

# 学位論文内容要旨

氏名：浅場 絢ヌネツ

題目：「抗乾癬作用を有する新規 MALT1 阻害薬の創製研究」

要旨：

## 1. 背景・目的

粘膜関連リンパ組織リンパ腫転座 1 (MALT1, mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation 1) は、NF- $\kappa$ B シグナル伝達の活性化と、このシグナル伝達に必要な負のフィードバックループに関与することで、T 細胞を含むリンパ球の活性化に重要な役割を果たしている<sup>1,2</sup>。MALT1 は、Bcl10 および CARD11 と結合して Bcl10-CARD-MALT1 (CBM) 複合体を形成する足場タンパク質としての機能と、RelB、CYLD11、A20 などのタンパク質基質を分解するシステインプロテアーゼとしての機能を有する<sup>3-5</sup>。MALT1 タンパク質のこれらの機能によって NF- $\kappa$ B が活性化する。

乾癬は、真皮血管の拡張と免疫細胞の浸潤による鱗屑と紅斑を伴う表皮の肥厚を特徴とする慢性の自己炎症性皮膚疾患である。多くの場合、関節症性乾癬などの合併症を伴うため社会的・心理的負担が非常に大きい<sup>6,7</sup>。現在の主な治療薬である免疫抑制剤や生物学的製剤は、望ましくない副作用や高い製造コストなどの課題を抱えており、代替となる治療薬のニーズが高まっている<sup>8</sup>。近年、乾癬患者で見つかった CARD14 変異のいくつかは、NF- $\kappa$ B 活性化を促進すると報告された<sup>9</sup>。また、MALT1 プロテアーゼ活性を阻害することで、ヒト初代ケラチノサイトにおいて高活性 CARD14 変異体の過剰発現によって誘導されるサイトカインおよびケモカインの発現を減少させることが報告されている<sup>10</sup>。そのため、MALT1 を介した NF- $\kappa$ B 機能の調節は、乾癬の治療標的として有望である。

以上のことから、乾癬の治療標的として MALT1 タンパク質の機能阻害が有効と考えられる。本研究では、経口投与が可能であり、*in vivo* における乾癬症状への有効性を示す、MALT1 タンパク質に対する新規低分子阻害剤の創出を目的とし、その合成、設計および薬理作用について述べる。

## 2. 本論

### 2.1 起点化合物の同定

自社ライブラリや市販化合物ライブラリから選定・構築した *in silico* スクリーニングライブラリに対して、アロステリック阻害剤チオリダジンと MALT1 タンパク質の複合体の結晶構造 (PDB ID: 4I1R)<sup>11</sup> を用いて、MALT1 タンパク質への結合親和性をシミュレーションした。上位にランクされた化合物を選抜し、酵素生化学的アッセイを実施した結果、非常に弱いながらも MALT1 プロテアーゼ活性に対して阻害作用を示すヒット化合物 **1** を取得した (図 1)。

