

氏名	高村 祐太
授与した学位	博士
専攻分野の名称	薬科学
学位授与番号	博甲第 6827 号
学位授与の日付	令和 5 年 3 月 24 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科 薬科学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)
学位論文の題目	レチノイド X 受容体作動薬 NEt-3IB の炎症性腸疾患治療薬としての実用化に向けた研究

学位論文要約

【背景・目的】

レチノイド X 受容体 (RXR) は核内受容体の 1 つであり、ホモ二量体もしくは他の核内受容体とヘテロ二量体を形成し機能することで、包括的な体内環境の改善に寄与する。RXR 作動薬である bexarotene (Figure 1A) は、皮膚浸潤性 T 細胞リンパ腫に臨床適応されていることに加え、2 型糖尿病、アルツハイマー病などの各種炎症性疾患モデル動物での治療効果が報告されている。しかしながら、bexarotene には甲状腺機能低下や脂質異常などの重篤な副作用が知られており、RXR を標的とした創薬研究は停滞している。

Kakuta らは、上述の bexarotene による副作用の改善を目指し、新たな RXR 作動薬として NEt-3IB (Figure 1A) を報告している。本化合物は経口投与しても全身血流に循環しにくく下部消化管に移行しやすい特徴を示すことから、炎症性腸疾患を対象とした医薬開発を進めている (Figure 1B-E)。

本研究では、NEt-3IB の医薬開発に向けて解決すべき課題である、①安定かつ大量に原薬供給可能なプロセス合成法の開発を目指した。また、②得られた無水結晶について経時的な重量の増加が観察されたことから、その原因の追求を施した。RXR アゴニストの医薬化を阻む副作用の 1 つに催奇形性が挙げられる。炎症性腸疾患は、若年層に多く見られる疾患であることに鑑み、③NEt-3IB の催奇形性評価ならびにそのメカニズム解明を目指した。

【実験方法】

① プロセス合成法の開発

これまでに報告している NEt-3IB の合成法 (MedChem 合成法) では、多種の有機溶媒の使用やカラムクロマトグラフィーによる精製操作が複数回あることから、医薬開発を目指したプロセス合成法としては必ずしも理想的とは言えない。そこで、NEt-3IB を大量かつ低コストで製造可能なプロセス合成法の開発を目指し、脂溶性エーテル溶媒の利用に注目した。疎水

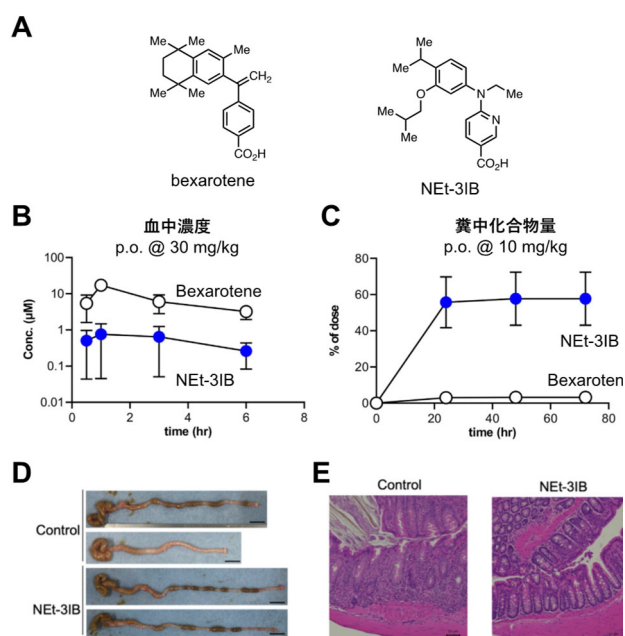


Figure 1. (A) RXR 作動薬 bexarotene および NEt-3IB の化学構造. (B, C) NEt-3IB の経口投与時の血中濃度および糞中化合物量の推移. (D, E) 炎症性腸疾患モデルマウスでの NEt-3IB による治療効果. 抗炎症による大腸長の改善と粘膜治癒を誘導する. (B-E) は *Front. Pharmacol.*, **2021**, *12*, 715752 より転載.

