

学位論文内容要旨

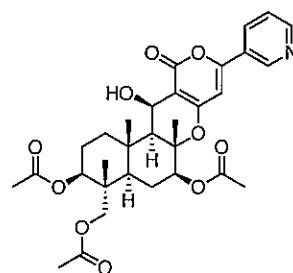
氏名 大多和 正樹



題目 「ACAT2 選択的阻害剤 pyripyropene A の構造活性相関研究」

<はじめに>

Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) は体内の遊離コレステロールのヒドロキシ基にアシル基を転移しコレステリルエステルの生成を触媒する酵素であり、その阻害剤は血中コレステロール量の低下や動脈硬化抑制が期待できる。このような背景の下、多くの製薬企業は 1980 年代より合成 ACAT 阻害剤の開発が展開されたが、副腎毒性や下痢などの副作用からその開発が中断された。一方、北里研究所にて合成剤と異なる骨格を求めて微生物資源より ACAT 阻害剤の探索を行った結果、1993 年に真菌の生産する pyripyropene A (1) を天然由来の最も強力な阻害剤として発見し、1 をリード化合物として多くの誘導体が合成された (第一次構造活性相関研究)。一方 1990 年代に入り、ACAT には 2 種のアイソザイム ACAT1 と ACAT2 が存在することが判明し、近年その機能の相違が明らかとなった。そこで既存の天然由来および合成 ACAT 阻害剤についてその選択性の再評価が行われた結果、1 は ACAT2 を高選択的に阻害する唯一の化合物であることが明らかとなった (Selectivity index (SI): $IC_{50}(ACAT1)/IC_{50}(ACAT2) > 1000$)。さらに最近、1 が経口投与により動脈硬化発症モデルマウスで有効であることが初めて証明されたことから、現在では脂質異常症予防治療のターゲットとして ACAT2 選択的な阻害剤からの可能性が強く示唆されている。従って申請者は、1 をリード化合物として、より高い ACAT2 阻害活性ならびにアイソザイム選択性を有する 1 の新規誘導体の創製を目指し、更なる詳細な構造活性相関研究を行った (第二次構造活性相関研究)。さらに、将来的な創薬開発を視野に入れ、天然物から誘導できない類縁体の合成に対応可能な応用性の高い 1 の全合成経路を確立し、その経路を応用することで 1 の新規構造簡略型誘導体の合成も行ったので以下順に説明する。



Pyripyropene A (PPPA, 1)

	IC_{50} (μ M)
ACAT1	>80.0
ACAT2	0.07
SI	>1000.0

Figure 1. Structure of pyripyropene A

<Pyripyropene A (1) の第二次構造活性相関研究>¹⁻⁸⁾

過去の構造活性相関研究より、1 の 7 位にベンゾイルオキシ基を有する誘導体 2 は、アイソザイム選択性は 1 より劣るものの ACAT2 阻害活性を維持することが明らかとなっている (Figure 2)。そこで、2 を基盤とした 7-置換ベンゾイルオキシ誘導体 3 を設計し、ACAT2 阻害活性並びにアイソザイム選択性の向上を試みた。

7-置換ベンゾイルオキシ誘導体 3 は過去に報告されている合成法に従い調製した (Scheme 1)。すなわち、1 の 7 位アセチル基の位置選択的な除去を行い、続く種々の置換安息香酸との縮合により 3 を得た。

