

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01959

研究課題名(和文) 配列選択的ヒストンメチル化誘導小分子による新規エピゲノム制御概念の開発

研究課題名(英文) Novel approach to selective modification of histone methylation using DNA-binding small molecules

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新しいタイプの抗がん剤として有望である、リジン特異的脱メチル化酵素(LSD1)阻害剤を、さらに効率良く機能させるために、DNA配列を認識できる小分子であるピロール・イミダゾールポリアミド(PIP)との融合させ、これまでにない機能を有する新規抗がん剤シーズの開発を目指した。LSD1阻害剤単体で処理したがん細胞では、GC配列に富むゲノム領域が主に標的となっていたが、AT配列へ結合するPIPとの融合体を投与した細胞では、標的箇所がAT配列に富む領域に変化した。以上の結果より、PIPとの融合体によって新しいエピゲノム制御型の抗がん剤を生み出せる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞の運命は、染色体上のDNA配列によるゲノム情報と、その周辺の化学的修飾であるエピゲノム情報に制御されている。本研究により、PIP-LSD1阻害剤の融合分子によって、ヒストンメチル化を選択的に制御できる新規概念が構築された。これら融合分子を用いてエピゲノム情報を改変する手法は、がんだけでなく様々な疾患治療に対しても有用性を見出すことができる。さらに、現時点で未解明な部分の多いヒストンメチル化のエピゲノム情報解析を大きく進歩させるツールとしても利用価値が高い上、細胞リプログラミングやウィルス感染治療等にも応用が可能である等、極めて広い分野への波及効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) inhibitors are promising as a new type of anti-cancer drug. In this study, we aimed to develop novel anti-cancer drugs by fusing LSD1 inhibitor to pyrrole-imidazole polyamides (PIP), which are small molecules that can recognize DNA sequences, in order to enhance efficiency of LSD1 inhibitors. In the cancer cells treated with the LSD1 inhibitor alone, the genomic regions with GC-rich sequence were the main target. In other hands, AT-rich regions were targetable by PIP-LSD1 inhibitor that binds to the AT-rich DNA sequence. These results suggest that a fusion with PIP could be a new epigenome-regulating anti-cancer drug.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：エピゲノム制御 核酸化学 遺伝子発現制御 ヒストンメチル化 ピロール・イミダゾールポリアミド

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

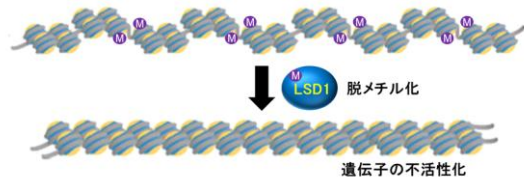
エピゲノムはゲノム情報を制御し、細胞の分化やリプログラムなど細胞の性質を運命づけるためのゲノム領域修飾情報であり、その異常は悪性腫瘍など様々な疾患の原因となる。それゆえ、エピゲノム変化を制御・阻害する手法は、生命現象を解き明かすツールとなりうるものとしてだけでなく、疾患治療薬として期待される。エピゲノム情報の制御を担う酵素の1つであるヒストン脱メチル化酵素は、リジン特異的脱メチル化酵素 1 (LSD1)と、十文字ドメイン含有ヒストン脱メチル化酵素の 2 種に大別される。近年の研究において、LSD1 は様々ながんで発現が上昇していること、LSD1 阻害剤が一部のがん細胞に対して強い抗がん活性を示すことが報告されており、新しいタイプの抗がん剤として有望視されている。

### 2. 研究の目的

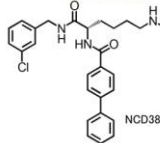
上述のように、エピゲノム阻害剤は多く報告されているが、作用領域の制御が困難である点にさらなる薬剤開発に向けた焦点の余地がある。そこで、我々は DNA 塩基配列能を有する小分子であるピロール-イミダゾールポリアミド (PIP) と、エピゲノム修飾酵素阻害剤誘導体との融合分子の開発を進めた。これまでに、我々は強力な LSD1 阻害剤である NCD38 の誘導体を PIP へ融合させた分子を作成し、PIP と NCD38 を融合させたプロトタイプ分子が、NCD38 単体とは異なる遺伝子を活性化する先行的な研究結果を得ていた。本研究では、これら分子の作用メカニズムの解明を進め、その結果をさらなる PIP との融合分子へフィードバックすることで、新規エピゲノム標的の概念の確立を目指した。

