

13. ピリミドインドール骨格を有する TLR4 リガンドの構造改変と構造活性相関解析

若尾 雅広¹⁾, 杜若 祐平¹⁾, Alast Ahmadiiveli²⁾, 馬場 暁士¹⁾, 大山 真也¹⁾, 新地 浩之¹⁾, Michael Chan²⁾, 林 公子²⁾, Howard B. Cottam²⁾, Dennis A. Carson²⁾, 隅田 泰生¹⁾

¹⁾鹿児島大学大学院理工学研究科, ²⁾カリフォルニア大学サンディエゴ校ムーアがんセンター

はじめに

Toll 様受容体 (Toll-like receptors: TLRs) は, 代表的なパターン認識受容体 (pattern recognition receptor: PRRs) の一つで, ウイルスやバクテリアなどの病原体に特徴的な分子パターン (pathogen-associated molecular patterns: PAMPs) や, 自己細胞の損傷・壊死によって生じる分子パターン (damage-associated molecular patterns: DAMPs) を認識することによって, 自然免疫, 獲得免疫, 炎症反応を誘導する^{1,2)}。ヒトでは TLR1 から TLR10 の 10 種類が, マウスでは TLR1 から TLR9, TLR11 から TLR13 の 12 種類がこれまでに見つかっており, TLR1, TLR2, TLR4, TLR6 は細胞表層に, TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 は細胞内の小胞体, エンドソームに存在している。それぞれ TLR は特定の分子構造を認識することが知られており, TLR2, TLR4, TLR6 は病原体の細胞壁成分の PAMPs を, TLR7, TLR9 は, 病原体由来の核酸成分の PAMPs を認識する。DAMPs については, 細胞表層成分が TLR2, TLR4 によって, 細胞やミトコンドリア由来の核酸成分が TLR7, TLR9 によって認識される。近年, TLR4 においては, 特定の天然有機化合物や合成化合物が TLR4 を活性化することが見出されており, これらを活用した炎症反応の分子機構解明や, がんやウイルスに対する免疫療法の開発などが注目されている。本稿では, TLR4 リガンドに焦点をあて, 最近の研究について概説する。

1. TLR4 の機能

TLR4 は, 主として樹状細胞などの自然免疫担当細胞の細胞表層やエンドソームに存在する。通常, アクセサリータンパク質であるミエロイド分化因子-2 (myeloid differential factor-2: MD-2) と複合体を形成しており, 細菌の外膜成分であるリポ多糖 (LPS) やリピド A などの PAMPs を認識することによって免疫系を活性化する³⁻⁵⁾。TLR4 の活性化は, CD14 依存的または CD14 非依存的なリガンド/TLR4/MD-2 複合体の形成と二量体化を経て, アダプタータンパク質である TI-

RAP-MyD88 を介する経路, または TRAM-TRIF を介する経路で起こり, 炎症性サイトカインまたは I 型インターフェロンの産生を促進する (図 1)^{4,6)}。TLR4 の活性化は, 炎症反応を誘導する一方で, 抗がん作用や抗ウイルス作用, 獲得免疫において重要な働きを持つことから, TLR4 リガンドを利用した抗ウイルス療法や抗がん療法の開発が検討されている。

2. TLR4 リガンド

2-1. リピド系 TLR4 リガンド

グラム陰性細菌の細胞表層を構成する LPS やリピド A は TLR4 のリガンドとして働く。LPS がエンドトキシンの活性本体⁷⁾であることが見出されて以来, これまでにさまざまなリピド A 誘導體, 類縁体が合成されている^{8,9)}。構造活性相関研究では, リピド A の脂質成分や, リン酸部位などの構造改変によって, TLR4 のアゴニスト活性, アンタゴニスト活性を有するリピド系 TLR4 リガンドが見出されている。アゴニスト活性には, 抗腫瘍作用や免疫賦活作用などの有用な作用がみられることから, TLR4 リガンドを用いたがん治療, ワクチン療法が検討されている。がん治療では, 現在のところよい成果は得られていないが, がんワクチン療法では, モノホスホリリピド A (MPLA)¹⁰⁾が, 子宮頸癌ワクチンなどのアジュバントとして現在使用されている。一方, アンタゴニスト活性を有するリピド系 TLR4 リガンドでは, いまだ治療法が確立していない敗血症治療などへの応用が検討されている。

2-2. 非リピド系 TLR4 リガンド

近年, 天然有機化合物, 漢方薬成分, 合成化合物ライブラリーを用いたスクリーニングによって, オピオイド類¹¹⁾やポリフェノール類¹²⁾, 4-アミノキナゾリン類¹³⁾, ネオセプチン類¹⁴⁾などの化合物に TLR4 活性化能が見出されている。これらの非リピド系 TLR4 リガンドは, リピド系 TLR4 リガンドとは異なり, CD14 を介さず MD-2 と結合して TLR4 のシグナル調節を行う。アゴニスト活性をもつ化合物は, リピド系 TLR4 アゴニストと同様に, がん治療, ワクチン療法への応用が検討さ

