

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19572

研究課題名(和文) 消化器癌を誘導する重要なエピゲノム変異に対し領域選択的に作用する阻害剤の開発

研究課題名(英文) Development of region-specific inhibitors against epigenomic aberrations critical for gastrointestinal tumorigenesis

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：エピゲノム阻害剤を、特定のDNA塩基配列を認識し結合する中分子PIポリアミドと縮合した中分子化合物を合成した。阻害剤親分子を癌細胞株に投与した場合と比較して、縮合剤を投与した場合、PIポリアミドが認識・結合する特定塩基配列が有意に多く含まれるゲノム領域に、より顕著にエピゲノム変化が認められた。PIポリアミドを用いて領域選択的に作用するエピゲノム阻害剤の開発は可能であり、さらに構造を簡素化したPIポリアミド縮合化合物を合成し、また胃癌や前立腺癌をモデルに癌で重要なエピゲノム異常に対してその領域を標的とするPIポリアミドを合成している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピゲノムとは細胞のゲノムの修飾物のことで、どの遺伝子を使いどの遺伝子を使わないか、つまりは細胞の運命や振舞いを決定する働きを持ち、その異常は癌の重要な原因の1つとなる。しかし現状のエピゲノム阻害剤は、癌の原因となっている異常修飾領域だけでなく、正常な細胞に存在する重要な修飾も含めてゲノム全体で作用してしまうことで副作用が問題となる。本研究は、特定の塩基配列を含む選択的なゲノム領域のみエピゲノム阻害剤が作用することを可能にする化合物開発に挑戦し、技術的に成功するとともに、次の発展を目指し胃癌・前立腺癌などで重要なエピゲノム異常を標的とする化合物開発へと進行している。

研究成果の概要(英文)：Taking advantage by utilizing small molecules that bind to DNA by sequence-specific manner, we develop middle molecule compounds that can rewrite the accumulated epigenomic aberrations or prevent their accumulations in targeted genomic regions. Pyrrole-imidazole (PI) polyamides are cell-permeable and intravenously injectable molecules with low toxicity that can bind to the minor groove of DNA by sequence-specific manner. Epigenetic inhibitors are conjugated to PI polyamides, and delivered to the targeted genomic regions by sequence-specific manner when given to cultured cancer cells. We established PI polyamides conjugated with epigenetic inhibitors that altered epigenome at selected regions. We also identified critical aberrant epigenomic alterations that were seen in cancer e.g. gastric and prostate cancer and could be candidate regions targeted by these conjugates.

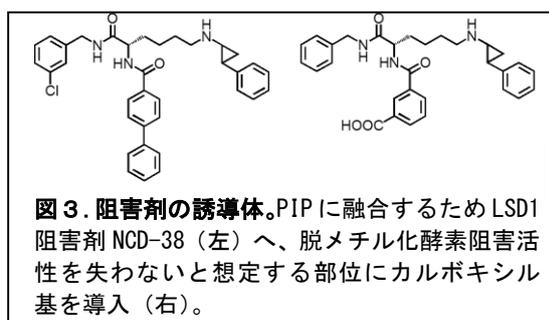
研究分野：癌エピジェネティクス

キーワード：癌 エピジェネティクス 阻害剤 PIポリアミド

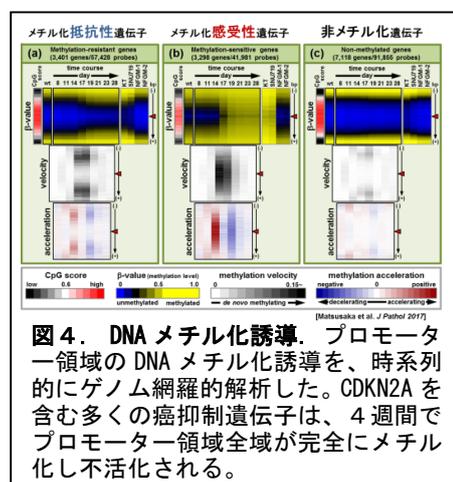
ゲノム全体に作用する薬剤であり、阻害効果が過多となる一方その効能は限定的である。本研究では、この問題点を解決する手段として DNA 配列認識能を有する PI ポリアミドを阻害剤に融合させ、ポリアミドが認識する DNA 配列に阻害剤をリクルートさせる。発癌ドライバーとなるエピゲノム変異領域に対して、特定のデリバリーを要さず細胞内、核内へ移行し塩基配列特異的に DNA に認識・結合する小分子を応用して、領域選択的にエピゲノムを制御しうる薬剤開発に挑戦し、癌治療・予防につながる新規エピゲノム治療の基盤を確立する。

