

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890193

研究課題名(和文)触媒メカニズムに基づくヒストン脱メチル化酵素(LSD1)阻害薬の創製

研究課題名(英文)Discovery of lysine-specific demethylase 1 Inhibitors based on enzymatic mechanism

研究代表者

伊藤 幸裕 (Itoh, Yukihiro)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30636402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) はフラビン依存的な酸化反応により、メチル化されたリシン残基を脱メチル化する酵素で、がんの新たな分子標的として知られている。トランシルプロピン(PCPA)がLSD1阻害薬として最も利用されているが、弱い活性、低い選択性が問題とされている。そこで、本研究では、阻害剤を標的酵素に効率的に送り届ける「究極のドラッグデリバリー型分子」という新概念を提唱し、それに基づいたLSD1阻害薬の設計、合成および活性評価を行った。その結果、PCPAをLSD1へ直接運ぶ一連のLSD1阻害薬の創製に成功した。

研究成果の概要(英文)：Selective inhibitors of lysine-specific demethylase 1 (LSD1) are considered to be candidate anticancer agents. Phenylcyclopropylamine (PCPA) is a best-known LSD1 inhibitor, but its potency and selectivity are inadequate. In this study, on the basis of the concept that LSD1 could be potentially and selectively inactivated by delivering PCPA directly to the enzyme's active site, LSD1 inhibitors were designed by conjugating PCPA moiety with a lysine moiety as a carrier targeting LSD1. As a result of their synthesis and biological evaluation, LSD1 inhibitors that showed high activity and selectivity were identified.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：創薬化学

キーワード：創薬化学 ドラッグデザイン 低分子薬物 エピジェネティクス ケミカルバイオロジー

## 1. 研究開始当初の背景

ヒストンリシン残基のメチル化は不可逆的修飾であると長く考えられていた。しかし、2004年、ヒストン脱メチル化酵素である Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1) が発見され、そのメチル化が可逆的修飾であることがわかると、ヒストンのメチル化に関わる研究は急速に展開された。現在、ヒストンのメチル化は DNA の塩基配列に依らない遺伝子発現機構 (エピジェネティクス機構) を調節する極めて重要な修飾として、盛んに研究されている。

LSD1 はフラビンアデノシンジヌクレオチド (FAD) を補酵素とし、ヒストン H3 の 4 番目のリシン (H3K4) のメチル化体を酸化的に脱メチルする酵素である。LSD1 の生化学的な働きに関して不明な点は多いが、LSD1 はメチル化ヒストン H3K4 の脱メチル化を介し、遺伝子の転写活性を制御していることが知られている。また、LSD1 阻害は、がん細胞の増殖阻害効果、ヘルペスウイルスに対する抗ウイルス作用およびエネルギー代謝病に対する治療効果が報告されている。すなわち、創薬化学的観点から LSD1 阻害薬の探索研究は極めて興味深い。しかし、LSD1 阻害薬に関する医薬化学的知見は不十分であり、強力かつ細胞評価系で効果的な活性を示す阻害薬はほとんど報告されていなかった。

これまでに報告されている LSD1 阻害薬として最も利用されているものは trans-2-phenylcyclopropylamine (PCPA) である。PCPA は元来モノアミノオキシダーゼ (MAO) 阻害薬として知られており、抗うつ薬としても利用されてきた。MAO は LSD1 と同じアミノオキシダーゼファミリーに属するため、PCPA は LSD1 に対する阻害活性もある程度示すが、LSD1 を選択的に阻害できない。すなわち、PCPA は LSD1 阻害活性・選択性とも不十分であった。そのため、高活性かつ高選択的な LSD1 阻害薬の創製が求められていた。

## 2. 研究の目的

研究開始当初の背景で記したことを受けて、本研究では新規 LSD1 選択的阻害薬の創製を目指すこととした。なお、*in vitro* の系のみならず、細胞評価系においても強力な活性を示す LSD1 選択的阻害薬の創製を目標とした。また、見出した LSD1 選択的阻害薬に関する構造活性相関研究を行い、将来的に LSD1 を標的とした治療薬開発へと展開できるよう構造学的な知見の拡充も目指した。さらに、LSD1 阻害薬は抗がん剤としての可能性も秘めているため、LSD1 阻害薬のがん細胞に対する増殖阻害効果についても検証することとした。

