

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300344

研究課題名(和文)ゲノム領域特異的ヒストンアセチルの誘導によるがん治療法の開発

研究課題名(英文)Development of cancer therapy inducing histone acetylation at the specific region of cancer genome

研究代表者

永瀬 浩喜(Nagase, Hiroki)

千葉県がんセンター(研究所)・がん遺伝創薬研究室・研究所長

研究者番号：90322073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,300,000円、(間接経費) 5,190,000円

研究成果の概要(和文)：がんで発現していない遺伝子には、がんが増えることやがんを不死化することを抑える作用を示すものがあります。これはがんががんであるために出ることを抑え込んでいる遺伝子と言えます。また免疫からがんが逃れるために発現を止めている遺伝子もあります。我々はこの遺伝子のがんでもう一度発現させる薬を創っています。遺伝子の活性化を起こす薬を特定の遺伝子に運ぶとその遺伝子の特異的に活性化出来ます。まだ臨床に使えるほどの強い効果は得られていませんが、がんの嫌がる遺伝子を再発現させる薬を創り出しました。この研究から、がんではなく、iPS細胞を創る薬が出来、これは京都大学と共同研究に至っています。

研究成果の概要(英文)：Tumor suppressor genes have anti-tumor effect leading antiproliferative and antipoptotic effects. Tumor also repress expression of tumor specific antigen to escape immunological reaction against cancer. We are generating drugs of DNA sequence-specific Pyrrole-Imidazole polyamide-SAHA conjugates which reexpress repressed tumor suppressor gene endogenously in cancers. SAHA is an HDACi and activate gene expression. PIP can deliver SAHA to the specific gene. This PIP-SAHA may be a promising chemicals to cure cancer patients, effective drug has not yet been developed though. However in the course of this study we have successfully collaborated with Kyoto University and developed the drug which has generated iPS cells in mice.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：ピロールイミダゾールポリアミド ヒストンアセチル化 ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 がん

1. 研究開始当初の背景

ヒストンテイルのリシンやアルギニンといったアミノ酸のメチル化、アセチル化などのヒストン修飾は遺伝子の発現調節などに重要な役割を演じている。さらにこれらの修飾を調節するヒストンメチル化酵素やヒストンアセチル化酵素の阻害作用を有する化合物は、広く研究・臨床に応用されている。ヒストン修飾のゲノム配列特異的な調節は疾患の治療、細胞環境の調整に非常に重要であることが予測されるが、ヒストン修飾阻害剤の作用部位をゲノム上の特定の部位に特異的に作用させることは、現在まで不可能であった。我々は、ピロール イミダゾール ポリアミド化合物 (PI ポリアミド) とヒストン修飾酵素阻害剤 SAHA の複合化合物 PIP-SAHA を作成し、ゲノム領域特異的なヒストン修飾の人為的変更を試み、がん細胞で発現抑制されている癌抑制遺伝子 p16 のプロモータ部位のヒストンアセチル化の化学物質による能動的変更にも成功した (Nagase et al. Tetrahedron Letters. 2009, 特許第 4873510)。これらの成果は日本癌治療学会、癌学会シンポジウム等でも発表された。

2. 研究の目的

ヒストン修飾酵素阻害剤は、ゲノム上のランダムな標的に対するヒストン修飾に影響するため、遺伝子発現への影響を予測することが困難であった。我々はゲノム上の標的とする遺伝子において特異的にヒストン修飾を制御する薬剤を開発し、抗がん分子標的を確認した上で内因性の遺伝子発現を特異的に活性化することを試みる。そのことで抗がん薬剤を開発することと、他の研究に応用することで生物研究に画期的進歩をもたらすことを目的として研究を進める。

