

## シクロオキシゲナーゼ-1 (COX-1) 阻害剤の開発意義とその創出

深井良祐, 鄭 曉霞, 本島和典, 加来田博貴\*

## Significance and Creation of Novel Cyclooxygenase-1 (COX-1) Selective Inhibitors

Ryosuke FUKAI, Xiaoxia ZHENG, Kazunori MOTOSHIMA, and Hiroki KAKUTA\*  
Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University,  
1-1-1 Tsushima-Naka, Kita-ku, Okayama 700-8530, Japan

(Received August 5, 2010)

Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are widely used to relieve physical and mental pain, and to improve patients' quality of life. However, stomach irritation is a major side effect. Most NSAIDs inhibit cyclooxygenases (COXs), and inhibition of COX-1 on the stomach mucous membrane is thought to be responsible for the gastric disturbance. Consequently, development efforts have focused on COX-2-selective inhibitors, while COX-1-selective inhibitors have been rather neglected. Subsequently, however, it was shown that inhibition of either COX-1 or COX-2 alone does not induce gastric damage. Therefore, we have developed the COX-1-selective inhibitor *N*-(4-aminophenyl)-4-trifluoromethylbenzamide (TFAP), which shows analgesic activity without causing gastric damage. However, metabolism of TFAP generates a colored metabolite, resulting in red-purple coloration of urine after administration. In addition, the analgesic activity of TFAP is weaker than that of indomethacin. Thus, we designed a series of new COX-1-selective inhibitors, the 5-amino-2-ethoxy-*N*-(substituted) benzamide (ABEX) series, in order to avoid formation of the colored metabolite by modifying the diaminopyridine skeleton. As a result of structural modification and *in vitro* and *in vivo* testing of compounds in the ABEX series, we found a novel COX-1-selective inhibitor, 5-amino-2-ethoxy-*N*-(3-trifluoromethylphenyl) benzamide (ABEX-3TF), which shows better analgesic activity than indomethacin, and does not cause coloration of urine.

**Key words**—cyclooxygenase-1 (COX-1); analgesic activity; colored urine; gastric damage

## 1. はじめに

シクロオキシゲナーゼ (COX)<sup>1-3)</sup> が分子標的として知られる非ステロイド性抗炎症剤 (NSAIDs) は、がん疼痛やリウマチなどを含む様々な痛みに対して広く利用されている。しかし、既存の NSAIDs は副作用として胃腸障害を生じ、<sup>4,5)</sup> 最悪の場合、消化管出血により死に至ることもある。NSAIDs 潰瘍の原因は、胃粘膜保護にプロスタグランジンが重要であること、また COX-1 が胃粘膜上に恒常的に発現していることから、COX-1 阻害のみによると考えられてきた。<sup>6,7)</sup> そのため、COX-1 阻害剤の研究は極めて滞った状態にあった。一方、炎症時誘導的に発現する COX-2 の存在が報告されたこともあ

り、<sup>8)</sup> セレコキシブ<sup>9)</sup> やロフェコキシブ<sup>10)</sup> などの COX-2 阻害剤が精力的に開発された。しかしながら、いくつかの COX-2 阻害剤により心筋梗塞などの循環器系疾患に起因した死亡例が頻発し、<sup>11)</sup> 現在は COX-2 阻害剤に対する関心も低下している。興味深いことに、COX-1, COX-2 両方を阻害すると胃腸障害が生じるものの、COX-1, COX-2 のいずれか一方を阻害する場合には胃腸障害を生じないことが報告された。<sup>12)</sup> 加えて、NSAIDs にみられる鎮痛作用は COX-2 阻害よりもむしろ COX-1 阻害に依存すること、<sup>13)</sup> また COX-1 阻害により血小板凝集抑制作用が報告された。<sup>14)</sup> これらの背景により、われわれは COX-1 阻害剤が胃腸障害のない鎮痛剤として魅力的に感じた。

既知の COX-1 阻害剤としては mofezolac,<sup>15,16)</sup> FR122047,<sup>17-19)</sup> SC-560 が知られる。<sup>20)</sup> SC-560 は体内動態が悪いためか鎮痛作用は弱い、<sup>21)</sup> mofezolac, FR122047 はいずれも強力な鎮痛作用が報告されて

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 (〒700-8530 岡山市北区津島中 1 丁目 1 番 1 号)

