

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659050

研究課題名(和文)細胞内局在性を有するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の合成

研究課題名(英文) Synthesis of HDAC inhibitors that locally develop their inhibition activity in cells

研究代表者

宮田 直樹 (MIYATA, Naoki)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50114674

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の細胞内局在性と機能発現との関連の解明を目的として、細胞内で局在的に活性を発現するHDAC阻害剤を合成した。細胞内の局所で活性を持たせる方法として光解除性ケージド化の手法を用いることとし、ケージドHDAC阻害剤の設計と合成を行った。合成したケージドHDAC阻害剤は、可視光照射により、光照射時間依存的にHDAC活性を阻害した。この結果は、光解除性ケージドHDAC阻害剤が、系外から細胞内の局所を光照射することにより細胞内局所的にHDAC阻害活性を制御しHDACの細胞内局在性と機能発現との関連の解明に役立つ有用なHDAC阻害剤となる可能性を示す。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the association between the localization and the function of histone deacetylases (HDACs) in cells, we designed and synthesized HDAC inhibitors which locally develop their activity in cells. We used a caged technique to control the HDAC activity. The synthesized HDAC inhibitors with photo-labile protecting group time-dependently inhibited HDAC activity under the visible light irradiation conditions. These results showed that these HDAC inhibitors can be controlled their activity by visible light irradiation even in the living cell systems and become a useful tool to elucidate the association between the localization and the function of HDAC in cells.

研究分野：薬学

キーワード：ヒストン脱アセチル化酵素 エピジェネティクス ケミカルバイオロジー 細胞内局在性 光解除性保護基 分子標的治療薬 制がん剤 蛍光検出

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現をエピジェネティックに制御する酵素の一つであるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は、核内のヒストンタンパク質のアセチル化されたリシン残基を脱アセチル化する酵素として見いだされた。その後の研究により、HDAC は、シークエンスの類似性から、18 種のアイソフォームが同定され、2 つのグループに分類されている。一つは Zinc 依存性酵素 (Class I, Class II and Class IV) であり、もうひとつは NAD⁺ 依存性酵素 (Class III: sirtuins) である。Zinc 依存性酵素である Class I の HDAC には HDAC1、HDAC2、HDAC3 および HDAC8 が含まれるが、HDAC1 および HDAC2 は核外輸送シグナル配列を欠いているため、ほぼ核内に局在している。一方、HDAC3 および HDAC8 は核外・核内輸送シグナル配列を持っているため核内のみならず細胞質にも存在することが明らかになった。Class II の HDAC には HDAC4、HDAC5、HDAC6、HDAC7、HDAC9 および HDAC10 が含まれ、このうち、HDAC4、HDAC5、HDAC7 および HDAC9 は、核内移行シグナル・核外移行シグナル配列の両方を持っており、HDAC3 および HDAC8 と同様に核と細胞質の間を移動する。また、HDAC6 および HDAC10 は細胞質にのみ局在し、特に HDAC6 は微小管の α -チューブリンを基質とし微小管の安定化に寄与することが知られている。HDAC11 は、もっとも最近に同定されたアイソフォームであり、Class IV に分類され核に存在する。一方、NAD⁺ 依存性酵素 (Class III: sirtuins) には、ヒト SIRT1-7 が含まれ、そのうち、SIRT1、SIRT6 および SIRT7 は、核に局在するのに対し、SIRT2 は核と細胞質に、SIRT3、SIRT4 および SIRT5 はミトコンドリアに局在することが報告されている。これらのうち、SIRT1、SIRT2、SIRT3 および SIRT5 はヒストンやその他の機能性タンパク質の脱アセチル化能を有することが報告されているが、SIRT4、SIRT6 および SIRT7 は *in vitro* において、脱アセチル化能を示さないことが報告されている。このように、HDAC には、核に存在しヒストンを基質とする HDAC のみならず、細胞質に局在する HDAC、ミトコンドリアに局在する HDAC、あるいは、細胞核と細胞質の両方に存在する HDAC などが見出されている。その結果、HDAC の基質となるタンパク質も HDAC の名前の由来であるヒストンタンパク質以外に、 α -チューブリンのような構造タンパク質、Hsp90 のようなシャペロンタンパク質、DNA 結合核内受容体、DNA 結合転写因子、PGC-1 のような転写制御タンパク質、Smad7 や Stat3 のようなシグナルメディエーター、DNA 修復酵素など多岐にわたっている。よって、HDAC は多様なタンパク質のアセチル化されたリシン残基を脱アセチル化する酵素であり、広く細胞の恒常性維持に係わる多様な機能を有していると認識されている。しかし、HDAC の細胞内局在性と機能との関係はいまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

