

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25713016

研究課題名(和文) ヒストンメチル化酵素結合阻害剤の開発と白血病治療への応用

研究課題名(英文) Development of PPIs for a histone methyltransferase for leukemia therapy

研究代表者

岡田 由紀 (OKADA, YUKI)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号：60546430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：エピジェネティック異常は様々な疾患に関与することが明らかとなり、それに伴いエピジェネティック分子を標的とした創薬(エピドラッグ)開発が加速している。中でもヒストンメチル化酵素 DOT1L の阻害剤は、様々な血液腫瘍の治療に有用であることが示されている。本研究では RaPID システムと呼ばれる環状ペプチドライブラリスクリーニングの系を用いて、新規の DOT1L 阻害剤を探索した結果、従来の低分子化合物とは異なる環状ペプチドを同定し、培養細胞でその効果を確認した。エピドラッグ開発における中分子化合物の前例は少なく、今後更なる発展応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Accumulating evidences have been indicating the involvement of epigenetic dysregulation in various type of diseases, and it accelerates the drug development targeting epigenetic modifiers. Among such modifiers, DOT1L, a histone methyltransferase, has been demonstrated as a promising target for several types of leukemia. In this study, we utilized a peptide library screening system called "RaPID system", and identified a peptide which inhibits the catalytic activity of DOT1L comparable to an existing commercially-available inhibitor. Thus, our finding not only proposes another inhibitor of DOT1L for leukemia therapy but also suggests peptide libraries for an useful source of epidrugs.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピドラッグ 白血病 ペプチドライブラリ

## 1. 研究開始当初の背景

ヒストンや DNA の化学修飾を主体とするエピジェネティクスは、様々な疾患病態に関与する。それに伴って「エピドラッグ」と称されるエピジェネティック分子を標的とした創薬開発が加速している。実際、DNA メチル化酵素 DNMT1 とヒストン脱アセチル化酵素 HDAC ファミリー蛋白の一部を標的とした阻害剤はすでに臨床応用の段階にあり、現在もより多様かつ強力なエピドラッグの開発が進行中である。

DOT1L はヒストン H3 の 79 番目のリジン残基(H3K79)をメチル化するメチル基転移酵素である。過去に我々は DOT1L による H3K79 メチル化が、MLL-AF10 融合白血病[t(10;11)(p12;q23)の転座]によって惹起される骨髄細胞の癌化に必須の働きをすることを報告し、DOT1L の阻害が MLL-AF10 白血病に有用である可能性を示した<sup>1</sup>。さらにその後の研究で、DOT1L は他の融合型の MLL 白血病にも広く関与することが示された<sup>2,3</sup>。MLL 白血病は小児の急性白血病の 15% を占め、米国では年間約 1300 例の発症が報告される。即ち、DOT1L 阻害剤はこれらの白血病治療に有用と考えられ、実際 DOT1L の酵素活性阻害剤 Pinometostat/EPZ-5676(プロトタイプ EPZ-004777 のアナログ)は現在米国で小児 MLL 白血病を対象とした治験が開始されている<sup>4</sup>。

## 2. 研究の目的

以上のように EPZ は MLL 融合白血病治療薬として期待される一方、なぜそれが MLL 融合白血病細胞にのみ特異的に作用するのか、その機序は不明である。多くのファミリーメンバーが存在する HDAC と異なり、DOT1L は H3K79 をメチル化する唯一の酵素であり、ファミリー蛋白による機能的補填が期待できない。実際 DOT1L は全身の主要組織で普遍的に発現しており、DOT1L の全身性ノックアウトマウスは胎生致死、組織特異的ノックアウトマウスは心筋症や骨髄の汎血球減少などで死亡する。即ち、腫瘍細胞特異性のメカニズムが不明な現段階では、EPZ のような酵素活性阻害剤は重篤な副作用を孕む可能性がある。そこで本研究では、DOT1L による骨髄細胞形質転換能が MLL 融合パートナーとの結合に依存している点に着目し、この結合を特異的に阻害する低分子化合物を同定して、MLL 白血病治療薬の新たな候補を提示することを目的とし

た。

## 3. 研究の方法

(1) **スクリーニング標的の決定**: DOT1L と結合が報告されている複数の MLL 融合蛋白質の中から、その親和性や細胞毒性などを考慮して、標的として最適な分子の選出を試みた。さらに DOT1L の酵素活性部位近傍のアミノ酸配列をもうひとつの標的とした。これは陽性コントロール目的に加え、EPZ アナログとは構造(もしくは作用機序)が異なる新たな酵素活性阻害剤の開発が狙いであった。