3. 研究の方法

標的遺伝子配列を認識する PIP-SAHA 化合物による標的領域ゲノムのヒストンアセチル化解析、遺伝子発現解析および標的外の領域での変化を検討し、特異的に標的遺伝子を再発現させることができる方法の開発を目指し研究を行った。逆に配列をランダムに選んで作成したポリアミド SAHA 複合体ライブラリーより、目的遺伝子の再発現や細胞の表現型に影響が生じる同複合体を探索し、目的とする表現型を促す化合物をスクリーニングする系を開発した。また、同化合物から表現型の変更を生じる新規の化合物を同定し、その機序の解明を試みた。

4. 研究成果

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 SAHA を特定のゲノムの部位にある一定の特異性を持って送達させることに成功した。このことでゲノムのヒストンアセチル化を一定のルールで特定のゲノム領域に誘導できることを確認し、特許第 4873510「標的遺伝子特異

的ヒストン修飾制御剤」を取得した。がん細胞に関する実験では、がん抑制遺伝子の再発現とランダムライブラリーによるヒストンアセチル化の誘導を試みたが、テストした化合物では明らかな増殖抑制や表現型の変更を導くことが出来なかった。ただし、合成したライブラリーを正常細胞に投与したところそれぞれの化合物で異なる遺伝子の発現パターンを得る事ができ、一部の化合物によって細胞のスフェア形成を認めた。これらの化合物の継続的投与により、マウス胎児線維芽細胞よりアルカリフォスファターゼ陽性の iPS 様細胞を得る事ができ、京都大学との共同研究により多くの論文を作成するに至った。ヒト細胞に置いても同様の研究を進め、山中因子をはじめとする ES 細胞に類似する遺伝子の発現を促すことに成功した。しかし、ヒト iPS 細胞を薬剤のみにより誘導するには至っていない。今後の研究成果が待たれる。同技術は、アルキル化剤の RAS がん遺伝子の変異アレルに対する送達にも応用でき、新たな抗がん剤開発に向けた特許出願に至った。

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 14 件)

1. Kawashima H, Sugito K, Yoshizawa S, Uekusa S, Furuya T, Ikeda T, Koshinaga T, Shinojima Y, Hasegawa R, Mishra R, Igarashi J, Kimura M, Wang X, Fujiwara K, Gosh S and Nagase H. DNA hypomethylation at the ZNF206-exon 5 CpG island associated with neuronal differentiation in mice and development of neuroblastoma in humans. International Journal of Oncology 40: 31-39 2012.
2. Pandian GN, Shinohara K, Ohtsuki A, Nakano Y, Minoshima M, Bando T, Nagase H, Yamada Y, Watanabe A, Terada N, Sato S, Morinaga H and Sugiyama H. Synthetic small molecules for epigenetic activation of pluripotent genes in mouse embryonic fibroblasts. ChemBioChem 12(18) 2822-2
3. Wan JX, Fukuda N, Ueno T, Watanabe T, Matsuda H, Saito K, Nagase H, Matsumoto Y, Matsumoto K. Development of a Novel Gene Silencer Pyrrole-Imidazole Polyamide Targeting Human Connective Tissue Growth Factor BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN 34: 10 1572-1577, 2011
4. 永瀬浩喜 エピジェネティクス疾患の新治療 チャイルドヘルス 診断と治療社 Vol.15 No.3 Page38-41 2012年
5. Hashizume O, Shimizu A, Yokota M, Sugiyama A, Nakad K, Miyoshi H, Itami M, Ohira M, Nagase H, Takenaga K, and Hayashi J-I. A specific mitochondrial DNA mutation in