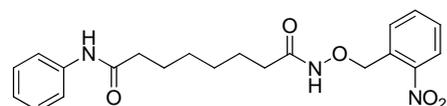
HDAC は細胞内で局在しており、その詳細な機能を調べるためには、細胞内で局所的に活性を発現する HDAC 阻害剤を設計・合成することが必要と考えられ、そのための方法の一つとして、系外から HDAC の活性を自由に制御できる化合物の利用が上げられる。そこで、照射により HDAC 活性の位置・時間の制御が行える化合物の開発を目指すこととした。系外からの HDAC 活性の時空間的な制御が可能となれば、ヒストンアセチル化の関与する機能の解明に役立つと考えられる。また、このようなケージド化合物を用いることにより、たとえば幹細胞分化を部位・時期選択的に制御することも可能になり、幹細胞を用いた特定の細胞の作製技術の開発にもつながると考えられる。以上、本研究は、HDAC の細胞内局在性と機能発現との関連の解明に焦点を当て、細胞内で局所的に活性を発現するケージド HDAC 阻害剤を設計・合成することを目的とした。

3. 研究の方法

ケージド化合物は、光解除性保護基で生理活性分子をプロドラッグ化した化合物であり、照射により活性を出現させることができる。このことを利用し、HDAC 阻害剤の酵素活性部位に光解除性保護基を導入することでケージド HDAC 阻害剤の開発を行った。HDAC 阻害剤としては、SAHA (Suberoylanilide hydroxamic acid / ZOLINZA[®]) を用い、その活性部位を *o*-nitrobenzyl や 7-diethylaminocoumarin 型の光分解性保護基で保護したケージド化合物を設計・合成し、機能評価を行った。

(1) ニトロベンジル型ケージド HDAC 阻害剤 (NB-SAHA) の合成と光分解特性

最初に、ニトロベンジル型ケージド SAHA (NB-SAHA) を合成した。NB-SAHA は、monomethyl suberate を aniline と脱水縮合させアミドとした後、メチルエステルを加水分解し、続いて酸クロライドに変換した後、2-nitrobenzylhydroxylamine と縮合させることで合成した。



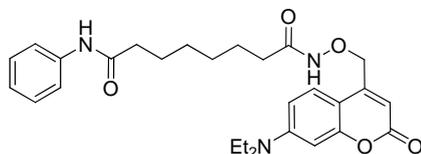
NB-SAHA

次に、NB-SAHA の照射による分解を調べた。照射装置の光強度を 0.86mW/cm² に設定して照射を行った結果、照射により NB-SAHA が分解し、活性体である SAHA が生成することが HPLC により確認できた。このことから NB-SAHA がニトロベンジル型ケージド化合物として機能し、照射によって SAHA が生成することが示された。しかし、NB-SAHA の水溶液中での極大吸収波長は 266 nm ($\epsilon_{272\text{nm}}=3.0 \times 10^3 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) であり、照射によ

