OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	High-Throughput Screening, Computer-Aided Hit-to-Lead Optimization, and Biological Evaluation of Novel Histone Lysine Demethylase 4C Inhibitors
Author(s)	Rokus Arnoldus Melsen, Paddy
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/107159
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

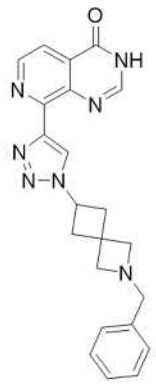
The University of Osaka

Form 3

Abstract of Thesis

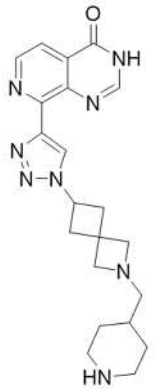
Name （Paddy Rokus Arnoldus Melsen）	
Title	High-Throughput Screening, Computer-Aided Hit-to-Lead Optimization, and Biological Evaluation of Novel Histone Lysine Demethylase 4C Inhibitors（新規ヒストンリジン脱メチル化酵素4C阻害剤のハイスループットスクリーニング、コンピュータ支援によるヒット化合物からリード化合物への最適化、および生物学的評価）

Abstract of Thesis



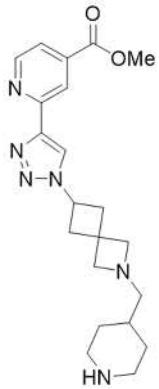
Ak1PAz5-BIC

KDM4C IC_{50}: n.d.
KDM4A IC_{50}: n.d.
Selectivity: n.d.
Cell-viability: 40-70% reduction @ 100 uM (U87/MCF-7), 20% reduction @ 100 uM (HEK293T)
H3K9me3 levels: strongly increased
PAMPA: n.d.
Caco-2: n.d.



G1C-BIC

KDM4C IC_{50}: 0.13 uM
KDM4A IC_{50}: 0.07 uM
Selectivity: 7-fold (KDM4D); 43-fold (KDM5B); 210-fold (KDM6B)
Cell-viability: no activity
H3K9me3 levels: weakly increased
PAMPA: 0.002 (10^{-6}cm/sec)
Caco-2: 0.3 (10^{-6}cm/sec)



G1C-PRO

KDM4C IC_{50}: 0.072 uM (COOH)
KDM4A IC_{50}: 0.052 uM (COOH)
Selectivity: 6-fold (KDM4D); 8-fold (KDM5B); 188-fold (KDM6B)
Cell-viability: no activity (U87/MCF7), >10% reduction @ 100 uM (HEK293T)
H3K9me3 levels: strongly increased
PAMPA: 0.004 (10^{-6}cm/sec)
Caco-2: 0.3 (10^{-6}cm/sec)

Epigenetic regulation governs gene expression through reversible chemical modifications of DNA and histone proteins without altering the underlying genetic code. Among the enzymes responsible for maintaining these modifications, histone lysine demethylases (KDMs) have emerged as attractive therapeutic targets because of their involvement in cancer, neurodegenerative disorders, and other human diseases. In particular, KDM4C regulates transcriptional programs associated with cell proliferation, DNA damage repair, stemness, and tumor progression, making it an attractive target for drug development. However, the discovery of selective KDM4C inhibitors remains challenging due to the highly conserved catalytic machinery shared among Fe(II)/2-oxoglutarate-dependent oxygenases. This thesis aimed to address these challenges by integrating medicinal chemistry, high-throughput synthesis,

and computational design to develop novel ligands targeting epigenetic proteins.