3. 研究の方法

研究協力者の鈴木が提供する LSD1 阻害薬などエピゲノム関連酵素に対する阻害剤を本研究では用いる。そのうちの 1 つ NCD38 は、遺伝子を不活化するヒストン H3K4 脱メチル化に対し、脱メチル化を阻害しヒストン活性化マークを保つ阻害剤である。PI ポリアミドとの縮合反応ができるようカルボキシル基などを導入した誘導体を作成する(図 3)。作成したプロトタイプ分子の HDM 阻害活性をヒストン脱メチル化酵素アッセイキット(Cayman Chemical 社, #700400)を用いて研究協力者の篠原が *in vitro* での評価を行い、親分子の阻害活性と比較して融合分子の活性阻害能に大きな差が出ないことを確認し、研究協力者の根本が 4~6 塩基の PI ポリアミドと縮合してプロトタイプ化合物を合成する。申請者らは癌細胞株にプロトタイプ分子の投与を行い、WST-8 assay で細胞毒性を測定し NCD-38 と比較評価し、またヒストン修飾変化を ChIP-seq 法にて、遺伝子発現変化を RNA-seq 法にて評価する。阻害剤親分子がゲノムワイドに活性化するのに対し、PI ポリアミドを縮合した開発化合物が、PI ポリアミドが認識する塩基配列が豊富な領域で選択的に活性化作用が認められるか検証する。さらに、PI ポリアミドを縮合するエピゲノム阻害剤について、リンカーの修正や構造の簡素化など、化合物の修正を加えて同様に細胞株投与にて検証する。



次に開発化合物の標的となりうるエピゲノム異常領域を同定する目的で、*in vitro* モデルを用いて網羅的なエピゲノム解析を行う。胃癌においては、エピゲノム異常が多いことで知られる EBV 陽性胃癌サブタイプにおける重要なエピゲノム異常を同定するため、*in vitro* EBV 感染システムを用いて解析する。臨床 EBV 胃癌に認められるエピゲノム変化を *in vitro* に胃上皮細胞に誘導し、時系列的に細胞を回収して、ダイナミックに変化するヒストン修飾、DNA メチル化、遺伝子発現を時系列的、網羅的に解析する(図 4)。プロモーター領域、エンハンサー領域など、発癌に関わる重要な遺伝子の発現を調節する領域におけるエピゲノム変化と、特に転写因子の認識モチーフなど、エピゲノム変化領域において標的となり得る有望な候補配列を同定する。胃癌以外の腫瘍についても、例えば前立腺癌についてはホルモン治療感受性の前立腺癌細胞株と、ホルモン治療抵抗性を獲得した前立腺癌細胞株について同様にエピゲノムと遺伝子発現の網羅的解析を行い、重要なエピゲノム変化領域とその配列特異性を同定する。



In vitro モデルの解析で同定した特異的塩基配列に対して、特異的に認識する PI ポリアミドをデザイン・合成し、上述のプロトタイプ化合物合成法によりヒストン脱メチル化酵素との融合を行いシース化合物を合成・開発する。

4. 研究成果

LSD1 阻害薬に対してカルボキシル基を導入した誘導体に対し、4 塩基型 PI ポリアミドに 2 分子のベータアラニンをはさんで縮合したプロトタイプを作成した。ヒストン脱メチル化酵素ア

