

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460152

研究課題名(和文) ACAT2選択的阻害剤pyripyropene A低分子型誘導体の創製研究

研究課題名(英文) Design, synthesis and biological evaluation of pyripyropene A truncated analogs as ACAT2 selective inhibitor

研究代表者

大多和 正樹(Ohtawa, Masaki)

北里大学・薬学部・講師

研究者番号：70453503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Pyripyropene A は唯一のACAT2選択的阻害剤であり、新規脂質異常症予防治療薬としての開発が期待されている。また当研究グループにおいて、種々の新規誘導体の合成に対応可能な、応用性の高いpyripyropene A の全合成経路の確立にも成功している。そこで本研究では更なる構造活性相関の知見を得るために、pyripyropene A の全合成経路を応用したA環簡略型誘導体群の合成と活性評価を行った。その結果、数種の誘導体が非天然化合物としては非常に強力かつアイソザイム選択的な阻害活性を示すことを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Pyripyropene A, isolated from the culture broth of *Aspergillus fumigatus* FO-1289, is currently the only compound known to strongly and selectively inhibit the acyl-CoA: cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2) isozyme. To assist the development of new cholesterol-lowering or anti-atherosclerotic agents, we designed new A-ring truncated pyripyropene A analogs. We report here our successful synthesis of truncated analogs via a stereoselective intramolecular Michael cyclization method, and the construction of a 6-pyridyl- $\alpha$ -pyrone moiety.

研究分野：創薬化学

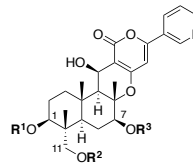
キーワード：創薬化学 構造活性相関 ACAT 有機合成化学

## 1. 研究開始当初の背景

現代における脂質異常症(高脂血症)や動脈硬化症の患者数は、自覚症状のない予備軍を含めて国内で3000万人にのぼるとされており、心筋梗塞や脳卒中など死に直結する疾患へと発展するリスクが高い。現在動脈硬化症の予防治療薬は、コレステロール生合成に関する律速酵素の一つであるHMG-CoA還元酵素を阻害するスタチン系医薬品が主に用いられており、世界中で非常に高い売上高となっている。しかし、現実には30~40%しか動脈硬化発症抑制効果が得られず、治療を受けてきた患者の半数が心疾患等を抑制していないことが明らかとなってきた。そこで我々は、スタチン耐性の動脈硬化症の治療や個々の病態に応じたテーラーメイド医療への発展が期待される薬剤標的として、コレステロールにアシル基を導入する酵素であるACAT(アシルCoA:コレステロールアシル転移酵素)に注目した。ACATは生体内で多様なコレステロール代謝に重要な役割を果たしており、小腸では食餌由来のコレステロール吸収に、肝臓では分泌されるリポタンパク質の生成に関与している。また動脈硬化巣ではマクロファージ内で脂肪滴が形成され泡沫化を起こすが、この過程にも深く寄与している。一方、ACATには2種のアイソザイムACAT1とACAT2の存在とその機能の相違が近年明らかとなり、現在ではACATを標的とする新規脂質異常症予防治療薬の開発を行う場合、ACAT2選択的阻害剤からの創薬の可能性が非常に高いことが示唆されている。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、1990年代に北里研究所生物機能研究所(現北里大学北里生命科学研究所)において単離・同定されていた真菌の二次代謝産物であるpyripyropene A(PPPA, **1**, Table 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。さらに最近、動脈硬化発症モデルマウスに**1**を3ヶ月間に渡り経口投与した結果、用量依存的に血中コレステロール値が減少し、さらに動脈硬化病巣も縮小していることが確認され、*in vivo*において初めてACAT2選択的阻害剤の有用性が示された。

続いて我々はより高い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、構造活性相関研究を行うこととした。計200種以上の誘導体の合成と、それらの活性評価に基づく構造活性相関より、天然物の**1**のACAT2阻害活性ならびにアイソザイム選択性を大幅に上回る新規誘導体群を見出した(Table 1)。これは現在のところ最強のACAT2選択的な阻害剤である。更にこれらは動物試験も進められ、**1**を遥かに超える非常に優れた結果を示した。従ってこれらの新規誘導体は、現在前臨床試験が進められている。

Table 1. Structures and ACAT inhibitory activities of natural pyripyropene A (PPPA, **1**) and its derivatives.