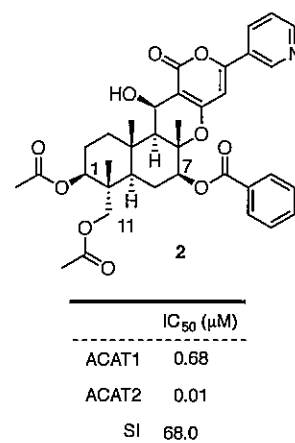
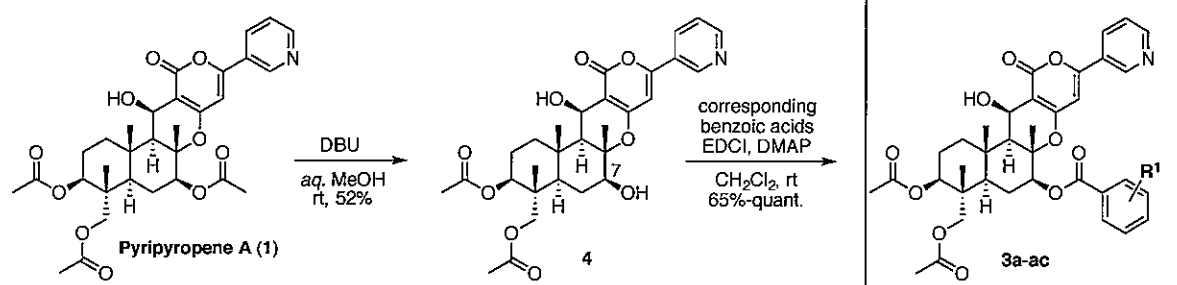


Figure 2. Structure of 7-benzoyloxy PPPA derivative 2



Scheme 1. Synthesis of 7-substituted benzoyloxy PPPA derivatives 3a-ac

合成した 7-置換ベンゾイルオキシ誘導体 3a-ac の活性評価の結果、多くの誘導体は高い ACAT2 阻害活性を示し、おおよそ *o*- < *m*- < *p*-置換の順で ACAT2 阻害活性が向上する結果となった (Table 1)。非常に高い ACAT2 阻害活性を有する誘導体も数種見出され、またベンゼン環上に電子供与性もしくは電子求引性置換基を有する誘導体間で ACAT2 阻害活性に対する大きな差は見られなかった。ただし、*p*-位にヒドロキシ基ならびにアミノ基を有する 3z, 3ac の ACAT2 阻害活性は 1 に比べ大きく低下した。一方アイソザイム選択性に注目すると、7-*p*-シアノベンゾイルオキシ誘導体 3b と 7-*p*-ニトロベンゾイルオキシ誘導体 3l が、初めて 1 を超える高いアイソザイム選択性を示すことが明らかとなった。そこで 7 位を *p*-シアノベンゾイル基に固定し、次に 1,11 位の更なる構造活性相関を検討することとした。

Table 1. ACAT1 and 2 inhibitory activity and isozyme selectivity of 7-substituted benzoyloxy PPPA derivatives **3a-ac**

