

# 新規メカニズムを有する糖尿病治療薬： 置換ベンズアミド型グルコキナーゼ活性化剤の創製

## 学位論文内容の要旨

### 1. はじめに

日本における糖尿病患者数は増加し、糖尿病予備軍を含めると数千万人に及ぶと言われている。糖尿病は治療せず長期に放置すると、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症などの糖尿病慢性期合併症の起こる頻度が高くなり、QOLの低下や死亡に至る。そのため、生活習慣の改善、薬剤による血糖コントロールによって合併症を防ぐことが治療目標となっている。

現在、経口血糖降下薬として、スルホニルウレア剤、チアゾリジン誘導体、ピクアナイド剤、 $\alpha$ グルコシダーゼ阻害剤及びジペプチジルペプチダーゼ阻害剤が用いられている。いずれの血糖降下剤もそれぞれに短所を有し、単剤での使用よりも併用されることが多い。しかし併用療法においては、長期投与における効果の減弱や予期せぬ副作用が懸念されることから、単剤で使用可能な新規メカニズムの安全で効果の強い糖尿病治療薬の開発が必要とされている。

グルコキナーゼ (GK) は、古くからその存在が知られ、グルコースをグルコース-6-リン酸へと変換する、糖代謝系の律速酵素である。GKは主に肝臓と膵臓 ( $\beta$ 細胞) に発現し、GKを活性化すると、肝臓では糖取り込みが促進し糖放出が抑制され、 $\beta$ 細胞ではインスリン分泌が亢進されることが知られている。このことから、GK活性化剤は、血糖値を低下させる薬剤として期待され、著者は新規メカニズムを有する糖尿病治療薬として、GK活性化剤の創薬研究を行った。

### 2. GK活性化剤リード化合物：2-アミノベンズアミド誘導体の創製

GK活性化能の測定系を用いて社内 sample collection をスクリーニングした結果、GK活性化能を有する5-置換-2-アミノベンズアミド骨格を有するヒット化合物が得られた ( $EC_{50}$ : 6.5  $\mu$ M)。活性の向上を目指して、ヒット化合物を誘導化することにより、良好な活性を有するリード化合物 (2-アミノ-N-メチルチアゾリル-5-トリアゾールチオベンズアミド) を見出した ( $EC_{50}$ : 0.42  $\mu$ M)。本化合物はラットにおけるPKプロファイルも良好であり、GK活性化剤のメカニズムコンセプト確認用ツール化合物として高次試験を行った。その結果、リード化合物はラット経口糖負荷試験 (OGTT) において、(i)肝臓グリコーゲン濃度の有意な上昇、(ii) 血漿中インスリン濃度の有意な上昇、及び(iii)それに基づく有意な血糖降下作用を示した。このことから、GK活性化剤が新規糖尿病治療薬となり得る可能性が示唆された。

### 3. 新規リード化合物：3-アルコキシ-5-フェノキシ-N-チアゾリルベンズアミド誘導体の発見

開発候補品の創薬研究を開始するにあたり問題となったのが、リード化合物のアニリン様アミノ基であった。アニリン様アミノ基は潜在的に遺伝毒性を示すことが報告されており、日々服用することが想定される糖尿病治療薬として開発することは困難であると判断した。そのため、アニリン様アミノ基を有さないGK活性化剤の創製が必要であった。著者はGKとGK活性化剤 (リード化合物、及びリード化合物の2-N-メチルアミノ体) との共結晶に成功し、

X線回折結果からそれぞれの GK 活性化剤の結合様式を解析した。その結果、リード化合物のアニリン様アミノ基の水素原子は Tyr215 と相互作用するのに対し、2-N-メチルアミノ体では Tyr215 は相互作用せずに自由度が大きく、この近傍に新しい空間ができることが判明した。この空間に置換基を導入することにより、ベンズアミド部3位にアミノ基を有さない GK 活性化剤の創製を開始した。3位へ置換基の導入を行った結果、嵩の高い置換基の導入により活性が向上し、さらに構造活性相関の検討によりリード化合物と同様の活性を示す 3-イソプロポキシ-5-(4-メタンスルホニルフェノキシ)ベンズアミド化合物を新規リード骨格として見出した。この化合物はラット OGTT においてリード化合物と同様に 30 mg/kg 経口投与において有意な血糖降下作用を示したことから、アニリン様アミノ基を有さない新規リード化合物として見出した。