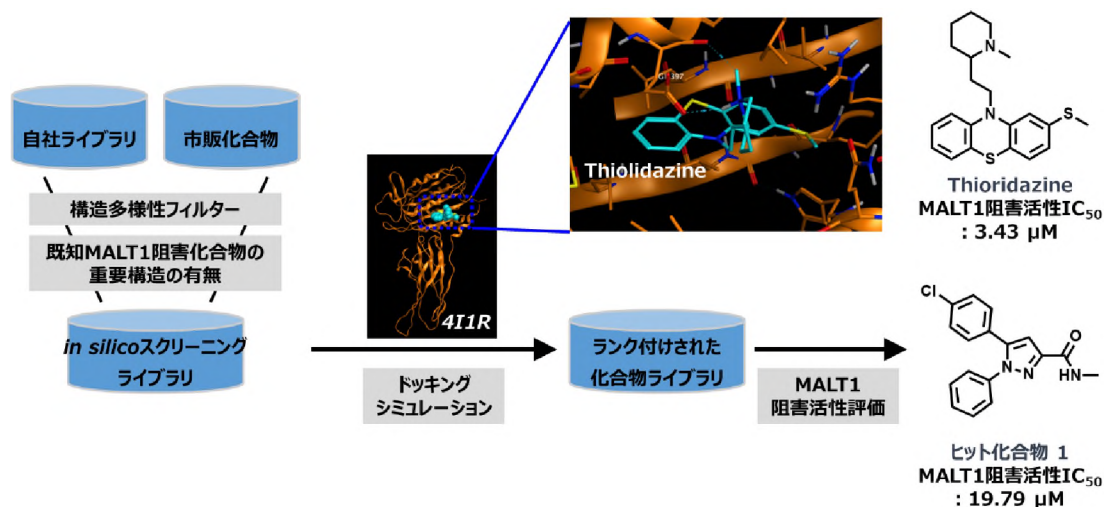


図 1 スクリーニングライブラリに対するドッキングシミュレーションに基づくヒット化合物周辺誘導体の探索

ヒット化合物 **1** の推定結合様式では、1,5-ジフェニルピラゾール部が結合ポケット内部の疎水性ポケットに位置し、*N*-メチルアミド窒素が 397 番グルタミン酸残基 (以下、Glu397 と称する) と水素結合相互作用を有していることが示された。我々は、構造活性相関情報の取得ならびに MALT1 阻害活性向上を目的として、前述の推定結合様式に基づき、MALT1 阻害活性に強く影響を与えると考えられる 3 つの部位 (①1 位フェニル部位、②5 位フェニル部位、③アミド部位) を探索することとした (図 2)。

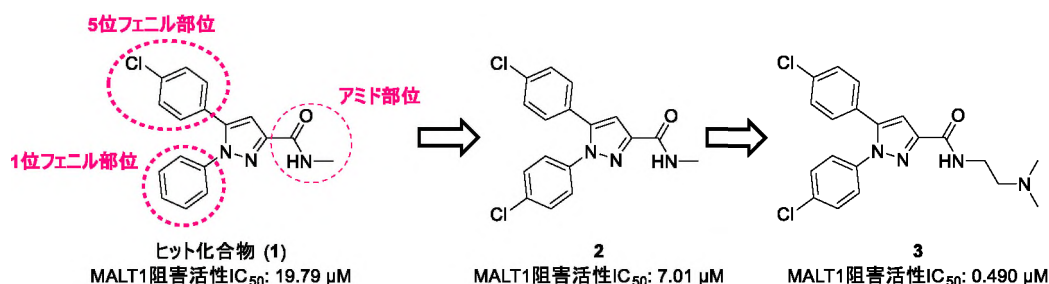


図 2 3 つの探索部位と化合物 **3** 取得の経緯

構造活性相関研究の結果、ピラゾール 1 位や 5 位には 4-クロロフェニル基が望ましいことが分かった。ピラゾール 1 位の置換フェニル基が *o*-クロロ基または *m*-クロロ基であると、MALT1 阻害活性が減弱した。ピラゾール 5 位置換基でも同様の傾向であった。ピラゾール 5 位置換基をヘテロアリアル基やその他の多くのパラ置換フェニル基に変換しても、MALT1 阻害活性が減弱した。1 位フェニル部位と 5 位フェニル部位は、MALT1 阻害活性に必須な構造要件であることが示された。アミド部位の変換では、第三級アミドよりも第二級アミドの MALT1 阻害活性が良好であり、末端官能基はヒドロキシ基やアルキル基、フェニル基、アミド基などより *N,N*-ジメチルアミノ基のような塩基性窒素原子を含む置換基の方が強い MALT1 阻害活性を示す傾向にあった。本探索の中では、*N,N*-ジメチルアミノエチル基を有する化合物 **3** が最も強力な MALT1 阻害活性を示した (MALT1 阻害活性 IC<sub>50</sub> : 0.490 μM)。

化合物 **3** は、MALT1 プロテアーゼ切断基質である CYLD の分解を抑制し、細胞評価系において NF-κB 活性や IL-2 産生に対して阻害作用を示した。また、化合物 **3** は MALT1 パラカスパーゼと構造的に関連する caspase-3、-8、-9 に対して阻害作用を示さず、カスパーゼ選択性を有することを明らかにした (図 3)。MALT1 プロテアーゼ活性に対する酵素反応速度評価によって、MALT1 阻害活性 IC<sub>50</sub> 付近の濃度 (0.5 μM) では、V<sub>max</sub> を減少させた一方で K<sub>m</sub> は変化しなかった。そのため、化合物 **3** は非競合的阻害剤であることが示された。すなわち、化合物 **3** は、チオリダジンと同様にアロステリックポケットに結合する可能性が示唆された。