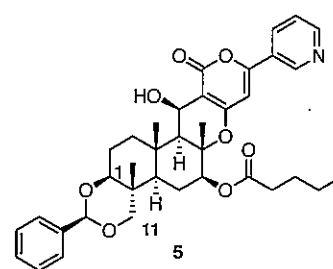
3a-ac

compound	R ¹	IC ₅₀ (μM)		SI*	compound	R ¹	IC ₅₀ (μM)		SI*
		ACAT1	ACAT2				ACAT1	ACAT2	
3a	<i>p</i> -OMe	0.51	0.0008	637.0	3p	<i>o</i> -I	0.19	0.0050	38.0
3b	<i>p</i> -CN	4.16	0.0009	4622.0	3q	<i>p</i> -N ₃	0.66	0.0050	132.0
3c	<i>p</i> -Me	0.27	0.0009	300.0	3r	<i>m</i> -Cl	0.21	0.0070	30.0
3d	<i>m</i> -F	0.23	0.0009	256.0	3s	<i>m</i> -SMe	0.11	0.0090	12.2
3e	<i>p</i> -Cl	0.69	0.0010	690.0	3t	<i>m</i> -CN	2.23	0.0100	223.0
3f	<i>p</i> -Et	0.19	0.0010	190.0	3u	<i>o</i> -Me	0.42	0.0100	42.0
3g	<i>m</i> -Br	0.12	0.0012	100.0	3v	<i>m</i> -vinyl	0.15	0.0110	13.6
3h	<i>p</i> -F	0.79	0.0017	465.0	3w	<i>m</i> -OMe	0.15	0.0150	10.0
3i	<i>p</i> -Br	0.83	0.0020	415.0	3x	<i>o</i> -F	1.00	0.0300	33.3
3j	<i>p</i> -SMe	0.54	0.0027	200.0	3y	<i>o</i> -Cl	1.00	0.0600	16.7
3k	<i>p</i> -I	1.17	0.0040	292.5	PPPA (1)		> 80.00	0.0700	> 1000.0
3l	<i>p</i> -NO ₂	7.41	0.0050	1482.5	3z	<i>p</i> -NH ₂	> 1.47	0.2000	> 7.4
3m	<i>p</i> -vinyl	0.71	0.0050	142.0	3aa	<i>o</i> -OMe	2.69	0.2300	11.7
3n	<i>m</i> -Me	0.65	0.0050	130.0	3ab	<i>o</i> -CN	1.62	0.2900	5.6
3o	<i>m</i> -I	0.25	0.0050	50.0	3ac	<i>p</i> -OH	> 1.46	0.3400	> 1.5

The derivatives were sorted in descending order of ACAT2 inhibitory activity.

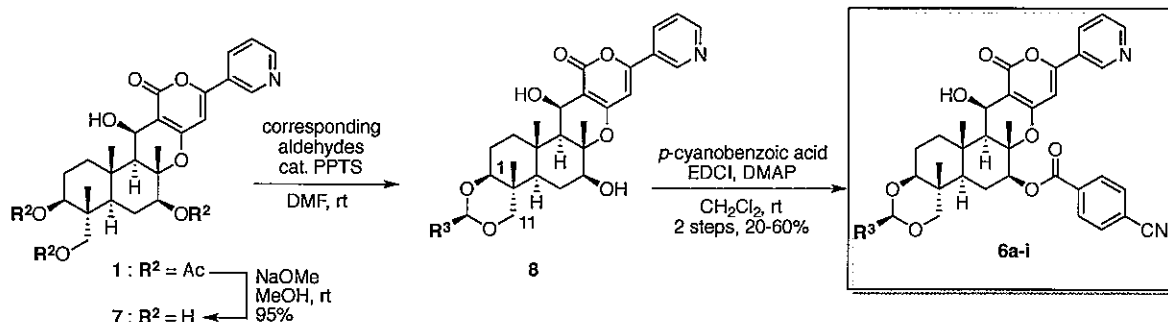
*Selectivity index (SI): IC₅₀ (ACAT1)/IC₅₀ (ACAT2)

一方 **Figure 3** に示すように、1,11-ベンジリデンアセタール誘導体 **5** も **1** と比べ ACAT2 阻害活性が向上することが過去の構造活性相関研究より明らかとなっている。そこで7位に *p*-シアノベンゾイル基を有する種々の 1,11-ベンジリデンアセタール誘導体 **6** の合成に着手した。**1** の 1,7,11-位のアセチル基をすべて除去しテトラオール **7** へと導き、1,11-位をベンジリデンアセタール化した後に7位を *p*-シアノベンゾイル化することにより **6** を合成した (**Scheme 2**)。



IC ₅₀ (μM)	
ACAT1	4.0
ACAT2	0.02
SI	200.0

Figure 3. Structure of 1,11-*O*-benzylidene PPPA derivative **5**



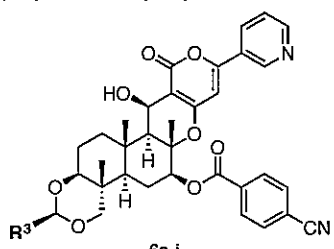
Scheme 2. Synthesis of 1,11-*O*-benzylidene-7-*p*-cyanobenzoyloxy PPPA derivatives **6a-i**

