



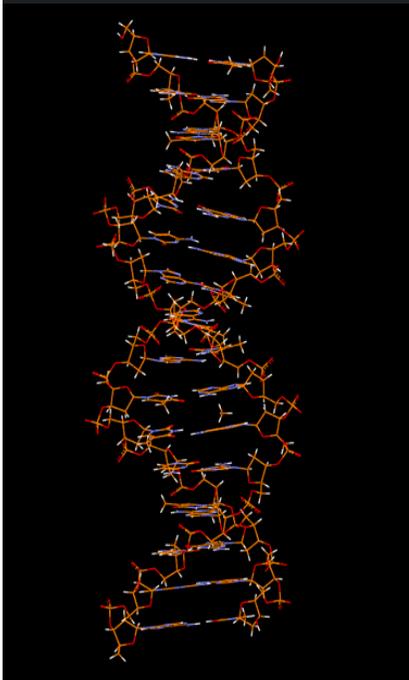
CHIBA CANCER CENTER

Chiba Cancer Center  
Research Institute



# PI ポリアミド化合物の開発

永瀬 浩喜 千葉県がんセンター 研究所



第3回ミトコンドリア病研究・患者公開フォーラム 2018年2月24日(土) 12:50-17:30



こころと体にやさしく、希望の持てるがん医療

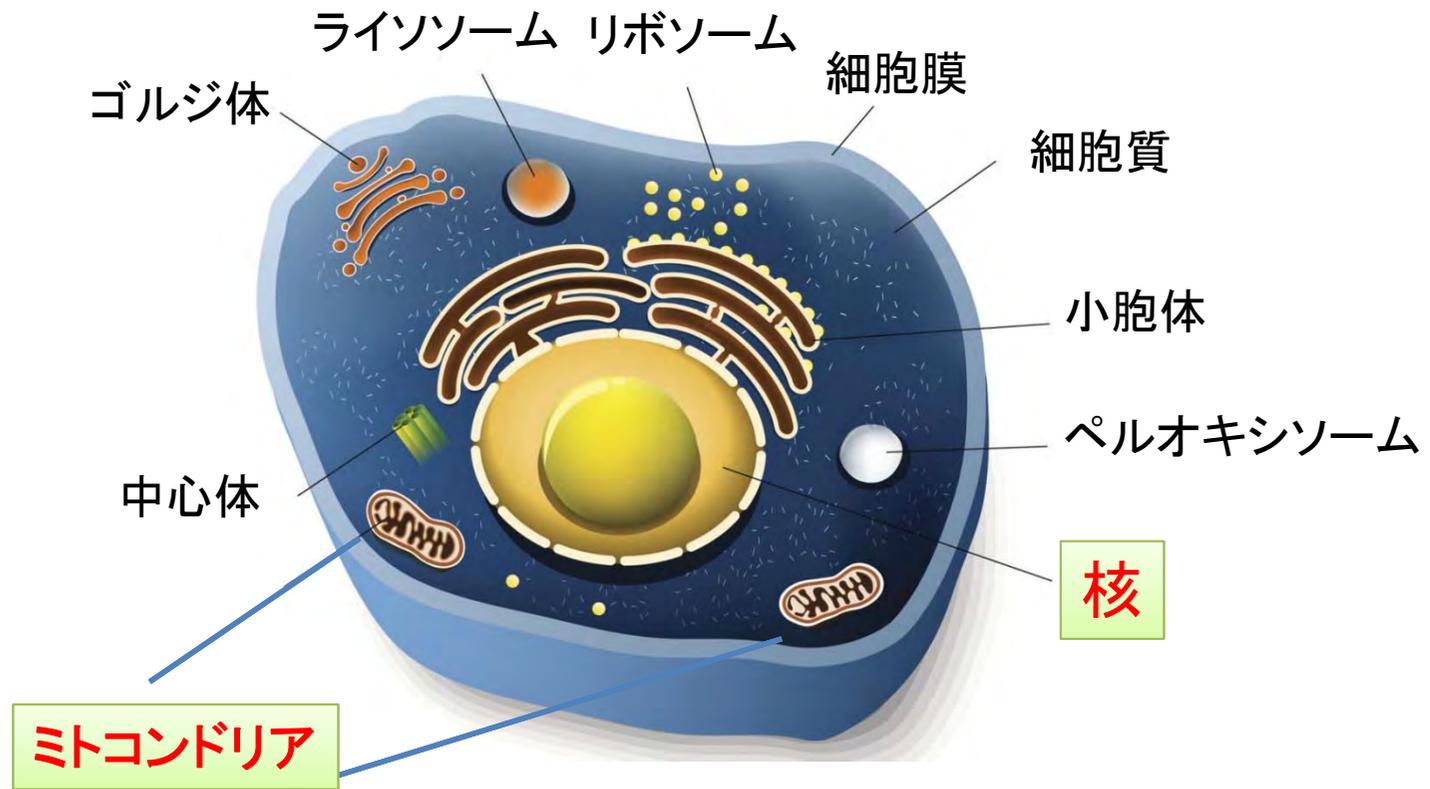
「ロボットを操縦して手術」



ミトコンドリアとがん

そして

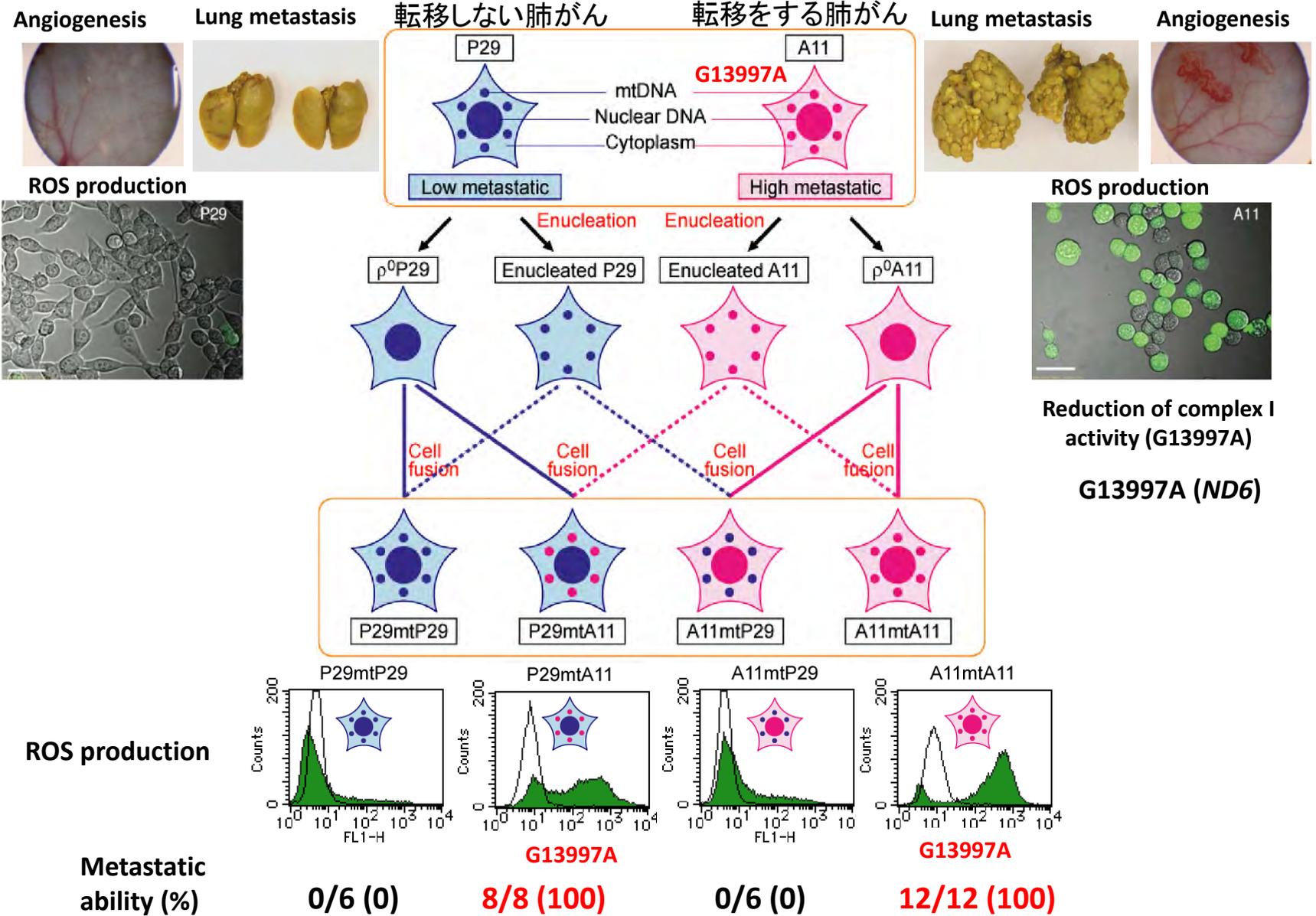
ミトコンドリア標的治療へ



Biology Wise より

# 千葉県がんセンターでの ミトコンドリア研究

# がんの転移をひきおこすミトコンドリア遺伝子異常の発見



Specific mitochondrial DNA mutation in mice regulates diabetes and lymphoma development

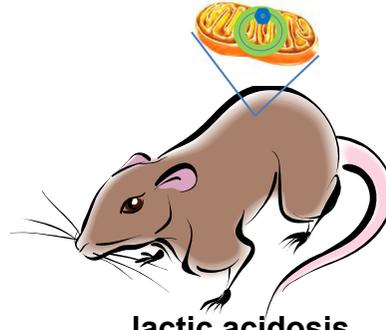
活性酸素を産生するミトコンドリア異常マウスは老化は認めなかったが  
糖尿病やがんを起こしやすく、抗酸化剤の飲用で発症が抑えられた

Mice with normal mitochondria  
正常なミトコンドリアを持つマウス



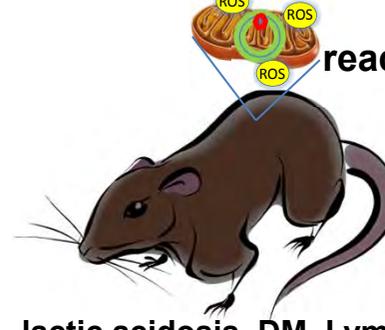
ミトコンドリアの突然変異は二十日ネズミに血液のがんをおこし、また、このがんは、抗酸化剤で予防できた。(つくば大学との共同研究)

Mice with type B mutation mitochondria  
病原性突然変異Bミトコンドリアを持つマウス



lactic acidosis  
高乳酸血症のみ

Mice with type A mutation mitochondria  
病原性突然変異Aミトコンドリアを持つマウス

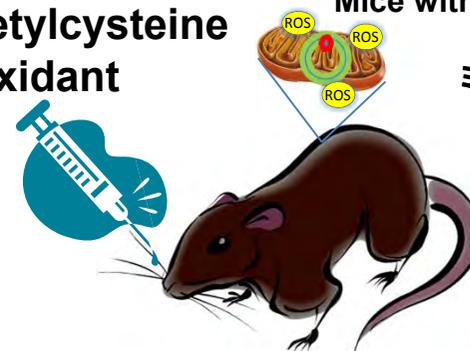


lactic acidosis, DM, Lymphoma  
高尿酸血症・糖尿病・リンパ腫

reactive oxygen species (ROS)+  
ROS産生

Treat with *N*-acetylcysteine (NAC) an antioxidant

Mice with type A mutation mitochondria  
病原性突然変異Aミトコンドリアを持つマウス



Reduced lactic acidosis, DM, Lymphoma  
高尿酸血症・糖尿病改善・リンパ腫発症予防

**ミトコンドリア 遺伝子変異で糖尿病に**  
筑波大など動物実験で解明

筑波大学の林純一教授や千葉大学のセンターなどは、生命活動に必要なエネルギーを細胞内で合成している小胞質ミトコンドリアの遺伝子に異常があると、糖尿病やリンパ腫になりやすいことを動物実験で突き止めた。山口智の米科学アカデミー紀要に掲載された。ミトコンドリアは呼吸で取り入れた酸素を使って活動に必要なエネルギーを作っている。研究チームがミトコンドリアの遺伝子を操作し、呼吸能力が低下して活性酸素が生じるような突然変異を起させたところ、糖尿病になることがわかった。マウスが死んだ後に解剖すると、リンパ腫が顕微鏡で発症していたことも明らかになった。突然変異を起したマウスに抗酸化剤を投与すると、糖尿病やリンパ腫の発症が抑えられた。このことから、研究チームは人間の症例でも、抗酸化剤の投与が予防に役立つのではないかと期待している。

OPEN

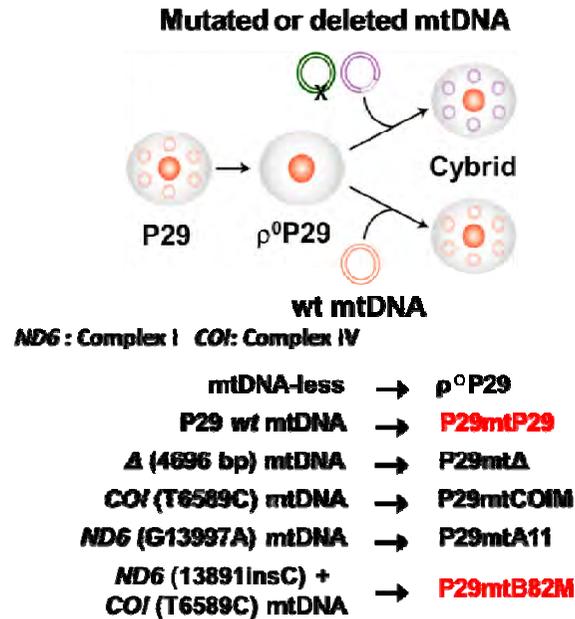
## Association of predicted pathogenic mutations in mitochondrial *ND* genes with distant metastasis in NSCLC and colon cancer

Received: 18 July 2017  
Accepted: 31 October 2017  
Published online: 14 November 2017

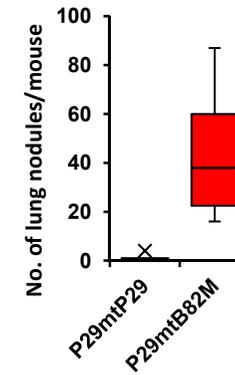
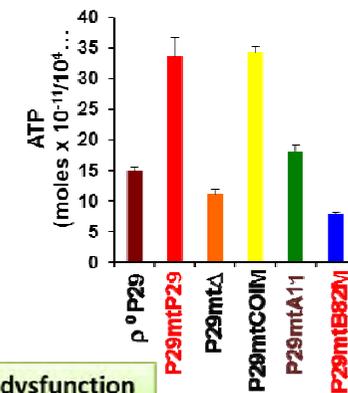
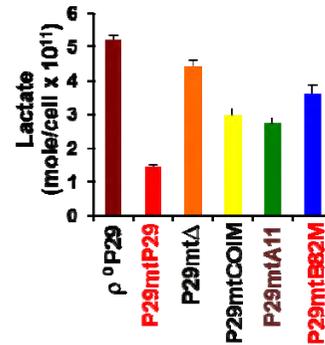
Nobuko Koshikawa<sup>1</sup>, Miho Akimoto<sup>2,4</sup>, Jun-Ichi Hayashi<sup>3</sup>, Hiroki Nagase<sup>1</sup> & Keizo Takenaga<sup>2</sup>

ミトコンドリア呼吸鎖に関係する遺伝子にがんでも変異が集積していた

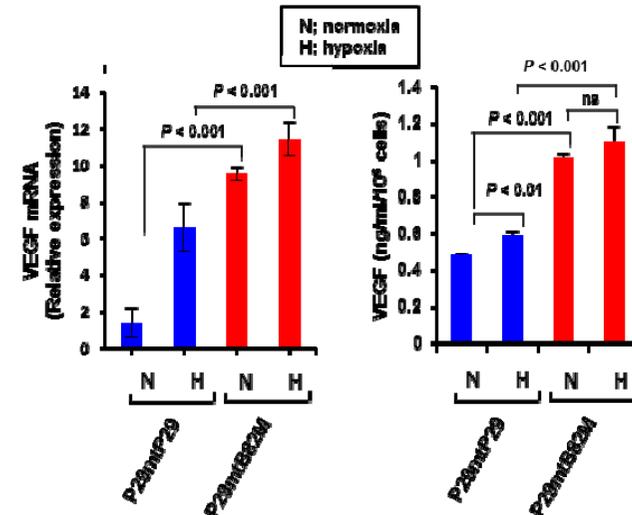
### Cybrids with mutated mtDNA



Cybrids with *ND6* mutations showed mitochondrial dysfunction



Metastasis-related gene expression



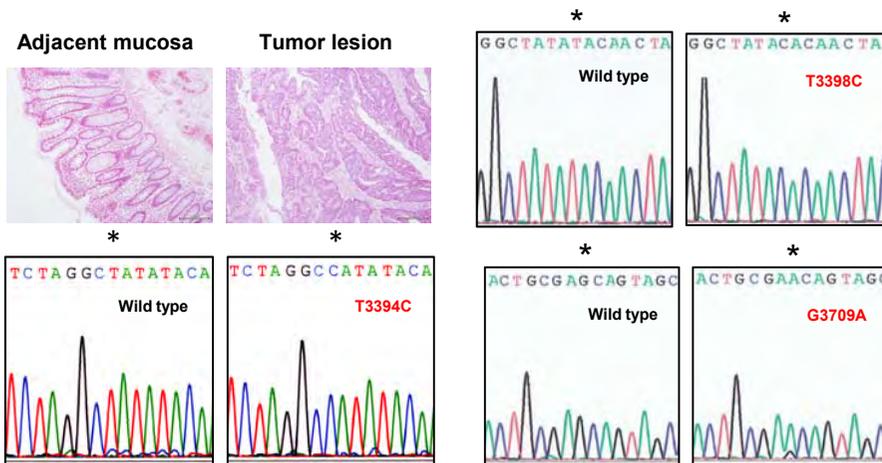
# 肝臓や肺、骨などに転移したがんではミトコンドリア遺伝子の異常が多い

Frequency of somatic mutation and the occurrence of SNVs and SNPs that meet the criteria for pathogenicity in the mtDNA genes.