- mice regulates diabetes and lymphoma development. *Proc Natl Acad Sci U S A* Jun 26;109(26):10528-33 2012.
6. Pandian GN, Nakano Y, Sato S, Morinaga H, Bando T, Nagase H, and Sugiyama H. A synthetic small molecule for rapid induction of multiple pluripotency genes in mouse embryonic fibroblasts. *Scientific Reports* 2, 544, 2012. DOI:10.1038/srep00544
 7. Sato A, Nagase H, Obinata D Inhibition of MMP-9 by using a pyrrole-imidazole polyamide reduced cell invasion in renal cell carcinoma., *International Journal of Oncology* 43: 1441-6, 2013.
 8. Fujiwara K, Ghosh S, Liang P, Morien E, Soma M, Nagase H. Genome-wide screening of aberrant DNA methylation which associated with gene expression in mouse skin cancers. *Molecular Carcinogenesis* 2013 Sep 24. doi: 10.1002/mc.22085. [Epub ahead of print]
 9. Iguchi A, Fukuda N, Takahashi T, Watanabe T, Matsuda H, Nagase H, Bando T, Sugiyama H, Shimizu K. RNA binding properties of novel gene silencing pyrrole-imidazole polyamides. *Biol Pharm Bull.* 36(7):1152-8, 2013
 10. Pandian GN, Nagase H Distinct DNA-based epigenetic switches trigger differential transcriptional activation in human dermal fibroblasts. *Scientific Reports* 2014 Jan 24;4:3843. doi: 10.1038/srep03843.
 11. Han L, Pandian GN, Junetha S, Sato S, Anandhakumar C, Taniguchi J, Saha A, Bando T, Nagase H and Sugiyama H. A Synthetic Small Molecule Enforces Targeted Transcriptional Activation of Germ Cell Genes in a Human Somatic Cell. *Angewandte Chemie* 2013 9;52(50):13410-3.
 12. Taylor RD, Asamitsu S, Takenaka T, Yamamoto M, Hashiya K, Kawamoto Y, Bando T, Nagase H, Sugiyama H. Sequence-Specific DNA Alkylation Targeting for Kras Codon 13 Mutation by Pyrrole-Imidazole Polyamide seco-CBI Conjugates. *Chemistry*. 2013 Dec 30. doi: 10.1002/chem.201303295.
 13. Uekusa S, Kawashima H, Sugito K, Yoshizawa S, Shinojima Y, Igarashi J, Ghosh S, Wang X, Fujiwara K, Ikeda T, Koshinaga T, Soma M and Nagase H. Nr4a3, a possible oncogenic factor for neuroblastoma associated with CpGi methylation within the third exon. *International Journal of Oncology* in press
 14. Taniguchi M, Nakai Y, Ozaki T, Koshikawa N, Kojima T, Kataba M, Oguni A, Matsuda H, Yoshida Y, Tokuhashi Y, Fukuda N, Ueno T, Soma T, Nagase H. Inhibition of malignant phenotypes of human osteosarcoma cells by a gene silencer, a pyrrole-imidazole polyamide, which targets E-box. *FEBS Open Bio* in press 2014
- [学会発表](計 28 件)
1. “Cell permeable synthetic chemicals targeting a specific DNA sequence to modify the mammalian genome regulation.” Nagase H 1st China-Japan Symposium on Cancer Research May 19th-20th 2011, Shenzhen China
 2. 「E-box 結合転写因子の結合抑制による MYC 下流遺伝子の制御:がん抑制ピロールイミダゾール ポリアミド」“Novel E-box binding PI polyamides inhibiting MYC-driven cell-proliferation” Nagase H 第 15 回日本分子標的学会 20110624 ホテル日航東京
 3. 「DNA 結合化合物による疾患モデルマウスの表現型の変更」 永瀬浩喜, 渡部隆博, 越川信子, 井上貴博, 石原優, 平岡桐子, 藤原恭子 第 25 回モロシヌス研究会 7 月 8 - 9 日 2011 年 十日町新潟
 4. 「合成 DNA 結合化合物を用いた多能細胞・疾患モデルに対する表現型の変更」 永瀬浩喜, 越川信子, 渡部隆義, 井上貴博, 石原優, 平岡桐子 第 87 回発生工学・疾患モデル研究会 2011 8/19 国立がんセンター
 5. “Cell permeable synthetic chemicals targeting a specific DNA sequence to modify the mammalian genome regulation” Nagase H Japanese-German Cancer Workshop Sep17-20. 2011 in Hiroshima, JAPAN
 6. “Genome sequence specific histone modification to regulate cell fate” 「ゲノム配列特異的なヒストン修飾阻害による細胞の運命変化」 Nagase H Symposia 「Cancer epigenetics: Breakthroughs in basic research and clinical applications」 2011/10/4 名古屋国際会議場 第 70 回日本癌学会
 7. “Novel E-box Binding PI polyamides Inhibiting MYC Driven Cell Proliferation” Nagase H International Society of Paediatric Oncology, 2011 10/25-29 Auckland, NewZealand
 8. “Molecular recognition of DNA: application of Pyrrole Imidazole polyamides for anti-inflammation and anti-cancer invasion.” Nagase H The 16 th Japan-Korea Cancer Research Workshop 2011/12/10
 9. MYCN TRANSCRIPTION SILENCER BY USING SYNTHETIC PYRROLE-IMIDAZOLE POLYAMIDE MOLECULE IN NEUROBLASTOMA CELLS Watanabe T, Nagase H 7th INTERNATIONAL SOCIETY OF PEDIATRIC ONCOLOGY ASIA CONGRESS Yogyakarta Indonesia 4/21-24 2012
 10. 特別講演 DNA binding molecules : Chemical Genetic Switch to Regulate Cell Fate. Nagase H The 8th Hebei Province Conference on Oncology 8/25/2012 滄州 China.
 11. Automatic synthesis of efficient transcription inhibitors as anticancer agents designing sequence-specific DNA-binding molecules. Nagase H, Koshikawa N, Watanabe