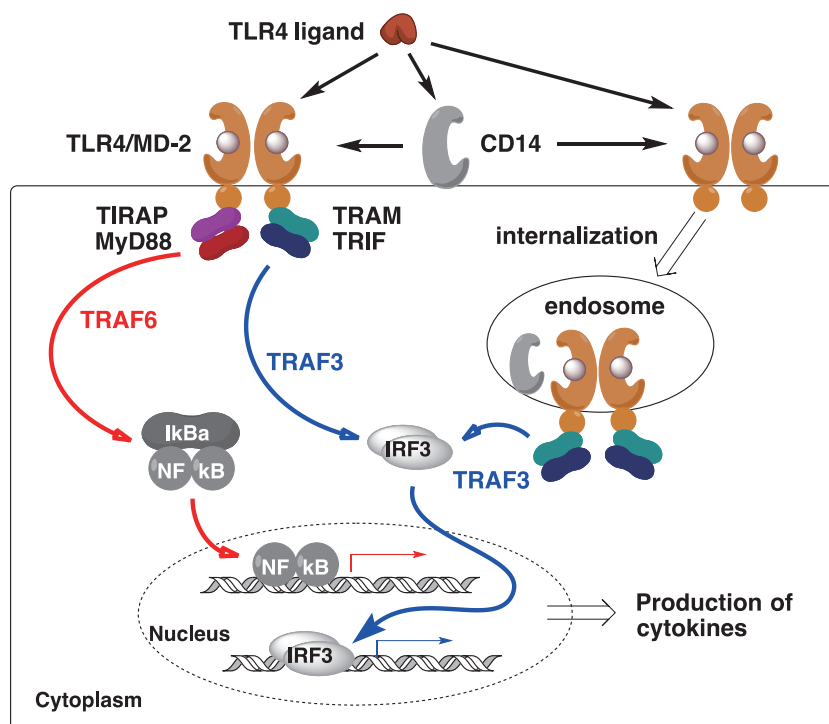


図1 TLR4のシグナル伝達経路

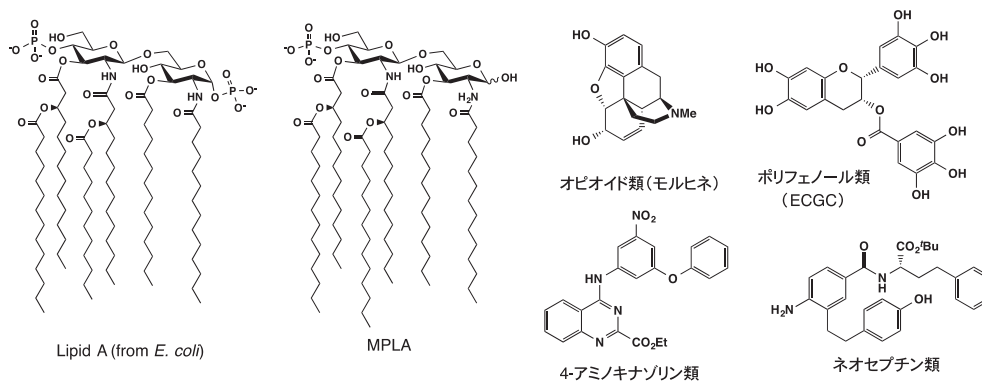


図2 TLR4リガンドの構造

れており、水溶性に乏しい脂質成分を含まないことから、製剤化においても注目されている。一方、オピオイド類においては、中枢神経系の炎症反応に関与し、神経障害性疼痛をはじめとする難治性の神経免疫疾患への関与が示唆されており、オピオイド類を用いた中枢神経系におけるTLR4シグナルの機能解析が進められている。

3. ピリミドインドール系TLR4リガンド

われわれの研究グループでは、ハイスループットスクリーニングの結果、ピリミドインドール骨格を持つ1Z65および1Z105がTLR4アゴニスト活性を有することを見出している(図3)¹⁵⁾。これまでの構造活性相関研究では、2位のチオアセトアミド基部分、3位のN-

フェニル基部分の構造がTLR4アゴニスト活性において重要であること、また5位のN-メチル基の有無が細胞毒性に影響することが報告されている。またTLR4/MD-2複合体の結晶構造を用いた分子モデリングでは、ピリミドインドール骨格のベンゼン環部位が、TLR4との相互作用に重要であることが示唆されている(図4)。われわれは、さらなるアゴニスト活性の向上を目指し、これまでに調べられていないピリミドインドール部位の構造活性相関について検討しており¹⁶⁾、本節では、ベンゼン環を持たないピロロピリミジン誘導体の設計と合成、ドッキングシミュレーションならびに生物活性について述べる。