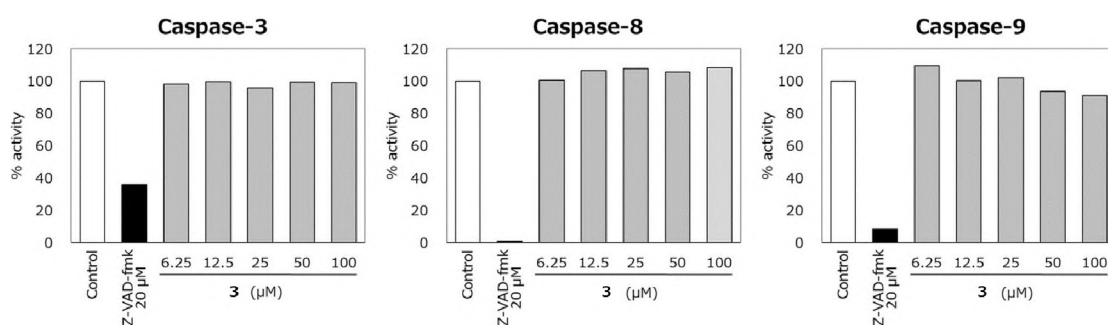


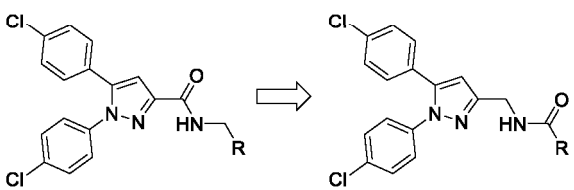
図 3 化合物 **3** の caspase-3、-8、-9 に対する阻害作用

## 2.2 スルホニルグアニジン構造を有する MALT1 阻害化合物 **6** の創出

化合物 **3** は、高用量 (100 mg/kg/day) の腹腔内投与によりイミキモド誘発乾癬モデルマウスの背部皮膚厚を改善したが、ADMET プロファイルが乏しく、経口投与では病態症状を改善することができなかった。そこで、より強力な阻害活性を示し、経口投与が可能で、*in vivo* で薬効を示す化合物の取得を目指し、新たなファーマコフォアの探索と ADME プロファイルの改善に着手した。

MALT1 阻害活性の向上を目的として、ピラゾール部位の 3 位置換基に着目した。3 位置換基のカルボニル基の位置を変化させただけの 2 つのケモタイプの構造活性相関は全く異なり (図 4)、本部位の変換により活性向上に繋がる新たなファーマコフォアを見いだせる可能性があると考えた。

ピラゾール-3-カルボキサミド系統に対してカルボニル基の位置を変えたピラゾール-3-イルメチルアミド系統の共通構造である化合物 4 を起点とし、そのアセチル基を生物学的等価体や類縁置換基に変換した (図 5)。その結果、メタンスルホニルグアニジンを含む化合物 5 では、化合物 3 と比較して MALT1 阻害活性が約 4.4 倍向上した。さらに、この化合物の周辺誘導体を探索したところ、スルホニルグアニジンの窒素原子にベンジル基を導入することで、MALT1 阻害活性が飛躍的に向上した化合物 6 を取得した。化合物 4 の周辺誘






R =	MALT1 IC <sub>50</sub>	MALT1 IC <sub>50</sub>
	0.490 μM	3.878 μM
	0.690 μM	4.021 μM
	>25 μM	0.188 μM

図 4 カルボニル基の位置の違いによる SAR の変化

導体においてもフェニル基を導入することで MALT1 阻害活性が向上していたことから、フェニル基は MALT1 阻害活性向上に寄与する新たなファーマコフォアであると考えた。しかし、化合物 6 およびその類縁体の代謝安定性は非常に乏しく、良好な経口吸収性を実現するためには代謝安定性の改善が必要であった。

