

研究報告書

「エピジェネティクス制御化合物の創製と応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 鈴木 孝禎

1. 研究のねらい

本研究では、エピジェネティクス制御化合物を創製し、その化合物を生物学研究のツールとして用いることで、生命機能、特に疾患に関与するエピジェネティクス機構を明らかにするとともに、それらの疾患の治療指針を提示することを目的とする。

本研究で行うような、低分子化合物を用いて標的タンパク質の機能を解明する手法は、「ケミカルジェネティクス」と呼ばれている。従来の遺伝学では、目的の遺伝子の機能を調べるのに遺伝子に変異を与える「ノックアウト」法が用いられてきた。最近では、RNA干渉の技術を用いた「ノックダウン」法も用いられている。これらの手法に対し、ケミカルジェネティクスは、標的タンパク質の特異的阻害剤を用いることにより、そのタンパク質の機能を理解しようとする新たな研究手法である。ノックアウト法やノックダウン法とは異なり、ケミカルジェネティクスでは、同じ機能の遺伝子が複数存在しても容易に表現型が観察できる、変異体が生存するために起こる代償(compensation)作用がない、タンパク質の中の特定のドメインの機能だけを標的にできる、操作が簡便である、などの利点がある。また、得られた化合物が直接創薬につながる可能性があるということが、ケミカルジェネティクスの最大の利点である。

本研究では、エピジェネティクス制御化合物を創製し、その化合物を生物学研究のツールとして用いることで、生命機能、特に疾患に関与するエピジェネティクス機構を明らかにするとともに、それらの疾患の治療指針を提示することを目的とする。具体的には、エピジェネティクス機構において重要な役割を担うヒストンリシン残基のアセチル化あるいはメチル化に関与する酵素を標的とし、それらの酵素の特異的阻害剤を創製する。つぎに、得られた低分子阻害剤を疾患の関与する細胞に投与し表現系を観察することで、エピジェネティクスと疾患の関係を調べる。さらに、それら低分子阻害剤の作用機構を解析することで、より詳細な疾患のメカニズムを理解し、エピジェネティクスが関与する疾患の治療指針を導き出す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、生物学を化学の切り口からアプローチする「ケミカルジェネティクス」によりエピジェネティクスの関与する疾患のメカニズムを解明すること、それらの疾患の治療指針を導き出すことを目的とした。ケミカルジェネティクスとは、古典遺伝学における変異の代わりに標的タンパク質の特異的阻害剤を用いることにより、そのタンパク質の機能を理解しようとする研究手法である。具体的には、エピジェネティクス制御化合物として、ヒストンのアセチル化修飾に関与するアイソザイム特異的なヒストン脱アセチル化酵素阻害剤(HDAC3 選択的阻害剤、HDAC8 選択的阻害剤)、ヒストンのメチル化修飾に関与するヒストン脱メチル化酵素阻害剤(JMJD2 選択的阻害剤、PHF8 阻害剤、LSD1 阻害剤)を化合物ライブラリーからの探索、合理

的な分子設計などにより創製した。そして、得られた低分子化合物を疾患の関与する細胞あるいは動物モデルに投与し、表現系を観察することで、エピジェネティクスとがんや HIV 感染などの疾患との関係を明らかにした。本研究により、新たな疾患の治療法を提示することができた。

(2) 詳細

研究テーマ A「アイソザイム選択的ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤の創製と応用」

HDAC は、ヒストンのアセチル化されたリシン残基を脱アセチル化する反応を触媒し、エピジェネティックに多くの遺伝子発現を制御している。HDAC には 18 種類のアイソザイムが知られているが、それぞれの詳細な機能は明らかになっていない部分が多い。本研究では、有用な阻害剤が報告されていない HDAC3 と HDAC8 にターゲットを絞り、その選択的阻害薬の探索および応用研究を行った。