合成した 1,11-*O*-ベンジリデン-7-*p*-シアノベンゾイルオキシ誘導体 **6a-i** の活性評価を **Table 2** に示した。いずれのベンジリデン誘導体も、期待どおり **1** よりも強い ACAT2 阻害活性を示した。しかし無置換ベンジリデン誘導体 **6a** のアイソザイム選択性は、**1** よりも劣っていた。一方ベンジリデンのベンゼン環上のオルト位にメチル基を有する誘導体 **6b** は、**3b** をも上回る非常に高いアイソザイム選択性 (SI =>6161) を有することが分かった。またベンジリデンのフェニル基を α -ナフチル基に変換した誘導体 **6g** も同様に、高いアイソザイム選択性を示すことが分かった。そこで次に、両オルト位にメチル基を導入した

1,11-*O*-*o,o*-ジメチルベンジリデン誘導体 **6i** を合成し、活性を評価したところ、我々の期待を超える前例のない、非常に高いアイソザイム選択性 (SI =>9916) を示すことが分かった。これは現在のところ最強の ACAT2 選択的阻害剤である。

以上のように著者は ACAT2 阻害活性ならびにアイソザイム選択性向上を目指し、**1** の第二次構造活性相関研究を行った。その結果、7 位アシル基部分は *p*-シアノベンゾイル基が最適であることを見出し、加えて 1,11 位部分に関しては、*o,o*-ジメチルベンジリデンアセタールとすることで強力な ACAT2 阻害活性ならびに現在のところ最高のアイソザイム選択性を示す新規 PPPA 誘導体を創製することができた (**Figure 4**、太字表記が今回明らかにした結果)。尚、要旨の都合上、合成した新規誘導体の一部のみを紹介したが、本論文ではより詳細な **1** の構造活性相関を述べる。

Table 2. ACAT1 and 2 inhibitory activity and isozyme selectivity of 1,11-*O*-benzylidene-7-*p*-cyanobenzoyloxy PPPA derivatives **6a-i**



compound	R ³	IC ₅₀ (μM)		SI*
		ACAT1	ACAT2	
PPPA (1)	—	>80.00	0.0700	>1000.0
6a	Ph	2.80	0.0060	466.7
6b	<i>o</i> -MePh	>72.80	0.0118	>6161.0
6c	<i>m</i> -MePh	3.73	0.0078	478.2
6d	<i>p</i> -MePh	8.11	0.0097	836.1
6e	<i>o</i> -MeOPh	>71.00	0.0368	>1929.3
6f	<i>o</i> -FPh	0.33	0.0068	48.5
6g	α -naphthyl	>69.10	0.0232	>2978.4
6h	<i>o,p</i> -diMePh	10.00	0.0066	1515.2
6i	<i>o,o</i> -diMePh	>71.20	0.0072	>9916.4

*Selectivity index (SI): IC₅₀ (ACAT1)/IC₅₀ (ACAT2)