#### 4. 3位イソプロポキシ部位周辺の構造活性相関による高次評価化合物の創製

新規リード化合物は、高い脂溶性、低い水溶性 (<0.1 µg/mL) 及び human Ether-a-go-go Related Gene potassium channel (hERG) 阻害という問題点を有していた。hERG 阻害は、心疾患を引き起こす可能性が報告されており、医薬品開発を行ううえで hERG 阻害活性の除去は必須である。これらの問題点の克服を目的として、GK 活性、親水性パラメータ [LogD (pH 7.4)]、hERG 阻害 (IC<sub>50</sub>) を指標として 3位イソプロポキシ基部位の誘導化を行った。その結果、S 配置を有する光学活性な 3-(2-ヒドロキシ-1-メチルエトキシ) 体が優れた活性、良好な親水性及び hERG 阻害との選択性を示した。光学活性アルコール化合物は、水溶性が改善され (5.2 µg/mL)、PK プロファイルも良好であり (ラット経口アベイラビリティ: 33%、イヌ: 57%)、糖尿病モデル動物において有意な血糖効果作用を示したことから、開発候補品となり得ると判断し、さらに光学活性 3-(2-ヒドロキシ-1-メチルエトキシ) 体の高次評価を行うこととした。

#### 5. チアゾールアミド部位の代謝活性

開発候補化合物の高次評価において、その代謝プロファイルを明らかにする必要があり、光学活性アルコール化合物の代謝酵素による代謝活性化試験 (共有結合性試験) を行った。共有結合性試験は、肝細胞ミクロソームにおける化合物及びその代謝物の蛋白質に対する不可逆的共有結合を定量的に測定する試験であり、ヒトにおける予期せぬ毒性を予測するために重要である。

まず、トリチウムラベル化した 3-(2-ヒドロキシ-1-メチルエトキシ) 体を用いて、ヒト及びラットの肝ミクロソームにおける共有結合性試験を行ったところ、社内基準値 (50 pmol-equiv binding/mg protein) を大きく上回る値 (ヒトミクロソーム: 715、ラットミクロソーム: 378) を示した。アルコール化合物の代謝経路を解明すべく、アルコール化合物のヒト及びラットの肝ミクロソームにおける代謝物を同定したところ、いずれも主要な代謝物はベンズアミド窒素原子に結合するチアゾールの開環体であり、ラットミクロソーム中でのグルタチオン (GSH) 付加試験においてもチアゾール開環 GSH 付加物が同定された。以上の結果から、チアゾール環の酸化-平衡により生成するチオラクトン環に対し、水、GSH 又は蛋白質が反応することによる開環メカニズムを推定した。推定したメカニズムを検証する目的で、3-(2-ヒドロキシ-1-メチルエトキシ) 体のチアゾール環周辺化合物を合成し、共有結合性試験を行った結果、チアゾール環のエポキシ化を回避したチアゾリン環化合物は代謝活性が大きく改善した。この結果から、チアゾール環の酸化により生成するエポキシ環が蛋白質と反応することにより共有結合が生じるメカニズムも推定された。チアゾール環 5 位酸化部位に窒素原子を導入したチアジアゾール体は共有結合が全く観察されなかった。この化合物は良好な GK 活性化能を示したことから、チアゾール化合物に替わる新たな GK 活性化剤候補品と考えられた。以上のように、著者はチアゾール環化合物の代謝メカニズム及び共有結合による毒性の可能性を明らかにした。さらに、チアジアゾール環化合物が共有結合を示さないことを見出し、チアゾール環の代替官能基としてチアジアゾール環の導入が今後のメディスナルケミストリーにおいて有用であると考えた。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	松田	彰
副査	教授	周東	智
副査	准教授	市川	聡
副査	准教授	有澤	光弘

## 学位論文題名

### 新規メカニズムを有する糖尿病治療薬： 置換ベンズアミド型グルコキナーゼ活性化剤の創製

日本における糖尿病患者数は増加し、予備軍を含めると数千万人に及ぶ。糖尿病は治療せずに放置すると、慢性期合併症の頻度が高まり、QOLの低下や死に至る。そのため、生活習慣改善、薬剤による血糖コントロールによる合併症防止が治療目標となっている。現在、経口血糖降下薬として、スルホニルウレア剤、チアゾリジン剤、ピクアナイド剤、 $\alpha$  グルコシダーゼ阻害剤及びジペプチジルペプチダーゼ阻害剤が用いられているが、いずれも短所を有し併用されることが多い。しかし併用療法においては、長期投与での効果の減弱や予期せぬ副作用が懸念され、単剤で使用可能な治療薬の開発が必要とされている。グルコキナーゼ (GK) は、古くからその存在が知られ、グルコースをグルコース-6-リン酸へと変換する酵素である。主に肝臓と膵臓 ( $\beta$  細胞) に発現し、GK を活性化すると、肝臓では糖取込み促進・糖放出の抑制が、 $\beta$  細胞ではインスリン分泌亢進が知られている。そこで、GK 活性化剤の創薬研究を行った。

