

# ピリミドインドール系 TLR4 リガンドの構造活性相関研究

大山 真也<sup>1)</sup>, 若尾 雅広<sup>1)</sup>, Alast Ahmadiiveli<sup>2)</sup>, 杜若 祐平<sup>1)</sup>, 山口 徹<sup>1)</sup>,  
 新地 浩之<sup>1)</sup>, Michael Chan<sup>2)</sup>, Nikunj M. Shukla<sup>2)</sup>, 林 公子<sup>2)</sup>, Howard B. Cottam<sup>2)</sup>,  
 Dennis A. Carson<sup>2)</sup>, 隅田 泰生<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>鹿児島大学大学院理工学研究科, <sup>2)</sup>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

## The study on structure-activity relationship of pyrimidoindoles TLR4 ligands

Shin-ya Oyama<sup>1)</sup>, Masahiro Wakao<sup>1)</sup>, Alast Ahmadiiveli<sup>2)</sup>, Yuhei Kakitsubata<sup>1)</sup>, Toru Yamaguchi<sup>1)</sup>, Hiroyuki Shinchi<sup>1)</sup>,  
 Michael Chan<sup>2)</sup>, Nikunj M. Shukla<sup>2)</sup>, Tomoko Hayashi<sup>2)</sup>, Howard B. Cottam<sup>2)</sup>, Dennis A. Carson<sup>2)</sup>, Yasuo Suda<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Chemistry, Kagoshima University

<sup>2)</sup>Moore's Cancer Center, University of California

### Abstract

Toll-like receptors (TLRs) are a family of type I membrane proteins, classified to pattern recognition receptors (PRR). TLRs are expressed in cell surface or endosomal compartment of immune cells. TLRs are activated by recognition of pathogen specific components called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Signal of TLRs induces the innate immune response and adaptive immune response. Therefore, TLRs play important roles in host defense system against viral or bacterial infection. In human, 10 kinds of TLR (TLR1 to TLR10) have been found. Each TLR recognizes different PAMP; lipoprotein for TLR1/6 and TLR2/6; nucleic acid components for TLR3, -7, -8, and -9; lipopolysaccharide (LPS) for TLR4. TLRs are also activated by the specific endogenous danger signal (called damage-associated molecular pattern, DAMPs) produced by damaged tissue, which is thought to cause various chronic inflammatory diseases. On the other hand, low molecular weight TLR ligands have been found from natural and synthetic compounds, those can be candidates for development of chemical probes and drugs. In this review, focusing on TLR4, we describe recent progress in exploring TLR4 ligands with agonistic or antagonistic activity and our recent study on the structure-activity relationship of pyrimido [5,4-b] indole derivatives.

Endotoxin and Innate Immunity 21 : 42~46, 2018

**Key words** : TLR4, アゴニスト, ピリミドインドール, 構造活性相関, 免疫

### はじめに

Toll 様受容体 (Toll-like receptor : TLR) はパターン認識レセプター (pattern recognition receptor : PRR) に分類される膜貫通型タンパク質で、樹状細胞などの免疫担当細胞の細胞表面またはエンドソームに局在する。TLRs はウイルスや細菌、菌類などの病原体に特徴的な分子パターン (pathogen-associated molecular patterns : PAMPs) を認識することで、自然免疫を活性化し獲得免疫を誘導することから、病原菌やウイルスなどの感染に対する宿主の防御機構において重要な役割を担う<sup>1,2)</sup>。TLR は、ヒトにおいては、これまでに TLR1 から TLR10 の 10 種類が、マウスにおいては、

TLR1 から TLR9, TLR11 から TLR13 の 12 種類が発見されており、それぞれが異なる PAMPs を特異的に認識する。すなわち、TLR1/2, TLR2/6, はリポ蛋白質類, TLR3, TLR7, TLR8, TLR9 は核酸成分, TLR4 はリポ多糖 (lipopolysaccharide : LPS) が天然のリガンドである。近年、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) が TLR の内在性リガンドとして、また特定の構造を有する天然化合物や合成化合物が TLR の低分子リガンドとして働くことが報告されている。DAMPs は、リュウマチなどのさまざまな炎症性自己免疫疾患に関与することが示唆されており<sup>3)</sup>、その分子機構の解明が注目されている。一方、特定の構造を有する天然

