

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 4 月 21 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24689007

研究課題名(和文) In situ クリックケミストリーを用いた医薬品候補化合物の創製研究

研究課題名(英文) Discovery of drug candidates by using in situ click chemistry

## 研究代表者

鈴木 孝禎 (Suzuki, Takayoshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90372838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,400,000円

研究成果の概要(和文)：今日の創薬化学研究では、化合物ライブラリーのスクリーニングや標的酵素の構造を基にした分子設計、スクリーニング等により同定されたリード化合物の構造を中心に経験則や試行錯誤によって最適化を行う手法といった3種の手法を組み合わせで行われるのが一般的である。しかし、既存の創薬手法は、多大な時間と労力、費用を必要とする。

このような背景のもと、本研究では、クリックケミストリーと呼ばれる手法を用い、in situでスクリーニングを行うことで阻害薬の探索を行った。その結果、本手法により、短時間で有望な酵素阻害薬を見出すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：In drug discovery, high-throughput screening, structure-based drug design, and ligand-based drug design are generally used. However, these methods take great time and effort.

With the background like this, we tried to identify selective inhibitors using click chemistry. As a result, we rapidly identified promising inhibitors by this method, suggesting the usefulness of this method in drug discovery.

研究分野：創薬化学

キーワード：ヒストン脱アセチル化酵素 アイソフォーム クリックケミストリー アジド アルキン トリアゾール 阻害薬

### 1. 研究開始当初の背景

今日の医薬品開発では、数万～数百万個の化合物からなるライブラリーをスクリーニングすることによりリード化合物を得、標的タンパク質の結晶構造を基にした分子設計 (Structure Based Drug Design, SBDD) により、そのアナログを設計、合成して構造最適化を行う方法が頻繁に用いられる。しかしながら、実際には、標的タンパク質が非常に柔軟でリガンドに依って構造を大きく変えてしまう場合、あるいは、標的タンパク質の結晶化が困難な場合が多く、その場合、リード化合物のアナログを広範に一つ一つ合成してそれらの活性を測定することにより構造の最適化を行う方法をとらざるを得ない。このように、標的タンパク質に対する親和性分子を最適化する際には、多大な時間と労力、費用がかかってしまうという実態から、有用で高活性な生理活性物質を短時間で選択的に合成する新たな戦略が望まれていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、従来の手法に比べ簡便かつ迅速に目的とする生理活性物質を見出す手法として、クリックケミストリーを用い、がんや神経変性疾患などの難治性疾患に与与することが報告されているが選択的な阻害薬が存在しない酵素であるサーチユイン 2 (SIRT2)、リシン脱アセチル化酵素 3 (HDAC3)、HDAC8 をターゲットとし、それらに対する高活性、高選択的な阻害薬を効率的に見出すことを目的とした。

### 3. 研究の方法

クリックケミストリーによりフラグメントを連結することを考慮し、SIRT 阻害薬用のアルキンユニットおよびアジドユニット、HDAC 阻害薬用のアルキンユニットおよびアジドユニットを設計し、合成する。つぎに、それらのアルキンユニットおよびアジドユニットを 96 穴プレート上で、クリックケミストリーの代表的反応である銅触媒アジド-アルキン環化付加反応 (CuAAC) を用いて連結させ、SIRT 阻害薬用および HDAC 阻害薬用ライブラリーを得る。その後、*in situ* での酵素阻害活性評価により、スクリーニングを行う。ヒット化合物を再合成、精製し、アイソザイム阻害活性、選択性を確かめる。高い活性、選択性を示した化合物については、細胞系の評価も行う。

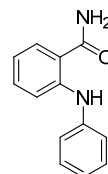
### 4. 研究成果

#### 1) SIRT2 選択的阻害薬の創製

SIRT は NAD<sup>+</sup> 依存的リシン脱アセチル化酵素であり、様々なタンパク質のアセチル化状態を制御している。SIRT は 7 種類のアイソザイムが知られているが、それぞれの詳細な機能は明らかにされていない。最近の研究により、SIRT2 がハンチントン病、パーキンソン病、アルツハイマー病等神経変性疾患の病態

に關与していることが明らかにされた。そのため、SIRT2 選択的阻害薬は SIRT2 の機能を調べる生物学的ツールとしてだけでなく、神経変性疾患治療薬としての応用が期待される。

