

信州大学審査学位論文

新規肝選択的甲状腺ホルモン受容体 β 作動薬に関する研究：

1-ベンジルインドール誘導体による

脂質代謝異常の改善効果

平成28年3月

高橋直希

目次

略語表.....	3
第 1 章 緒言.....	5
第 2 章 1-ベンジル-4-アミノインドール骨格を有する新規 TR β 作動薬の創出	15
2-1 序論.....	15
2-2 リンカー長の検討.....	17
2-3 カルボン酸側鎖の最適化	22
2-4 コレステロール負荷ラットモデルにおける薬理効果.....	27
2-5 小括.....	30
2-6 実験の部.....	31
第 3 章 SKL 化合物の薬理学的特性の解明.....	50
3-1 序論.....	50
3-2 SKL 化合物のラット PK.....	51
3-3 化合物の組織分布.....	54
3-4 SKL-13784 のフルクトース負荷ラットモデルにおける薬理効果.....	56
3-6 考察.....	59
3-7 小括.....	62
3-8 実験の部.....	63
第 4 章 SKL-13784 の肝臓特異的移行性メカニズムの解明.....	66
4-1 序論.....	66
4-2 <i>In vitro</i> 肝取込み評価 (Media-loss アッセイ)	69
4-3 ラット肝ミクロソーム中での代謝安定性.....	72
4-4 MDR1-LLC-PK1 細胞を用いた MDR1 認識性.....	75

4-5	人工膜を用いた化合物の膜透過性評価 (PAMPA)	76
4-6	胆管カニュレーションラット (BDC ラット) を用いた胆汁排泄.....	77
4-7	BDC ラットを用いた SKL-13784 の体内動態.....	79
4-8	SKL-13784 の PK 線形性.....	81
4-9	考察.....	84
4-10	小括.....	87
4-11	実験の部.....	88
第 5 章	結語.....	93
参考文献	96
謝辞	106

略語表

AUC	: area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度-時間曲線下面積
BA	: bioavailability	生物学的利用率
BDC ラット	: bile duct cannulated rat	胆管カニューレションラット
BLQ	: below the limit of quantitation	定量限界下限
C_{max}	: maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CL_p	: plasma clearance	血漿クリアランス
CYP	: cytochrome P450	チトクローム P450
DIO	: diet-induced obesity	食餌誘導性肥満
DI1	: type 1 deiodinase	1型脱ヨード酵素
DI2	: type 2 deiodinase	2型脱ヨード酵素
DI3	: type 3 deiodinase	3型脱ヨード酵素
DMEM	: dulbecco's modified eagle medium	ダルベッコ改変イーグル培地
DMF	: <i>N,N</i> -dimethylformamide	<i>N,N</i> -ジメチルホルムアミド
D-T4	: dextrothyroxine sodium	デキストロチロキシナトリウム
ED ₅₀	: half maximal (50%) effective concentration	50%有効濃度
ESI	: electrospray ionization	エレクトロスプレーイオン化
FBS	: fetal bovine serum	ウシ胎児血清
GA	: gum arabic solution	アラビアゴム溶液
HDL	: high-density lipoprotein	高比重リポタンパク
HMG-CoA	: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A	3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA
HPT	: hypothalamic-pituitary-thyroid	視床下部/下垂体/甲状腺
HRMS	: high-resolution mass spectrum	高分解能質量スペクトル
IC ₅₀	: half maximal (50%) inhibitory concentration	50%阻害濃度
IR	: infrared spectrum	赤外吸収スペクトル
IS	: internal standard	内部標準物質
i.v.	: intravenous	静脈内
LBD	: ligand binding domain	リガンド結合部位
LC-MS/MS	: high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry	高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析法

LDL : low-density lipoprotein 低比重リポタンパク

MRM : multiple reaction monitoring 多重反応モニタリング

MS : mass spectrum 質量スペクトル

NADPH : nicotinamide adenine dinucleotide phosphate ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸

NBS : *N*-bromosuccinimide *N*-ブロモスクシンイミド

NMR : nuclear magnetic resonance 核磁気共鳴

PAMPA : parallel artificial membrane permeability assay 人工膜透過性試験

PK : pharmacokinetics 薬物動態

p.o. : per os 経口

QD : quaque die 1日1回投与

RCT : reverse cholesterol transport コレステロール逆転送系

S.E.M. : standard error of the mean 標準誤差

RNA : ribonucleotide リボ核酸

RTH : syndrome of resistance to thyroid hormone 甲状腺ホルモン不応症

SREBP : sterol regulatory element-binding protein ステロール調節エレメント結合タンパク質

$t_{1/2}$: elimination half-life 消失半減期

T4 : thyroxine チロキシン

T3 : triiodothyronine トリヨードチロニン

T2 : 3,3'-diiodothyronine 3,3'-ジヨードチロニン

TBG : thyroxine binding globulin チロキシン結合グロブリン

TC : total cholesterol 総コレステロール

TG : triglyceride トリグリセリド

THF : tetrahydrofuran テトラヒドロフラン

T_{max} : time of C_{max} 最高血漿中濃度に達する時間

TR : thyroid hormone receptor 甲状腺ホルモン受容体

TRH : thyrotropin-releasing hormone 甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン

TSH : thyroid-stimulating hormone 甲状腺刺激ホルモン

TTR : transthyretin トランスチレチン

UDPGA : uridine 5'-diphosphoglucuronic acid ウリジン 5'-二リン酸-グルクロン酸

VLDL : very low-density lipoprotein 超低比重リポタンパク

Vd_{ss} : distribution volume of steady-state 定常状態における分布容積

第1章 緒言

我が国における動脈硬化性疾患，ことに心筋梗塞を中心とした心血管系疾患と脳梗塞・脳出血を中心とした脳血管障害による総死亡数は，男女ともに悪性腫瘍について多く，死因の約 30%を占めている¹⁾。また，加齢に伴いそれらの疾患による死亡者数は増加しており，今後超高齢化が進む我が国において，その予防の重要性は益々高くなることが予測される。

心血管系疾患や脳血管障害は生命を脅かす疾患であるが，仮に一命を取り留めたとしても，その後遺症により日常生活動作能力や生活の質の保たれた健康寿命を脅かすことになる。したがって，動脈硬化症の予防は医療経済的な側面からも極めて重要と考えられている。

動脈硬化発症の背景には脂質異常症，高血圧，糖尿病，肥満，喫煙など複数の危険因子が存在していることが知られている。特に脂質異常症，高血圧，糖尿病，肥満はお互いに影響を及ぼしながら，相乗的に作用して動脈硬化症を進行させることから「死の四重奏」と呼ばれている (Figure 1-1)。これまでの疫学的調査研究や臨床介入研究により，低比重リポタンパク (LDL) コレステロールは動脈硬化性疾患と高い正の相関を，また高比重リポタンパク (HDL) コレステロールは負の相関を示すことや高 LDL コレステロール血症を治療することでこれらの疾患を予防できることが明らかにされてきた²⁻¹⁰⁾。したがって，これら脂質異常症の治療は最優先事項である。

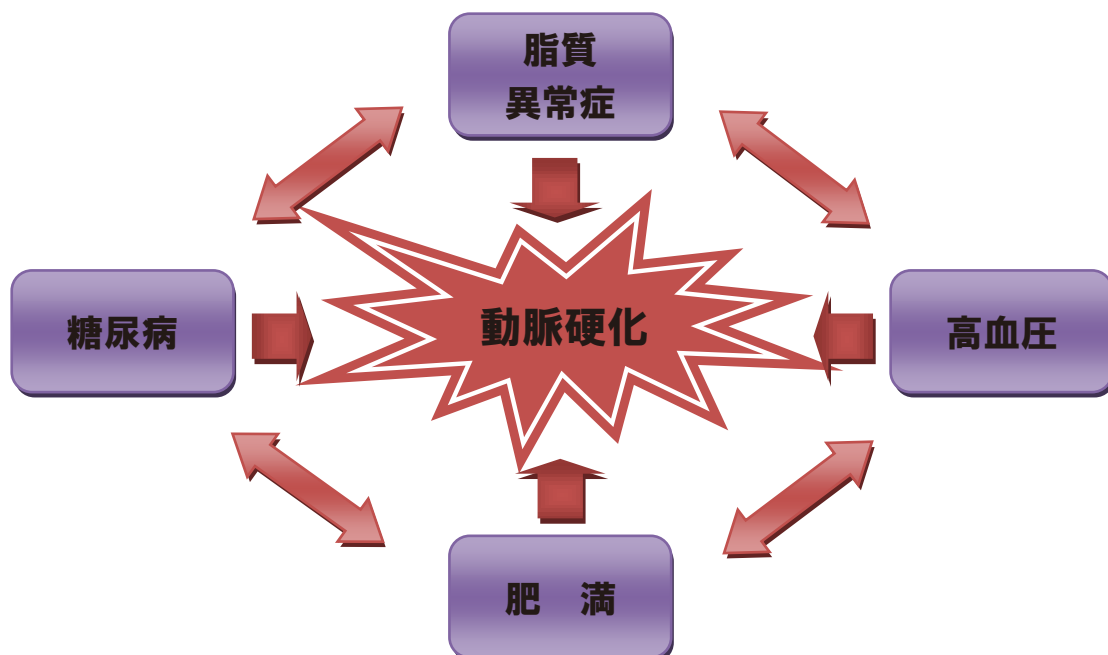


Figure 1-1. Arteriosclerosis risk factors.

近年、日本人のライフスタイルの欧米化による食生活の変化や慢性的運動不足の影響を受け、40歳代、50歳代のコレステロール値は1960年代から1990年代にかけて上昇の一途をたどり、動脈硬化性疾患の発生頻度の上昇が危惧されている。

脂質異常症の治療および予防の基本はあくまでも食事療法や運動療法を中心としたライフスタイルの改善であるが、その効果が十分でない場合には薬物療法が選択される。高脂血症治療薬は、その作用機序などからいくつかのグループに分けられる。LDLコレステロール低下薬としては、コレステロール合成阻害薬として3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリルCoA (HMG-CoA)還元酵素を阻害するスタチン、コレステロール吸収阻害薬としては胆汁酸の吸収を阻害する陰イオン交換樹脂（レジン）と小腸コレステロールトランスポーター阻害薬（エゼチミブ）などがある。トリグリセリド（TG）低下薬としてはフィブラート系薬、ニコチン酸、n-3多価不飽和脂肪酸などがある。

現在、治療に用いられているものは主にHMG-CoA還元酵素阻害薬のプラバスタチン、シンバスタチンやアトルバスタチンなどである。スタチン系薬剤はHMG-CoA還元酵素を阻害するだけでなく、肝臓でのコレステロールプールが低下することで、脂質合成転写因子であるステロール調節エレメント結合タンパク質2（SREBP2）の核型が増加し、肝臓においてLDL受容体が高発現して血液中から肝臓へのLDLコレステロールの取込みが亢進するとともに、血清のLDLコレステロールを低下させる¹¹⁾。LDLコレステロールの低下効果は25～30%であり、現在のところ最も効果の強い薬剤である。一方、肝臓でのコレステロールの合成低下はLDLの前駆リポタンパクである超低比重リポタンパク（VLDL）の合成分泌を抑制することから、結果的に血清TGの低下をもたらすことが知られている。そのTGの低下効果は決して高くなく10～20%程度である¹²⁾。

スタチン系薬剤は一般に安全性が高いが、まれに横紋筋融解を誘発することが問題となっている。実際にセリバスタチンは米国において単剤投与で横紋筋融解症が多発し、死亡例が出たばかりか、フィブラート系薬剤であるゲンフィプロジルとの併用でさらに高頻度で誘発され、2001年に自主的に市場撤退した¹³⁾。また、フィブラート系薬剤との併用は原則禁忌となっている。

多くの大規模臨床試験により、スタチンを用いてLDLコレステロールを低下させることで、動脈硬化性疾患の発症や進展を抑制できることは証明されているが、それでも、心血管イベント発症率を30%程度しか低下させることができない^{14,15)}。

このようにスタチン治療には改善の余地があり、LDLコレステロールだけでなく脂質・糖代謝全般に対して優れた作用を有し、かつ安全に服用できる薬剤の開発が望まれている。

甲状腺ホルモンは成長・分化の他、心拍数、血中コレステロール並びに TG 濃度、全身の代謝速度並びに体重の制御など生命機能の維持に非常に重要な役割を担っている¹⁶⁾。甲状腺では主に不活性型のチロキシン (T4) が合成され、活性型のトリヨードチロニン (T3) の産生量は非常に少ない。血中に放出された甲状腺ホルモンのほとんどはチロキシン結合グロブリン (TBG) に結合し、その他にトランスチレチン (TTR) やアルブミンに結合しており、約 99%は結合型として血中に存在する。特に TBG は T4 への親和性が T3 の約 20 倍高く、TBG は血中の甲状腺ホルモン濃度を定める大きな因子となっている¹⁷⁾。血中の甲状腺ホルモンはフリー体がトランスポーターを介して各標的組織に取り込まれ、標的組織内で脱ヨード酵素 (DI) により代謝され活性型の T3 に変換される (Figure 1-2)。脱ヨード酵素には活性型 T3 に変換できる 1 型 (DI1)、2 型 (DI2) と、非活性型に変換する 3 型 (DI3) が存在する。高発現している組織はそれぞれ異なり、DI1 は肝臓や腎臓などで、DI2 は中枢神経系、下垂体、褐色脂肪組織、胎盤などに発現している¹⁸⁾。甲状腺ホルモンの合成と分泌は視床下部/下垂体/甲状腺 (HPT) 軸のフィードバック機構によって厳格に制御され、血中の甲状腺ホルモンは一定に保たれている (Figure 1-3)。しかし、標的組織中の甲状腺ホルモンの恒常性は細胞内への取込みと代謝によって維持されている¹⁹⁾。DI2 と DI3 が細胞内の T3 のコントロールに重要な役割を果たしていると言われており (Figure 1-4)、したがって細胞内 T3 は血中の甲状腺ホルモン濃度に影響されない。DI1 は T4 との親和性が低く、その役割は十分に理解されていない。細胞内の甲状腺ホルモンは、核内の甲状腺ホルモン受容体 (TR) を介して各標的組織に特徴的な生理作用をもたらす。TR は核内受容体スーパーファミリーに属するリガンド依存性の転写調節因子であり、 α 及び β の 2 つの遺伝子でコードされた 2 つのサブタイプが存在する。さらに、RNA スプライシングの違いによりいくつかのアイソフォーム (TR α 1, TR α 2, TR β 1, TR β 2, TR β 3) が知られており、各組織に発現しているアイソフォームは異なっている。

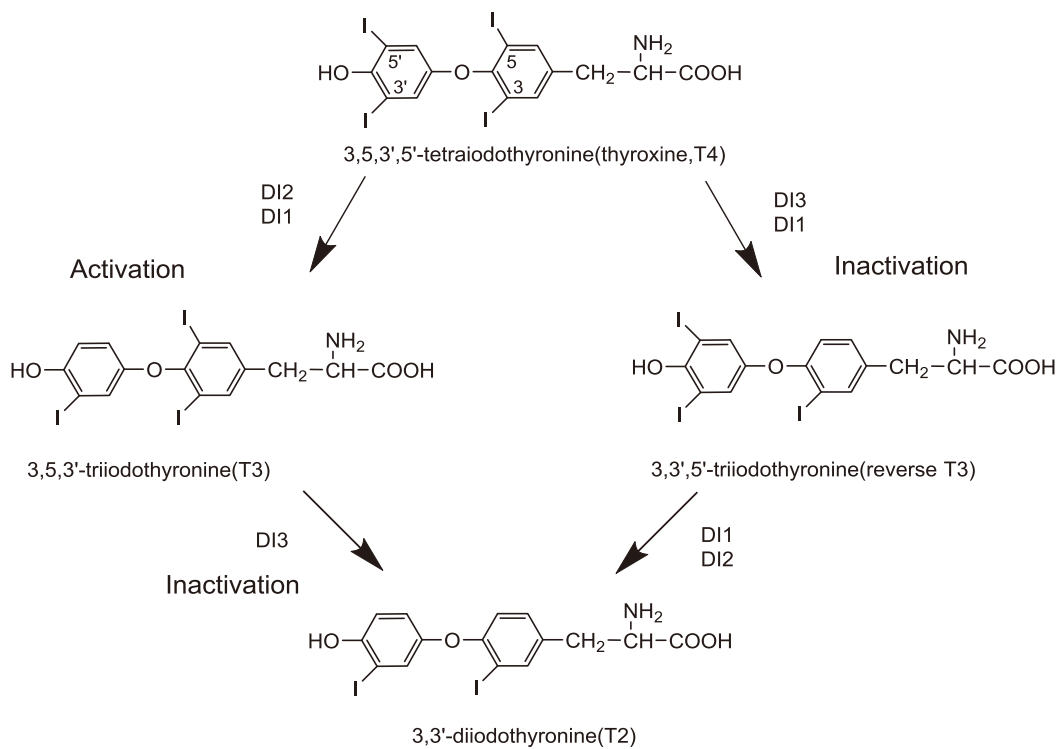


Figure 1-2. Thyroid hormone metabolism.
 DI1, DI2, DI3 = Type 1, type 2, type3 deiodinase

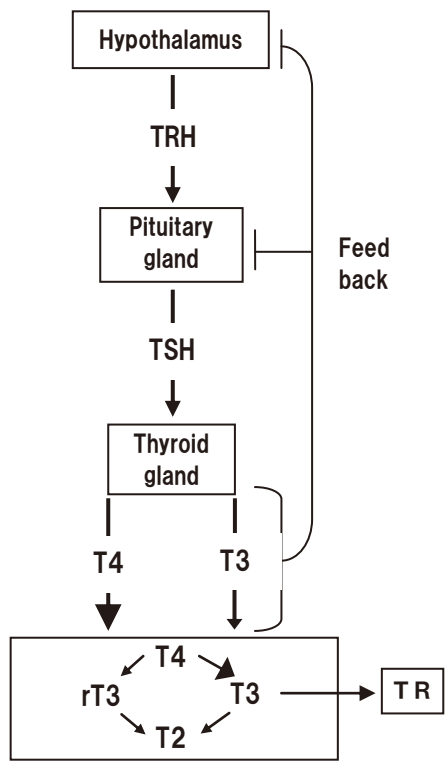


Figure 1-3. Hypothalamic-pituitary-thyroid axis feedback of thyroid hormones.
 TRH, thyroid-releasing hormone; TSH, thyroid-stimulating hormone.

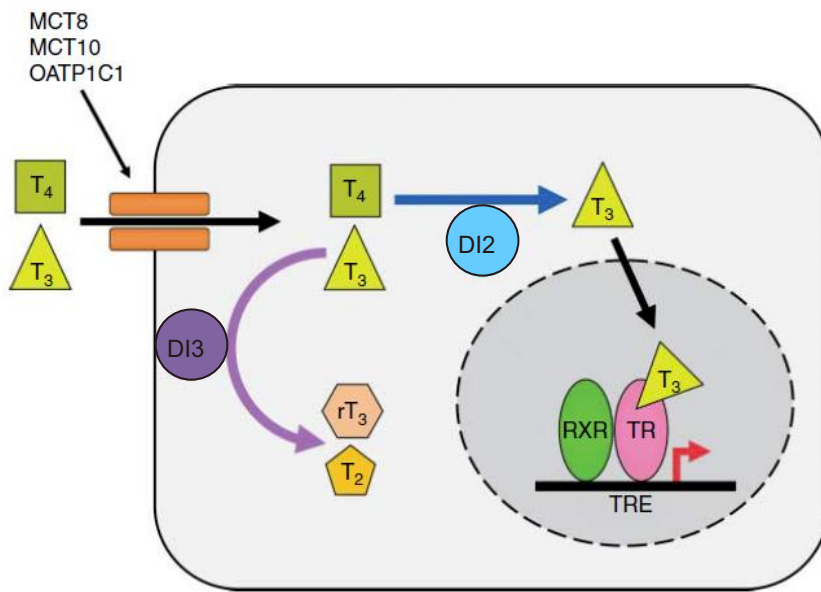


Figure 1-4. Regulation of intracellular supplies of T₃ to the nucleus of T₃ target cells. MCT8 and MCT10, monocarboxylate transporters 8 and 10; OATP1C1, organic acid transporter protein-1C1; DI2 and DI3, type 2 and 3 deiodinases; TR, thyroid hormone receptor, RXR, retinoid X receptor; T₄, thyroxine; T₃, 3,5,3'-triiodothyronine; rT₃, 3,5,3'-triiodothyronine; T₂, 3,3'-diiodothyronine; TRE, thyroid hormone response element. (Adapted from Ref. 19.)

下垂体の障害や先天的機能異常等による甲状腺ホルモン欠乏状態では心拍数減少、血中コレステロール上昇、体重増加が認められる。一方、バセドウ病のような甲状腺ホルモン過剰状態では頻脈、不整脈、うっ血性心不全の他、疲労感、呼吸促迫、骨格筋減少、骨粗鬆症等が認められるが²⁰⁾、血中コレステロールレベルの低下、基礎代謝増加等、代謝性疾患の治療上で有益な現象も認められる。そのため、甲状腺ホルモンのコレステロール低下作用を高脂血症治療に応用することが古くから検討されている。

1960年代後半に高脂血症を伴う冠動脈疾患患者を用いてT4のD型異性体デキストロチロキシナトリウム(D-T4)(Figure 1-5)の有効性と安全性が検証された²¹⁾。D-T4投与群はコントロール群に比べて血中コレステロールが12%、血中TGが15~20%低下した。3年間投与が続けられ、有効性は認められたが、D-T4投与群ではプラセボ投与群に比べて心筋梗塞や狭心症の病歴を持つ患者の死亡リスクを増悪させた。

このことを背景として、心臓への作用など有害な作用を回避して、血中コレステロール低下作用や体重低下作用など甲状腺ホルモンの有益な作用を特異的に発揮させるための甲状腺ホルモン誘導体研究が盛んに行われるようになった。そのような研究の中から、L-94901²²⁾やCGS23425²³⁾などが見出された(Figure 1-5)。これらの化合物は動物モデルにおいて心機能に影響することなく血中コレステロールレベルを低下させた。また、CGS23425は血中の総コレステロール(TC)とLDLコレステロールを低下させ、ApoA1の合成を増加させた。しかしながら、理由は明確ではないが、臨床応用まで至らなかった。

TR作動薬の研究がブレークスルーしたのは、1980年代後半にTRの主要なアイソフォームがクローニングされ、各受容体の組織分布と機能が明らかとなってからである^{24,25)}。TR β 2は脳や視床下部など限られた組織に発現しており、HPT軸のホルモンフィードバック機構として働いていると考えられた。TR α 2はTR α 1の選択的スプライシング変異体で、甲状腺ホルモンと結合しない受容体であり、転写調節の阻害作用がある。TR α 1とTR β 1は全身組織に広く発現しているが、組織により発現の程度は異なっている。TR β 1は特に肝臓に多く発現しており、その発現量はT3結合型TRの約80%である。一方、心臓ではTR β 1の発現量は少なく、TR α 1が多く発現している²⁶⁾。これらの事実に加え、甲状腺ホルモン不応症(RTH)患者の研究やTR遺伝子ノックアウトマウスを用いた研究によりTRのそれぞれのアイソフォームの機能が明確となった。RTH家系の約85%はTR β 遺伝子変異によるものであり、患者のほとんどはホルモンフィードバック機能が働かないため血中の甲状腺ホルモン値が高くなっている。しかし、甲状腺ホルモンに対する臓器の反応性が低下しているため、ほとんど症状として現れないが頻脈や動悸が認められる。そのため、心拍の調整はTR α を介して発現しているものと考えられた²⁷⁾。さらに、TR α 1ノックアウトマウスでは、基礎心拍数の減少、基礎体温の低下が観察され、T3を投与しても心拍数の回復は認められ

なかった。また、TR β ノックアウトマウスではコレステロール値がわずかに上昇し、T3による脂質代謝に影響が認められた。また、甲状腺ホルモン合成のフィードバックに影響が認められた²⁸⁻³⁰⁾。

これらの研究により、心臓への作用は主に TR α に基づいており、TR β 選択的な薬物が創製できれば、新しい脂質異常症治療薬になるかもしれないという仮説が生まれた。そこで、肝臓選択性を指向した TR β 選択的作動薬の研究が盛んに行われるようになった^{31,32)}。その中で、GC-1とKB2115 (Figure 1-5)は臨床試験において有望な結果を示した。GC-1はTR α に対して10倍の選択性を示し、コレステロール負荷ラットで心拍数を増加させることなく、用量依存的に血中コレステロールレベルを低下させた^{33,34)}。健常人を用いた試験では、GC-1を1日1回(QD)100 μ gを2週間投与したとき、良好な耐容性を示し、LDLコレステロールレベルを41%まで低下させた。また、GC-1と同じように肝選択的TR β 作動薬であるKB2115は血中TCが255 mg/dlの肥満患者に投与された^{35,36)}。KB2115 100 μ gを1週間投与した結果、LDLコレステロール値が40%まで低下し、心臓への影響は認められなかった。また、高コレステロール血症患者を用いて、スタチンとKB2115 100 μ gを2週間併用投与した臨床試験では、血中コレステロール値が32%まで低下した。さらに、TG、Lp(a)の低下も認められ、心臓、骨、下垂体に対する顕著な副作用も認められなかった。

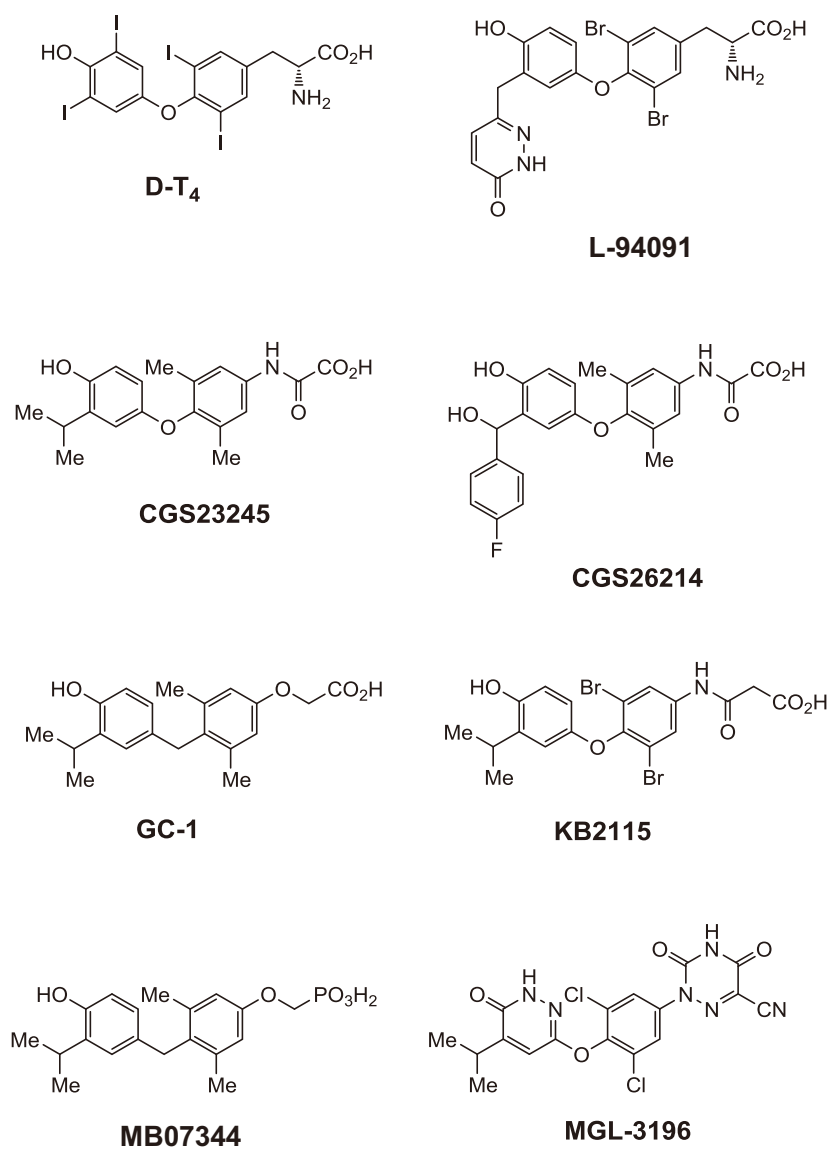


Figure 1-5. Structures of representative TR agonists.

しかしながら、これまで開発されてきた TR β 選択的作動薬は未だ実用化に至っていないのが現実である。その原因は甲状腺ホルモンの全身への作用、特に甲状腺刺激ホルモン (TSH) の抑制作用が現れるためだと考えられた。GC-1 はラットにおいて有効用量で用量依存的に血中 TSH レベルを低下させた^{37,38)}。また、KB2115 はヒト臨床試験においてコレステロールを低下させる最低有効用量 100 μ g で血中 TSH レベルを低下させた³⁵⁾。TSH は脳下垂体前葉から分泌され、甲状腺に働きかけ甲状腺ホルモンの分泌を促す。TSH もまた視床下部から分泌される甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) により分泌が促される。TSH と TRH は甲状腺ホルモンのネガティブフィードバックにより分泌が抑制される³⁹⁻⁴¹⁾。一般的に、甲状腺ホルモンの合成と分泌は、甲状腺ホルモンの濃度を一定に保つためネガティブフィードバックシステムで制御されており、TSH の低下は甲状腺機能低下症を引き起こす可能性を暗示している。

最近の研究により甲状腺ホルモンおよび TR の脂質代謝や脂肪酸代謝に関与する分子メカニズムが解明されてきており (Figure 1-6)⁴²⁾、スタチン系薬剤とは作用メカニズムが異なる脂質異常症治療薬が望まれている中、臨床的には TR 作動薬の開発により高 TG 血症やスタチン系薬剤に治療耐性を持つ高 LDL 血症などへの新たな治療が期待される。

このように脂質異常症治療薬として大変に期待のもてる TR 作動薬であるが、実用化するには下垂体 TSH 分泌に対する抑制作用が大きな問題である。

そこで本研究では、TR 作動薬の課題である HPT 軸への影響を回避することを目指して、TR β 選択性を高めると共に肝臓特異的に作用する化合物の探索を行うこととした。さらに、得られた化合物の薬理学的特性を明らかにすることとした。

本論文は第 1 章から第 5 章までの構成とする。本章では本研究の背景となる事項について紹介した。第 2 章では甲状腺ホルモン誘導体のインナーリングとして 2-メチルインドールに着目して行った最適化研究について述べる。さらに、最適化研究により見出した 1-ベンジル-4-アミノインドール骨格を有する新規 TR β 選択的作動薬 (SKL-12846, SKL-13784) の薬理効果と心臓および HPT 軸への影響について、コレステロール負荷ラットモデルを用いて検討した結果を示す。第 3 章では SKL 化合物の薬理学的特性を明らかにするために、SKL-12846 と SKL-13784 のラット薬物動態と組織分布について検討した結果を GC-1 と比較して論ずる。第 4 章では SKL-13784 の肝臓への特異的移行性のメカニズムについて検討した結果を GC-1 と比較して論じ、第 5 章では本研究の結語を述べることとする。

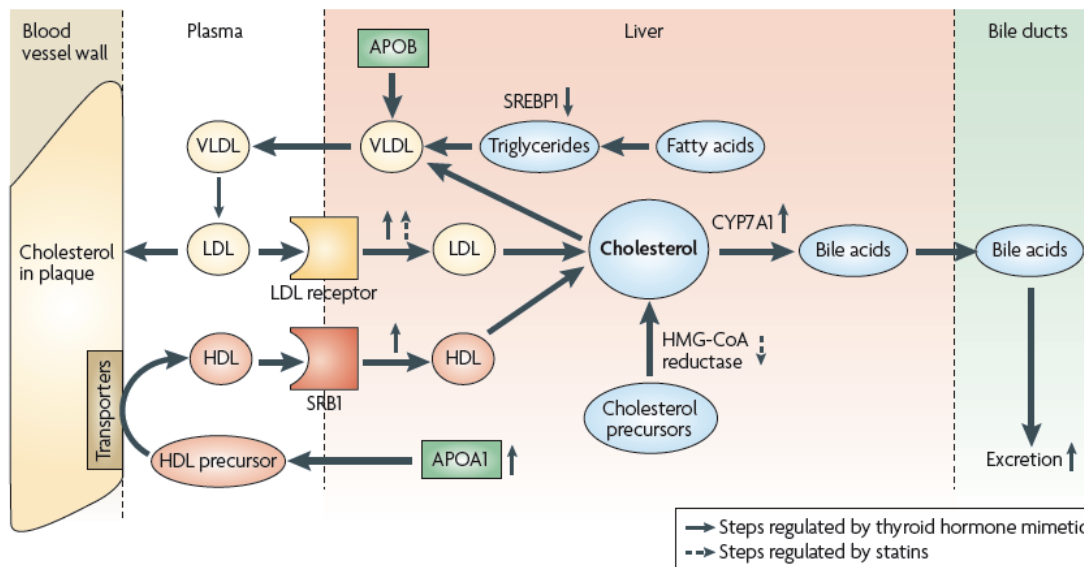


Figure 1-6. Effect of thyroid hormone mimetics and statins on cholesterol metabolism. For the low-density lipoprotein (LDL) pathway, very-low-density lipoprotein (VLDL) particle containing apolipoprotein B (ApoB), triglycerides and cholesterol are synthesized and secreted by liver into the circulation, where they are converted to LDL particles. LDL-cholesterol particles can deposit cholesterol in the blood vessel wall to form plaques or can be reabsorbed into the liver through interactions with LDL receptors. For the high-density lipoprotein (HDL) pathway, precursor particles containing apolipoprotein A1 (ApoA1) are secreted into the circulation, where they pick up cholesterol from atherosclerotic plaques and other sources to become mature HDL particles. HDL particles are taken up by the liver through interactions with liver HDL receptors, including the scavenger receptor B1 (SRB1). Liver cholesterol content is regulated by the rate of synthesis and the rate of conversion to bile acids, which are secreted into the intestine. The transcription factor SREBP1 (sterol response element binding protein 1) and the enzymes 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase and cytochrome P450 7A1 (CYP7A1) regulate important steps in cholesterol metabolism. Steps known to be influenced by thyroid hormone mimetics are indicated by thin arrows, and upregulated and downregulated steps are distinguished by the direction of the arrow. Steps known to be influenced by statins are represented by dashed arrows. (Adapted from Ref. 43.)

