

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15592

研究課題名(和文) 癌遺伝子選択性を実現するエピゲノム創薬の新展開

研究課題名(英文) New development of epigenome drug discovery to realize oncogene selectivity

研究代表者

佐藤 太郎 (SATO, Taroh)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号：40368303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：臨床において癌遺伝子を標的化するためには正確なエピゲノム情報に基づいて効果的な創薬の展開を図ることが重要である。そこで本研究では、網羅的なトランスクリプトーム解析の手法を用いて、癌遺伝子c-MYCにより制御されるヒストン脱メチル化酵素を標的候補として抽出した。その結果、ヒストンのメチル化修飾系が重要であること、さらにその標的としてN066が消化器癌において重要な役割を果たすこと、さらにMYC-N066を標的とした創薬により難治癌を克服できる可能性を示し、そのための基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：To target an oncogene in clinical setting, it is important to develop effective drug discovery based on the accurate information in epigenome. In the present study, the histone demethylating enzyme controlled by oncogene c - MYC was identified as a target candidate by using the comprehensive transcriptome analysis method. As a result, it was shown that histone methylation modification system was important and that N066 played an important role in gastrointestinal cancer as its target. Furthermore we showed that it was possible to overcome refractory cancer by drug discovery targeting MYC - NO 66, for which we constructed the foundation.

研究分野：腫瘍内科学

キーワード：癌 酵素

1. 研究開始当初の背景

Q. そもそも、なぜエピゲノムを標的とするのか? A. 治療抵抗性克服のため

癌細胞は heterogeneity (不均一性、多様性) を持った細胞群であると同時に、抗癌剤などに対抗してしなやかにその性質を変える、可塑性の高い集団である。抗癌剤耐性の一部は、2 次的な遺伝子変異で説明されるが、多くの抗癌剤に対する耐性獲得の鍵を握るのは DNA やヒストンメチル化、アセチル化を始めとするエピゲノム修飾である。単分子を標的とする分子標的治療は一定の成果を収めてきたものの、いまだ決定的な治療の切り札とはならない。その背景には癌細胞の驚くべき可塑性による薬剤耐性獲得のメカニズムがあり、これを克服するためにはそのダイナミズムそのもの、つまりエピゲノムを標的としなければならないと考えた。

Q. なぜ数あるヒストン修飾因子の中で NO66 なのか? A. 癌遺伝子への選択性を狙う

ヒストン修飾因子は、その網羅性ゆえ様々な標的に作用するため、正常細胞に対する影響や癌遺伝子以外への作用が懸念される。本研究で注目するヒストン脱メチル化酵素 NO66(別名 C14orf169, MAPJD) は、様々な癌種で発癌・癌進展に中心的な役割を果たす癌遺伝子 c-MYC と協調してクロマチン制御に関わることが知られている。また最近では癌の悪性化に重要な役割を果たすポリコム複合体 PRC2 とゲノム上で会合し、お互いの相乗効果をもたらすことが報告されている (Nat structural & Mol Biology, 2012, Mol Cancer Ther 2007)。これら癌遺伝子との密接な関わりは癌での発現特異性を示唆する。実際にわれわれの研究から正常組織ではほとんど検出されない NO66 が大腸癌組織で高発現していることが確認された。

2. 研究の目的

網羅的なトランスクリプトーム解析の手法を用いて、80 種類以上ある 2-OG 依存性酵素群の中から、癌遺伝子 c-MYC により制御されるヒストン脱メチル化酵素 NO66(MAPJD) を標的候補として抽出した。本研究では、NO66 の癌エピゲノムに及ぼす影響を詳細に明らかにするとともに、NO66 を標的とする創薬にむけて系の作動まで展開する。MYC-NO66 を基軸とする癌特異的エピゲノム制御の全体像が明らかとなれば、癌の進展・転移、ならびに治療抵抗性獲得の新たなメカニズムの解明、ひいては革新的な治療開発につながる可能性がある。

3. 研究の方法

NO66 が癌エピゲノムに与える影響をより詳細に明らかにするために、NO66 の強制発現、抑制系(レンチウイルスシステム、RNAi 干渉系を用いる)を用い、NO66 の発現が変化した