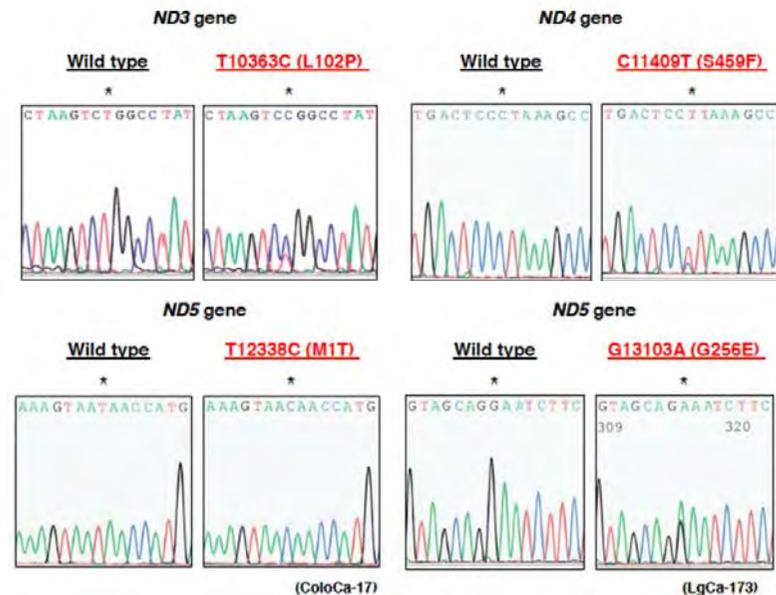
ND gene		No. of somatic mutations (Average No. per 100 bp)			No. of SNVs/SNPs that meet the criteria for pathogenicity (Average No. per 100 bp)
Name	Size (bp)	Nonsynonymous	Synonymous	Total	Total
ND1	956	4 (0.418)	5 (0.628)	9 (0.941)	6 (0.628)
ND2	1,042	2 (0.192)	2 (0.192)	4 (0.384)	0 (0)
ND3	346	2 (0.578)	0 (0)	2 (0.578)	1 (0.289)
ND4L	297	0 (0)	1 (0.337)	1 (0.337)	0 (0)
ND4	1,378	3 (0.218)	6 (0.435)	9 (0.653)	1 (0.073)
ND5	1,812	7 (0.386)	9 (0.497)	16 (0.883)	5 (0.276)
ND6	525	4 (0.762)	6 (1.143)	10 (1.905)	1 (0.19)
Total	6356	22 (0.346)	29 (0.456)	51 (0.802)	14 (0.22)
COII	684	2 (0.293)	5 (0.731)	7 (1.023)	0 (0)
ATP6	681	3 (0.441)	4 (0.587)	7 (1.028)	0 (0)
CYTB	1,141	6 (0.526)	0 (0)	6 (0.526)	1 (0.088)
Total	2,506	11 (0.439)	9 (0.359)	20 (0.798)	1 (0.04)

Selected SNVs and SNPs are accumulated in the ND genes compared to COII, ATP6 and CYTB genes that were sequenced for reference.

## Mutations in the ND1

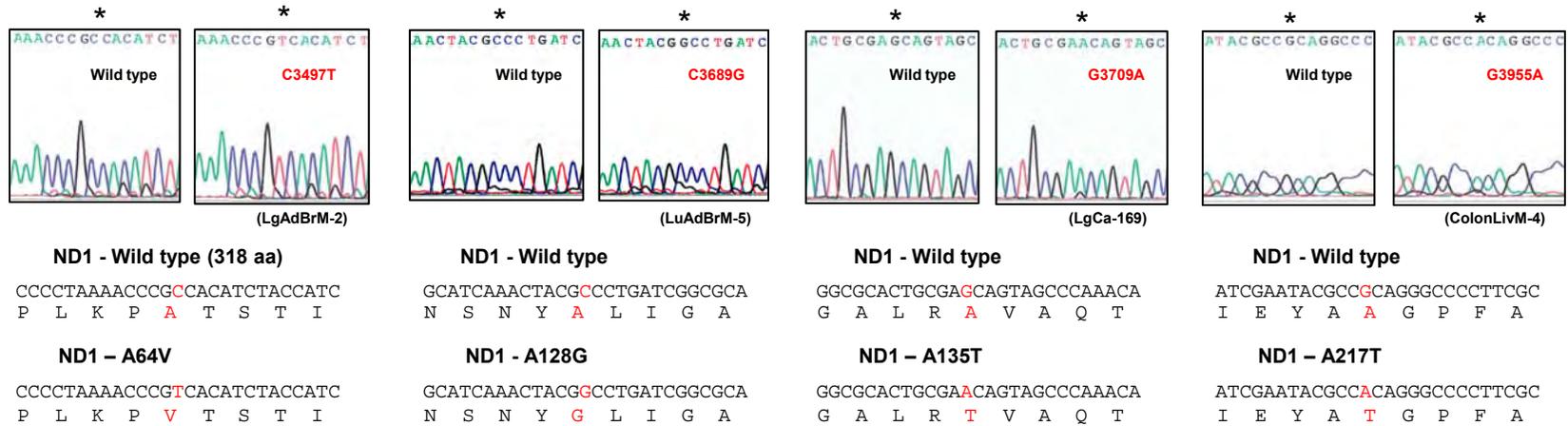


Category	Cancer	No. of cases with the indicated mutation / Total No. of cases		Significance
		Group 1 (Primary w/o distant meta)	Group 2 (Primary w/ distant meta & Metastases)	
Somatic mutations (missense and nonsense)	NSCLC	5/44	9/38	ns
	Colon cancer	6/15	4/16	ns
	Total	11/59	13/54	ns
Selected SNPs and SNVs	NSCLC	4/44	12/38	$p = 0.0104^*$ $p < 0.05^{**}$
	Colon cancer	3/15	5/16	ns
	Total	7/59	17/54	$p = 0.0109^*$ $p < 0.05^{**}$
	Lung adenocarcinoma	1/22	12/29	$p = 0.0036^*$ $p < 0.01^{**}$
	Colon adenocarcinoma	2/15	3/9	ns
Total	3/37	15/38	$p = 0.0018^*$ $p < 0.01^{**}$	

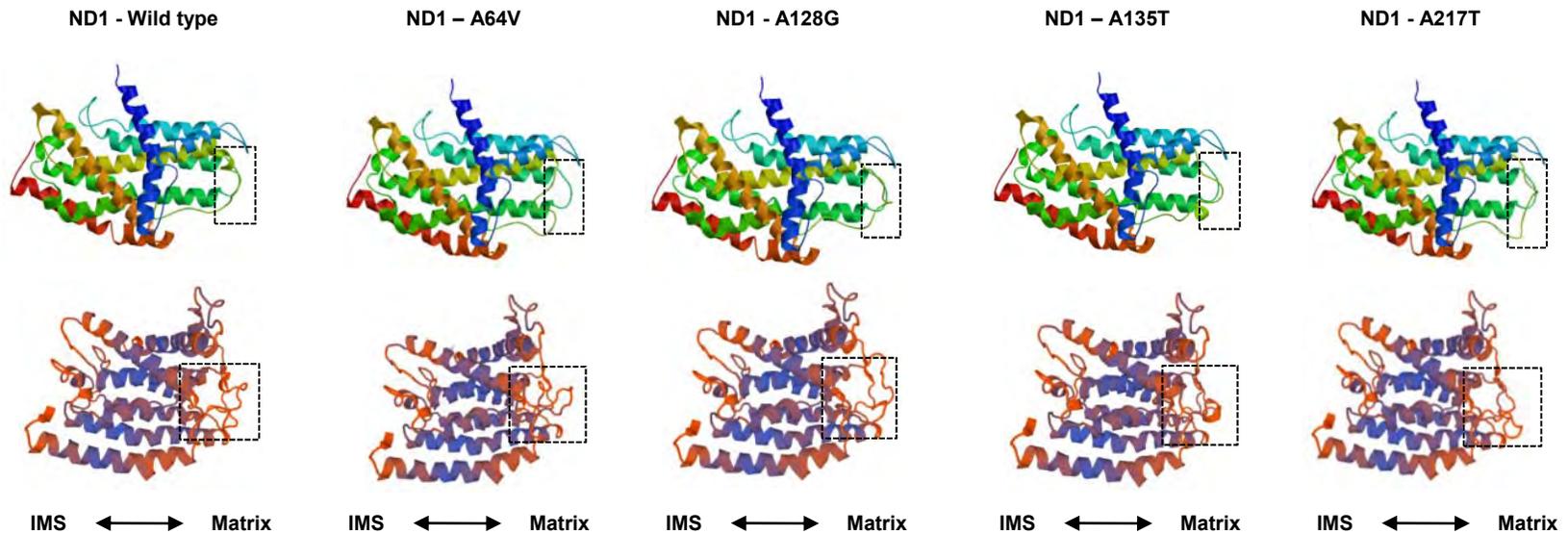


# ミトコンドリアの呼吸鎖遺伝子から翻訳されるたんぱく質の形が変わってしまっている

A



B



IMS: intermembrane space Matrix: mitochondrial matrix side

臨床医から  
創薬研究の経験

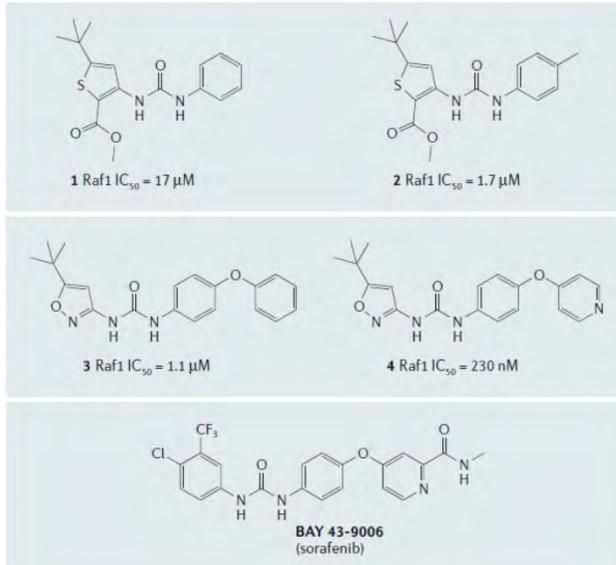
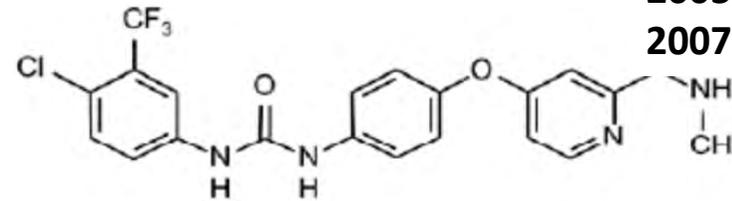
そして  
ミトコンドリア標的治療へ

米国ONYX社で開発に携わった腎臓がんや肝臓がんに対する治療薬

Nexavar: A Multikinase Inhibitor

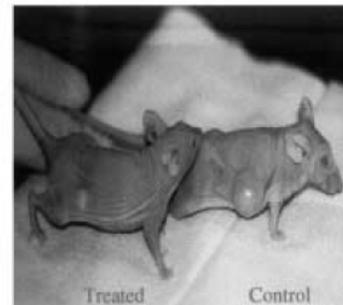
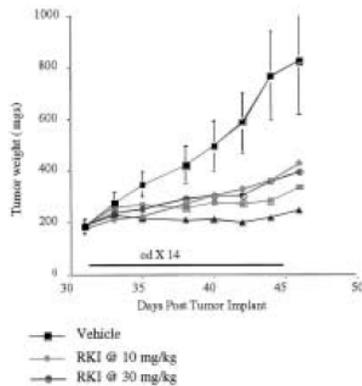
ソラフェニブ

1996年最初の発見  
2005年米国承認  
2007年日本承認

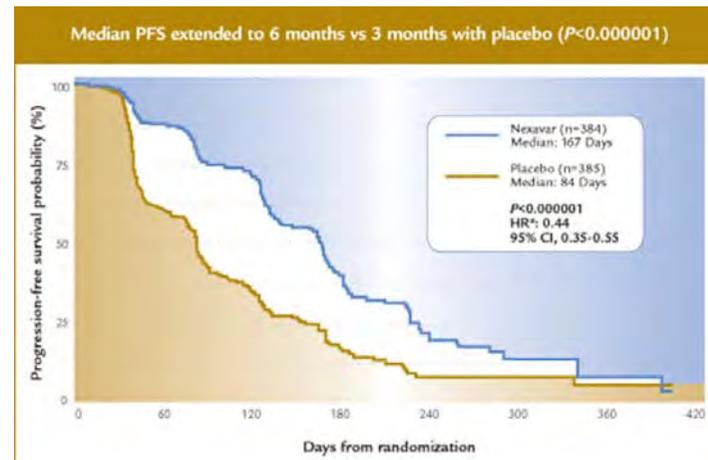


- Originally identified through inhibitory effects on Raf-1, a serine/threonine kinase<sup>1</sup>
- Further activity against B-Raf and additional receptor tyrosine kinases, including VEGFR-2, PDGFR, Flt-3, and c-KIT<sup>2</sup>
- Broad-spectrum, antitumor activity in a number of tumor xenograft models, including renal adenocarcinoma<sup>2,3</sup>

1. Wilhelm S, Chien DS. *Curr Pharm Des.* 2002;8(25):2255-2257.  
2. Wilhelm SM, et al. *Cancer Res.* 2004;64(19):7099-7109.  
3. Chang YS, et al. Presented at: 96th AACR Annual Meeting; April 16-20, 2005; Anaheim, Calif.



