

氏名（本籍）	ふじもと じゅん 藤本 潤（福岡県）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	論博第 370 号
学位授与の日付	令和 2 年 7 月 15 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文題目	生体内成分の代謝機構に関連する 3 種の酵素に対する低分子阻害剤 の創薬化学研究
論文審査委員	（主査）教授 松本 隆司 教授 林 良雄 教授 高木 教夫 教授 三浦 剛

論文内容の要旨

本論文は、生体内成分である多価不飽和脂肪酸（polyunsaturated fatty acid: PUFA）、糖、アミノ酸の各々の代謝機構に関連する 3 種の酵素に対する低分子阻害剤の創製について述べたものである。生体内の代謝機構を制御する創薬研究は、これまでは糖尿病、高血圧症といった生活習慣病領域が主な対象であったが、本研究では十分に知られてこなかった創薬標的を検証し、アンメット・メディカル・ニーズの高い疾患の治療薬への適用を試みた。そして、それぞれの阻害剤創製の過程で、今後の創薬化学研究に広く演繹可能な種々の新知見を得た。本論文では、それらの成果を詳述し、生体内代謝機構の制御を指向した生物学研究、ならびに低分子阻害剤創出を目指した創薬化学研究の発展に寄与することを目的とする。

第一章では、 Δ -5 デサチュラーゼ（D5D）阻害剤のリード創出・最適化研究について述べた。D5D は、肝臓内での PUFA 合成経路においてジホモ- γ -リノレン酸（DGLA）をアラキドン酸（AA）に変換する酵素である。D5D 阻害剤は、DGLA の蓄積量の増加および AA の生合成量の減少をもたらし、抗炎症作用をもつことが期待される。これまでの D5D 阻害剤の報告はごく僅かであるなか、筆者は、抗炎症作用をメカニズムとするファースト・イン・クラスの動脈硬化進展抑制剤を目指して研究を開始した。まず、ハイスループットスクリーニング（HTS）により、いくつかのヒット化合物を得た。しかし、いずれも比較的単純な構造をした化合物であったため、そこからの研究展開は新規性確保の点で問題があると考えられた。そこで、それらの構造上の類似性に着目してファーマコフォアモデルを作成し、それに合致する新たな化学骨格を探索した。その結果、良好な D5D 阻害活性をもつ 3,5-ジフェニル-1,3-オキサゾリジン-2-オン誘導体 **5h** を見出すことに成功した。化合物 **5h** は肝ミクロソームにおける代謝安定性が優れなかったため、最適化段階ではその改善に重点をおいた。まず、代謝物解析により、化合物 **5h** の主代謝部位がメトキシ基およびオキサゾリジン-2-オン環の 4 位であるとの情報を得た。実際、メトキシ基を酸化的代謝されにくい置

換基に変更すると一定の効果が得られ、さらに、4 位をメチル基で立体的にブロックすると安定性が格段に向上することが明らかになり、化合物 **(4*S*,5*S*)-5i** を見出すに至った。また、3-シアノフェニル基を 3,5-ジシアノフェニル基に変更した化合物 **(4*S*,5*S*)-5n** が、強力な D5D 阻害活性ならびに持続的な血漿中薬物濃度を示し、C57BL/6J マウスへの単回投与 (3 mg/kg, *p.o.*) において 74% の *in vivo* D5D 阻害指数を示すことを見出した。この値は、*in vivo* において D5D が最大限阻害されたものと解釈できる。加えて、動脈硬化モデル apoE ノックアウトマウスへの 2 週間連続投与 (1 mg/kg, *p.o.*) 試験でも、最大レベルの *in vivo* D5D 阻害指数 (68%) を示すことも明らかとなった。さらに、この化合物を実験用バルクスケール (数 g) で供給するための不斉合成経路も確立できた。以上、*in vitro*、*in vivo* において優れた D5D 阻害活性を示し、経口投与可能な化合物 **(4*S*,5*S*)-5n** の創製に成功した。この化合物は、D5D 阻害剤開発におけるツールとしてだけでなく、抗炎症という新規作用メカニズムをもつファースト・イン・クラスの動脈硬化治療薬として、前臨床試験段階へと進むのに十分な質を備えたものである (Figure 1)。

