



Title	がん治療を目的とした高活性かつ選択的な線維芽細胞増殖因子受容体（FGFR）阻害剤ASP5878の創出
Author(s)	栗脇, 生実
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/98675
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名(栗脇生実)	
論文題名	がん治療を目的とした高活性かつ選択的な線維芽細胞増殖因子受容体(FGFR)阻害剤ASP5878の創出
論文内容の要旨	
<p>尿路上皮がんの一つに分類される膀胱がんでは、現治療法より治療効果や安全性が高い分子標的治療薬の登場が望まれている。膀胱がんを対象とした分子標的薬の臨床試験が積極的に進められており、高い治療効果が報告されているが、事前の遺伝子検査等で細分類された特定の患者のみが対象となっているため、膀胱がんを適応症とした分子標的薬の開発には、さらなるニーズがあると考えられる。また転移性膀胱がんでは、特に脳転移の場合は中枢移行性を有する薬剤が必要となるため低分子モダリティでの分子標的治療薬の登場が待ち望まれている。</p> <p>チロシンキナーゼは分子標的薬の主要な創薬標的の1つであり、チロシンキナーゼを標的とした多くの低分子阻害剤が抗がん剤として承認されている。チロシンキナーゼの一つであるFGFR3では、その活性化遺伝子変異や活性化型融合遺伝子が、一部の膀胱がん患者にて発現している。そのためFGFR3は膀胱がん患者を治療する有力な標的であり、FGFR3を阻害する薬剤創出を目指した研究は近年盛んに行われている。尿路上皮がん患者に対するFGFR阻害剤の臨床試験にて有効性が報告されていることから、FGFR3を標的とした治療薬の創出は膀胱がんに対する新たな治療手段として非常に魅力的だと考えられる。各FGFRサブファミリーの触媒ドメイン構造は、VEGFR2との相同性が高い。古典的なFGFR阻害剤ドビチニブの臨床試験にて副作用として認められた高血圧が、VEGFR2酵素阻害活性に因るものだと考えられている。臨床試験が現在進行中のインフィグラチニブとRPN-1371は、VEGFR2に対して高いFGFR3酵素選択性が獲得できている。</p> <p>そこで筆者は、VEGFR2酵素阻害活性の消失した強力なFGFR3酵素阻害剤は、高血圧等の厳しい副作用が発現しない魅力的な膀胱がん治療薬になると考え、医薬品候補化合物の創出を目的として創薬研究に着手した。特に重要と考えられる高い標的選択性獲得に向けて、標的蛋白と化合物との複合体構造情報を取得し、SBDDアプローチに基づく理論的な化合物デザインを目指した。</p> <p>第一章では、FGFR3酵素阻害活性評価によるHTSを実行し、ヒット化合物1を取得した。化合物1はFGFR1、2、3に対する酵素阻害活性が強力であったが、VEGFR2酵素阻害活性との選択性に乏しかった。化合物1とFGFR2酵素とのX線複合体構造解析を活用したSBDDアプローチにより、理論的にVEGFR2との酵素選択性を拡大させる2つの戦略を立案した。第一に溶媒領域周辺に配置されているLys476側鎖との水素結合を、第二にバックポケット周辺に配置されているMet529側鎖との疎水性相互作用を各々形成する計画を立てた。</p> <p>前者のアプローチでは、化合物1のベンゼン環上3'位メトキシ基の先にHBAを導入し、FGFR3酵素阻害活性が3倍増強しVEGFR2との選択性は139倍に広がった化合物18bを見出した。化合物18bとFGFR2蛋白との複合体構造の解析結果によると、Lys485のアミノ側鎖にあるアミノ基と弱い水素結合(3.1Å)を形成したことに加え、化合物18bのモルホリン内のメチレン部位がMet497のアミノ酸側鎖と疎水的相互作用を形成したことが、VEGFR2に対して高い選択性でFGFR3酵素阻害活性を示した1つの要因であると著者は考察した。</p> <p>後者のアプローチでは、化合物1の1,3,5-トリアジン環の1位から伸長させてバックポケットへアクセスし、FGFR3酵素阻害活性が3倍増強しVEGFR2との選択性は233倍以上に広がった化合物40aを見出した。化合物40aの類縁構造である化合物37とFGFR3蛋白とのX線複合体構造解析から、計画当初に予想した通り3,5-ジメトキシフェニル基部分はバックポケットを占有し、Met529のアミノ酸側鎖であるSδ原子、Cε原子とvdW相互作用を形成していた。対照的に、この置換基はVEGFR2蛋白のLeu889のアミノ酸側鎖であるCδ原子のみとvdW相互作用を形成していることが、VEGFR2酵素に対する選択性が獲得できた1つの要因と考察した。</p> <p>第二章では、得られた化合物40aの物理化学的性質や代謝安定性を改善するために、ピリミジン誘導体の構造最適化</p>	

