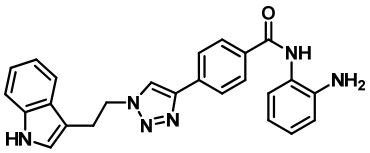
107　速度論的概念に基づく酵素阻害薬の創製研究	伊藤　幸裕

【目的】阻害薬－酵素複合体の解離反応には、熱力学的側面と速度論的側面がある。創薬化学研究では、通常、熱力学的指標となる阻害定数もしくは50%阻害濃度（IC_{50}）といった熱力学的パラメータによって阻害薬の評価を行う。しかし、これらの値は評価系の影響を受けやすく、様々な因子が存在する細胞系ならびに *in vivo* 系では、*in vitro* 評価によって算出された熱力学的パラメータ値を反映する薬理作用を示さないことが多々見受けられる。その一方で、熱力学的指標だけでなく、酵素阻害速度論に基づいた指標（速度論的パラメータ）を用いることが重要性であるとの報告もある。特に、阻害薬－酵素複合体における解離速度定数は、系の影響を受けにくく、細胞系や *in vivo* 系においても阻害薬－酵素相互作用の強さを反映する値として阻害薬評価に利用すべきであると提唱されている。以上の背景から、我々は、熱力学的指標のみならず、速度論的指標にも着目し、酵素阻害薬の創製研究を行うことが重要だと考えた。そこで、本研究では、酵素阻害速度論に基づいて、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害薬の創製研究を行った。

【方法および結果】速度論的パラメータが優れた値を示すHDAC選択阻害薬を見出すために、クリックケミストリーを利用したHDAC阻害薬用フォーカストライブラリーを構築した。その後、蛍光基質によるHDAC1阻害活性評価系にてスクリーニングを行い、ヒット化合物**1**を得た。化合物**1**を別途合成・単離精製し、詳細な酵素阻害速度解析を行ったところ、化合物**1**の解離速度定数（k_{off}）は非常に小さく、また、レジデンスタイムτが非常に大きかった。これらの速度論的パラメータは、既知のHDAC阻害薬であるvorinostatやentinostatに比べて優れていた。以上のように、我々は、優れた速度論的パラメータをもつHDAC阻害薬を見出すことに成功した。

見出した速度論的HDAC阻害薬とその阻害定数（K_i）、
解離速度定数（k_{off}）およびレジデンスタイム（τ）



1

	1
K_i (nM)	0.453
k_{off} (min^{-1})	0.0011
τ (min)	909

107. 速度論的概念に基づく酵素阻害薬の創製研究

伊藤　幸裕

京都府立医科大学 大学院医学研究科 医薬品化学

Key words：分子設計，解離速度，レジデンスタイム

緒　言

阻害薬－酵素複合体の形成には、熱力学的側面と速度論的側面がある（図 1）。通常の酵素阻害薬の創製では、熱力学的パラメータである阻害定数（K_i）もしくは 50%阻害濃度（IC_{50}）といった熱力学的パラメータによって化合物の活性を評価するのが一般的である。しかし、様々な因子が存在し、多様なライフイベントが起こる細胞系ならびに *in vivo* 系では、K_i もしくは IC_{50} 値を反映した薬理作用を示さないことが多い。一方、通常軽視されているが、酵素阻害速度論に基づいた評価方法もある。特に、阻害薬－酵素複合体における解離速度定数（k_{off}）もしくは、その逆数の値となるレジデンスタイム（τ ：$\tau = 1/k_{off}$）といった速度論的パラメータは、系の影響を受けにくく、細胞系や *in vivo* 系においても阻害薬－酵素相互作用の強さを見積もりやすい値であることが報告されている［1］。一般に、ある標的に対して k_{off} が小さい（τ が大きい）阻害薬は、その標的阻害に伴う高い薬理作用が期待できる。また、阻害薬の標的選択性については、k_{off} が大きい（τ が小さい）標的に比べて、k_{off} が小さい（τ が大きい）標的の方がより解離しにくいため、k_{off} が小さい（τ が大きい）標的に伴う作用が選択的に現れると期待される（図 1）。すなわち、狙った標的に対する k_{off} が小さければ（τ が大きければ）、その分だけオフ・ターゲット効果を避けやすい傾向にあり、副作用の低減が望める。実際に、抗悪性腫瘍薬などに使用されているメトトレキサート（ジヒドロ葉酸還元酵素阻害薬）や高コレステロール血症治療薬のロスバスタチン（HMG-CoA 還元酵素阻害薬）など、現在医薬品として使われている酵素阻害薬の多くは、標的に対する τ が大きい［1］。以上の点を踏まえ、我々は、熱力学的側面だけなく、速度論的側面にも着目して酵素阻害薬の創製研究を行うことが重要であると考えた。そこで、K_i 値に加え、k_{off} や τ にも着目し、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）阻害薬の創製研究を行った。

