

| | |
|-----------|--|
| 氏名（本籍） | 金 澤 奨 勝（東京都） |
| 学 位 の 種 類 | 博 士（工学） |
| 学位授与番号 | 甲第 9 号 |
| 学位授与日付 | 平成 23 年 6 月 30 日 |
| 専 攻 | 創薬科学専攻 |
| 学位論文題目 | アロディニア誘発に関わる受容体探索及び機能解明のための分子プローブ の創製 (Synthesis of an acromelic acid analog-based PET tracer for exploration of the site of action of acromelic acid in allodynia induction) |
| 学位論文審査委員 | (主査) 教 授 北 出 幸 夫 (副査) 教 授 丹 羽 雅 之 (副査) 准教授 古 田 享 史 (副査) 教授 鈴 木 正 昭 |

論文内容の要旨

【背景・目的】

アロディニアは本来痛みとは感じない刺激で激痛を惹起する感覚異常であるが、その発症メカニズムは解明されていない。最近、ドクササコの成分の一つであるアクロメリン酸をマウス髄腔内へ投与することによりアロディニアが引き起こされることが見いだされた。このアクロメリン酸によるアロディニア誘発の作用機序を解明することができれば、アロディニア治療薬の開発に重要な手がかりを与えるものと期待される。そこで、本研究ではアクロメリン酸のアロディニア誘発に関わる標的受容体の同定を目的に、その発現部位を探索するための分子プローブの創製を目指した。

【計画・方法】

アクロメリン酸受容体の探索には、*in vivo*において高感度に動態の解析が可能な陽電子放射断層画像撮影法 (PET) を活用することとした。このため、アクロメリン酸を基にした PET トレーサーを合成し、ラットでの全身スキャンおよび脳・脊髄切片を用いた *in vitro* ARG を行つて特異的結合部位を検索する。PET トレーサーに関しては、アクロメリン酸の直接の化学修飾が困難であるため、まず、アクロメリン酸と同等の活性を示し、分子プローブとしての構造修飾にも柔軟に対応できる新たな類縁体を創製したのち、陽電子放射核を導入することとした。

【結果】

PET プローブ化候補化合物としてアクロメリン酸のピロリジン環 4 位に置換フェノキシ基またはフェニルチオ基を導入した類縁体を設計し、4-ヒドロキシプロリン誘導体と置換フェノールまたはチオフェノールとの光延型カップリングを鍵反応として、約 10 工程、総収率約 5~20% で合成した。合成した化合物をマウス髄腔内へ投与しアロディニア誘発活性を検証した結果、フェノキシ型化合物 (POPA) はアクロメリン酸と同等の強いアロディニア誘発活性を示すことがわかった。一方、フェニルチオ型化合物 (PSPA) および POPA の C-4 エナンチオマー (*a*POPA) にはアロディニア誘発活性は認められなかったが、アクロメリン酸により誘発されるアロディニアを競合的に抑制する阻害剤として作用することが分かった。以上の結果から、POPA, PSPA, *a*POPA はアクロメリン酸受容体を探索するための PET プローブに適用できることが明らかとなった。

続いて、合成したアクロメリン酸類縁体のうち活性の高かった **PSPA-4**, **aPOPA-10** および **POPA-23** の **PET** プローブ化を検討した。いずれの化合物も芳香環上にメチル基を有するため、導入する陽電子放射核として ^{11}C 基を選択し、ヨウ化メチルとパラジウム触媒を用いる高速メチル化反応を適用することとした。なお、化合物はアミノ酸であり、これらの官能基は高速メチル化反応の効率を低下させる可能性が考えられたため、カルボキシ基とアミノ基を保護し、メチル化反応後に脱保護することとした。 ^{11}C の約20分という短い半減期からメチル化―脱保護は5分程度で行う必要があるため、アルカリ条件にて短時間で脱保護できるアミノ酸保護基としてメチルエステルとトリフルオロアセチル基を用い、二つの工程をワンポットで行えるルートを考案した。

まず、高速メチル化反応の前駆体となるホウ素体の合成を行った。**PSPA-4**, **aPOPA-10**, **POPA-23**のいずれについても、芳香環上のメチル基を臭素に置き換え、アミノ酸部位を上記のように保護した誘導体を合成し、Pd触媒を用いたビス(ビナコラート)ジボロンとのカップリング反応を行って対応するホウ素体を得た。合成した前駆体を用いて、コールド条件下で高速メチル化―脱保護反応を検討した。その結果、ホウ素体、 $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, $\text{P}(\sigma\text{-tolyl})_3$, K_2CO_3 のDMF溶液に CH_3I を加え、 100°C で5分間加熱、続いて溶液に直接2M水酸化ナトリウム水溶液を加えて1分間加熱、という条件で効率よく目的物が得られることがわかった。これによりワンポット高速メチル化―脱保護によるアクロメリン酸受容体探索**PET**トレーサーの合成法を確立することができた。

