

審査の結果の要旨

氏名 前崎 博信

前崎 博信は「基質結合様式に基づくプロテアーゼ阻害薬基本骨格の分子設計—ジペプチジルペプチダーゼ 4 による検証—」を論文題目とし、以下の研究をおこなった。

プロテアーゼ、とりわけ基質認識能の高いプロテアーゼは、生体機能の恒常性に関わる生体分子を生成あるいは分解するものが多く、生理作用発現の鍵因子として幅広い疾患領域で治療薬研究の重要な標的群として注目されてきた。その高い基質認識能は、触媒活性中心近傍の複数の結合ポケットで基質アミノ酸残基と相互作用することにより達成される。これら結合ポケットおよび活性中心との相互作用を利用し、多くのプロテアーゼ阻害薬が種々の疾患治療薬として創製されてきた。しかし、それらのほとんどは基質ペプチドに由来するペプチドミメティクスに分類される。ペプチドミメティクスに比べて多くの長所があるにもかかわらず、低分子プロテアーゼ阻害薬の実例が少ないのは、複数のポケットで認識された基質と酵素との結合を阻害する分子が必要となるため、一般に低分子化合物ライブラリーからのハイスループットスクリーニング (HTS) の成功率が低いこともその一因である。したがって、低分子プロテアーゼ阻害薬の研究開発を促進するためには、低分子リード創出のための有効な戦略の確立が必須であると考えられる。

過去に創製されたプロテアーゼ阻害薬の結合様式を考察すると、プロテアーゼ阻害には活性中心近傍との合計 3 点以上の相互作用が必要であると考えられた。一方、概して阻害薬は酵素活性中心のアミノ酸残基とその近傍の 2 つ以上の結合ポケットとの相互作用を利用していたが、実例は少ないものの、活性中心とは相互作用せずその近傍の 3 つ以上の結合ポケットとの相互作用を利用する阻害薬もあった。すなわち、活性中心との結合がなくても、S1'、S1、S2 など 3 つ以上の結合ポケットとの相互作用を可能にすれば有効な阻害活性を発揮しうると考えられた (図 1 参照)。

この考察を基に、基質ペプチドをリードとしてペプチドミメティクスを探索する戦略ではなく、①S1、S2 ポケットなど 2 つの結合ポケットと相互作用しうるヘテロ環スキャフォールドを構築し、②これに新たな相互作用点を追加導入し、合計 3 つの結合ポケットとの相互作用により、活性中心との相互作用なしに阻害活性などのリードとして必要な特性を高める戦略 (スキャフォールド戦略 Type B、図 1) を着想した。

そこで本研究の目的を、着想し

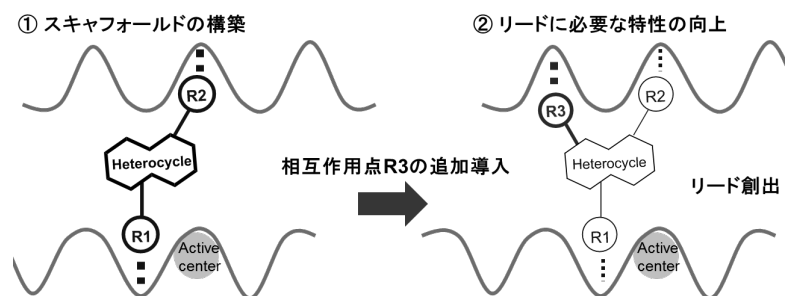


図 1 スキャフォールド戦略 Type B の概要

たスキファールド戦略の、基質認識能の高いプロテアーゼに対する阻害薬リード創出戦略としての有効性確認とし、その題材として糖尿病治療薬のターゲットの一つであるジペプチジルペプチダーゼ (DPP) 4 を選んだ。

