

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25560227

研究課題名(和文)クロマチン構造制御によるエピゲノム創薬の創製

研究課題名(英文)Epigenetic therapy by artificial chromatin remodeling

研究代表者

川上 浩良(Kawakami, Hiroyoshi)

首都大学東京・都市環境科学研究科・教授

研究者番号：10221897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、先ずクロマチンの構造制御を支配するDNAメチル化とヒストン修飾を工学的手法で行うことにより、新しい遺伝子工学に基づくエピゲノム創薬の創製を目指した。具体的には、エピジェネティクス的な修飾を工学的に制御するため、エピジェネティクス修飾酵素を発現するプラスミドDNAと、当該修飾の逆反応を行う酵素の阻害剤を同時封入可能な新規生分解性ナノ粒子(エピジェネティクスコントロール(EpC)キャリア)によるエピジェネティクス修飾制御法を提案し合成した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have designed epigenetics control carrier (EpC carrier) as a novel method to control histone acetylation by the synergistic effect of gene transfection and inhibitors (Fig. 1B). If we could establish the method, it is expected that control for cell differentiation and treatment of diseases will become possible by returning to original state of the epigenome. The resulting epigenetics engineering can be a treatment of intractable diseases. We demonstrated that EpC carrier enhances the acetylation amount and the cell differentiation ratio by the synergistic effect and the biodegradability.

研究分野：生体材料学

キーワード：エピジェネティクス ジェネティクス クロマチン エピゲノム創薬 細胞分化治療

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムの解読により疾患因子の遺伝的理解は着実に進歩したが、同時に疾患の多くは後天的環境因子の影響を強く受けるため、従来型ゲノム治療法の限界も示された。エピゲノムは DNA 塩基配列によらずに遺伝子発現を制御でき、細胞の分化・脱分化、増殖、老化等に深く関わり、環境因子との相関も強く、細胞分裂後もその機能が維持されるという特徴を有している。特に、ガンや慢性疾患には後天的な遺伝子発現であるエピゲノム異常が強く関与していることを考えると、エピゲノムを人為的に制御できれば全く新しい治療法が確立できる。さらにエピゲノムは、胚発生・分化、組織幹細胞の分化の制御にも必須の機構であり、再生医療や細胞治療としても極めて有望な技術となる。

エピゲノムに異常が起きると様々な疾患が引き起こされるが、その代表的な疾患の1つがガンである。DNA メチル化異常による遺伝子変異、ガン抑制遺伝子の不活化、細胞周期異常を引き起こすことが知られている。糖尿病においても、ヒストン 3 の 9 番目のリジンのメチル化、脱メチル化が疾患に強く関与していることが示され、エピゲノム異常が遺伝子の低転写、それに伴う慢性的炎症、非可逆的な遺伝子の低発現を誘発することが明らかになっている。

本研究では、エピゲノムを支配する DNA メチル化とヒストン修飾により誘導されるクロマチン構造の制御を人為的に行うことにより、革新的な遺伝子発現制御を目指したエピゲノム創薬の開発を目指した。

2. 研究の目的

エピゲノムの転写は、クロマチン構造(ヘテロクロマチン構造(転写 OFF))とユークロマチン構造(転写 ON))により決まる。つまり従来の遺伝子治療とは全く異なり、塩基配列を伴わずにクロマチン構造を人為的に制御することにより遺伝子操作が可能となる。

本研究では、それらを可能にするエピジェネティクスコントロール(EpC)キャリアを合成、このような新しい遺伝子操作によるエピゲノムの効果を細胞系で評価し、その結果を基に将来的には動物実験系への展開を試みる。特に、細胞の分化・脱分化を利用した新しい治療法に関わる成果に期待した。

3. 研究の方法

EpC キャリアは、ポリ乳酸(PLA)・カチオン性脂質・プラスミド DNA・阻害剤を用いて調製した。ヒストンアセチル化を制御する際には、ヒストンアセチル化酵素(CAF)をコードしたプラスミド DNA とヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A(TSA)を使用した。ヒストンアセチル化とヒストンメチル化を同時制御する際には、ヒス