#### Lysine Specific Demethylase 1 (LSD1, KDM1A)

非常に多くのがん細胞中で高発現が認められている



#### LSD1阻害剤

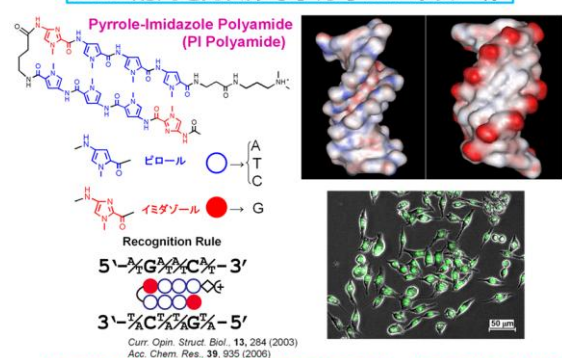


京都府立医大  
鈴木教授らが開発

Angew Chem Int Ed, 52 8620-8624 (2013)

ゲノム領域選択性は？

#### DNA配列を認識する小分子: PIPポリアミド



細胞膜透過性・核局在性に優れたDNAマイナーストック結合小分子

図 1. LSD1 阻害剤 NCD38 と PIP

### 3. 研究の方法

本研究では、PIP と LSD1 阻害剤誘導体との融合分子は PyBOP を用いた縮合反応を軸に化学合成し (図 2)、急性毒性の出ない濃度にてヒト大腸がん細胞 RKO またはヒト白血病細胞 HL60 へ長期間処理した系を用いて、H3K4me1 や H3K4me2、H3K27Ac に対する抗体を用いた ChIP-Seq 解析を中心に、エピゲノム変化を調査した。解析の際には、エピゲノム変化が確認された領域周辺の DNA 配列を 6 塩基単位で抽出して、どのような配列が標的となっているかを図示するための独自のルーチンを開発し、ChIP-Seq 解析結果とリンクさせて評価した。また、融合分子の LSD1 阻害活性は蛍光を用いたスクリーニングキットを用いて、DNA 結合能はゲルシフトアッセイによってそれぞれ評価した。

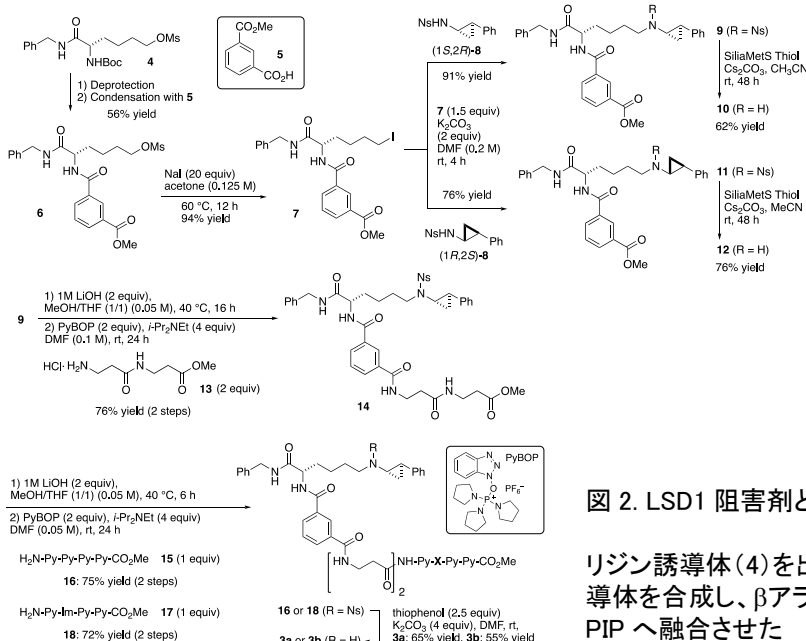


図 2. LSD1 阻害剤と PIP 融合分子の合成手順

リジン誘導体 (4) を出発物質として、NCD38 誘導体を合成し、βアラニン 2 分子をリンカーとして PIP へ融合させた

#### 4. 研究成果

本研究にて NCD38 と PIP の融合分子に関する細胞生物学的解析を進めるにあたり、まず最初に LSD1 阻害剤単体投与系として、NCD38 で処理した RKO 細胞を用いた。処理濃度は急性毒性の出ない 2  $\mu\text{M}$  を選定し、30 日間処理をした。これら細胞のエピゲノム変化に関しては、0.1% の DMSO のみで処理した対照群と比較して 2 倍以上の活性化が認められた領域を抽出し、それら領域に含まれる DNA 配列を抽出した結果、G・C リッチな配列が有意に多いことが示唆された (図 3)。また、エピゲノム変化領域に関しては、半数近くがプロモーター領域となっており、この結果が G・C リッチ領域が多くなった一因であることが予想される。一方で、このようなエピゲノム変化は短期間処理 (4 日間) では発現しなかった。