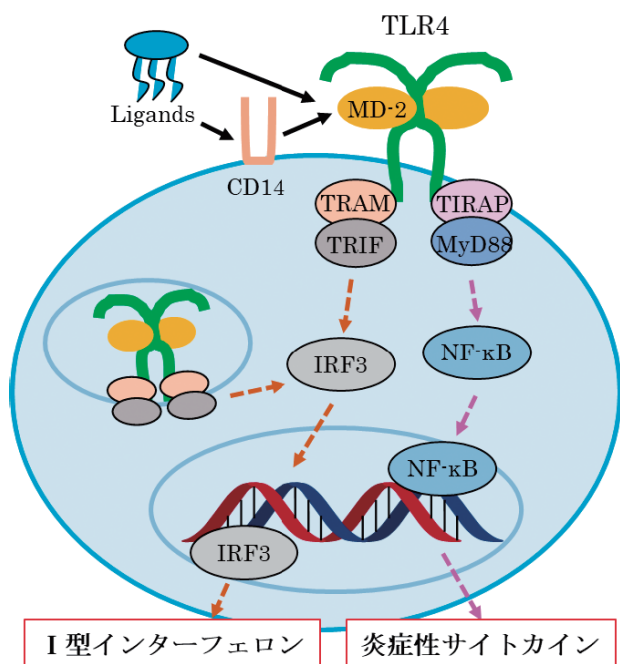


図 1 TLR4 のシグナル伝達

化合物や合成化合物などの低分子リガンドは、免疫制御分子として活用できることから、がんや感染症、自己免疫疾患などに対する薬剤開発において注目されている。本稿では、TLR4 リガンドに焦点をあて、最近の研究について紹介する。

### 1. TLR4 とシグナル伝達

TLR4 は、主として単球、マクロファージ、樹状細胞

などの免疫系細胞の細胞表層やエンドソームに発現しており、アクセサリタンパク質のミエロイド分化因子-2 (myeloid differentiation protein-2: MD-2) と複合体を形成している。LPS 中のリポド A 部分が MD-2 に認識されると、TLR4 のヘテロ (LPS/MD-2/TLR4) 二量体形成を誘導し、TLR4 のシグナルを活性化する<sup>4)</sup>。TLR4 のシグナルは、アダプタータンパク質である TIRAP-MyD88 を介して、または TRAM-TRIF を介して伝達され、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誘導する<sup>5)</sup> (図 1)。TLR4 の活性化は、炎症反応を引き起こす一方で、獲得免疫を誘導できることから、がんや感染症などの免疫療法においては、TLR4 の機能を制御できるリガンド開発が重要となっている。

### 2. TLR4 リガンド

#### 2-1. 天然由来の TLR4 リガンド

LPS は最初に発見された TLR4 リガンドである。LPS の活性中心がリポド A であることが明らかにされて以来<sup>6)</sup>、種々のグラム陰性菌からアゴニスト活性、アンタゴニスト活性を有するリポド A 成分が見出されている。アゴニスト活性とアンタゴニスト活性は、リポド A 成分のリン酸基などの極性官能基の有無やアシル鎖の数、鎖長、動物種によって異なる<sup>7)</sup>。糖脂質以外の TLR4 リガンドとしては、中国、インドの伝統的医学で用いられる漢方類、薬草類から TLR4 リガンドが見つかっている<sup>8)</sup>。図 2 に例を示す。ウコンに含まれるポリフェノール化合物である①クルクミンは、MyD88 経路

