

ベーターの会合が起こり、転写活性を有するようになる。PPAR- γ の内因性リガンドとしては、シクロオキシゲナーゼ代謝産物の 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -プロスタグランジン J₂(15d-PGJ₂)が想定されているが、現在さらに内因性リガンドの探索が進められている。また、PGF₂は PPAR- γ 活性を負に調節することが知られている。

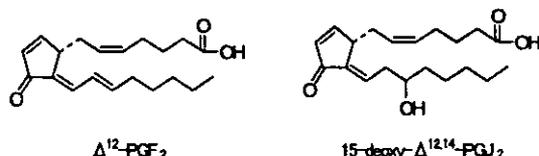


図 PPAR- γ の内因性リガンドとして知られている化合物

1-2 肥満に伴ってインスリン抵抗性が起こるメカニズム

肥満状態においては脂肪細胞が肥大化しており、その肥大脂肪細胞からはインスリン抵抗性惹起因子である TNF- α 、レジスチンなどのサイトカイン、さらには、脂肪分解が亢進し FFA (free fatty acid: 遊離脂肪酸) が放出され、レプチンも過剰放出される。レプチンは本来エネルギー消費を活性化し、抗肥満、あるいは抗インスリン抵抗性に働くと考えられるが、肥大脂肪細胞を有する肥満ではこのようなレプチンの作用に抵抗性があり、レプチンが過剰に分泌されるからといってインスリン抵抗性が軽減される方向には働いていない。一方、肥満でもレプチンの交感神経緊張促進の作用に対しては抵抗性がないため、レプチンの過剰は高血圧を起こす。また、肥大脂肪細胞から

PAI-1(プラズミノゲン・アクティベーター・インヒビター1)も放出され、血栓傾向を起こす。

1-3 Thiazolidinedione 誘導体について

1988年に、チアゾリジン誘導体を肥満動物に投与すると、肥満動物の大型脂肪細胞、肥大脂肪細胞を二週間で小型脂肪細胞に置き換えるということが明らかとなった。ヒトは思春期を過ぎると脂肪細胞の分化はほとんどストップするが、PPAR- γ の強力なアゴニストで PPAR- γ を活性化させると、再び前駆脂肪細胞が小型脂肪細胞へと分化し始め、肥大脂肪細胞は PPAR- γ によってアポトーシスさせられ死ぬということが明らかになった。すなわち、これまでストップしていた分化を促進することによって、小型脂肪細胞をたくさん作り、同時に大型の脂肪細胞を殺すことで、肥大脂肪細胞を小型脂肪細胞へと置き換える。その結果インスリン感受性ホルモンが小型脂肪細胞から放出されインスリン抵抗性が改善される。

1-4 PPAR- γ アンタゴニスト、RXRのアンタゴニストについて

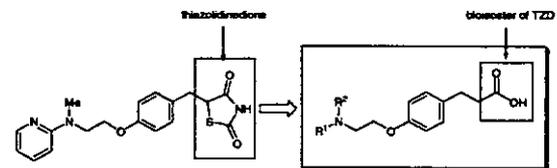
また PPAR- γ を抑制する (RXRのアンタゴニスト) 薬剤「HX531」を「高脂肪食下では肥満、インスリン抵抗性、糖尿病をきたす KKA γ マウス」というマウスに投与すると、高脂肪食を十分食べていながら、肥満やインスリン抵抗性がほぼ抑制されるという結果が見出された。また、LG100641はRXRに結合するレチノイドとして構造展開された化合物のなかで PPAR- γ アンタゴニストとして見出さ

れた化合物である。これらのリガンドは PPAR- γ の活性を抑制して脂肪細胞の肥大化を抑制することによって抗糖尿病薬、また抗肥満薬としての効果が期待できる。しかし Pro12Ala 多型保持者のようにすでに PPAR- γ の機能が低下している症例にアンタゴニストを投与すると、その投与量によってはインスリン抵抗性をかえって憎悪する危険性もある。

以上のように、PPAR- γ は、脂肪組織に多く発現して脂肪細胞分化に深く関与しており、分化促進による脂肪細胞の質的変化が PPAR- γ アゴニストによるインスリン抵抗性メカニズムの一つと考えられている。これまでに3種類のチアゾリジン薬が臨床に用いられてきた。そのうち、Troglitazone は副作用である重篤な肝障害のために市販後中止になった薬剤である。副作用の原因については不明な点も多いが、他の核内レセプターにも作用することが原因である可能性が指摘されている。

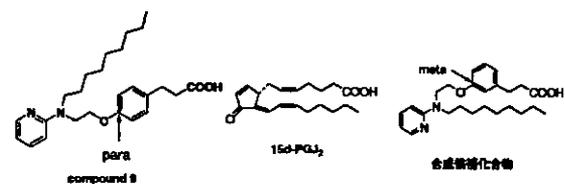
我々は、肝毒性が問題になった Troglitazone、毒性が発現しない(あるいは、低い) Rosiglitazone、Pioglitazone の構造を参考に、毒性の少ない PPAR- γ アゴニストを見いだす目的で、チアゾリジン骨格を持たない一連の PPAR- γ アゴニストの合成を行ってきた。それらの中で、Thiazolidinedione 骨格を有する化合物のもつ副作用などの問題点を回避するため、Thiazolidinedione 骨格を生物学的等価体であるカルボキシル基に置換した、3-[4-(2-aminoethoxy)phenyl]-propionic acid を基本骨格として、そのアミノ窒素に種々のヘテロ環やベンゼン環 (R^1) とアルキル基 (R^2) を組み合わせて導入した化合物を合成した。前駆脂肪細胞分化試験による生理

活性評価を行った結果、 R^1 として 2-pyridinyl、 R^2 として n -nonyl を有する化合物 (Compound 9) が最も高い活性を示すことを明らかにした (平成15年度報告書)。



また、Compound 9 (PY9) を含む新規化合物 4 種 (a-Me、c-Me、PY1、PY9) は、分担研究者二宮に提供し、遺伝子発現解析を行った (分担研究報告書 N30、参照)。Troglitazone、Rosiglitazone、Pioglitazone、および、これらの新規合成化合物について遺伝子発現を解析し相関を明らかにすることにより、より毒性の少ない PPAR- γ アゴニストの開発に有用な知見が得られることが期待できる。

本年度は、ベンゼン環上の置換基の位置をパラ位からメタ位にすることで、さらに 15d-PGJ₂ の構造に近づけることで、より高活性な PPAR γ アゴニストの創生ができると考え、引き続き新規な誘導体の合成実験を行った。



1-5 ヒト PPAR- γ に結合した合成候補化合物の構造

合成候補化合物について、ヒト PPAR- γ との結合様式を報告されているヒト PPAR- γ の結晶構造解析データに基づいて予測した。

次図に示すように、今回設計した化合物の方が Compound 9 よりもアルキル鎖の位置が 15d-PGJ₂ に近いことがわかる。

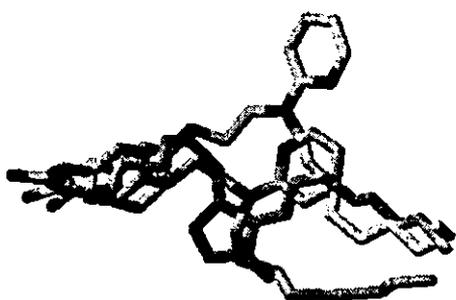


図 ヒト PPAR- γ と結合する合成候補化合物、15d-PGJ₂、及び、Compound 9 の三次元構造

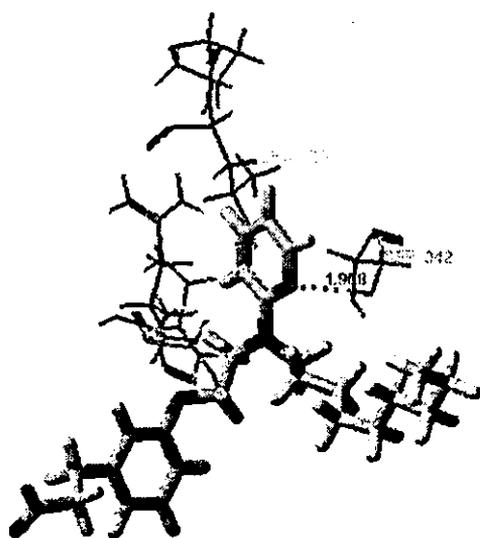
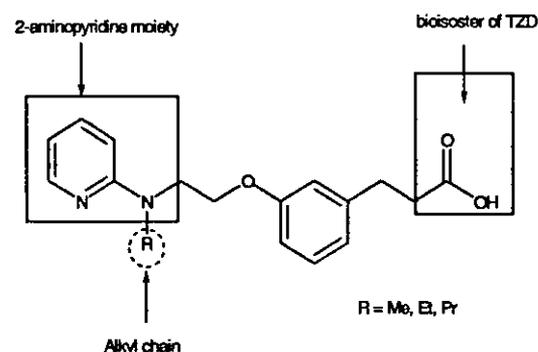