T. AACR American Association for Cancer Research AAUAL MEETING 2013 2013/4/6-10. ワシントン DC 米国

12. Nagase H, Hiraoka K, Inoue T, Ozaki T, Watanabe T, Shinohara K, Koshokawa N: A novel alkylating pyrrole imidazole polyamide specifically targeting KRAS codon12 mutations preferentially suppresses the malignant phenotypes in colon cancer cells bearing G12D or G12V mutation. An AACR Special Conference on RAS ONCOGENES:FROM BIOLOGY TO THERAPY 2014年2月24日-27日. オランダ 米国

13. 永瀬 浩喜, 平岡桐子, 井上隆博, 渡部隆義 KRAS コドン 12 変異を標的とした分子標的アルキル化剤第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会 2013/6/26 仙台

14. 藤原恭子, 谷口真史, 相馬正義, 永瀬浩喜: E-box 配列認識 PI ポリアミドによる抗腫瘍効果の検討 第 22 回日本癌病態治療研究会 2013年6月27日-28日東京

15. 井上貴博, 平岡桐子, 養田裕行, 杉本博一, 篠原憲一, 渡部隆義, 越川信子, 板東俊和, 杉山弘, 尾崎俊文, 永瀬浩喜 変異型 KRAS を標的とした塩基配列特異的アルキル化剤によるマウス移植ヒト大腸癌の増殖抑制 第 36 回 日本分子生物学会年会 2013年12月3日~6日. 神戸

16. 藤原恭子, 相馬正義, 永瀬浩喜 Genome-wide screening of aberrant DNA methylation which associated with gene expression in skin cancers 第 36 回 日本分子生物学会年会 2013 12/3 ~ 6. 神戸

17. 平岡桐子, 井上貴博, 養田裕行, 杉本博一, 篠原憲一, 渡部隆義, 越川信子, 板東俊和, 杉山弘, 尾崎俊文, 永瀬浩喜 変異型 KRAS を標的とした 配列特異的アルキル化剤による腫瘍細胞の増殖抑制 第 36 回 日本分子生物学会年会 . 2013 12/3 ~ 6. 神戸

