

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2016～2019
課題番号：16K18913
研究課題名(和文) ヒストン変異癌のケミカルエピジェネティクス：リジンメチル化モジュレータの創製

研究課題名(英文) Chemical epigenetics of histone mutations in cancer: development of lysine methyltransferase modulators

研究代表者
薬師寺 文華 (Yakushiji, Fumika)
北海道大学・薬学研究院・講師

研究者番号：40548476
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では小児脳幹グリオーマドライバ―遺伝子変異 H3K27M に着目し、ヒストン H3K27 メチル化モジュレータの創製を行った。H3K27 メチル化酵素 PRC2 活性促進剤の創製研究では、EED 結合性鎖状ペプチドをもとに構造展開を行なうことで、リード化合物より強力な作用を示す環状ペプチドを獲得した。また、分子内水素結合による配座固定が所望の作用発現に重要であることを見出した。ヒストン H3K27M 機能阻害剤の創製研究では、化合物アレイによるヒストン親和性化合物の探索を行った。親和性を示す化合物を見出したものの、再合成した化合物ではスクリーニング結果を再現することができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒストン H3K27M 変異が報告されて以来、小児脳幹グリオーマの新規治療法開発が盛んに行われており、H3K27 メチル化増加を目的とした脱メチル化酵素阻害剤の探索が主流になっている。一方、申請者は独自のアプローチとして PRC2 活性促進剤および H3K27M 機能阻害剤を見出すことで H3K27 メチル化増加を狙う点を特色としており、エピゲノム創薬分野において高い新規性、独創性を有している。現在細胞評価系でも有効な PRC2 活性促進剤および H3K27M 機能阻害剤は報告例がないことから、新規化学プローブの獲得および新規治療薬創製への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop histone H3K27 methyltransferase modulators with focusing on H3K27M-mutant pediatric gliomas. The project for the study on development of positive modulators of H3K27 methylation, a linear peptide, which has affinity for EED, was structurally optimized and a cyclic peptide derivative that exhibited potent PRC2 activator activity was obtained. The existence of intramolecular hydrogen bonds in the cyclic peptide was suggested to be important for the specific secondary structure inducing the PRC2 stimulation. In addition, we tried to find molecules that have affinity to the histone H3K27M protein by using compound arrays. Some molecules showed affinity to the target protein, however resynthesized compounds did not show avidity to the mutated protein with good reproducibility.

研究分野：ケミカルエピジェネティクス

キーワード：ケミカルエピジェネティクス ヒストンメチル化 ポリコーム抑制複合体2 ヒストン変異

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エピゲノム創薬は、近年産学官連携のもと活発に研究が進められている分野である。特に、ガン細胞におけるエピゲノム変化の詳細な解析は新たな治療戦略につながることから、ドライバー遺伝子変異の同定、続くエピゲノム治療標的に作用する化合物の探索が最先端研究分野となっている。申請者らは、小児脳幹グリオーマのドライバー遺伝子変異であるヒストン H3K27M に着目し、ケミカルエピジェネティクスによる新規治療法の開発を念頭に、新規モジュレータの創製を行うこととした。

ヒストン H3K27M は、手術困難な最悪性型グリオーマのドライバー遺伝子変異として 2012 年に報告され、ヒト ES 細胞を用いた解析より神経幹細胞特異的な増殖亢進が明らかにされている。また、本ヒストン変異はヒストンメチル化酵素 PRC2 阻害作用を有しており、ゲノム全体で H3K27me3 の有意な減少が観察された。これより、H3K27 メチル化増加を念頭においたケミカルエピジェネティクスを目的として、1) ヒストン H3K27 メチル化酵素 PRC2 活性促進剤、2) ヒストン H3K27M 機能阻害剤の創製を試行することで、新規リジンメチル化モジュレータの獲得を目指す。

2. 研究の目的

上記の背景より本研究では、1) ヒストン H3K27 メチル化酵素 PRC2 活性促進剤、2) ヒストン H3K27M 機能阻害剤の創製を試みる。

これまでに細胞内でも効果を示す PRC2 活性促進剤は報告例がないことから、細胞評価系にも適用できる新規 PRC2 活性促進剤の創製を行う。また、見出した化合物をもとに小児脳幹グリオーマの治療薬開発へと展開する。さらに、PRC2 活性促進作用の詳細を解析することで、生物学的新規知見の獲得を目指す。

一残基変異を有するヒストン H3K27M に親和性を有する化合物の獲得はチャレンジングな課題である。ヒストン変異は翻訳後修飾に特異的に影響を与える可能性があることから、検討を重ねることでヒストン変異体の新規創薬標的としての妥当性を検証することができる。また、見出した化合物を化学プローブとして用いることで変異タンパク質の挙動あるいはクロマチン構造変換が与える遺伝子発現への影響を詳細に検討することができ、新たなメカニズムによるエピゲノム医薬品開発研究へとつながることが期待される。

