

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670055

研究課題名(和文) 治療に有効な遺伝子を制御する自然を模倣した革新的小分子化合物

研究課題名(英文) Nature-inspired small molecules for regulation of therapeutically important genes

研究代表者

ナマシヴァヤム パンディアン (NAMASIVAYAM, Ganesh Pandian)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・助教

研究者番号：20625446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：疾患治療に有効な遺伝子の活性化分子の開発が求められている。我々は、特定のDNA配列を標的としたエピジェネティック活性をもつ化合物を用いて、視覚障害やHIVを含むいくつかの疾患に関わる遺伝子群の活性化に成功した。また、miR-302ファミリーのONスイッチや、がん遺伝子EVI1のOFFスイッチも開発した。エピジェネティック調節分子とDNA結合分子の統合により、多能性および軟骨分化に関わる遺伝子群を活性化した。次世代シーケンサによる解析によって、より高性能な化学構造を構築した。我々のproof-of-conceptの研究は、多面的な活性を持つ分子を開発するための分子基盤を提供した。

研究成果の概要(英文)：Synthetic transcriptional activators adept of therapeutic gene modulation could be harnessed for developing strategies to treat some uncured defect-transcriptional machinery associated disorders. We have successfully advanced distinct DNA-based epigenome-modulating small molecules as first-ever bio-inspired genetic switches for activating exclusive cluster of therapeutically important genes including those providing resistance towards ocular disorders and HIV. Also, an `ON` switch for miR-302 familial microRNAs and an `OFF` switch for EVI1 oncogene were developed. Integration of epigenetic modulators on synthetic DNA-based domain effectively activated genes associated pluripotency and cartilage development. Next-generation sequencing studies guided the construction of second-generation genetic switches. Our proof-of-concept studies validate the switchable roles of epigenetic enzymes in gene regulation and provide a molecular basis for developing versatile bioactive ligands.

研究分野：ケミカルバイオロジー

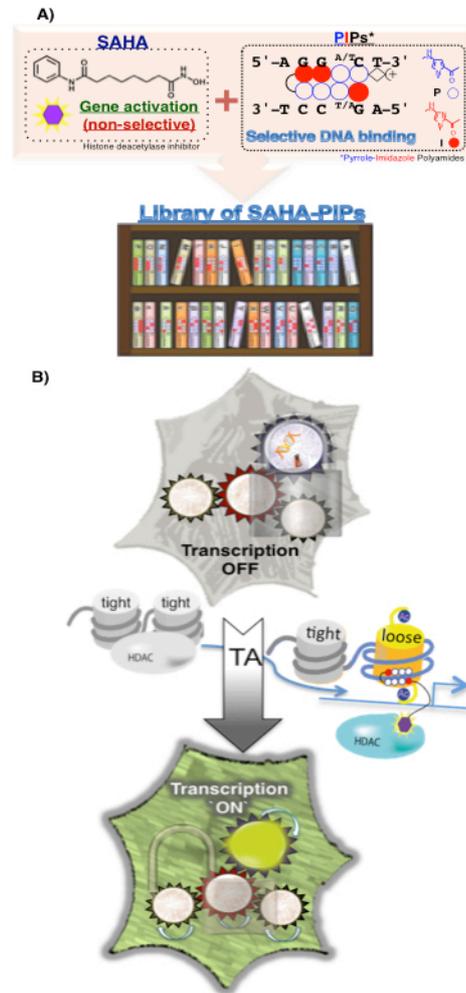
キーワード：天然分子を模倣した化合物 DNAベースの治療 遺伝子発現制御 マルチターゲットな小分子化合物 エピゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

