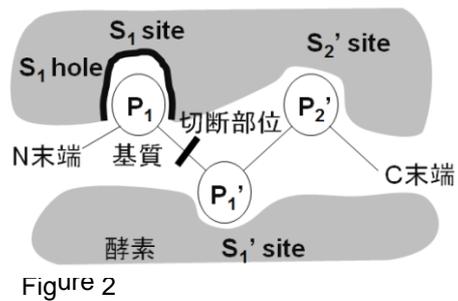
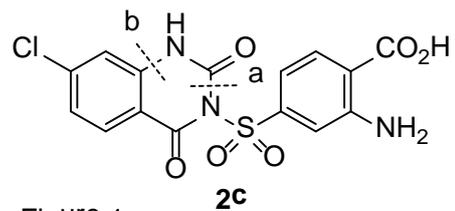


氏名・（本籍）	たなか たいさく 田中 太作（岐阜県）
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	博士乙第 4815 号
学位授与の日付	平成 28 年 2 月 19 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	アトピー性皮膚炎治療薬を志向した、キマーゼを阻害する化合物の分子設計と合成に関する研究
論文審査委員	（主査）教授 須貝 威（農学博士） （副査）教授 増野 匡彦（薬学博士） 教授 大澤 匡範（博士（学術））

## 論文内容の要旨

### ① キマーゼ阻害剤に関する従来研究

キマーゼは、キモトリプシン様セリンプロテアーゼの一種であり、陽性を示すマスト細胞は主として皮膚に分布することから、アトピー性皮膚炎における役割が注目されている。本酵素は、アレルギー刺激によりマスト細胞から脱顆粒に伴い細胞外に放出、その局所でのみ作用するため、阻害しても全身的な影響は少ない。加水分解酵素に対する基質の各アミノ酸残基は、切断部位から N 末端側に P<sub>1</sub> site、C 末端側に P<sub>1</sub>'、P<sub>2</sub>' site と数える (Figure 2)。一方、酵素の活性中心には、基質の P<sub>1</sub> と相互作用する S<sub>1</sub> site、P<sub>1</sub>'、P<sub>2</sub>' と作用する S<sub>1</sub>'、S<sub>2</sub>' site が存在する。さらに、S<sub>1</sub> site の中に、加水分解酵素に特徴的な S<sub>1</sub> hole と呼ばれる、ポケット構造が存在する。他の酵素を阻害することによる副作用発現の可能性を検証するため、キマーゼの S<sub>1</sub> hole の形状およびアミノ酸配列を他のセリンプロテアーゼと比較した。