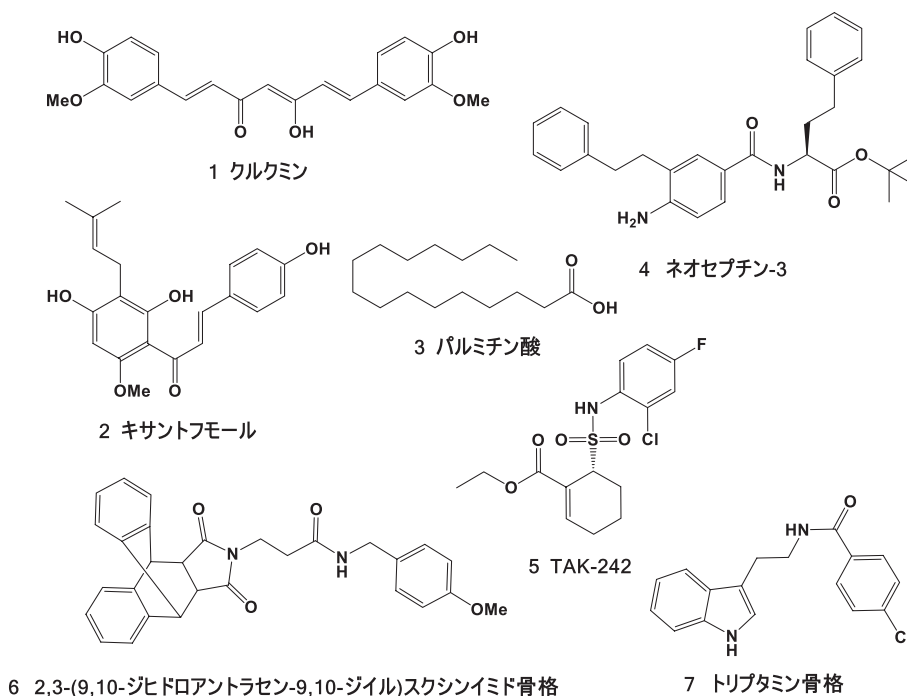


図 2 TLR4 リガンドの構造

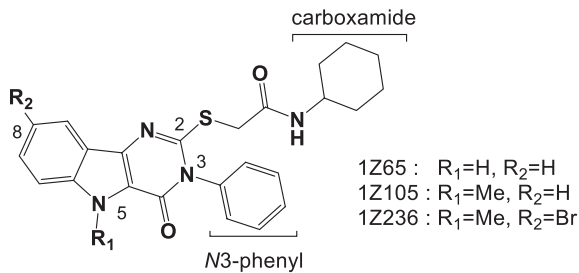


図 3 ピリミドインドール系 TLR4 リガンド

を阻害することで強力な抗炎症作用を示す<sup>9)</sup>。また、ビール原料のホップに含有されるフラボノイド化合物である②キサントフモールは抗炎症作用を示すことで知られている。最近の研究では、抗炎症作用が TLR4 のアンタゴニスト作用に起因することがわかった<sup>10)</sup>。一方、Liang らは、動植物由来の油脂に豊富に含まれるパルミチンの代謝物である③パルミチン酸が MD-2 に結合して TLR4 を慢性的に活性化するので、肥満心筋症に関与することを報告している<sup>11)</sup>。このように、近年数多くの TLR4 リガンドが発見されており、化合物の作用機序や疾患との関連性が明らかになりつつある。作用特異的な TLR4 リガンドの探索は、がんや感染症に対する免疫療法において重要であり、見出されているリガンドは創薬研究のリード化合物として、また TLR4 の作用を調べるための分子プローブとして期待される。

## 2-2. 化学合成された TLR4 リガンド

糖脂質系 TLR4 リガンドでは、リピド A の糖構造や脂質構造の改変によって、さまざまな誘導体や類縁体が合成されている。近年、化合物ライブラリーを用いた TLR4 リガンド探索も検討されており、Beutler らは、リピド A と全く構造の異なる低分子 TLR4 アゴニストとして④ネオセプチンを見出している<sup>12)</sup>。武田薬品工業株式会社により見出された TLR4 リガンドである⑤ TAK-242 は、糖脂質類とは作用機構が異なり、MD-2 には結合せず TLR4 の細胞内ドメインに作用する<sup>13)</sup>。また最近の計算化学の進展に伴い、*in silico* でのスクリーニングも検討されている。Prymula らは TLR4/MD-2 の X 線結晶構造解析のタンパク質構造を用いたバーチャルスクリーニングにより、2,3-(9,10-ジヒドロアントラセン-9,10-ジイル) スクシンイミド骨格をもつ化合物<sup>6</sup><sup>14)</sup>およびトリプタミン骨格をもつ化合物<sup>7</sup><sup>15)</sup>を見出している。これらの化合物はアゴニスト活性を有しており、化合物 6 は、ヒト TLR4 HEK Blue 細胞を用いた分泌型アルカリホスファターゼ (SEAP) アッセイで、子宮頸がんワクチンアジュバントとして臨床利用されている MPLA と類似したアゴニスト活性を示す。これらの合成された TLR4 リガンドにおいて