第2章 1-ベンジル-4-アミノインドール骨格を有する新規 TR β 作動薬の創出

2-1 序論

TR の各アイソフォームの機能と組織分布が完全に解明されるまでは^{28-30,43-48}，甲状腺ホルモン⁴⁹⁻⁵¹の有益な脂質低下作用を特異的に発揮させるために，甲状腺ホルモン誘導体を肝臓選択的に移行させる努力がなされてきた。そのため，初期の甲状腺ホルモン誘導体はコンフォメーションを活性型に保持しつつ，肝集積性を付与する修飾が行われている。また，多くの最適化研究は修飾が容易なアウターリングの3'-ヨウ素置換基の等価体をデザインすることに焦点が置かれた。ピリダニンジル基は最適な3'置換基の1つであり，それを持つL-94901⁴⁹⁻⁵¹は非常によく研究された誘導体である。残念ながら，3'置換基の最適化研究は盛んに行われたが，その中から医薬品となるものは見出されなかった。この結果はTR β 選択性獲得も重要な戦略になりうることを示すとともに，TR作動薬の活性と選択性を向上させるにはインナーリング周辺の最適化研究が必要となった^{52,53}。

甲状腺ホルモン誘導体の活性型コンフォメーションは2つの芳香環が垂直方向に配置し，アウターリングの3'置換基がインナーリングの芳香環に対して最も遠い位置にある。したがって，インナーリングの3, 5位に大きな置換基を導入し，アウターリングの回転を固定するデザインが重要となってくる (Figure 2-1)⁵⁴⁻⁵⁷。

筆者はGC-1の構造に着目し，インナーリングを最適化することで，活性と選択性の向上を目指すこととした。GC-1は活性型コンフォメーションを保持しているが，構造が単純であるため，インナーリング周辺を修飾する余地が残されていた。また，予想通りGC-1とTR β リガンド結合部位(LBD)との複合体結晶構造解析は3,5-ジメチルフェニルのインナーリングが結合ポケットを完全に占有していないことを示していた (Figure 2-2)⁴⁴。

そこで，2-メチルインドールの1位にアウターリングを結合させれば，大きな平面構造である2-メチルインドールがアウターリングとの回転障害を生じ (Figure 2-3)，活性型コンフォメーションを保持するだけでなく，結合ポケットにぴったり収まる安定な複合体を形成するという作業仮説を立て，2-メチルインドール誘導体研究を開始した。

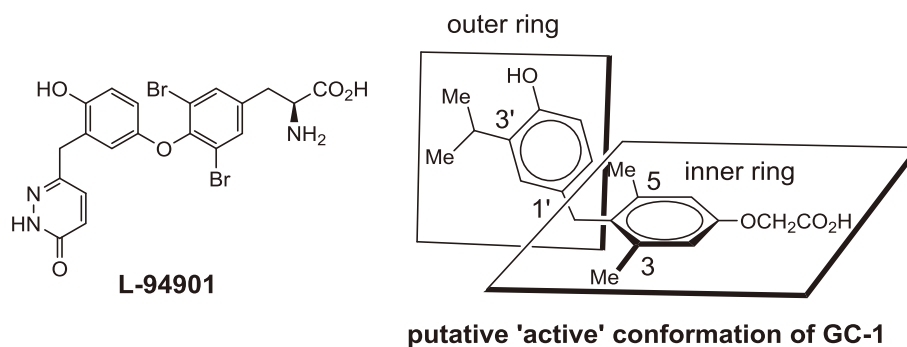


Figure 2-1. Structure of L-94901 and schematic representation of putative 'active' conformation of TR agonists. (Based on Ref. 44, 54-56.)

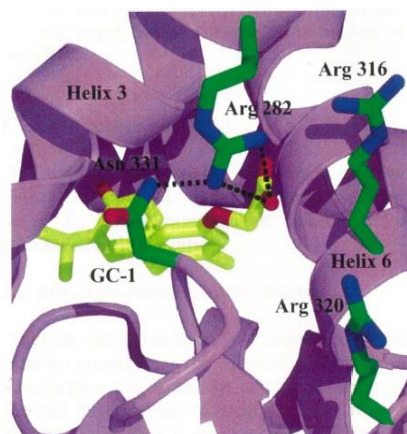


Figure 2-2. GC-1 fitted into the ligand-binding pocket of hTR β . The α -carbon backbone of the receptor is shown in light purple. The ligand is shown in yellow. Three Arg residues and one Asn residue that protrude into the polar pocket of the ligand-binding cavity are shown in green with oxygens in red and nitrogens in blue. Potential hydrogen bonds are shown by the dotted lines. (Adapted from Ref. 44.)

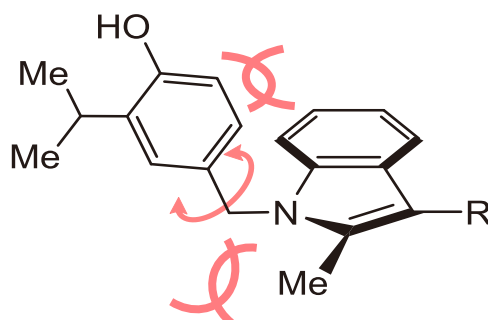


Figure 2-3. Putative conformation of 2-Methyl Indole derivative.

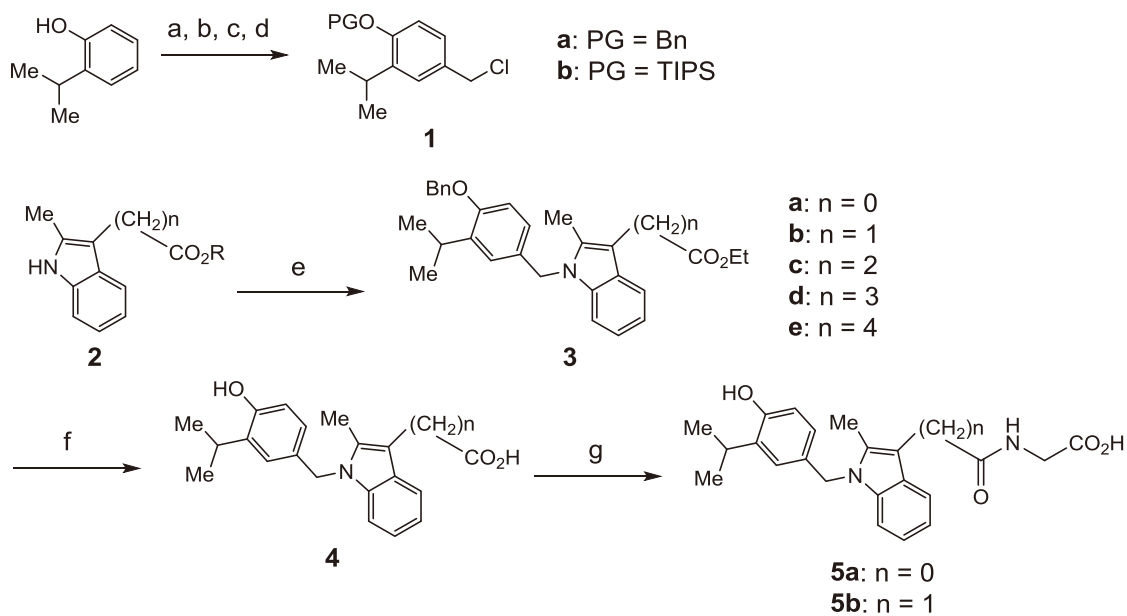
2-2 リンカー長の検討

2-2-1 候補化合物の合成

インナーリングに見たてた 2-メチルインドール環と末端カルボン酸の間のリンカー長の検討を行うため、さまざまな長さのリンカーを持つ化合物を Scheme 2-1 に沿って合成した。

まず、アウターリング部分であるベンジルクロライド **1** を以下のようにして合成した。市販されている 2-イソプロピルフェノールの 4 位を、*N*-ブロモスクシンイミド (NBS) を用いてブロモ化した後、水酸基を保護した。続いて、 t BuLi によりリチオ化した後、パラホルムアルデヒドを反応し、ヒドロキシメチル基を導入した。最後に、水酸基を塩化チオニルでクロル化し、4 ステップで化合物 **1** を得た。得られた化合物 **1** は不安定であるため、精製せずに次のステップへ進めた。

3 位にさまざまな長さのリンカーを持つ 2-メチルインドール誘導体 **4a-e** は以下のようにして合成した。対応する 2-メチルインドール **2** に塩基として水素化ナトリウムを用いて化合物 **1** との *N*-アルキル化を行った。続いてベンジル基をパラジウム触媒存在下水素添加で切断した後、エチルエステルを加水分解することにより高収率で目的の化合物 **4** を得た。**4a-e** の収率は 29% から 44% であった。得られた化合物 **4a, 4b** に縮合剤として WSC と HOBt を用いてグリシンエチルエステルを導入した後、加水分解することにより目的の 2-メチルインドール誘導体 **5a, 5b** をそれぞれ 35% と 87% の収率で得た。



Scheme 2-1. Synthesis of **5**. Reagents and conditions: (a) NBS, MeCN (quant.); (b) PG = Bn: BnCl, NaHCO₃, NaI, MeCN, 60°C (86%), PG = TIPS: TIPSCl, imidazole, DMF (67%); (c) (i) ^tBuLi, THF, -78 °C, (ii) paraformaldehyde, -78 °C (46%); (d) SOCl₂, CH₂Cl₂; (e) (i) NaH, DMF, 0°C, (ii) compound **1a**, 0 °C (**3a** : 88%, **3b** : 46%, **3c** : 17%, **3d** : 34%, **3e** : 12%); (f) (i) H₂/Pd-C, EtOH/EtOAc, (ii) NaOH, MeOH, 60°C (**4a** : 38%, **4b** : 38%, **4c** : 40%, **4d** : 29%, **4e** : 44%); (g) glycine ethyl ester-HCl, WSC, HOBT, Et₃N, DMF (**5a** : 35%, **5b** : 87%).

2-2-2 活性評価および考察

得られた化合物の TR 結合親和性は受容体結合試験（バインディングアッセイ）により評価し、アゴニスト活性は転写活性化試験（レポーターアッセイ）により評価した。バインディングアッセイは大腸菌に発現させたヒト TR α 1 またはヒト TR β 1 の LBD を用いて行い、TR α 1 LBD または TR β 1 LBD への ^{125}I -T3 の特異的結合に対する化合物の競合阻害を評価することによって行った。レポーターアッセイはヒト TR α 1 またはヒト TR β 1 とレポーター遺伝子としてアルカリホスファターゼ遺伝子を配したプラスミドを導入したサル由来細胞の CV-1 を用いて評価した。

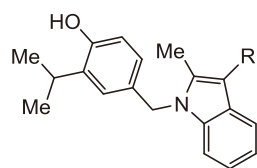
合成した化合物のバインディングアッセイとレポーターアッセイの結果を Table 2-1 に示す。T3 の TR α 1 と TR β 1 に対する親和性は非常に高く、IC $_{50}$ はそれぞれ 3.2 nM と 2.9 nM であった。また、T3 は TR α 1 と TR β 1 に対して強いアゴニスト作用を示し、ED $_{50}$ はそれぞれ 2.1 nM と 2.0 nM であった。しかし、 α/β の選択性は 1.1 であり、受容体選択性は非常に乏しかった。以上より、今回構築した評価系で化合物の *in vitro* 活性は適切に評価できると判断した。

2-メチルインドール誘導体 4a-e と 5a-b の TR α 1 と TR β 1 に対する親和性は T3 に比べて 100 倍以上低下したが、概して TR β 1 に対する親和性が TR α 1 への親和性よりも良好であり、2-メチルインドール誘導体の受容体選択性は向上することが示された。4c-e の親和性を比較すると、リンカーが長くなると TR α 1 に対する親和性は大きく低下するものの、TR β 1 に対する親和性には大きな変化はなく、リンカーの長さは TR β 1 よりも TR α 1 に対する親和性に影響を与え、受容体選択性を向上させることが示された。4 と 5 の選択性を比較すると、5 の選択性の方が高く、4 と 5 で受容体選択性に違いが認められた。今回合成した化合物の中で、化合物 5b は TR β 1 への選択性が最も高く、19 倍の選択性を示した。化合物 4c-e の TR β 1 に対するアゴニスト作用は同程度であり、いずれの化合物も良好なアゴニスト活性を示した。

結合親和性においては、T3 に比べて見劣りする結果であったが、全ての化合物でアゴニスト活性は結合親和性から予測されるよりも強く現れた。Malm らのグループもまた結合親和性がアゴニスト活性を反映していないことを報告している^{46,52}。しかし、彼らが報告したアッセイ間の相違は結合親和性よりもアゴニスト活性が弱いというものであり、本研究で認められた相違とは反対であった。その理由として彼らはレポーターアッセイに用いた培養細胞には取込みトランスポーターが欠損しているためであると説明している。彼らはハムスター由来の CHO-K1 細胞を用いて試験を行っており、今回使用したサル由来の CV-1 細胞とは異なる。結合親和性がアゴニスト活性を反映していない原因については、細胞に

由来する可能性など様々なことが考えられるが、化合物 **4c-e** はバインディングアッセイで評価した結合親和性よりも細胞を用いたアゴニスト活性が強く現れていることから、少なくとも化合物 **4c-e** は標的部位である核への移行性が良好であることが期待された。

以上の結果から、2-メチルインドールはインナーリングの構造として適した骨格であり、リンカーの長さは受容体選択性に影響することが示された。また、**4** と **5** で受容体選択性に違いが認められることからカルボン酸側鎖が受容体選択性に影響していることが示唆された。

Table 2-1. Potency of compounds **4a–e** and **5a–b** for TRs

Comp	R	Binding assay ^a (IC ₅₀ , μM)			Reporter assay (EC ₅₀ , μM)		
		TR α	TR β	α/β	TR α	TR β	α/β
T3		0.0032	0.0029	1.1	0.0021	0.002	1.0
4b	CH ₂ CO ₂ H	—	—	—	0.45	0.15	3.0
4c	CH ₂ CH ₂ CO ₂ H	1.3	0.76	1.7	0.039	0.037	1.0
4d	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CO ₂ H	3.4	0.29	11	0.18	0.037	4.8
4e	CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CO ₂ H	>10	1.4	>7.1	0.10	0.062	1.6
5b	CH ₂ CONHCH ₂ CO ₂ H	8.2	0.43	19	—	—	—
5a	CONHCH ₂ CO ₂ H	>10	1.1	>9.0	—	—	—

^a Values are the means of quadruplicate experiments.

2-3 カルボン酸側鎖の最適化

TR α と TR β のリガンド結合ポケット内でのアミノ酸残基の違いは1残基しかなく、それぞれ Ser-277 と Asn-331 になっていることが結晶構造研究から明らかになっている⁴⁴⁾。さらに、リガンド-TR LBD 共結晶構造解析により、リガンドのカルボキシラートは Ser-277/Asn-331 と隣接するアルギニン残基と水分子を介して水素結合ネットワークを形成することが明らかとなっている (Figure 2-4)⁴⁶⁾。TR α と TR β の LBD の違いはわずかであるため、リガンドのそれぞれの受容体への結合はリガンドのカルボキシラートの位置に大きく依存すると言われている⁵⁸⁾。この解析結果は、前節 2-2 の検討結果とも矛盾しない。そこで、受容体選択性を向上させるためにカルボン酸側鎖を中心に更なる最適化を行った。

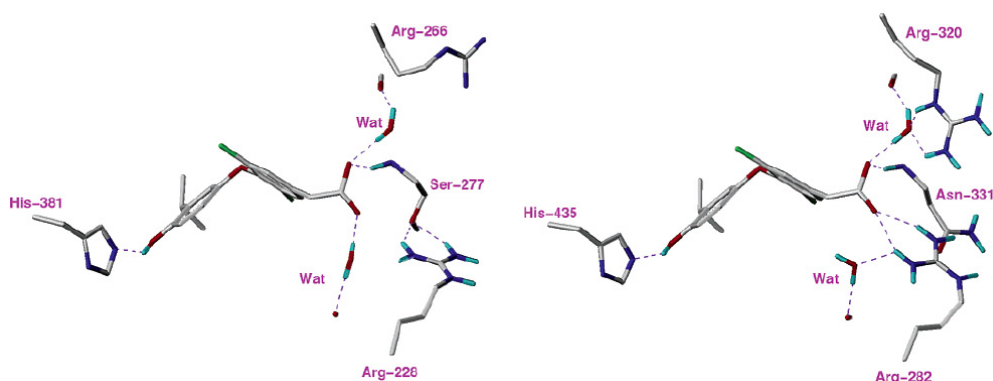
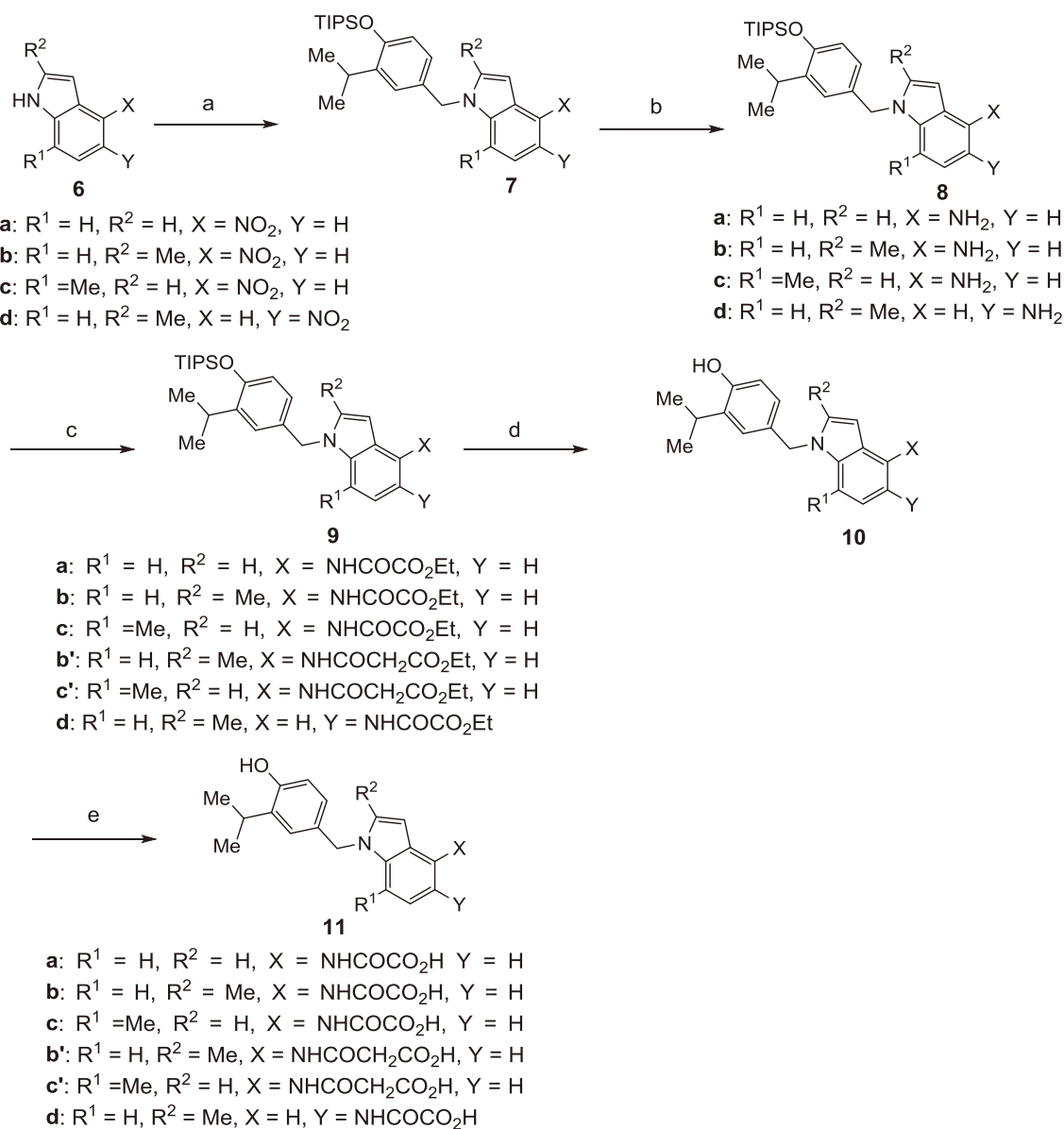


Figure 2-4. Interaction of the thyroid receptor ligand with TR α (left) and TR β (right) as seen in the crystallographic structures of the LBD/ligand complexes. Carbon atoms are depicted as white, oxygen as red, nitrogen as blue, chlorine as green, and hydrogen as cyan. Hydrogen bonding interactions are represented as dashed purple lines. In the TR α complex, Arg-228 forms two hydrogen bonds with Ser-227 while the corresponding Arg-282 in TR β forms a bifurcated hydrogen bond to one of the carboxylate oxygen atoms of ligand. The strong electrostatic interaction between the Arg-282 and the ligand accounts for the selectivity of this ligand for TR β . (Adapted from Ref. 46.)

2-3-1 候補化合物の合成

インドール環の 4 位および 5 位にカルボン酸側鎖を有するインドール誘導体 **11** は Scheme 2-2 に沿って合成した。ニトロ基を持つニトロインドール **6** はアミノ基への変換後にカルボン酸側鎖を容易に導入することができるため本合成における出発物質とした。

まず、対応する化合物 **6** は文献の方法に従って合成 (2-6 実験の部参照) または市販品を用いた。アウターリングの 1 位への導入は 2-2-1 で述べた方法と同様に塩基として水素化ナトリウムを用いて行い、化合物 **7** を得た。次に、接触水素化によりニトロ基を還元し、化合物 **8** へと変換した後、シュウ酸ジエチルまたはエチルマロニルクロリドと反応し、化合物 **9** を得た。最後にシリル保護基の脱保護、エステル加水分解を行い、目的の化合物 **11** を得た。

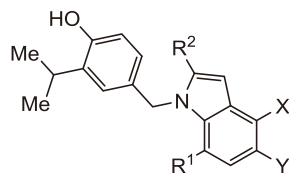


Scheme 2-2. Synthesis of **11**. Reagents and conditions: (a) (i) NaH, DMF, 0 °C, (ii) **1b**, 0 °C (**7a** : 84%, **7b** : 45%, **7c** : 82%, **7d** : 34%); (b) H₂/Pd-C, EtOH (**8a** : 82%, **8b** : 54%, **8c** : 71%, **8d** : 74%); (c) **9a**, **9b**, **9c**, and **9d**: diethyl oxalate, 100 °C (**9a** : 74%, **9b** : 81%, **9c** : 85%, **9d** : 75%), **9b'** and **9c'**: ethyl malonyl chloride, Et₃N, CH₂Cl₂ (**9b'** : 71%, **9c'** : 62%); (d) TBAF, THF (**10a** : 42%, **10b** : 23%, **10c** : 12%, **10b'** : 88%, **10c'** : 87%, **10d** : 30%); (e) NaOH, EtOH (**11a** : quant., **11b** : quant., **11c** : 95%, **11b'** : quant., **11c'** : quant., **11d** : quant.).

2-3-2 活性評価および考察

4 のバインディングアッセイとレポーターアッセイの結果の違いがサル由来の細胞のみに認められる現象であるのかを確認するため、今回のレポーターアッセイはヒト由来の細胞である HepG2 を用いて行った。Table 2-2 に **11a-d** および **11b'-c'** のバインディングアッセイとレポーターアッセイの結果を示す。種差が相違の原因であると期待したが、予想に反して、化合物群 **11** の評価においては、CV1 および HepG2 のレポーターアッセイの結果はバインディングアッセイの結果とよく相関した。しかし、僅かながら HepG2 を用いたアッセイ結果の方が結合親和性とよく一致していた。

側鎖の位置が異なる **11b** と **11d** の間には TR β 1 への親和性に大きな違いが認められた。4 位から側鎖を延ばした化合物 **11b** は TR β 1 への親和性が最も高く、IC₅₀ で 40 nM であった。一方、5 位から側鎖を延ばした化合物 **11d** の TR β 1 への親和性は最も低く、IC₅₀ で 1500 nM であった。この結果から 4 位から側鎖を延ばすことが受容体への親和性に重要であると考えられた。**11a** と **11b** を比較すると、無置換体 **11a** の TR β 1 に対する親和性は 170 nM であり 2-メチル置換体 **11b** に比べて親和性が 4 倍以上低下した。この結果は 2-メチル基が受容体への親和性に影響していることを示しており、2-メチル基の存在がアウターリングの回転を抑制するという作業仮説を支持する結果であった。更に興味深いことに、7-メチル置換体 **11c** の TR β 1 への親和性は 54 nM と高く、2-メチル置換体 **11b** と同程度の親和性を示し、メチル基は 2 位でも 7 位でも同じような効果を示すことが分かった。リンカー長の検討において、リンカーの長さが受容体選択性に影響することが示されたため、カルボキシル基とインドール環とのリンカーをメチレン基で 1 つ伸ばす効果を 2-メチル置換体 **11b** と 7-メチル置換体 **11c** で確認した。リンカーを伸ばした化合物 (**11b'**, **c'**) の TR β 1 に対する選択性は、それぞれ 21 倍と 26 倍を示し、**11b**, **c** に比べて選択性は大きく向上した。しかしながら、**11b'**, **c'** の TR β 1 への親和性は **11b**, **c** に比べて 5 倍程度低下したため、活性向上にはリンカーを伸ばす効果はないと判断し、これ以上のリンカーの展開は行わないこととした。2 つのアナログ化合物 (**11b'**, **c'**) はレポーターアッセイにおいて、どちらも TR β アゴニスト作用を示し、HepG2 での EC₅₀ はそれぞれ 0.22 μ M と 1.3 μ M を示した。HepG2 を用いたレポーターアッセイにおける TR β 選択性にわずかな違いが認められたが、これらの化合物の活性強度と受容体選択性には実質的に差異はないと考えられた。また、**11c'** のカルボン酸を一般にカルボン酸のアイソスターと言われているテトラゾール環に変えた化合物も同等の活性を示したが、脂溶性が高くなるため、本系列の中では **11b'** と **c'** が最も好ましい化合物であると判断した。

Table 2-2. Potency of compounds **11a-d** and **11b'-c'** for TRs

Comp	Substituents			Binding assay ^a (IC ₅₀ , μM)			Reporter assay (EC ₅₀ , μM)				
	X	Y	R1	R2	TR α	TR β	α/β	CV-1		HepG2	
11b	NHCOCO ₂ H	H	H	Me	0.23	0.04	5.7	0.59	2.2	0.11	1.5
11d	H	NHCOCO ₂ H	H	Me	0.23	1.5	0.15	-	-	-	-
11c	NHCOCO ₂ H	H	Me	H	0.19	0.054	3.5	0.50	1.5	0.19	2.5
11a	NHCOCO ₂ H	H	H	H	1.2	0.17	7.0	1.9	2.7	0.55	2.2
11b'	NHCOCH ₂ CO ₂ H	H	H	Me	5.2	0.23	21	1.7	4.5	0.22	16
11c'	NHCOCH ₂ CO ₂ H	H	Me	H	6.2	0.24	26	3.1	3.4	1.3	7.2

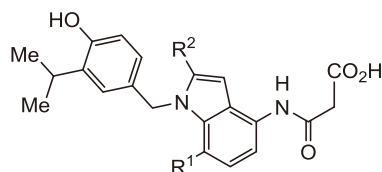
^a Values are the mean of quadruplicate experiments.