—◆— RKI @ 100 mg/kg



# 大村智博士 ノーベル医学・生理学賞

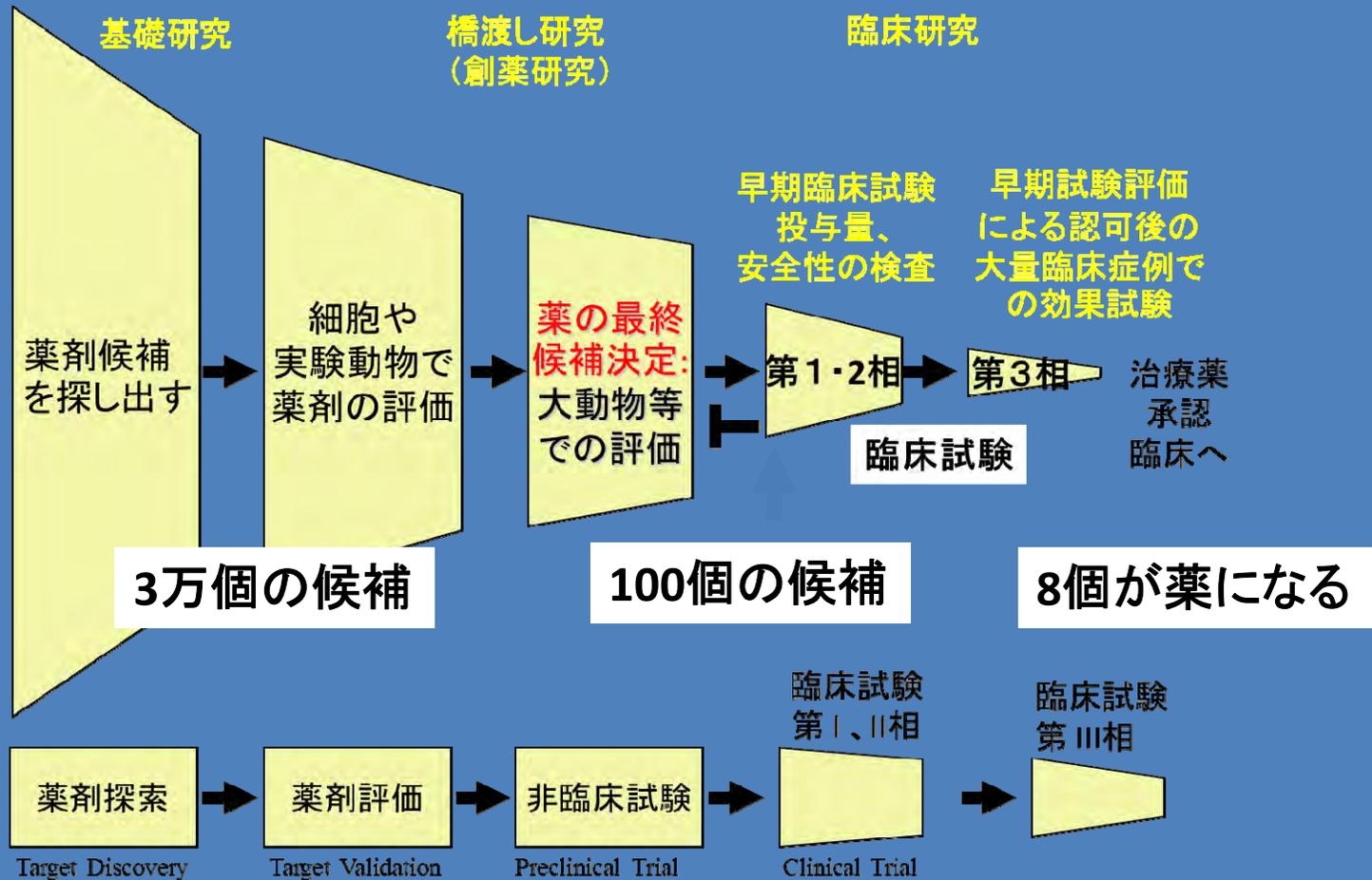


ゴルフ場の土壌微生物から  
アベルメクチンを発見

メルク社

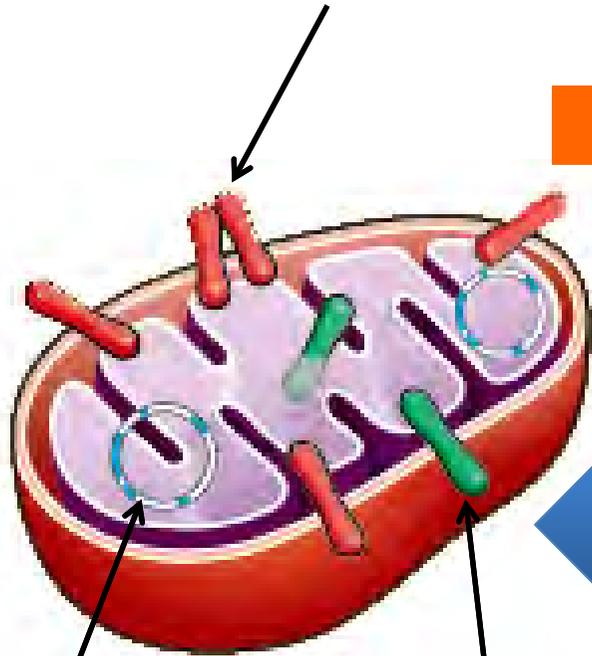
イベルメクチンを開発

数百万個



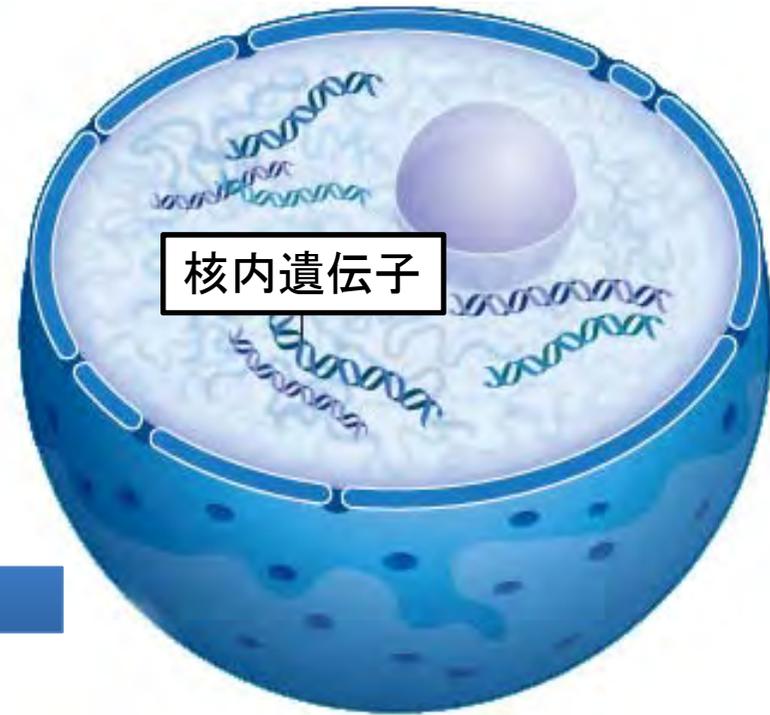
ミトコンドリア病は、  
ミトコンドリアだけでなく細胞の核の中の  
遺伝子異常でも起きる

核に記憶されたタンパク質



ミトコンドリア  
遺伝子(37)

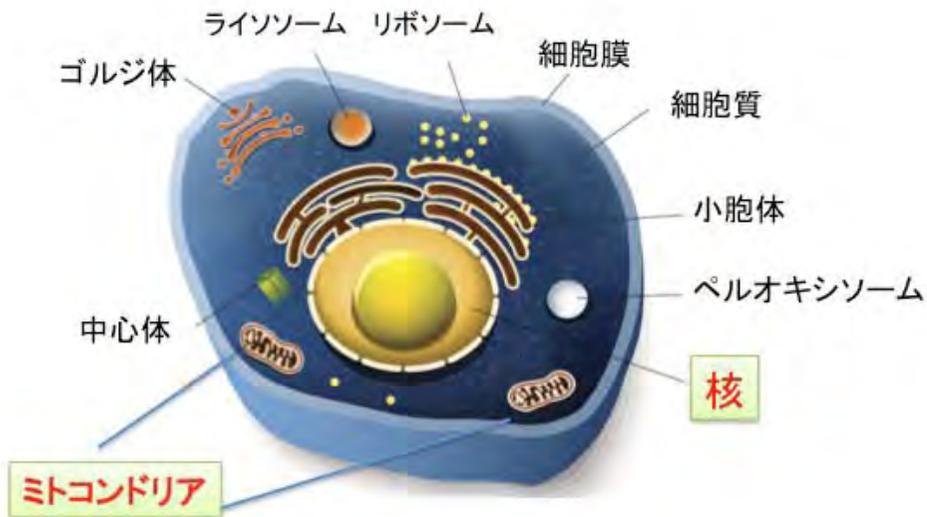
ミトコンドリアに記憶された  
タンパク質



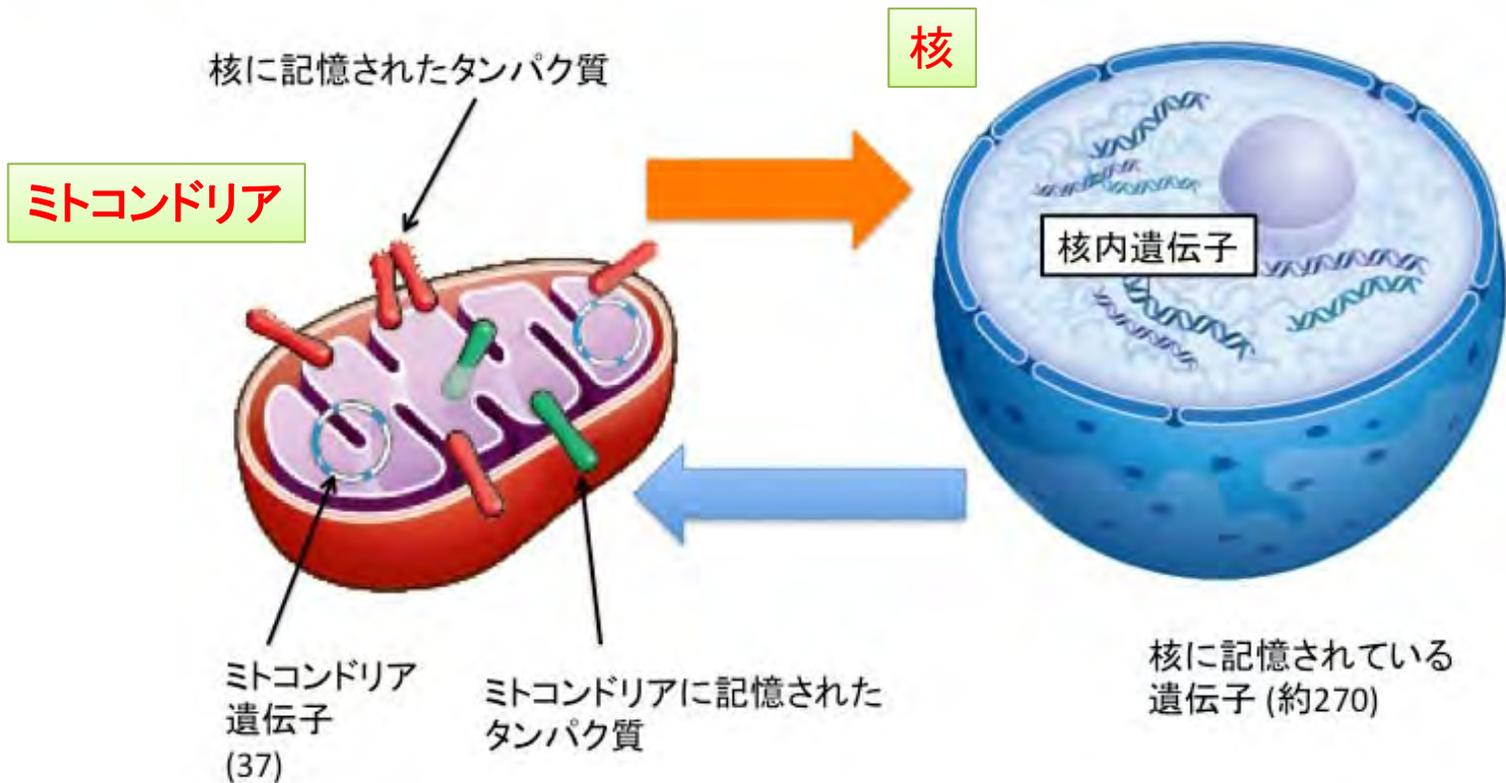
核内遺伝子

核に記憶されている  
遺伝子 (約270)



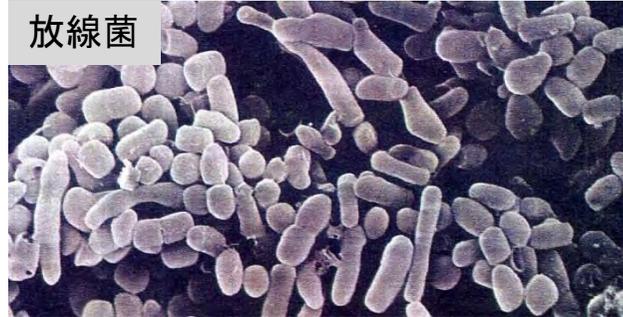


牧場全体が細胞



# 遺伝子を直接標的にした治療法の開発

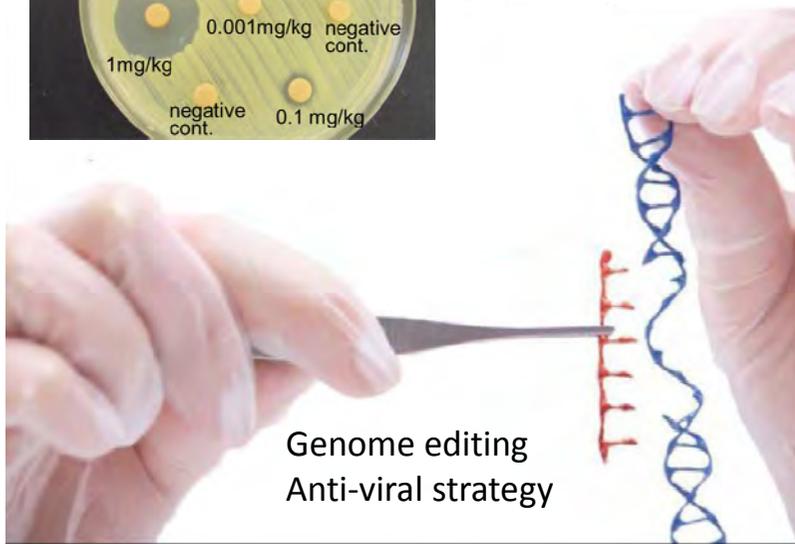
# ゲノム編集・抗生物質は、細菌がウイルスなどの外的から自らを守る免疫機構



黄色ブドウ球菌 球菌



抗生物質  
DNA結合化合物



## Innate immune system

In lower organisms, even conserved in higher organisms

Evolutionary conserved

- Nuclease
- Restriction enzyme
- DNA methylation
- Chromatin structure
- TALE Nuclease**
- CRISPR CAS**
- Interfering RNA

子宮内に引き込んでウイルスを撃退

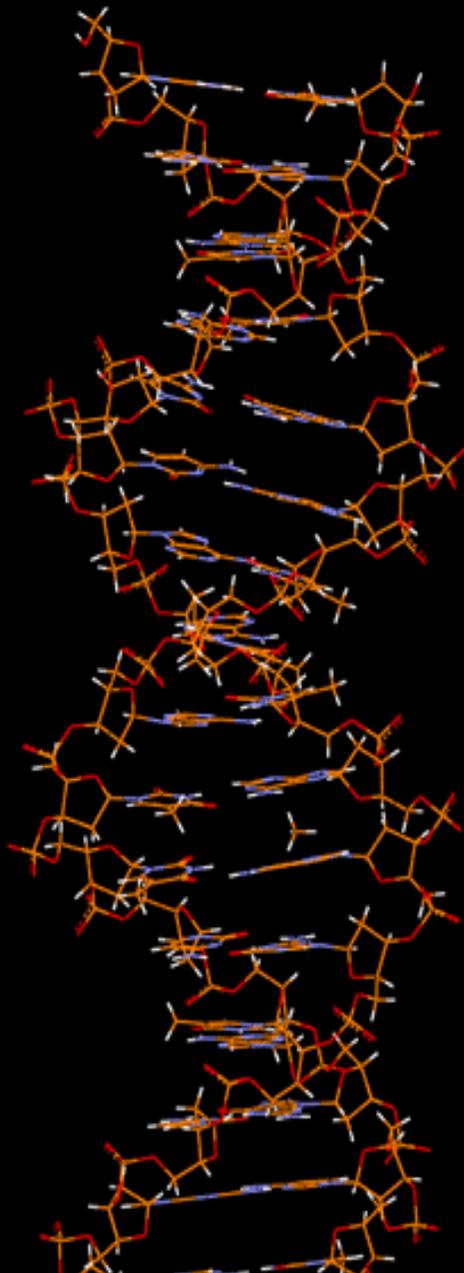
細胞外に毒をだして他の細菌を退治

抗生物質(遺伝子に結合する)

## Acquired immune system

Higher organisms, such as vertebrates

# 遺伝子の配列を認識して結合する薬の開発



## Streptomyces



Streptomyces secrete antibiotics as a homing drug targeting parasite genome to protect from parasite invasion

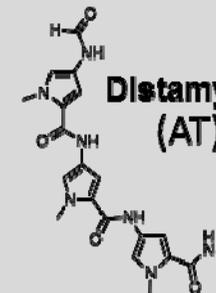
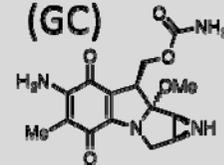
## Antibiotics

Minor groove binders

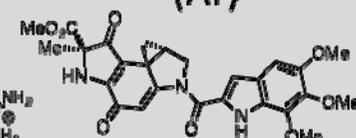
## Staphylococcus Aureus



## Mitomycin C (GC)



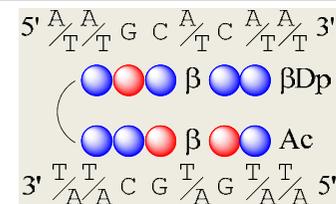
## (+)-Duocarmycin A (AT)



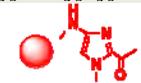
Minor groove binders recognize DNA sequence

Pair	A/T	T/A	C/G	G/C
Py/Py	+	+	-	-
Py or β/Im	-	-	+	-
Im/Py or β	-	-	-	+
β/β	+	+	-	-
γ turn	+	+	-	-

Favored (+), disfavored (-)

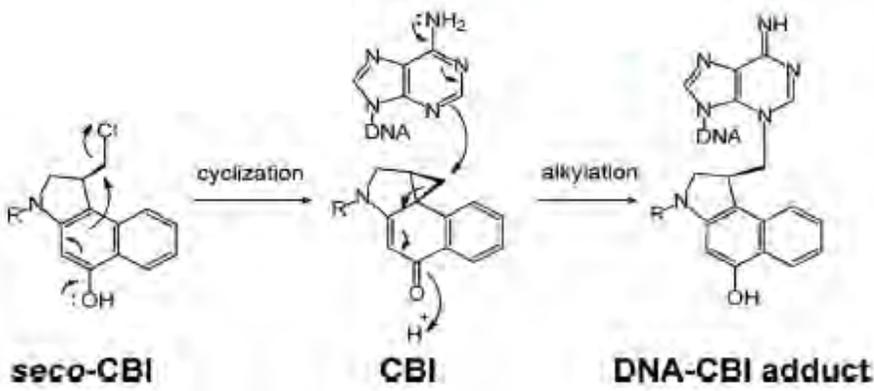
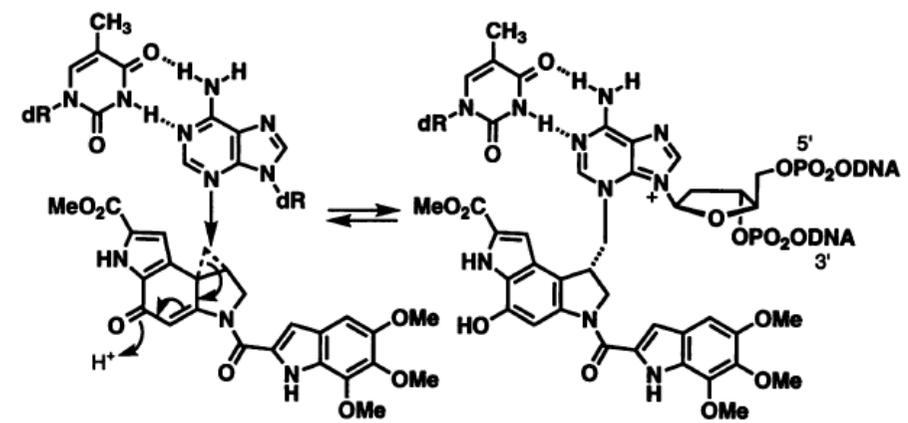


N-methylpyrrole (Py)