る細胞および組織に対する障害性を考慮した場合、照射する光の波長は、紫外光ではなく可視光が好ましい。

(2) アミノクマリン型ケージド HDAC 阻害剤 (AC-SAHA) の合成と光分解特性

可視光で光分解を起こす光解除性保護基を持つケージド HDAC 阻害剤としてアミノクマリン型ケージド SAHA (AC-SAHA) を合成することとした。7-diethylamino-4-methylcoumarin のメチル基を、Riley oxidation に続くヒドリド還元によりヒドロキシメチル基へと変換し、さらにメシル体を経てプロモメチル体に導き、*N*-Boc-hydroxylamine を付加し、*N*-Boc-hydroxylmethyl 体とし、最後に Boc 基を脱保護し、4-(aminooximethyl)-7-diethylaminocoumarin の塩酸塩を得た。これと NB-SAHA の合成に用いた 7-(phenylcarbamoyl)heptanoic acid とを縮合剤 COMU を用いて縮合させることで、アミノクマリン型 HDAC 阻害剤である AC-SAHA を合成した。



AC-SAHA

合成した AC-SAHA の Tris buffer 中での極大吸収波長は 398nm ($\epsilon_{398\text{nm}}=1.24 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) であり、可視光領域の光を吸収して保護基が切断されることが期待できる。

AC-SAHA の光分解を HPLC を用いて調べた。Tris buffer で希釈した AC-SAHA に対し、可視光 (400 ~ 430 nm) を用い、照射時の光強度を $66 \text{mW}/\text{cm}^2$ に設定して 10 分間照射を行った。その結果、光照射によって AC-SAHA に由来するピークが減少し、SAHA に由来するピークが増加した。また、光分解時に SAHA と共に生成すると考えられる、ヒドロキシメチルクマリンに由来するピークの増加も確認された。従って、AC-SAHA が想定される反応機構にしたがって光分解を起こしていることが示唆された。

次に、AC-SAHA に光照射した際の SAHA の生成量を HPLC で定量した。20 μM (20% DMSO in Tris buffer) の AC-SAHA に、400 ~ 430 nm の波長の光を、光強度を $66 \text{mW}/\text{cm}^2$ に設定して 10 分間照射したところ約 27 % の SAHA が生成していることがわかった。

次に吸収された光がどれだけ効率よく反応に使われたかを示す値である量子収率を測定した。光照射によって吸収された光子数は、シュウ酸鉄カリウムの光還元反応を利用して算出した。その結果、分解量子収率は 0.00449 ± 0.00019 、生成量子収率は 0.00153 ± 0.00021 と算出された。また、405nm のモル吸光係数 ($\epsilon_{405\text{nm}}$) が $1.21 \times 10^4 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ であっ

たので、(photolytic) は 54 ± 2.3 、(production) は 19 ± 2.5 と算出された。これらの光学特性値は、AC-SAHA が光解除性ケージド HDAC 阻害剤として十分利用可能であることを示す。

(3) アミノクマリン型ケージド HDAC 阻害剤 (AC-SAHA) の HDAC 阻害活性評価

HDAC 阻害活性評価は、細胞系への応用を考えて可視光で保護基が解除できる AC-SAHA で行った。HDAC アッセイキット (HDAC-Glo™ I/II assay kit; G6430, Promega Corporation) を用いて AC-SAHA の HDAC 阻害活性評価を行った。96 ウェルプレートに 500 nM (0.5% DMSO in Assay buffer) の AC-SAHA (2.0 μM , 2.0% DMSO in Assay buffer を 50 μL 添加) と HeLa 細胞の核抽出物 50 μL を加え、光照射を行い、続いて室温で 1 時間インキュベーションし、アッセイ Reagent (Substrate + Developer) を 100 μL 加えて室温で 30 分間インキュベーションした後、プレートリーダーで化学発光強度を測定した。光照射は 400-430 nm の波長の光を用い、照射時の光強度を $66 \text{mW}/\text{cm}^2$ に設定して 1.0, 3.0, 6.0, 10 分間の照射を行った。その結果、AC-SAHA が光照射時間依存的に HDAC を阻害することが示された。また、HPLC による解析によって確認された光反応副生成物であるヒドロキシメチルクマリンやカルボン酸誘導体が HDAC を阻害することはなく、また光照射自体による不活化も確認されなかった。これらの結果は、in vitro 酵素系の実験で、AC-SAHA が光解除性ケージド HDAC 阻害剤として機能することを示す。

