

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「新機能創出を目指した分子技術の構築」
研究課題「創薬を目指したエピジェネティクス制御
の分子技術」

研究終了報告書

研究期間 2014年10月～2020年3月

研究代表者:鈴木 孝禎
(大阪大学産業科学研究所 教授)

§ 1 研究実施の概要

(1)実施概要

エピジェネティクス(DNA の塩基配列に依らない遺伝子発現制御機構)の異常は、がんや神経精神疾患を引き起こす。異常なエピジェネティクス状態を正常状態に戻すことが出来れば、がんや神経精神疾患の根本治療が実現できると考えられる。本課題では、エピジェネティクス制御の分子技術の確立と創薬への応用を目指した。

エピジェネティクスを制御するヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)のアイソザイムである HDAC2、SIRT2 やヒストン脱メチル化酵素(KDM)アイソザイムである LSD1、KDM5C を標的とした小分子阻害剤の分子設計(鈴木グループ)、ドッキングスタディ(岡本グループ)、合成(鈴木、新井グループ)、酵素阻害活性評価(鈴木グループ)、細胞・動物レベルでの薬効評価(鈴木、内田、酒井グループ)を行った。以下に、HDAC2 阻害剤、SIRT2 阻害剤、LSD1 阻害剤、KDM5C 阻害剤の成果を示す。

•HDAC2 阻害剤

速度論的選択性という概念に基づき、HDAC2 選択的阻害薬を創製した。速度論的選択性とは、阻害薬の各標的に対する解離速度定数 (k_{off}) の差に注目した概念である。阻害薬の HDAC2 に対する k_{off} 値が小さく、HDAC1 に対する k_{off} 値が大きい場合、その阻害薬の効果として、より解離しにくい HDAC2 に伴う作用が持続的かつ選択的に表れる。フォーカスライブラリーのスクリーニングと構造最適化により、速度論的に高選択的な HDAC2 阻害薬 KTT1 を見出した。KTT1 は、従来の HDAC 阻害薬に見られた副作用を示すことなく、中枢神経疾患モデルに対して高い効果を示し、神経精神疾患治療薬としての可能性が示された。

•KDM5C 阻害剤

標的誘導型合成の一つである *in situ* click chemistry の改良型を用いて、KDM5C 選択的阻害薬の探索を行った結果、 $IC_{50} = 8.8$ nM の高い活性を有する KDM5C 阻害薬 NPC-3422 を見出した。NPC-3422 のプロドラッグ体 NPC-3455 は、内側前頭前野において、神経スピンの形成に関わる NPAS4 の遺伝子発現を上昇させ、うつ病モデルマウスに対して抗うつ作用を示したことから、KDM5C 選択的阻害薬の抗うつ薬としての可能性が示された。

•SIRT2 阻害剤

ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT2-阻害薬複合体の X 線結晶構造を基に、SIRT2 選択的阻害薬を設計した。その結果、SIRT2 の NAD^+ 依存的脱アセチル化触媒作用を受けることにより酵素内で生成した ADP-ribose 複合体が、「基質結合サイト」「 NAD^+ 結合サイト」「SIRT2 選択的結合ポケット」の3つのポケットを同時に占有することで、強力かつ選択的に SIRT2 を阻害することを明らかにした。本 SIRT2 選択的不活性化薬は、高い乳がん細胞増殖阻害活性、高い神経成長活性を示したことから、抗がん剤、神経精神疾患治療薬としての可能性が示された。

•LSD1 阻害剤

標的タンパク質自身に阻害剤を合成させる標的誘導型合成という創薬手法により見出したヒストン脱メチル化酵素 LSD1 に対する特異的阻害剤 IMG-7289 の、米国、豪州における急性骨髄性白血病治療薬、骨髄異形成症候群治療薬としての臨床試験(phase1/2)が開始された。さらに、LSD1 阻害剤の構造を基に、がん細胞にだけ抗がん剤を届ける抗がん剤デリバリー小分子を見出した。

以上の成果を基にした更なる展開により、エピジェネティクス制御の分子技術に基づいた新規抗がん剤候補化合物、抗神経精神疾患薬候補化合物の創製が期待できる。

(2) 顕著な成果

<優れた分子技術としての特筆すべき成果>

1. 抗がん剤デリバリー小分子の創製

概要: LSD1 阻害薬である PCPA の LSD1 阻害機構をもとに、PCPA-drug conjugate (PDC) を考案した(図1)。PDC は LSD1 を高発現するがん細胞においては LSD1 阻害に伴い、抗がん剤を放出し、抗がん作用を示す。一方で、LSD1 をほとんど発現しない正常細胞においては抗がん剤が放出されない。すなわち、抗がん剤由来の副作用の低減が期待される。実際、PDC として合成した PCPA と乳がん治療薬 tamoxifen の conjugate および PCPA と皮膚がん治療薬 vorinostat の conjugate は、正常細胞に影響せず、抗がん効果を示した(ACIE 2016)。

