

## 平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 事業名：革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業
2. 研究開発課題名：任意の遺伝子発現制御を可能にする革新的ポリアミド薬剤の開発
3. 研究開発代表者：大学院理学研究科 化学専攻・教授・杉山 弘
4. 研究開発の成果

本課題では、核内DNAの特定の塩基配列を認識して、その塩基配列に可逆的に結合する特性（塩基配列特異性）を有するピロール-イミダゾールポリアミド（以下「PI-ポリアミド」と言う）を用い、任意の遺伝子発現制御をエピジェネティックな方法で可能にする革新的ポリアミド薬剤の開発を目的とする。

その目的を達成するために、ヒストンのアセチル化に関連する酵素、HAT（ヒストンアセチル基転移酵素）やHDAC（ヒストン脱アセチル化酵素）を制御する薬剤である SAHA（HDAC 阻害剤）や CTB（HAT 活性化剤）、DNA 損傷を引き起こす CBI や Chb（クロラムブシル）を用いて、PI-ポリアミドとのコンジュゲートの合成技術を確認する。次いで、最新の遺伝子発現解析技術によって、その塩基配列特異性と遺伝子発現制御能を解明する。最終的に、遺伝子発現制御能から期待される薬効について実証し、「任意の遺伝子発現制御を可能にする革新的なポリアミド薬剤」を開発する。

### PI-ポリアミドの設計と合成

10 mg - 100 mg スケールでの SAHA、CTB、CBI 部分の大量供給に向けた合成と精製に関する実験室レベルでの技術的な改良を進めた。特に、ポリアミドのブロックユニットを開発し、ポリアミドの合成純度を上げて総合的な収率を改善した。SAHA、CTB PI-ポリアミドの32種ライブラリーは、10 mg スケールで構築することに成功しており、医学系の共同研究者への評価サンプルの提供を進めてきた。将来的に現在の研究室の設備では、g スケールでの合成や、GLP合成を実施していくことに問題を残しているものの、大学の研究室レベルで実施可能なPI-ポリアミドの設計と機能評価、合成技術の改善を進める。

### HAT 活性化能を有する CTB PI-ポリアミド

SAHA ポリアミドライブラリー構築の過程で、ヒストンアセチル基転移酵素（HAT）を活性化する CTB PI-ポリアミドを新たに設計、合成することに成功した。実際に、CTB PI-ポリアミドは SAHA PI-ポリアミドと遜色ない特定遺伝子の発現を活性化することを確認し、その結果を論文として報告した(Angew. Chem. Int. Ed. 2015, 54: 8700-8703)。CTB PI-ポリアミドの合成は、SAHA PI-ポリアミドの合成より容易であり、転写を活性化する遺伝子スイッチとしての有用性が期待される。

### アルキル化 CBI PI-ポリアミド

PI-ポリアミド研究の一環として、平成27年4月27日に千葉県がんセンター・永瀬教授らと共同研究を進めていたKRAS codon 12変異を標的とするアルキル化CBI PI-ポリアミド（KR12）の研究成果が、*Nature Communications* 6, Article number: 6706に公開となった。マウス実験によって得られたこの研究成果は、アルキル化ユニットを導入したPI-ポリアミドによる特定がん腫に対する特異的な抗腫瘍活性を誘導する可能性を示したものである。代表者が現在、開発を進めているChb PI-ポリアミドのコンセプトにも繋がっている。

## アルキル化 Chb PI-ポリアミド

研究開発分担者の京都大学医学研究科上久保らと、がん細胞の増殖に関連する遺伝子群を標的とした白血病への PI-ポリアミドの医療応用を目指す連携研究を進めた。その過程で、DNA アルキル化能を有する Chb(クロラムブシル)と複合化させた PI-ポリアミド、Chb-M' と Chb-50 が増殖関連遺伝子群の抑制において有望であることを見出した。同時に、フラッシュクロマトグラフィーによる Chb-M' と Chb-50 の 100 mg スケールの合成・精製工程を確立し、現在開発を進めている Chb PI-ポリアミドの動物実験や安全性評価に必要な量を確保した。

## 白血病マウスモデルでの薬効評価

まず、Chb-M' の投与量の検討を正常 NOG mouse に対して実施した。その結果、静脈注射により 320 マイクログラム/kg～24 mg/kg を投与して 2 ヶ月経ってもマウスの体重減少は起こらず、病理的異常は観察されなかった。次いで、急性骨髄性白血病細胞を移植したマウスに対して、Chb-M' と Chb-50 の抗がん活性試験を実施した。その際、濃度は、320 マイクログラム/kg でも 3 mg/kg でも大きな差はなかった。また、投与回数は週一回から二回に増やすと大幅に生存率が改善したが、週三回に増やすと体重減少等、毒性が確認され、生存率は週一回投与のケースと同程度になった。

これらの結果を基にして、他の白血病マウスモデルでも薬効を評価した。

致死性の高い他の変異型急性骨髄性白血病細胞マウスモデルは、通常放置すれば 20 日で死ぬモデルである。このモデルに対して、DMSO、クロラムブシル、Chb-S (配列特異性の異なる negative control としての Chb PI ポリアミド)、完全寛解量のキロサイド (1 mg/kg、毎日投与を 5 日間) の投与群と比較した結果、Chb-50 (0.32 mg/kg、週二回投与) では明らかに生存率の改善が確認された。

フィラデルフィア染色体陽性急性リンパ性白血病マウスモデルでは、現在最良の治療法である imatinib 投与でも 30 日で全滅したのに比して、Chb-M' 投与では 55 日経過しても全例生存した。またクロラムブシル(Chb)を持たない M' の配列特異性を有する PI-ポリアミドには抗腫瘍活性がないことを確認した。このことは、Chb の DNA アルキル化能と M' の配列特異性の組み合わせが、白血病の抗腫瘍活性において重要な鍵を握っていることを示している。

市販のクロラムブシルはヒト肺腺癌には効果がないことが臨床試験によりよく知られているが、Chb-50 は市販のクロラムブシルに比べて 100 分の 1 の優れた IC<sub>50</sub> を示し、ヒト肺腺癌に対しても有効な抗腫瘍活性を示した。この結果は、白血病以外の疾患に対しても適用を拡大できる可能性を示唆している。

## Chb-M' の安全性評価

Chb-M' を 1, 3.2, 10 mg/kg の投与量で各群雌 5 匹の Cr1:CD1 (ICR)マウスに単回静脈内投与したときの毒性変化を調べた。対照群には 2.5%ジメチルスルフォキシド/リン酸緩衝食塩液を投与した。

一般状態、体重及び投与後 9 日目の剖検では、被験物質に起因する変化はみられなかった。血液学的検査では、3.2 及び 10 mg/kg 群で血小板の低値がみられた。血液生化学的検査では、1 及び 10 mg/kg 群で  $\alpha$ 2-グロブリン比率の高値、3.2 mg/kg 群で  $\alpha$ 1-グロブリン比率の高値、10 mg/kg 群で  $\beta$ -グロブリン比率の低値がみられたが、いずれも被験物質に起因する変化ではないと考えられた。

以上のことから、Chb-M' をマウスに単回静脈内投与したときの毒性変化は、3.2 mg/kg 以上の群での血小板の低値のみであった。

平成 28 年度には、これらの抗腫瘍活性に関する研究成果とマイクロアレイ解析等の解析、機能評価の結果を加えて、Chb-M' と Chb-50 の抗腫瘍活性を中心とした特許出願を目指す。