(4) ウェスタンブロット解析によるアミノクマリン型ケージド HDAC 阻害剤 (AC-SAHA) の機能評価

細胞内における AC-SAHA の HDAC 阻害活性評価をウェスタンブロット解析によって行った。細胞はヒト結腸腺癌由来細胞株 HCT116 を用いた。HCT116 に 10 μM (0.5% DMSO) の AC-SAHA を処置し、3 時間インキュベーションした。培地を除去して D-PBS で洗浄後、再び D-PBS 培地中で光照射を行った。D-PBS を除去し、再び D-PBS 培地にし、8 時間インキュベーションした細胞を用いて、光照射実験を行い、ウェスタンブロット解析を行った。光照射は 400-430 nm の波長の光を用い、照射時の光強度を $66 \text{mW}/\text{cm}^2$ に設定して 1.0, 3.0, 10 分間照射した。その結果、AC-SAHA が光照射依存的にヒストン H4 のアセチル化を亢進することが示され、AC-SAHA が細胞内においても HDAC を阻害することが示唆された。

(5) アミノクマリン型ケージド HDAC 阻害剤 (AC-SAHA) のがん細胞増殖抑制試験

SAHA はがん細胞において、細胞増殖を抑制することが報告されているため、細胞増殖アッセイキット (CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability assay kit; G7570, Promega Corporation) を用いて、HCT116 における AC-SAHA の細胞増殖抑制効果を評価した。

HCT116 (1.0 x 10⁵ cells/mL の密度で 50 μL 添加) に 10 μM (0.5% DMSO) の AC-SAHA を処置し、3 時間または 24 時間インキュベーションした。培地を除去して D-PBS で洗浄後、光照射を行った。D-PBS を除去し、再び D-PBS 培地にし、48 時間インキュベーションし、室温で静置した細胞にアッセイ Reagent を加えて室温で 15 分間インキュベーションした後、プレートリーダーで化学発光強度を測定した。光照射は 400-430 nm の波長の光を用い、照射時の光強度を 66 mW/cm² に設定して 1.0, 3.0, 10 分照射を行った。その結果、AC-SAHA が光照射時間依存的に細胞増殖を抑制することが示された。また、光照射のみによる細胞死は確認されなかった。

4. 研究成果

遺伝子発現をエピジェネティックに制御する酵素の一つである HDAC は、広くタンパク質のアセチル化されたリシン残基を脱アセチル化する酵素であり、核内、細胞質、ミトコンドリアなどに局在し、細胞の恒常性維持に係わる多様な機能が注目されている。本研究では、HDAC の細胞内局在性と機能発現との関連の解明に焦点を当て、細胞内で局所的に活性を発現する HDAC 阻害剤を合成し、HDAC の機能解明に役立たせることを目的として研究を行った。初年度は、クリックケミストリーの手法を用いて、HDAC8 および HDAC3 にそれぞれ選択性を有する阻害剤を見出した。二年目は、細胞内の局所で活性を持たせる方法として光解除性ケージド化の手法を用いることとし、ケージド HDAC 阻害剤としてニトロベンジル型 HDAC 阻害剤(NB-SAHA)及びアミノクマリン型 HDAC 阻害剤(AC-SAHA)の設計と合成を行った。最終年度は、合成した可視光領域に光吸収極大をもつアミノクマリン型ケージド HDAC 阻害剤(AC-SAHA)を用いた実験を行い、in vitro 非細胞系および細胞系の実験により、可視光照射により、光照射時間依存的に HDAC 阻害剤を生成し、HDAC 活性を阻害し、がん細胞の増殖を照射時間依存的に抑制することにも成功した。以上の結果は、ヒドロキサム酸系の HDAC 阻害剤に対して光解除性ケージド化の方法が適用可能であることを示す。これらの結果は、合成したケージド HDAC 阻害剤が、系外から細胞内の局所を光照射することにより細胞内局所的に HDAC 阻害活性を制御できる有用な HDAC 阻害剤となる可能性を示唆する。今後は、今回のケージド HDAC 阻害剤研究で得られた知見を元に、より性能の良いケージド HDAC 阻害剤を開発する必要がある。HDAC はがん治療や再生医療の新たなターゲットとして注目を集めているが、HDAC は生体内で遍在していたり、ヒストンアセチル化レベルが細胞周期や分化の段階で異なっていたりしているため、HDAC による調節機構が詳細に調べられているとは言い難い。そこで、細胞内のヒストンアセチル化を制御するツールとして開発さ