上記の手法を基に、実際の標識合成装置を用いた**PET**トレーサーの合成を行ない、**PSPA-4**, **aPOPA-10**, **POPA-23**のいずれについても**PET**研究に適用可能な十分な放射能量と純度(単離放射能量: $>2\text{ GBq}$, 純度: $>99\%$ (RI), $>99\%$ (UV))を有した標識体を得ることに成功した。続いて、合成した ^{11}C **PSPA-4**をラットに投与し**PET**による全身スキャンを行ったが、投与されたラベル化体は血流に乗り体内を循環した後、早い段階から尿路排泄されてしまい、特定の部位への集積や中枢への移行は確認することができなかった。また、作動薬型の ^{11}C **POPA-23**を用いた場合も同様な結果であった。そこで、ラットの脳と脊髄の切片を用いた *in vitro* ARG を行った。 ^{11}C **POPA-23**については非特異的な結合が多く解析が困難であったが、 ^{11}C **PSPA-4**においては、脳および脊髄にカイニン酸により阻害を受ける特異的結合部位を見出すことに成功した。

【結論】

本研究では、強力なアロディニア誘発作用を有するアクロメリン酸の構造を基に、機能性官能基の導入が容易でアクロメリン酸と同等の活性を示す作動薬および競合阻害剤を創製し、**PET**トレーサー化を検討した。ホウ素化合物を用いた高速メチル化反応と脱保護をワンポット、5分で行う反応条件を確立し、 ^{11}C 基を導入した高放射比活性を有する**PET**トレーサーの合成に成功した。また、阻害剤型**PET**トレーサーを用いた *in vitro* ARG 実験により、脳および脊髄に特異的結合部位を見出すことにも成功した。このトレーサーの集積部位にアロディニア誘発に関わる受容体が分布している可能性が考えられ、受容体同定とアロディニア誘発機序の解明に向けた重要な成果であると言える。また、本研究で開発した高速メチル化―脱保護をワンポットで行う手法は他の化合物の**PET**トレーサー合成にも適用可能であり、標識体合成の幅を広げるものである。

論文審査結果の要旨

難治性の神経障害性疼痛の治療薬開発に向けて、その主症状の一つであるアロディニアの発症・維持機

構の解明が重要な課題となっている。本論文では、毒茸ドクササコの成分であるアクロメリン酸がアロディニア誘発作用を示すとの知見をもとに、アクロメリン酸によって特異的に活性化されアロディニアを引き起こす新規受容体の同定及び機能解析を目的とした分子プローブの創製研究に取り組んでいる。

研究手法として、標的受容体の発現部位を *in vivo* で探索できる陽電子放射断層画像撮影法 (PET) を活用することとし、リガンドであるアクロメリン酸を基にした PET プローブを合成してラットでの動態解析を行い、特異的結合部位を検索する計画を立てている。まず、複雑な構造を持つアクロメリン酸を直接化学修飾して PET プローブ化することは困難であるため、アクロメリン酸と同等の活性を示し、分子プローブとしての構造修飾にも柔軟に対応できる新たな類縁体の創製を検討している。活性発現に必要なグルタミン酸骨格と放射核種の導入が可能な部位を有する類縁体として、アクロメリン酸のピロリジン環 4 位に置換フェノキシ基またはフェニルチオ基を導入した化合物を設計し、4-ヒドロキシプロリン誘導体と置換フェノールまたはチオフェノールとの光延型カップリングを鍵反応として、約 10 工程、総収率約 5~20% で 24 個の化合物を合成することに成功している。合成した化合物をマウス髄腔内へ投与しアロディニア誘発活性を検証した結果、フェノキシ型化合物 (POPA) がアクロメリン酸と同等の強いアロディニア誘発活性を示すこと、フェニルチオ型化合物 (PSPA) および POPA の C-4 エナンチオマー (*a*POPA) はアロディニア誘発活性を示さないが、アクロメリン酸により誘発されるアロディニアに対して阻害剤として作用することなどを見いだしている。以上の結果から、POPA, PSPA, *a*POPA はアクロメリン酸受容体を探索するための PET プローブに適用できることを明らかにしている。

