

論文の内容の要旨

論文題目 クマリン骨格を有する選択的MTHFD2阻害薬の合成研究

氏名 川井 準也

MTHFD2 (Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase 2) はミトコンドリアに局在する酵素であり、細胞質に存在するアイソザイムであるMTHFD1と同様に、葉酸代謝経路における反応を触媒することで、核酸生合成に重要な役割を果たしていると考えられる (Figure 1)。近年、乳癌や大腸癌など複数の癌種において、癌組織におけるMTHFD2の発現量と癌の悪性度との相関が報告されたことから、MTHFD2が癌の予後不良因子であることが示唆されており、癌の新たな治療標的の一つとして注目されている。

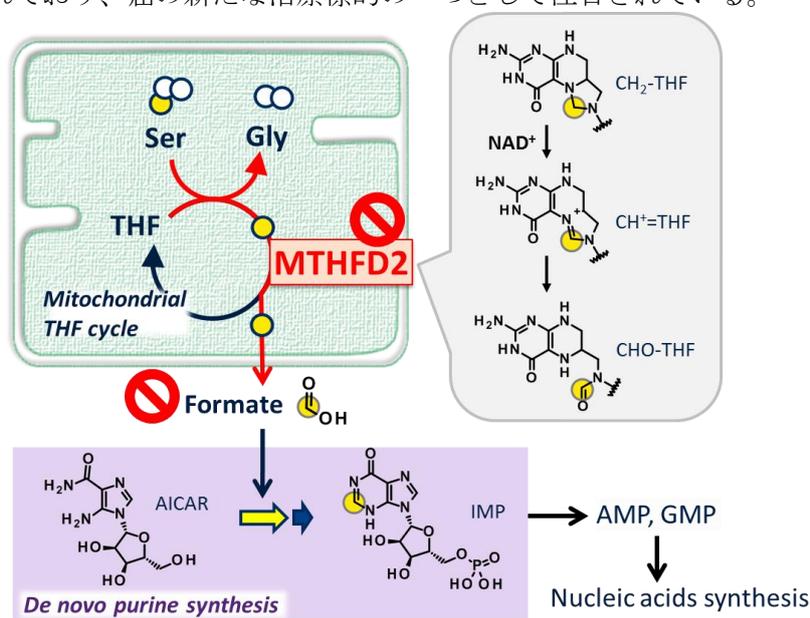


Figure 1. Role of MTHFD2 in mitochondrial 1C metabolism

正常細胞にも広く発現しているMTHFD1とは対照的に、MTHFD2は発生初期を除く正常細胞ではほとんど発現していない。このことから、MTHFD1を阻害せずMTHFD2を選択的に阻害する薬剤は、副作用の少ない新規抗癌剤になり得ると考えた。しかしながら、アイソザイムに対して選択性を有する阻害剤はこれまで報告されていなかったため、癌に対するMTHFD2阻害剤の作用は十分に検討されていなかった。そこで私は選択的MTHFD2阻害薬の獲得を目指し、研究に着手した。

第1章 クマリン骨格を有するリード化合物の獲得

既知MTHFD2阻害剤のほとんどは基質をミミックした葉酸誘導体であり、極性表面積 (PSA) が非常に大きいゆえに、膜透過性あるいは経口吸収性の獲得に対して潜在的なリス

クがあると考えた。そこでアイソザイム選択性の獲得に加え、経口薬を見据えた十分な膜透過性の確保を目的に、葉酸誘導体以外の化合物獲得を目指すことにした。

High-throughput screening (HTS) により、MTHFD2の葉酸ポケットを占有し、中程度の阻害活性 ($IC_{50} = 8.3 \mu M$) を有する化合物**1**が得られた。本化合物はMTHFD1に対しては全く阻害活性を示さないという所望の選択性を有しており、この選択性発現の主要因はMTHFD2のみが有するAsn87と化合物**1**のアミド部位との相互作用であると考察した。

基本SARを取得したところ、末端の酸性置換基が阻害活性に重要であることが示唆され、安息香酸誘導体がより高活性を与えることを見出した。さらに阻害活性の向上と潜在的な物性改善を目的に、母核の変換を実施し、ピリミジノンに代えてクマリン骨格を有する化合物**41**を獲得した。化合物**41**は化合物**1**と同様の結合モードでMTHFD2に結合し、MTHFD1に対する選択性も維持することが分かった。ヒット化合物よりリガンド効率 (LE) が向上し、PSAも低下した化合物**41**は、選択的MTHFD2阻害剤として有用な初期リード化合物であると考えられる (Figure 2, 3)。

