HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	フェノタイプ及びターゲットベースドスクリーニングによる新規ヘモグロビン症治療薬の創製 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	片山, 勝史
Citation	北海道大学. 博士(薬科学) 乙第7139号
Issue Date	2021-09-24
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/83485
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Katsushi_Katayama_abstract.pdf (論文内容の要旨)

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称　博士（薬 科 学）氏　名　　片山　勝史

学 位 論 文 題 名

フェノタイプ及びターゲットベースドスクリーニングによる
新規ヘモグロビン症治療薬の創製

β-サラセミアと鎌状赤血球症（SCD）は、ヘモグロビンの β-グロビン鎖の構造と産生に影響を及ぼし、それによって重度の溶血性貧血を引き起こす単一遺伝子性ヘモグロビン症である。β-サラセミアは、ヘモグロビン A（HbA; α2β2）の主成分の 1 つである β-グロビン鎖の合成の低下または欠如を特徴とする単一遺伝子障害である。一方、SCD では、β-グロビン遺伝子置換（$\beta6^{Glu\rightarrow Val}$）により生じる鎌状赤血球ヘモグロビン（HbS; $\alpha2\beta^{s}2$）が脱酸素状態となり、溶血と血管閉塞が引き起こされる。一般に、ヘモグロビンは 2 つの α-および β-グロビン鎖から構成されるヘテロ四量体であり、成人の血液中の酸素を運ぶ役割を果たすが、新生児では β-グロビン鎖の代わりに γ-グロビン鎖が赤血球の主要な α-グロビン対応物であり、胎児ヘモグロビン（HbF）の形成をもたらす。そして、出生後すぐに、γ-グロビンはグロビンスイッチングと呼ばれるプロセスによって β-グロビンに置き換えられる。臨床研究では、赤血球での HbF 産生の増加が β-サラセミアと SCD の疾患進行の改善につながることが示されているため、HbF 産生を増加させる治療薬は、ヘモグロビン症患者の臨床的罹患率と死亡率を低下させるための重要な治療戦略となっている。そこで筆者は、フェノタイプ及びターゲットベースドスクリーニングによる 2 つのアプローチにより HbF を誘導させる新規 β-サラセミアおよび鎌状赤血球症治療薬の獲得を目指し、研究に着手した。

① フェノタイプスクリーニングによる *In vivo* で HbF 誘導効果を示す化合物の獲得

まず、ヒト赤芽球細胞株 HUDEP-2 細胞を用いたフェノタイプスクリーニングを社内化合物ライブラリ約 18000 化合物に対して実施し、HbF 誘導活性を評価したところ、イソオキサゾールを母格に有するヒット化合物を取得した。ヒット化合物は、分子量が 305 g/mol で $logD_{7.4}$=1.4 と好ましい物理化学的特性を示したものの、サル肝ミクロソーム中での代謝安定性が低く（10%）、サルの薬物動態（PK）プロファイルが悪かった。したがって、薬理活性を保持しながら、PK プロファイルを改善させた新規誘導体の獲得を目指すこととした。

各部位の構造活性相関を検討したところ、イソオキサゾール部分とジメチルアミド部分の間のリンカー部周辺はメチル基やジメチル基を導入すると活性が減弱し、活性を示すスペースが狭いことが明らかとなった。そこで、活性及び物性向上を目指して、立体障害の小さい細長い置換基であり、かつコンフォメーションの固定化した 2-アザスピロ[3.3]ヘプタン誘導体を設計した。期待通り、2-アザスピロ誘導体は HbF 誘導活性を保持したままサル肝ミクロソームにおける代謝安定性が 64%と改善した。さらにサルにおける PK 試験（1 mg/kg, po）においても、高い最大血漿曝露（AUC_{last} = 4212 ng*h/mL）と長い消失半減期（$t_{½}$ = 3.7 h）を示し、スピロ構造の PK プロファイルに関する優位性が確認された。

次に、2-アザスピロ誘導体のこの良好な PK プロファイルに基づき、正常なカニクイザルを用いて *in vivo* 試験にて HbF 誘導活性を評価した。その結果、2-アザスピロ誘導体は用量依存的に HbF を誘導し、30 mg/kg での vehicle 対照群と比較して統計的に有意な誘導を示すことがわかった。

以上より、ヒット化合物からフェノタイプスクリーニングにより合成展開を実施し、より剛性が高く、ユニークな構造を持つ 2-アザスピロ[3.3]ヘプタン誘導体を取得する事ができた。2-アザスピロ誘導体は、活性を保持しつつ良好な代謝安定性と好ましい PK プロファイルを示し、*in vivo* 試験においても用量依存的に γ-グロビン遺伝子発現を誘導した。