ッセイキットを用いて in vitro での阻害活性評価を行い、縮合分子は親分子 NCD38 と同等の阻害活性を持っていることを確認した。このプロトタイプ化合物を、癌細胞株に投与してエピゲノム阻害効果を検証した。ヒストン修飾に対する ChIP-seq 解析、および遺伝子発現に対する RNA-seq 解析を行い、親分子である NCD38 を投与した場合と比較した。

NCD38 を投与した際にはプロモーター領域を中心に GC-rich な配列を比較的豊富に含むゲノム領域がエピゲノム変化し活性化されていた。活性化領域周囲に含まれる 6 塩基の配列をカウントすると、SSSSSS など GC-rich な配列が、WWWWWW や WWCWW など配列よりも有意に多く含まれていた (S = G or C. W = A or T.) (図 5 上)。

そこで WWWWWW 配列あるいは WWCWW 配列に特異的に結合すると予想されるプロトタイプ分子を合成し癌細胞株に投与すると、その活性化領域は親分子とは異なっていた。WWWWWW 配列を認識すると予想された NCD38-β2P4 を投与した場合、活性化領域周囲の配列に含まれる 6 塩基配列をカウントすると、SSSSSS など GC-rich な配列は有意に少なくなり、WWWWWW など AT-rich な配列が有意に多く含まれていた (図 5 下)。同様に、WWCWW 配列を認識すると予想される NCD38-β2PIPP を投与した場合、活性化領域周囲に含まれる 6 塩基配列は、同様に SSSSSS など GC-rich な配列は有意に少なくなり、融合分子が標的とする WWCWW 配列は逆に有意に多く含まれていた。

それぞれの分子が認識すると予想された WWWWWW、WWCWW への配列特異的な結合も、オリゴ DNA を用いたゲルシフトアッセイで検証し確認した。すなわち、ヒストン修飾阻害剤 NCD38 を、塩基配列特異的に誘導し領域特異的にヒストン修飾を改変することが可能であることを証明し (学会発表 1, 2, 4, 6, 7)、その生物学的なエピゲノム阻害効果と [Alagarwamy ら, *Oncotarget*, 2018]、その化学的な合成手法について [Qin ら, *Heterocycles*, 2019]、論文にて成果報告した。

化合物の改変として、エピゲノム阻害剤の構造簡素化に着手した。まず、領域特異的なエピゲノム改変に成功した LSD1 阻害剤 NCD38 について、その構造を極端に簡素化し、同様に WWWWWW 認識、および WWCWW 認識となるプロトタイプ化合物を合成した (図 6)。同様に、ヒストンをアセチル化して活性化させることが知られるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 MS275 についても、その構造を同様の着想で簡素化し、PI ポリアミドを縮合してプロトタイプ化合物を合成した。そのどちらにおいても、癌細胞株に投与しエピゲノム変化を網羅的に同定し、配列特異的な効果を検証して学会発表し (発表 3, 8, 9)、現在論文を執筆中である。

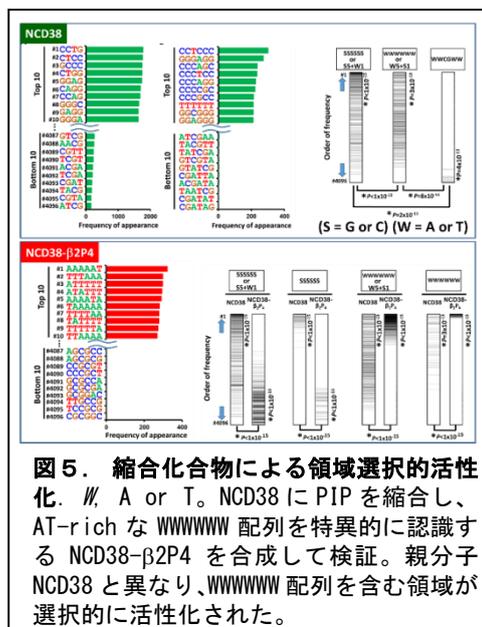


図 5. 縮合化合物による領域選択的活性化。// A or T. NCD38 に PIP を縮合し、AT-rich な WWWWWW 配列を特異的に認識する NCD38-β2P4 を合成して検証。親分子 NCD38 と異なり、WWWWWW 配列を含む領域が選択的に活性化された。