図 ヒト PPAR γ と合成候補化合物のピリジン環の窒素原子との相互作用

また 15d-PGJ₂ と rosiglitazone はピリジン環と周りのアミノ酸残基との間に相互作用は見られないが、合成候補化合物のピリジン環と周辺のアミノ酸残基との相互作用について調べてみると、Ser 342 とピリジン環の窒素原子との間に水素結合が見られ(下図)、この相互作用が活性発現に効果的である可能性がある。

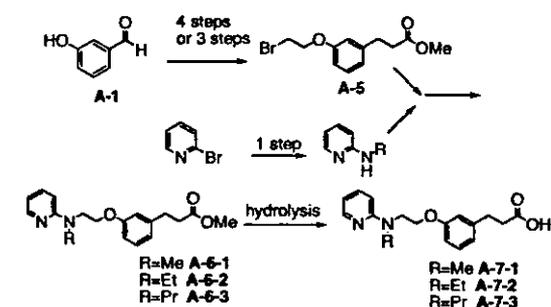
1-6 合成候補化合物の構造

合成候補化合物は、2-aminopyridine 部分と長鎖アルキル基をもち Thiazolidinedione 骨格を生物学的等価体であるカルボン酸骨格に変換した構造を有する以下に示す化合物とした。

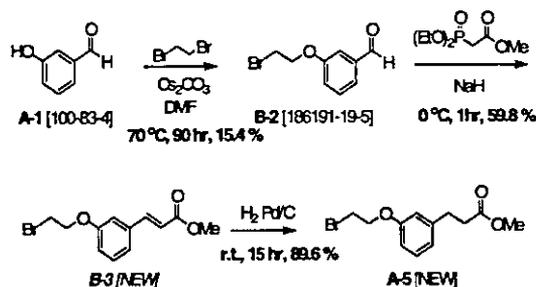


1-7 合成戦略

全体の合成スキーム全体を下図に示した。

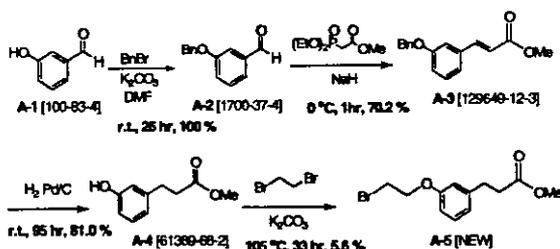


重要な中間体である A-5 を A-1 から Scheme 1 及び Scheme 2 で合成し、また 2-Bromopyridine から 2-aminopyridine 誘導体を Buchwald 反応を用いて合成し、その 2 つを S_N2 反応によって結合させることで A-6-1、A-6-3 を得た。その後、それらを加水分解することによって A-7-1、A-7-3 を合成した。



1-8 重要な中間体 A-5 の合成

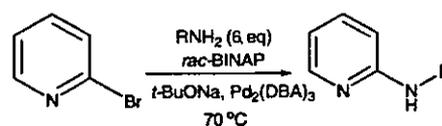
最初の方法は、最後に 1,2-dibromoethane と A-4 を S_N2 反応で結合させる方法である。A-1 の hydroxyl 基を benzyl 保護しその後、Horner-Wadsworth-Emmons 反応によって A-3 を得た。その後、接触還元を行い、二重結合の還元と Bn 基の脱保護を同時に行った。その後 1,2-dibromoethane と A-4 を S_N2 反応させることによって A-5 を得た。



二番目の方法は、最初に 1,2-dibromoethane を反応させる方法である。3-hydroxybenzaldehyde に S_N2 反応を行い B-2 を合成し、その後 Horner-Wadsworth emmons 反応によって B-3 を合成した後、これを接触還元することによって A-5 を合成した。この方法を用いることで前法に比べ 1 工程短縮でき、total の収率も向上した。

1-9 Buchwald 反応による 2-aminopyridine 誘導体の合成

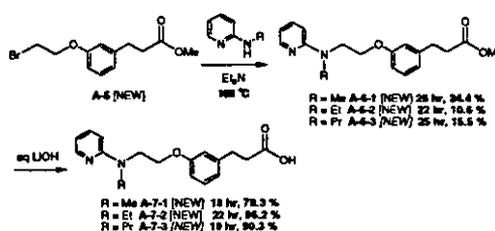
2-Bromopyridine (1 当量) に対し alkylamine を 6 当量用いることにより、副生成物の生成を抑え収率を向上させることに成功した。



R = (CH ₂) ₁₁ CH ₃ a-12 (NEW)	59 hr, 84.4 %
R = (CH ₂) ₉ CH ₃ a-10 [101259-87-4]	60 hr, 93.7 %
R = (CH ₂) ₈ CH ₃ a-9 (NEW)	21 hr, 23.0 %
R = (CH ₂) ₇ CH ₃ a-8 [34366-90-0]	22 hr, 81.9 %
R = (CH ₂) ₆ CH ₃ a-7 [24573-34-0]	47 hr, 68.6 %
R = (CH ₂) ₅ CH ₃ a-6 [100051-12-5]	51 hr, 79.8 %
R = (CH ₂) ₄ CH ₃ a-5 [24255-26-3]	20 hr, 34.6 %
R = (CH ₂) ₃ CH ₃ a-4 [33525-72-3]	17 hr, 82.1 %
R = (CH ₂) ₂ CH ₃ a-3 [45815-08-5]	17 hr, 75.0 %

1-10 最終生成物 A-7-1~A-7-3 の合成

A-5 と Buchwald 反応によって合成した 2-aminopyridine 誘導体を S_N2 反応によって結合させ A-6-1~A-6-3 を得、続いて、加水分解して A-7-1~A-7-3 を合成した。



以上、A-5 を中間体とし、Buchwald 反応によって a-3~a-10、及び a-12 を収率 23.0~93.7%で合成することに成功した。ついで、最終生成物である A-7-1 を total 1.58 %、A-7-2 を total 0.84 %、A-7-3 を total 1.15 %で合成した。

1-11 生物活性評価

現在、昨年度報告したのと同様に、CoA-BAP システムを用いて、これらの化合物と PPAR- γ との結合活性の解析、ならびに、ラット前駆脂肪細胞を用いた細胞分化誘導試験を行っている。

1-12 遺伝子発現解析試験

合成した化合物 (a-Me、c-Me、PY1、PY9 (Compound 9)) について、分担研究者二宮がプライマリーヒト細胞を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、Troglitazone、Rosiglitazone、Pioglitazone でのデータとの相関を解析した。これらの結果は、分担研究者二宮の報告書に記した。

2 ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬

世界一の長寿国となった現在の日本において、主要死因別死亡率のトップは癌である。故に今日の癌研究では、患者の quality of life (QOL)向上のため、より副作用の少ない抗癌剤の合成や探索が行われている。このような状況の中、最近注目されているのが分子標的治療薬である。最近のヒト細胞のバイオサイエンス研究の急速な進歩により、癌細胞の増殖あるいは悪性化の分子機構が明らかにされつつある。癌細胞の増殖に関与す

る分子の機能を制御することにより癌治療を行うという新しいコンセプトが癌の分子標的治療である。癌の分子標的治療薬は、癌細胞の異常増殖の原因となる分子あるいはそのシグナル伝達経路など、癌の原因により近い分子を標的とするため、従来の治療薬に比べ副作用が少ないことが期待される。現在、乳癌細胞に特異的に高発現する ErbB2 を標的とした癌抗体薬剤 trastuzumab や BCR/ABL タンパクチロシンキナーゼ阻害剤 imatinib (Fig 1) などが癌の分子標的治療薬として日本で使用されている。



Fig. 1 Structure of imatinib.

最近、癌治療における標的分子の一つとして注目されているのがヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) である。

HDAC はヒストンのアセチル化されたリシン残基からアセチル基を除去する反応を触媒し、遺伝子発現を調節する重要な酵素である。1999年に報告されたヒト HDAC ホモログである HDLP (HDAC-like protein) の結晶構造、2004年に発表されたヒト HDAC のアイソザイムの一つである HDAC8 の結晶構造から、HDAC の構造についてはある程度の知見が得られている。基質結合部位の内壁は疎水性残基によって形成され、酵素活性中心には亜鉛イオンが存在しており、それに水分子が配位していることが明らかになっている。また、この結晶構造から HDAC による

ヒストン脱アセチル化のメカニズムは次のように推定されている。まず、亜鉛及び His140 (HDAC1 の番号)により活性化された水分子が亜鉛に配位したヒストンのアセチル化されたリシン残基のカルボニル基を求核攻撃する。カルボニルの炭素は四面体構造をとり、最終的に C-N 結合の開裂が起きて、Asp191-His141 から電荷移動によりプロトンを受け取り、脱アセチル化が完結する(Fig. 2)。

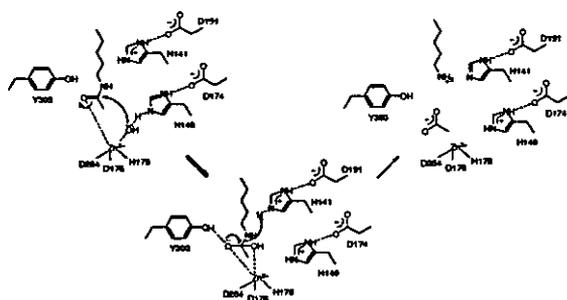


Fig. 2 Proposed catalytic mechanism of acetylated lysine (H = His, D = Asp, Y = Tyr).