近年、難病の治療法の開発のため、DNA 配列情報に基づいた治療戦略に注目が集まっている。標的治療は効果が高く副作用が少ないため、テイラーメイドの薬に対する需要が高まっている。実験・解析技術の進歩により、現在では病気に関連している転写因子を予測することが可能になった。転写調節機構の異常と疾患の関連性に対する知見が増えたことで、このような遺伝子の転写を制御する薬剤の開発が強く求められている (Nat. Chem. Biol. 2014, 10, 291)。エピゲノムはその可逆的な性質から、薬剤による調節が可能である。我々は、DNA 配列選択性および活性において天然の転写因子と同等の能力をもつ **Transcriptional Activator (TA)**を開発してきた。我々は **SAHA-PIP** という新規小分子化合物による **P16** がん抑制遺伝子のプロモーター領域の高アセチル化誘導を示した (Tetrahedron Lett. 2009, 50, 7288)。SAHA-PIP はエピジェネティック活性をもつ SAHA と、任意の標的 DNA 配列に結合するピロールイミダゾールポリアミド (PIP) を結合させた構造をもつ。マウス細胞でのスクリーニングから、いくつかの SAHA-PIP が多能性関連遺伝子の発現を促進させることを見出した (ChemBioChem 2011, 12, 2822; Sci. Rep. 2012, 2, e544)。ヒト繊維芽細胞においては、生殖細胞で特異的に発現している PIWI-interacting RNA を活性化させる SAHA-PIP を同定した。減数分裂を調節する PIWI-interacting RNA は体細胞において通常発現しないため、SAHA-PIP による活性化は不妊治療への応用の可能性を示唆した (Angew. Chem. Int. Ed. 2013, 52, 13410 [HOT PAPER])。

## 2. 研究の目的

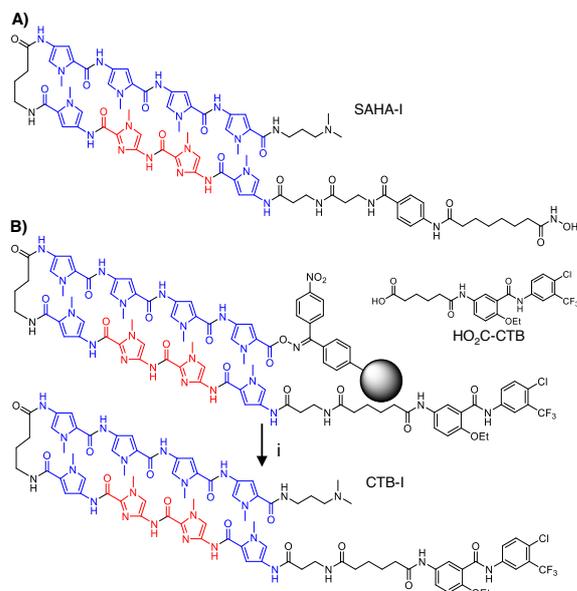
変異型遺伝子を人為的に調節するためには、遺伝子治療などいくつかの方法が知られている。しかし、多くの疾患は単一の遺伝子だけではなく、複数の遺伝子によって制御される転写調節機構とも関連している。現在では、遺伝子の転写を人為的に活性化させる方法のほとんどが外来因子を含んでおり、安全面に疑問が残る。小分子化合物で代用することができれば、安全でかつ低コストな治療を実現できる。さらに、小分子化合物はワクチン、ペプチド、siRNA などの他のどんな薬剤よりも多く実用化されている (Nat. Chem. Biol. 2005, 1, 64)。天然の転写因子と同等の能力を得るためには、人工転写因子は DNA 認識モジュールと転写装置をリクルートする機能モジュールを併せ持つ必要がある。遺伝子を選択的に活性化させるバイオインスパイアドな **Transcriptional Activator** は、転写制御機構の異常と関連する疾患の治療において利用される可能性をもつ (Fig. 1)。



**Figure 1.** (A) 新規 **Transcriptional Activator (TA)** SAHA-PIP のライブラリ。SAHA-PIP はエピジェネティック活性をもつ (*Suberoylanilide hydroxamic acid*) SAHA と配列特異的に DNA に結合するピロールイミダゾールポリアミド (PIP) を結合させたものである。(b) **Transcriptional Activators (TA)** は部位特異的にクロマチン構造を変化させ、*silent* な転写調節機構の活性化を引き起こす。

## 3. 研究の方法

我々の戦略は、疾患治療において重要な遺伝子を選択的に活性化させるエピジェネティックスイッチを開発することである。様々な認識配列をもつ PIP を合成し、エピジェネティック調節分子と結合させた。また、PIP や機能部位の化学構造を変えることで、コントロール化合物も合成した。最初のスクリーニングにおいて、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤の SAHA を 'I' という配列の PIP に結合した化合物が、多能性関連遺伝子を活性化させることを見出した (Scheme 1A)。転写活性化のシグナルであるヒストンアセチル化を誘導するためには、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) を阻害するよりも、ヒストンアセチル基転移酵素 (HAT) を活性化するほうが効果的であると考えら



Scheme 1. (A). SAHA-I の化学構造 (B) CTB-PIP の合成スキーム。反応条件: (i) 3-dimethylaminopropylamine (Dp), 45°C, 3h.

