

学位論文内容要旨

氏名： 倉本 和幸

題目：乳癌治療薬としての Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase (AMPK) 非直接的活性化剤の合成と構造活性相関に関する研究

要旨：AMPK は、真核細胞において高度に保存されているセリン・スレオニンキナーゼである。AMPK は、エネルギーストレス下において生じる AMP : Adenosine Triphosphate (ATP)比、及び Adenosine Diphosphate (ADP) : ATP 比の増加を感知して活性化し、ATP の産生経路を亢進すると共に、ATP の消費に関わる経路を阻害することにより、細胞内のエネルギーバランスを回復することが知られている。全ての細胞において、エネルギーストレス下におけるエネルギー恒常性の維持及び適応は重要な機構であることから、本機構において主要な役割を担う AMPK は、代謝のマスタースイッチと呼ばれる酵素である。

近年、様々な癌原遺伝子の変異に伴い、AMPK 遺伝子の転写、並びに AMPK のリン酸化・ユビキチン化機構に変化が生じることにより、癌細胞内において AMPK の活性が低下することが報告されている。一方で、AMPK の発現増加、及び活性の向上が、ヒトの複数の癌種において生存率の改善に寄与することが知られている。実際に、細胞内において AMPK が活性化されることにより、複数の経路を介して抗腫瘍効果が発揮されることが報告されている。以上のことから、癌細胞において AMPK を活性化する化合物の創製は、新たな抗癌剤の開発に繋がると考えられる。

これまでに、直接的あるいは非直接的に AMPK を活性化することが報告されている化合物の例として、以下に示すものが挙げられる (Figure 1, 2)。

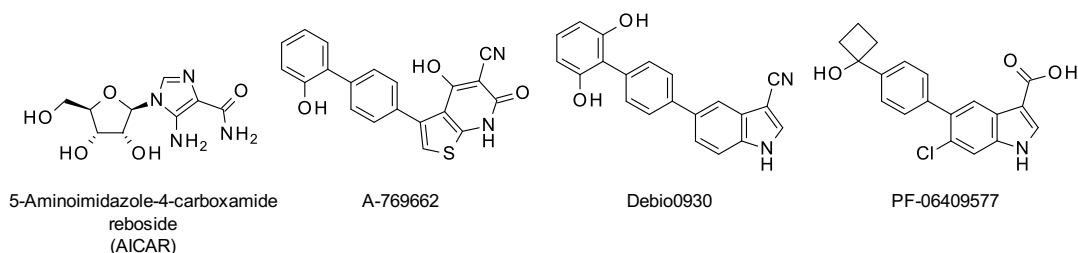


Figure 1. 直接的 AMPK 活性化剤

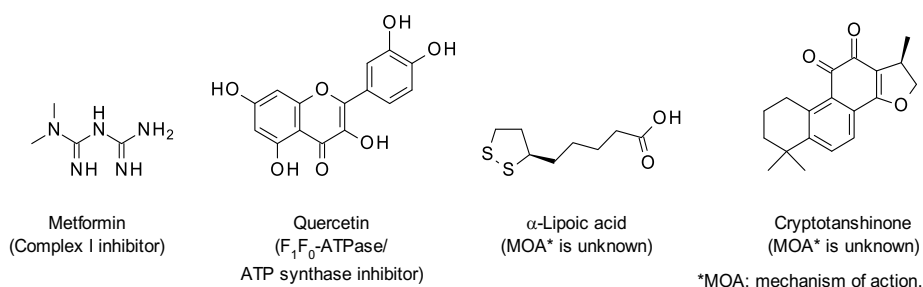


Figure 2. 非直接的 AMPK 活性化剤

こうした背景の下、著者は、新規な AMPK 活性化剤の探索を目的とし、アステラス製薬所有化合物ライブラリに対し、ヒト乳癌細胞株を用いたフェノタイプアッセイスクリーニングを行った。その結果、既知の直接的 AMPK 活性化剤に見られない、特徴的な選択性を以て細胞増殖を阻害する化合物を複数見出した。著者は、これらの化合物が示すフェノタイプに興味を持ち、その特性を保持した上で薬理・物性・薬物動態プロファイルに優れた化合物を見出すことが、乳癌治療のための新規なプレジジョンメディスンの創製に繋がると考え、研究を行った。