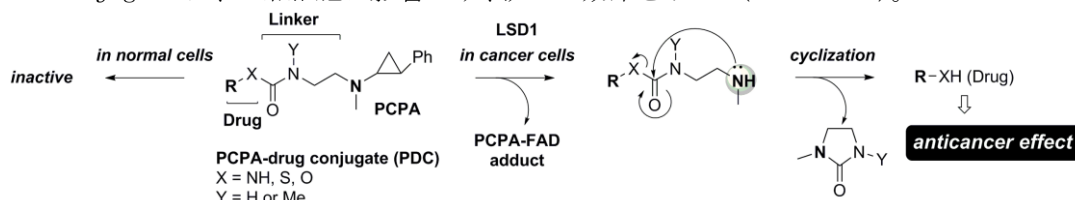


図1. PCPA-drug conjugate (PDC) の概略図

2. 抗うつ作用を示す KDM5C 阻害剤の創製

概要: 標的誘導型合成の一つである *in situ* click chemistry の改良型(図2)を用いて、世界初の KDM5C 選択的阻害薬の探索を行った結果、 $IC_{50} = 8.8$ nM の高い活性を有する KDM5C 阻害薬 NPC-3422 を見出した。NPC-3422 のプロドラッグ体 NPC-3455 は、内側前頭前野において、神経スパインの形成に関わる NPAS4 の遺伝子発現を上昇させ、うつ病モデルマウスに対して抗うつ作用を示したことから、KDM5C 選択的阻害薬の抗うつ薬としての可能性が示された(特願 2019-106166)。

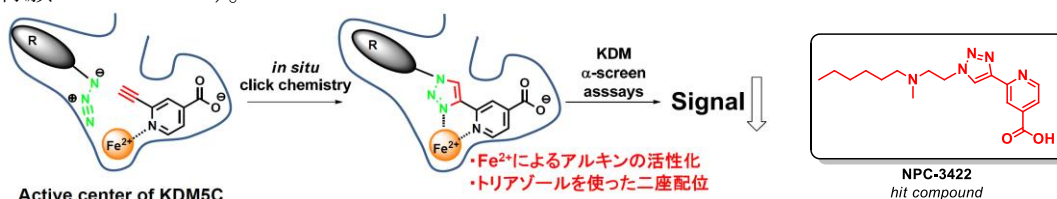


図2. 改良型 *in situ* click chemistry screening による KDM5C 阻害剤 NPC-3422 の同定

3. 抗がん活性、神経成長活性を示す SIRT2 阻害剤の創製

概要: ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT2-阻害薬複合体の X 線結晶構造を基に、SIRT2 選択的阻害薬を設計した。その結果、SIRT2 の NAD^+ 依存的脱アセチル化触媒作用を受けることにより酵素内で生成した ADP-ribose 複合体が、「基質結合サイト」「 NAD^+ 結合サイト」「SIRT2 選択的結合ポケット」の3つのポケットを同時に占有することで、強力かつ選択的に SIRT2 を阻害することを明らかにした。本 SIRT2 選択的不活性化薬は、高い乳がん細胞増殖阻害活性、高い神経成長活性を示したことから、抗がん剤、神経精神疾患治療薬としての可能性が示された(Chem. Sci. 2017)。

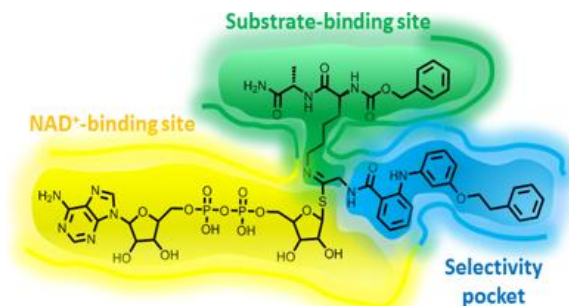


図 3. Structure-Based Drug Design/標的誘導型合成による SIRT2 阻害剤の同定

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 速度論的ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬の創製