DPP4 は、その基質ペプチドの N 末端から 2 番目にある Ala または Pro の C 末端側アミド結合を加水分解する。その際、S1 ポケットにより切断部の N 末端側 Pro/Ala 残基を認識し、かつ S2 ポケットで基質の N 末端アミノ酸残基のアミノ基と側鎖の両方を認識することで基質を選別する。これまでに数多くの DPP4 阻害薬が上市されているが、酵素活性中心と直接結合しないグループの阻害薬はいずれも独自性の高い多様な化合物クラスの阻害薬となっており、活性中心との直接結合を狙わない本戦略が適用できれば、独自性の高い創薬リードの創出が期待できると考えられた。

上述の基質結合様式の情報に基づき、S2 ポケットに対シアミノアルキル基および脂溶性基を、また S1 ポケットに対シアリール基などの脂溶性基を、それぞれ適切に配置したヘテロ環スキファールドが阻害活性発現のための基本構造とになりうると考えた。本戦略検証の予備検討では、HTS ヒット化合物 **1a** を基にイソキノロン系テンプレート (**1e**) を構築し、これに新たな相互作用点として 6 位置換基を導入することで、阻害活性が約 80 倍向上した誘導体 **2a** を得ることに成功している (図 2)。DPP4 と **2a** との共結晶構造からは、**2a** がスキファールド部分で活性中心近傍の S2 および S1 ポケットと

結合し、追加導入した 6 位置換基で S1' ポケットと相互作用していることが確認できた。そこで創薬リード候補獲得による本戦略の

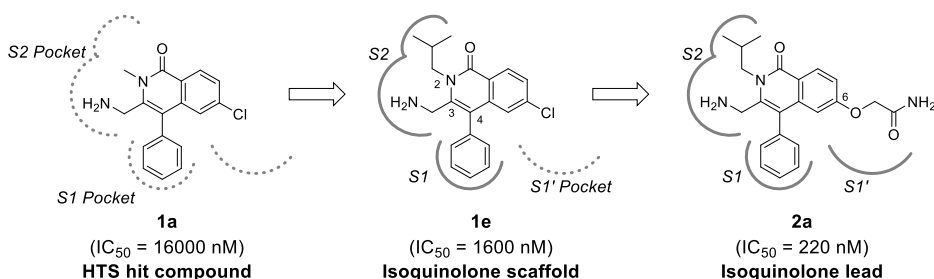


図 2 イソキノロン系スキファールドを用いた DPP4 阻害薬創出検討

完成を目指し、**2a** と同様の結合様式を取り、かつイソキノロンよりも優れた新たなスキファールドを用いるリード創出を検討した。

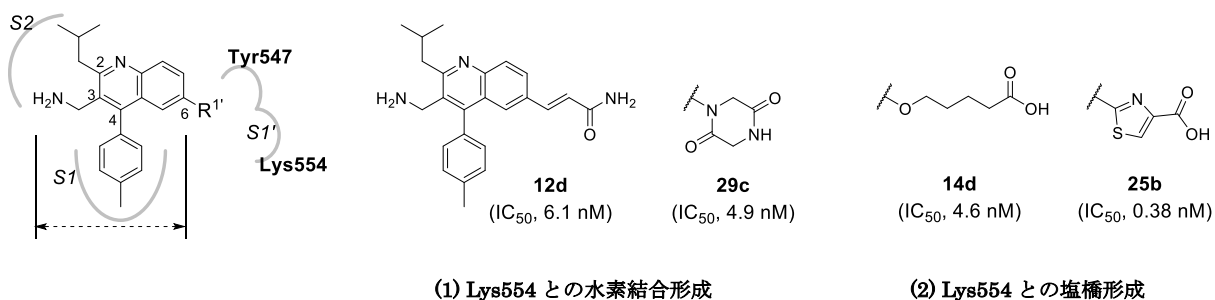
(1) 新規キノリン系ジペプチジルペプチダーゼ 4 阻害薬の創出

新規スキファールドを見出すべく、置換基配置を **2a** に対応させることができ、かつ合成例のある複数の縮合環化合物について、ドッキングプログラム GOLD を使って **2a** の共結晶構造に基づくドッキングモデルでの酵素との親和性をスコア化した。その結果、基本骨格がキノリンの場合が最も良好なスコアを示した。この結果は実際に代表化合物を合成して確認できたため、以降はキノリン系スキファールドに的を絞って検証を進めることにした。

