

氏名 みねひら だいすけ
峰平 大輔

学位の種類 博士 (薬科学)

学位記番号 富医薬博甲第 166 号

学位授与年月日 平成 27 年 3 月 24 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士後期課程
薬科学専攻

学位論文題目 糖代謝関連疾患治療を目指した低分子化合物の創製研究

論文審査委員

(主査)	教授	矢倉 隆之
(副査)	教授	松谷 裕二
(副査)	教授	豊岡 尚樹
(副査)	教授	足立 伊佐雄
(指導教員)	教授	酒井 秀雄

論文内容の要旨

製薬企業、大学や公的研究機関の科学者の多大な努力により、多様な切り口による医薬品が開発され、医療現場の治療選択肢を拡大させている。古くは有機合成化学により提供される低分子医薬がその中心を占有していたが、抗体医薬、近年は核酸医薬が台頭してきている。一方、現在の医薬品の大半を占める低分子医薬と抗体医薬にはそれぞれ一長一短がある。例えば、投与に際し、低分子医薬は多くの場合経口薬として用いられるが、抗体医薬はタンパク製剤であり注射が不可欠となる。しかしながら、抗体医薬は標的とするタンパクとの親和性が高いために、副作用発現のリスクが一般に少ない。それ以外にも、薬価や医薬品開発過程などその違いは顕著であり、創薬ニーズに沿った戦略を立てることが重要である。低分子医薬の開発においては年々その成功確度が低下しており優れたリード化合物を選定、獲得することの重要性が一層増してきている。近年はコンピュータ支援による合理的な分子設計が取り込まれているものの、天然物の構造をモチーフとする古典的なアプローチも依然として有力な手段の一つとして存在する。欧米諸国のみならず日本においてもアカデミア発の医薬シーズを生かそうとする傾向が近年広がっており、新規な医薬シーズを創製することは社会的な要請に応えることに繋がる。

こうした背景のもと、今回著者は天然物の構造をモチーフとした合成展開により、糖代謝関連疾患を標的とした生物活性物質の創製を行った。第一章では糖尿病性合併症（神経障害）治療における標的酵素である AKR1B1 選択的阻害剤の開発、第二章では糖尿病の治療標的である GLP-1 に焦点を当て、そして第三章では多くの糖や糖質の代謝に関与し、様々な病態に密接に関連するグリコシダーゼを標的とした研究を展開した。

1. 選択的 AKR1B1 阻害剤開発を目指した新規チオアミド誘導体の創製

2014年の世界の糖尿病有病数は3億8670万人、20-79歳の成人の有病率は8.3%にまで達し、年々増加の一途を辿っている。中でもアジアをはじめとする新興国の増加傾向は顕著である。一方、糖尿病の真の恐ろしさは高血糖持続に伴う糖尿病性合併症の発症にある。そのため、糖尿病患者においては適切な血糖コントロールを行うと同時に合併症の発症を予防することが重要である。糖尿病性合併症の発生機序は諸説挙げられており、中でも重要な役割を果たすと考えられているのが polyol 経路による sorbitol, fructose の産生である。そこで、この polyol 経路の最初の段階を担う律速酵素 AKR1B1 の阻害剤が糖尿病性合併症特に神経障害治療に貢献できるとして多くの阻害剤が開発されてきた。しかしながら、本邦において同酵素阻害に基づき臨床利用されているのは epalrestat 一品目のみとなっており、薬剤が有色であることに伴う汗、涙の着色等コンプライアンスにおける臨床上の課題改善や治療選択肢を拡大させるため有用な薬剤開発は急務である。これまでに開発されてきた多くの薬剤は *in vivo* における薬効欠如や副作用といった観点からドロップアウトしている。この副作用発現を抑制するアプローチの一つとしては、酵素阻害選択性を獲得することがある。生体内の毒性分子の解毒に関与する AKR1A1 に加え近年は類縁酵素である AKR1B10 に対しても阻害作用を示さない、すなわち、AKR1B1 に高選択的な阻害剤を創製することがより安全性の高い薬剤に繋がると考えられている。