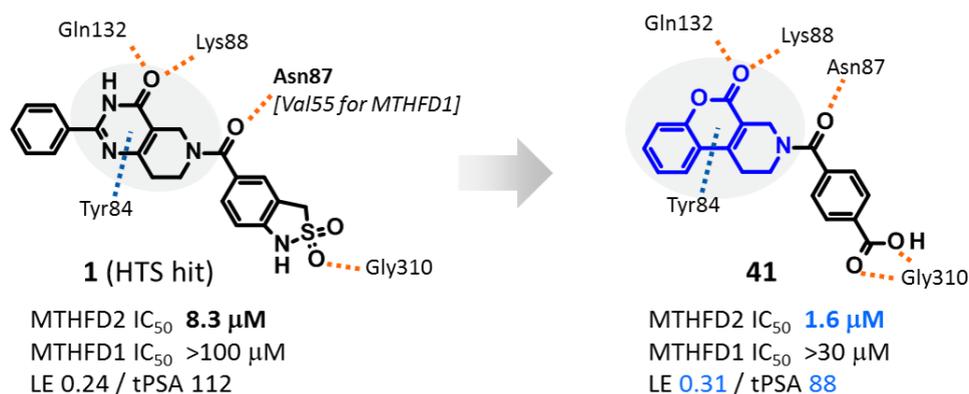


Figure 2. Profiles and representative interactions for compounds **1** and **41**.

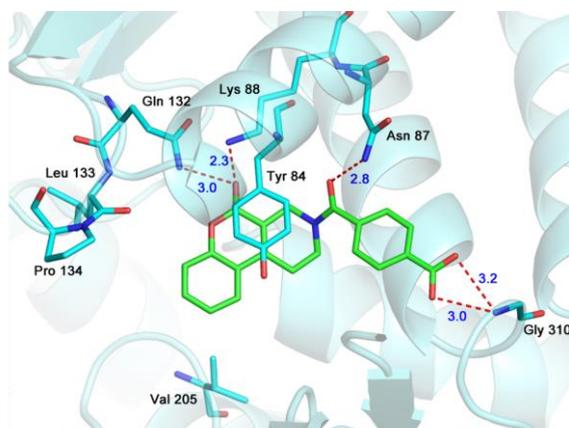


Figure 3. X-ray structure of the compound **41**/MTHFD2 complex.

第2章 Structure-based drug design による高活性な MTHFD2 阻害薬の獲得

リード化合物**41**の酵素阻害活性を向上させるべく、クマリン骨格上の置換基を検討した。複合体の結晶構造を参考に遠隔位の相互作用を狙ったところ、クマリン8位に塩基性置換基を導入した化合物にて阻害活性が大きく向上することが分かった。さらに芳香環上のメチルスキャンにより、7位にメチル基を導入することでさらなる阻害活性の向上が確認された。以上2つの発見と、カルボン酸部位の組み合わせ検討によって、高活性かつ高いイソザイム選択性を有する化合物**56**を獲得した (Figure 4)。化合物**56**はヒト乳癌由来の細胞株であるMDA-MB-231細胞増殖阻害試験において、弱いながらも増殖阻害活性を示した。

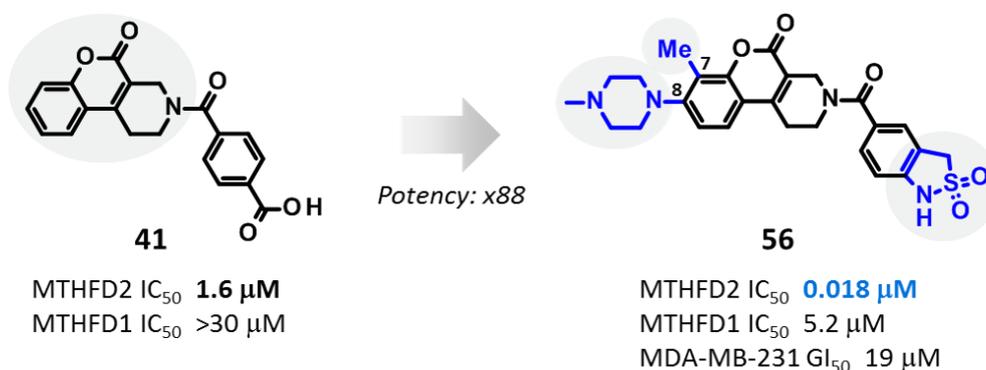


Figure 4. Structure-based functionalization of the coumarin core.