(2) **Random Peptide Integrated Discovery (RaPID) システムを用いた天然環状ペプチド様物質のスクリーニング**: 東京大学理学研究科 菅裕明研究室の協力の下、菅研究室で開発された RaPID システムを用いてスクリーニングを行った。このシステムでは  $\sim 10^{13}$  サイズのライブラリスクリーニングが可能であること、さらに得られたペプチドを自発的に環状化させることで、天然環状ペプチド薬剤の人工的合成が可能であることが特徴である。

(3) **RaPID システムで得られた物質の in vitro/in vivo での評価**: B で得られた候補物質について、in vitro ヒストンメチル化アッセイを用いた酵素活性阻害効果、および MLL 融合白血病細胞における効果を評価した。

## 4. 研究成果

(1) **スクリーニング標的の決定**: DOT1L と結合する MLL 融合蛋白質の中から、AF10、ENL、AF9 を標的候補とした。小児白血病発症頻度が AF9 > ENL >> AF10 の順であること、AF9 と ENL は構造的類似性が認められ DOT1L の同じアミノ酸部位に結合することから、当初 AF9 を標的とすることで AF9 と ENL 両方への効果を期待した。しかし DOT1L への結合親和性は AF10 が AF9 の約 10 倍高いこと、さらに AF9 と ENL の欠損マウスは致死性の表現型を示すことから、汎用性は劣るが AF10 を標的と決定した(図 1)。

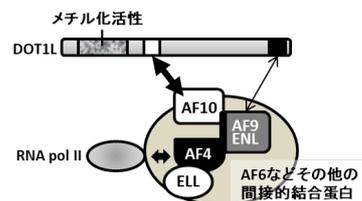


図 1) DOT1L と MLL 融合蛋白質との結合様式

そこで AF10 欠損が細胞に与える影響を検討するために、培養細胞株を用いた RNAi 実験を計画していたところ、AF10 欠損細胞を用いた MLL 白血病の癌化能に関する研究が報告され、さらにその中で DOT1L-AF10 の結合阻害剤探索が言及されていた<sup>5</sup>。この著者らは EPZ の開発・治験に携わっている研究チームであることから、本研究では依然 RaPID システムを用いるという利点はあるものの、AF10 を標的とする研究の継続に再考の必要が生じた。

一方、当初陽性コントロールとして用意した DOT1L の酵素活性部位周辺配列であるが、本スクリーニングで得られる候補ペプチドは通常の低分子化合物ライブラリよりも分子量の大きい物を想定しており、そのため EPZ など従来の低分子化合物とは異なる作用機序を有する可能性がある。さらに近年、EPZ が DOT1L とは結合しない(と考えられる) MLL 融合白血病や、MLL 転座を持たない一部の血液腫瘍にも効果があるという報告が相次いでなされている。即ち DOT1L の酵素活性阻害剤はより多くのタイプの血液腫瘍に対する汎用性が期待されたことから、こちらのスクリーニングを継続することとした。

**(2) DOT1L 結合ペプチドの探索:** RaPID システムを用いて DOT1L の酵素活性部位周辺配列約 400 アミノ酸に結合するペプチドを探索した結果、分子量が 2,000 前後のペプチド 7 種類 (Pep#1 ~7) が得られた。この 7 種類のペプチド配列は互いに共通性に乏しく、また EPZ を含む既報の DOT1L 酵素活性阻害剤との類似性も乏しいものであったことから、既報の酵素活性阻害剤とは異なる作用機序を有することが期待された。

**(3) RaPID システムで得られたペプチドの DOT1L 酵素活性阻害評価 (in vitro):** 上記 Pep#1 ~7 の DOT1L 酵素活性阻害能を、in vitro ヒストンメチル化アッセイを用いて評価した。試験管内で DOT1L とヌクレオソームを混合し、そこに Pep#1 ~7 を加えて反応後、H3K79 メチル化特異的によるウェスタンブロットを行った。その結果、Pep#2 において、DOT1L 酵素活性阻害効果が認められた (図 2)。