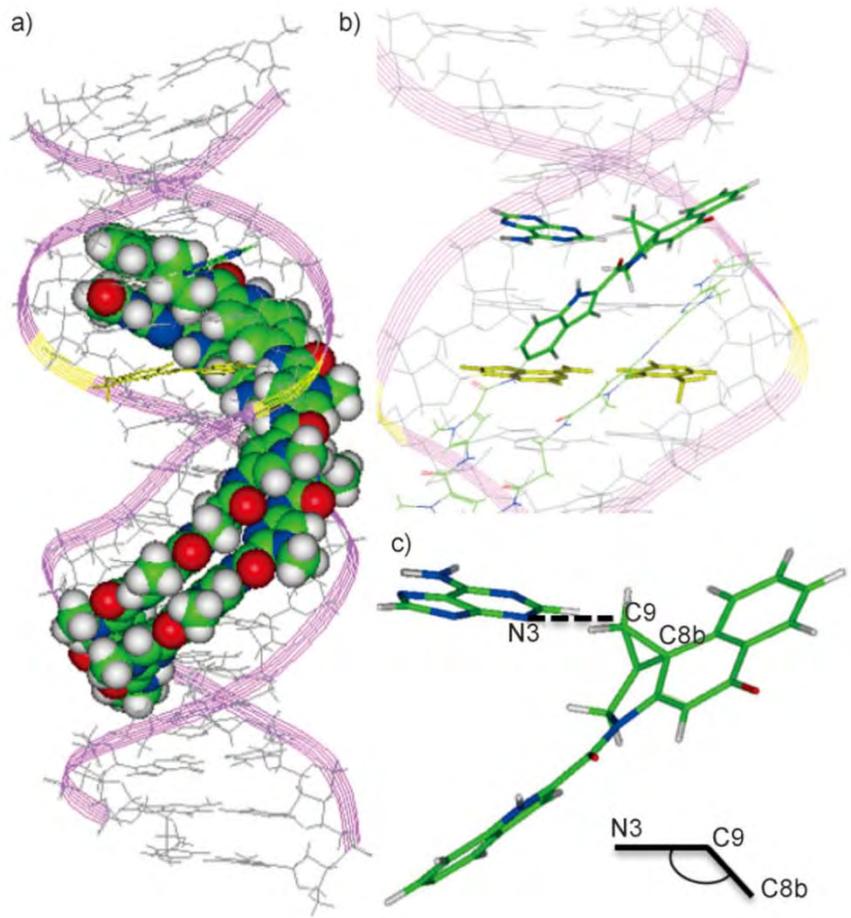
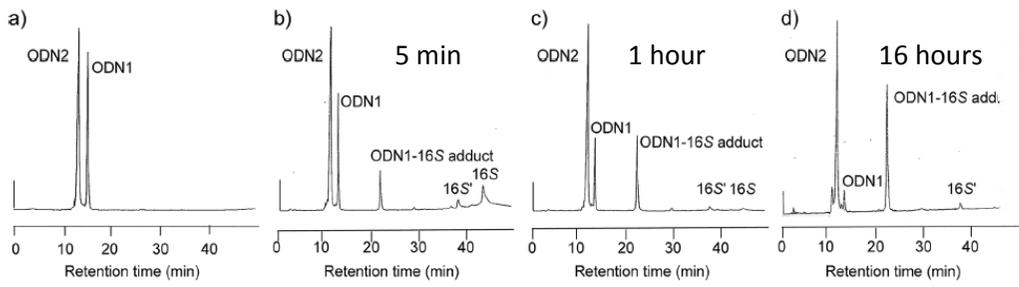


N-methylimidazole (Im)

# DNAとくっついて離れなくなる薬を病気の遺伝子に運んで遺伝子を止める



Creation of adduct formation between Oligo (ODN1) and KR12



Conjugate 4	Distance (N3-C9)	Angle (N3-C9-C8b)
Match site	3.03 Å	150°
1 bp mismatch	3.12 Å	149°

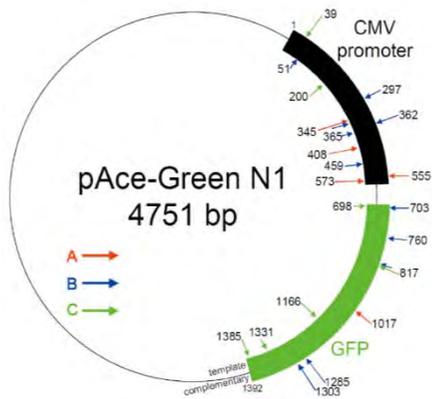
Chemistry. 2014 20(5):1310-7.  
Chemistry. 2015 21:1-9.

# 遺伝子の転写を止める(遺伝子が読めなくなる)

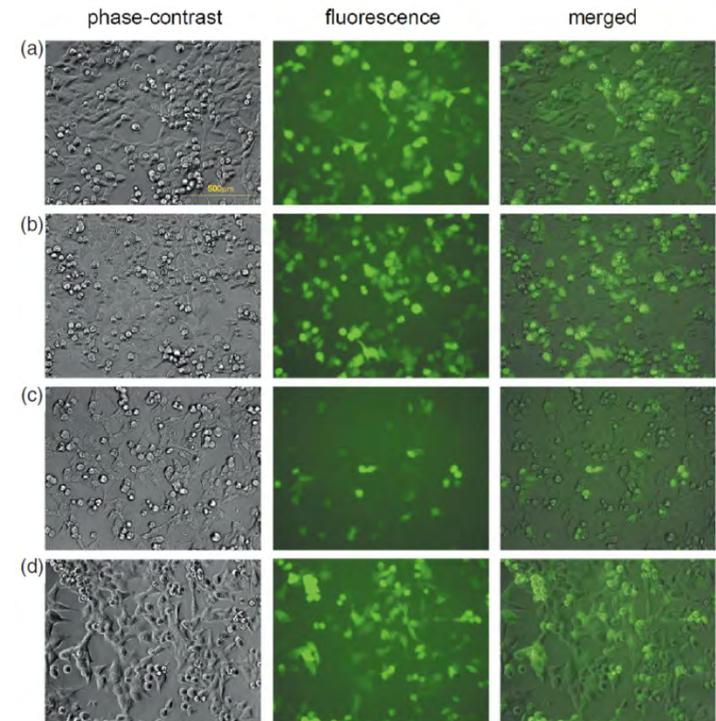
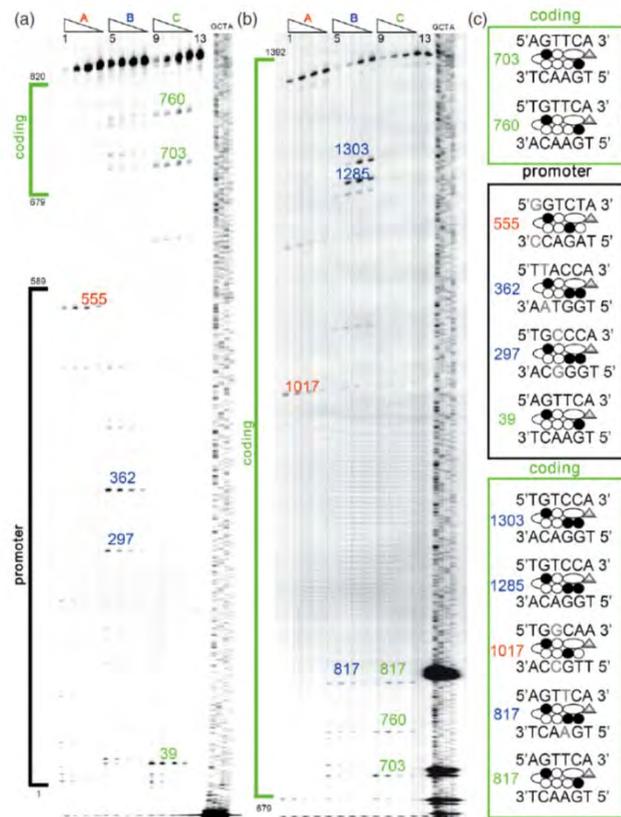
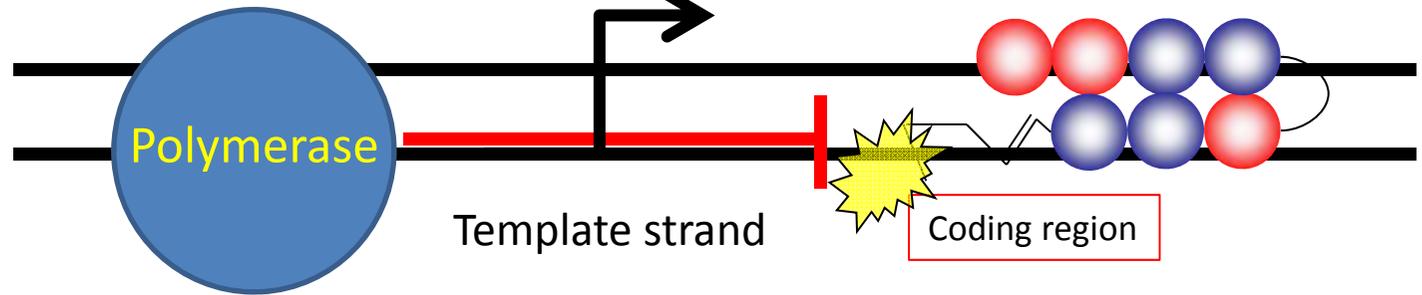
Alkylation of template strand of coding region causes effective gene silencing



下村 脩博士  
ノーベル化学賞  
緑色蛍光タンパク質  
(GFP) の発見と開発



Alkylating of coding region



Nucleic Acids Res. 2006; 34(4): 1189–1195.

# 抗がん剤の開発： KRAS変異配列標的アルキル化剤の開発

## 標的ゲノム配列への介入

**アルキル化剤**

DNA配列認識部位

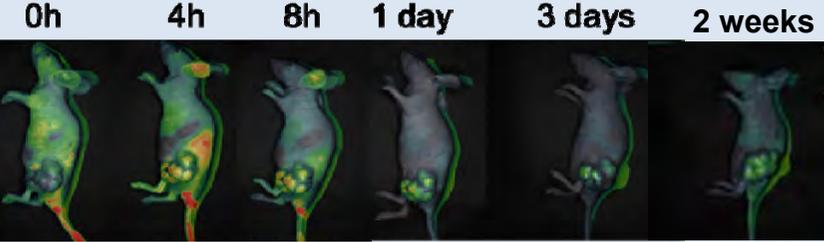
標的遺伝子アルキル化

PIポリアミド薬物複合体(PDC)

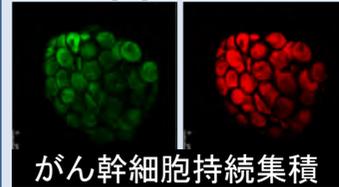
## 化合物の自動合成系の確立

標的配列に対する薬剤候補の自動合成を創薬プラットフォームとして企業(S社)と連携して開発

## がん細胞への特異的取り組み、蓄積、貯留



1.0 mg/kg FITC-PIPを尾静脈投与後撮影



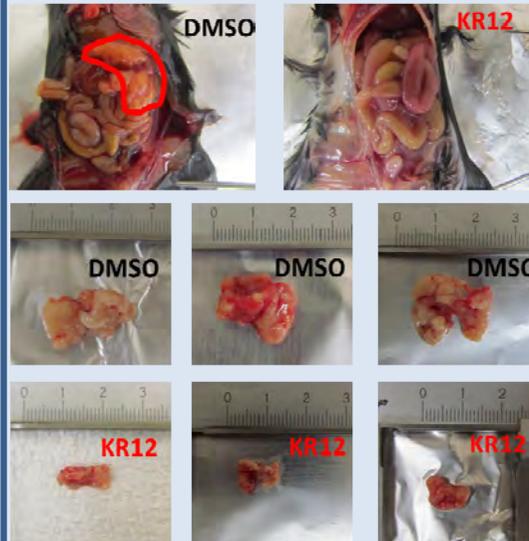
- ・ 正常臓器での副作用低減
- ・ がん幹細胞への送達
- ・ 薬物耐性機構からの回避
- ・ DDSの付加を必要としない

## 単回投与で大腸がん縮小



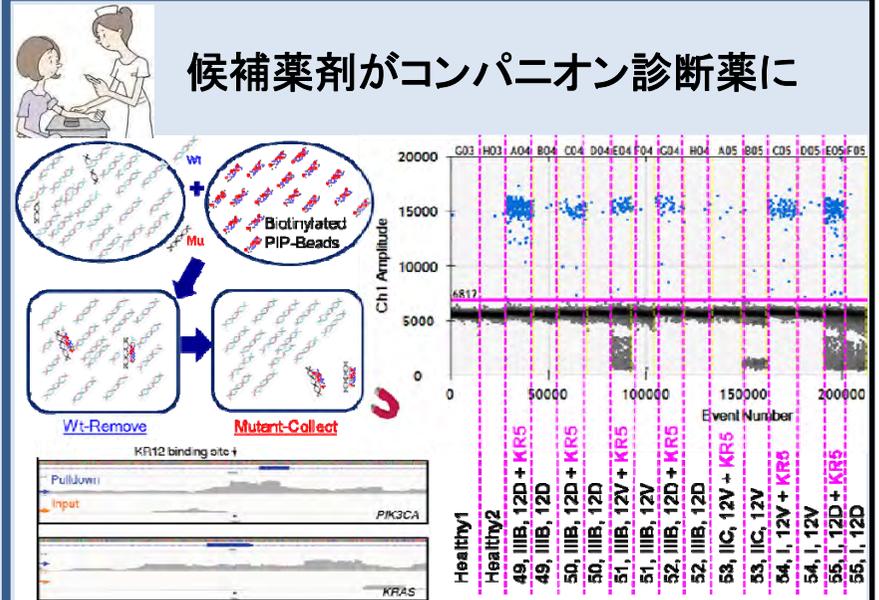
ヒト大腸がん移植モデルでの腫瘍縮小効果(単回投与)  
薬剤候補として企業導出をA社と協議中