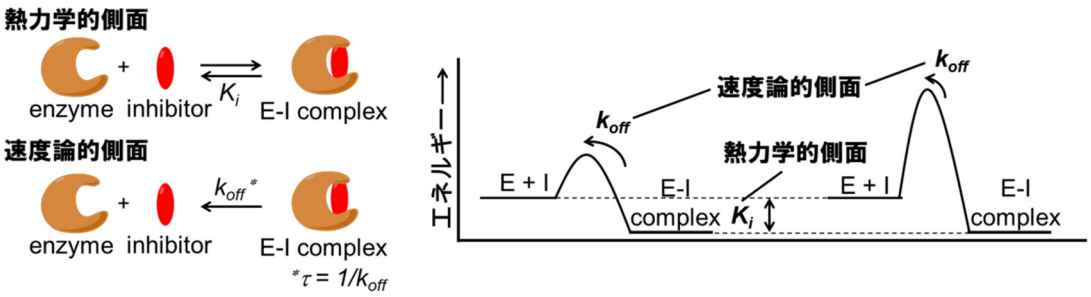


図 1. 酵素阻害における熱力学的側面と速度論的側面

酵素阻害における熱力学は、酵素や阻害薬の定常状態における濃度に依存する。細胞系や *in vivo* 系では、濃度が一様に保たもたれにくく、*in vitro* 系で算出した K_i もしくは IC_{50} 値を反映した薬理作用を示さないことが多い。一方、酵素阻害における速度論は、阻害薬－酵素複合体の形成における活性化エネルギーに依存する。k_{off}（$\tau = 1/k_{off}$）は複合体から阻害薬の遊離のしやすさに依存するため、環境に影響されにくい。また、K_i 値が同じであっても、τ が小さい阻害薬は遊離されやすく、τ が大きい阻害薬は遊離されにくい。

HDAC は、ヒストンのアセチル化反応を介し、様々な遺伝子の発現を制御している。HDAC は、がんなどの疾患に関与していることが報告されており、HDAC 阻害薬は、抗がん剤などの治療薬として期待されている［2］。これまでにヒドロキサム系 HDAC 阻害薬 vorinostat や *Chromobacterium violaceum* から得られる天然物由来の HDAC 阻害薬である romidepsin が悪性リンパ腫に対する治療薬として FDA 承認を受けている（図 2）［3］。しかし、血液系への副作用などが懸念されており、適応症の拡大が進んでいない。そこで、我々は、副作用がより少なく、他の疾患にも適応できるような HDAC 阻害薬を見出すため、酵素阻害速度論に活路を見出そうと考えた。実際には、HDAC 阻害薬用ライブラリーを構築し、そのスクリーニングを展開した結果、HDAC アイソフォームの一つである HDAC1 に対して優れた速度論的パラメータを示す化合物として **1** を見出した。以下の詳細について報告する。

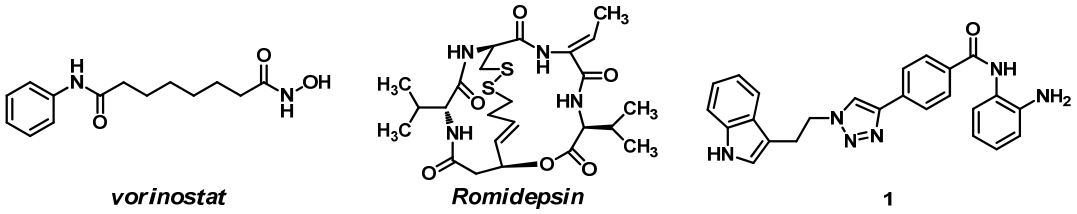


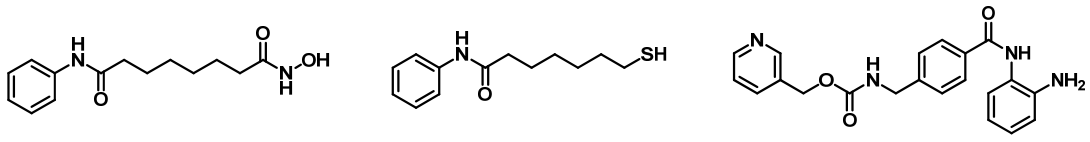
図 2. 代表的な HDAC 阻害薬と本研究で見出し速度論的 HDAC 阻害薬の構造

