

## 論文内容要旨

(題目) インシリコ技術を基軸としたレニン阻害薬及び *O*-GlcNAcase 阻害薬の創薬研究

(氏名) 多和田 倫子

近年、有望な創薬標的の枯渇及び薬物安全性試験の重厚化等により、新薬の開発に要する期間と費用は増大する傾向にある。一方、分子モデリングやインフォマティクスを軸としたインシリコ創薬は、創薬標的であるタンパク質の X 線結晶構造の増加や化合物の生物活性・毒性データベースの拡充、高スペック計算機の普及により目覚ましい発達を遂げ、創薬プロセスを加速化、また成功確率を上げるために、積極的な活用が期待されている。しかし、インシリコの方法論やソフトウェアが充実してきたとはいえ、現状のツールを単に適用すればその威力が発揮される訳ではなく、インシリコ技術が創薬の加速化および成功確率の上昇に明確に貢献するためには、論理的な戦略立案が不可欠である。インシリコ技術の活用にあたっては、特に、(1) 化合物や生物の情報に基づいて適切な方法を選択してインシリコスクリーニングや合成の方針を打ち出す、(2) メディシナルケミストの考える範囲を超える網羅的解析を行う、(3) 提案した戦略を実験で検証することが、成功の鍵となる。筆者はそれらの点を重視して、インシリコ技術を活用した創薬研究を追究してきた。

本研究論文では、インシリコ技術を効果的に活用し、効率的にヒット化合物を同定、およびリード化合物や *in vivo* ツール化合物を創製した創薬研究成果について述べる。1 つ目はレニン阻害薬に関する研究で、低分子阻害薬の開発が難しいレニンに対してフラグメントベースのアプローチを適用して良質なヒット化合物を見出し、ホットスポットを重点的に狙って高活性な新規阻害薬を創製した研究成果を述べる。2 つ目は *O*-GlcNAcase 阻害薬に関する研究で、バーチャルスクリーニングによりヒット化合物を見出し、ドッキングモデルや molecular dynamics(MD)によるポケット解析、並びに中枢移行性の指標となる物性値を活用して、中枢移行性の良い *in vivo* ツール化合物を短期間で創製した研究成果を述べる。

レニンは、レニン-アンジオテンシン-アルドステロン(RAAS)系の第一段階を司るアスパラギン酸プロテアーゼであり、高血圧症治療薬として有望な創薬標的である。アスパラギン酸プロテアーゼは、ペプチドが結合する広大なポケットを持ち、かつ触媒残基としてアスパラギン酸という酸性アミノ酸を持つため、分子量が大きく塩基性官能基を有する化合物と結合しやすい傾向がある。そのような化合物は動態が悪く毒性が懸念されるため、創薬標的とし

ては難易度の高い酵素である。レニンには古くから注目され様々な製薬企業がその阻害薬の開発に取り組んでいたにもかかわらず、上市されたのは Novartis 社の Aliskiren のみであり、この化合物も低い経口吸収性が課題となっている。そこで、筆者は、レニンの広大なポケットの中でリガンドの結合への寄与が特に大きいサイト、すなわちホットスポットを同定し、そのホットスポットを重点的に狙って、リガンド効率 (ligand efficiency: LE、ligand lipophilicity efficiency: LLE) の高い化合物を目指すことが、動態プロファイルのよい阻害薬の創出につながると考えた。その戦略を実行するために、フラグメントをシードとして低分子量で LE、LLE が高い化合物を創製する fragment-based drug discovery (FBDD) という手法に着目し、FBDD を利用した新規阻害薬の創出に着手した。まず、多様性が富むように設計された maximum common substructure フラグメントライブラリーを高濃度酵素アッセイと X 線結晶構造解析でスクリーニングし、通常の高スループットスクリーニングでは見つからなかった低分子量の化合物 **1** をヒットとして同定した (図 1)。レニンとの複合体結晶構造解析から、このヒット化合物が基質結合部位である S1 サイトと S3 サイト、およびその近傍の S3<sup>SP</sup> サイトに結合することを明らかにし、その知見からレニンのホットスポットは S1、S3、S3<sup>SP</sup> サイトであると考えた。そこで最適化合成においてはこの 3 つのポケットを精力的に狙うことにした。通常の FBDD では得られたヒット化合物を起点として合成展開を開始するが、本ヒット化合物の骨格は物性や毒性の問題が懸念されたため、まず母核の変換を検討した。インシリコ技術の利点を生かして網羅的なライブラリー設計を行い、S3 サイトに結合する置換基と S3<sup>SP</sup> サイトに結合する置換基をマトリックスで組み合わせた大規模ライブラリーを設計し、それらをドッキングで評価した。この結果に基づき、有望な構造が濃縮されかつ多様性に富む小ライブラリーを高スループット

