

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20390034

研究課題名（和文） エピジェネティックに遺伝子発現を制御する医薬品候補化合物の創製

研究課題名（英文） Development of drug candidates that epigenetically regulate gene expression

研究代表者

宮田 直樹（MIYATA NAOKI）

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：50114674

研究成果の概要（和文）：200字程度

ヒストン修飾に関与する酵素であるヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）およびヒストン脱メチル化酵素（HDME）を対象にして、高活性かつ高選択的な阻害剤の創製研究を行った。その結果、HDACのアイソザイムであるHDAC8、SIRTおよびHDAC3など、また、HDMEのアイソザイムであるJMJD2、PHF8およびLSD1などに対する高活性かつ高選択的な阻害剤の創製を達成した。これらの阻害剤は遺伝子発現を制御する医薬品候補化合物として有用である。

研究成果の概要（英文）：

Chromatin remodeling, caused by histone modifications, plays a crucial role in the regulation of epigenetic gene expression. Histone deacetylase (HDAC) and histone demethylase (HDME) were selected as target enzymes. Isozyme selective and highly active inhibitors against these enzymes were designed and synthesized. HDAC8, SIRT and HDAC3 selective and JMJD2, PHF8, LSD1 selective inhibitors were developed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：エピジェネティクス、遺伝子発現制御、創薬分子設計、ヒストン脱メチル化酵素阻害剤、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬

1. 研究開始当初の背景

近年、エピジェネティックな遺伝子発現の制御メカニズムが明らかになるにともない、それに関わる酵素が医薬品開発のターゲット分子として注目されている。エピジェネティックな遺伝子発現制御としては、DNAのメチル化、ヒストンタンパク質のメチル化、アセチル化、リン酸化、クロマチン化などが知られている。特に、ヒストンタンパク質の可逆的なアセチル化あるいはメチル化は、細胞

のがん化、分化誘導、細胞変成、老化などの病態発現や生体の恒常性維持に大きく関与していることから、これらの酵素を阻害する化合物は、これらの酵素の機能解明や医薬品への利用が期待されている。特に、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）あるいはヒストン脱メチル化酵素（HDME）を阻害する化合物は、医薬品候補化合物としての大きな可能性を秘めている。一方、これらの酵素には多くのアイソザイムが存在することから、これらの

酵素の機能解明や医薬品としての開発のためには、高いアイソザイム選択性を有する高活性な阻害剤の創製が必要となっている。

2. 研究の目的

本研究では、HDAC および HDME をターゲット分子として、アイソザイム選択的な阻害剤の分子設計・合成、および活性の評価を行い、高活性で高選択的な阻害剤を創製し、これらの酵素の機能の評価や医薬品候補化合物としての可能性を探る。

3. 研究の方法

本研究では、Class I, IIa, IIb, III (SIRT), IV に分類される 18 種類の HDAC アイソザイム、および、フラビン依存性および Fe(II)- α -ケトグルタル酸依存性に大別される HDME を対象に、PDB (プロテインデータバンク) に登録されている X 線構造解析情報および分子モデリングによって得たタンパク質の三次元情報、並びに、酵素の触媒メカニズムに基づいて阻害剤を分子設計・合成し、アイソザイム選択的な *in vitro* 酵素阻害活性評価試験、細胞系での作用評価 (ウエスタンブロット解析やがん細胞増殖抑制効果) を行った。

4. 研究成果

(1) HDAC をターゲットとするアイソザイム選択的阻害剤の創製:

ヒストンのリシン残基のアセチル化は様々な遺伝子発現に関与することが報告されており、ヒストンアセチル化酵素及びヒストン脱アセチル化酵素により可逆的に制御されている。本研究では、ヒストン脱アセチル化酵素のアイソザイム選択的な阻害化合物の創製研究を行った。

1-1) 活性部位に亜鉛イオンを有する HDAC (Class I, II, IV) に対する選択的な阻害剤として、HDAC 阻害剤としては世界で初めて亜鉛イオンに対する配位基としてボロン酸構造を有する阻害化合物 (論文⑥) を見出した。HDAC の活性部位に存在する水分子がボロン酸基に付加して酵素を阻害すると考えられ、阻害作用が HDAC 選択的であることが予測される。このため既存のヒドロキサム酸構造を有する HDAC 阻害剤に比べて副作用が軽減できる可能性がある。

1-2) HDAC の Class I に属する HDAC 8 に選択的な阻害剤を見出した (特許⑤)。本阻害剤は、HDAC 8 の基質結合部位の構造に基づいて設計したキャップ部位化合物と活性部位の亜鉛イオンに対する配位基としてヒドロキサム酸官能基を有する化合物とのアジド-アルキン付加環化反応 (Huisgen 反応, Click Chemistry) により合成した 120 種の化合物の酵素活性阻害評価試験の結果見出した。Class I 以外の Class II, III, IV に対して阻

