

氏名 (生年月日) ひら やま たか はる  
平 山 孝 治 (1979年7月29日)

学位の種類 博士(薬学)

学位記番号 論博 第207号

学位授与の日付 2017年3月18日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 有糸分裂制御に基づく抗癌薬を目指した新規 CENP-E 阻害薬の合成研究

論文審査委員 (主査) 教授 赤路 健一

(副査) 教授 斎藤 博幸

(副査) 教授 山下 正行

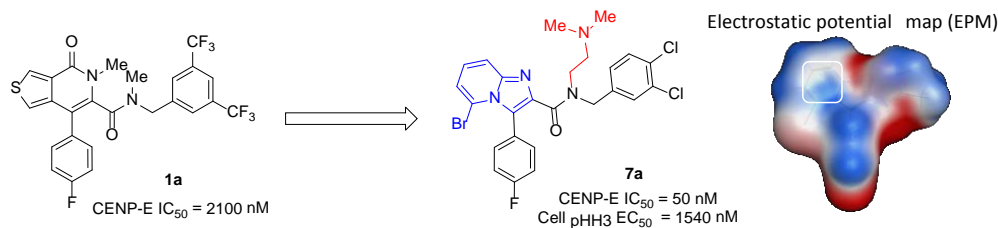
## 論文内容の要旨

### 第1章 序論

CENP-Eは有糸分裂キネシンファミリーに属するモータータンパクで、細胞分裂M期中期から後期への移行に必須の分子である。CENP-EはATPを加水分解する際に生じた化学エネルギーを利用し微小管上を移動することで、染色体を赤道面上に運搬・整列させる重要な役割を担っている。CENP-Eの機能を阻害すると、細胞分裂M期において染色体の不整列が生じ、細胞分裂の停止、次いで細胞死へと誘導されることが報告されている。このような背景を基に、CENP-Eは次世代抗癌薬ターゲットとして注目されている。CENP-EのATPase活性を阻害する低分子化合物の取得を目指し、化合物ライブラリーのハイスループットスクリーニングを実施した結果、著者は中程度のCENP-E阻害活性を有する複数のヒット化合物を見出すことに成功した。これを基に、著者は、医薬品として開発可能なプロファイルを有する低分子CENP-E阻害薬の創製研究を開始した。

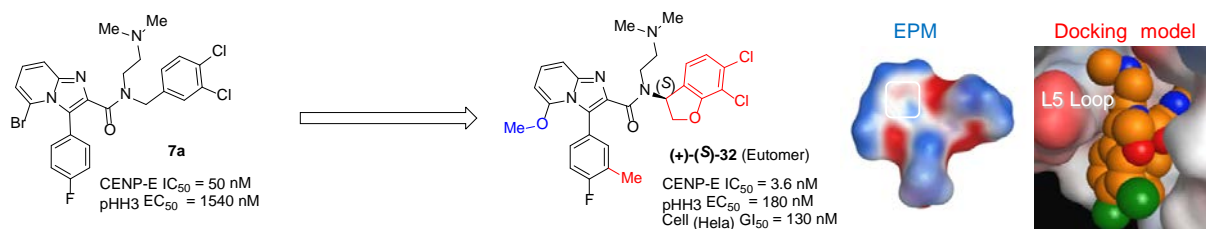
### 第2章 縮合二環性コア骨格の探索と生物評価

著者は、CENP-Eとリード化合物とのドッキングモデルを構築・活用し、ハイスループットスクリーニングから見出された化合物 **1a** に対し、種々の構造変換を検討した。その結果、2-(ジメチルアミノ)エチル基の導入がCENP-E阻害活性を顕著に向上させることを見出した。更に、種々の縮合二環性骨格を探索した結果、強力なCENP-E阻害活性を有する3-プロモチエノ[3,2-*b*]ピロール誘導体を見出した。本誘導体の構造活性相関を解釈するために、分子表面の静電ポテンシャルマップ (EPM) を解析した。本解析を基に、著者は、母骨格左環の電荷状態が中性であることがCENP-Eとの結合親和性向上に重要であるとの仮説を立てた。本仮説を基に新たにデザインした5-プロモイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体 **7a** は、強力なCENP-E酵素阻害活性 ( $IC_{50} = 50$  nM) を示すとともに、HeLa細胞に対し分裂停止作用をもたらした ( $p$ -HH3  $EC_{50} = 1540$  nM)。本章では、CENP-EとのドッキングモデルおよびEPM解析を用いた縮合二環性誘導体のデザイン・合成とその生物学的特性に関して詳述する。



