

## 日本医療研究開発機構 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 事後評価報告書



### I 基本情報

補助事業課題名：（日本語）創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業  
（プログラム名）（英語）Platform Project for Supporting Drug Discovery and Life Science Research

実施期間：平成29年4月1日～令和4年3月31日

補助事業担当者 氏名：（日本語）杉山 弘  
（英語）Hiroshi Sugiyama

補助事業担当者 所属機関・部署・役職：  
（日本語）国立大学法人京都大学・大学院理学研究科・教授  
（英語）Professor, Graduate School of Science, Kyoto University

### II 補助事業の概要

本研究開発事業では、転写開始領域標的型 PIP 複合体の分子設計を基盤とした新規 PIP 複合体ライブラリーを構築・整備して、様々な疾患関連遺伝子群を制御するリード化合物をスクリーニングによって探索・選定する。次いで、見出されたリード化合物の薬効メカニズムや動態等を詳細に解析、評価することで、PIP 複合体ライブラリーの実用的な価値を高めることを目的としている。

具体的には、以下の（1）～（4）の研究開発項目を挙げて研究を展開した。

（項目1）PIP複合体ライブラリーの構築：様々な遺伝子発現制御能を付与したPIP複合体によって、遺伝子配列特異的なスクリーニング探索を可能にするライブラリーを作成する。加えて、誘導体化によって、蛍光性を付与したリード化合物を作成する。

（項目2）PIP複合体のスクリーニング評価：RT-PCR、DNAマイクロアレイ解析装置を活用して、PIP複合体ライブラリーの培養ヒト細胞に対する疾患関連遺伝子群の制御能を評価する。また、DNA損傷反応、ヒストンタンパク質の修飾反応を評価する。

（項目3）PIP複合体の遺伝子制御機構の解明：次世代シーケンサーを活用して、疾患関連遺伝子制御能を有する有望なリード化合物のゲノム上での結合サイトを特定する。加えて、結合サイトと遺伝子発現制御機構との関連性、遺伝子発現量と配列特異性の因果を解明する。

（項目4）PIP複合体の薬剤評価：疾患関連遺伝子群を制御するリード化合物を用いて、疾患細胞を移

植したモデルマウスでの治療評価を進める。また、蛍光性を付与したリード化合物によって、細胞、組織内の動態や局在性を評価する。

支援における研究成果：

### **遺伝子発現を特異的に抑制する PIP コンジュゲートライブラリー**

2017 年度からの支援研究において、81 品種の DNA 配列特異的損傷能をもつクロラムブシル(Chb)-ピロールイミダゾールポリアミド(PIP)複合体ライブラリーを共同研究者ら提供可能な状態にした。そのライブラリーの中からマイクロアレイの結果より有効性が観察された 32 種の Chb-PIP 複合体を選別した PIP 複合体プレートを京都大学 CiRA と共同して作成し、共同研究者らにがん細胞に対する毒性評価用プレートとして提供した。

### **遺伝子発現を特異的に活性化する PIP コンジュゲートライブラリー**

2018 年度からの支援研究において、遺伝子発現を活性化させる新規化合物ライブラリー構築に向けて、新しい PIP コンジュゲートの開発を進めた。遺伝子発現を活性化する様々な機能分子の探索、機能解析の結果、プロモドメイン阻害剤(Bi)を PEG で連結させた PIP コンジュゲートが有望であることを見出した。実際に、Bi-PIP コンジュゲートを用いて、PIP の配列特異的結合性にヒストンアセチル化転移酵素(HAT)が誘起された遺伝子発現の特異的な活性化をマイクロアレイや RT-PCR によって確認した。

### **各種 PIP コンジュゲートライブラリーの機能評価**

2019 年度からの支援研究において、32 品種の遺伝子発現抑制型 Chb、遺伝子発現活性化型 SAHA、Bi-PIP ライブラリーの構築を達成しており、サンプルや評価用プレートでの提供を可能にした。構築された 6 塩基配列認識能を持つ PIP コンジュゲートは、細胞や動物実験の実験例も多く薬剤候補として現時点で最適の分子設計であると考えられる。一連の支援研究の中で、SAHA による HDAC 阻害と、Bi による HAT 誘起する方法論との間で遺伝子発現の活性化能とを比較検証した結果、標的遺伝子に対する異なる機序からの活性化法として両コンジュゲートの有用性を確認した。