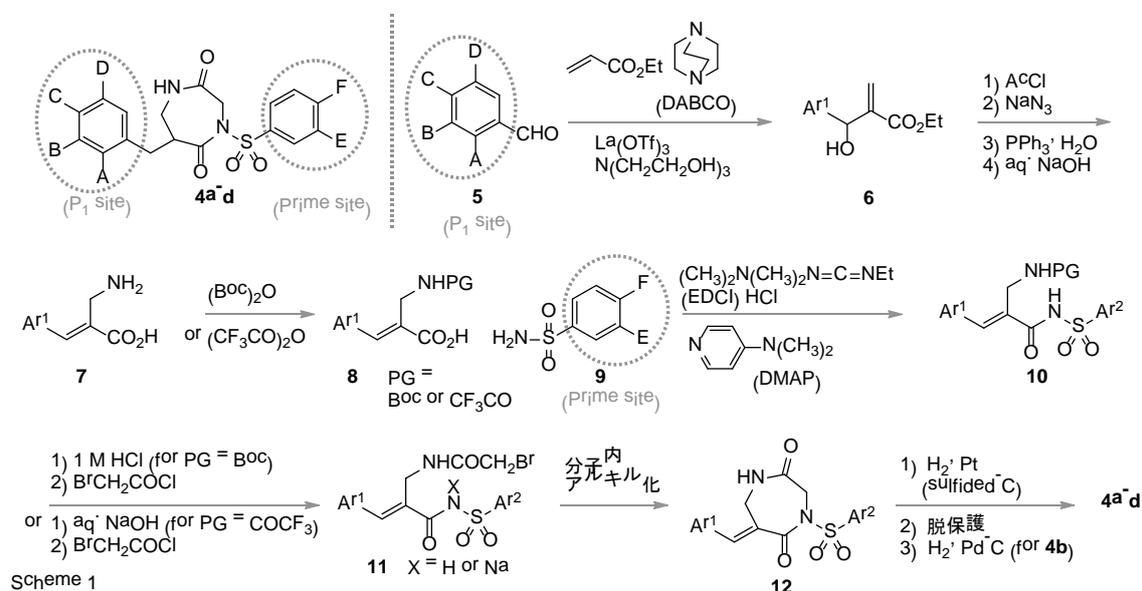


その結果、高い特異性を示すキマーゼ阻害剤が得られると期待した。本研究開始以前に、既にキマーゼを阻害する物質が広く探索され、基質に類似したペプチド構造を持つ阻害剤、さらに、ペプチド構造を模倣した阻害剤が見出された。しかし、これらの阻害剤は、消化管吸収性や生体内安定性が低いと考えられた。一方、化合物ライブラリーや *in silico* スクリーニングにより探索研究が進められ、S<sub>1</sub> hole と相互作用しうる部分構造を持つ低分子阻害剤が見出された。演者が所属していた、サントリー生物医学研究所においては、キナゾリン環を持つ阻害剤 **2c** が見出されていた (Figure 1)。しかし、**2c** は、強い阻

害活性 ( $IC_{50} = 0.13 \mu M$ )を示したものの、血漿中半減期が7分と極めて短く、*in vivo* 皮膚炎モデルにおける抑制効果が不十分で、アトピー性皮膚炎治療薬としては不適であった<sup>\*1-3</sup>。著者は、生体内で不安定であったことが *in vivo* 活性が弱い大きな原因と考え、この克服を最大のキーワードとし、骨格をさまざまに改変することにした。

## ② 生体内安定性向上-1: ジアゼパン骨格への置き換え

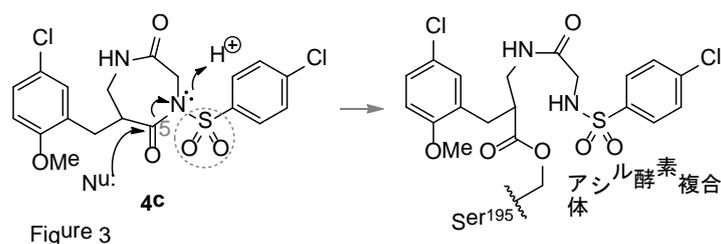
阻害剤 **2c** には、3ヶ所の電子求引基が隣接する不安定なスルホニルイミド構造が存在し、このため生体内の安定性が低いと考えた。この不安定な構造から脱却しようと、一方の電子求引基との間(---a, Figure 1)にメチレン基を挿入、左端の芳香環を切り離し(---b)、ジアゼパン構造とした **4a-d** を設計した。化合物 **4a-d** は、Scheme 1 に従い合成した。本合成法は、 $P_1$  site に対応する芳香環、prime site に対応する芳香環を含む前駆体をそれぞれ合成し、合成経路半ばで連結するので、さまざまな置換基が導入可能である。



ヒトキマーゼに対する阻害活性測定<sup>\*2</sup>では(Table 1)、いずれの化合物も、もとのキナゾリン型化合物と遜色ない阻害活性を示した。これにより、ジアゼパン骨格が妥当であったと判断した。しかし、

**4c** の血漿中半減期の測定<sup>\*3</sup>を依頼したところ、18分と**2c**より延長したが、まだ不十分であった。この不十分な生体内安定性の原因を解明するた

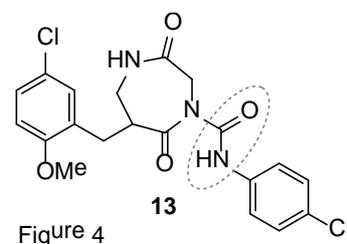
4	A	B	C	D	E	ヒトキマーゼに対する $IC_{50}$ ( $\mu M$ ) <sup>*2</sup>
<b>a</b>	H	H	H	H	H	0.42
<b>b</b>	OMe	H	H	H	H	0.14
<b>c</b>	OMe	H	H	Cl	H	0.034
<b>d</b>	OMe	H	H	Cl	NH <sub>2</sub>	0.062