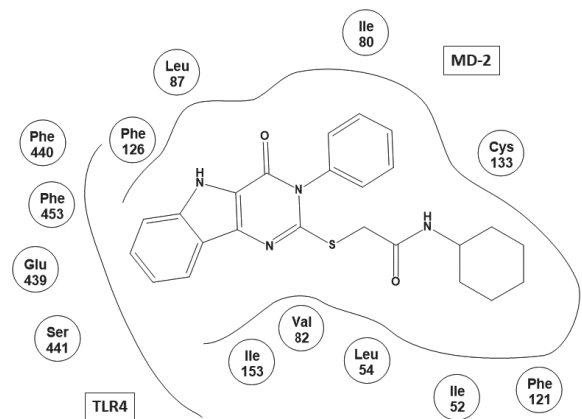


図 4 分子モデリング

も、天然由来のリガンドと同様、がんや感染症などの治療薬の開発や、作用機構を理解するためのプローブとしての活用が期待される。

## 3. ピリミドインドール系 TLR4 リガンド

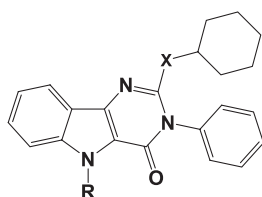
われわれのグループでは、ハイスループットスクリーニングにより、低分子 TLR4 リガンドとしてピリミドインドール骨格を有する 1Z65, 1Z105 を見出している<sup>16)</sup> (図 3)。これらのリガンドは、CD-14 欠損細胞でも活性を保っていたので、CD-14 非依存的に TLR4 に作用すると考えられている。これまでの構造活性相関研究において、1Z105 骨格のカルボキシアミド部位と N3 のフェニル基の疎水性が活性に重要であること、また、N5 のメチル基が細胞毒性の低減に寄与すると考えられている。また、分子モデリングではこれらのリガンドが MD-2 の疎水性ポケットに結合し、TLR4 と相互作用することが示唆された (図 4)。

TLR4 の活性化には MD-2 との結合が重要であることから、われわれは、アゴニスト活性の向上を目指し、1Z105 のさらなる構造活性相関解析を行った<sup>17)</sup>。本項では、① 2-チオアセトアミド部位の改変、② インドール部位の 8 位置換基の改変、の 2 つの構造改変について、誘導体の合成および生物活性評価について述べる。

### 3-1. 2-チオアセトアミドの構造改変と生物活性評価

合成した 2-チオアセトアミド誘導体の構造を図 5 に示す。まず、TLR4 活性化に対するチオアルキル鎖の影響を調べるため、硫黄原子を酸素または窒素原子に置換した誘導体 8, 9, 10 を合成した。またチオアセトアミド基の鎖長の影響を調べるため、アルキル鎖長の異なる誘導体 11, 12 を合成した。

合成した 2-チオアセトアミド誘導体をマウスまたはヒト TLR4 HEK Blue 細胞を用いた分泌型 SEAP アッセイならびにマウス骨髄由来樹状細胞 (mBMDC) を用



- 8: R=Me, X=-OCH<sub>2</sub>CONH-  
 9: R=Me, X=-NHCH<sub>2</sub>CONH-  
 10: R=Me, X=-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CONH-  
 11: R=H, X=-S(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CONH-  
 12: R=H, X=-S(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CONH-

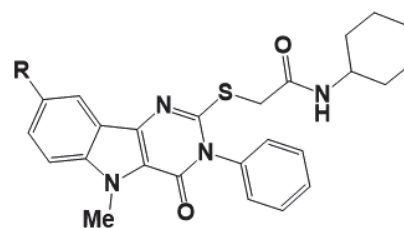
図 5 2-チオアセトアミド誘導体の構造

いたインターロイキン-6 (IL-6) の産生誘導能により評価した。その結果、合成したすべての誘導体において TLR4 の活性化が消失することがわかった。以上から、1Z105 の硫黄原子ならびにアルキル鎖は MD-2 との疎水性ポケットへの結合に重要であることを示した。