性エーテルは反応、抽出など汎用性に富むことに加えて、共沸脱水が可能であり、反応後に回収し再利用できるため、廃液の削減も可能である。本研究では、これまでに報告されている MedChem 合成法を元に、使用する溶媒を cyclopentyl methyl ether (CPME) に置換し、加えて大量合成に適した再結晶と分液操作のみで精製を行うプロセス合成法の確立を目指した。

② 無水結晶の重量増加の原因究明

下記のプロセス合成法で得られた NEt-3IB 無水物は、空气中で保存するとその重量が増加することが確認された。この原因を解明するべく、重量増減前後の両サンプルについて、元素分析、熱質量測定、粉末 X 線回折、X 線単結晶解析を行った。また、最終合成工程での再結晶溶媒として、様々なアルコール性溶媒を検討し、再結晶収率、得られた結晶の水への溶解性を評価した。

③ 催奇形性評価とそのメカニズム解明

臨床で使用されており催奇形性が知られる RXR 作動薬 bexarotene を比較対象に NEt-3IB の催奇形性評価を行った。RXR が様々な核内受容体とヘテロ二量体を形成して機能することから、催奇形性に関係するヘテロ二量体活性化能について、レポーターアッセイにより比較した。催奇形性評価法として汎用されるゼブラフィッシュ受精卵へ RXR 作動薬を 120 時間暴露し、稚魚の形態異常を顕微鏡で観察した。各 RXR 作動薬の血液胎盤関門透過性について、両薬物の炭素 11 標識体を用いて、positron emission tomography (PET) による胎仔移行の動的イメージングと、ガンマカウンターによる胎児移行の定量を行った。妊娠ラットに対して妊娠 1 日目から 19 日目まで各 RXR 作動薬を 30 mg/kg/day で反復経口投与し、妊娠 20 日目の胎仔を摘出し、その形態異常を観察した。これら胎仔を用いて透明骨格標本を作成し、骨形成異常を評価した。

【結果・考察】

① プロセス合成法の開発【参考論文 1】

NEt-3IB の MedChem 合成法をもとに、使用する有機溶媒を CPME と EtOH への置換し、精製操作の省略もしくは再結晶への変換を検討した。その結果、全 7 工程において使用する有機溶媒は 2 種類、2 回の再結晶のみによる精製で、総収率 30% 以上、1 回の合成で 10 g 以上の NEt-3IB を合成可能なプロセス法の開発に成功した (Table 1)。多段階合成による環境

Table 1. MedChem 合成法とプロセス合成法の比較

	MedChem 合成法	プロセス合成法
工程	7	7
使用有機溶媒種	6	2
分液	6 回	3 回
カラム精製	3 回	0 回
再結晶	1 回	2 回
総収率	~10%	32%
1 回あたりの合成可能量	< 100 mg	> 10 g
E-factor	4669	124
合成コスト (円/g)	9721	1719

負荷の指標である E-factor (=最終目的物の重量/総廃棄物の重量) を比較したところ、MedChem 法では 4669 であったのに対して、プロセス法では 124 と、35 倍以上の改善に加えて、合成コストの削減にも成功した。本プロセス合成法は、NEt-3IB の医薬開発のみならず、環境に優しいプロセス合成法開発への貢献も期される。