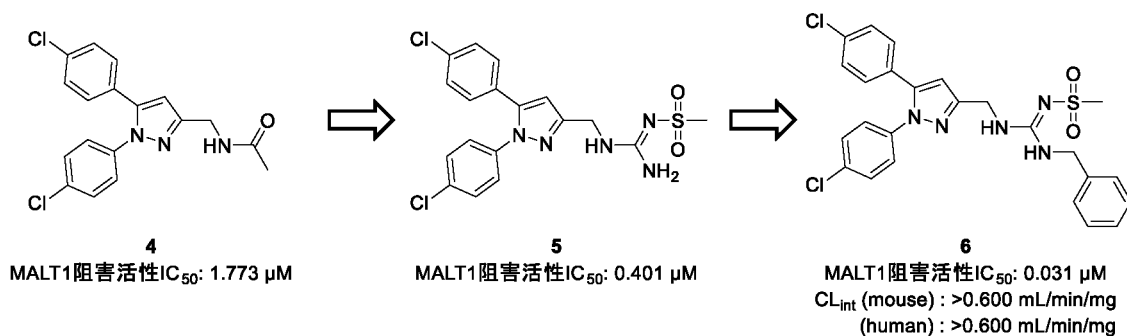


図 5 化合物 6 取得の経緯

### 2.3 経口投与で抗乾癬作用を有する MALT1 阻害化合物 7 の創出

化合物 5 の代謝安定性が良好であったこと、また、化合物 6 のベンジル位メチレン部位に置換基を導入した誘導体において代謝安定性が改善したことから、このメチレン部位が代謝を受けていると考えられた。そこで、易代謝部位と想定されるメチレン基がなく、活性向上に重要なフェニル基をもつ化合物として、ベンゼンスルホニルグアニジン誘導体を設計した (図 6)。期待通り、化合物 7 は高い MALT1 阻害活性を維持しつつ、代謝安定性を大幅に改善させることに成功した。また、化合物 7 の末端フェニル基をベンジル基や極性の高いヘテロアリール基に変換すると MALT1 阻害活性が減弱するが、疎水性置換基を導入した置換フェニル基では同等の MALT1 阻害活性を維持した。

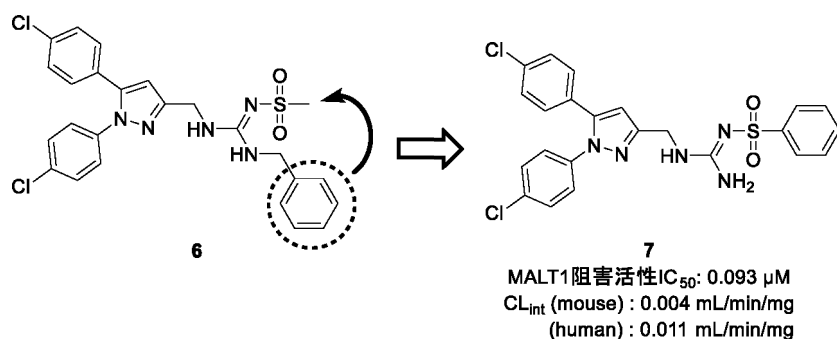


図 6 化合物 7 取得の経緯

化合物 7 は、化合物 3 と同様に、MALT1 タンパク質を介した基質切断阻害作用と IL-2 産生抑制作用を示し、さらにマウスにおける PK プロファイルが良好であった。また、化合物 7 のマウスにおけるバイオアベイラビリティは、経口投与に望ましい約 40%であったため、イミキモド誘発乾癬マウスモデルを用いて化合物の *in vivo* 有効性を評価した。その結果、15~60 mg/kg を 1 日 2 回経口投与したとき、溶媒投与群と比較して用量依存的に耳の厚さを改善させることができた (図 7)。

### 2.4 Docking study による推定結合様式の同定

MALT1 タンパク質への結合様式を明らかにする目的で、チオリダジンが結合した MALT1 タンパク質の結晶構造 (PBD ID: 411R) を用いて、化合物 7 に対するドッキングシミュレーションを実施した (図 8)。しかし、ドッキングシミュレーションにおける S スコア (低値であるほど安定な結合様式であることを示す) を比較すると、MALT1 阻害活性が大幅に向上したにもかかわらず、化合物 7 の S スコア (-7.49 kcal/mol) は、チオリダジン (S スコア: -7.67 kcal/mol、MALT1 阻害活性 IC<sub>50</sub>: 3.43 μM) と同等であった。化合物 7 の S スコアが、実