れたケージド HDAC 阻害剤が、ヒストンアセチル化の関与する機能の解明や、幹細胞分化の部位や時期選択的な制御による特定の細胞の作製技術の開発にとって重要な位置を占めると期待される。

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 5 件)

Takayoshi Suzuki, Nobusuke Muto, Masashige Bando, Yukihiro 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*, 査読有、**9**, 657-664(2014)

DOI: 10.1002/cmdc.201300414

Yukihiro Itoh, Takayoshi Suzuki and Naoki Miyata, Small-molecular modulators of cancer-related epigenetic mechanisms, *Mol. Biosyst.*, 査読有、**9**, 873-896(2013). DOI: 10.1039/C3MB25410K

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

DOI:101371/journal.pone.0068669

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

DOI: 10.1021/jm300837y

Takayoshi Suzuki, Mohammed Naseer Ahmed Khan, Hideyuki Sawada, Erika Imai, Yukihiro Itoh, Katsura Yamatsuta, Natsuko Tokuda, Jun Takeuchi, Takuya Seko, Hidehiko Nakagawa, and Naoki Miyata, Design, Synthesis, and Biological Activity of a Novel Series of Human Sirtuin-2-Selective Inhibitors, *J. Med. Chem.*, 査読有、**55**, 5760-5773(2012).

DOI: 10.1021/jm3002108

[学会発表](計 4 件)

山田創太、家田直弥、川口充康、宮田直

樹、中川秀彦、クマリン構造を有する光で活性制御可能な HDAC 阻害剤の開発、日本薬学会第 135 年会, 2015 年 3 月 25-28 日, 神戸, 26R-pm06

Sota Yamada, Naoya Ieda, Mitsuyasu Kawaguchi, Naoki Miyata, Hidehiko Nakagawa, Development of a caged HDAC inhibitor with 7-diethylaminocoumarin-type photolabile protecting group, ICBS2014, November 17-19, 2014, San Francisco, Poster Session II-53

山田創太、家田直弥、川口充康、宮田直樹、中川秀彦、7-Diethylaminocoumarin 型光解除性保護基を用いたケージド HDAC 阻害剤の開発、第 67 回日本酸化ストレス学会学術集会, 2014 年 9 月 4-5 日, 京都, P-64

山田創太、家田直弥、川口充康、宮田直樹、中川秀彦、7-Diethylaminocoumarin 型光解除性保護基を導入したケージド HDAC 阻害剤の合成と機能評価、日本ケミカルバイオロジー学会第 9 回年会, 2014 年 6 月 11-13 日, 大阪, P-095

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

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: 5 0 1 1 4 6 7 4

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

中川 秀彦 (Nakagawa, Hidehiko)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号: 8 0 2 8 1 6 7 4

(4) 研究協力者

山田 創太 (YAMADA Souta)