

ゲノム化学に基づく先進医療開発研究

福田 昇^{1), 2)}, 五十嵐潤²⁾, 齋藤孝輔²⁾, 藤原恭子²⁾, 上野高浩²⁾, 相馬正義²⁾

Researches to develop advanced medicines based on the chemical genomics

Noboru FUKUDA^{1), 2)}, Jun IGARASHI²⁾, Kosuke SAITO²⁾, Kyoko FUJIWARA²⁾, Takahiro UENO²⁾, Masayoshi SOMA²⁾

要旨

「ゲノム化学に基づく先進医療開発研究拠点」プロジェクトは、新規遺伝子制御薬ピロール・イミダゾール (PI) ポリアミドの創薬開発プラットフォームを確立し、癌や腎臓疾患などの難治性疾患への治療法の開発研究として、PIポリアミドの合成法の開発、PIポリアミドの物性と薬物動態研究、毒性安全性試験を行っている。これまで進行性腎障害へTGF- β 1に対するPIポリアミドの前臨床試験を行い、癌疾患に対しMYCに対するPIポリアミド、融合遺伝子を抑制するPIポリアミドを開発している。またPIポリアミドを用いて日大式ヒトiPS細胞誘導法を開発している。今後、創薬開発をGMP、GLPレベルまで行える研究拠点とし、臨床第I相までの開発研究を目指している。

1. はじめに

日本の医療は世界最高水準であるが、癌や腎臓病など未だに治らない疾患は多く存在する。医学研究の目的はこれらの疾患に対し、新たな治療法を開発し、難治性疾患に苦しんでいる患者さんに光明を与え、人類を幸福にする事である。医学研究として基礎研究のみでは難治性疾患の治療開発は出来ず、基礎研究での成果を臨床応用するためには、動物実験、前臨床試験、GLP試験、臨床試験を繰り返し実用化に到達する必要があるが、この実用化へのトランスレーショナルリサーチに莫大な研究費と産学連携が必要であり、死の谷となっている。政府の成長戦略として研究開発から事業化までの死の谷を克服し、イノベーションの創出を促進する方針を掲げている。

2003年にヒトゲノム解読が完了し、ヒトのゲノム配列に相当するDNAの塩基配列が明らかになり、21世紀はポストゲノム時代に突入した。現在、解明されたヒトの設計図である塩基配列のゲノム情報解読が進められており、癌を中心に多くの疾病が

DNAレベルで理解されるようになってきている。ゲノム化学に基づいたゲノム創薬、遺伝子治療への応用が今後の医療で大きく期待されている。ゲノム化学とは、ゲノムに限らずプロテオミクスをも含む広い範囲のバイオロジーの分野において化学を活用する研究全般を指し、ゲノム創薬、遺伝子診断、バイオ材料など、今後の医療においても最重要分野である。今後発展するゲノム産業分野に大きく日本が関与するため、この分野の研究に我が国が全力を注がなければならない。残念ながら日本では「ゲノム化学」の分野の講座、研究室はほとんど無いのが実状であり、ゲノム産業創出に国際的に大きく遅れをとっている状況である。

このような背景のなか、日本大学医学部戦略的研究基盤形成支援事業「ゲノム化学に基づく先進医療開発研究拠点」プロジェクトは、日本大学に形成された創薬開発基盤とゲノム創薬の新しい手法を用いることで、新規薬剤候補を生み出す先進的創薬開発プラットフォームを確立することに基づいている。このプラットフォームで新規薬剤候補を医師主導で臨

1) 日本大学総合科学研究科

2) 日本大学医学部

相馬正義: souma.masayoshi@nihon-u.ac.jp

床応用に向けた迅速な対応がとれる基盤整備を行うことを本プロジェクトの主体にしている。すなわち遺伝子配列を認識する化合物の自動合成システムを国内外に先駆けて確立し、臨床前試験を行う系が学内に確立された。このことは、核酸医薬を含めたゲノム創薬分野で実際の応用に向けての問題点を克服する可能性を有する研究拠点と言える。