一般に HDAC 阻害薬は、酵素活性中心の亜鉛イオンに配位する Zinc-Binding Group (ZBG) と HDAC の酵素表面のアミノ酸残基と相互作用する Cap 部位、ZBG と Cap 部位をつなぐ Linker 部位から構成される。本研究では、Cap 部位と ZBG をクリックケミストリーと呼ばれる手法により連結するために、トリアゾール Linker を有する HDAC 阻害薬を設計した。ZBG を有するアルキン体 9 個と Cap 部位をもつアジド体 56 個をクックケミストリーにより連結させる事で、短時間に 504 個の HDAC 阻害薬用ライブラリーを構築した。HDAC 蛍光アッセイを用いて、そのライブラリーのスクリーニングを行った結果、それぞれ HDAC3、HDAC8 を選択的に阻害する化合物 T247、C149 を見出した(図 1)(論文 1, 5、特許 2, 5)。

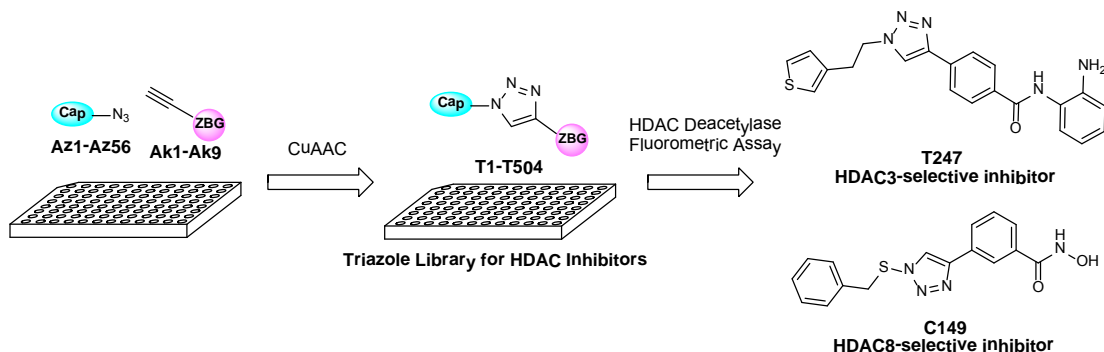


図 1. HDAC 阻害薬用ライブラリーの構築と HDAC3 選択的阻害薬 T247、HDAC8 選択的阻害薬 C149 の同定

さらに、これらのアイソザイム選択的 HDAC 阻害薬を用いたケミカルジェネティクス研究により、HDAC3 が大腸がん細胞、前立腺がん細胞の増殖に関与すること、HDAC3 が HIV-1 の転写活性化に関与すること、HDAC8 が T 細胞性リンパ腫の増殖に関与することを示すとともに、それらアイソザイム選択的 HDAC 阻害薬の治療薬としての可能性を示した。

研究テーマ B「Jumonji C-domain を含むヒストン脱メチル化酵素(JHDM)阻害剤の創製と応用」

JHDM は、メチル化されたヒストンリシン残基の脱メチル化反応を触媒することにより、

エピジェネティックな遺伝子発現を制御する酵素である JHDM の一種である KDM4 (JMJD2) や KDM7B (PHF8) の発現は、がん細胞の増殖に關与する可能性も示唆されている。従って、JHDM 阻害薬は、その酵素の働きを調べるためのバイオプローブとしてだけでなく、新たな作用機序の抗がん剤としても期待できる。しかしこれまでに、高活性かつ高選択的な JHDM 阻害薬は報告されていない。そこで、KDM4 (JMJD2) および KDM7B (PHF8) 選択的阻害薬の創製研究を行うこととした。

JMJD2A および PHF8 の X 線結晶構造を基に、活性中心に存在する鉄イオン、アミノ酸残基との相互作用を考慮し、JMJD2 および PHF8 選択的阻害薬の設計、合成、活性評価を行った。その結果、高活性、高選択的な JMJD2 選択的阻害薬 **NCDM-32** および PHF8 選択的阻害薬 **NCDM-64** を見出した (図 2) (論文 4、特許 1, 6)。さらに、これらの阻害薬を用いたケミカルジェネティクス研究から、PHF8 ががん細胞の増殖に關与することが示唆された。