まずキノリン系スキファールドを構築すべく、DPP4 の S2 および S1 ポケットと相互作用する 2 位脂溶性置換基および 4 位アリール基の構造活性相関を調べた。その結果、2 位はイソブチル基が、4 位は *p*-トリル基が最適であることを確認した。これら最適置換基と 3 位アミノメチル基をキノリン環に導入することにより、図 3 に示すキノリン系スキファールド構築を完成させた。

次に、このスキファールドに S1' ポケットとの相互作用を付与することで目的とする高活性な DPP4 阻害薬が得られるかどうかを検証した。S1' ポケットには Tyr547 などの疎水性アミノ酸残基が

多いが、その遠壁面に Lys554 が存在する。実際に **2a** の共結晶構造でも、6 位置換基末端と Lys554 側鎖との水素結合が確認できている。この Lys554 との相互作用を分子設計に取り入れれば、活性中心との相互作用なしでも高活性を示す独自性の高い DPP4 阻害薬リードを創出しようと考え、6 位 R^{1'}基末端への、Lys554 との (1) 水素結合形成および (2) 塩橋形成を指向した 2 通りのデザインの置換基導入を検討した (図 3)。(1) のうち、鎖状置換基ではリンカーに π 電子を有するアクリルアミド体 **12d** が、環状置換基ではカルボニル基を持つピペラジン誘導体 **29c** が 10⁻⁹ M オーダーの高い活性を示した。(2) では、キノリン環と Lys554 との距離よりも長い炭素鎖長 $n=4$ の **14d** が高い活性を示し、**14d** がリンカーを S1'ポケットに畳み込んで疎水性相互作用を増すことで活性向上に



キノリン系スキファールド

図 3 完成したキノリン系スキファールドと S1'ポケットを標的とした DPP4 阻害薬創出検討

寄与していることが示唆された。実際に、カルボン酸との塩橋形成だけでなく S1'ポケットの Tyr547 との π - π 相互作用をデザインに取り込んだ芳香環リンカーを有する **25b** は、10⁻¹⁰ M オーダーの非常に高い阻害活性を示した。DPP4 とのドッキングモデルからも、本スキファールドに Lys554 と Tyr547 の両方のアミノ酸残基と相互作用する置換基を導入することで、活性中心 Ser630 との相互作用なしに非常に高い阻害活性を示す独自性の高い阻害薬が得られることが示唆された (図 4)。

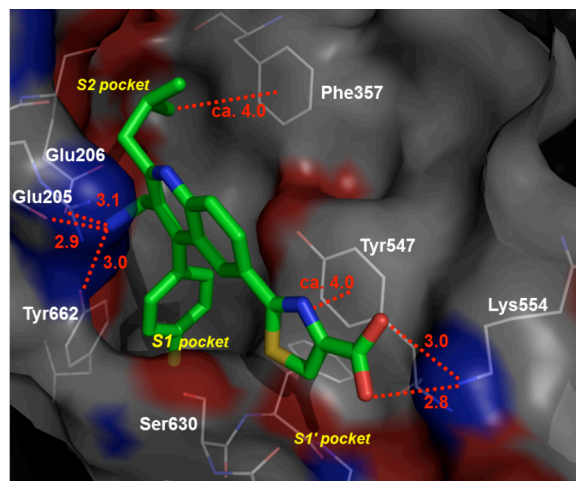


図 4 DPP4 と **25b** とのドッキングモデル

(2) 新規ピリジン系ジペプチジルペプチダーゼ 4 阻害薬の創出

キノリン誘導体のドッキングモデルでは、キノリン環のベンゼン環部分は特に相互作用に関与せず、6 位置換基の方向性を規定する役割のみが示唆された。この仮説に基づき、スキファールド戦略の新たな応用例として、Lys554 との塩橋形成を導入したファーマコフォア (図 5) を構築し、スキファールドの構造を単純化したピリジン系 DPP4 阻害薬の創出を検討した。

