

平成 25 年度

# 博士 学位 論文

内容の要旨  
および  
審査結果の要旨

(平成 26 年 3 月)

近畿大学大学院  
農学 研究科

# 農 学 研 究 科

平 成 25 年 度

(論 文 提 出 に よ る)

(平 成 26 年 3 月)

倉 田 道 雄

小 宮 正 文

城 智 也

菊 田 幸 雄

# 学位論文審査結果の報告書

氏 名 小宮 正文

---

生 年 月 日 (昭和)・平成 55年 12月 11日

本 籍 (国籍) 大阪府

---

学位の種類 博 士 ( 農 学 )

学位記番号 農 第 **191** 号

学位授与の条件 学位規程第5条2項該当  
(博士の学位)

論 文 題 目 Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII $\gamma$   
阻害作用を有する新規アシルインドール誘導体に関する研究

---

---

## 審 査 委 員

(主 査) 飯田 彰 教授



(副主査) 松田 一彦 教授



(副主査) 上嶋 繁 教授



(副 査)



(副 査)



## 論文内容の要旨

関節リウマチは、多発性関節炎を主徴とし、同時に多臓器を障害する全身性炎症疾患である。寛解と増悪を繰り返しながら慢性に進行し、関節の破壊と変形をもたらす、やがて運動機能障害を呈し、ときには生命をも脅かす可能性もある疾患である。現在日本では約70~80万人、全世界では約2370万人が関節リウマチに罹患している。関節リウマチにおける炎症の主病変は関節滑膜であり、滑膜の増殖、炎症細胞の活性化および骨・軟骨の破壊などの病態が確認されている。その病態形成の機序は未だ十分に解明されていないものの、炎症細胞から分泌される種々のサイトカインやケモカインが複合的に作用した結果であると考えられている。治療法については、生物学的製剤の登場で根治を目指した治療が可能となり、患者の病態は大幅に改善されつつある。しかしながら、関節リウマチ患者の約3割が抗体療法に抵抗性であり、投与経路が非経口投与であることと、高価であること、さらに依然として副作用の懸念があることから、全ての患者がその恩恵を受けられるわけではない。これらの課題の改善を目的として、生物学的製剤と同等の治療効果を狙った、低分子化合物の開発に注目が集まった。JAKの標的分子としての有用性が明らかとなったことから、炎症シグナルを制御している他のキナーゼが創薬標的として期待されている。

Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII (calcium-calmodulin-dependent protein kinase II: CaMKII) は、ラット脳においてトリプトファンヒドロキシラーゼ (神経伝達物質の一つであるセロトニン生合成の律速酵素) を活性化するカルモジュリン依存性リン酸化酵素である。本酵素は、細胞内に増加したCa<sup>2+</sup>とカルモジュリンの複合体により活性化されることが知られており、①脳に多量に存在する、②臓器特異性アイソフォームが存在する、③自己リン酸化によって活性を制御する、などの特長を備えている。現在までに、CaMKIIのアイソフォームとして、CaMKII  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  および  $\delta$  が知られている。最近の研究により、本酵素が記憶などの高次神経機能の制御や種々の細胞機能の調節に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきている。その中でもCaMKII  $\gamma$  は、関節リウマチの病態形成に大きく関与している破骨細胞の分化および骨吸収に関与していることが報告されている。CaMKII  $\gamma$  阻害薬として開発されていたSMP-114は、非臨床試験において動物関節炎モデルに対して病態改善効果を示すことが報告されている。

以上の背景の下、著者は関節リウマチの病態形成に大きく関与していることが知られているCaMKII  $\gamma$  に注目し、薬剤満足度が不十分な関節リウマチ治療において期待される薬剤となり得ると考え選択的CaMKII  $\gamma$  阻害薬の合成研究に着手した。

