

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 1 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14982

研究課題名(和文) 遺伝性疾患の治療を目指した脱メチル化/アセチル化酵素モジュレータの創製

研究課題名(英文) Discovery of demethylase/deacetylase modulators towards therapy for hereditary diseases

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、先天性遺伝疾患である グロビン異常症、コルネリアデランゲ症候群の治療を目指して、それぞれ、ヒストンリシン脱メチル化酵素LSD1阻害薬、ヒストンリシン脱アセチル化酵素8(HDAC8)活性化薬を創製することを目的とした。合理的な分子設計やスクリーニングを行った結果、高活性、高選択的なLSD1阻害薬およびHDAC8活性化薬を見出すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, aiming to find therapeutic agents for hereditary diseases such as beta-globin disorder and Cornelia de Lange syndrome, we attempted to identify lysine-specific demethylase 1 (LSD1) inhibitors and histone deacetylase 8 (HDAC8) activators. Rational drug design and screening allowed us to identify highly selective and potent LSD1 inhibitors and HDAC8 activators.

研究分野：創薬化学

キーワード：遺伝性疾患 エピジェネティクス 脱メチル化酵素 脱アセチル化酵素 阻害剤 活性化剤

## 1. 研究開始当初の背景

多くの遺伝性疾患は、染色体や遺伝子の変異によって起こる病気であることから、不治の難病と考えられてきた。そのため、治療薬の開発も、ほとんど進んでいない状況である。しかしながら、最近の生物学研究により、ヒストンのアセチル化やメチル化を制御することにより疾患関連遺伝子の発現を変化させることで、いくつかの遺伝性疾患の治療が可能となることが示された。以下に、本研究で対象とする遺伝性疾患について述べる。

### 1) $\beta$ グロビン異常症

$\beta$ サラセミアや鎌状赤血球症は、最も患者数が多い遺伝性貧血病として知られ、重篤な患者は死に至る。その治療のためには、遺伝子変異をもつ $\beta$ グロビンの代わりに、胎児型グロビンを発現させれば良い。しかしながら、成人では胎児型グロビンは発現していないため、この治療戦略は、困難なものと考えられてきた。しかし、最近、胎児型グロビン遺伝子の発現がヒストン脱メチル化酵素 LSD1 により抑制されていることが明らかとなった (*Nat. Med.* **2013**, *19*, 291-294.)。

### 2) コルネリアデランゲ症候群

コルネリアデランゲ症候群 (CdLS) は、精神運動発達遅延や成長障害などを特徴とする遺伝性多発奇形症候群である。最近、HDAC8 の変異による酵素活性の低下により、CdLS が引き起こされることが明らかになった (*Nature* **2012**, *489*, 313-317.)。 $\beta$ グロビン異常症、CdLS ともに、特効薬が存在しないのが現状である。

## 2. 研究の目的

上述の通り、 $\beta$ グロビン異常症に LSD1 が関与することから、LSD1 を選択的に阻害することができれば、胎児型グロビン遺伝子の発現が上昇するため、 $\beta$ グロビン異常症の治療が可能となる。本研究では、 $\beta$ グロビン異常症の治療を目指して、LSD1 選択的阻害薬を創製することを目的とした。

また、CdLS の発症に HDAC8 の変異による酵素活性の低下が関与することから、変異型 HDAC8 を活性化することが出来れば、CdLS の治療につながると思われる。本研究では、CdLS 治療薬を目指した HDAC8 活性化剤を創製することも目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) LSD1 阻害薬の創製研究については、LSD1 の X 線結晶構造も基にした合理的な分子設計により LSD1 阻害薬を設計、合成し、それら合成化合物の酵素阻害活性評価を行うことで高活性かつ高選択的な LSD1 阻害薬の創製を行う。

(2) HDAC8 活性化薬の創製研究については、当研究室所有の化合物ライブラリーの HDAC8 酵素活性スクリーニングを行うことにより、HDAC8 活性化薬の同定を行う。