\*e-mail: kakuta@pharm.okayama-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 130 年会シンポジウム GS04 で発表したものを中心に記述したものである。

いる.<sup>15-19)</sup>しかし、これらの COX-1 阻害薬は分子構造が類似していることから、COX-1 以外の分子標的により鎮痛効果が生じている可能性が考えられた。そこでわれわれは、これらと分子構造が異なる COX-1 阻害薬により鎮痛効果が確認されれば COX-1 阻害による鎮痛効果を示唆できると考え、既存の COX-1 阻害薬と分子構造が異なる *s*-トランス型を有する COX-1 阻害薬 TFAP を創出した。<sup>22)</sup> TFAP は胃腸障害を回避し、マウス、ラットいずれの場合でも鎮痛作用を示し、COX-1 阻害による鎮痛効果が明らかとなった。しかしながら、TFAP は COX 非選択的阻害薬である indomethacin よりも *in vitro*, *in vivo* での作用が弱いこと、また TFAP を大量投与した際に顕著な尿の着色が課題となった。そこで、われわれは TFAP における尿の着色の原因を調べるため、TFAP を投与したマウスの尿を採取し、UV スペクトル及び LC-MS による解析を行った。その結果、TFAP による尿の着色の原因として、代謝によって TFAP のアミド結合が切断され、これによって生じるジアミノピリジンが赤色であることに起因することを確認している。<sup>23)</sup> そこでわれわれは、高活性かつ尿の着色を回避した新たな COX-1 阻害薬の創出を目指し、本研究を行ったところ、胃腸障害及び尿の着色を回避し、indomethacin 以上の鎮痛作用を示す 5-amino-2-ethoxy-*N*-(3-trifluoromethylphenyl) benzamide (ABEX-3TF) の創出に至った。本総説では本化合物の発見経緯、並びに COX-1 阻害薬の開発意義について紹介する。

## 2. 新規 COX-1 阻害薬の分子設計<sup>24)</sup>

TFAP は既存の COX-1 阻害薬と異なる *s*-トランス型の分子構造を有する。また、TFAP は多くの NSAIDs に共通する酸性化合物ではなく、アミノ基を持つ塩基性化合物である点も特徴的である。

COX-1 阻害活性の強い parsalimide が TFAP と同様にアミノ基を有することから、これらをリード化合物として、TFAP による尿の着色の原因として考えられたジアミノピリジン構造を回避した *N*-フェニル-アミノサリチル酸アミドを基本構造とする ABEX シリーズをデザイン、合成した (Fig. 1)。本分子構造はアミノ基の位置、アルコキシ基、及び *N*-フェニル基上の置換基を変化させることで、多種多様な誘導体創出が可能である点で優位性が高い。

## 3. 新規 COX-1 阻害薬の *in vitro* 試験

合成した化合物の COX 阻害活性は、市販のキットを用いて評価した。TFAP, parsalimide のアミノ基はアミド結合に対してそれぞれ 4 位、5 位に位置することから、まず ABEX シリーズのアミノ基の位置、及びアルコキシ基について各種アルキル化を施し COX 阻害活性を調べた。その結果、アミノ基はアミド結合に対して 5 位に、アルコキシ基はエトキシ基が良好な COX 阻害活性を与えた (data not shown)。そこで、アミノ基を 5 位に、アルコキシ基はエトキシ基に固定し、さらなる合成、活性評価を行うことにした。*N*-フェニル基上 4 位の置換基を変換して COX 阻害活性を評価したものの、置換基変換によって大幅な活性上昇が見込めないことが分かった (Table 1)。

TFAP がトリフルオロメチル基を有すること、また mofezolac, FR122047, SC-560 など既存の COX-1 阻害薬や indomethacin がクロロ基やメトキシ基を有することから、これらの置換基を *N*-フェニル基上の 3 位及び 2 位に導入した化合物について COX 阻害活性を調べた (Table 2)。いずれの置換基の場合においても、4 位よりも 3 位に、3 位よりも 2 位に置換基を有する化合物において COX-1 阻害活性が強くなる傾向がみられ、中でも ABEX-2OMe が

