

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350977

研究課題名(和文)ゲノム領域特異的ヒストンメチル化阻害剤の開発

研究課題名(英文) 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・特任助教

研究者番号：70378561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：エピゲノム情報は分化・増殖・恒常性の維持等、細胞の運命を左右する鍵であるが、エピゲノムを標的とする薬剤の開発は立ち遅れている。本研究ではヒストンメチル化酵素阻害剤とピロール・イミダゾール・ポリアミドとの融合分子を作成し、その分子が選択的にヒストンメチル化を誘導できるかどうかの評価を中心に進めた結果、この融合分子は阻害剤単独では活性化されなかった遺伝子プロモータ領域のヒストンメチル化を誘導できることが示唆された。また、ピロール・イミダゾール・ポリアミドを用いた新規領域選択的なDNAメチル化阻害概念も開発した。以上の結果より、これら分子が新しいエピゲノム標的薬のシーズであることが示された。

研究成果の概要(英文)：Aberrant DNA methylation and histone modification cause major epigenetic changes and have been implicated in cancer growth. While drugs for epigenome such as SAHA and decitabine can be available for cancer treatment, site-specific modification of epigenome is now requested to be technically achieved. Pyrrole-imidazole polyamides are small molecules that can be designed to recognize and bind to particular DNA sequences. In this study, we synthesized PIP-LSD1 inhibitor conjugates and investigated whether the conjugates show site-selective changing of histone methylation. The results in this study indicate that PIP-inhibitor conjugates induced histone methylation where single inhibitor could not change. In addition, it is shown that PIP can act as sequence-specific antagonists of CpG methylation in living cells.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ピロール・イミダゾール・ポリアミド 核酸化学 発現制御 エピゲノム ヒストンメチル化 DNA配列認識

1. 研究開始当初の背景

(1) エピゲノム情報は分化・増殖・恒常性の維持等、細胞の運命を左右する鍵であり、がんや遺伝子疾患発生のメカニズム、脳機能、人工多能性幹細胞作成における細胞リプログラミング等においても重要な役割を果たしている。代表的なエピゲノム情報として、DNAメチル化やヒストンアセチル化が挙げられるが、近年ではヒストンのメチル化制御も重要な役割を持つことが示されている。

(2) ヒストンのメチル化はメチル化酵素と脱メチル化酵素の競争的な作用によって厳密に制御され、遺伝子の発現を調節しているとされるが、その詳細機構は不明である。ヒストンメチル化を人為的に制御するには、これら酵素の発現を RNAi 等で落とす手段や、阻害剤を用いる方法が利用されている。しかしながら、これらの手法では作用する領域の特異性に欠ける点が、今後の応用範囲を限定的にしてしまう可能性がある。

(3) 本研究の研究代表者である篠原は、これまでに DNA 塩基配列を認識する小分子ピロール・イミダゾール・ポリアミド(PIP, 図1)を用いて、他の機能性小分子へ DNA 配列認識能を付与させる研究を進めてきた。

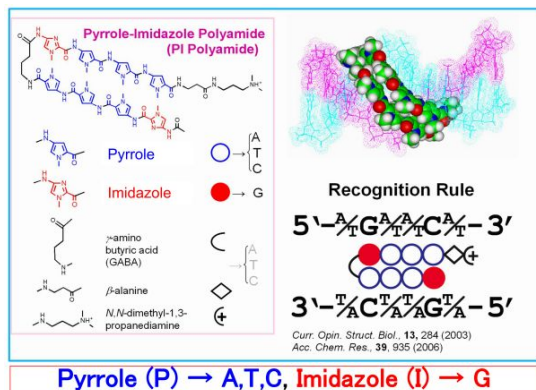


図1. DNA 配列を認識する小分子: PIP

2. 研究の目的

(1) 本研究では、上記の問題点を解決する手段として、ヒストン脱メチル化酵素阻害剤へ DNA 塩基配列認識能を持たせることで作用場所を局所化させる手法の開発を目指した。

(2) これまでに存在しなかったエピゲノム制御法の確立は、現段階で不透明であったエピゲノム情報解析研究を大きく進歩させるだけでなく、それらに関わるがんを始めとした様々な疾患治療に対しても有用である上、細胞リプログラミング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。

3. 研究の方法

(1) DNA 配列認識分子にはピロール・イミダゾール・ポリアミド(PIP)を、ヒストンメチル化酵素阻害剤には Lysine-specific Histone Demethylase 1 (LSD1) の阻害剤である NCD38 を用い、それらの融合分子を合

成した。両分子間にはリンカーとして2分子のβアラニンを用いた。

(2) PIP-NCD38 融合分子の機能評価には、Inhibitor Screening Assay Kit (Cayman Chemical)を用いてヒストンメチル化酵素阻害活性の *in vitro* 評価を進めた。ヒト大腸がん細胞 RKO を用いた *in cellulo* 系では、PIP-NCD38 融合分子を 2 μM の条件で 30 日間処理した細胞をホルミアルデヒド固定し、超音波破碎による DNA 断片化処理を施したサンプルへ、メチル化ヒストン (H3K4me2) に対する抗体を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降にて得られたサンプルより DNA を精製し、その DNA サンプルに対して次世代シーケンサーを用いた網羅的解析を進めた (ChIP-seq 法)。