キナーゼはアデノシン三リン酸 (ATP) と結合することで活性化し、その役割を果たすことが知られている。ATPと酵素の相互作用はおもに水素結合を介していることが明らかになっている。特に、ATPのアデニン骨格と、酵素のヒンジ領域と呼ばれる部位のアミノ酸残基の水素結合の寄与が大きいことが知られている。キナーゼ阻害剤には4つの阻害様式が知られているが、多くのキナーゼ阻害薬は、酵素に存在するATPの結合部位と相互作用するように設計されている。キナーゼ阻害薬には酵素との親和性を高めるため、水素結合を生じさせることを目的として、ATPを模した部分構造が必須となっている。ところで、ATP結合部位は518種類の酵素において構造が非常によく保存されていることがわかっている。そのため、ATP結合阻害型のキナーゼ阻害薬の創出に向けて、残る517種類の酵素に対する選択性を獲得することが一番重要な課題となる。また、ATP結合部位には脂溶性置換基と相性のよい空間が存在することも知られており、キナーゼ阻害薬の設計において重要であることが分かっている。

著者は独自の化合物群の中からHTSによって、CaMKII  $\gamma$  阻害活性を有する複数の分子構造を発見した。何れの骨格においても、酵素との水素結合が形成可能な部分構造を有していることが確認できる。ここで、骨格の優先順位を決定するために、以下の要素に注目した。すなわち、骨格の代謝酵素安定性、阻害活性の選択性、新規性および物性である。例えば、フラボン骨格は天然に存在するため物性の面からは優れていると期待されるが、本骨格を部分構造とする生理活性天然物が多く報告されており、CaMKII  $\gamma$  以外の標的に対する選択性の確保の面で懸念がある。キノゾリン構造は、多くの医薬品に活用されている骨格であり、新規性および選択性確保の面で不安が残る。カルボン酸誘導体は、一般的に膜透過性に課題があることが多く、フラン誘導体は反応性代謝物が生成しやすいことが知られている。アシルインドール誘導体はKN-93やSMP-114とは異なる構造であり、新規性確保にも課題はない。よって、アシルインドール骨格をベースとした創薬研究を開始した。

## 第一章 アシルインドール骨格をコア構造としたCaMKII $\gamma$ 阻害剤の創出

HTSにて見出されたアシルインドール誘導体3に対して、CaMKII  $\gamma$  阻害作用増強を目的として研究を行った。キナーゼ阻害剤に特徴的な部分構造である、プロトンドナー、プロトンアクセプターおよび脂溶性構造に注目して研究を進めた。まず、アシルインドール誘導体を、ベンゼン環を含むA-partおよびインドール骨格を含むB-partに分け、それぞれに置換基導入を行った。A-partのベンゼン環上のパラ位に対して、電子的効果および置換基の大きさを考慮して種々の置換基の検討を行った。その結果、ハロゲン原子を導入すると活性は減弱し、メチル基や嵩高いアルコキシ基を導入すると活性が維持または向上した。本結果より、ベンゼン環上パラ位に電子供与基の導入が許容されることと、脂溶性を有する置換基が優れている可能性が示唆された。そこで、さらに嵩高いフェニル基やフェノキシ基を導入したところ、フェノキシ体のCaMKII  $\gamma$  阻害活性は大きく向上した。続いて、フェノキシ基をオルト位またはメタ位に有する位置異性体の阻害活性を評価したところ、何れも強いCaMKII  $\gamma$  阻害活性を示すものの、パラ位置換体が優れていることが分かった。以上より、A-partにおいて優れた置換基であるフェノキシ基を見出した。次に、B-partのNH基のCaMKII  $\gamma$  阻害活性に対する重要性を調べた。NH基をメチル基で置換した誘導体でCaMKII阻害活性を示したことから、NH基はCaMKII阻害活性に必須ではなく、NH基の修飾が許容されることが分かった。最後に、B-partの水酸基の重要性についても検証を行った。水酸基を除去した誘導体は活性が大きく減弱し、メチル基で修飾した誘導体は活性が消失した。また、水酸基を6位に有する誘導体の活性は5位置換体のものと比べ、減弱する結果となった。以上より、インドール骨格5位水酸基はCaMKII  $\gamma$  阻害活性に重要な部分構造であることが分かった。探索研究の結果、著者は公知のCaMKII  $\gamma$  阻害剤KN-93(1)より優れたCaMKII  $\gamma$  阻害活性を有する化合物15の創製に成功した。