## 4. 研究成果

### (1) LSD1 阻害薬の創製

LSD1 の X 線結晶構造解析から、基質のヒストンペプチドは、 $\gamma$ -turn 構造をとることが明らかになっている (図 1)。

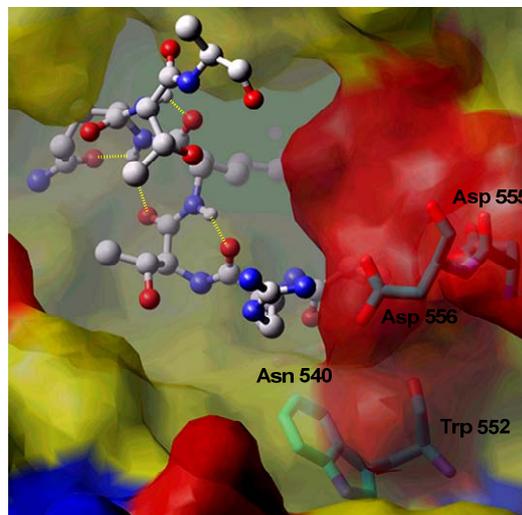


図 1. LSD1 と基質ヒストンペプチドの共結晶構造

これまでに我々は、LSD1 選択的阻害薬である NCD38 を見出したが、NCD38 のアミド部分も $\gamma$ -turn 構造であると考えられる (図 2 上)。 $\gamma$ -turn mimetics (図 2 下) は、 $\gamma$ -turn のコンホメーションを固定化した構造であり、この固定化により、LSD1 阻害活性の向上が期待できる。また、NCD38 の phenylcyclopropane (PCPA) の構造は、LSD1 阻害活性に必須の構造である。PCPA の LSD1 阻害メカニズムを図 3 に示した。PCPA は、LSD1 の活性中心において、補酵素である FAD からの一電子酸化を受けカチオンラジカルとなる。その後、シクロプロパン環の開裂により、より安定なベンジルラジカルを生成する。そのベンジルラジカルと FAD アニオンラジカルが反応することにより、FAD-PCPA 結合体が生じ、これにより LSD1 は阻害される。したがって、PCPA のベンゼン環は、ラジカルを安定化できる他の芳香環 (置換基のついたベンゼン環やヘテロ環) に変換可能である (図 2 下)。以上のことを考慮し、図 2 下に示す一連の $\gamma$ -turn mimetics を設計した。

設計化合物は、スキーム 1 に示す合成ルートにしたがって、合成した。ヨードベンゼン誘導体とエチレンジアミンのウルマン型反応によりアニリン誘導体を得、ベンズアルデヒド誘導体との還元的アミノアルキル化反応、マロニルクロリドとの反応により、 $\gamma$ -turn mimetic 構造を合成した。さらに、4-ブロモブタノールを付加させた後、アルコールをメシル化させ、シクロプロピルアミンと反応させることで、効率的に目的物を合成することに成功した。

