

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15608

研究課題名(和文) ゲノム領域選択的にエピゲノム異常誘導を阻害する癌エピゲノム医療開発の基盤構築

研究課題名(英文) Development of platform for cancer epigenetic therapy by region-specific inhibition of epigenomic alteration

研究代表者

金田 篤志 (Kaneda, Atsushi)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：10313024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：エピゲノムの異常は発癌に重要な役割を果たす。エピゲノム修飾の阻害薬剤はこれまで、ゲノム全体に対し非特異的に作用するため、それによる副作用や細胞毒性の問題から、癌治療において限定的しか治療応用できていないという問題が存在する。本研究ではエピゲノム修飾阻害剤に、特定のゲノム配列に選択的に結合する小分子を融合した。異なる配列に結合する小分子を融合した阻害剤を合成すると、それぞれが特異的に認識する塩基配列を豊富に含んだ全く異なる領域で選択的にヒストン修飾を改変することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Epigenomic alteration play important roles in tumorigenesis. Epigenetic inhibitors developed so far, however, reprogram the epigenome broadly and randomly; thus, unfavorable side effects can occur along with the antitumor effects, resulting in limited clinical application. To develop epigenetic inhibitors that could alter epigenetic status in region-selective manner, we here applied the technologies of DNA-binding small molecules that recognized specific DNA sequences. We conjugated epigenetic inhibitor with different small molecules, and successfully altered histone modification at different genomic regions where the specific DNA sequences recognized by the conjugated DNA-binding small molecules were frequently included.

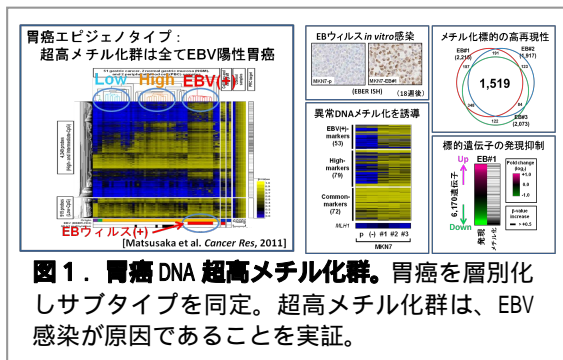
研究分野：癌

キーワード：癌 エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

正常細胞に蓄積したエピゲノム異常が消化管腫瘍の発癌リスクを上昇させる原因となることを申請者は世界に先駆けて証明してきた。さらにマウスモデルを用いて、そのエピゲノム異常により活性化するシグナルに対しシグナル阻害剤を用いることで、特異的な発癌リスク低減療法が可能であることも示した。すなわちエピゲノム異常は発癌に関わる重要な因子であり、それらを治療標的とした戦略は実現可能である。これらの成果から、癌症例はそのエピゲノム特性によって層別化し、サブタイプごとに発癌分子基盤を解明されるべきと考え、消化器癌層別化研究を進めてきた。

網羅的解析による症例層別化は TCGA などの国際グループにより各腫瘍で世界的に進められているが(大腸癌, TCGA *Nature* 2012; 胃癌 TCGA *Nature* 2014)、申請者は網羅的エピゲノム情報を用いて大腸癌[申請者ら *Clin Cancer Res* 2010]、胃癌[申請者ら *Cancer Res* 2011]に関して世界に先駆けて層別化し報告してきた。DNA メチル化は発癌の早期に蓄積し、*MLH1* や *CDKN2A* などのドライバーとなる異常メチル化を経て発癌に至る。胃癌では、ピロリ菌による慢性炎症に伴い萎縮性胃粘膜の段階からポリコム標的遺伝子群を中心とした異常メチル化の蓄積を背景として発癌するサブタイプや、EBウイルス (EBV) 感染に伴ってゲノム広範囲に異常メチル化を獲得して発癌するサブタイプ、などが存在する (図 1)。



これらの背景をふまえ、発癌に重要なエピゲノム異常に対し、その領域のみ特異的に阻害する薬剤を開発する挑戦的研究を着想した。これまでエピゲノム修飾の阻害には、DNA メチル化に対し 5-aza-2'-deoxycytidine など、ヒストン脱アセチル化に対し Trichostatin A などのヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤、などが利用されている。しかしながらこれらの薬剤はゲノムの作用領域に特異性を持たず、ゲノム全体に対し非特異的に脱メチル化やアセチル化が誘導され、細胞毒性や副作用の問題から限定的にしか利用できないという問題が存在する。