## 連続投与での膵臓がん縮小

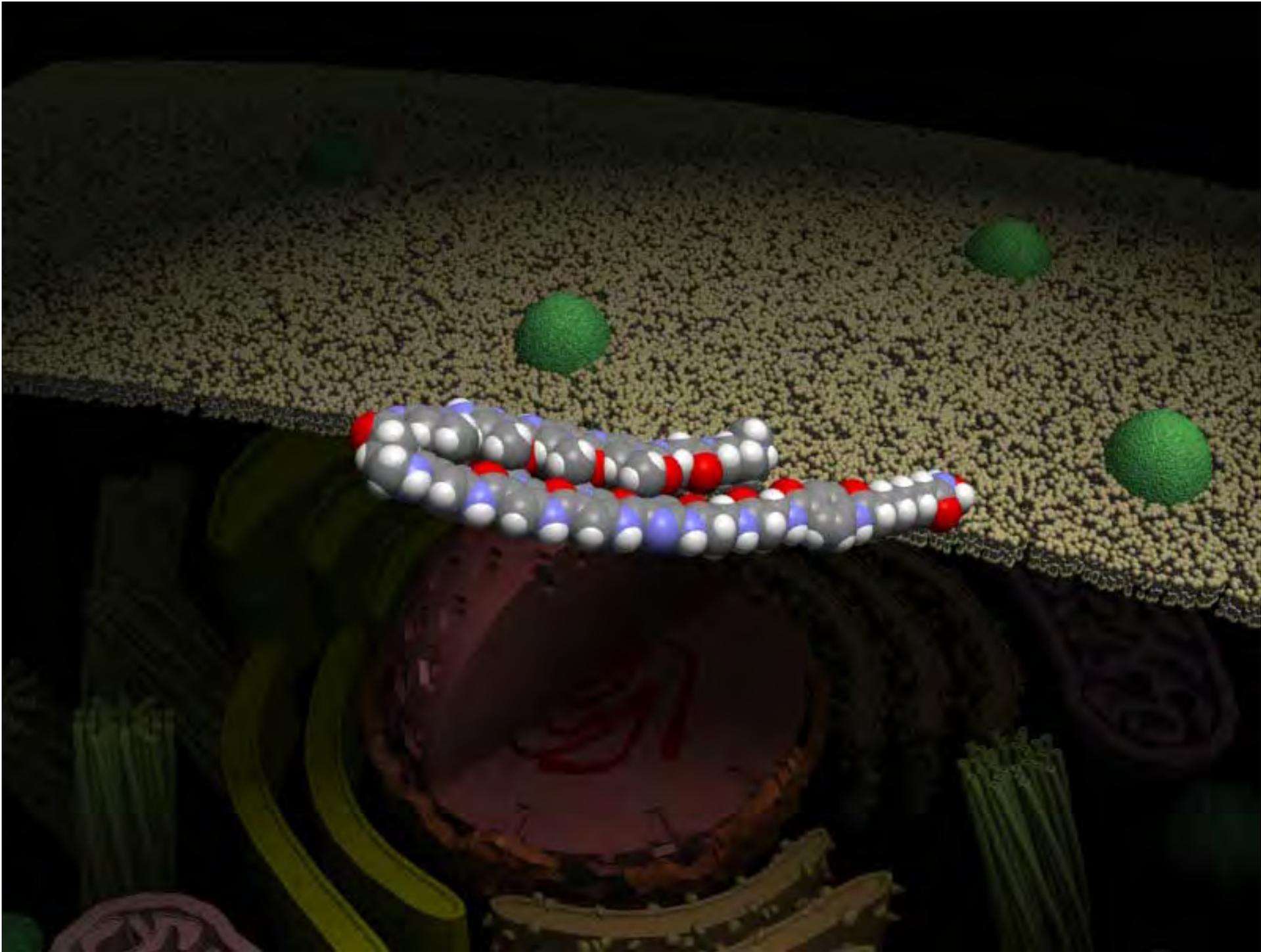


膵臓がん自然発症モデルでの腫瘍縮小効果(連続投与)  
薬剤候補として企業導出を視野

## 候補薬剤がコンパニオン診断薬に



細胞内ゲノム結合配列をNGS解析を用いて同定可能  
血中KRAS変異DNAを濃縮、デジタルPCRで診断  
T社との共同出願



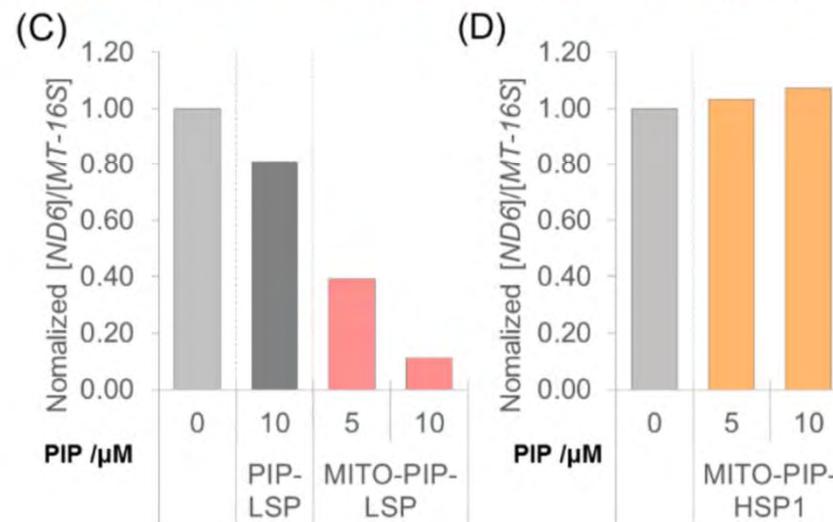
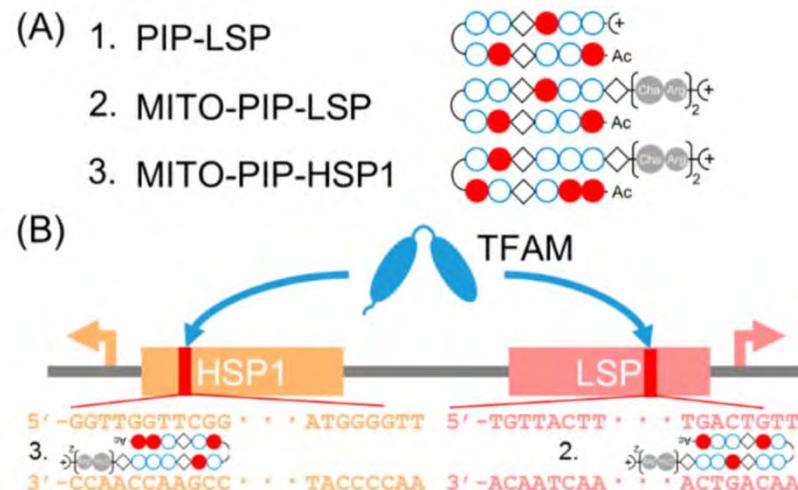
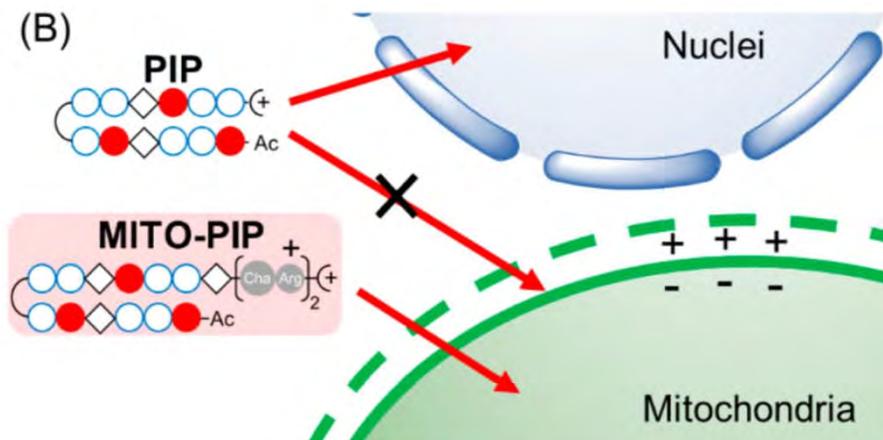
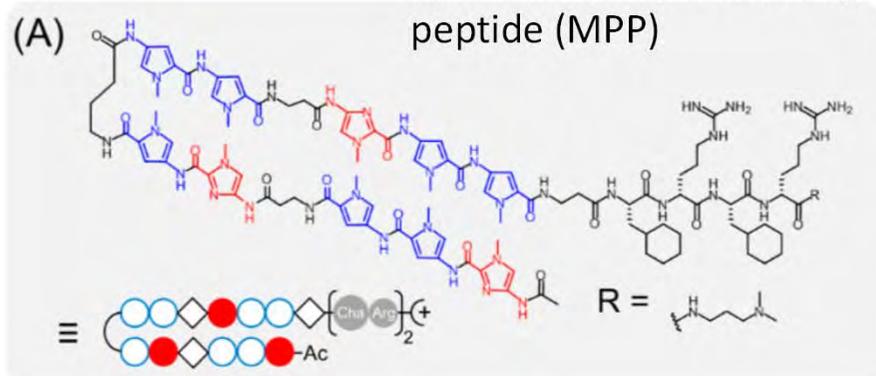
ミトコンドリアDNAを直接標的にした  
治療薬ができるか？

# ミトコンドリアの中に薬を運んでミトコンドリア遺伝子の発現を調節できた

## Creation of a Synthetic Ligand for Mitochondrial DNA Sequence Recognition and Promoter-Specific Transcription Suppression

Takuya Hidaka,<sup>†</sup> Ganesh N. Pandian,<sup>\*‡</sup> Junichi Taniguchi,<sup>†</sup> Tomohiro Nobeyama,<sup>§</sup> Kaori Hashiya,<sup>†</sup> Toshikazu Bando,<sup>†</sup> and Hiroshi Sugiyama<sup>\*†‡§</sup>

### Mitochondria penetrating peptide (MPP)



ND6呼吸鎖遺伝子の発現を抑制

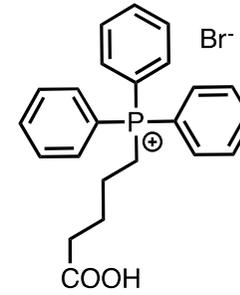
Chemical Formula: C<sub>75</sub>H<sub>93</sub>N<sub>31</sub>O<sub>15</sub>  
Exact Mass: 1667.75  
Molecular Weight: 1668.74

## PIP1-TPP structure

PIP-1-β



+

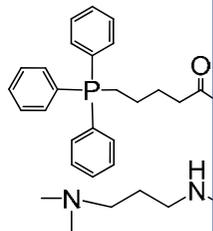
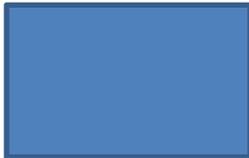


TPP

- 1) PyBOP, DIEA, NMP, 1 h
- 2) NMP, 4 h

TPP – β

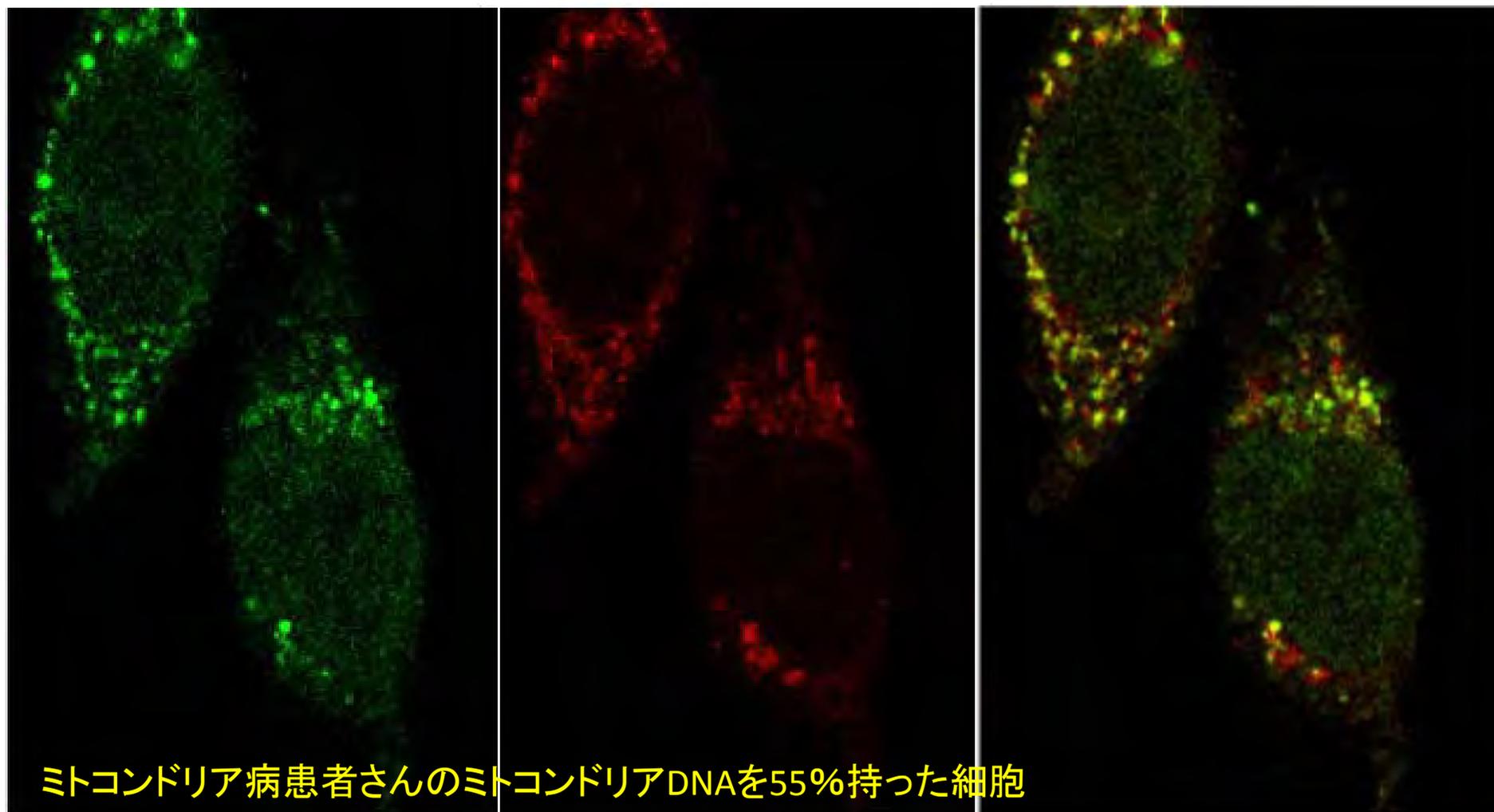
Dp β



PIP-1-β-TPP

ミトコンドリアのDNAのあるところに薬の候補が届いている

**PIP-TPP localization in HeLamt 3243 55% cybrids**



Green:anti-TPP

CytC: red

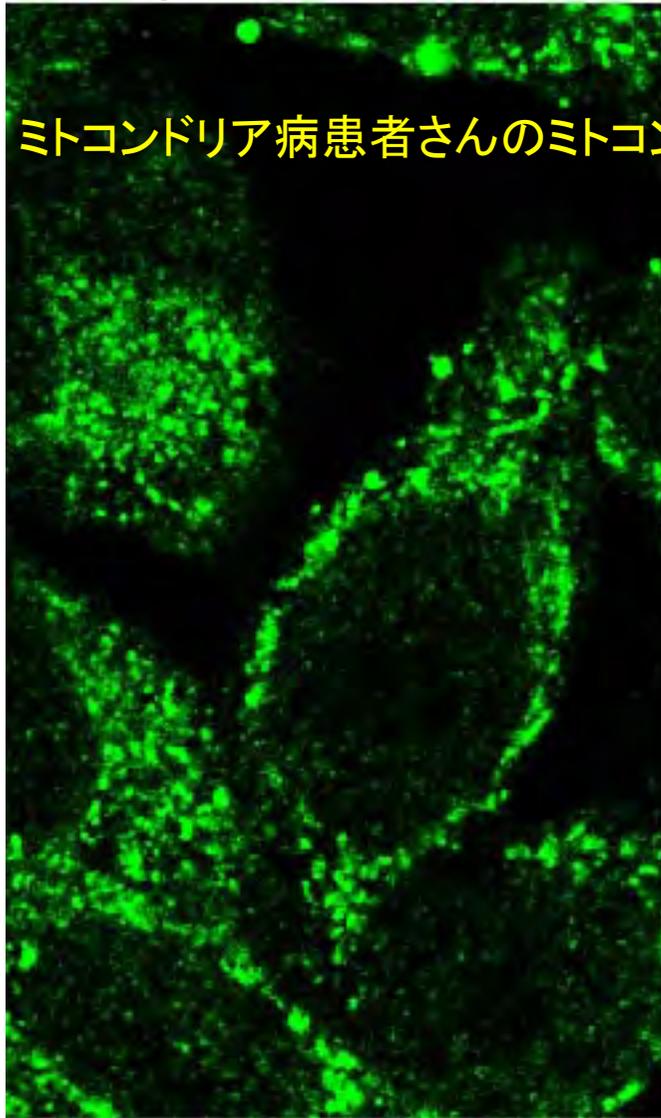
Merge

Antibody provided by Dr. Murphy (Cambridge Univ.)