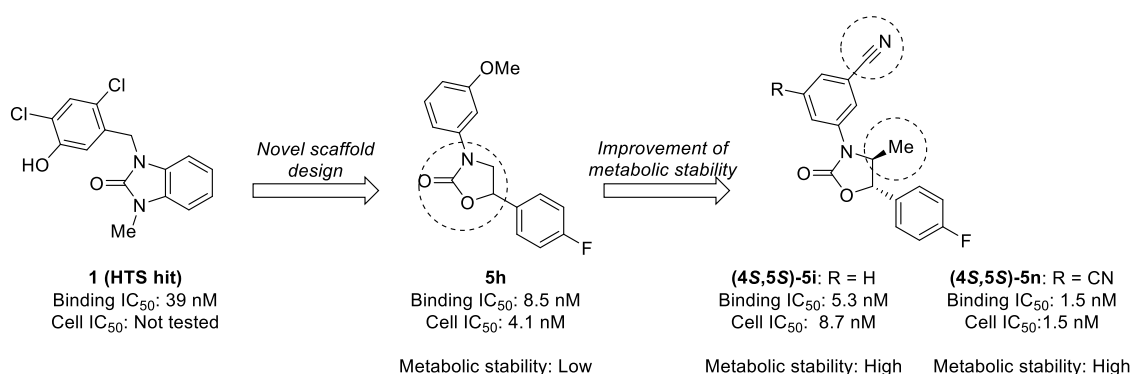


Figure 1. Medicinal chemistry efforts on D5D inhibitor (Chapter 1).

第二章では、サイクリン依存性キナーゼ 8 (CDK8) 阻害剤の創薬化学研究を論じた。CDK8 は、がん細胞の増殖促進に様々な点で関与することが知られている。特に最近では、がん細胞の糖代謝への寄与も明らかになっており、製薬企業からの注目度も高くなっている。筆者は、ファースト・イン・クラスの抗がん剤への適用を目指して、CDK8 阻害剤の研究に着手した。はじめに、HTS によってピリジルアクリルアミド誘導体 **45** を見出した。この化合物は、小規模キナーゼパネル試験で良好な選択性を示すものの、CDK8 阻害活性 ($IC_{50} = 80$ nM) の向上が必要であったため、CDK8 とのドッキングモデルを活用し、構造に基づく薬剤設計 (Structure-Based Drug Design : SBDD) を検討した。まず、化合物 **45** の 4-フルオロフェニル基を様々なヘテロ環へ置き換えることにより、CDK8 のバックポケット近傍の Phe97、Lys52、Glu66 との相互作用を獲得することを目指した。その結果、ピラゾール誘導体 **46f** および **46k** が、10 倍以上強い CDK8 阻害活性を示すことが明らかになった ($IC_{50} = 6.5$ nM for **46f**, 6.4 nM for **46k**)。しかし、これらの化合物は時間依存的な CYP3A4 阻害作用 (CYP3A4 TDI) をもつことが、新たな課題として浮上した (CYP3A4 TDI of **46k**: 54% of compound remaining at 60 min, 30 μ M)。そこで、第一章と同様にここでも代謝物情報を活用するべく、化合物 **46f** のマウスによる代謝物を解析したところ、末端のモルホリン環が主代謝

部位であることが分かった。このことから、問題の CYP3A4 TDI がモルホリン環の酸化的代謝に起因するのではないかという仮説を立て、この部位の構造を変換することを検討した。その結果、ひずみの大きな環構造の導入が CYP3A4 TDI の回避に決定的な効果を示すことが明らかになり、強力な CDK8 阻害活性 ($IC_{50}=2.5$ nM) を示し、かつ CYP3A4 TDI がほぼ消失 (CYP3A4 TDI: 99% compound remaining at 60 min, 30 μ M) したアゼチジン誘導体 **48k** を見出すに至った。この化合物は、良好な水溶性、経口吸収性および非常に高いキナーゼ選択性を有し、さらに複数の腫瘍細胞株において CDK8 シグナル下流に位置する STAT1 のリン酸化阻害作用を示した。また、骨髄腫 RPMI8226 株異種移植マウスに対する 1 日 2 回 (30 mg/kg)、2 週間の経口投与において、深刻な体重減少を誘発することなく、完全な腫瘍増殖抑制作用を示した (T/C: -2%)。これらの結果は、CDK8 の阻害が、がん治療の新規なアプローチとなりうることを強く期待させるものである。化合物 **48k** は、前臨床試験化合物に選定され、安全性試験等のさらなる精査が実施される予定である (Figure 2)。