2-1 HDAC 阻害薬

HDAC を阻害すると相対的にヒストンアセチル化酵素 (HAT) の働きが強くなり、ヒストンは過剰にアセチル化された状態となる (Fig.3)。このヒストンハイパーアセチレーションにより、多くの遺伝子の転写活性化が起こる。HDAC 阻害により転写活性化される遺伝子の中で最も注目されているのが癌抑制に関わる p21 遺伝子である。p21 は、cyclin-dependent kinase-2を阻害し、癌の細胞周期を停止する。このような癌抑制に関わる遺伝子の発現を制御する HDAC 阻害薬は、新たな癌の分子標的治療薬となり得る。

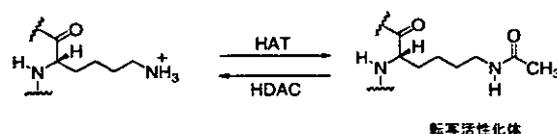


Fig.3 Mechanism of gene expression by the reversible acetylation of histone lysine residues.

これまでに報告された HDAC 阻害薬のほとんどはトリコスタチン A (TSA)¹⁾ やスベロイルアニリドヒドロキサム酸 (SAHA) (Fig.4) に代表されるようなヒドロキサム酸系化合物であり、ヒドロキサム酸が酵素活性中心にある亜鉛に配位し、基質であるアセチル化されたリシンに拮抗して阻害活性を示すと考えられている。しかしながら、一般にヒドロキサム酸を zinc-binding group (ZBG) として持つ化合物は体内動態が悪く、毒性の懸念も多い。それ故に、より体内動態の改善した抗癌剤、より副作用の少ない抗癌剤になり得る非ヒドロキサム酸系 HDAC 阻害薬の開発が望まれている。

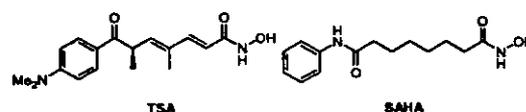


Fig.4 Structures of TSA and SAHA.

これまでに、Harvard 大学の Schreiber らが報告した *o*-アミノアニリド 1 や Abbott 社で開発されたトリフルオロメチルケトン 2、Scripps 研究所の Schultz らが見出した *N*-ホルミルヒドロキシアミン 3 などの非ペプチド系低分子化合物が HDAC 阻害活性を示すことが分かっているが (Fig.5)、それらの化合物は活性面でヒドロキサム酸系 HDAC 阻害薬を凌駕するものではない。このような背景を踏まえた上で、我々は、本研究班

において、毒性の少ない新たな癌の分子標的治療薬の開発を目的とし、非ヒドロキサム酸系 HDAC 阻害薬の創製研究を行ってきた。以下に三年間の成果をまとめて報告する。

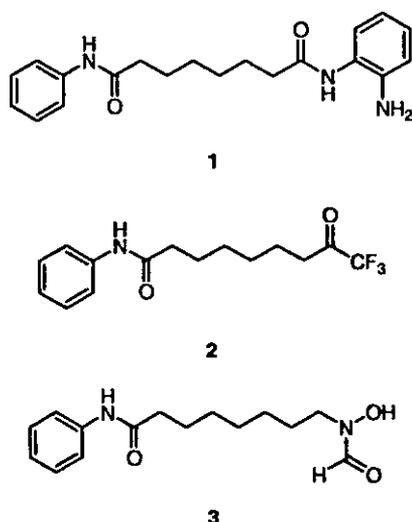
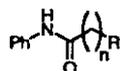


Fig.5 Previously reported non-hydroxamate HDAC inhibitors.

2-2. 非ヒドロキサム酸系 HDAC 阻害薬の設計

我々は、以下の 5 つの概念により Fig.6 に示すような非ヒドロキサム酸系 HDAC 阻害薬の設計を行った。



- | | |
|--|--|
| 4 : R = -NHCONHOH, n = 5 | 12 : R = -NHCOCH ₂ NH ₂ , n = 5 |
| 5 : R = -NHCONHNH ₂ , n = 5 | 13 : R = -NHCOCH ₂ OH, n = 5 |
| 6 : R = -SO ₂ NHOH, n = 6 | 14 : R = -NHCOCH ₂ SH, n = 5 |
| 7 : R = -SH, n = 6 | 15 : R = -NHCOCH ₂ Sac, n = 5 |
| 8 : R = -SAC, n = 6 | 16 : R = -NHCH ₂ C≡CH, n = 5 |
| 9 : R = -SMe, n = 6 | 17 : R = -N(CH ₂ C≡CH) ₂ , n = 5 |
| 10 : R = -NHSO ₂ Me, n = 5 | 18 : R = -NHCOCH ₂ Br, n = 5 |
| 11 : R = -SO ₂ Me, n = 6 | |

Fig.6

2-2-1 酵素の三次元構造を基にした設計

HDLp あるいは HDAC8 と SAHA の複合体の X 線結晶構造解析の結果から、ヒドロキ

サム酸は HDAC の活性中心にある亜鉛イオンに二座配位し、さらにチロシン及び 2 つのヒスチジン残基と水素結合することが分かっている (Fig.8)。我々は、このデータを基に、亜鉛、チロシン、ヒスチジンと同様の相互作用をされると考えられるヒドロキシウレア 4、セミカルバジド 5、ヒドロキシスルホンアミド 6 を設計した。

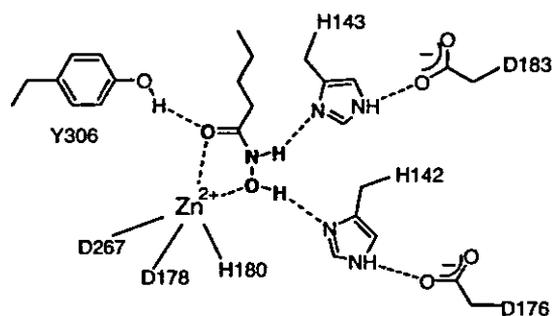


Fig.7

2-2-2 亜鉛の硫黄親和性の高さを利用した設計

亜鉛イオンは硫黄親和性が高いことが知られており、特にチオールは他の亜鉛含有酵素阻害薬で ZBG としてよく用いられる官能基である。我々は、低分子 HDAC 阻害薬でも同様の効果が期待できると考え、SAHA のヒドロキサム酸をチオールに変換した化合物 7 及びチオエステル 8、メチルスルフィド 9 を設計した。

2-2-3 遷移状態アナログの設計

HDAC の基質であるアセチル化されたリシンが HDAC により脱アセチル化される際の遷移状態構造は、アミドカルボニルが亜鉛に配位した水分子から求核攻撃を受け、テトラヘドラルな炭素を含む構造になると考えられている (Fig.2, Fig.8a)。我々は、このテトラ

ヘドラルな炭素を硫黄に置き換えた構造、すなわちスルホン誘導体が遷移状態構造に類似していることに着目し (Fig.8b), スルホンアミド 10, スルホン 11 を遷移状態アナログとして設計した。

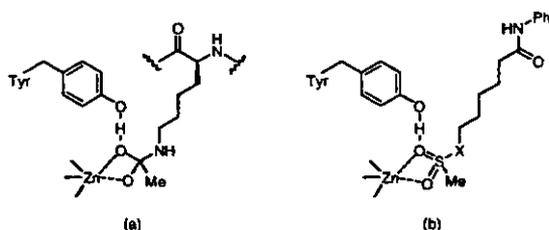


Fig.8 The transition state proposed for HDACs (a), and models for the binding of sulfone derivatives (b).

2-2-4 酵素の触媒メカニズムを基にした設計

酵素反応部位に取り込まれた基質のアセチル化されたリシンは、亜鉛に配位した水分子から求核攻撃を受け、脱アセチル化されると考えられている (Fig.2, Fig.9a)。そこで我々は、アセタミドのカルボニルの位に不対電子をもつヘテロ原子を導入すれば、その原子が亜鉛に配位することにより、脱ア

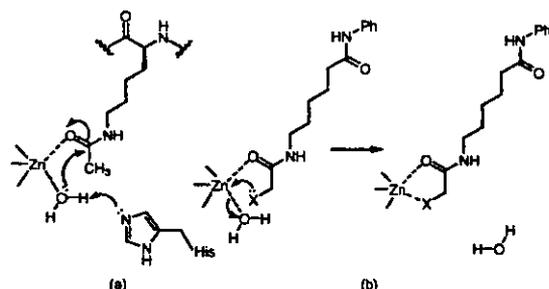


Fig.9 The mechanism proposed for the deacetylation of acetylated lysine substrate (a), and a model for the binding of hetero atom-containing substrate analogues to

zinc ion (b).