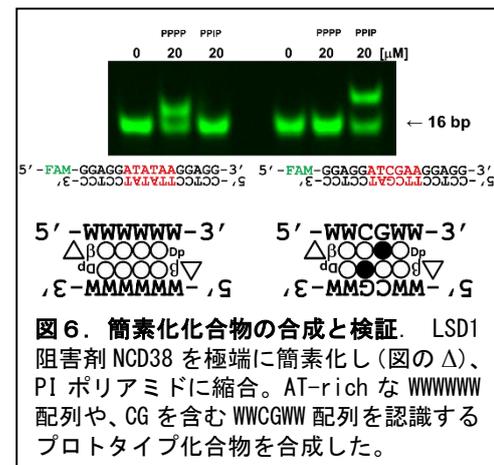


図 6. 簡素化化合物の合成と検証。LSD1 阻害剤 NCD38 を極端に簡素化し (図の Δ)、PI ポリアミドに縮合。AT-rich な WWWWWW 配列や、CG を含む WWCWW 配列を認識するプロトタイプ化合物を合成した。

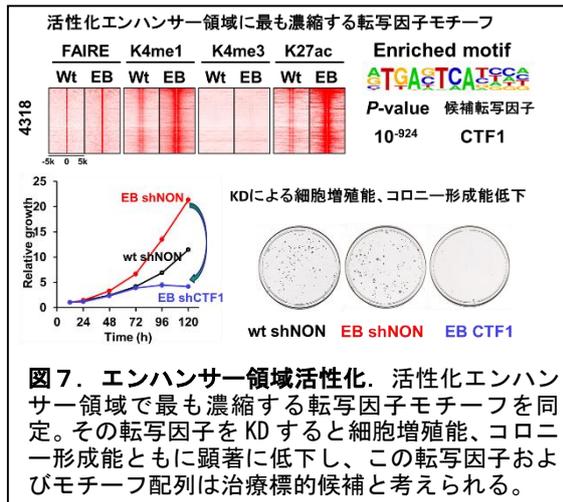
これら開発した領域特異的なエピゲノム阻害剤の有効な標的領域を同定する目的で、2つのモデルで重要なエピゲノム異常領域の同定を行った。1つは EBV 陽性胃癌であり、胃上皮細胞に EBV を in vitro 感染することで、臨床 EBV 陽性胃癌標本に認めるエピゲノム異常を実際に EBV 感染した前後で時系列的に解析し、誘導されるエピゲノム異常領域を同定した。ウイルス感染前後のヒストン修飾変化およびオープンクロマチン領域の変化を ChIP-seq 法および FAIRE-seq 法を用いて網羅的に解析したところ、エピゲノム変化はプロモーター領域だけでなくエンハンサー領域に広く及んだ。プロモーター領域は重要な癌抑制遺伝子や接着関連因子が、ヒストンの活性化マークを失って不活化するとともに DNA メチル化を獲得して、遺伝子発現が強く抑制されていた。それに対しエンハンサー領域では、上皮細胞分化や細胞増殖抑制に関連する遺伝子群がヒストン活性化マークを失うことで不活化され、逆に細胞増殖促進に関連する遺伝子群がヒストン活性化マークが新たに入ることによって活性化されるなど、DNA メチル化を伴わずにヒストン修飾変化のみで顕著に変化し、細胞状態も発癌へ向けて大きく変化していた。エピゲノム変化は、活

