

日本医療研究開発機構 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業 (革新的中分子創薬技術の開発) 事後報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) DNA 副溝認識化合物による画期的ゲノム創薬技術開発
(英語) Development of designable bioactive molecules, capable of sequence-specific DNA binding

研究開発実施期間: 平成30年6月4日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 永瀬 浩喜
(英語) Hiroki Nagase

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 千葉県がんセンター・研究所・所長
(英語) Chiba Cancer Center・Research Institute・Director

II 研究開発の概要 (和文)

蛋白構造を標的とした低分子創薬や細胞表面蛋白を主に標的とする抗体医薬だけでは難治疾患の治療薬開発は困難である。この問題を克服するためゲノム DNA を標的とした機能性化合物を疾患・用途に合わせて薬剤候補として合成するプラットフォームを確立し、連続的に供給するパイプラインの構築を試みることを本事業の目的とした。下記に記載の通り実際に多数のゲノム DNA を標的とした機能性化合物を合成し、多くの研究機関に化合物を供給するとともに複数の特許出願や論文発表、企業との共同研究に結び付けることができた。

2018年度は、DNA 副溝を配列特異的に認識する人工化合物(MGB)と低分子既存薬剤の複合体 (図1 参照) を合成する

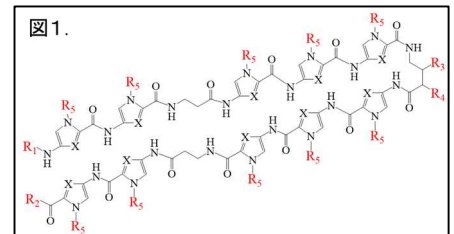


図2 RASがん遺伝子コドン12変異を標的とした配列特異的DNA損傷の誘導 (県内s社と新規構造変換化合物共同研究、特許 第6705903)

<p>標的ゲノム配列への介入</p> <p>DNA配列認識部位 アルキル化剤 標的遺伝子アルキル化 Piポリアミド薬物複合体(PDC)</p>	<p>化合物の自動合成系の確立</p> <p>標的配列に対する薬剤候補の自動合成を創薬プラットフォームとして企業(s社)と連携して開発</p>	<p>がん細胞への特異的取り組み、蓄積、貯留</p> <p>0h 4h 8h 1 day 3 days 2 weeks</p> <p>1.0 mg/kg FITC-PIPを電顕観察で検出</p> <p>がん幹細胞持続集積</p> <ul style="list-style-type: none"> 正常臓器での副作用低減 がん幹細胞への迷達 薬物耐性機構からの回避 DDSの付加を必要としない
<p>単回投与で大腸がん縮小</p> <p>4 weeks 7 weeks 11 weeks</p> <p>ヒト大腸がん移植モデルでの腫瘍縮小効果(単回投与) 薬剤候補として企業導出をA社と協議中</p>	<p>連続投与での膵臓がん縮小</p> <p>DMSO DMSO DMSO</p> <p>膵臓がん自然発症モデルでの腫瘍縮小効果(連続投与) 薬剤候補として企業導出を視野</p>	<p>候補薬剤がコンパニオン診断薬に腫瘍ゲノム研究室との共同研究</p> <p>細胞内ゲノム結合配列をNGS解析を用いて同定可能 血中KRAS変異DNAを濃縮、デジタルPCRで診断 国内大手およびグローバル大手と3者共同開発契約</p>

ための合成系の確立、およびその機能の確認、さらに化合物のゲノムへの結合部位と発現解析から薬剤の効果及び副作用を予測する情報解析ソフトの開発を行った。図 2 に我々の先行研究における癌遺伝子 KRAS 恒常的活性化変異に対する抗腫瘍薬剤候補の開発例を示すが、同様のアプローチで神経芽腫の癌遺伝子 MYCN を標的とした MGB とアルキル化剤の複合体によってがんで特異的に増幅した MYCN 遺伝子のコピー数が、MYCN 遺伝子領域に DNA 二本鎖切断を誘導することによって増幅した MYCN 遺伝子コピー数を削減し、神経芽腫の増殖を抑制することを培養細胞及びマウスモデルで確認し、薬剤候補としての概念実証 (POC) を得た (Cancer Research 79(4):830-40, 2019)。また MGB アルキル化剤複合化合物における副作用予測研究では実験動物で投与後に予測した副作用が観察されることを観察し報告した (PLoS One 14(4):e0215247 2019)。さらにその予測プログラム CRED を報告し、公開した (J. Open Source Softw 4(37)1423, 2019)。特定のゲノム領域で可塑性のエピジェネティックな変化を制御するエピゲノム変更化合物の研究では、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、ヒストンアセチル化酵素活性化剤、プロモドメイン阻害薬と MGB の複合体化合物について、より効率的な合成法を確立した。