## 3. 研究の方法

## (1) LSD1 阻害薬の設計と合成

本研究では高活性かつ高選択的な LSD1 阻害薬を見出すために LSD1 の酵素反応メカニズムに基づく標的誘導型合成を利用した創薬手法を用いた。標的誘導型合成とは標的タンパク質が持つ特有のポケットを使ってタンパク質自身に *in situ* で強力な阻害薬を合成させる創薬手法であり、選択的阻害薬を得るのに適した手法である。そこで、本手法を利用し、既知の LSD1 阻害薬である PCPA の構造を基に新規 LSD1 阻害薬の設計を試みた。

PCPA は LSD1 の活性中心で FAD と共有結合を形成し、LSD1 を不可逆的に阻害する (図 1)。その際、PCPA の窒素原子はアンモニア分子として LSD1 活性中心から放出される (図 1)。この機構に基づいて、リシン部分および PCPA 部分を有する LSD1 阻害薬 1 を設計した (図 2)。メチル化リシンは LSD1 の基質であるため、化合物 1 は LSD1 により効率的かつ選択的に認識されると予想される。続いて LSD1 活性中心に運び込まれた化合物 1 の PCPA 部分は FAD と付加体を形成し LSD1 を阻害する。その際、化合物 1 のリシン部分はイミン中間体となり、続く加水分解を受けることで LSD1 活性中心から化合物 1' として放出されると予想される (図 2)。すなわち、化合物 1 のリシン部分は LSD1 阻害活性を有する PCPA を LSD1 活性中心に選択的かつ効率的に運び込む「輸送体」として働く。この機構により、化合物 1 はドラッグデリバリー型の強力な LSD1 選択的阻害薬となることが期待された。そこで、本戦略に基づき、化合物 1 の一連の類縁体を合成し、活性評価を行った。