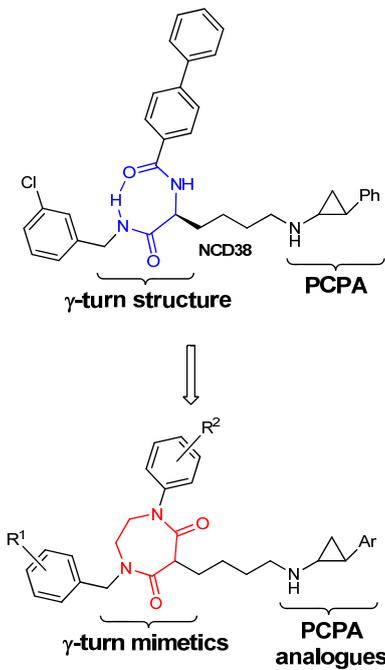


図 2.  $\gamma$ -turn mimetic 構造をもつ LSD1 阻害薬の分子設計

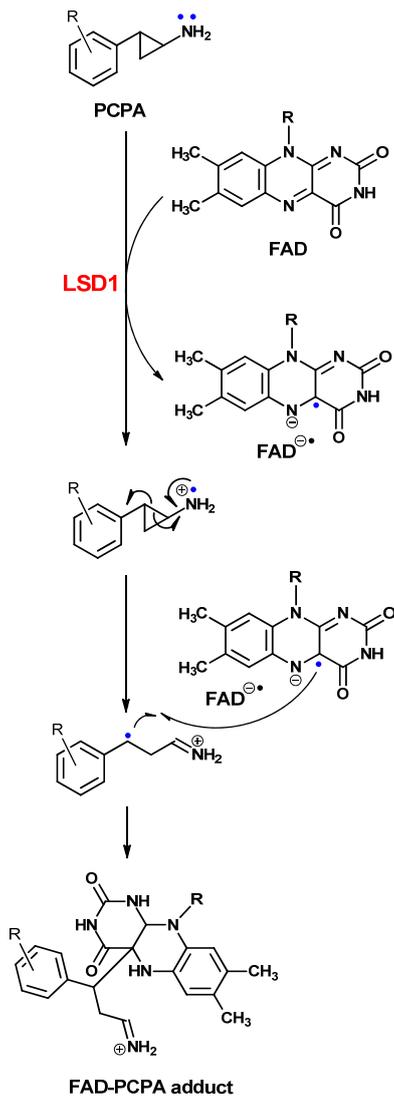
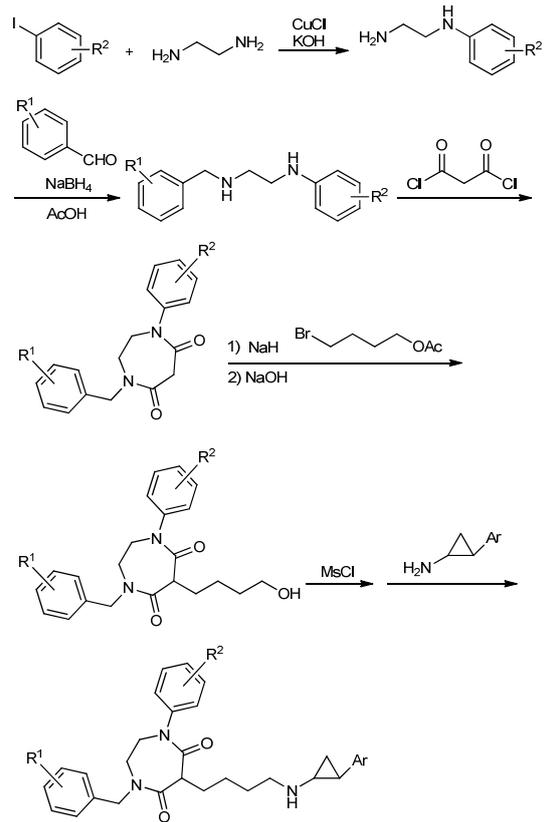


図 3. PCPA の LSD1 阻害メカニズム

### スキーム 1



スキーム 1 で合成した化合物群の LSD1 阻害活性評価を行ったところ、合成化合物の多くは LSD1 を強力に阻害した。最も強く LSD1 を阻害した化合物の IC<sub>50</sub> 値は 0.063  $\mu$ M であった。また、これらの化合物は、LSD1 の類似酵素であるモノアミノオキシダーゼは阻害しなかった。

つぎに、これらの  $\gamma$ -turn mimetics が細胞系でも効果を示すかどうかを確認するために、LSD1 を高発現するがん細胞 (MDA-MB-231 細胞、MCF-7 細胞、HeLa 細胞、A549 細胞) に対する増殖阻害活性を調べた。その結果、いくつかの  $\gamma$ -turn mimetics が強いがん細胞増殖阻害活性を示した。

### (2) HDAC8 活性化薬の創製

HDAC8 活性化薬を見出すために、当研究室が所有する化合物ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、HDAC8 の脱アセチル化活性を促進する化合物を 1 つ見出した。本化合物の HDAC8 活性化能は、容量依存的で、100  $\mu$ M の濃度では 140%、1000  $\mu$ M の濃度では 155% HDAC8 の脱アセチル化活性を促進した (図 4)。

HDAC8 は、細胞核内でコヒーシンの脱アセチル化を触媒することが知られている。今後、細胞系でコヒーシンのアセチル化状態を調べることにより、本化合物が細胞系でも HDAC8 を活性化するかどうかを確認する予定である。

