

論文の内容の要旨

論文題目 血管内皮増殖因子受容体チロシンキナーゼ
を標的にした経口抗腫瘍物質の創製

氏 名 久保和生

チロシンキナーゼ(TK)は生体の恒常性に関わる重要な役割を担うタンパク質で、ヒトゲノム解析により 90 を超える TK の存在が予測されている。TK はアデノシン三リン酸(ATP)を利用し、タンパク質の特定のチロシン残基のリン酸化を触媒する酵素で、受容体型 TK の場合、細胞外からの種々のシグナルを受容し細胞内シグナルに変換する。一方、TK の過剰発現・欠失・変異等によるシグナルの制御異常は、主に発癌、発生発達障害や免疫異常などの疾病として現れる。細胞内で TK 活性を抑制する物質は、リガンドの種類に影響されず、リガンド非依存的な活性化も阻害でき、細胞内シグナル伝達機構研究の有効な研究ツールとして古くから注目されており、標的にした TK に対する高い選択性および強い阻害活性を有す化合物が求められている。しかしながら、各 TK 間の構造相同性が非常に高いことから、高選択的阻害物質の創製は困難と考えられ、特に医療分野への応用は重篤な副作用の発現が懸念されていた。高い選択性を有す TK 阻害物質を見出せば生命現象の解明を促進する有用な手段を提供できるだけでなく、標的に対して選択的に作用する副作用の少ない医薬品としての活用も考えられる。

筆者は本研究において、血小板由来増殖因子受容体(PDGFR)TK 阻害物質に対し高い選択性、強い活性を有す化合物群を見出した。また、血管内皮増殖因子受容体(VEGFR)TK に対し阻害活性を有す化合物群を明らかにし、これを発展させ、血管新生阻害を主作用とする経口投与で抗腫瘍効果を示す物質を見出すことができた。以下、本物質の創製にいたる経緯を、1) PDGFR TK 阻害物質の創製、2) その構造最適化、3) 経口投与で抗腫瘍活性を示す VEGFR TK 阻害物質の創製、および、4) 合成中間体である 4-キノロン骨格の新規合成法の開発、に分けて述べる。

1) PDGFRTK 阻害物質の創製

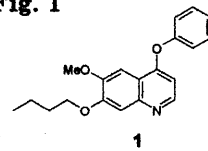
PDGF およびその受容体は、間葉系細胞等の増殖・分化を制御する重要な役割を担っている。PDGFR ファミリーは5種類知られており、それらは、細胞外に5つの免疫グロブリン様領域、細胞内にキナーゼ挿入部位を含む TK 領域を有す構造をしている。一方、PDGFRTK のシグナル伝達異常は癌、慢性炎症性疾患など多くの病因と考えられている。そこで PDGFRTK を選択的かつ強力に阻害する低分子化合物を見出し、各種生物活性を評価し医薬品への可能性を検討しようと考えた。PDGFR が高発現しているラット腎メサンギウム細胞を用い PDGFR のリン酸化阻害活性の評価系を構築し、キリンビール(株)医薬探索研究所保有の約 5000 化合物をスクリーニングしたところ、4-フェノキシキノリン誘導体(1)がヒットした(Fig. 1)。このとき、50%阻害濃度(IC₅₀)は 2.6μM であった。合成ルートを開発し(Scheme 1)、1 のフェノキシ基上に様々な置換基を導入した誘導体を合成し構造最適化を試みたところ、IC₅₀ が 0.13 μM である 3,4-ジメトキシ基を置換した誘導体(10v)を見出した。10v は、ATP との競合実験により ATP 拮抗型であることが判明し、また、PDGF 刺激下、腎メサンギウム細胞の増殖を濃度依存的に抑制した。以上のことから、10v は、PDGFR の ATP 結合部位に作用し、受容体のリン酸化を抑制することにより細胞増殖を阻害するものと考えられた。