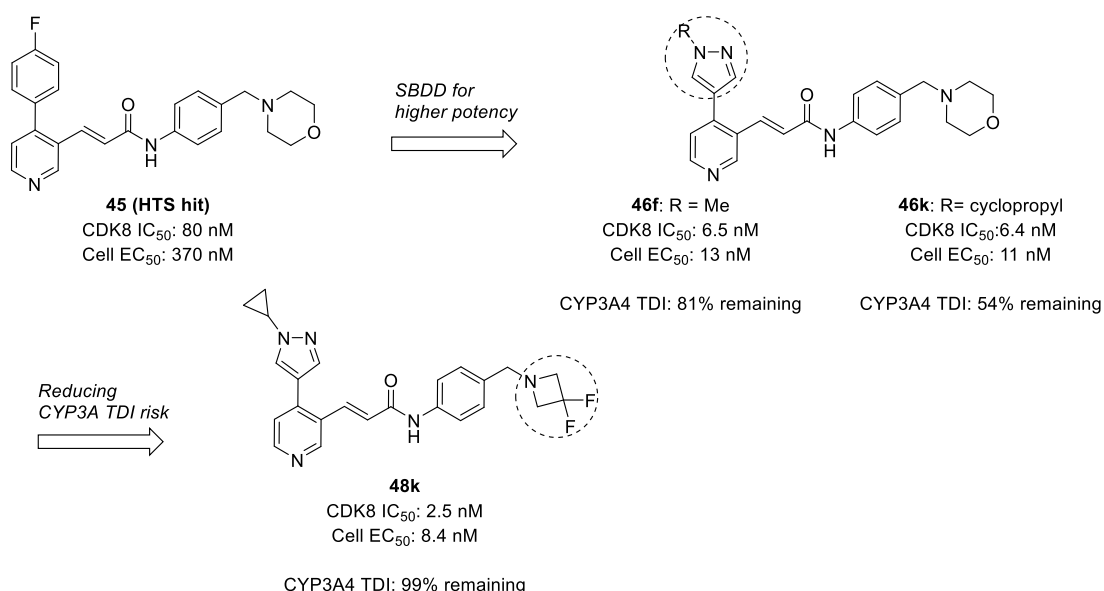


Figure 2. Medicinal chemistry efforts on CDK8 inhibitor (Chapter 2).

第三章では、ジェネラル・コントロール・ノンデプレッシブル 2 (GCN2) 阻害剤のリード創出について述べた。GCN2 は、がん微小環境におけるアミノ酸代謝を制御するキナーゼであり、アミノ酸欠乏の状態にあるがんの生存、増殖に重要な因子とされる。これまでに GCN2 高選択的な阻害剤の報告はなされていないことから、ファースト・イン・クラスの抗がん薬の創出を目的として研究を行った。まず、HTS によるヒット同定を試みたが、キナーゼ選択性に難のある化合物ばかりであり、そこからの展開は断念せざるを得なかった。そこで、GCN2 阻害活性をもつ化合物を文献で調査したところ、B-Raf 阻害剤として論文発表されていた化合物 **91** が、GCN2 の α C-helix 近傍のアロステリックポケットを利用して結合する type I 1/2 型の GCN2 リガンドであると

