

氏名（本籍）	はやし よしき 林 良樹（長野県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博第285号
学位授与の日付	平成30年3月14日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	2-ピリジル構造を有するジケトピペラジン型チューブリン重合阻害剤の創製研究
論文審査委員	（主査） 教授 林 良雄 教授 三浦 剛 教授 野水 基義

## 論文内容の要旨

微小管は $\alpha\beta$ -チューブリンのヘテロダイマーを基本単位として構成される管状の細胞内小器官であり、細胞骨格を構成し細胞の形態維持や細胞内輸送、有糸分裂における紡錘体の形成などに関わっている。特に細胞分裂における紡錘体の形成と、紡錘体による染色体の分裂は細胞分裂における最も重要な過程の一つであることから、微小管は抗がん剤の有力な標的の一つとして広く知られている。

申請者の所属する研究室では、1997年に *Aspergillus ustus* より単離された、チューブリン重合阻害作用を有する天然のジケトピペラジン (DKP) 型化合物 (-)-phenylahistin (1) の構造を元に強力なチューブリン重合阻害剤 plinabulin (2) の創製に至っている。

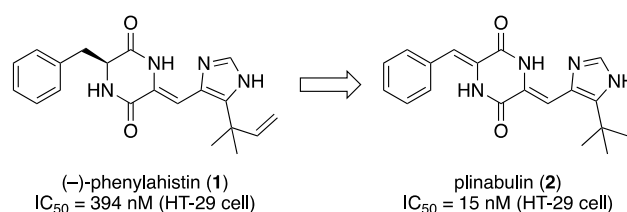


Figure 1. structure of (-)-phenylahistin (1) and plinabulin (2)

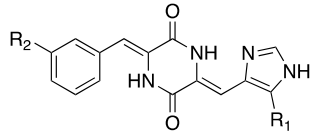
本化合物は高い殺細胞活性 (IC<sub>50</sub> = 15 nM, HT-29 cell) を示し、抗がん剤候補化合物として臨床試験 (phase III) が進められているほか、そのシンプルな構造を基盤としてさらなる誘導体合成が精力的に展開されている。しかしながら、単純な構造であるがために構造的な誘導の余地は多くはなく、これまでの誘導体合成はほとんどがフェニル基側における修飾であった。そこで、本博士論文研究においては、修飾例の非常に少ないイミダゾール環部位に着目した誘導体合成を行うことで、ジケトピペラジン型チューブリン重合阻害剤の研究における新たな方向性の提案を行い、新たな臨床候補化合物の創製につなげるべく研究に着手した。

## 1. 2-ピリジル型ジケトピペラジン誘導体 KPU-300 の創製

Plinabulin とその誘導体において、*tert*-ブチル基をメチル基へと変換した誘導体 **3** は活性が大きく減弱したため、*tert*-ブチルイミダゾール構造は殺細胞活性の発現に必須であると考えられ、種々の誘導体合成においても堅持されてきた。一方で、フェニル基側では精力的な構造活性相関研究が展開され、ベンゾイル基を導入した KPU-105 (**4**) が plinabulin より強い活性を示す誘導体として発見された。申請者は、活性が向上したベンゾフェノン型 DKP 誘導体 KPU-105 の構造を基盤とすれば、イミダゾール環部位を変換しても十分な活性が維持できると考え、ベンゾフェノン型 DKP 誘導体の合成に着手した。Plinabulin における修飾と同様に、KPU-105 のイミダゾール環 *tert*-ブチル基をメチル基へと変換した誘導体 **5** は plinabulin と同等程度の活性を維持することを発見し (Table 1)、ベンゾフェノン型 DKP 誘導体においてはイミダゾール環部位を修飾できる可能性を見出した。

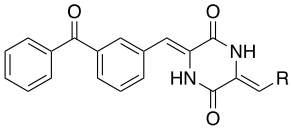
この知見に基づき、イミダゾールに代わる構造の探索を行い、合成した誘導体の HT-29 細胞に対する殺細胞活性と、アミド水素の <sup>1</sup>H NMR スペクトルに低磁場シフトが見られるか否か、すなわち水素結合を形成しているか否かを Table 2 に示