著者らのグループでは、薬用植物である *Evodia rutaecarpa* (呉茱萸) に含まれる rhetsinine が AKR1B1 に対し阻害作用を示し、sorbitol の蓄積を抑制することを既に明らかにしている¹⁾。そこで、阻害作用の増強および AKR1A1 や AKR1B10 に対する酵素阻害選択性の向上を目指し、rhetsinine の構造をモチーフとした誘導体の合成に着手した。まず、既存の AKR1B1 阻害剤の部分構造である酢酸ユニットを組み込んだ **4** を合成しその AKR1B1 阻害活性評価を行った。その結果、 $IC_{50} : 48.6 \mu M$ を示し、epalrestat ($IC_{50} : 0.1 \mu M$) と比較するとその活性はかなり劣る結果となった。そこで、硫黄原子を導入したチオアミド誘導体を合成したところ軒並み活性の向上が認められた。酵素阻害選択性については、特に AKR1B10 が AKR1B1 とアミノ酸配列、高次構造を含め極めて相同性が高いことから選択性を獲得することは容易ではなかったが各種誘導体を合成することで、阻害活性 ($IC_{50} : 0.17 \mu M$) と選択性 (selectivity index : $AKR1A1/AKR1B1 = 312$, $AKR1B10/AKR1B1 = 253$) とともに優れた **8t** を見出すに至った (**Figure 1**)。AKR1B1, AKR1B10 と **8t** との結合様式に大きな差異が認められこれに伴い選択性が得られたと考えている²⁾。

2. GLP-1 分泌促進作用を有する新規三環系化合物の創製

近年、糖尿病治療戦略においてはインクレチン関連薬と呼ばれる薬剤の台頭が目覚ましく、中でも GLP-1 受容体作動薬は優れた血糖降下作用を示すだけでなく、他の薬剤と比較して低血糖リスクが低く、HbA1c の改善作用を有している。また、食欲抑制にも寄与することから単剤で過食傾向、肥満を伴う 2 型糖尿病患者に対してより良い治療効果をもたらすことが期待される。しかしながら、本薬剤がタンパク製剤であることから、注射による投与に限定され、医療施設、医療従事者の関与が不可欠であり患者への身体的負担が問題点として挙げられる。そこで、著者は GLP-1 分泌促進作用を有する新規低分子化合物の探索を行った。

著者らが有する化合物群を用いて初期スクリーニングを行った。評価についてはヒト腸管細胞株である NCI-H716 細胞を用いて ELISA 法により GLP-1 の分泌量を測定した。その結果、前述した AKR1B1 阻害剤の研究過程で得られた化合物の中から GLP-1 分泌促進作用を有する化合物 **10** が見出され、この化合物をもとに更に誘導体化を展開したところ、合成の都合上、混合物ではあるが、強力に GLP-1 の分泌を促す **A** ($1',3'$ -cis 置換体 **9** と $1',4'$ -trans 置換体 **30** の 5 : 1 混合物) が得られた (**Figure 2**)。本混合物は正常マウス C57BL/6J における糖負荷試験で有意な血糖降下作用を示し (**Figure 3**)、加えて、糖尿病モデルマウスにおいても抗糖尿病作用を示した。この混合物 **A** の合成過程においては立体特異的な転位反応が伴うことを明らかにした。すなわち、置換シクロヘキサノールに対し、Friedel-Crafts 反応を行うと予期に反し転位が伴った **20** が主成績体として得られる。この混合物を出発原料として合成を展開すると評価化合物 **A** が得られる (**Scheme 1**)。混合物 **A** の活性本体は、詳細に合成経路を検討し、それぞれ単一の化合物 **9**, **30** を得たのち活性評価を行ったところ $1',3'$ -cis 置換体 **9** であった³⁾。