セチル化に必要な水分子を加水分解の反応点から追い出して HDAC を阻害することができると考え (Fig.9b), ヘテロ原子の置換したアセタミド 12-15 を基質アナログとして設計した。

2-2-5 不可逆的阻害を意図した設計

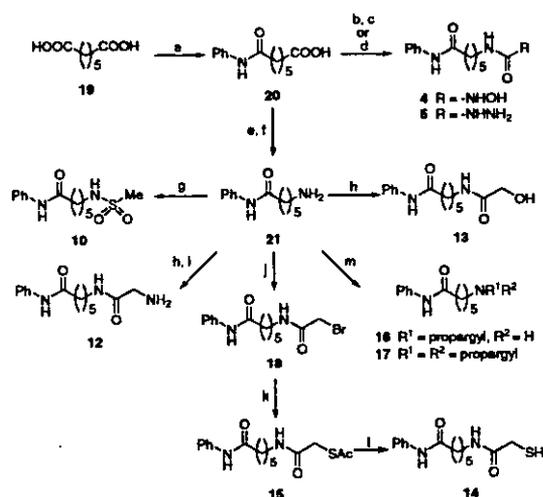
HDLP, HDAC8 の 3 次元構造から、酵素の活性中心はヒスチジンなどの求核性の高いアミノ酸から構成されていることが分かっている。我々は、それらのアミノ酸残基と共有結合を形成し、不可逆的に酵素を阻害し得る化合物としてプロパルギルアミン 16, 17, プロモアセタミド 18 を設計した。

2-3 非ヒドロキサム酸系化合物の合成

スキーム 1 に化合物 4, 5, 10, 12-18 の合成ルートを示す。化合物 4, 5 は、ジカルボン酸 19 から合成した。19 をモノアミド化した後、Curtius 転位により生成したイソシアネートに *O*-テトラヒドロピラニルヒドロキシルアミンあるいはヒドラジンを反応させ、*O*-テトラヒドロピラニルヒドロキシウレア及びセミカルバジド 5 を得た。*O*-テトラヒドロピラニルヒドロキシウレアを酸性条件で脱保護することによりヒドロキシウレア 4 を合成した。

化合物 10 及び 12-18 は、共通の中間体であるアミン 21 から合成した。まず、カルボン酸 20 を Curtius 転位を用いアミン 21 に変換し、21 をメシル化することによりスルホンアミド 10 を得た。アミノアセタミド 12 は、アミン 21 と *N*-tert-ブトキシカルボニルグリシンをカップリングさせた後、脱保護を行うことにより、またヒドロキシアセタミド 13 は、21 とグリコール酸をカップリングすることにより合成した。

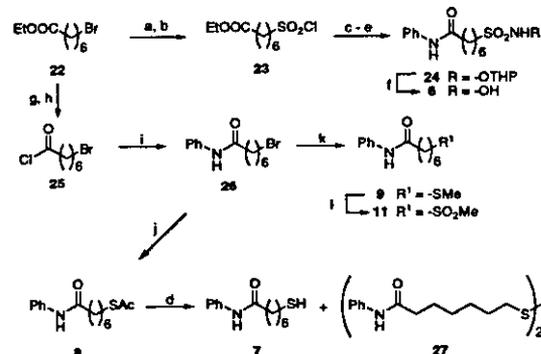
アミン 21 をプロモアセチルブロマイドと反応させ、プロモアセタミド 18 を得、つづいてポタシウムチオアセテートと反応させ、チオエステル 15 に導いた後、脱アセチル化を行い、メルカプトアセタミド 14 を得た。モノ及びジプロパルギル体 16, 17 は、アミン 21 をプロパルギルブロマイドと反応させることにより合成した。



(a) aniline, 180° C, 49%; (b) diphenylphosphoryl azide (DPPA), Et₃N, toluene, reflux, and then O-(2-tetrahydropyranyl)hydroxylamine, reflux, 69%; (c) TsOH, MeOH, rt, 32%; (d) DPPA, Et₃N, benzene, reflux, and then hydrazine monohydrate, reflux, 52%; (e) DPPA, Et₃N, benzene, reflux, and then BnOH, reflux, 63%; (f) H₂, 5%Pd-C, MeOH, rt, 96%; (g) MsCl, pyridine, rt, 71%; (h) HOCH₂COOH or BocNHCH₂COOH, EDCI, HOBt, DMF, rt, 70% for 12, 99% for 13; (i) TFA, CHCl₃, rt, 84%; (j) BrCH₂COBr, Et₃N, THF, rt, 23%; (k) AcSK, EtOH, rt, 99%; (l) K₂CO₃, MeOH, rt, 62%; (m) propargyl bromide, K₂CO₃, MeOH, rt, 51% for 16, 23% for 17.

Scheme 1

化合物 6-9 及び 11 は、スキーム 2 に従い、プロマイド 22 から合成した。22 を亜硫酸ナトリウムでスルホン酸ナトリウムに変換後、塩化チオニルにより塩化スルホニル 23 へと導いた。23 と O-テトラヒドロピラニルヒドロキシルアミンからスルホンアミドを得、エステルの加水分解、アミド化により得た 24 のテトラヒドロピラニル基を脱保護することでヒドロキシスルホンアミド 6 を合成した。チオール 7, チオアセテート 8, メチルスルフィド 9 及びスルホン 11 の合成は、以下のように行った。まず、22 を 7-プロモヘプタン酸クロライド 25 に誘導



(a) Na₂SO₃, EtOH, H₂O, reflux; (b) SOCl₂, DMF, toluene, reflux, 93% (two steps); (c) O-(2-tetrahydropyranyl)hydroxylamine, 4-(dimethylamino)pyridine, pyridine, CH₂Cl₂, rt, 94%; (d) 2N aq NaOH, EtOH, rt, 86% for 6, 87% for 7; (e) aniline, EDCI, HOBt, DMF, rt, 88%; (f) TFA, CH₂Cl₂, 60° C, 61%; (g) LiOH·H₂O, EtOH, THF, H₂O, rt, 99%; (h) (COCl)₂, DMF, CH₂Cl₂, rt; (i) aniline, Et₃N, CH₂Cl₂, rt, 87%; (j) AcSK, EtOH, reflux, 98%; (k) 15% aq NaSMe, EtOH, rt, 99%; (l) m-chloroperoxybenzoic acid, CH₂Cl₂, rt, 70%.

Scheme 2

し、アニリンと反応させることによりアミド体 26 を得た。26 のプロモ基をチオアセテートに置換し 8 を得た後、加水分解することにより、目的のチオール 7 を合成した。チオール 7 の合成の際、副産物としてジスルフィド 27 もわずかに(4%)生成した。チオアセテート 8 を合成した時と同様の置換反応によりスルフィド 9 を得、*m*-クロロ過安息香酸で酸化することによりスルホン 11 に導いた。

2-4. HDAC 阻害活性評価

2-4-1 非ヒドロキサム酸系化合物の酵素阻害活性評価

設計・合成した非ヒドロキサム酸系化合物 4-18 の HDAC 阻害活性評価は、HDAC Activity Assay/Drug discovery Kit (AK-500, BIOMOL)を用いて行った。結果を表 1 に示す。

既知の HDAC 阻害薬である SAHA と *o*-アミノアニリド 1 の IC_{50} 値は、それぞれ $0.28 \mu M$, $120 \mu M$ であった。また、トリフルオロメチルケトン 2, *N*-ホルミルヒドロキシアミン 3 は、それぞれ $6.7 \mu M$, $2.8 \mu M$ の IC_{50} 値で HDAC を阻害することが報告されている。

酵素の三次元構造を基に設計した化合物の中では、ヒドロキシウレア 4, セミカルバジド 5 に HDAC 阻害活性が見られた。しかしながら、それらの活性は、*o*-アミノアニリド 1 と同等であったものの、SAHA やトリフルオロメチルケトン 2, *N*-ホルミルヒドロキシアミン 3 には及ばなかった。

つぎに、亜鉛の硫黄親和性を利用して設計したチオール 7 の活性を調べた。チオールは一座配位で亜鉛にキレートするため、二座配位でキレートするヒドロキサム酸よりも

亜鉛への配位能は小さいと考えられている。実際に、別の亜鉛含有酵素であるマトリックスポロテイナーゼの阻害薬においては、チオール系阻害薬はヒドロキサム酸系阻害薬に比べ約 10 倍弱い酵素阻害活性しか示さないことが分かっている。しかしながら、チオール 7 は HDAC に対しては予想以上の強い阻害活性を示した。チオール 7 の HDAC 阻害活性は、 $IC_{50} = 0.21 \mu M$ と既知の非ヒドロキサム酸系阻害薬である *o*-アミノアニリド 1, トリフルオロメチルケトン 2, *N*-ホルミルヒドロキシルアミン 3 の活性を上回り、SAHA の活性と同等以上であった。S-アセチル体 8, S-メチル体 9 では活性が減弱したことから、生理条件下で生成するチオレートアニオンが亜鉛の配位に関与していることが予想された。