め、酵素阻害を詳細に検討、その持続性からアシル酵素複合体を形成すると想定した。この複合体は、X線結晶構造解析<sup>\*3</sup>により確認した。これにより、非可逆的な反応が低い安定性の原因と判断した。

### ③ 生体内安定性向上-2: カルバモイル基への置き換え

ジアゼパン型化合物では、環内窒素原子に強い電子求引性を示すスルホニル基が直接結合している(Figure 3)。このことが、ジアゼパン環5位のカルボニル基が求核剤の攻撃を受けやすく、生体内安定性が低い原因である。そこで、スルホニル基を電子求引性が弱いカルバモイル基に置き換



えた **13** を設計(Figure 4)、Scheme 1 中の **8** から同様の方法で合成した。薬物動態試験<sup>\*3</sup>の結果(Table 2)、**13** は血漿中半減期が 60 分以上と、**4c** と比べ大幅な改善を示した。長時間経過した後も血漿中で化合物 **13** がそのまま確認できたことから、狙い通り、求核攻撃が抑制されたと考えた。しかしその一方で、阻害活性は大きく下がってしまった。そこで、

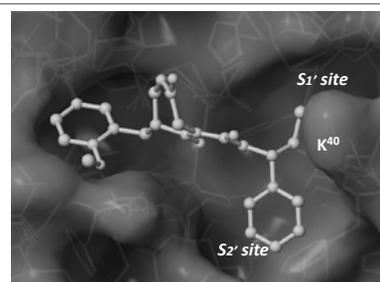
Table 2

化合物	血漿中半減期 (マウス) (min) <sup>3</sup>	ヒトキマゼに対する IC <sub>50</sub> (μM) <sup>2</sup>
<b>4c</b>	18	0.034
<b>13</b>	>60	5.4

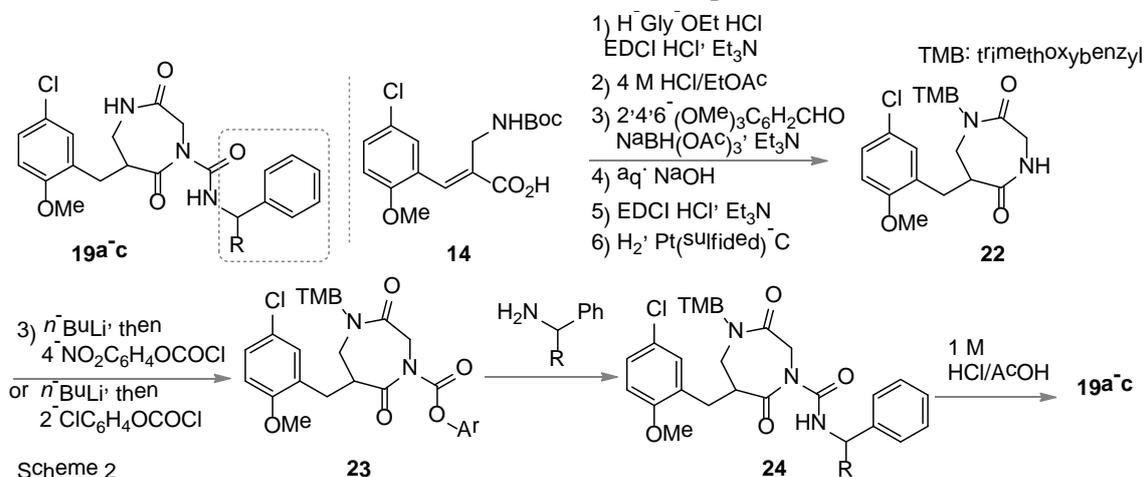
**13** をベースとし、活性回復を目指し、分子設計し直すことにした。

### ④ 阻害活性の回復-1: ベンジル型への置き換え

化合物 **13** の活性が低かったことから、狭い S<sub>1</sub>' site に対応するより、広い S<sub>2</sub>' site と良好に相互作用するように構造を改変すべきと考え、prime site の芳香環と窒素



原子の間に一炭素を挿入したベンジル型化合物 **19a** を設計した。さらにアルキル基をベンジル位に置換した **19b, c** を考えた。構造が屈曲し、prime site 芳香環が S<sub>2</sub>' site に配置



