

---

## 総 説

---

# 次世代エピジェネティックドラッグを 目指した創薬研究

鈴木 孝 禎\*

京都府立医科大学大学院医学研究科医薬品化学

## Drug Discovery Research Towards Next-generation Epigenetic Drugs

Takayoshi Suzuki

*Department of Chemistry, Kyoto Prefectural University of Medicine,  
Graduate School of Medical Science*

### 抄 録

DNA の塩基配列に依存せず遺伝子の発現を制御する機構は、エピジェネティクスと呼ばれている。最近の研究により、シトシンのメチル化やヒストンリシン残基のアセチル化、メチル化が重要なエピジェネティクス機構の一つであることが明らかにされた。また、エピジェネティックな異常は、がんなどの疾病に関与することも報告されている。これまでに、DNA メチル基転移酵素阻害剤やヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤が開発され、臨床応用されている。我々の研究グループは、次世代エピジェネティックドラッグを目指して、アイソザイム選択的な HDAC 阻害剤やヒストン脱メチル化酵素阻害剤の創製研究を行っている。これらの阻害剤は、新たな作用機序の治療薬として期待されている。

キーワード：エピジェネティクス、ヒストン、アセチル化、メチル化、創薬。

### Abstract

The term "epigenetics" is defined as "heritable changes in gene expression that occur without changes in DNA sequence". Recently, it has been revealed that DNA methylation and histone modifications such as acetylation and methylation are epigenetic mechanisms according to this definition. In addition, disruption of the balance of epigenetic networks is known to cause some disease states such as cancer. To date, DNA methyltransferase inhibitors and histone deacetylase (HDAC) inhibitors have been developed and utilized in clinical practice. In this review, isozyme-selective HDAC inhibitors and histone demethylase inhibitors discovered by us are presented. These inhibitors are expected as next-generation epigenetic drugs.

**Key Words:** Epigenetics, Histone, Acetylation, Methylation, Drug discovery.

---

平成24年8月6日受付

\*連絡先 鈴木孝禎 〒603-8334 京都市北区大將軍西鷹司町 13

suzukit@koto.kpu-m.ac.jp

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

## はじめに

2003年4月にヒトゲノム配列の解読完了が宣言された。DNA情報がRNAに転写され、さらにタンパク質へ翻訳されるというセントラルドグマに従うと、ヒトゲノム配列の読解により生命機能を担うすべてのタンパク質が分かれば生命現象がすべて理解できるはずである。しかし、実際にはDNAの塩基配列だけでは理解できない生命現象は多く存在する。例えば、一つの受精卵からの細胞の分化である。すべての細胞は同じ塩基配列のDNAを持っているにも関わらず、異なる形態や機能を持つ細胞へと分化していく。これは、DNAの塩基配列が同じであっても発現する遺伝子の種類が異なるためである。最近の研究により、ヒストンのメチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化やDNAのメチル化などの修飾が塩基配列に依存せず遺伝子の発現を制御することが明らかになってきた。この様な後天的な修飾により遺伝子発現が制御されることに起因する遺伝学あるいは分子生物学の研究分野は「エピジェネティクス」と呼ばれる<sup>1)</sup>。エピジェネティックな制御を行う化合物は、生命現象を理解するための重要なツールとなるであろうし、エピジェネティックな異常は癌などの疾病をもたらすことも明らかになっていることから、治療薬として応用できる可能性もある。実際に、DNAのメチル化を制御するDNAメチル基転移酵素(DNMT)阻害剤のazacitidineとdecitabineは、骨髄異形成症候群治療薬として<sup>2-4)</sup>、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤のvorinostatとromidepsinは、皮膚T細胞腫治療薬として<sup>5-7)</sup>、臨床応用されている。現在我々は、DNMT阻害剤とHDAC阻害剤に続く次世代エピジェネティックドラッグとして、アイソザイム選択的HDAC阻害剤、ヒストン脱メチル化酵素阻害剤に着目し、研究を進めている。本総説では、それらの阻害剤の創製研究について概説する。