3. グリコシダーゼ阻害剤開発を目指したイミノ糖誘導体の合成と活性評価

糖加水分解酵素群であるグリコシダーゼは、細胞内での糖タンパク質、糖脂質プロセシング、小腸での糖質消化をはじめとして生体内において重要な役割を果たしている。この一連の生理作用は、糖尿病、AIDS、がん転移、リソソーム蓄積症といった疾患に密接に関連しており、各種グリコシダーゼに対する阻害剤の開発研究に多大な努力が注がれてきた。グリコシダーゼ阻害剤の代表格としてはイミノ糖が広く知られておりその構造的特徴としては piperidine, pyrrolidine, pyrrolizidine, indolizidine, nortropane のいずれかのへ

テロ環を母核構造としてもち、かつ複数の水酸基を有していることが挙げられる。現在までにイミノ糖をベースとする医薬品やその候補薬が創出されているものの、その母核構造は単糖の良好なミミックとして機能する piperidine, pyrrolidine 骨格に限定的であった。

Hyacinthacine 類はヒアシンス科及びユリ科の植物より単離された pyrrolizidine 型イミノ糖である。このアルカロイドは pyrrolizidine 環の 5 位, 6 位, 7 位に水酸基を持たない A 群, 水酸基を一つ含む B 群, 水酸基を二つ持つ C 群の 3 種類に分類されている (Figure 4)。これら化合物の中からはグリコシダーゼに対し阻害活性を有するものが報告されているものの、関連する研究の大部分は合成化学的興味による全合成研究やそのエピ体合成に限定的である。一方、グリコシダーゼに対する阻害作用は水酸基の立体化学に加え側鎖の長さによってその活性が劇的に変化することが知られており、pyrrolizidine を含む二環性イミノ糖は、単環性イミノ糖と比較すると単糖との構造的類似性が低いことも相まってその阻害能を予測することは容易ではない。しかしながら、単環性イミノ糖の合成研究や活性評価については網羅的に展開され多くの知見が得られている現状もあり、今回著者は網羅的構造活性相関が未だ明らかではなく、よりチャレンジングな pyrrolizidine 型イミノ糖に焦点を当て合成研究に着手した。そこでまず、hyacinthacine 類の構造をモチーフとして化合物をデザインし (Figure 5)、これら化合物のグリコシダーゼ阻害活性評価を行うことで、水酸基の立体化学や C-3 位から伸張されるアルキル側鎖がもたらす影響について検討した。両対掌体を効率的に得るために、単一の光学活性体から両対掌体の合成が可能な enantio divergent strategy に基づき効率的に目的化合物を合成することとした。併せて合成経路終盤での誘導體化を可能とする経路の構築を目指した。

ピロールから 4 工程で得られるジオール **47** に対し、文献既知の方法⁴⁾に従い非対称化を行い光学活性なモノアセテート **48** とし、更に 4 工程にて α,β -不飽和エステル **52** とした。続いて、ジヒドロキシル化を行い、中程度の立体選択性 (2:1) にてジオール **53** を得た。この 2 種類のジアステレオマーは容易にカラムクロマトグラフィーでの分離が可能である。次に、得られたジオールを 4 工程にて環化前駆体である α,β -不飽和エステル **60** に変換し、Boc 基の脱保護で得られる 2 級アミンについて塩基性条件下にて分子内 aza-Michael 環化反応を行い **63** とした。最後に環化体 **63** 及び脱シリル化が伴った **62** をもとに 4 種類の誘導體を合成した (Scheme 2)。また、共通中間体 **48** について 4 工程にて保護基の架け替えを行い、*ent*-**50** を合成し、上記合成経路同様、*ent*-**65**, *ent*-**73-75** を合成した。得られた化合物の立体化学については NOE を測定することで決定している。光学異性体を含む計 8 種類の誘導體について各種グリコシダーゼに対する酵素阻害活性評価を行った。その結果、化合物 **65** が α -L-fucosidase に対し阻害活性を示すことが明らかになった (IC_{50} : 34 μ M)。 α -L-fucosidase は細菌細胞壁の強度維持に関与していることが近年明らかになっており、化合物 **65** が同酵素阻害剤のリード化合物として期待できることが示唆された⁵⁾。

