

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：結合解離速度論に基づいた低分子医薬品候補化合物の創出

Development of small molecule drug candidates based on binding kinetics

研究開発実施期間：令和2年6月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：鈴木 孝禎

Takayoshi Suzuki

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人大阪大学 産業科学研究所 複合分子化学研究分野教授

National University Corporation, SANKEN, Department of Complex Molecular Chemistry, Professor

II 研究開発の概要

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 (K_i) 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 K_i 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。熱力学的指標だけでなく、酵素結合速度論に基づいた指標を用いることも重要であると考えられる。特に、阻害薬-酵素複合体における解離速度定数 (k_{off}) 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ることも提案されている。一般に、ある標的に対する k_{off} 値が小さい阻害薬は、 k_{off} 値が大きい阻害薬に比べて、その標的阻害に伴う高い薬理作用が期待できる。また、阻害薬の各標的に対する選択性については、 k_{off} 値が大きい標的に比べて、 k_{off} 値が小さい標的の方がより解離しにくいため、 k_{off} 値が小さい標的に伴う作用が選択的に現れると予想される。すなわち、狙った標的に対する k_{off} 値が小さければ、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、現在医薬品として使われている酵素阻害薬に目を向けると、非常に多くの阻害薬が k_{off} 値の小さい阻害薬であることが分かってきた。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、 K_i 値に加え、 k_{off} 値にも着目し、*in vivo* 系においても、高い標的タンパク質結合選択性を示すアイソフォーム選択的阻害薬の創製を目指した。具体的には、神経性疾患に関与することが知られているヒストン脱アセチル化酵素 2 (HDAC2) および HDAC5 を標的タンパク質として、速度論的に標的タンパク質アイソフォームを識別する阻害薬の創製研究を行った。

(1) 速度論選択的 HDAC2 阻害薬の創製

ヒストン脱アセチル化酵素 1 (HDAC1) と神経性疾患に関与する HDAC2 は、構造類似性が 93% と高く、阻害薬結合部位の構造もほとんど同じであるため、熱力学的観点からだけでは、選択的阻害薬を創製することは困難である。しかしながら、速度論的観点からは、アイソフォーム選択的阻害薬創出の可能性がある。すなわち、阻害薬の HDAC2 に対する k_{off} 値が小さく、HDAC1 に対する k_{off} 値が大きい場合、その阻害薬の効果として、より解離しにくい HDAC2 に伴う作用が持続的かつ選択的に表れると期待できる。

クリックケミストリーを用いて、既知の HDAC1/2 阻害薬の誘導体群を 30 化合物合成し、酵素阻害活性評価、速度論解析を行った。その結果、 $K_i = 0.24$ nM、HDAC2 速度論選択性 30 倍 ($k_{\text{off}}(\text{HDAC1})/k_{\text{off}}(\text{HDAC2}) = 30$) の速度論選択的 HDAC2 阻害薬 OTT-1 を見出した。OTT-1 の速度論的 HDAC2 選択性のメカニズムを明らかにするために、HDAC2-OTT-1 複合体の X 線結晶構造を取得し、拡張アンサンブル法を用いたドッキング計算を行った。その結果、HDAC1 では、阻害薬結合領域から離れた位置にある Ser263 が隣接する Gly×4 ループの阻害薬結合ポケットにはみ出すのを妨げ、OTT-1 が比較的低エネルギーで結合・解離できるのに対し、HDAC2 では、Ala278 が疎水性相互作用により安定で動きにくく、隣接する Gly×4 ループが阻害薬結合ポケットにはみ出してしまい、OTT-1 の結合・解離により高いエネルギーが必要であることが予測された。つぎに、OTT-1 が細胞内で HDAC2 を選択的に阻害するかどうかを調べるために、遺伝子発現解析を行った。siRNA により HDAC1 または HDAC2 をノックダウンした細胞の遺伝子発現解析を行うことにより、HDAC2 により発現が制御される遺伝子が 31 個見出された。そのうちの神経成長に関わる 5 つの遺伝子について、さらに解析を行ったところ、速度論選択的 HDAC2 阻害薬 OTT-1 は、非選択的阻害薬 TTA に比べ、5 つの遺伝子の発現を顕著に促進した。これらの結果から、OTT-1 は、細胞内で HDAC2 を選択的に阻害することが示された。また、Neuro2a (N2a) 細胞における神経突起伸長活性を調べたところ、速度論選択的 HDAC2 阻害薬 OTT-1 は、非選択的阻害薬である vorinostat (SAHA) および entinostat (MS275) に比べ、高い神経突起伸長作用を示し、速度論的 HDAC2 選択性と活性の相関があることがわかった。HDAC1 阻害により血小板減少の副作用が起こることが知られているため、ヒト骨髄由来の血液前駆細胞を用いた評価系において、血小板減少に関する作用を評価した。その結果、OTT-1 の血小板減少作用は、非選択的阻害薬である vorinostat、CI-994 に比べて低く、N2a 細胞における神経突起伸長活性との選択性 (Selectivity Index) は非常に高いことが分かった (vorinostat 1; OTT-1 3,000)。以上の結果から、速度論選択的 HDAC2 阻害薬は、副作用の少ない神経精神疾患治療薬として有用であることが示唆された。最後に、動物実験による薬効評価を行った。ストレスを負荷したうつ病モデルマウスを用いて、速度論選択的 HDAC2 阻害薬 OTT-1 の神経細胞樹状突起スパイン密度亢進活性を評価し、vorinostat (SAHA) および entinostat (MS275) と活性の比較を行った。その結果、速度論選択的 HDAC2 阻害薬 OTT-1 は、非選択的阻害薬である SAHA、MS275 よりも顕著な神経細胞樹状突起スパイン密度亢進活性を示し、スパイン密度を正常化させた。さらに、うつ病モデルマウスを用いて、社交性試験、スクロース嗜好性試験を行ったところ、速度論選択的 HDAC2 阻害薬 OTT-1 は、非選択的阻害薬である SAHA、MS275 よりも顕著な抗うつ様効果を示した。一方、OTT-1 による体重減少や行動活性異常 (多動) といった毒性・異常行動は認められなかった。