概要: 抗がん剤の標的タンパク質である HDAC1/2 にゆっくり結合し、ゆっくり解離する阻害剤 KPZ532、KPZ540、KPZ560 の詳細な酵素結合メカニズムを調べ、KPZ532、KPZ540 が1段階の slow-binding メカニズム(A)で HDAC に結合し、KPZ560 が2段階の slow-binding メカニズム(B)で結合する阻害薬であることを見出した(図 4)。KPZ560 は KPZ532、KPZ540 に比べ、高いがん細胞増殖阻害効果を示し、細胞増殖や DNA ダメージに関わる遺伝子の発現を亢進するという KPZ532、KPZ540 とは異なる遺伝子発現パターンをした。slow-binding メカニズム(B)で結合する阻害薬が治療薬として有効である可能性とそのメカニズムの一端が示された。

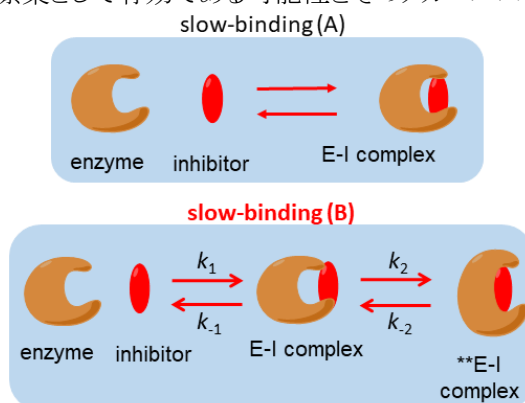


図 4. KPZ532, KPZ540 は slow-binding メカニズム(A)により、KPZ560 は slow-binding メカニズム(B)により HDAC1/2 を阻害する。

2. 速度論選択的 HDAC2 阻害薬の創製

概要: 速度論的選択性の概念に基づき、HDAC2 選択的阻害薬を創製した。速度論的選択性とは、阻害薬の各標的に対する解離速度定数 (k_{off}) の差に注目した概念である。阻害薬の HDAC2 に対する k_{off} 値が小さく、HDAC1 に対する k_{off} 値が大きい場合、その阻害薬の効果として、より解離しにくい HDAC2 に伴う作用が持続的かつ選択的に表れる(図 5)。フォーカスライブラリーのスクリーニングと構造最適化により、速度論的に高選択的な HDAC2 阻害薬 KTT1 を見出した。KTT1 は、高い神経成長活性、記憶力増強活性を示し、神経精神疾患治療薬としての可能性が示された(特願 2018-108464)。

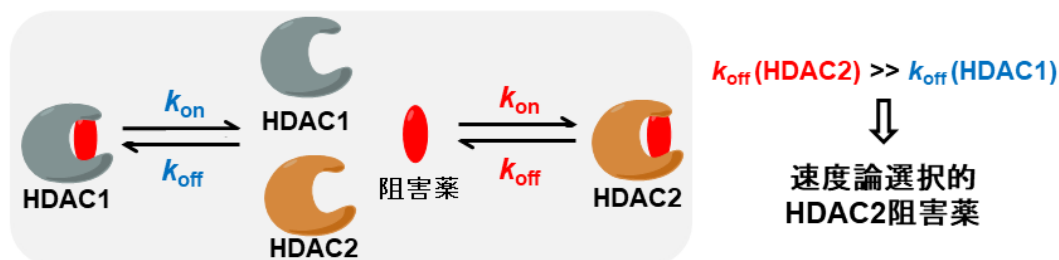


図 5. 速度論選択的 HDAC2 阻害薬

3. リガンド-タンパク質間結合における $\text{N}^+\text{-C-H}\cdots\text{O}$ 水素結合

概要: リガンド-タンパク質間結合における $\text{N}^+\text{-C-H}\cdots\text{O}$ 水素結合の重要性について、計算化学的解析、プロテインデータバンクの調査、実験的検証の 3 つの側面から検証した。その結果、リガンド-タンパク質間結合における $\text{N}^+\text{-C-H}\cdots\text{O}$ 水素結合は、タンパク質のリガンド認識において、重要な相互作用であることが示された (図 6) (Sci. Rep. 2019)。さらに、KDM5 の Tyr 残基との $\text{N}^+\text{-C-H}\cdots\text{O}$ 水素結合を期待して、脂肪族アミノ基を導入した阻害剤を設計した結果、高活性な KDM5 阻害剤を見出した。