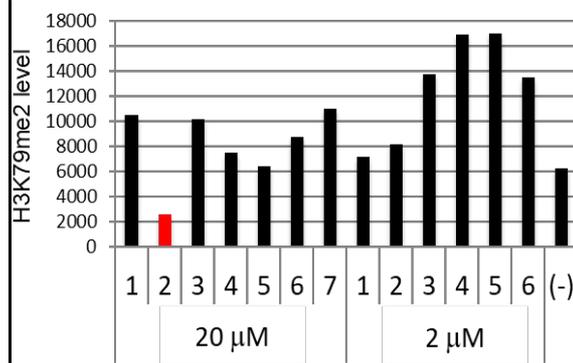


図 2) RaPID システムで得られたペプチドの in vitro 評価

**(4) RaPID システムで得られたペプチドの DOT1L 酵素活性阻害評価 (培養細胞):** 上記 (3) で効果が確認された Pep#2 について、培養細胞株での評価を行った。このために、下記 4 種類のヒト白血病由来細胞株を用意した。

細胞株	白血病タイプ	染色体転座
K562	Chronic myelocytic leukemia	BCR-ABL1
U-937 (DE-4)	Monocytic leukemia	CALM-AF10
HL-60	Promyelocytic leukemia	N/A
THP-1	Acute Monocytic Leukemia	MLL-AF9

これらを用いてまず市販の EPZ アナログ SGC0946 に対する感受性を確認した。その結果、THP-1 において H3K79 メチル化のグローバルな減少が認められ、阻害剤の効果が MLL 融合蛋白質依存的事であることが確認できた (図 3)。

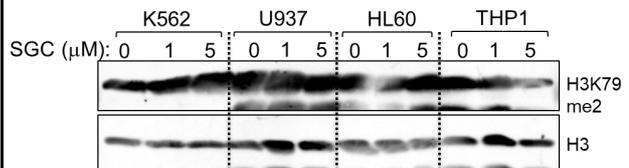


図 3) 白血病細胞株における DOT1L 阻害剤感受性の確認

以上の結果に基づき、次に K562 と THP1 の培地に Pep#2 を 20 μM の濃度で添加し、H3K79 メチル化の変化をウェスタンブロットで検討した。その結果、THP1 でのみ僅かなメチル化の減少が認められたが、in vitro に比べてその効果は低いものであった。これは、培地中に Pep#2 由来の沈殿物が認められたことから、Pep#2 の可溶性向上が不可欠と考えられた。

そこで、菅研究室において可溶性を向上すると考えらえる改変を施した Pep#2 の改変体を作製し、20  $\mu$ M で培地添加時に明らかな細胞毒性を示さなかった 11 種類 (Pep#2\_m1 ~ m11) について、K562 および THP1 の培地中に 1 週間添加し、その効果を評価した。その結果、THP1 でのみヒストンメチル化の減少が確認された化合物が存在した。従ってこれらの効果を THP1 細胞で詳細に検討したところ、Pep#2\_m5 において、陰性コントロール (DMSO) に比較し 65% のメチル化阻害効果が認められた。これは改変前の Pep#2 および SGC0946 (5  $\mu$ M) に比較しても高いものであった。しかし Pep#2\_m5 添加培地中では依然として沈殿が顕著であったことから、Pep#2\_m5 で認められた改善は、可溶性向上によるものではなく DOT1L への親和性等他の原因であると考えられた。すなわち今後 Pep#2\_m5 の可溶性改善により、さらに効果の高い化合物を得られる可能性が示唆された (図 4)。

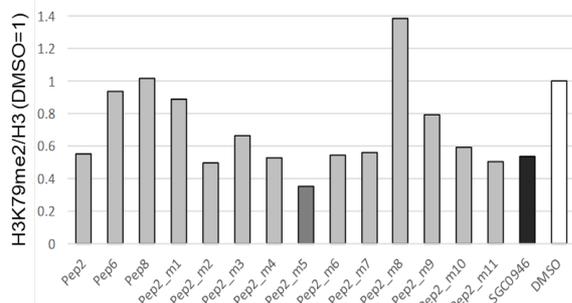


図 4 ) Pep#2 改変体のメチル化阻害効果

#### (5) Pep#2 が細胞増殖に及ぼす効果の検討

DOT1L 阻害剤の効果は細胞増殖速度に比例する (= 細胞増殖が速い程、阻害剤存在下でメチル化が希釈される) と予想される。SGC0946 や AF10 欠損の場合、MLL-AF9 で形質転換した細胞の増殖は、7 日目まで 20% 程度と 14 日間で >90% 抑制される報告されている<sup>5,6</sup>。我々の THP1 を用いた検討では、Pep#2 (改変前) と Pep#2\_m5 処理後の DMSO コントロールに比較した細胞数は、少なくとも検討した 11 日目までは著変はなく、より長期の検討が必要と考えられた (図 5)。また Pep#2 改変体のうち 3 種類が 4 日目までに顕著な細胞の死滅を示し、これらは非特異的な細胞毒性と考えられた。