### 3-2. 8 位誘導体の合成と生物活性評価

合成した 8 位置換体を図 6 に示す。これらの置換体は、8 位のプロモ基をもつ 1Z236 を用いて、ボロン酸類との Suzuki-Miyaura カップリング、または末端アルキン類との Sonogashira カップリングにより調製した。エチニル基をもつアルキン体 17 については、アジド化合物との Huisgen 反応を行ってトリアゾール置換体 27, 28 へ誘導した。

合成した 8 位置換体の TLR4 アゴニスト活性は、先と同様に TLR4 HEK Blue 細胞または mBMDC を用いた IL-6 産生誘導能を指標に評価した。その結果、8 位に疎水性官能基を有する置換体 13, 16, 19, 25 において優位にアゴニスト活性が向上することがわかった (表 1, 2)。しかし、より高い疎水性官能基を有する置換体 4 については活性が消失した。一方、8 位に親水性官能基を有する置換体においては、アゴニスト活性が減少 (置換体 23, 26) または消失 (置換体 21, 24) することがわかった。これらの結果より、8 位への適度な大きさをもつ疎水基の導入は、TLR4/MD-2 複合体の



- 13: R=Ph  
 14: R=Bi-Ph  
 15: R=α-naphthyl  
 16: R=β-naphthyl  
 17: R=C≡CH  
 18: R=C≡CTMS  
 19: R=C≡C-cyclopropyl  
 20: R=C≡C-cyclohexyl  
 21: R=C≡C-CH<sub>2</sub>OH  
 22: R=C≡C-Ph  
 23: R=C≡C-2-methoxyphenyl  
 24: R=C≡C-4-methoxyphenyl  
 25: R=C≡C-3-thiophenyl  
 26: R=C≡C-2-pyridyl  
 27: R=1-phenyl-1-H-1,2,3-triazole  
 28: R=1-cyclohexyl-1-H-1,2,3-triazole

図 6 合成した 8 位置換体

形成に優位に働くと考えられる。一方、より高い疎水性官能基、水素結合能を有する官能基の導入は、TLR4/MD-2 複合体の形成に不利に働くと考えられる。

以上のように、われわれは、ピリミドインドール系 TLR4 リガンドのさらなる構造最適化を行い、これまでに見出されていた 1Z105 よりも高いアゴニスト活性を有するピリミドインドール系リガンド 13, 16, 19, 25 を見出した。アゴニスト活性をもつ化合物については今後アジュバント活性の評価が課題である。一方、TLR4 の活性制御においては、アンタゴニストの開発も重要なことから、アンタゴニストの探索も課題である。

### おわりに

TLR4 は炎症反応、自然免疫、獲得免疫の誘導に働く。近年、慢性的な TLR4 の活性化は、リュウマチなどの自己免疫疾患や、神経系疼痛に関与すると考えられている。TLR4 の生体機能は十分に解明されていないため、TLR4 リガンドは、その機能解析ツールとして活用できる。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 リガンドの創製は、

表 1 アリール置換体の生物活性評価

Compd	R	mTLR4 <sup>a</sup>		hTLR4 <sup>a</sup>		mBMDC	
		EC <sub>50</sub> <sup>b</sup> (μL)		IL-6 <sup>c</sup>		MTT <sup>d</sup>	
1Z105	H	3.17±0.65	8.26±1.76	100	106		
1Z236	Br	2.45±0.99	3.58±0.92	120	63		
13	Ph	0.82±0.03	0.43±0.08	123	93		
14	Bi-Ph	>10	>10	0	23		
15	α-naphthyl	2.58±0.07	2.12±0.59	80	102		
16	β-naphthyl	2.01±0.25	0.92±0.20	137	84		

<sup>a</sup>: TLR4 トランスフェクト HEK293 細胞 SEAP アッセイにて評価, <sup>b</sup>: 50%効果濃度 (μM), <sup>c</sup>: 化合物 5 μM で処理したときの IL-6 の産生量 化合物 1 の産生量 (6.4±1.0 ng/mL) 標準化, <sup>d</sup>: 5 μM の化合物で処理したときの mBMDC 細胞の細胞生存率