方法、結果および考察

1. 代表的な HDAC 阻害薬の酵素阻害速度解析

優れた速度論的パラメータを示す HDAC 阻害薬を見出すために、既知の HDAC 阻害薬の酵素阻害速度解析を行った。上述した vorinostat に加え、以前、我々のグループが見出したチオール系 HDAC 阻害薬の NCH-7［4］やオルトアミノアニリド型 HDAC 阻害薬である entinostat［5］の酵素阻害速度論解析を行った。酵素阻害速度論解析には、蛍光性基質を用いた HDAC 阻害評価系［6］を利用した。本評価系にて、阻害薬存在下における HDAC1 活性を継時的に測定し、解析ソフト Grafit 7.0 を使用して、熱力学的パラメータ（K_i）および速度論的パラメータ（k_{off} 値および τ 値）を算出した。Vorinostat や NCH-7 の K_i 値はそれぞれ 8.50 nM および 15.7 nM と算出できたものの、k_{off} 値は非常に大きく（τ 値が非常に小さく）算出限界範囲を超えていた（表 1）。一方、entinostat では、K_i は 1.48 nM、K_i は 1.48 nM、k_{off} は 0.0020 min^{-1}（τ = 500 min）と算出できた。この結果から、オルトアミノアニリド型 HDAC 阻害薬は τ が大きくなると期待できた。

表 1. Vorinostat、NCH-7 および entinostat の酵素阻害速度論解析



	vorinostat	*NCH-7*	*entinostat*
K_i (nM)	8.50	15.7	1.48
k_{off} (min^{-1})	-	-	0.0020
τ (min)	-	-	500

2. HDAC 阻害薬用ライブラリーの構築とそのスクリーニング

さらに優れた速度論的パラメータを示す HDAC 阻害薬を見出すために、HDAC 阻害薬用フォーカストライブラリーを構築することとした。ライブラリー構築には、既知の HDAC 阻害薬の構造的特徴に基づき、クリックケミストリーの代表的な反応である銅触媒アジドーアルキン環化付加反応を利用した［7］。上述したようにオルトアミノアニリド型 HDAC 阻害薬は τ が大きくなると期待された。そこで、(i) オルトアミノアニリド構造を有する種々のアルキンと種々のアジドを準備し、(ii) それらを 96 ウェルプレートの各ウェルで銅触媒アジドーアルキン環化付加反応にて連結させ（トリアゾールライブラリーの構築）、(iii) 生成したトリアゾールを単離・精製することなくスクリーニングを行う、という 3 段階［8, 9］で、τ が大きい HDAC 阻害薬の同定を目指した（図 3）。実際には、オルトアミノアニリド構造を導入した 6 種のアルキン（Ak6）および 56 種のアジド（Az1-56）を用い、これらを掛け合わせた 336 化合物からなる HDAC 阻害薬用ライブラリーを構築した。その後、蛍光基質による評価系にて HDAC1 阻害活性を評価した。その結果、化合物 **1** が 10 μM で HDAC1 を強く阻害（> 90%阻害）することがわかった。

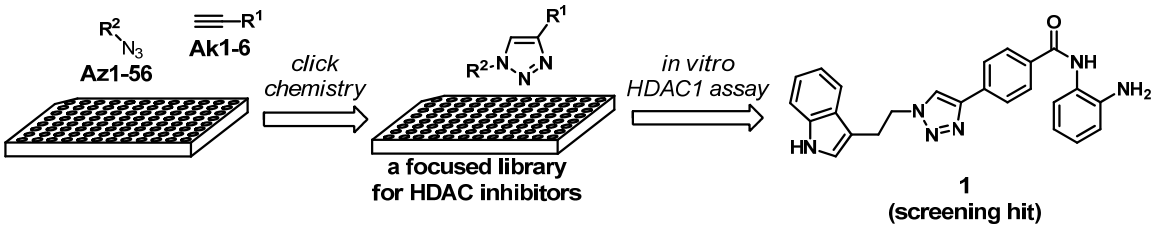


図 3. クリックケミストリーによるライブラリー構築とそのスクリーニング

3. ヒット化合物の合成とその酵素阻害速度解析

上述のスクリーニングは、未精製の状態で実施したため、化合物 **1** を別途合成・単離精製し、詳細な酵素阻害速度解析を行うこととした。化合物 **1** は、図 4 に示すルートで合成した。まず、ジアミン **2** のモノ Boc 化を行い、化合物 4 と縮合することでアルキン **5** を得た。続いて、アルキン **5** とアジド **6**［9］を銅触媒アジド―アルキン環化付加反応にてカップリングさせ、**7** を合成したのち、Boc 基の脱保護を行うことで、化合物 **1** を調整した。