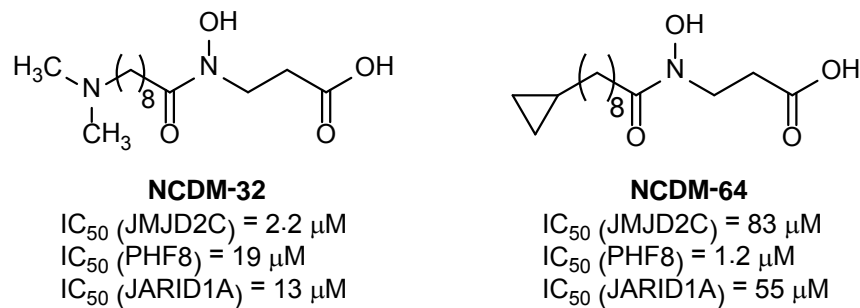


図 2. JMJD2 選択的阻害薬 **NCDM-32** および PHF8 選択的阻害薬 **NCDM-64** の構造と活性

研究テーマ C「フラビン依存性ヒストン脱メチル化酵素 Lysine-Specific Demethylase 1 (LSD1) 阻害剤の創製と応用」

LSD1 は、ヒストン H3 の 4 番目のリシン残基のモノまたはジメチル体 (H3K4me1/2) をフラビン依存的に脱メチル化する酵素で、遺伝子発現をエピジェネティックに制御している。しかしこれまでに、高活性かつ高選択的な LSD1 阻害薬は報告されていない。そこで、本研究では、LSD1 選択的阻害薬の創製研究を行うこととした。

LSD1 中の FAD と monoamineoxidase (MAO) 阻害剤である tranylcypromine の複合体の X 線結晶構造および LSD1 の触媒メカニズムを基に新規 LSD1 選択的阻害薬を設計、合成し、酵素阻害活性評価を行った。その結果、高い LSD1 阻害活性、選択性を有する **NCL-1** (Ueda, R.; Suzuki, T. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 17536–17537.) および **NCD-38** を見出した (図 3) (論文 3、特許 7)。さらに、**NCL-1** および **NCD-38** を用いたケミカルジェネティクス研究により、LSD1 選択的阻害薬が抗がん効果を示すこと (論文 2)、HIV 潜伏感染細胞において HIV の転写を活性化すること (特許 3)、iPS 細胞の樹立効率を上げること (特許 4) などが明らかとなった。また、これらの結果から、LSD1 選択的阻害薬の治療薬としての可能性が示された。

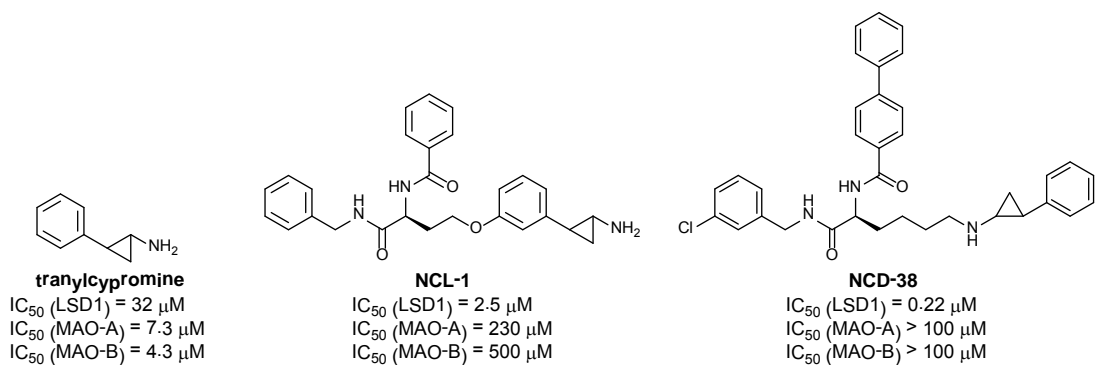


図 3. LSD1 阻害薬 tranylcypromine、NCL-1、NCD-38 の構造と活性

(3) 創製したエピジェネティクス制御化合物の製品化
 次の化合物が試薬として商品化され、発売されている。

エピジェネティクス制御化合物の種類	製品名	関連特許	発売会社
リジン特異的脱メチル化酵素 1 (LSD1) 選択的阻害薬	NCL-1	PCT Int. Appl. (2010), WO2010143582. 特開 2012-036124. PCT Int.Appl. (2012), WO 2012128343.	東京化成工業、 和光純薬
α -ケトグルタル酸依存性ヒストン脱メチル化酵素 (JHDM) 阻害剤	NCDM-32b	特開 2011-168581	東京化成工業、 和光純薬
ヒストン脱アセチル化酵素 8 (HDAC8) 選択的阻害剤	NCC-149	PCT Int. Appl. (2011), WO 2011089995	東京化成工業、 和光純薬