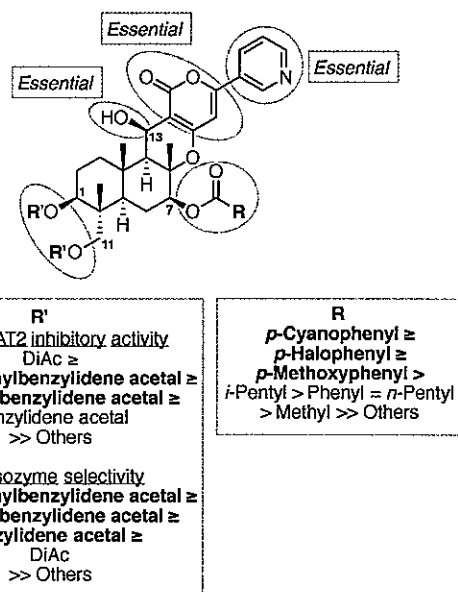
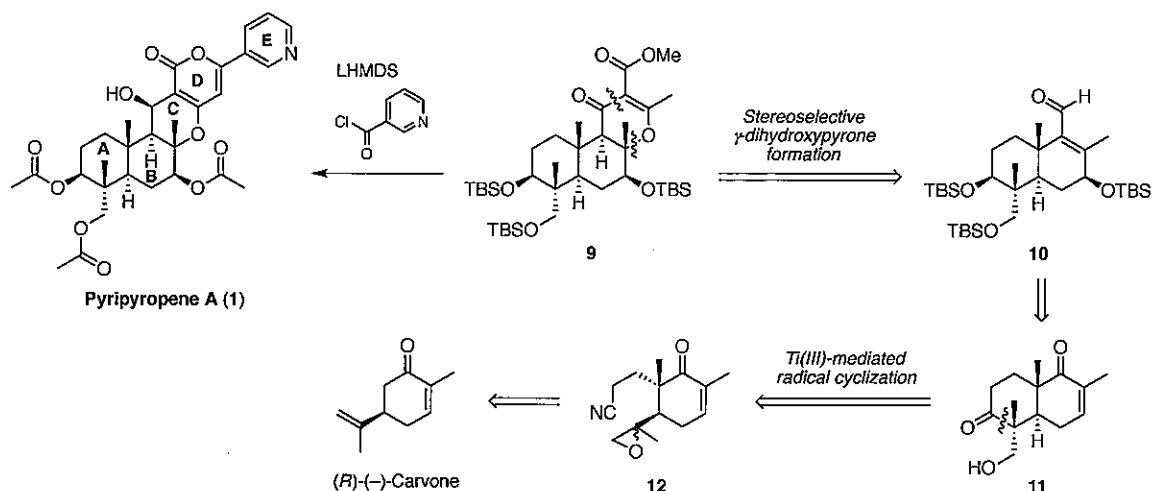


Figure 4. Summary of previous and current SAR studies on synthetic PPPA derivatives