精製した化合物 **1** を先に記した方法と同様の方法にて酵素阻害速度解析を行ったところ、化合物 **1** の k_{off} 値は非常に小さく（τ 値が非常に大きく）、entinostat よりも 1.8 倍程度優れていた（表 2）。以上のように、我々は、優れた速度論的パラメータを有する化合物として **1** を同定した。今後は、化合物 **1** を細胞系にて評価し、優れた速度論的パラメータを有する HDAC 阻害薬の有用性を明らかとしていきたい。

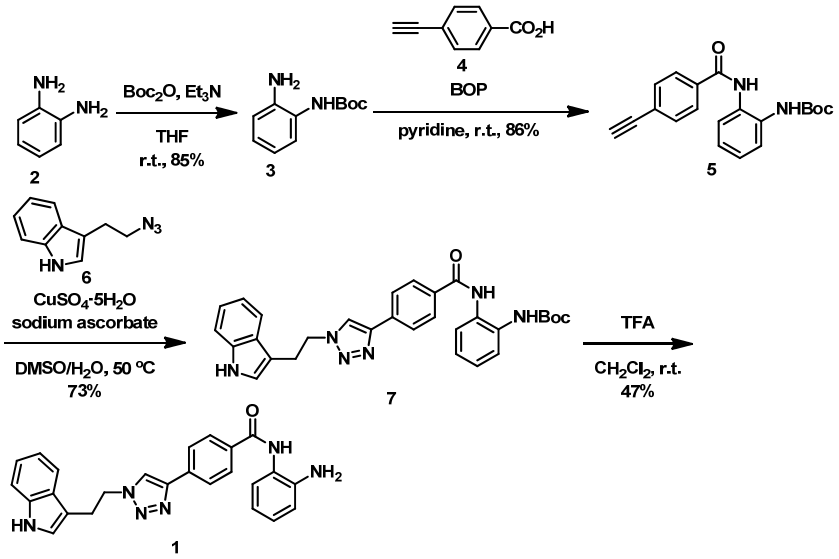


図 4. 化合物 1 の合成

表 2. 化合物 **1** および entinostat の酵素阻害速度論解析

	1	***entinostat***
K_i (nM)	0.453	1.48
k_{off} (min^{-1})	0.0011	0.0020
τ (min)	909	500

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、京都府立医科大学大学院医学研究科の鈴木孝禎教授、東條敏史博士（現東京理科大学助教）である。最後に、本研究に対しご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文　献

1） Copeland RA. The drug-target residence time model: a 10-year retrospective. Nat Rev Drug Discov. 2016 Feb;15(2):87-95. PMID: 26678621 DOI: 10.1038/nrd.2015.18

2） Qin HT, Li HQ, Liu F. Selective histone deacetylase small molecule inhibitors: recent progress and perspectives. Expert Opin Ther Pat. 2017 May;27(5):621-636. PMID: 28033734 DOI: 10.1080/13543776.2017.1276565

3） Itoh Y, Suzuki T, Miyata N. Small-molecular modulators of cancer-associated epigenetic mechanisms. Mol Biosyst. 2013 May;9(5):873-96. PMID: 23511667 DOI: 10.1039/c3mb25410k

4） 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 Feb 24;48(4):1019-32. PMID: 15715470 DOI: 10.1021/jm049207j

5） Suzuki T, Ando T, Tsuchiya K, Fukazawa N, Saito A, Mariko Y, Yamashita T, Nakanishi O. Synthesis and histone deacetylase inhibitory activity of new benzamide derivatives. J Med Chem. 1999 Jul 29;42(15):3001-3. PMID: 10425110 DOI: 10.1021/jm980565u

6） Itoh Y, Suzuki M, Matsui T, Ota Y, Hui Z, Tsubaki K, Suzuki T. False HDAC Inhibition by Aurone Compound. Chem Pharm Bull (Tokyo). 2016;64(8):1124-8. PMID: 27477650 DOI: 10.1248/cpb.c16-00123

7） Kolb HC, Finn MG, Sharpless KB. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. Angew Chem Int Ed Engl. 2001 Jun 1;40(11):2004-2021. PMID: 11433435

8） 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 Nov 26;55(22):9562-75. PMID: 23116147 DOI: 10.1021/jm300837y

9） Suzuki T, Kasuya Y, Itoh Y, Ota Y, Zhan P, Asamitsu K, Nakagawa H, Okamoto T, Miyata N. Identification of highly selective and potent histone deacetylase 3 inhibitors using click chemistry-based combinatorial fragment assembly. PLoS One. 2013 Jul 16;8(7):e68669. PMID: 23874714 DOI: 10.1371/journal.pone.0068669