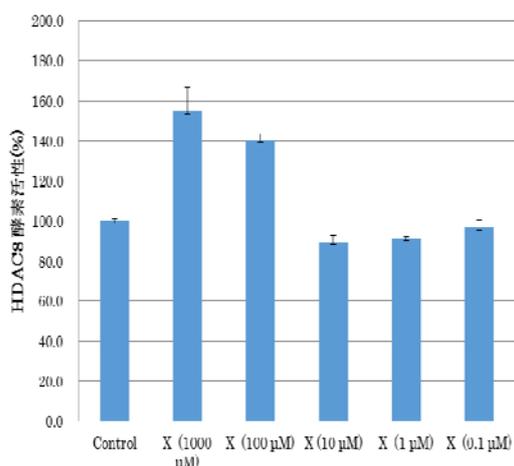


図4. スクリーニングヒット化合物のHDAC8活性化活性

以上のように、遺伝性疾患治療薬候補化合物として、LSD1 阻害薬および HDAC8 活性化薬を同定した。

#### 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 6 件)

- ① Yukihiro Ito, Takayoshi Suzuki. "Drug" Discovery with the Help of Organic Chemistry. *Yakugaku Zasshi*, 査読有, 137 巻, 2017, 283-292  
DOI: 10.1248/yakushi.16-00231-1.
- ② Shin Miyamura, Misaho Araki, Yosuke Ota, Yukihiro Ito, Shusuke Yasuda, Mitsuharu Masuda, Tomoyuki Taniguchi, Yoshihiro Sowa, Toshiyuki Sakai, Takayoshi Suzuki, Kenichiro Itami, Junichiro Yamaguchi. C-H Activation Enables Rapid Structure-Activity Relationship Study of Arylcyclopropyl Amines for Potent and Selective LSD1 Inhibitors. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 査読有, 14 巻, 2016, 8576-8585  
DOI: 10.1039/c6ob01483f.
- ③ Taeko Kakizawa, Tamio Mizukami, Yukihiro Ito, Makoto Hasegawa, Ryuzo Sasaki, Takayoshi Suzuki. Evaluation of phenylcyclopropylamine compounds by enzymatic assay of lysine-specific demethylase 2 in the presence of NPAC peptide. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 査読有, 26 巻, 2016, 1193-1195  
DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.01.036.
- ④ Yukihiro Ito, Keisuke Aihara, Paolo Mellini, Toshifumi Tojo, Yosuke Ota, Hiroki Tsumoto, Viswas Raja Solomon, Peng Zhan, Miki Suzuki, Daisuke Ogasawara, Akira Shigenaga, Tsubasa Inokuma, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, Tamio Mizukami,

Akira Otaka, Takayoshi Suzuki. Identification of SNAIL1 Peptide-Based Irreversible Lysine Specific Demethylase 1-Selective Inactivators. *Journal of Medicinal Chemistry*, 査読有, 59 巻, 2016, 1531-1544

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b01323.

- ⑤ Xueshun Wang, Boshi Huang, Takayoshi Suzuki, Xinyong Liu, Peng Zhan. Medicinal chemistry insights in the discovery of novel lysine-specific demethylase 1 inhibitors. *Epigenomics*, 査読有, 7 巻, 2015, 1379-1396

DOI: 10.2217/epi.15.86.

- ⑥ Peng Zhan, Yukihiro Ito, Takayoshi Suzuki, Xinyong Liu. Strategies for the Discovery of Target-specific or Isoform-selective Modulators. *Journal of Medicinal Chemistry*, 査読有, 58 巻, 2015, 7611-7633.

DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00229.