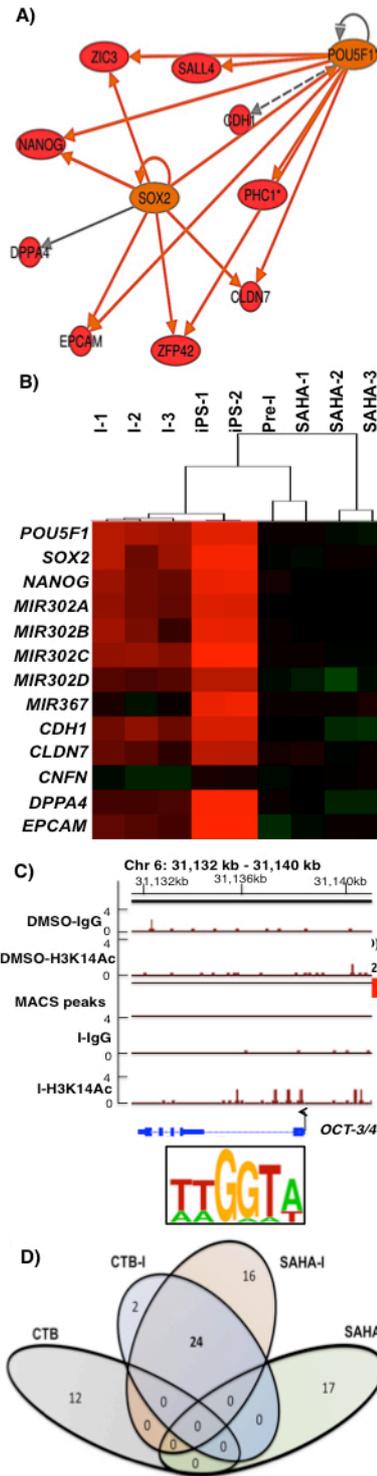
れた。そこで、SAHA の代わりに既知の HAT 活性化分子である *N*-(4-chloro-3-trifluoromethyl-phenyl)-2-ethoxy-benzamide (CTB) を DNA 認識ドメイン `I` に結合させた (Scheme 1B)。水溶性を高めるため、イソフタル酸 (IPA) を PIP の C 末端に結合させたもの (SAHA-2) も合成した。

これらの化合物を処理した細胞から RNeasy Mini Kit を用いて RNA を抽出した。この RNA に対して SurePrint G3 Human GE v2 8x60K Microarray (Agilent Technologies, USA) または Human Gene 2.1 ST Array (Affymetrix, USA) を用いてマイクロアレイ解析を実施した。得られたデータは GeneSpring GX v12.1.0 (Agilent Technologies, USA) または Transcriptome Analysis Console (Affymetrix, USA) を用いて処理された。発現変動が見られた遺伝子群は Ingenuity Pathway Analysis (IPA™) やその他のツールを用いて機能解析が行われ、治療に重要な遺伝子の発現を誘導する化合物を同定した。これらの化合物の活性は定量 PCR によって確かめられ、細胞処理条件の最適化が行われた。表面プラズモン共鳴アッセイにより、化合物の結合アフィニティが評価された。次世代シーケンサを用いた Bind-n-seq 法により、標的 DNA 配列を調べた。また、H3Ac、H3K14Ac および H3K27Ac 抗体を用いてクロマチン免疫沈降-シーケンシング (ChIP-seq) 解析を行った。DNA ライブラリは Ion PGMTM template 200 kit v2 and 316/318 chip を用いて Ion PGM sequencer によりシーケンシングされた。アライメントには Torrent Mapping Alignment Program 3.4.3-1 (TMAP) が用いられ、ピーク検出には MACS 1.4.2. が用いられた。