2-4 コレステロール負荷ラットモデルにおける薬理効果

最適化研究において TR β に対する選択性が高くアゴニスト活性が強い 1-ベンジル-4-アミノインドール骨格を有する **11b'**と **11c'** (以降, SKL 化合物と呼ぶ) を見出した。TR β 作用薬を臨床応用するには, 第 1 章で述べたようにコレステロール低下作用と心臓や HPT 軸への作用といった副作用を回避する必要がある。そこで, SKL 化合物について, 脂質低下作用と心臓およびホルモンフィードバックへの作用について, コレステロール負荷ラットモデルを用いて評価した。コレステロール低下作用について Table 2-3 に結果を示す。薬物投与前にコレステロールを 1 週間負荷したラット (コントロールラット) の血漿中コレステロール値は, コレステロールを負荷しないラット (正常ラット) の値 66 mg/dl に対して 3 倍上昇し, 190 mg/dl であった。SKL 化合物を 6 mg/kg または 30 mg/kg の用量で QD 1 週間投与した時, どちらの化合物も TC レベルを有意に低下させた。T3 を 50 μ g/kg QD 1 週間投与においても SKL 化合物と同様にコレステロール低下作用を示した。SKL 化合物と T3 のコレステロール低下作用を示す用量の違いは化合物の受容体への結合親和性の違いが少なくとも一部寄与していると考えられた。また, いずれの化合物も LDL コレステロールが有意に低下しており, これらの化合物のコレステロール低下作用は主に LDL コレステロールの低下によるものであった。これは他の肝選択的な甲状腺ホルモン誘導体である GC-1 や T-681 のマウス試験においても認められる結果である^{59,60}。血漿中 TG レベルに関しては, 化合物 **11c'**は有意に低下させたが, **11b'**は低下傾向に留まった。面白いことに T3 投与群は TG レベルを低下させなかった。SKL 化合物は血漿中 LDL コレステロールを低下させることから, SKL 化合物の TG 低下は LDL の肝臓への取込みが高まりコレステロール逆転送系 (RCT) が活性化し, VLDL 合成が減少したためであると考えられた。一方, SKL 化合物と同様に LDL コレステロールを低下させた T3 で TG 低下作用は認められなかった。T3 は TR α を介して脂肪組織での脂肪分解を亢進する⁶¹。そのため, 末梢から肝臓への脂肪酸の取込みが増加し, 肝臓での脂肪合成を亢進したためだと考えられた。

甲状腺ホルモンで懸念される心臓や HPT 軸への作用について評価した結果を Table 2-4 に示す。T3 および SKL 化合物を 1 週間投与した結果, いずれの化合物も心拍数や心重量はわずかに増加したが, 有意な差は認められなかった。特に SKL 化合物は高用量投与群 (150 mg/kg) でも心重量を有意に増加させなかった。心重量は心毒性の鋭敏なマーカーであり, SKL 化合物は心臓に対して安全性が高いことが示された。また, SKL 化合物の心拍数は高用量投与群 (150 mg/kg) においても臨床上問題となる増加率 15%⁵⁹までの上昇は認められず, SKL 化合物は心作用に対して安全性が高いことが示された。さらに, T3 や GC-1 と違い^{37,38}, SKL 化合物はコレステロールを低下させる用量において TSH に影響を与えなかつ

た。TR β はコレステロール代謝と TSH 分泌の調整に関与していると考えられているため、これらの化合物がコレステロール低下作用を示す用量において TSH レベルに影響を与えないことは、SKL 化合物の特性であると考えられる。さらに、SKL 化合物はコレステロールを低下させる用量で血中 T3 や T4 レベルを有意に低下させなかった。これらの結果は、SKL 化合物はコレステロール負荷ラットモデルの有効用量において心臓や HPT 軸にほとんど影響を与えないこと示している。

Table 2-3. Cholesterol-lowering effects of **11b'** and **11c'** in cholesterol-fed rats^a

	R ¹ , R ²	Total Cho (mg/dl)	LDL-Cho (mg/dl)	Free Cho (mg/dl)	HDL-Cho (mg/dl)	TG (mg/dl)
Normal		66 ± 11	8.0 ± 2	39 ± 9	28 ± 3	100 ± 40
Control		190 ± 49	51 ± 15	36 ± 9	22 ± 6	62 ± 25
T3		123 ± 15*	28 ± 5*	22 ± 2*	22 ± 2	61 ± 8
11c'	Me, H	94 ± 5*	20 ± 2*	15 ± 1*	20 ± 1	27 ± 7*
11b'	H, Me	111 ± 19*	25 ± 7*	19 ± 4*	23 ± 7	44 ± 9

^a Cholesterol-fed rats were orally treated daily for 1 week with **11b'** (30 mg/kg/day, n = 13), **11c'** (6 mg/kg/day, n = 13), T3 as a positive control (50 µg/kg/day, n = 13), or the vehicle or to be the untreated (control).

* $p < 0.05$ compared to the treated control.

Table 2-4. Effect of **11b'** and **11c'** on heart rate, heart weight, TSH, T3, and T4^a

	Heart rate (bpm)	Heart weight (g)	TSH (µIU/mL)	Total-T4 (µg/dl)	Total-T3 (ng/dl)
Normal	404.8 ± 37.2	1.08 ± 0.04	2.8 ± 1.6	4.4 ± 1.2	68 ± 6
Control	383.0 ± 26.7	1.14 ± 0.12	3.0 ± 1.0	3.8 ± 0.9	62 ± 7
T3	430.0 ± 19.3	1.25 ± 0.13	0.1 ± 0*	0.9 ± 0.4*	31 ± 9*
Low-dose 11c'	401.8 ± 22.3	1.12 ± 0.06	2.7 ± 1.8	2.4 ± 1.0*	61 ± 14
High-dose 11c'	424.3 ± 36.5	1.18 ± 0.08	1.3 ± 0.6	1.9 ± 0.5*	53 ± 8
Low-dose 11b'	403.2 ± 32.5	1.13 ± 0.10	3.1 ± 1.3	2.8 ± 0.5	63 ± 11
High-dose 11b'	415.8 ± 35.8	1.24 ± 0.07	0.9 ± 0.7	1.7 ± 0.3*	53 ± 8

^a Cholesterol-fed rats were orally treated daily for 1 week with **11b'** (30 and 150 mg/kg/day, n = 13), **11c'** (6 and 150 mg/kg/day, n = 13), T3 as positive control (50 µg/kg/day, n = 13), or the vehicle or to be the untreated (control).

* $p < 0.05$ compared to the treated control.

2-5 小括

第2章において1-ベンジルインドール骨格をもつ一連の化合物を合成し、その活性を評価した。その結果、TR β アゴニスト作用が強く、TR β に対する親和性がTR α より20倍以上高い1-ベンジル-4-アミノインドール骨格を有するSKL化合物11b'と11c'を見出した。これらの化合物はコレステロール負荷ラットモデルにおいて心臓やHPT軸にほとんど影響することなく血漿中コレステロール値を有意に低下させた。すなわち、TR β 選択的な薬剤で、肝特異的に作用させれば、従来問題であったHPT軸への影響を排除できることを示せた。Malmらのグループは先の研究において1*H*-インドール-2-カルボン酸をインナーリングのアイソスターとしてデザインし、TR β 選択的リガンドとして非常に優れた骨格であることを示した⁵²⁾。今回の研究では、その研究をさらに発展させ、1-ベンジル-4-アミノインドールがTR β 選択的作動薬として優れた骨格であることも示すことができ、インナーリングのアイソスターとしてインドールの可能性を更に広げることができた。

2-6 実験の部

2-6-1 化合物合成

2-6-1-1 試薬と測定装置

実験に使用した試薬および溶媒は、市販の試薬および溶媒をそのまま使用した。出発物質の 2-methylindole-3-carboxylic acid と ethyl 2-methylindole-3-acetate および 2-methyl-5-nitroindole は市販品を使用した。その他の 3-indoyl acid ester 化合物^{62,63}と nitroindole 化合物⁶⁴は文献の方法に従って合成した。フラッシュクロマトグラフィーは Silica Gel 60 (particle size 0.040 - 0.050 mm, Kanto Kagaku) または Hi-Flash columns (silica gel, particle size 0.070 mm, Yamazen Science) を使用して行った。融点は Yanaco MP-J3 微量融点測定装置を用いて測定し、補正なしの値として示した。¹H 核磁気共鳴 (NMR) スペクトルは Bruker AVANCE III を用いて 400 MHz, 25 °C で、トリメチルシランを内部標準として測定した。データは以下のように表記した。トリメチルシランに対する化学シフト ppm (δ), 積分値, シグナル(s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, br = broad, m = multiplet), カップリング定数 (Hz)。赤外吸収スペクトル (IR) は JASCO FT/IR-4200 赤外分光光度計を用いてシングル反射ダイヤモンド ATR ユニットで測定した。質量スペクトル (MS) は Waters Micromass ZMD2000 LC/MS システム (Alliance2690/PDA 210-400 nm/Micromass ZMD2000) で測定した。高分解能質量スペクトル (HRMS) は Thermo LTQ Orbitrap を用いて測定した。

2-6-1-2 4-Bromo-2-isopropylphenol

2-Isopropylphenol (50.0 g, 367 mmol) をアセトニトリル (500 mL) に溶解し、0 °C で NBS (71.9 g, 404 mmol) を加えた。反応液を室温で 4 時間攪拌した後、減圧濃縮した。残渣をヘキサンに懸濁し、不溶物をろ去した。ろ液を水、飽和食塩水の順に洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤をろ去後、減圧濃縮し、薄黄色オイル状の表題化合物 (84.0 g, 収率 quant.) を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.10 (6H, d, J = 7.0 Hz), 3.17 (1H, m), 6.61 (1H, d, J = 8.4 Hz), 7.15 (1H, dd, J = 2.2, 8.4 Hz), 7.27 (1H, d, J = 2.2 Hz); MS (ESI) m/z 213, 215 (M - H)⁻.

2-6-1-3 1-Benzyl-4-bromo-2-isopropylbenzene

4-Bromo-2-isopropylphenol (2.2 g, 7 mmol) をアセトニトリル (10.0 mL) に溶解し、室温で塩化ベンジル (1.7 g, 13 mmol) を加えた。60 °C で 18 時間攪拌した後、反応液を室温に戻し、減圧濃縮した。残渣に水を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水の順で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤をろ去し、減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルフラッシュクロマトグラフィー (溶出溶媒: ヘキサン/酢酸エチル=1/0-9/1) で精製し、無色のオイル状の表題化合物(27.0 g, 収率 86%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1.21 (6H, d, $J=7.2$ Hz), 3.37 (1H, m), 6.76 (1H, d, $J=8.4$ Hz), 7.23 (1H, dd, $J=2.8, 8.4$ Hz), 7.31-7.43 (6H, m); MS (ESI) m/z 303, 305 ($\text{M}-\text{H}$) $^-$.

2-6-1-4 4-Bromo-2-isopropyl-1-triisopropylsilyloxybenzene

4-Bromo-2-isopropylphenol (84.8 g, 394 mmol) の *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) に溶解し、トリイソプロピルシリルクロリド (101 mL, 472 mmol) とイミダゾール (53.7 g, 789 mmol) を加えた。室温で 24 時間攪拌した後、反応液をヘキサンで希釈し、水、飽和食塩水の順で洗浄した後、硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤をろ去し、減圧濃縮した後、残渣をアセトニトリルで結晶化し、白色固体の表題化合物 (98.0 g, 収率 67%) を得た。

mp 59-60 °C; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1.10 (18H, d, $J=7.3$ Hz), 1.18 (6H, d, $J=7.0$ Hz), 1.28 (3H, m), 3.32 (1H, m), 6.63 (1H, d, $J=8.4$ Hz), 7.12 (1H, dd, $J=2.6, 8.4$ Hz), 7.25 (1H, d, $J=2.6$ Hz); MS (ESI) m/z 370, 372 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

2-6-1-5 (3-Isopropyl-4-triisopropylsilyloxyphenyl)methanol

4-Bromo-2-isopropyl-1-triisopropylsilyloxybenzene (23.6 g, 64 mmol) をテトラヒドロフラン (THF) に溶解し、-78 °C で 1 時間かけて $t\text{BuLi}$ (1.5 M ペンタン溶液, 100 mL, 150 mmol) を滴下した。1 時間攪拌した後、パラホルムアルデヒド (3.9 g) を加えて、-78 °C で 1 時間攪拌し、その後室温で 3 時間攪拌した。反応液をジエチルエーテル (300 mL) で希釈した後、1M 塩酸水溶液、飽和食塩水の順で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤をろ去し、減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルフラッシュクロマトグラフィー (溶出溶媒: ヘキサン/酢酸エチル=1/0-4/1) で精製し、無色のオイル状の表題化合物 (9.4 g, 収率 46%) を得た。

^1H NMR (CDCl_3) δ 1.12 (18H, d, $J = 7.3$ Hz), 1.21 (6H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.32 (3H, m), 3.37 (1H, m), 4.59 (2H, d, $J = 5.5$ Hz), 6.75 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 7.02 (1H, dd, $J = 1.2, 8.0$ Hz), 7.20 (1H, d, $J = 1.2$ Hz); MS (ESI) m/z 305 ($\text{M} - \text{H}_2\text{O}$) $^+$, 321 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$.

2-6-1-6 (4-Benzyloxy-3-isopropylphenyl)methanol

1-Benzyloxy-4-bromo-2-isopropylbenzene を用いて、2-6-1-5 と同様の方法で、白色固体の表題化合物を得た。

mp 56–58 °C; ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.22 (6H, d, $J = 7.2$ Hz), 3.41 (1H, m), 4.60 (2H, s), 5.07 (2H, s), 6.87 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.12 (1H, dd, $J = 2.0, 8.4$ Hz), 7.23–7.43 (6H, m); MS (ESI) m/z 239 ($\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}$) $^+$, 255 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$.

2-6-1-7 (4-Chloromethyl-2-isopropylphenoxy)triisopropylsilane (1b)

塩化チオニル (1.6 mL, 22 mmol) を(3-isopropyl-4-triisopropylsilanyloxyphenyl)methanol (4.6 g, 14 mmol) のジクロロメタン溶液 (46 mL) に滴下して加え、室温で2時間攪拌した。次に反応液を減圧濃縮して **1b** を得た。**1b** は精製せずに、次のステップに使用した。1-Benzyloxy-4-chloromethyl-2-isopropylbenzene (**1a**) は対応するアルコールを用いて、**1b** と同様の方法で合成し、次の反応に使用した。

2-6-1-8 Ethyl [1-(4-benzyloxy-3-isopropylbenzyl)-2-methyl-1H-indol-3-yl]acetate (3b)

水素化ナトリウム (含量 60%, 87.1 mg, 2.2 mmol) を DMF (2.0 mL) に懸濁した後、0 °C で ethyl (2-methylindol-3-yl)acetate (430.0 mg, 2.0 mmol) の DMF 溶液 (2.0 mL) を滴下した。0 °C で1時間攪拌した後、**1a** (ca. 2.2 mmol) の DMF 溶液 (2.0 mL) を0 °C で滴下し、3時間攪拌した。反応液を氷水に注いだ後、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水の順で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤をろ去し、減圧濃縮した後、シリカゲルフラッシュクロマトグラフィー (溶出溶媒: ヘキサン/酢酸エチル=9/1) で精製し、白色固体の表題化合物 (387 mg, 収率 43%) を得た。

mp 76–77 °C; ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.18 (6H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.22 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 2.35 (3H, s), 3.35 (1H, m), 3.73 (2H, s), 4.14 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 5.00 (2H, s), 5.25 (2H, s), 6.57 (1H, dd, $J = 2.2, 8.4$ Hz), 6.72 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.02 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 7.09–7.13 (2H,

m), 7.24 (1H, m), 7.32 (1H, m), 7.36–7.40 (4H, m), 7.58 (1H, m); MS (ESI) m/z 456 (M + H)⁺; HRMS (ESI) m/z calcd for C₃₀H₃₄NO₃ (M + H)⁺ 456.2533, found 456.2528.

2-6-1-9 Ethyl 1-(4-benzyloxy-3-isopropylbenzyl)-2-methyl-1*H*-indole-3-carboxylate (3a)

Ethyl 2-methyl-1*H*-indole-3-carboxylate を用いて, **3b** と同様の方法で, 白色固体の表題化合物 (収率 88%) を得た。

mp 89–91 °C, ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.18 (6H, d, J = 6.9 Hz), 1.26 (3H, t, J = 7.1 Hz), 2.75 (3H, s), 3.35 (1H, m), 4.43 (2H, q, J = 7.1 Hz), 5.00 (2H, s), 5.29 (2H, s), 6.58 (1H, dd, J = 1.9, 8.4 Hz), 6.73 (1H, d, J = 8.4 Hz), 7.04 (1H, d, J = 1.9 Hz), 7.13–7.32 (4H, m), 7.36–7.40 (4H, m), 8.17 (1H, d, J = 7.5 Hz); MS (ESI) m/z 442 (M + H)⁺; HRMS (ESI) m/z calcd for C₂₉H₃₂NO₃ (M + H)⁺ 442.2377, found 442.2378.

2-6-1-10 Ethyl [1-(4-benzyloxy-3-isopropylbenzyl)-2-methyl-1*H*-indol-3-yl]propanoate (3c)

Ethyl (2-methylindol-3-yl)propanoate を用いて, **3b** と同様の方法で, 泡状の表題化合物 (収率 17%) を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.18 (6H, d, J = 6.9 Hz), 1.26 (3H, t, J = 7.0 Hz), 2.32 (3H, s), 2.62 (2H, t, J = 7.8 Hz), 3.08 (2H, t, J = 7.8 Hz), 3.35 (1H, m), 4.11 (2H, q, J = 7.0 Hz), 5.00 (2H, s), 5.22 (2H, s), 6.54 (1H, dd, J = 2.2, 8.4 Hz), 6.71 (1H, d, J = 8.4 Hz), 7.00 (1H, d, J = 2.2 Hz), 7.05–7.12 (2H, m), 7.22 (1H, m), 7.30 (1H, m), 7.34–7.41 (4H, m), 7.54 (1H, m); MS (ESI) m/z 470 (M + H)⁺; HRMS (ESI) m/z calcd for C₃₁H₃₆NO₃ (M + H)⁺ 470.2690, found 470.2690.

2-6-1-11 Ethyl [1-(4-benzyloxy-3-isopropylbenzyl)-2-methyl-1*H*-indol-3-yl]butanoate (3d)

Ethyl (2-methylindol-3-yl)butanoate を用いて, **3b** と同様の方法で行い, 泡状の表題化合物 (収率 34%) を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.18 (6H, d, J = 6.9 Hz), 1.23 (3H, t, J = 7.1 Hz), 1.97 (2H, m), 2.29 (3H, s), 2.32 (2H, t, J = 7.3 Hz), 2.80 (2H, t, J = 7.3 Hz), 3.35 (1H, m), 4.11 (2H, q, J = 7.1 Hz), 5.00 (2H, s), 5.23 (2H, s), 6.57 (1H, dd, J = 1.4, 8.4 Hz), 6.73 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.97

(1H, d, $J = 1.4$ Hz), 7.06–7.12 (2H, m), 7.22 (1H, m), 7.31 (1H, m), 7.34–7.41 (4H, m), 7.54 (1H, m); MS (ESI) m/z 484 (M + H)⁺; HRMS (ESI) m/z calcd for C₃₂H₃₈NO₃ (M + H)⁺ 484.2846, found 484.2843.

2-6-1-12 Ethyl [1-(4-benzyloxy-3-isopropylbenzyl)-2-methyl-1*H*-indol-3-yl]pentanoate (3e)

Ethyl (2-methylindol-3-yl)pentanoate を用いて、**3b** と同様の方法で、泡状の表題化合物 (収率 12%) を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.18 (6H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.22 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 1.63–1.74 (4H, m), 2.29 (3H, s), 2.31 (2H, t, $J = 6.9$ Hz), 2.76 (2H, t, $J = 6.9$ Hz), 3.35 (1H, m), 4.11 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 5.00 (2H, s), 5.22 (2H, s), 6.55 (1H, dd, $J = 2.2, 8.5$ Hz), 6.72 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.99 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 7.03–7.11 (2H, m), 7.22 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 7.28 (1H, m), 7.34–7.40 (4H, m), 7.53 (1H, m); MS (ESI) m/z 498 (M + H)⁺; HRMS (ESI) m/z calcd for C₃₃H₄₀NO₃ (M + H)⁺ 498.3003, found 498.3004.

2-6-1-13 [1-(3-Isopropyl-4-hydroxybenzyl)-2-methyl-1*H*-indol-3-yl]acetic acid (4b)

3b (339 mg, 0.7 mmol) を酢酸エチル (2.5 mL) とエタノール (2.5 mL) に溶解し、10% Pd-C (135 mg) を加えた。反応液を水素雰囲気下、室温で 3 時間攪拌した。パラジウム触媒はろ去し、ろ液を減圧濃縮した。残渣をシリカゲルフラッシュクロマトグラフィー (溶出溶媒: ヘキサン/酢酸エチル = 1/0–4/1) で精製し、脱ベンジル中間体を得た (206 mg; MS (ESI) m/z 394 (M + H)⁺, 392 (M – H)⁻)。得られた脱ベンジル中間体をメタノール (2.0 mL) に溶解し、1M 水酸化ナトリウム水溶液 (1.1 mL) を加えた後、反応液を 60 °C で 2 時間攪拌した。減圧濃縮した後、1M 塩酸水溶液と酢酸エチルを加えた。有機層を飽和食塩水で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤をろ去し、減圧濃縮した後、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: ヘキサン/酢酸エチル = 1/1) で精製し、泡状の表題化合物 (95 mg, 収率 38%, 2 steps) を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.17 (6H, d, $J = 6.9$ Hz), 2.31 (3H, s), 3.12 (1H, m), 3.76 (2H, s), 5.21 (2H, s), 6.48 (1H, dd, $J = 1.8, 8.4$ Hz), 6.52 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.94 (1H, d, $J = 1.8$ Hz), 7.07–7.12 (2H, m), 7.21 (1H, m), 7.57 (1H, m); IR (ATR) 3498, 2960, 1698 cm⁻¹; MS (ESI) m/z 338 (M + H)⁺, 336 (M – H)⁻; HRMS (ESI) m/z calcd for C₂₁H₂₄NO₃ (M + H)⁺ 338.1751, found 338.1752.

2-6-1-14 1-(3-Isopropyl-4-hydroxybenzyl)-2-methyl-1*H*-indole-3-carboxylic acid (4a)

3a を用いて、**4b** と同様の方法で、白色固体の表題化合物（収率 38%, 2 steps）を得た。mp 198–200 °C (dec), ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.19 (6H, d, *J* = 6.9 Hz), 2.70 (3H, s), 3.12 (1H, m), 5.35 (2H, s), 6.52 (1H, dd, *J* = 1.8, 8.0 Hz), 6.64 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 7.01 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 7.10–7.16 (2H, m), 7.51 (1H, m), 8.00 (1H, m), 9.26 (1H, brs); IR (ATR) 3111, 1698 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z* 324 (M + H)⁺, 322 (M – H)⁻; HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₀H₂₂NO₃ (M + H)⁺ 324.1594, found 324.1597.

2-6-1-15 [1-(3-Isopropyl-4-hydroxybenzyl)-2-methyl-1*H*-indol-3-yl]propanoic acid (4c)

3c を用いて、**4b** と同様の方法で、泡状の表題化合物（収率 40 %, 2 steps）を得た。¹H NMR (CDCl₃) δ 1.19 (6H, d, *J* = 7.0 Hz), 2.34 (3H, s), 2.66 (2H, t, *J* = 7.3 Hz), 3.08 (2H, t, *J* = 7.3 Hz), 3.14 (1H, m), 5.19 (2H, s), 5.28 (1H, s), 6.43 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 6.51 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.97 (1H, s), 7.07–7.12 (2H, m), 7.24 (1H, m), 7.57 (1H, d, *J* = 6.6 Hz); IR (ATR) 3386, 2965, 1669 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z* 352 (M + H)⁺, 350 (M – H)⁻; HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₂H₂₆NO₃ (M + H)⁺ 352.1907, found 352.1910.

2-6-1-16 [1-(3-Isopropyl-4-hydroxybenzyl)-2-methyl-1*H*-indol-3-yl]butanoic acid (4d)

3d を用いて、**4b** と同様の方法で、泡状の表題化合物（収率 29 %, 2 steps）を得た。¹H NMR (CDCl₃) δ 1.21 (6H, d, *J* = 7.0 Hz), 2.07 (2H, m), 2.30 (3H, s), 2.39 (2H, t, *J* = 7.3 Hz), 2.83 (2H, t, *J* = 7.3 Hz), 3.17 (1H, m), 5.23 (2H, s), 6.49 (1H, dd, *J* = 1.2, 8.4 Hz), 6.56 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.96 (1H, brs), 7.10–7.14 (2H, m), 7.23 (1H, brd, *J* = 7.7 Hz), 7.55 (1H, d, *J* = 7.6 Hz); IR (ATR) 3380, 2959, 1702 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z* 366 (M + H)⁺, 364 (M – H)⁻; HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₃H₂₈NO₃ (M + H)⁺ 366.2064, found 366.2064.

2-6-1-17 [1-(3-Isopropyl-4-hydroxybenzyl)-2-methyl-1*H*-indol-3-yl]pentanoic acid (4e)

3e を用いて、**4b** と同様の方法で、泡状の表題化合物（収率 44%, 2 steps）を得た。¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.07 (6H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.45–1.70 (4H, m), 2.22 (2H, t, *J* = 7.0 Hz), 2.33 (3H, s), 2.69 (2H, t, *J* = 6.6 Hz), 3.21 (1H, m), 5.23 (2H, s), 6.52 (1H, dd, *J* = 2.2, 8.4 Hz), 6.63 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.89 (1H, d, *J* = 1.9 Hz), 6.95 (1H, t, *J* = 7.0 Hz), 7.01 (1H, t,

$J = 6.9$ Hz), 7.33 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.44 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 9.09 (1H, brs), 11.8 (1H, brs); IR (ATR) 3394, 2929, 1703 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z 380 ($M + H$)⁺, 378 ($M - H$)⁻; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{NO}_3$ ($M + H$)⁺ 380.2220, found 380.2223.

2-6-1-18 {[1-(3-Isopropyl-4-hydroxybenzyl)-2-methyl-1*H*-indol-3-yl]acetylamino}acetic acid (5b)

4b (985 mg, 2.9 mmol) を DMF (75 mL) に溶解し、トリエチルアミン (985 μL , 7.0 mmol), HOBt (492 mg, 3.2 mmol), グリシンエステル塩酸塩 (448 mg, 3.2 mmol), WSC (671 mg, 3.5 mmol) を室温で加えた後、反応液を室温で 48 時間攪拌した。反応液に水と酢酸エチルを加えた。有機層を飽和炭酸水素ナトリウム水溶液, 1M 塩酸水溶液, 水, 飽和食塩水の順で洗浄し, 硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤をろ去し, 減圧濃縮した後, 残渣をヘキサン/ジエチルエーテルで固体化し, エステル中間体 (1.1 g; MS (ESI) m/z 423 ($M + H$)⁺, 421 ($M - H$)⁻) を得た。得られた中間体を **4b** と同様の方法で加水分解し, 白色固体の表題化合物 (1.0 g, 収率 87%) を得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.10 (6H, d, $J = 6.9$ Hz), 2.32 (3H, s), 3.13 (1H, m), 3.24 (2H, d, $J = 4.0$ Hz), 3.51 (2H, s), 5.24 (2H, s), 6.51 (1H, dd, $J = 2.2, 8.4$ Hz), 6.64 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.91–7.14 (4H, m), 7.35 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.46 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 9.32 (1H, brs); IR (ATR) 3302, 2959, 1731, 1651, 1509 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z 395 ($M + H$)⁺, 393 ($M - H$)⁻; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4$ ($M + H$)⁺ 395.1965, found 395.1954.

2-6-1-19 2-[1-(4-Hydroxy-3-isopropylbenzyl)-2-methyl-1*H*-indole-3-carboxamidol]acetic acid (5a)

4a を用いて, **5b** と同様の方法で行い, 白色固体の表題化合物 (収率 35%) を得た。mp 145–148 °C (dec); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.10 (6H, d, $J = 7.0$ Hz), 2.32 (3H, s), 3.13 (1H, m), 3.88 (2H, d, $J = 5.2$ Hz), 5.32 (2H, s), 6.51 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.65 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.03 (1H, s), 7.07–7.18 (2H, m), 7.48 (1H, d, $J = 7.3$ Hz), 7.62 (1H, brs), 7.86 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 9.20 (1H, brs); IR (ATR) 3328, 2958, 1721, 1591, 1543 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z 381 ($M + H$)⁺, 379 ($M - H$)⁻; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4$ ($M + H$)⁺ 381.1809, found 381.1812.

2-6-1-20 1-(3-Isopropyl-4-triisopropylsilanyloxybenzyl)-4-nitro-1*H*-indole (7a)

水素化ナトリウム (含量 60%, 59.2 mg, 1.5 mmol) を DMF (1.0 mL) に懸濁し, 4-nitro-1*H*-indole (200 mg, 1.2 mmol) の DMF 溶液 (1.0 mL) を 5 °C で滴下した後, 室温で 1 時間攪拌した。続いて, **1b** (ca. 1.5 mmol) の DMF 溶液 (2.0 mL) を加え, 室温で 3 時間攪拌した。反応液を氷水に注ぎ, 酢酸エチルで抽出した後, 有機層を水, 飽和食塩水の順で洗浄し, 硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤をろ去し, 減圧濃縮した後, シリカゲルフラッシュクロマトグラフィー (溶出溶媒: ヘキサン/酢酸エチル=9/1) で精製し, 黄色固体の表題化合物 (481 mg, 収率 84%) を得た。

mp 98–100 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.08 (18H, d, *J* = 7.4 Hz), 1.09 (6H, d, *J* = 6.6 Hz), 1.27 (3H, m), 3.34 (1H, m), 5.29 (2H, s), 6.67 (1H, s), 7.05 (1H, s), 7.26 (3H, m), 7.38 (1H, d, *J* = 6.2 Hz), 7.66 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 8.13 (1H, d, *J* = 8.1 Hz); MS (ESI) *m/z* 467 (M + H)⁺; HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₇H₃₉N₂O₃Si (M + H)⁺ 467.2724, found 467.2720.

2-6-1-21 1-(3-Isopropyl-4-triisopropylsilanyloxybenzyl)-2-methyl-4-nitro-1*H*-indole (7b)

2-Methyl-4-nitro-1*H*-indole を用いて, **7a** と同様の方法で, 黄色固体の表題化合物 (収率 45%) を得た。

mp 116–118 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.07 (18H, d, *J* = 7.4 Hz), 1.14 (6H, d, *J* = 7.0 Hz), 1.26 (3H, m), 2.46 (3H, s), 3.32 (1H, m), 5.29 (2H, s), 6.42 (1H, dd, *J* = 2.2, 8.4 Hz), 6.62 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 6.94 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 7.08 (1H, s), 7.13 (1H, t, *J* = 8.1 Hz), 7.54 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 8.10 (1H, d, *J* = 8.0 Hz); MS (ESI) *m/z* 481 (M + H)⁺; HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₈H₄₁N₂O₃Si (M + H)⁺ 481.2881, found 481.2875.

2-6-1-22 1-(3-Isopropyl-4-triisopropylsilanyloxybenzyl)-7-methyl-4-nitro-1*H*-indole (7c)

7-Methyl-4-nitro-1*H*-indole を用いて, **7a** と同様の方法で, 黄色固体の表題化合物 (収率 82%) を得た。

mp 102–104 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.08 (18H, d, *J* = 6.9 Hz), 1.13 (6H, d, *J* = 7.4 Hz), 1.26 (3H, m), 2.63 (3H, s), 3.34 (1H, m), 5.55 (2H, s), 6.42 (1H, dd, *J* = 2.4, 8.3 Hz), 6.65 (1H, d, *J* = 8.3 Hz), 6.86 (1H, d, *J* = 2.4 Hz), 6.94 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.29 (1H, d, *J* = 3.1

Hz), 7.33 (1H, d, $J = 3.1$ Hz), 8.04 (1H, d, $J = 8.1$ Hz); MS (ESI) m/z 481 (M + H)⁺; HRMS (ESI) m/z calcd for C₂₈H₄₁N₂O₃Si (M + H)⁺ 481.2881, found 481.2880.

2-6-1-23 1-(3-Isopropyl-4-triisopropylsilanyloxybenzyl)-2-methyl-5-nitro-1*H*-indole (7d)

2-Methyl-5-nitro-1*H*-indole を用いて, **7a** と同様の方法で, 黄色固体の表題化合物 (収率 34%) を得た。

mp 118–120 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.07 (18H, d, $J = 7.3$ Hz), 1.14 (6H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.26 (3H, m), 2.41 (3H, s), 3.32 (1H, m), 5.26 (2H, s), 6.45 (1H, dd, $J = 2.2, 8.5$ Hz), 6.48 (1H, s), 6.63 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.92 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 7.23 (1H, s), 8.02 (1H, dd, $J = 2.2, 8.8$ Hz), 8.50 (1H, d, $J = 2.2$ Hz); MS (ESI) m/z 481 (M + H)⁺; HRMS (ESI) m/z calcd for C₂₈H₄₁N₂O₃Si (M + H)⁺ 481.2881, found 481.2877.