[学会発表] (計 20 件)

- ① Takayoshi Suzuki. Targeting Histone Lysine Demethylases for Cancer Therapy. 2017 Queenstown Molecular Biology Meetings, Mar 16, 2017, Shanghai
- ② 鈴木孝禎、エピジェネティクスを標的とした創薬研究、Kyoto University MIC/SK-Project Seminar、2017年2月3日、京都
- ③ 鈴木孝禎、化学の力で難治性疾患に挑む～エピジェネティクス創薬化学～、第6回 CSJ化学フェスタ2016、2016年11月16日、東京
- ④ 鈴木孝禎、エピジェネティクス制御に基づいた創薬研究～LSD1阻害薬の創製～、北海道大学生命科学特別講演会、2016年10月24日、札幌
- ⑤ Takayoshi Suzuki. Chemical Control of Epigenetics for Cancer Therapy ~Discovery of Histone Lysine Demethylase Inhibitors with Anticancer Activity~. Chung-Ang University Center for Metareceptome Research 2016 International Symposium, Oct 17, 2016, Seoul
- ⑥ Takayoshi Suzuki. Histone Lysine Demethylase Inhibitors for Cancer Therapy. The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association ~Epigenetic therapeutic targets: Discovery and utilization~, Oct 6, 2016, Yokohama
- ⑦ 鈴木孝禎、ヒストン脱メチル化酵素を標的とした抗がん剤創製研究、千葉大学再生システムと疾患・癌エピゲノム公開シンポジウム、2016年9月16日、千葉
- ⑧ 鈴木孝禎、エピジェネティクス制御因子阻害剤の創製とその応用、第38回日本生物学的精神医学会・第59回日本神経化学会大会 合同年会 脳とこころのエピジェネティクス創薬、2016年9月9日、福岡
- ⑨ Takayoshi Suzuki. Targeting Lysine

Demethylases for Cancer Therapy. The 35th Sapporo International Cancer Symposium 2016~Cancer epigenome: from discovery to translation~, Jun 24, 2016, Sapporo

- ⑩ Takayoshi Suzuki. Discovery of Histone Lysine Demethylase Inhibitors with Anticancer Activity, Eleventh Drug Discovery Chemistry~Epigenetic Inhibitor Discovery~, Apr 20, 2016, San Diego
- ⑪ 鈴木孝禎、創薬を目指したエピジェネティクス制御の分子技術、日本化学会第96春季年会 分子設計と分子技術：その創りだす新しい世界、2016年3月24日、京田辺
- ⑫ Takayoshi Suzuki. Targeting Histone Demethylases for Cancer Therapy, Kick-Off Symposium in Nagoya City University in 2016, Mar. 1, 2016, Nagoya
- ⑬ Takayoshi Suzuki. Discovery of histone lysine demethylase-selective inhibitors, Pacificchem 2015, Dec. 18, 2015, Honolulu
- ⑭ Takayoshi Suzuki. Chemical Control of Epigenetics ~Discovery of Lysine Demethylase Inhibitors~, The 40th Naito Conference; Sep 18, 2015, Sapporo
- ⑮ Takayoshi Suzuki. Chemical Control of Epigenetics ~Discovery of Histone Lysine Demethylase Inhibitors~, The 10th Asian Epigenomics Meeting 2015, Sep 9, 2015, Seoul
- ⑯ 鈴木孝禎、エピジェネティクス制御化合物の創製と医薬への応用、第31回若手化学者のための化学道場、2015年8月27日（淡路）
- ⑰ 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、シオノギ未来創薬セミナー、2015年7月24日、札幌
- ⑱ 鈴木孝禎、標的誘導型合成によるエピジェネティクス制御化合物の創製研究、第49回分子認識科学を基盤とする創薬研究会、2016年6月2日、長崎
- ⑲ 鈴木孝禎、エピジェネティクス制御化合物の創製研究、近畿化学協会合成部会 平成27年度 第1回合成フォーラム、2015年5月29日、神戸
- ⑳ 鈴木孝禎、ポストゲノム時代の創薬研究～エピジェネティクス創薬～、日本薬学会東海支部特別講演会、2015年5月8日、岐阜

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称： $\gamma$  ターン構造を有する化合物及びそれを用いた LSD1 阻害剤

発明者：伊丹健一郎、山口潤一郎、荒木美紗保、鈴木孝禎、伊藤幸裕、太田庸介

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2016-065756 号

出願年月日：2016年3月29日

国内外の別：国内

〔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