

## 論文の内容の要旨

論文題目            合理的設計による新規ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の創製

氏名                鈴木孝禎

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は、ヒストン N 末端領域のアセチル化されたりシン残基からアセチル基を除去する反応を触媒することにより遺伝子発現を調節する重要な役割を担っている。また、HDAC 阻害薬は、*in vivo* で癌の増殖を抑えることから、新たな作用機序の抗癌剤として期待されている。

既存の HDAC 阻害薬のほとんどは、スベロイルアニリドヒドロキサム酸 (SAHA) のようなヒドロキサム酸系化合物である。しかしながら、一般にヒドロキサム酸を有する化合物は体内動態が悪く、毒性の懸念も多い。それ故に、より体内動態の改善した抗癌剤、より副作用の少ない抗癌剤になり得る新たな HDAC 阻害薬の開発が望まれている。これまでに、製薬会社の化合物ライブラリーを基にした探索により、いくつかの非ヒドロキサム酸系 HDAC 阻害薬が見出されたが、それらの HDAC 阻害活性は、ヒドロキサム酸系化合物に遠く及ばない。新たな方法により、非ヒドロキサム酸系 HDAC 阻害薬を見出す必要がある。

一方で、HDACの構造研究に関しては、大きな進展が見られている。1999 年、FinninらによりヒトHDACホモログであるHDAC-like protein (HDLP)とTSA、SAHAの複合体の結晶構造が、2004 年にはヒトHDACのアイソザイムの一つであるHDAC8 とヒドロキサム酸系阻害薬の複合体の結晶構造が発表された。酵素活性中心には、 $Zn^{2+}$ が存在し、ヒドロキサム酸部分のカルボニル基とヒドロキシ基の酸素が $Zn^{2+}$ に配位しており、さらにカルボニル基の酸素はTyr297 (HDLPの番号)と、窒素原子に付いた水素はHis132 と、ヒドロキシ基の水素はHis131 と水素結合を形成していることが明らかとなった。また、この結晶構造からHDACによるヒストン脱アセチル化のメカニズムも推定されている。

HDACの構造や触媒メカニズムは明らかになりつつあるものの、HDAC阻害薬の開発研究は、天然物や製薬会社のケミカルライブラリー由来の化合物を基に見出されたリード化合物からの展開がほとんどであり、偶然に頼る部分が多いのが現状である。そこで、私は、より効率的なアプローチとして、HDACの構造的特徴や触媒メカニズムを考慮した合理的なドラッグデザインによるHDAC阻害薬の創製を目的とし、本研究に着手した。

## 1. HDAC阻害薬における新規zinc-binding group (ZBG)の探索

私は、SAHAをリード化合物とし、大きく分けて2つの方法により図1に示すようなヒドロキサム酸を持たないHDAC阻害薬を設計した。ひとつは、酵素の静的状態である結晶構造を基にした設計、もうひとつは、酵素の動的状態である触媒反応を考慮した設計である。

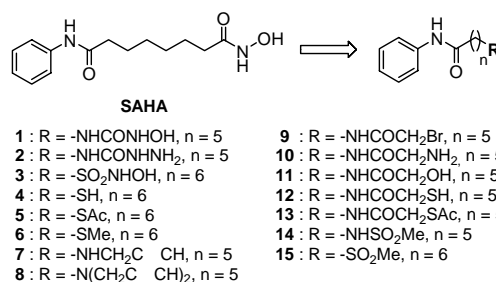


図1

[酵素の結晶構造を基にした設計(1) 二座配位型ZBGを持つ化合物の設計] HDACホモログであるHDLPあるいはHDAC8とSAHAの複合体のX線結晶構造解析の結果から、ヒドロキサム酸はHDACの活性中心にあるZn<sup>2+</sup>に二座配位し、さらにTyr及び2つのHisと水素結合することが分かっている(図2)。このデータを基に、Zn<sup>2+</sup>、Tyr、Hisと同様の相互作用をすると考えられるヒドロキシウレア1、セミカルバジド2、ヒドロキシスルホンアミド3を設計した。

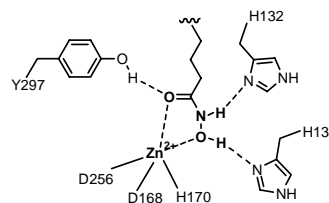


図2

[酵素の結晶構造を基にした設計(2) 一座配位型ZBGを持つ化合物の設計] 一座配位型ZBGを考案するにあたり、Zn<sup>2+</sup>が高い硫黄親和性を持つことに着目した。特に他の亜鉛含有酵素であるアンジオテンシン変換酵素やマトリックスメタロプロテイナーゼの阻害薬でZBGとしてよく用いられる官能基であるチオールは、Zn<sup>2+</sup>とだけではなく、活性中心のアミノ酸残基との相互作用も期待できる。そこで、SAHAのヒドロキサム酸をチオールに変換した化合物4及びチオエステル5、スルフィド6を設計した。