2-6-1-24 1-(3-Isopropyl-4-triisopropylsilanyloxybenzyl)-1*H*-indol-4-ylamine (8a)

7a (311 mg, 0.7 mmol) を THF (5.0 mL) とエタノール (5.0 mL) に溶解し, 10% Pd-C (93.3 mg) を加えた後, 水素雰囲気下, 室温で 3 時間攪拌した。パラジウム触媒をろ去し, 減圧濃縮した。残渣をシリカゲルフラッシュクロマトグラフィー (溶出溶媒: ヘキサン/酢酸エチル = 1/0–4/1) で精製し, 泡状の表題化合物 (257 mg, 収率 82%) を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.07 (18H, d, $J = 7.3$ Hz), 1.15 (6H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.24 (3H, m), 3.33 (1H, m), 3.92 (2H, brs), 5.19 (2H, s), 6.39 (1H, d, $J = 7.3$ Hz), 6.41 (1H, d, $J = 3.3$ Hz), 6.64 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 6.70 (1H, dd, $J = 2.2, 8.5$ Hz), 6.81 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.98–7.02 (2H, m), 7.05 (1H, s); MS (ESI) m/z 437 (M + H)⁺, 435 (M – H)[–]; HRMS (ESI) m/z calcd for C₂₇H₄₁N₂O₃Si (M + H)⁺ 437.2983, found 437.2984.

2-6-1-25 1-(3-Isopropyl-4-triisopropylsilanyloxybenzyl)-2-methyl-1*H*-indol-4-ylamine (8b)

7b を用いて, **8a** と同様の方法で, 泡状の表題化合物 (収率 54%) を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.09 (18H, d, $J = 7.3$ Hz), 1.16 (6H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.27 (3H, m), 2.36 (3H, s), 3.33 (1H, m), 3.49 (1H, brs), 5.16 (2H, s), 6.21 (1H, s), 6.38 (1H, d, $J = 7.3$ Hz), 6.48 (1H, dd, $J = 2.2, 8.1$ Hz), 6.59 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.75 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 6.94 (1H, t,

$J = 7.9$ Hz), 7.01 (1H, d, $J = 1.8$ Hz); MS (ESI) m/z 451 ($M + H$)⁺; HRMS (ESI) m/z calcd for C₂₈H₄₃N₂OSi ($M + H$)⁺ 451.3139, found 451.3134.

2-6-1-26 1-(3-Isopropyl-4-triisopropylsilanyloxybenzyl)-7-methyl-1*H*-indol-4-ylamine (8c)

7c を用いて, **8a** と同様の方法で, ベージュ色固体の表題化合物 (収率 71%) を得た。
mp 121–123 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.08 (18H, d, $J = 7.3$ Hz), 1.15 (6H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.26 (3H, m), 2.48 (3H, s), 3.33 (1H, m), 3.81 (2H, brs), 5.47 (2H, s), 6.31 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 6.42 (1H, d, $J = 2.3$ Hz), 6.47 (1H, dd, $J = 2.2, 8.4$ Hz), 6.62 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 6.69 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 6.94 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 6.96 (1H, d, $J = 2.9$ Hz); MS (ESI) m/z 451 ($M + H$)⁺; HRMS (ESI) m/z calcd for C₂₈H₄₃N₂OSi ($M + H$)⁺ 451.3139, found 451.3136.

2-6-1-27 1-(3-Isopropyl-4-triisopropylsilanyloxybenzyl)-2-methyl-1*H*-indol-5-ylamine (8d)

7d を用いて, **8a** と同様の方法で, ベージュ色固体の表題化合物 (収率 74%) を得た。
mp 105–106 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.07 (18H, d, $J = 7.3$ Hz), 1.15 (6H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.25 (3H, m), 2.33 (3H, s), 3.32 (1H, m), 3.46 (1H, brs), 5.15 (2H, s), 6.12 (1H, s), 6.44 (1H, dd, $J = 2.2, 8.4$ Hz), 6.55 (1H, dd, $J = 2.2, 8.4$ Hz), 6.58 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.87 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 6.98 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 7.03 (1H, d, $J = 8.7$ Hz); MS (ESI) m/z 451 ($M + H$)⁺; HRMS (ESI) m/z calcd for C₂₈H₄₃N₂OSi ($M + H$)⁺ 451.3139, found 451.3134.

2-6-1-28 Ethyl *N*-[1-(3-isopropyl-4-triisopropylsilanyloxybenzyl)-1*H*-indol-4-yl]oxamate (9a)

8a (139.0 mg, 0.3 mmol) と diethyl oxalate (3.0 mL) を 100 °C で 3 時間攪拌した。反応液を室温に冷却し, 減圧濃縮した。残渣をシリカゲルフラッシュクロマトグラフィー (溶出溶媒: ヘキサン/酢酸エチル = 1/0–4/1) で精製し, 薄い黄色固体の表題化合物 (126 mg, 収率 74%) を得た。
mp 115–116 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.06 (18H, d, $J = 7.3$ Hz), 1.13 (3H, m), 1.35 (3H, t, $J = 7.3$ Hz), 3.31 (1H, m), 4.33 (2H, q, $J = 7.3$ Hz), 5.21 (2H, s), 6.51 (1H, d, $J = 3.3$ Hz), 6.64 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.68 (1H, dd, $J = 2.2, 8.4$ Hz), 7.01 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 7.11 (1H,

d, $J = 3.3$ Hz), 7.17 (1H, d), 7.90 (1H, m), 9.16 (1H, brs); MS (ESI) m/z 537 ($M + H$)⁺; HRMS (ESI) m/z calcd for C₃₁H₄₅N₂O₄Si ($M + H$)⁺ 537.3143, found 537.3152.

2-6-1-29 Ethyl *N*[1-(3-isopropyl-4-triisopropylsilanyloxybenzyl)-2-methyl-1*H*-indol-4-yl]oxamate (9b)

8b を用いて, **9a** と同様の方法で, 泡状の表題化合物 (収率 81%) を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ 1.07 (18H, d, $J = 7.3$ Hz), 1.15 (6H, d, $J = 7.3$ Hz), 1.26 (3H, m), 1.46 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 2.40 (3H, s), 3.33 (1H, m), 4.45 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 5.23 (2H, s), 6.33 (1H, s), 6.45 (1H, dd, $J = 2.4, 8.3$ Hz), 6.61 (1H, d, $J = 8.3$ Hz), 6.96 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 7.13 (2H, m), 7.86–7.90 (1H, m), 9.13 (1H, s); MS (ESI) m/z 551 ($M + H$)⁺; HRMS (ESI) m/z calcd for C₃₂H₄₇N₂O₄Si ($M + H$)⁺ 551.3300, found 551.3301.

2-6-1-30 Ethyl *N*[1-(3-isopropyl-4-triisopropylsilanyloxybenzyl)-7-methyl-1*H*-indol-4-yl]oxamate (9c)

8c を用いて, **9a** と同様の方法で, 黄色固体の表題化合物 (収率 85%) を得た。

mp 136–138 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.07 (18H, d, $J = 7.3$ Hz), 1.15 (6H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.25 (3H, m), 1.46 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 2.55 (3H, s), 3.32 (1H, m), 4.45 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 5.23 (2H, s), 6.33 (1H, s), 6.44 (1H, dd, $J = 2.2, 8.4$ Hz), 6.61 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 6.96 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 7.12–7.15 (2H, m), 7.91 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 9.14 (1H, s); MS (ESI) m/z 551 ($M + H$)⁺; HRMS (ESI) m/z calcd for C₃₂H₄₇N₂O₄Si ($M + H$)⁺ 551.3300, found 551.3301.

2-6-1-31 Ethyl *N*[1-(3-isopropyl-4-triisopropylsilanyloxybenzyl)-2-methyl-1*H*-indol-5-yl]oxamate (9d)

8d を用いて, **9a** と同様の方法で, 白色固体の表題化合物 (収率 75%) を得た。

mp 150–151 °C; ¹H NMR (CDCl₃) δ 1.07 (18H, d, $J = 7.4$ Hz), 1.15 (6H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.26 (3H, m), 1.42 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 2.52 (3H, s), 3.31 (1H, m), 4.42 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 5.20 (2H, s), 6.31 (1H, s), 6.43 (1H, dd, $J = 2.2, 8.4$ Hz), 6.60 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.95 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 7.20 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.26 (1H, dd, $J = 2.2, 8.8$ Hz), 7.91 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 8.89 (1H, brs); MS (ESI) m/z 551 ($M + H$)⁺; HRMS (ESI) m/z calcd for C₃₂H₄₇N₂O₄Si ($M + H$)⁺ 551.3300, found 551.3303.

2-6-1-32 Ethyl *N*[1-(3-isopropyl-4-triisopropylsilanyloxybenzyl)-2-methyl-1*H*-indol-4-yl]malonamate (9b')

8b (829.8 mg, 1.8 mmol) とトリエチルアミン (284 μ L, 2.0 mmol) をジクロロメタン (40 mL) に溶解し, ethyl malonyl chloride (248 μ L, 1.9 mmol) を 0 °C で加えた。反応液を 30 分間室温で攪拌した。酢酸エチルで希釈した後, 水, 飽和食塩水の順で洗浄し, 硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤をろ去し, 減圧濃縮した後, 残渣をシリカゲルフラッシュクロマトグラフィー (溶出溶媒: ヘキサン/酢酸エチル=4/1) で精製し, 泡状の表題化合物 (737.6 mg, 収率 71%) を得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1.07 (18H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.15 (6H, d, $J = 6.8$ Hz), 1.25 (3H, m), 1.35 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 2.39 (3H, s), 3.31 (1H, m), 3.55 (2H, s), 4.31 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 5.21 (2H, s), 6.37 (1H, s), 6.45 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.59 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.97 (1H, s), 7.05–7.11 (2H, m), 7.82 (1H, d, $J = 7.3$ Hz), 9.66 (1H, s); MS (ESI) m/z 565 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_4\text{Si}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ 565.3456, found 565.3455.

2-6-1-33 Ethyl *N*[1-(3-isopropyl-4-triisopropylsilanyloxybenzyl)-7-methyl-1*H*-indol-4-yl]malonamate (9c')

8c を用いて, **9b'** と同様の方法で, 白色固体の表題化合物 (収率 62%) を得た。mp 118–120 °C; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1.08 (18H, d, $J = 4.9$ Hz), 1.14 (6H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.26 (3H, m), 1.35 (3H, m), 2.53 (3H, s), 3.33 (1H, m), 3.55 (2H, s), 4.30 (2H, q, $J = 7.3$ Hz), 5.50 (2H, s), 6.42 (1H, dd, $J = 2.2, 8.4$ Hz), 6.59–6.62 (2H, m), 6.86 (1H, d, $J = 7.6$ Hz), 6.91 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 7.05 (1H, d, $J = 3.3$ Hz), 7.73 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 9.69 (1H, s); MS (ESI) m/z 565 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$, 563 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{33}\text{H}_{49}\text{N}_2\text{O}_4\text{Si}$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ 565.3456, found 565.3455.

2-6-1-34 Ethyl *N*[1-(4-hydroxy-3-isopropylbenzyl)-1*H*-indol-4-yl]oxamate (10a)

9a (112.0 mg, 0.2 mmol) を THF (1.0 mL) に溶解し, tetrabutylammonium fluoride (1 M THF 溶液, 230 μ L, 0.2 mmol) を加え, 室温で 30 分間攪拌した。反応液を酢酸エチルで希釈し, 水, 飽和食塩水の順で洗浄し, 硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤をろ去し, 減圧濃縮した後, 残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (溶出溶媒: ヘキサン/酢酸エチル=1/0–4/1) で精製し, 白色固体の表題化合物 (33.1 mg, 収率 42%) を得た。

mp 145–146 °C; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1.20 (6H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.45 (3H, t, $J = 7.3$ Hz), 3.17 (1H, m), 4.45 (2H, q, $J = 7.3$ Hz), 5.24 (2H, s), 6.54 (1H, d, $J = 3.3$ Hz), 6.65 (1H, d, $J = 4.5$ Hz), 6.74 (1H, dd, $J = 2.2, 10.2$ Hz), 7.04 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 7.13 (1H, d, $J = 3.3$ Hz), 7.19–7.20 (2H, m), 7.92 (1H, m), 9.18 (1H, brs); IR (ATR) 3359, 2960, 1761, 1692, 1536 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z 381 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$, 379 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_4$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ 381.1809, found 381.1809.

2-6-1-35 Ethyl *N*[1-(4-hydroxy-3-isopropylbenzyl)-2-methyl-1*H*-indol-4-yl]oxamate (10b)

9b を用いて, **10a** と同様の方法で, 黄色固体の表題化合物 (収率 23%) を得た。
mp 143–145 °C; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1.19 (6H, d, $J = 6.9$ Hz), 1.46 (3H, t, $J = 6.9$ Hz), 2.40 (3H, s), 3.15 (1H, m), 4.45 (2H, q, $J = 6.9$ Hz), 4.66 (1H, s), 5.24 (2H, s), 6.34 (1H, s), 6.50 (1H, dd, $J = 2.2, 8.1$ Hz), 6.59 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 6.95 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 7.09–7.15 (2H, m), 7.87 (1H, dd, $J = 1.8, 6.6$ Hz), 9.12 (1H, brs); IR (ATR) 3339, 2959, 1687, 1538 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z 395 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$, 393 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ 395.1965, found 395.1954.

2-6-1-36 Ethyl *N*[1-(4-hydroxy-3-isopropylbenzyl)-7-methyl-1*H*-indol-4-yl]oxamate (10c)

9c を用いて, **10a** と同様の方法で, 黄色固体の表題化合物 (収率 12%) を得た。
mp 138–139 °C; $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 1.19 (6H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.46 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 2.55 (3H, s), 3.16 (1H, m), 4.45 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 4.69 (1H, s), 5.51 (2H, s), 6.48 (1H, dd, $J = 2.2, 8.1$ Hz), 6.54 (1H, d, $J = 3.3$ Hz), 6.62 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 6.88 (1H, d, $J = 2.6$ Hz), 6.90 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.08 (1H, d, $J = 3.3$ Hz), 7.80 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 9.14 (1H, brs); IR (ATR) 3316, 2958, 1764, 1682, 1541 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z 395 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$, 393 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ 395.1965, found 395.1956.

2-6-1-37 Ethyl *N*[1-(4-hydroxy-3-isopropylbenzyl)-2-methyl-1*H*-indol-4-yl]malonamate (10b')

9b を用いて, **10a** と同様の方法で行い, 泡状の表題化合物 (収率 88%) を得た。

^1H NMR (CDCl_3) δ 1.20 (6H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.35 (3H, t, $J = 7.4$ Hz), 2.39 (3H, s), 3.16 (1H, m), 3.55 (2H, s), 4.30 (2H, q, $J = 7.4$ Hz), 4.83 (1H, s), 5.22 (2H, s), 6.37 (1H, s), 6.49 (1H, dd, $J = 2.2, 8.0$ Hz), 6.58 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 6.96 (1H, d, $J = 2.2$ Hz), 7.02–7.11 (2H, m), 7.81 (1H, d, $J = 6.6$ Hz), 9.68 (1H, s); IR (ATR) 3312, 2960, 1717, 1659, 1551 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z 409 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$, 407 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_4$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ 409.2122, found 409.2113.

2-6-1-38 Ethyl *N*[1-(4-hydroxy-3-isopropylbenzyl)-7-methyl-1*H*-indol-4-yl] malonamate (10c')

9c を用いて, **10a** と同様の方法で, 白色固体の表題化合物 (収率 87%) を得た。
mp 141–142 °C; ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.19 (6H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.34 (3H, t, $J = 7.1$ Hz), 2.52 (3H, s), 3.16 (1H, m), 3.55 (2H, s), 4.30 (2H, q, $J = 7.1$ Hz), 4.93 (1H, s), 5.49 (2H, s), 6.46 (1H, dd, $J = 2.0, 8.2$ Hz), 6.59 (1H, d, $J = 3.3$ Hz), 6.60 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 6.85 (1H, d, $J = 7.7$ Hz), 6.90 (1H, d, $J = 1.2$ Hz), 7.04 (1H, d, $J = 3.3$ Hz), 7.72 (1H, d, $J = 8.1$ Hz), 9.70 (1H, s); IR (ATR) 3262, 2957, 1719, 1652, 1621, 1556 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z 409 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$, 407 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{24}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_4$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ 409.2122, found 409.2120.

2-6-1-39 Ethyl *N*[1-(4-hydroxy-3-isopropylbenzyl)-2-methyl-1*H*-indol-5-yl]oxamate (10d)

9c を用いて, **10a** と同様の方法で, 黄色固体の表題化合物 (収率 30%) を得た。
mp 126–129 °C; ^1H NMR (CDCl_3) δ 1.18 (6H, d, $J = 7.0$ Hz), 1.41 (3H, t, $J = 7.0$ Hz), 2.35 (3H, s), 3.18 (1H, m), 4.40 (2H, q, $J = 7.0$ Hz), 5.45 (2H, s), 5.57 (1H, s), 6.28 (1H, s), 6.45 (1H, dd, $J = 1.9, 8.1$ Hz), 6.61 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 6.93 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 7.15 (1H, d, $J = 8.8$ Hz), 7.24 (1H, dd, $J = 2.2, 9.1$ Hz), 7.89 (1H, s), 8.92 (1H, brs); IR (ATR) 1736, 1683 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z 395 ($\text{M} + \text{H}$) $^+$, 393 ($\text{M} - \text{H}$) $^-$; HRMS (ESI) m/z calcd for $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_4$ ($\text{M} + \text{H}$) $^+$ 395.1965, found 395.1959.

2-6-1-40 *N*[1-(4-Hydroxy-3-isopropylbenzyl)-1*H*indol-4-yl]oxamic acid (11a)

10a (33.0 mg, 0.1 mmol) をエタノール (0.5 mL) に溶解した後、1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (173 μ L, 0.2 mmol) を加え、室温で1時間攪拌した。反応液を減圧濃縮し、残渣を水で溶解し、1M 塩酸水溶液を加えた後、酢酸エチルで抽出した。有機層を水、飽和食塩水の順で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。乾燥剤をろ去し、減圧濃縮した後、残渣をジエチルエーテル/ヘキサンで結晶化し、灰白固体の表題化合物 (22 mg, 収率 quant.) を得た。

mp 153–155 °C (dec); ^1H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.11 (6H, d, J = 6.9 Hz), 3.12 (1H, m), 5.27 (2H, s), 6.56 (1H, d, J = 3.0 Hz), 6.67 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.81 (1H, dd, J = 1.2, 8.4 Hz), 7.09 (1H, t, J = 7.7 Hz), 7.13 (1H, d, J = 1.2 Hz), 7.36 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.42 (1H, d, J = 7.7 Hz), 7.44 (1H, d, J = 3.0 Hz), 9.27 (1H, s), 10.35 (1H, s); IR (ATR) 1748, 1691 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z 353 ($\text{M} + \text{H}$)⁺, 351 ($\text{M} - \text{H}$)⁻; HRMS (ESI) m/z calcd for C₂₀H₂₁N₂O₄ ($\text{M} + \text{H}$)⁺ 353.1496, found 353.1498.

2-6-1-41 *N*[1-(4-Hydroxy-3-isopropylbenzyl)-2-methyl-1*H*indol-4-yl]oxamic acid (11b)

10b を用いて、**11a** と同様の方法で、泡状の表題化合物 (収率 quant.) を得た。

^1H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.09 (6H, d, J = 6.9 Hz), 2.37 (3H, s), 3.13 (1H, m), 5.25 (2H, s), 6.34 (1H, s), 6.53 (1H, dd, J = 2.2, 8.4 Hz), 6.64 (1H, d, J = 8.4 Hz), 6.98 (1H, d, J = 2.2 Hz), 7.01 (1H, t, J = 7.7 Hz), 7.26 (1H, d, J = 8.1 Hz), 7.36 (1H, d, J = 7.7 Hz), 9.15 (1H, s), 10.19 (1H, s); IR (ATR) 1741, 1685, 1552 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z 367 ($\text{M} + \text{H}$)⁺, 365 ($\text{M} - \text{H}$)⁻; HRMS (ESI) m/z calcd for C₂₁H₂₃N₂O₄ ($\text{M} + \text{H}$)⁺ 367.1652, found 367.1656.

2-6-1-42 *N*[1-(4-Hydroxy-3-isopropylbenzyl)-7-methyl-1*H*indol-4-yl]oxamic acid (11c)

10b を用いて、**11a** と同様の方法で、黄色固体の表題化合物 (収率 95%) を得た。

mp 145–146 °C (dec); ^1H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.08 (6H, d, J = 6.6 Hz), 2.46 (3H, s), 3.13 (1H, m), 5.43 (2H, s), 6.40 (1H, dd, J = 2.4, 8.2 Hz), 6.56 (1H, d, J = 3.3 Hz), 6.65 (1H, d, J = 8.1 Hz), 6.78 (1H, d, J = 8.1 Hz), 6.87 (1H, d, J = 2.2 Hz), 7.30 (1H, d, J = 7.3 Hz), 7.32 (1H, d, J = 3.3 Hz), 9.22 (1H, s), 10.15 (1H, s); IR (ATR) 1752, 1692, 1548 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z 367 ($\text{M} + \text{H}$)⁺, 365 ($\text{M} - \text{H}$)⁻; HRMS (ESI) m/z calcd for C₂₁H₂₃N₂O₄ ($\text{M} + \text{H}$)⁺ 367.1652, found 367.1654.

2-6-1-43 *N*[1-(4-Hydroxy-3-isopropylbenzyl)-2-methyl-1*H*indol-4-yl]malonic acid (11b')

11b を用いて、**10b'** と同様の方法で行い、淡黄色固体の表題化合物（収率 quant.）を得た。

mp 139–141 °C (dec); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.09 (6H, d, *J* = 7.0 Hz), 2.37 (3H, s), 2.88 (2H, s), 3.12 (1H, m), 5.23 (2H, s), 6.39 (1H, s), 6.49 (1H, dd, *J* = 2.0, 8.2 Hz), 6.63 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 6.91 (1H, t, *J* = 7.9 Hz), 6.95 (1H, s), 7.03 (1H, d, *J* = 8.1 Hz), 7.78 (1H, d, *J* = 7.7 Hz), 9.14 (1H, s); IR (ATR) 1761, 1692, 1574 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z* 381 (M + H)⁺, 379 (M – H)⁻; HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₂H₂₅N₂O₄ (M + H)⁺ 381.1809, found 381.1813.

2-6-1-44 *N*[1-(4-Hydroxy-3-isopropylbenzyl)-7-methyl-1*H*indol-4-yl]malonic acid (11c')

11b を用いて、**10c'** と同様の方法で、白色固体の表題化合物（収率 quant.）を得た。

mp 157–158 °C (dec); ¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.07 (6H, d, *J* = 6.6 Hz), 2.46 (3H, s), 3.13 (1H, m), 3.48 (2H, s), 5.48 (2H, s), 6.39 (1H, dd, *J* = 2.2, 8.4 Hz), 6.54 (1H, d, *J* = 2.2 Hz), 6.64 (1H, d, *J* = 8.4 Hz), 6.82 (1H, s), 6.86 (1H, s), 7.31 (1H, d, *J* = 2.9 Hz), 7.74 (1H, s), 9.14 (1H, s), 9.68 (1H, s); IR (ATR) 1740, 1609, 1556 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z* 381 (M + H)⁺, 379 (M – H)⁻; HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₂H₂₅N₂O₄ (M + H)⁺ 381.1809, found 381.1812.

2-6-1-45 *N*[1-(4-Hydroxy-3-isopropylbenzyl)-2-methyl-1*H*indol-5-yl]oxamic acid (11d)

10d を用いて、**11a** と同様の方法で、泡状の表題化合物（収率 quant.）を得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆) δ 1.08 (6H, d, *J* = 7.0 Hz), 2.35 (3H, s), 3.12 (1H, m), 5.22 (2H, s), 6.23 (1H, s), 6.52 (1H, dd, *J* = 1.5, 8.0 Hz), 6.64 (1H, d, *J* = 8.0 Hz), 6.94 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 7.33 (2H, s), 7.88 (1H, s), 9.14 (1H, s), 10.39 (1H, s); MS (ESI) *m/z* 367 (M + H)⁺, 365 (M – H)⁻; HRMS (ESI) *m/z* calcd for C₂₁H₂₃N₂O₄ (M + H)⁺ 367.1652, found 367.1655.

2-6-2 TR 結合親和性評価 (TR バインディングアッセイ)

ヒト TRα1 および TRβ1 の LBD は、His-Patch Thioredoxin 融合タンパク質発現システ

ム (Invitrogen) を用いて His-Patch Thioredoxin の C 末端にヒト TR α 1 およびヒト TR β 1 の LBD を有する融合タンパク質 (組換えヒト TR α 1 またはヒト TR β 1) として大腸菌に発現した。融合タンパク質は、ヒト TR LBD の cDNA を挿入した組換えプラスミドをトランスフォーメーションした大腸菌 (JM109) を培養し、増殖途中に IPTG を添加して発現誘導することで産生した。

組換えヒト TR α 1 またはヒト TR β 1 を含む結合溶液に ^{125}I -T3 (Perkin Elmer) を 0.16 nM になるように添加し、室温で 1~3 時間放置し、組換えヒト TR α 1 またはヒト TR β 1 と ^{125}I -T3 の複合体を形成させた。この結合溶液を 96well plate (MultiScreen-HV, Millipore) の全ウェルに 60 μL 加え、被験物質または非標識の T3 を終濃度の 1.67 倍になるように調製した希釈系列溶液 90 μL を加えた。プレートを 25 $^{\circ}\text{C}$ で 2~3 時間インキュベートすることで、被験物質または非標識 T3 により ^{125}I -T3 と TR の複合体形成を阻害した。各ウェルに 80 μL の SephadexG25 を加え、そこに結合溶液を添加して十分に膨潤させた後、600 g で 1 分間遠心分離することで SephadexG25 カラムを調整した。被験物質または非標識 T3 を加えた混合液から 25 μL を取り、SephadexG25 カラムに上層し、直ちに 600 g で 1 分間遠心分離した。再度、SephadexG25 カラムに未処理の結合溶液を 25 μL 上層し、直ちに 600 g で 1 分間遠心分離した。2 回の遠心処理でカラムを通過した ^{125}I -T3 との複合体を含む分離溶液を Isoplate (PS) (Perkin Elmer) に回収した。分離溶液の入った各ウェルに 200 μL の Optiphase Super Mix (Perkin Elmer) を添加し、1450 Microbeta Trilux (Perkin Elmer) で放射活性を測定した。放射活性から換算される ^{125}I -T3 量を組換えヒト TR α 1 またはヒト TR β 1 と ^{125}I -T3 の複合体量とした。なお、本試験に用いる組換えヒト TR α 1 またはヒト TR β 1 の量は、上記の試験系において、受容体添加量と上記の複合体量が比例する範囲で妥当な放射活性が得られる量を使用した。

被験物質または T3 を添加しない場合の放射活性 (^{125}I -T3 との複合体形成率 100%) から、過剰量の T3 (0.256 μM) を加えた場合の残存放射活性 (^{125}I -T3 との複合体形成率 0%) を非特異的結合として減じた値から組換えヒト TR α 1 またはヒト TR β 1 と ^{125}I -T3 の真の総複合体量を近似値として換算した。被験物質または T3 の各濃度での残存する組換えヒト TR α 1 またはヒト TR β 1 と ^{125}I -T3 の複合体量 (残存複合体量) は、測定された放射活性から残存放射活性を減じた値から換算した。これを総複合体量で除し、結合率として次式のように算出した。

結合率 = 残存複合体量 / 総複合体量

IC₅₀ は、結合率および被験物質または T3 の各濃度の対数値を用いて直線近似を行い、結合率 = 0.5 となる濃度とすることで求めた。直線近似には結合率が 0.1 から 0.9 の範囲にあ

る被験物質又は T3 の各濃度のみを用いた。

2-6-3 TR 転写活性化評価（レポーターアッセイ）

細胞を 10% FBS, ペニシリン/ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich) 含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich) に懸濁し, 96well cell culture plate (BD Falcon) に播種し, 37 °C で CO₂ インキュベーター (5% CO₂, 95%湿度) 内で 24 時間培養した。プラスミドを 6% FuGENE を含む DMEM に添加して, 溶液を 15 分間静止した後, 20 倍量の 10% FBS - DMEM で希釈した。培養上清を除いた細胞にプラスミド溶液を添加し, トランスフェクションした後, 37 °C で CO₂ インキュベーター (5% CO₂, 95%湿度) 内で 24 時間培養した。培養上清を除去し, T3 または被験物質を含む 10% FBS - DMEM を添加し, 37 °C で CO₂ インキュベーター (5% CO₂, 95%湿度) 内で 8~10 時間培養し, 分泌型アルカリフォスファターゼ (SEAP) を発現誘導した。SEAP 活性は, 基質としてパラニトロフェニルリン酸を用い, 生成したパラニトロフェノールを Tecan Spectra Fluor Plus reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Switzerland) で測定した。活性測定には培養上清 10 µL と 100 µL 反応溶液 (2 mg/mL パラニトロフェニルリン酸, 1 mM MgCl₂, 0.1 M Na₂CO₃, pH 9.8) を混合し, 室温で 30 分間反応させた後に, 10 mM EDTA を含む 4M 水酸化ナトリウム溶液を 100 µL 添加して反応を停止させた後, 405 nm の吸光度を測定した。活性値はヒトアルカリフォスファターゼの検量線から補正して求めた。

結果は 4 回の試験から得られた EC₅₀ 値の平均値として示した。EC₅₀ 値は陽性対照 T3 の最大活性化率を 100% とし, 活性化率と被験物質または T3 の各濃度の対数値を用いて直線近似を行い, 活性化率=50%となる濃度とした。直線近似には結合率が 10%から 90%の範囲にある被験物質または T3 の各濃度のみを用いた。

2-6-4 コレステロール負荷ラットモデル

本試験は, 「株式会社三和化学研究所三重研究パーク動物実験指針」を遵守して適正に実施した。

雄性 Sprague-Dawley (SD) ラット (Charles River, Kanagawa, Japan) に 1 週間, 高コレステロール食 (1.5%コレステロール+0.5%コール酸) (Oriental Yeast, Tokyo, Japan) を給与し, 6 群に分けた。各群にそれぞれ 11b' (30, 150mg/kg/day, n = 13) , 11c' (6, 150mg/kg/day, n = 13) , T3 (50 µg/kg/day, n = 13) (陽性対照) , 媒体 (5%アラビアゴム) を QD, 1 週間 p.o.投与した。これらの群は投与期間も高コレステロール食を給与し

た。コントロール群は一般の固形飼料を給与して媒体を投与した。血圧と心拍は最終投与 3～6 時間後に Tail-cuff 法によるラット・マウス用非観血式自動血圧測定装置 (BP-98A, Softron, Japan) を用いて測定した。その後、麻酔下で剖検を行い、血液は腹部大動脈から採血し、脂質、TSH、T4、T3 分析に用いた。TC、フリーコレステロール、LDL コレステロール、フリー脂肪酸、TG 値は酵素法で測定し、HDL コレステロールは直接法で測定した。TSH、T4、T3 値は化学発光免疫測定法 (CLIA) により測定した。

2-6-2-3 統計解析

実験結果は平均値±S.E.M.にて表示した。群間の有意差検定は Student *t* - test で行い、*p* 値が 0.05 以下の場合を統計上有意と判断した。

第3章 SKL化合物の薬理学的特性の解明

3-1 序論

第2章において、肝臓特異的に作用する新規 TR β 選択的作動薬 **11b'**と **11c'**を見出した。SKL化合物 **11b'**と **11c'**をそれぞれ SKL-12846 と SKL-13784 と名称し (Figure 3-1), 以降の研究に用いた。SKL-12846 と SKL-13784 はコレステロール負荷ラットモデルにおいて有効用量で心機能や下垂体 TSH 分泌に影響を与えなかった。第1章で述べたように、これまでに報告された肝選択的 TR β 作動薬である GC-1 や KB2115 はコレステロール低下作用と TSH 抑制作用が乖離していない。

SKL-12846 や SKL-13784 が下垂体 TSH 分泌に影響を与えることなく脂質低下作用を示すのは、これまでの肝選択的 TR β 作動薬とは明らかに違う点である。そこで、第3章では、SKL化合物の薬理学的特性を解明するために、SKL化合物の薬物動態 (PK) と組織分布を正常ラットで評価し、GC-1 と比較した。また、SKL-12846 と SKL-13784 の肝臓と脳の薬物濃度比がコレステロール低下作用と TSH 抑制作用の乖離に影響しているのかについて検討した。さらに、SKL化合物の薬理学的特性を明確にするため、高 TG 血症モデルであるフルクトース負荷ラットを用いて SKL-13784 の脂質とグルコース代謝への効果について検証した。

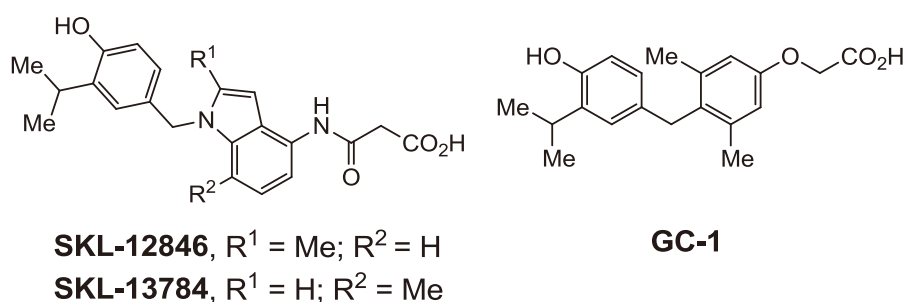


Figure 3-1. Chemical structures of SKL-12846, SKL-13784, and GC-1.