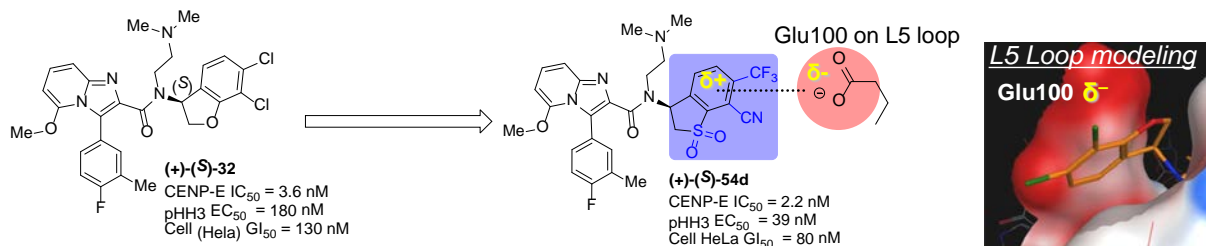
### 第3章 CENP-E タンパクの部位特異的変異体解析および新規イミダゾ[1,2-a]ピリジン誘導体探索を目的とした静電ポテンシャルマップ (EPM)の応用

著者は、イミダゾ[1,2-a]ピリジン誘導体の結合サイトを特定すべく、CENP-E タンパクの部位特異的変異体解析試験を実施し、本誘導体がCENP-EのL5サイトに結合していることを明らかとした。本結果を基に、精度を高めたドッキングモデルを構築・活用し、イミダゾ[1,2-a]ピリジン誘導体の最適化研究を進めた。5位置換基の最適化検討に、前章で有効であることを見出したEPM解析を応用し、5-メトキシイミダゾ[1,2-a]ピリジン誘導体を新たに創出した。本章における研究の過程で、CENP-EのL5 loopが、環化したベンジル部位の不斉構造を強く認識することが明らかとなった。最終的に得られた eutomer (+)-(S)-**32** は強いCENP-E 酵素阻害活性 (IC<sub>50</sub> = 3.6 nM) と HeLa 細胞増殖阻害活性 (GI<sub>50</sub> = 130 nM) を示すとともに、ヒト大腸癌由来細胞株 Colo205 異種移植マウスモデルにおいて有意な抗腫瘍効果を示した (T/C = 40% at 75 mg/kg, bid.)。本章では、部位特異的変異体解析による結合サイトの特定、およびEPM解析を応用した新規イミダゾ[1,2-a]ピリジン誘導体のデザイン・合成とその生物学的特性に関して詳述する。



### 第4章 L5 loop との効果的な相互作用獲得を目指したベンジル位縮合二環性構造のデザインと生物評価

著者は、第3章で明らかとなったL5 loopと環化ベンジル部位との特異的な相互作用を、EPM解析を応用して更に詳細に検証した。タンパク質表面のEPM解析により、標的とするL5 loopは局在するアミノ酸残基の影響で負電荷を帯びていることが明らかとなった。そこで、(+)-(S)-**32**の側鎖二環性部位であるジヒドロベンゾフラン環上の静電ポテンシャルを正電荷に調整することでL5 loopとの結合親和性を向上できると考えた。検討の結果、二環性部位が最も正に帯電する2,3-ジヒドロ-1-ベンゾチオフェン1,1-ジオキソド誘導体が、リード化合物を凌ぐ強力な細胞活性を示した。最終的に得られた、(+)-(S)-**54d**は、*In vivo*においてCENP-E阻害に基づく細胞分裂停止作用 (p-HH3集積)および良好な薬物体内動態を示した。環化ベンジル部位の最適化研究の中で、著者は医薬品のビルディングブロックとしても有用と考えられる3-アミノ-2,3-ジヒドロ-1-ベンゾチオフェン1,1-ジオキソド骨格の簡便なワンポット合成法を開発した。本章では、医薬品として開発可能なプロファイルを有するCENP-E阻害薬の創出を目指した環化ベンジル部位の最適化および新規合成法の開発について詳述する。