活性化エンハンサーも不活化エンハンサーも一定のモチーフ配列の濃縮が見られた (図7)。これらのモチーフ配列を認識する転写因子の中で、実際にEBV感染した胃上皮細胞で発現上昇する転写因子に着目し、その転写因子をノックダウンすると細胞増殖能やコロニー形成能は低下し、転写因子結合領域におけるヒストン修飾変化は減弱し、発癌に重要と考えられる下流標的遺伝子の発現も有意に変化していた (学会発表 5)。

もう1つは、前立腺癌における去勢抵抗性モデルである。ホルモン治療感受性の前立腺細胞株である LNCaP と、ホルモン治療抵抗性を獲得した LNCaP に由来する細胞株 LNCaP95 について、網羅的にエピゲノム解析および遺伝子発現解析を行い重要なエピゲノム変化領域を検証した。その結果、LNCaP95 において特異的に活性化し、LNCaP95 の細胞増殖に重要な役割を果たす遺伝子群を同定し、またそれらを活性化する遺伝子エンハンサー領域で特異的に濃縮する塩基配列を同定した (学会発表 11, 12, 13, 14)。

これらの成果について論文執筆中であり、同定した重要なモチーフ配列を認識する PI ポリアミドを合成した。現在、塩基配列特異的な結合についてオリゴDNAを用いたゲルシフトアッセイにて検証中であり、検証後に癌細胞株への投与へと進めて行く。