### アイソザイム選択的HDAC阻害剤

HDACは、ヒストンのN末端領域のアセチル

化されたりシン残基を脱アセチル化する酵素であり、エピジェネティックな遺伝子発現に関与する酵素である<sup>8-11)</sup>。HDACには、11種類のアイソザイム(HDAC1~11)が知られており、HDACアイソザイムと病態の関連も数多く報告されている<sup>12-16)</sup>。したがって、アイソザイム選択的なHDAC阻害剤は、副作用の少ない治療薬となることが期待されている。しかしながら、アイソザイム選択的なHDAC阻害剤の報告例は少ない。我々は、新規作用機序の治療薬を目指し、HDAC6選択的阻害剤、HDAC3選択的阻害剤、HDAC8選択的阻害剤の創製研究を行った。

#### 1. HDAC6選択的阻害剤

我々は、アイソザイム選択性を示さないHDAC阻害剤vorinostatをリード化合物としたさまざまな化学構造変換により、HDAC6選択的阻害剤NCT-14(図1)を見出した<sup>17)18)</sup>。NCT-14は、HDAC1、HDAC4に対しておよそ40~50倍の選択性でHDAC6を阻害し、これらは既存のHDAC阻害剤では見られない高いHDAC6選択性であった。NCT-14は、HDAC6の基質タンパク質である $\alpha$ -チューブリンを選択的にアセチル化する活性を有することも分かり、NCT-14は細胞内においてもHDAC6を選択的に阻害するということが示唆された。

さらに我々は、HDAC6ノックアウトマウスが抗不安状態にあることを見出すとともに、HDAC6選択的阻害剤NCT-14が抗不安作用を有することも明らかにした<sup>19)</sup>。これらの結果から、HDAC6選択的阻害剤が抗うつ薬として有用であることが示された。

#### 2. HDAC3選択的阻害剤とHDAC8選択的阻害剤

クリックケミストリーとは、簡単かつ短時間に複数の化合物を結合させる反応を利用して、新たな機能性分子を作り出す手法である<sup>20)</sup>。クリックケミストリーの代表的反応である銅触媒アジド-アルキン付加環化反応(CuAAC)は、材料科学や化学生物学など多くの分野で応用されてきた<sup>21-25)</sup>。我々は、クリックケミストリーを用いてヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤候補化合物ライブラリーを構築し、そのス

