

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業
(英語) Basic Science and Platform Technology Program for Innovative Biological Medicine

研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Development of innovative polyamides that control gene expression on-demand

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人 京都大学大学院理学研究科 教授 杉山 弘
所属 役職 氏名： (英語) Hiroshi Sugiyama, Professor, Graduate School of Science, Kyoto University

実施期間： 平成 28年 4月 1日 ~ 平成 29年 3月 31日

II. 成果の概要 (総括研究報告)

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を有するピロロール-イミダゾールポリアミド (以下「PI-ポリアミド」と言う) を応用し、任意の疾患関連遺伝子群の特異的な発現制御を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、DNA 損傷を引き起こす Chb (クロラムブシル) 等を用いて、アルキル化能を有する PI-ポリアミドコンジュゲートの合成技術を確立する。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し、期待される薬効を検証する。最終的には、「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」の開発を目指す。

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アルキル化 Chb PI-ポリアミドの医療応用を目指す研究を進めた。その過程で、細胞増殖に関連する転写因子群の結合塩基配列を標的とする Chb-M' が、がん増殖関連遺伝子群の抑制において有効に働くことを見出した。現在、受託企業による Chb-M' は 100 mg スケールでの合成を可能にしており、そのプロセス合成に向けたコスト等の問題解決を含めた合成経路の検討を進めている。

白血病マウスモデルでの薬効評価

これまでに得られた各種白血病細胞を移植したマウスに対する Chb-M' の薬効評価の結果は、優れたものであった。

Chb-M' の安全性、及び、動態評価試験

Chb-M' を各群雌 5 匹の Cr1:CD1 (ICR) マウスに投与する単回静脈内投与毒性試験を実施した。その結果、「3.2 mg/kg 以上の高濃度投与群で血小板の低値が認められた」のみで、それ以外の重篤な毒性は確認されなかった。企業導出の上でも必要とされる動物実験による動態評価も進めた。別途合成した Chb-M' の重水素化ラベル体を受託企業に供与して、静脈内投与時のマウスの血中薬物動態試験も実施した。その結果、低分子薬剤の挙動とは異なる非線形の動態挙動と半減期を確認した。

研究開発代表者による報告(英文)

The purpose in this project is to develop innovative polyamide drug which enables specific regulation of genes related to arbitrary diseases of interest through unique properties of pyrrole-imidazole polyamide (or PI-polyamide) to recognize and bind reversibly to a specific sequence in nuclear DNA.

In order to achieve this goal, the synthetic scheme will be established for alkylating PI-polyamide conjugates with Chb (chlorambucil) and so on which causes DNA damage. Next, the expected drug action will be validated by elucidating their sequence-specificities and abilities to regulate gene expressions using up-to-date techniques to analyze them. Finally, we aim to develop “innovative polyamides that control gene expressions on demand”.

Alkylating Chb PI-Polyamide

We and our collaborator Kamikubo (Graduate School of Medicine, Kyoto University) conducted research for medical application of alkylating Chb PI-polyamides which target relevant genes as to cancer proliferation. In the process, it was found that Chb-M' effectively inhibit oncogenes which affect transcription factors involved in cell proliferation. Recently, some commissioned companies have achieved 100 mg-scale synthesis of Chb-M', but our efforts are continued to solve the problems especially on cost of process synthesis.

Evaluation of Drug Efficacy to Leukemic Mouse Model

The evaluation of drug efficacy of Chb-M' has been outstanding so far against mice transplanted with leukemic cells.

Safety and Pharmacokinetic Study of Chb-M'

We performed a single intravenous dose toxicity test toward Cr1:CD1 (ICR) mice where each group consisted of five females. The results show a slight thrombocytopenia in high-dose groups with equal or more than 3.2 mg/kg, but no severe toxicity was observed. We also advanced pharmacokinetic study, which would be required for licensing-out to a company. As a result, a non-linear behavior was observed which is characteristic of medium to large molecules, and half-life data in blood was acquired.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌0件、国際誌7件）