## 第二章 アシルインドール誘導体に対する、酵素選択性改善の検討

第一章で見出したリード化合物15に対して、酵素選択性改善に取り組んだ。CaMKII  $\gamma$  阻害活性に重要な官能基である水酸基が、酵素のアミノ酸残基と水素結合を形成しているとの仮説を立て検証を行った。また相互作用の強度は、水酸基の酸性度に相関すると考えた。そこで、水酸基の酸性度を変化させるために、水酸基の隣接位に電子効果の異なる置換基の導入を行った。まず、インドール骨格4位に電子供与性置換基であるメチル基を導入したところ、CaMKII  $\gamma$  阻害活性を示したものの、リード化合物15と比べ活性が減弱する結果となった。このことより、4位への置換基導入の許容性は示唆されたものの、活性減弱の原因として電子許与性置換基の影響が考えられた。次に、分子サイズはメチル基と同等であるが、電子求引性であるクロロ基の導入を行ったところ、リード化合物15と同等の阻害活性を示した。ここで水酸基の酸性度に注目してみると、メチル体と比べクロロ体が高い酸性度を示しており、活性の増強には酸性度の増大が寄与したと考えられた。さらに酸性度を上げるべく、6位に対してもクロロ基の導入を行ったところ、ジクロロ体のCaMKII  $\gamma$  阻害活性はリード化合物15より約10倍向上した。続いて、クロロ基と比べて脂溶性の高いブロモ基に変換したところ、モノブロモ体、ジブロモ体共にクロロ置換体よりCaMKII  $\gamma$  阻害活性は増強し、ジブロモ体47はCaMKII  $\gamma$  阻害作用 $IC_{50}$ 値=0.012  $\mu$ Mという非常に強力な阻害活性を示した。このジブロモ体47に対して酵素選択性の評価を行った。評価の際に、CaMKII  $\gamma$  と同じカルモジュリン依存酵素であるMLCK、抗炎症作用との関連が報告されているP38  $\alpha$  およびAkt1、カルシウムイオンによって活性化することが知られているPKC  $\gamma$  を選択した。評価の結果、リード化合物15に比べ何れの酵素に対しても選択性が改善する結果となった。CaMKII  $\gamma$  阻害活性に重要である水酸基の隣接位の修飾は、CaMKII  $\gamma$  阻害作用を選択的に向上させることが示された。以上の検討の結果、著者はCaMKII  $\gamma$  阻害作用 $IC_{50}$ 値=0.012  $\mu$ Mという非常に強力な阻害活性を有し、酵素選択性を有する化合物47の創出に成功した。

## 第三章 アシルインドール誘導体に対する、水溶性を指標とした経口吸収性改善の検討

第二章で見出したハロゲン置換体は、優れたCaMKII  $\gamma$  阻害作用および酵素選択性を有するものの、経口吸収性の低さが課題であった。著者はこの原因としてハロゲン置換体の低水溶性に起因すると考え、課題解決の糸口をつかむために、第一章で見出したリード化合物15の水溶性を高めることを目的として研究を行った。アシルインドール誘導体の構造活性相関をもとに、A-partおよびB-partに対して、脂溶性を減弱させるような官能基の導入を行った。化合物を設計する際に、脂溶性の変化の度合いを推測するための指標として、あらかじめ計算可能なcLogP値を参考にした。まず、A-partのベンゼン環を同様の嵩高さを有するテトラヒドロフラン環へ変換したところ、活性が減弱したものの、cLogP値の低下と相関し、僅かながら水溶性の改善が見られた。続いて、より脂溶性低減効果の期待できるアミノ基を有するピペリジン環へと変換を行ったが、水溶性は大き