References

- 1) Kato, A. *et al. Phytomedicine* **2009**, *16*, 258-261.
- 2) Minehira, D. *et al. Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 356-367.
- 3) Minehira, D. *et al. Heterocycles* **2015**, *90*, 372-404.
- 4) Robert, C. *et al. Tetrahedron Asymmetry* **2008**, *19*, 1333-1338.
- 5) Minehira, D. *et al. Tetrahedron Lett.* **2015**, *56*, 331-334.

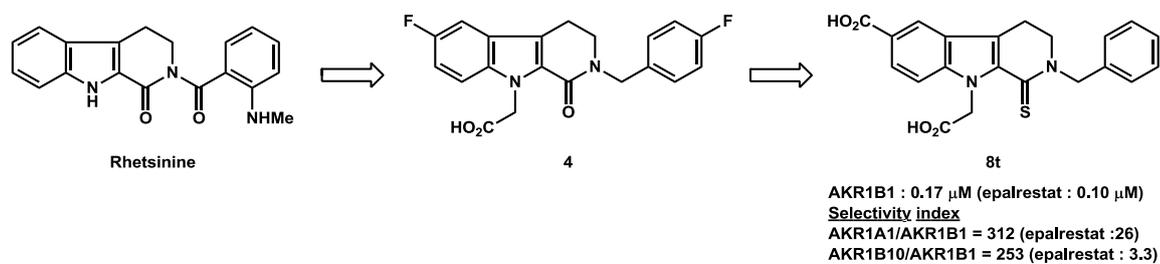


Figure 1. Development of selective AKR1B1 inhibitors.

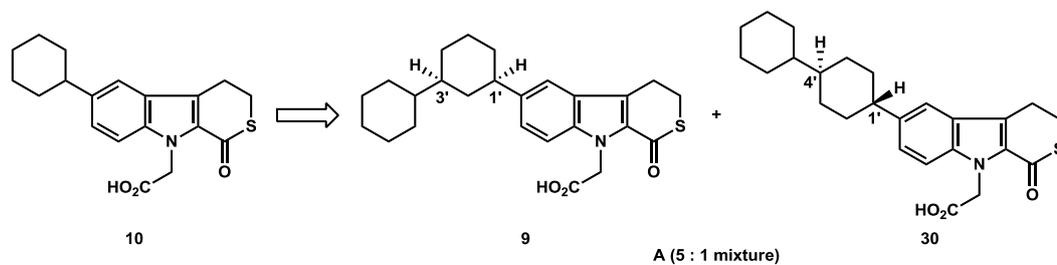


Figure 2. Structures of 10, 9 and 30.