本研究拠点は平成23年度に文部科学省私立大学高度化推進事業プロジェクトとして開始され、総合内科、腎臓高血圧内分泌内科、消化器肝臓内科、呼吸器内科、消化器外科、小児外科、泌尿器科、整形外科、皮膚科等の教室が参画し、主に新規遺伝子制御薬ピロール・イミダゾールポリアミドの創薬開発研究を行っている。

2. ピロール・イミダゾール (PI) ポリアミドについて

PIポリアミドは1996年カルフォルニア工科大学のDervanらにより発見された低分子有機化合物で、DNAのマイナーグループ(狭い溝)を認識していることが分かった^{1,2)}。京都大学杉山らは1996年に抗生物質であるデュオカルマイシンAとディスタマイシンAが協同的なDNAのアルキル化能を有していることを発見し、それに基づいてこれまでPIポリアミドを基盤とした様々な機能分子を設計している³⁾。合成されたPIポリアミドは、Py/ImペアがCG, Py/PyペアはATまたはTA, Im/PyペアはGC

を認識し、これにより任意の二本鎖DNAに塩基特異的に結合し、標的遺伝子を抑制することができる。PIポリアミドは遺伝子の転写調節領域に結合することにより、転写に関わる因子(基礎転写因子や転写制御因子)の結合を阻害し、遺伝子発現を制御する(図1)。

PIポリアミドは、あらゆる標的遺伝子に対して合成することができるため、阻害する転写因子を選択することで遺伝子の抑制効果を任意に調節することができる。また、既存のアンチセンスDNA, siRNAなどの核酸医薬と異なり、核酸構造を持たない低分子化合物であり生体内投与においてDDSを必要とせず、単独投与にて細胞の核、生体内でも臓器の核に効率よく長時間取り込まれる。またPIポリアミドはsiRNAと違い、遺伝子をロックダウンするのではなく、疾患の状態で転写活性が亢進した遺伝子発現を正常レベルまで戻す遺伝子制御であり、通常の転写活性にある場合には影響しないため、創薬での副作用の面での利点がある。

3. PIポリアミドの創薬開発

1) PIポリアミドの合成法の開発

今までPIポリアミドの最大の問題点は合成の難しさであった。そのためPIポリアミドの研究が行える施設は世界的にも極わずかであった。我々の研究グループはFmoc法による固相自動合成で、縮合活性化剤としてHCTUを用い、それに最も適切な

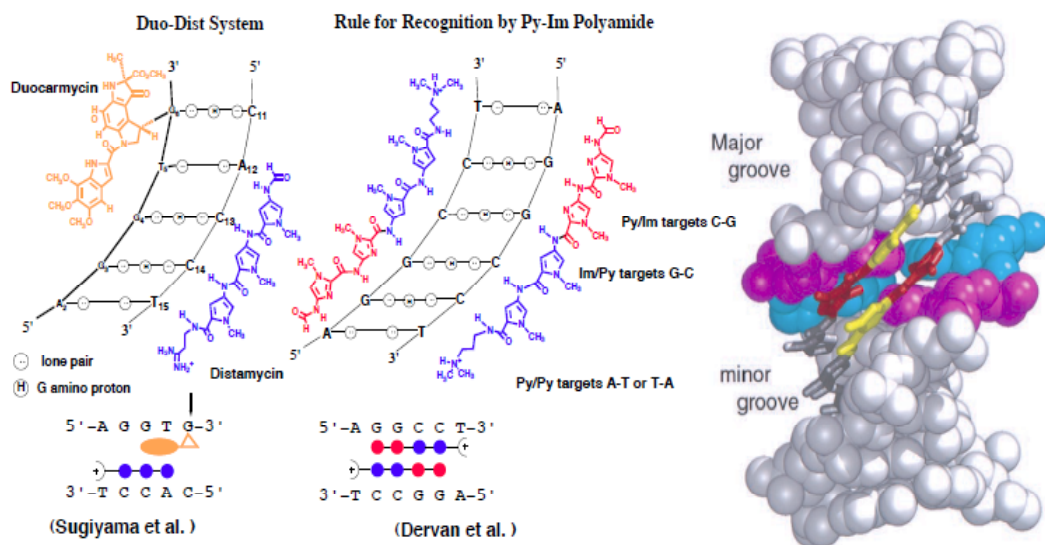


図1. PIポリアミドの二本鎖DNAのマイナーグループへの結合。

合成条件，合成機のセットアップを行った。また従来最も合成困難であったイミダゾールピロール配列に対しては，ピロール酸塩化物を用いた手合成法により定量的に合成することに成功した。この方法を基に，日本大学でさらに改良し，現在99%の純度で合成，精製し，1回に100mg以上の合成が可能となっている。またPIポリアミドの分子設計でのβリンカー挿入構造によりいかなる塩基配列に対しても，対応する分子の設計が可能となった。