エピジェネティクス研究用試薬

DNA メチル化阻害剤

A2033	5-Azacytidine (>95.0%)	100mg 5,000円 / 1g 25,900円
New A2232	5-Aza-2'-deoxycytidine	20mg 9,800円 / 100mg 34,300円
G0272	Genistein (>96.0%)	100mg 7,300円 / 1g 26,500円
A1163	Procaine Hydrochloride (>98.0%)	25g 2,300円
E0694	(-)-Epigallocatechin Gallate Hydrate (>98.0%)	100mg 12,300円

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤

New H1340	NCC-149 ¹⁾ (>95.0%)	5mg 19,900円
New H1388	Vorinostat (=SAHA) (>98.0%)	200mg 13,900円
New A2501	Acetyldinaline (>98.0%)	10mg 9,800円 / 50mg 34,300円
New D4188	M 344	20mg 16,600円 / 100mg 58,000円
T2477	Trichostatin A (>98.0%)	10mg 36,700円
B3803	Butein (>98.0%)	100mg 7,100円 / 1g 35,400円
P0042	Quercetin Hydrate (>95.0%)	25g 4,900円
P1928	Piceatannol (>98.0%)	100mg 11,500円 / 1g 68,800円
R0071	Resveratrol (>98.0%)	1g 8,700円 / 5g 28,900円
S0519	Sodium Butyrate (>98.0%)	25g 3,100円 / 100g 6,400円
P0823	Valproic Acid (>99.0%)	25mL 5,300円 / 500mL 44,300円

ヒストン脱メチル化酵素阻害剤

New A2411	NCL-1-HCl ²⁾ (>97.0%)	5mg 27,700円
New D4078	NCDM-32b ³⁾ (>97.0%)	5mg 15,000円
P0553	2,4-Pyridinedicarboxylic Acid Hydrate (>98.0%)	5g 7,500円 / 25g 22,300円
New D4015	Daminozide (>98.0%)	5g 4,800円 / 25g 16,800円

¹⁾²⁾³⁾名古屋市立大学 富田直樹先生、京都府立医科大学 鈴木孝禎先生らのご指導のもと製品化いたしました。
(各製品の詳細につきましては裏面をご覧ください。)

これらの製品はすべて“試薬”です。試験・研究用にご使用ください。

上記以外の化合物についてもお問合せください。受託合成での対応も可能です。



エピジェネティクス研究に

ヒストン修飾酵素

阻害剤 活性化剤

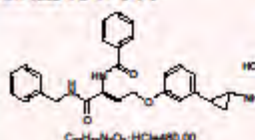
エピジェネティクスとはDNAの塩基配列によらない遺伝子発現調節制御のことで、ヒストンの化学修飾(アセチル化、メチル化、リン酸化など)やDNA塩基のメチル化による調節機構が知られています。個体発生や細胞分化に大きく貢献すると同時に、エピジェネティクスの異常がさまざまな疾病に関与していることが報告されています。

当社ではヒストン脱メチル化酵素(LSD1:Lysine-specific Histone Demethylase 1, JHDM:Jumonji C domain-containing Histone Demethylase)、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC:Histone Deacetylase)に作用する試薬及び修飾ヒストンに対するモノクローナル抗体を取り揃えています。

◇ ヒストン脱メチル化酵素LSD1 阻害剤

① NCL-1 *New!*

本品はヒストン脱メチル化酵素LSD1の阻害剤です。LSD1は遺伝子発現の調節のほか、前立腺がん細胞の増殖に関与します。本阻害剤はLSD1と相関性が高いMonoamine Oxidase(MAO)への選択性が低いことが確認できています。