2. 研究の目的

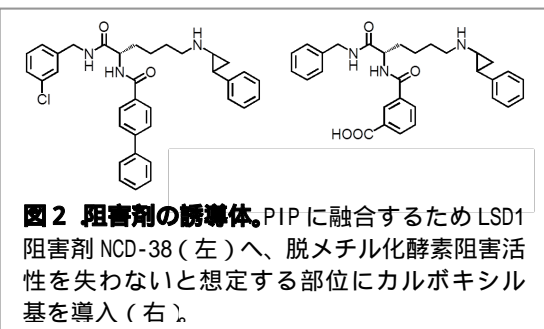
エピゲノム修飾を標的とした機能性分子

による治療法の開発が求められる中、それらの機能性分子単剤では作用領域が広範囲であり阻害効果が過多となる問題点を解決するため、本研究では、DNA 配列認識能を有するピロール-イミダゾールポリアミドを機能性分子に融合させ、その作用領域を局所化させる技術開発を進める。エピゲノム状態を局所的にコントロールできる薬剤を開発し、癌の治療、予防につながる新しいエピゲノム治療の基盤を確立する。

3. 研究の方法

本研究では機能性分子としてヒストン H3K4 脱メチル化酵素として知られる LSD1 に対する阻害剤を用いる。PIP との縮合反応ができるよう、カルボキシル基を導入した誘導体を作成する (図 2)。

試験的 PIP として 4 つのピロールないしイ



ミダゾールを結合し、リンカーとして 2 分子のアラニンをはさんで阻害薬分子と融合するプロトタイプを作成する。作成したプロトタイプ分子の HDM 阻害活性をヒストン脱メチル化酵素アッセイキット (Cayman Chemical 社, #700400) を用いて *in vitro* での評価を行い、親分子の阻害活性と比較して融合分子の活性阻害能に大きな差が出ないことを確認する。

癌細胞株にプロトタイプ分子の投与を行い、WST-8 assay で細胞毒性を測定し NCD-38 と比較評価する。4 週間以上の長期間投与を行うことが可能な、細胞毒性の出ない濃度を決定する。

決定した濃度で癌細胞株に投与を行い、細胞を回収する。化合物は、親分子単独、PIP 単独、および融合したプロトタイプ分子、を比較検討する。回収した細胞において、ヒストン修飾解析を含む網羅的エピゲノム解析、および遺伝子発現解析を行う。プロトタイプ分子によるヒストン修飾変化とその領域における配列選択性を解析する。

4. 研究成果

LSD1 阻害薬に対して、PI ポリアミドとの融合反応ができるようにいくつかの誘導体を作成したが、そのうちの 1 つ、カルボキシル基を導入した誘導体が条件を満たした。4 塩基対認識型 PI ポリアミドに 2 分子のベータアラニンをはさんで融合したプロトタイプを作成し、ヒストン脱メチル化酵素アッセイキットを用いて *in vitro* での

阻害活性評価を行ったところ、カルボキシル基導入した誘導体そのものは活性を失っていたが、融合分子は親分子と同等の阻害活性を持っており、初年度に順調にプロトタイプ合成に成功した。

このプロトタイプ融合分子を、癌細胞株に投与して in cellulo のエピゲノム阻害効果を検証した。ヒストン修飾に対する ChIP-seq 解析、および遺伝子発現に対する RNA-seq 解析を行うと、親分子である LSD1 阻害薬を投与した場合と比較して、融合したプロトタイプ分子を投与した場合には活性化されるゲノム領域および遺伝子は標的が異なった。活性化されたゲノム領域の配列に注目すると、融合分子中の PI ポリアミドおよびベータアラニンが認識すると考えられる塩基配列が豊富に含まれていた。

すなわち、親分子を投与した際には GC-rich な配列を比較的豊富に含むゲノム領域がエピゲノム変化し活性化されていた。活性化領域周囲に含まれる 6 塩基の配列をカウントすると、SSSSSS など GC-rich な配列が、