#### 4. 研究成果

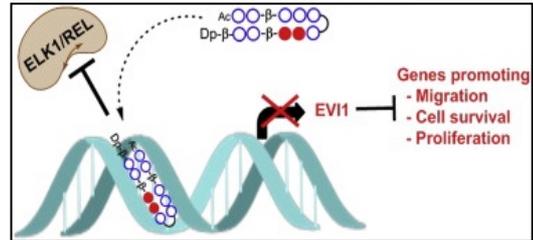
我々は、エピジェネティックスイッチが治療に有効な様々な遺伝子およびノンコーディング RNA を活性化しうることを示した。はじめに、マウス細胞で観察されたパターン (Sci. Rep. 2012, 2, e544) とは異なり、ヒト細胞では SAHA-PIP  $\delta$  は多能性関連遺伝子を活性化しなかった。マイクロアレイ解析により、SAHA-PIP `I` がヒト細胞で OCT-3/4 パスウェイを活性化することを見出した (Fig. 2A)。miR302/367 クラスターの強制発現は iPSC 細胞の作成速度を高めることが知られている (Cell Stem Cell, 2011, 8, 376) が、SAHA-PIP `I` は miR-302 ファミリー (MIR-302A, -302B, -302C, -302D) を活性化することが示された小分子化合物の初めての例であることがかった (Fig. 2B)。このことは、SAHA-PIP が細胞の運命制御を担う microRNA を活性化させるツールとなる可能性を示唆した (ACS Chem. Biol. 2014, 9, 2729)。表面プラズモン共鳴アッセイでは、`I` がミスマッチ配列の PIWIL2 (生殖細胞関連遺伝子) よりもマッチ配列の OCT-3/4 (多能性関連遺伝子) に対する親和性が高いことが示された。ChIP-seq 解析により、`I` を処理した細胞で OCT-3/4 の転写領域が高レベルの H3K14 アセチル化を示した (Fig. 2C)。細胞の長期処理では、21 日でアルカリフォスファターゼ陽性細胞が 0.06%±0.03% の割合で出現し、`I` が部分的なリプログラミングを引き起こしたことが示唆された。次世代シーケンサを用いた解析により、`I` の結合配列のモチーフが明らかになり、より高い配列特異性を持った PIP ( $\beta$ -PIPs) を設計することができた (ChemBioChem. 2014, 15, 2647)。

ヒストンのアセチル化は転写調節において非常に重要で、HAT と HDAC によってアセチル化レベルが維持・調節されている。HDAC を標的とする小分子化合物は数多く知られている一方、HAT を標的とする化合物は数えるほどしかない。HAT によって調節を受けている遺伝子を活性化させるための化学的アプローチとして、我々は SAHA-I と同一の遺伝子群を活性化する化合物 CTB-I を合成した (Fig. 2D)。HDAC 活性測定により、SAHA-I や SAHA とは異なり CTB-I は HDAC 阻害活性を持たないことがわかった。ChIP-seq 解析では `I` の結合配列を含む領域で CTB-I および SAHA-I が同一のアセチル化ピークを示した。したがって、SAHA と CTB という別々の機能を持った化合物が DNA 認識ドメイン `I` と結合することにより同一の細胞活性を得ることを示すことに成功した。この proof-of-concept の合成的戦略は HDAC と HAT の遺伝子発現調節における switchable な機能を評価し、多面的な活性を持つ分子を開発するための分子基盤を提供した (Angew. Chem. Intl. ed., 2015, DOI: 10.1002/anie.201503607)。



