



## 血液脳関門透過性を有するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の探索研究 [論文要旨及び審査の要旨]

著者	平中 誠弥
発行年	2020-03-31
学位授与機関	関西大学
学位授与番号	34416甲第774号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10112/00020203">http://hdl.handle.net/10112/00020203</a>

	[18]
氏 名	ひらなか せいや 平中 誠弥
博士の専攻分野の名称	博士 (工学)
学位記番号	理工博第 75 号
学位授与の日付	2020 年 3 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	血液脳関門透過性を有するヒストン脱アセチル 化酵素阻害剤の探索研究
論文審査委員	主査教授 長岡 康夫 副査教授 福永 健治 副査教授 岩木 宏明 専門審査委員 准教授 住吉 孝明

## 論文内容の要旨

ヒストン脱アセチル化酵素（以下 HDAC）は遺伝子の発現を抑制方向に調節する酵素である。近年、その過剰発現が、がん抑制遺伝子や神経系の機能維持に必要な遺伝子の発現量の低下を招き、広範囲に及ぶ種々のがんやアルツハイマー病、統合失調症などの精神神経疾患の発症に関与することが報告され、HDAC 阻害剤はこれらの疾患に対する治療薬として期待されている。実際、複数の HDAC 阻害剤が抗がん剤として上市されているが、血液脳関門透過性が低いために精神神経疾患治療薬として上市されたものは存在しない。血液脳関門透過性が低い理由として、HDAC 阻害剤には HDAC の酵素活性中心にある亜鉛に配位するための極性基が必須であることがあげられる。HDAC 阻害剤の基本構造は、亜鉛結合部位、酵素ポケット表面のアミノ酸側鎖との相互作用によりふたをする役割を果たす CAP 部位、この 2 つを繋ぐ Linker 部位からなる。亜鉛結合部位は、ヒドロキサム酸、チオール、N-(2-aminophenyl)benzamide などの極性基であり、一般的に脂溶性である細胞膜を通過しにくい。本課題を解決するために、脂溶性を高めた HDAC 阻害剤の探索が行われてきたが、高過ぎる脂溶性は代謝不安定化やオフターゲットへの非特異的結合を招き、医薬品として不適であった。そこで、本研究では、脂溶性を大きく増加させることなく、HDAC 阻害活性と血液脳関門移行性を向上させる新しい方法論を開発した。

第 1 章では、ヒストン脱アセチル化酵素を標的とした創薬の現状について解説している。具体的には、HDAC も含めた修飾因子による遺伝子配列によらない後天的な遺伝子発現制御機構を研究するエピジェネティクスについて最初に概説し、続いて HDAC の遺伝子調節機能、11 種類存在するアイソザイムの分類、がん、精神神経疾患、自己免疫疾患、アレルギー疾患など幅広い疾患との関わりについて記述した。最後に、現在上市されている HDAC

阻害剤やアイソザイム選択的阻害剤の意義を示した。

第2章では、ピリラミン感受性 H<sup>+</sup> 共役型有機カチオンアンチポーター (PYSOCA) を介した血液脳関門透過性 HDAC 阻害剤開発研究について論じている。一般的に HDAC 阻害剤は血液脳関門透過性に乏しい。本章では、最初に精神神経疾患と関わりのある HDAC アイソザイムについて解説し、それらのアイソザイム選択的阻害剤を中心に現在見出されている中枢移行性 HDAC 阻害剤について紹介している。次に受動拡散に血液脳関門透過性向上の手法などの従来法を紹介し、現在までに精神神経疾患の治療薬として HDAC 阻害剤が上市されていない原因について記述している。続いて、その課題を解決するためのアイデアとして着目した PYSOCA について解説した。そして、PYSOCA の基質であるピリラミンの構造を HDAC 阻害剤にハイブリッドすることによって、ピリラミンの構造を PYSOCA が認識し、化合物が血液脳関門を能動的に通過することができるとの着想、化合物設計について述べた。本戦略は、脂溶性を大きく上昇させることなく血液脳関門透過性を高めることが期待できる。