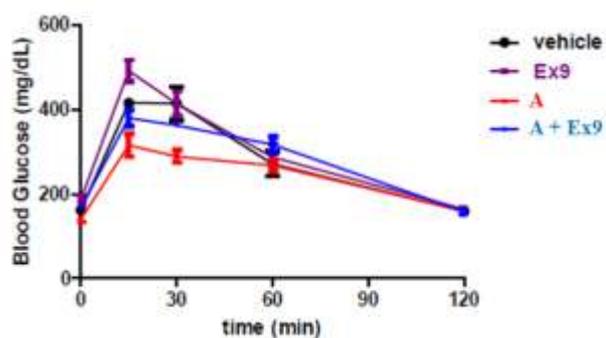
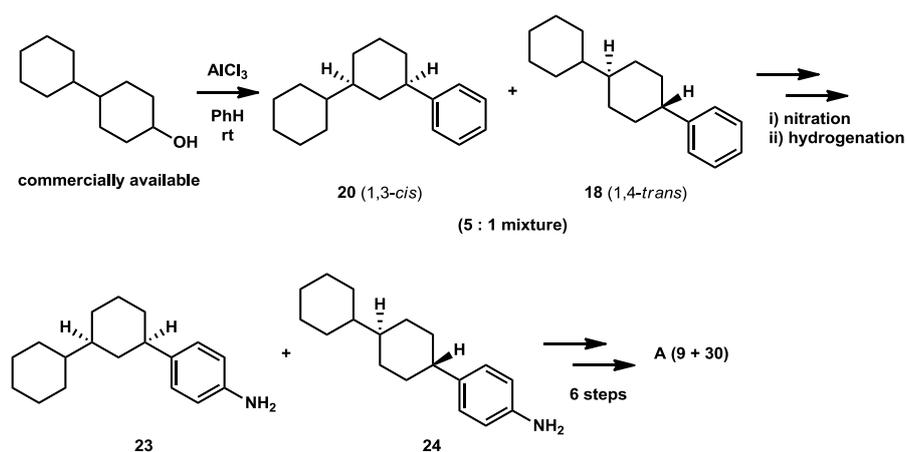


Figure 3. Hypoglycemic effect of A after an oral glucose load and the influence of a GLP-1 antagonist (Exendin (9-39)) on it in C57BL/6J mice.



Scheme 1. Synthesis of A.

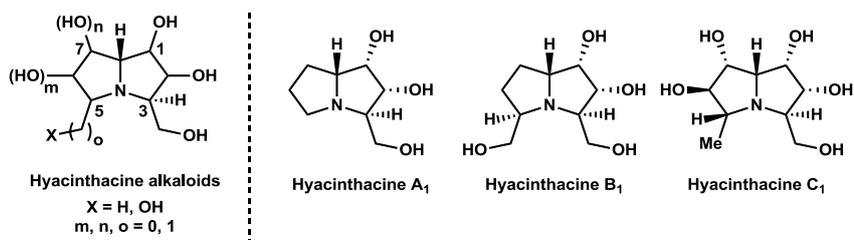


Figure 4. Structures of hyacinthacine alkaloids.

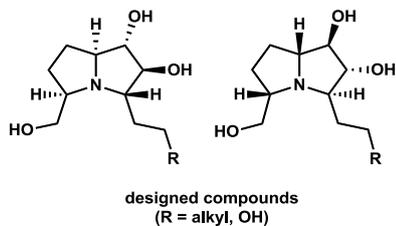
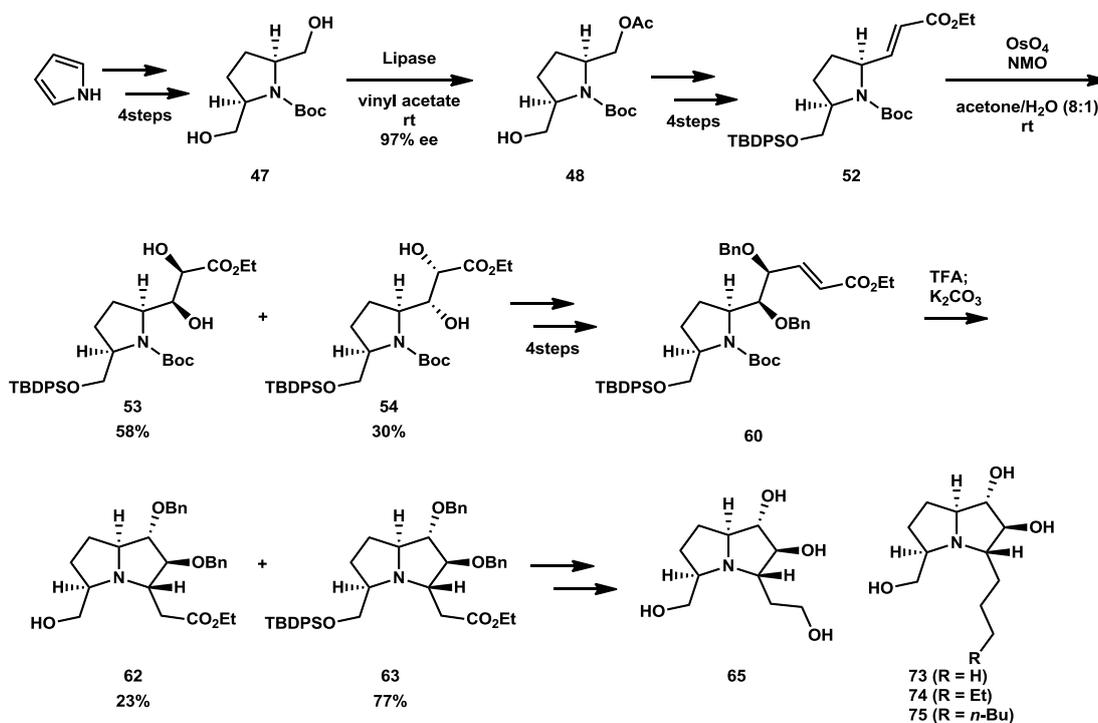