く改善されたもののCaMKII  $\gamma$  阻害活性が消失する結果となった。

以上より、化合物の脂溶性を減弱することで水溶性が改善した化合物の創出に成功したが、A-partにおいて、極性基の導入および変換は許容されないことが判明した。次にB-partのNH基に対して水溶性置換基の導入を行った。エチルアルコールを導入したところ水溶性の改善は見られなかったため、より脂溶性の低減効果の期待できるメチルカルボキシル基の導入を行ったところ、CaMKII  $\gamma$  阻害活性を示すと共に、大幅な水溶性の改善が見られた。続いて、アシルインドール骨格への窒素原子の導入を行ったが、cLogP値は低減しているものの水溶性の改善は見られなかった。さらにCaMKII  $\gamma$  阻害活性も消失したことから、骨格への窒素原子の導入は許容されないことが示された。最後に、インドール骨格5位水酸基への置換基の導入の検討を行った。第一章で、インドール骨格の水酸基がCaMKII  $\gamma$  阻害活性発現に重要な官能基であることを述べた。さらに第二章の検討結果より、水酸基が酵素の特定のアミノ酸残基と水素結合を形成しているものと推測した。そこで、同様の酸性プロトンをもつ官能基を導入することで活性を維持できるのではないかと考えた。官能基として、優れた水溶性改善効果を有するカルボキシル基を選択した。その結果、リード化合物15より強いCaMKII  $\gamma$  阻害活性を示すと共に、水溶性も大幅に改善した。以上の検討の結果、インドール骨格のNH基においては極性基の導入が許容され、かつ水溶性も改善されることを見出した。特に、カルボキシル基の導入が水溶性の改善にとって優れていた。さらに、CaMKII  $\gamma$  阻害活性発現に必須の構造だと考えられていた水酸基の代替構造として、カルボキシメトキシ基を見出した。

#### 結論

著者は新規作用機序の抗リウマチ薬創製を目的として、タンパク質リン酸化酵素の一つであるCaMKII  $\gamma$  に注目し、その阻害薬の創出を目指して研究を行った。その結果、以下に示す知見を得た。

- ① キナーゼ阻害薬の構造的特徴に着目して構造展開を行う手法は、エックス線結晶構造解析情報や阻害剤に関する報告が十分ではない標的に対して、効率的に探索研究を行うための一つの方策として有用であると考えられる。
- ② オフターゲットの阻害活性に対する選択性を改善させる方法の一つとして、標的タンパク質の阻害活性に重要な部分構造を特定し、その構造に注目して化合物を設計することが効果的であることが示唆された。
- ③ 薬剤の水溶性を改善する方策として、脂溶性の低減を目指すことが有効であることが知られている。研究を進める際に、設計した化合物が元の化合物と比べ脂溶性が増加しているのか、低下しているのかをあらかじめ推測するための指標として、計算可能なcLogP値を参考にすることが効果的であることを示した。

以上、CaMKII  $\gamma$  阻害薬に関する活性向上、キナーゼ選択性および水溶性改善の知見は、経口投与可能な選択的CaMKII  $\gamma$  阻害薬の創出につながる成果であると考えられる。さらに本知見は、キナーゼ阻害薬の効率的な探索研究の一助となることが期待される。また、近年、家族として認識されている伴侶動物の高齢化に伴い増加している関節炎にもヒトと同じ薬効成分の抗リウマチ薬が用いられている現状から、ヒトのみならず動物の治療のためにも本研究を基盤とした新規抗リウマチ薬開発の意義は大きいと考えられる。