されうると期待した。これらの候補化合物の中から、エチル基を持つ **19b** とキマーゼの複合体モデル作成<sup>\*3</sup>を依頼、ドッキングスコアが最も高かった異性体を Figure 5 に示す。芳香環が  $S_2'$  site に、エチル基が  $S_1'$  site に無理なく収容されると考えられた。ベンジル型とした化合物は、Scheme 2

に従って合成した。本経路は、同一の骨格に対し prime site をさまざまに変えた化合物を効率良く合成できる。しかし、ヒトキマーゼに対する阻害活性測定<sup>\*2</sup>の結果、構造変更前の **13** と比べほとんど活性が向上していなかった。

### ⑤ 阻害活性の回復-2 : prime site 芳香環の修飾および変換

これまでの検討から、prime site 芳香環近傍に、 $K^{40}$  の側鎖アミノ基、 $R^{143}$  の側鎖グアニジル基、 $F^{41}$

の主鎖アミドカルボニル基が存在することが判っていた。そこで、これらと相互作用し

うるカルボキシル基やアミノ基を prime site 芳香環に導入すれば、阻害活性が向上すると考え、

**25** を設計、Scheme 2 と同様の方法で合成した。

化合物 **25a-d** の活性<sup>\*2</sup>は、**19b** と比べ大幅に向上し、 $S_2'$  site と相互作用しうる置換基の導入が活性回復に有効であった。

### ⑥ 立体異性体の分離と立体化学解明

これまで、複合体モデルを頼りに分子を設計してきたが、合成品は立体異性体の混合物であり、特定の立体異性体が有効である可能性が高い。そこで、**25a** について立体

化学を決定することにした。2ヶ所の不斉中心のうち、エチル基の付け根の部分、不斉合成によって、多くの情報を得ることが可能である。しかし、ジアゼパン部の不斉中心については、不斉合成も誘導も困難で、絶対立体配置決定は挑戦的課題である。そこで、