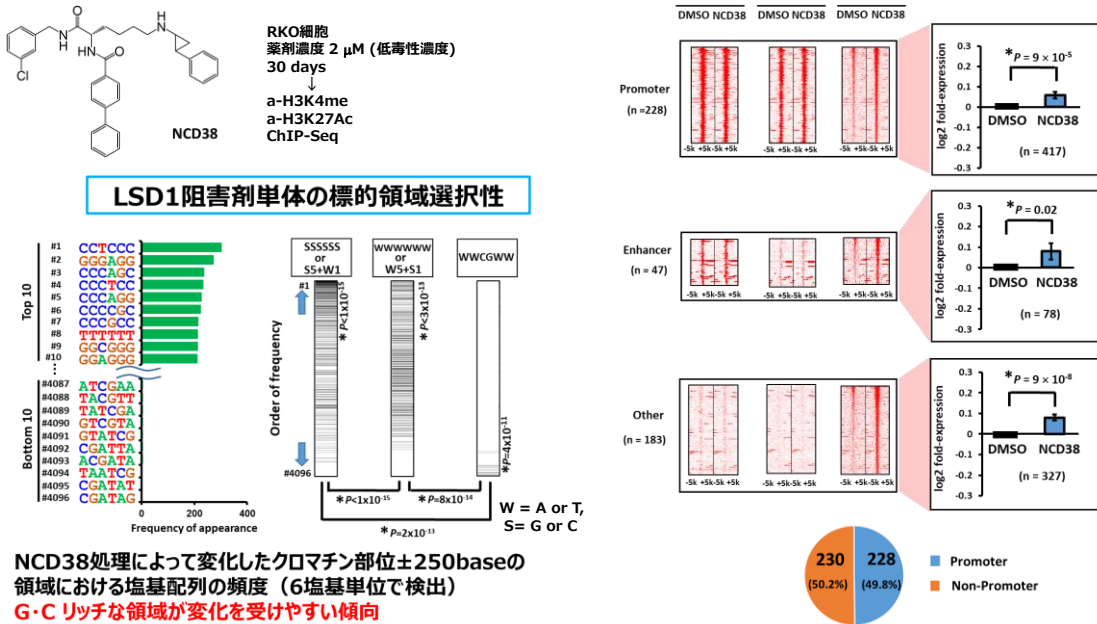


図 3. LSD1 阻害剤単体処理系におけるエピゲノム変化

このため、より良い対象として A・T リッチな DNA 配列へ結合できるように設計した PIP (ピロール 4 分子の縮合体) と NCD38 との融合分子 (NCD38- $\beta_2\text{P}_4$ ) を軸に選定した。この融合体は、 $\beta$ アラニンが 2 分子リンカーとして用いられている影響もあり、6 塩基対認識型の分子として A・T リッチ配列へ結合することが明らかとなり、LSD1 の阻害活性に関しては阻害剤単体系と比較しても大きく低下することはなかった。一方で、HDAC を直接的に阻害する活性は両分子ともに認められなかった (図 4)。