## 論文審査結果の要旨

関節リウマチは、多発性関節炎を主徴とし、同時に多臓器を障害する全身性炎症疾患である。寛解と増悪を繰り返しながら慢性に進行し、関節の破壊と変形をもたらし、やがて運動機能障害を呈し、ときには生命をも脅かす可能性もある疾患である。現在日本では約70~80万人、全世界では約2370万人が関節リウマチに罹患している。関節リウマチにおける炎症の主病変は関節滑膜であり、滑膜の増殖、炎症細胞の活性化および骨・軟骨の破壊などの病態が確認されている。その病態形成の機序は未だ十分に解明されていないものの、炎症細胞から分泌される種々のサイトカインやケモカインが複合的に作用した結果であると考えられている。治療法については、生物学的製剤の登場で根治を目指した治療が可能となり、患者の病態は大幅に改善されつつある。しかしながら、関節リウマチ患者の約3割が抗体療法に抵抗性であり、投与経路が非経口投与であることと、高価であること、さらに依然として副作用の懸念があることから、全ての患者がその恩恵を受けられるわけではない。これらの課題の改善を目的として、生物学的製剤と同等の治療効果を狙った、低分子化合物の開発に注目が集まった。JAKの標的分子としての有用性が明らかとなったことから、炎症シグナルを制御している他のキナーゼが創薬標的として期待されている。

Ca<sup>2+</sup>/カルモジュリン依存性プロテインキナーゼII (calcium-calmodulin-dependent protein kinase II: CaMKII) は、ラット脳においてトリプトファンヒドロキシラーゼ (神経伝達物質の一つであるセロトニン生合成の律速酵素) を活性化するカルモジュリン依存性リン酸化酵素である。本酵素は、細胞内に増加したCa<sup>2+</sup>とカルモジュリンの複合体により活性化されることが知られており、①脳に多量に存在する、②臓器特異性アイソフォームが存在する、③自己リン酸化によって活性を制御する、などの特長を備えている。現在までに、CaMKIIのアイソフォームとして、CaMKII  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ および $\delta$ が知られている。最近の研究により、本酵素が記憶などの高次神経機能の制御や種々の細胞機能の調節に重要な役割を果たしていることが明らかにされてきている。その中でもCaMKII  $\gamma$ は、関節リウマチの病態形成に大きく関与している破骨細胞の分化および骨吸収に関与していることが報告されている。CaMKII  $\gamma$ 阻害薬として開発されていたSMP-114は、非臨床試験において動物関節炎モデルに対して病態改善効果を示すことが報告されている。

以上の背景の下、申請者は関節リウマチの病態形成に大きく関与していることが知られているCaMKII  $\gamma$ に注目し、薬剤満足度が不十分な関節リウマチ治療において期待される薬剤となり得ると考え選択的CaMKII  $\gamma$ 阻害薬の合成研究に着手した。

申請者は独自の化合物群の中からHTSによって、CaMKII  $\gamma$ 阻害活性を有する複数の分子構造を見出した。何れの骨格においても、酵素との水素結合が形成可能な部分構造を有していることが確認できる。ここで申請者は、骨格の優先順位を決定するために、以下の要素に注目した。すなわち、骨格の代謝酵素安定性、阻害活性の選択性、新規性および物性である。例えば、フラボン骨格は天然に存在するため物性の面からは優れていると期待されるが、本骨格を部分構造とする生理活性天然物が多く報告されており、CaMKII  $\gamma$ 以外の標的に対する選択性の確保の面で懸念がある。キナズリン構造は、多くの医薬品に活用されている骨格であり、新規性および選択性確保の面で不安が残る。カルボン酸誘導体は、一般的に膜透過性に課題があることが多く、フラン誘導体は反応性代謝物が生成しやすいことが知られている。アシルインドール誘導体はKN-93やSMP-114とは異なる構造であり、新規性確保にも課題はない。よって、アシルインドール骨格をベースとした創薬研究を開始した。

申請者はまず、アシルインドール誘導体のCaMKII  $\gamma$ 阻害剤としての有用性を見極めるべく検討を行った。HTSにて見出されたアシルインドール誘導体3に対して、CaMKII  $\gamma$ 阻害作用増強を目的として研究を行った。キナーゼ阻害剤に特徴的な部分構造である、プロトンドナー、プロトンアクセプターおよび脂溶性構造に注目して研究を進めた。アシルインドール誘導体を、ベンゼン環を含むA-partおよびインドール骨格を含むB-partに分け、それぞれに置換基導入を行い、構造活性相関を取得した。その結果、A-partにおいて優れた置換基であるフェノキシ基を見出した。さらに、インドール骨格5位の水酸基はCaMKII  $\gamma$ 阻害活性に必須の官能基であるという知見を得た。探索研究の結果、申請者は公知のCaMKII阻害剤KN-93 (1)より優れたCaMKII  $\gamma$ 阻害活性を有する化合物15の創製に成功した。