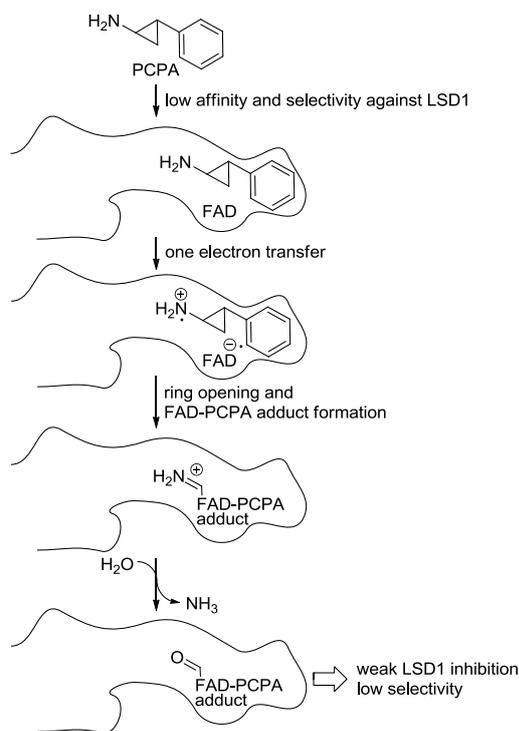


図 1 PCPA による LSD1 の阻害機構

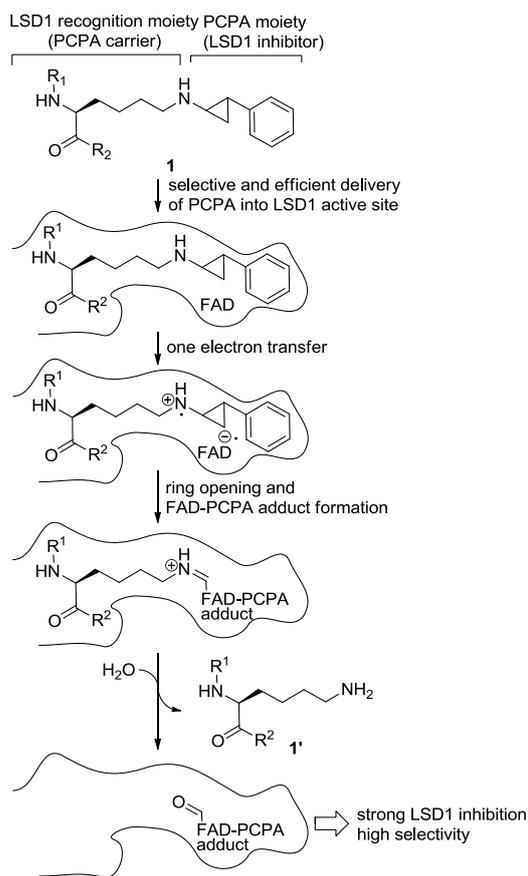


図2 化合物1によるLSD1の推定阻害機構

### (2) 酵素系および細胞系での活性評価

LSD1 阻害活性の評価には LSD1 peroxidase-coupled (POD) assay により行った。LSD1 による脱メチル化反応では、副産物として過酸化水素が生成する。生成した過酸化水素を用いてペルオキシダーゼが 4-アミノアンチピリンと 3, 5-ジクロロ-2-ヒドロキシベンゼンスルホン酸を酸化縮合し、キノン色素 ( $\lambda_{\max} = 512 \text{ nm}$ ) を生成する。このキノン色素を比色定量することで、LSD1 活性を評価することができる。また LSD1 阻害薬の選択性を評価するために MAO に対する阻害活性も調べた。MAO 阻害活性にはプロメガ社の MAO-Glo™ assay kit を用いた。

in vitro の酵素系評価において、高活性かつ高選択性を示す化合物についてはがん細胞増殖阻害活性も評価した。活性評価には LSD1 が過剰発現している子宮頸がん細胞 HeLa および神経芽細胞腫細胞 SH-SY5Y を使用し、MTT アッセイにより細胞増殖阻害率を算出することで評価した。

### (3) 阻害メカニズム解析

上述の (1)、(2) より得られた LSD1 選択的阻害薬について、(1) で示した作業仮説通りに LSD1 を阻害しているかを確認するために阻害メカニズム解析を行った。解析法としては酵素速度論的解析と MALDI-TOF MS 解析を用いた。PCPA は LSD1 内で FAD と反応し、

PCPA-FAD 付加体を形成し、LSD1 を不可逆的に阻害することが報告されている。したがって、酵素速度論解析から、不可逆的阻害であるかを検証した。一方、MALDI-TOF MS 解析では、LSD1 存在下および非存在下において、FAD と LSD1 阻害薬を反応させ、その反応液の質量分析を行い、LSD1 存在下のみ付加体および 1' に相当する MS ピークが得られるか検証した。

## 4. 研究成果

研究の方法の(1)に示したように、既知の LSD1 阻害薬である PCPA の阻害機構を基に標的誘導型合成による創薬手法を用いて、LSD1 阻害薬の創製を目指したところ、下記に示す化合物 NCD-18 (**1a**) が高い LSD1 阻害活性およびがん細胞増殖阻害活性を示すことが明らかとなった(表 1)。さらに化合物 **1a** の構造最適化を試みた結果、高い LSD1 阻害活性およびがん細胞増殖阻害活性を示す NCD-25 (**1b**) および NCD-38 (**1c**) を見出した(表 1)。また、化合物 **1b** および **1c** の MAO A および MAO B 阻害活性を評価したところ、MAOs をほとんど阻害しないことがわかった。さらに、化合物 **1b** および **1c** の LSD1 阻害メカニズム解析を行った結果、酵素速度論解析から、それらの阻害が不可逆的阻害であることがわかり、一方、MALDI-TOF MS 解析から LSD1 存在下において、PCPA-FAD 付加体および輸送体 1' に相当する MS ピークが得られた。以上の阻害メカニズム解析より、**1b** および **1c** は(1)に記したメカニズムで LSD1 を阻害していることが示唆された。

本研究で見出された新規 LSD1 阻害薬は高いがん細胞増殖阻害活性を示したことから、新たな作用機序の抗がん剤としての可能性も期待される。また、本研究で提唱した「ドラッグデリバリー型標的酵素阻害薬」という概念は PCPA 構造を有する LSD1 阻害薬を設計する上で有用であると考えられる。