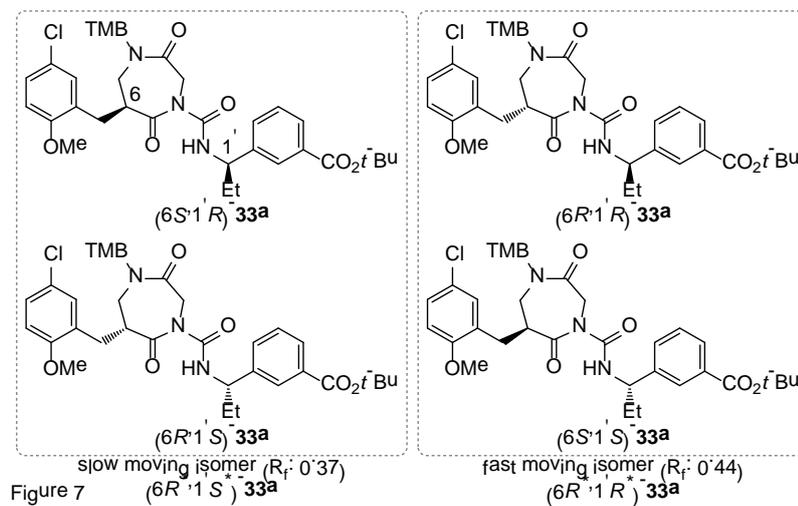


Figure 7

Table 3

19	R	ヒトキマーゼ に対する IC <sub>50</sub> (μM) <sup>*2</sup>
a	H	4.9
b	Et	2.8
c	nPr	69.3

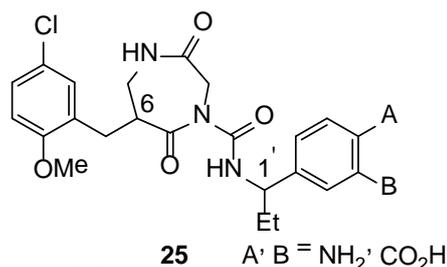


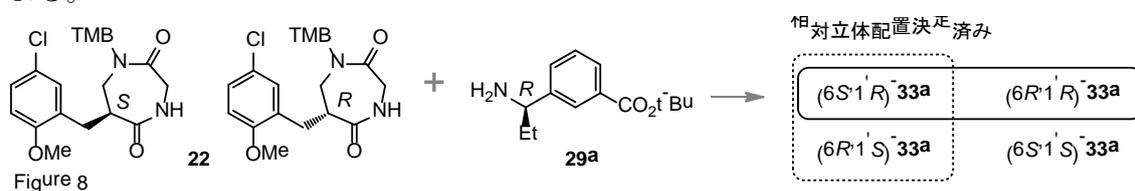
Figure 6

Table 4

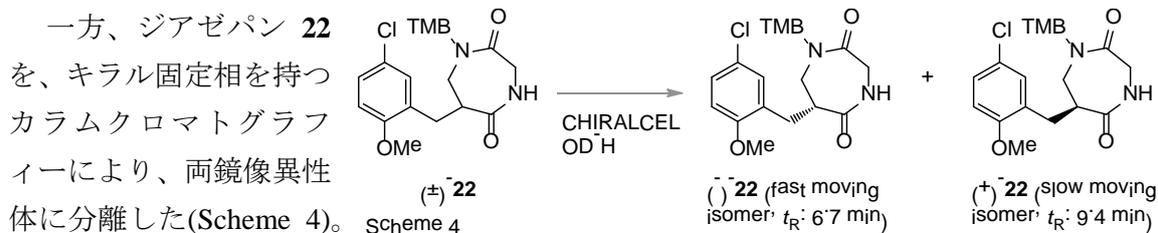
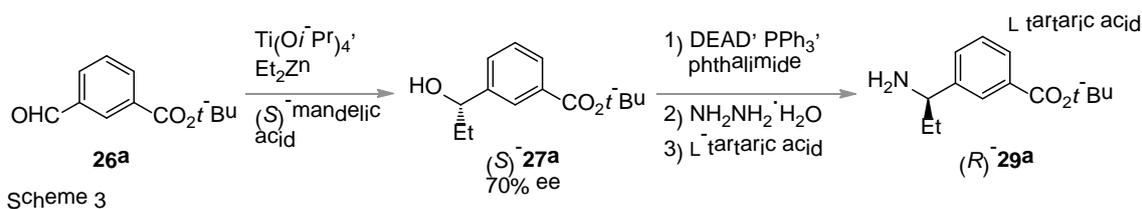
25	A	B	ヒトキマーゼ に対する IC <sub>50</sub> (μM) <sup>*2</sup>
a	H	CO <sub>2</sub> H	0.54
b	NH <sub>2</sub>	CO <sub>2</sub> H	0.63
c	CO <sub>2</sub> H	H	0.47
d	CO <sub>2</sub> H	NH <sub>2</sub>	0.50

以下に示す間接的、演繹的手法で解明を試みた。まず前駆体 **33a** を選び、ジアステレオマーをカラムクロマトグラフィーにより分離、ラセミ体とした(Figure 7)。このうち slow moving isomer は結晶化したので、単結晶 X 線測定<sup>\*3</sup>を依頼、相対立体配置は(6*R*\*,1'*S*\*)であった。

ベンジルアミンを純粋な立体異性体としてから合成すれば、(6*S*,1'*R*)-体と(6*R*,1'*R*)-体の2種類(実線枠)しか生じない(Figure 8)。これらの化合物はジアステレオマーの関係にあるので、カラムクロマトグラフィーにより分離可能である。両者の薄層クロマトグラフィー上の挙動やNMRスペクトルを相対立体配置が決定済みの点線で示すサンプルと比較、一致する立体異性体が(6*S*,1'*R*)-体であり、残りもこの情報をもとに立体化学が決まる。



まず、(*R*)-体の絶対立体配置を持つベンジルアミンを Scheme 3 に従い不斉合成した。**(*R*)-29a** は、X 線結晶構造解析<sup>\*3</sup>により、立体化学が(*R*)-であることを確認した。