2) PIポリアミドの物性と薬物動態研究

薬学部ではPIポリアミドのUV-HPLCでの定量系を確立し，薬物動態を検討としてPIポリアミドをラットに静注し，殆どが尿排泄で，一部胆汁排泄であり，分子量が大きくなると血清での減衰は緩やかであり，臓器に長期結合している事が明らかとなった^{7,8)}。

ラットでFITCラベルしたPIポリアミドを静脈より投与し14日後まで腎臓では尿管，糸球体の核に取り込みが見られた(図2)。大動脈では内皮や平滑筋層に取り込みが観察され，PIポリアミドは強力かつ長期の核への結合が認められた。肝臓，肺にも取り込みが見られたが，心臓，脳には取り込みが認められなかった。

3) PIポリアミドの毒性安全性試験

大量投与安全性試験としてPIポリアミドをマウ

スの静脈内に大量単回投与を行った。PIポリアミドをマウスに急速静脈内投与すると40 mg/kg以上では，PIポリアミドの粘性の為マウスは死亡した。投与量20 mg/kg以下では全く健康で，臓器障害もなかった。反復投与毒性試験では，大量のPIポリアミドをマウスに投与し，体重，摂餌量，飲水量，血液化学的検査，尿検査，組織学的検査を検討したが，特に副作用は認められず，薬として開発可能と考えられた。

4) TGF-β 1に対するPIポリアミドの創薬開発

TGF-β 1は細胞外基質の増生，線維芽細胞の遊走に関与し，腎炎，血管狭窄，肝硬変症，肺線維症などの線維性疾患の責任分子であるが，未だにTGF-β 1を抑制する実地薬剤は無い。そこで我々は，TGF-β 1に対するPIポリアミドを用いて，進行性腎障害や肝硬変，肺線維症，皮膚癬痕などの線維性疾患の遺伝子治療の目的で創薬開発を行った^{4,11)}。進行性腎障害のモデルラットである高食塩負荷のDahl食塩感受性ラットにTGF-β 1に対するPIポリアミドを2週間，静注投与すると著明に尿蛋白と腎内TGF-β 1 mRNA発現を抑制した(図3)。更に4週間投与を行ったところ，腎臓の組織障害の改善効果がみられた。TGF-β 1に対するPIポリアミドの前臨床試験として，ラットに長期投与したところ，体重や摂餌量には影響せず，血清でも通常の薬剤と同様な薬物動態を示した。これらの成績から疾患モデル