<Pyripyropene A (1) の全合成>^{8,9)}

続いて 1 の構造簡略型誘導体の合成を可能とする応用性の高い 1 の全合成経路の構築を目指す事とした。

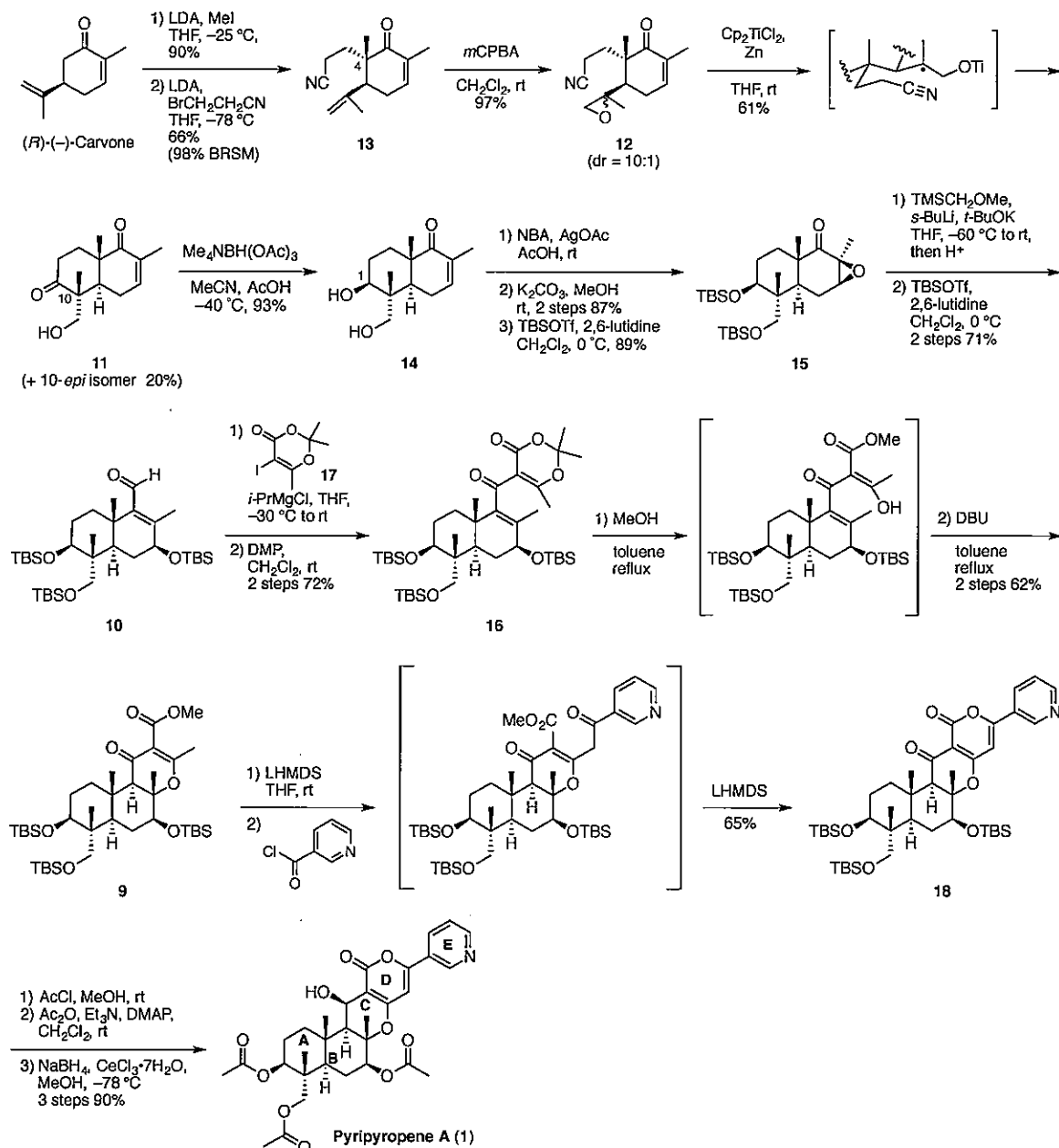
1 を合成するにあたり、Scheme 3 に示すような逆合成経路を考案した。すなわち、過去に我々のグループより報告された手法に従い既知のエステル 9 より合成することとし、エステル 9 はアルデヒド 10 よりβ-ケトエステル等価体を付加させた後、立体選択的な分子内ヘテロマイケル環化反応による C 環の構築により得られると考えた。アルデヒド 10 は 11 のα,β-不飽和ケトンから B 環上の官能基を構築することで導くこととした。エノン 11 は (R)-carvone を出発原料として、段階的なジアルキル化、エポキシ化の後に三価のチタニウム試薬を用いたラジカル環化反応にて立体選択的に A 環を構築することで得られると考えた。



Scheme 3. Retrosynthesis of pyripyropene A (1)

(R)-Carvone を出発原料として、段階的なジアルキル化により望む 4 位の立体配置を有する 13 とし、続いて位置選択的なエポキシ化を経て 12 を合成した。次に Ti(III) を用いたラジカル環化反応を試みた結果、目的の立体配置を有する 11 を得る事ができた。この反応は Scheme 4 に示すような 6 員環遷移状態を経由して進行すると考えられ、チタノキシルラジカルが発生した際、立体障害の大きいチタノセンを含む側鎖部位がエクアトリアル位に位置してラジカル環化が進行することで、立体選択的にジケトアルコール 11 が形成したものと考えている。その後、Evans 還元を行うことで目的の 1 位の立体配置を有するジオール 14 とし、続いて 14 に対するα,β-不飽和ケトンにおける Prévost 反応とその後の加溶媒分解を経て立体選択的にβ-エポキシドを構築した後、2 つのヒドロキシ基の TBS 基にて保護することで 15 へと導いた。次にケトン 15 に対する Peterson 反応と続く酸処理により対応するアルデヒドとし、生じた第 2 級ヒドロキシ基を TBS 基で保護することにより 10 を得た。続いて系中で 17 より調製した Grignard 試薬と反応させた後、第 2 級ヒドロキシ基を酸化してβ-ケトエステル等価体 16 を得ることができた。次にメタノールによる加溶