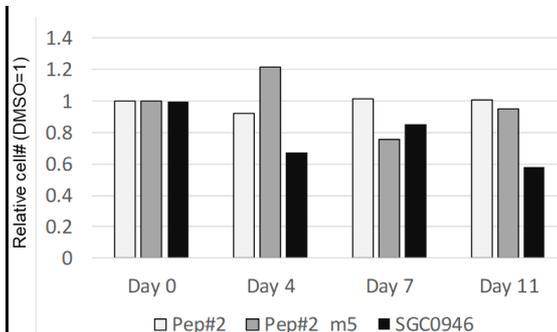


図 5 ) Pep#2 の細胞増殖に及ぼす効果

#### (6) まとめと考察

本研究は当初、既存の DOT1L 酵素活性阻害剤を白血病治療薬として応用する際の副作用を懸念して、DOT1L と MLL 融合白血病との結合阻害剤の同定を提案した。しかし当時は DOT1L-MLL 融合蛋白複合体の全体像が明らかでなく、間接的結合を含めると 10 種類を超える DOT1L の結合蛋白のどれを第一標的にすべきかの絞り込みに時間を要した。研究期間中に、AF10 が有力な候補になり得る知見が論文発表されたが、この報告はエピソードの開発で世界を牽引する Epizyme 社と提携して EPZ の開発・治験に携わっている研究チームによるもので、Epizyme 社は蛋白質間相互作用阻害剤 (PPI) 開発の実績もあることから、現時点で同一の化合物を探索することは得策ではないと考えた。しかし PPI は Epizyme 社が有する従来の低分子化合物ライブラリよりも、本研究で使用した RaPID システムのような中分子化合物に利点があり、今後探索する価値はあると考えられる。

一方 DOT1L の酵素活性阻害剤は、プロトタイプ EPZ-004777 の開発から 6 年が経過し、現在米国で EPZ-5676 の治験が phase 1 を通過したところである。その間様々な EPZ アナログが登場し、細胞株やマウス白血病モデルでその効果が検証されている。

本研究で我々が同定した Pep#2 は分子量約 2000 ダルトンの環状ペプチドである。EPZ アナログは分子量 600 ダルトン前後でベンゾイミダゾールを有し、DOT1L が本来 SAM を取り込む活性ポケットに入り込むことで阻害効果を発揮する。Pep#2 と EPZ アナログ間の構造的類似性は乏しく、活性ポケットの物理的阻害以外の作用機序も考えられることから、今後 Pep2-DOT1L の共結晶構造解析が必須である。さらに Pep#2\_m5 は培地に難溶性ながらも低細胞毒性で Pep#2 よりもより高いメチル化阻害効果を発揮したことから、今後可溶性の改善により、より効果の高い改変体の取得と生体への応用が期待される。

近年の研究において DOT1L 酵素活性阻害剤は、DOT1L の関与が明らかでない MLL 融合白血病や、他の遺伝子変異に起因する白血病を抑制すること、さらに最近では脳腫瘍や大腸癌への効果までが示唆されている。従ってより安全性の高い DOT1L 酵素活性阻害剤の需要は大きく、今後も継続的な探索・改善が期待される。

#### 【参考文献】

1. Okada et al. (2005) Cell
2. Bernt et al. (2011) Cancer Cell
3. Wang et al, (2016) Curr Opin Genet Dev.
4. Shukla et al. (2016) Blood
5. Deshpande et al. (2014) Cancer Cell
6. Yu et al. (2012) Nat Comm.

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願・該当なし

〔その他〕

研究室 HP

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/lab/okada/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 由紀 (OKADA YUKI)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号：60546430

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

菅 裕明 (SUGA HIROAKI)

東京大学・大学院理学系研究科・教授

00361668