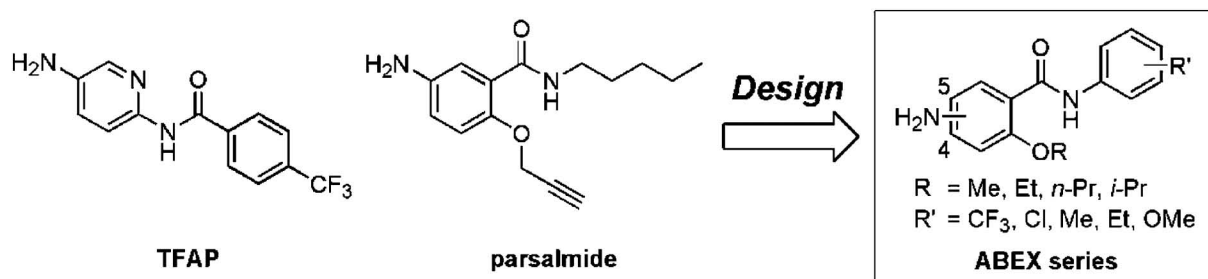


Fig. 1. Chemical Structures of TFAP and Parsalimide, and Molecular Design Strategy of New COX-1 Inhibitors

COX-1 に対して  $0.11 \mu\text{M}$  の  $\text{IC}_{50}$  を与えた.

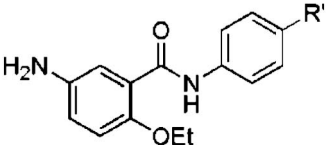
#### 4. 新規 COX-1 阻害薬における *in vivo* 試験

Table 2 に示す *N*-フェニル基上の 3 位と 2 位にトリフルオロメチル基, クロロ基, メトキシ基を有する化合物に高活性な COX-1 阻害活性を見出したことから, これらの化合物について, 酢酸ライジング試験による鎮痛作用を調べた (Fig. 2). いずれの

化合物とも  $30 \text{ mg/kg}$  の単回投与において鎮痛作用がみられる傾向にあり, 中でも COX-1 阻害活性が indomethacin に匹敵する ABEX-2OMe に indomethacin と同等の鎮痛作用がみられた. 興味深いことに, COX-1 阻害活性が indomethacin に比べて 10 倍程度弱い ABEX-3TF に indomethacin を超える鎮痛作用が認められた.

ABEX-3TF は, TFAP で問題となった尿の着色を認めなかった. また, ラットを用いた胃腸障害の

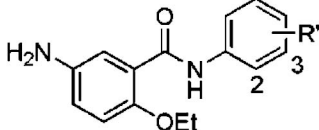
Table 1. Substituent Effects at the Para Position of *N*-phenyl Rings on COX-inhibitory Activities



Compound	R'	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	
		COX-1	COX-2
indomethacin		$0.089 \pm 0.028$	$4.3 \pm 1.6$
TFAP		$3.2 \pm 0.9$	$235 \pm 25$
parsalmide		$3.1 \pm 0.6$	$117 \pm 9$
ABEX-4CF <sub>3</sub>	CF <sub>3</sub>	$1.6 \pm 0.2$	$>100$
ABEX-4Cl	Cl	$1.8 \pm 0.4$	$>100$
ABEX-H	H	$0.80 \pm 0.26$	$>100$
ABEX-4Me	Me	$1.0 \pm 0.1$	$>100$
ABEX-4Et	Et	$1.1 \pm 0.1$	$>100$
ABEX-4 <i>i</i> Pr	<i>i</i> -Pr	$2.3 \pm 0.3$	$>100$
ABEX-4OH	OH	$2.7 \pm 0.1$	$>100$
ABEX-4OMe	OMe	$2.1 \pm 0.8$	$>100$

Data shown are the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n=3$ ).

Table 2. Substituent Effects at Meta or Ortho Position of *N*-phenyl Rings on COX-inhibitory Activities



Compound	R'	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	
		COX-1	COX-2
indomethacin		$0.089 \pm 0.028$	$4.3 \pm 1.6$
TFAP		$3.2 \pm 0.9$	$235 \pm 25$
parsalmide		$3.1 \pm 0.6$	$117 \pm 9$
ABEX-3TF	3-CF <sub>3</sub>	$1.0 \pm 0.0$	$>100$
ABEX-2TF	2-CF <sub>3</sub>	$0.46 \pm 0.03$	$>100$
ABEX-3Cl	3-Cl	$0.19 \pm 0.05$	$>100$
ABEX-2Cl	2-Cl	$0.15 \pm 0.05$	$>100$
ABEX-3OMe	3-OMe	$1.3 \pm 0.2$	$>100$
ABEX-2OMe	2-OMe	$0.11 \pm 0.02$	$>100$

Data shown are the mean  $\pm$  S.E.M. ( $n=3$ ).

