傾向が観測された。

以上のように、著者はリード化合物が抱える課題を解決することにより脳内移行性を示すイミダゾ [1,2-*a*] ピリジン化合物を見出すことに成功した。イミダゾ [1,2-*a*] ピリジン化合物を用いた薬効評価試験では、摂食量の低下及び体重減少の傾向が認められた。これらの結果から MCH1R 拮抗薬であるイミダゾ [1,2-*a*] ピリジン化合物は、新規抗肥満薬として有望であることが示唆される。

Research and development of brain penetrable melanin-concentrating hormone 1 receptor antagonists

Hiroyuki Kishino

With changing a life style in recent years, obesity is increasing in Japan and western countries as well as developed country. If individual has any two or more than two out of hypertension, dyslipidaemia and diabetes in addition to obesity, it will be diagnosed as metabolic syndrome, and it has been reported that the onset risk of cardiovascular disease or a cerebrovascular disease increase. Although the exercise cure and dietary therapy are efficacious to improve the obesity, insufficient efficacy may be achieved. Therefore, the development of anti-obese agent for the treatment and prevention of obesity is remarkable as one of the drug development target.

Melanin-concentrating hormone (MCH) is a cyclic nonadecapeptide mainly expressed in the lateral hypothalamus and zona incerta region of the brain in mammals. MCH is believed to play an important role in the regulation of food intake and energy homeostasis. MCH1 receptor (MCH1R) and MCH2 receptor (MCH2R) are expressed in the brain in mammals whereas only MCH1R is expressed in the brain in rodents. Although the functional role of MCH2R is not well defined so far, MCH1R is highly expressed in hypothalamus related to food intake while MCH2R is predominantly expressed in hippocampus and amygdala, and less expressed in hypothalamus. Therefore MCH2R is indicated to be lower related to food intake. It was reported that acute injection of MCH into brain in rats increased food intake and chronic injection of MCH into brain in rats were hyperphagic and led to obesity. MCH KO mice led to decreased adiposity and increased energy expenditure compared with wild-type mice. On the other hand, it was reported that no obesity was observed in MCH KO mice fed on a high-fat diet, and chronic injection of MCH into brain in MCH KO mice did not result in hyperphagia and obesity. Chronic injection of peptide/non-peptide MCH1R antagonists into brain in diet-induced obese rats or mice led to decrease in food intake and body weight. These non-clinical studies indicate that MCH control the food intake and energy homeostasis via MCH1R and is highly related to obesity. Therefore, I decide to start the development of melanin-concentrating hormone 1 receptor antagonists for the treatment of obesity.

A novel spiro-piperidine urea compound with MCH1R antagonist activity was identified by high-throughput screening (HTS). As this compound showed the inhibitory activity against human α_{1A} -adrenoceptor as well as MCH1R, I started the modification of spiro-piperidine urea compound so as to reduce the human α_{1A} -adrenoceptor activity and enhance MCH1R antagonist activity. Urea bond and phenyl group at the side chain in the spiro-piperidine urea compound were replaced with amide bond and 5-membered heterocycles. These modifications were successfully improved in MCH1R antagonist activity and selectivity. Subsequent modification of substituent on the N-atom at the amide bond and spiro-piperidine core led to the identification of compounds with highly improved, selective and non-P-gp substrate MCH1R antagonist. However spiro-piperidine amide compounds exhibited poor metabolic stability against microsomal hepatocyte in rats and unfortunately were unable to evaluate *in vivo* pharmacological study in rats.

In order to discover the newly lead compound with enhanced metabolic stability, we reevaluated and modified the identified compounds from HTS. As a result, 2-aminobenzimidazole compounds were identified to show the good MCH1R antagonist activity, and improve lipophilicity and metabolic stability in rats. This result indicates that basicity is indispensable to show the MCH1R antagonist activity because both 2-aminobenzimidazole compounds and spiro-piperidine compounds contain the basicity in their compounds. The modification of 2-aminobenzimidazole at 2-position resulted that branched-chain amine such as N-methyl-isopropylamine showed high MCH1R antagonist activity. Replacement of dihydrocinnamyl moiety at 2-aminobenzimidazole compounds with biaryl group improved metabolic stability, and compound with pyrazine ring at the biaryl moiety exhibited high MCH1R antagonist activity, moderate metabolic stability, good pharmacokinetic profiles and brain penetrability. It was observed that oral dose of 2-aminobenzimidazole compounds in rats suppressed the MCH-induced food intake. Therefore, the proof of concept for MCH1R antagonist was demonstrated.