1. 新規 3,5-ジメチルピリジン-4(1H)-オン誘導体の合成及び構造活性相関¹⁾

ヒト乳癌細胞株である MDA-MB-453 を用いてフェノタイプアッセイスクリーニングを行った結果、中程度の AMPK 活性化作用を示し、新規な 3,5-ジメチルピリジン-4(1H)-オン骨格を有する化合物 **1** を見出した。MDA-MB-453、及び同じくヒト乳癌細胞株である SK-BR-3 に対する化合物 **1** の増殖阻害活性を、既知の直接的 AMPK 活性化剤である AICAR と比較した結果、選択性なく増殖を阻害した AICAR とは異なり、化合物 **1** は、MDA-MB-453 の増殖を阻害した一方で、SK-BR-3 に対しては極めて弱い増殖阻害活性を示した。このことから、化合物 **1** は AMPK に直接作用せず、別の標的を介し、非直接的に AMPK を活性化することが示唆された。

まず初めに、著者は、化合物 **1** の主活性向上を目的とし、ビアリアル部位の

最適化を行った。その結果、中央ピリジン環 3 位のメチル基を 6 位へと移すことにより、主活性が 10 倍向上した化合物 **2** を得た。加えて、ベンゼン環パラ位のフッ素基をトリフルオロメチル基へと変換することにより、さらに 7 倍活性が向上した化合物 **3** を得た (Figure 3)。

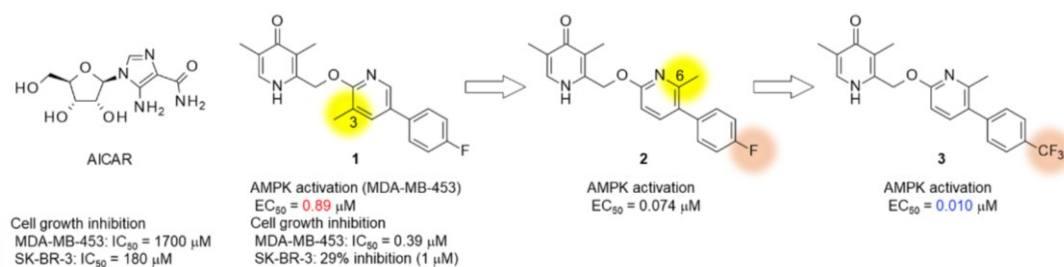


Figure 3. 化合物 **3** の発見

化合物 **3** は強力な AMPK 活性化作用を示す一方で、腸管 pH 付近における水溶性に乏しく、経口投与時の薬剤吸収に懸念があることが分かった。そこで著者は、化合物 **3** の水溶性向上のため、ビアリアル構造間へのスペーサー導入を試みた (Figure 4)。その結果、スペーサーとしてピペリジン環を導入することにより、水溶性が大幅に向上した化合物 **4** を得た。さらに、主活性向上を目的とし、スペーサーの最適化を行った結果、ピペリジン環に二重結合を導入した化合物 **5** において、良好な水溶性、並びに化合物 **3** と同等の強力な AMPK 活性化作用が認められた。化合物 **5** は化合物 **1** と同様の細胞選択性を保持し、且つ MDA-MB-453 に対し、強力な増殖阻害作用を示した。

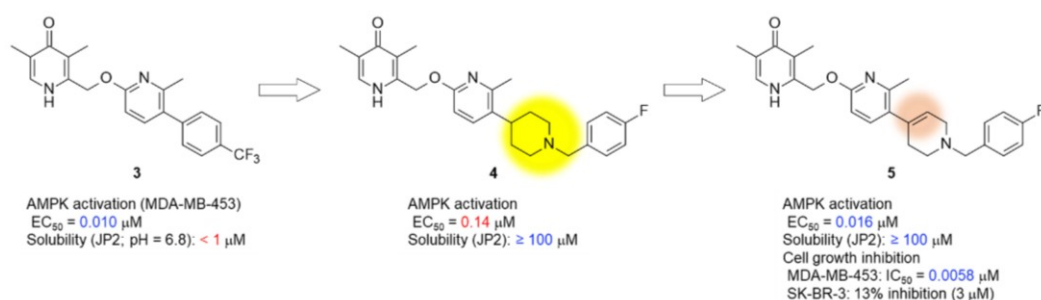


Figure 4. 化合物 **5** の発見

2. 開発化合物 ASP4132 並びにその周辺化合物の合成及び構造活性相関²⁾

化合物 **5** の *in vivo* における薬理活性評価を目的とし、担癌マウスモデルを用いた抗腫瘍試験を行った。その結果、化合物 **5** の動態面及び毒性面の課題により、作用の検証が困難であることが分かった。そこで著者は、フェノタイプア