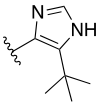








Table 1. Cytotoxic activities of methyl derivatives



compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	IC <sub>50</sub> (nM, HT-29 cell)
plinabulin ( <b>2</b> )	tBu	H	15
Me deriv. ( <b>3</b> )	Me	H	331
KPU-105 ( <b>4</b> )	tBu	Bz	1.4
BP-Me Deriv. ( <b>5</b> )	Me	Bz	15

Table 2. cytotoxic activities of aromatic derivatives



compounds	R	IC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup>	H-bond <sup>b</sup>	compounds	R	IC <sub>50</sub> (nM) <sup>a</sup>	H-bond <sup>b</sup>
plinabulin ( <b>2</b> )	NA <sup>c</sup>	14.9 ± 3.8	+	KPU-105 ( <b>4</b> )		1.4 ± 0.4	+
<b>6</b>		94.3 <sup>d</sup>	-	<b>10</b>		75.3 ± 8.1	+
KPU-300 ( <b>7</b> )		7.0 ± 1.1	+	<b>11</b>		147 <sup>d</sup>	+
<b>8</b>		>1000	-	<b>12</b>		>1000	-
<b>9</b>		>1000	-	<b>13</b>		>1000	+

<sup>a</sup>Values are mean ± SD of at least three independent experiments. <sup>b</sup>H-bond: "+" indicates the hydrogen bonding was detected by <sup>1</sup>H NMR. <sup>c</sup>NA: Not Applicable. <sup>d</sup>Values are average from two independent experiments.

した。3種のピリジル誘導体 **7, 8, 9** を比較すると、2-ピリジル型 DKP 誘導体 KPU-300 (**7**) のみ高い活性を示した。活性を示さないピリジル誘導体 **8, 9** は水素結合を持たないのに対し、KPU-300 は DKP 環とピリジン環の間に水素結合を有しており、これにより生じる平面構造が KPU-300 の

特異的な高活性の発現に寄与していると考察している。同じ傾向は五員環誘導体でも見られ、水素結合を有するフリル体 **11** に弱いながら活性が見られた。一方、興味深いことに、無置換のイミダゾール誘導体 **13** では水素結合を有するにもかかわらず活性を示さないことから、イミダゾール環上のアルキル鎖はイミダゾール型 DKP 誘導体において非常に重要な構造であることを確認する結果となった。KPU-300 はピリジン環上に置換基を持たずとも plinabulin を超える活性を示したことから、DKP 型チューブリン重合阻害剤の環構造としてはピリジン環構造が適していることが示唆された。DKP 型チューブリン重合阻害剤において、ヘテロ五員環構造から脱却した初の誘導体である KPU-300 は、さらなる誘導体合成の基盤となりうる化合物であると期待され、さらなる評価を行うこととした。

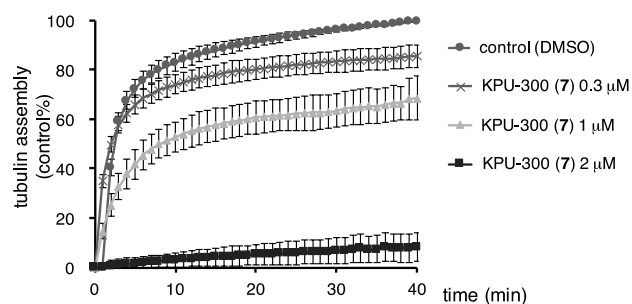
## 2. 新規誘導体 KPU-300 の生物活性の検討

新たに創製した有力な 2-ピリジル型 DKP 誘導体 KPU-300 (**7**) について、*in vitro* における精製チューブリンに対する重合阻害能、及びチューブリンに対する親和性を評価した結果、**Table 3** に示すようにリード化合物である plinabulin (**2**) よりやや高いチューブリン重合阻害活性と、同等の  $K_d$  値を示すことが明らかとなった。また、**Figure 2** に示すように、KPU-300 によるチューブリン重合阻害は濃度依存的な作用を示すことも確認した。さらに、抗 $\alpha$ -チューブリン抗体を用いた HeLa 細胞の免疫染色から、KPU-300 は細胞分裂時に形成される紡錘体の形成を抑制し、細胞分裂の停止を引き起こすことを確認した。紡錘体の機能不全により細胞分裂が正常に進行できない細胞はアポトーシスへと導かれるが、これはチューブリン重合阻害剤の抗がん剤としての作用機序の一つとなっている。

