

研 究 報 告 書
令和5年度：A課題

2025年4月24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 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-29

研究者氏名 小沼 剛

(研究課題)

転写制御因子 BRD4 の立体構造に立脚した中分子すい癌治療薬の開発

令和6年3月31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。

【研究の背景】

膵がんは、患者の 5 年生存率が 12.5%に留まる代表的な難治がんである。我が国を含め先進国において膵がんの死亡者数は増加傾向にあり、膵がんの新規治療法や予防法の開発は喫緊の福祉課題となっている。膵がん細胞では、がん原遺伝子である *MYC* が過剰に発現しており、その発現量と膵がん患者の生存率には負の相関があることが知られている (Witkiewicz, *Nat Commun* 2015)。また、転移性の高い膵がんほど *MYC* の発現量が高いことも確認されている (Maddipati, *Cancer Discov* 2022)。これらの結果は *MYC* が膵がんの治療標的の有力な候補であることを示唆しているが、*MYC* はドメイン構造を有しない典型的な天然変性タンパク質であるため、*MYC* に直接結合してその活性を阻害する化合物の開発は困難である。

そこで本研究では、*MYC* を標的遺伝子として発現誘導機能を持つ転写制御因子 BRD4 (bromodomain-containing protein 4) に着目し、その阻害剤を膵がんの新規治療薬候補として開発することとした。申請者はこれまで BRD4 のブロモドメインや ET ドメインに対する阻害剤開発に取り組み、世界に先駆けて ET ドメイン-低分子化合物複合体の構造解析に成功している。本研究ではこれらの実績に基づき、膵がん治療薬シーズとして ET ドメイン阻害剤の創出を目指した。

【研究目的】

BRD4 は、2 つの Bromodomain (BrD) と 1 つの Extra-terminal domain (ETD) を有する (図 1)。BrD はアセチル化されたヒストンに結合

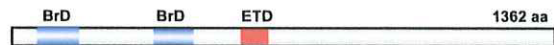


図 1. BRD4 の一次配列における BrD と ETD 領域

し、ETD は転写関連因子をクロマチンにリクルートする。BRD4 は急性骨髄性白血病など複数のがん種の治療標的として知られ、BrD を標的とする阻害剤 (BrD inhibitor: BrDi) が 13 種治験中である。しかし、これらの阻害剤は 2 つの BrD に対する選択性に乏しく、両方の BrD に結合することで強い副作用を招来する。このような状況から ETD を標的とする治療戦略が有用と考えられているが、ETD 阻害剤 (ETD inhibitor: ETDi) の報告はいまだない。そこで本研究にて、中分子ペプチドを利用した ETDi の開発を行うこととした。

【研究結果】

新規中分子ペプチドの合成およびスクリーニング

申請者はこれまでに約 30 nM の解離定数で ETD に結合するペプチド MLV_11 の開発に成功していた (図 2)。そこでこのアミノ酸配列をベースとして、アミノ酸置換や環状化を行なった複数の中分子ペプチドを合成した。それらの解離定数を等温滴定型熱量計 (ITC) もしくは流動誘起分散解析 (FIDA) システムで測定および比較を行い、約 1 nM という極めて強く ETD に結合する環状ペプチド cMLV_04 の開発に成功した (図 3)。さらに、cMLV_04 のアミノ酸配列について Deep Mutational Scanning (DMS) を実施し、R6I と G18W の変異が結合

力の向上に効果的であるとの予測が得られたので（図4）、cMLV_04の変異体であるcMLV_04 R6I、cMLV_04 G18W、cMLV_04 R6I/G18Wの環状ペプチドを合成し、表面プラズモン共鳴（SPR）測定からETDに対する解離定数を見積もった。しかしながら、いずれもcMLV_04より強く結合しなかった。ここまでで合成した中分子ペプチドの中でETDに最も強く結合したcMLV_04を最も良い阻害剤とし、細胞を用いた活性測定を行うこととした。

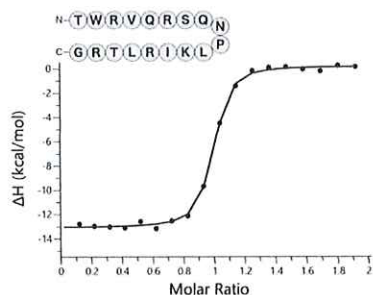


図2. MLV_11はETDと $K_d = 30$ nMで結合する。MLV_11のアミノ酸配列（上図）とITCプロファイル（下図）。

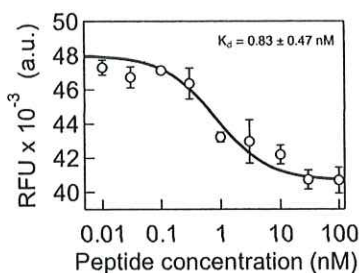


図3. cMLV_04はETDと $K_d = \sim 1$ nMで結合する。FIDAシステムによって測定された。

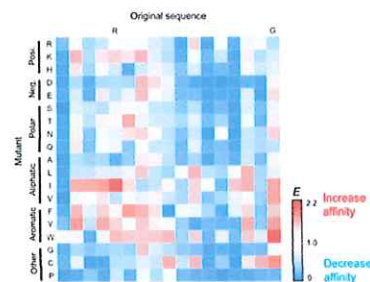


図4. cMLV_04のアミノ酸配列最適化のために行ったDMSの結果。R6I、G18Wの変異がそれぞれ効果的であることが予想された。

cMLV_04とETDの複合体構造解析

cMLV_04とETDの結合様式を理解するため、cMLV_04-ETD複合体の立体構造解析を行った。まずはX線結晶構造解析による複合体の構造解析を行うため、600条件下でその結晶化を試みたが、結晶が得られなかった。そのためX線結晶構造解析は諦め、核磁気共鳴法（NMR）による立体構造解析を行ったところ、解析に成功した（図5）。この複合体において、cMLV_04は分子内 β シート構造を、さらにETDと分子間 β シート構造を形成していることが明らかとなった。

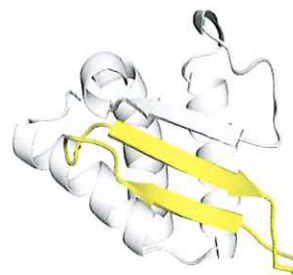


図5. cMLV_04（黄色）とETD（白色）の複合体NMR構造。