ッセイスクリーニングで得られた別母核化合物 **6** に着目した (Figure 5)。化合物 **6** の *in vitro* におけるプロファイルを評価した結果、化合物 **6** は化合物 **5** と同等以上の AMPK 活性化作用を有すると共に、同様の細胞選択性を以て増殖阻害活性を示したことから、薬理活性の面において魅力的なプロファイルを有することが分かった。一方で、腸管 pH 付近における水溶性及びヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性に課題があることが分かった。そこで著者は、これら非薬効薬理プロファイルの改善を目的とし、合成展開を行った。

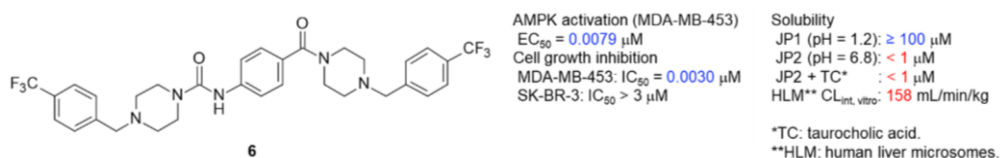


Figure 5. 化合物 **6** の *in vitro* プロファイル

化合物 **6** の脂溶性を計算した結果、*clogP* 値が高い値を示したことから、化合物 **6** は脂溶性に富む化合物であることが分かった。そこで著者は、化合物 **6** の非薬効薬理面における課題解決に向け、まず化合物 **6** の脂溶性を低減することとした (Figure 6)。その結果、左部ベンゼン環上のトリフルオロメチル基をメトキシ基へと置換した化合物 **7** において、脂溶性の低減に伴い、水溶性の改善が認められた。一方で、化合物 **7** の代謝安定性は不良であった。次に著者は、塩基性を高めることで代謝安定性を改善するよう試みた。その結果、左部ピペラジン環をピペリジン環とすることで、その環内三級アミン部位の塩基性が増大し、代謝安定性が改善することを見出した。さらに、左部ベンゼン環をピリジン環へと変換することにより、薬理活性・水溶性・代謝安定性において良好なバランスを有する化合物 **8** を見出した。

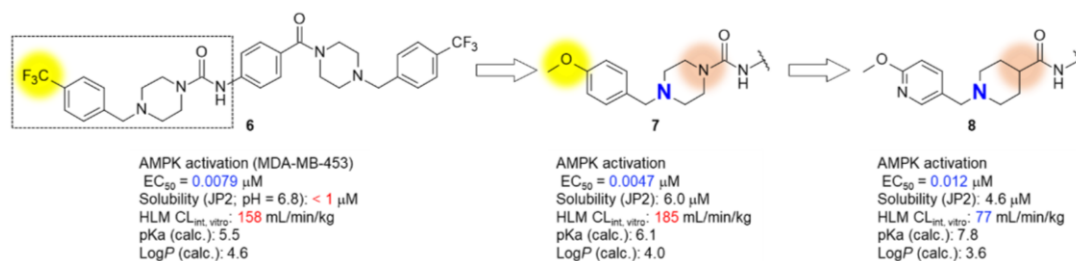


Figure 6. 化合物 **8** の発見

しかしながら、化合物 **8** のラット Pharmacokinetics (PK) 試験を行った結果、化合物 **8** の全身クリアランス (CL_{tot}) は非常に大きく、バイオアベイラビリティ

イ (F) も低値であることが明らかとなった。ラットにおける代謝物検索試験の結果、中央ベンゼン環と左部とを結ぶアニリド結合が加水分解された代謝物が見出されたことから、著者は、このアニリド部位の変換に着手した (Figure 7)。

まず初めに、アニリド結合を中央ベンゼン環と縮環した構造に置換したベンゾイミダゾール体 **9** を合成したが、薬理活性、水溶性は共に不良であった。一方で、ベンゾイミダゾール環の向きを逆転させた化合物 **10** は、薬理活性、水溶性、並びに代謝安定性において良好なバランスを示した。化合物 **10** のラット PK 試験を行った結果、期待通り、アニリドリンカーを回避した化合物 **10** は良好な全身クリアランス、バイオアベイラビリティを示した。