1. Kawamoto, Y.; Sasaki, A.; Chandran, A.; Hashiya, K.; Ide, S.; Bando, T.; Maeshima, K.; *Sugiyama, H., Targeting 24 bp within Telomere Repeat Sequences with Tandem Tetramer Pyrrole-Imidazole Polyamide Probes. *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 14100-14107.
2. Chandran, A.; Syed, J.; Li, Y.; Sato, S.; Bando, T.; *Sugiyama, H., Genome-wide assessment of the binding effects of artificial transcriptional activators by utilizing the power of high-throughput sequencing. *ChemBioChem.* **2016**, *17*, 1905-1910.
3. Kashiwazaki, G.; Chandran, A.; Asamitsu, S.; Kawase, T.; Kawamoto, Y.; Sawatani, Y.; Hashiya, K.; Bando, T.; *Sugiyama, H., Comparative analysis of DNA-binding selectivity of hairpin and cyclic pyrrole-imidazole polyamides based on next generation sequencing. *ChemBioChem.* **2016**, *17*, 1752-1758.
4. Sasaki, A.; Ide, S.; Kawamoto, Y.; Bando, T.; Murata, Y.; Shimura, M.; Yamada, K.; Hirata, A.; Nokihara, K.; Hirata, T.; *Sugiyama, H., Maeshima, K., Telomere visualization in tissue sections using pyrrole-imidazole polyamide probe. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 29261.
5. Sawatani, Y.; Kashiwazaki, G.; Chandran, A.; Asamitsu, S.; Guo, C.; Sato, S.; Hashiya, K.; Bando, T.; *Sugiyama, H., Sequence-specific DNA binding by long hairpin pyrrole-imidazole polyamides containing an 8-amino-3,6-dioxo-octanoic acid unit. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 3603-3611.
6. Asamitsu, S.; Li, Y.; Bando, T.; *Sugiyama, H., Ligand-mediated G-quadruplex Induction in a Double-stranded DNA Context by Cyclic Imidazole/Lysine Polyamide. *ChemBioChem.* **2016**, *17*, 1317-1322.
7. Chandran, A.; Syed, J.; Taylor, R. D.; Kashiwazaki, G.; Sato, S.; Hashiya, K.; Bando, T.; *Sugiyama, H., Deciphering the Genomic Targets of Alkylating Polyamide Conjugates Using High-throughput Sequencing. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 4014-4024.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. DNAの構造と機能を制御するケミカルバイオロジー、口頭（招待公演）、杉山 弘、第55回日本白内障学会総会・第42回水晶体研究会（岩手県情報交流センター アイーナ・盛岡）、2016年7月29日～31日（29日）、国内
2. 二本鎖DNAを標的とした人工遺伝子スイッチの開発、口頭（招待公演）、杉山 弘、第90回日本薬理学会年会 年会企画次世代のシンポジウム「核酸をターゲットとした創薬研究の最前線」、（長崎ブリックホール・長崎）、2017年3月15日～17日（15日）、国内
3. Analysis of Genomic DNA-Binding Sequences of an Alkylating PI Polyamide Conjugate by a High-Throughput Sequencer、口頭発表、KASHIWAZAKI, Gengo; TANIGUCHI, Junichi; BANDO, Toshikazu; KAMIKUBO, Yasuhiko; SUGIYAMA, Hiroshi、日本化学会第97春季年会（慶應義塾大学 日吉キャンパス・横浜）、2017年3月16～19日（16日）、国内
4. 非小細胞肺癌におけるEGFRチロシンキナーゼ阻害剤耐性を克服する治療戦略の構築 口頭発表、松尾明彦、森田剣、杉山成明、杉山弘、足立壮一、上久保靖彦 日本Cell Death学会学術集会（きゅりあん品川区立総合区民会館・東京）、2016年9月9日～10日、国内
5. 新規化合物C-Mを用いた神経芽腫における新規治療戦略の開発 口頭発表 中谷 哲章、森田 剣、野口 勇貴、岩井 詩咲花、杉山 弘、上久保 靖彦、足立 壮一 日本Cell Death学会学術集会（きゅりあん品川区立総合区民会館・東京）、2016年9月9日～10日、国内

6. Cluster regulation of RUNX family by “gene switch” triggers a profound tumor regression of diverse origins. 口頭発表 Ken Morita, Kensho Suzuki, Shintaro Maeda, Akihiko Matsuo, Yoshihide Mitsuda, Ayaka Yano, Yoshimi Yamada, Hiroki Kiyose, Chieko Tokushige, Paul P. Liu, Hiroshi Sugiyama, Yasuhiko Kamikubo and Souichi Adachi, 58th ASH Annual Meeting and Exposition San Diego, CA, US (December 3-6, 2016) 国外
7. Targeting Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia with a novel transcriptional inhibitor. ポスター発表 Shintaro Maeda, Ken Morita, Kensho Suzuki, Hiroshi Sugiyama, Souichi Adachi, and Yasuhiko Kamikubo 58th ASH Annual Meeting and Exposition San Diego, CA, US (December 3-6, 2016) 国外
8. RUNX1 遺伝子クラスター制御による抗腫瘍戦略の構築 口頭発表 光田吉秀、森田剣、足立壮一、杉山弘、上久保靖彦 第 33 回京都がん研究会（京都教育文化会館、京都）、2016 年 3 月 17 日 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 遺伝子スイッチでガンを治す、杉山 弘、京都大学アカデミックデイ 2016、2016/9/18、国内

(4) 特許出願

(希望しない)