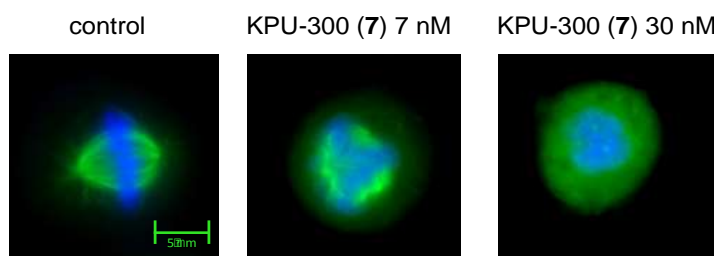
**Table 3.** activities of KPU-300 (**7**) for tubulin

compounds	Inhibition of tubulin polymerization $IC_{50}$ ( $\mu$ M) <sup>a</sup>	tubulin binding dissociation cons: $K_d$ ( $\mu$ M) <sup>a</sup>
plinabulin ( <b>2</b> )	$1.8 \pm 0.3$	$1.0 \pm 0.5$
KPU-300 ( <b>7</b> )	$1.2 \pm 0.1$	$1.3 \pm 0.3$

<sup>a</sup>Values are mean  $\pm$  SD of at least three independent experiments.



**Figure 2.** inhibition of tubulin polymerization



**Figure 3.** Immunostaining of M phase HeLa cell.

### 3. KPU-300 水溶性プロドラッグの創製

抗がん剤候補化合物として魅力的な活性を示した KPU-300 (7) であるが、臨床応用を目指す上では、その水溶性の低さが課題となる。この難水溶性は DKP 誘導体に共通の課題であり、既に plinabulin の水溶性プロドラッグ化研究が進められている。このプロドラッグ化は、Figure 4 に示すように DKP 環をモノラクチムへと変換して修飾点を形成しているため、KPU-300 への応用も可能であると考え、KPU-300 水溶性プロドラッグの合成に着手した。水溶性補助基の構造として、大幅な水溶性向上が期待できるカルボン酸塩構造を二つ有するアスパラギン酸型ユニットを選択し、プロドラッグ 15 の創製に成功した。本プロドラッグは期待通り、KPU-300 (溶解度: < 0.1  $\mu\text{g/mL}$ ) よりも 80 万倍以上の高い水溶性 (溶解度: 80  $\text{mg/mL}$ ) を示し、Figure 5 に示すようにエステラーゼによって加水分解され、半減期 8.7 時間で KPU-300 を再生することを確認した。