高度化における研究成果：

### **クロラムブシル(Chb)-PIP コンジュゲートの機能解析評価**

2017 年度から有用なリード化合物の選定に向けて、合成した Chb-PIP ライブラリーを用いて各種がん細胞に対する毒性スクリーニング評価を行った。その結果、顕著な有効性を示す Chb-PIP コンジュゲートが見出され、疾患関連遺伝子群の抑制効果の解明に向けてマイクロアレイ、RT-PCR 解析が行われた。特に、Chb-PIP ライブラリーのスクリーニング結果から、スキルス胃癌、食道癌、難治性白血病、TNBT(トリプルネガティブ乳癌)、MRT(小児脳腫瘍)、肺癌(非小細胞性肺癌 EGFR 野生型)等の細胞株の癌細胞を移植した野生型マウスを用いて評価を進めた。

上記の Chb-PIP ライブラリーを用いる各種がん細胞に対する殺細胞効果の解析評価の結果から、Chb-M' と呼ぶリード化合物が見出された。それらは、転写因子の一種である RUNX 系の遺伝子群を抑制することで、マウスを用いた動物実験でも白血病や肺がん細胞に対して有効性が示されたものである。また、委託研究の中で、ヒト肺がん細胞を移植した Xenograft mice に Chb-M' を投与した結果、明確な肺がん細胞の縮小が観察されている。その際の体重減少もほとんど見られていない。2020 年度の委託研究の中では、候補化合物として Chb-M' と類似した塩基配列特異性を有する Chb-N', Chb-26' と呼ばれる PIP コンジュゲートの評価が実施され、ゼノグラフトマウスに移植した膵臓がん細胞(Panc-1)の明らかな腫瘍体積の縮小を観察している。膵臓癌の治療に用いられているゲムシタビン(既存薬)との効果を比較した結果、効果の比較の為に濃度を下げた時、ChbN'や Chb26'はゲムシタビンのおよそ 50 分の 1 の当量で同等の効果を示すことを確認した。

## 二量体形成能をもつ PIP コンジュゲートの機能解析評価

PIP の機能の高度化研究の一環として、シクロデキストリンやアダマンタンを導入した PIP コンジュゲートを合成し、DNA 上での二量体形成による標的配列特異性の向上を目指した研究を行った。原理的には各々の PIP 複合体の分子量を 2000 以下に抑えながら、10 塩基を超える配列特異性を獲得することを可能にするアプローチである。

## ミトコンドリア集積性をもつ PIP コンジュゲートの機能解析評価

ミトコンドリア集積性を有するペプチド基(MPP)を導入した PIP を合成し、細胞内でのミトコンドリア組織への集積性、並びに、LSP プロモーター領域への PIP の結合による下流の ND6 遺伝子の発現抑制を確認した。この研究は、核以外の組織であるミトコンドリア DNA を標的可能にするための PIP 機能の高度化を目指したものであり、ミトコンドリア内の特定遺伝子発現阻害剤の実現に向けた可能性を示している。

## グアニン四重鎖構造結合性をもつ PIP コンジュゲートの機能解析評価

DNA の特殊な高次構造の一つであるグアニン四重鎖構造とその近傍の二本鎖 DNA 塩基配列を同時に認識して特異的に結合する PIP コンジュゲートの開発に成功した。また、ヒトテロメア配列において、DNA の特殊な高次構造の一つであるグアニン四重鎖構造とその近傍の二本鎖 DNA 塩基配列を同時に認識して特異的に結合するピロドスタチン-PIP コンジュゲート(TH59b-SL-PDS)の開発も行った。

## 環状 PIP による結合配向性の制御

従来、PIP の結合配向において、5'-3' N-C 配向 (forward 配向) が優先的に起きていると考えられてきた。しかしながら、近年、5'-3' C-N 配向 (reverse 配向) と呼ばれる逆の結合配向を好むケースが報告された。理論上、PIP に 2 種類の結合配向が共存している場合、標的外配列に対する認識(Off-Target 効果)による特異性の低下が懸念されることになる。我々は、PI ポリアミドによる結合配向の優先性を制御するために、turn 部のアミノ基の不斉が異なる 2 つの環状 PI ポリアミドを設計し、従来の環化反応条件を改良して合成することに成功した。DNA オリゴヌクレオチドに対する  $T_m$  値測定や SPR 解析によって、(R) -アミノ基を持つ環状 PI ポリアミドの優れた forward 配向性が観察された。一方で、(S) -アミノ基を持つ環状 PI ポリアミドは、明確な reverse 配向性を有することが確認された。さらに、reverse 配向 DNA 結合性の環状 PIP の機構を理解するために、X 線結晶構造解析に着手した。DNA の配列や構造、様々な結晶化条件を検討し、得られた DNA-環状 PIP 複合体の単結晶を用いて SPring-8 での X 線結晶構造解析に成功した。その結果、これまで報告されていない reverse 配向に結合した結晶構造 (NDB: 6M5B) を解明し、論文として報告した。

