

# Click chemistry による HDAC 阻害薬ライブラリーの構築と アイソザイム選択的阻害薬の同定

京府医大院医<sup>1</sup>、名市大院薬<sup>2</sup>、JST さきがけ<sup>3</sup>

○伊藤幸裕<sup>1</sup>、太田庸介<sup>2</sup>、粕谷侑輝<sup>2</sup>、中川秀彦<sup>2</sup>、宮田直樹<sup>2</sup>、鈴木孝禎<sup>1,3</sup>

## 【背景】

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は、ヒストンなどのアセチル化リシン残基の脱アセチル化反応を触媒し、遺伝子発現を制御している。HDAC には 11 種のアイソザイム (HDAC1-11) が存在するが、それぞれが異なる生命現象や疾患に関わる。そのため、アイソザイム選択的阻害薬は、個々のアイソザイムの機能解明を行うケミカルツールとして有用で、かつ、副作用の少ない治療薬としての可能性を秘めている。実際に、我々は HDAC6 選択的阻害薬の創製に成功しており、HDAC6 選択的阻害薬は抗うつ作用があることなどを見出してきた<sup>1</sup>。しかし、アイソザイム選択的阻害薬の創製は困難を伴う課題であり、数多くの HDAC 阻害薬が創製されながらも、高活性かつ高選択的な阻害薬は未だ数少ない。したがって、上述のようにアイソザイム選択的阻害薬がバイオプローブや治療薬として利用された例はほとんどない<sup>2</sup>。そこで我々は、効率的にアイソザイム選択的阻害薬を創出するために、click chemistry を用いて HDAC 阻害薬用ライブラリーを構築し、アイソザイム選択的阻害薬の同定を試みた。なお、本発表では医薬化学的に興味深い HDAC8 および HDAC3 を標的とした研究について報告する。

## 【方法】

HDAC 阻害薬は、酵素活性中心に存在する亜鉛イオンに配位することで HDAC を阻害すると考えられている。一般に HDAC 阻害薬は、活性中心の亜鉛イオンに配位する Zinc-Binding Group (ZBG) と酵素表面のアミノ酸残基と相互作用する cap 部位、それらをつなぐリンカー部位から構成される (Fig.1)。そこで、ZBG を有する種々のアルキンと cap 部位を持ち合わせた種々のアジドを合成し、96 well plate 上で銅触媒アジド-アルキン環化付加反応による click chemistry にて短時間で効率的に連結し (トリアゾールライブラリーの構築)、続いて、化合物の単離・精製なしに酵素阻害評価を行うという方法にて、アイソザイム選択的阻害薬の同定を目指した (Fig.2)。

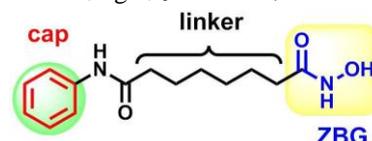


Figure 1. HDAC 阻害薬の基本構造



Figure 2. HDAC 阻害薬ライブラリーの設計

## 【HDAC8 選択的阻害薬の創出】

HDAC8 は、急性骨髄性白血病細胞での遺伝子発現、平滑筋でのアクチン骨格系に関与することが報告されている。また、HDAC8 阻害は T 細胞リンパ腫や神経芽細胞腫に対して抗がん作用を示すことなどが知られており、HDAC8 選択的阻害薬の創製は興味深い研究課題である。