2019 年度に、効率的な多機能中分子複合体の合成法を確立、合成化合物の評価、臨床応用時の効果予測を行い、ミトコンドリアゲノムを標的にした新規化合物を開発、変異ミトコンドリアをもつ細胞で特異的に変異ミトコンドリア除去もしくは細胞死誘導できる方法を確認し特許出願 (特願 2019-053528)、国際特許出願 (WO/2020/189779) を行った。またゲノム標的化合物の副作用予測に関する総説を Biomolecules 誌に報告した (Biomolecules 2020, 10(4), 544)。さらに、ビオチン化した DNA 結合化合物を用いることで体液中に存在する腫瘍由来の DNA を濃縮する技術を凸版印刷とともに開発し、国際特許出願 (WO2017/061128) を行っていたが、この技術によって大腸がんの超早期である粘膜内がんを患者初診時保存血清より診断できることを確認し、体液からのリキッドバイオプシーによる早期がん診断法として確立し Scientific Reports 誌に報告した (Scientific Reports 2019 9:11346.)。この技術が開発中の薬剤候補をどの患者に使用すべきかを判断する指標となる診断バイオマーカーとして使用できることを示す結果であり、今後の創薬開発における高感度患者層別化マーカーに使用できる重要なエビデンスとなった。

2020 年度に、前述の診断法をさらに発展させ体液検査に基づくがんの早期診断法として凸版印刷、大手企業と 3 者契約を結び、キット化に向けて研究を進める契約を進めた。また、ミトコンドリアゲノムを標的にした抗癌治療薬候補の効果と作用機序を検証し Cancer Science 誌に報告した (Cancer Science 2021 Apr 2. doi: 10.1111/cas.14912. Online ahead of print.)。また COVID-19 感染症のパンデミックに際し、SARS-Cov-2 に対する治療薬候補を合成し国立感染研究所と研究を進めた。COVID-19 感染に必要な宿主側のヒト遺伝子の発現を抑制する複数の化合物を機械学習による予測のもと設計合成し、複数のヒト細胞株で感染に必要な宿主ヒト遺伝子の発現を抑制する 8 種類の化合物を同定、国立感染研でのアフリカミドリザル細胞を用いた薬剤スクリーニングに加えていただいた。この系においても感染を抑制する化合物が同定されたがしかし既存薬を上回る効果は得られなかったため研究は中止することとなった。但し、アフリカミドリザルとヒトのゲノム配列は異なるためヒト細胞を用いた感染系での薬剤候補スクリーニングで今後検討する必要があると考えられた。このほかゲノム標的的特異的に既存薬などの機能性低分子化合物を送達できる複数の複合体化合物を合成した。インビトロでの抗腫瘍効果を確認できた化合物も複数認められており、今後がんのみでなく様々な疾患に応用できる化合物を機械学習による予測に基づき合成出来るものと期待している。また本事業期間中には前述の国立感染研究所に加え、群馬大学、宮崎大学、日本大学、放医研、産総研、国立がん研究センターなどに化合物を供与した。凸版印刷との共同特許の実用化のための契約など本研究領域のコンソーティウムを構築し、共同研究機関と定期的な会合を行い、研究を推進している。2020 年度以降も引き続き、AI による効果予測をさらに精度向上させるための基礎データの取得を進め、高精度効果予測に基づくゲノム・エピゲノムへの介入技術の確立を行う。このことによって合成される化合物を応用し、産業化に向けた企業等への導出を試みていく予定である。

実際に、本事業で確立してきたミトコンドリアゲノム標的治療薬は、抗がん作用を示すことを報告したが、さらに小児先天性代謝疾患で最も多く、現在対症療法しかない難治性のミトコンドリア病に対する治療薬への発展が期待され、日本医療研究開発機構（AMED）の令和3年度難治性疾患実用化研究事業に応募し、採択され、治療薬開発を継続して行う上での研究助成が得られることとなった。ミトコンドリア病の最も頻度の高い病因である変異ミトコンドリア DNA を除去することにより、MELAS などのミトコンドリア病の根治を目指す治療薬の開発に 2021 年度より取り組んでいく。

また本事業での成果に基づき、前述の特許出願済みのリキッドバイオプシー技術を応用することで日本医療研究開発機構（AMED）のムーンショット型研究開発事業目標7のミトコンドリア先制医療に血中ミトコンドリア DNA バイオプシー開発課題として分担研究開発担当者として参画することとなった。超早期に老化や生活習慣病の原因となる慢性炎症を本事業で培った DNA 結合化合物によるリキッドバイオプシー技術を用いて未病の状態から慢性炎症の進行度、老化の進行度を診断する新たな検診、診断技術の開発に携わる。さらにその病態進行の抑制による疾患予防、疾患が生じた場合の治療法の開発を本事業で培った化合物を用いて行う。