次に、他研究機関から報告された上皮増殖因子受容体(EGFR)に対し高い選択性、強いリン酸化阻害活性を有す物質(11a)と 10v の構造活性相関を比較検討した(Fig. 2)。10v と 11a のそれぞれを構成する3つの部分構造、X、Y、R を入れ替えた8通りの化合物を合成し、PDGFR および EGFR のリン酸化阻害活性を測定するとそれぞれの受容体に対する阻害活性は大きく変化した。特にフェニル基上の置換基が選択性発現に大きく関わっていることが判明した(Table 1)。以上の結果から、置換基や原子を適切に基本骨格に導入することにより、高い選択性、強いリン酸化阻害活性を有すキナーゼ阻害剤の創製が可能であることが示唆された。

2) PDGFRTK 阻害物質の構造最適化

前述の検討において、フェニル基上にケトン基を置換した化合物の中には良好な活性、選択性を示す化合物があった。そこで、PDGFR に対する選択性、阻害活性の向上を目指しケトン基を導入した化合物、およびさらなる活性向上を目指し、アミド基を導入した化合物を合成した結果、末端のフェニル基上4位に嵩高いアルキル基を有す化合物に PDGFR に対する良好なリン酸化阻害活性

Fig. 1



Scheme 1

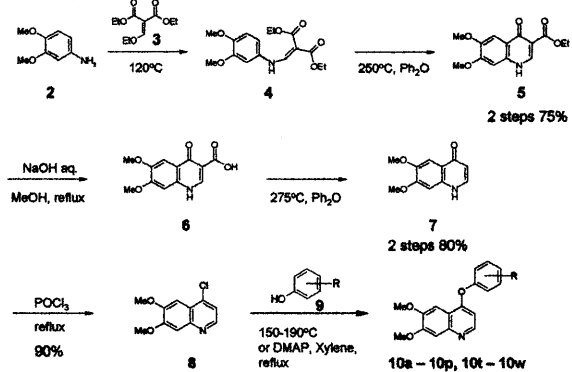


Fig. 2

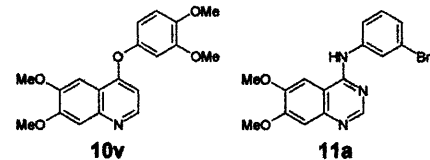
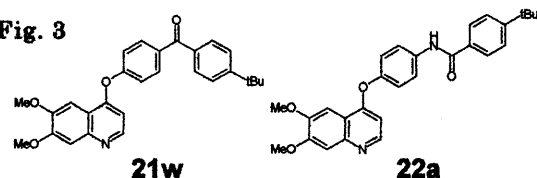


Table 1

No.	X	Y	R	IC ₅₀ (μM)	
				PDGFR	EGFR
10v	O	CH	A	0.13	>100
11b	O	N	A	0.57	>100
10x	NH	CH	A	2.6	81
11c	NH	N	A	4.5	2.8
10y	O	CH	B	8.4	2.5
10z	NH	CH	B	21.5	0.37
11d	O	N	B	14.8	0.07
11a	NH	N	B	21.9	0.004

Fig. 3



(IC₅₀ 0.31 μM (21w)、0.05 μM (22a)) が認められた(Fig. 3)。次に、前述の 10v、および 21w、22a の各種キナーゼに対する阻害活性を評価したところ、10v、21w および 22a は、EGFR、線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR)、インスリン受容体(InsulinR)などの受容体型 TK に対して高い選択性を示した(Table 2)。

	IC ₅₀ (μM)			
	PDGFRβ	EGFR	FGFR	InsulinR
10v	0.13	>100	>100	>100
21w	0.31	>100	3.8	>100
22a	0.050	>100	>100	>100