に着手した。Lipinski's rule of fiveを参考にMWとHBAがより少ない化合物をデザインした。シュガーポケットを占有しているN-エチル-2-スルファモイル-アニリノ基を水素原子へと置き換えた化合物48は、10倍前後のFGFR3酵素及び細胞活性の僅かな減弱を認めた一方で、PAMPAやJP2溶解性が共に改善された。3, 5-ジメトキシフェニル基部位に2つのフルオロ基を導入した化合物57bにおいて顕著な酵素及び細胞活性の増強が認められ、フルオロ基の効果を明らかにする目的で分子動力学シミュレーションに着手した。フッ素原子が持つ高い電気陰性度が影響してAsp635の主鎖NH部分との水素結合が形成できたことが、酵素阻害活性向上の1つの理由であると予想した。

最適化研究の成果として得られた化合物57bは、in vivoにてマウスでの高い血漿中濃度や、その時の腫瘍細胞内での高いFGFR3自己リン酸化阻害活性を示した。さらには、in vivo抗腫瘍試験にて腫瘍サイズの退縮効果が認められたことから、膀胱がん患者の治療に向けた有望なリード化合物であると結論付けた。

第三章では、得られたリード化合物57bの低いヒト代謝安定性や高いhERGチャネル阻害活性の2つの課題を克服する目的で、ピリミジン誘導体の構造最適化に着手した。ヒト代謝安定性を向上させる目的で、代謝部位予測ソフトウェアを活用して構造変換サイトを絞り込んだ。その結果、メトキシ基部位とエチレンリンカー部位をそれぞれ変換した化合物78aと78eにおいて、薬理活性が同程度に維持した上でヒト代謝安定性を改善させることができた。

hERGチャネル阻害活性低減については、標的認識部位として有力な溶媒領域を占めるフェニル基部分に焦点を当てて化合物を設計した。その結果、ピラゾール環へと変換した化合物82、84、80において高い薬理活性を維持しつつ、hERGチャネル阻害活性について8倍以上の低減効果を達成した。考察のために、hERGチャネルとの相互作用への影響が予想される化合物パラメーターを算出したところ、 E_{HOMO} 値との相関が認められた。この結果から、hERGチャネルにおけるPhe656との $\pi-\pi$ スタッキング相互作用の減弱が、hERGチャネル阻害活性の低下を引き起こしていると推察した。

最適化研究の過程で得られた有望化合物群の内、高い膜透過性を維持できた化合物80においてのみ、マウスへの経口投与時の高い血漿中濃度、及び強力なin vivo薬理活性が認められた。魅力的なプロファイルを有する化合物80の高次評価の結果、安全性に関しては(1) in vitro全細胞パッチクランプ法でのhERG電流への影響が10 μM までは影響を与えないこと、(2) イヌに単回経口投与した際には、100 mg/kgまでは中枢神経系、心血管系、及び呼吸器系に対しての重篤な副作用は認められないことを確認した。薬物動態に関しては(1) ラット及びイヌにおいて、肝血流以下の全身クリアランス値と高い経口バイオアベイラビリティを示したこと、(2) 放射性標識化合物80をラットに経口投与した結果、中枢移行性を有することが明らかになった。