3-1. ピロロピリミジン誘導体の設計と合成

設計・合成したピロロピリミジン誘導体を図5に示す。置換基 R¹ においては、メチル基の有無によって細胞毒性が変わることから、ヒドリド体ならびにメチル化体の合成を行った。また置換基 R², R³ においては、置換基効果を調べるため、無置換体 (2A61, 2A164), ジメチル体 (2A38, 2A96), シクロヘキシル体 (2A59, 2A157), シクロヘプチル体 (2A212, 2A228) を設計した。これらの誘導体は、市販の2-シアノケトン類または3-アミノピロール-2-カルボン酸類を出発化合物とし、ピリミジン骨格を形成させた後、チオアセトアミド側鎖の導入を行ってピロロピリミジン類を合成した。

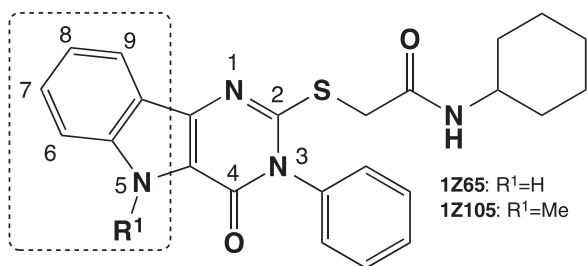


図3 ピリミドインドール系 TLR4 リガンド

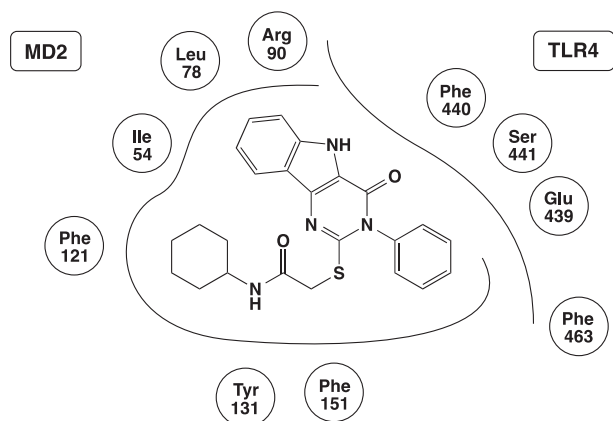


図4 ピリミドインドール系 TLR4 リガンドの分子モデリングによる解析

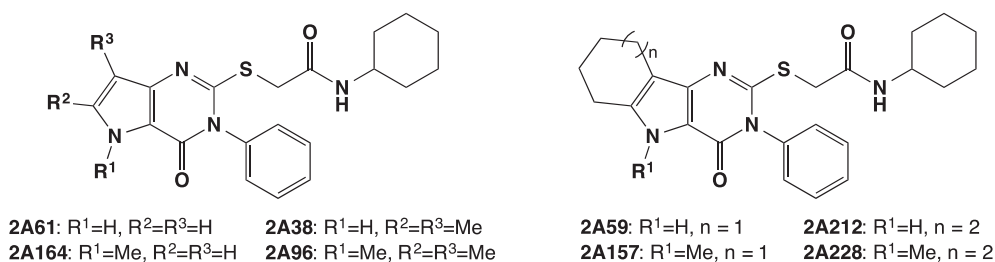


図5 ピロロピリミジン誘導体の設計

3-2. ピロロピリミジン誘導体のドッキングシミュレーション

設計・合成したピロロピリミジン誘導体のドッキングシミュレーションは、MOE (Molecular Operating Environment) を用いて行った。結晶構造には、マウス由来またはヒト由来の LPS/TLR4/MD-2 複合体の結晶構造 (PDB, マウス: 5IJJ, ヒト: 3FXI) を用い、リガンド分子である LPS を除去後、TLR4/MD-2 複合体の最適化を行って計算に使用した。結合サイトの選定は Site Finder を用い、ドッキング実験は Dock を用いて行った。ドッキング実験の結果を表1に示す。1Z65, 1Z105 では、リガンド/TLR4/MD-2 複合体形成が予想される良好なドッキングスコアが得られた。ベンゼン環を持たない誘導体 2A61, 2A164 においては、スコアが増大することから、親和性の低下が予想される。一方、置換基を有する 2A39, 2A95, 2A59, 2A157, 2A212, 2A228 においては、置換基が大きくなるにしたがいスコアが減少することから、疎水性の向上に伴い親和性が向上すると予想される。

表1 合成した TLR4 リガンドのドッキングシミュレーション

Compound	DS ^a to hTLR4 ^b /MD-2 (kcal/mol)	DS ^a to mTLR4 ^c /MD-2 (kcal/mol)
1Z65	-7.62	-7.29
1Z105	-7.95	-7.67
2A61	-7.38	-7.10
2A164	-7.75	-7.55
2A39	-7.60	-7.54
2A95	-7.95	-7.60
2A59	-7.94	-7.69
2A157	-8.19	-7.90
2A212	-8.15	-8.09
2A228	-8.31	-8.31

^aDS: Docking score, ^bhTLR4/MD-2: human TLR4/MD-2 complex (PDB: 3FXI), ^cmTLR4/MD-2: mouse TLR4/MD-2 complex (PDB: 5IJJ).

