

学位論文題名

新規コレステロール合成阻害剤の開発と Ras ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤への展開

学位論文内容の要旨

新規な作用機作を有する血中コレステロール(Ch)低下剤として、Ch 生合成系の必須の酵素であるスクアレンエポキシダーゼ(SE)とスクアレン合成酵素(SS)の阻害剤を開発した。また、SS 阻害剤の研究の過程で、Ras 蛋白のプレニル化を阻害するファルネシルプロテイントランスフェラーゼ(FT)の阻害剤を発見し、同阻害剤が抗癌剤として有効であることを確認した。以下、これら三つの酵素の阻害剤の開発研究について項目別に概説する。

(スクアレンエポキシダーゼ阻害剤の開発)

SE はステロール合成系の下流に位置し、スクアレンを酸化して 2,3-オキシドスクアレンを合成する酵素である。哺乳動物において同酵素を阻害すれば、Ch の生合成が阻害され、その結果血中 Ch の低下が起こり、更にその際には、既存の HMG-CoA 還元酵素阻害剤の問題点であるイソプレノイド生合成系の他の代謝産物の生成抑制は起きないものと予想される。筆者は、真菌 SE の阻害剤として知られる抗真菌剤や基質スクアレンの構造を基に多様な化合物を合成し、その中から哺乳動物の SE のみを選択的に阻害する化合物、(E)-N-メチル-N-(6,6-ジメチル-2-ヘプテン-4-イニル)-3-(フェニルメトキシ)ベンゼンメタナミンを発見した。その後、この化合物をリードとして化学修飾による構造の最適化を行い、開発候補化合物 NB-598、(E)-N-エチル-N-(6,6-ジメチル-2-ヘプテン-4-イニル)-3-[(3,3'-ビチオフェン-5-イル)メトキシ]ベンゼンメタナミン塩酸塩を創製した。NB-598 は、ヒト肝癌(Hep G2)細胞から単離した酵素及び同細胞中での Ch 合成を、それぞれ 0.74 nM、3.4 nM の 50%阻害濃度(IC₅₀)で阻害し、また、ラット in vivo での Ch 合成を、5.1 mg/kg の 50%阻害経口投与量(ED₅₀)で阻害した。また、同化合物 10 mg/kg/day を、血中 Ch 低下剤評価の為の最も標準的動物モデルであるイヌに対して経口で4週間投与したところ、血中総 Ch 値が約 40%低下した。この作用は対照に置いた HMG-CoA 還元酵素阻害剤、シンバスタチンの活性とほぼ同等の強さであった。本化合物を医薬品として開発する為に大量合成法を検討し、パラジウム触媒によるクロスカップリング反応を利用して中間体のビチオフェン骨格と(E)-6,6-ジメチル-2-ヘプテン-4-イン骨格を合成する極めて工業的な製造法を開発した。

NB-598 は公知の全ての血中 Ch 低下剤の中で、HMG-CoA 還元酵素阻害剤と並んで最も作用が強力な化合物であり、ヒトでの効果が期待される化合物である。

(スクアレン合成酵素阻害剤の開発)