3-2 SKL化合物のラットPK

SDラットにSKL-12846またはSKL-13784を1 mg/kgの用量で静脈内 (i.v.) 投与または30 mg/kgの用量で経口 (p.o.) 投与を行い、血漿中未変化体濃度をLC-MS/MSを用いて測定し、血漿中濃度推移を評価すると共にPKパラメーターを算出した。SKL-12846とSKL-13784のラットPKパラメーターをTable 3-1に、それぞれの化合物の血漿中濃度推移をFigure 3-2に示す。SKL-12846とSKL-13784はi.v.投与後、3相性の血漿中濃度推移を示し、投与後速やかに血漿中から消失した。最終相の半減期 ($t_{1/2}$) はそれぞれ6.76 hと9.40 hであった。血漿クリアランス (CL_p) はSKL-12846が1.00 L/h/kg, SKL-13784が1.39 L/h/kgであり、いずれの化合物もラットの肝血流量 (3.31 L/h/kg)⁶⁵⁾の半分程度であった。SKL-13784の定常状態における分布容積 ($V_{d_{ss}}$) はSKL-12846の $V_{d_{ss}}$ の3倍であり、SKL-13784は分布容積の大きな化合物であった。30 mg/kgの用量でp.o.投与した後、SKL-12846とSKL-13784は速やかに消化管から吸収され、SKL-12846は0.33 hに最高血漿中濃度 (C_{max}) に達し、SKL-13784は0.50 hで C_{max} に達した。 C_{max} はそれぞれ4.61 μ Mと5.32 μ Mであった。 C_{max} はSKL-13784がSKL-12846よりも高い値を示したが、 $t_{1/2}$ はSKL-12846の方が長く、SKL-13784が5.16 hであるのに対してSKL-12846は6.92 hであった。血漿中濃度-時間曲線下面積 ($AUC_{0-\infty}$) はSKL-12846が15.8 h $\cdot\mu$ M, SKL-13784が12.0 h $\cdot\mu$ Mであり、SKL-12846の方がわずかに大きかった。SKL-12846とSKL-13784を経口投与した時の生物学的利用率 (BA) は20%以上を示したが、どちらもそれほど高くなく、BAはそれぞれ20.8%と22.1%であった。

Table 3-1. Pharmacokinetic parameters of SKL-12846 and SKL-13784 after intravenous (1 mg/kg) and oral (30 mg/kg) administration in rats^a

Compound	Dose, i.v./p.o. (mg/kg)	i.v. $t_{1/2}$ (h)	CL_p (L/h/kg)	Vd_{ss} (L/kg)	$AUC_{i.v.}$ (h· μ M)	oral $t_{1/2}$ (h)	C_{max} (μ M)	$AUC_{p.o.}$ (h· μ M)	T_{max} (h)	BA (%)
SKL-12846	1.0/30	6.76	1.00	2.38	2.53	6.92	4.61	15.8	0.33	20.8
SKL-13784	1.0/30	9.40	1.39	6.55	1.81	5.16	5.32	12.0	0.50	22.1

^a Male SD rats were acclimated to experimental conditions 7–14 days before use, and had free access to food and water throughout the acclimatization period. The animals were fasted overnight, and SKL-13784 or SKL-12468 was administered intravenously via the tail vein or orally (by gavage) at the indicated doses (n = 2–3) as a solution in saline and 5% GA. Blood samples were taken periodically and the plasma was analyzed by LC-MS/MS with quantitation against a standard curve. AUC, area under the plasma concentration-time curve; BA, bioavailability; CL_p , plasma clearance; C_{max} , maximum plasma concentration; $t_{1/2}$, half-life; T_{max} , time to reach C_{max} ; Vd_{ss} , steady-state volume of distribution. Values represent the mean (n = 2–3).

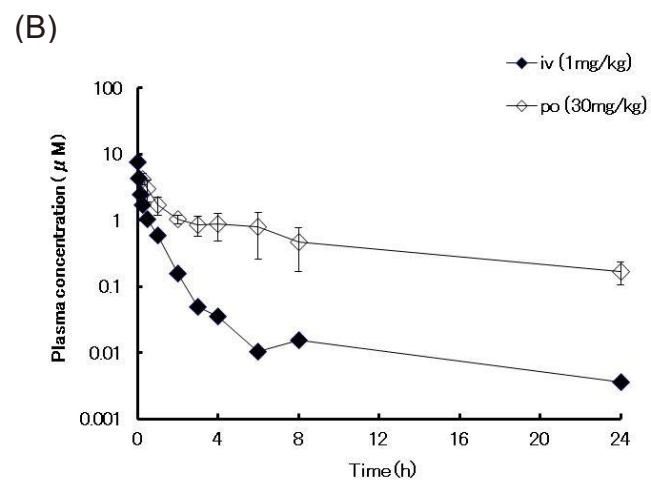
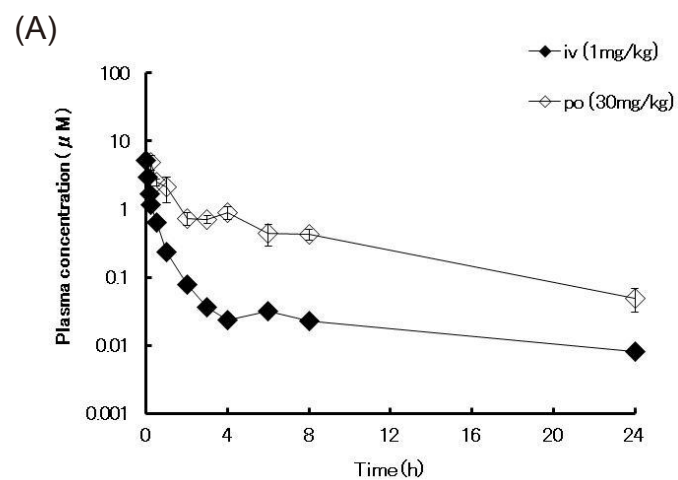


Figure 3-2. Plasma concentrations-time profiles of SKL-13784 (A) and SKL-12846 (B) in normal SD rats. Each point represents the mean of two rats for intravenous (◆) dose of 1 mg/kg and the mean ± S.D. of three rats for oral (◇) doses of 30 mg/kg.

3-3 化合物の組織分布

SKL 化合物を 30 mg/kg または GC-1 を 5.0 mg/kg の用量でラットに p.o.投与した時の組織中濃度を評価した。SKL 化合物は投与後 2, 4, 8, 24 時間に, GC-1 は投与後 0.5, 4, 24 時間に組織を採取した。それぞれの化合物の組織中濃度を Table 3-2 に示す。すべての化合物で肝臓中濃度 (L) が最も高く, 続いて血漿 (P), 心臓 (H), 脳 (B) 中濃度の順番であった。SKL-13784 と SKL-12846 の L/H は投与後 2 時間でそれぞれ 179 と 175 の濃度比を示した。さらに, SKL 化合物の L/H は投与後 8 時間まで 100 倍以上の値を示し, SKL 化合物の肝臓中濃度は心臓中濃度に比べて極めて高くなっていた。一方で GC-1 の L/H は最大で 40.5 (投与後 0.5 時間) であり, SKL 化合物よりも低い濃度比を示した。また, SKL-13784 の脳中濃度は極めて低く, 投与 4 時間以降は定量限界以下 (BLQ) であった。SKL-13784 と SKL-12846 の L/B は投与後 2 時間でそれぞれ 1380 と 1820 であり, 投与後 8 時間まで 300 倍以上の値を示し, SKL 化合物の肝臓中濃度は脳中濃度に比べて極めて高くなっていた。一方, GC-1 の L/B は SKL 化合物よりも遥かに低く, 投与後 0.5 時間で 157 であった。さらに, GC-1 の脳中濃度は全ての評価時間でほぼ一定であり, 投与後 0.5 時間で 0.338 μM , 投与後 24 時間で 0.240 μM を示し, GC-1 は投与後 24 時間で脳からほとんど消失しなかった。GC-1 と違い SKL 化合物の組織中濃度は投与後 2 時間から 24 時間で減衰が認められた。

Table 3-2. Plasma and tissue concentrations of SKL-compounds and GC-1 after oral administration in SD rats^a

	SKL-13784 (30 mg/kg)				SKL-12846 (30 mg/kg)				GC-1 (5 mg/kg)		
	Time (h)				Time (h)				Time (h)		
	2	4	8	24	2	4	8	24	0.5	4	24
Tissue											
Plasma (P) (μM)	0.455	0.335	0.186	0.0495	0.982	0.835	0.261	0.169	7.95	1.15	0.0323
Liver (L) (μM)	19.7	16.0	4.60	0.873	21.7	12.6	6.11	1.64	53.0	10.8	0.308
Heart (H) (μM)	0.110	0.0604	0.0454	0.0328	0.124	0.0847	0.0348	0.0180	1.31	0.435	0.247
Brain (B) (μM)	0.0143	BLQ ^c	BLQ ^c	BLQ ^c	0.0119	0.0112	0.00805	– ^b	0.338	0.268	0.240
Ratio											
L/H	179	265	101	26.6	175	149	176	91.1	40.5	24.8	1.25
L/B	1380	>1290	>371	>70.4	1820	1130	759	– ^b	157	40.3	1.28
B/P	0.0314	<0.0370	<0.0677	<0.251	0.0121	0.0134	0.0308	– ^b	0.04	0.23	7.43

^a Male SD rats were acclimated to experimental conditions 7–14 days before use, and had free access to food and water throughout the acclimatization period. The animals were fasted overnight, and SKL-13784 or SKL-12846 was administered orally (by gavage) at the indicated doses (n = 1) as a solution in 5% GA. Blood samples were taken periodically and the plasma was analyzed by LC-MS/MS with quantitation against a standard curve.

^b Not determined. ^c Below the limit of quantitation (BLQ was 0.0124 μM).

3-4 SKL-13784 のフルクトース負荷ラットモデルにおける薬理効果

SKL-13784 のフルクトース負荷ラットモデルに対する効果を評価した。結果を Figure 3-3 に示す。60%フルクトースを負荷したラット（コントロールラット）の血漿中 TC, TG およびグルコース (Glu) レベルは無処置の正常ラットに比べて有意に高くなっていた。特に TG レベルは正常ラットに比べてフルクトース負荷ラットでは 3 倍以上高くなっており、2 週間負荷した後の値は 240 mg/dL までに達した。フィブラート系薬物であるベザフィブラートを 60 mg/kg/day 投与した時、フルクトース負荷ラットの血漿中 TC および TG レベルはコントロールラットに比べて有意に低下した。しかし、Glu レベルには影響を与えなかった。SKL-13784 投与群は血漿および肝臓中 TG の増加を用量依存的に抑制した。特に、2.0 mg/kg/day と 6.0 mg/kg/day を 4 週間投与した群では血漿および肝臓中 TG が正常レベルまで低下しており、SKL-13784 は非常に強い TG 低下作用を示した。さらに、SKL-13784 の 2.0 mg/kg/day 投与群と 6.0 mg/kg/day 投与群は Glu レベルを有意に抑制した。しかしながら、SKL-13784 高用量群でも TC レベルには影響を与えなかった。SKL-13784 の TG および Glu 低下作用は、2 週間投与よりも 4 週間投与の方が強く現れた。ベザフィブラートは血漿中 T3 レベルを有意に低下させたが、SKL-13784 は最高用量においても血漿中 T3 レベルを低下させなかった。しかし、SKL-13784 は TG 低下作用を示す用量よりも低い用量である 0.6 mg/kg から T4 を用量依存的に有意に低下させた。最終投与 24 時間後の SKL-13784 の血漿および肝臓中濃度を評価した結果、肝臓中濃度と血漿中濃度の比 (K_p) は 55 であり、正常ラットで確認した時に比べて高い値を示した (Table 3-3)。

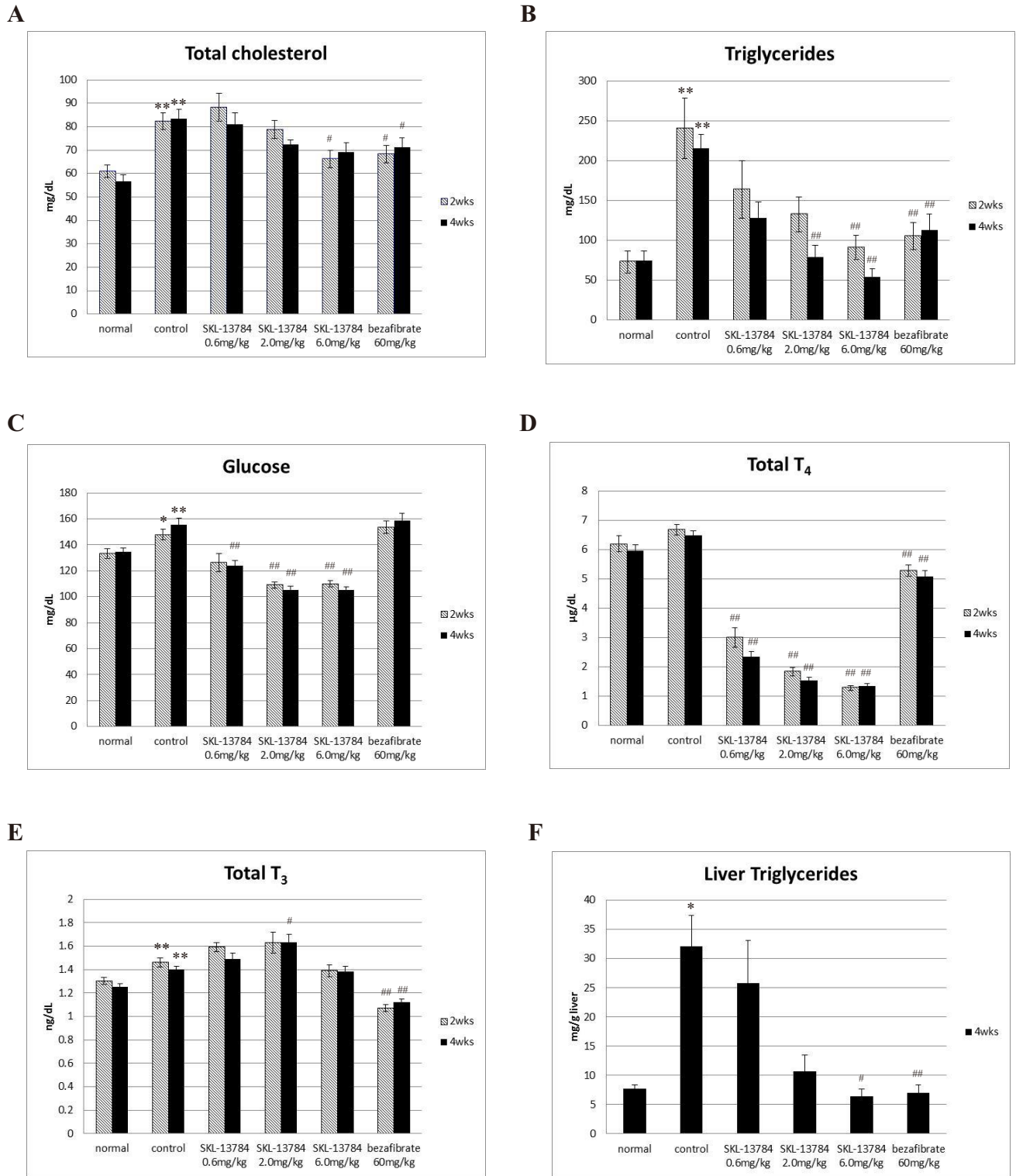


Figure 3-3. Effects of SKL-13784 in fructose-induced hypertriglyceridemic rats. Rats were treated with SKL-13784 for 2 weeks (grey bar) and 4 weeks (black bar). Data represent the mean \pm S.E.M. (n = 10); * p < 0.05 compared to normal control, ** p < 0.01 compared to normal control. # p < 0.05 compared to treated control, ### p < 0.01 compared to treated control.

Table 3-3. Plasma concentration of SKL-13784 in fructose-fed rats

Dose (mg/kg)	plasma (nM)	liver (nM)	K_p
0.6	1.60 ± 0.38	112 ± 33	70
2.0	2.50 ± 0.90	141 ± 29	56
6.0	8.13 ± 3.20	314 ± 100	39

Values are the mean ± S.E.M. (n = 5). After 24 h of the final drug treatment, blood was collected from the inferior vena cava and analyzed.

Table 3-4. Effects of SKL-13784 on body weights in fructose-induced hypertriglyceridemic rats

Diet	Normal diet	60% Fructose diet			
Group	Vehicle	Vehicle	SKL-13784		
Dose (mg/kg)	0	0	0.6	2	6
Days of administration					
1	260 ± 3	260 ± 3	262 ± 4	263 ± 3	265 ± 4
3	270 ± 4	261 ± 3	265 ± 4	265 ± 3	267 ± 4
5	284 ± 5	275 ± 4	276 ± 4	278 ± 4	276 ± 6
7	297 ± 4	286 ± 4	292 ± 4	293 ± 4	291 ± 6
9	307 ± 5	300 ± 4	307 ± 5	308 ± 4	300 ± 6
11	520 ± 6	312 ± 4	316 ± 6	319 ± 5	315 ± 7
13	328 ± 7	324 ± 4	329 ± 6	333 ± 4	324 ± 7
15	337 ± 9	333 ± 5	340 ± 6	342 ± 4	330 ± 7
17	343 ± 10	342 ± 5	352 ± 7	355 ± 5	341 ± 7
19	350 ± 11	352 ± 5	367 ± 7	365 ± 6	350 ± 8
21	357 ± 11	361 ± 6	377 ± 7	376 ± 6	360 ± 8
23	365 ± 12	371 ± 5	389 ± 8	385 ± 6	371 ± 9
25	371 ± 12	378 ± 6	402 ± 8	396 ± 7	379 ± 9
28	382 ± 12	390 ± 6	414 ± 9	410 ± 8	390 ± 10
29	379 ± 12	391 ± 6	414 ± 9	408 ± 9	390 ± 10

Values are the mean (g) ± S.E.M. (n = 10).

Table 3-5. Effect of SKL-13784 on food intake in fructose-induced hypertriglyceridemic rats

Diet	Normal diet	60% Fructose diet			
Group	Vehicle	Vehicle	SKL-13784		
Dose (mg/kg)	0	0	0.6	2	6
Days of administration					
Pre	21 ± 1	22 ± 1	21 ± 1	22 ± 1	23 ± 1
2	22 ± 1	20 ± 1	20 ± 1	19 ± 1	19 ± 1
7	24 ± 1	21 ± 1	23 ± 1	24 ± 1	23 ± 1
13	23 ± 1	22 ± 1	24 ± 1	25 ± 1	24 ± 1
21	23 ± 1	21 ± 1	24 ± 1	25 ± 1 [#]	24 ± 1
27	23 ± 1	23 ± 1	25 ± 1	26 ± 1 [#]	24 ± 1

Each value shows the mean (g/day) ± S.E.M.

Significantly different from normal diet : vehicle group ([#]: $p < 0.05$)

3-6 考察

SKL 化合物をラットに p.o.投与した時、化合物は消化管から速やかに吸収され、BA が 20%あるにもかかわらず、30 mg/kg 投与した時の循環血への曝露 (C_{max} と AUC) は低く、特に SKL-13784 は投与後 2 時間までに C_{max} の 1/10 程度まで血漿中濃度が低下した (Table 3-1, Figure 3-2)。そのため、SKL-13784 を 30 mg/kg p.o.投与した時の血漿中濃度は投与後 1~2 時間程度しか TR β アゴニスト活性 ($EC_{50} = 1.3 \mu\text{M}$) を維持していないことが判明した。SKL-13784 のラット i.v.投与後の CL_p がラット肝血流量 (3.31 L/h/kg) の 1/3 程度であることから、薬物の体内からの消失に対する肝臓の寄与はそれほど大きくないが、 Vd_{ss} が比較的大きいため SKL 化合物の血漿中曝露は低く、投与直後の血漿からの消失が非常に早くなったと考えられた。このことは、SKL 化合物は p.o.投与後速やかに肝臓に分布することを示唆する結果である。さらに、i.v.投与後の 3 相性の消失と半減期の長い最終相の存在は移行性の高い組織コンパートメントが存在していることを示している。これらのことは、SKL 化合物は標的組織である肝臓に集積し、優れた薬効を発揮したことを示唆するものである。実際に p.o.投与後の肝臓中濃度を確認した結果、SKL 化合物の肝臓中濃度は血漿中濃度よりも非常に高くなっており、肝臓中濃度は血漿中濃度に比べて遥かに長く TR β アゴニスト活性を維持していた。つまり、SKL 化合物の優れた薬効は肝臓への高い集積が寄与していると考えられた。

SKL 化合物と GC-1 の組織分布評価において、GC-1 は p.o.投与後 0.5 時間と 4 時間の L/H がそれぞれ 40.5 と 24.8 であり (Table 3-2)、以前報告された i.v.投与後 1 時間の L/H の値 (17) ³⁷⁾ に比べて高い値を示した。この違いは投与経路の違いや採取時間の違いによるものと考えられた。今回の試験では投与経路の影響をなくすために薬理試験と同じ経路である p.o.投与で組織分布を評価することとした。SKL 化合物の L/H は投与後 8 時間まで 100 以上であり、GC-1 より極めて高い値であった。GC-1 が T3 と違い心拍数上昇なしにコレステロール低下作用を示すのは、TR β 選択性に加えて高い L/H 比によると言われており ³⁷⁾、SKL 化合物がコレステロールを低下させる用量の 5 倍以上の用量を投与しても心拍数上昇や心重量増加といった心毒性を示さないのは、TR β に対する選択性に加えて SKL 化合物の極めて高い L/H が寄与していると考えられた。さらに、L/B に関しては SKL 化合物と GC-1 で大きな違いが認められた。SKL 化合物の L/B は投与 8 時間まで 300 以上と GC-1 に比べて極めて高い値を示した (Table 3-2)。SKL 化合物と GC-1 は共に脳移行性は低いいため、この L/B の違いは化合物の肝臓への移行性の違いによるものである。おそらく、SKL 化合物は肝臓に能動的に取込まれているため、全身への曝露が低くなっていると考えられた。SKL 化合物が TSH 抑制作用なしにコレステロールを低下させるのは、SKL 化合物の

極めて高い L/B によるものであると考えられた。一方で、GC-1 のラットモデルでの TSH 抑制作用と脂質低下作用のマージンの低さは GC-1 の脳からの消失が非常に緩やかであるためと考えられた。

高フルクトース負荷は VLDL-TG の分泌を増加させ、結果として高 TG 血症ラットになることが知られている⁶⁶⁾。SKL-13784 はフルクトース負荷ラットの血漿中 TG レベルを用量依存的に低下させ、2.0 mg/kg 投与群では正常レベルまで低下させた (Figure 3-3B)。また、肝臓中の TG 増加を用量依存的に抑制した。この効果も甲状腺ホルモンの機能として説明できる。すなわち、甲状腺ホルモンは肝臓での LDL の取込みを高め、RCT を活性化して肝臓での VLDL 合成を減少させ、血漿および肝臓中 TG を低下させる^{42,59,67-71)}。フルクトース負荷モデルでのコレステロール低下作用は第 2 章で報告したコレステロール負荷モデルの結果と比較してわずかであったが、その理由はフルクトース負荷モデルの TC レベルの上昇がそれほど高くないためであると考えられた (Figure 3-3A)。また、KB141⁷²⁾も含め他の TR β 作動薬と同様に SKL-13784 はフルクトース負荷ラットの Glu レベルを低下させた (Figure 3-3C)。食餌誘導性肥満 (DIO) マウスモデルを用いた KB141 の研究では体重が減少したマウスのみ Glu レベルの低下が認められ、筆者らは Glu の低下は体重低下によるインスリン感受性の効果による 2 次的なものであると報告している⁷²⁾。今回の試験では平均の体重と摂餌量はコントロール群と比べて有意な減少は認められなかった (Table 3-4, 3-5)。そのため、SKL 化合物の血糖低下作用は他のメカニズムによるものであると考えられた。SKL 化合物は TR β 選択的で肝臓への集積性が高いため、TR α が高発現している骨格筋で糖の取込みを亢進した可能性は低いと考えられる。最近、甲状腺ホルモンは細胞質に存在する TR β を介して PI3 キナーゼを活性化し、糖代謝を亢進することが報告された⁷³⁾。おそらく、SKL 化合物は PI3 キナーゼを活性化して糖代謝を亢進させたのではないかと考えられた。

SKL-13784 を 4 週間投与してもフルクトース負荷ラットモデルでの薬効の減弱、いわゆるエスケープ現象は認められなかった。外因性の甲状腺ホルモンを長期投与すると、脂質低下作用のエスケープ現象が起こることが知られている⁷⁴⁾。その原因は外因性甲状腺ホルモンの HPT 軸を介した TSH と甲状腺ホルモンの産生低下によるものと考えられている。SKL-13784 の正常ラットの B/P から考えると、フルクトース負荷ラットの脳中薬物濃度は非常に小さく、無視できるレベルであると予測される。そのため、SKL-13784 は HPT 軸へ影響することはなく、全ての用量でエスケープ現象が現れなかったと考えられる。また、このことは SKL-13784 が下垂体 TSH 分泌を抑制しないことを示している。しかしながら、SKL-13784 は T4 レベルに影響を与え、有効用量より低い用量から用量依存的に T4 レベルを有意に低下させた (Figure 3-3D)。一方で、T3 レベルには影響を与えなかった (Figure

3-3E)。その理由として、もっとも妥当な説明が TR β 作動薬である MB07811 の研究の中で報告されている。MB07811 は肝臓で CYP3A により代謝されて活性型の MB07344 となり、肝臓のみで作用する TR β 作動薬である^{72,75)}。MB07811 は血漿中 T3 や TSH に影響することなく DIO マウスの血中脂質を低下させた。しかし、SKL-13784 と同じように T4 も同時に低下させた。MB07811 は肝臓で T4 を T3, rT3, 3,3'-diiodothyronine (T2) に代謝する DI1 の発現を増加させた。その結果、内因性の T4 代謝が亢進し、薬効発現と同時に T4 レベルを低下させたと考えられている^{19,76,77)}。これらの結果は、TR β が肝臓で甲状腺ホルモン代謝調節に重要な働きをしていることを示すものである。

3-7 小括

SKL 化合物の肝臓中濃度は他の組織（血漿，心臓，脳）に比べて非常に高かった。SKL-13784 の L/H や L/B は GC-1 に比べて極めて高く，SKL 化合物は GC-1 に比べて標的組織である肝臓へ特異的に分布することが明らかとなった。SKL 化合物がコレステロール負荷ラットモデルにおいて心臓や HPT 軸に影響を与えることなく有益な脂質低下作用を示すのは，SKL 化合物の肝臓への非常に優れた分布特性によることが示された。特に，GC-1 と異なり SKL 化合物が有効用量で TSH 抑制作用を示さないのは L/B が極めて高いためであると考えられた。加えて，SKL-13784 はフルクトース負荷ラットモデルの TG や Glu レベルを有意に低下させ，長期投与によるエスケープ現象を示さなかった。これらの結果は，TR β 選択的作動薬を肝臓に特異的に分布させることは有効性と安全性を備えた TR β 作動薬を創製する上で非常に有用であることを示すものである。

3-8 実験の部

3-8-1 化合物

SKL-12846 と SKL-13784 は前章で述べた方法で合成した。GC-1 は文献⁷⁸⁾の方法に従って合成した。

3-8-2 動物

雄性 SD ラット (Charles River Japan, Kanagawa, Japan) は 12 時間明暗サイクルの標準的な条件下で飼育し、最低 5 日間検疫と環境馴化をさせた。飲水および市販のラット固形飼料 (Oriental Yeast, Japan) を給与し、自由摂取させた。実験は「株式会社三和化学研究所三重研究パーク動物実験指針」を遵守して適正に実施した。

3-8-3 正常ラットを用いた PK 試験

SD ラット (n = 2-3) は実験前日の夕方より 1 晩絶食した。被験物質は生理食塩水に 1 mg/mL の濃度で溶解し、尾静脈から 1 mL/kg の用量で i.v. 投与した。p.o. 投与は 5% アラビアゴム溶液 (GA, Wako, Osaka, Japan) に 30 mg/mL の濃度で懸濁し、5 mL/kg の用量で投与した。投与後 5 (i.v. のみ)、10 (i.v. のみ)、15、30 分、1、2、3、4、6、8、24 時間にヘパリン処理したシリンジを用いて軽麻酔下で頸静脈より採血した。採取した血液を 4 °C で遠心分離して血漿を得た。

3-8-4 正常ラットにおける薬物の組織濃度

被験物質を 5% GA に懸濁し、SKL-12846 と SKL-13784 は 30 mg/kg、GC-1 は 5.0 mg/kg の用量で p.o. 投与した。投与後、SKL 化合物は 2、4、8、24 時間に、GC-1 は 0.5、4、24 時間に組織を採取した (n = 1)。麻酔下でヘパリン処理したシリンジを用いて頸静脈より採血し、4 °C で遠心分離して血漿を得た。ラットを放血後、頸椎脱臼により致死させ、脳、肝臓、心臓を採取し、氷冷した生理食塩水で洗浄した。

3-8-5 フルクトース負荷TG血症ラットモデル

SD ラットを 8 群 (n = 10) に分け, うち 1 群は, 正常粉末飼料 (NMF, Oriental Yeast, Japan) を給与し, 媒体を投与する群とした。他の群には高フルクトース飼料 (F2HFrD, Oriental Yeast, Japan) を給与し, 媒体投与群, SKL-13784 投与群 (0.06, 0.2, 0.6, 2, 6 mg/kg/day), 陽性対照としてベザフィブラート投与群 (60 mg/kg/day) に分けた。SKL-13784 とベザフィブラートは 0.5% CMC-Na に懸濁し, QD, 4 週間 p.o.投与した。投与 14 日と 28 日の 24 時間後に血液を眼窩静脈叢か腹大動脈から採取した。投与 28 日の採血した後, ラットを放血後, 頸椎脱臼で致死させ, 肝臓を採取し, 氷冷の生理食塩水で洗浄した。血漿 TC と TG 値は酵素法で, T4 と T3 値は化学発光免疫測定法 (CLIA) で測定した。