これまでに我々は、2-アニリノベンズアミド 1 (図 1) が弱いながらも SIRT 阻害活性を有することを見出している。



1

図 1. 化合物 1 の構造

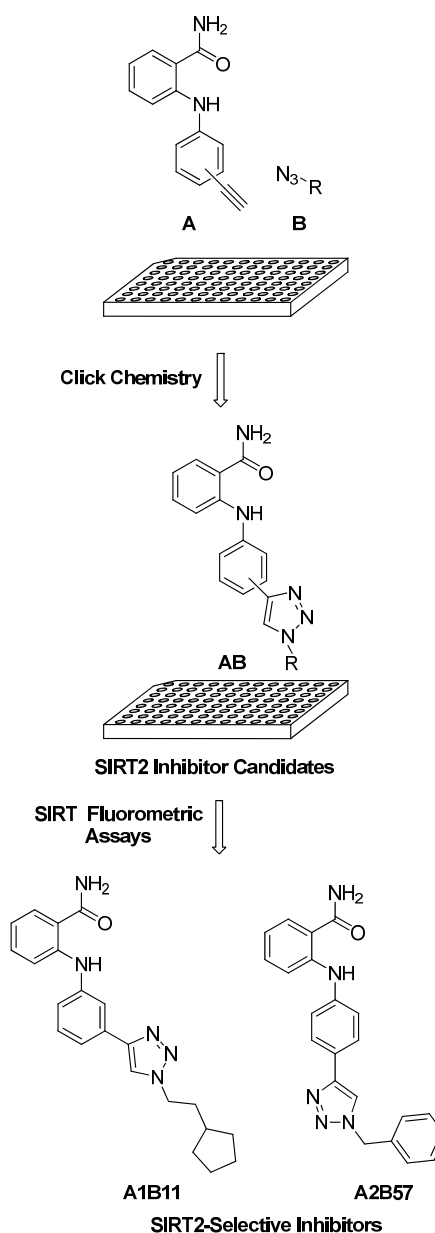


図 2. クリックケミストリーを用いた SIRT2 選択的阻害薬の創製

本研究ではクリックケミストリーを利用した SIRT 阻害薬用フォーカスライブラリーの構築と *in situ* スクリーニングにより、高活性かつ選択的な SIRT2 阻害薬を探索した。

2-アニリノベンズアミド構造有するアルキン A 2 個と SIRT2 の疎水性ポケットに収まることを期待したアジド B 57 個を設計、合成した(図 2)。マイクロプレート上で銅触媒存在下 A と B をクリックケミストリーにより連結させ、114 個の SIRT 阻害薬用フォーカスライブラリー AB を構築した。次いで単離、精製することなく直接 SIRT 蛍光アッセイを行った結果、高い SIRT2 阻害活性を有する新規 SIRT2 阻害薬 A1B11、A2B57 を同定した。また、別途合成、精製した A1B11、A2B57 は SIRT2 を強く阻害し、SIRT2 に対する選択性が確認された。

## 2) HDAC3 選択的阻害薬、HDAC8 選択的阻害薬の創製

HDAC は、ヒストンのアセチル化されたリシン残基を脱アセチル化する反応を触媒し、エピジェネティックに多くの遺伝子発現を制御している。亜鉛依存的な HDAC には 11 種類のアイソザイムが知られているが、それぞれの詳細な機能は明らかになっていない部分が多い。本研究では、有用な阻害剤が報告されていない HDAC3、HDAC8 の選択的阻害薬の探索をクリックケミストリーの代表的反応である CuAAC 反応を用いて行った。さらに、見出された阻害薬の医薬品としての有効性も調べた。

一般に HDAC 阻害薬は、酵素活性中心の亜鉛イオンに配位する Zinc-Binding Group (ZBG) と HDAC の酵素表面のアミノ酸残基と相互作用する Cap 部位、ZBG と Cap 部位をつなぐ Linker 部位から構成される。本研究では、Cap 部位と ZBG をクリックケミストリーと呼ばれる手法により連結するために、トリアゾール Linker を有する HDAC 阻害薬を設計した。ZBG を有するアルキン体 9 個と Cap 部位をもつアジド体 56 個をクリックケミストリーにより連結させる事で、短時間に 504 個の HDAC 阻害薬用ライブラリーを構築した。HDAC 蛍光アッセイを用いて、そのライブラリーのスクリーニングを行った結果、それぞれ HDAC3、HDAC8、HDAC9 を選択的に阻害する化合物 T247、C149 を見出した(図 3)。