② HbF 誘導効果を示す新規 G9a/GLP 阻害作用の獲得

次に、ターゲットベースのアプローチにより新規 HbF 誘導薬の取得を目指し、ターゲットとしてヒストンメチルトランスフェラーゼ（HMT）である G9a と GLP に着目した。2015 年に Renneville らは、G9a と GLP の個々の遺伝子ノックダウンが HbF 産生を誘導することを明らかとした。したがって、HbF 産生を誘導できる強力な G9a/GLP 阻害剤の開発は、β-サラセミアおよび SCD を治療するための標的アプローチとなる可能性があると考えられる。現在までに多様な G9a/GLP 阻害剤が数多く報告されているが、筆者は Epizyme 社より報告された EPZ035544 を出発化合物として強力な新規 G9a/GLP 阻害剤の創製を目指すこととした。

社内の *in vitro* アッセイを用いて EPZ035544 の G9a と GLP の阻害活性を評価したところ、それぞれ IC_{50} 値 16.9, 185 nM の阻害活性を示した。しかし、ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）阻害活性を示すとともに（10 μM で 42%阻害）、マウス PK プロファイルは良好ではなかった（バイオアベイラビリティ 17%）。したがって、筆者は G9a/GLP 阻害活性を保持しながら、hERG 阻害活性及び PK プロファイルが改善された化合物の獲得を目指した。

合成展開を開始する前に、EPZ035544 の最安定配座を Maestro によって計算したところ、EPZ035544 の側鎖である 3-（ピロリジン-1-イル）プロポキシ基は真っ直ぐ伸びており、Aronov が提唱する hERG ファーマコフォアモデルに含まれていることがわかった。一方、EPZ035544 と G9a の共結晶構造においては、上記側鎖は真っ直ぐに伸びるのではなく丸く歪んでいることがわかった。以上のことから、まず側鎖を環化して固定化した誘導体を設計・合成することとした。その結果、7 員環に環化したテトラヒドロアゼピン体は期待通り、hERG 阻害活性が 10 μM でも 1%の阻害にとどまり、EPZ035544（42%@10 μM）より改善した。これは、テトラヒドロアゼピン体の側鎖が環化して固定化されることで、Aronov の hERG ファーマコフォアモデルから外れたためだと示唆された。また、テトラヒドロアゼピン体は、EPZ035544 と比較して G9a に対して 4 倍、GLP に対して 6 倍活性が向上した。

次に、テトラヒドロアゼピン基の汎用性を調べるために、この側鎖を既知の G9a/GLP 阻害剤の中心骨格に種々導入した。すなわち、テトラヒドロアゼピン基をキノリン誘導体、インドール誘導体、ベンズイミダゾール誘導体に導入したところ、いずれも G9a/GLP 阻害活性を示し、かつ hERG 阻害活性も改善した。このことより、テトラヒドロアゼピン側鎖は、様々な中心骨格に対しても適用可能で汎用性があることを明らかとした。次に筆者は、スピロ[シクロブタン-1,3’-インドール]-2’-アミノ誘導体に焦点を当て、G9a/GLP 阻害活性を保持しながら PK プロファイルが改善された新規化合物の獲得を目指した。その結果、インドール誘導体の構造活性相関を検討し、強い G9a/GLP 阻害活性を示す DS79932728 を得た。DS79932728 は、サルの PK 試験においても良好な PK プロファイルを示し、経口投与による *in vivo* サル薬効試験に適したプロファイルを持つことを確認した。

次に、静脈切開されたカニクイザルモデルを用いて、*in vivo* 試験にて DS79932728 の γ-グロビン産生の誘導を評価したところ、DS79932728（15 mg/kg, bid）は、HU（35 mg/kg, qd; 臨床的に使用される最高用量に相当）と同等の薬効を示した。筆者の知る限り、DS79932728 はカニクイザルモデルで γ-グロビン産生の誘導を示した最初の G9a/GLP 阻害剤となった。

以上より、フェノタイプスクリーニングによる研究では *in vivo* 試験にて HbF 誘導活性を示す 2-アザスピロ[3.3]ヘプタン誘導体を取得し、ターゲットベースドスクリーニングによる研究では新規 G9a/GLP 阻害剤 DS79932728 を創出した。臨床現場では、HU の細胞毒性などの問題を解決した安全で効果的な新規 HbF 誘導剤が求められており、本研究で得られた知見は β-サラセミアおよび SCD の治療薬の開発に役立つと期待される。