In order to discover higher brain penetrable compound, we conducted further modification based on the concept of the “rule of five” reported by Lipinski and identified imidazo[1,2-*a*]pyridine compound with MCH1R antagonist activity. Imidazo[1,2-*a*]pyridine compound had comparable basicity with 2-aminobenzimidazole and reduced the number of hydrogen donor compared with 2-aminobenzimidazole, thereby improvement in brain penetrability was expected. Modification of imidazo[1,2-*a*]pyridine resulted that compounds with small alkyl groups at 2-position showed MCH1R antagonist activity and only methyl group at 3-position was acceptable. Further replacement of biaryl moiety with hydrophilic heterocycles were performed so as to reduce the lipophilicity of imidazo[1,2-*a*]pyridine compounds because imidazo[1,2-*a*]pyridine compound with small alkyl group at 2- and 3-position were highly lipophilic. In case of imidazo[1,2-*a*]pyridine compound with hydrogen atom at 3-position, introduction of hydrophilic heterocycles into biaryl moiety resulted in loss of MCH1R antagonist activity. However MCH1R antagonist activity was recovered when methyl group was introduced into imidazo[1,2-*a*]pyridine compounds at 3-position even though hydrophilic heterocycles were introduced into biaryl moiety. Imidazo[1,2-*a*]pyridine compound with phenylpyridine moiety exhibited high MCH1R antagonist activity, moderate metabolic stability, good pharmacokinetic profiles and brain penetrability. It was observed that oral dose of imidazo[1,2-*a*]pyridine compounds in rats suppressed the MCH-induced food intake likewise 2-aminobenzimidazole and lower dose at 10 mg/kg of compound significantly suppressed the MCH-induced food intake. Furthermore, chronic oral dose of imidazo[1,2-*a*]pyridine compounds at 10 mg/kg q.d. in diet-induced obese mice observed decrease in spontaneous food intake and oral dose for 7 consecutive days showed decrease in body weight. In conclusion, the author successfully identified brain penetrable imidazo[1,2-*a*]pyridine compounds which exhibited the suppression of food intake and decrease in body weight in *in vivo* pharmacological study. These results indicate that imidazo[1,2-*a*]pyridine compounds for MCH1R antagonist are promising drug candidates for the treatment of obesity.

論文審査の結果の要旨

先進国では肥満が増加傾向にあり、肥満と高血圧症や糖尿病などの生活習慣病が合併すると、重篤な心疾患や脳血管疾患を引き起こすリスクが高まることが指摘されている。運動や食事療法のみでは十分な肥満改善効果が得られないこともあり、肥満を効果的に改善する抗肥満薬の開発が求められている。

脳内の視床下部に局在するメラニン凝集ホルモン (Melanin-Concentrating Hormone: MCH) は19残基のアミノ酸から成る神経ペプチドで、MCHが結合する受容体には1型 (MCH1受容体: MCH1R) と2型が知られている。MCHの生物学的機能については不明な点も多いが、MCH1R欠損マウスでは肥満が見られない。さらにMCH1R欠損マウスにMCHを投与しても肥満を呈せず、一方、肥満マウスにMCH1R拮抗薬を投与すると摂食や体重減少が認められることから、MCH1Rは摂食及びエネルギー代謝に深く関与していることが示唆されている。この生理作用に基づいて、本博士論文ではMCH1R阻害剤の開発による新しい抗肥満薬の創製を目指している。