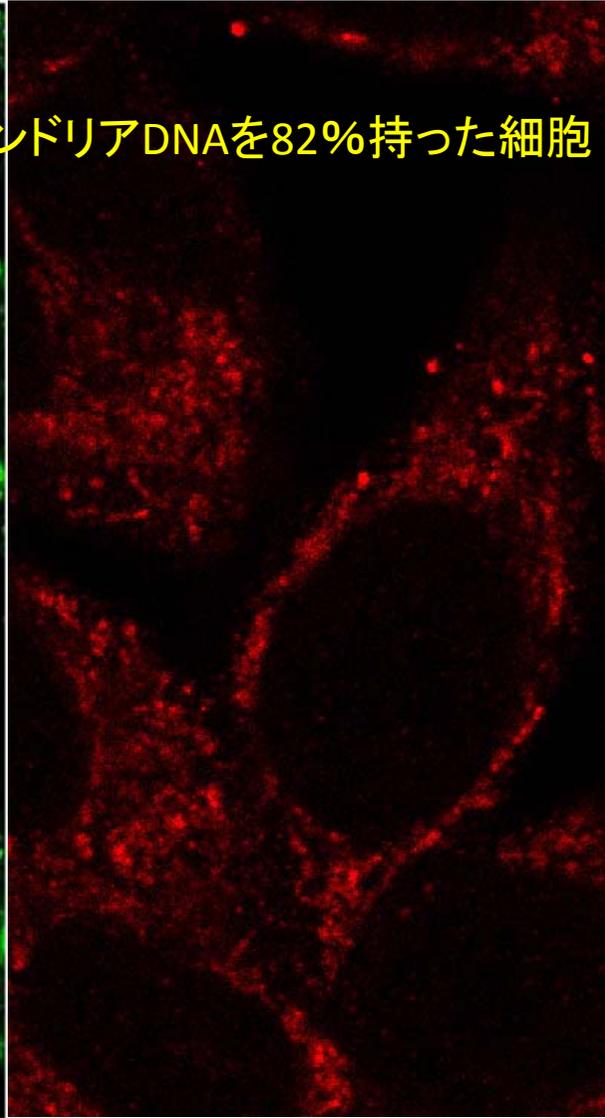
ミトコンドリアのDNAのあるところに薬の候補が届いている

**PIP-TPP localization in HeLamt 3243 82% cybrids**

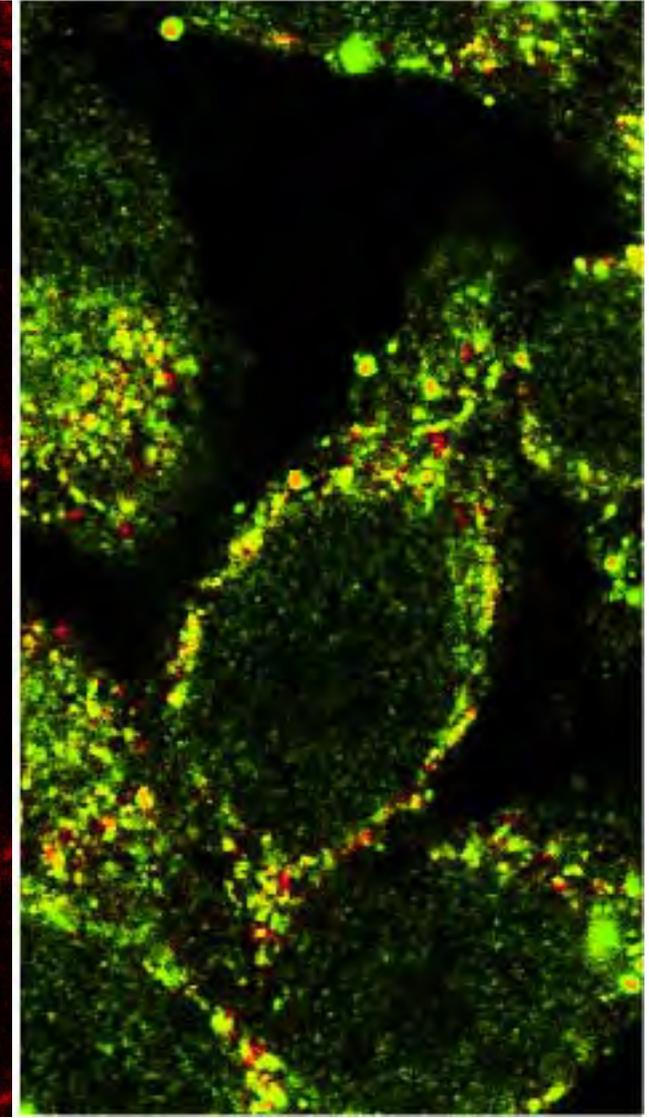
ミトコンドリア病患者さんのミトコンドリアDNAを82%持った細胞



green: anti-TPP

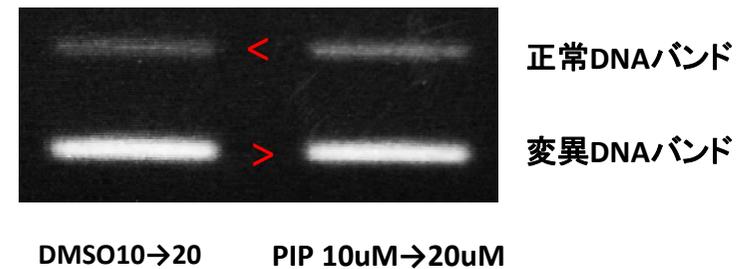
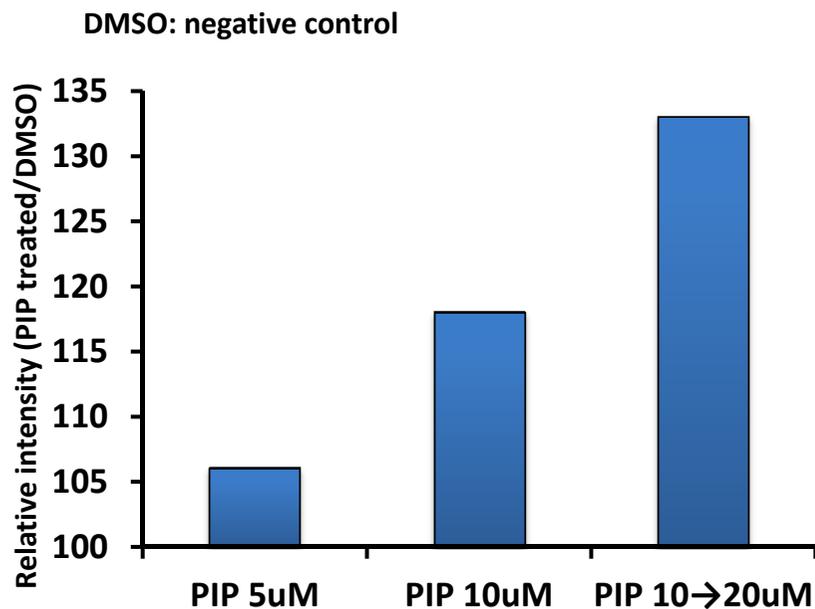
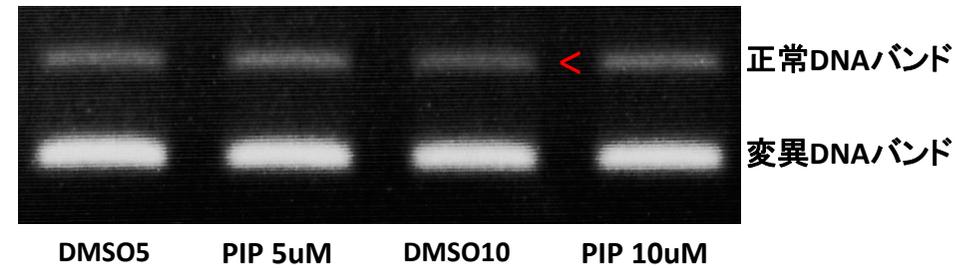
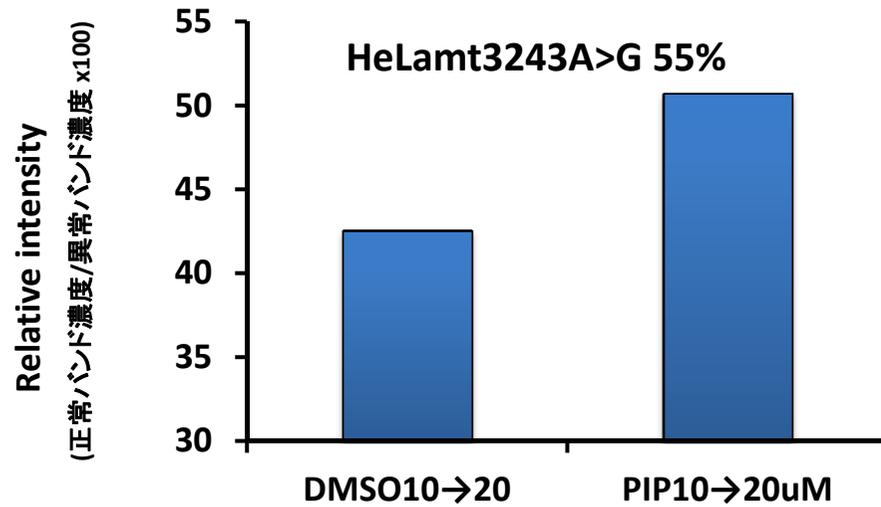


Red: anti cytC

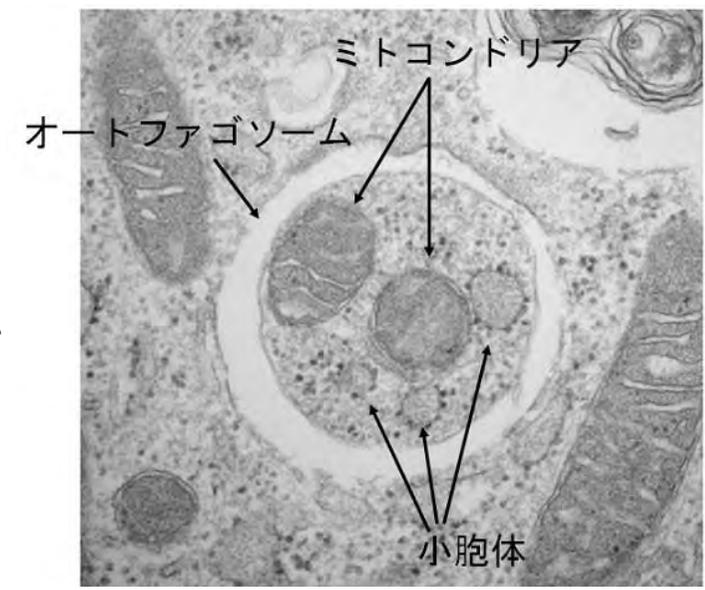
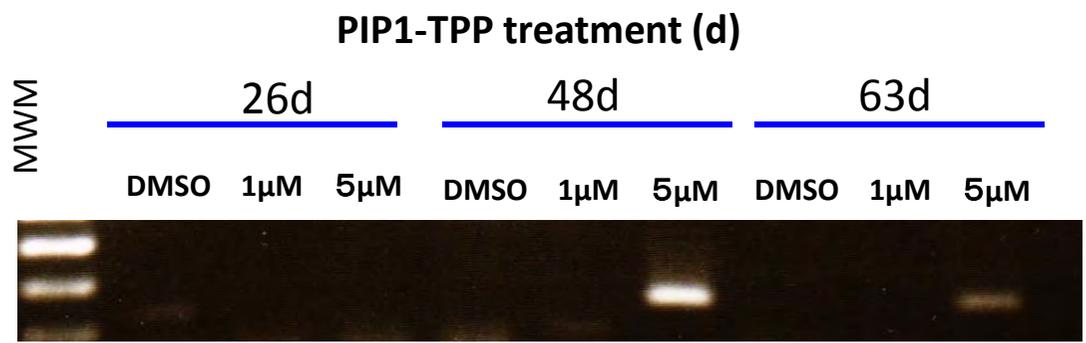


Merge

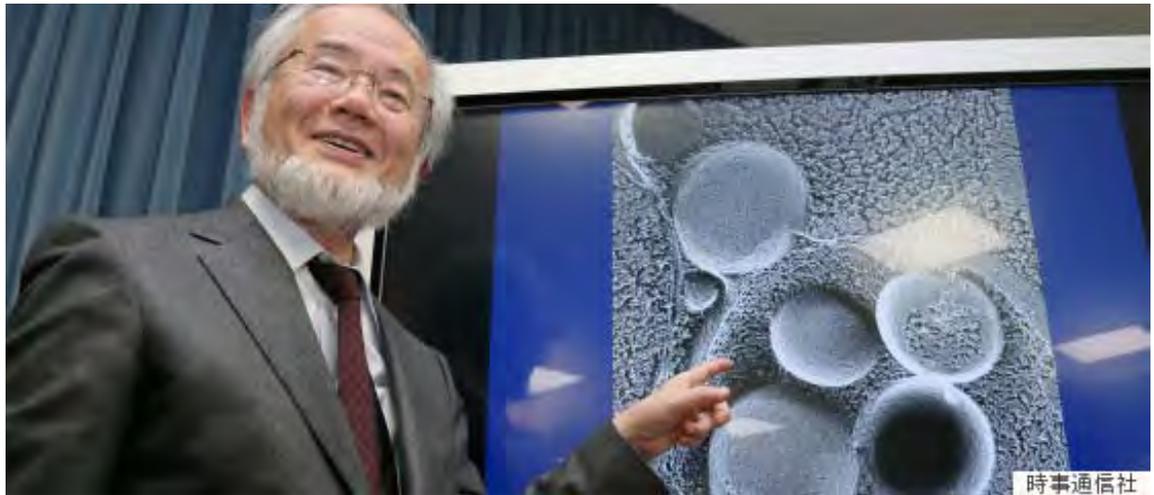
# 正常mtDNA量がPIP2-TPP投与で増加傾向 変異mtDNA量は減少傾向



# PIP1-TPP という薬剤候補は ミトコンドリア病の細胞でミトコンドリアのオートファジー(ミトコンドリアを壊す)を誘導



大隅良典教授 ノーベル医学・生理学賞

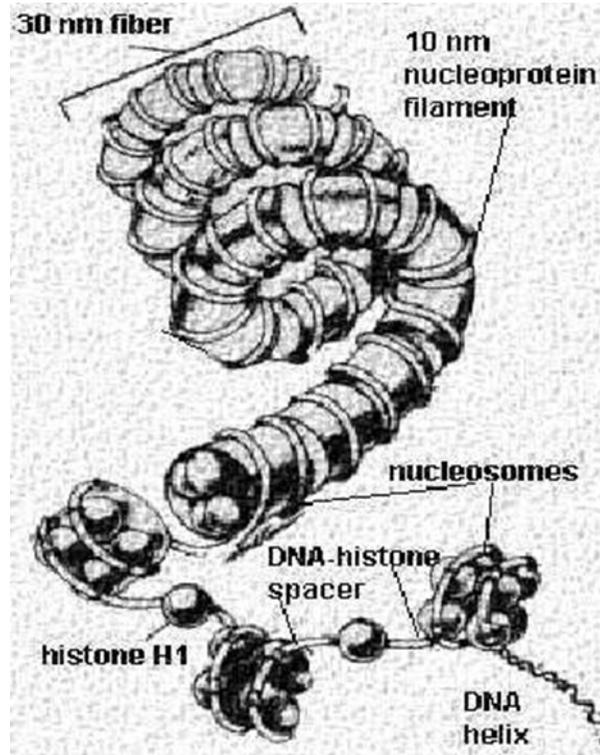


遺伝子異常は、DNAの異常だけでない

遺伝子配列は正常でも遺伝子がで亡くなったり出すぎると病気が起きる

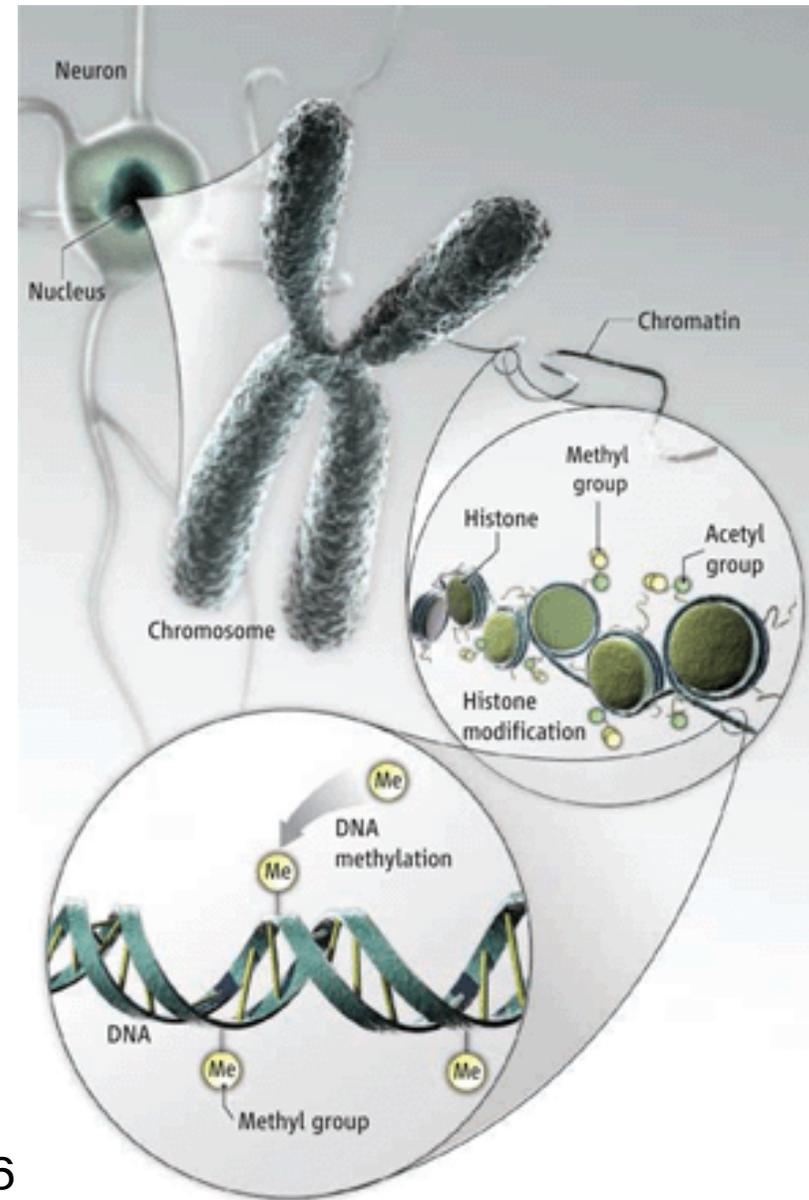
# DNAの巻き方が変わると遺伝子の出方が変わる

遺伝子 DNA は長い ひも



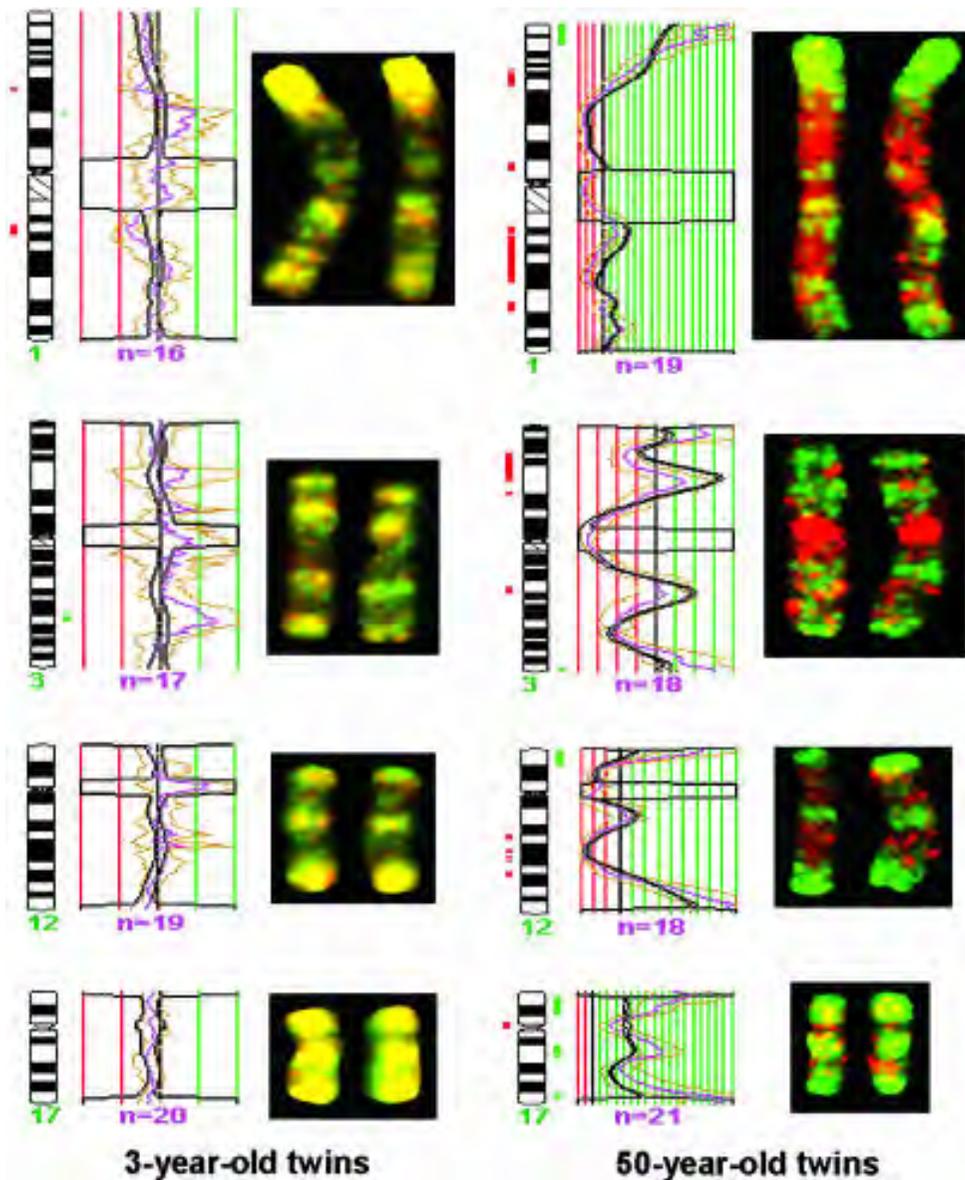
ひもがもつれないように糸巻の芯のようなたん白質(ヒストン)があります

一つの細胞に約2mのDNAが格納されていてヒトは60兆個の細胞を持っていますので、一人当たり1200億キロメートルのDNA、太陽系の半径の約16倍の長さのDNAを持っています。