## 論文審査の結果の要旨

CENP-E (Centromere-Associated Protein-E) は有糸分裂キネシンファミリーに属するモーター蛋白で、細胞分裂M期中期から後期への移行に必須の分子である。CENP-EはATPの加水分解で生じる化学エネルギーを利用して染色体を赤道面上に運搬・整列させる。CENP-Eの機能が阻害されると細胞分裂M期において染色体の不整列が生じ、細胞分裂の停止と続く細胞死への誘導がおこる。このため、CENP-Eは有望な次世代抗腫瘍ターゲットと考えられている。申請者は、自社化合物ライブラリーのハイスループットスクリーニングから得られた化合物をもとに新規CENP-E阻害剤の設計と構造最適化を行い、以下の結果を得た。

### 1. 縮合二環性コア骨格の探索と生物評価

申請者は、CENP-Eのホモロジードッキングモデルを活用することにより、ハイスループットスクリーニングから見出された化合物への2-(ジメチルアミノ)エチル基の導入がCENP-E阻害活性を顕著に向上させることを見出した。さらに、種々の縮合二環性骨格を探索した結果、強力なCENP-E阻害活性を有する3-ブロモチエノ[3,2-*b*]ピロール誘導体を見出した。また、本誘導体の構造活性相関の解釈に、分子表面の静電ポテンシャルマップ (EPM) が有効であることを見出し、阻害剤母骨格左環の電荷状態が中性であることがCENP-Eとの結合親和性向上に重要であるとの仮説に至った。本仮説を基に新たに設計した5-ブロモイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体は、強力なCENP-E酵素阻害活性 ( $IC_{50} = 50 \text{ nM}$ )を示すとともに、HeLa細胞の分裂停止作用を有していた。

### 2. 部位特異的変異型CENP-Eの解析および新規イミダゾピリジン誘導体探索

前章で得られたイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体のCENP-E結合サイトを特定すべく、CENP-E蛋白の部位特異的変異体解析試験を行い、本誘導体が当初の想定通りにCENP-EのL5サイトに結合している可能性がきわめて高いことを確認した。ついで、本結果を基に精度を高めたドッキングモデルを構築し、前章で有効であることを見出したEPM解析を応用することで5位置換基を最適化した5-メトキシイミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体を新たに創出した。さらに、CENP-EのL5 loopが、本阻害剤の不斉構造を強く認識していることを明らかにした。活性型立体配置を持つ阻害剤は、強いCENP-E酵素阻害活性 ( $IC_{50} = 3.6 \text{ nM}$ )とHeLa細胞増殖阻害活性を示すとともに、ヒト大腸癌由来細胞株 Colo205 異種移植マウスモデルにおいて有意な抗腫瘍効果を示した。

### 3. ベンジル位縮合二環性構造の設計と生物評価

前章で明らかにしたCENP-EのL5 loopとの特異的相互作用をEPM解析によって詳細に検証することにより、阻害剤の側鎖二環性ジヒドロベンゾフラン環上の静電ポテンシャルを正電荷に調整することでL5 loopとの結合親和性を向上させることを試みた。その結果、二環性部位が最も正に帯電する2,3-ジヒドロ-1-ベンゾチオフェン1,1-ジオキソ誘導体が、*in vivo*においてCENP-E阻害に基づく細胞分裂停止作用および良好な薬物体内動態を示すことを明らかにした。あわせて、医薬品のビルディングブロックとして有用な3-アミノ-2,3-ジヒドロ-1-ベンゾチオフェン1,1-ジオキソ骨格のワンポット合成法を開発した。

以上申請者は本研究において、縮合二環性骨格を持つ新規CENP-E阻害剤が有効な抗腫瘍剤リード化合物となることを見出した。さらに、分子表面の静電ポテンシャルマップ (EPM) 解析が阻害剤構造の最適化

に極めて有効であることを明らかにした。これらの結果は新規 CENP-E 阻害型抗癌薬創製に大きく貢献する貴重な成果である。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文として価値を有するものと判断する。