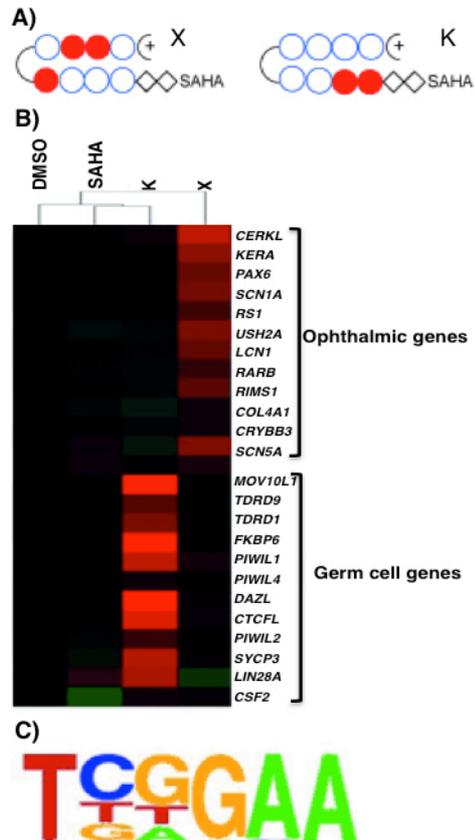
**Figure 2.** (A) `I` 処理 HDF の上流因子解析により、OCT-3/4 パスウェイに属する多能性関連遺伝子の活性化が明らかとなった。(B) `I` 処理 HDF における代表的なコア多能性関連遺伝子の発現強度のクラスタリング解析。SAHA、Pre-I : ネガティブコントロール。201B7-IPS : ポジティブコントロール。(C) OCT-3/4 遺伝子における ChIP-Seq プロファイル。枠内は `I` の結合モチーフ。(D) 化合物処理によって発現上昇 (>5-fold,  $p < 0.05$ ) した遺伝子の数を示したベン図。SAHA-I および CTB-I が共通の遺伝子群を発現上昇させたことがわかる。

CTB と PIP を結合させたナノ粒子ベースの人工転写因子において、我々のコンセプトを拡張することに成功した。ナノスクリプトと呼ばれるこのプラットフォームは軟骨分化のマスター因子 SOX9 を標的として設計された。蛍光イメージングと定量 PCR 法により、このナノスクリプトは間葉系幹細胞で軟骨マーカーの発現を促進することが示された (*J. Am. Chem. Soc.* 2015, 137, 4598)。骨-腱ジャンクションの治療にこのストラテジーが応用される可能性を示唆した。



**Figure 3.** EVI1 がん遺伝子の OFF スイッチ

疾患治療に対して、遺伝子発現調節は活性化だけではなく抑制することも有効な場合がある。ectopic viral integration site 1 (EVI1) は多くの悪性腫瘍で重要な役割を果たしているがん遺伝子である。我々は EVI1 プロモーターの REL/ELK1 結合サイトを標的とする PIP を設計し、この PIP が MDA-MB-231 細胞株で EVI1 遺伝子を抑制して乳がん細胞の移動を抑制することを示した (*Fig. 3*) (*Chem. Biol.* 2014, 21, 1370)。

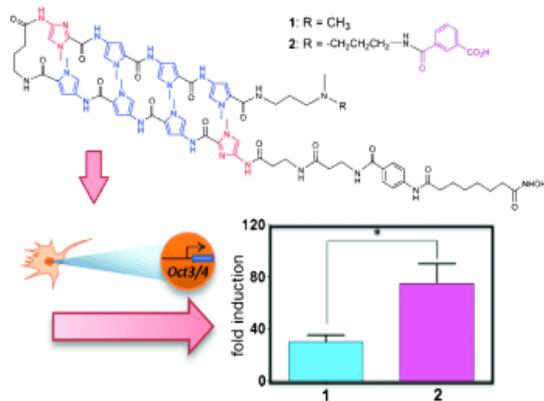


**TCGGAA**

**Figure 4.** (A) SAHA-PIP `X`および`K`の化学構造。(B) 化合物処理細胞で発現上昇した遺伝子群の発現強度ヒートマップ。(C) `X`の結合配列モチーフ。

網膜は中枢神経系の一部であり、網膜剥離、アッシュャー症候群、加齢性黄斑変性(AMD)、網膜色素変性(RP)など、様々な視覚障害に関わる。*CERKL* 遺伝子の欠損はRPの進行の原因になる。我々のスクリーニングにより、SAHA-PIP `X`が*CERKL* 遺伝子やその他の網膜関連遺伝子群(*PAX6*, *RS1*, *USH2A*, *CRYBB3*, *STRA6*)を活性化することが明らかになった(Fig. 4A, B) (ChemBioChem. 2015 doi:10.1002/cbic.201500140)。ChIP解析により得られたモチーフは、SAHA-PIP Xの結合配列(5'-WCGGWW-3')に類似していることが明らかになった(Fig. 4C)。