② 無水結晶の重量増加の原因究明【参考論文 2】

上記プロセス法では、70% EtOH からの再結晶により NEt-3IB を精製し、加熱乾燥させることで無水物が得られる。しかしながら、当該結晶を空气中で保存すると、その重量が増加することが判明した。その元素組成は炭素のみが顕著に減少したことから、空气中の保存に伴う水和を疑い、乾燥前後のサンプルについて熱質量分析を行ったところ、乾燥前のサンプルのみ 100°C 未満での 4.9% の重量減少がみられた (Figure 2A)。70% EtOH より得られた結晶について X 線単結晶解析の結果、カルボキシ基に水 1 分子が水和した一水和物構造が得られ、その水和水は加熱乾燥によって容易に脱水和することが明らかとなった。水和水が再結晶溶媒に由来すると考え、無水アルコール性溶媒からの再結晶を検討したところ、得られた結晶の粉末 X 線回折は 70% EtOH より再結晶したサンプルと異なるスペクトルを示した。興味深いことに、70% EtOH から再結晶し、十分に加熱減圧乾燥させたサンプルの粉末 X 線回折スペクトルは、EtOH から得た結晶のスペクトルと同一であった (Figure 2B)。このことから、一水和物を乾燥させて得た無水物と、非含水溶媒から再結晶して得た無水物の結晶構造は同一であることが示唆された。これらの結晶の X 線単結晶解析の結果を比較すると、NEt-3IB の分子立体構造はほとんど変化していなかった。カルボン酸間の水素結合を形成する分子

ペアは同一であり、一水和物では隣接分子のピリジン環上の窒素との水素結合の形成が示唆された (Figure 2C)。70% EtOH から得た一水和物、それを乾燥させて得た無水物、無水 EtOH から得た無水物の水への溶解性を調べたところ、無水物間での差はなく、それに比べて一水和物で顕著に低い溶解度を与えた (Figure 2D)。NEt-3IB の炎症性腸疾患に対する治療薬として開発する上では、水溶性がより低い一水和物が、上部消化管吸収を抑えられ、効率的に下部消化管へ移行する特徴が活用できると判断された。

③ 催奇形性評価【参考論文 3】

Bexarotene をはじめとする RXR 作動薬のみならず、RXR 拮抗薬にも催奇形性が報告されていることから、RXR 作動性により催奇形性が誘導されるとは考えにくい。そこで、bexarotene と NEt-3IB の RXR ヘテロ二量体活性化能を比較したところ、細胞分化に関わるレチノイン酸 (RAR)/RXR において bexarotene で高い活性化傾向を与えた (Figure 3A)。RAR/RXR が結合する DNA 配列下流には、内因性 RAR 作動性物質であり、発生過程で重要な all-trans レチノイン酸 (ATRA) の代謝酵素として働く CYP26A1 遺伝子が存在する。発生過程で重要な ATRA は過不足により催奇形性を生じるため、CYP26A1 により生体内濃度均衡が厳重に保たれている。

外因性分子による RAR/RXR 活性化は、それに起因した生体内 ATRA 濃度ならびに ATRA により厳密に調節されていた RAR/RXR 活性に伴う下流遺伝子の転写調節均衡を崩しかねない。この観点から、RAR/RXR 活性を誘導しにくい NEt-3IB は、bexarotene に比べて催奇形性を示しにくいと推測された。

ゼブラフィッシュ受精卵への RXR 作動薬の暴露による形態異常は、NEt-3IB で bexarotene に比べ軽減化されることが確認された。また、催奇形性に関わる要因の 1 つである薬物の胎児移行性を調べるべく、両 RXR 作動薬を放射性同位元素である炭素 11 (^{11}C) で標識し、妊娠ラットへの静脈投与時の positron emission tomography (PET) を行った。投与量や胎仔への移行量の少なさから、胎仔移行性の動的イメージングには至らなかったが、撮像後に胎仔を摘出しガンマカウンターで放射能を測定したところ、母体血液に対する胎仔の放射線量は、bexarotene に比べて NEt-3IB で高値を与えた (Figure 3B)。この結果は、血液胎盤関門透過性の *in vitro* モデルとして汎用される BeWo 細胞を用いた膜透過性試験でも同様であった (Figure 3C)。母体における NEt-3IB の血中濃度は bexarotene の 10 分の 1 程度であることを含めて考えると、NEt-3IB の胎仔移行量は bexarotene と同程度もしくは低減が予想される。NEt-3IB による催奇形性リスクを最小限に抑えるためにも、消化管吸収されにくいために血中濃度を抑え、結果的に胎仔移行の低減が期待できる一水和物としての利用が望ましいと考えられる。NEt-3IB は bexarotene に比べて、催奇形性への関与が疑われる RAR とのヘテロ二量