状態でのエピゲノムのプロファイリングを行う。各種ヒストンメチル化抗体(H3K4m0/1/2/3、H3K36m0/1/2/3)でクロマチン免疫沈降後シーケンス(ChIP-seq)すると同時に、様々なパラエティーが想定される NO66 によるヒストン修飾を網羅的に検出するために、液体クロマトグラフィー質量分析(LC-MS/MS)によるヒストン修飾の検出を行った。さらにこれらのデータにトランスクリプトームの情報を統合し解析することで、NO66 が制御する癌エピゲノムの全体像を明らかにした。

4. 研究成果

NO66 の新規ターゲットに関して、プロモーターアッセイ等でターゲットであることの確証を得た上で、この MYC-NO66-新規標的の基軸が細胞形質に与える変化を分子生物学的に明らかにした。具体的には定型的な in vitro アッセイ(増殖、浸潤、コロニー形成能)に加え、エピゲノムが重要な役割を果たす薬剤耐性や癌幹細胞性への関与を、薬剤耐性試験や sphere 形成アッセイ、表面マーカーによる flow cytometry などで検証した。癌臨床検体での POC(proof of concept)の取得を目指す。臨床サンプルの収集・取り扱いに関しては、大阪大学倫理委員会の承認のもとに倫理規定を遵守して施行、大阪大学消化器外科との連携により採取した。約 100 症例の消化器癌臨床検体とそれに対応する正常組織において免疫組織学的染色を行い、臨床病理学的因子、予後、化学療法耐性と、この蛋白発現との関連を調べた。これらのデータ蓄積により NO66 の発現と発癌・癌進展との関連が明らかとなれば、これを癌の早期診断や、化学療法の効果判定のための有用なバイオマーカーとして活用することも可能である。さらに、以上の研究が予定通り進捗すれば、治療への応用を目指し、標的に対する阻害剤のスクリーニングの立 HTRF® (Homogeneous Time Resolved Fluorescence; ホモジニアス 時間 分解 FRET) システムを用いて、基質であるヒストンタンパクに結合させた光エネルギー供与体に脱メチル化ヒストンを認識する抗体が物理的に近接した場合にのみ FRET による蛍光を発するアッセイをデザインし、NO66 による脱メチル化活性を FRET の強度により定量的に把握する系を構築した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 11 件)

- 1) Koseki, J., Konno, M., Asai, A., Colvin, S. H., Kawamoto, K., Nishida, N., Sakai, D., Kudo, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii H. Enzymes of the one-carbon folate metabolism as anticancer targets predicted