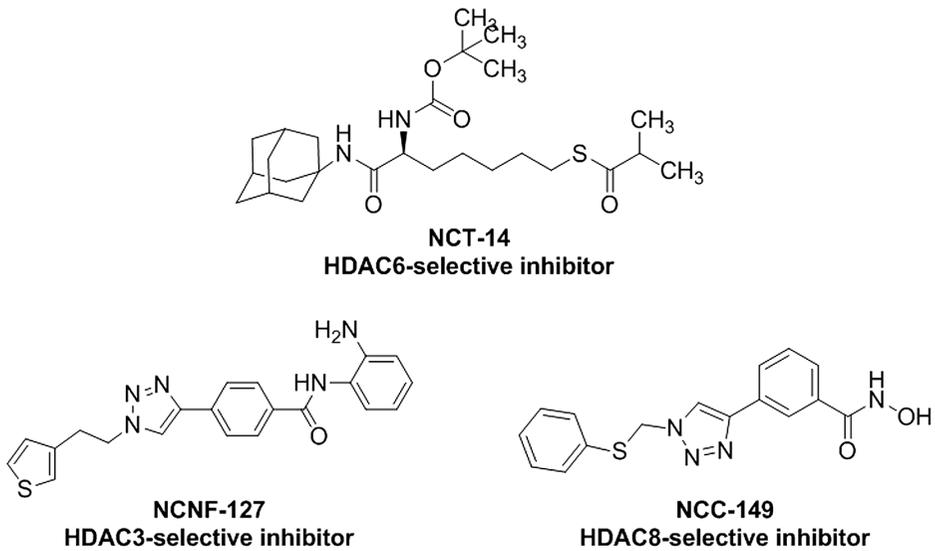


図1 アイソザイム選択的 HDAC 阻害剤

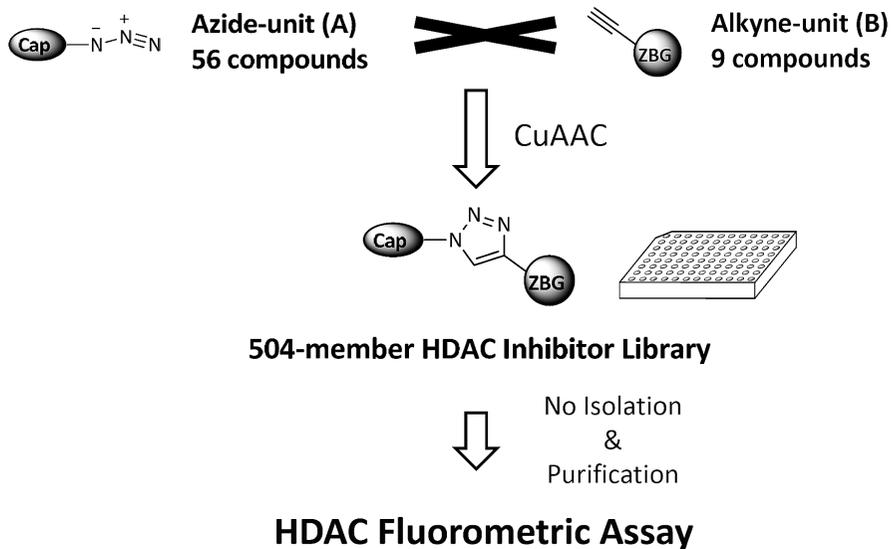


図2 クリックケミストリーを用いたアイソザイム選択的 HDAC 阻害剤の探索

クリーニングによりアイソザイム特異的 HDAC 阻害剤の創出を試みた。

HDAC 阻害薬は、HDAC の酵素活性中心に在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。図2の vorinostat の例に示すように、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 をつなぐリンカー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により連結するために、対応するアルキン、アジ

ドユニットの分子設計・合成を行った。アルキンユニット56化合物とアジドユニット9化合物を96穴プレート上でCuAAC反応により連結させることで、短時間に504個のトリアゾール体ライブラリーを構築した。原料の消失とトリアゾール体の生成は、TLCとLCMSによって確認した。続いて単離、精製することなしに直接HDAC蛍光アッセイを行った。その結果、HDAC3選択的阻害剤NCNF-127<sup>26)</sup>およびHDAC8選択的阻害剤NCC-149<sup>27)</sup>を見出した(図1)。NCNF-127は、固形がん細胞増殖阻害活性、HIV転写促進活性、NCC-149は、抗T細胞リンパ腫活性を示したことから、HDAC3選択的阻害剤の抗がん剤、抗ウイルス剤としての有効性、HDAC8選択的阻害剤の抗がん剤としての有効性が示された。

### ヒストン脱メチル化酵素阻害剤

ヒストン脱メチル化酵素(KDM)は、メチル化されたヒストンリシン残基を脱メチル化する反応を触媒する酵素で、エピジェネティックに遺伝子の発現を制御している<sup>28-31)</sup>。KDMは、フラビン依存性の脱メチル化酵素(LSD1)と

Jumonji C-domainを含む脱メチル化酵素(JHDM)の二つのファミリーに分類することが出来る。LSD1およびJHDMのアイソザイムのいくつかは、がんなどの病態に関与することも報告されており、次世代エピジェネティックドラッグとして期待されている<sup>32,33)</sup>。

#### 1. LSD1 選択的阻害剤

LSD1は、ヒストンH3の4番目のリシン残基のモノあるいはジメチル体を脱メチル化するフラビン依存性の酵素であり、エピジェネティックに遺伝子発現を制御している<sup>28,29)</sup>。また、LSD1はがん細胞の増殖にも関与する<sup>32,33)</sup>。そのため、LSD1阻害薬は、新たな作用機序の抗がん剤としても期待されている。

我々は、LSD1のX線結晶構造を基に、LSD1阻害薬のドラッグデザインを行った。その結果、世界初となる細胞系で利用可能なLSD1選択的阻害薬NCL-1(図3)を見出した<sup>34,35)</sup>。NCL-1は、がん細胞増殖阻害活性を示し、動物実験においても、抗がん作用を示した。また、NCL-1は、HIVの転写抑制作用を有することも明らかとなった<sup>36)</sup>。以上の結果から、LSD1選択的阻害剤の抗がん剤、抗ウイルス剤としての有効性が