Figure 5. Structures of designed compounds.



Scheme 2. Synthesis of **65**, **73-75**.

学位論文審査の要旨

生体のエネルギー源かつ構成成分として機能する糖は広範な生理作用を担っている。糖の正常な代謝機能が失われることは様々な疾患の発症につながる。

糖尿病は糖代謝が関連する疾患の代表例であり、インスリン抵抗性などの特徴を示す。糖尿病などによる高血糖状態の持続は3大合併症に代表される重篤な糖尿病性合併症を発症することが知られている。従って、優れた糖尿病性合併症治療薬が少ない現状において、効果的な薬剤の開発は重要な研究課題である。

マンノースやガラクトースをはじめとする単糖から構成される糖鎖はタンパク質や脂質と複合体を形成し、細胞間の認識や相互作用、組織の保護作用など様々な役割を担っている。この糖鎖の生理的な役割は完全には明らかにされていないがウイルス、細菌による感染症やがんの発生、転移などの疾患発症に関与するといわれており、徐々にその役割が明らかにされつつある。この糖鎖の形成、修飾に深く関与しているグリコシダーゼをうまくコントロールする化合物は基礎研究などのツールとしてだけでなく、医薬品開発など幅広い応用研究を進展させる可能性がある。そこで、申請者は糖代謝関連疾患治療を目指し、医薬品候補化合物として期待できる低分子化合物の創製あるいはそれら分子の創出を可能とする手法を確立する研究を実施した。

本研究の内容の骨子および審査結果は次のとおりである。

選択的 AKR1B1 阻害剤開発を目指したチオアミド誘導体の創製

Aldo-keto reductase family 1, member B1(AKR1B1)阻害剤は糖尿病性合併症治療薬として臨床利用されている。しかしながら、現在までに開発されたAKR1B1阻害剤の多くは副作用や毒性を示すことが明らかになっており、実際に医薬品として利用されているのは epalrestat 一品目であり、治療選択肢を広げるために優れた薬剤の開発が望まれている。そこで、申請者は薬用植物ゴシュユに含まれる rhetsinine が弱い AKR1B1 阻害作用を示すという知見に着目し、数百種以上の誘導体合成を行うことで epalrestat と同等の阻害活性を示す化合物の創製に成功した。また、近年の AKR1B1 阻害剤開発においては、類縁酵素である AKR1A1 や AKR1B10 との酵素阻害選択性を獲得することが副作用の発症の抑制につながると考えられている。創製した化合物は epalrestat と比較して、この酵素阻害選択性についても非常に優れていることを明らかにした。