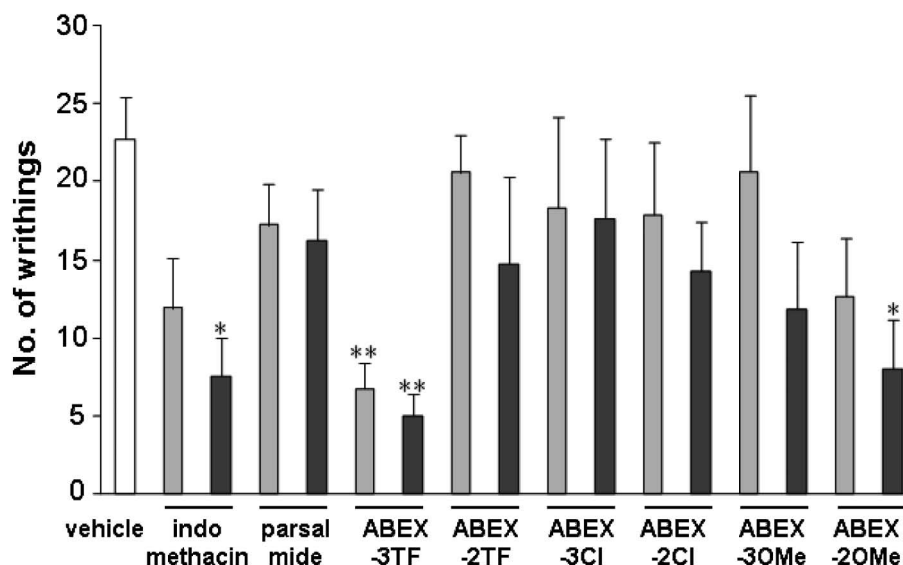


Fig. 2. Analgesic Effect on Acetic Acid-induced Writhing Test in Mice

Gray and black bars indicate number of writhes at 10 and 30 mg/kg, respectively. Each compound was orally administered. Data shown are the average of the total number of writhes  $\pm$  S.E.M. ( $n=8/\text{group}$ ). The following indicates significantly different from the vehicle: (\*)  $p < 0.05$ ; (\*\*)  $p < 0.01$ .

実験においても、10 mg/kg の indomethacin を経口投与したラットが激しい胃腸障害を生じる一方、ABEX-3TF は 100 mg/kg の経口投与でも胃腸障害を起こさないことが確認された。これらの結果より、ABEX-3TF は indomethacin 以上の鎮痛作用を示しつつ、胃腸障害及び尿の着色を回避し得ることが分かった。本化合物は、安価な原料から高収率で得られることも含めて、新規鎮痛薬候補物質として魅力的であると思われる。

## 5. まとめ

これまで、COX-1 阻害は NSAIDs による胃腸障害の原因として考えられていたため、「悪者」とされてきた。しかしながら、COX-1 阻害作用を示しながら胃腸障害なく強い鎮痛作用を示す ABEX-3TF の創出に成功したことは、COX-1 阻害が悪ではなく、むしろ胃腸障害なく鎮痛活性を示す魅力的な創薬ターゲットであることを改めて示したものと考えている。低用量アスピリンの血小板凝集抑制作用は COX-1 を標的としていること、また COX-1 阻害に基づく血管新生阻害作用による抗がん活性が報告されていることから、<sup>25-27)</sup> COX-1 阻害薬は鎮痛剤のみならず新規血小板凝集抑制剤や新規抗がん剤としても期待できる。本研究成果も踏まえると、COX-1 は創薬ターゲットとして魅力的と言えよう。