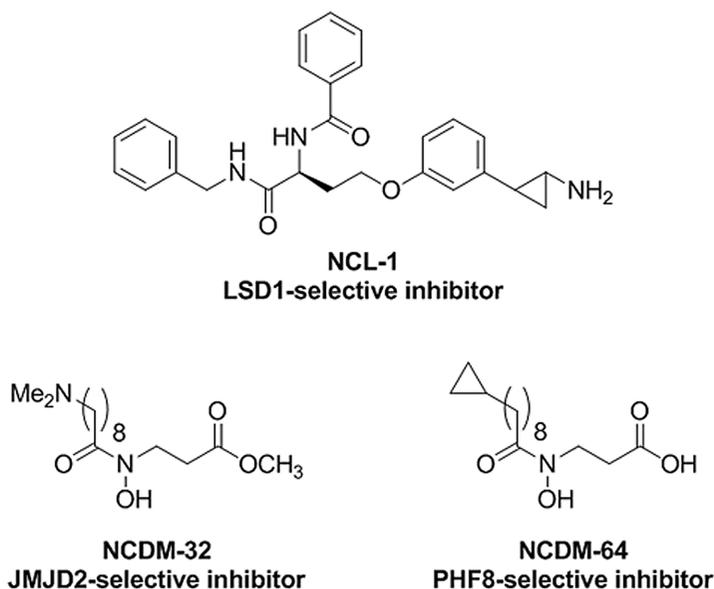


図3 アイソザイム選択的KDM阻害剤

示された。

## 2. JMJD2 選択的阻害剤と PHF8 選択的阻害剤

JHDM には 21 種類のアイソザイムが報告されているが、いくつかのアイソザイムは疾患に関与することが報告されている。JHDM のアイソザイムである JMJD2 と PHF8 に関しては、siRNA によるそれらの酵素のノックダウンが、がん細胞の増殖を抑制するという報告がある。したがって、JMJD2 阻害剤および PHF8 阻害剤は、新たな作用機序の抗がん剤として期待されている。しかしながら、ノックダウン実験と阻害剤を用いた実験では表現型に違いが見られるケースも多くあり<sup>37)</sup>、その酵素の低分子医薬品開発のターゲットとしての可能性は、阻害剤を用いた実験により検証する必要がある。JMJD2 と PHF8 の選択的阻害剤は、報告例が無かったため、我々は、それらの酵素の選択的阻害剤の創製研究を行った。

JMJD2 と PHF8 の X 線結晶構造を基に、酵素の活性中心に作用し得る化合物群を設計、合成し、酵素阻害活性評価を行った結果、高い選択

性および阻害活性を有する JMJD2 選択的阻害剤 NCDM-32<sup>38)</sup> および PHF8 選択的阻害剤 NCDM-64<sup>39)</sup> を見出した (図 3)。興味深いことに、JMJD2 あるいは PHF8 のノックダウンはがん細胞の増殖抑制という表現型を示すのに対し、JMJD2 選択的阻害剤はがん細胞に対して何の効果も示さず、PHF8 選択的阻害剤はがん細胞増殖抑制作用を示した。これらの実験結果から、PHF8 阻害剤が抗がん剤として有効であると考えられた。

## おわりに

第一世代エピジェネティックドラッグである DNMT 阻害剤と HDAC 阻害剤に続いて、本稿で述べたようなアイソザイム選択的 HDAC 阻害剤や KDM 阻害剤が、次世代エピジェネティックドラッグとして期待されている。HDAC 阻害剤、KDM 阻害剤以外にも、ヒストンメチル化酵素である EZH2、DOT1L 阻害剤などが抗血液系腫瘍薬として前臨床段階にある<sup>40)41)</sup>。これらの創薬研究が、近い将来実を結び、病気で苦しむ患者さんの治療に役立つことを期待する。