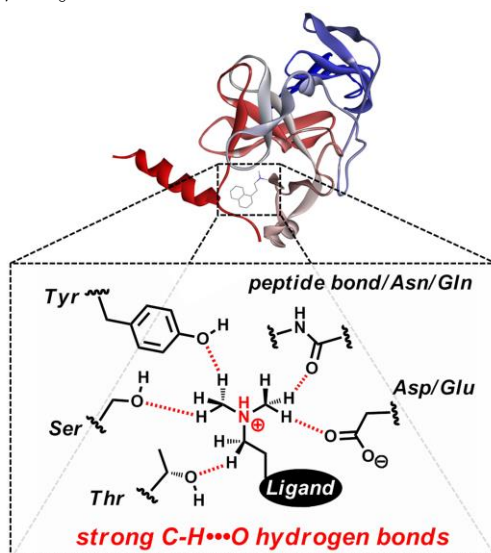


図 6. リガンド-タンパク質間結合における $\text{N}^+\text{-C-H}\cdots\text{O}$ 水素結合

< 代表的な論文 >

- “Targeting Cancer with PCPA-Drug Conjugates: LSD1 Inhibition-Triggered Release of 4-Hydroxytamoxifen” Yosuke Ota, Yukihiro Itoh, Asako Kaise, Kiminori Ohta, Yasuyuki Endo, Mitsuharu Masuda, Yoshihiro Sowa, Toshiyuki Sakai, Takayoshi Suzuki. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 16115-16118.
- “Potent Mechanism-Based Sirtuin-2-Selective Inhibition by an *In-Situ*-Generated Occupant of the Substrate-Binding Site, “Selectivity Pocket” and NAD^+ -Binding Site” Paolo Mellini, Yukihiro Itoh, Hiroki Tsumoto, Ying Li, Miki Suzuki, Natsuko Tokuda, Taeko Kakizawa, Yuri Miura, Jun Takeuchi, Maija Lahtela-Kakkonen, Takayoshi Suzuki. *Chem. Sci.* **2017**, *7*, 6400-6408.
- “ $\text{N}^+\text{-C-H}\cdots\text{O}$ Hydrogen bonds in protein-ligand complexes” Yukihiro Itoh, Yusuke Nakashima, Shuichiro Tsukamoto, Takashi Kurohara, Miki Suzuki, Yoshitake Sakae, Masayuki Oda, Yuko Okamoto, Takayoshi Suzuki. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 767.

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

① 「鈴木」グループ

- ・研究代表者:鈴木 孝禎 (大阪大学産業科学研究所 教授)
- ・研究項目
 - ・エピジェネティクス制御化合物の設計
 - ・エピジェネティクス制御化合物の合成
 - ・エピジェネティクス制御化合物の酵素阻害活性評価

② 「岡本」グループ

- ・主たる共同研究者:岡本 祐幸 (名古屋大学大学院理学研究科 教授)
- ・研究項目
 - ・エピジェネティクス制御化合物と標的酵素のドッキングシミュレーションスタディ

③ 「内田」グループ

- ・主たる共同研究者:内田 周作 (京都大学大学院医学研究科 講師)
- ・研究項目
 - ・エピジェネティクス制御化合物の抗神経精神疾患効果の評価
 - ・エピジェネティクス制御化合物の抗神経精神疾患効果の分子メカニズム解析

④ 「酒井」グループ

- ・主たる共同研究者:酒井 敏行 (京都府立医科大学大学院医学研究科 教授)
- ・研究項目
 - ・エピジェネティクス制御化合物の抗がん効果の評価
 - ・エピジェネティクス制御化合物の抗がん効果の分子メカニズム解析

⑤ 「新井」グループ

- ・主たる共同研究者:新井 義信 (日本理化学工業(株) 顧問)
- ・研究項目
 - ・ドッキングスタディを基にした分子設計と合成
 - ・動物実験用サンプルの大量合成

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

- ・抗認知症薬としての HDAC2 選択的阻害剤の創製研究について、某製薬企業と共同研究。
- ・抗炎症薬としての HDAC2 選択的阻害剤の創製研究について、慶應義塾大学・長谷耕二教授と共同研究。
- ・抗インフルエンザ薬としての KDM5C 選択的阻害剤の創製研究について、医薬基盤・健康・栄養研究所・今井由美子博士と共同研究。
- ・抗白血病薬、骨髄異型性症候群治療薬としての LSD1 阻害薬の創製について、滋賀医科大学・血液内科・河原真大講師と共同研究。
- ・抗前立腺がん薬、抗精巣がん薬としての LSD1 阻害薬の創製について、名古屋市立大学・泌尿器科・安井孝周教授と共同研究。
- ・がん幹細胞を標的とした、LSD1 阻害によるがん治療研究について、テキサス大学ヘルスサイエンスセンターサンアントニオ校・Ratna K Vadlamud 教授と共同研究。
- ・抗うつ薬としての SIRT2 選択的阻害剤の創製について、スペイン・ナバーラ大学・Rosa M. Tordera 教授と共同研究。
- ・筋委縮性側索硬化症 (ALS) 治療薬としてのエピジェネティクス制御化合物創製について、京都府立医科大学・神経内科・徳田隆彦教授、京都工芸繊維大学・山口政光教授と共同研究。