Science published online 18 August 2010

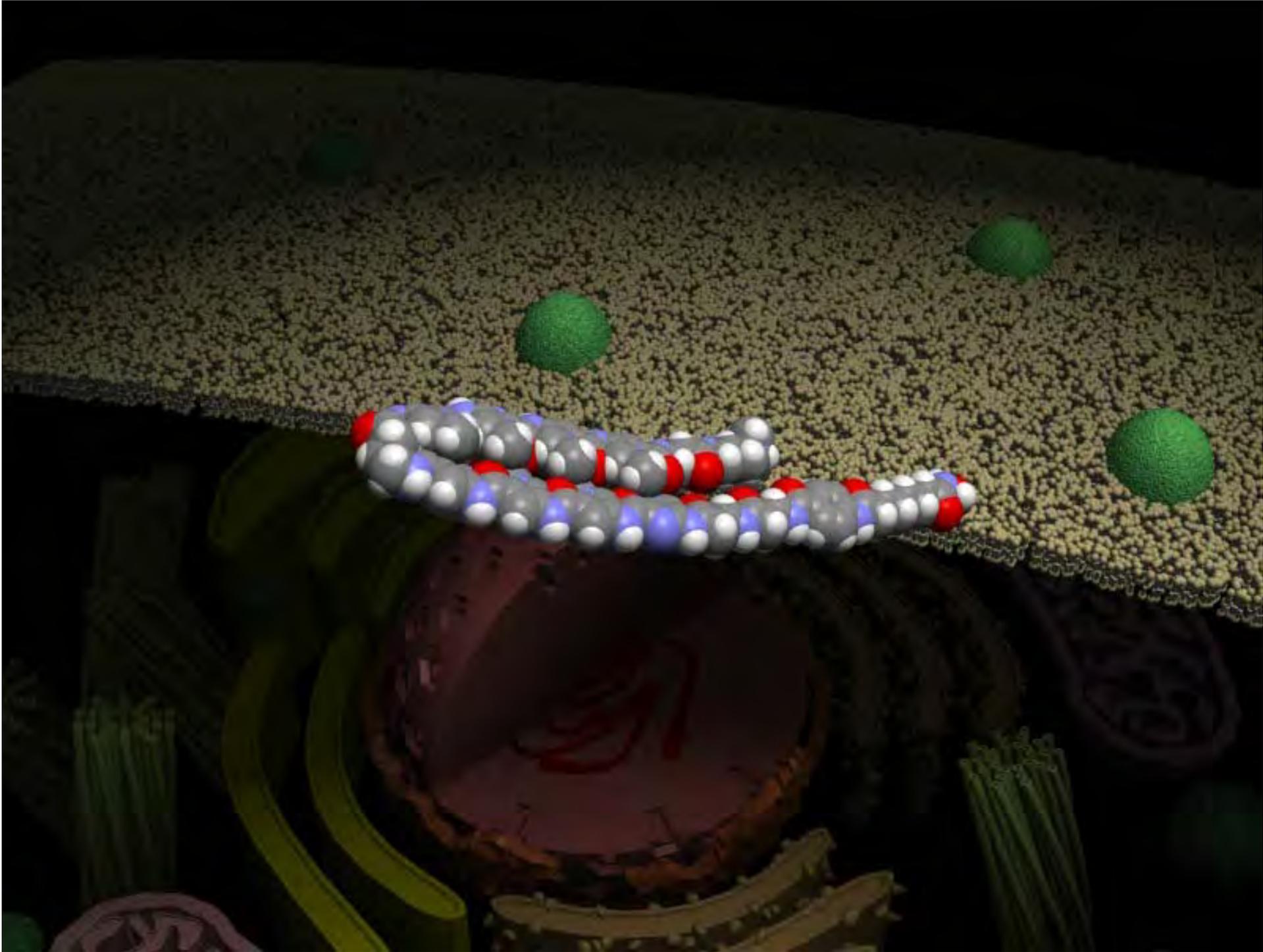
双子は遺伝配列は同じでも年を取ってくると遺伝子の修飾のパターンが変わる  
 遺伝子の巻き方が変わる



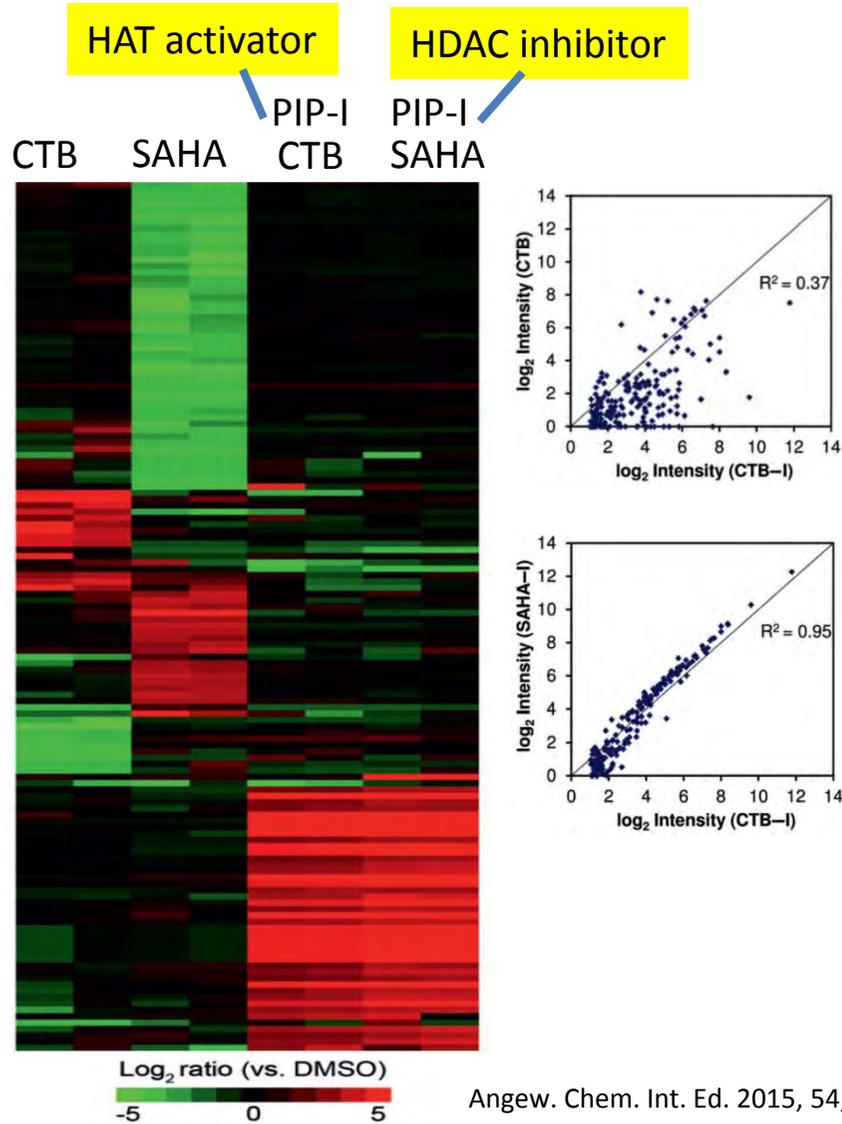
Identical Twins



PNAS 102:10604, 2005

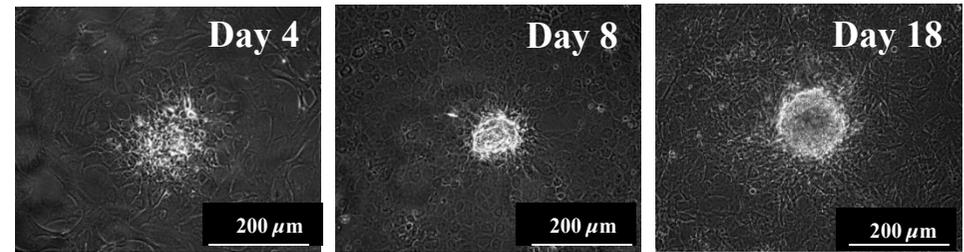


# DNAの糸をほぐして遺伝子の発現を導き出す薬を山中因子に運ぶ



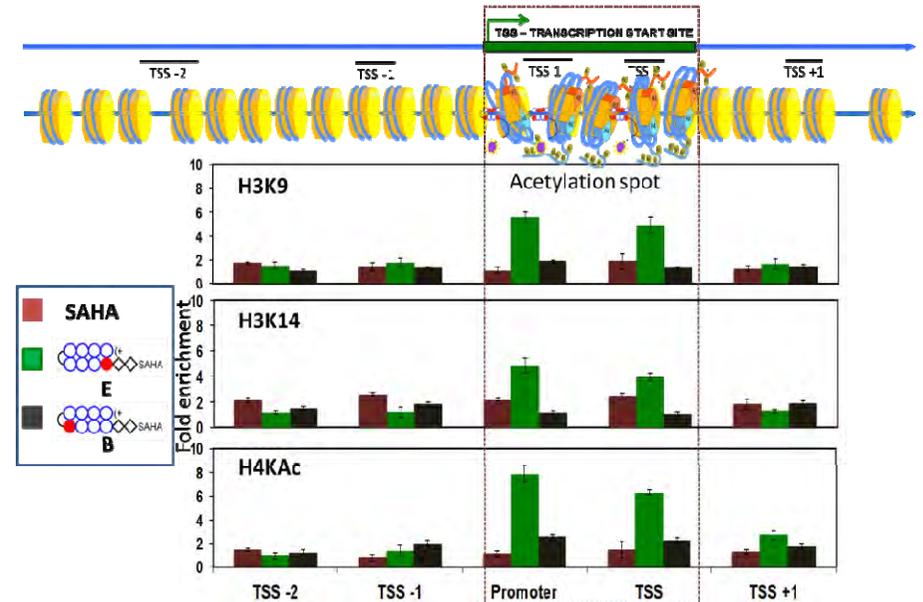
同じ遺伝子の場所に似た作用を持つ  
別々の薬を運ぶと同じような遺伝子を  
発現させることができた。

iPS 細胞みたいな細胞ができた



Significant morphological change only with SAHA-PIPs

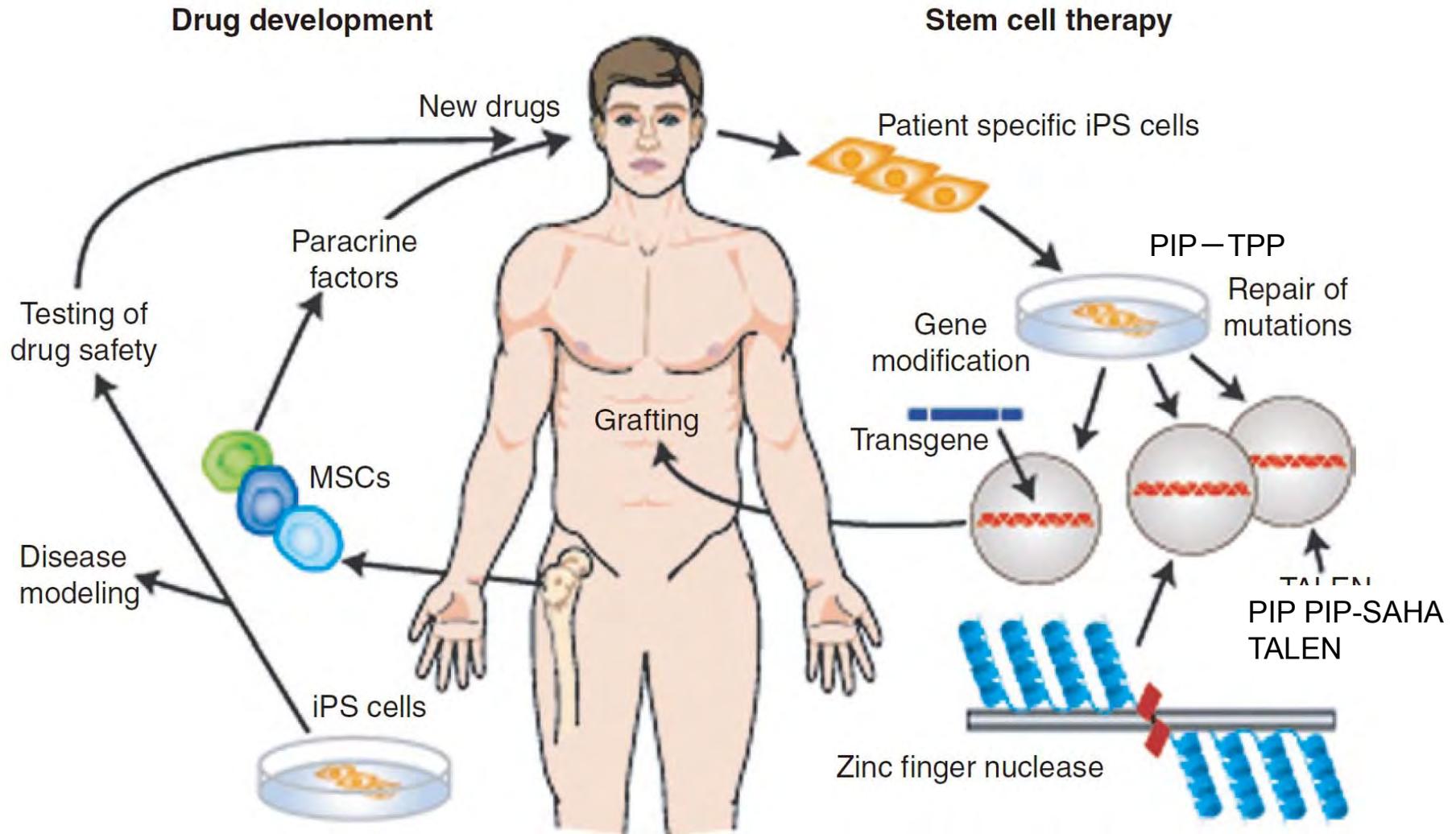
Selective histone acetylation in *Nanog* by "E"



Sequence-specific acetylation of histone H3K9, H3K14 and H4KAc by E ChemBioChem 2011, 12, 2822.

HDAC inhibitor, SAHA and HAT activator, CTB induced a similar  
gene expression profile when delivered by the same PIP