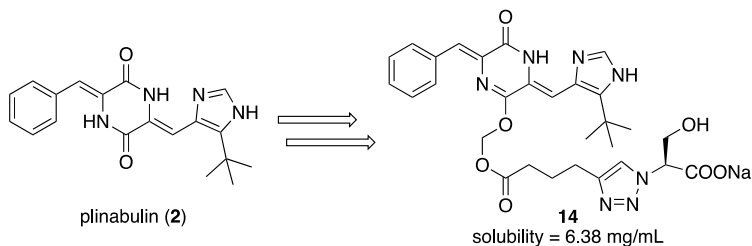


Figure 4. Serine type plinabulin prodrug

り、既に plinabulin の水溶性プロドラッグ化研究が進められている。このプロドラッグ化は、Figure 4 に示すように DKP 環をモノラクチムへと変換して修飾点を形成しているため、KPU-300 への応用も可能であると考え、KPU-300 水溶性プロドラッグの合成に着手した。水溶性補助基の構造として、大幅な水溶性向上が期待できるカルボン酸塩構造を二つ有するアスパラギン酸型ユニットを選択し、プロドラッグ 15 の創製に成功した。本プロドラッグは期待通り、KPU-300 (溶解度: < 0.1  $\mu\text{g/mL}$ ) よりも 80 万倍以上の高い水溶性 (溶解度: 80  $\text{mg/mL}$ ) を示し、Figure 5 に示すようにエステラーゼによって加水分解され、半減期 8.7 時間で KPU-300 を再生することを確認した。

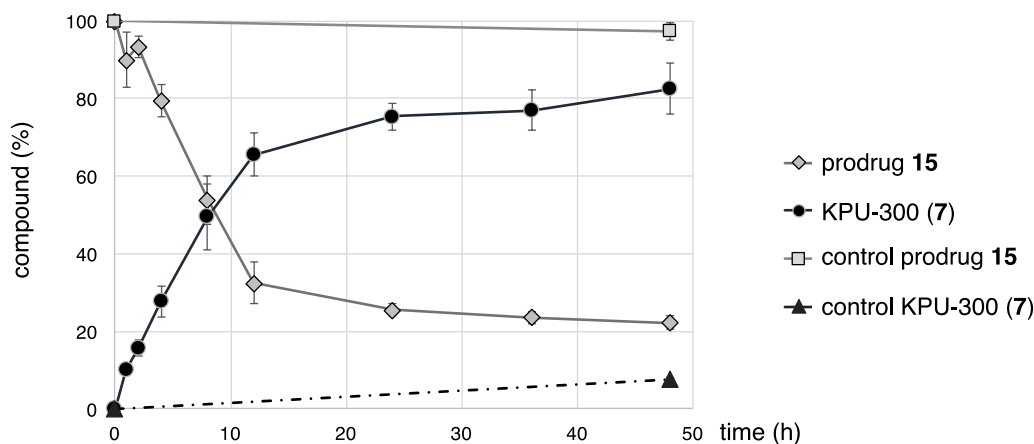
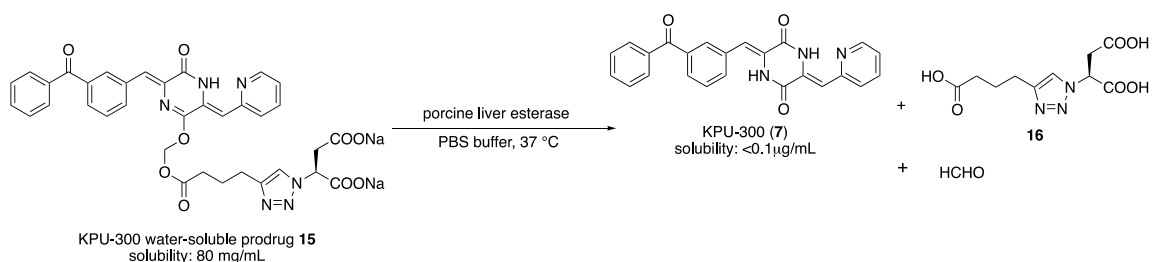


Figure 5. Hydrolysis of KPU-300 water-soluble prodrug 15 by esterase.

#### 【研究成果の掲載誌】

1. Y. Hayashi, H. Takeno, T. Chinen, K. Muguruma, K. Okuyama, A. Taguchi, K. Takayama, F. Yakushiji, M. Miura, T. Usui, Y. Hayashi. *ACS Med. Chem. Lett.*, **5**, 1094-1098 (2014).