推定するに至った。そこで、この化合物を起点として、高いキナーゼ選択性を有する化合物群への展開を試みることにした。はじめに、化合物 **91** と GCN2 ホモロジーモデルとのドッキングモデルを構築し、 α C-helix 近傍との相互作用部位を構造変換した誘導体を合成・評価した。その結果、*ortho*, *meta*-二置換芳香環をもつ化合物群（化合物 **93e** 他）において、大幅な活性向上と高いキナーゼ選択性を達成した。その後、GCN2 との X 線共結晶構造解析により、化合物 **93d** および **93e** が、GCN2 に対して type I 1/2 型で結合することが確認され、分子デザインの妥当性が証明された。化合物 **93d** は、アスパラギナーゼ抵抗性急性リンパ性白血病（ALL）株 CCRF-CEM に対し、アスパラギナーゼ処理下において高い細胞増殖抑制作用を示した。さらに化合物 **93d** および **93e** は、CCRF-CEM 異種移植マウスへの経口投与試験（**93d**: 3 mg/kg, **93e**: 10 mg/kg）において、アスパラギナーゼ併用下で、GCN2 関連シグナル因子の活性化をほぼ完全に抑制した。また、興味深いことに、化合物 **93d** は GCN2 からの解離が遅い特徴を有しており、それが強い *in vivo* 作用に繋がっている可能性が示唆された。以上、GCN2 阻害剤が、がん治療のためのファースト・イン・クラスのアプローチとなり得ること、さらに化合物 **93d** および **93e** は有望なリード化合物であることを実証した。今後、さらなる最適化研究により前臨床研究に資する化合物の創出が期待される (Figure 3)。

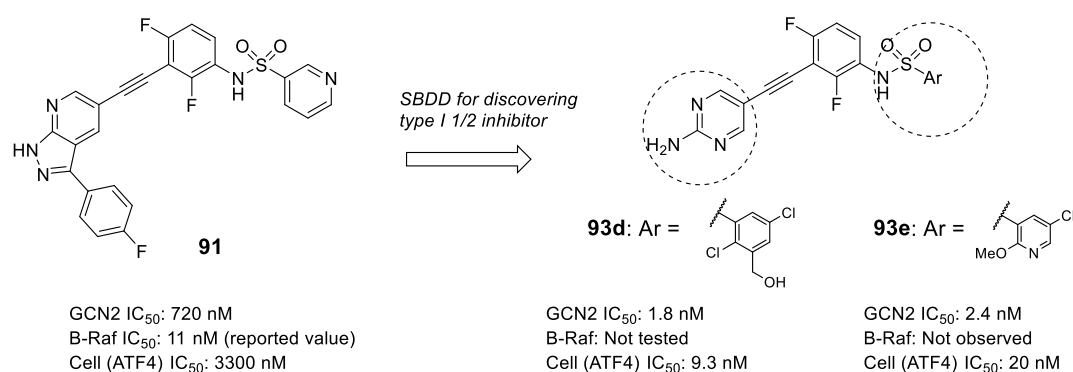


Figure 3. Medicinal chemistry efforts on GCN2 inhibitor (Chapter 3).

以上のとおり、本論文では、生体内代謝機構の制御に関する 3 種の酵素について、アンメット・メディカル・ニーズの高い動脈硬化およびがんへのファースト・イン・クラスの薬剤標的となる可能性を示した。さらに、いずれについても質の高い阻害剤の創出に成功した。また、リード創出・最適化段階において創薬化学研究者がしばしば直面する課題と、それを克服するための方策についても述べた。具体的には、1) 標的タンパクもしくは類似タンパクの 3 次元構造情報が得られる場合は、SBDD により、標的酵素への活性および類縁酵素に対する選択性を高次元まで極める薬剤設計が可能であること (CDK8、GCN2 阻害剤での例)、2) 標的タンパクの立体情報が無く、SBDD が適用できないケースであっても、複数のリガンド構造を起点にしたファーマコフォアモデル作成を経て、新規骨格の創出と活性向上が達成できること (D5D 阻害剤での例)、3) 代謝物

解析情報を活用することにより代謝部位のブロックや変換等の、代謝安定性の向上につながる薬剤設計が図れること（D5D 阻害剤、CDK8 阻害剤での例）、4) 代謝物解析情報は CYP3A4 TDI 回避のための薬剤設計にも応用可能であること（CDK8 阻害剤での例）、等である。

本研究で得られた知見は、生体内代謝機構の制御に基づく新たな創薬研究の発展に資するだけでなく、酵素及びその他のターゲットクラスを標的とした創薬化学研究に横断的に応用可能であり、研究者個人の経験のみに依存することのない、体系的なリード創出・最適化研究手法の確立にも寄与するものと考ええる。

【研究結果の掲載誌】

1. *J. Med. Chem.*, **60**, 8963–8981 (2017).
2. *Bioorg. Med. Chem.*, **25**, 3018–3033 (2017).
3. *ACS Med. Chem. Lett.*, **10**, 1498–1503 (2019).

