



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on p53-MDM2 Interaction Inhibitors as a Novel Anticancer Agent [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	宮崎, 理樹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	乙第6900号
Issue Date	2013-12-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/54889
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Masaki_Miyazaki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏 名 宮 崎 理 樹

学 位 論 文 題 名

Study on p53-MDM2 Interaction Inhibitors as a Novel Anticancer Agent
(p53-MDM2 結合阻害活性を有する新規抗癌剤の創製に関する研究)

近年、様々な分子標的薬の創製により、癌の治療効果は徐々に高まりつつあるものの、高血圧など他の疾患と比較すると依然として医療満足度は低いのが現状である。癌は直接生死に関わる疾患であり、より治療効果の高い抗癌剤の開発が切に望まれている。

我々の生体内に存在する癌抑制タンパク質である p53 は、DNA 損傷の発生した細胞に対し細胞周期停止やアポトーシス誘導等の重要な役割を担っており、通常は癌化した細胞の増殖をコントロールしている。一方、MDM2 (murine double minute 2) は p53 の negative feedback protein であり、p53 と結合して核外排出や、E3 リガーゼとして p53 のユビキチン化を促進し、p53 の分解に深く関与している。癌全体の 50%を占める野生型 p53 を有する癌細胞では MDM2 が過剰発現しており、p53 量が低下することで本来発揮される癌抑制の機能が失われている。そこで、p53 と MDM2 の相互作用を阻害することで p53 の不活性化を防ぎ、癌抑制タンパクとしての機能を活性化できれば新たなメカニズムによる癌化学療法して期待できる。本研究では、p53-MDM2 阻害活性を有する新たな分子標的薬の創製を目的として、独自骨格を有するリード化合物を見出し、抗腫瘍活性を示す誘導体を獲得すべく、化合物の最適化研究 (Lead Optimization) を実施した。

p53 と MDM2 は、主に p53 の Phe19, Trp23, Leu26 の三残基が MDM2 タンパク表面との疎水性相互作用によって結合する。これまでに、本相互作用部位を活用したデザインにより得られた様々な低分子化合物が報告されている。本研究を開始するにあたり、上記三残基の立体配置をミミックしてデザインされた Nulin-2 (dihydroimidazoline 誘導体, Roche) と MDM2 との複合体解析 (Science 誌, 2004) を参考に、二環性の独自骨格を種々デザインし、p53-MDM2 阻害活性を有する骨格の探索を行った。その結果、dihydroimidazothiazole 骨格が高い活性 ($IC_{50} < 1\mu M$) を有していることを見出し、構造活性相関を構築すると共に誘導体の最適化研究を開始した。

初期ヒット化合物として獲得した化合物 **9c** は高い p53-MDM2 阻害活性を示し ($IC_{50} = 0.26\mu M$)、光学分割を実施することにより両エナンチオマーの活性に大きく差があることが判明した ((+)-**9c**: $IC_{50} = 0.16\mu M$, (-)-**9c**: $11.9\mu M$)。本結果は先に報告された Nutlin 誘導体と同じ傾向であり、MDM2 との複合体ドッキング計算においても、高活性体(+)-**9c** が Nutlin-2 と同様の結合様式で相互作用していることが示唆された。また得られた(+)-**9c** は既報の高活性化合物である Nutlin-3a ($IC_{50} = 0.09\mu M$) とほぼ同等の活性を示すことが明らかとなった。

一方で(+)-**9c** は dihydroimidazothiazole 骨格が容易に酸化され、p53-MDM2 阻害活性を有しない imidazothiazole 骨格へと変換されることが判明した。そこで本問題を解決すべく、MDM2 との相互作用部位に影響を及ぼさない形で dihydroimidazothiazole C-6 位へメチル基を導入した骨格をデザインした。本方策により、imidazothiazole 骨格の生成を回避することに成功した。また中間体として得られるジアミン誘導体のラセミ混合物に対し、酒石酸を用いて塩分割を実施することにより、簡便に光学活性体を得ることに成功した（従来はキラルカラムを用いた HPLC にて最終体を分取）。更に C-6 位へのメチル基の導入は、母核の酸化を回避し光学活性体を容易に獲得できたことに加え、活性面でも有利に働くことが判明した (**28b**: $IC_{50} = 0.092\mu M$)。