害活性を示さず、また、Class I に属する HDAC 1, HDAC 2 に対してもほとんど阻害活性を示さない。既存の選択的 HDAC 8 阻害剤を凌駕する高い選択性と高い阻害活性を示した。さらに、がん細胞増殖抑制試験において、T 細胞腫瘍特異的に抗腫瘍活性を示し、正常細胞の生育には影響しないことを確認した。HDAC 8 選択的阻害剤として T 細胞性悪性腫瘍治療薬への応用が期待できる。なお、本阻害剤は、現在、試薬会社から生化学試薬として販売されている。

1-3) HDAC の Class III (SIRT) に対する選択的な阻害剤を見出した。SIRT は、NAD⁺ を補酵素とする HDAC である。今回、酵素の触媒反応メカニズムに基づく新規阻害化合物の創製に成功した (論文⑤)。今回見出した阻害化合物は、酵素実験により SIRT を選択的に阻害した。また、ヒト大腸がん由来細胞 HCT116 を用いたウエスタンブロット解析でアセチル化 p53 を検出することにより、細胞系でも SIRT を阻害していることが確かめられた。さらに、ヒト悪性リンパ腫由来細胞 Daudi 細胞に対して増殖抑制作用を示した。見出した阻害剤は、SIRT の生物学的意義を調べるプローブとして有用であり、抗がん剤としての可能性も期待される。

1-4) HDAC をテンプレートとし酵素上で *in situ* Click 反応を行い、続いて生成物を単離せず蛍光アッセイを行うことによりテンプレートである酵素の構造を反映した HDAC 阻害剤の探索が可能であることを明らかにした (論文③)。

1-5) HDAC を阻害する医薬品候補化合物の創製に関するその他の研究成果として、

1-5-1) 研究代表者らが見いだすすでに報告している HDAC6 選択的阻害剤がマウスを用いた *in vivo* 試験により抗うつ作用を有することを見出した (特許③、PLoS One, 7, e30924 (2012). その他①新聞/WEB 報道)。

1-5-2) Click Chemistry の手法を用いることにより、HDAC の Class I に属する HDAC3 に対する選択的阻害剤を見出した (特許②、論文投稿準備中)。本阻害剤は、細胞系でも活性を示すことから、抗がん剤や神経変成疾患治療薬としての開発が期待できる。

(2) HDME をターゲットとするアイソザイム選択的阻害剤の創製:

ヒストンのリシン残基のメチル化は様々な遺伝子発現に関与することが報告されており、ヒストンメチル化酵素及びヒストン脱メチル化酵素により可逆的に制御されている。本研究では、ヒストン脱メチル化酵素のアイソザイム選択的な阻害化合物の創製研究を行った。

2-1) Fe(II)- α -ケトグルタル酸依存性のヒストン脱メチル化酵素 (JHDM) は現在までに 21 のアイソザイムが確認されている。その一

つである JMJD2 に対する選択的阻害化合物として、アイソザイムのホモロジーモデルに基づく分子設計と合成により、N-オキザリルグリシン構造を有する化合物およびヒドロキサム酸構造を有する化合物を見出した (論文②、特許⑥など)。これらの化合物は、JMJD2 を選択的に阻害し、同類の酵素であるプロリルヒドロキシラーゼは阻害しないことを明らかにした。また、この阻害剤については、細胞膜透過性を向上させたプロドラッグ体を合成し、それを用いた細胞増殖抑制試験で、後述の LSD1 阻害剤による細胞増殖抑制作用を相乗的に向上させることを見出した。JMJD2 選択的阻害剤は、JHDM の機能を調べるバイオプローブとしてのみならず、新しい作用機序を持つがん治療薬創製のためのリード化合物として有用と考える。なお、本阻害剤も、試薬会社から生化学試薬として販売されるようになった。

2-2) JHDM のアイソザイムの一つである PHF8 は、前立腺がんの増殖に関与すること、またその変異により X 連鎖性精神遅延が生じることが報告されている。2-1) で合成した化合物を中心とする in house 化合物ライブラリーの中から PHF8 選択性を有する阻害剤を見出し、それをリードとして PHF8 に高い選択性を有する高活性阻害剤を見出した。なお、PHF8 阻害活性の評価には、JHDM の触媒メカニズムを利用したアッセイ法 (PHF8 の基質である H3K4me3K9me2 ペプチドを用い、MALDI-TOF 質量分析法により、H3K4me3K9me2 ペプチド残量から活性を算出) を用いた。本阻害剤が、がん細胞増殖抑制効果を示したことから、現在抗がん剤として研究を展開している (特許①、論文投稿準備中)。