遷移状態アナログとして HDAC を阻害することを期待したスルホン誘導体 10, 11 では、スルホン 10 が $IC_{50} = 230 \mu M$ で HDAC を阻害したが、活性は SAHA や既知の非ヒドロキサム酸系阻害薬 1-3 には及ばなかった。

酵素の触媒メカニズムを基に設計したアセタミド 12-15 では、アミノアセタミド 12, ヒドロキシアセタミド 13 は阻害活性を示さなかったが、メルカプトアセタミド 14 に強い活性が見られた。その活性は、*o*-アミノアニリド 1, トリフルオロメチルケトン 2, *N*-ホルミルヒドロキシルアミン 3 を上回り、SAHA に匹敵した。S-アセチル体 15 では活性が低下したことから、チオール 7 の場合と同様にチオールのイオン化が活性発現の重要な要素であることが示唆された。

不可逆的阻害を意図して設計した化合物 16-18 の中では、プロモアセタミド 18 が HDAC 阻害活性を示した。しかし、活性は、

o-アミノアニリド 1 を上回ったが, SAHA には及ばなかった。

Table 1 HDAC Inhibition Data for SAHA and SAHA-based Non-hydroxamtes

$\text{Ph-N} \begin{array}{c} \text{H} \\ \diagup \\ \text{C} \\ \diagdown \\ \text{O} \end{array} \text{-(CH}_2\text{)}_n\text{R}$				
compd	R	n	% inhibn at 100 μM	IC ₅₀ (μM)
SAHA ^a	-CONHOH	6	100	0.28
1 ^c		6	48	120
2	-COCF ₃	6	ND	6.7 ^d
3		7	ND	2.8 ^e
4	-NHCONHOH	5	58	80
5	-NHCONHNH ₂	5	35	150
6	-SO ₂ NHOH	6	14	>100
7	-SH	6	100	0.21
8	-SAc	6	85	7.1
9	-SMe	6	11	>100
10	-NHSO ₂ Me	5	10	7500
11	-SO ₂ Me	6	33	230
12	-NHCOCH ₂ NH ₂	5	6	>100
13	-NHCOCH ₂ OH	5	0	>100
14	-NHCOCH ₂ SH	5	99	0.39
15	-NHCOCH ₂ SAc	5	72	22
16		6	16	>100
17		6	8	>100
18	-NHCOCH ₂ Br	6	79	14

^a Values are means of at least three experiments. ^b Prepared as described in ref 20. ^c Prepared as described in ref 12. ^d Data taken from the literature (ref 13). ^e Data taken from the literature (ref 14). ND = No Data.

以上の結果から, 低分子HDAC阻害薬において, チオール及びメルカプトアセタミドがヒドロキサム酸に匹敵する活性を持つZBGであることが分かった。これら両官能基は, 低分子HDAC阻害薬において, ヒドロキサム酸と同等の活性を示した初めてのZBGである。

2-4-2 酵素阻害機構の解析

今回我々が見出した低分子 HDAC 阻害薬は, 酵素の活性中心にある亜鉛との相互作用を意図して設計したものである。そこで, 最も高いHDAC阻害活性が見られたチオール 7 存在下での酵素反応速度の解析を行い, Lineweaver-Burk のプロットにより HDAC 阻害機構を調べた (Fig.10)。反応速度の逆数を縦軸に, 基質濃度の逆数を横軸にとり, チオール 7 の濃度を変化させてプロットしたところ, それらの直線は縦軸上で交わり, その結果, チオール 7 の HDAC 阻害機構は可逆的競合阻害であることが明らかとなった ($K_i = 0.11 \mu\text{M}$)。システインは, HDAC の基質結合部位を構成するアミノ酸には含まれていないことから, 化合物 7 のスルフィドリル基は HDAC のシステイン残基とジスルフィド結合を形成することなく, 活性中心の亜鉛と相互作用していると考えられる。

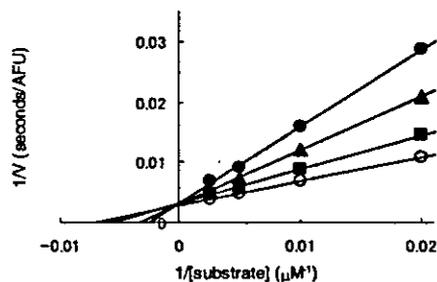


Fig.10 Reciprocal rate vs reciprocal acetylated lysine substrate concentration in the presence of 0.3 (●), 0.1 (▲), 0.03 (■), and 0 (○) μM of 7.

つぎに, Macromodel 8.1 を用い, チオール 7 の HDAC8 活性中心における安定コンホメーションを計算した (Fig.11)。チオール 7

の硫黄原子は、亜鉛から2.35Å, Tyr306のヒドロキシル基から2.24Å, His142に水素結合している水分子から2.66Åの距離に位置していることから、チオール7は、亜鉛および2つのアミノ酸残基(Tyr306, His142)と相互作用することによりHDACを阻害していると推定された。

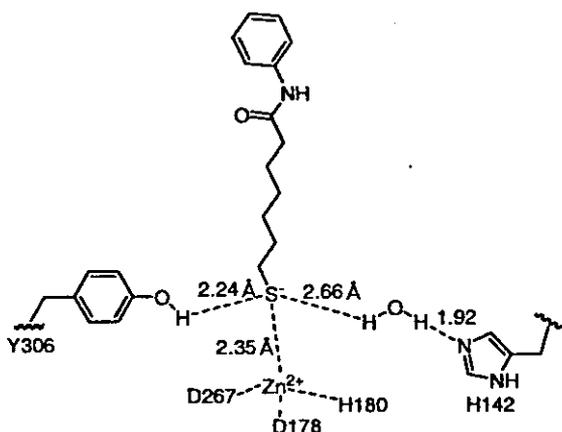


Fig.11 View of the conformation of 7 docked in the HDAC8 catalytic core.

同様に、メルカプトアセタミド14のHDAC阻害機構もLineweaver-Burkのプロットにより競合阻害であることが示された($K_i = 0.78 \mu\text{M}$) (図12)。メルカプトアセタミド14のHDAC8活性中心における安定コンホメーションを計算したところ(Fig.13),メルカプトアセタミドの酸素原子と硫黄原子が亜鉛に二座配位し(S-Zn, 2.44 Å; CO-Zn, 2.04 Å), 亜鉛に配位していた水分子が亜鉛から遠ざかった状態($\text{H}_2\text{O-Zn}$, 4.95 Å)が安定構造となった。この結果から、設計の際に期待した通り、化合物14のメルカプトアセタミドが亜鉛に配位することにより、脱アセチル化に必要な水分子を加水分解の反応点から引き離し、自身が加水分解されることなく、HDACを阻害していると考えられる。

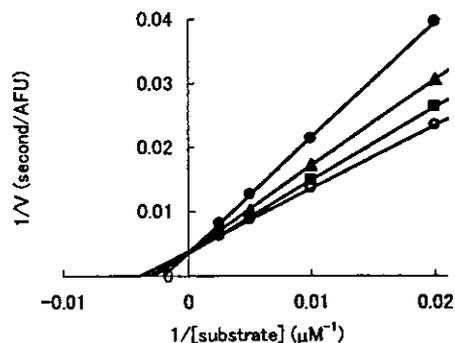


Fig.12 Reciprocal rate vs reciprocal acetyl lysine substrate concentration in the presence of 1 (●), 0.3 (▲), 0.1 (■), and 0 (○) $\cdot\text{M}$ of 14.

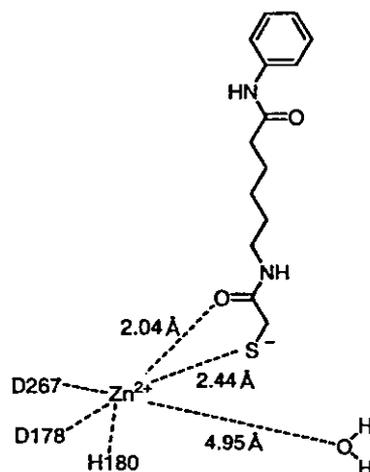
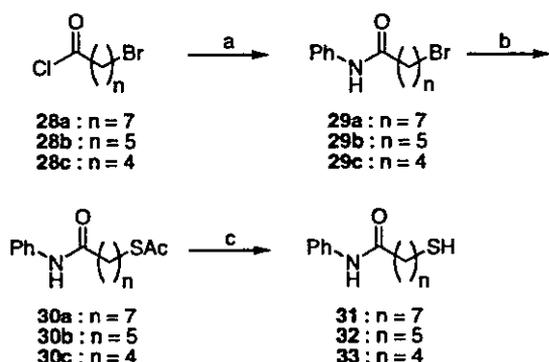


Fig.13 View of the conformation of 14 docked in the HDAC8 catalytic core.