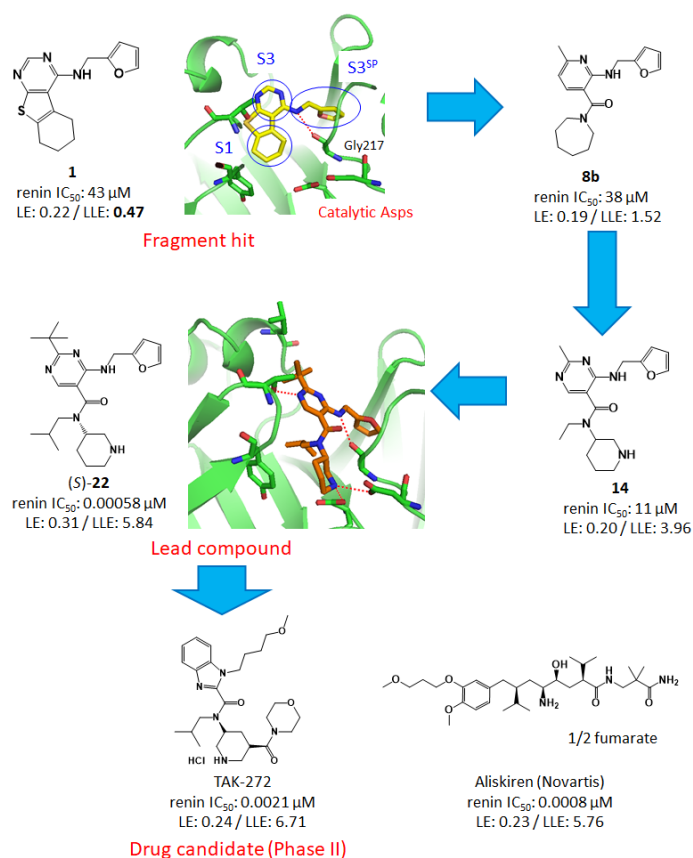


図1 フラグメントヒットからレニン阻害薬創出の概要

ット合成技術により合成した。その結果、化合物 **1** の 3 環構造を単環に変換しても阻害活性が保持されることを見出した。得られた単環骨格を基に、次のホットスポットである S1 サイトを指向してアミドピリジン骨格の小ライブラリーを設計・合成した。その結果、LLE および初期物性・毒性が大幅に改善されたアミド誘導体 **8b** を見出した。続いて、このアミド骨格を維持したまま、触媒部位のアスパラギン酸との相互作用を狙ってペリリジンを導入し(化合物 **14**)、この化合物の活性増強を目指して、S1 サイトと S3 サイトに結合する置換基を最適化した。その結果、活性が **14** に対して約 20000 倍上昇し、かつ経口吸収性が良好な *N*-ペリリジン-3-イルピリミジン-5-カルボキサミド誘導体(*S*)-**22** を見出した。なお、(*S*)-**22** を基にその後更なる構造変換が行われた結果、TAK-272 が見い出され、第二相の臨床試験に至っている。本研究は、臨床試験に進んだ医薬品候補化合物につながる、優れた薬効および動態プロファイルを持つ新規リード化合物を創出した実例を示すとともに、FBDD の効果的かつ効率的な進め方を確立し、FBDD の実用化を推進する役割を果たすと考える。