2-3) LSD1 (lysine-specific demethylase 1) は、HDME のアイソザイムであり FAD 依存的にヒストン H3 の 4 番目のリシン残基 (H3K4) のモノメチル体とジメチル体を脱メチル化し、遺伝子の発現を制御することが知られている。これまでに、LSD1 が前立腺がん細胞や神経芽腫細胞の増殖に関与していることが報告されており、また、最近、LSD1 が α -ヘルペスウイルスの増殖に関与していることが示唆されている。さらに、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) では H3K4 が高度にメチル化されていることが分かっており、LSD1 阻害薬は iPS 細胞の作製効率の向上に寄与することが期待されている。したがって、LSD1 阻害薬は、LSD1 の機能を調べるためのバイオプローブとして、また、がんをはじめとする種々の疾患に対する新たな作用機序の治療薬として期待されている。しかし、既存の LSD1 阻害薬は、モノアミンオキシダーゼ (MAO) やポリアミンオキシダーゼ (PAO) を阻害、細胞膜を通過しないといった問題があり、細胞系で利用できる LSD1 選択的阻害薬は報告されてい

ない。本研究では、細胞系でも利用可能な LSD1 選択的阻害薬の開発を目的として研究を行い、世界初の細胞系でも高い阻害活性を示す選択的な LSD1 阻害薬の創製に成功した (論文④、特許⑦)。本阻害剤は、酵素の基質および補酵素結合部位周辺の構造情報に基づいて設計・合成した化合物であり、様々ながん細胞に対して細胞増殖阻害活性を示したことから、LSD1 の機能を解明するためのバイオプローブとして利用できるのみならず、がん治療に利用できる可能性がある。なお、この成果は、Nature Group の学術情報専門誌に囲み記事で紹介されている (その他②)。さらに、本阻害剤が HIV 複製阻害作用を有し、抗ウイルス薬としても開発可能であることも明らかにした (特許④)。本阻害剤は、現在、試薬会社から生化学試薬として販売されている。

なお、HDME に対する選択的阻害剤の研究をまとめた論文①は、J. of Medicinal Chemistry の Most Read Article にランクされた。

3) 研究開始時に計画した DNA メチル化酵素 (DNMT) 阻害化合物、ヒストンアセチル化酵素 (HAT) 阻害化合物の創製研究については、HDAC および HDME 選択的阻害化合物の創製研究が予想以上に展開したことにより、研究勢力を HDAC および HDME 選択的阻害化合物の創製に集約したため、特筆できる成果を上げることはできなかった。本研究で得た技術と手法を活用して、今後も引き続き DNMT および HAT 阻害剤の研究も行っていきたい。

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 20 件)

- ① Takayoshi Suzuki, Naoki Miyata, Lysine demethylases inhibitors, *J. Med. Chem.*, **54**, 8236-8250 (2011).
- ② Shohei Hamada, Takayoshi Suzuki, Koshiki Mino, Koichi Koseki, Felix Oehme, Ingo Flamme, Hiroki Ozasa, Yukihiro Itoh, Daisuke Ogasawara, Haruka Komarashi, Aiko Katoh, Hiroki Tsumoto, Hidehiko Nakagawa, Makoto Hasegawa, Ryuzo Sasaki, Tamio Mizukami, Naoki Miyata, Design, Synthesis, Enzyme-inhibitory Activity, and Effect on Human Cancer Cells of a Novel Series of Jumonji Domain-Containing Protein 2 Histone Demethylase Inhibitors, *J. Med. Chem.*, **53**, 5629-5638 (2010).
- ③ Takayoshi Suzuki, Yosuke Ota, Yuki Kasuya, Motoh Mutsuga, Yoko Kawamura,

Hiroki Tsumoto, Hidehiko Nakagawa, M. G. Finn, Naoki Miyata, An Unexpected Example of Copper-Mediated In Situ Click Chemistry, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **49**, 6817-6820 (2010).

- ④ Rie Ueda, Takayoshi Suzuki, Koshiki Mino, Hiroki Tsumoto, Hidehiko Nakagawa, Makoto Hasegawa, Ryuzo Sasaki, Tamio Mizukami, Naoki Miyata, Identification of Cell-Active Lysine Specific Demethylase 1-Selective Inhibitors, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 17536-17537, (2009).
- ⑤ Tomomi Asaba, Takayoshi Suzuki, Rie Ueda, Hiroki Tsumoto, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, Inhibition of Human Sirtuins by In Situ Generation of an Acetylated Lysine-ADP-ribose Conjugate, *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 6989-6996 (2009).
- ⑥ Nobuaki Suzuki, Takayoshi Suzuki, Yosuke Ota, Tatsuya Nakano, Masaaki Kurihara, Haruhiro Okuda, Takao Yamori, Hiroki Tsumoto, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, Design, Synthesis, and Biological Activity of Boronic acid-Based Histone Deacetylase Inhibitors, *J. Med. Chem.*, **52**, 2909-2922 (2009).