さらに、HDAC8 阻害薬 C149 のトリアゾール環を他の芳香環に変換した化合物を設計、合成し、HDAC 阻害活性評価を行ったところ、C149 に比べて、HDAC8 選択性の改善した化合物 C170 を見出した(図 4)。

また、これらのアイソザイム選択的 HDAC 阻害薬を用いて細胞系の評価を行った。その結果、HDAC3 選択的阻害薬が大腸がん細胞、前立腺がん細胞の増殖を阻害すること、HDAC3 選択的阻害薬が HIV-1 の転写活性化を促進すること、HDAC8 選択的阻害薬が T

細胞性リンパ腫の増殖を阻害することが示された。これらの結果から、HDAC3 選択的阻害薬、HDAC8 選択的阻害薬の治療薬としての可能性が強く示された。

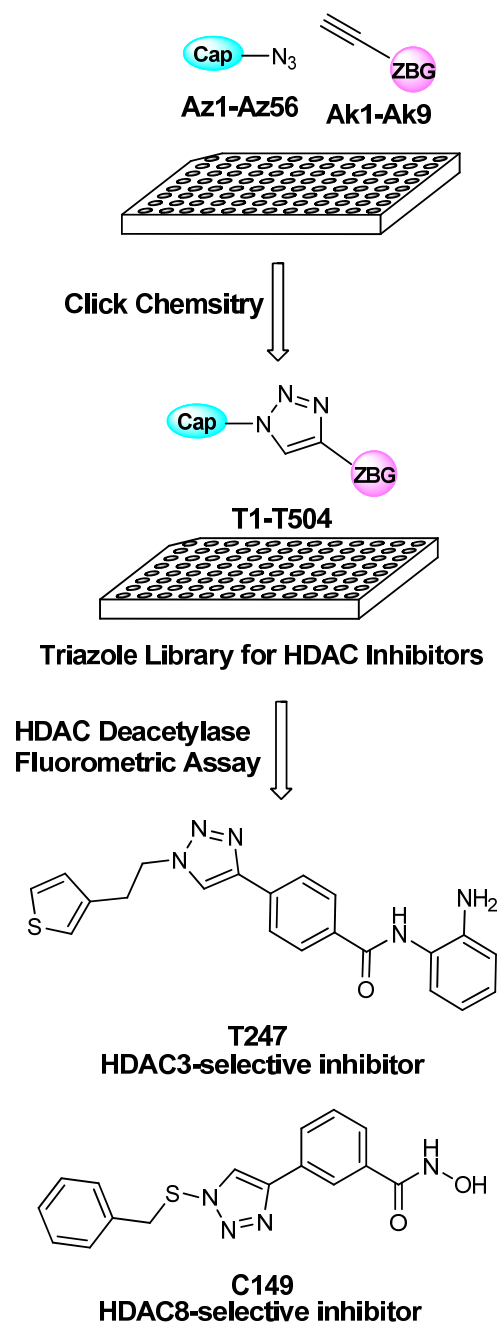


図 3. クリックケミストリーを用いたアイソザイム選択的 HDAC 阻害薬の創製

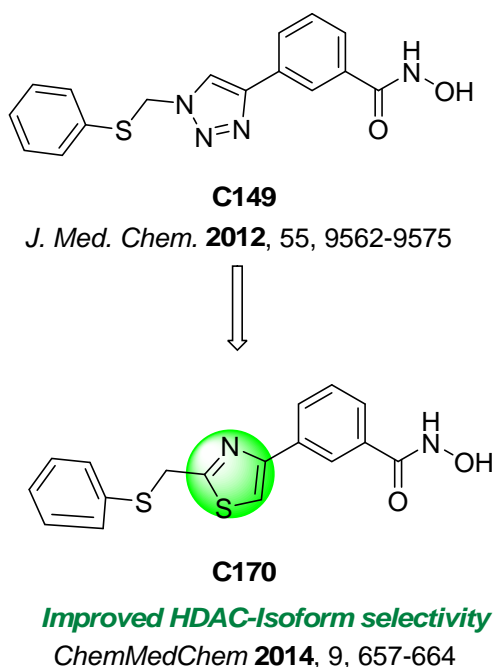


図 4. HDAC8 選択的阻害薬 C149 の構造最適化

#### 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)

[論文発表](計 6件)

Takayoshi Suzuki, Yosuke Ota, Masaki Ri, Masashige Bando, Aogu Gotoh, Yukihiko Itoh, Hiroki Tsumoto, Prima R. Tatum, Tamio Mizukami, Hidehiko Nakagawa, Shinsuke Iida, Ryuzo Ueda, Katsuhiko Shirahige, Naoki Miyata. Rapid Discovery of Highly Potent and Selective Inhibitors of Histone Deacetylase 8 Using Click Chemistry to Generate Candidate Libraries. *J. Med. Chem.* **2012**, 55, 9562–9575.