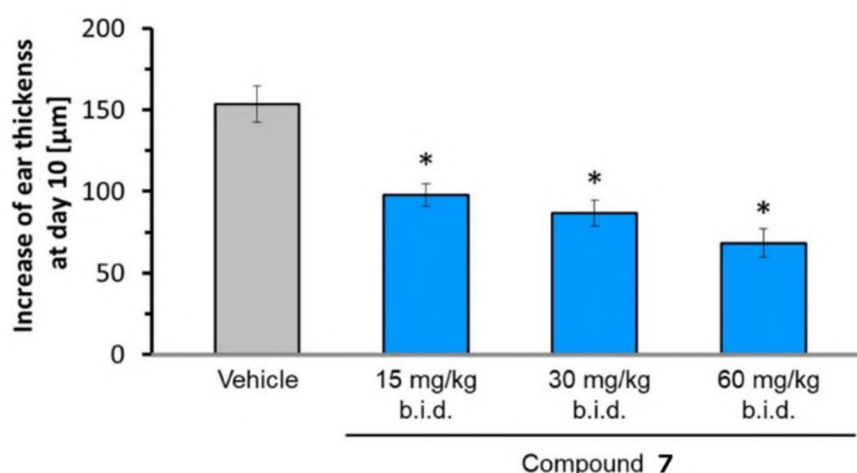


図7 イミキモド誘発乾癬モデルマウスにおける化合物7の効果

BALB/c マウス (8 週齢) の両耳にイミキモドクリーム (5%, 5mg) を 0 日目から 5 日目、7 日目、9 日目に塗布した。これらのマウスは、化合物7 投与群 (15、30 または 60 mg/kg、1 日 2 回 (b.i.d.)、7~9 日目に経口) または溶媒投与群 (0.5% MC-0.025% Tween20、1 日 2 回 (b.i.d.)、7~9 日目に経口) による治療処置を受けた。耳の厚さは 0 日目 (イミキモド塗布前) と 10 日目に測定した。結果は、10 日目と 0 日目の耳の厚さの差で表した (平均±SEM、化合物7 の 15 mg/kg 群では n=5、化合物7 の 30 および 60 mg/kg 群と溶媒投与群では n=6)。統計解析は、Steel の方法に続いて Shirley-Williams 多重比較検定を用いた。\*:  $p < 0.05$  vs 溶媒投与群。

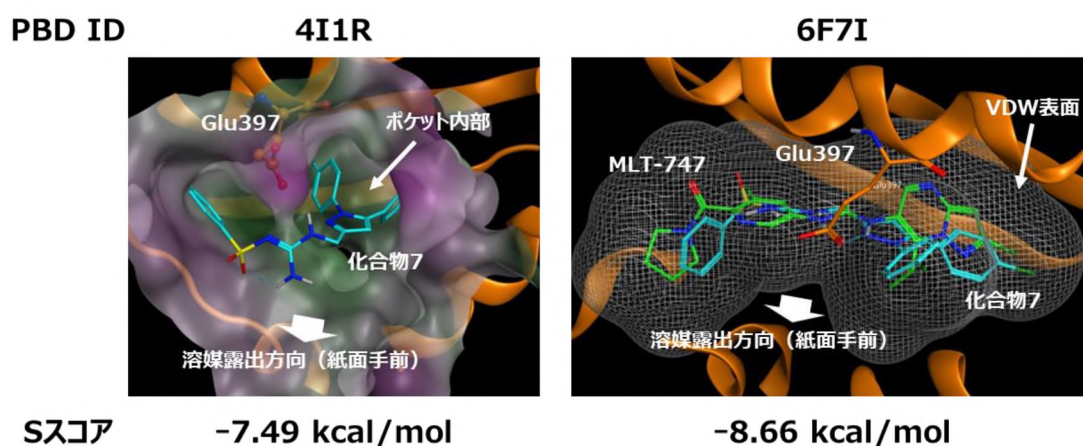


図8 MALT1 タンパク質に対する化合物7 (水色) の推定結合様式

(左) チオリダジンとの共結晶構造 (PBD ID: 4I1R) を用いたドッキングシミュレーション結果であり、MALT1 タンパク質の結合ポケット表面を表示した、(右) MLT-747 との共結晶構造 (PBD ID: 6F7I) であり、網目状に MLT-747 (緑) の VDW 表面を表示した。