本研究により、FGFR3酵素阻害活性を有するピリミジン誘導体の構造活性相関研究に関する多様な知見を得た。その結果として、高い薬理活性、及び優れた薬物動態と安全性プロファイルを有する化合物80の創出に成功した。本化合物を臨床試験に進める化合物として選択し、ASP5878と命名した。ASP5878(80)は、FGFR3依存性の膀胱がん患者の治療に向けた魅力的な薬剤候補であり、膀胱がんからの脳転移を持つ患者に対しての追加効果も期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名(栗脇生実)		
	(職)	氏名
論文審査担当者	主査 副査 副査	教授 教授 教授
		赤井周司 小比賀聰 有澤光弘

論文審査の結果の要旨

線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) の1つであるFGFR3は膀胱がん患者を治療する有力な標的であり、FGFR3を阻害する薬剤創出を目指した研究は近年盛んに行われている。古典的なFGFR阻害薬の臨床試験において副作用として認められた高血圧は血管内皮細胞増殖因子受容体 (VEGFR) の1つであるVEGFR2阻害活性に因ると考えられている。そこで著者は、新規膀胱がん治療薬の創出を目指し、VEGFR2阻害活性の消失した強力なFGFR3阻害薬の開発研究を実施した。標的タンパク質と薬物候補化合物との複合体のX線結晶構造情報を基にした合理的な化合物設計による創薬研究の結果を3つの章にまとめた。

第1章では以下の成果を述べている。ハイスループットスクリーニングによりFGFR3阻害活性が強い化合物**1**を見出したが、VEGFR2との選択性に乏しかった。そこで、**1**とFGFR2との複合体構造を活用してVEGFR2との選択性拡大を目指し、①Lys476側鎖との水素結合、②バックポケットのMet529側鎖との疎水性相互作用を形成する計画を立てた。①ではFGFR3/VEGFR2選択性が139倍に向上した化合物**2**を見出した。**2**とFGFR2との複合体構造から、Lys485残基との水素結合に加え、Met497残基と疎水的相互作用を形成したことが高い選択性獲得につながったと考察した。②では、FGFR3/VEGFR2選択性が233倍以上に向上した化合物**3**を見出した。**3**の類縁体とFGFR3との複合体構造において、置換基がFGFR3バックポケットのMet529残基と、一方でVEGFR2のLeu889残基と各々ファンデルワールス相互作用を形成したことが選択性拡大の要因と考察した。

第2章では、**3**のマウスにおける薬物動態を改善するための構造最適化を図り、分子量と水素結合受容基がより少ない化合物を設計した。見出した化合物**4**では膜透過性と溶解性が改善され、マウス血漿中濃度が11倍向上した。また**4**に2つのフルオロ基を導入した化合物**5**において酵素及び細胞活性の顕著な増強が認められた。分子動力学 (MD) シミュレーションにより、**5**のフルオロ基がAsp635の主鎖NH部分と水素結合を形成したことが主活性向上の理由であると考察した。

第3章では、**5**が有する低いヒト代謝安定性と高いヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子 (hERG) 阻害活性の課題を克服する目的で構造最適化を進めた。代謝部位予測ソフトウェアを活用し構造変換した結果、化合物**6**と**7**でヒト代謝安定性が改善した。また、hERG阻害活性抑制のために、標的認識部位と考えられたフェニル基をピラゾール環へと変換した化合物**8**は、hERG阻害活性が8倍以上低減した。**8**とhERGとのπ-πスタッキング相互作用の減弱が一因と推察した。**8**の高次評価において薬物動態や安全性に関する懸念が無かつたことから、本化合物を臨床試験に進める化合物として選択した。

本研究では、以下に示す2種のアプローチで実験結果を考察したことは科学的意義が高い。1つ目は、FGFR3とVEGFR2のアミノ酸残基の違いによる微細な相互作用の変化を丁寧に考察し、FGFR3/VEGFR2選択性拡大の要因を解明した。2つ目は、フルオロ基導入の効果について、MDシミュレーションによる安定配座情報に基づく考察を行った。通常は一つの最安定配座情報を用いて考察されることが多いが、著者は多数のドッキングポーズを発生させて相互作用の距離分布をヒストグラムとし、その関係性から相互作用を考察した。

以上、安全性の高い有効な膀胱がん治療薬の創製を目指した本研究では、独自の手法で合理的に分子設計を進め、臨床試験に進める化合物を見出した。この成果は、創薬研究手法への学術的な波及効果なども認められることから、博士（薬学）の学位に値するものと認める。