*O*-GlcNAcase(OGA)は、グリコシル化されたタンパク質から *O*-結合型 *N*-アセチルグルコサミン(*O*-GlcNAc)と呼ばれる糖を加水分解する酵素であり、様々なタンパク質の機能制御やシグナル伝達の調節に関わることが知られている。アルツハイマー病患者を対象とした臨床および非臨床の研究により、 $\alpha$ -シヌクレインや tau はグリコシル化されるとそれらの凝集が抑制されると提唱されているため、OGA はアルツハイマー病治療薬の創薬標的として注目されているが、その作用メカニズムの詳細はまだ解明されていない。本研究開始当初、基質である糖の構造を模倣した化合物が複数知られていたが、糖由来の構造は、極性が高く、動態と中枢移行性が悪い傾向があるため、治療薬の開発およびこの新しい創薬標的の機構解明のための *in vivo* ケミカルツールとして、ドラッグライクな低分子阻害薬の開発が世界的に期待されていた。OGA を標的とした創薬研究を開始するに当たり、OGA に低分子化合物が結合できるかどうかの可能性を見積もるため、バクテリア OGA の X 線結晶構造を用いて druggability 解析を実施した。その結果、OGA は低分子が結合可能な druggable なポケットがあると判断し、低分子を対象としたヒット探索のアプローチを開始した。短期間で効率的にヒット化合物を得るため、所有する全ライブラリーをスクリーニングするのではなく、バーチャルスクリーニングで有望な化合物を選択して酵素アッセイで評価する戦略を立てた。バーチャルスクリーニングでは、化学・生物の情報を最大限に活用し、多面的な観点から化合物を絞り込んだ。所有する大規模ライブラリーから、既知 OGA 阻害薬の形状および化学

的性質が類似する化合物を shape similarity search で選択し、それらをヒト OGA のホモロジーモデルにドッキングして、タンパク質との親和性を評価した。タンパク質との結合も良好と予測された化合物を、中枢薬を指向した物性値パラメーターでフィルタリングし、良質なプロファイルを持つ化合物のみを選択して酵素アッセイを実施した。その結果、41 nM の  $IC_{50}$  値をもつヒット化合物 **32** を同定した。このヒット化合物から効率的に最適化研究を進めるにあたり、各置換基の役割と効果を明らかにするため、ドッキングスタディーと MD を用いたポケット解析を実施した。その結果、(1)母核のアミノピリミジン骨格はアスパラギン酸と相互作用をしているため変換するべきでない、(2)ピペラジン環は溶媒がアクセス可能なオープン領域に結合しているため様々な置換基に変換可能と推測した。その推測に基づき、中枢移行性に重要なパラメーター、LLE の向上を目指してピペラジンを最適化した結果、細胞で *O*-GlcNAc 化タンパク質の上昇作用を示し、かつ優れた動態プロファイルと中枢移行性を持つ化合物 **33i** を創製した。その後、**33i** と同じアミノピリミジン骨格を持つ化合物の X 線結晶構造が解析され、ドッキングモデルで予測した結合モードが正しいことが実証され、ドッキングモデルを基に構築した合成方針の妥当性が確認された。**33i** は、OGA の *in vivo* ケミカルツールとして、プローブの創製・普及を担う Structure Genomics Consortium (SGC) を通じて世の中に提供され、幅広く利用されると考えている。本研究は、バーチャルスクリーニングから *in vivo* ケミカルツールの創出までわずか6か月で行っており、インシリコ創薬を活用することで、良質なプロファイルを持つ化合物を短期間で見出せることを示した。

