

平成 30 年 5 月 25 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：16K15616

研究課題名(和文) 創薬[®]ロファイナ[®]技術を駆使したエピゲノム創薬の加速化と実現

研究課題名(英文) Acceleration and satisfaction of epigenetic drug discovery using profiling technology

研究代表者

小関 準 (KOSEKI, Jyun)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：20616669

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)：大規模計算機を用いたバーチャルスクリーニング(in silico スクリーニング)によって、従来では困難であったエピゲノム制御因子(JARID1B)の阻害剤スクリーニングを可能にした。我々は既に、約500万化合物を対象としてin silicoスクリーニングを実施し、絞り込んだ候補化合物を対象に化学スクリーニングを実施し阻害剤を絞り込んだ。これら阻害剤候補を細胞レベルで効果検討し、さらにその一部を動物実験で効果検討した。これらの実験による機能確認を元に、化合物の合成展開指針を示すまでの道筋を確立することに成功した。この確立した手順に従い、更に効率的な薬物構造を設計する事が可能になる。

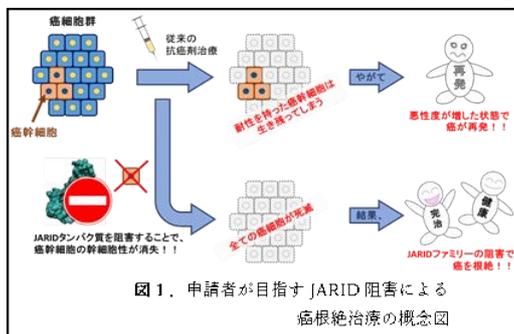
研究成果の概要(英文)：It was very difficult in the past to screen inhibitors of JARID1B, one of epigenome regulatory factor. We have made it possible using our in silico screening technologies with large-scale computer. In silico screening has been already performed to pick up the candidate compounds from five million drug like compounds. Then, we selected first lead compounds from the picked up candidate compounds with chemical assay. We have investigated the in vitro anti-cancer effects of these lead compounds, and the after, investigated the in vivo anti-cancer effects for the part of them. We succeeded in establishing a pathway to show the synthetic evolution guidelines for lead compounds based on the functional information from these experimental results. According to this procedure, it is possible to design a more efficient drug structure.

研究分野：創薬物理化学、量子物理化学

キーワード：癌 エピゲノム 創薬 インシリコスクリーニング

1. 研究開始当初の背景

消化器等の固形癌に於いて、特に早期の治療は外科的治療が基本であり、化学療法・放射線療法が相乗効果を高め、分子標的療法が追加投入されているのが現状である。しかし、現状でもわが国の癌死亡の過半数は消化器癌であり、特に就労年齢人口での罹患率が高いことを鑑みればこの疾患の克服は喫緊焦眉の国民的課題である。この癌の治療を最も困難としている根源は腫瘍の多様性であり、その分子基盤はエピゲノムである。JARID1A,B,C,D は Jumonji ドメインを有するヒストン脱メチル化酵素の1つであり、癌の悪性度の調節に関わることが注目されており (Oncogene Review, 2011)、創薬の標的として重要であり、その阻害は、H3K4メチル化誘導を介して、癌抑制や癌細胞の細胞老化を誘導することが知られている。従ってJARID1B阻害剤は、微小環境の研究から創出された消化器癌の癌幹細胞の特効薬として、挑戦的な成果を期待できる。



2. 研究の目的

大規模計算機を利用した *in silico* スクリーニングと生物学的スクリーニングを組み合わせることでオフターゲットを低減し正常細胞への毒性を低下させた JARID1B 阻害化合物を絞り込む。加えて JARID1B 阻害剤候補をさらに最適化することで治療抵抗性癌幹細胞のエピゲノムを癌幹細胞の **可塑性の阻害**、**枯渇化**を行い、難治性消化器癌の根治を目指した。