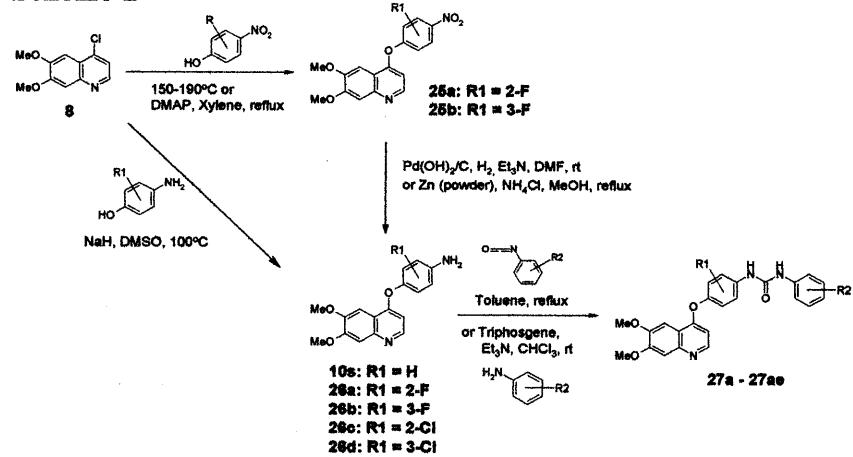
以上のことから、末端に嵩高いアルキル基をベンゾイル、ベンズアミド基に置換した化合物が PDGFR に対する高い選択性、強い阻害活性を有することが明らかになった。

3) 経口投与で抗腫瘍活性を示す VEGFR TK 阻害物質の創製

VEGF および VEGFR は中心的な血管新生因子で血管内皮細胞増殖、透過性亢進などに関与し、胎生期の個体発生等に重要な役割を担っている。VEGFR ファミリーは 3 種知られており、これらの構造は PDGFR に非常に類似しており、細胞外に 7 つの免疫グロブリン様領域、細胞内にキナーゼ挿入部位を含む TK 領域を有している。一方、腫瘍増殖には血管新生が必須で、VEGF-A と VEGFR が主要な役割を果たしていることが明らかにされている。一般に、腫瘍細胞は VEGF を分泌し周囲の血管内皮細胞を刺激することにより腫瘍血管を新生させると考えられている。腫瘍血管は、酸素・栄養の補給路として細胞増殖に寄与したり、転移経路にも利用される。

さて、PDGFR TK 阻害物質の検討を続け、フェノキシ基 4 位にウレア基を置換した化合物を合成したところ(Scheme 2)、IC₅₀ が 1 nM レベルという強力な阻害活性を有することを見出した(Fig. 4)。癌細胞を移植したヌードマウス xenograft モデルに 27a を腹腔内投与したと

Scheme 2



ころ抗腫瘍効果が認められ、さらなる検討の結果、試験管レベルの実験において癌細胞の増殖を抑制しないにもかかわらず、動物実験においては種々の癌細胞に有意な抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。作用機序を検討すると、VEGFR にも強力なリン酸化阻害活性を有することが判明した。そこで、これらの化合物をもとに経口抗腫瘍物質の研究に着手した。NIH3T3 細胞を用い VEGF 刺激下における VEGFR のリン酸化阻害活性の評価系を構築し、各種誘導体をスクリーニングした結果、キノリン環 4 位に置換された酸素原子を窒素原子にした化合物や、ウレア基をチオウレア基やシアノグアニジン基に変換した化合物の活性は著しく低下した。構造最適化の検討から得られた 27ab(Fig.5)の各種キナーゼに対する阻害活性を評価すると、EGFR、肝細胞増殖因子受容体(HGFR)、および InsulinR には 1000 nM でも

Fig. 4

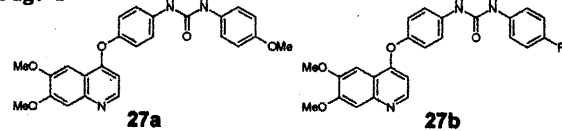
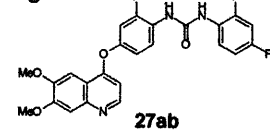


Fig. 5



阻害活性が認められなかったが、PDGFR α 、c-Kit にはやや強い活性が認められた(**Table 3**)。27ab は VEGF 刺激下のヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)の増殖を用量依存的に阻害し、また、このときの阻害濃度では癌細胞に対する直接的な増殖阻害活性を示さなかったことから、抗腫瘍活性は VEGFR を介する血管新生阻害によるものと考えた。また、ヒト肺癌を移植したヌードラット xenograft モデルに対して、27ab を 5 mg/kg、1 日 1 回、14 日間連日経口投与したところ、投与期間中、体重減少、重篤な毒性所見なしに完全に腫瘍増殖を抑制した(**Fig.6**)。以上の結果から、27ab は VEGFR を標的にした血管新生阻害活性を作用機序とする経口投与可能な抗腫瘍物質であることが明らかになった。