2-4-3 チオール系 HDAC 阻害薬の構造活性相関

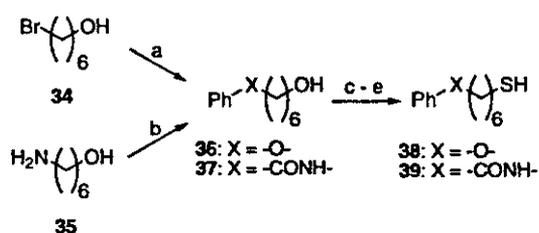
つぎに、高い活性を有するチオール7を基本構造としてリンカー部位を変換した化合物のHDAC阻害活性を調べた。7の炭素鎖の長さを変えた化合物31-33の合成は、スキーム3に示すようにチオール7の合成(スキーム2)と同じ方法で行った。7の

アミド基をエーテルに変換した化合物 38, 逆アミドに変換した化合物 39 はスキーム 4 に従って合成した。ブロマイド 34 を炭酸カリウム存在下, フェノールと反応させエーテル 36 を得, アミン 35 を安息香酸と縮合させることによりアミド 37 を得た。アルコール 36, 37 をブロマイドに変換後, ポタシウムチオアセテートを反応させ, 引き続いて加水分解することにより目的のエーテル 38, 逆アミド 39 を合成した。



(a) aniline, Et₃N, CH₂Cl₂, rt, 90–99%; (b) AcSK, EtOH, reflux, 88–96%; (c) 2N aq NaOH, EtOH, rt, 47–61%.

Scheme 3



(a) Phenol, K₂CO₃, DMF, 80° C, 96%; (b) benzoic acid, EDCI, HOBT, DMF, rt, 63%; (c) CBr₄, PPh₃, CH₂Cl₂, 0° C, 63–99%; (d) AcSK, EtOH, rt, 47–98%; (e) 2N aq NaOH,

EtOH, THF, rt, 46–64%.

Scheme 4

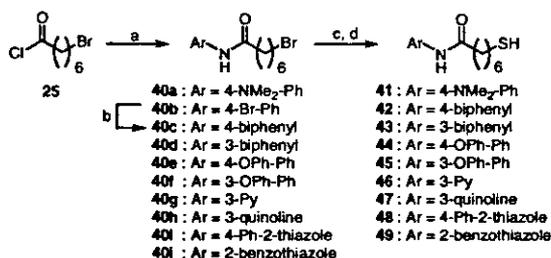
7 のリンカー部位を変換した化合物 31–33, 38, 39 の HDAC 阻害活性を評価した結果を表 2 に示した。炭素鎖の数が 6 の場合 (7) に最も強い活性を示し, 5 の場合 (32) でも活性は保持されることが分かった。炭素鎖の長さが 6 の化合物が最も強い活性を示すという結果は, ZBG がヒドロキサム酸の場合の構造活性相関と類似しており, チオール系阻害薬は, ヒドロキサム酸系阻害薬と同様の結合様式で HDAC を阻害することを示唆している。また, フェニル基と炭素鎖をつなぐアミド基をエーテルに変換した化合物 38 では活性は減弱したが, 逆アミドに変換した化合物 39 では活性は保持されることが明らかとなった。

Table 2 Effect of Linker Variation on HDAC Inhibitory Activity of Thiols^a

Ph-X-(CH ₂) _n -SH			
compd	X	n	IC ₅₀ (μM)
7	-NHCO-	6	0.21
31	-NHCO-	7	1.5
32	-NHCO-	5	0.37
33	-NHCO-	4	6.2
38	-O-	6	11
39	-CONH-	6	0.36

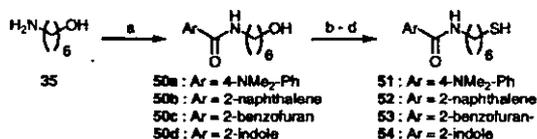
^a Values are means of at least three experiments.

つづいて, スキーム 5, 6 に従い, チオール 7, 39 のフェニル基を他の芳香環に変換した化合物 41–49, 51–54 を合成し, HDAC 阻害活性を調べた (表 3)。



(a) ArNH₂, Et₃N, CH₂Cl₂, rt, 25–99%; (b)
 PhB(OH)₂, Pd(PPh₃)₄, NaHCO₃,
 1-methyl-2-pyrrolidinone, H₂O, 80° C,
 18%; (c) AcSK, EtOH, 60° C, 84–96%; (d)
 2N aq NaOH, EtOH, THF, rt, 59–90%.

Scheme 5



(a) ArCOOH, EDCI, HOBT, DMF, rt,
 61–96%; (b) CBr₄, PPh₃, CH₂Cl₂, 0° C,
 25–89%; (c) AcSK, EtOH, rt, 86–99%; (d) 2N
 aq NaOH, EtOH, THF, rt, 28–74%.

Scheme 6

アミド構造を有する化合物(41–49)では、
 ベンゼン環の 4 位に置換基を導入した化合
 物で活性が低下する傾向にあった。具体的
 には、4-ジメチルアミノフェニル 41, 4-ビフェ
 ニル 42, 4-フェノキシフェニル 44 は、フェ
 ニル体 7 に比べ 3~10 倍活性が低下した。逆
 に、7 のベンゼン環の 3 位にフェニル基を導
 入した化合物 43 では、約 3 倍活性が上昇し
 (IC₅₀ = 0.075 μM), 同じく 3 位にフェノキシ
 基を導入した化合物 45 でも活性は保持され
 た。7 のベンゼン環を複素環に変換した化合
 物では、3-ピリジン 46, 4-フェニル-2-チア
 ザゾール 48, 2-ベンゾチアゾール 49 で活性が

Table 3 Effect of Aromatic Group Variation on HDAC Inhibitory Activity of Thiols^a

compd	Ar	X	IC ₅₀ (μM)
7	Ph-	-NHCO-	0.21
41		-NHCO-	1.2
42		-NHCO-	1.1
43		-NHCO-	0.075
44		-NHCO-	0.62
45		-NHCO-	0.21
46		-NHCO-	0.11
47		-NHCO-	0.072
48		-NHCO-	0.17
49		-NHCO-	0.34
39	Ph-	-CONH-	0.36
51		-CONH-	0.61
52		-CONH-	0.085
53		-CONH-	0.079
54		-CONH-	0.10

^a Values are means of at least three experiments.

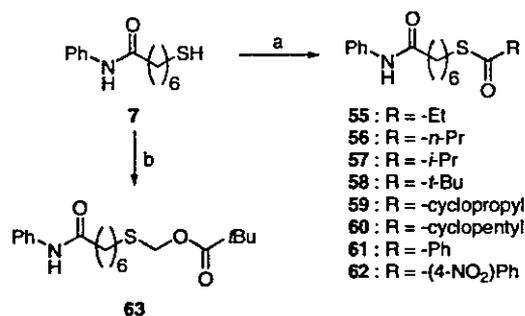
保持,あるいは、やや上昇したという結果に
 対し、3-キノリン 47 が IC₅₀ = 0.072 μM と、ア
 ミド化合物の中で最も強い HDAC 阻害活性
 を示した。逆アミド構造を有する化合物
 (51–54) では、4-ジメチルアミノフェニル体
 51 を除いた 3 つの化合物 52, 53, 54 でフェ
 ニル体 39 よりも強い活性が見られた。特に、
 ナフタレン置換した化合物 52, ベンゾフラン

置換した化合物 53 では、フェニル体 39 に比べ約 4 倍の活性上昇を示した(それぞれ、 $IC_{50} = 0.085 \mu M$, $0.079 \mu M$)。結果として、3-ビフェニル体 43, 3-キノリン体 47, 2-ナフトレン体 52, 2-ベンゾフラン体 53 は、SAHA と比較して 3~4 倍強い HDAC 阻害活性を示した。

2-5. チオール系 HDAC 阻害薬の癌細胞増殖抑制活性評価

2-5-1 チオール 7 及びその誘導体の癌細胞増殖阻害作用

チオール系 HDAC 阻害薬の抗癌剤としての有効性を確かめるため、癌細胞増殖抑制試験を行った。まずチオール 7 の癌細胞増殖抑制試験を行った。癌細胞には、肺癌細胞である NCI-H460 細胞を用いた。その結果、チオール 7 は NCI-H460 細胞に対し、 $50 \mu M$ でわずか 34%の阻害作用しか示さなかった。チオール 7 は強い HDAC 阻害活性を示すにもかかわらず癌細胞増殖抑制試験で弱い増殖阻害活性しか示さなかった原因の一つとして、チオール 7 の細胞膜透過性の低さが考えられる。そこで、チオール 7 を S-アシル化あるいは S-アルキル化してプロドラッグ体を合成し(スキーム 7), それらの癌細胞増殖抑制効果を調べた。

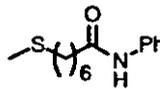
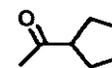


(a) RCOCl, 4-(dimethylamino)pyridine, pyridine, CH₂Cl₂, rt, 68–99%; (b) NaH, chloromethyl pivalate, DMF, 0° C to rt, 32%.