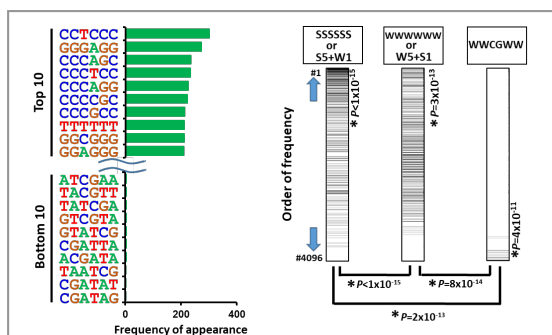


図 3. 阻害剤の親分子が活性化する領域周囲の配列。 GC-rich な配列を豊富に含むゲノム領域が活性化されていた。

WWWWWW や WWCGWW などの配列よりも有意に多く含まれていた (図 3)。

そこで WWWWWW 配列あるいは WWCGWW 配列に特異的に結合すると予想されるプロトタイプ分子を細胞に投与すると、その活性化領域は親分子とは異なっていた。WWWWWW 配列を認識すると予想されたプロトタイプ分子で活性化された領域周囲に含まれる 6 塩基の配列をカウントすると、SSSSSS など GC-rich な配列は有意に少なくなり、WWWWWW など AT-rich な配列が有意に多く含まれていた (図 4)。同様に、WWCGWW 配列を認識すると予想されるプロトタイプで活性化された領域周囲に含まれる 6 塩基の配列をカウントすると、同様に SSSSSS など GC-rich な配列は有意に少なくなり、融合分子が標的とする WWCGWW 配列が有意に多く含まれていた。それぞれの分子が認識すると思われる WWWWWW、WWCGWW への特異的な結合も、オリゴ DNA を用いたゲルシフトアッセイで確認した。すなわち、ヒストン修飾阻害剤を、塩基配列特異的に誘導し領域特異的にヒストン修飾を改変することが可能であることを順調に証明し

報告した [Alagarswamy ら. *Oncotarget*, in

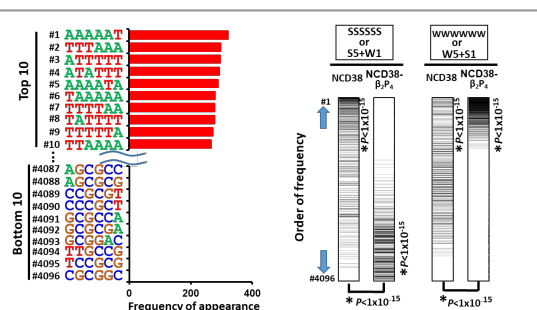


図 4. プロトタイプ融合分子が活性化する領域周囲の配列。 融合分子が特異的に認識する配列を豊富に含むゲノム領域が活性化された。

press]。

以上、本研究では、ヒストン脱メチル化酵素 LSD1 に対する阻害薬を PI ポリアミドと融合し、ヒストン修飾を改変する領域を、領域特異的とすることに成功した。異なる PI ポリアミドを融合することにより、それぞれが特異的に認識する塩基配列を豊富に含んだ、全く異なる領域を選択的にヒストン修飾改変し、活性化する挑戦的課題に成功した。

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 4 件)

1. Alagarswamy K, Shinohara K, Takayanagi S, Fukuyo M, Okabe A, Rahmutulla B, Yoda N, Qin R, Shiga N, Kita K, Suzuki T, Nemoto T, Kaneda A. Region-specific alteration of histone modification by LSD1 inhibitor conjugated with pyrrole-imidazole polyamide. *Oncotarget* 査読有 in press.
2. 篠原憲一、金田篤志. ゲノム領域選択的なエピゲノム制御アプローチ. *Medical Science Digest* 査読無 43:72-5, 2017
3. Shiga N, Takayanagi S, Muramoto R, Murakami T, Qin R, Suzuki Y, Shinohara K, Kaneda A, Nemoto T. Synthesis of pyrrole-imidazole polyamide oligomers based on a copper-catalyzed cross-coupling strategy. *Bioorg Med Chem Lett* 査読有 27: 2197-200, 2017. doi: 10.1016/j.bmcl.2017.03.052
4. Shinohara K, Yoda N, Takane K, Watanabe T, Fukuyo M, Fujiwara K, Kita K, Nagase H, Nemoto T, Kaneda A. Inhibition of DNA methylation at the MLH1 promoter region using pyrrole-imidazole polyamide. *ACS Omega* 査読有 1: 1164-72, 2016. doi: 10.1021/acsomega.6b00229