	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	IC <sub>50</sub> (μM)		SI*
				ACAT1	ACAT2	
Pyripyropene A (PPPA, <b>1</b> )	Ac	Ac	Ac	>80.00	0.0700	>1000.0
<b>2</b>	Ac	Ac	p-CN-Bz	4.16	0.0009	4622.0
<b>3</b>	—CHPh—	—	p-CN-Bz	2.80	0.0060	466.7
<b>4</b>	—CH(o-Me-Ph)—	—	p-CN-Bz	>72.80	0.0118	>6161.0
<b>5</b>	—CH(o,p-diMe-Ph)—	—	p-CN-Bz	>71.20	0.0072	>9916.4

\*Selectivity Index (SI): IC<sub>50</sub>(ACAT1) / IC<sub>50</sub>(ACAT2)

## 2. 研究の目的

ここまで述べたように、新規脂質異常症予防治療薬の開発を目指したPPPA(**1**)をリード化合物とする優れたACAT2選択的阻害剤の創製研究は今のところ順調に進み、動物試験も実施され、良好な結果を得るまでに至っている。一方、ここ20年近く最も売り上げが高い医薬品であるスタチン系脂質異常症予防治療薬の開発の経緯を顧みると、真菌由来の複雑な構造を有する天然物コンパクトンやロバスタチン(メバコール<sup>®</sup>)からそれぞれ微生物変換体であるプラバスタチン(メバロチン<sup>®</sup>)や半合成誘導体であるシンバスタチン(リピバス<sup>®</sup>)へと実用化され、更に現在では、ファーマコフォア部分を残して構造を簡素化した全合成化合物アトロバスタチン(リピトール<sup>®</sup>)へと展開されている。そこで我々も将来的な創薬開発を見越して、**1**からは導くことのできない**1**の構造を簡素化した新規誘導体の合成研究も進めておく必要があると考えた。しかしながら**1**は複雑な骨格を有していることから、**1**からの構造の簡略化は非常に困難である。従って、後述の構造簡略型誘導体の合成に対応可能な応用性の高い**1**の全合成経路を構築することを目的とし、**1**の全合成研究を開始し、その全合成を達成している。

## 3. 研究の方法

PPPA(**1**)の全合成の合成経路を応用して導くことが可能と考えられる新規A環簡略型誘導体の合成を行うこととした。標的として、**1**のA環部分の酸素官能基も簡略化した**6**、そして**1**の第二次構造活性相関研究より得られ

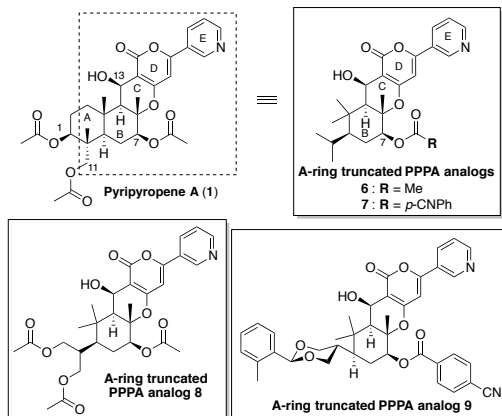
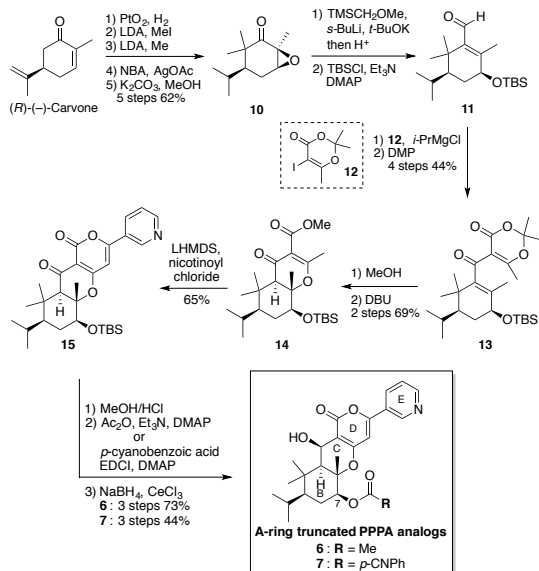


Figure 1. Design of A-ring truncated PPPA analogs 6-9

た知見を生かし、**6** の 7 位を *p*-シアノベンゾイルオキシ基に変換した **7**、A 環部分の酸素官能基を残した **8**、更には 1 および 11 位を *o*-メチルベンジリデンアセタールへと変換した **9** をそれぞれ設定した (Figure 1)。これら新規誘導体は、**1** の全合成経路のうち、A 環構築に関わる工程のみを省いて踏襲することにより、合成できると考えた。