**謝辞** 本研究を行うにあたり、胃腸障害試験にご協力頂いた県立広島大学の田井章博博士、矢間太博士並びに同研究室の方々に深く感謝致します。

## REFERENCES

- Herschman H. R., *Biochem. Biophys. Acta*, **1299**, 125-140 (1996).
- Fu J. Y., Masferrer J. L., Seibert K., Raz A., Needleman P., *J. Biol. Chem.*, **265**, 16737-16740 (1990).
- Chandrasekharan N. V., Dai H., Roos K. L. T., Evanson N. K., Tomsik J., Elton T. S., Simmons D. L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 13926-13931 (2002).
- Davis N. M., Wallace J. L., *J. Gastroenterol.*, **32**, 127-133 (1997).
- Richy F., Bruyere O., Ethgen O., Rabenda V., Bouvenot G., Audran M., Herrero-Beaumont G., Moore A., Eliakim R., Haim M., Reginster J. Y., *Ann. Rheum. Dis.*, **66**, 759-766 (2004).
- Warner T. D., Giuliano F., Vojnovic I., Bucasa A., Mitchell J. A., Vane J. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 7563-7568 (1999).
- Vane J. R., Bakhle Y. S., Botting R. M., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **38**, 97-120 (1998).
- Fu J. Y., Masferrer J. L., Seibert K., Raz A., Needleman P., *J. Biol. Chem.*, **265**, 16737-16740 (1990).
- Penning T. D., Talley J. J., Bertenshaw S. R., Carter J. S., Collins P. W., Docter S., Granelto M. J., Lee L. F., Malecha J. W., Miyashiro J. M., Rogers R. S., Rogier D. J., Yu S. S., Anderson G. D., Burton E. G., Cogburn J. N., Gregory S. A., Koboldt C. M., Perkins W. E., Seibert K., Veenhuizen A. W., Zhang Y. Y., Isakson P. C., *J. Med. Chem.*, **97**, 1347-1365 (1997).
- Prasit P., Wang Z., Brideau C., Chan C. C., Charleson S., Cromlish W., Ethier D., Evans J. F., Ford-Hutchinson A. W., Gauthier J. Y., Gordon R., Guay J., Gresser M., Kargman S., Kennedy B., Leblanc Y., Léger S., Mancini J., O'Neill G. P., Ouellet M., Percival M. D., Perrier H., Riendeau D., Rodger I., Zamboni R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 1773-1778 (1999).
- Mukherjee D., Nissen S. E., Topol E. J., *JAMA*, **286**, 954-959 (2001).
- Wallace J. L., McKnight W., Reuter B. K., Vergnolle N., *Gastroenterology*, **119**, 706-714 (2000).
- Ballou L. R., Botting R. M., Goorha S., Zhang J., Vane J. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10272-10276 (2000).
- Webster J., Douglas A. S., *Blood Rev.*, **1**, 9-20 (1987).
- Goto K., Ochi H., Yasunaga Y., Matsuyuki H., Imayoshi T., Kusuhara H., Okumoto T., *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, **56**, 245-254 (1998).
- Yamawaki I., Ogawa K., *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 3142-3146 (1988).
- Ochi T., Motoyama Y., Goto T., *Eur. J. Pharmacol.*, **391**, 49-54 (2000).
- Dohi M., Sakata Y., Seki J., Namikawa Y., Fujisaki J., Tanaka A., Takasugi H., Motoyama Y., Yoshida K., *Eur. J. Pharmacol.*, **243**,

- 179–184 (1993).
- 19) Tanaka A., Sakai H., Motoyama Y., Ishikawa T., Takasugi H., *J. Med. Chem.*, **37**, 1189–1199 (1994).
- 20) Smith C. J., Zhang Y., Koboldt C. M., Muhammad J., Zweifel B. S., Shaffer A., Talley J. J., Masferrer J. L., Seibert K., Isakson P. C., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13313–13318 (1998).
- 21) Saito O., Aoe T., Yamamoto T., *J. Anesth.*, **19**, 218–224 (2005).
- 22) Kakuta H., Zheng X., Oda H., Harada S., Sugimoto Y., Sasaki K., Tai A., *J. Med. Chem.*, **51**, 2400–2411 (2008).
- 23) Kakuta H., Fukai R., Zheng X., Ohsawa F., Bamba T., Hirata K., Tai A., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20**, 1840–1843 (2010).
- 24) Fukai R., Zheng X., Motoshima K., Tai A., Yazama F., Kakuta H., *ChemMedChem*. (in press)
- 25) Kitamura T., Kawamori T., Uchiya N., Itoh M., Noda T., Matsuura M., Sugimura T., Wakabayashi K., *Carcinogenesis*, **23**, 1463–1466 (2002).
- 26) Daikoku T., Wang D., Tranguch S., Morrow J. D., Orsulic S., DuBois R. N., Dey S. K., *Cancer Res.*, **65**, 3735–3744 (2005).
- 27) Sano H., Noguchi T., Miyajima A., Hashimoto Y., Miyachi H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 3068–3072 (2006).