次に、合成したアクロメリン酸類縁体のうち高い活性を示した POPA-23, PSPA-4, および *a*POPA-10 の PET プローブ化を検討している。いずれの化合物も芳香環上にメチル基を有するため、導入する陽電子放射核として [^{11}C]CH₃ 基を選択し、ヨウ化メチルとパラジウム触媒を用いる高速メチル化反応の適用を計画している。化合物がアミノ酸であり、これらの官能基が高速メチル化反応の効率を低下させる可能性を考慮し、カルボキシ基とアミノ基を保護し、メチル化反応後に脱保護する経路を設定している。 ^{11}C の約 20 分という短い半減期からメチル化-脱保護は 5 分程度で行う必要があるため、アルカリ条件にて短時間で脱保護できるアミノ酸保護基としてメチルエステルとトリフルオロアセチル基を用い、二つの工程をワンポットで行えるルートを考案している。まず、高速メチル化反応の前駆体となるホウ素体の合成を検討し、アミノ酸部位を保護し芳香環上のメチル基を臭素に置換した誘導体を合成したのち、Pd 触媒を用いたビス (ピナコラート) ジボロンとのカップリング反応を行う経路で、POPA-23, PSPA-4, *a*POPA-10 のいずれについても対応するホウ素体を得ることに成功している。続いて、合成した各前駆体を用いて非放射性条件下で高速メチル化-脱保護反応を検討している。その結果、ホウ素体、Pd₂(dba)₃, P(σ -tolyl)₃, K₂CO₃ の DMF 溶液に CH₃I を加え、100 °C で 5 分間加熱、続いて溶液に直接 2M 水酸化ナトリウム水溶液を加えて 1 分間加熱、という条件で効率よく目的物が得られることを見出している。これによりワンポット高速メチル化-脱保護によるアクロメリン酸受容体探索 PET プローブの合成法が確立されたことになる。

上記のワンポット法を基に、実際の標識合成装置を用いた PET プローブの合成を行ない、POPA-23, PSPA-4, *a*POPA-10, のいずれについても PET 研究に適用可能な十分な放射能量 (単離放射能量: >2 GBq) と純度 (>99%(RI), >99%(UV)) を有した標識体を得ることに成功している。続いて、合成した [^{11}C]PSPA-4 および [^{11}C]POPA-23 をラットに投与し PET による全身スキャンを行っている。その結果、投与されたラベル化体はいずれも血流に乗り体内を循環した後、早い段階から尿路排泄され、特定の部位への集積

や中枢への移行は確認されなかった。そこで、ラットの脳と脊髄の切片を用いた *in vitro* オートラジオグラフィを検討している。その結果、 $[^{11}\text{C}]\text{POPA-23}$ および $[^{11}\text{C}]\text{aPOPA-10}$ については非特異的な結合が多く解析が不可能であったが、 $[^{11}\text{C}]\text{PSPA-4}$ では脳および脊髄にカイニン酸により阻害を受ける特異的結合部位を見出すことに成功している。これらの結果から、創製した PET プローブの集積部位にアロディニア誘発に関わる受容体が分布している可能性が考えられ、今後の受容体同定とアロディニア誘発機序の解明に向けた重要な成果であると言える。また、これらの知見は、神経障害性疼痛の治療薬開発にも大いに寄与するものと考えられる。

以上に詳しく述べたように、本論文では強力なアロディニア誘発および抑制作用を示す新規化合物を各種合成するとともに、アロディニア誘発に関わる受容体を探索するための PET プローブの合成に成功し、ラット脳切片を用いた *in vivo* イメージング解析により脳・脊髄に特異的な結合部位が存在することを見いだしている。本知見はアロディニア病態の分子レベルでの解明に寄与するとともに、神経障害性疼痛の治療薬開発の可能性も示すものであり、この論文の有用性は極めて高いものと判断される。従って、審査の結果、この論文を学位論文に値するものと判定した。

最終試験結果の要旨

金澤奨勝氏の学位論文の主要部分は、審査付き学術雑誌に公表済みの 1 編の論文に基づくものであり、本論文が学位論文として完成された内容を有することを確認した。

公聴会において、学位論文の内容を中心として、またこれに関する事項、即ちアロディニア誘発に関わる受容体探索のための分子プローブの創製とその生物学的意義と現状、プローブに応用するアクロメルリン酸類縁体の設計と合成法、生物活性の確認法、短寿命放射核種を持つ PET プローブの合成法や PET イメージング解析法、さらに今後の展開や本研究の将来性などに関して諮問を行った。学位論文申請者から、十分な内容を持った回答が得られたので、最終試験にも合格したものと判定した。

論文リスト

Kanazawa, M., Furuta, K., Doi, H., Mori, T., Minami, T., Ito, S., Suzuki, M., Synthesis of an acromelic acid A analog-based ^{11}C -labeled PET tracer for exploration of the site of action of acromelic acid A in allodynia induction, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **21**, 2017–2020 (2011). (IF 2.650)