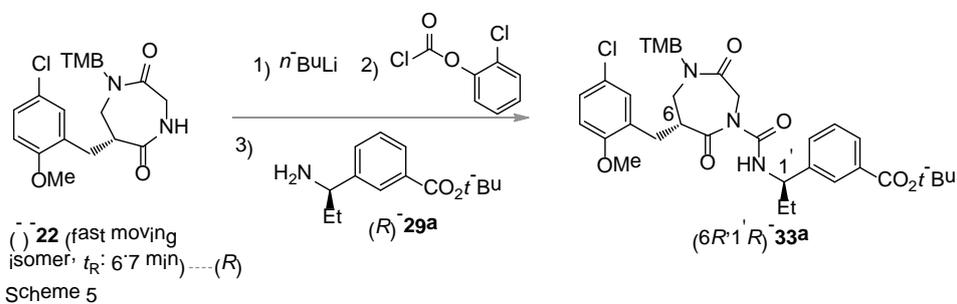


このうち、保持時間 6.7

分の **22** を

(*R*)- **29a** と縮合、**33a** を合成した (Scheme 5)。

この化合物の薄層クロ



マトグラフィーにおける  $R_f$  値および NMR スペクトルは、(6*R*\*,1'*R*\*)-**33a** と一致した。遡って、fast moving isomer は(*R*)-体、さらに、slow moving isomer は(*S*)-体と結論された。

**25a** の 4 種異性体は、このようにして全立体化学が明らかになった。立体化学と活性の関係性を **Table 5** に示す。最も高いドッキングスコアを示していた(6*R*,1'*R*)-体が、予測通り強い活性を示した。さらにアミノ基を導入した **25d** の全立体異性体を合成し、阻害活性の測定<sup>\*2</sup>を依頼した(**Table 6**)。この化合物では興味深いことに、(6*R*,1'*R*)-体と比べ、ジアステレオマーである(6*S*,1'*R*)-体の活性が、わずかながら上回っていた。

Table 5

25	絶対立体配置		置換基		ヒトキマーゼ に対する IC <sub>50</sub> (μM) <sup>*</sup>
	6	1'	A	B	
<b>a</b>	R	R	H	CO <sub>2</sub> H	0.24
	S	S	H	CO <sub>2</sub> H	>10
	S	R	H	CO <sub>2</sub> H	3.1
	R	S	H	CO <sub>2</sub> H	>10

Table 6

25	絶対立体配置		置換基		ヒトキマーゼ に対する IC <sub>50</sub> (μM) <sup>*</sup>
	6	1'	A	B	
<b>d</b>	R	R	CO <sub>2</sub> H	NH <sub>2</sub>	0.30
	S	S	CO <sub>2</sub> H	NH <sub>2</sub>	>10
	S	R	CO <sub>2</sub> H	NH <sub>2</sub>	0.17
	R	S	CO <sub>2</sub> H	NH <sub>2</sub>	>10

#### ⑦ *in vivo* 皮膚炎モデルにおける有効性向上

(6*R*,1'*R*)-**25d** および(6*S*,1'*R*)-**25d** の生体内安定性<sup>\*3</sup>と *in vivo* 皮膚炎モデルにおける有効性<sup>\*2</sup>評価を依頼した(**Table 6**)。その結果、血漿中半減期は、60分

Table 6

化合物	ヒトキマーゼ に対する IC <sub>50</sub> (μM) <sup>*2</sup>	マウス 血中半減期 T <sub>1/2</sub> (min) <sup>*3</sup>	有意な抑制を示す 投与量(mg/kg) <sup>*2</sup>
<b>2c</b> (先行研究)	0.13	7	50 (腹腔内)
(6 <i>R</i> ,1' <i>R</i> )- <b>25d</b>	0.3	60	2.0 (経口)
(6 <i>S</i> ,1' <i>R</i> )- <b>25d</b>	0.17	54	0.4 (経口)

程度と生体内安定性が向上していた。さらに動物モデルでは、**2c** が 50 mg/kg を腹腔内投与でようやく抑制効果を示したのに対し、それぞれ 2.0, 0.4 mg/kg という低い用量で経口投与するという条件でさえ、皮膚炎を有意に抑制した。

#### 結論

演者は、既存の **2c** を出発点としてキマーゼ阻害剤の最適化研究を試みた。まず、生体内安定性の向上を目指し、不安定なスルホニルイミド構造をメチレン鎖の導入により解消した。強い活性を示す **4c** を見出したが、安定性は不十分であった。そこで、スルホニル基を、さらに電子求引性が弱いカルバモイル基に変換した(化合物 **13**)。その結果、生体内安定性が大幅に向上した。しかし、阻害活性は大きく低下した。その回復を目指し、S<sub>2</sub>' site との親和性を指標に、複合体モデルをもとに分子を設計、prime site 芳香環の修飾した化合物 **25** を合成した。その結果、強い阻害活性と生体内安定性を併せ持ち、*in vivo* 皮膚炎モデルにおいて、低い投与量から有効性を示す **25d** を見出した。有効な化合物については、合成化学的手法と X 線結晶構造解析を組み合わせる方法で立体化学