3. 研究の方法

***in vitro* 阻害剤効果検討**

50 個程度まで絞り込んでいる化合物の効果検討を行った。網羅性・解析精度を高めるために、CD 番号を付された市販抗体のほぼ全て約 400 個を搭載した細胞表面抗体アレイを使用し、全自動 12 補色 3D マルチカラーにより新鮮状態で瞬時に展開した。JARID1B の阻害効果が癌幹細胞の可塑性を阻害し、癌幹細胞を枯渇化するに最適な化合物を 5 個程度まで絞り込んだ。

***in vivo* 阻害剤効果検討**

絞り込んだ JARID1B 阻害化合物を用いて動物実験による化合物の絞り込みを行った。具体的には個体に移植した

腫瘍に対する治療効果を検討した。加えて肝機能腎機能などの生化学的データや貧血などの造血データも取得した。

阻害剤の最適化展開予測

絞り込んだ候補化合物と JARID1B 触媒部位への結合相互作用の詳細を解析する事で、阻害のために必要な側鎖と不要な側鎖を特定した。化合物の構造最適化の手順として、不要な側鎖を取り除き、必要な側鎖についてはタンパク質と化合物間の余分な空間を考慮しつつ更に適切な側鎖が無いのかを探索し、結合親和性を予測した。予測された最適化構造の幾つかを実際に合成し、阻害効果を検証し、実験的な阻害データを元に、再度コンピュータを用いた構造最適化を実施した。

4. 研究成果

阻害剤候補化合物の効果検討

50 個程度の候補化合物の酵素アッセイと、様々ながん細胞株を用いた JARID1B 発現量比較及び、50%増殖阻害濃度の比較を実施した。これによって更なる絞り込みを実施した。本研究において当初予期していなかったこととして、絞り込んだ化合物を再合成し阻害活性を測ったところ、阻害活性が弱かった。この原因として、当初購入していた化合物を質量分析によって成分を確認したところ不純物が多く含まれており、複数の不純物が阻害化合物であることが判明した。幾つかの不純物構造は解明できたが、残念ながら全ては判明できなかった。

タンパク質構造解析と不純物同定

不純物混入による候補化合物が混迷した問題をうけて研究計画を一部変更し、平成 28 年度でコンピュータを用いた解析を前倒した。具体的には、まず Jarid1B タンパク質の立体構造、特に触媒部位を詳細に解析した。その上で、構造が特定できた不純物に対してコンピュータ解析を実施した。構造が特定できた不純物がどのように結合し、どの程度の阻害活性が見込めるのかを予測することで構造が特定できていない化合物の予測に取り組んだ。考えられる構造を実際に合成し不純物構造を同定する試みを繰り返した仮定で、当初考えていた阻害活性化合物よりも強く Jarid1B に結合する化合物が同定できた。これにより、当初の計画手順とは異なるが、Jarid1B に対する候補化合物を絞り込むことに成功した。

阻害剤の合成展開予測と阻害活性実験

平成 28 年度までに絞り込んだ候補化合物に対して、コンピュータを用いたシミュレーション (タンパク質-薬物候補化合物間相互作用解析: ドッキング・シミュレーション、分子熱振動解析及び結合安定性解析: 分子動力学計算) を実行した事により、薬物候補化合物にとってどの置換基が重

要なのか、もしくはどの原子の存在が重要なのかを予測することに成功した。その結果を基に、新たに様々な候補化合物を合成して、酵素活性の阻害能を検証することによって、実際に阻害能に関わる置換基もしくは骨格内原子種を確認する事を行った。このコンピュータ・シミュレーションと *in vivo* 酵素活性測定 of 繰り返しによって、JARID1B との相互作用で必要な薬物構造との関係性の解析(構造活性相関解析)が予想以上に進んだ。

抗腫瘍効果と安全性・副作用の検討

In vitro 酵素阻害実験の結果を受けて、絞り込んだ最適化阻害候補化合物の中から代表的な構造のものに対して動物実験で抗腫瘍効果と副作用の検討を行った。その結果、我々が設計した候補化合物は腫瘍径を大きく縮小させる傾向が見受けられた。その一方で、副作用の一つとある体重減少は確認されなかった。さらに副作用と安全性検討のために血液生化学的実験を行ったが、不投与群と比較して大きな変化を起しているものは見られなかった。