表 2 アルキン置換体, トリアゾール置換体の生物活性評価

Compd	R	mBMDC
		EC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup>
1Z236	Br	152
17	-C ≡ CH	N. D. <sup>b</sup>
18	-C ≡ CTMS	122
19	-C ≡ C-cyclopropyl	22
20	-C ≡ C-cyclohexyl	118
21	-C ≡ C-CH <sub>2</sub> OH	>1,000
22	-C ≡ C-phenyl	171
23	-C ≡ C-2-methoxyphenyl	435
24	-C ≡ C-4-methoxyphenyl	>1,000
25	-C ≡ C-3-thiophenyl	37
26	-C ≡ C-2-pyridyl	280
27	1-phenyl-1-H-1,2,3-triazole	>1,000
28	1-cyclohexyl-1-H-1,2,3-triazole	>1,000

<sup>a</sup>: 50%効果濃度 (nM), <sup>b</sup>: Not Determined

TLR4 を標的とした抗ウイルス療法や抗がん療法への応用, 自己免疫疾患などの治療薬開発につながると期待される。

## 謝 辞

本研究の一部は, 「[知]の集積と活用」による研究開発モデル事業」の支援を受けて行われました。

## 文 献

- 1) Akira S, Takeda K : Toll-like receptor signalling. *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) Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LA, Roelofs MF, et al. : Inhibition of Toll-like receptor 4 breaks the inflammatory loop in autoimmune destructive arthritis. *Arthritis Rheum* 56 : 2957-2967, 2007
- 4) 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
- 5) Kawasaki T, Kawai T : Toll-like receptor signaling pathways. *Front Immunol* 5 : 461, 2014
- 6) Westphal O, Lüderitz O : Chemische Erforschung von lipopolysacchariden gram-negativer Bakterien. *Angew Chem* 66 : 407-417, 1954
- 7) Steimle A, Autenrieth IB, Frick JS : Structure and

function : Lipid A modifications in commensals and pathogens. *Int J Med Microbiol* 306 : 290-301, 2016

- 8) Peri F, Calabrese V : Toll-like receptor 4 (TLR4) modulation by synthetic and natural compounds : an update. *J Med Chem* 57 : 3612-3622, 2014
- 9) Gradisar H, Keber M, Pristovsek P, et al. : MD-2 as the target of curcumin in the inhibition of response to LPS. *J Leukoc Biol* 82 : 968-974, 2007
- 10) Peluso MR, Miranda CL, Hobbs DJ, et al. : Xanthohumol and related prenylated flavonoids inhibit inflammatory cytokine production in LPS-activated THP-1 monocytes : Structure-activity relationships and in silico binding to myeloid differentiation protein-2 (MD-2). *Planta Med* 76 : 1536-1543, 2010
- 11) Wang Y, Qian Y, Fang Q, et al. : Saturated palmitic acid induces myocardial inflammatory injuries through direct binding to TLR4 accessory protein MD2. *Nat Commun* 8 : 13997, 2017
- 12) 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
- 13) Ii M, Matsunaga N, Hazeki K, et al. : A Novel Cyclohexene Derivative, Ethyl (6R)-6-[N-(2-Chloro-4-fluorophenyl) sulfamoyl] cyclohex-1-ene-1-carboxylate (TAK-242), Selectively Inhibits Toll-Like Receptor 4-Mediated Cytokine Production through Suppression of Intracellular Signaling. *Mol Pharmacol* 69 : 1288-1295, 2006
- 14) Honegr J, Malinak D, Dolezal R, et al. : Rational design of novel TLR4 ligands by in silico screening and their functional and structural characterization *in vitro*. *Eur J Med Chem* 146 : 38-46, 2018
- 15) Honegr J, Dolezal R, Malinak D, et al. : Rational Design of a New Class of Toll-Like Receptor 4 (TLR4) Tryptamine Related Agonists by Means of the Structure- and Ligand-Based Virtual Screening for Vaccine Adjuvant Discovery. *Molecules* 23 : 102, 2018
- 16) 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
- 17) 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. *J Med Chem* 60 : 9142-9161, 2017