#### 4. 研究成果

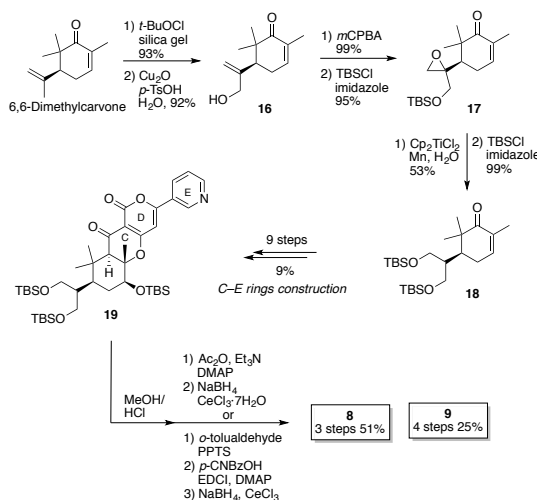
まずはじめに新規 A 環簡略型誘導体 **6** の合成を行った。(R)-(-)-Carvone に対する位置選択的な接触還元につき、段階的にケトンの  $\alpha$  位をジメチル化した。 $\alpha,\beta$ -不飽和ケトンにおけるハロヒドリンの形成、エポキシ化、TBS 基による保護を経て  $\beta$ -エポキシド **10** を合成した。次いで Peterson 反応、それに続く酸処理によるエポキシドの開裂を行い、 $\alpha,\beta$ -不飽和アルデヒドを構築し、ヒドロキシ基を TBS 基で保護することで **11** とした。中間体 **11** に対し **12** から調製した Grignard 試薬との反応、続く酸化を行いジケトエステル等価体 **13** へと導いた。**13** の加溶媒分解後、DBU で処理すると立体選択的分子内ヘテロ環化反応が起こり C 環を形成し、エステル **14** を単一のジアステレオマーとして得ることができた。その後、C-アシル化と続く環化反応によりピリジル- $\alpha$ -ピロン部位を構築後、脱保護、トリアセチル化、還元を行い、**6** の合成を達成した (Scheme 1)。また ACAT2 阻害活性ならびにアイソザイム選択性向上を目指し、第二次構造活性相関研究の結果から 7 位を *p*-シアノベンゾイルオキシ基とした誘導体 **7** も合成した。



Scheme 1. Synthesis of A-ring truncated PPPA analogs **6** and **7**

続いて新規 A 環簡略型誘導体 **6** に、**1** の 1 位および 11 位に相当する 2 つのアセトキシ基を導入した新規 A 環簡略型誘導体 **8** の合成も試みることにした (Scheme 2)。すなわち、既知の 6,6-dimethylcarvone のイソプロペニル基を段階的に酸化することで 1,3-ジオール部位

を構築し、その後は先と同様の手法で目的の A 環簡略型誘導体 **8** の合成を達成した。さらに第二次構造活性相関研究の結果を鑑み、7 位を *p*-シアノベンゾイルオキシ基、1 位および 11 位を *o*-メチルベンジリデンアセタールへと変換した新規誘導体 **9** の合成も達成した。



Scheme 2. Synthesis of A-ring truncated PPPA analogs **8** and **9**

ここまで合成した A 環簡略型誘導体の ACAT 阻害活性およびアイソザイム選択性の評価を行った (Table 2)。その結果、**6** および **8** の ACAT2 阻害活性ならびにアイソザイム選択性は **1** に比べ大きく低下したものの、**7** および **9** は期待通り **1** と同等の高い ACAT2 阻害活性を示し、合成低分子化合物としては高い ACAT2 選択性を示した。従って、**1** の構造活性相関研究にて見出された *p*-シアノベンゾイル基等の ACAT2 阻害活性にとって有効な官能基は、A 環簡略型誘導体群においても高い相関があることが明らかとなった。現在はこれらの情報を基に、**1** の更なる構造の簡素化を試みている。

Table 2. ACAT1 and ACAT2 inhibitory activity and isozyme selectivity of A-ring truncated PPPA analogs

	IC <sub>50</sub> (μM)		SI*
	ACAT1	ACAT2	
Pyripyropene A ( <b>1</b> )	>80.0	0.07	>1000.0
<b>6</b>	>22.0	3.40	6.5
<b>7</b>	8.0	0.07	114.3
<b>8</b>	>17.4	>17.40	-
<b>9</b>	9.8	0.11	89.1

\*Selectivity index (SI): IC<sub>50</sub>(ACAT1)/IC<sub>50</sub>(ACAT2)

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

- (1) Ohshiro, T.; Ohtawa, M.; Nagamitsu, T.; Matsuda, D.; Yagyū, H.; Davis, M. A.; Rudel, L. L.; Ishibashi, S.; Tomoda, H. New pyripyropene derivatives, highly SOAT2-selective inhibitors, improve hypercholesterolemia and atherosclerosis in atherogenic mouse model. *J. Pharm. Exp. Ther.* **2015**, *355*, 299-309. 査読有 DOI:

10.1124/jpet.115.227348

- (2) Ohshiro, T.; Matsuda, D.; Ohtawa, M.; Yamazaki, H.; Nagamitsu, T.; Tomoda, H. *In vitro* metabolism of pyripyropene A and ACAT inhibitory activity of its metabolites. *J. Antibiot.* **2015**, *68*, 27-34. 査読有 DOI : 10.1038/ja.2014.91
- (3) 大多和 正樹, 大村 智, 供田 洋, 長光 亨 ACAT2 選択的阻害剤ピリピロペン A の構造簡略型誘導体創製研究 *MEDCHEMNEWS* **2014**, *24*, 25-31. 査読無
- (4) Ohtawa, M.; Tomoda, H.; Nagamitsu, T. Regioselective mono-deprotection of di-*tert*-butylsilylene acetal derived from 1,3-diol with ammonium fluoride. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2014**, *87*, 113-118. 査読有 DOI : 10.1246/bcsj.20130237
- (5) 大多和 正樹, 大村 智, 供田 洋, 長光 亨 新規脂質異常症予防治療薬を指向した ACAT2 選択的阻害剤ピリピロペン A の構造活性相関研究 *有機合成化学協会誌* **2013**, *8*, 830-843. 査読有 DOI : 10.5059/yukigouseikyokaishi.71.830
- (6) Ohtawa, M.; Yamazaki, H.; Ohte, S.; Matsuda, D.; Ohshiro, T.; Rudel, L. L.; Omura, S.; Tomoda, H.; Nagamitsu, T. Synthesis and structure-activity relationship of pyripyropene A derivatives as potent and selective acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2) inhibitors: Part 3 *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 3798-3801. 査読有 DOI : 10.1016/j.bmcl.2013.04.075
- (7) Ohtawa, M.; Yamazaki, H.; Matsuda, D.; Ohshiro, T.; Rudel, L. L.; Omura, S.; Tomoda, H.; Nagamitsu, T. Synthesis and structure-activity relationship of pyripyropene A derivatives as potent and selective acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2) inhibitors: Part 2 *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 2659-2622. 査読有 DOI : 10.1016/j.bmcl.2013.02.088
- (8) Ohtawa, M.; Yamazaki, H.; Ohte, S.; Matsuda, D.; Ohshiro, T.; Rudel, L. L.; Omura, S.; Tomoda, H.; Nagamitsu, T. Synthesis and structure-activity relationship of pyripyropene A derivatives as potent and selective acyl-CoA:cholesterol acyltransferase 2 (ACAT2) inhibitors: Part 1 *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2013**, *23*, 1285-1287. 査読有 DOI : 10.1016/j.bmcl.2012.12.099

〔学会発表〕 (計 5 件)

- ① Ohtawa, M., Structure-activity relationship

study and total synthesis of pyripyropene A as a ACAT2-selective inhibitor, Pacificchem 2015, 2015/12/18, Hawaii Convention Center, Honolulu (USA)

- ② Ohtawa, M., Structure-activity relationship study and total synthesis of pyripyropene A as a ACAT2-selective inhibitor, The 13<sup>th</sup> International Kyoto Conference on New Aspects of Organic Chemistry, 2015/11/12, Rihga Royal Hotel Kyoto (Japan)
- ③ 大多和 正樹, ACAT2 選択的阻害剤 pyripyropene A の構造簡略型誘導体の創製研究、第 32 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2014 年 11 月 26 日、神戸国際会議場 (兵庫) (招待講演)
- ④ 大多和 正樹, ACAT2 選択的阻害剤 pyripyropene A の構造簡略型誘導体の創製研究、第 31 回北里化学シンポジウム、2013 年 12 月 14 日、北里大学白金キャンパス (東京)
- ⑤ 大多和 正樹, ACAT2 選択的阻害剤 pyripyropene A の構造簡略型誘導体の創製研究、第 31 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2013 年 11 月 21 日、アステールプラザ (広島) (MCS 優秀賞受賞)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称：コレステロールアシル転移酵素アイソザイム 2 (ACAT2)阻害活性を有する新規医薬化合物

発明者：供田 洋、大多和 正樹、大村 智、長光 亨

権利者：同上

種類：PCT 出願

番号：WO 2015/198966 A1

出願年月日：2015 年 12 月 30 日

国内外の別： 国外

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大多和 正樹 (OHTAWA MASAKI)

北里大学薬学部・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：70453503