以上、がん治療薬や診断法を中心に開発したゲノム標的化合物のプラットフォームが本事業で構築でき、今後臨床応用に向けて取り組むための創薬基盤を築くことができた。

最後に本研究事業に多大なるご支援を頂いた日本医療研究開発機構およびスタッフの方々に改めて謝意を述べたい。

研究開発の概要（英文）

Research Summary

While numerous studies have explored the possibility of directly targeting biomacromolecule responsible for the onset or progression of disease phenotypes, in many intractable and/or rare diseases clinically viable drugs against such targets have yet to become commercially available, for instance critical oncogenic proteins, such as p53, RAS and MYC, or amyloid- β ($A\beta$) peptides for Alzheimer's disease (AD). Complexities in three-dimensional protein surface topologies and binding pocket inaccessibility present major hurdles for protein-level inhibitors to overcome and hinder the development of successful therapeutics. Additional externalities, for example time, cost, and labor, can also delay rational design-based developments of new therapeutics. As such, a new middle size strategy that can directly target critical driver genes may provide a more direct route to address unmet medical needs for the conquest of those unfavorable diseases.

Pyrrole-Imidazole (PI) polyamide specifically recognizes, binds and targets the minor groove of genomic DNA in a sequence-dependent manner. We have successfully synthesized various PI polyamide-drug conjugates (PDC) targeting driver genes in the disease genome, and subsequently evaluated those conjugates, both in vitro and in vivo, to confirm their anti-disease efficacy as well as genetic or epigenetic modification to the target genes.

PDCs against their gene-level frequently showed promising anti-disease effect and subsequent target modification in the unhealthy genome, and mouse models of various human diseases also confirmed the anti-disease efficacy of PDCs, simultaneously showing little adverse events. Intriguingly, pharmacokinetic studies also suggested PI polyamide conjugates to possess enhanced permeability and retention- (EPR) like effect, an additional advantage for PDC's to restrictively localize in tumor and tumor environments, as expected of well-performing cancer therapeutics. We also confirmed that several modifications to a candidate PDC could alter its intracellular localization, for instance improved specific mitochondrial localization and the subsequent reduction of mutant mitochondrial DNA copy numbers. Druggability, synthesizability and modifiability of PDC, coupled

with the capability of targeting disease genomes at specifically affected lesions/locations, prevent a new design strategy against difficult diseases.

We, the Chiba Cancer Center Research Institute are capable of producing PDCs at bench- and pilot-scales, and accordingly proposed the use of PDCs for drug development pipelines to supply researchers under drug discovery collaboration agreement.

In the last three years of this research projects, we have developed alkylating PI polyamides targeting MYCN, immune checkpoints, ALK and PIK3CA (Cancer Research 79(4):830-840, 2019., The Japanese Journal of Pediatric Hematology/Oncology; JJPHO 56:3 331-333 2019. and Cancer Science 112(3):1141-1149 2021.) and established its bioinformatic estimation of the genome-wide off-target effects (PLoS One. Apr 9;14(4):e0215247 2019.). We also developed cationic PI polyamides targeting GPR56 (Sci Rep 8(1):13741 2018.) and TGF- β 1 (Molecules 25(12), 2883 2020.) for external researchers, according to the genome binding prediction and off-target effects using in-house software (Journal of Open Source Software 4(37):1423, 2019. and Biomolecules 10(4):544 2020.).

We also developed drug candidates targeting mitochondrial DNA mutations for mitochondrial disease of MELAS initially. Intriguingly it also induced apoptosis to cervical cancer of HeLa cells when induced MELAS 3243G mutation in the cells (Cancer Sci doi: 10.1111/cas.14912 2021.). Not only for MELAS A3243G but also for many other mitochondrial mutations in cancer cells, we have developed PIP-TPP targeting cancer specific homoplasmic mtDNA SNVs in order to treat a substantial number of cancer patients and confirmed its anti-cancer effect in various cancer type in vitro and in vivo. We believe our invention of this novel therapeutic approach targeting mitochondrial DNA should provide a definite-curative remedy for cancer patients and perhaps patients with various mitochondrial diseases (WO/2020/189779).

Thus, we have successfully completed this research projects and discovered new anticancer approach including several drug candidates. Some of those are promising for future clinical use and have been founded by the AMED projects starting the year of 2021.

In the end, we would like to express our sincere thanks to the AMED and their staffs involved in this project.