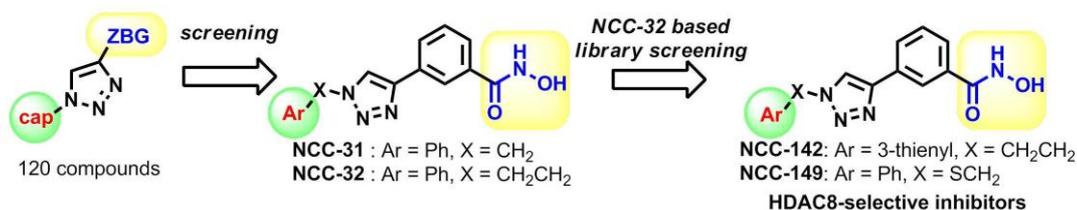


Figure 3. HDAC8 選択的阻害薬の創出

HDAC8 選択的阻害薬の創出のために、ZBG としてヒドロキサム酸構造または *o*-アミノアニリド構造を持つアルキン 8 種と、HDAC8 の表面のアミノ酸残基と相互作用することを期待した疎水性の脂肪族および芳香環を導入したアジド 15 種を、上述した方法で反応させ、120 種の化合物からなるライブラリー構築をした (Fig. 3)。続いて、HDAC8 酵素阻害活性および HDAC1 と 2 を豊富に含む HeLa 細胞の核抽出液を用いて HDAC 阻害活性を評価した。その結果、NCC-31 と NCC-32 に HDAC8 選択性が見られた (Fig. 3)。さらに有用な阻害薬創出のため、NCC-32 の構造を基に、アルキンを 1 種に固定し、31 種のアジドを用いてライブラリー構築を行った。この 31 種を評価した結果、NCC-142 と NCC-149 に高い HDAC8 選択性が見られた (Fig. 3)。さらに、別途合成、精製した NCC-142 と NCC-149 を評価した結果、既知の HDAC8 選択的阻害薬 PCI-34051 を凌ぐ高活性かつ高選択性を示した (Table 1)。また、NCC-149 は細胞評価系においても HDAC8 選択的阻害活性を示し、T 細胞リンパ腫や神経芽細胞腫に対して増殖阻害活性を示した (Table 2) <sup>3</sup>。

#### 【HDAC3 選択的阻害薬の創出】

HDAC3 は結腸癌細胞の増殖、炎症および神経変性疾患に関与することが報告されており、HDAC3 選択的阻害薬の抗がん剤、抗炎症剤および神経変性疾患治療薬への応用が期待されている。

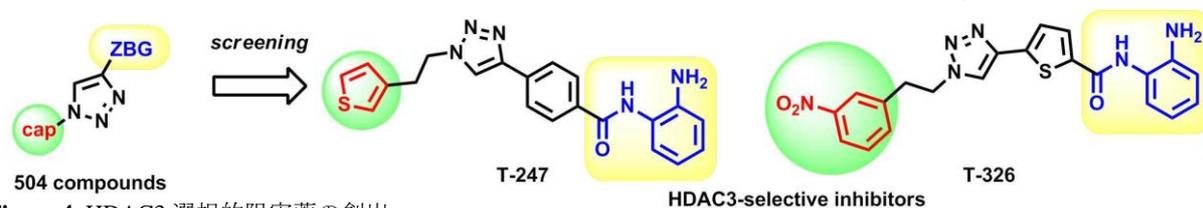


Figure 4. HDAC3 選択的阻害薬の創出

HDAC3 選択的阻害薬用ライブラリーの構築には、HDAC3 の酵素活性中心の構造等を考慮した 9 種のアルキンユニットおよび 56 種のアジドユニットを用いた。すなわち、このライブラリーは、それらを click chemistry により掛け合わせた 504 化合物からなる。続いて、HDAC3 および HeLa 細胞の核抽出液を用いた評価系により、スクリーニングを行った結果、高い HDAC3 阻害活性、選択性を示す T-247 および T-326 を見出した (Fig. 4)。さらに、これらを別途合成、精製し、活性評価を行ったところ、既知の HDAC 阻害薬である vorinostat に匹敵する HDAC3 阻害活性を有し、かつ高い選択性を示した (Table 3)。また、細胞評価系においても HDAC3 選択性を示し、結腸腺癌細胞および前立腺癌細胞に対して増殖阻害活性を示した (Table 4) <sup>4</sup>。

Table 1. NCC-142 と NCC-149 の HDAC 阻害活性

compd	IC <sub>50</sub> (μM)				
	HDAC8	HDAC1	HDAC2	HDAC4	HDAC6
PCI-34051	0.31	> 100	> 100	> 100	9.3
NCC-142	0.10	> 100	> 100	> 100	1.1
NCC-149	0.070	38	> 100	44	2.4

Table 2. NCC-149 の細胞増殖阻害効果

cell type	cell line	GI <sub>50</sub> (μM)	
		PCI-34051	NCC-149
T-cell	Jurkat	11	7.6
	HH	> 100	23
	MT2	15	11
	MT4	25	15
neuroblastoma cell	NB-1	14	12
	LA-N-1	3.9	6.4
healthy PBMC cell	PB-O	97	>100
	PB-N	> 100	>100

Table 3. T-247 および T-326 の HDAC 阻害活性

compd	IC <sub>50</sub> (μM)				
	HDAC3	*HDACs	HDAC4	HDAC6	HDAC8
vorinostat	0.27	0.073	> 10	0.34	0.66
T-247	0.24	> 100	> 100	> 100	> 100
T-326	0.26	> 100	> 100	> 100	> 100

\* rich in HDAC1/2 activity

Table 4. T-247 および T-326 の細胞増殖阻害効果

cell type	cell line	GI <sub>50</sub> (μM)		
		vorinostat	T-247	T-326
colon cancer	HCT116	1.3	1.9	0.94
prostate cancer	PC3	1.6	0.94	1.0

<references> (1) (a) Itoh, Y. *et. al. J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 5425.; (b) Fukada, M. *et. al. PLoSOne* **2012**, *7*, e30924. (2) Itoh, Y. *et. al. Curr. Pharm. Design* **2008**, *14*, 529. (3) (a) Suzuki, T. *et. al. Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2010**, *49*, 6817.; (b) Suzuki, T. *et. al. J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 9562. (4) Suzuki, T. *et. al. manuscript submitted.*