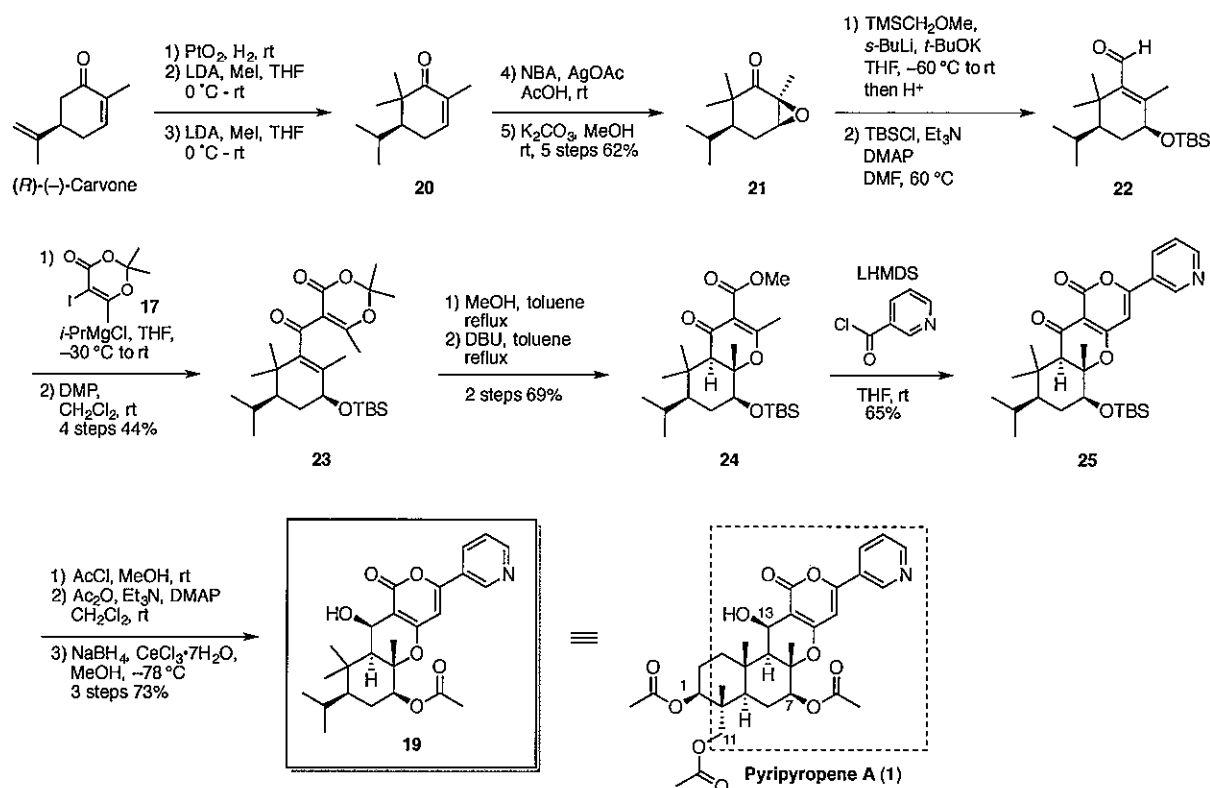
媒分解を行った後、DBU 存在下、立体選択的な分子内環化反応により BC 環を有する **9** を合成した。次に **9** とニコチノイルクロリドとのカップリング、続く分子内環化反応により **18** へと導いた。最後に TBS 基の脱保護、アセチル化、Lucas 還元により **1** の全合成を、計 18 工程、総収率 6% で達成する事ができた。