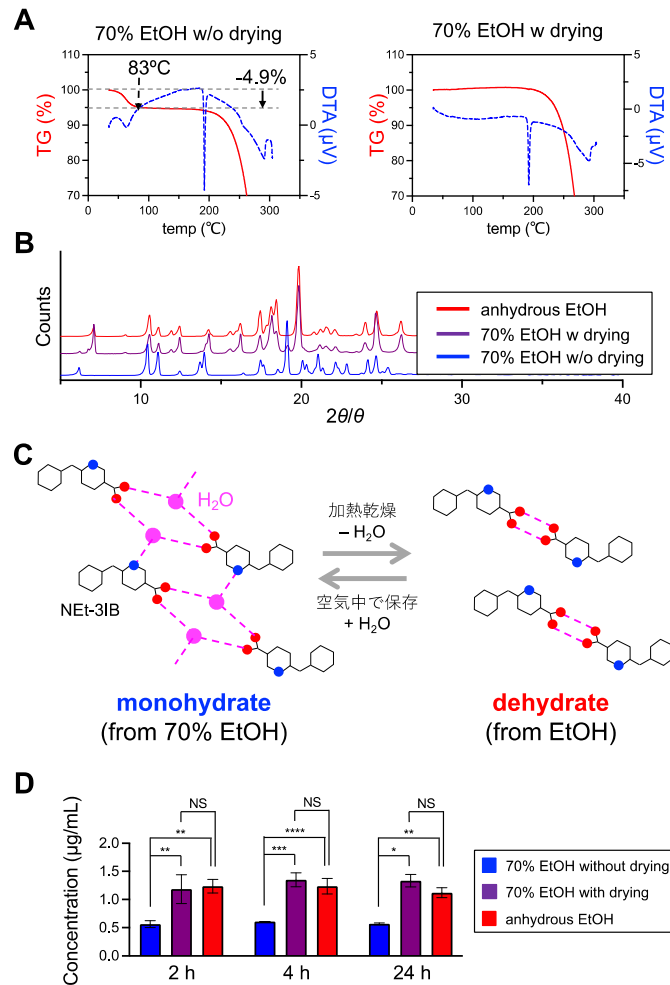


Figure 2. (A) 乾燥前後の熱質量測定結果. (B) 各溶媒からの再結晶で得た NEt-3IB の粉末 X 線回折スペクトル. (C) NEt-3IB の水和・脱水和の概念図. ピンク線は水素結合を示す. (D) 各結晶形の水への溶解性の比較. Bonferroni, ****; $p < 0.0001$, ***; $p < 0.001$, **; $p < 0.01$, *; $p < 0.1$, NS; not significant.

体活性およびゼブラフィッシュ胚モデルでの催奇形性の低減が認められ、加えて同程度もしくは低い胎仔移行性を有することが示唆された。そこで次に、両RXR作動薬を妊娠ラットへ反復経口投与した場合での胎仔への影響を調べた。ラット胎仔の形態異常を比較すると、bexarotene投与群はnormal群に比べてその身長、体重に顕著な減少がみられたのに対して、NEt-3IB投与群ではその軽減が確認された。透明骨格標本による骨形成異常については、bexarotene投与群でみられた頭蓋骨の骨形成不足、手足の萎縮、肋骨の異常がNEt-3IB投与群で軽減されていた(Figure 3D)。

【結論】

本研究では、NEt-3IBの炎症性腸疾患治療薬への開発を目指し、プロセス合成法の開発、擬結晶多形の検討、RXR作動薬にみられる催奇形性評価とその原因解明を行った。これらの研究成果は、NEt-3IBの医薬開発を大きく促進するものである。