ピリラミン構造をベンズアミド型 HDAC 阻害剤とハイブリッドすることで、HDAC 阻害活性と PYSOCA 基質性をあわせもつ化合物 1 を合成した。また、その類縁体として化合物 2-7 を合成した。これらの化合物の HDAC 阻害活性を評価した結果、脳移行性が高いことが知られている既存のベンズアミド型 HDAC 阻害剤 CI-994 と同等の阻害活性、および class I HDAC 選択性を示した。有望化合物として化合物 1 を選択し、HeLaS3 細胞で評価した結果、化合物 1 および CI-994 とともに 10 mM でヒストン H3K9 のアセチル化を亢進した。以上の結果から、ピリラミン構造が HDAC 阻害剤の部分構造として許容されることを見出している。

次に、ヒト血液脳関門血管内皮細胞株化細胞 (hCMEC/D3) を用いた細胞取り込み試験を行ったところ、化合物 1 は 37 ° C で細胞内への取り込みが時間依存的に増加したのに対し、4 ° C では取り込みがほとんど起こらなかった。また、アジ化ナトリウムおよび塩化アンモニウムを添加した結果、この化合物 1 の細胞内取り込みは ATP 依存のかつ pH 依存性であった。さらに、PYOSCA の基質共存下で細胞内取り込みが有意に低下したのに対し、その他の有機カチオントランスポーターの基質共存下では細胞内への取り込みに有意な変化はみられなかった。以上の結果から、化合物 1 は PYSOCA の基質であることが示された。ラットを用いて *in vivo* の血液脳関門透過性を評価した結果、化合物 1 は、CI-994 に比べて約 3.3 倍の透過性を示した。

第3章では、ピリラミン型ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の構造最適化について論じている。具体的には、第2章で記述した化合物 1 の代謝安定性の向上や心毒性のリスクを低減するために、酸化代謝を受けやすい 4-メトキシベンジル基のベンゼン環の電子密度を下げる改変や、hERG 阻害率を低減するための構造改変を行った化合物 8-13 を合成した。ジメチルアミノ基をよりかさ高いピロリジンに変換した。その結果、化合物のジメチルアミノ基をピロリジン基に変換したことは hERG 阻害率低減には寄与しなかったが、化合物

1 の亜鉛結合部位である、ベンズアミド基を 4-メトキシベンジル基のメトキシ基と置き換えた化合物 13 が、化合物 1 よりも強い HDAC 阻害活性、低い分子量、hERG 阻害率、tPSA を示すことを見出した。本化合物は、化合物 1 より医薬品候補化合物に適していると考えられる。

ベンズアミド型 HDAC 阻害剤にピリラミン構造をハイブリッドした化合物 1 が、HDAC 阻害活性を失うことなく高い血液脳関門透過性を示した。

## 論文審査結果の要旨

中枢神経系は血液脳関門 (BBB) とよばれる強固なバリアーにより保護されているため、中枢作用薬の開発においては、対象となる薬物をこの BBB を透過させて脳内に送達する必要がある。既存の中枢作用薬の多くは、受動拡散により透過が可能な、比較的 low molecular weight で脂溶性が高い分子構造をもつがほとんどであるが、今後の中枢作用薬の創薬の発展には、生体分子との多様な分子間相互作用を可能とする極性分子を対象とすることが強く求められている。申請者は、精神病治療薬への応用が期待されるが、比較的極性が高いため今まで中枢作用薬への応用が困難であった、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤の BBB 透過性を向上させる手段として、BBB での特異的な薬物トランスポーターである、ピリラミン感受性  $H^+$  共役型有機カチオンアンチポーター (PYSOCA) を介した血液脳関門透過性 HDAC 阻害剤開発研究を進めた。実際に、申請者は PYSOCA を介した BBB 透過性が期待できる化合物として、ピリラミン-HDAC 阻害剤複合体の合成に成功した。さらに、その化合物の代謝安定性の向上や副作用軽減の観点からの官能基変換を施し、薬物動態プロファイルの優れた化合物に仕上げている。

本研究で申請者が考案した PYSOCA を利用した中枢への薬物輸送システムは、HDAC 阻害剤のような極性基が活性発現に必要とされる創薬研究において、新たな BBB 透過性向上の方法論であり、今後の中枢作用薬開発の展開に貢献することが期待できる。よって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。