18. Kawashima H, Sugito K, Yoshizawa S, Uekusa S, Furuya T, Ikeda T, Koshinaga T, Shinojima Y, Hasegawa R, Mishra R, Igarashi J, Kimura M, Wang X, Fujiwara K, Gosh S, NagaseH: DNA hypomethylation at the ZNF 206-exon 5 CpG island associated with neuronal differentiation in mice and development of neuroblastoma in humans 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会 2013/11/29-12/1 福岡

19. 永瀬浩喜, 越川信子, 渡部隆義: 標的ゲノム配列特異的なヒストンアセチル化の誘導 第 72 回 日本癌学会学術総会 2013 10/3-5. 横浜

20. 大日方大亮, 篠原恭子, 高山賢一, 浦野友彦, 永瀬浩喜, 相馬正義, 井上聡, 高橋悟: 前立腺癌特異的融合遺伝子 TMPRSS 2-ERG の生成を抑制するピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドの開発 第 72 回日本癌学会学術総会. 2013年10月3-5日. 横浜

21. 高木恵子, 高山忠利, 藤原恭子, 相馬正

義, 永瀬浩喜: 肝癌進行を抑制する TGF-β1 をターゲットにした PI ポリアミドの開発 第 72 回日本癌学会学術総会. 2013年10月3-5日. 横浜

22. 藤原恭子, 相馬正義, 永瀬浩喜: 抗腫瘍効果を持つ E-box 認識ピロール・イミダゾール・ポリアミドの開発 第 72 回日本癌学会学術総会. 2013年10月3-5日. 横浜

23. 永瀬浩喜 転写因子特異的な TGF β、MMP9 抑制剤による線維化・炎症・がん転移の抑制 第 9 回免疫アジュバント研究会 2013年9月6日. さいたま市

24. 吉澤信輔, 杉藤公信, 星玲奈, 渡邊揚介, 植草省太, 川島弘之, 大橋研介, 池田太郎, 越永従道, 吉澤信輔, 星玲奈, 渡邊揚介, 藤原恭子, 永瀬浩喜 腎芽腫細胞株(G401)における KCNQ10T1 遺伝子を標的とした PYRROLE IMIDAZOLE POLYAMIDE(PIP) の抗腫瘍効果の検討 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会・第 11 回日本小児がん看護学会・第 18 回がんの子供を守る会公開シンポジウム Nagase H 2013/11/29~12/1. 福岡

25. 永瀬浩喜, 越川信子, 渡部隆義, 藤原恭子, Rajeev M 新規 E ボックス認識化合物による MYC 依存性腫瘍の増殖抑制 第 55 回日本小児血液・がん学会学術集会・第 11 回日本小児がん看護学会・第 18 回がんの子供を守る会公開シンポジウム 2013/11/29~12/1. 福岡

〔図書〕(計 1 件)

1. 「遺伝子疾患モデルの作成と利用 がん」第 7 章 皮膚および運動器系 第 1 節 表皮腫瘍誘発モデル 永瀬浩喜 2012年10月30日発刊

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: ドライバーオンコジーンの遺伝子変異を標的にアルキル化する新規アルキル化剤
発明者: 永瀬浩喜, 杉山 弘, 板東俊和
権利者: 千葉県および京都大学
種類: 特許
番号: 特願 2013-214044
出願年月日: 2013年10月11日
国内外の別: 国内

取得状況(計 1 件)

名称: 標的遺伝子特異的ヒストン修飾制御剤
発明者: 永瀬浩喜, 杉山 弘, 鈴木 司, 板東俊和, 木村 真, 大肚彰道
権利者: 日本大学
種類: 特許
番号: 第 4873510
取得年月日: 平成 23 年 12 月 2 日
国内外の別: 国内

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.pref.chiba.lg.jp/gan/kenkyujo/soshiki/iden/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

(永瀬 浩喜)

研究者番号：90322073

(2) 研究分担者

(渡部 隆義)

研究者番号：60526060

(3) 連携研究者

(板東 俊和)

研究者番号：20345284

(杉山 弘)

研究者番号：50183843