を決定し、目的とする立体化学を持つ化合物を効率よく合成する手法を確立した。本研究により、臨床試験を実施した化合物の供給も果たしており、「安全性が高く、経口投与が可能なアトピー性皮膚炎治療薬」の創製に合成化学的見地から貢献した。

\*1: 著者は本研究を、サントリー(株)生物医学研究所、医薬探索研究所、第一アスピオファーマ(株)化学グループおよびアスピオファーマ(株)創薬化学ファカルティにて行った。活性試験等は、共同研究者により以下に示す部署で行われ、ここに深く謝意を表す。\*2: アスピオファーマ(株)免疫・炎症疾患フィールド; \*3: 同社創薬技術ファンクション

## 論文審査結果の要旨

博士論文発表は、平成 28 年 2 月 19 日(金) 13 時 00 分から、慶應義塾大学薬学部 1 号館地下 1 階マルチメディア講堂にて、研究科委員会のメンバーなどの出席の下、学内公開の形で実施された。なお、予備審査の段階で、副査 2 名によって論文草稿が査読されており、また、副査に対するプレゼンテーション、質問討論を通じ、内容に関する疑問点の指摘並びに改善に関する指導が行われた。

30 分間の口頭発表では、研究の背景並びに問題点、研究過程並びに研究成果が整然と提示された。その後の 15 分間の試問では、質問に対して概ね的確な応答がなされた。

本研究は、申請者がアスピオファーマ株式会社で行った「アトピー性皮膚炎治療に有効なキマーゼ阻害剤の創製」に関わる分子設計・合成を内容とし、第 1 部から第 7 部にわたる構成で発表された。第 1 部では、まず研究の背景として、生体内におけるキマーゼの意義、酵素の触媒サイト構造と阻害剤の設計コンセプト( $P_1$  site、prime site 等)に関わる、基礎事項について述べた。

次いで、その阻害がアトピー性皮膚炎治療に寄与する可能性、循環系等へ懸念される悪影響に対する予測、類似する加水分解酵素と比較して、その立体構造の差異等について言及した。さらに、本研究開始以前の探索研究、具体的には基質に類似するペプチド系およびそれらのミミック、ライブラリーからクリーニングによって見いだされてきた阻害剤について紹介した。その中からシーズとして選んだ候補化合物 **1** の *in vivo* 活性の向上を目指し、分子設計・合成の指針を示した。このシーズは、著者が所属したサントリー生物医学研究所から見出されていた化合物である。血中半減期が非常に短いという、大きな欠点を有していた。

第 2 部および第 3 部では、まず、**1** に含まれ、非常に求核攻撃を受けやすいと推定したスルホニルイミド構造をメチレン基の挿入により解消してスルホンアミド **2** とする試みを述べた。この際、キマーゼの  $S_1$  hole との親和性および原料入手の容易さを考慮

し、P<sub>1</sub> site を独立させたジアゼパン骨格としている。置換ベンズアルデヒドを含む三成分からさまざまな化合物を合成した。高い活性を示したものの、安定性はまだ不十分であった。共同研究者により酵素に対する持続的・非可逆的阻害が観察され、X線構造解析で共有結合した複合体が確認された。そこで、電子求引性の強いスルホニル基をカルバモイル基に置き換えたところ、安定性が大幅に向上した化合物 **3** を得た。しかし、活性は大幅に低下してしまった。

第4部および第5部では、活性回復を目指し、酵素の S<sub>2</sub> site との相互作用を念頭に、一炭素挿入して prime site をベンジル型とし、さらに S<sub>1</sub>' site と効果的に相互作用しうるアルキル基、S<sub>2</sub>' site と効果的に相互作用しうる極性官能基を prime site 芳香環に導入する試みを述べた。これらの検討を通じ、活性が回復した阻害剤 **4a** および **4b** を見出した。