The first chapter focused on the discovery and optimization of selective KDM4 inhibitors. A high-throughput Cu(I)-catalyzed azide–alkyne cycloaddition (CuAAC) synthesis platform enabled the rapid generation of structurally diverse triazole-based inhibitors, leading to the identification of the hit compound **Ak1PAz5**, containing a 2-azaspiro[3.3]heptane scaffold. Guided by molecular docking, molecular dynamics simulations, and the SINCHO platform, **Ak1PAz5** was optimized to the lead compound **G1C**. In parallel, pyrido[3,4-*d*]pyrimidin-4(3H)-one analogues and methyl ester prodrugs were synthesized to further investigate structure–activity relationships and improve cellular activity. The optimized compounds displayed low-micromolar inhibitory activity against KDM4C with excellent selectivity over related KDMs and other 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases. Moreover, **Ak1PAz5-PRO/BIC** and **G1C-PRO** induced a marked increase in H3K9me3 levels in U87 cells, outperforming the reference inhibitor **SD-70** at similar concentrations. The second chapter explored DNA-encoded library (DEL) technology as a complementary ligand discovery platform. A six-cycle DNA-encoded macrocyclic peptide library was designed using a cheminformatics-guided workflow, and the DNA-compatible synthetic transformations required for library construction were successfully established and validated. Although assembly of the complete library was ultimately limited by instrumental constraints, this work established a practical workflow for DNA-compatible macrocycle synthesis.

Overall, this thesis demonstrates the successful integration of medicinal chemistry, computational design, and high-throughput synthesis for the discovery of ligands targeting epigenetic proteins. The discovery of novel KDM4 inhibitor scaffolds and the demonstration of cellular target engagement provide a strong foundation for the development of next-generation KDM4 chemical probes. Future optimization should focus on improving membrane permeability through modulation of lipophilicity, reducing metabolic liabilities, and enhancing pharmacokinetic properties while maintaining potency and selectivity.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（ Paddy Rokus Arnoldus Melsen ）	
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査　教授	鈴木孝禎
	副 査　教授	梶原康宏
	副 査　教授	北條裕信

論文審査の結果の要旨

ヒストン脱メチル化酵素 4C（KDM4C）は、ヒストンのメチル化状態をリセットするエピジェネティクス制御因子（Eraser）であり、膠芽腫（glioblastoma）をはじめとする多くの悪性腫瘍の発生、増殖、およびアポトーシス抑制に深く関与している。そのため、KDM4C は有望な抗がん剤の創薬標的として注目されているが、既存の KDM4 阻害剤の多くは触媒ポケットの構造的類似性から選択性が低く、また細胞透過性が悪いという課題を抱えている。触媒ポケットを選択的に遮断しつつ、細胞内で効果を発揮する新規阻害剤の創製は、がん治療戦略において極めて重要である。そこで学位申請者は、新規かつ高活性・高選択的な KDM4C 阻害剤の創出を目指し、ハイスループットスクリーニング（HTS）系の構築、計算科学を活用した合理的なリード最適化、および細胞系における生物学的評価の一貫した研究を行った。

学位申請者はまず、迅速かつ高い化学選択性を持つ銅触媒アジド・アルキン環化付加反応（CuAAC）に着目し、ウェルプレート上で阻害剤ライブラリを直接合成してスクリーニングに供する効率的なプラットフォームを開発した。18 種のアルキンと 48 種のアジドを組み合わせた計 864 種のトリアゾール化合物を合成し、最適化した AlphaScreen 法を用いて阻害活性を評価した結果、有意な KDM4C 阻害活性を示すヒット化合物として Ak1PAz5 を見出した。次いで、分子ドッキングや分子動力学シミュレーション、AI 分子生成ツールを用いた構造に基づく薬物設計（SBDD）を展開し、Ak1PAz5 の構造最適化を試みた。その結果、末端にピペリジン環を導入した G1C および G1D が元のヒット化合物を上回る優れた阻害活性を示すことを突き止めた。さらに、細胞透過性と選択性の向上を志向し、カルボン酸のバイオアイソスターとしてピリド[3, 4-d]ピリミジン-4(3H)-one（BIC）骨格を導入した G1C-BIC を創製し、これが KDM4A–C に対して強力な阻害活性を示し、他のデメチラーゼやヒドロキシラーゼに対して高い選択性を有することを確認した。最後に、これら化合物の細胞膜透過性と細胞生存率への影響を評価した結果、親水性の高い誘導体は細胞透過性が低く十分な効果を示さなかったものの、疎水性を高めたプロドラッグ体である Ak1PAz5-PRO および Ak1PAz5-BIC は透過性が改善し、ヒト膠芽腫 U87 細胞および乳癌 MCF7 細胞に対して濃度依存的な生存率低下効果を示すことを見出した。

本研究は膨大な実験量に基づく新規かつ高活性な KDM4C 阻害剤の創製研究であり、本専攻の博士論文研究に相応しい業績である。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。