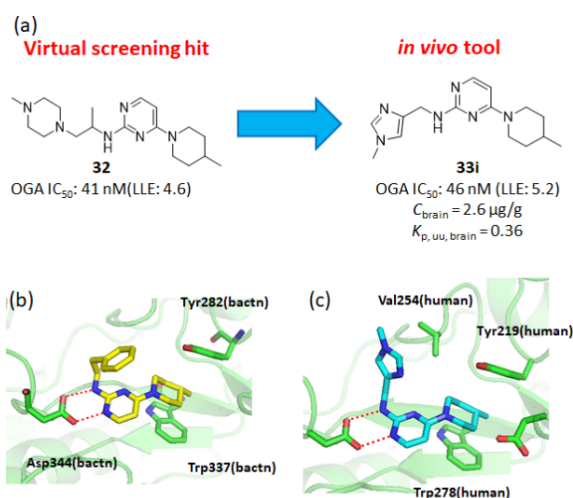


図2 (a)OGAヒット化合物と*in vivo*ツール**33i**、(b)バクテリアOGAと化合物**33a**のX線結晶構造、(c)ヒトOGAホモロジーモデルと化合物**33i**の結合モデル

以上の2つの創薬標的に対するヒット同定とその最適化研究を通じて、インシリコ創薬を軸とした創薬研究を示した。本論文は、インシリコ創薬において重要となる要素、すなわち論理的な戦略立案と、的確な方法論の選択と網羅的解析、検証を、創薬研究の実例の中で示しており、インシリコ研究者および実験研究者がインシリコ技術を効果的に活用して創薬研究を促進するために重要な知見になると考える。

## 論文審査結果の要旨

論文提出者: 多和田 倫子

論文審査委員 (主査): 土井 隆行

論文題目: インシリコ技術を基軸としたレニン阻害薬及び *O*-GlcNAcase 阻害薬の創薬研究

本論文はインシリコ技術を活用し、レニン阻害薬、および *O*-GlcNAcase(以下 OGA と略す)阻害薬を見出した研究成果について述べたものである。

筆者は、創薬研究においてインシリコ創薬に期待される役割、および創薬プロセスの各段階で活用されるインシリコの基幹技術、並びにこれらの技術を適用して創薬を成功に導くための重要な視点と課題について述べ、レニンと OGA 阻害薬研究の背景と目的を明らかにしている。

まず、低分子阻害薬の開発が難しいレニンに対して、フラグメントベースのアプローチを適用して、良質なヒット化合物を見出している。活性発現に必要な最小フラグメントを同定し、レニンとの共結晶構造解析の結果を基に、バーチャルスクリーニングを実施し、ハイスループット合成と組み合わせることで効率よくヒットシリーズ化合物を見出している。

続いて、レニンのホットスポットとして S1 および S3 サイトを標的として極性置換基を導入している。さらに、疎水性置換基がインデューストフィットするサイトを見出し、少数の炭素原子を導入することにより飛躍的な活性向上に成功し、リガンド効率およびリガンド脂溶性効率が高く、優れた経口吸収性をもつリード化合物の創製に成功している。

OGA 阻害薬の研究では、糖由来の化学構造から脱却するため、構造類似性アプローチを導入したバーチャルスクリーニングを実施し、中枢薬に適した物性値範囲でのフィルタリングを組み合わせることで、優れたヒット化合物を見出すことに成功している。さらにウォーターマップ解析を基に、不安定な水分子の代わりとなる極性置換基を導入して脂溶性を下げることによって、優れた薬物動態と中枢移行性を示すインビボケミカルツールの創製に成功している。糖構造を持たない世界初の OGA 阻害薬を見出している。本研究は開始からわずか6ヶ月で達成され、インシリコ技術を的確に適用することで創薬研究を加速できることを示している。

以上要するに、本論文はレニン、および OGA 阻害薬の創薬研究を通して、創薬ターゲット評価、ヒット化合物探索、および構造最適化の創薬段階においてインシリコ技術を適用することにより、効率よくリード化合物を創出できることを示した研究成果であり、薬科学上貢献するところが大きい。

よって、本論文は博士(薬科学)の学位論文として合格と認める。