■ IC₅₀: 2.5 μmol/L(LSD1)
[230 μmol/L(MAO-A),
500 μmol/L(MAO-B)]
■ CAS No. 1196052-98-8

[参考文献] Ueda, R. et al.: J. Am. Chem. Soc., 131, 17536(2009)

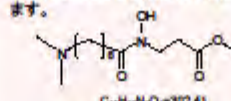
◆ヒストンのメチル化



⇒ 遺伝子発現 OFF

② NCDM-32b *New!*

本品はヒストン脱メチル化酵素JHDMの一種であるJMJD2Cの阻害剤です。JMJD2Cは食道がんや前立腺がんに関与することが示唆されています。



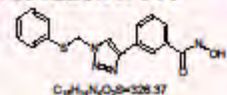
■ IC₅₀(NCDM-32bのヒストンH3-メチル化阻害剤として):
0.5 μmol/L(JMJD2C)
[>185 μmol/L(LSD1)]

[参考文献] Hamada, S. et al.: J. Med. Chem., 53, 5629(2010)

◇ ヒストン脱アセチル化酵素 阻害試薬

① NCC-149 *New!*

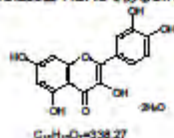
本品はHDACの一つ、HDAC8の選択的な阻害剤です。HDAC8はT細胞性腫瘍や神経芽細胞腫に関与することが報告され、抗がん剤開発ターゲットとして注目されています。



■ IC₅₀: 0.07 μmol/L(HDAC8)
[38 μmol/L(HDAC1),
>100 μmol/L(HDAC2),
44 μmol/L(HDAC5),
2.4 μmol/L(HDAC6)]
[国際公報番号: WO 2011/06695 A1]

② Quercetin Dihydrate

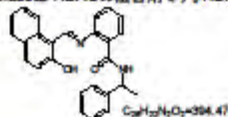
本品はClass III HDACであるSIRT1の阻害剤です。



■ CAS No. 6151-25-3

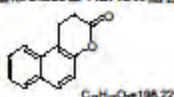
③ Sirtinol

本品はClass III HDACの阻害剤です。HDAC1には作用しません。



④ Splitomicin

本品はClass III HDACの阻害剤です。



■ CAS No. 5695-03-0

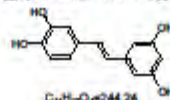
◆ヒストンのアセチル化



⇒ 遺伝子発現 ON

① Piceatannol

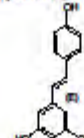
本品はClass III HDACであるSIRT1の活性化剤です。



■ CAS No. 10083-24-8

② Resveratrol

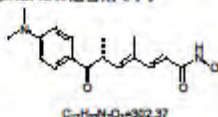
本品はClass III HDACであるSIRT1の活性化剤です。



■ CAS No. 501-36-0

③ Trichostatin A

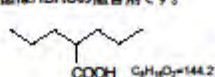
本品はHDACの阻害剤です。



■ CAS No. 56950-19-8

④ Valproic Acid

本品はHDACの阻害剤です。



■ CAS No. 99-86-1



3. 今後の展開

本研究では、エピジェネティクスに關与する酵素の新しい阻害剤を開発し、それらをケミカルツールとして用いることで、エピジェネティクスに關与する酵素のバイオロジーを明らかにし、病態との關連を示した。エピジェネティクスに關連するタンパク質は他にも数多く存在しているが、阻害剤が存在しないタンパク質も多い。今後、ケミストがそれらのタンパク質に対するケミカルツールを開発し、バイオロジカルな手法と組み合わせた研究が進展することで、多くのエピジェネティクスに關与する生命現象が解明されると考えられる。また、それらの研究で用いられた化合物は、今後の創薬のヒントとなる化合物であり、将来の治療薬開発に大きく貢献することも期待される。