更なる活性向上を目指し、**28b** をリード化合物として dihydroimidazothiazole C-2 位の置換基変換を実施した。その結果、dimethylcarbamoyl-L-proline 誘導体を導入した **34b** において飛躍的な

p53-MDM2 阻害活性の向上がみられ、**28b** や Nutlin-3a と比較して約 10 倍の高活性化を達成した ($IC_{50} = 0.0092\mu M$)。また **34b** を用い、MDM2 との複合体 X 線結晶構造解析を実施した。**34b** は従来報告されてきた 3 ヲ所 (Phe19, Trp23, Leu26) の p53-MDM2 相互作用ポケットに加え、C-2 位に導入したプロリン環部分を介して、4 番目の新たな相互作用部位を形成していることが判明した。加えて、4 番目の相互作用が空間的に密な induced-fitting を形成しているため、MDM2 タンパクの三次元構造が歪んで変化していることも判明した。C-2 位に四員環や六員環を導入した誘導体では **34b** 程の活性向上が見られなかったことから、複合体解析により判明した一連の現象が、**34b** が示した高活性化の裏付けとなっていることが示唆された。一方で C-2 位プロリン側鎖末端のアミド部分は、種々変換しても活性には影響が見られなかったことから、本部位の変換により活性を維持しつつ溶解性等の物性を調整することが可能であることも判明した。

in vitro 試験において高活性を示した **34b** であるが、マウスに経口投与しても抗腫瘍活性を示さないことが判明した。*in vivo* にて薬効を示すためには、活性に加えて化合物の代謝安定性や溶解性等、薬物動態のパラメータが非常に重要となるが、**34b** は代謝安定性・溶解性共に低い化合物であった。そこで **34b** の推定代謝部位を C-2 位のアミド結合近傍炭素の酸化であると予測し、本部位への酸化代謝を阻害する目的で C-2 位プロリン環上へのアルキル側鎖の導入を試みた。即ち 5(R)-, 5(S)-配置に対し、メチル基もしくはエチル基を導入した計 4 種類のプロリン誘導体を合成し評価した。その結果、5(R)-エチル基の導入が、活性を維持しつつ代謝安定性の改善効果が最も高いことが判明した (代謝安定性: 9%rem→70%rem)。一方で溶解性向上のため、物性等の調整が可能なプロリン側鎖末端部への水溶性置換基の導入を試みた。その結果、ピペラジン誘導体を導入した複数の化合物において、高活性を維持しつつ代謝安定性・溶解性の改善を達成した。

得られた誘導体のうち、種々のパラメータが良好であった化合物 (**78**, **85**) について PK 試験を実施し、いずれの化合物も良好な体内動態を示すことを確認した。マウスによる MV4-11 (白血病細胞) xenograft モデルを用いた抗腫瘍試験を実施したところ、両化合物とも 200mg/kg/qd の経口連続投与により、体重減少等の毒性を示さずに強力な抗腫瘍活性を示した (**78**: TGI=71%, **85**: 76%)。両化合物は Western blot 解析により、明確な p53 レベルの上昇、アポトーシスの誘導が見られたことから、観察された抗腫瘍活性が p53-MDM2 阻害によるものであることを確認した。

以上の研究により、①p53-MDM2 阻害活性を有する独自の dihydroimidazothiazole 骨格を見出し、②側鎖変換を実施することで飛躍的に *in vitro* 活性を向上させ、③代謝安定性・溶解性を改善した高活性化合物を獲得したことにより、*in vivo* で明確な抗腫瘍効果を示す化合物の創製に成功した。本研究により見出された成果は、今後 MDM2 阻害薬という新たな分子標的抗癌剤の開発に対し、重要な知見となることが期待される。

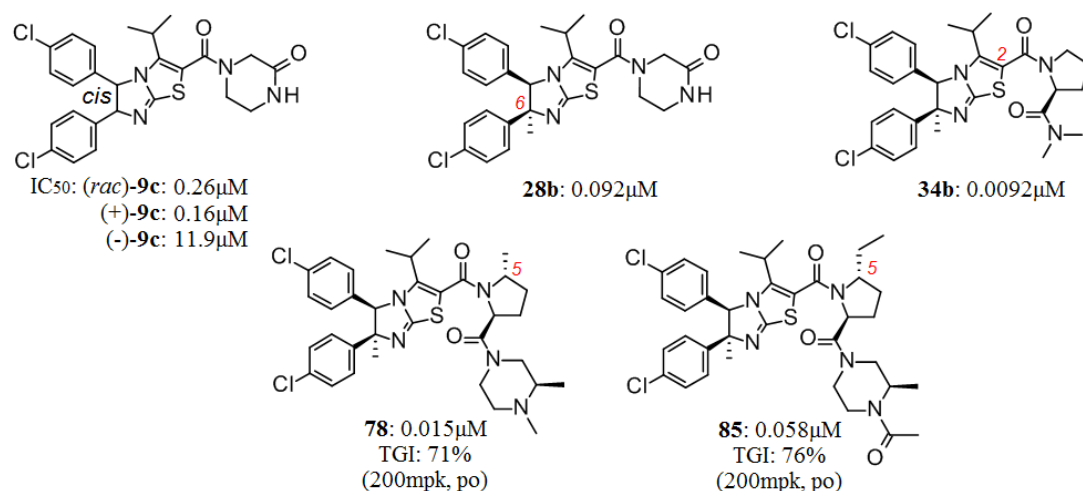


Figure. Key compounds of dihydroimidazothiazoles having p53-MDM2 inhibitory activity