4)4-キノロン骨格新規合成法の開発

4)4-キノロン骨格新規合成法の開発

本研究において 6,7-ジメトキシ-4-キノロンは鍵中間体で、各種試験の実施のために大量合成する必要があったが、従来の方法

では、ジフェニルエーテルなどを用い 250°C を超える高温反応を必要とする工程を 2 つ含み、また、扱いづらい中間体が生成する大量合成には不向きであった。そこで、大量合成に適用可能な簡便で収率の高い合成法を検討することにした。

各種検討の結果、THF 中、NaH 存在下、2-アミノ-3,4-ジメトキシアセトフェノン(**A**)に 1 当量のギ酸エチルを室温で作用後、水で処理すると、4-キノロン体が収率 26% で得られることが明らかになった。詳細に反応条件

を検討すると、3 当量の NaH 存在下、ギ酸エチルを 5 当量用いると収率は 95% になった。また、非プロトン性溶媒では収率良く反応は進行するが、EtOH ではほとんど進行しないこと、また、塩基に NaOMe を利用できることも明らかになった(**Table 4**)。

本反応で生成した反応中間体を単離し構造解析を試みたところ、ギ酸エチルが 2 当量反応した化合物 **a** および **b**(**Fig. 7**)であることが判明した。この結果 **Fig. 7**

本反応は、**A** に 2 当量のギ酸エチルが作用し安定な中間体(**a**, **b**)を経由する反応機構であると推定された。

以上のように、PDGFR α 阻害物質の研究から端を発し、VEGFR-2TK 阻害物質を見出し、これをさらに発展させ血管新生阻害を主作用とする経口投与で抗腫瘍効果を示す物質を創製することができた。また、鍵中間体 4-キノロンの簡便な合成法を開発することができた。

Table 3

Kinase	Cell	IC ₅₀ (nM)
VEGFR-2	NIH3T3	0.9
PDGFR α	G292	67
c-Kit	HMC-1	40
FGFR-2	HepG2	170
EGFR	A431	>10000
HGFR	A431	>10000
InsulinR	HepG2	>10000

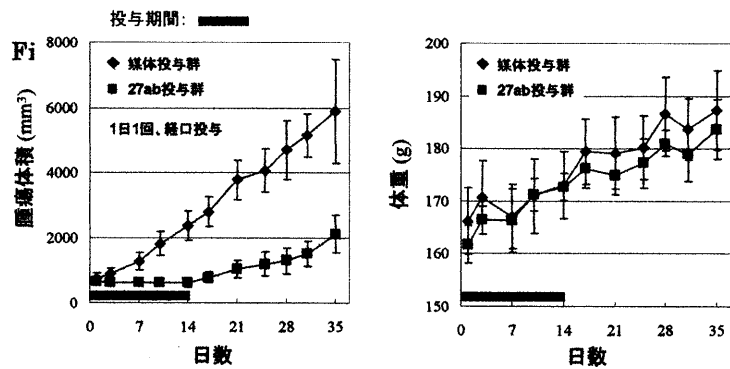
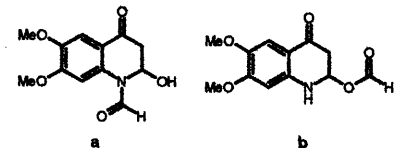


Table 4

Base	Solvent	Time (h)	Yield (%)
NaH	THF	2.5	95
NaH	DMF	6.5	77
NaH	CH ₃ CN	2.5	98
NaH	Toluene	5.0	91
NaH	EtOH	3.5	Trace
NaOMe	THF	3.2	98
NaOMe	1,2-Dimethoxyethane	1.4	95
NaOMe	1,4-Dioxane	3.5	98



以上