3. 研究の方法

(1) ヒット化合物の探索

① PRC2 活性促進剤の創製研究では、所望の作用を有する化合物の獲得を目指し、生化学的条件下における低分子化合物のスクリーニングを試みる。さらに、EED に結合することでアロステリックに PRC2 ヒストンメチル化を活性化する鎖状ペプチドを基に構造展開を行う。

② ヒストン H3K27M 機能阻害剤の創製では、化合物アレイを用いヒストン H3K27M に親和性を有する化合物の探索を遂行する。理研が有する約 2 万化合物からなる天然化合物ライブラリーに対しスクリーニングを行うことで、ヒット化合物を探索する。

(2) 見出したヒット化合物の構造最適化

上記で見出した化合物とタンパクとの相互作用解析、*in vitro* での PRC2 酵素活性試験、酵素選択性、溶解性、安定性を総合的に評価し、ヒット化合物を選択する。続いて、ヒット化合物の有機化学的手法による再合成、構造活性相関研究へと展開し、構造最適化を行う。

(3) 細胞を用いた評価系での機能評価

構造最適化した PRC2 活性促進剤およびヒストン H3K27M 機能阻害剤がもたらす影響を、細胞を用いた試験により検討する。具体的には、細胞増殖抑制作用、ヒストン H3K27 を中心としたヒストン修飾の抗体検出、定量的 RT-PCR による遺伝子発現解析を行う。

(4) 作用機構解析への展開

同定した化合物をもとに各々のタンパクに対する特異的認識プローブを創製後、ヒストン H3K27 メチル化モジュレータの詳細な作用機構、クロマチン構造への影響を解析することで、クロマチンシグナル伝達への寄与を検討する。

4. 研究成果

(1) ヒストン H3K27 メチル化酵素 PRC2 活性促進剤の創製研究

ヒストン H3K27 メチル化酵素 PRC2 活性促進剤の創製として、低分子化合物ライブラリーに対するスクリーニングを行なったが、再現性の良いヒット化合物を見出すことは出来なかった。そこで、PRC2 構成因子の一つである EED に結合し、ヒストンメチル化をアロステリックに促進する鎖状ペプチドをもとに PRC2 活性促進剤の創製を試みることにした。本鎖状ペプチドにおいて、N-末端および C-末端をそれぞれ短縮することでヒストンメチル化活性促進に必須の残基を見出したのち、環状体へと変換することで物性および生物活性の向上を図った。PRC2 活性促進作用に必須の残基からなる環状ペプチド誘導体は、リード化合物である EED 結合性鎖状ペプチドより強力な PRC2 活性促進作用を示した。また、見出した環状ペプチドの構造解析を行った結果、分子内水素結合が存在することが明らかになった。そこで、分子内水素結合を形成している箇所を NMR により同定した後、N-メチ

ル化することで水素結合を切断したところ、PRC2 活性促進作用が減弱することを確認した。これより、分子内水素結合による環状ペプチドの配座固定が、PRC2 活性促進作用発現に重要であることを見出した。

(2) ヒストン H3K27M 機能阻害剤の創製

ヒストン H3K27M 機能阻害剤の創製研究として、変異ヒストンに親和性を有する化合物の探索を理研化合物アレイを用いたハイスループット法により行った。ヒストン H3K27M に親和性を示す化合物が確認されたため、誘導体化の後いくつかの化合物を用いて示差走査型蛍光定量法 (DSF) や等温滴定型カロリメトリー (ITC) により検討を行なったが、再現性の良い親和性化合物を見出すことは出来なかった。これより、ヒストン H3K27M 機能阻害剤については、別のアプローチによる検討を行うこととした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tokodai, Yasuaki; Yakushiji, Fumika; Sengoku, Toru; Katsuyama, Akira; Ichikawa, Satoshi	4. 巻 1
2. 論文標題 Development of positive modulators of histone H3K27 methylation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Peptide Science	6. 最初と最後の頁 14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 戸子臺泰光、薬師寺文華、市川聡
2. 発表標題 PRC2アロステリックアクティベーターの創製研究
3. 学会等名 日本薬学会北海道支部第145回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 薬師寺文華、戸子臺泰光、市川聡
2. 発表標題 ヒストン H3K27 メチル化モジュレーターの創製研究
3. 学会等名 第12回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 薬師寺文華、戸子臺泰光、市川聡
2. 発表標題 ペプチドを基盤としたヒストン H3K27 メチル化モジュレーターの創製研究
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第 13 回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuaki Tokodai, Fumika Yakushiji, Toru Sengoku, Akira Katsuyama, Satoshi Ichikawa
2. 発表標題 Development of positive modulators of histone H3K27 methylation
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戸子臺泰光、薬師寺文華、仙谷徹、勝山彬、市川聡
2. 発表標題 ヒストンH3K27メチル化酵素複合体PRC2活性化剤の創製研究
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----