- by survival rate analysis. *Sci. Rep.*, 8(1):303, 2018.
DOI: 10.1038/s41598-017-18456-x
- 2) Konno, M., Matsui, H., Koseki, J., Asai, A., Kano, Y., Kawamoto, K., Nishida, N., Sakai, D., Kudo, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Computational trans-omics approach characterised methylomic and transcriptomic involvements and identified novel therapeutic targets for chemoresistance in gastrointestinal cancer stem cells. *Sci. Rep.*, 8(1):899, 2018.
DOI: 10.1038/s41598-018-19284-3
 - 3) Taketo, K., Konno, M., Asai, A., Koseki, J., Toratani, M., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H., Ogawa, K. The epitranscriptome m⁶A writer METTL3 promotes chemo- and radioresistance in pancreatic cancer cells. *Int. J. Oncol.*, 52(2):621-629, 2018.
DOI: 10.3892/ijo.2017.4219
 - 4) Ohashi, T., Eguchi, H., Kawamoto, K., Konno, M., Asai, A., Colvin, H., Ueda, Y., Takaoka, H., Iwagami, Y., Yamada, D., Asaoka, T., Noda, T., Wada, H., Gotoh, K., Kobayashi, S., Koseki, J., Satoh, T., Ogawa, K., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Mitochondrial pyruvate carrier modulates the epithelial-mesenchymal transition in cholangiocarcinoma. *Oncol. Rep.*, 39(3):1276-1282, 2018.
DOI: 10.3892/or.2017.6172
 - 5) Nishizawa, Y., Konno, M., Asai, A., Koseki, J., Kawamoto, K., Miyoshi, N., Takahashi, H., Nishida, N., Haraguchi, N., Sakai, D., Kudo, T., Hata, T., Matsuda, C., Mizushima, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Hypoxia stimulates the cytoplasmic localization of oncogenic long noncoding RNA LINC00152 in colorectal cancer. *Int. J. Oncol.*, 52(2):453-460, 2018.
DOI: 10.3892/ijo.2017.4218
 - 6) Nishizawa, Y., Konno, M., Asai, A., Koseki, J., Kawamoto, K., Miyoshi, N., Takahashi, H., Nishida, N., Haraguchi, N., Sakai, D., Kudo, T., Hata, T., Matsuda, C., Mizushima, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Oncogene c-Myc promotes epitranscriptome m⁶A reader YTHDF1 expression in colorectal cancer. *Oncotarget*, 9(7):7476-7486, 2017.
DOI: 10.18632/oncotarget.23554
 - 7) Asukai, K., Kawamoto, K., Eguchi, H., Konno, M., Asai, A., Iwagami, Y., Yamada, D., Asaoka, T., Noda, T., Wada, H., Gotoh, K., Nishida, N., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Micro-RNA-130a-3p regulates gemcitabine resistance via PPARG in cholangiocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.*, 24(8):2344-2352, 2017.
DOI: 10.1245/s10434-017-5871-x
 - 8) Konno, M., Asai, A., Kawamoto, K., Nishida, N., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. The one-carbon metabolism pathway highlights therapeutic targets for gastrointestinal cancer. *Int. J. Oncol.*, 50(4):1057-1063, 2017.
DOI: 10.3892/ijo.2017.3885
 - 9) Nishizawa, Y., Nishida, N., Konno, M., Kawamoto, K., Asai, A., Koseki, J., Takahashi, H., Haraguchi, N., Nishimura, J., Hata, T., Matsuda, C., Mizushima, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Clinical significance of histone demethylase NO66 in invasive colorectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 24(3):841-849, 2017.
DOI: 10.1245/s10434-016-5395-9
 - 10) Hata, T., Kudo, T., Sakai, D., Takahashi, H., Haraguchi, N., Nishimura, J., Hata, T., Mizushima, T., Yamamoto, H., Doki, Y., Mori, M., Satoh, T. Impact of capecitabine and S-1 on anticoagulant activity of warfarin in patients with gastrointestinal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 78(2):389-396, 2016.
DOI: 10.1007/s00280-016-3080-0
 - 11) Colvin, S. H., Nishida, N., Konno, M., Haraguchi, N., Takahashi, H., Nishimura, J., Hata, T., Kawamoto, K., Asai, A., Tsunekuni, K., Koseki, J., Mizushima, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Oncometabolite D-2-hydroxyglurate directly induces epithelial-mesenchymal transition and is associated with distant metastasis in colorectal cancer. *Sci. Rep.*, 6:36289, 2016.
DOI: 10.1038/srep36289
- 〔学会発表〕(計4件)
- 1) 小関準、佐藤太郎、他：新規トランスオミックス法を用いたがん幹細胞における化学療法耐性の解析、第76回日本癌学会学術総会、2017年9月29日、パシフィコ横浜(神奈川)
 - 2) 今野雅允、佐藤太郎、他：消化器癌の悪性度に関わるメカノバイオロジー、第76回日本癌学会学術総会、2017年9月29日、パシフィコ横浜(神奈川)
 - 3) 今野雅允、佐藤太郎、他：転移性癌幹細胞に特異的な代謝機構の究明、第26回日本がん転移学会学術集会・総会、2017年7月28日、大阪国際会議場(大阪)
 - 4) 西田尚弘、佐藤太郎、他：ヒストンメチル化酵素 KDM5B の消化器がん進展への関わり、第26回日本がん転移学会

学術集会・総会、2017年7月27日、大
阪国際会議場（大阪）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 太郎 (SATOH Taroh)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座
教授
研究者番号：40368303

(2) 研究分担者

西田 尚弘 (NISHIDA Naohiro)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50588118

今野 雅允 (KONNO Masamitsu)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座
講師
研究者番号：80618207

川本 弘一 (KAWAMOTO Koichi)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教
（常勤）
研究者番号：30432470

小関 準 (KOSEKI Jyun)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教
（常勤）
研究者番号：20616669

工藤 敏啓 (KUDO Toshihiro)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講
座助教
研究者番号：20593859

坂井大介 (SAKAI Daisuke)
大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講
座助教
研究者番号：10621071

(3) 連携研究者

石井 秀始 (ISHII Hideshi)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任教
授(常勤)
研究者番号：10280736

森 正樹 (MORI Masaki)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70190999