次に申請者は、第一章で見出したリード化合物15に対して、酵素選択性の改善に取り組んだ。CaMKII $\gamma$ 阻害活性に重要な官能基である水酸基が、酵素のアミノ酸残基と水素結合を形成しているとの仮説を立て検証を行った。また相互作用の強度は、水酸基の酸性度に相関すると考えた。水酸基の酸性度を変化させるために、水酸基の隣接位に電子効果の異なる置換基の導入を行った。その結果、ハロゲン原子を導入した化合物群が非常に強力な阻害能を有し、高い酵素選択性を有することを見出した。以上の検討の結果、申請者はCaMKII $\gamma$ 阻害作用IC<sub>50</sub>値=0.012  $\mu$ Mという非常に強力な阻害活性を有し、酵素選択性を有する化合物47の創出に成功した。

最後に申請者はアシルインドール誘導体15に対して、水溶性を指標とした経口吸収性改善の検討を行った。第二章で見出したハロゲン置換体は、優れたCaMKII $\gamma$ 阻害作用および酵素選択性を有するものの、経口吸収性の低さが課題であった。著者はこの原因としてハロゲン置換体の低水溶性に起因すると考え、課題解決の糸口をつかむために、第一章で見出したリード化合物15の水溶性を高めることを目的として研究を行った。アシルインドール誘導体の構造活性相関をもとに、A-partおよびB-partに対して、脂溶性を減弱させるような官能基の導入を行った。化合物を設計する際に、脂溶性の変化の度合いを推測するための指標として、あらかじめ計算可能なcLogP値を参考にした。検討の結果、インドール骨格のNH基においては極性基の導入が許容され、かつ水溶性も改善されることを見出した。とくにカルボキシル基の導入が水溶性の改善にとって優れていた。さらに、CaMKII $\gamma$ 阻害活性発現に必須の構造だと考えられていた水酸基の代替構造として、カルボキシメトキシ基を見出した。

本研究の結論を申請者は以下のように要約した。

新規作用機序の抗リウマチ薬創製を目的として、タンパク質リン酸化酵素の一つであるCaMKII $\gamma$ に注目し、その阻害薬の創出を目指して研究を行った。その結果、以下に示す知見を得た。

- ① キナーゼ阻害薬の構造的特徴に着目して構造展開を行う手法は、エックス線結晶構造解析情報や阻害剤に関する報告が十分ではない標的に対して、効率的に探索研究を行うための一つの方策として有用であると考えられる。
- ② オフターゲットの阻害活性に対する選択性を改善させる方法の一つとして、標的タンパク質の阻害活性に重要な部分構造を特定し、その構造に注目して化合物を設計することが効果的であることが示唆された。
- ③ 薬剤の水溶性を改善する方策として、脂溶性の低減を目指すことが有効であることが知られている。研究を進める際に、設計した化合物が元の化合物と比べ脂溶性が増加しているのか、低下しているのかをあらかじめ推測するための指標として、計算可能なcLogP値を参考にすることが効果的であることを示した。

そして申請者はCaMKII $\gamma$ 阻害薬に関する活性向上、キナーゼ選択性および水溶性改善の知見は、経口投与可能な選択的CaMKII $\gamma$ 阻害薬の創出につながる成果であり、さらに本知見はキナーゼ阻害薬の効率的な探索研究の一助となることが期待されると結論付けた。また、申請者は動物の高齢化に伴う関節炎にもヒトと同じ薬効成分の抗リウマチ薬が用いられている現状に着目し、ヒトのみならず動物の治療のためにも本研究を基盤とした新規抗リウマチ薬開発の意義は大きいと考えている。

よって、本論文は、博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会などの所定の手続きを経たうえ、平成26年2月7日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。