## 論文審査の結果の要旨

林良樹氏の博士学位申請論文は、天然環状ジペプチド(-)-フェニラヒスチン及びその誘導体プリナブリンを緒とするジケトピペラジン型チューブリン重合阻害剤の創製研究である。具体的にはプリナブリンの構造活性相関研究に基づく高活性誘導体の獲得とその臨床応用を志向した水溶性プロドラッグの創製である。

チューブリンのヘテロ二量体を構成単位とする微小管は、癌化学療法における重要な分子標的である。既に、タキサンやビンカアルカロイドなどが臨床で用いられているが、新たな微小管作用薬の開発も求められている。最近、微小管を標的とするジケトピペラジン型チューブリン重合阻害剤プリナブリンも新たな抗がん剤として有望視されており、注射剤として第 III 相臨床試験が進められている。林氏は、新規なジケトピペラジン型阻害剤の創製をめざし、プリナブリンの構造活性相関研究を展開した。殊にベンゾフェノン型誘導体でのヘテロ環部位に着目した誘導体合成により、2-ピリジル構造を有する新規阻害剤 KPU-300 及びその水溶性プロドラッグの創製を達成した。本化合物は、プリナブリンと同様に今後の臨床応用が期待される。氏の博士学位申請論文は、これらの研究成果を 3 章に亘ってまとめたものである。

第一章では、プリナブリンのベンゾフェノン型誘導体を基に、ヘテロ環部位の構造活性相関研究を展開した。従来、ジケトピペラジン型阻害剤ではヘテロ環部位に相当する分岐アルキル鎖を含むイミダゾール環構造が活性発現に必須と考えられてきた。一方、氏はフェニル基 3 位ベンゾイル化体（ベンゾフェノン誘導体）が、プリナブリンのより 10 倍以上も殺細胞活性を向上させたことに着目した。そして、その要因としてチューブリンに対するベンゾフェノン部での新たな相互作用の存在を提案した。さらに氏は、この仮説を礎にベンゾフェノン誘導体では分子反対側に存在するヘテロ環部位の誘導が可能であると考察し、イミダゾール環を種々の芳香環へと変換したベンゾフェノン型誘導体を合成し、それらの構造活性相関研究を実施した。その結果、分岐アルキル鎖を含むイミダゾール環構造は活性に必須であると言う既成の概念を打破し、プリナブリンよりも強い殺細胞活性を有する 2-ピリジル型誘導体 KPU-300 の創製に成功した。本誘導体は、活性発現に必須であった分岐アルキル鎖を欠いても強力な殺細胞活性を示す初めての誘導体例であり、従来型の誘導体から一線を画す新たな抗がん剤候補化合物としての化学構造の提案に至った。

第二章では、第一章で得られた新規誘導体 KPU-300 の詳細な *in vitro* 評価を展開した。その結果、複数の癌細胞株に対しても強力な殺細胞活性を示すことを明らかにした。また、精製チューブリンを用いたチューブリン重合阻害試験から、KPU-300 が濃度依存的にチューブリンの自己重合を抑制することを確認した。さらに、HeLa 細胞の免疫染色により、KPU-300 は紡錘体の形成を阻害して有糸分裂を強力に抑制することを確認し、その作用機序がチューブリン重合阻害であることを示唆した。

第三章では、KPU-300 の臨床応用における大きな障害の一つである難水溶性を改善するべく、上記プリナブリンにおけるプロドラッグ化法を応用することで KPU-300 のエステルゼ型プロドラッグを創製した。本プロドラッグの水に対する溶解度は KPU-300 の 80 万倍以上と大幅に改善され、注射剤として十分な溶解性の確保に至った。また、エステルゼによる加水分解によ

って KPU-300 を定量的に再生することを確認した。したがって、本プロドラッグ体の創製は KPU-300 の医薬品適用への道を開く有益な成果であると考ええる。

以上、林氏の博士学位申請論文研究によって得られた成果は、常に新たな薬剤が求められる癌化学療法分野において、有用な医薬候補化合物の供給に繋がるものである。また、本研究にておいて見いだされた KPU-300 は、その強力な活性に比べ化学構造が非常に単純であることから、さらなる誘導のためのリード化合物としても期待される。すなわち、臨床薬学の基盤形成に有意義な成果と貢献をもたらす研究と言える。したがって、本論文は博士（薬学）学位申請論文として相応しい内容を有すると判断する。