# 体から取り出した細胞からiPS細胞を作り、薬で変異ミトコンドリアを減らし、様々な臓器になることができる細胞として体にもどす

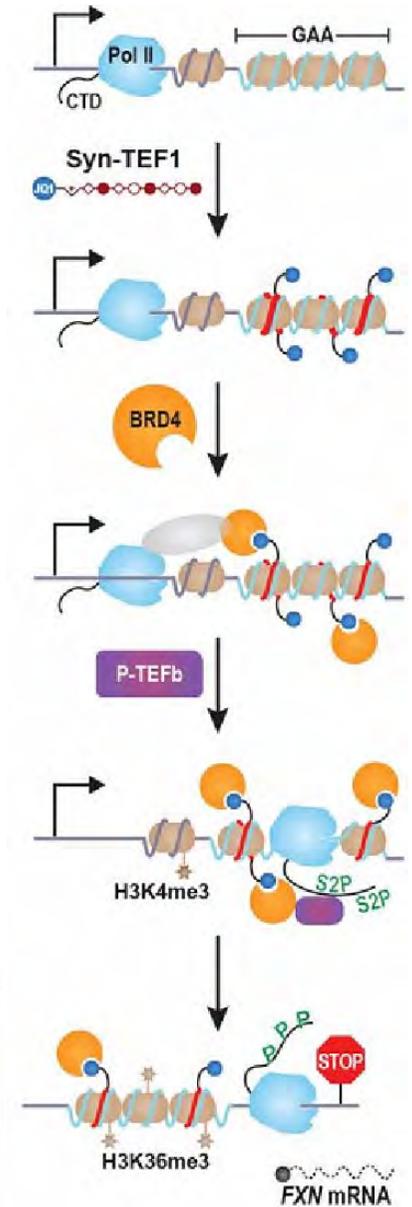
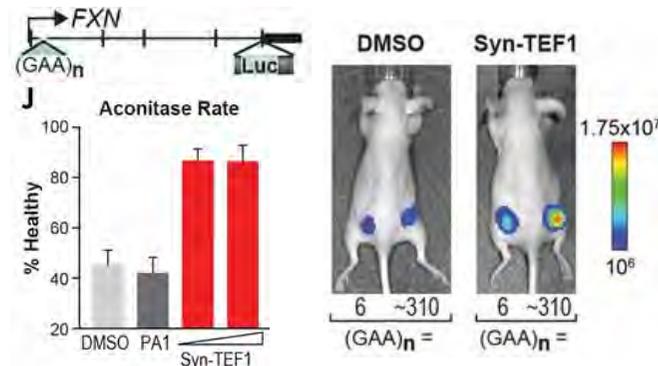
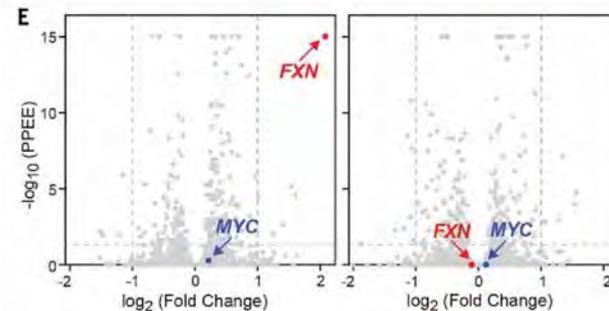
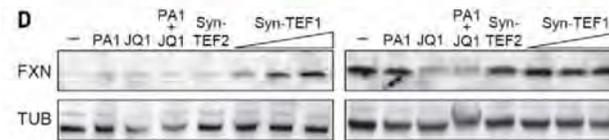
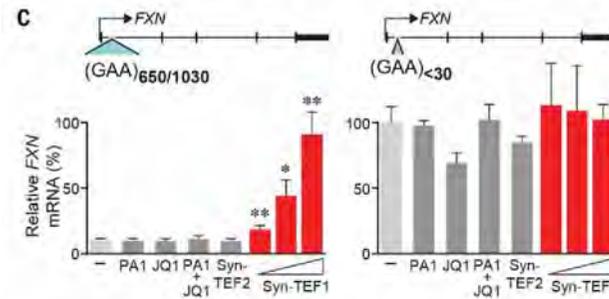
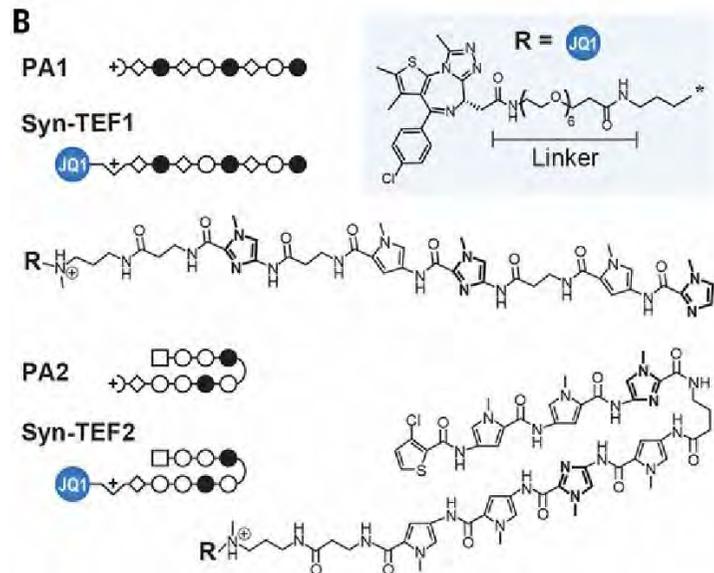
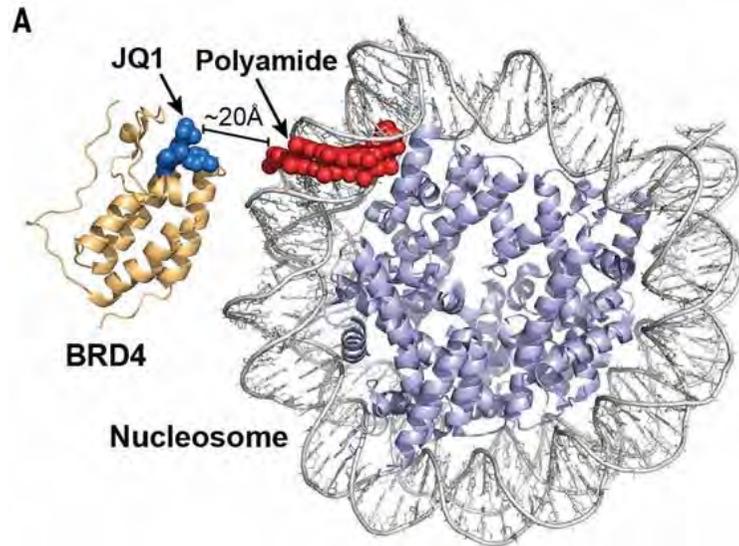


Cell therapy: Infusion of genetically modified stem cells, immune activation, modification of cell environment, replacement of tissue defects after surgery or chemo

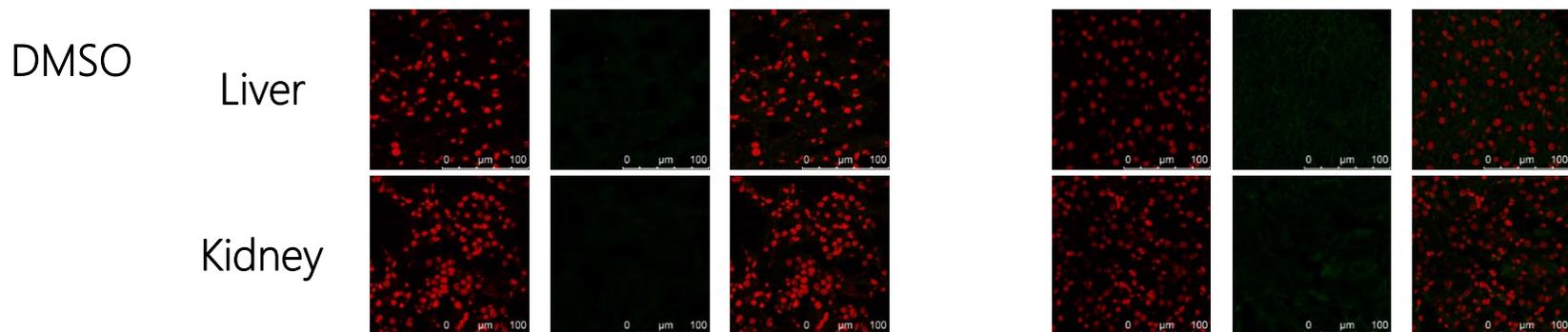
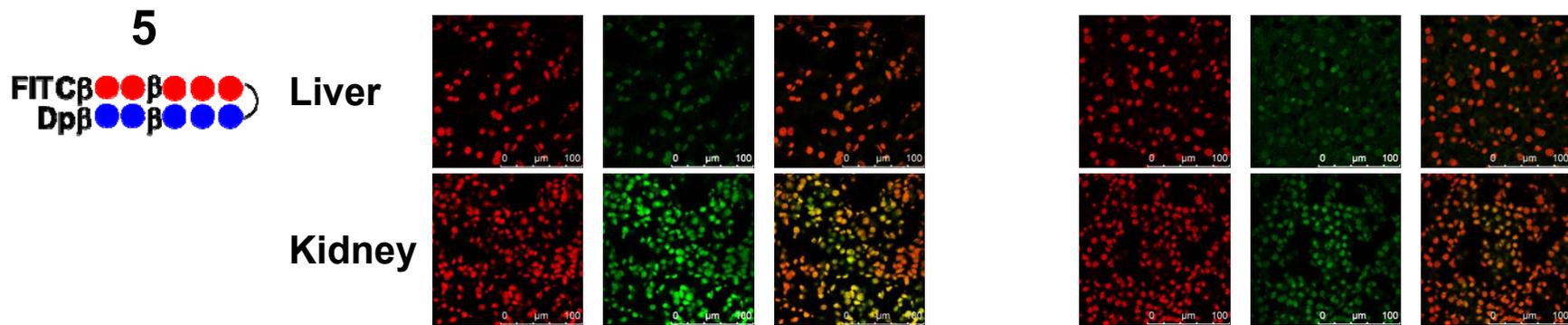
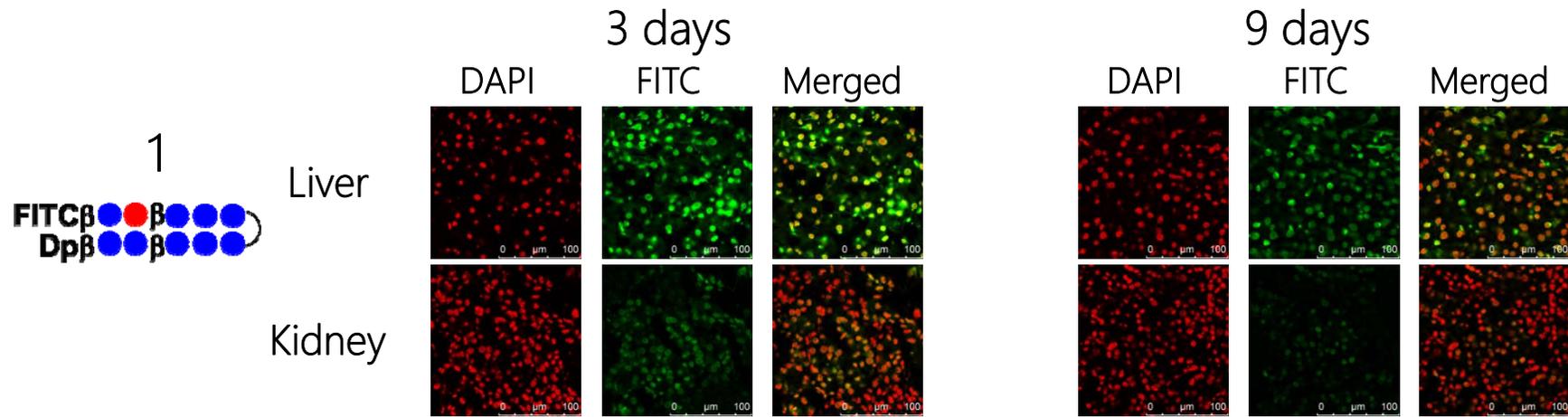
# 小児希少疾患フリードライヒ運動失調症の遺伝子を薬で出させる

Aseem Z. Ansari *Science* 30 Nov 2017:aan6414DOI: 10.1126/science.aan6414

Friedreich's ataxia (FRDA) caused by loss of *FXN* expression due to expanded GAA repeats.  
Loss of *FXN* induce mitochondrial dysfunction.

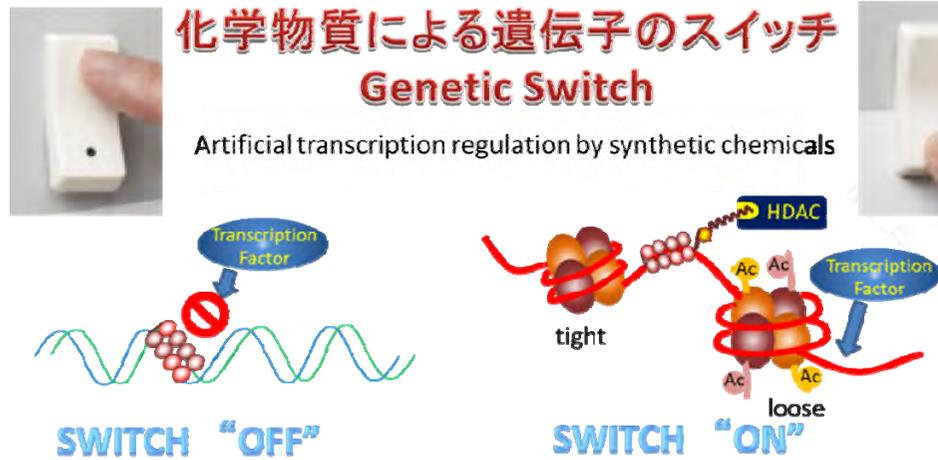


# 薬を肝臓に集めるか腎臓に集めるかをコントロールして副作用軽減

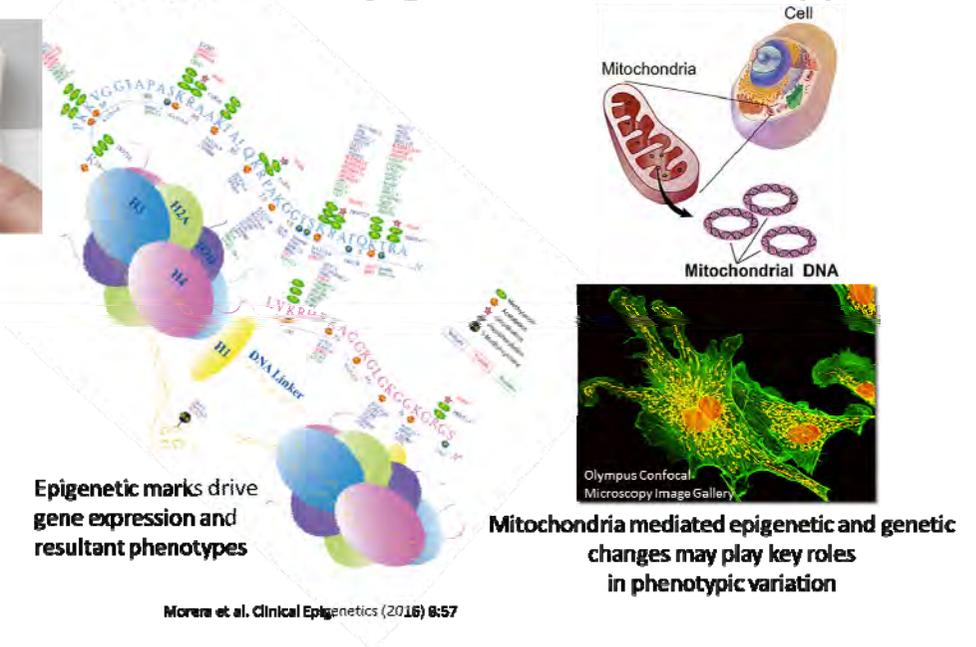


## まとめ

- PIポリアミド化合物のようなDNA副溝結合化合物(MGB)は、生体遺伝子のコントロールに使用できる
- 核内ゲノムDNAのみでなく、ミトコンドリアゲノムDNAにも送達できる
- ゲノムDNA結合蛋白や修飾酵素を制御できる低分子化合物のゲノム上の特定の部位に送達ができる
- 腫瘍集積性などの薬物動態のコントロールができ、生体内で安定
- 動物で副作用が許容された



## Target epigenetic regulation using Pyrrole-Imidazole polyamide conjugates for disease therapy





CHIBA CANCER CENTER

### **Chiba Cancer Center Research Institute**

<b>Nobuko Koshikawa</b>	<b>Atsushi Takatori</b>
<b>Takayoshi Watanabe</b>	<b>Osamu Shimosato</b>
<b>Jason Lin</b>	<b>Hiroyuki Yoda</b>
<b>Takahiro Inoue</b>	<b>Kiriko Hiraoka</b>
<b>Nina Matsuo</b>	<b>Yuto Hirano</b>
<b>Asuka Hattori</b>	<b>Yu Ishihara</b>
<b>Nanami Yasui</b>	<b>Yoshiaki Maru</b>
<b>Mayu Shinohara</b>	<b>Yasuko Imai</b>
<b>Sun Ki</b>	<b>Hirokazu Sugimoto</b>
<b>Yume Tabata</b>	<b>Toshinori Ozaki</b>
<b>Rie Igarashi</b>	<b>Yuki Kaiho</b>
<b>Tomoko Koga</b>	<b>Kei Murayama</b>



### **Kyoto University**

**Hiroshi Sugiyama**  
**Toshikazu Bando**  
**Ganesh N. Pandian**  
**Akimichi Ohtsuki**

### **Chiba University**

**Atsushi Kaneda**  
**Ken-ichi Shinohara**

### **Tokyo University**

**Satoru Miyano**  
**Seiya Imoto**

### **UCSF**

**Allan Balmain**

### **Gentire Biosystems**

Funded by AMED

Practical Research for Innovative Cancer Control  
P-DIRECT

MEXT

Academic Frontier Project 2006-2010

KIBAN (B)

Innovative Areas “Conquering Cancer through  
Neo-dimensional Systems Understanding”

### **Nihon University**

**Noboru Fukuda**  
**Yoshiaki Matsumoto**  
**Isao Saito**  
**Xiaofei Wang**  
**Min Chen**  
**Kyoko Fujiwara**  
**Makoto Kimura**  
**Rajeev Mishra**  
**Asako Oguni**  
**Kaoru Tagata**  
**Tsukasa Suzuki**

### **Advanced Industrial Science and Technology**

**Paul Horton**

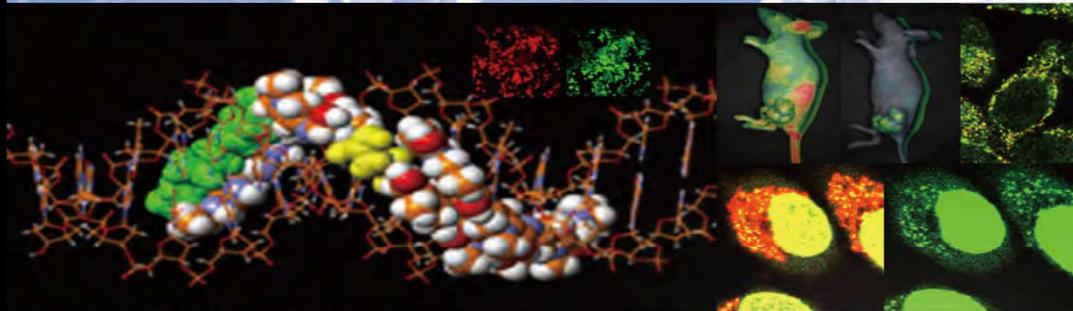
### **RIKEN**

**Shigeharu Wakana**  
**Atsushi Yoshiki**

# Chiba Cancer Center International Symposium

*Cancer Genetic Research  
towards Clinical Application*

June 1<sup>st</sup>, 2018 14:00~17:00  
Port Plaza Chiba, Chiba, Japan



## Presenters



[CHI=BA+KUN]



Rosemary Akhurst  
(UCSF)



Allan Balmain  
(UCSF)



Koji Matsushima  
(Univ. of Tokyo)



Hiroki Nagase  
(Chiba Cancer Center)



Keshav Singh  
Alabama Univ.

主 催：千葉がんシンポジウム実行委員会  
共 催： NPO 法人 医療・福祉ネットワーク千葉、千葉県  
連絡先：千葉県がんセンター研究所 筆宝義隆 (TEL 043-264-5431)

ミトコンドリア研究で  
高名な先生も来日し  
ます。  
Mitochondorion誌の  
Chief editor