Takayoshi Suzuki, Yuki Kasuya, Yukihiko Itoh, Yosuke Ota, Peng Zhan, Kaori Asamitsu, Hidehiko Nakagawa, Takashi Okamoto, Naoki Miyata. Identification of Highly Selective and Potent Histone Deacetylase 3 Inhibitors Using Click Chemistry-Based Combinatorial Fragment Assembly. *PLoS ONE* **2013**, 8, e68669.

Yukihiko Itoh, Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata. Small-molecular modulators of cancer-associated epigenetic mechanisms. *Mol. Biosyst.* **2013**, 9, 873–896.

Takayoshi Suzuki, Nobusuke Muto, Masashige Bando, Yukihiko Itoh, Ayako Masaki, Masaki Ri, Yosuke Ota, Hidehiko Nakagawa, Shinsuke Iida, Katsuhiko Shirahige, Naoki Miyata. Design, synthesis, and biological activity of NCC149 derivatives as histone deacetylase 8-selective inhibitors. *ChemMedChem* **2014**, 9, 657–664.

Prima R. Tatum, Hideyuki Sawada, Yosuke

Ota, Yukihiko Itoh, Peng Zhan, Naoya Ieda, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, Takayoshi Suzuki. Identification of novel SIRT2-selective inhibitors using a click chemistry approach. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 1871–1874.

Yukihiko Itoh, Naoki Miyata, Takayoshi Suzuki. Target-guided Synthesis: Medicinal Chemistry Strategy to Allow Target Enzymes Themselves to Synthesize their Own Inhibitors *J. Syn. Org. Chem. Jpn.* **2014**, 72, 702–716.

[学会発表](計 10件)

鈴木孝禎、エピジェネティクス機構を分子標的とする治療薬の進展、第25回 インターフェックス ジャパン / 第6回 ファーマ ジャパン ~ 医薬品原料 国際展 (招待講演)、2012年06月28日、東京ビッグサイト

鈴木孝禎、エピジェネティクス制御化合物の創製研究、名古屋大学理学部 ITbM/IGER/RCMSセミナー(招待講演)、2013年2月8日、名古屋大学

鈴木孝禎、創薬を目指したエピジェネティクス制御化合物の創製研究、平成25年度トメックス第12回研究会(招待講演)、2013年9月5日、富山

Takayoshi Suzuki, Discovery of Histone Lysine Demethylase Inhibitors, XXII National Meeting on Medicinal Chemistry (NMMC2013) (Invited Lecture), Sep. 11, 2013, Rome

Takayoshi Suzuki, Design, synthesis, and biological activity of lysine-specific demethylase 1 inhibitors, 2014 Queenstown Molecular Biology Meetings (Invited Lecture), Mar. 13, 2014, Shanghai

Takayoshi Suzuki, Discovery of Histone Lysine Demethylase Inhibitors, Ninth Drug Discovery Chemistry~Epigenetic Inhibitor Discovery~ (Invited Lecture), Apr. 23, 2014, San Diego

Takayoshi Suzuki, Chemical Control of Histone Lysine Methylation, Sino-Japan Workshop on Chemical Biology (Invited Lecture); Oct 12, 2014, Beijing

鈴木孝禎、エピジェネティクス制御化合物の開発、第87回 日本生化学会大会(招待講演)、2014年10月15日、京都国際会館

鈴木孝禎、エピジェネティクスのケミカルコントロール、第18回スクリプス・バイオメディカルフォーラム(招待講演)、2014年11月22日、大阪

鈴木孝禎、創薬を目指したエピジェネティクス制御化合物の創製、天然物ケミカルバイオロジー地区シンポジウム(招待講演)、2015年1月15日、東北大学

〔図書〕(計 2件)

鈴木 孝禎、次世代エピジェネティック  
ドラッグ開発の最前線 遺伝子医学  
MOOK 25 エピジェネティクスと病気  
2013, pp 260-265.

鈴木 孝禎、次世代エピジェネティクス  
創薬 エピジェネティクスの産業応用  
シーエムシー出版 2014, pp 333-340.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/y/chemistry/publications.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 孝禎 (Suzuki, Takayoshi)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：90372838