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) 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) 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
- 4) 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
- 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) Taketo, K., Konno, M., Asai, A., Koseki, J., Toratani, M., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H., Ogawa, K. 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
- 7) 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
- 8) Haraguchi, N., Ohara, N., Koseki, J., Takahashi, H., Nishimura, J., Hata, T., Mizushima, T., Yamamoto, H., Ishii, H., Doki, Y., Mori, M. High expression of ADAMTS5 is a potent marker for lymphatic invasion and lymph node metastasis in colorectal cancer. *Mol. Clin. Oncol.*, 6(1):130-134, 2017.
DOI: 10.3892/mco.2016
- 9) Miyo, M., Konno, M., Colvin, S. H., Nishida, N., Koseki, J., Kawamoto, K., Tsunekuni, K., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. The importance of mitochondrial folate enzymes in human colorectal cancer. *Oncol. Rep.*, 37(1):417-425, 2017.
DOI: 10.3892/or.2016.5264
- 10) Ohara, N., Haraguchi, N., Koseki, J., Nishizawa, Y., Kawai, K., Takahashi, H., Nishimura, J., Hata, T., Mizushima, T., Yamamoto, H., Ishii, H., Doki, Y., Mori, M. Low expression of the GOPC is a poor prognostic marker in colorectal cancer.

- Oncol. Lett.*, 14(4):4483-4490, 2017.
DOI: 10.3892/ol.2017.6817
- 11) Tsunekuni, K., Konno, M., Asai, A., Koseki, J., Kobunai, T., Takechi, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H., MicroRNA profiles involved in trifluridine resistance. *Oncotarget.*, 8(32):53017-53027, 2017.
DOI: 10.18632/oncotarget.18078
- 12) 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
- 13) Baek, SJ., Sato, K., Nishida, N., Koseki, J., Azuma, R., Kawamoto, K., Konno, M., Hayashi, K., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H., Ogawa, K. MicroRNA miR-374, a potential radiosensitizer for carbon ion beam radiotherapy. *Oncol. Rep.*, 36(5):2946-2950, 2016.
DOI: 10.3892/or.2016.5122
- 14) Koseki, J., Gouda, H., Hirono, S. Molecular Orbital Study of the Formation of Intramolecular Hydrogen Bonding of a Ligand Molecule in a Protein Aromatic Hydrophobic Pocket. *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)*, 64(7):1031-1035, 2016.
DOI: 10.1248/cpb.c16-00126.

[学会発表](計7件)

- 1) 小関準、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(神奈川県)
- 2) 小関準、他：トランス-オミックス法を用いたがん幹細胞におけるポリアミン代謝経路の意義の解析、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)
- 3) 小関準、他：がん幹細胞におけるオルニチン代謝経路のトランスオミックス解析、第5回がん代謝研究会 in 札幌、2017年7月13日、北海道大学医学部学友会館「フラテ」大ホール(北海道)
- 4) 小関準、他：Trans-Omics Analysis Shows Novel Functional Change in the Ornithine Metabolic Pathway Between Cancer Stem Cells and Non-Cancer Stem Cells, The 26th Hot Spring Harbor International Symposium, Trans-omics: New Approaches in Biology and Medicine 2016、2016年11月2日-3日、Collaborative Research

Station-I in the Hospital Campus of Kyushu University, Fukuoka (福岡)

- 5) 小関準、他：トランスオミックス解析により見出された、がん幹細胞におけるオルニチン代謝経路の新機能、第75回日本癌学会学術総会、2016年10月8日、パシフィコ横浜(神奈川県)
- 6) 小関準：トランスオミックス解析により見出された癌幹細胞におけるオルニチン代謝経路の新機能、第3回次世代がんインフォマティクス研究会、2016年6月3日、岡山大学(岡山)
- 7) 小関準、他：Thermodynamic and molecular orbital analysis of the effects caused by incorporation of novel anti-tumor agent Trifluridine to DNA.、AACR Annual Meeting 2016、2016年4月19日、New Orleans (アメリカ)

[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

小関 準 (KOSEKI Jun)
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

(2) 研究分担者

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

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

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

(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