[学会発表] (計 43 件)

- ① Takayoshi Suzuki, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, et al., Discovery of isozyme-selective histone deacetylase inhibitors by click chemistry, ACS National Meeting, Sprong 2012, March 25, 2012(San Diego)
- ② Daisuke Ogasawara, Takayoshi Suzuki, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata et al., Design, Synthesis, and Biological Activity of cyclopropylamine-based LSD1 inhibitor, 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, 29 Nov.-2 Dec. 2011(東京).
- ③ 宮田直樹、創薬化学のすすめ：タンパク質の翻訳後修飾を阻害する化合物の創生を例にして、創薬懇話会 2011 in 岡山(招待講演), 2011 年 7 月 6-7 日, (岡山)
- ④ T. Suzuki, H. Nakagawa, N. Miyata, et al., Discovery of selective inhibitors of lysine specific demethylase-1, Pacificchem 2010, 2010 年 12 月 15-20 日, Honolulu, USA.
- ⑤ Y. Kasuya, N. Miyata, et al., Identification of isozyme-selective histone deacetylase inhibitors by click chemistry, Pacificchem2010, 2010

年 12 月 15-20 日, Honolulu, USA.

- ⑥ 宮田直樹、エピジェネティックに遺伝子発現を制御する低分子化合物の設計と合成、第 38 回構造活性相関シンポジウム(招待講演)、2010 年 10 月 31 日、(徳島)。
- ⑦ 宮田直樹、エエピジェネティックに遺伝子発現を制御する化合物：新たな制がん剤の開発をめざして、第 2 回 Cancer Research Seminar(招待講演)、2009 年 11 月 18 日、(愛知)。
- ⑧ 宮田直樹、他、HDAC6 非感受性阻害薬の創製とその多発性骨髄腫細胞増殖抑制機構の解明、日本ケミカルバイオロジー学会 第 4 回年会、2009 年 5 月 19 日、(兵庫)。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 7 件)

- ① 名称：新規ヒドロキサム酸誘導体及びその用途
発明者：宮田直樹、他
権利者：名古屋市立大学、他
種類：特許
番号：2012-38977
出願年月日：平成 24 年 2 月 24 日
国内外の別：国内
- ② 名称：新規アミド化合物及びその用途
発明者：宮田直樹、他
権利者：名古屋市立大学
種類：特許
番号：2012-37082
出願年月日：平成 24 年 2 月 23 日
国内外の別：国内
- ③ 名称：抗うつ薬及びその用途
発明者：宮田直樹、他
権利者：名古屋市立大学、他
種類：特許
番号：2010-196993
出願年月日：平成 22 年 9 月 2 日
国内外の別：国内
- ④ 名称：HIV 複製阻害剤
発明者：宮田直樹、他
権利者：名古屋市立大学、他
種類：特許
番号：2010-477176
出願年月日：平成 22 年 8 月 6 日
国内外の別：国内
- ⑤ 名称：ヒドロキサム酸誘導体及びそれを用いた HDAC8 阻害剤
発明者：宮田直樹、他
権利者：名古屋市立大学、他
種類：特許
番号：2010-011431
出願年月日：平成 22 年 1 月 21 日

- 国内外の別：国内、国外
- ⑥ 名称：ヒドロキサム酸誘導体及び JHDM 阻害剤
発明者：宮田直樹、他
権利者：名古屋市立大学、他
種類：特許
番号：2010-009834
出願年月日：平成 22 年 1 月 20 日
国内外の別：国内
- ⑦ 名称：LSD 阻害剤
発明者：宮田直樹、他
権利者：名古屋市立大学、他
種類：特許
番号：2009-140553
出願年月日：平成 21 年 6 月 11 日
国内外の別：国内、国外

○取得状況（計 0 件）

[その他]

- ① 新聞/WEB 報道
朝日新聞、読売新聞、平成 24 年 2 月 16 日。
共同通信、平成 24 年 2 月 16 日。
<http://www.47news.jp/CN/201202/CN2012021601001686.html>
- ② 専門学術紹介記事
SciBX, 46, p.3, (2009).
- ③ ホームページ
<http://www.phar.nagoya-cu.ac.jp/hp/ykg/Yakka/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 直樹 (MIYATA NAOKI)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：50114674

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

鈴木 孝禎 (SUZUKI TAKAYOSHI)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師
研究者番号：90372838
(平成 23 年 8 月 31 日まで)

中川 秀彦 (NAKAGAWA HIDEHIKO)
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：80281674