以上、本研究ではヒストン修飾酵素阻害薬をPIポリアミドと縮合し、領域特異的なヒストン修飾介入に成功するとともに、開発化合物の簡素化など構造改良と、胃癌、前立腺癌をモデルに癌化に重要なエピゲノム変化領域を特異的に制御する化合物開発へと発展中である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Alagarswamy K, Shinohara K, Takayanagi S, Fukuyo M, Okabe A, Rahmutulla B, Yoda N, Qin R, Shiga N, Sugiura M, Sato H, Kita K, Suzuki T, Nemoto T, Kaneda A.	4. 巻 9
2. 論文標題 Region-specific alteration of histone modification by LSD1 inhibitor conjugated with pyrrole-imidazole polyamide.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 29316-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.18632/oncotarget.25451	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Qin R, Takayanagi S, Kondo Y, Li J, Shiga N, Nakajima M, Shinohara K, Yoda N, Suzuki T, Kaneda A, and Nemoto T	4. 巻 99
2. 論文標題 Synthesis of LSD1 Inhibitor-Pyrrole-Imidazole Polyamide Conjugates for Region-Specific Alterations of Histone Modification.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heterocycles	6. 最初と最後の頁 891-905
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） DOI: 10.3987/COM-18-S(F)57	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 2件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kokiladevi Alagarswamy, Ken-ichi Shinohara, Shihori Takayanagi, Masaki Fukuyo, Atsushi Okabe, Bahityar Rahmutulla, Natsumi Yoda, Rui Qin, Naoki Shiga, Kazuko Kita, Takayoshi Suzuki, Tetsuhiro Nemoto, Atsushi Kaneda.
2. 発表標題 LSD1 Inhibitor Conjugated with PI Polyamide Enhances Region Specific Activation of Genomic Regions.
3. 学会等名 Vanderbilt-Ingram Cancer Center Annual Scientific Retreat（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠原憲一, 依田夏美, 覃 睿, 福世真樹, 岡部篤史, Alagarswamy Kokiladevi, 仲野駿一, 鈴木孝禎, 根本哲宏, 金田篤志.
2. 発表標題 癌エピゲノム異常の制御を目指した塩基配列選択的DNA結合小分子の開発.
3. 学会等名 第27回日本癌病態治療研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 依田夏美, 篠原憲一, 岡部篤史, 根本哲宏, 福世真樹, 喜多和子, 金田篤志.
2. 発表標題 DNA結合小分子とLSD1阻害剤の融合化合物による新規エピゲノム標的薬剤の開発.
3. 学会等名 平成 30年度関東研究医養成コンソーシアム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 篠原憲一, 依田夏美, 福世真樹, 岡部篤史, Kokiladevi Alagarswamy, Bahityar Rahmutulla, 覃 睿, 中島誠也, 喜多和子, 鈴木孝禎, 根本哲宏, 金田篤志.
2. 発表標題 DNA結合小分子を応用した領域選択的エピゲノム制御概念の開発.
3. 学会等名 第41回分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wenzhe Li, Atsushi Okabe, Keisuke Matsusaka, Rahmutulla Bahityar, Masaki Fukuyo, Atsushi Kaneda.
2. 発表標題 Increased expression of tumor related genes by histone modification alteration at enhancer regions in GC cells with Epstein-Barr virus infection.
3. 学会等名 The 41st Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Rui Qin, 高柳志穂理, 滋賀直樹, Kokiladevi Alagarswamy, 篠原憲一, 鈴木孝禎, 金田篤志, 根本哲宏.
2. 発表標題 PIP-LSD1選択的阻害剤ハイブリッド分子の合成と機能評価.
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 篠原憲一、依田夏美、Qin R、福世真樹、岡部篤史、中島誠也、鈴木孝禎、Rahmutulla B、根本哲弘、金田篤志
2. 発表標題 がんエピゲノム異常に焦点を当てた塩基配列選択的DNA結合小分子の開発
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Martin Lackner, Ken-ichi Shinohara, Atsushi Okabe, Masaki Fukuyo, Rui Qin, Masaya Nakajima, Bahityar Rahmutulla, Eriko Ikeda, Nemoto Tetsuhiro, Atsushi Kaneda
2. 発表標題 Region-selective alteration of histone modification using novel conjugates between Py-Im-polyamides and inhibitor of epigenome-related enzymes
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Martin Lackner, Ken-ichi Shinohara, Atsushi Okabe, Masaki Fukuyo, Rui Qin, Masaya Nakajima, Bahityar Rahmutulla, Nemoto Tetsuhiro, Atsushi Kaneda
2. 発表標題 How do MS-275-PIP Conjugates Affect the Epigenome?
3. 学会等名 6th International Cancer Epigenomics Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 池田英里子、喜多和子、井上貴登、松田和暁、宮崎柊子、竹野有加里、新宅敬彦、依田夏美、丸山陽佳、福世真樹、篠原憲一、松坂恵介、根本哲宏、金田篤志
2. 発表標題 新規化学合成化合物によるp53依存的抗がん作用
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsushi Kaneda, Masahiro Sugiura, Hiroaki Sato, Manato Kanesata, Atsushi Okabe, Masaki Fukuyo, Tomohiko Ichikawa
2. 発表標題 Identification of critical AR-V7 downstream targets and aberrant super-enhancer regulation in castration resistant prostate cancer
3. 学会等名 Tohoku Forum for Creativity Thematic Program 2019 “Cancer Etiology” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金坂学斗、佐藤広明、杉浦正洋、岡部篤史、福世真樹、坂本信一、小宮顕、市川智彦、金田篤志
2. 発表標題 Differences between castration sensitive and resistant prostate cancer in response to hypoxia
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sato A, Sugiura M, Okabe A, Fukuyo M, Kanesaka M, Sakamoto S, Komiya A, Ichikawa T, Kaneda A
2. 発表標題 Aberrant AR-independent super-enhancer activation in castration resistant prostate cancer
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金田篤志、杉浦正洋、佐藤広明、岡部篤史、福世真樹、金坂学斗、市川智彦
2. 発表標題 前立腺癌の去勢治療抵抗性獲得におけるエピジェネティック機構
3. 学会等名 第5回がんゲノム・エピゲノム研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

千葉大学大学院医学研究院分子腫瘍学HP
<http://www.m.chiba-u.ac.jp/class/moloncology/>

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
研究協力者	根本 哲宏 (Nemoto Tetsuhiro)		
研究協力者	篠原 憲一 (Shinohara Ken-ichi)		
研究協力者	鈴木 孝禎 (Suzuki Takayoshi)		