



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	新規EP300/CBPアセチルトランスフェラーゼ阻害薬DS-9300の創製研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	金田, 龍太郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	乙第7185号
Issue Date	2023-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90918
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Ryutaro_Kanada_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 金田 龍太郎

学位論文題名

新規 EP300/CBP アセチルトランスフェラーゼ阻害薬 DS-9300 の創製研究

EP300/CBP (E1A-associated protein p300/CREB-binding protein) は Histone Acetyltransferase (HAT) の一種であり、ヒストンのリジン残基をアセチル化することで遺伝子の発現を制御する他、転写コアクチベーターとして機能し、多数のヒストン修飾タンパク質及び核内受容体と結合して多様なシグナル伝達経路の制御に関与している。EP300/CBP の過剰発現や変異は多くの腫瘍で認められ、がんの発生や進展に深く関与していることが報告されており、その阻害薬は新たながん治療の有望な選択肢の一つとなることが期待されている。実際に、EP300/CBP のプロモドメイン阻害薬は複数の薬剤が血液がん、前立腺がん等を対象として臨床試験が進められている。一方で、プロモドメインと同様にがん治療の有望な標的として認識されている HAT ドメインを阻害する薬剤は複数の報告があるものの、選択性や細胞膜透過性、薬物動態に課題があり、*in vivo*、特に経口投与における EP300/CBP HAT 阻害薬の作用が十分に検討されていなかった。そこで私はインシリコスクリーニング及びハイスループットスクリーニング (HTS) を手掛かりとして経口投与可能な選択的 EP300/CBP HAT 阻害薬の獲得を目指し、研究に着手した。

① 4-ピリドン-3-カルボン酸骨格を有する新規 EP300/CBP HAT 阻害薬の合成と構造活性相関

まず、公開されている EP300/Lys-CoA 二者複合体の X 線結晶構造及び EP300/C646 のドッキングモデルの解析からファーマコフォアを設定し、市販の低分子バーチャライブラリー 400 万化合物を用いてバーチャルスクリーニングを実施した。その結果、中程度の EP300 HAT 阻害活性 ($IC_{50} = 35.4 \mu M$) を有するヒット化合物を得た。本化合物は陽性対照化合物として設定した C646 より強力な EP300 HAT 阻害活性を有しており、また毒性の原因構造となり得るニトロ基を持たないことから、有望なヒット化合物と判断して誘導体展開を実施することとした。

本化合物は α, β -不飽和カルボニル構造を有することから、システイン含有タンパク質との反応性が懸念される他、分子全体に共役系が広がる化合物であることから、高い蛍光性による薬理評価系への影響が想定された。そこで共役系分断を指向した 5 員環部のスキヤフォールドホッピングを実施したところ、ジヒドロピロン骨格を有する化合物において阻害活性が向上することが分かった。さらに細胞増殖阻害活性向上を目的としてカルボン酸部位の酸性度や脂溶性を調節する誘導体展開を実施した結果、安息香酸骨格と同等の EP300 HAT 阻害活性を示す 4-ピリドン-3-カルボン酸誘導体を獲得した。本誘導体は細胞増殖阻害活性が 9 倍以上向上しており、4-ピリドン-3-カルボン酸骨格が安息香酸のバイオアイソスターとなり得ることを見出した。また HAT 選択性評価によって、本誘導体が C646 よりも EP300/CBP 選択性が高く、選択的 EP300/CBP HAT 阻害剤として有用なツール化合物となり得ることを示した。

② HTS ヒットからの *in vivo* ツール化合物の獲得

次に独自骨格の取得を目指し、自社化合物ライブラリーを用いた HTS を実施した。約 46 万化合物について薬理評価を実施した結果、サブ μM オーダーの EP300 HAT 阻害活性 ($IC_{50} = 0.61 \mu M$) と良好な細胞内 H3K27 アセチル化阻害活性 ($IC_{50} = 2.24 \mu M$) を示すオキサゼパン骨格誘導体をヒット化合物として得た。続いて疎水性領域に囲まれたテトラヒドロピラン環部の変換を実施した結果、シクロアルキル基に変換することで EP300 HAT 阻害活性が向上し、特にシクロペンチル基を導入した化合物は 10 倍以上活性が向上した ($IC_{50} = 0.050 \mu M$)。続いて本化合物の高次評価