表 1 LSD1 阻害活性の活性評価

NCD-18 (**1a**):  $R^3 = R^4 = \text{H}$   
 NCD-25 (**1b**):  $R^3 = \text{Ph}, R^4 = \text{H}$   
 NCD-38 (**1c**):  $R^3 = \text{Ph}, R^4 = \text{Cl}$

compound	LSD1 inhibition <sub>50</sub> IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	MAO-A inhibition <sub>50</sub> IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	MAO-B inhibition <sub>50</sub> IC <sub>50</sub> (μM) <sup>a</sup>	cell growth inhibition	
				HeLa <sup>a</sup> GI <sub>50</sub> (μM)	SH-SY5Y <sup>a</sup> GI <sub>50</sub> (μM)
PCPA	32	7.3	4.3	>500	500
<b>1a</b>	0.30	ND <sup>b</sup>	ND <sup>b</sup>	35	17
<b>1b</b>	0.48	88	>100	10	3.3
<b>1c</b>	0.59	>100	>100	4.3	2.7

<sup>a</sup> Values are the means of at least three experiments.

<sup>b</sup> ND = no data.

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2件)

1. Yukihiro Itoh, Daisuke Ogasawara, Yosuke Ota, Tamio Mizukami, Takayoshi Suzuki. Synthesis, LSD1 Inhibitory Activity, and LSD1 Binding Model of Optically Pure Lysine-PCPA Conjugates. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 9, (2014), e201402002.  
DOI:http://dx.doi.org/10.5936/csbj.201402002. 査読有
2. Daisuke Ogasawara, Yukihiro Itoh, Hiroki Tsumoto, Taeko Kakizawa, Koshiki Mino, Kiyoshi Fukuhara, Hidehiko Nakagawa, Makoto Hasegawa, Ryuzo Sasaki, Tamio Mizukami, Naoki Miyata, Takayoshi Suzuki. Lysine-Specific Demethylase 1-Selective Inactivators Based on Protein-Targeted Drug Delivery Mechanism. *Angewandte Chemie International Edition*, 52, (2013), 8620-8624.  
DOI:10.1002/anie.201303999. 査読有

[学会発表] (計7件)

1. 伊藤幸裕、小笠原大介、太田庸介、水上民夫、鈴木孝禎 PCPA-リシン誘導体ハイブリット型 LSD1 不活性化薬の立体化学-活性相関研究 日本薬学会 第 134 年会 28M-pm19 2014年3月28日 熊本
2. 伊藤幸裕、小笠原大介、三野光識、中川秀彦、杉野典子、河原真大、高折晃史、水上民夫、宮田直樹、鈴木孝禎ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 へ阻害薬を運ぶ低分子化合物 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 広島
3. 伊藤幸裕、小笠原大介、三野光識、中川秀彦、水上民夫、宮田直樹、鈴木孝禎 ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 に阻害薬を届ける低分子化合物の創製 第 39 回反応と合成の進歩シンポジウム 2013年11月5日 福岡
4. Yukihiro Itoh. Design and Synthesis of LSD1 inactivators Based on Enzyme-targeted Drug Delivery Mechanism. 2nd Annual Conference ICBS2013, Oct. 7, 2013, Kyoto.
5. 小笠原大介、伊藤幸裕、三野光識、中川秀彦、杉野典子、河原真大、高折晃史、水上民夫、宮田直樹、鈴木孝禎標的酵素への直接的ドラッグデリバリーに基づいた LSD1 選択的不活性化薬の創製 日本ケミカルバイオロジー学会 第8回年会 2013年6月20日 東京
6. 伊藤幸裕、宮田直樹、鈴木孝禎 ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 へ阻害薬を届ける

小分子 第 13 回第日本蛋白質科学会年会  
2013年6月12日 鳥取

7. 小笠原大介、伊藤幸裕、三野光識、中川秀彦、水上民夫、宮田直樹、鈴木孝禎、標的酵素へのドラッグデリバリーを目指した LSD1 不活性化薬の創製 日本薬学会 第 133 年会 2013年3月28日 横浜

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: リシン構造を有する LSD1 選択阻害薬  
発明者: 鈴木孝禎、伊藤幸裕、小笠原大介、宮田直樹、水上民夫、佐々木隆造、河原真大  
権利者: 学校法人 関西文理総合学園 長浜バイオ大学、京都府公立大学法人、公立大学法人 名古屋市立大学、国立大学法人 京都大学、株式会社フロンティアファーマ  
種類: 物質特許  
番号: 特願 2012-260222  
出願年月日: 2012年11月28日  
国内外の別: PCT 出願

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 幸裕 (ITOH Yukihiro)  
京都府立医科大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 30636402