論文は、構造活性相関に基づいたMCH1R阻害活性を有する化合物探索とその生物学的評価が研究課題であり、論文内容は第1章、第2章および第3章から構成されている。第1章では、ハイスループットスクリーニングにより見出されたリード化合物を基に、副作用であるアドレナリン α_{1A} 受容体阻害活性の低減に加えて脳内移行性に富む化合物探索が行われ、代謝安定性が評価されている。第2章では、第1章とは異なる別のリード化合物を基に、脂溶性の高さに起因する他の生体分子への非特異的結合活性の低減ならびに代謝安定性の改善を目指した化合物探索が行われ、ラットによる摂食抑制が評価されている。第3章では、より優れた脳内移行性を示すMCH1R阻害活性化合物の探索が行われ、自発性摂食抑制が評価されている。以下に、各章の実験項目とその結果および考察とともに審査内容の概要を纏めた。

第1章では、スピロピペリジンウレア化合物をリード化合物として、同化合物中のウレア基にメチル基、スピロインダン骨格に酸素原子を、側鎖のジアリール基にはフッ素原子とメチル基を導入することで、アドレナリン α_{1A} 受容体阻害活性を殆ど発現させずに、MCH1Rに対して高い選択性で阻害活性作用を示す化合物が得られている。さらにウレア基をアミド基に置換して、側鎖にフェニル基やピラゾール基を導入することで、脳内排出トランスポーターの作用を受け難いことが予想される化合物が得られている。一方で得られた化合物の肝ミクロソームを用いた代謝安定性試験では、いずれも代謝安定性が乏しいことを明らかにした。構造活性相関に基づいた、有機合成手法による複雑な化合物の誘導化が的確に実施されており、スピロピペリジンウレア骨格が代謝され易い構造であることを明らかにしたことは評価される。代謝安定性を改善する化合物探索が次の課題であることも明確にしている。

第2章では、2-アミノキノリン化合物をリード化合物として、2-アミノベンズイミダゾール骨格に変換することで脂溶性を低下させ、さらにアミノ基とジヒドロシナミル基を誘導化することで、他の生体分子への非特異的結合性の低減が図られ、優れた代謝安定性を

有する化合物を得ることに成功している。この化合物のラットを用いた摂食抑制試験では、自発性摂食抑制効果は認められないものの、MCH 誘発による摂食においては 10 mg/kg の経口投与で 32%、30 mg/kg で 72%と摂食量が減少し、用量依存的な摂食抑制が見られることを明らかにした。リード化合物の脂溶性に着目することによって、他の生体分子への非特異的結合性の低減ならびに代謝安定性の大幅な向上を達成している。また、得られた化合物を用いたラットへの経口投与試験では、MCH 誘発による摂食の抑制が確認されるまでに至っている。

第3章では、リピンスキーの rule of five の概念に基づいて、ベンズイミダゾール化合物の誘導化を検討して、MCH1R 阻害活性と代謝安定性がともに高く、かつ優れた脳内移行性を有するイミダゾ[1,2-a]ピリジン骨格を持つ化合物の創製に成功している。これをラットに 10 mg/kg を経口投与すると自発性摂食の抑制と体重の減少傾向を示すとともに、30 mg/kg で MCH 誘発による摂食の完全な抑制が起きることを明らかにした。自発性摂食抑制を促進する MCH1R 阻害剤開発まで到達しており、今後の実用化に向けての発展が大いに期待される結果を得ている。

以上、本論文は、MCH1R 阻害活性に基づく新しい抗肥満薬の開発を目指し、2つのリード化合物から構造活性相関に基づいた、有機合成手法によって特異的阻害活性や代謝安定性、さらには脳内移行性に優れた MCH1R 阻害活性化合物の創製を達成している。MCH 誘発による摂食の抑制や、さらには自発性摂食の抑制をもたらす薬理効果があることを実証した。MCH1R 阻害剤が今後の抗肥満薬開発の新しいターゲットと成り得るという有用な知見を提供している。新規性が認められる本論文は、その独創性および研究意義の観点から、本研究科課程によらない博士（薬科学）の論文に十分に値するものであると判断した。