

京都大学	博士（薬科学）	氏名	高須 康明
論文題目	肝疾患治療薬開発を指向した新規TGF-βシグナル伝達経路遮断薬 KUSC-Y244の創製研究		
（論文内容の要旨） Transforming growth factor β (TGF-β)は、元々、正常線維芽細胞の増殖を促進する因子の1つとして培養上清中から発見されたサイトカインであり、その後の解析の結果、多くの細胞に対して強力な増殖抑制作用を有することが明らかとなった。またTGF-βは、細胞外マトリックスの産生作用を介して組織修復などに重要な役割を果たしている。一方、過剰なTGF-βの作用は、組織に異常な線維沈着を誘導し、特に肝臓ではTGF-βが肝星細胞に作用し、コラーゲンなどの細胞外マトリックスの産生を亢進して肝硬変を引き起こし、さらには肝がんへと進展しうる。そのため、肝星細胞内のTGF-βシグナル伝達経路の遮断薬は有望な肝疾患治療薬の候補として期待されている。 そこで申請者は、新規肝疾患治療薬の開発を指向したTGF-βシグナル伝達経路遮断薬の創製研究に着手し、リード化合物KUSC-Y244の創製に成功した。KUSC-Y244は生細胞レベルにおいてTGF-βシグナル伝達経路の活性化を顕著に抑制させるだけでなく、動物レベルにおいても効果を示した。さらに、詳細な作用機序解明をはじめとするケミカルバイオロジー研究への展開を目指して、KUSC-Y244の骨格を基盤とした蛍光プローブ、フォトアフィニティプローブ、PETプローブ前駆体の合成にも成功した。			
第1章 生細胞レベルでの化合物評価系の構築と化合物スクリーニング 本研究では新規な骨格や作用機序を有する化合物がヒットすることを目指して生細胞レベルでの評価系を適用することとした。そこで、ルシフェラーゼ遺伝子上流にSmad結合配列であるCAGA配列を挿入したレポーターベクターをMv1Lu細胞（ミンク肺上皮様細胞）に導入し、スクリーニング用細胞株x9CAGA/Mv1Lu細胞を樹立した。本細胞のTGF-βに対する十分な応答性を確認後、合成化合物や微生物代謝物を含む化合物ライブラリーからスクリーニングを行い、阻害活性、選択性、細胞毒性、構造展開性などの観点からKUSC-C004を含むヒット化合物群を同定した。			
第2章 構造活性相関研究に基づいたリード化合物KUSC-Y244の創製および生物活性 ヒット化合物KUSC-C004は構造の新規性や構造展開性の観点から興味深かったが、TGF-βシグナル伝達経路の阻害活性は非常に弱いものであった(IC₅₀ = 1000 μM)。そこで、詳細な構造活性相関研究により阻害活性の向上を目指した。KUSC-C004は分子内にsulfonamide基を1つ有していたが、これをdisulfonamide体へ変換するとわずかながら阻害活性の向上が認められた。さらに複数の誘導体の阻害活性の結果を考え合わせて、1,3-benzenedisulfonamide骨格を遮断薬のscaffoldに設定した。合成展開の基本的な戦略として、化合物をright unit及びleft unitのモジュールに分けて両unitをアミノ基で置換することで、1,3-benzenedisulfonyl chlorideとのカップリングを容易にさせた。構造活性相関			

研究の結果、right unitにはBoc基で保護したaminomethyl piperidineを導入すると活性が向上することが判明した。Left unitにはcyclohexane環を導入すると高い阻害活性が得られたが、他のシグナル伝達経路に対する阻害効果も認められた。しかし、benzene環を導入するとTGF- β シグナル伝達経路の阻害活性は低下したものの、選択性は著しく改善された。これらの結果に加えて、後の構造活性相関研究も考慮し、left unitにはbenzene環を採用することとした。そして、benzene環上の置換基の効果について詳細に検討し、最終的にdimethylaminobenzene誘導体を導入したKUSC-Y244を創出した($IC_{50} = 0.6 \mu M$)。KUSC-Y244はx9CAGA/Mv1Lu細胞で細胞毒性を示さない濃度域においてTGF- β シグナル伝達経路の活性化を顕著に阻害した。さらに、肝星細胞や肝疾患動物モデルにおいても種々の線維化マーカーの遺伝子発現を有意に抑制した。

第3章 ケミカルプローブのデザインおよび創製

KUSC-Y244の作用機序解明や体内動態解析を目的として、種々のケミカルプローブのデザインし、合成を行った。はじめにKUSC-Y244の修飾可能部位や最適なリンカーの検討を行うためにいくつかのケミカルプローブ前駆体を合成し、TGF- β シグナル伝達経路の阻害活性に与える影響を調べ、活性低下を引き起こさない修飾可能部位を同定した。そして、これらの実験結果を基に、4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY) や diethylaminocoumarine を有する細胞内局在観察用の蛍光プローブ、trifluoromethyldiazirine基を用いた標的分子探索・同定用のフォトアフィニティープローブ、Stille反応を用いる高速メチル($^{11}CH_3$)化法による分子イメージング用PETプローブ前駆体の合成に成功した。

以上、本研究では、肝の線維化に深く関与しているTGF- β シグナル伝達経路を標的とする創薬化学的研究を行った。化合物の構造、活性、選択性、細胞毒性などの指標に基づいた構造活性相関研究を展開し、リード化合物KUSC-Y244の創製に成功した。KUSC-Y244は*in vitro*のみならず*in vivo*においても効果を示し、その有望性が示された。さらにKUSC-Y244の骨格を基盤とした種々のケミカルプローブの合成に成功した。合成したこれらのケミカルプローブ類は、標的分子の探索・同定、化合物の細胞内局在解明、ならびに体内動態の解明への利用が期待される。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、肝の線維化に深く関与しているTGF- β シグナル伝達経路を標的として、新規肝疾患治療薬の開発を指向した創薬化学的研究を行った。すなわち、スクリーニング研究により得られたヒット化合物に対して、構造、活性、選択性、細胞毒性などの指標に基づいた詳細な構造活性相関研究を展開し、リード化合物KUSC-Y244の創製に成功した。KUSC-Y244は*in vitro*のみならず*in vivo*においても薬効を示し、その有望性が示された。さらにKUSC-Y244の骨格を基盤として、蛍光分子プローブ、光親和性分子プローブ、PETプローブ前駆体など、有用なケミカルプローブの合成に成功した。今後、これらのケミカルプローブ類は、標的分子の探索・同定、化合物の細胞内局在解明、ならびに体内動態の解明への利用が期待される。

よって本論文は博士（薬科学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成23年2月22日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成24年 3月31日以降