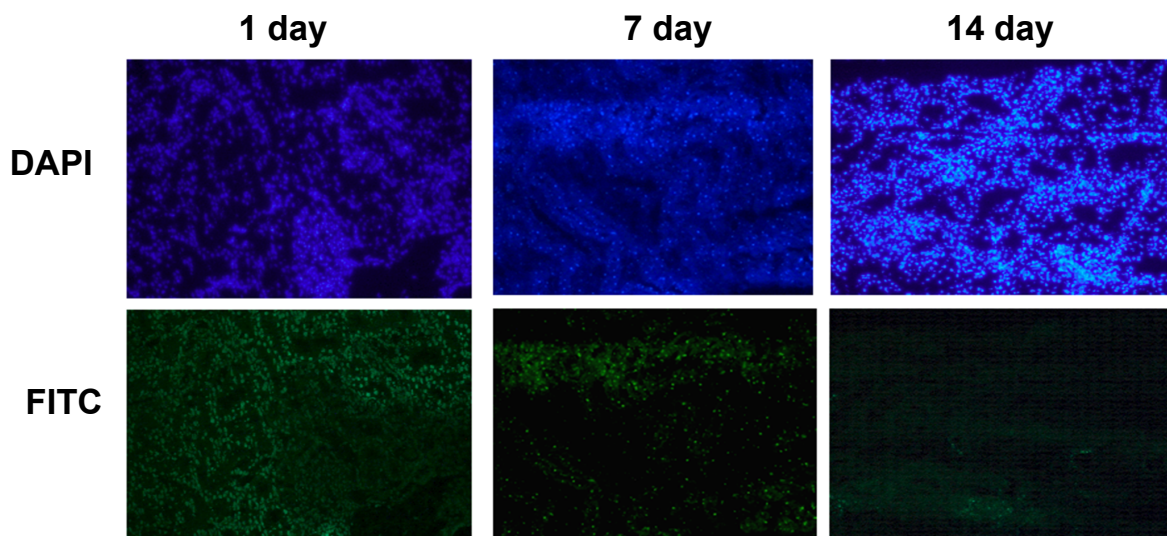


図2. FITCラベルPIポリアミドの静脈投与後の14日後まで腎臓尿管，糸球体での核への取り込み。

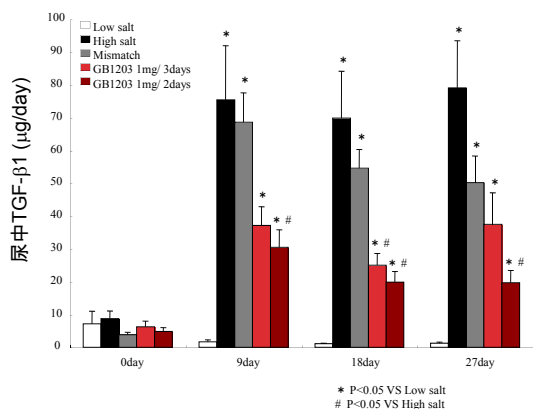


図3. Dahl食塩感受性ラットにTGF-β1に対するPIポリアミドを4週間、静注投与すると著明に尿中TGF-β1排泄を投与量依存性に抑制した。

においてPIポリアミドの遺伝子治療としての有用性が示唆された。

5) ヒトTGF-β1のPIポリアミドの前臨床試験

我々はヒトTGF-β1のプロモーターに対するPIポリアミドを7つ分子設計した。その中からヒト線維芽細胞培養系を用いて、TGF-β1 mRNA発現を最も強く抑制するリードPIポリアミドを選定した。我々はリード決定したヒトTGF-β1に対するPIポリアミドについて、ヒトゲノムと相同性の高い霊長類マーモセットを用いて前臨床試験を行う事とし

た。マーモセットは新世界猿に属し、その繁殖性の高さから、製薬会社を含め創薬開発前臨床試験で用いられる。日本大学内にマーモセット飼育施設がないため、平成24年度より川崎市にある公益法人実験動物中央研究所と日本大学との契約で、TGF-β1に対するPIポリアミドの創薬開発共同研究を開始した。マーモセットの皮膚にTGF-β1に対するPIポリアミドを局所注射して、切創を作成、42日後の皮膚肥厚性瘢痕形成を評価した。PIポリアミドを注射した皮膚では肥厚性瘢痕は殆ど出来なかった。また組織学的にも皮膚肥厚、線維化、ビメンチン陽性線維芽細胞浸潤を著明に抑制した(図4)。

さらに皮膚肥厚性瘢痕に対しTGF-β1に対するPIポリアミドを医学部附属板橋病院薬剤部製剤室で軟膏化した。FITCラベルしたPIポリアミドを5種類(ワセリン、プラスチベース、親水軟膏、ソルベース、サンジェロース)の水性基剤と水溶性基剤と組み合わせで調合しサンプルを作製し、ラットの背部の皮膚瘢痕に塗布し、皮膚への到達度を検討し、ソルベースを基剤としたPIポリアミドが最も皮膚へのデリバリーが高かった。

平成25年度には進行性腎障害のバイオ医薬として、TGF-β1に対するPIポリアミドの効果を検証するため、マーモセットにシクロスポリン腎症を作成し、PIポリアミドの効果を検証する計画である。