#### 1. GK 活性化剤リード化合物：2-アミノベンズアミド誘導体の創製

ライブラリーをスクリーニングした結果、5-置換-2-アミノベンズアミドを有するヒット化合物が得られた ( $EC_{50}$ : 6.5  $\mu$ M)。活性向上を目指して誘導化したところ、高活性なリード化合物 (2-アミノ-N-メチルチアゾリル-5-トリアゾールチオベンズアミド) を見出した ( $EC_{50}$ : 0.42  $\mu$ M)。本化合物はラットでの PK プロファイルが良好であり、メカニズムコンセプト確認用ツール化合物として高次試験を行った。その結果、ラット経口糖負荷試験 (OGTT) で、(i)肝臓グリコーゲン濃度の上昇、(ii)血漿中インスリン濃度の上昇、及び(iii)それに基づく血糖降下作用を示した。このことから、GK 活性化剤が新規糖尿病治療薬となり得る可能性が示唆された。

#### 2. 新規リード化合物：3-アルコキシ-5-フェノキシ-N-チアゾリルベンズアミド誘導体の発見

遺伝毒性を避けるためにアニリン様アミノ基を有さない GK 活性化剤の創製が必要であった。そこで、GK と GK 活性化剤との共結晶を得て、X 線回折結果から活性化剤の結合様式を解析した。その結果、Tyr215 近傍に空間があり、そこに置換基を導入することにより、2 位アミノ基を有さない GK 活性化剤の創製を開始した。構造活性相関の検討によりリード化合物と同様の活性を示す 3-イソプロポキシ-5-(4-メタンスルホニルフェノキシ) ベンズアミド化合物を新規なリード骨格として見出した。本化合物はラット OGTT 試験でリード化合物と同様に 30 mg/kg 経口投与において有意

な血糖降下作用を示した。

### 3. 3位イソプロポキシ部位周辺の構造活性相関による高次評価化合物の創製

新規リード化合物は、高い脂溶性、低い水溶性 (<0.1 µg/mL) 及び hERG 阻害という問題点を有していた。そこで、GK 活性、親水性パラメータ [LogD (pH 7.4)]、hERG 阻害 (IC<sub>50</sub>) を指標として 3 位イソプロポキシ基部位の誘導化を行ったところ、S 配置を有する光学活性な 3-(2-ヒドロキシ-1-メチルエトキシ)体が優れた活性、良好な親水性及び hERG 阻害との選択性を示した。本化合物は、水溶性が改善され (5.2 µg/mL)、PK プロファイルも良好であり、糖尿病モデル動物において有意な血糖効果作用を示したことから、開発候補品となり得ると判断し高次評価を行うこととした。

### 4. チアゾールアミド部位の代謝活性

そこで、代謝酵素による共有結合性試験を行った。本試験は、肝細胞ミクロソームにおける化合物の蛋白質に対する不可逆的共有結合を定量的に測定する試験であり、ヒトにおける予期せぬ毒性を予測するために重要である。トリチウムラベルした化合物を合成し試験を行ったところ、基準値 (50 pmol-equiv binding/mg protein) を大きく上回る値 (ヒトミクロソーム: 715、ラットミクロソーム: 378) を示した。この原因を調べたところ、主要な代謝物としてチアゾール開環体が同定された。この結果から、チアゾール環の酸化により生成するチオラクトン環に対し、水、GSH 又は蛋白質が反応する開環メカニズムを推定した。そこで、周辺化合物を合成し試験を行ったところ、チアゾリン環化合物が代謝活性を大きく改善した。この化合物は良好な GK 活性を示したことから、チアゾール化合物に替わる新たな GK 活性化剤候補品と考えられた。以上のように、チアゾール環化合物の代謝メカニズム及び共有結合による毒性の可能性を明らかにした。さらに、チアジアゾール環化合物が共有結合を示さないことを見出し、チアゾール環の代替官能基としてチアジアゾール環の導入が今後のメディシナルケミストリーにおいて有用であると考えられた。

論文発表に続いて発表内容とその関連の専門分野を含めた口頭試問を実施した。その内容は、本研究の背景、目的および関連分野等における知識など多岐に亘った。これらに対する回答は、適切かつ高度なものであり、博士の学位を与えるに相応しいと判断した。

提出された学位論文は独創的かつ有用性に富み、本専門研究分野の中で高く評価されるに値する内容であると判断した。

以上の結果、本論文審査委員会は、飯野智晴氏を博士 (生命科学) の学位を授与するに相応しい十分な学力と研究能力を有するものと認めた。