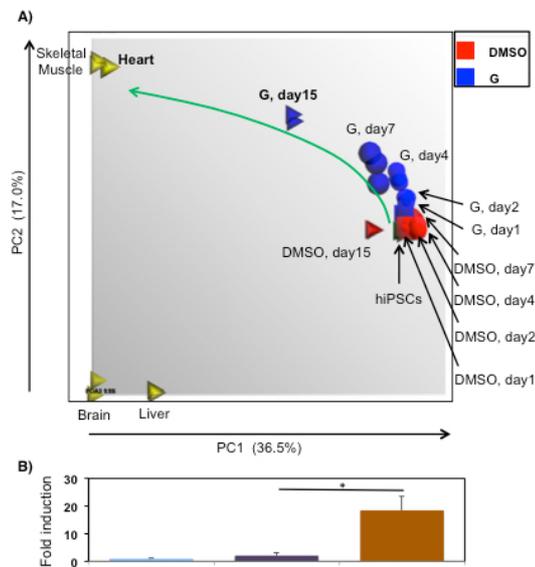
マウス繊維芽細胞において、イソフタル酸(IPA)をPIPのC末端に導入することで`SAHA-2`第二世代のSAHA-PIPを開発した。SAHA-2はオリジナルのSAHA-1と比較して有意( $P < 0.05$ )に遺伝子発現活性が向上した(Fig. 5) (ChemMedChem. 2014, 9, 2374)。現在、ヒト細胞でこの戦略を評価している。



**Figure 5.** PIPのC末端にイソフタル酸(IPA)を導入した第二世代エピジェネティックスイッチ`2`による、遺伝子発現促進活性の向上。

上記の成果に加えて以下の結果も得ており、発表準備中である。PIP コンジュゲートのヒト多能性幹細胞(201B7 iPSC)における効果のスクリーニングを行い、NODAL, LEFTY1, HAS2, PITX2 など、心血管系の分化初期に重要な役割を果たす遺伝子を活性化させる`G`を同定した(Fig. 6A)。また、`H`がMX2、TRIM-5 $\alpha$ 、SAMHD1を含む抗HIV遺伝子ネットワークを活性化させることを見出した(Fig. 6B)。興味深いことに、`H`は血液単球細胞株THP-1においてもその活性を示すことから、AIDSの治療への応用の可能性が考えられた。現在、活性向上を狙った次世代のエピジェネティックスイッチを開発中である。1  $\mu\text{M}$  の

濃度で死細胞50%の細胞毒性を示すSAHAに対し、CTBやそのコンジュゲートは5  $\mu\text{M}$ でも毒性を示さないことから、治療薬への応用が期待される。また、我々はDNAメチル基転移酵素阻害剤のRG-108もPIPに結合させ、評価を行っている。今後は、i) 認識配列の拡張、ii) エピジェネティック調節因子の統合、iii) 化学構造改変による細胞膜透過性の向上に焦点を当てていく予定である。



**Figure 6.** (A) `G`を処理したヒトiPS細胞の遺伝子発現プロファイルの主成分分析(PCA)。`G`処理によって心血管系の細胞系譜の特徴を示したことがわかる。(B) SAHA-PIP HはTHP-1細胞において抗HIV遺伝子MX2遺伝子の発現を上昇させた。

## 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 9 件)

(1) A. Saha, Ganesh N. Pandian *et al.*, Chemically modified synthetic small molecule boosts its biological efficacy against pluripotency genes in mouse fibroblast, *ChemMedChem*, REFEREED 9, 2014, 2374-2380. DOI: 10.1002/cmdc.201402117

(2) Ganesh N. Pandian *et al.*, Identification of a small molecule that turns `ON` the pluripotency gene circuitry in human fibroblasts, *ACS Chem. Biol.* REFEREED 9, 2014, 2729-2736. DOI: 10.1021/cb500724t

(3) Ganesh N. Pandian *et al.*, Alteration of epigenetic program to recover memory and alleviate neurodegeneration: Prospects of multi-target molecules, *Biomater. Sci.*, REFEREED 2, 2014, 1043-1056. DOI: 10.1039/C4BM00068D