[酵素の結晶構造を基にした設計(3) 不可逆的阻害を意図した化合物の設計] HDLPあるいはHDAC8の3次元構造から、酵素の活性中心はヒスチジンなどの求核性の高いアミノ酸から構成されていることが分かっている。我々は、それらのアミノ酸残基と共有結合を形成し、不可逆的に酵素を阻害し得る化合物として化合物7、8、9を設計した。

[酵素の触媒反応を考慮した設計(1) 基質アナログの設計] 酵素活性ポケットに取り込まれた基質のアセチル化されたリシンは、Zn<sup>2+</sup>に配位した水分子から求核攻撃を受け、脱アセチル化されると考えられている(図3a)。そこで、アセトアミドのカルボニルのα位に不対電子をもつヘテロ原子を導入すれば、その原子がZn<sup>2+</sup>に配位し、脱アセチル化に必要な水分子も加水分解の反応点から追い出し、自身は

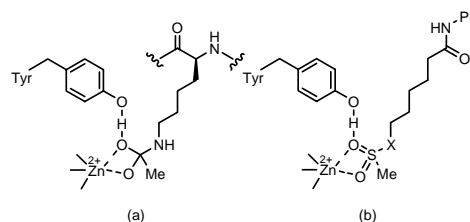


図3

加水分解されることなく、HDAC を阻害することができると考え (図 3b)、ヘテロ原子の置換したアセトアミド 10~13 を基質アナログとして設計した。

[酵素の触媒反応を考慮した設計 (2) 遷移状態アナログの設計] HDACの基質であるアセチル化されたリシンがHDACにより脱アセチル化される際の遷移状態構造は、アミドカルボニルがZn<sup>2+</sup>に配位した水分子から求核攻撃を受け、テトラヘドラルな炭素を含む構造になると考えられている (図 4a)。このテトラヘドラルな炭素を硫黄に置き換えた構造、すなわちスルホン誘導体が遷移状態構造に類似していることから酵素と強く複合体形成する可能性に着目し (図

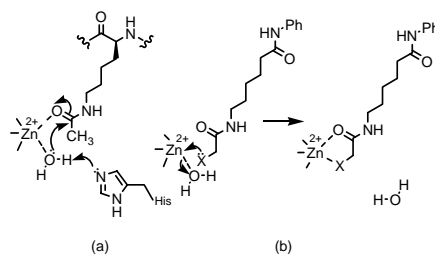


図 4

4b)、スルホンアミド 14、スルホン 15 を遷移状態アナログとして設計した。

化合物 1~15 を合成しHDAC阻害活性評価を行ったところ、Zn<sup>2+</sup>の硫黄親和性の高さを考慮し一配位型ZBGを持つ化合物として分子設計したチオール 4、ヘテロ原子含有基質アナログとして分子設計したメルカプトアセトアミド 12 が、既知の非ヒドロキサム酸系HDAC阻害薬を大きく上回り、リード化合物であるSAHAに匹敵する酵素阻害活性を示した (SAHAのIC<sub>50</sub> = 0.28 μM、4のIC<sub>50</sub> = 0.21 μM、12のIC<sub>50</sub> = 0.39 μM)。本研究で見出されたチオール及びメルカプトアセトアミドは、低分子HDAC阻害薬において、ヒドロキサム酸と同等の活性を示した初めてのZBGである。

Lineweaver-Burk のプロットを行い、チオール 4、メルカプトアセトアミド 12 の酵素阻害機構を調べたところ、化合物 4 および 12 の HDAC 阻害機構は、基質に対して可逆的競合阻害であることが明らかとなった。Macromodel 8.1 を用いた結合様式解析により、化合物 4 では、硫黄原子が亜鉛イオンに強く配位し、His に水素結合している水分子および Tyr と相互作用することにより HDAC を阻害すると推定された。また、化合物 12 についても同様に Macromodel 8.1 を用いて結合様式を推定したところ、化合物 12 のメルカプトアセトアミドが亜鉛に強力に配位することにより、脱アセチル化に必要な水分子を加水分解の反応点から引き離し、自身が加水分解されることなく、HDAC を阻害すると考えられた。

つぎに、より活性の高いチオールを ZBG に固定し、linker 部位および cap 部位 (芳香環部位) の構造活性相関を調べ、構造最適化を試みた結果、SAHA よりも強い HDAC 阻害活性を有する化合物 16~19 を見出した (図 5)。