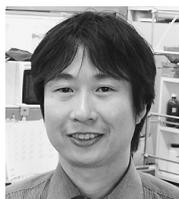
## 文 献

- 1) Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science* 1999; 286: 481-486.
- 2) Lubbert M. DNA methylation inhibitors in the treatment of leukemias, myelodysplastic syndromes and hemoglobinopathies: clinical results and possible mechanisms of action. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 249: 135-164.
- 3) Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 2002; 21: 5483-5495.
- 4) Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429: 457-463.
- 5) Li JY, Horwitz S, Moskowitz A, Myskowski PL, Pulitzer M, Querfeld C. Management of cutaneous T cell lymphoma: new and emerging targets and treatment options. *Cancer Manag Res* 2012; 4: 75-89.
- 6) Sato A. Vorinostat approved in Japan for treatment of cutaneous T-cell lymphomas: status and prospects. *Onco Targets Ther* 2012; 5: 67-75.
- 7) Lyseng-Williamson KA, Yang LP. Romidepsin: a guide to its clinical use in cutaneous T-cell lymphoma. *Am J Clin Dermatol* 2012; 13: 67-71.
- 8) Grozinger CM, Schreiber SL. Deacetylase enzymes: Biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem Biol* 2002; 9: 3-16.
- 9) Yoshida M, Shimazu T, Matsuyama A. Protein deacetylases: enzymes with functional diversity as novel therapeutic targets. *Prog Cell Cycle Res* 2003; 5: 269-278.
- 10) Glazak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 2005; 363: 15-23.
- 11) Konstantinopoulos PA, Karamouzis MV, Papavasiliou AG. Focus on acetylation: the role of histone deacetylase inhibitors in cancer therapy and beyond. *Expert Opin Investig Drugs* 2007; 16: 569-571.

- 12) Biel M, Wascholowski V, Giannis A. Epigenetics - An epicenter of gene regulation: Histones and histone-modifying enzymes. *Angew Chem Int Ed* 2005; 44: 3186-3216.
- 13) Mai A, Massa S, Rotili D, Cerbara I, Valente S, Pezzi R, Simeoni S, Ragno R. Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy. *Med Res Rev* 2005; 25: 261-309.
- 14) Suzuki T, Miyata N. Epigenetic control using natural products and synthetic molecules. *Curr Med Chem* 2006; 13: 935-958.
- 15) Schaefer S, Jung M. Chromatin modifications as targets for new anticancer drugs. *Arch Pharm* 2005; 338: 347-357.
- 16) Itoh Y, Suzuki T, Miyata N. Isoform-selective histone deacetylase inhibitors. *Curr Pharm Des* 2008; 14:529-544.
- 17) Suzuki T, Kouketsu A, Itoh Y, Hisakawa S, Maeda S, Yoshida M, Nakagawa H, Miyata N. Highly potent and selective histone deacetylase 6 inhibitors designed based on a small-molecular substrate. *J Med Chem* 2006; 49: 4809-4812.
- 18) Itoh Y, Suzuki T, Kouketsu A, Suzuki N, Maeda S, Yoshida M, Nakagawa H, Miyata N. Design, synthesis, structure-selectivity relationship, and effect on human cancer cells of a novel series of histone deacetylase 6-selective inhibitors. *J Med Chem* 2007; 50: 5425-5438.
- 19) Fukada M, Hanai A, Nakayama A, Suzuki T, Miyata N, Rodriguiz RM, Wetsel WC, Yao TP, Kawaguchi Y. Loss of deacetylation activity of Hdac6 affects emotional behavior in mice. *PLoS One* 2012; 7: e30924.
- 20) Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angew Chem Int Ed* 2001; 40: 2004-2021.
- 21) Lutz JF. 1,3-dipolar cycloadditions of azides and alkynes: a universal ligation tool in polymer and materials science. *Angew Chem Int Ed* 2007; 46: 1018-1025.
- 22) Salisbury CM, Cravatt BF. Optimization of activity-based probes for proteomic profiling of histone deacetylase complexes. *J Am Chem Soc* 2008; 130: 2184-2194.
- 23) Xu C, Soragni E, Chou CJ, Herman D, Plasterer HL, Rusche JR, Gottesfeld JM. Chemical probes identify a role for histone deacetylase 3 in Friedreich's ataxia gene silencing. *Chem Biol* 2009; 16: 980-989.
- 24) Carlmark A, Hawker C, Hult A, Malkoch M, New methodologies in the construction of dendritic materials. *Chem Soc Rev* 2009; 38: 352-362.
- 25) 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; 4: 6817-6820.
- 26) 宮田直樹, 鈴木孝禎, 粕谷侑輝. ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC3 阻害剤. 特願 2012-037082.
- 27) Miyata N, Suzuki T, Ota Y, Ueda R, Iida S, Ri M. Preparation of hydroxamic acid derivatives as HDAC8 inhibitors. *PCT Int Appl* 2011; WO 2011089995.
- 28) Kubicek S, Jenuwein T. A crack in histone lysine methylation. *Cell* 2004; 119: 903-906.
- 29) Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstone JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 2004; 119: 941-953.
- 30) Klose RJ, Kallin EM, Zhang Y. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 715-727.
- 31) Shi Y. Histone lysine demethylases: emerging roles in development, physiology and disease. *Nat Rev Genet* 2007; 8: 829-833.
- 32) Suzuki T, Miyata N. Lysine demethylases inhibitors. *J Med Chem* 2011; 54: 8236-8250.
- 33) Arrowsmith CH, Bountra C, Fish PV, Lee K, Schapira M. Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2012; 11: 384-400.
- 34) Ueda R, Suzuki T, Mino K, Tsumoto H, Nakagawa H, Hasegawa M, Sasaki R, Mizukami T, Miyata N. Identification of cell-active lysine specific demethylase 1-selective inhibitors. *J Am Chem Soc* 2009; 131: 17536-17537.
- 35) 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.
- 36) 岡本 尚, 朝光かおり, 宮田直樹, 鈴木孝禎. HIV 複製阻害剤. 特願 2010-177176.
- 37) Knight ZA, Shokat KM. Chemical genetics: where genetics and pharmacology meet. *Cell* 2007; 128: 425-430.
- 38) Hamada S, Suzuki T, Mino K, Koseki K, Oehme F, Flamme I, Ozasa H, Itoh Y, Ogasawara D, Komarashi