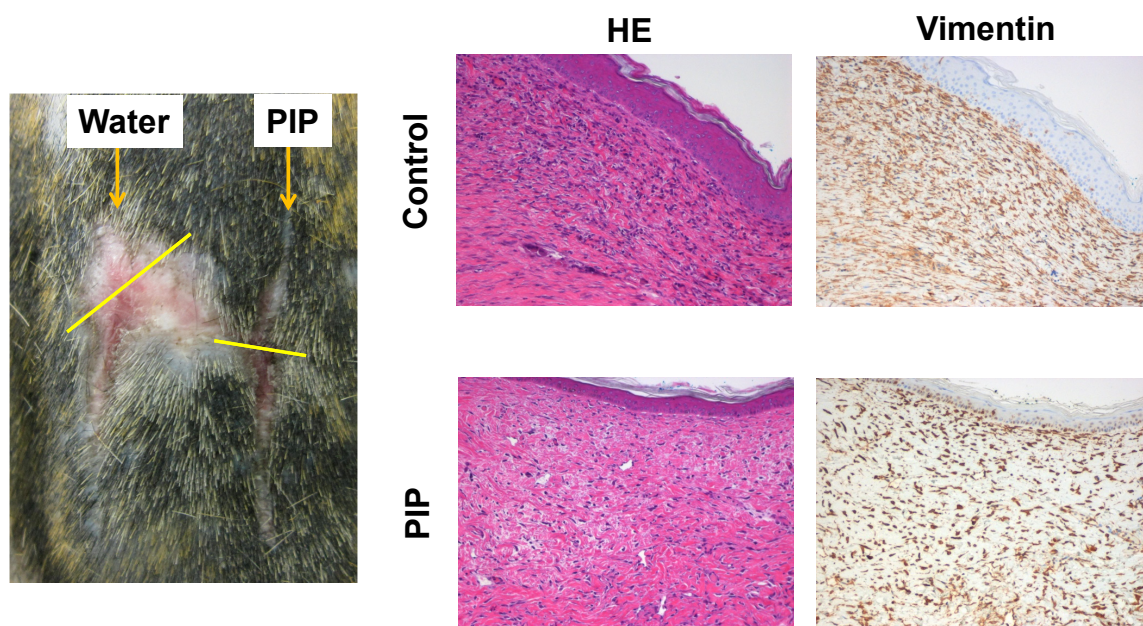


図4. マーモセット皮膚瘢痕モデルに対するTGF-β1に対するPIポリアミド抑制効果。

6) 抗腫瘍効果を持つPIポリアミドの創薬開発

難治疾患治療開発グループではMYC結合E-box配列CACGTGを完全にまたは部分的に認識するPIポリアミドがヒト骨肉腫細胞株、慢性骨髄性白血病細胞株に対し増殖抑制効果を示す事を確認した。骨肉腫細胞株を用いた詳細な解析により、同ポリアミドがアポトーシスを誘導すること、マウス皮下腫瘍モデルにおいても抗腫瘍効果を示すことを確認した。泌尿器科のグループは前立腺癌においてアンドロゲン受容体に依存したTMPRSS2-ERG融合遺伝子の切断・転座を抑制するPIポリアミドを開発し、前立腺癌細胞増殖能と遊走能ともに抑制する事を認め、特許化し創薬開発を行っている。小児外科のグループでは、LIT1遺伝子プロモーター領域のCAAT boxに結合するよう作成したPIポリアミドが肝芽腫細胞株、腎芽腫細胞株で、LIT1遺伝子発現抑制と抗腫瘍効果を認めた。

7) サイクリックPIポリアミドの創薬開発

これまでのPIポリアミドの構造はヘアピン型で、Kd値は10-9Mであったが、2本鎖DNAへの結合が不安定になることが問題であった。サイクリックPIポリアミドはポリアミドの構造を環状にすることにより、2本鎖DNAに安定に結合し、理論上は100~10分の1の濃度で2本鎖DNAに結合するため、最終的な創薬に有利である。日本大学では京都大学との共同研究でサイクリックPIポリアミドの合成に成功した。そこでサイクリックPIポリアミドの薬効、薬物動態をヘアピンPIポリアミドに比較検討し、創薬開発を行っている。

