

## 審査の結果の要旨

氏名 久保和生

チロシンキナーゼ(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に対する強い阻害活性を有する化合物が求められている。しかしながら一方で、各TK間の構造相同性が非常に高いことから、高い選択性を有する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きた。高い選択性を有するTK阻害物質を見いだすことができれば、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期待される。

本論文はこの問題に取り組み、まず、血小板由来増殖因子受容体(PDGFR)TK阻害物質に対して高い選択性、強い活性を有する化合物群を見いだしている。さらに、血管内皮増殖因子受容体(VEGFR)TKに対して阻害活性を有する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いだした結果について述べたものである。

第一章では、PDGFR TK阻害物質の創製について述べている。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領域を有する。一方、PDGFR TKのシグナル伝達異常は、癌や慢性炎症性疾患など多くの病因と考えられている。そこで本論文は、PDGFR TKを選択的かつ強力に阻害する低分子化合物を見だし、各種生物活性を評価し医薬品への可能性を検討することを目的としている。まず、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た後、これを用いて約5000の化合物をスクリーニングし、4-フェノキシキノリン誘導体が有意な阻害活性を有することを見いだしている。次に、この化合物をリード化合物として新たな合成ルートを開発し、この化合物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、さらに優れた阻害活性を有する

3,4-ジメトキシ基を置換した誘導体を見出している。さらにこの化合物は、ATP との競合実験により ATP 拮抗型であること、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することを明らかにし、これらのことからこの化合物は、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推定している。

次に、他の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と、本論文で見いだした化合物の構造活性相関を比較検討している。これらの化合物のそれぞれを構成する3つの部分構造に由来する8種の化合物を合成し、PDGFR および EGFR のリン酸化阻害活性を測定している。その結果、それぞれの受容体に対する阻害活性は大きく変化し、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を明らかにし、これらの結果から、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を示している。

第二章では、PDGFR TK 阻害物質の構造最適化を行っている。第一章の検討において得られた知見から、フェニル基上にケトン基およびアミド基を導入した化合物を検討し、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が認められることを明らかにしている。次に、第一章で見いだした化合物も含め、各種キナーゼに対する阻害活性を評価し、これらの化合物は、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すことを見いだしている。さらに、末端に嵩高いアルキル基を有するベンゾイル、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ことを明らかにしている。

第三章では、経口投与で抗腫瘍活性を示す VEGFR TK 阻害物質の創製について述べている。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おり、腫瘍血管は、酸素・栄養の補給路として細胞増殖に寄与する一方、転移経路にも利用される。本論文では 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が強力な阻害活性を有することを見いだしている。さらに、癌細胞を

移植したヌードマウス xenograft モデルにこの化合物を腹腔内投与したと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を明らかにしている。さらに作用機序を検討し、VEGFRにも強力なリン酸化阻害活性を有することを明らかにし、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ている。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 位に置換されたウレア基の末端ベンゼン環のフッ素置換体が優れた活性を示すことを見いだしている。この化合物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 には阻害活性が認められないが、PDGFR $\alpha$ 、c-Kit にはやや強い活性が認められることも明らかにしている。ここで見いだした化合物は、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察している。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、この化合物を 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することを見だし、以上の結果から、この化合物は 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を明らかにしている。

第四章では、4-キノロン骨格の新規合成法の開発について述べている。本研究において 6,7-ジメトキシ-4-キノロンが鍵中間体であり、この化合物の大量合成に適した簡便かつ収率の高い合成法を検討している。種々検討の結果、THF 中、3 当量の NaH 存在下、2-アミノ-3,4-ジメトキシアセトフェノンに 5 当量のギ酸エチルを室温で作用させた後、水で処理すると、4-キノロン体が収率 95% で得られることが明らかにしている。さらに本反応で生成した中間体を単離し構造解析を行い、この化合物がギ酸エチルが 2 当量反応した構造を有することを見いだしている。

以上、本論文は PDGFR $\alpha$  阻害物質の研究から端を発し、VEGFR-2TK 阻害物質を見だし、さらに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創製したものである。また、鍵中間体 4-キノロンの簡便な合成法も開発しており、博士(薬学)の学位に値するものと判定した。