[学会発表](計 8 件)

1. Kaneda A. Cancer epigenetics as a target of diagnosis and treatment. JSMO / ASCO Young Oncologist Workshop 2018. Feb 8-10,

2018. Tokyo. (招待講演)
2. 篠原憲一、依田夏美、福世真樹、喜多和子、根本哲宏、金田篤志. DNA 配列を認識する小分子による選択的 DNA メチル化阻害. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017/12/09、神戸ポートアイランド・神戸商工会議所(兵庫県・神戸市) (口頭)
 3. 金田篤志. Epigenomic alterations contributing to gastrointestinal carcinogenesis and development of small molecules to modify epigenome in region-specific manner 第 40 回日本分子生物学会・第 90 回日本生化学会大会(ConBio2017) 2017.12.8 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)(招待講演)
 4. 金田篤志. Cancer epigenome and its application to diagnosis and therapy. 第 76 回日本癌学会総会. 2017/9/30 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)(招待講演)
 5. Kokiladevi Alagarwamy, Ken-ichi Shinohara, Atsushi Okabe, Masaki Fukuyo, Natsumi Yoda, Hiroki Nagase, Takayoshi Suzuki, Tetsuhiro Nemoto, Atsushi Kaneda. Region specific alteration of histone modification using LSD1 inhibitor conjugated with Pyrrole Imidazole Polyamide. 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, 2017/9/28 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市) (口頭)
 6. 金田篤志. 胃癌で誘導されるエピゲノム異常と小分子を用いた領域特異的エピゲノム制御. 千里ライフサイエンスセミナー L1 がんシリーズ第 6 回「エピゲノム情報に基づくがんの制御」2017/5/31 千里ライフサイエンスセンタービル(大阪府・大阪)(招待講演)
 7. Atsushi Kaneda, Keisuke Matsusaka, Eiji Sakai, Kenichi Shinohara, Natsumi Yoda, Hiroki Nagase, Tetsuhiro Nemoto, Kokiladevi Alagarwamy, Takayoshi Suzuki, Masaki Fukuyo, Atsushi Okabe, Kiyoko Takane, Sayaka Funata, Hiroe Namba. Epigenetic driver of tumorigenesis in gastrointestinal cancer. International Symposium for the Drug-discovery of the Pyrrole-imidazole Polyamides as Novel Biomedicines. 2017/2/24. Tokyo, Japan. (招待講演)
 8. 金田篤志. がんの層別化とゲノム情報. 千葉県におけるゲノム医療実現に向けて 2016/10/4 ホテルグリーンタワー幕張(千葉県・千葉市)(招待講演)

〔図書〕(計 1 件)

金田篤志. 「がんゲノムとは」 アルファ・クラブ 419:2-3, 2017.

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: 含窒素芳香族アミドの製造方法、ピロール・イミダゾールポリアミドの製造方法、及び化合物
 発明者: 根本哲宏、滋賀直樹、高柳志穂里、鈴木雄太、金田篤志
 権利者: 同上
 種類: 特許
 番号: 特願 2016-074677
 出願年月日: 2016 年 4 月 1 日
 国内外の別: 国内

名称: 配列特異的で設計可能な標的遺伝子の転写抑制阻害剤およびこれを含む組成物並びにその使用
 発明者: 金田篤志、篠原憲一、根本哲宏
 権利者: 同上
 種類: 特許
 番号: PCT/JP2017/003623
 出願年月日: 2017 年 2 月 1 日
 国内外の別: 国外

取得状況(計 0 件)
 なし

〔その他〕
 ホームページ等
 千葉大学大学院医学研究院分子腫瘍学
<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/molonc01/>

6. 研究組織
 (1) 研究代表者
金田 篤志 (KANEDA, Atsushi)
 千葉大学・大学院医学研究院・教授
 研究者番号: 10313024

(2) 研究分担者
 なし

(3) 連携研究者
 なし

(4) 研究協力者
根本 哲宏 (NEMOTO, Tetsuhiro)
 千葉大学・大学院薬学研究院・教授
 研究者番号: 80361450
篠原 憲一 (SHINOHARA, Ken-ichi)
 千葉大学・大学院医学研究院・助教
 研究者番号: 70378561
鈴木 孝禎 (SUZUKI, Takayoshi)
 京都府立医科大学・医学系研究科・教授
 研究者番号: 90372838