**4a** および **4b** は2カ所の不斉中心を有し、4種の立体異性体の混合物である。第6部では、不斉合成と化合物の単結晶 X線結晶構造を組み合わせる、演繹的な新しい方法で全立体異性体の立体化学を決定する試みを述べた。

さらに、立体化学と活性の相関を明らかにした。(6R,1R')-体が **4a, b** とともに強い活性を示した。阻害剤の分子設計の段階でキマーゼとドッキングシミュレーションを試みていたが、その時点で、最もドッキングスコアが高かった立体異性体である。Prime site 芳香環にアミノ基が加わった **4b** においては、(6S,1R')-体の活性がわずかながら(6R,1R')-体のそれを上回った。

第7部では、第5部までで紹介した化合物の生体内半減期、*in vivo* 皮膚炎モデルにおける活性について言及し、最後に本研究を総括した。

発表に引き続く質問討論においては、合成化学的視点からみた本研究の特長、すなわち、不斉合成や既知物質の誘導からでは決定困難な不斉炭素原子の立体化学を、新しい間接的手法で決定する手法を開拓したこと、収束的手法で多数の誘導体が迅速に合成できるよう経路、出発原料ともに工夫を重ねた点を再度確認した。

さらに、本研究で合成した化合物を含む、さまざまな阻害剤とキマーゼの共結晶 X線構造解析から得られる情報に基づき、阻害剤-キマーゼの相互作用様式の比較も簡単ながら紹介された。他社で創製された阻害剤の多くは、S<sub>2</sub> site を含めた non-prime site のみに置換基のほとんどの部分が収容されている。それに対し、本研究で見出した **4** は、prime site との相互作用が強いという対照的な結果であった。キマーゼ阻害剤の分子設計に、これまでにない視点を加えたことも大きな知見であった。

以上田中君の発表・質問討論は、以下のようにまとめられる。当初候補とした **1** から、ドッキングシミュレーションに基づく、触媒サイト-阻害剤の部分構造の相互作用

に関する作業仮説を基盤に、さまざまな化合物を有機合成した。その結果、生体内における安定性を大幅に増した阻害剤 **4** にまで改良され、*in vivo* 活性の向上を達成した。臨床試験に用いられた化合物供給も達成し、アトピー性皮膚炎治療への可能性を示した。

提出論文並びに論文発表に対し、2名の副査からは以下のような見解が示された。

増野教授：アトピー性皮膚炎治療薬としてのキマーゼ阻害剤を創製するべく出発化合物 **1** から構造展開を行い、血中安定性の向上と活性の維持を成し遂げている。血中安定性は生体分子との反応点の電子密度制御、阻害活性はドッキングシミュレーションを駆使して行った研究で博士の学位にふさわしいと判断する。

大澤教授：ドッキングシミュレーションによる化合物の結合様式に対する作業仮説を、自ら合成した化合物とキマーゼとの複合体の X 線結晶構造解析により実験的検証を加えることにより、先行研究では標的とされていない新規部位を含む相互作用部位を標的とした合成研究を展開した点は評価でき、博士の学位に値する。

以上の経緯を踏まえ、博士論文発表会後に行われた薬学研究科委員会の合否判定会議で本研究論文に関する討議が行われたが、特に問題となる点の指摘はなく、田中太作君提出の学位論文の内容は博士の学位を授与するに値するものであると評価され、学位を授与することが決定した。

## 論文目録

- 1) Tanaka, T.; Muto, T.; Maruoka, H.; Imajo, S.; Fukami, H.; Tomimori, Y.; Fukuda, Y.; Nakatsuka, T. Identification of 6-substituted 4-arylsulfonyl-1,4-diazepane-2,5-diones as a novel scaffold for human chymase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3431-3434.
- 2) Maruoka, H.; Muto, T.; Tanaka, T.; Imajo, S.; Fukami, H.; Tomimori, Y.; Fukuda, Y.; Nakatsuka, T. Development of 6-benzyl substituted 4-aminocarbonyl-1,4-diazepane-2,5-diones as orally active human chymase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 3435-3439.
- 3) Tanaka, T.; Sugawara, H.; Maruoka, H.; Imajo, S.; Muto, T. Discovery of novel series of 6-benzyl substituted 4-aminocarbonyl-1,4-diazepane-2,5-diones as human chymase inhibitors using structure based drug design. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 4233-4249.