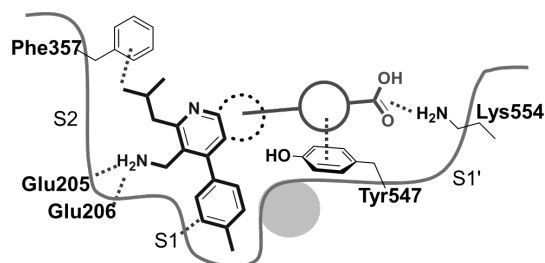


図 5 DPP4 阻害薬のファーマコフォアモデル

その結果、直鎖アルキルリンカーを有する **49a** に比べ、Tyr547 との相互作用をデザインに取り入

れた **49e** や **54** では阻害活性が向上した (表 1)。一方、**25b** のキノリン環を開環したデザインにより、 10^{-9} M オーダーの高い活性を示す **57a,b** を得ることに成功した。

表 1 ピリジン系スキファールドを用いた DPP4 阻害薬の創出検討

Compound	R ^{1'}	IC ₅₀ (nM)	Compound	R ^{1'}	IC ₅₀ (nM)
49a		470	57a		5.5
49e		17	57b		2.6
54		7.2			

(3) 新規ジペプチジルペプチダーゼ 4 阻害薬の生物学的特性

得られた **25b** の抗糖尿病薬リードとしての可能性を評価したところ、経口投与後のラット血中 DPP 活性を持続的に阻害し、ラット経口糖負荷試験では 1 mg/kg, p.o. で、活性中心と共有結合するタイプの市販薬である vildagliptin とほぼ同等の血糖上昇抑制作用およびインスリン分泌促進作用を示し、創薬リードレベルの薬効を示すことが確認できた。また本戦略で得られた阻害薬は、DPP8 などアイソザイムに対して高い選択性を有していることも分かった。

まとめ 本研究は、有機合成低分子プロテアーゼ阻害薬のリード創出戦略として着想したスキファールド戦略—①酵素活性中心ではなく 2 つの結合ポケットと相互作用するスキファールドの構築、②新たな結合ポケットとの相互作用点の導入—の有効性の確認を目的とした。本戦略を DPP4 阻害薬リード創出に適用した結果、S1 および S2 ポケットと相互作用する 3 置換キノリンならびに 3 置換ピリジンスキファールドとして見出し、新たな結合部位として S1' ポケット (Lys554 および Tyr547) との相互作用を獲得することにより、高活性かつ高選択的なリード化合物の創出に成功した。本戦略で得られたリード化合物は、一般的なペプチドミメティクス阻害薬とは異なり、酵素活性中心と直接結合することなく 10^{-9} M レベル以上の非常に高い阻害活性を示し、経口投与での創薬リードレベルの薬効を示す阻害薬であった。

以上の結果から、本研究は、スキファールド戦略が独自性の高い低分子プロテアーゼ阻害薬のリード創出の方法論として有用であることを示した。一般的に活性中心と相互作用しないプロテアーゼ阻害薬の創製は困難と考えられ、このような難易度の高い低分子プロテアーゼ阻害薬創出において有効な方法論を提案した。

以上の業績は、メディシナルケミストリーにおける分子設計指針を整理・提案するものであり、その実効性を示し、薬科学の進歩に有意に貢献するものである。よって本論文は博士 (薬科学) の学位に値するものと判断する。