Scheme 7

プロドラッグ化体の癌細胞増殖抑制試験の結果を表 4 に示す。細胞内の還元条件下でチオール 7 を生成することが期待されたジスルフィド 27 は、チオール 7 に比べ活性が減弱したが、S-アシル化した化合物 8, 55–62 でチオール 7 を上回る活性が見られた。特に S-イソブチリル体 57 が $EC_{50} = 20 \mu M$ と最も強い活性を示した。化合物 57 自身の HDAC 阻害活性は、 $IC_{50} = 56 \mu M$ とチオール 7 ($IC_{50} = 0.21 \mu M$) よりも約 270 倍小さいことから、S-アシル化体は、チオール体に比べ脂溶性が高いため細胞膜をより効率的に透過し、細胞内で加水分解され強い HDAC 阻害活性を持つチオール 7 に変換されたと考えられる。また、S-ピバル酸メチル化した化合物 63 にも活性が見られたが、その活性は S-イソブチリル体 57 に比べやや弱かった。

Table 4 Cell Growth Inhibition Data on NCI-H460 Cells for Compound 7 and its S-Modified Prodrugs^a

compd	R	EC ₅₀ (μM)
7	-H	>50 ^b
27		>50 ^c
8	-Ac	36
55	-COEt	28
56	-CO <i>n</i> -Pr	22
57	-CO <i>i</i> -Pr	20
58	-CO <i>t</i> -Bu	>50 ^d
59		27
60		21
61	-Bz	25
62		24
63	-CH ₂ OCO <i>t</i> -Bu	25

^a Values are means of at least two experiments. ^b 34% inhibition at 50 μM. ^c 10% inhibition at 50 μM. ^d 42% inhibition at 50 μM.

つぎに、表 3 で示した強い HDAC 阻害活性を持つ化合物のスルフィドリル基をイソブチリル化した化合物 64-72 を合成し(スキーム 8), それらの NCI-H460 細胞に対する増殖抑制活性を調べた(表 5)。



43 : Ar = 3-biphenyl, X = -NHCO-
 45 : Ar = 3-OPh-Ph, X = -NHCO-
 46 : Ar = 3-Py, X = -NHCO-
 47 : Ar = 3-quinoline, X = -NHCO-
 48 : Ar = 4-Ph-2-thiazole, X = -NHCO-
 49 : Ar = 2-benzothiazole, X = -NHCO-
 52 : Ar = 2-naphthalene, X = -CONH-
 53 : Ar = 2-benzofuran, X = -CONH-
 54 : Ar = 2-indole, X = -CONH-
 64 : Ar = 3-biphenyl, X = -NHCO-
 65 : Ar = 3-OPh-Ph, X = -NHCO-
 66 : Ar = 3-Py, X = -NHCO-
 67 : Ar = 3-quinoline, X = -NHCO-
 68 : Ar = 4-Ph-2-thiazole, X = -NHCO-
 69 : Ar = 2-benzothiazole, X = -NHCO-
 70 : Ar = 2-naphthalene, X = -CONH-
 71 : Ar = 2-benzofuran, X = -CONH-
 72 : Ar = 2-indole, X = -CONH-

(a) isobutyryl chloride, 4-(dimethylamino)-
 (b) pyridine, pyridine, CH₂Cl₂, rt, 77-99%.

Scheme 8

その結果、化合物 65 を除く全ての化合物でフェニル体 57 を上回る活性が見られ、特に 3-ビフェニル 64, 3-ピリジン 66, 4-フェニル-2-チアゾール 68 では EC₅₀ 値が 2~3 μM と高い活性を示した。

Table 5 Cell Growth Inhibition Data on NCI-H460 Cells for Compound 57 and its derivatives^a

compd	Ar	X	EC ₅₀ (μM)
57	Ph-	-NHCO-	20
64		-NHCO-	2.8
65		-NHCO-	25
66		-NHCO-	2.9
67		-NHCO-	8.0
68		-NHCO-	2.1
69		-NHCO-	9.5
70		-CONH-	12
71		-CONH-	4.1
72		-CONH-	12

^a Values are means of at least two experiments.

NCI-H460 細胞に対し最も強い増殖抑制活性を示した化合物 68 及び SAHA について、さらに 9 種類の癌細胞に対する増殖抑制活性評価を行った。癌細胞には、乳癌細胞である MDA-MB-231 細胞、脳腫瘍細胞である SNB-78 細胞、大腸癌細胞である HCT116 細胞、肺癌細胞である NCI-H226 細胞、メラノーマ細胞である LOX-IMVI 細胞、卵巣癌細胞である SK-OV-3 細胞、腎癌細胞である RXF-631L 細胞、胃癌細胞である St-4 細胞、前立腺癌細胞である DU-145 細胞を用いた(表 6)。その結果、化合物 68 は、9 種類全ての癌細胞に対し増殖阻害活性を示し、その活性は現在臨床開発が進められている SAHA に匹敵するものであった (SAHA の平均 $EC_{50} = 3.7 \mu M$, 68 の平均 $EC_{50} = 3.8 \mu M$)。

Table 6 Growth Inhibition of Various Cancer Cells Using SAHA and Compound 68

cell		SAHA EC_{50} (μM)	68 EC_{50} (μM)
MDA-MB-231	Breast Cancer	1.5	2.3
SNB-78	Central Nervous System	16	9.1
HCT116	Colon Cancer	0.58	3.0
NCI-H226	Lung Cancer	2.6	2.6
LOX-IMVI	Melanoma	1.3	1.1
SK-OV-3	Ovarian Cancer	2.5	4.5
RXF-631L	Renal Cancer	2.0	2.4
St-4	Stomach Cancer	5.2	5.0
DU-145	Prostate Cancer	1.6	4.5
mean		3.7	3.8

^a Values are means of at least two experiments.

2-5-2 化合物 68 の癌細胞増殖阻害機構

先に述べたように、HDAC 阻害薬により HDAC の機能を停止させると相対的に HAT の働きが強くなり、ヒストンは過剰にアセチル化された状態となる(図 3)。このヒストンのハ

イパーアセチレーションにより、癌抑制に関わる p21 遺伝子の転写活性化が起こることが知られている。そこで、化合物 68 の癌細胞増殖抑制作用が細胞内の HDAC 阻害に依るものであることを確かめるため、ウエスタンブロット解析によりヒストンの高アセチル化及び p21^{WAF1/CIP1} の誘導を調べた(図 14)。その結果、化合物 68 は、用量依存的にヒストンを高アセチル化し、p21^{WAF1/CIP1} を誘導していることが分かった。この結果から、化合物 68 の癌細胞増殖阻害作用は、細胞内の HDAC 阻害に関与していることが示唆された。

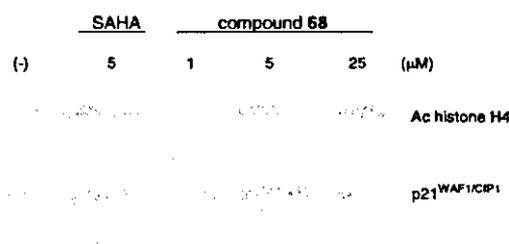


Fig.14. Western blot analysis of histone hyperacetylation and p21^{WAF1/CIP1} induction in HCT 116 cells produced by compound 68 and by reference compound SAHA.