として、*xenograft* モデルを用いた経口 *in vivo* 試験にて EP300 HAT 阻害の薬力学的バイオマーカーである転写因子 SOX2 mRNA の発現抑制活性を評価したところ、十分な血中暴露を示さず、明確な mRNA 発現抑制は認められなかった。筆者は血中暴露を示さなかった要因をオキサゼパン環部の酸化代謝にあると考え、オキサゼパン骨格の脱却を目指したスキヤフォールドホッピングを実施した結果、ヒット化合物と同程度の *in vitro* 活性を有するプロリン誘導体を見出した。次に、オキサゼパン骨格誘導体/EP300 二者複合体の共結晶構造を基にプロリン環 4 位へ置換基導入した誘導体を設計、合成したところ、EP300 HAT 阻害活性と代謝安定性を両立した DS17701585 を見出した。

次に *xenograft* モデルを用いた *in vivo* 試験を実施したところ、DS17701585 は 50 mg/kg 及び 200 mg/kg の 2 用量の経口投与によって用量依存的な SOX2 mRNA 発現抑制活性が認められた。DS17701585 は EP300/CBP HAT ファミリー選択的な阻害活性を有していることから、EP300/CBP 阻害に基づく *in vivo* 活性であることが示唆された。

③ 1 日 1 回の経口投与で去勢抵抗性前立腺がんモデルに抗腫瘍効果を示す DS-9300 の獲得

臨床に適用可能なプロファイルを持った化合物の取得を目指し、更なる誘導体展開を実施することとした。合成展開を開始する前にオキサゼパン誘導体とプロリン誘導体の EP300 との二者複合体共結晶構造を比較すると、末端インダゾール環と EP300 との間の相互作用が変化していることが明らかとなった。両化合物は EP300 HAT 阻害に活性差があることから、インダゾール環部の相互作用の最適化によって活性が向上することが示唆された。そこで、インダゾール環を種々変換した誘導体を設計、合成した結果、アザインダゾール誘導体において、大幅な EP300 HAT 阻害活性向上が認められた ($IC_{50} = 0.024 \mu M$)。本化合物と EP300 との二者複合体共結晶構造を取得、解析すると、アザインダゾール環はオキサゼパン誘導体のインダゾール環と同様の相互作用が観察され、想定通りの相互作用形成が確認された。

次に、*in vivo* 試験実施に適した薬物動態プロファイルを有する化合物の取得を目指し、代謝安定性の改善を志向した誘導体展開を実施することとした。アザインダゾール誘導体の ADME プロファイルを測定すると、肝ミクロソーム中の代謝安定性は低値に留まる結果であった。筆者は、分子全体の脂溶性低減、推定代謝部位のブロック、電子豊富な芳香環の電子密度低減に焦点を当て、ADME プロファイルを改善した新規化合物の獲得を目指した。その結果、EP300 HAT 阻害活性を保持し、かつ代謝安定性を改善した DS-9300 を見出した。DS-9300 はマウス PK 試験においても良好な経口吸収性が認められ ($BA = 62\%$)、*in vitro* 活性及び薬物動態の点で望ましいプロファイルを有することから、より詳細な薬理評価を進めることとした。

EP300 及び CBP はアンドロゲン受容体 (AR) の転写コアクチベーターとして知られており、前立腺がんにおいては EP300/CBP の HAT 活性が AR 活性を増強することでがんの進展に関与することが報告されている。前立腺がん細胞株に対する増殖抑制活性評価を実施したところ、DS-9300 は AR 陽性細胞株に選択的な増殖阻害活性を示し、細胞内でのヒストンアセチル化と AR 制御タンパク質である前立腺特異抗原 (PSA) の発現を用量依存的に抑制することを示した。さらに去勢雄マウスで樹立した VCaP 細胞 *xenograft* マウスの去勢抵抗性前立腺がん (CRPC) モデルを用いた *in vivo* 薬効評価では、DS-9300 は 1 日 1 回の経口投与にて用量依存的な腫瘍増殖抑制作用と血中 PSA 量抑制効果を示した。特に最高用量の 3 mg/kg 投与群では体重減少することなく、完全に腫瘍径増加を抑制した。

以上より、インシリコスクリーニング及び HTS ヒットを基にした誘導体展開の中から、*in vivo* 薬効評価モデルにおいて経口投与により顕著な抗腫瘍効果を示す DS-9300 を創出した。DS-9300 は 1 日 1 回の経口投与で CRPC モデルに顕著な抗腫瘍効果を示した初めての EP300/CBP HAT 阻害薬であり、本研究で得られた知見は今後の薬剤開発にとって有用となることが期待される。