

研 究 報 告 書
令和5年度：A課題

2025 年 4 月 30 日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀 田 知 光 殿

研究施設：横浜市立大学

住 所：横浜市鶴見区末広町1-7-29

研究者氏名：有田恭平

(研究課題)

がんの治療薬開発を目指したDNAメチル化酵素DNMT1の阻害剤の探索とその評価

令和6年 3月 18日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【研究背景と目的】

哺乳類における DNA メチル化の異常は、がん抑制遺伝子の転写抑制やトランスポゾンの活性化によるゲノム不安定性を引き起こすことが知られている。これらの現象は、がんの発症・進展と密接に関係しており、DNA メチル化制御に関わるタンパク質群は、抗がん薬の創薬標的として注目されている。実際に、骨髄異形成症候群に用いられている治療薬 5-アザシチジンは、DNA メチル化酵素 DNMT1 を標的としており、DNA メチル化阻害が抗腫瘍効果を発揮しうることを示している。しかし現在、DNA メチル化を標的とした薬剤として臨床で用いられているのは、この 5-アザシチジン（1960 年代に発見され、2004 年に FDA の承認を取得）のみであり、革新的な DNA メチル化阻害剤の開発は長らく停滞している。さらに、5-アザシチジンは細胞複製時にゲノム DNA へ組み込まれ、DNMT1 と不可逆的な共有結合を形成するため、重篤な副作用を引き起こす可能性がある点も課題である。

申請者は DNMT1 の活性化因子であるユビキチン化 H3 が結合した DNMT1 の活性化型の立体構造をクライオ電子顕微鏡単粒子解析法で決定した (Kikuchi *Nature Comm.* 2022)。DNMT1 の N 末端領域（1 次配列上活性部位から 600 アミノ酸離れている）に新規活性化モチーフ Activating Helix を発見した。これが触媒ドメイン中の活性制御ポケット（トグルポケット）に入り込むことが DNMT1 の活性化に必須である。トグルポケットに結合する化合物は Activating Helix の侵入を阻害し、DNMT1 の活性阻害に働くと考えられ、これまでの阻害剤とは異なる作用機序で DNMT1 の活性制御ができる可能性がある。本申請では DNMT1 の新規活性制御部位を標的にした阻害剤の探索とその評価を行い、DNA メチル化阻害を作用点とした新しい抗ガン剤の開発の構造基盤の解明を目指した。

【方法と結果】

予備的に in silico 解析（ドッキングシミュレーションと MD シミュレーション）で約 20 万個の化合物ライブラリーから DNMT1 に結合する候補化合物を選別した。本研究では、ユビキチン化 H3 で活性化された DNMT1 のメチル化活性を、候補化合物有り無しで行い、その阻害効果を評価した。その結果、十数個の化合物が DNMT1 のメチル化活性を約半分にする阻害活性を有することを明らかにした。さらに、この化合物が DNMT1 に結合するかを、DNMT1 の熱変性温度の変化で評価した (Thermal Shift Assay)。その結果、2 つの化合物が DNMT1 の熱変性温度を上昇させたことから、DNMT1 に直接的に結合し、阻害している可能性が明らかになった。

この候補化合物の構造に類似する化合物を再度ライブラリーから探索して、試験管内 DNA メチル化実験によって阻害効果を検証した。その結果、初期スクリーニングでヒットした化合物が最も阻害活性を有することが分かった。

【今後の展望と考察】

本研究では、DNMT1 の活性を阻害する候補化合物の絞り込みに成功した。今後は、候補化合物と DNMT1 の結合の強さを定量的に解析する。また、候補化合物の阻害機構の構造基盤を明らかにするために、DNMT1 と候補化合物の複合体を調製して、クライオ電子顕微鏡単粒子解析や X 線結晶構造解析を行う。得られた構造情報をもとに化合物の構造展開を行い、より高選択的かつ高活性で DNMT1 に結合して阻害効果を示す化合物の開発を行う。