(4) J. Syed, Ganesh N. Pandian *et al.*, Targeted suppression of EVI1 oncogene expression by sequence-specific pyrrole-imidazole polyamide, *Chem. Biol.* REFEREED 21, 2014, 1370-1380. DOI: 10.1016/j.chembiol.2014.07.019

(5) C. Anandhakumar, Y. Li, S. Kizaki, Ganesh N. Pandian, *et al.*, Next-generation sequencing studies guide the design of pyrrole-imidazole polyamides with improved binding specificity by the addition of  $\beta$ -alanine, *ChemBioChem*. REFEREED 15, 2014, 2647-2651. DOI: 10.1002/cbic.201402497

(6) S. Patel, T. Pongkulapa, P. Yin, Ganesh N. Pandian, *et al.*, Integrating epigenetic modulators into NanoScript for enhanced chondrogenesis of stem cells, *J. Am. Chem. Soc.*, REFEREED 137, 2015, 4598-4601. DOI: 10.1021/ja511298n

(7) C. Anandhakumar, S. Kizaki, Ganesh N. Pandian *et al.*, Advancing small-molecule-based chemical biology with next-generation sequencing technologies, *ChemBioChem*, REFEREED 16, 2015, 20-38. DOI: 10.1002/cbic.201402556

(8) J. Syed, C. Anandhakumar, Ganesh N. Pandian *et al.*, A synthetic transcriptional activator of genes associated with retina in human dermal fibroblasts, *ChemBioChem.*, REFEREED, 2015, In press. DOI: 10.1002/cbic.201500140

(9) L. Han and Ganesh N. Pandian *et al.*, A synthetic DNA-binding domain guides distinct chromatin-modifying small molecules to activate an identical gene network, *Angew. Chem. Int. Ed.*, REFEREED, 2015, DOI: 10.1002/anie.201503607.

[学会発表] (計 2 件)

(1) Ganesh N. Pandian, S. Sato, H. Le, J. Taniguchi, T. Bando and H. Sugiyama. Transcriptional regulation of silent developmental genes in somatic cells using DNA-based epigenetic switches, July 13-16, Poster presentation in Cell Symposia - Transcriptional regulation in development, 2014, Chicago, USA.

(2) Ganesh N. Pandian, J. Taniguchi, S. Sato, L. Han, S. Junetha, T. Bando and H. Sugiyama. Alteration of global gene expression in human somatic cells using DNA-based epigenetic switches, November 5-7, Poster presentation in ISSCR Regional Forum - Global control of stem cells, 2014, Biopolis, Singapore.

[図書] (計 1 件)

(1) Ganesh N. Pandian, J. Syed and H. Sugiyama, Synthetic strategies to identify and regulate noncoding RNAs in Long Noncoding RNAs: Structure and Function, Springer Japan, First edition, ed. by Riki Kurokawa REFEREED 2015, DOI: 10.1007/978-4-431-55576-6.

[その他]

#### 招待講演

(1) Ganesh N. Pandian, Therapeutic gene modulation using DNA-based transcriptional activators, Asian International Symposium - Medicinal Chemistry in The 95th Annual Meeting of The Chemical Society of Japan, Funabashi, Chiba, Japan, March 26-29. 2015.

#### 講演

(1) Ganesh N. Pandian, Artificial genetic `ON` switch in Rossi Lab, Harvard Medical School, Boston, USA, July 18. 2014.

(2) Ganesh N. Pandian, Bio-inspired genetic switches for therapeutic gene regulation in Ki-Bum lee Lab, Rutgers University, New Jersey, USA, July 21. 2014.

ホームページ等

INSIDE COVER in Biomaterials Science  
<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2014/bm/c4bm90023e#!divAbstract>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

ナマシヴァヤム パンディア  
(NAMASIVAYAM Ganesh Pandian)  
京都大学 物質-細胞統合システム拠点  
(iCeMS) 特定助教  
研究者番号: 20625446

##### (2)研究分担者

杉山 弘 (SUGIYAMA Hiroshi)  
京都大学 理学研究科 教授  
研究者番号: 50183843

板東俊和 (BANDO Toshikazu)  
京都大学 理学研究科 准教授  
研究者番号: 20345284