3-8-7 血漿および組織中薬物濃度測定

組織はマルチビーズショッカー (Yasui Kikai, Japan) を用いて, 氷冷精製水でホモジネートし, 分析用サンプルとした。血漿または組織ホモジネート 20 μ L に内部標準物質 (IS) を含むメタノール 20 μ L とアセトニトリル 30 μ L を加え, よく混合し, 5 分間遠心分離して除タンパクした。得られた上清を 5 mM 酢酸アンモニウム 10 μ L で希釈し, LC-MS/MS で分析した。分析は NANOSPACE LC システム (Shiseido, Tokyo, Japan), TSQ7000 質量分析装置 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) で構成した LC-MS/MS システムを用いた。分析カラムは YMC Pack Pro C18 (2.0 \times 50 mm; YMC, Kyoto, Japan) を用い, 移動相は 5 mM 酢酸アンモニウム水溶液とアセトニトリルのグラジェントとした。MS 条件は ESI ポジティブモード, 多重反応モニタリング (MRM) 測定で行った。MRM 条件 (parent > product) は SKL-12846 が 381 > 233, SKL-13784 が 381 > 233 を選択した。ピークエリアは Xcalibur®ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を用いて解析した。

3-8-8 PK解析

PK パラメーター (AUC, CL_p , $t_{1/2}$, Vd_{ss}) は Phoenix WinNonlin ソフトウェア (Pharsight, Mountain View, CA) を用いてノンコンパートメントモデルで解析した。 C_{max} と T_{max} は血中濃度推移から求めた。

経口投与時の BA は無限大までの AUC を用いて以下の式から算出した。

$$BA(\%) = AUC_{p.o.}/AUC_{i.v.} \times Dose_{i.v.}/Dose_{p.o.} \times 100$$

組織 - 血漿濃度比は組織中濃度を血漿中濃度で除して算出した。

3-8-9 統計解析

薬効試験のデータは平均値 ± S.E.M.で表示した。コントロール群, SKL-13784 投与群, ベザフィブラート投与群間の有意差検定は, 2 群間の比較で実施する際は Student *t*-test で行い, コントロール群に対する多群間比較を実施する際は Dunnett's test を行った。*p* 値が 0.05 以下のとき統計上有意と判断した。

第4章 SKL-13784の肝臓特異的移行性メカニズムの解明

4-1 序論

第3章において、SKL化合物はGC-1に比べて肝臓に特異的に分布することが分かった。SKL化合物がラットモデルにおいて心臓やHPT軸に影響することなく有効性を示すのは、SKL化合物の肝臓への分布特性が非常に優れているためであることが示された。このことは、SKL化合物の優位性を示すと同時に、TR β 作動薬の最適化には標的組織である肝臓に効率的かつ極めて選択的に集積させることが非常に有効な手段であることを示している。

TR β 作動薬の先行研究においても甲状腺ホルモンの有害事象を回避し、血中コレステロールを低下させる、或いは基礎代謝を増加させるといった甲状腺ホルモンの有益な側面を特異的に発揮させるために、化合物の肝臓選択性を高める試みが行われてきた^{35,38,79}。化合物の肝臓選択性を高める戦略には主に以下の3つが考えられる。

- ①Organic anion-transporting polypeptide transporter (OATP/Oatp)や organic cation transporter (OCT/Oct)など肝臓に特異的に発現しているトランスポーターに認識され肝臓に取り込まれるように化合物を最適化すること⁸⁰
- ②胆汁酸などの肝臓特異的に移行する構造との複合体を合成すること^{81,82}
- ③肝臓で特異的に代謝されるプロドラッグをデザインすること^{83,84}

プロドラッグ化による肝臓への集積を高めた化合物には、先にも紹介した Metabasis Therapeutic 社が創製した肝選択的プロドラッグ TR β 作動薬 (MB07811) がある^{75,85}。この化合物は肝臓で CYP3A4 により活性型の化合物 (MB07344) に代謝され (Figure 4-1)、他の組織にはほとんど分布しない。実際に MB07811 はげっ歯類で心拍数や TSH 分泌に影響を与えることなく脂質低下作用を示している。

SKL化合物が肝臓特異的に分布するのは、上で述べた3つの戦略から見て、特異的トランスポーターによる肝臓への取込みが関与している可能性が高いと考えられるが、詳細なメカニズムについては明らかではない。そこで、SKL-13784の肝臓への特異的移行性メカニズムをGC-1と比較して明らかにすることを試みた。一般に薬物の肝臓への分布は洞様毛細血管膜を通り取込まれ、細胞内で代謝または代謝されずに胆汁に排泄される (Figure 4-2)⁸⁶⁻⁸⁸。そこで、ラット新鮮肝細胞を用いて化合物の肝臓への取込み、ラット肝ミクロソームを用いた化合物の代謝安定性、i.v.投与後の化合物の胆汁排泄を調べることとした。

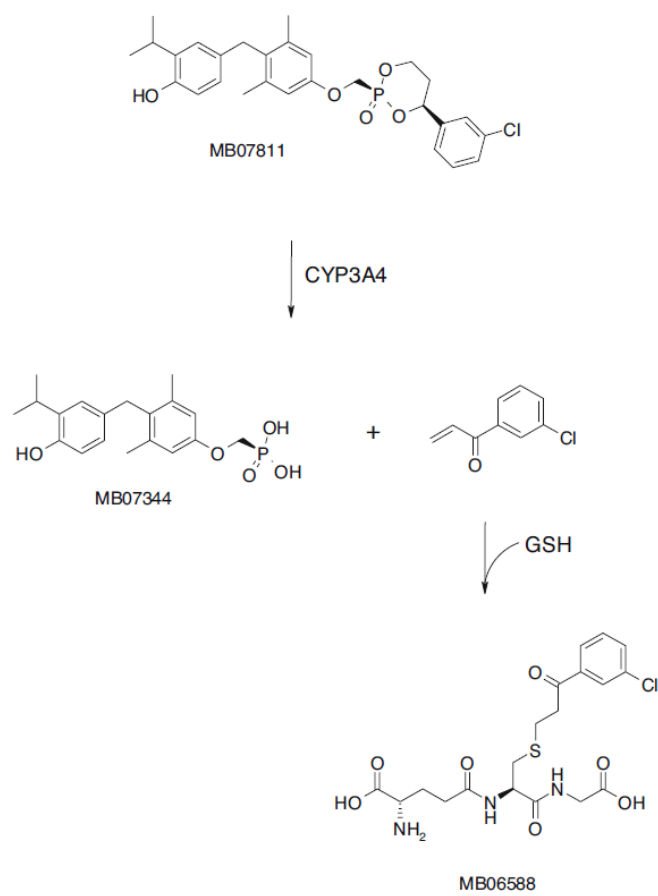


Figure 4-1. Sequence of conversion of HepDirect MB07811 to the active metabolite MB07344 releasing the glutathione (GSH) by-product MB06588.

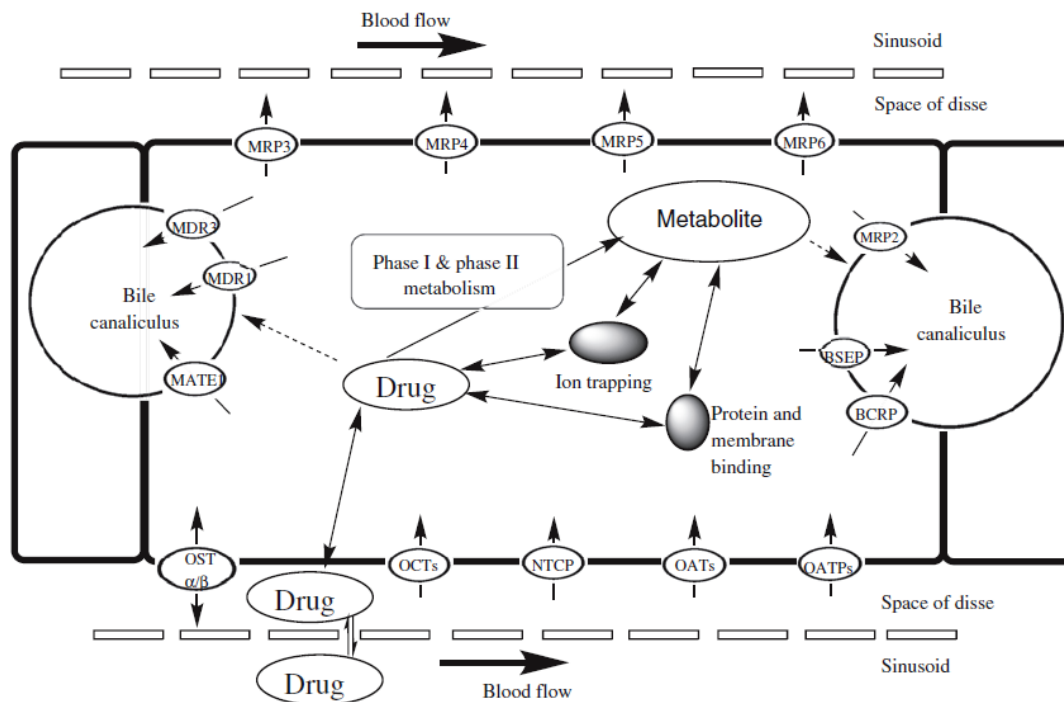


Figure 4-2. Drug disposition and transport from the sinusoid through the hepatocyte. BCRP, breast cancer resistance protein; BSEP, bile salt export pump; MATE, multidrug and toxin extrusion protein; MDR, multidrug resistance protein; MRP, multidrug resistance-associated protein; NTCP, Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide; OAT, organic anion transporter; OCT, organic cation transporter; OATP, organic anion-transporting polypeptide; OST, organic solute transporter. (Adapted from Ref. 88.)

4-2 *In vitro* 肝取込み評価 (Media-loss アッセイ)

ラット新鮮肝細胞を用いて SKL-13784 と GC-1 の肝臓へのアクティブな取込みを *in vitro* で評価した。肝臓へのアクティブな取込みを *in vitro* で評価するには、一定時間の肝細胞内濃度を評価する方法と媒体中の薬物濃度の減衰を評価する方法 (media-loss アッセイ)^{89,90}がある。Media-loss アッセイは標識化合物を用いることなく化合物の評価が可能であるため、探索段階の化合物を評価するのに適した方法である。そこで、SKL-13784 と GC-1 の肝臓への取込みを media-loss アッセイで評価することとした。Figure 4-3 に肝細胞取込みと肝細胞代謝による SKL-13784 または GC-1 の媒体からの消失を示す。Table 4-1 に見かけの固有クリアランス (CL_{int}) を示す。どちらの化合物も media-loss アッセイにおいて化合物添加後 2 分間は直線的に媒体から消失した。そこで、消失速度定数は初めの消失相である 0.25 - 2 分間で算出した。肝細胞代謝と比較すると、どちらの化合物も media-loss アッセイの消失が有意に大きく、このことはトランスポーターによる能動的な肝細胞への取込み機構が存在することを示唆している。SKL-13784 の $CL_{int, media\ loss}$ (553 mL/min/kg) は GC-1 の $CL_{int, media\ loss}$ (348 mL/min/kg) の 1.6 倍大きかった。また、SKL-13784 と GC-1 は Oatp 阻害剤として知られているリファンピシン存在下で、媒体からの消失が抑制され、 $CL_{int, media\ loss}$ はそれぞれ 131 と 117 mL/min/kg と非存在下に比べて低下した (p 値はそれぞれ 0.06 と < 0.05)。

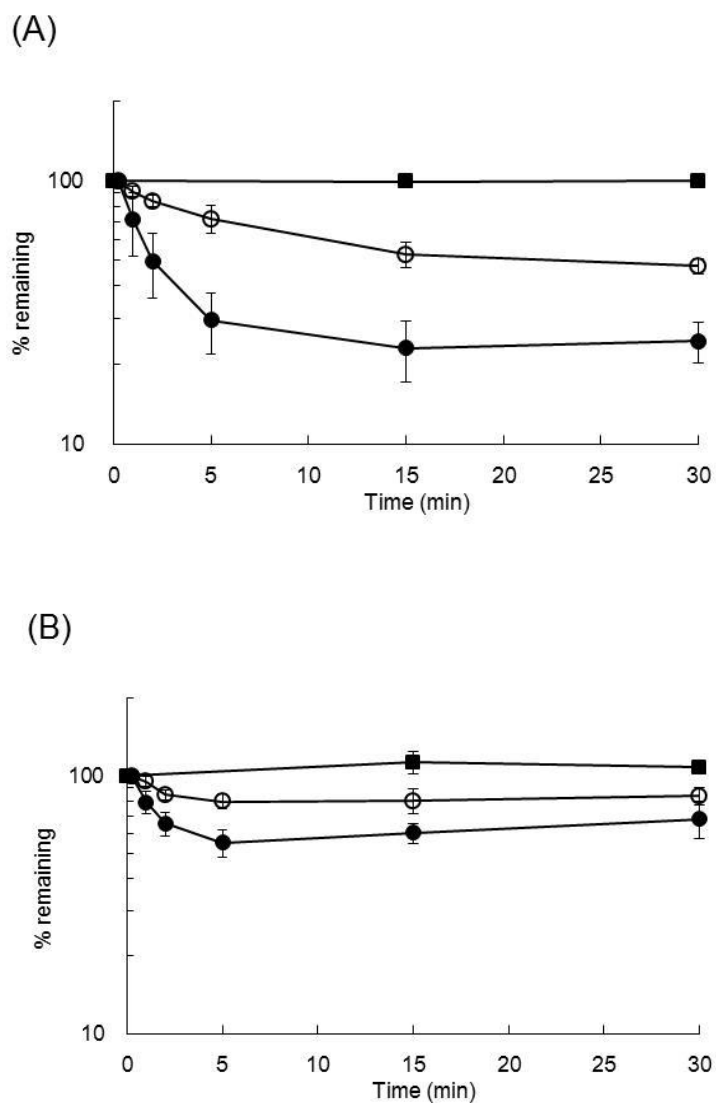


Figure 4-3. Disappearance from media in the media-loss assay and metabolic stability of SKL-13784 (A) and GC-1 (B) using freshly isolated rat hepatocytes. The media-loss assay was performed without (closed circle) and with (open circle) rifampicin. The metabolic stability was performed without rifampicin (open square). Each point references the mean \pm S.D. of triplicate experiments.

Table 4-1. CL_{int} determined by media loss without and with rifampicin, and hepatocyte stability assays using fresh rat hepatocytes

Compound	$CL_{int,media-loss}$ alone (mL/min/kg)	$CL_{int,media-loss}$ + rifampicin (mL/min/kg)	$CL_{int,hepatocyte}$ alone (mL/min/kg)
SKL-13784	553 ± 283	131 ± 30	< 0
GC-1	348 ± 72	117 ± 36*	< 0

Each value represents the mean ± S.D. of triplicate experiments.

* $p < 0.05$ versus values in the absence of rifampicin.

4-3 ラット肝ミクロソーム中での代謝安定性

薬物は肝臓に取り込まれた後、代謝や胆汁排泄により体内から消失する。薬物代謝の種類には大まかに分けて2種類の反応があり、1つは酸化、還元、加水分解などの第I相反応である。この反応を触媒する代表的酵素はCYPである。他の代謝にはグルクロン酸抱合、硫酸抱合、アセチル抱合などの抱合反応による第II相反応がある。SKL-13784とGC-1がCYPによる酸化的代謝やグルクロン酸抱合代謝の影響を受けるかを検討するため、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)またはウリジン5'-二リン酸-グルクロン酸(UDPGA)存在下でラット肝ミクロソーム中での化合物の安定性を評価した。ラット肝ミクロソーム中での化合物の減衰をFigure 4-4に示す。Table 4-2に固有クリアランス($CL_{int, microsome}$)の値を示す。SKL-13784はミクロソーム中でNADPH存在下では157 min, UDPGA存在下で127 minの $t_{1/2}$ で消失した。 $CL_{int, microsome}$ はそれぞれ7.97 mL/min/kgと10.1 mL/min/kgであった。GC-1はミクロソーム中でNADPH存在下では減衰が認められず安定であったが、UDPGA存在下では65 minの $t_{1/2}$ で消失し、 $CL_{int, microsome}$ は19.4 mL/min/kgであった。これらの結果は、SKL-13784はグルクロン酸抱合とCYPによる酸化の両方で代謝され、GC-1はグルクロン酸抱合のみで代謝されることを示している。

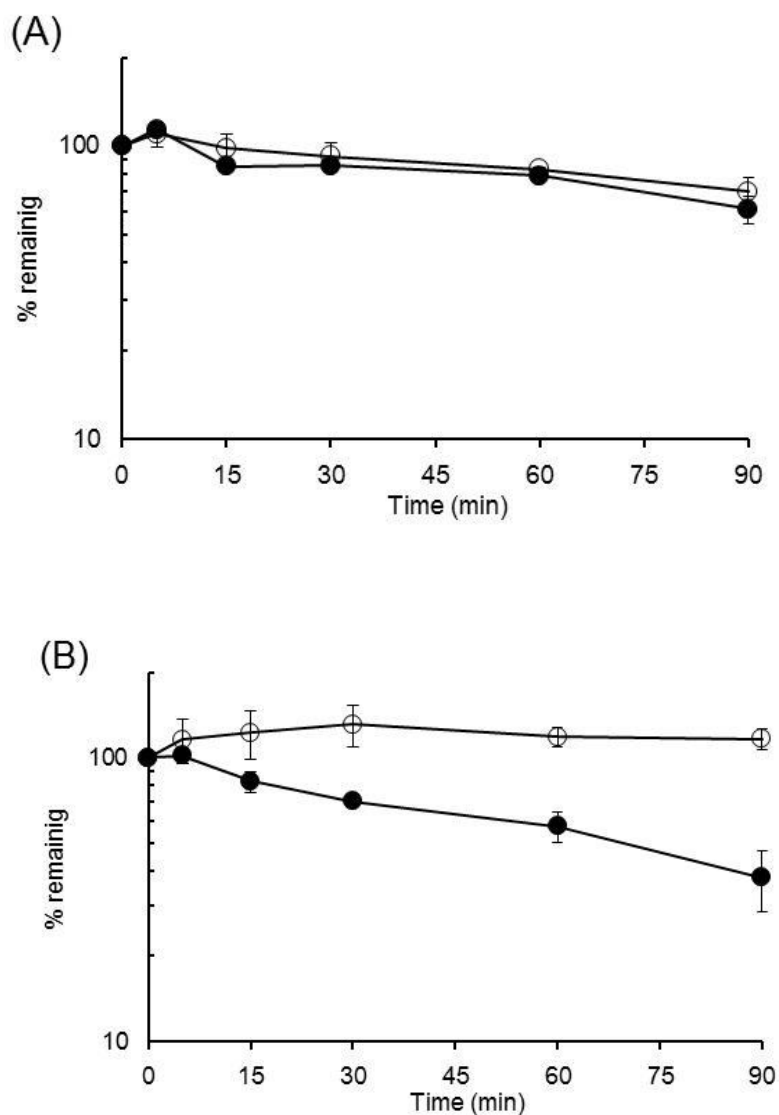


Figure 4-4. Time course of SKL-13784 (A) and GC-1 (B) deletion in rat liver microsomes. Both compounds (1 μ M) were incubated with 5 mg/ml of pooled rat liver microsomes in the presence of NADPH (open circle) or UDPGA (closed circle). Each point represents mean \pm S.D. of triplicate experiments.

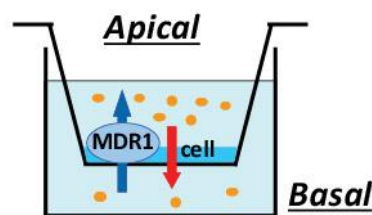
Table 4-2. CL_{int} determined by rat liver microsomes in the presence of NADPH and UGPDA

Compound	$CL_{int,microsome}$ (mL/min/kg)	
	NADPH	UDPGA
SKL-13784	7.97 ± 0.52	10.1 ± 2.3
GC-1	< 0	19.4 ± 2.9

Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate experiments.

4-4 MDR1-LLC-PK1 細胞を用いた MDR1 認識性

ブタ腎臓近位尿細管由来の上皮細胞株 LLC-PK1 細胞にヒト MDR1/P 糖タンパク質 (P-gp) を発現させた MDR1-LLC-PK1 細胞を用いて、化合物が MDR1 の基質になるのかを評価した。化合物の apical 側から basal 側



Experimental model for transcellular transport

(A-B) の透過係数 ($P_{app,A-B}$) と basal 側から apical 側 (B-A) の透過係数 ($P_{app,B-A}$) および Efflux ratio ($P_{app,B-A}/P_{app,A-B}$) を Table 4-3 に示す。SKL-13784 の Efflux ratio は 2.1 であり, $P_{app,B-A}$ が $P_{app,A-B}$ よりも 2 倍大きく, SKL-13784 は MDR1 に認識されることが示された。一方, GC-1 の Efflux ratio は 0.6 であり, GC-1 は MDR1 に認識されないことが示された。

Table 4-3. Permeability of SKL-13784 and GC-1 in MDR1-LLC-PK1 cells

Compound	$P_{app,A-B}$ ($\times 10^{-6}$ cm/s)	$P_{app,B-A}$ ($\times 10^{-6}$ cm/s)	Efflux ratio (B-A/A-B)
SKL-13784	3.31 \pm 0.74	6.99 \pm 0.48	2.1
GC-1	12.9 \pm 2.6	8.29 \pm 0.50	0.6

Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate experiments.

4-5 人工膜を用いた化合物の膜透過性評価 (PAMPA)

化合物の受動的な膜透過性を評価するために、PAMPA を用いて pH 7.4 における SKL-13784 と GC-1 の膜透過性を評価した (Table 4-4)。膜透過性が高い化合物としてメトプロロール、膜透過性が低い化合物としてスルファザラジンを同じ試験の中で評価した。その結果、メトプロロールの P_{app} は 48×10^{-6} cm/s と高い値を示した。一方、スルファザラジンの P_{app} は 0.12×10^{-6} cm/s と低い値を示した。SKL-13784 と GC-1 の P_{app} はそれぞれ 0.073×10^{-6} cm/s と 4.5×10^{-6} cm/s であった。SKL-13784 の P_{app} は膜透過性が低いスルファザラジンより低く、生理的条件下で SKL-13784 の膜透過性は非常に低いことが示された。一方、GC-1 は SKL-13784 よりも膜透過性が 60 倍高く、中程度の透過性を示した。

Table 4-4. Permeability of SKL-13784 and GC-1 in PAMPA

Compound	$P_{app, \text{pH } 7.4}$ ($\times 10^{-6}$ cm/s)
SKL-13784	0.073
GC-1	4.5
Metoprolol	48
Sulfasalazine	0.12

Each value represents the mean of duplicate experiments.

4-6 胆管カニューレションラット (BDC ラット) を用いた胆汁排泄

化合物の胆汁排泄を確認するため、BDC ラットに SKL-13784 または GC-1 を 1 mg/kg の用量で i.v. 投与し、化合物の胆汁排泄率を評価した (Figure 4-5)。SKL-13784 は投与後 8 時間までに胆汁中に未変化体として投与量の 30.3% が排泄された。胆汁中のグルクロン酸抱合体を加水分解するために胆汁を β -グルクロニダーゼで処理した結果、胆汁中の SKL-13784 は投与量の 83.0% まで増加した。一方で GC-1 の胆汁中の未変化体量は非常にわずかであり、投与後 8 時間までに投与量の 2.53% しか排泄されなかった。胆汁を β -グルクロニダーゼで処理すると、SKL-13784 と同様に GC-1 の回収率は増加し、投与量の 59.7% となった。これらの結果はどちらの化合物も主排泄ルートは胆汁であるが、SKL-13784 は未変化体とグルクロン酸抱合の形で排泄され、GC-1 はグルクロン酸抱合体の形で排泄されることを示した。また、どちらの化合物も胆汁中への排泄は非常に早く、投与後 2 時間までに SKL-13784 は投与量の 75.9%、GC-1 は 51.8% が排泄された。

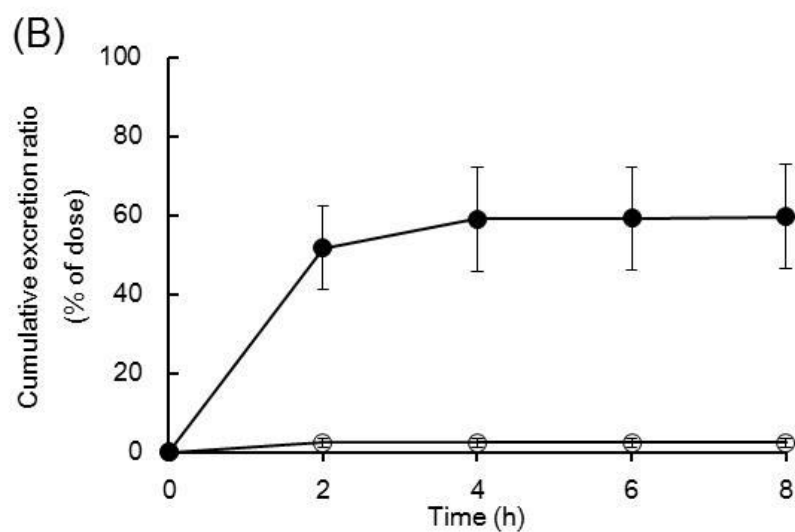
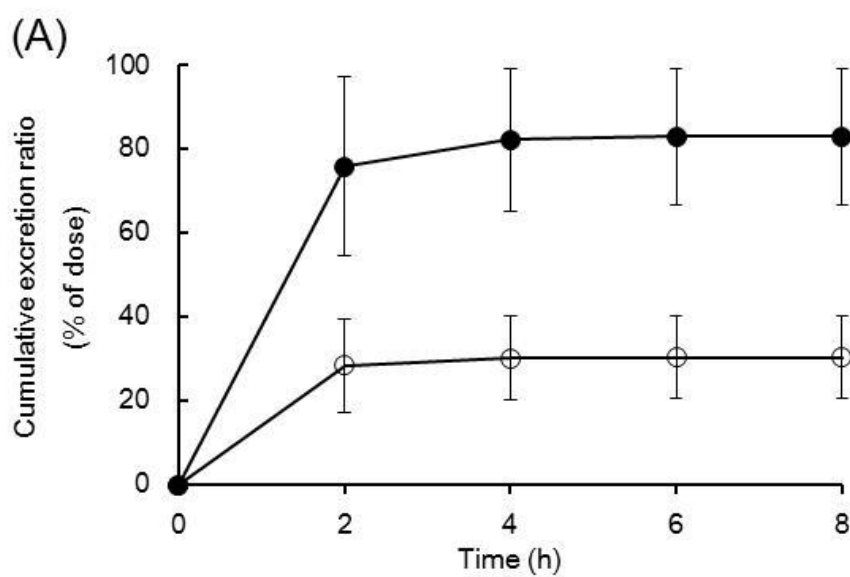


Figure 4-5. Cumulative excretion ratio (%) of unchanged compounds and their glucuronide metabolites in bile after intravenous administration (1 mg/kg) of SKL-13784 (A) or GC-1 (B) to BDC rats. Open and closed circles indicate unchanged drug and total drug (unchanged drug and its glucuronide metabolite). Each point represents mean \pm S.D. of three animals.

4-7 BDC ラットを用いた SKL-13784 の体内動態

SKL-13784 の腸肝循環を確認するため、BDC ラットと無処置ラットに SKL-13784 を i.v. 投与し、血漿中濃度推移および PK パラメーターを評価した (Figure 4-6, Table 4-5)。無処置ラットに 1 mg/kg の用量で単回 i.v.投与した時、SKL-13784 の CL_p は 3540 mL/h/kg、 Vd_{ss} は 6370 mL/kg と大きな値を示した。そのため、 $AUC_{0-\infty}$ は 282 ng·h/kg と小さな値を示した。最終相の $t_{1/2}$ は 4.41 h であった。DBC ラットに 1 mg/kg の用量で単回 i.v.投与した時、 CL_p は 3210 mL/h/kg であり、無処置ラットと有意な差は認められなかった。しかしながら、 Vd_{ss} は無処置ラットに比べて有意 ($p < 0.05$) に小さくなり、その値は 2140 mL/kg と無処置ラットの 3 倍小さくなった。見かけの最終相の $t_{1/2}$ は無処置ラットに比べて 4.3 倍短くなり、有意差が認められた ($p < 0.01$)。これらの結果は SKL-13784 が腸肝循環していることを示すものである。

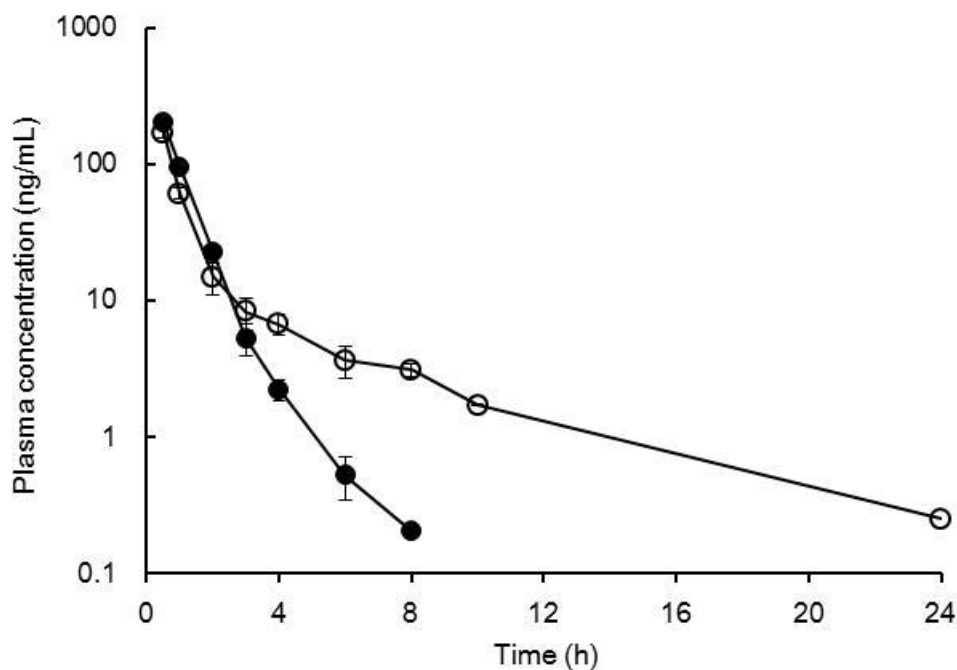


Figure 4-6. Plasma concentration-time profile of SKL-13784 after intravenous administration (1 mg/kg) to intact (open circle) and BDC (closed circle) rats. Each point represents mean \pm S.D. of three animals.

Table 4-5. Pharmacokinetic parameters of SKL-13784 in intact and BDC rats after i.v. administration at 1 mg/kg

Parameters	Intact	BDC
AUC _{0-∞} (ng h/mL)	283 \pm 13	313 \pm 27
CL _p (mL/h/kg)	3540 \pm 170	3210 \pm 280
V _{d_{ss}} (mL/kg)	6370 \pm 1300	2140 \pm 390*
t _{1/2} (h)	4.41 \pm 0.75	1.02 \pm 0.31**

Each value represents the mean \pm S.D. of three animals.

** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$

4-8 SKL-13784 の PK 線形性

化合物がトランスポーターに認識される場合、トランスポーターの飽和などにより PK が非線形になることがあり、医薬品として好ましくない。そこで、SKL-13784 の p.o.投与後の PK 線形性を確認するため、SKL-13784 をラットに 0.06, 0.6, 6 mg/kg の用量で p.o.投与し、血漿中濃度推移および PK パラメーターを評価した (Figure 4-7, Table 4-6)。SKL-13784 をラットに 0.06, 0.6, 6 mg/kg の用量で p.o.投与した時、投与後 0.25 分に C_{max} に達し、SKL-13784 は消化管から速やかに吸収された。 C_{max} の値は、それぞれ 2.25, 23.8, 359 ng/mL を示し、 $AUC_{0-\infty}$ はそれぞれ 8.01, 65.8, 715 ng/mL であった。SKL-13784 は 0.06 - 6 mg/kg の用量範囲で C_{max} は用量に比例して増加し、 $AUC_{0-\infty}$ もほぼ線形に増加していることが確認された。

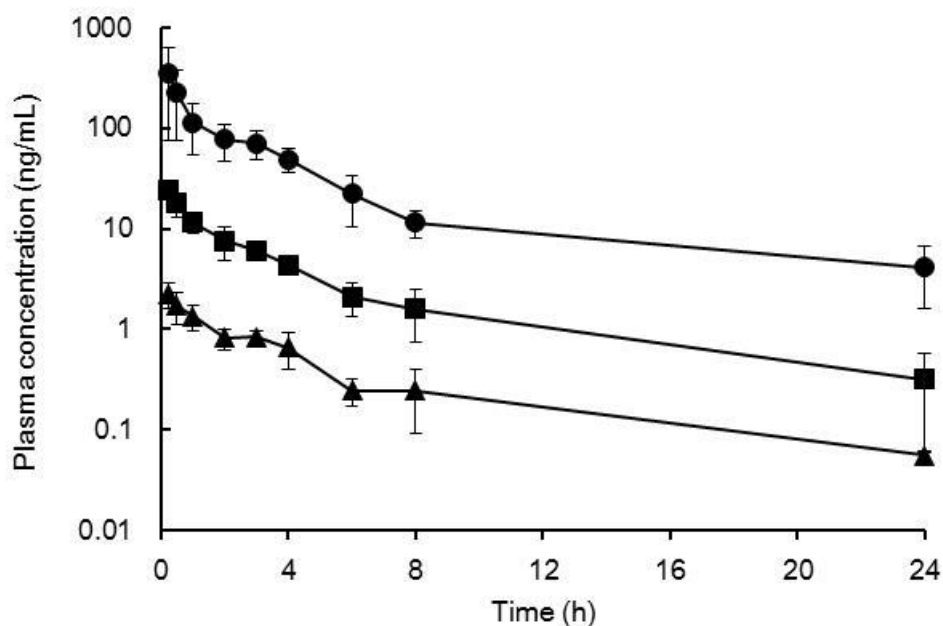


Figure 4-7. Plasma concentration-time profile of SKL-13784 after oral administration at 0.06 mg/kg (triangle), 0.6 mg/kg (squares) and 6mg/kg (circles) to rats. Each point represents mean \pm S.D. of three animals.

Table 4-6. Pharmacokinetic parameters of SKL-13784 in rats after p.o. administration at 0.06, 0.6 and 6 mg/kg

Dose (mg/kg)	Parameters	
	C_{max} (ng/mL)	AUC _{0-∞} (ng h/mL)
0.06	2.25 \pm 0.64	8.01 \pm 1.44
0.6	23.8 \pm 3.4	65.8 \pm 11.1
6	359 \pm 282	715 \pm 236

Each value represents the mean \pm S.D. of three animals.

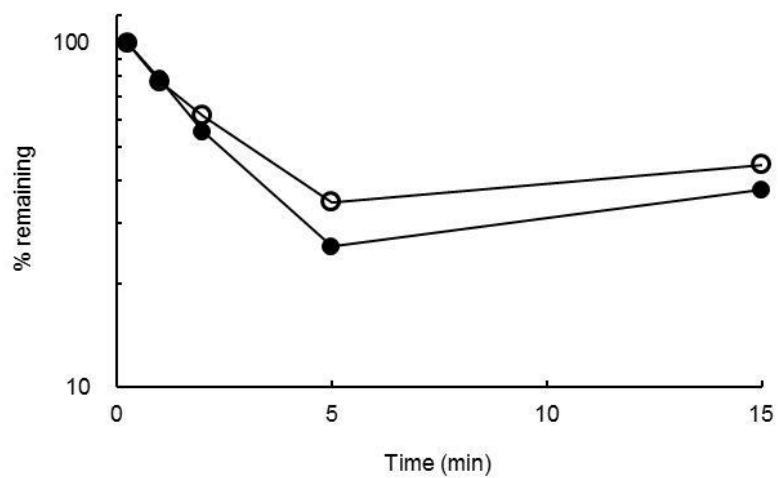


Figure 4-8. Disappearance from media in the media-loss assay of atorvastatin using freshly isolated rat hepatocytes. The media-loss assay was performed without (closed circle) and with (open circle) SKL-13784.

4-9 考察

SKL-13784 は TR β への親和性が 20 倍高い TR 作動薬であり、GC-1 に比べて肝臓特異的に分布し、副作用を発現する心臓や脳にはほとんど分布しない化合物である。そのため、SKL-13784 はラットモデルの有効用量において、心臓や HPT 軸に影響を与えなかった。この章では、SKL-13784 の肝臓への特異的な移行性メカニズムを GC-1 と比較した。一般的に薬物の肝臓への分布は 3 つの過程で成り立っている。消化管から吸収された化合物は受動的または能動的に門脈血から肝臓へ取り込まれ、肝臓内で CYP または第 II 相の代謝酵素、もしくは両方の酵素で代謝される。その後、胆汁中に受動的または能動的に排泄される。

初めに肝臓への取込みに注目し、media-loss アッセイを用いて SKL-13784 の肝移行性のメカニズムを調べた (Figure 4-3)。SKL-13784 の $CL_{int,media\ loss}$ 値 (553 mL/min/kg) は GC-1 (348 mL/min/kg) の 1.6 倍と高く、SKL-13784 は GC-1 よりも効率的に肝臓に取込まれていることが示された。肝臓での代謝をラット肝マイクロソームで確認した結果 (Figure 4-4)、SKL-13784 はグルクロン酸抱合と CYP により代謝され、GC-1 は主にグルクロン酸抱合により代謝されることが明らかとなった。SKL-13784 と GC-1 の $CL_{int,microsome}$ 値と $CL_{int,media\ loss}$ 値を比較すると、 $CL_{int,microsome}$ は非常に小さな値であった。この結果はどちらの化合物もラットにおいて肝臓への取込みが化合物の体内動態特性に重要な役割を果たしていることを示している。Figure 4-3 と Table 4-1 に示すように 2 つの化合物は、Oatps の阻害剤であるリファンピシン⁹¹⁾により肝細胞への取込みが有意に阻害され、肝臓への取込みに Oatp ファミリーが寄与していることが示唆された。Oatp の基質になる化合物の多くは陰イオン性か両親媒性の化合物であり、比較的分子量の大きな化合物である⁹²⁾。また、Varms らはトランスポーターへの認識性には化合物のイオン性基が重要であると報告している⁹³⁾。さらに、Tu らは脂溶性が低い化合物は OATP に認識されやすいことを示している⁹⁴⁾。SKL-13784 と GC-1 はどちらもカルボキシル基を持っているが、2 つの化合物の親水性には違いが認められる。SKL-13784 の $clogD_{7.4}$ は 0.32、GC-1 の $clogD_{7.4}$ は 1.24 であり、SKL-13784 は GC-1 よりも親水性が高い。このことは、SKL-13784 は親水性が高いため、Oatp に認識されやすく、GC-1 よりも効率的に肝臓に取込まれることを示している。さらに、SKL-13784 の膜透過性は GC-1 よりも極めて低いことが、PAMPA から明らかとなった (Table 4-4)。この結果は第 3 章で確認した SKL-13784 のラット BA の低さに現れている。しかし、膜透過性の低さは化合物の肝選択的分布に重要であると言われている⁹⁴⁾。*In vivo* で化合物を肝臓に選択的に分布させるには、トランスポーターにより化合物を積極的に肝臓に取込ませる必要があるが、同時に、肝臓から全身血への移行を抑えることが重

要である。SKL-13784 の低い膜透過性は肝選択性を高め、肝臓以外への化合物の分布を抑制する要因になっていると考えられる。

肝臓に取込まれた後の化合物の排泄ルートを知るため、BDC ラットを用いて胆汁排泄を確認した。Figure 4-5 に示すように、SKL-13784 と GC-1 は胆汁排泄がラットにおける主な排泄ルートであった。しかし、2 つの化合物には代謝に違いが認められ、SKL-13784 は投与量の 30.3%が未変化体として、59.7%がグルクロン酸抱合体として胆汁中に排泄された。GC-1 は SKL-13784 よりも胆汁中への排泄量が少なく、投与量の 59.7%が胆汁中に排泄され、ほとんどがグルクロン酸抱合体の形であった。SKL-13784 は肝臓に取込まれた後、ほとんどが胆汁中に排泄されており、胆汁排泄が SKL-13784 の体内からの消失に最も重要なルートとなっていた。SKL-13784 は膜透過性が低いことから、胆汁排泄にはトランスポーターが関与していることが考えられる。Multidrug resistance 1 (MDR1/Mdr1)や multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2/Mrp2), breast cancer resistance protein (BCRP/Bcrp) などの ATP-binding cassettes (ABC)トランスポーターがヒトやラットで薬物の胆汁排泄に重要な働きをしていることが知られている^{95,96}。Table 4-3 に示すように、MDR1-LLC-PK1 細胞を用いた透過試験で SKL-13784 は $P_{app,B-A}$ が $P_{app,A-B}$ に比べて 2.1 倍高く、SKL-13784 は MDR1 の弱い基質となっていることが示された。しかしながら、SKL-13784 はラット胆汁中に未変化体として投与量の 30.3%とかなりの部分が排泄されていることを考えると、MDR1/Mdr1 以外の MRP2/Mrp2 や BCRP/Bcrp などの他のトランスポーターが胆汁への排泄に主に関与している可能性が考えられる。

SKL-13784 の主な排泄ルートは胆汁であることから、化合物が腸肝循環している可能性が考えられた。予測通り、BDC ラットを用いた試験で SKL-13784 が腸肝循環していることが示された (Figure 4-6, Table 4-5)。無処置ラットと比べて BDC ラットの V_{dss} は小さく、それに伴って最終相の $t_{1/2}$ が短くなった。2 つのラットモデルの関係から SKL-13784 の腸肝循環が無処置ラットの大きな V_{dss} の原因であり、最終相の $t_{1/2}$ を長くしている要因であると考えられた。SKL-13784 は胆汁中にグルクロン酸抱合体として多く排泄されている。胆汁から排泄されたグルクロン酸抱合体は消化管で加水分解され再び吸収されるが、胆汁から排泄された後、加水分解を受ける部位に移動するまでにラグタイムが存在する⁹⁷。おそらく、SKL-13784 の腸管からの再吸収時間が見かけの V_{dss} を大きくしている主な要因と考えられる。

SKL-13784 は肝臓のトランスポーターに認識されて肝臓に効率的に移行することが明らかとなったが、トランスポーターが PK に関与する場合、トランスポーターの飽和により PK が非線形を示すことや、同じトランスポーターで認識される薬物との相互作用を起こすなど好ましくない問題が発生する可能性がある。しかし、SKL-13784 は 0.06 - 6 mg/kg の

用量範囲においてラットで線形の PK を示しており、この用量範囲でのトランスポーターの飽和は認められない。さらに、SKL-13784 は Oatp の基質として知られているアトルバスタチン⁹⁸⁾の肝細胞への取込みを media-loss アッセイで阻害しなかった (Figure 4-8)。

最近、プロドラッグ化することで肝臓への集積を高めた MB07811 が開発されている。この化合物は、肝臓で代謝され活性型の化合物になり、他の組織へ分布しない薬物である⁸⁵⁾。今回、見出した SKL-13784 はトランスポーターにより効率的に肝臓へ取込まれた後、胆汁中に排泄され、腸肝循環することで、肝臓への集積が高まり、他の組織への分布が抑えられていることが明らかとなった。SKL-13784 は特殊な技術を必要とするプロドラッグ化や肝特異的キャリア分子を付けることなく肝臓への集積を高めている点で、肝臓選択性を指向した TR β 選択的作動薬を展開する上で非常に興味深い化合物と考えられる。

4-10 小括

本研究により、SKL-13784 の肝臓への高い集積性は以下の特性によることが明らかとなった (Figure 4-9)。①SKL-13784 は GC-1 に比べてトランスポーター (Oatps) に認識されやすく、肝臓に効率的に移行する。②SKL-13784 は膜透過性が非常に低いため、肝臓から循環血への移行が抑えられ、肝臓以外の組織への分布が小さい。③SKL-13784 は胆汁中に排泄され、腸肝循環することで肝臓への集積性が高い。

以上のように、標的組織である肝臓への SKL-13784 の分布特性は非常に優れており、GC-1 に比べて効率的かつ極めて選択的であることが示された。また、SKL-13784 の優れた肝臓への分布特性は化合物の物性によると考えられ、SKL-13784 の比較的強いカルボン酸と低い脂溶性が大きく寄与していると考えられた。TR β 選択的作動薬を肝トランスポーターに認識させ、肝臓に特異的に分布させるためには、化合物のカルボキシル基または親水性、もしくは両方のチューニングが重要であることが示された。

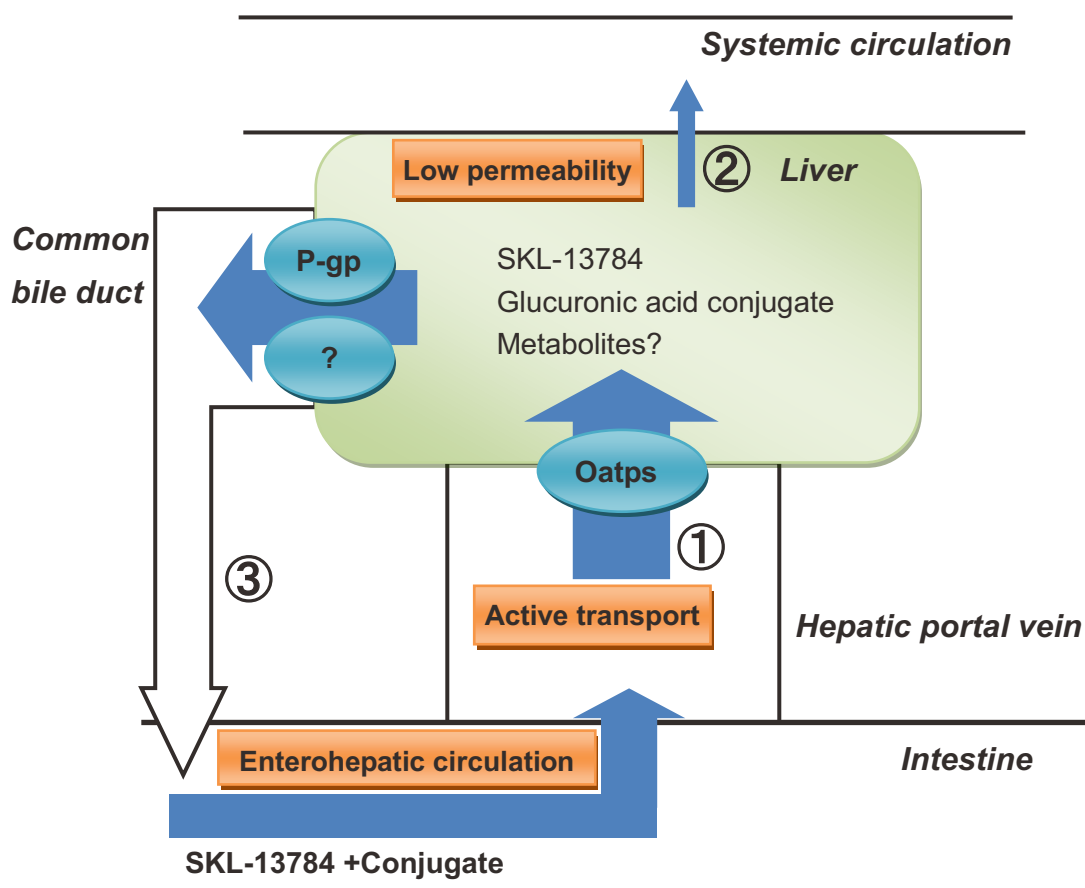


Figure 4-9. Schematic diagram illustrating the presumed liver specific distribution of SKL-13784

4-11 実験の部

4-11-1 試薬

ラット肝ミクロソームは XenoTech (Lenexa, KS) より購入した。NADPH リジェネレーションシステムと UGT リアクションミックスは BD Biosciences (Woburn, MA) より購入した。ニフルム酸 (NA) は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より購入した。HPLC グレードの有機溶媒と塩類は市販品をそのまま使用した。精製水はミリ Q 水精製システム (Millipore, Bedford, MA) を用いて調製した。その他の試薬は試薬特級または分析用のグレードを購入した。

4-11-2 動物

雄性 SD ラット (7-9 週令, Charles River Japan, Kanagawa, Japan) は 12 時間明暗サイクルの一般的な条件で飼育し, 水と固形飼料 (NMF, Oriental Yeast, Tokyo, Japan) は自由摂取とし, 最低 5 日間検疫と環境馴化をした。薬物投与の前日に 1 晩絶食し, 投与後 6 時間で給餌した。各群は 3 例で行った。動物実験は, 「株式会社三和化学研究所三重研究パーク動物実験指針」を遵守して適正に実施した。

4-11-3 ラット肝細胞を用いた Media-loss アッセイと代謝安定性評価

ラット肝細胞は *in situ* 2 段階コラゲナーゼ還流法により単離を行った。ラットを麻酔下で開腹し, 門脈と下大静脈にカニューレーションを行い, 肝還流液 (Life Technologies, Carlsbad, CA) を約 10 分間還流した。続いて, 200 mg/L コラゲナーゼ H (Sigma-Aldrich) を含む肝消化液 (Life Technologies) を約 5 分間還流し, 肝臓の結合組織を消化した。その肝臓を切り出し, 肝細胞洗浄液 (Life Technologies) に肝細胞を十分に分散させた。粗分散細胞浮遊液をフィルターろ過し, 再度, 肝細胞洗浄液に分散した。遠心分離後, 得られた細胞を 10 mM HEPES を含む pH 7.4 の HBSS (Life Technologies) に分散し, 肝細胞懸濁液とした。

Media-loss アッセイは上記の方法で得られた肝細胞懸濁液を用いて, 文献^{14,15)}の方法を少し改良して行った。ラット肝細胞 (8×10^6 cells/mL) を含むバイアルを 5 分間, 37 °C でプレインキュベーションした。同時に 2 μ M 被験物質と DMSO またはリファンピシン (200 μ M) を含む HBSS を 37 °C でインキュベーションした。ラット肝細胞懸濁液に同じ

量の被験物質を含む HBSS を加えて反応を開始した。反応開始後、一定時間 (0.25, 1, 2, 5, 15, 30 分) に 100 μL を遠心チューブに分取した。チューブを 2,000 g で 15 秒間遠心分離し、上清 50 μL に内標準物質 (IS) (100 μM NA) を含む氷冷アセトニトリルを加え、4,500 g で 10 分間遠心分離し、得られた上清を LC-MS/MS で分析した。

肝細胞代謝安定性評価は上記の方法で単離したラット肝細胞を用いて行った。反応は media-loss アッセイと同じ方法で行い、一定時間 (0, 15, 30 分) に 50 μL を取り、IS を含む氷冷アセトニトリルを加えて反応を停止させた。4,500 g で 10 分間遠心分離し、得られた上清を LC-MS/MS で分析した。

Media-loss アッセイと代謝安定性評価の固有クリアランス (CL_{int}') は $CL_{int}' = V \times k$ の式で算出した。V はインキュベーションボリューム、k は緩衝液または肝細胞懸濁液からの消失速度定数を表す。k の算出は log 濃度-時間プロットの初期の直線部分で算出し、media-loss アッセイでの非特異的吸着の影響をなくすために、直線の開始は 0.25 分とした。

見かけの固有クリアランス (CL_{int}) は $CL_{int} = CL_{int}' \times SF$ を用いて算出し、体重あたりで表記した。SF は 1.35×10^8 cells/g liver, 40 g liver/kg^{65,99})を用いた。

4-11-4 ラット肝細胞を用いた代謝安定性評価

SKL-13784 または GC-1 (1 μM) を 0.1 M リン酸バッファー中でラット肝ミクロソーム (1.0 mg protein/mL) と 37 °C で 5 分間プレインキュベーションした。その後、NADPH リジェネレーションシステム (1.3 mM NADP⁺, 3.3 mM glucose-6-phosphate, 0.4 unit/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase, 3.3 mM MgCl₂) を加えて、反応を開始した (n = 3)。37 °C で一定時間 (0, 5, 15, 30, 60 分) インキュベーションした後、反応液を 100 μL を取り、400 μL の IS を含む氷冷アセトニトリルを加え、反応を停止した。4,500 g で 10 分間遠心分離し、得られた上清を LC-MS/MS で分析した。

グルクロン酸抱合反応は 50 mM Tris バッファー (pH 7.5) にラット肝ミクロソーム (1.0 mg protein/mL) とアラメチン (25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of protein) を添加し、30 分間氷冷下に置いた。続いて、SKL-13784 または GC-1 (1 μM) を加えて、37 °C で 5 分間プレインキュベーションした。UGT リアクションミックス (50 mM Tris - HCl (pH 7.5), 8 mM MgCl₂, 2 mM UDPGA) を加えて反応を開始した。37 °C で一定時間 (0, 5, 15, 30, 60 分) インキュベーションした後、上で述べた方法と同じように反応を停止し、得られた上清を LC-MS/MS で分析した。

代謝安定性評価における CL_{int}' は 4-11-3 で述べた方法と同じように算出した。SF は 45 mg microsomal protein/g liver, 40 g liver/kg^{99,100})を用いて、体重あたりの *in vivo* クリ

アランスを算出した。

4-11-5 MDR1-LLC-PK1 を用いた経細胞輸送評価

MDR1-LLC-PK1 細胞は BD Biosciences より購入した。細胞を 7% FBS, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ゲンタマイシンを含む Medium119 (Sigma-Aldrich) 培地に 15×10^4 cells/mL の濃度で分散させ、24well インサートプレート (Transwell plate; BD Biosciences) に播種した。播種後、37 °C で 5 日間 CO₂ インキュベーター (5% CO₂, 95%湿度) 内に入れ、細胞を接着させた。5 日後、各ウェルの培地を除き、10 mM HEPES を含む HBSS (pH 7.4) (TM) に置換し、37 °C で 30 分間 CO₂ インキュベーター (5% CO₂, 95%湿度) 内に置いた。Apical 側に 300 μL または basal 側に 1000 μL の被験物質 1 μM を含む TM を添加して、2 時間インキュベーションした。その後、被験物質を添加していない側から TM 150 μL を取り、被験物質濃度を LC-MS/MS で分析した。被験物質の見かけの膜透過係数 (P_{app} , cm/s) は $P_{\text{app}} = \text{Amount}/\text{Area}/C_0/\text{Time}$ の式で算出した。“Amount” は透過した化合物量, “Area” は膜面積 (0.33 cm²), “C₀” は初期薬物濃度, “Time” はインキュベーション時間を表す。Efflux ratio は $P_{\text{app,B-A}}/P_{\text{app,A-B}}$ で算出し, $P_{\text{app,B-A}}$ は basal から apical 方向の P_{app} , $P_{\text{app,A-B}}$ は apical から basal 方向の P_{app} を表す。Efflux ratio が 2 以上の時, 化合物は MDR1 の基質であると判断した。

4-11-6 人工膜透過性評価 (PAMPA)

PAMPA は, UV-based PAMPA Evolution (pION, Inc., Wobrn, MA) を用いて, pION のプロトコールに従って実施した。すなわち, マイクロタイタープレート (pION) と 96well フィルタープレート (Millipore) とで構成され, 20% (w/v) ドデカン溶液-レシチン混合液をコートした 125 μm 厚マイクロフィルターディスク (0.45 μm pore, pION) を挟んだサンドイッチプレートを用いた。ドナー側とアクセプター側の緩衝液は pH 7.4 に調整し, ドナー側に 250 μM の被験物質を含む緩衝液を添加した。アクセプター側に緩衝液を添加し, 25 °C で 3 時間インキュベーションした。その後, ドナー側とアクセプター側の緩衝液 150 μL を, UV プレートに移し, UV プレートリーダーを用いて, 被験物質濃度を測定した。 P_{app} は pION PSR4p ソフトウェア (pION, Inc.) を用いて算出した。評価は 2 例で行い, 平均値で表記した。メトプロロールとスルファサラジンはそれぞれ透過性の高い標準化合物と低い標準化合物として用いた。

4-11-7 胆管カニューレション (BDC)ラットを用いた胆汁排泄評価

胆汁を採取する為に、ラットに麻酔下で総胆管に PE-10 polyethylene tubes (I.D., 0.28 mm; O.D., 0.61 mm; BD, Parsippany, NJ) を外科的に挿入した。被験物質を 40% v/v DMSO/生理食塩水に溶解し、BDC ラットに 1 mg/kg の用量で尾静脈より i.v.投与した。投与後、胆汁を氷冷下で 2 時間おきに 8 時間まで採取した。

胆汁中の未変化体はそのまま薬物濃度を測定した。胆汁中のグルクロン酸抱合体量は胆汁を脱抱合処理して測定した。脱抱合処理はラット胆汁 100 μ L に β -グルクロニダーゼ (type H2; Sigma-Aldrich) 1000 units/mL を含む 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 900 μ L を添加して、37 $^{\circ}$ C でインキュベーションした。24 時間後、反応液 50 μ L を分取し、200 μ L のアセトニトリルを加えて反応を停止させ、10 分間遠心分離し、上清を得た。

4-11-8 BDC ラットを用いた PK 評価

6 匹の SD ラットを 2 群に分け、1 群は麻酔下で PE-10 polyethylene tube (I.D., 0.28 mm; O.D., 0.61 mm; BD) と polyurethane tube (I.D., 0.6 mm; O.D., 0.9 mm; Access technologies, Skokie, IL) をそれぞれ右頸静脈と総胆管に外科的に挿入した。他の 1 群は麻酔下で PE-10 polyethylene tube を右頸静脈に挿入した。両方の群に SKL-13784 を 1 mg/kg i.v.投与した。投与後 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24 時間に採血を行い、得られた血液を 4 $^{\circ}$ C で遠心分離し、血漿を得た。

4-11-9 SKL-13784 の p.o.投与後の PK 評価

SKL-13784 を 0.5% CMC に懸濁し、0.06, 0.6, 6 mg/kg の用量でラットに p.o.投与した。投与後 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24 時間に血液をヘパリン処理したシリンジで頸静脈より採取した。採取した血液を 4 $^{\circ}$ C で遠心分離し、血漿を得た。

4-11-10 サンプル測定

全てのサンプルの濃度測定は Accela pump, CTC HTC PAL auto sampler, Thermo TSQ Vantage Triple Stage Quadrupole Mass Spectrometer, heated ESI probe で構成した LC-MS/MS システム (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) で行った。血漿と胆汁は、サンプル 10 μ L に IS を含むメタノール 10 μ L, アセトニトリル 70 μ L を添加して、よ

く混合した後、遠心分離し、除タンパクを行った。得られた上清を 0.1 % ギ酸で希釈し、LC-MS/MS にインジェクションした。胆汁と *in vitro* サンプルはカラム温度 40 °C、流速 0.6 mL/min とし、移動相は A 液 (0.1% ギ酸) と B 液 (MeCN) のグラジエントで分析した。グラジエント条件は 0 - 0.3 分が 10% B, 0.3 - 0.7 分が 10% B - 50% B, 0.7 - 0.8 分が 50% B - 80% B, 0.8 - 2.0 分が 80% B, 2.0 - 3.0 分が 80% B - 10% B で行った。分析カラムは YMC triart C18 guard column (3 µm, 2.0 mm × 10 mm, YMC) と YMC triart C18 column (3 µm, 2.0 mm × 30 mm, YMC, Kyoto, Japan) を使用した。

血漿サンプルは YMC triart C18 guard column (3 µm, 2.0 mm × 10 mm, YMC) と YMC triart C18 column (3 µm, 2.0 mm × 50 mm, YMC) を使用し、カラム温度 40 °C で分析した。移動相は 0.1% ギ酸/アセトニトリル (1 : 1) を使用し、流速は 0.35 mL/min, 分析時間は 4 分で行った。MS 条件は ESI ポジティブモードまたはネガティブモードで、MRM 測定で行った。MRM 条件 (parent > product) は 以下に示す。 SKL-13784 (381 > 215), NA (283 > 265, IS), in positive-ion mode ; GC-1 (327 > 269), NA (281 > 237, IS), in negative-ion mode。データ処理は Xcaliber®ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific) で行った。

4-11-11 PK解析

ノンコンパートメントモデルで PK 解析を行った。AUC_{0-∞}はマイクロソフトエクセルで利用できるモーメント解析ソフトを用いて算出した。

4-11-12 統計解析

データは平均 ± S.D.で表記した。有意差検定を 2 群間の比較で実施する際は、等分散の場合は Student's *t* - test で行い、非等分散の場合は Welch's *t* - test を行った。*p* 値が 0.05 以下の場合、統計上有意と判断した。

第5章 結語

甲状腺ホルモンの脂質代謝改善作用に着目し、TR β 選択的かつ肝臓特異的に作用する TR 作動薬の探索を行った。また、得られた化合物の薬理学的特性を明らかにした。以下、本研究の成果を総括する。

新規 TR β 作動薬の探索

本研究では 2-メチルインドールの 1 位にアウターリングを結合させれば、大きな平面構造である 2-メチルインドールがアウターリングとの回転障害を生じ、活性型コンフォメーションを保持できるフレームワークとなるという作業仮説を立て、2-メチルインドール誘導体合成研究を行った。初めに、コアインドール環とカルボン酸の間のリンカーの長さの検討を行った。2-メチルインドール誘導体 **4** と **5** は T3 に比べて TR α 1 と TR β 1 に対する活性が低下したが、概して TR β 1 に対して良好な親和性を示し、T3 に比べて受容体選択性が向上した。受容体選択性は **4** よりも **5** の方が高く、化合物 **5b** は 19 倍の選択性を示した。受容体選択性の違いはカルボキシラートの位置によるものだと考えられ、選択性を向上させるためにカルボン酸側鎖を中心に更なる最適化研究を行った。その結果、新規 TR β 選択的作動薬 **11b** と **11d** を獲得でき、また、インドール 5 位よりも 4 位から側鎖を延ばすことが受容体への親和性に重要であることが示された。また、2-メチル基が受容体への親和性に重要であることを見出した (**11a** vs. **11b**)。さらに、7-メチル置換体 **11c** の TR β への親和性は IC₅₀ で 54 nM と高く、2-メチル置換体 **11b** と同程度であり、メチル基は 2 位でも 7 位でも同じような効果を示すことが分かった。最終的に、TR β に対する親和性は IC₅₀ で 0.23 μ M と 0.24 μ M であり、**11b** と **11c** に比べて劣るものの、TR β に対して 20 倍以上の選択性を有する **11b'** と **11c'** を得た。そこで、**11b'** と **11c'** のコレステロール低下作用を確認した。これらの化合物はコレステロール負荷ラットモデルにおいて心臓や HPT 軸にはほとんど影響を与えず、血漿中コレステロール値を有意に低下させた。

本研究により肝特異的に作用する TR β 選択的作動薬として 1-ベンジル-4-アミノインドール骨格を有する **11b'** (SKL-12846) と **11c'** (SKL-13784) を見出した。また、インナーリングのアイソスターとしてインドールの可能性を示すことができた。