(3) 上述の RKO 細胞は DNA のメチル化が高頻度で発生しているグループに属する大腸がん細胞株であり、本研究において我々は実際に DNA メチル化を受けているがん抑制遺伝子である *MLH1* の転写開始点に一番近い CpG 部分を標的とする PIP と、*MLH1* プロモータへ結合領域を持たない PIP を、より長い配列を認識できるヘアピン型にて設計・合成した。これら PIP による選択的 DNA メチル化阻害能を、*in vitro* および *in cellulo* で評価を進めた。DNA メチル化レベルは、バイサルファイト処理による C-T 変換と Pyro-sequencing 法を併用した定量的解析を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) 合成した融合分子 (Im0-N および Im3-N) の *in vitro* における LSD1 阻害活性評価では、両融合体とも NCD38 に劣らない LSD1 阻害活性を示し (図 2, a)、H3K4me2 抗体による ChIP-seq 解析結果は、Im3-N は NCD38 単独では活性化されなかった遺伝子プロモータ領域のヒストンメチル化を誘導した (図 2, b)。

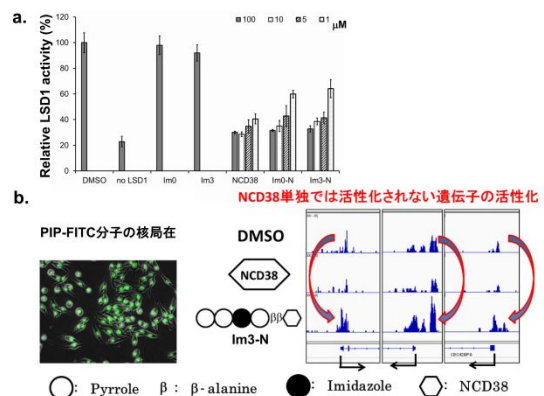


図2. PIP-NCD38 融合分子の機能評価

(2) *MLH1* のプロモータを標的とする PIP1 は (図 3, a) *in vitro* DNA メチル化での評価においては、PIP1 の添加濃度依存的に標的配列周辺の DNA メチル化反応が阻害された (図 3, b)、5-aza-2'-deoxycytidine で脱メ

チル化処理をした RKO 細胞を、1%酸素濃度で 30 日培養することで DNA メチル化レベルが再び亢進する系を利用した *in cellulo* 系での評価においても、PIP1 (5  $\mu$ M, 20-30 日) は選択的に標的領域の DNA メチル化を阻害した (図 3, c)。一方で、MLH1 プロモータを標的としない PIP2 ではこのような効果が得られなかった。以上の結果より、PIP は生細胞における DNA メチル化反応を、結合領域選択的に阻害できることが示唆された。

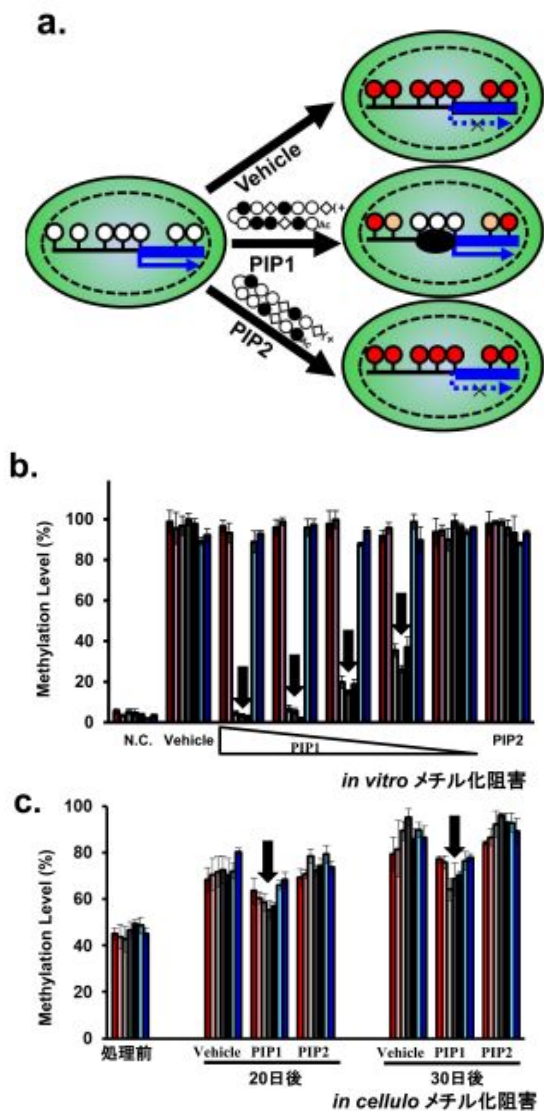


図 3. PIP による DNA メチル化の選択的阻害

(3) 本研究で開発を進めた、ゲノム領域選択的なエピゲノム制御法を応用することで、エピゲノム異常によって損なってしまった細胞機能の回復や、人工的に細胞の機能をリプログラムすることがより容易になるかもしれない。最近では、CRISPR-Cas9 を応用した配列特異的エピゲノム改変法が開発され注目を浴びており、この手法と我々のアプローチへお互いの長所を組み合わせるなど、今後さらなる研究をすすめることで、これまでになかったゲノム領域選択的なエピゲノム制御概念が確立できることを期待したい。

## 5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 8 件)

— 篠原憲二、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*, Vol. 43、2017、116-121. 査読無

— 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*, **27**: 2197-2200, 2017. 査読有  
doi: 10.1016/j.bmcl.2017.03.052.