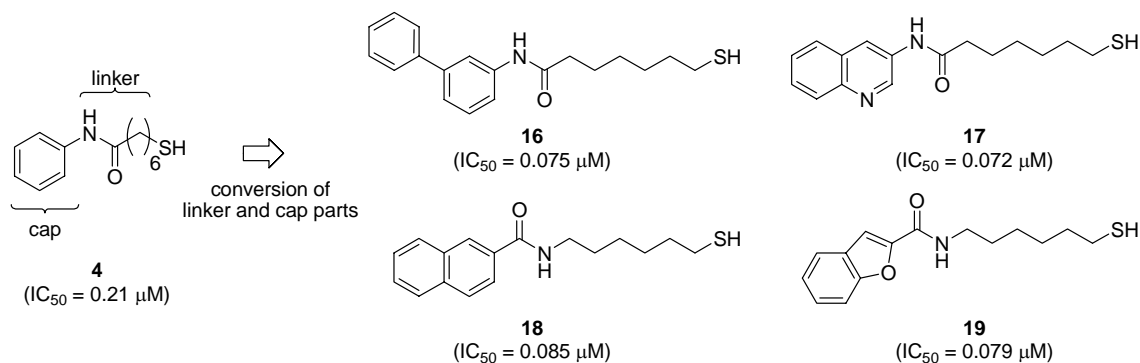


図 5

## 2. チオール系HDAC阻害薬の癌細胞増殖抑制評価

ヒドロキサム酸系HDAC阻害薬の生物活性として、抗癌作用がよく知られている。そこで、高いHDAC阻害活性を持つチオール **4** の癌細胞増殖抑制試験を行った。しかし、チオール **4** は、肺癌細胞であるNCI-H460細胞に対し、弱い増殖抑制活性 (34% inhibition at 50  $\mu$ M) しか示さなかった。この活性の弱さは、チオール **4** の低い細胞内移行性が原因であると考え、チオール **4** のプロドラッグ化の検討を行った。その結果、チオール **4** をS-イソブチリル化した化合物 **20** が、 $EC_{50} = 20 \mu$ Mで癌細胞増殖抑制活性を示した。このS-イソブチリル化体自身はHDAC阻害活性が弱いことから ( $IC_{50} = 56 \mu$ M) S-イソブチリル化体 **20** は、チオール **4** に比べ効率的に細胞膜を透過し、細胞内で高いHDAC阻害活性を持つチオール **1** に変換されたものと考えられる。さらに、化合物 **20** のベンゼン環を他の芳香環に変換したところ、3-ビフェニル **21**、3-ピリジン **22**、4-フェニル-2-チアゾール **23** に強い癌細胞増殖抑制作用が見られた ( $EC_{50} = 2\sim 3 \mu$ M、図6)。特に化合物 **23** は、9種類の癌細胞を用いたマルチパネル評価で、現在、抗癌剤として臨床開発が行われているSAHAに匹敵する活性を示した (SAHAの平均 $EC_{50} = 3.7 \mu$ M、**23**の平均 $EC_{50} = 3.8 \mu$ M)。

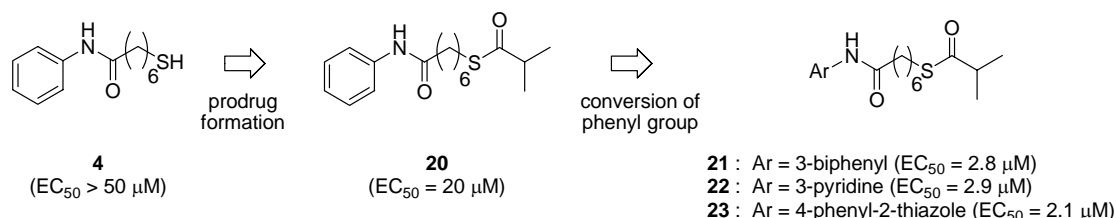


図 6

HDAC 阻害薬により HDAC の機能を停止させると相対的にヒストンアセチル化酵素の働きが強くなり、ヒストンは過剰にアセチル化された状態となる。このヒストンの高アセチル化により、*p21* 遺伝子の転写活性化が起こることが知られている。そこで、化合物 **23** が実際に、癌細胞内の HDAC を阻害していることを確かめるため、ウエスタンブロット解析によりヒストンの高アセチル化及び *p21* の誘導を調べた。その結果、化合物 **23** は、用量依存的にヒストンを高アセチル化し、*p21* を誘導していることが分かった。この結果から、化合物 **23** の癌細胞増殖阻害作用と細胞内の HDAC 阻害には良い相関があることが示された。

以上、私は、SAHAをリード化合物として、非ヒドロキサム酸系HDAC阻害薬の合理的設計、合成、酵素阻害活性評価を行った結果、SAHAと同等の活性を示すチオール **4** 及びメルカプトアセトアミド **12** を見出した。また、チオール系HDAC阻害薬のプロドラッグ化により、強い癌細胞増殖作用を持つ化合物を見出した。特に化合物 **23** は、SAHAに匹敵する強い癌細胞増殖抑制作用を示した。また、ウエスタンブロット解析の結果から、化合物 **23** から生成したチオール体が細胞内のHDACを阻害することにより癌細胞の増殖を抑制することが示唆された。本研究により見出されたチオール **4** は、HDACの活性中心に在るZn<sup>2+</sup>の硫黄親和性の高さを利用して合理的に分子設計することにより見出された化合物であり、今後のHDAC阻害薬開発のための新規リード化合物として有用であると考えられる。