- 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.
- 39) 宮田直樹, 鈴木孝禎, 小笹弘貴, 水上民夫, 佐々木隆造, 東田裕一. ヒストン脱メチル化酵素 KDM7 選択的阻害剤. 特願 2012-038977.
- 40) Sneeringer CJ, Scott MP, Kuntz KW, Knutson SK, Pollock RM, Richon VM, Copeland RA. Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 20980-20985.
- 41) Daigle SR, Olhava EJ, Therkelsen CA, Majer CR, Sneeringer CJ, Song J, Johnston LD, Scott MP, Smith JJ, Xiao Y, Jin L, Kuntz KW, Chesworth R, Moyer MP, Bernt KM, Tseng JC, Kung AL, Armstrong SA, Copeland RA, Richon VM, Pollock RM. Selective killing of mixed lineage leukemia cells by a potent small-molecule DOT1L inhibitor. *Cancer Cell* 2011; 20: 53-65.

## 著者プロフィール



### 鈴木 孝禎 Takayoshi Suzuki

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科医薬品化学 教授

略 歴：1995年3月 東京大学薬学部薬学科卒業

1997年3月 東京大学大学院薬学系研究科薬学専攻修士課程修了

1997年4月 (株)日本たばこ産業入社

2003年1月 名古屋市立大学大学院薬学系研究科助手

2005年7月 博士(薬学)取得(東京大学大学院薬学系研究科)

2007年4月 名古屋市立大学大学院薬学系研究科助教

2007年4月 米国スクリプス研究所客員研究員

2009年4月 名古屋市立大学大学院薬学系研究科講師

2009年10月 科学技術振興機構さきかけ研究者(兼任)

2011年9月 京都府立医科大学大学院医学研究科教授

現在に至る

専門分野：創薬化学, 有機化学

- 主な業績：1. Suzuki T, Nagano Y, Kouketsu A, Matsuura A, Maruyama S, Kurotaki M, Nakagawa H, Miyata N. Novel inhibitors of human histone deacetylases: design, synthesis, enzyme inhibition, and cancer cell growth inhibition of SAHA-based non-hydroxamates. *J Med Chem* 2005; 48: 1019-1032.
2. Itoh Y, Suzuki T, Kouketsu A, Suzuki N, Maeda S, Yoshida M, Nakagawa H, Miyata N. Design, synthesis, structure-selectivity relationship, and effect on human cancer cells of a novel series of histone deacetylase 6-selective inhibitors. *J Med Chem* 2007; 50: 5425-5438.
3. Asaba T, Suzuki T, Ueda R, Tsumoto H, Nakagawa H, Miyata N. Inhibition of human sirtuins by in situ generation of an acetylated lysine-ADP-ribose conjugate. *J Am Chem Soc* 2009; 131: 6989-6996.
4. Ueda R, Suzuki T, Mino K, Tsumoto H, Nakagawa H, Hasegawa M, Sasaki R, Mizukami T, Miyata N. Identification of cell-active lysine specific demethylase 1-selective inhibitors. *J Am Chem Soc* 2009; 131: 17536-17537.
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.