論文審査の結果の要旨

本論文は、生体内成分である多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid: PUFA)、糖、アミノ酸の各々の代謝機構に関連する 3 種の酵素に対する低分子阻害剤の創製について述べたものである。

第一章では、 Δ -5-デサチュラーゼ (D5D) 阻害剤のリード創出・最適化研究について述べている。D5D は肝臓内での PUFA 合成経路においてジホモ- γ -リノレン酸 (DGLA) をアラキドン酸 (AA) に変換する酵素である。その阻害剤は、DGLA 蓄積量の増加および AA 合成量の減少をもたらす、抗炎症作用をもつことが期待される。著者は、ハイスループットスクリーニング (HTS) および *in silico* でのファーマコフォアモデル作成、代謝物解析を活用した論理的分子設計に基づく代謝安定性の改善等を経て、強力な D5D 阻害活性を示す化合物を見出した。本化合物は動脈硬化モデル apoE ノックアウトマウスへの 2 週間連続投与 (1 mg/kg, *p.o.*) において *in vivo* D5D 阻害指数 68% を示し、D5D 阻害剤開発におけるツールとしてだけでなく、抗炎症という新規作用メカニズムをもつ抗動脈硬化治療薬として前臨床試験段階へと進むのに十分な質を備えている。さらに、本化合物を実験用バルクスケールで供給するための不斉合成経路を開発することにも成功した。

第二章では、サイクリン依存性キナーゼ CDK8 阻害剤の創薬化学研究について述べている。CDK8 は、がん細胞の糖代謝に関与することが最近明らかになり注目されている。著者は HTS で見出した化合物を出発点とし、CDK8 とのドッキングモデルを活用した Structure-Based Drug Design、さらには、代謝物解析に基づく画期的な分子設計によって時間依存的 CYP3A 阻害作用 (CYP3A TDI) を克服し、強力な CDK8 阻害活性 ($IC_{50} = 2.5$ nM) を示す化合物を見出した。本化合物は CDK8 に対してきわめて高い選択性を有し、さらに複数の腫瘍細胞株において CDK8 シグナル下流に位置する STAT1 のリン酸化阻害作用を示した。また骨髄腫 RPMI8226 株異種移植マウスに対する 1 日 2 回 (30 mg/kg)、2 週間の経口投与において、深刻な体重減少を誘発することなく、完全な腫瘍増殖抑制作用を示した。これらの結果は、CDK8 阻害ががん治療の新規なアプローチとなりうることを強く期待させるものである。

第三章では、ジェネラル・コントロール・ノンデプレッシブル 2 (GCN2) 阻害剤のリード創出について述べている。GCN2 は、がん微小環境におけるアミノ酸代謝を制御するキナーゼであり、アミノ酸欠乏の状態にあるがんの生存・増殖に重要な因子である。著者は、ほとんど例のない type I 1/2 型と呼ばれる形式で α C-helix 近傍のアロステリックポケットに結合する分子を設計することによって、CDK8 に対する高い阻害活性と高選択性を備えたはじめての化合物を見出した。これら化合物はアスパラギナーゼ抵抗性急性リンパ性白血病株 CCRF-CEM に対し、アスパラギナーゼ処理下において高い細胞増殖抑制作用を示し、また、CCRF-CEM 異種移植マウスへの経口投与試験において、アスパラギナーゼ併用下で GCN2 関連シグナル因子の活性化をほぼ完全に抑制した。これらの結果は、GCN2 阻害剤が、がん治療のための新たなアプローチとなり得ること、さらに、これら化合物が有望なリード化合物となることを示している。

以上のとおり本研究では、生体内代謝機構の制御に関する 3 種の酵素、D5D, CDK8, GCN2 に

ついて、動脈硬化およびがん治療のための新たな薬剤標的となる可能性が示され、さらに、そのいずれについても質の高い阻害剤の創出に成功している。これらの成果は、関連領域における創薬研究に多くの新知見をもたらすものであり、また、薬学への学術的貢献も多大である。よって、本論文は博士（薬学）の学位を授与するに十分値するものと判断する。