



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_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 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

審査担当者	主 査	教 授	西 村 紳 一 郎
	副 査	教 授	出 村 誠
	副 査	教 授	門 出 健 次
	副 査	准教授	比 能 洋

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)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

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。

本論文では、このような現状にある癌治療の分野において、癌抑制タンパク質である p53 と、p53 の分解に関与する MDM2 (murine double minute 2) との相互作用に着目した。これら両タンパクの結合を阻害することで MDM2 による p53 の不活性化を防ぎ、p53 が有するアポトーシス等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として期待できる。そこで 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。上記三残基の立体配置をミミックしてデザインされた Nutlin-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。

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ため、本問題を解決すべく、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すると共に、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。加えて C-6 位へのメチル基の導入は、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 誘導体と比較して約 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 カ所 (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。

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かったため、化合物の代謝安定性や溶解性等、薬物動態パラメータの改善を志向した最適化研究を実施した。まずは **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プロリン環上へのアルキル側鎖の導入を試みた。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。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、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 (ヒト白血病細胞) 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、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、p53-MDM2 阻害に基づく抗腫瘍効果であることが示された。これらの結果より、p53-MDM2 結合阻害薬として新規の dihydroimidazothiazole 骨格を有し、明確な抗腫瘍活性を示す高活性化化合物の獲得を達成した。

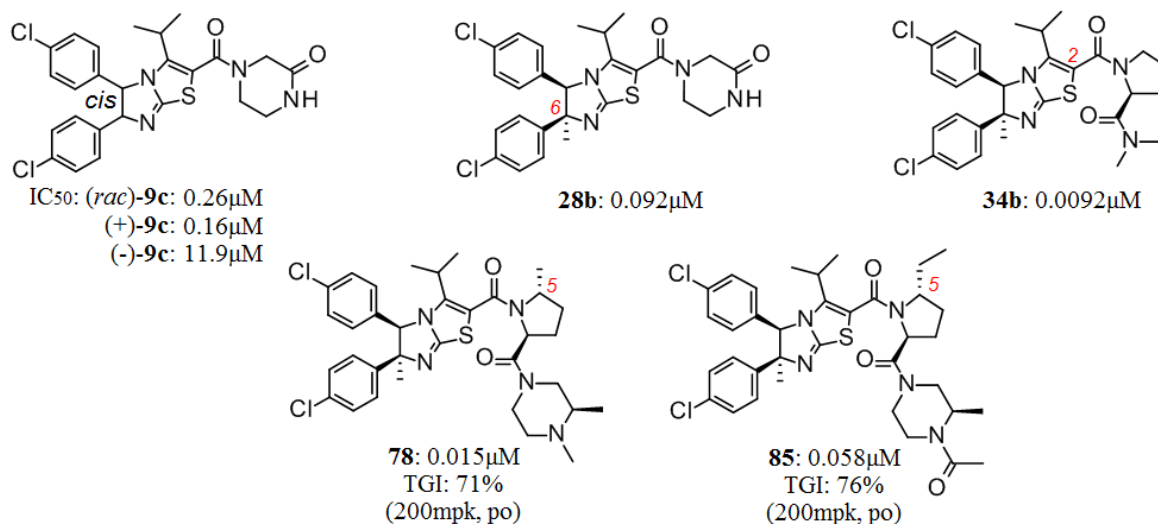


Figure. Key compounds of dihydroimidazothiazoles having p53-MDM2 inhibitory activity

以上の研究により、申請者は抗癌剤の研究開発において、p53-MDM2 結合阻害薬という新規メカニズムによる分子標的薬の創製へと結びつく、非常に有用な知見を得た。本論文により見出された成果は、今後の癌治療の分野に大きく貢献するものである。

よって申請者は、北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格があるものと認める。