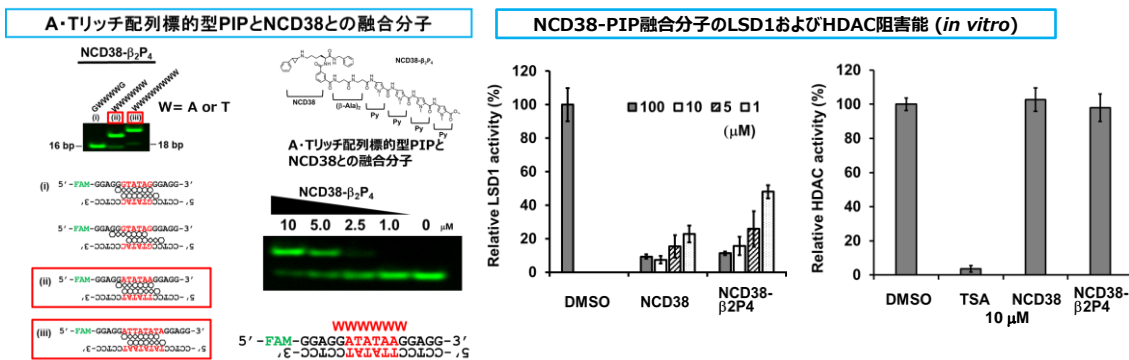


図 4. A・T リッチ配列標的型 PIP と NCD38 との融合分子の化学的性質

NCD38- $\beta_2\text{P}_4$  処理系における同様の解析を進めたところ、G・C リッチな領域を標的としていた NCD38 単体処理系とは大きく異なり、大きなエピゲノム変化が発生した領域周辺の DNA 配列は A・T リッチなゲノム領域がほとんど上位に入っていた。これらの領域の殆どはプロモーターやエンハンサー領域ではなかった (図 5)。以上の結果から、本来は G・C リッチな領域へ作用する NCD38 の作用領域が、A・T リッチな配列へ結合する PIP と融合されたことによって、それらの配列を含むゲノム領域へ変化させることが可能であることが示された。

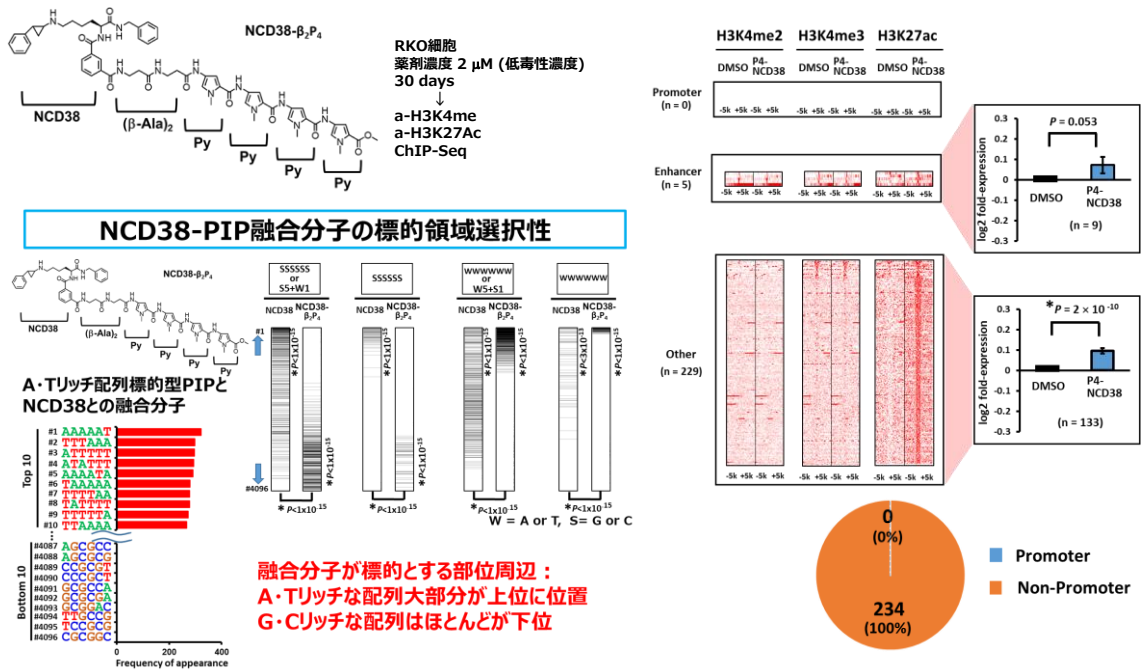


図 5. A・T リッチ配列標的型 PIP と NCD38 との融合分子によるエピゲノム変化

他方、合成の複雑な NCD38 に代わる LSD1 阻害剤の選定も進め、よりシンプルな GSK-LSD1 を筆頭に、PIP 融合体のためのさらなる分子設計改良も進めた。同時に、これまで用いていた βアラニン 2 分子をリンカーとする設計へのテコ入れや、さらなる DNA 配列認識能・結合力強化へつながるヘアピン型 PIP との融合も進めた。現在検討中である新規 LSD1 阻害剤に関しては、NCD38 とは異なり A・T リッチな DNA 領域が標的とされる事が判明するなど、新しい知見も得られており、さらなる詳細解析を現在も進めている (図 6)。