— 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*, **1**:1164-72, 2016. 査読有  
doi: 10.1021/acsomega.6b00229

— Watanabe T, Shinohara K, Shinozaki Y, Uekusa S, Wang X, Koshikawa N, Inoue, T, Hiraoka K, Bando T, Sugiyama H, Nagase H. Double Beta-alanine Substitutions Incorporated in 12-ring Pyrrole-Imidazole Polyamides for Lengthened DNA Minor Groove Recognition. *Adv Tech Biol Med*, **175**: 1000175, 2016. 査読有  
doi: 10.4172/2379-1764.1000175

— Suzuki Y, Tanaka Y, Nakano S, Dodo K, Yoda N, Shinohara K, Kita K, Kaneda A, Sodeoka M, Hamada Y, Nemoto T. Platinum-Catalyzed Friedel-Crafts-Type C-H Coupling-Allylic Amination Cascade to Synthesize 3,4-Fused Tricyclic Indoles. *Chemistry*, **22**:4418-21, 2016. 査読有  
doi: 10.1002/chem.201600375

- Saito K, Fukuda N, Shinohara K, Masuhiro Y, Hanazawa S, Matsuda H, Fujiwara K, Ueno T, Soma M. Modulation of the EMT/MET Process by Pyrrole-Imidazole Polyamide Targeting Tuman Transforming Growth Factor- $\beta$ 1. *Int J Biochem Cell Biol*, **66**:112-20, 2015. 査読有  
doi: 10.1016/j.biocel.2015.07.011.
- Hiraoka K, Inoue T, Taylor RD, Watanabe T, Koshikawa N, Yoda H, Shinohara K, Takatori A, Sugimoto H, Maru Y, Denda T, Fujiwara K, Balmain A, Ozaki T, Bando T, Sugiyama H, Nagase H. Inhibition of KRAS Codon 12 Mutants Using a Novel DNA-Alkylating Pyrrole-Imidazole Polyamide Conjugate. *Nat Commun*, **6**:6706, 2015. 査読有  
doi: 10.1038/ncomms7706.
- Sugimoto H, Nakamura M, Yoda H, Hiraoka K, Shinohara K, Sang M, Fujiwara K, Shimozato O, Nagase H, Ozaki T. Silencing of RUNX2 Enhances Gemcitabine Sensitivity of p53-Deficient Human Pancreatic Cancer AsPC-1 Cells through the Stimulation of TAp63-Mediated Cell Death. *Cell Death Dis*, **6**:e1914, 2015. 査読有  
doi: 10.1038/cddis.2015.242.

〔学会発表〕(計 2件)

篠原憲一、日本ケミカルバイオロジー学会第11回年会、DNA結合小分子を用いた選択的DNAメチル化阻害、2016年6月15日、京都テルサ テルサホール(京都府・京都市南区)

篠原憲一、第38回日本分子生物学会年会、DNA配列認識小分子によるエピゲノム制御、2015年12月3日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市中央区)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 2件)

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：特許願 PCT/JP2017-003623 号  
出願年月日：2017年02月01日  
国内外の別：国外

名称：遷移金属触媒反応を利用した3,4位中員環縮環3-アルキリデンインドリン類、および3,4位中員環縮インドール

類の合成法

発明者：根本哲宏、濱田康正、鈴木雄太、仲野駿一、田中唯人、井上直也、金田篤志、篠原憲一、喜多和子、依田夏美  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特許願 2016-158433 号  
出願年月日：2016年8月12日  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ

<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/moloncol/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

篠原 憲一 (SHINOHARA, Ken-ichi)  
千葉大学・大学院医学研究院・特任助教  
研究者番号： 70378561

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

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

根本 哲宏 (NEMOTO, Tetsuhiro)

千葉大学・大学院薬学研究院・特任助教  
研究者番号： 80361450

鈴木 孝禎 (SUZUKI, Takayoshi)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号： 90372838

杉山 弘 (SUGIYAMA, Hiroshi)

京都大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号： 50183843

永瀬 浩喜 (NAGASE, Hiroki)

千葉県がんセンター・研究所・所長  
研究者番号： 90322073

渡部 隆義 (WATANABE, Takayoshi)

千葉県がんセンター・研究所・研究員  
研究者番号： 60526060

(4)研究協力者

依田 夏美 (YODA, Natsumi)

福世 真樹 (FUKUYO, Masaki)

高根 希世子 (TAKANE, Kiyoko)

藤原 恭子 (FUJIWARA, Kyoko)

喜多 和子 (KITA, Kazuko)

福田 昇 (FUKUDA, Noboru)