## ヘアピン型 PIP コンジュゲートの機能解析評価

PIP 蛍光誘導体研究の一環として、ヒトテロメア配列に対して特異的な生細胞イメージングを可能にする近赤外蛍光性 PIP コンジュゲートを開発し、そのヒトテロメア配列への集積性を含めた解析評価結果を報告した。さらに、ヘアピン型 PIP にトリアルギニン側鎖を導入した PIP コンジュゲートを開発し、細胞内動態や遺伝子発現量の解析によって効果的な細胞内取り込みが確認された。

In this research and development project, we will construct and maintain a new PIP conjugate library based on the molecular design of transcription initiation region targeted PIP conjugates. And, lead compounds that control various disease-related gene clusters are searched and selected by screening. Then, the purpose of the research is to enhance the practical value of the PIP conjugate library by analyzing and evaluating the drug efficacy mechanism and dynamics of lead compounds in detail. Specifically, the research was developed by listing the following R & D items (1)-(4).

**Item 1: Construction of PIP conjugate library:** A library that enables gene sequence-specific screening search is created by using PIP conjugates with various gene expression control abilities. In addition, derivatization produces a lead compound with fluorescence.

**Item 2: Screening evaluation of PIP conjugate:** RT-PCR and DNA microarray analyzer will be utilized to evaluate the control ability of disease-related genes for cultured human cells in the PIP conjugate library. In addition, DNA damage reaction and histone protein modification reaction will be evaluated.

**Item 3: Elucidation of gene regulation mechanism of PIP conjugate:** Utilizing next-generation sequencer, identify binding sites on the genome of promising lead compounds having disease-related gene control ability. In addition, the relationship between the binding site and the gene expression control mechanism, the causal effect of gene expression level and sequence specificity will be elucidated.

**Item 4: Drug evaluation of PIP conjugate:** We will proceed with therapeutic evaluation in model mice transplanted with diseased cells using lead compounds that control disease-related genes. In addition, the fluorescence-imparted lead compound is used to evaluate the dynamics and localization in cells and tissues.

Research results in support :

**PIP conjugate library that specifically suppresses gene expression:** We created a chlorambucil(Chb)-pyrrole imidazole polyamide (PIP) conjugate library with 81 varieties of DNA sequence-specific damaging potential.

**PIP conjugate library that specifically activates gene expression:** Using the Bi-PIP conjugate, we confirmed the specific activation of gene expression in which histone acetyltransferase (HAT) was induced in the sequence-specific binding of PIP.

**Functional evaluation of various PIP conjugate libraries:** The constructed PIP conjugate with 6-base sequence recognition ability is considered to be the most suitable molecular design at present as a drug candidate with many experimental examples of cell and animal experiments.

Research results in sophistication :

**Functional analysis and evaluation of Chlorambucil (Chb)-PIP conjugate:** As a result of administration of Chb-M'to Xenograft mice transplanted with human lung cancer cells, clear reduction of lung cancer cells has been observed. Almost no weight loss was seen at that time.

**Functional analysis and evaluation of PIP conjugates with dimer forming ability:** We synthesized PIP conjugates introduced with cyclodextrin and adamantane, and aimed to improve target sequence specificity by dimer formation.

**Functional analysis and evaluation of PIP conjugates with mitochondrial accumulation:** We synthesized PIPs with a peptide group (MPP) having mitochondrial accumulation, and confirmed the intracellular accumulation in mitochondrial tissues, and the suppression of ND6 gene expression by binding of PIP to the LSP promoter region.

**Functional analysis and evaluation of PIP conjugates with guanine quadruplex structural binding:** We have succeeded in developing a PIP conjugate that simultaneously recognizes and specifically binds to the guanine quadruplex structure and the double-stranded DNA in the vicinity.

**Control of DNA binding orientation by cyclic PIP:** We investigated the sequence and structure of DNA and various crystallization conditions, and succeeded in X-ray crystal structure analysis at SPring-8 using the obtained single crystal of the DNA-cyclic PIP (NDB: 6M5B).

**Functional analysis and evaluation of hairpin PIP conjugate:** We have developed a near-infrared fluorescent PIP conjugate that enables live cell imaging specific to human telomeric sequences.