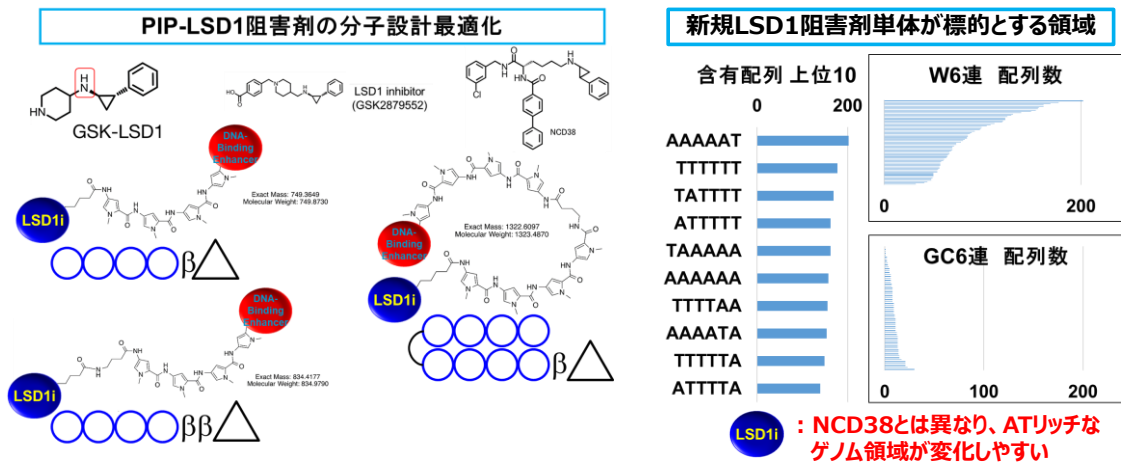


図 6. さらなる改良を施した融合分子に関する機能解析

以上の結果より、PIP と LSD1 阻害剤との融合分子による、領域選択的なヒストンメチル化制御が可能であることが示唆され、本研究を通じて PIP を応用した新しいエピゲノム制御概念の構築を大きく進めることができた。NCD38 と PIP の融合体においては、化学合成に関する詳細を報告した論文 (*Heterocycles* 2019, 99, 891.) と、細胞投与時におけるエピゲノム変化を報告した論文 (*Oncotarget* 2018, 9, 29316.) に分けてそれぞれ報告済みである。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Qin R, Takayanagi S, Kondo Y, Li J, Shiga N, Nakajima M, Shinohara K, Yoda N, Suzuki T, Kaneda A, and Nemoto T	4. 巻 99
2. 論文標題 Synthesis of LSD1 Inhibitor-Pyrrole-Imidazole Polyamide Conjugates for Region-Specific Alterations of Histone Modification	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heterocycles	6. 最初と最後の頁 891 ~ 905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3987/COM-18-S(F)57	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Alagarswamy K, Shinohara K, Takayanagi S, Fukuyo M, Okabe A, Rahmutulla B, Yoda N, Qin R, Shiga N, Sugiura M, Sato H, Kita K, Suzuki T, Nemoto T, Kaneda A	4. 巻 9
2. 論文標題 Region-specific alteration of histone modification by LSD1 inhibitor conjugated with pyrrole-imidazole polyamide	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 29316 ~ 29335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25451	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakagawa Takuya, Matsusaka Keisuke, Misawa Kiyoshi, Ota Satoshi, Takane Kiyoko, Fukuyo Masaki, Rahmutulla Bahityar, Shinohara Ken-ichi, Kunii Naoki, Sakurai Daiju, Hanazawa Toyoyuki, Matsubara Hisahiro, Nakatani Yukio, Okamoto Yoshitaka, Kaneda Atsushi	4. 巻 407
2. 論文標題 Frequent promoter hypermethylation associated with human papillomavirus infection in pharyngeal cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Lett	6. 最初と最後の頁 21 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2017.08.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shiga Naoki, Takayanagi Shihori, Muramoto Risa, Murakami Tasuku, Qin Rui, Suzuki Yuta, Shinohara Ken-ichi, Kaneda Atsushi, Nemoto Tetsuhiro	4. 巻 27
2. 論文標題 Synthesis of pyrrole-imidazole polyamide oligomers based on a copper-catalyzed cross-coupling strategy	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioorg Med Chem Lett	6. 最初と最後の頁 2197 ~ 2200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2017.03.052	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Yosuke, Ishizuka Yoshiaki, Hirano Takayuki, Nagasaki-Maeoka Eri, Hoshi Reina, Yoshizawa Shinsuke, Uekusa Shota, Kawashima Hiroyuki, Sugito Kiminobu, Shinohara Kenichi, Fukuda Noboru, Nagase Hiroki, Soma Masayoshi, Koshinaga Tsugumichi, Fujiwara Kyoko	4. 巻 34