8) TGF-β1に対するPIポリアミドによる日大式ヒトiPS細胞誘導法の開発

近年iPS細胞をソースとした再生医療実現化に向けて世界中で研究が行われているが、現時点では初期化因子の導入はウイルスを用いる手法が主流であるため安全性に問題がある。近年、山中4因子による転写レベルでのiPS誘導のメカニズムは、E-カドヘリンの増加とTGF-β1の抑制による、間葉細胞の上皮化(mesenchymal-epithelial transition:MET)によることが報告された¹²⁾。一方、生物資源科学部の舩廣らは蛋白を細胞内に高効率に導入するSutabilon蛋白を開発している。そこで我々は舩廣研究室

と共同研究としてヒトiPS細胞誘導時にSutabilon結合初期化因子を導入、さらにフィーダー細胞にリシードした時にTGF-β1に対するPIポリアミドを用いる事により、より安全な日大式iPS細胞法を開発している。

5. 今後の展望

現在の難治疾患に対する創薬は、候補物質からの実際の薬となる確率が32,500分の1である昨今、製薬会社が自社での化合物候補探索・研究から、大学のバイオ医薬候補に目を向け始めた。しかし、大学でのアーリーシーズを製薬会社がライセンス購入した場合、その後の開発費用が莫大となるため、製薬会社は大学独自で臨床第I相まで開発し、発癌、安全性などGLPで検証したシーズを求めている。そこで当研究プロジェクトのように大学研究機関のみで、これまで有効な薬剤の無かった難治性疾患に対し創薬開発を行い、臨床科におけるGMP、GLPレベルの検証まで行える研究拠点で、臨床第I相までの開発研究を行うことは、先駆的な研究を臨床応用という実践的研究に結び付けることを可能にする極めて意義深い試みと言える。この基盤形成に基づく研究体制が確立し、臨床応用への対応ができる体制が整えば、これを範として広く国内にゲノム化学、ゲノム創薬の新たな展開を切り開くことができ、ゲノム産業における国際的な形勢を本国が十分に逆転できる可能性もあると言って過言ではないと考えられる。

文献

- 1) Trauger JW, Baird EE, Dervan PB. Recognition of DNA by designed ligands at subnanomolar concentrations. *Nature* 1996; 382: 559-561.
- 2) Dervan PB. Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorg Med Chem* 2001; 9: 2215-2235.
- 3) Sugiyama H, Lian C, Isomura M, et al. Distamycin A Modulates the Sequence Specificity of DNA Alkylation by Duocarmycin A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 14405-14410.
- 4) Lai Y-M, Fukuda N, Ueno T, et al. Synthetic pyrrole-imidazole polyamide inhibits human transforming growth factor-β1 gene expression. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 571-575.
- 5) Matsuda H, Fukuda N, Ueno T, et al. Development of gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeted to the TGF-β1 promoter for treatment of progressive renal diseases. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 422-432.
- 6) Matsuda H, Fukuda N, Ueno T, et al. Transcriptional regulation of progressive renal disease by the gene

- silencing pyrrole-imidazole polyamide targeted to the TGF- β 1 promoter. *Kidney Int* 2011; **79**: 46-56.
- 7) Fukasawa A, Nagashima T, Aoyama T, et al. Optimization and validation of a high-performance liquid chromatographic method with UV detection for the determination of pyrrole-imidazole polyamides in rat plasma. *J Chromatograph B* 2007; **859**: 272-275.
- 8) Nagashima T, Aoyama T, Yokoe T, et al. Pharmacokinetic modeling and prediction of plasma pyrrole-imidazole polyamide concentration in rats using simultaneous urinary and biliary excretion data. *Biol Pharm Bull* 2009; **32**: 921-927.
- 9) Yao E-H, Fukuda N, Ueno T, et al. A novel gene silencer pyrrole-imidazole polyamide targeting TGF- β 1 inhibited restenosis and preserved endothelialization in the injured artery. *Cardiovasc Res* 2009; **81**: 797-804.
- 10) Washio H, Fukuda N, Matsuda H, et al. Transcriptional inhibition of hypertrophic scars by a gene silencer. *J Invest Dermatol* 2011; **31**: 1987-1995.
- 11) Ichida JK, Blanchard J, Lam K, et al. A small-molecule inhibitor of tgf-beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell* 2009; **5**: 491-503.