以上の結果、チオール系 HDAC 阻害薬のプロドラッグ化体が分子標的治療薬として有用性が高いことが示唆される。

2-6 プライマリーヒト細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析

接着型凍結プライマリーヒト肝細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析実験を行った。被験物質としては、SAHA、および、チオール系活性化合物 7 (HDAI-1) と化合物 43 (HDAI-2)、プロドラッグ化合物 66 (HDAI-3) と 68 (HDAI-4) を用いた。実験は、分担研究

者である二宮が担当した。

C. 結論と考察

本研究事業では、新規技術による長期培養可能なプライマリーヒト肝・腎細胞を用いて、薬剤曝露時の網羅的な遺伝子発現解析を行い、毒性発現に係わる遺伝子群の同定、ならびに、遺伝子発現パターンの解析を行ってきた。さらに、薬剤の構造修飾が遺伝子発現に及ぼす影響の解析を行い、より安全性の高い薬物を得るための知見を得ることを目的として基盤的な実験を行った。また、ヒトでの安全性の高い薬剤を開発する目的で、実験動物から得られた遺伝子発現データをヒトへ外挿するための基本手法の開発を行い、薬剤の副作用の回避あるいは軽減するための評価法の確立を目指した。

分担研究者宮田は、肝毒性が報告されている薬剤としてインスリン非依存型糖尿病治療薬として使用されたことのある Troglitazone、および、毒性が軽減されて上市されている Rosiglitazone、Pioglitazone を母骨格とし、チアゾリジン骨格を持たない II 型糖尿病治療薬の開発を目指し、50 を超す新規化合物を合成した。これらの化合物の生物活性を調べるために、前駆脂肪細胞を用いる定量的スクリーニングに加えて、PPAR- γ 受容体との結合性を *in vitro* スクリーニング系で直接評価する系を導入し、活性評価を行った。その結果、Compound 9 をはじめとする多くの活性物質を見いだすことができた。特に、昨年度見いだした Compound 9 の活性は Rosiglitazone に匹敵する前駆脂肪細胞の分化誘導作用があることから、今年度は、より活性の増加と安全性の増大を目指し、Compound 9 の更なる構造

修飾を行った。特に、構造修飾に際しては、PPAR- γ の内因性の基質プロスタグランジンの構造との類似性を高める化合物を設計した。今年度に新たに合成した化合物については、現在、活性評価中である。また、昨年度までに合成した高活性化合物 (a-Me、c-Me、PY1、PY9 (Compound 9) については、Troglitazone、Rosiglitazone、Pioglitazone を加え、分担研究者二宮が、プライマリーヒト細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析実験を行った。その結果、これらの PPAR- γ 作動薬の遺伝子発現は、共通するクラスターを形成した (分担研究報告書、N24,25,26 参照)。現在、毒性指標となる発現遺伝子の解析を進めている。

また、遺伝子発現を制御し新しいタイプの分子標的抗がん剤になることが期待されているヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤については、既知の阻害剤である SAHA をモデルにして、HDAC の活性部位の構造と触媒反応機構に着目した新規阻害剤の設計を行い、70種類以上の新規化合物を合成した。これらについて、HDAC 阻害活性を調べた結果、化合物68など SAHA に優る活性を持つ HDAC 阻害活性を見いだすことができた。SAHA、および、チオール系活性化合物7 (HDAI-1) と化合物 43 (HDAI-2)、プロドラッグ化合物 66 (HDAI-3) と 68 (HDAI-4) について、分担研究者二宮が接着型凍結プライマリーヒト肝細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析実験を行い、1 時間処理ではそれほど多くの発現変動は見受けられなかったが、4 時間処理では SAHA および新規合成化合物において非常に多くの遺伝子の発現変動が観察された。発現変動した遺伝子の中には、発現抑制される遺伝子が

多かった。我々が合成した化合物においても、SAHA 処理と共通した遺伝子が発現しており、これらの薬剤がヒストン脱アセチル化酵素を阻害する効果によって起こる遺伝子発現変化が似ていることを示す。現在、毒性指標となる遺伝子の解析を進めている。HDAC 阻害剤による遺伝子発現制御は、非常に顕著であり、これまで、このように遺伝子発現を大きく変化させた薬剤はなく大変興味を持たれる。今後の更なる解析によって遺伝子発現制御に関わる遺伝子の同定ならびに抗がん活性に関わる遺伝子を同定することも期待できる。

薬剤の構造修飾が遺伝子発現パターンに及ぼす影響の解析は、毒性が少なくより有効な医薬品の創製にも有用な知見を与えることが期待できる分野である。本研究で得られた遺伝子発現解析のデータと実験動物を用いた遺伝子発現解析のデータを比較し、ヒトへの外挿を行うための基本手法の開発を行うことにより、プロテオーム解析による安全性・有効性評価のための新たな診断マーカーを見つけることも期待できる。

また、本研究の成果は、ゲノム創薬の根幹となる薬剤の毒性発現に係わるヒトでの遺伝子発現情報が収集できるようになることが期待される。医薬品候補化合物等について迅速・効率的にヒトでの安全性の予測が可能になれば、安全性が高い薬剤の開発するためのトキシコゲノミックスの基盤技術開発に資することができるかと確信している。

D. 健康危険情報

なし。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Novel inhibitors of human histone deacetylases: design, synthesis, enzyme inhibition, and cancer cell growth inhibition of SAHA-based non-hydroxamates, Takayoshi Suzuki, Yuki Nagano, Akiyasu Kouketsu, Azusa Matsuura, Sakiko Maruyama, Mineko Kurotaki, Hidehiko Nakagawa, and Naoki Miyata, *J. Med. Chem.*, **48**, 1019-1032 (2005).
- 2) Design, synthesis and biological activity of novel PPAR γ ligands based on rosiglitazone and 15d-PGJ $_2$, Shinya Usui, Takayoshi Suzuki, Yoshifumi Hattori, Kazuma Etoh, Hiroki Fujieda, Makoto Nishizuka, Masayoshi Imagawa, Hidehiko Nakagawa, Kohfuku Kohda, and Naoki Miyata, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **15**, 1545-1551 (2005).
- 3) Identification of a potent non-hydroxamate histone deacetylase inhibitor by mechanism-based drug design, Takayoshi Suzuki, Azusa Matsuura, Akiyoshi Kouketsu, Hidehiko Nakagawa, Naoki Miyata, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **15**, 331-335 (2005).
- 4) Thiol-based SAHA analogues as potent histone deacetylase inhibitors, Takayoshi Suzuki, Akiyasu Kouketsu, Azusa Matsuura, Arihiro Kohara, Shin-ichi Ninomiya, Kohfuku Kohda, Naoki Miyata, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **14**(12), 3313-3317(2004).
- 5) Product Analyses of Ozone Mediated

- Nitration of Benzimidazole Derivatives with Nitrogen Dioxide: Formation of 1-Nitrobenzimidazoles and Conversion to Benzotriazoles, Toyo Kaiya, Kei Nakamura, Masaru Tanaka, Naoki Miyata, Kohfuku Koda, *Chem. Pharm. Bull.*, **52**(5), 570-576(2004).
- 6) Oxidative DNA damage induced by carcinogenic dinitropyrenes in the presence of P450 reductase, Mariko Murata, Shiho Ohnishi, Kazuharu Seike, Kiyoshi Fukuhara, Naoki Miyata, Shosuke Kawanishi, *Chem. Res. Toxicol.*, **17**(12), 1750-1756 (2004).
- 7) 1-Amino-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-amino-4-phenylpyridinium salt, the 1-amino analogues of neurotoxins, MPTP and MPP⁺, induce apoptosis in PC12 cells: Detection of apoptotic cells by comet assay and flow cytometric analysis, Yasuhiro Noda, Tomoe Sumino, Yuki Fujisawa, Naoki Miyata, Toyo Kaiya, Kohfuku Kohda, *In vivo*, **18**, 561-570 (2004).
- 8) An HPLC assay of hydroxyl radicals by the hydroxylation reaction of terephthalic acid., Linxiang Li, Yoshihiro Abe, Yukiko Nagasawa, Risa Kudo, Noriko Usui, Kazuhiro Imai, Tadahiko Mashino, Masataka Mochizuki, Naoki Miyata, *Biomedical Chromatography*, **18**(7), 470-474 (2004).
- 9) Associations between chemical properties and oxidative damage due to nitrophenanthrenes and their related compounds in primary rat hepatocytes, Nobuyuki Sera, Hiroshi Tokiwa, Hideo Utsumi, Shigeki Sasaki, Kiyoshi Fukuhara, Naoki Miyata, *Polycyclic Aromatic Compounds*, **24**(4-5), 487-500 (2004).
- 10) Design and synthesis of cyclic urea compounds: a pharmacological study for retinoidal activity, Masaaki Kurihara, Abu Shara Shamsur Rouf, Hisao Kansui, Hiroyuki Kagechika, Haruhiro Okuda, Naoki Miyata, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **14**(16), 4131-4134 (2004).
- 11) Synthesis of C60 derivatives for photoaffinity labeling, Eiji Okada, Yuka Komazawa, Masaaki Kurihara, Hideshi Inoue, Naoki Miyata, Haruhiro Okuda, Toshie Tsuchiya, Yoko Yamakoshi, *Tetrahedron Letters*, **45**(3), 527-529 (2004).
- 12) Distinguishing the 5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide (DMPO)-OH radical quenching effect from the hydroxyl radical scavenging effect in the ESR spin-trapping method, Linxiang Li, Yoshihiro Abe, Kiyotada Kanagawa, Noriko Usui, Kazuhiro Imai, Tadahiko Mashino, Masataka Mochizuki, Naoki Miyata, *Analytical Chimica Acta*, **512**, 121-124(2004).
- 13) Design and efficient synthesis of 2alpha-(omega-hydroxy)-1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 analogues, including 2-epi-ED-71 and their 20-epimers with HL-60 cell differentiation activity, Nozomi Saito, Yoshitomo Suhara, Masaaki Kurihara, Toshie Fujishima, Shinobu