3-3. ピロロピリミジン誘導体の生物活性評価

合成したピロロピリミジン誘導体の生物活性については、マウス TLR HEK Blue 細胞を用いた分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) アッセイによる予備的な活性試験を行った。その結果、無置換体 (2A61, 2A164) では、TLR4 の活性化がみられなかったが、ジメチル体 (2A38, 2A96)、シクロヘキシル体 (2A59, 2A157)、シクロヘプチル体 (2A212, 2A228) においては、TLR4 の活性化がみられることがわかった。よりかさ高く疎水性の高いシクロヘプチル体では、1Z105 に類似する活性がみられることから、1Z105 のベンゼン環部位への疎水基の導入は、TLR4/MD-2 複合体の形成に優位であると考えられる。さらなる生物活性評価とピリミドインドール系 TLR4 リガンドの構造活性相関解析は今後の課題である。

おわりに

ピリミドインドール系 TLR4 リガンドの構造活性相関解析では、アゴニスト活性において、ピリミドインドール骨格のベンゼン環部位の疎水性が重要であることがわかった。この部位でのさらなる構造最適化は、より高い活性を持つ TLR4 リガンドの創製につながる。また、アゴニスト活性やアンタゴニスト活性など、シグナル選択的に作用する TLR4 リガンドを見出すことができれば、TLR4 を標的とした抗ウイルス療法や抗がん療法への応用が期待できる。

文 献

- 1) Akira S, Takeda K : Toll-like receptor signaling. *Nat Rev Immunol* 4 : 499-511, 2004
- 2) Bianchi ME : DAMPs, PAMPs and alarmins : all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 81 : 1-5, 2007
- 3) Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. : Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice : mutations in *Tlr4* gene. *Science* 282 : 2085-2088, 1998
- 4) Kobayashi M, Saitoh S, Tanimura N, et al. : Regulatory roles for MD-2 and TLR4 in ligand-induced receptor clustering. *J Immunol* 176 : 6211-6218, 2006
- 5) Park BS, Song DH, Kim HM, et al. : The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4-MD-2 complex. *Nature* 458 : 1191-1195, 2009
- 6) Yamamoto M, Takeda K, Akira S : TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling. *Mol Immunol* 40 : 861-868, 2004
- 7) Westphal O, Lüderitz O : Chemische Erforschung von lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien. *Angew Chem* 66 : 407-417, 1954
- 8) Wang X, Smith C, Yin H : Targeting toll-like receptors with small molecule agents. *Chem Soc Rev* 42 : 4859-4866, 2013
- 9) Peri F, Calabrese V : Toll-like receptor 4 (TLR4) modulation by synthetic and natural compounds : an update. *J Med Chem* 57 : 3612-3622, 2014
- 10) Mata-Haro V, Cekic C, Martin M, et al. : The vaccine adjuvant monophosphoryl lipid A as a TRIF-biased agonist of TLR4. *Science* 316 : 1628-1632, 2007
- 11) Wang X, Loram LC, Ramos K, et al. : Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 109 : 6325-6330, 2012
- 12) Youn HS, Lee JY, Saitoh SI, et al. : Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of Toll-like receptor by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea. *Biochem Pharmacol* 72 : 850-859, 2006
- 13) Nour A, Hayashi T, Chan M, et al. : Discovery of substituted 4-aminoquinazolines as selective Toll-like receptor 4 ligands. *Bioorg Med Chem Lett* 24 : 4931-4938, 2014
- 14) Wang Y, Su L, Morin MD, et al. : TLR4/MD-2 activation by a synthetic agonist with no similarity to LPS. *Proc Natl Acad Sci USA* 113 : E884-E893, 2016
- 15) Chan M, Hayashi T, Mathewson RD, et al. : Identification of substituted pyrimido [5,4-b] indoles as selective toll-like receptor 4 ligands. *J Med Chem* 56 : 4206-4223, 2013
- 16) Chan M, Kakitsubata Y, Hayashi T, et al. : Structure-activity relationship studies of pyrimido [5,4-b] indoles as selective Toll-like receptor 4 ligands. submitted to *J Med Chem*