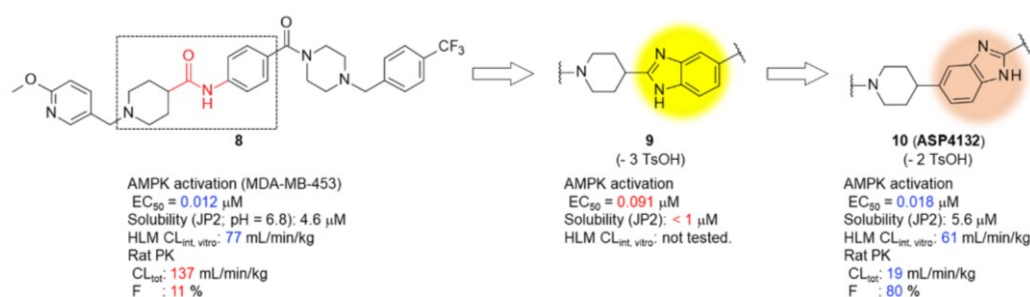


Figure 7. PK プロファイル改善

さらに詳細な化合物 **10** の薬理活性プロファイルを評価した結果、*in vitro* における増殖阻害作用の細胞選択性は保持されており、加えて、担癌マウスモデルにおいて、体重減少を伴わず、一日一回、2 mg/kg の経口投与で腫瘍退縮作用を示すことが分かった。以上のことから、著者は、本化合物を第一世代の開発化合物 **ASP4132** として選択した。

3. 第二世代化合物としてのエーテルリンカー化合物の合成及び構造活性相関³⁾

ASP4132 は腸管 pH 付近における水溶性が中程度であったため、臨床試験において腸管で化合物が析出し、血漿中濃度が用量依存的に上昇しないことで、十分な薬効を発揮できないことが懸念された。そこで著者は、**ASP4132** の薬理活性プロファイルを保持し、且つ水溶性に優れる第二世代化合物の創製を目的とし、さらなる合成展開を行った (Figure 8)。

まず初めに、脂溶性の低減を目的とし、アニリドタイプの化合物 **11** の中央ベンゼン環をピリジン環へと変換した。その結果、得られた化合物 **12** は、主活性がやや減弱したものの、良好な水溶性を示すことが分かった。次に、アニリド部位の代謝加水分解の回避を目的とし、アニリド部位をエーテル結合へと変換した結果、高い水溶性及び良好な代謝安定性を有し、且つ主活性が大きく向上

した化合物 **13** を見出した。一方で、化合物 **13** は、心血管系毒性リスクとなる human ether-a-go-go related gene (hERG) チャンネル阻害活性が強く、本作用の回避が必要であると考えられた。

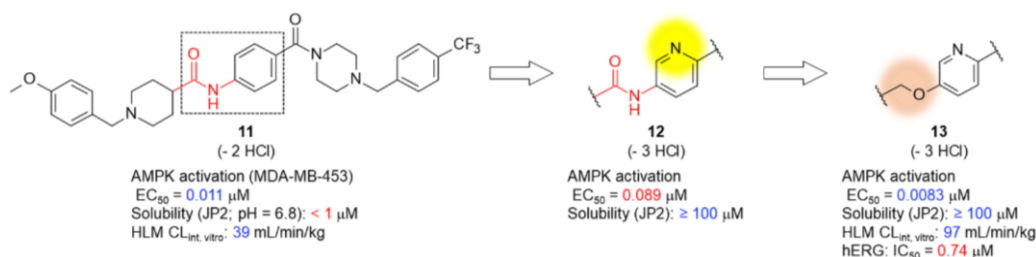


Figure 8. 化合物 **13** の発見

化合物 **13** の脂溶性及び塩基性を計算した結果、*clogP* 値と *pKa* 値が高い値を示したことから、これらが強力な hERG チャンネル阻害活性の要因であると考えられた (Figure 9)。化合物 **13** の脂溶性、塩基性の低減を目的とした合成展開を行った結果、左部のベンゼン環をピリジン環へと変換することで化合物の塩基性の低減を達成し、さらに、右部のベンゼン環上のトリフルオロメチル基をシアノ基へと変換することで、大幅な脂溶性低減を達成した。さらに各部の置換基を最適化した結果、左部メトキシ基をエトキシ基とすること、並びに中央ピリジン環にメチル基を導入することにより、主活性が向上することを見出した。このようにして見出した化合物 **14** は、化合物 **13** と同等の薬理活性、及び良好な水溶性・代謝安定性を示すと共に、化合物 **13** と比較して hERG チャンネル阻害活性が大きく減弱した。