(2) 速度論選択的 HDAC5 阻害薬の創製

上記の速度論選択的アイソフォーム阻害の概念に基づき、速度論選択的 HDAC5 阻害薬の創製を試みた。クリックケミストリーを用いて、既知の HDAC4/5 阻害薬の誘導体群を 60 化合物合成し、酵素阻害活性評価、速度論解析を行った。その結果、HDAC4 をほとんど阻害せず、HDAC5 にゆっくりと結合・解離して阻害する AMA01-056 (K_i for HDAC5 = 17 nM; k_{off} for HDAC5 = 0.0033 min^{-1} ; HDAC4 $\text{IC}_{50} > 10$ mM) を見出した。HDAC5 阻害薬 AMA01-056 は、神経細胞に対して毒性を示すことなく ($\text{IC}_{50} > 200$ mM)、2 nM の濃度で神経突起伸長活性を示した。HDAC5 阻害薬 AMA-056 について、ストレスを負荷したうつ病モデルマウスを用いて、神経細胞樹状突起

スパイン密度亢進活性を評価した結果、AMA-056 は、顕著な神経細胞樹状突起スパイン密度亢進活性を示し、スパイン密度を正常化させた。また、AMA-056 の投与は社交性試験における抗うつ様行動を示した。一方、HDAC5 阻害薬による体重減少や行動活性異常といった毒性・異常行動は認められなかった。

上述のように、速度論選択的にアイソフォームを阻害することが可能であり、速度論選択的アイソフォーム薬が低い毒性で高い薬効を示すことを明らかにした。以上の結果を基に、低分子創薬化学における「速度論選択的アイソフォーム阻害」という新しい概念を提唱することができた。

Enzyme-inhibitor binding/dissociation has thermodynamic and kinetic aspects. Enzyme inhibitors have traditionally been evaluated by comparing their thermodynamic parameters such as inhibition constant (K_i) values. However, it is important to evaluate enzyme inhibitors based on not only thermodynamic parameters but also kinetic ones. For example, dissociation rate (k_{off}) is regarded as an important kinetic parameter because inhibitors with a small k_{off} value exert prolonged pharmacological effects. Moreover, the k_{off} values estimated in *in vitro* assay systems are less susceptible to assay conditions and better reflects the strength of enzyme-inhibitor interaction in cells. Indeed, a number of clinically used enzyme inhibitors show long residence time on their target enzymes, and the length of the residence time strongly correlates with their outstanding pharmacological activity. Thus, drug discovery studies based on kinetics should be important to identify useful enzyme inhibitors although they have never received great attention so far.

In drug discovery, it is also important to develop isoform-selective enzyme inhibitors which have fewer side effects. However, in many cases, it is quite difficult to identify isoform-selective inhibitors because the structural difference between the isoforms is too small. Even in such cases, we considered that it might be possible to identify kinetically isoform-selective inhibitors although it is thought to be difficult to identify thermodynamically selective inhibitors. If the k_{off} value on enzyme isoform X ($k_{off(X)}$) of an inhibitor is smaller than that on enzyme isoform Y ($k_{off(Y)}$), the isoform X should be selectively inhibited after the binding/dissociation between the inhibitor and the isoforms reaches equilibrium.

To demonstrate the hypothesis, in this study, we attempted to identify small molecules that kinetically differentiate between the histone deacetylase (HDAC) isoforms, which are the ultimate example of structurally similar isoforms. Specifically, we identified kinetically selective HDAC2 inhibitors and HDAC5 inhibitors by screening a focused library and biological evaluation. These kinetically selective HDAC isoform inhibitors showed potent neurite outgrowth-promoting activity without cytotoxicity in cell-based assays and exerted potent antidepressant activity without causing severe toxicity in *in vivo* studies. This study should provide a new concept to identify selective small molecule inhibitors that are expected to show beneficial effects in clinical practice.