【参考論文】

1. [Takamura Y](#), Morishita KI, Kikuzawa S, Watanabe M, Kakuta H. Development of Scaled-Up Synthetic Method for Retinoid X Receptor Agonist NEt-3IB Contributing to Sustainable Development Goals. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **70**, 146–154 (2022). [IF: 1.903 (2021)]
2. [Takamuta Y](#), Kikuzawa S, Fujihara M, Sunatsuki Y, Ota H, Higaki K, Kakuta H. Characterization and Interconversion of Two Polymorphs of NEt-3IB, a Retinoid X Receptor Agonist. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **71**, 282–288 (2023). [IF: 1.903 (2021)]
3. [Takamura Y](#), Kato I, Fujita-Takahashi M, Azuma-Nishii M, Watanabe M, Nozaki R, Akehi M, Sasaki T, Hirano H, Kakuta H. Teratogenicity and Fetal-Transfer Assessment of the Retinoid X Receptor Agonist Bexarotene. *ACS Pharmacol. Transl. Sci.*, **9**, 811–818 (2022).

【関連論文】

1. [Takamura Y](#), Takahashi M, Nishii M, Shibahara O, Watanabe M, Fujihara M, Kakuta H. 3H-Imidazo[4,5-b]pyridine-6-carboxylic Acid Derivatives as Rexinoids with Reduced Teratogenicity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2019**, **29**, 1891–1894. [IF: 2.940 (2021)]
2. [Takamura Y](#), Kakuta H. In Vivo Receptor Visualization and Evaluation of Receptor Occupancy with Positron Emission Tomography (Review). *J. Med. Chem.*, **64**, 5226–5251 (2021). [IF: 8.039 (2021)]

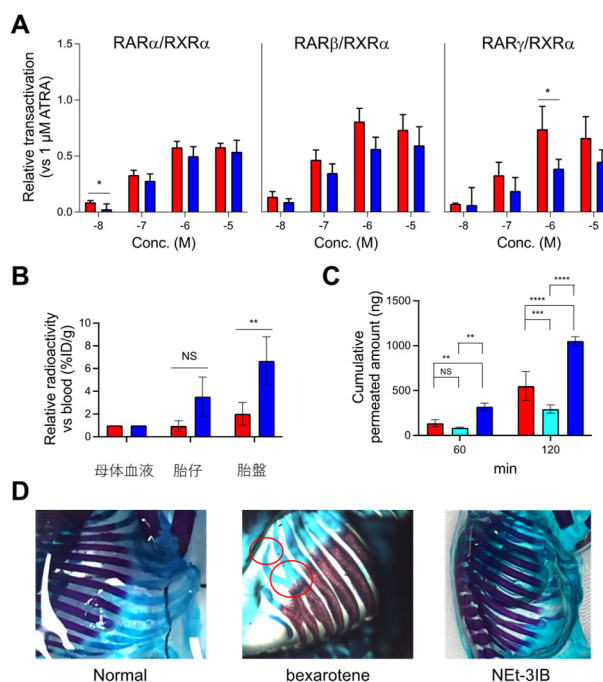


Figure 3. (A) Bexarotene (赤) と NEt-3IB (青) の RAR/RXR ヘテロ二量体活性化能の比較. Student T test, ****; $p < 0.0001$, **; $p < 0.01$, *; $p < 0.1$. (B) [¹¹C]bexarotene (赤) および [¹¹C]NEt-3IB (青) の母体血液に対する胎仔、胎盤の重さあたりの放射能. Student T test, **, $p < 0.01$, NS; not significant. (C) BeWo 細胞膜の透過性. 赤, 水色, 青はそれぞれ bexarotene (10 μM), NEt-3IB (1 μM), NEt-3IB (10 μM) を曝露した場合での累積透過量を示す. Bonferroni, ****; $p < 0.0001$, ***, $p < 0.001$, **, $p < 0.01$, NS; not significant. (D) 妊娠ラットへの RXR 作動薬の反復投与時の胎仔骨格標本(肋骨)の写真. 赤丸は骨形成異常箇所を指す.