SS は Ch 生合成系の中、SE の一段階前に位置する酵素であり、2モルのファルネシルピロリ

ン酸(FPP)を縮合してプレスクアレノピロリン酸經由スクアレンを合成する酵素である。同酵素の阻害剤として6年前に天然から発見されたザラゴジン酸(別名スクアレスタチン)誘導体は、強力な活性を有し、この分野の薬剤としては最も有望な化合物であるが、消化管からの吸収性が悪く、経口剤としての開発は困難である。その為、コンピューターを用いてザラゴジン酸と類似の三次元構造を有する化合物を、10万個を超える化合物ライブラリー(過去の合成品や天然物等を集めたもの)の中から採り出し、リード化合物 L-592,901、N-[3-(4-クロロフェニル)-2-(4-クロロフェニル)-1-メチルプロピル]カルバモイルメチルコハク酸を発見した。次いで、この化合物をリードとして化学修飾による構造の最適化を行い、Hep G2細胞由来のSSをそれぞれ0.72 nM、2.5 nMのIC₅₀で阻害する高活性化合物 J-104,118、(3S,7S,8S)-N-[3-(3,4-ジクロロフェニル)-2-(2-フルオロ-4-ビフェニルリル)-1-メチルプロピル]カルバモイルメチルコハク酸及び J-104,123、N-[(1S,2S,3E)-2-(3,4-ジクロロベンジル)-1-メチル-4-ナフチル-3-ブテニル]カルバモイル-(3R)-3-メチルブタン酸を開発した。両化合物は、マウス、ラットを用いた *in vivo* での経口投与実験でザラゴジン酸 A を凌ぐ強い Ch 合成阻害作用を示し、経口吸収性に優れた化合物である。その為、イヌにおいて二週間の経口投与実験を行った所、両者の中で特に経口吸収性に優れた J-104,123 が有意な血中 Ch 低下作用を示した。両阻害剤の大量合成を可能にする為製法の検討を行い、J-104,118 については Sharpless の不斉ジヒドロキシル化を、また J-104,123 については(R)-3-ヒドロキシブタン酸メチルのジアステレオ選択的ベンジル化を鍵反応とする極めて効率的な製造法を開発した。J-104,123 は、現在までに報告されている数多くの SS 阻害剤の中で、イヌに対して有意な血中 Ch 低下作用を示す唯一の化合物であり、今後の開発が期待される化合物である。

(ファルネシルプロテイントランスフェラーゼ阻害剤の開発)

癌遺伝子 *ras* がコードする Ras 蛋白は、その機能発現のために FT によるファルネシル化が必要である。FT は基質として SS と同じく FPP を利用するため、基質の構造類似体として酵素を阻害する上記の SS 阻害剤の関連化合物が、同様に FT に対しても阻害活性を有することが期待される。その為、筆者は SS 阻害剤の開発の際に合成された化合物の FT 阻害活性を調べ、FT 阻害剤開発の為のリード化合物、N-[3-(4-クロロフェニル)-2-(4-クロロフェニル)-1-メチルプロピル]-N-(2-ナフチルメチル)カルバモイルメチルコハク酸を発見した。この化合物を基に構造の最適化を行い J-104,134、(4S,5S)-5-[N-[(1R,2R,4E)-5-(2-ベンツオキサゾリル)-メチル-2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-4-ペンテニル]-N-(2-ナフチルメチル)カルバモイル]-1,3-ジオキサラン-2,2,4-トリカルボン酸を創製した。J-104,134 はラット FT を 5 nM の IC₅₀ で阻害し、他の類縁酵素である SS 及びゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ I は殆ど阻害しなかった。同化合物は H-*ras* NIH3T3 細胞において 4.3 μM の IC₅₀ で Ras 蛋白のファルネシル化を阻害し、また、ヌードマウスの *in vivo* 移植癌モデルにおいても 40、80 mg/kg の6日間連続腹腔内投与で投与量依存の有意な制癌効果を示した。本化合物の合成は、SS 合成阻害剤研究の際に開発された合成法を基に、リパーゼを用いる光学分割の利用等の改良を加え達成された。

J-104,134 は、FPP 拮抗型 FT 阻害剤として始めて *in vivo* の効果が確認された化合物であり、今後の展開が期待される化合物である。現在、更なる高活性化合物を求めて精力的な検討を行っている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 塚 栄 子

副 査 教 授 橋 本 俊 一

副 査 教 授 松 田 彰

副 査 助教授 井 上 英 夫

学 位 論 文 題 名

新規コレステロール合成阻害剤の開発と Ras ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤への展開

申請者は新規な作用機作を有する血中コレステロール (Ch) 低下剤として, Ch 生合成系の必須の酵素であるスクアレンエポキシダーゼ (SE) とスクアレン合成酵素 (SS) の阻害剤およびRas蛋白のプレニル化を阻害するファルネシルプロテイントランスフェラーゼ (FT) の阻害剤の研究を行って来たが, 以下のような成果を得た.