GLP-1分泌促進作用を有する新規三環系化合物の創製

Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)は優れた抗糖尿病作用を示すことが知られており、GLP-1受容体作動薬として糖尿病治療に利用されている。しかしながら、この薬剤は注射薬であり、投与に際し、患者の身体的負担がかかることや医療施設、医療従事者の関与が不可欠であ

るなど臨床利用上の課題が存在する。そこで、GLP-1分泌促進作用を有する低分子化合物を創製できれば、経口投与を可能とする薬剤開発につながり、上記課題解決に貢献できる。申請者は、AKR1B1阻害剤開発において独自に構築した化合物群の中から、GLP-1分泌促進作用を有する低分子化合物を見出した。得られた化合物について活性増強を目的とした合成展開を行った結果、GLP-1の分泌を強力に促進する化合物の創製に成功した。本化合物は正常マウスのみならず、糖尿病モデルマウスにおいても優れた血糖降下作用を示すことを明らかにしている。

グリコシダーゼ阻害剤開発を目指したイミノ糖誘導体の合成

近年、ピロリチジンを母核とするイミノ糖がグリコシダーゼ阻害作用のほか優れた生物活性を示すことが報告されている。しかしながら、これらのイミノ糖は、天然からの供給量が少ないなどの課題があり、詳細な生物活性評価や構造活性相関研究を行う際の障害となっている。従って、誘導体化を可能とする天然型ならびに非天然型ピロリチジン型イミノ糖の合成方法の開発は基礎研究だけでなく、医薬品開発に応用可能な分子の創出へとつながることが期待される。そこで、申請者は *enantio divergent strategy* による効率的かつ柔軟なピロリチジン型イミノ糖の合成方法を構築し、光学異性体を含む計 8 種類の誘導体の合成を行い、併せて、それらのグリコシダーゼ阻害活性についても明らかにした。

以上申請者は、強力な酵素阻害活性と高い酵素阻害選択性を有する AKR1B1 阻害剤の創製、ならびに、GLP-1 の分泌促進に基づき、*in vivo* において抗糖尿病作用を示す化合物の創製に成功した。これらの結果は、今後の医薬品開発研究の発展に大きく貢献するものである。さらに、ピロリチジン型イミノ糖の柔軟な合成手法を確立したことで、構造活性相関研究の実施を可能にただけでなく、医薬品開発研究に応用可能な分子の創出につながることが期待される。

主査および副査は、申請者峰平大輔君に面接試験を行うと共に論文内容を綿密に審査し、この論文が博士 (薬科学) を受けるに十分値すると判断した。

Minehira, D.; Takeda, D.; Urata, H.; Kato, A.; Adachi, I.; Wang, X.; Matsuya, Y.; Sugimoto, K.; Takemura, M.; Endo, S.; Matsunaga, T.; Hara, A.; Koseki, J.; Narukawa, K.; Hirono, S.; Toyooka, N. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of Novel (1-Thioxo-1,2,3,4-tetrahydro- β -carbolin-9-yl) Acetic Acids as Selective Inhibitors for AKR1B1. *Bioorg. Med. Chem.*, 20, 356-367, 2012.

Minehira, D.; Takeda, D.; Miyawaki, S.; Kato, A.; Adachi, I.; Miyazaki, A.; Miyatake, R.; Umezaki, M.; Miura, K.; Kitahara, Y.; Sugimoto, K.; Matsuya, Y.; Toyooka, N. Synthesis and Evaluations of

GLP-1 Secretion and Anti-Diabetic Effect in KKAY Mice of New Tricyclic Compounds. *Heterocycles*, 90, 372-404, **2015**.

Minehira, D.; Okada, T.; Iwaki, R.; Kato, A.; Adachi, I.; Toyooka, N. Enantiodivergent strategy for the synthesis of polyhydroxylated pyrrolizidines and evaluation of their inhibitory activities against glycosidases. *Tetrahedron Lett.*, 56, 331-334, **2015**.