4. 自己評価

本研究では、化合物ライブラリーからの探索、標的酵素の X 線結晶構造を基にしたドラッグデザイン、酵素の触媒機構を基にしたドラッグデザインにより、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) のアイソザイムである HDAC3、HDAC8 に対する選択的阻害薬、ヒストン脱アセチル化酵素 (KDM) のアイソザイムである JMJD2、PHF8、LSD1 に対する選択的阻害薬を首尾よく見出すことが出来た。さらに、それらの低分子阻害薬を用いたケミカルジェネティクス研究により、HDAC3 が前立腺がん、大腸がんの増殖、HIV の潜伏感染に關与すること、HDAC8 が T 細胞リンパ腫、神経芽細胞腫の増殖に關与すること、PHF8 が固形がん細胞の増殖に關与すること、LSD1 が血液系がん、固形がんの増殖、HIV の潜伏感染に關与することを示すことが出来た。これらの結果から、本研究のねらいである、がんや HIV 感染などの疾患に対して新たな治療指針を提示することが出来たと考えている。本研究で見出した「化合物」をいかにして「医薬品」へと成長させるかが、今後の課題である。

5. 研究総括の見解

一貫してエピジェネティック創薬ターゲットの阻害薬探索に取り組んで、新たな化合物の創出を行った。対象となる各酵素について、構造やケミストリーを考慮して特異性の高い阻害剤を同定していることは高く評価できる。特に、HDAC8 と LSD1 に関しては、細胞実験に使用できる活性と選択性を持つ化合物の創出に成功し、ターゲットの生物学的機能の役割解明に貢献してきている。3 年間という短い研究期間の間に研究課題を目標通りに達成し、創製したエピジェネティクス制御化合物の製品化、ならびに多数の特許出願まで至った実績は称賛に値する。

今後、より広い基礎生物学者とのネットワークを作ってターゲットのバイオロジーを明らかにし、研究の標準となるツール化合物や治療に使えるような化合物を創出していただきたい。また、一方では創出された化合物を医薬品として成長させるべくその努力もお願いしたい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. [Suzuki T](#), Ota Y, Ri M, Bando M, Gotoh A, Itoh Y, Tsumoto H, Tatum PR, Mizukami

T, Nakagawa H, Iida S, Ueda R, Shirahige K, Miyata N. Rapid discovery of highly potent and selective inhibitors of histone deacetylase 8 using click chemistry to generate candidate libraries. *J. Med. Chem.* 2012, 55, 9562–9575.

2. Cortez V, Mann M, Tekmal S, Suzuki T, Miyata N, Rodriguez-Aguayo C, Lopez-Berestein G, Sood AK, Vadlamudi RK. Targeting PELP1-KDM1 axis as a potential therapeutic strategy for breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2012, 14, R108.

3. Ogasawara D, Suzuki T, Mino K, Ueda R, Khan MNA, Matsubara T, Koseki K, Hasegawa M, Sasaki R, Nakagawa H, Mizukami T, Miyata N. Synthesis and biological activity of optically active NCL-1, a lysine-specific demethylase 1 selective inhibitor. *Bioorg. Med. Chem.* 2011, 19, 3702–3708.

4. Hamada S, Suzuki T, Mino K, Koseki K, Oehme F, Flamme I, Ozasa H, Itoh Y, Ogasawara D, Komaarashi H, Kato A, Tsumoto H, Nakagawa H, Hasegawa M, Sasaki R, Mizukami T, Miyata N. 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.* 2010, 53, 5629–5638.

5. Suzuki T, Ota Y, Kasuya Y, Mutsuga M, Kawamura Y, Tsumoto H, Nakagawa H, Finn MG, Miyata N. An unexpected example of protein-templated click chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010, 49, 6817–6820.

(2)特許出願

研究期間累積件数:7件 (内 国際出願2件)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

・主要な学会発表

1. 「触媒メカニズムに基づいた酵素阻害薬の創製研究」創薬懇話会 2009;2009年12月11日(岐阜)(招待講演)
2. 「標的誘導型合成による酵素阻害薬の創製研究」第29回メディシナルケミストリーシンポジウム;2010年11月17日(京都)(招待講演)
3. 「エピジェネティクス機構を分子標的とする治療薬の進展」第25回インターフェックスジャパン / 第6回 ファーマ ジャパン～医薬品原料 国際展～;2012年6月28日(東京)(特別講演)

・受賞

1. 平成23年度科学技術分野の文部科学大臣表彰若手科学者賞
2. 平成24年度長瀬研究振興賞