2. 論文標題 ZAR1 knockdown promotes the differentiation of human neuroblastoma cells by suppression of MYCN expression	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Med Oncol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12032-017-0999-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 篠原憲一、金田篤志	4. 巻 43
2. 論文標題 ゲノム領域選択的なエピゲノム制御アプローチ	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 72-75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Rui Qin, 高柳志穂理, 滋賀直樹, Kokiladevi Alagarwamy, 篠原憲一, 鈴木孝禎, 金田篤志, 根本哲宏
2. 発表標題 PIP-LSD1選択的阻害剤ハイブリッド分子の合成と機能評価
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 篠原憲一, 依田夏美, 福世真樹, 岡部篤史, Kokiladevi Alagarwamy, Bahityar Rahmutulla, 覃 睿, 中島誠也, 喜多和子, 鈴木孝禎, 根本哲宏, 金田篤志
2. 発表標題 DNA結合小分子を応用した領域選択的エピゲノム制御概念の開発
3. 学会等名 第41回分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 依田夏美, 篠原憲一, 岡部篤史, 根本哲宏, 福世真樹, 喜多和子, 金田篤志
2. 発表標題 DNA結合小分子とLSD1阻害剤の融合化合物による新規エピゲノム標的薬剤の開発
3. 学会等名 平成30年度関東研究医養成コンソーシアム 第9回夏のリトリート
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠原憲一, 依田夏美, 覃 睿, 福世真樹, 岡部篤史, Alagarswamy Kokiladevi, 仲野駿一, 鈴木孝禎, 根本哲宏, 金田篤志
2. 発表標題 癌エピゲノム異常の制御を目指した塩基配列選択的DNA結合小分子の開発
3. 学会等名 第27回日本癌病態治療研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kokiladevi Alagarswamy, Ken-ichi Shinohara, Shihori Takayanagi, Masaki Fukuyo, Atsushi Okabe, Bahityar Rahmutulla, Natsumi Yoda, Rui Qin, Naoki Shiga, Kazuko Kita, Takayoshi Suzuki, Tetsuhiro Nemoto, Atsushi Kaneda
2. 発表標題 LSD1 Inhibitor Conjugated with PI Polyamide Enhances Region Specific Activation of Genomic Regions
3. 学会等名 Vanderbilt-Ingram Cancer Center Annual Scientific Retreat (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠原憲一, 依田夏美, 福世真樹, 喜多和子, 根本哲宏, 金田篤志
2. 発表標題 DNA配列を認識する小分子による選択的 DNAメチル化阻害
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 覃睿、高柳志穂里、滋賀直樹、Alagarswamy KOKILADEVI、篠原憲一、鈴木孝禎、金田篤志、根本哲宏
2. 発表標題 PIP-LSD1選択的阻害剤ハイブリッド分子の合成と機能評価
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学大学院 医学研究院 分子腫瘍学ホームページ <a href="http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/moloncology/">http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/moloncology/</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	ラヒムトラ バハテヤリ  (Rahmutulla Bahityar)		
連携研究者	金田 篤志  (Kaneda Atsushi)  (10313024)	千葉大学・医学研究院・教授   (12501)	
連携研究者	福世 真樹  (Fukuyo Masaki)  (40639085)	千葉大学・医学研究院・助教   (12501)	



## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	岡部 篤史 (Okabe Atsushi)  (80778118)	千葉大学・医学研究院・助教  (12501)	
連携研究者	根本 哲宏 (Nemoto Tetsuhiro)  (80361450)	千葉大学・薬学研究院・教授  (12501)	
連携研究者	鈴木 孝禎 (Suzuki Takayoshi)  (90372838)	大阪大学・産業科学研究所・教授  (14401)	
連携研究者	永瀬 浩喜 (Nagase Hiroki)  (90322073)	千葉県がんセンター・研究所・所長  (82504)	
連携研究者	福田 昇 (Fukuda Noboru)  (40267050)	日本大学・総合科学研究所・教授  (32665)	
連携研究者	杉山 弘 (Sugiyama Hiroshi)  (50183843)	京都大学・理学部・教授  (14301)	