Scheme 4. Total synthesis of pyripyropene A (**1**)

<PPPA の A 環簡略型誘導体の合成>^{8,10)}

目的の PPPA (**1**) の全合成経路の確立に成功したので、続いて本経路を応用した新規 A 環簡略型誘導体の合成を目指すこととし、まず **19** を標的化合物として設定した (**Scheme 5**)。このような **1** の構造の低分子化を指向した新規誘導体は **1** から直接導くことは不可能であり、全合成経路を応用することで初めて展開可能となる誘導体群である。



Scheme 5. Design and synthesis of A-ring truncated PPPA analog **19**

新規 A 環簡略型誘導体 **19** も市販の(*R*)-carvone を原料として用い、A 環構築に関わる工程のみを省いて **1** の全合成経路を踏襲することにより合成することができた (Scheme 5)。すなわち、(*R*)-carvone に対する位置選択的な接触還元につき、段階的にケトンのα位をジメチル化することで **20** とした。その後は Scheme 4 と同様の工程を経ることで、目的の A 環簡略型誘導体 **19** の合成を達成した。

合成された新規 A 環簡略型誘導体 **19** の ACAT2 阻害活性を評価した結果、弱いながらも ACAT2 選択的な阻害活性 (ACAT2 IC₅₀ = 3.4 μM, SI = 6.5) を示すことが明らかとなった。更なる構造簡略型 PPPA 誘導体の合成および構造活性相関研究を進めたところ、**1** と同等の ACAT2 阻害活性ならびにアイソザイム選択性を示す誘導体も見出されており、その詳細は論文内で述べる。

<総括>

以上、新規脂質異常症予防治療薬の標的として注目されており、唯一の ACAT2 選択的阻害剤である天然有機化合物 pyripyropene A の第二次構造活性相関研究、全合成、そして全合成を応用した新規構造簡略型誘導体の合成を行った。その結果見出されたいくつかの新規誘導体は現在動物試験が進められており、現在のところ優れた結果を示している。今後の新規脂質異常症予防治療薬としての更なる開発が多いに期待されるところである。

<参考文献>

- 1) M. Ohtawa, H. Yamazaki, S. Ohte, D. Matsuda, T. Ohshiro, L. L. Rudel, S. Omura, H. Tomoda, T. Nagamitsu. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1285-1287.
- 2) M. Ohtawa, H. Yamazaki, D. Matsuda, T. Ohshiro, L. L. Rudel, S. Omura, H. Tomoda, T. Nagamitsu. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 2659-2662.
- 3) M. Ohtawa, H. Yamazaki, S. Ohte, D. Matsuda, T. Ohshiro, L. L. Rudel, S. Omura, H. Tomoda, T. Nagamitsu. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 3798-3801.
- 4) H. Tomoda, T. Nagamitsu, S. Omura, L. L. Rudel. WO2009081957.
- 5) H. Tomoda, T. Nagamitsu, D. Matsuda, T. Ohshiro, M. Ohtawa, S. Omura, WO 2010150739.
- 6) H. Tomoda, T. Nagamitsu, D. Matsuda, T. Ohshiro, M. Ohtawa, S. Omura, WO 2011122468.
- 7) M. Ohtawa, H. Tomoda, T. Nagamitsu. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2014**, *in press*.
- 8) M. Ohtawa, S. Omura, H. Tomoda, T. Nagamitsu. *有機合成化学協会誌* **2013**, *71*, 830-843.
- 9) A. Odani, K. Ishihara, M. Ohtawa, H. Tomoda, S. Omura, T. Nagamitsu. *Tetrahedron* **2011**, *67*, 8195-8203.
- 10) M. Ohtawa, S. Omura, H. Tomoda, T. Nagamitsu. 特願 2013-012868.