SKL 化合物の薬理学的特性の解明

SKL 化合物が TSH 抑制作用なしに有効性を示すのは、これまでの TR β 選択的作動薬とは明らかに違う点である。そこで、SKL-12846 と SKL-13784 の薬理学的特性を明らかにするため、SKL 化合物の PK と組織分布を正常ラットで評価し、GC-1 と比較した。SKL

化合物のラット PK は期待に反し、それ程良好ではなかった。しかし組織分布の結果から SKL 化合物は標的組織である肝臓に高い集積を示し、このことがコレステロールの強い低下作用に寄与していることが明らかとなった。また、心臓や脳中薬物濃度は肝臓中薬物濃度に比べて極めて低く、L/H と L/B は投与 8 時間まで 100 以上の値を示した。その値は GC-1 よりも極めて高く、SKL 化合物は GC-1 に比べて標的組織である肝臓への分布特性が非常に優れており、肝臓特異的に分布する化合物であることが示された。SKL 化合物が TSH 抑制作用なしにコレステロール値を低下させることができるのは、SKL 化合物の極めて高い L/B によるものであると考えられた。一方で、GC-1 のコレステロール低下作用と TSH 抑制作用とのマージンの低さは GC-1 の脳からの消失が緩やかであるためと考えられた。さらに、SKL-13784 はフルクトース負荷ラットで TG や Glu を有意に低下させ、有効用量でエスケープ現象を示さなかった。このことも、SKL-13784 が HPT 軸に作用しないことを示している。しかしながら、SKL-13784 は血漿中の T4 レベルに影響を与えた。肝臓の DI1 は T3 により活性化されることが知られており、SKL-13784 は肝臓中濃度が非常に高いため、肝臓の DI1 を活性化したと考えられた。

本研究では SKL 化合物の肝臓への分布特性が非常に優れていることを明らかとし、TR 作動薬を肝臓に特異的に分布させることが HPT 軸への影響を回避するのに非常に有効な手段であることを示した。しかし同時に、肝集積性を高めることは肝臓での T4 代謝に影響を与えることが示された。

SKL-13784 の肝臓特異的移行性メカニズムの解明

SKL 化合物の肝臓への特異的な移行性メカニズムを明らかにすることは肝臓特異的な化合物を展開するために非常に重要である。そこで、GC-1 と比較してそのメカニズムの検討を行った。*In vitro* 肝取込み試験の結果は、SKL-13784 と GC-1 は Oatp により肝臓に能動的に取込まれることを示した。また、代謝 CL よりも肝取込み CL が高いことから、肝臓への取込みがラットの薬物動態特性に重要な役割を果たしていると考えられた。SKL-13784 の肝取込み CL は GC-1 より高く、SKL-13784 は GC-1 より効率的に肝臓に取込まれることを示す結果であった。また、どちらの化合物も主排泄ルートは胆汁であるが、SKL-13784 は GC-1 よりも胆汁への排泄率が高く、このことも、全身への曝露を抑える要因になっていると考えられた。SKL-13784 が GC-1 に比べて肝臓への分布特性が非常に優れているのは、SKL-13784 の物性によると考えられた。つまり、SKL-13784 の比較的強いカルボン酸と低い脂溶性が、Oatp への認識性と膜透過性に大きく影響し、肝臓への移行性を高め、肝臓以外の組織への分布を抑えていると考えられた。本検討により TR β 選択的作動薬を肝トランスポーターに認識させ肝臓に効率的に取込ませ、受動的な膜透過性を抑えるには、TR 作動

薬のカルボキシル基の酸性度または親水性、もしくは両方のチューニングが重要であることを示すことができた。しかしながらトランスポーターの関与や膜透過性は薬物の経口吸収性などの PK パラメーターに影響を与えるため、肝臓選択性と経口吸収性の最も良いバランスのとれた化合物特性を見出すための更なる研究が必要である。また、今回の検討はラットを用いて行っているが、トランスポーターの基質認識性には種差があることは一般的に知られていることから、ヒト PK, 特に肝臓への選択的移行を予測するためには SKL-13784 の肝取込みと胆汁排泄についてヒト試料などを用いて更なる検討が必要である。

本研究で高い安全性を確保した TR 作動薬を目指して、TR β に対する選択性が 20 倍以上で、肝臓特異的に分布する SKL-12846 と SKL-13784 を得た。期待通り、SKL 化合物はラットモデルにおいて心臓や HPT 軸への作用を排除し、コレステロールや TG を強力に低下させた。しかしながら T4 への作用を回避することは出来なかった。この原因は肝臓での DI1 の活性化によるものであると予測され、これは肝特異的化合物では回避することができないと考えられる。しかしながら、げっ歯類で認められた T4 の低下はヒトで問題になる可能性は低いと考えている。ヒトではげっ歯類と違い血中 T4 のほとんどは TBG と強固に結合しており、トータル T4 が変動してもフリー T4 の変動は小さいと言われている。事実、肝選択的 TR β 作動薬 MGL-3196 の臨床結果が最近報告され、脂質低下作用を示す用量でも、フリー T4 の変動は正常範囲内であった¹⁰¹⁾。このことは、積極的に肝臓特異性を上げることが、臨床上有益であることを示している。また、組織での T3 の恒常性は DI2 と DI3 が重要であることを考えると、DI1 の活性化は副作用面で問題にならないと考えている。しかしながら、DI1 のヒトでの役割は明らかではなく、この酵素の活性化の影響については、肝選択的 TR β 作動薬の長期臨床研究が進むことで検証されることを望む。

本研究は TR β 選択性を高めると共に肝臓特異的に分布させることが TR 作動薬の有効性と安全性に有用であることを示した。また、SKL 化合物の肝臓特異的移行性のメカニズムを示した。本研究で得られた知見は、肝臓特異的な化合物デザインの可能性を示しており、脂質異常症治療薬としてスタチンとは異なるメカニズムを持つ TR β 作動薬の創薬研究の発展につながるものと期待している。

参考文献

1. 動脈硬化性疾患予防ガイド 2012年版
2. Okamura T, Kadowaki T, Hayakawa T, Kita Y, Okayama A, Ueshima H; Nippon Data80 Research Group. What cause of mortality can we predict by cholesterol screening in the Japanese general population? *J Intern Med.*, **253**, 169-180 (2003).
3. Okamura T, Tanaka H, Miyamatsu N, Hayakawa T, Kadowaki T, Kita Y, Nakamura Y, Okayama A, Ueshima H; NIPPON DATA80 Research Group. The relationship between serum total cholesterol and all-cause or cause-specific mortality in a 17.3-year study of a Japanese cohort. *Atherosclerosis*, **190**, 216-223 (2007).
4. Ueshima H, Sekikawa A, Miura K, Turin TC, Takashima N, Kita Y, Watanabe M, Kadota A, Okuda N, Kadowaki T, Nakamura Y, Okamura T. Cardiovascular disease and risk factors in Asia: a selected review. *Circulation*, **118**, 2702-2709 (2008).
5. Nakamura H, Arakawa K, Itakura H, Kitabatake A, Goto Y, Toyota T, Nakaya N, Nishimoto S, Muranaka M, Yamamoto A, Mizuno K, Ohashi Y; MEGA Study Group. Primary prevention of cardiovascular disease with pravastatin in Japan (MEGA Study): a prospective randomised controlled trial. *Lancet*, **368**, 1155-1163 (2006).
6. Ueshima H. Trend in Asia, II-1 Worldwide trends, Section II Global picture of coronary heart disease. In: Marmot M, Elliott P, editors. *Coronary Heart Disease Epidemiology*. 2. Oxford University Press, Oxford, 102-112 (2005).
7. Yokoyama M, Origasa H, Matsuzaki M, Matsuzawa Y, Saito Y, Ishikawa Y, Oikawa S, Sasaki J, Hishida H, Itakura H, Kita T, Kitabatake A, Nakaya N, Sakata T, Shimada K, Shirato K; Japan EPA lipid intervention study (JELIS) Investigators. Effects of eicosapentaenoic acid on major coronary events in hypercholesterolaemic patients (JELIS): a randomised open-label, blinded endpoint analysis. *Lancet*, **369**, 1090-1098 (2007).
8. 厚生労働省原発性高脂血症調査 2000
9. Nakamura Y, Yamamoto T, Okamura T, Kadowaki T, Hayakawa T, Kita Y, Saitoh S, Okayama A, Ueshima H; NIPPON DATA 80 Research Group. Combined cardiovascular risk factors and outcome: NIPPON DATA80, 1980-1994. *Circ J.*, **70**, 960-964 (2006).
10. 高脂血症治療薬の選択と適正使用 2000
11. Imano H, Noda H, Kitamura A, Sato S, Kiyama M, Sankai T, Ohira T, Nakamura M,

- Yamagishi K, Ikeda A, Shimamoto T, Iso H. Low-density lipoprotein cholesterol and risk of coronary heart disease among Japanese men and women: the Circulatory Risk in Communities Study (CIRCS). *Prev Med.*, **52**, 381-386 (2011).
12. Morikawa S, Takabe W, Mataka C, Kanke T, Itoh T, Wada Y, Izumi A, Saito Y, Hamakubo T, Kodama T. The effect of statins on mRNA levels of genes related to inflammation, coagulation, and vascular constriction in HUVEC. Human umbilical vein endothelial cells. *J Atheroscler Thromb.*, **9**, 178-83 (2002).
 13. FDA talk paper (2001) Bayer voluntarily withdraws Baycol on August 2001.
 14. Fager G, Wiklund O. Cholesterol reduction and clinical benefit. Are there limits to our expectations? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **17**, 3527-3533 (1997).
 15. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R; Cholesterol Treatment Trialists' (CTT) Collaborators. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet*, **366**, 1267-1278 (2005).
 16. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.*, **81**:1097-1142 (2001).
 17. Suzuki S. Thyroid hormone transport: A journey from thyroid gland to targeted nuclear receptors. *The Shinshu Medical Journal*, **59**, 403-410 (2011).
 18. Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev.*, **23**, 38-89 (2002).
 19. Williams GR, Bassett JH. Deiodinases: the balance of thyroid hormone: local control of thyroid hormone action: role of type 2 deiodinase. *J Endocrinol.*, **209**, 261-271 (2011).
 20. Gessl A, Lemmens-Gruber R, Kautzky-Willer A. Thyroid disorders. *Handb Exp Pharmacol.*, **214**, 361-386 (2012).
 21. The Coronary Drug Project Research Group. *JAMA.* **220**: 996 (1972)
 22. Ichikawa K, Miyamoto T, Kakizawa T, Suzuki S, Kaneko A, Mori J, Hara M, Kumagai M, Takeda T, Hashizume K. Mechanism of liver-selective thyromimetic activity of SK&F L-94901: evidence for the presence of a cell-type-specific nuclear iodothyronine transport process. *J Endocrinol.*, **165**, 391-397 (2000).
 23. Taylor AH, Stephan ZF, Steele RE, Wong NC. Beneficial effects of a novel

- thyromimetic on lipoprotein metabolism. *Mol Pharmacol.*, **52**, 542-547 (1997).
24. Sap J, Muñoz A, Damm K, Goldberg Y, Ghysdael J, Leutz A, Beug H, Vennström B. The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. *Nature*, **324**, 635-640 (1986).
 25. Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ, Evans RM. The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor. *Nature*, **324**, 641-646 (1986).
 26. Tancevski I, Eller P, Patsch JR, Ritsch A. The resurgence of thyromimetics as lipid-modifying agents. *Curr Opin Investig Drugs*, **10**, 912-918 (2009).
 27. Yen PM. Molecular basis of resistance to thyroid hormone. *Trends Endocrinol Metab.*, **14**, 327-333 (2003).
 28. Forrest D, Vennström B. Functions of thyroid hormone receptors in mice. *Thyroid*, **10**, 41-52 (2000).
 29. O'Shea PJ, Williams GR. Insight into the physiological actions of thyroid hormone receptors from genetically modified mice. *J Endocrinol.*, **175**, 553-570 (2002).
 30. Flamant F, Samarut J. Thyroid hormone receptors: lessons from knockout and knock-in mutant mice. *Trends Endocrinol Metab.*, **14**, 85-90 (2003).
 31. Webb P. Selective activators of thyroid hormone receptors. *Expert Opin Investig Drugs*, **13**, 489-500 (2004).
 32. Pramfalk C, Pedrelli M, Parini P. Role of thyroid receptor β in lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta.*, **1812**, 929-937 (2011).
 33. Scanlan TS. Sobetirome: a case history of bench-to-clinic drug discovery and development. *Heart Fail Rev.*, **15**, 177-182 (2010).
 34. Tancevski I, Demetz E, Eller P. Sobetirome: a selective thyromimetic for the treatment of dyslipidemia. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov.*, **6**, 16-19 (2011).
 35. Berkenstam A, Kristensen J, Mellström K, Carlsson B, Malm J, Rehnmark S, Garg N, Andersson CM, Rudling M, Sjöberg F, Angelin B, Baxter JD. The thyroid hormone mimetic compound KB2115 lowers plasma LDL cholesterol and stimulates bile acid synthesis without cardiac effects in humans. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, **105**, 663-667 (2008).
 36. Ladenson PW, Kristensen JD, Ridgway EC, Olsson AG, Carlsson B, Klein I, Baxter JD, Angelin B. Use of the thyroid hormone analogue eprotirome in statin-treated dyslipidemia. *N Engl J Med.*, **362**, 906-916 (2010).
 37. Trost SU, Swanson E, Gloss B, Wang-Iverson DB, Zhang H, Volodarsky T, Grover

- GJ, Baxter JD, Chiellini G, Scanlan TS, Dillmann WH. The thyroid hormone receptor-beta-selective agonist GC-1 differentially affects plasma lipids and cardiac activity. *Endocrinology*, **141**, 3057-3064 (2000).
38. Grover GJ, Egan DM, Sleph PG, Beehler BC, Chiellini G, Nguyen NH, Baxter JD, Scanlan TS. Effects of the thyroid hormone receptor agonist GC-1 on metabolic rate and cholesterol in rats and primates: selective actions relative to 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Endocrinology*, **145**, 1656-1661 (2004).
39. Brent GA. Mechanisms of thyroid hormone action. *J Clin Invest.*, **122**, 3035-3043 (2012).
40. Costa-e-Sousa RH, Hollenberg AN. Minireview: The neural regulation of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *Endocrinology*, **153**, 4128-4135 (2012).
41. Stathatos N. Thyroid physiology. *Med Clin North Am.*, **96**, 165-173 (2012).
42. Baxter JD, Webb P. Thyroid hormone mimetics: potential applications in atherosclerosis, obesity and type 2 diabetes. *Nat Rev Drug Discov.*, **8**, 308-320 (2009).
43. Wagner RL, Apriletti JW, McGrath ME, West BL, Baxter JD, Fletterick RJ. A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature*. **378**, 690-697 (1995).
44. Wagner RL, Huber BR, Shiau AK, Kelly A, Cunha Lima ST, Scanlan TS, Apriletti JW, Baxter JD, West BL, Fletterick RJ. Hormone selectivity in thyroid hormone receptors. *Mol Endocrinol.*, **15**, 398-410 (2001).
45. Baxter JD, Dillmann WH, West BL, Huber R, Furlow JD, Fletterick RJ, Webb P, Apriletti JW, Scanlan TS. Selective modulation of thyroid hormone receptor action. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, **76**, 31-42 (2001).
46. Ye L, Li YL, Mellström K, Mellin C, Bladh LG, Koehler K, Garg N, Garcia Collazo AM, Litten C, Husman B, Persson K, Ljunggren J, Grover G, Sleph PG, George R, Malm J. Thyroid receptor ligands. 1. Agonist ligands selective for the thyroid receptor β 1. *J Med Chem.*, **46**, 1580-1588 (2003).
47. Borngraeber S, Budny MJ, Chiellini G, Cunha-Lima ST, Togashi M, Webb P, Baxter JD, Scanlan TS, Fletterick RJ. Ligand selectivity by seeking hydrophobicity in thyroid hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, **100**, 15358-15363 (2003).
48. Martínez L, Nascimento AS, Nunes FM, Phillips K, Aparicio R, Dias SM, Figueira AC, Lin JH, Nguyen P, Apriletti JW, Neves FA, Baxter JD, Webb P, Skaf MS,

- Polikarpov I. Gaining ligand selectivity in thyroid hormone receptors via entropy. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, **106**, 20717-20722 (2009).
49. Leeson PD, Ellis D, Emmett JC, Shah VP, Showell GA, Underwood AH. Thyroid hormone analogues. Synthesis of 3'-substituted 3,5-diiodo-L-thyronines and quantitative structure-activity studies of in vitro and in vivo thyromimetic activities in rat liver and heart. *J Med Chem.*, **31**, 37-54 (1988).
50. Leeson PD, Emmett JC, Shah VP, Showell GA, Novelli R, Prain HD, Benson MG, Ellis D, Pearce NJ, Underwood AH. Selective thyromimetics. Cardiac-sparing thyroid hormone analogues containing 3'-arylmethyl substituents. *J Med Chem.*, **32**, 320-336 (1989).
51. Yokoyama N, Walker GN, Main AJ, Stanton JL, Morrissey MM, Boehm C, Engle A, Neubert AD, Wasvary JM, Stephan ZF, Steele RE. Synthesis and structure-activity relationships of oxamic acid and acetic acid derivatives related to L-thyronine. *J Med Chem.*, **38**, 695-707 (1995).
52. Garcia Collazo AM, Koehler KF, Garg N, Färnegårdh M, Husman B, Ye L, Ljunggren J, Mellström K, Sandberg J, Grynfarb M, Ahola H, Malm J. Thyroid receptor ligands. Part 5: novel bicyclic agonist ligands selective for the thyroid hormone receptor β . *Bioorg Med Chem Lett.*, **16**, 1240-1244 (2006).
53. Shiohara H, Nakamura T, Kikuchi N, Ozawa T, Nagano R, Matsuzawa A, Ohnota H, Miyamoto T, Ichikawa K, Hashizume K. Discovery of novel indane derivatives as liver-selective thyroid hormone receptor β (TR β) agonists for the treatment of dyslipidemia. *Bioorg Med Chem.*, **20**, 3622-3634 (2012).
54. Koerner D, Schwartz HL, Surks MI, Oppenheimer JH. Binding of selected iodothyronine analogues to receptor sites of isolated rat hepatic nuclei. High correlation between structural requirements for nuclear binding and biological activity. *J Biol Chem.*, **250**, 6417-6423 (1975).
55. Dietrich SW, Bolger MB, Kollman PA, Jorgensen EC. Thyroxine analogues. 23. Quantitative structure-activity correlation studies of in vivo and in vitro thyromimetic activities. *J Med Chem.*, **20**, 836-880 (1977).
56. Cody V. Role of iodine in thyroid hormones: molecular conformation of a halogen-free hormone analogue. *J Med Chem.*, **23**, 584-587 (1980).
57. Blaney JM, Jorgensen EC, Connolly ML, Ferrin TE, Langridge R, Oatley SJ, Burrige JM, Blake CC. Computer graphics in drug design: molecular modeling of

- thyroid hormone-prealbumin interactions. *J Med Chem.*, **25**, 785-790 (1982).
58. Yoshihara HA, Apriletti JW, Baxter JD, Scanlan TS. Structural determinants of selective thyromimetics. *J Med Chem.*, **46**, 3152-3161 (2003).
 59. Johansson L, Rudling M, Scanlan TS, Lundåsen T, Webb P, Baxter J, Angelin B, Parini P. Selective thyroid receptor modulation by GC-1 reduces serum lipids and stimulates steps of reverse cholesterol transport in euthyroid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **102**, 10297-10302 (2005).
 60. Tancevski I, Demetz E, Eller P, Duwensee K, Hoefler J, Heim C, Stanzl U, Wehinger A, Auer K, Karer R, Huber J, Schgoer W, Van Eck M, Vanhoutte J, Fievet C, Stellaard F, Rudling M, Patsch JR, Ritsch A. The liver-selective thyromimetic T-0681 influences reverse cholesterol transport and atherosclerosis development in mice. *PLoS One*, **15**, e8722 (2010).
 61. Erion MD, Cable EE, Ito BR, Jiang H, Fujitaki JM, Finn PD, Zhang BH, Hou J, Boyer SH, van Poelje PD, Linemeyer DL. Targeting thyroid hormone receptor-beta agonists to the liver reduces cholesterol and triglycerides and improves the therapeutic index. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, **104**, 15490-15495 (2007).
 62. Diane S. Farlowa, Michael E. Flaugh, Sharon D. Horvath, Edward R. Lavagnino, Paul P. Two efficient syntheses of indole-3-propionic esters and acids. Further applications of meldrum's acid. *Org. Prep. Proced. Int.*, **13**, 39-48 (1981).
 63. Sawada K, Hirai H, Golden P, Okada S, Sawada Y, Hashimoto M, Tanaka H. (1-Benzylindole-3-yl)alkanoic acids; novel nonsteroidal inhibitors of steroid 5 alpha-reductase (I). *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, **46**, 1683-1687 (1998).
 64. Bergman J, Sand P. Synthesis of indoles via ring closure of 2-alkylnitroaniline derivatives. *Tetrahedron*, **46**, 6085-6112 (1990).
 65. Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res.*, **10**, 1093-1095 (1993).
 66. Zavaroni I, Chen YD, Reaven GM. Studies of the mechanism of fructose-induced hypertriglyceridemia in the rat. *Metabolism*. **31**, 1077-1083 (1982).
 67. Zhu X, Cheng SY. New insights into regulation of lipid metabolism by thyroid hormone. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.*, **17**, 408-413 (2010).
 68. Joharapurkar AA, Dhote VV, Jain MR. Selective thyromimetics using receptor and tissue selectivity approaches: prospects for dyslipidemia. *J Med Chem.*, **55**, 5649-5675 (2012).

69. Shoemaker TJ, Kono T, Mariash CN, Evans-Molina C. Thyroid hormone analogues for the treatment of metabolic disorders: new potential for unmet clinical needs? *Endocr Pract.*, **18**, 954-964 (2012).
70. Pedrelli M, Pramfalk C, Parini P. Thyroid hormones and thyroid hormone receptors: effects of thyromimetics on reverse cholesterol transport. *World J Gastroenterol*, **16**, 5958-5964 (2010).
71. Tancevski I, Wehinger A, Demetz E, Eller P, Duwensee K, Huber J, Hochegger K, Schgoer W, Fievet C, Stellaard F, Rudling M, Patsch JR, Ritsch A. Reduced plasma high-density lipoprotein cholesterol in hyperthyroid mice coincides with decreased hepatic adenosine 5'-triphosphate-binding cassette transporter 1 expression. *Endocrinology*, **149**, 3708-3712 (2008).
72. Erion MD, Cable EE, Ito BR, Jiang H, Fujitaki JM, Finn PD, Zhang BH, Hou J, Boyer SH, van Poelje PD, Linemeyer DL. Targeting thyroid hormone receptor- β to the liver reduces cholesterol and triglycerides and improves the therapeutic index. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, **104**, 15490-15495 (2007).
73. Moeller LC, Broecker-Preuss M. Transcriptional regulation by nonclassical action of thyroid hormone. *Thyroid Res.* **4**, S6 (2011)
74. Strisower B, Gofman JW, Galioni E, Rubinger JH, O'brien GW, Simon A. Effect of long-term administration of desiccated thyroid on serum lipoprotein and cholesterol levels. *J Clin Endocrinol Metab.*, **15**, 73-80 (1955).
75. Fujitaki JM, Cable EE, Ito BR, Zhang BH, Hou J, Yang C, Bullough DA, Ferrero JL, van Poelje PD, Linemeyer DL, Erion MD. Preclinical pharmacokinetics of a HepDirect prodrug of a novel phosphonate-containing thyroid hormone receptor agonist. *Drug Metab Dispos.*, **36**, 2393-2403 (2008).
76. Bianco AC, Kim BW. Deiodinases: implications of the local control of thyroid hormone action. *J Clin Invest.*, **116**, 2571-2579 (2006).
77. Boelen A, Kwakkel J, Fliers E. Beyond low plasma T3: local thyroid hormone metabolism during inflammation and infection. *Endocr Rev.*, **32**, 670-693 (2011).
78. Chiellini G, Nguyen NH, Yoshihara HA, Scanlan TS. Improved synthesis of the iodine-free thyromimetic GC-1. *Bioorg Med Chem Lett.*, **10**, 2607-2011 (2000).
79. Grover GJ, Mellström K, Ye L, Malm J, Li YL, Bladh LG, Sleph PG, Smith MA, George R, Vennström B, Mookhtiar K, Horvath R, Speelman J, Egan D, Baxter JD. Selective thyroid hormone receptor- β activation: a strategy for reduction of weight,

- cholesterol, and lipoprotein (a) with reduced cardiovascular liability. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, **100**, 10067–10072 (2003).
80. Kusuhara H, Sugiyama Y. Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs: transporters in the liver, small intestine, brain and kidney. *J Control Release*, **78**, 43–54 (2002).
 81. Kramer W, Wess G, Schubert G, Bickel M, Girbig F, Gutjahr U, Kowalewski S, Baringhaus KH, Enhsen A, Glombik H, et al. Liver-specific drug targeting by coupling to bile acids. *J Biol Chem.*, **267**, 18598–18604 (1992).
 82. Meijer DK, Molema G. Targeting of drugs to the liver. *Semin Liver Dis.*, **15**, 202–256 (1995)
 83. Erion MD, van Poelje PD, Mackenna DA, Colby TJ, Montag AC, Fujitaki JM, Linemeyer DL, Bullough DA. Liver-targeted drug delivery using HepDirect prodrugs. *J Pharmacol Exp Ther.*, **312**, 554–560 (2005).
 84. Lew W, Chen X, Kim CU. Discovery and development of GS 4104 (oseltamivir): an orally active influenza neuraminidase inhibitor. *Curr Med Chem.*, **7**, 663–672 (2000).
 85. Erion MD, Cable EE, Ito BR, Jiang H, Fujitaki JM, Finn PD, Zhang BH, Hou J, Boyer SH, van Poelje PD, Linemeyer DL. Targeting thyroid hormone receptor- β agonists to the liver reduces cholesterol and triglycerides and improves the therapeutic index. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, **104**, 15490–15495 (2007).
 86. Müller M, Jansen PL. Molecular aspects of hepatobiliary transport. *Am J Physiol.*, **272**, G1285–303 (1997).
 87. Yamazaki M, Suzuki H, Sugiyama Y. Recent advances in carrier-mediated hepatic uptake and biliary excretion of xenobiotics. *Pharm Res.*, **13**, 497–513 (1996).
 88. Büdingen FV, Gonzalez D, Tucker AN, Derendorf H. Relevance of Liver Failure for Anti-Infective Agents: From Pharmacokinetic Alterations to Dosage Adjustments. *Ther Adv Infect Dis.*, **2**, 17-42 (2014).
 89. Imaoka T, Mikkaichi T, Abe K, Hirouchi M, Okudaira N, Izumi T. Integrated approach of in vivo and in vitro evaluation of the involvement of hepatic uptake organic anion transporters in the drug disposition in rats using rifampicin as an inhibitor. *Drug Metab Dispos.*, **41**, 1442–1449 (2013).
 90. Soars MG, Grime K, Sproston JL, Webborn PJ, Riley RJ. Use of hepatocytes to assess the contribution of hepatic uptake to clearance in vivo. *Drug Metab Dispos.*,

- 35**, 859–865 (2007).
91. Ye ZW, Augustijns P, Annaert P. Cellular accumulation of cholyl-glycylamido-fluorescein in sandwich-cultured rat hepatocytes: kinetic characterization, transport mechanisms, and effect of human immunodeficiency virus protease inhibitors. *Drug Metab Dispos.*, **36**, 1315–1321 (2008).
 92. Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch.*, **447**, 653–665 (2004).
 93. Varma MV, Chang G, Lai Y, Feng B, El-Kattan AF, Litchfield J, Goosen TC. Physicochemical property space of hepatobiliary transport and computational models for predicting rat biliary excretion. *Drug Metab Dispos.*, **40**, 1527–1537 (2012).
 94. Tu M, Mathiowetz AM, Pfefferkorn JA, Cameron KO, Dow RL, Litchfield J, Di L, Feng B, Liras S. Medicinal chemistry design principles for liver targeting through OATP transporters. *Curr Top Med Chem.*, **13**, 857–866 (2013).
 95. Matsushima S, Maeda K, Kondo C, Hirano M, Sasaki M, Suzuki H, Sugiyama Y. Identification of the hepatic efflux transporters of organic anions using double-transfected Madin-Darby canine kidney II cells expressing human organic aniontransporting polypeptide 1B1 (OATP1B1)/multidrug resistance-associated protein 2, OATP1B1/multidrug resistance 1, and OATP1B1/breast cancer resistance protein. *J Pharmacol Exp Ther.*, **314**, 1059–1067 (2005).
 96. Tian X, Li J, Zamek-Gliszczynski MJ, Bridges AS, Zhang P, Patel NJ, Raub TJ, Pollack GM, Brouwer KL. Roles of P-glycoprotein, Bcrp, and Mrp2 in biliary excretion of spiramycin in mice. *Antimicrob Agents Chemother.*, **51**, 3230–3234 (2007).
 97. Fukuyama T, Yamaoka K, Ohata Y, Nakagawa T. A new analysis method for disposition kinetics of enterohepatic circulation of diclofenac in rats. *Drug Metab Dispos.*, **22**, 479–85 (1994).
 98. Lau YY, Okochi H, Huang Y, Benet LZ. Multiple transporters affect the disposition of atorvastatin and its two active hydroxyl metabolites: application of in vitro and ex situ systems. *J Pharmacol Exp Ther.*, **316**, 762–771 (2006).
 99. Houston JB, Carlile DJ. Prediction of hepatic clearance from microsomes,

- hepatocytes, and liver slices. *Drug Metab. Rev.*, **29**, 891-922 (1997).
100. Obach RS, Baxter JG, Liston TE, Silber BM, Jones BC, MacIntyre F, Rance DJ, Wastall P. The prediction of human pharmacokinetic parameters from preclinical and in vitro metabolism data. *J Pharmacol Exp Ther.*, **283**, 46–58 (1997).
101. Taub R, Chiang E, Chabot-Blanchet M, Kelly MJ, Reeves RA, Guertin MC, Tardif JC. Lipid lowering in healthy volunteers treated with multiple doses of MGL-3196, a liver-targeted thyroid hormone receptor- β agonist. *Atherosclerosis*, **230**, 373-380 (2013)

謝辞

本研究および本論文執筆にあたり、多くの方のご支援とご指導を賜りましたことをここに厚くお礼申し上げます。

信州大学学術研究院農学系 真壁秀文教授にはご多忙中にも関わらず、本論文審査の主査をお引き受け頂き、また、本論文をまとめるにあたり、終始ご懇篤なるご指導と適切なご助言を賜りましたことを深く感謝いたします。

本論文を審査していただき有益なご助言を賜りました信州大学学術研究院農学系 藤田智之教授、信州大学先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所 藤井博教授、信州大学学術研究院農学系 下里剛士准教授ならびに山形大学大学院理工学研究科 今野博行准教授に心から感謝いたします。また、学位取得のご支援を賜りました信州大学学術研究院農学系 千菊夫教授に感謝いたします。

本研究は株式会社三和化学研究所で行われた研究であり、本研究を遂行する機会と環境を与えて下さいました株式会社三和化学研究所に心から感謝いたします。

本研究に関する論文投稿および本論文執筆に当たり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜りました探索研究所長 渡邊信英博士に心から感謝いたします。

本研究の推進に当たり、化合物の合成と分析にご協力くださいました前田宏治氏、薬理評価にご協力くださいました浅野幸康氏、薬物動態評価にご協力くださいました井土徹氏に心から感謝いたします。また、学位取得を強く進めて下さいました元上司の白井真宏氏と論文執筆にご理解を頂きました ADME/TOX グループのメンバーに感謝いたします。

最後に、本論文執筆に当たり、温かく見守ってくれた家族に心から感謝します。