第3章 In vivo で抗腫瘍効果を示す MTHFD2 阻害薬の獲得

化合物**56**は膜透過性が非常に低いことが判明し、これが細胞増殖阻害活性の低さに繋がっていると推察した。膜透過性の低い原因がスルタムの高い酸性度 (pK_a 5.7) にあると考え、スルタムを代替する置換基の検討を行った。スルタムに代えて酸性度の低いスルホンアミドを導入したところ、酵素阻害活性は減弱するものの膜透過性が大幅に向上し、その結果、細胞増殖阻害活性はむしろ向上するという重要な知見を得た。置換基効果を詳細に検討し、スルホンアミドのオルト位置置換基が活性と膜透過性の双方に重要であることを見出し、高活性と高い膜透過性を両立した化合物**79**を獲得した。さらにピペラジニル基の最適化により、非常に強い酵素阻害活性と細胞増殖阻害活性を有し、MTHFD1に対して90倍の選択性を示す化合物**87** (DS18561882) を獲得することができた (Figure 5)。

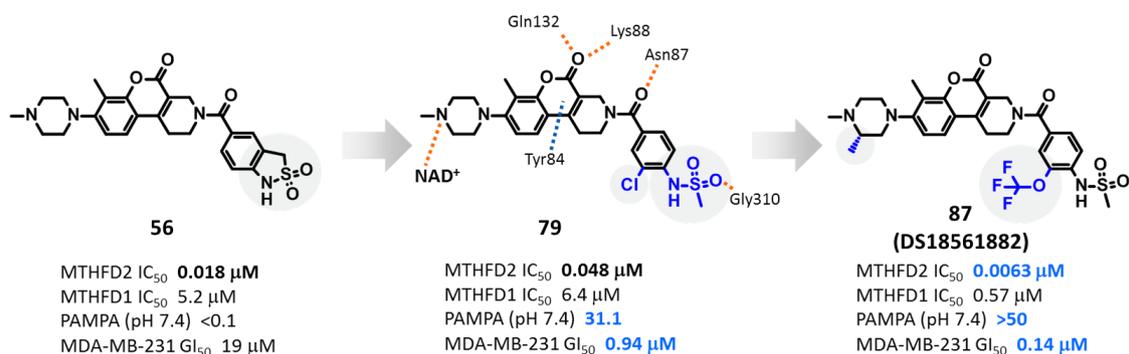


Figure 5. Replacement of the sultam moiety with sulfonamide and optimization.

化合物**79**/NAD⁺/MTHFD2三者複合体のX線結晶構造により、SARの理解には補酵素NAD⁺の存在が重要であることが判明した。クマリン8位に導入したピペラジニル基は、NAD⁺のリン酸部位と塩橋を形成することで高活性化に寄与したことが強く示唆された (Figure 6)。

代表化合物**79**およびDS18561882はいずれも経口剤として良好なin vitro ADMEパラメータを有し、マウスにおいて高い経口吸収性を示した。さらにMDA-MB-231株を皮下移植したマウスを用いるxenograftモデルにおいて、両化合物は経口投与にて腫瘍増殖抑制作用を示した。特にDS18561882の300 mg/kg, BID投与群では、有意な体重減少をさせることなく、ほぼ完全に腫瘍径増加を抑制した (Figure 7)。

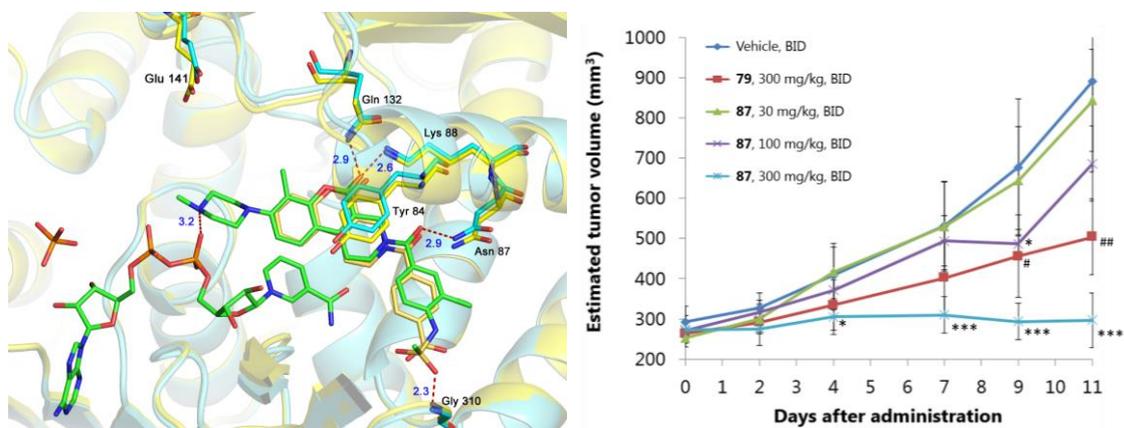


Figure 6. (Left) Superposition of the **79**/NAD⁺/MTHFD2 complex and the **41**/MTHFD2 complex.

Figure 7. (Right) Anti-tumor effect of **79** and **87** (DS18561882) in mouse xenograft model.

以上のように、これまで報告の無かった選択的MTHFD2阻害薬を初めて獲得し、構造最適化を経て、マウスへの経口投与により抗腫瘍効果を認めるDS18561882を創出した。本研究で得られた知見は、今後の薬剤開発にとって有用な情報であると考えられる。