スクアレンエポキシダーゼ阻害剤

申請者は, 真菌SEの阻害剤として知られる抗真菌剤や基質スクアレンの構造を基に多様な化合物を合成し, その中から哺乳動物のSEのみを選択的に阻害する化合物, (E)-N-メチル-N-(6,6-ジテチル-2-ヘプテン-4-イニル)-3-(フェニルメトキシ)ベンゼンメタナミンを発見した. その後, この化合物をリードとして化学修飾による構造の最適化を行い, 開発候補化合物NB-598, (E)-Nエチル-N-(6,6-ジメチル-2-ヘプテン-4-イニル)-3- [(3,3'-ビチオフエン-5-イル)メトキシ] ベンゼンメタナミン塩基塩を創製した.

スクアレン合成酵素阻害剤

スクアレン合成酵素の阻害剤として6年前に天然から発見されたザラゴジン酸 (別名スクアレスタチン) 誘導体は, 強力な活性を有し, この分野の薬剤としては最も有望な化合物であるが, 消化管からの吸収性が悪く, 経口剤としての開発は困難である. その為, コンピューターを用いてザラゴジン酸と類似の三次元構造を有する化合物を10万個を超える化合物ライブラリ (過去の合成品や天然物等を集めたもの) の中から探り出し, リード化合物L-592, 901, N

[3-(4-クロロフェニル)-2-(4-クロロフェニル)-1-メチルプロピル] カルバモイルメチルメチルコハク酸を発見した。次いで、この化合物をリードとして化学修飾による構造の最適化を行い、Hep G2細胞の由来のSSをそれぞれ1.72nM, 2.5nM の IC_{50} で阻害する高活性化合物 J-104, 118, (3S, 7S, 8S)-N- [3-(3,4-ジクロロフェニル)-2-(2-フルオロ-4-ビフェニルリル)-1-メチルプロピル] カルバモイルメチルコハク酸及びJ-104, 123, N- [(1S, 2S, 3E)-2-(3,4-ジクロロベンジル)-1-メチル-4-ナフチル-3-ブテニル] カルバモイル-(3R)-3-メチルブタン酸を開発した。両化合物は、マウス、ラットを用いたin vivoでの経口投与実験でザラゴジン酸Aを凌ぐ強いCh合成阻害作用を示し、経口吸収性に優れた化合物である。その為、イヌにおいて二週間の経口投与実験を行った所、両者の中で特に経口吸収性に優れたJ-104, 123 が有意な血中Ch低下作用を示した。両阻害剤の大量合成を可能にする為製法の検討を行い、J-104, 118についてはSharplessの不斉ジヒドロキシ化を、またJ-104, 123については(R)-3-ヒドロキシブタン酸メチルのジアステレオ選択的ベンジル化を鍵反応とする極めて効率的な製造法を開発した。

ファルネシルプロテイントランスフェラーゼ阻害剤

癌遺伝子*ras*がコードするRas蛋白は、その機能発現のためにFTによるファルネシル化が必要である。FTは基質としてSSと同じくFPPを利用するため、基質の構造類似体として酵素を阻害する上記のSS阻害剤の関連化合物が、同様にFTに対しても阻害活性を有することが期待されたので、SS阻害剤の開発の際に合成された化合物のFT阻害活性を調べ、FT阻害剤開発の為のリード化合物、N- [3-(4-クロロフェニル)-2-(4-クロロフェニル)-1-メチルプロピル] -N-(2-ナフチルメチル)カルバモイルメチルコハク酸を発見した。この化合物を基に構造の最適化を行い、J-104, 134,(4S, 5S)-5- [N- {(1R,2R,4E)-5-(2-ベンツオキサゾリル)-メチル-2-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-4-ペンテニル} -N-(2-ナフチルメチル)カルバモイル] -1,3-ジオキソラン-2,2,4-トリカルボン酸を創製した。J-104, 134はH-*ras*NIH3T3細胞において4.3 μ Mの IC_{50} でRas蛋白のファルネシル化を阻害し、また、ヌードマウスのin vivo移植癌モデルにおいても40, 80mg/kgの6日間連続腹腔内投与で投与量依存の有意な制癌効果を示した。

以上の業績は、博士（薬学）を授与するのに値するものと判断した。