

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：「がんエピゲノム異常を標的とした治療・診断法の開発」（DNA 及びヒストンのメチル化異常を標的とする治療薬開発）

2. 研究開発代表者： 松田 彰（国立大学法人北海道大学 大学院薬学研究院 特任教授）

3. 研究開発の成果

DNA 及びヒストンのメチル化異常を標的とする治療薬開発を目的として、DNA CpG 配列のメチル化の促進及び阻害、また、ヒストン中のリシンのメチル化阻害に焦点を当て、それぞれの非選択的な調節剤及び選択的な化合物の開発を行った。下記の 5 項目についての研究開発成果を以下に項目ごとに記載する。

- ① 非選択的 CpG メチル化促進、阻害剤開発：ヌクレオシド 5'-三リン酸体への代謝活性化が可能な 2'-デオキシ-5-メチルシチジン(dmC) と 2'-デオキシ-5-フォルミルシチジン(dfC) の 5'-モノリン酸プロドラッグ 6 化合物を合成したが、いずれも *in vitro* 殺細胞活性と CpG 配列のメチル化亢進活性は認められなかった。また、4 種の 5'-ジリン酸プロドラッグの複数のがん細胞におけるメチル化度合いを評価したところ、顕著なメチル化パターンの変化は見られなかった。そこで、上市されているアザシチジンと同様に共有結合により DNMT1 を阻害する化合物を設計した。ヌクレオシド体を化学合成した後、オリゴヌクレオチドへの導入を行い、その DNMT 阻害能を検討した (IC₅₀ 20 nM)。また、HeLa 細胞に対する殺細胞活性も検討し、500 nM で顕著に細胞増殖を抑制することが明らかとなった。
- ② 選択的 DNMT1, DNMT3 阻害剤開発：選択的 DNMT1, DNMT3 阻害剤として、dfC を CpG に含む二本鎖ダンベル型デコイ分子を合成した。このデコイ分子は DNMT1 選択的に共有結合し、かつ 50% ヒト血清中での半減期が大幅に向上した。DNMT1 を標的とした dfC を含むダンベル型デコイ分子のがん細胞標的化を行うべく、前立腺がんマーカーである PSMA のリガンドを結合したダンベル型デコイ分子の合成を行った。そのデコイ分子は LNCaP 細胞 (PSMA を高発現) において、100 nM の濃度でわずかながら殺細胞活性を示した。
- ③ 非選択的メチル化阻害剤開発：3-デアザネプラノシン (DZNep) と 10 個の DZNep 誘導体を合成し、その生物活性を検討したところ、EZH2 発現量低下、H3K27 トリメチル化阻害活性を有するものを見出した。DZNep の活性増強に向けた新規誘導体として、インシリコドッキングの結果をもとに 3-ハロデアザネプラノシンを設計し、3-クロロ体、3-ブロモ体、3-ヨード体の合成を完了し、さらに、3-フルオロ体の合成を検討した。
- ④ 低分子 EZH2/EED 阻害剤開発：EZH2 と EED の結合を阻害する化合物を探索すべく、スクリーニング系の構築と東大化合物ライブラリーのバーチャルスクリーニングにより、EED/EZH2 間の結合を競合阻害する 3 つのヒット化合物を得た。その構造活性相関を行うために、東大化合物ライブラリーと市販化合物それぞれ 13 個ずつの化合物に加えて、35 個の化合物を合成し (計 61 化合物)、活性評価を行った。その結果、5 μM で EED と EZH2 の結合を完全に阻害する化合物を見出す事ができた。さらに HeLa 細胞において、H3K27 メチル化を阻害するとともに細胞増殖抑制活性が見られた。さらなる構造活性相関を展開するために 26 個の周辺化合物を合成した。
- ⑤ 分子選択的 H3K37 トリメチル化阻害剤開発：EZH2 を標的としたヌクレアーゼ抵抗性化学修飾 siRNA を合成した。これらはいずれも効果的に EZH2 を抑制することが明らかとなった。マウス *in vivo* 投与による制がん効果を評価した結果、顕著な抗腫瘍効果が観察された。また、機能性 RNA 発現デバイスからの miR-101 補充療法の開発を行なった。デバイスの配列について検討した結果、U6 プロモーターを有する pri-miR-101 発現ベクターが高活性であることを明らかとした。さらに、化学修飾した RNA 発現デバイスは自然免疫応答を回避できることが明らかとなった。