測した MALT1 阻害活性から想定されるよりも高値となったのは、MALT1 阻害活性向上に大きく寄与するフェニル基が MALT1 タンパク質の外部へ露出し MALT1 タンパク質と相互作用しない結合様式であったためであると考えた。MALT1 阻害活性の向上から考察すると、フェニル基は MALT1 タンパク質と何らかの相互作用を獲得しているはずである。そのため、化合物展開をしている間に結合様式が変化した可能性が考えられた。

そこで、化合物 **7** と類似したファーマコフォアをもつ MLT-747 との結晶構造 (PBD ID: 6F7I) <sup>12</sup> を用いて、再度、ドッキングシミュレーションを実施したところ、S スコアは大きく改善した (S スコア: -8.66 kcal/mol)。化合物 **7** の 1 つのクロロフェニル基は MLT-747 ピラゾロピリミジン部分に、新たなファーマコフォアであるフェニル基は MLT-747 クロロピリジン近傍に位置し、それぞれ、MALT1 タンパク質アポ構造において Trp580 と Met717 が占める領域に位置していた。その結果、MALT1 タンパク質を不活性コンフォメーションで安定化させ、強力な MALT1 阻害活性を実現していると考えられた <sup>12</sup>。一方で、化合物 **7** は、チオリダジンや MLT-747 が相互作用している Glu397 との水素結合相互作用が認められなかった。今後、このアミノ酸残基との相互作用を獲得することで、さらなる MALT1 阻害活性の向上が期待できる。

### 3. 総括

我々は、ヒット化合物 **1** のアミド部位への置換基導入による SAR の変化に着目した探索を展開することで、より高活性な起点化合物としてスルホニルグアニジン構造を持つ化合物 **5** を見いだした。さらに、2 つの 4-クロロフェニル基の他に、MALT1 阻害活性を向上させる新たなファーマコフォアとしてフェニル基を発見した。代謝安定性の改善を目指し、これまで見いだした構造活性相関情報を基にベンゼンスルホニルグアニジン構造を着想し、MALT1 阻害活性を維持しつつ、課題であった経口吸収性の改善を実現した化合物 **7** を取得した。化合物 **7** の推定結合様式では、MALT1 タンパク質アポ構造における Trp580 や Met717 が占める位置に、4-クロロフェニル基やフェニル基が占めていた。これにより MALT1 タンパク質を不活性コンフォメーションで安定化させ、強力な MALT1 阻害活性を実現したと考えられた。本化合物は、経口吸収性が良好であり、経口投与でイミキモド誘発乾癬マウスモデルにおいて抗乾癬活性を示した。化合物 **7** は乾癬治療薬創出に向けたリード化合物として有用である。

### 引用文献

1) Klein Theo, *et al. Nat. Commun.*, **2015**, *6*, 8777.

- 2) Rosebeck Shaun, *et al. Cell Cycle*, **2011**, 10, 2485.
- 3) Klein T, *et al. Nat. Commun.*, **2015**, 3, 8777.
- 4) Rosebeck S, *et al. Cell Cycle*, **2011**, 1, 2485.
- 5) Afonina IS, *et al. FEBS J.*, **2015**, 282, 3286.
- 6) Rapp SR, *et al. J. Am. Acad. Dermatol.*, **1999**, 41, 401.
- 7) Takeshita J, *et al. J. Am. Acad. Dermatol.*, **2017**, 76, 393.
- 8) Jason E Hawkes, *et al. J. Allergy Clin. Immunol.*, **2017**, 140, 645.
- 9) Howes A, *et al. Biochem. J.*, **2016**, 473, 1759.
- 10) Juilland M, Thome M. *Front. Immunol.*, **2018**, 30, 1927.
- 11) Schlauderer F, *et al. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **2013**, 52, 10384.
- 12) Quancard J, *et al. Nat. Chem. Biol.*, **2019**, 15, 304.

以上