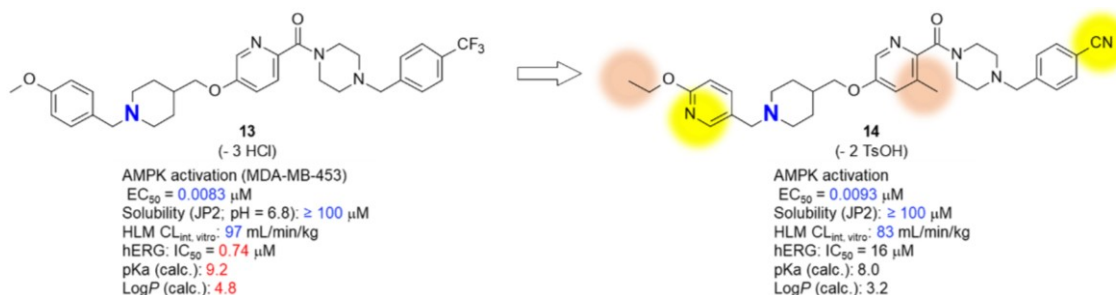


Figure 9. 化合物 **14** の発見

さらなる hERG チャンネル阻害活性の低減を目的とし、左部ピリジン環をピラジン環へと変換し、ピペリジン環 4 位にフッ素基を導入した結果、化合物 **14** と同等の薬理活性・水溶性・代謝安定性を有し、hERG チャンネル阻害活性がさらに

減弱した化合物 **15** を見出した (Figure 10)。加えて、化合物 **15** のラット PK 試験を行った結果、全身クリアランス及びバイオアベイラビリティは良好であり、**ASP4132** と比較して同等以上であることが分かった。

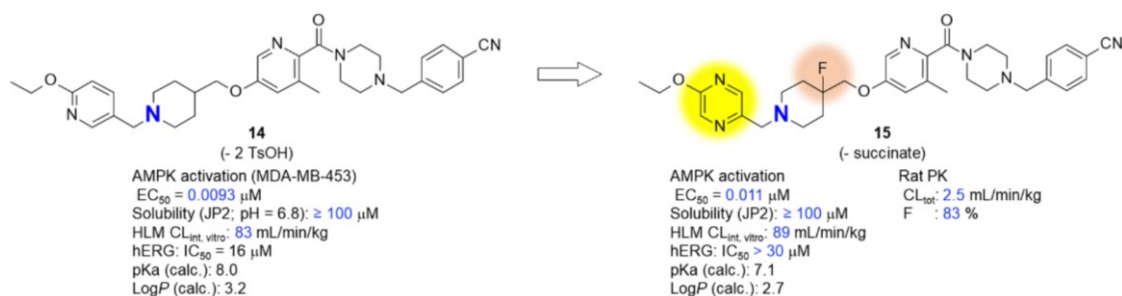


Figure 10. 化合物 **15** の発見

化合物 **15** は、**ASP4132** と同様の選択性で細胞増殖阻害作用を示すと共に、担癌マウスモデルにおいて、体重減少を伴わず、一日二回、2 mg/kg の経口投与で腫瘍退縮作用を示した。以上の結果から、著者は、薬理活性・薬物動態・非薬効薬理面全てにおいてバランスの取れた化合物 **15** を第二世代開発候補化合物として見出すことに成功した。

< 参考文献 >

- 1) Kuramoto K., Sawada Y., Ishibashi N., Yamada T., Nagashima T., Shin T., *Chem. Pharm. Bull.*, **68**, 77–90 (2020).
- 2) Kuramoto K., Yamada H., Shin T., Sawada Y., Azami H., Yamada T., Nagashima T., Ohnuki K., *Bioorg. Med. Chem.*, **28**, 115307 (2020).
- 3) Kuramoto K., Sawada Y., Yamada T., Nagashima T., Ohnuki K., Shin T., *Chem. Pharm. Bull.*, **68**, 452–465 (2020).

以上