トンメチル化酵素(MLL5)をコードしたプラスミドと TSA を用いた。次に、EpC キャリアを投与したヒト骨髄性白血病細胞(HL60)細胞におけるヒストン修飾評価は、ウエスタンブロット法により行った。顆粒球への分化率評価は NBT 染色および FACS 解析により行った。

4. 研究成果

EpC キャリアを添加した細胞は、コントロールと比較してアセチル化ヒストン量が著しく増大した。同様に、MLL5 と TSA を封入した EpC キャリアを添加した場合には、コントロールと比較してアセチル化量、メチル化量ともに上昇していた。以上の結果から EpC キャリアにより単一のエピジェネティクス修飾を強力に制御することや複数の修飾を同時に制御することが可能であることが示された。

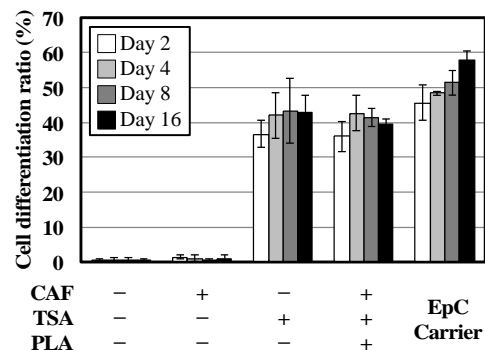


図1 EpC キャリアの細胞分化率の結果
HL60 における CAF と TSA の効果

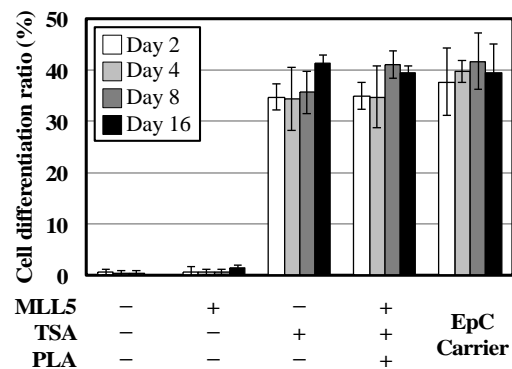


図2 EpC キャリアの細胞分化率の効果
HL60 における MLL5 と TSA の効果

さらに、EpC キャリアを投与した細胞は、コントロールの細胞よりも高い分化率を示した(図1)。特に、日数を追うごとに分化率が向上していた。この結果は、EpC キャリアの持つ生分解性により薬剤が徐放されることによると考えられる。さらに、この徐放作用は細胞の生存率にも影響を与えており、EpC キャリアを添加した細胞は、薬剤を単独

で添加した場合よりも高い生存率を示した。
最後に、MLL5 と TSA を封入した EpC キャリアを添加した HL60 の顆粒球への分化率を評価した(図2)。EpC キャリアを添加した細胞は、分化は確認されたが、薬剤を単独で添加した場合よりも有意な向上は認められなかった。

以上の結果より、CAF と TSA を添加した場合には、TSA が HDAC3 を含む種々の HDAC を阻害することと CAF によるアセチル化が相乗的に機能することで分化率の向上につながったと考えられる。一方、MLL5 と TSA を添加した細胞では、TSA の効果が支配的であり、MLL5 との相乗効果は認められなかった。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計4件)

- (1) 小鯖 翔, 浅羽 祐太郎, 朝山 章一郎, 川上 浩良, 人工的クロマチン構造制御による細胞分化治療, 第 52 回人工臓器学会, 2014 年 10 月 17 日-19 日, (京王プラザホテル札幌(北海道))
- (2) 浅羽 祐太郎, 朝山 章一郎, 中林 一彦, 川上 浩良, 生分解性エピジェネティクスコントロールキャリアによる細胞分化制御, 第 43 回医用高分子シンポジウム, 2014 年 7 月 28 日-29 日, (産業技術総合研究所 臨海副都心センター(東京))
- (3) 草津 舞, 浅羽 祐太郎, 中林 一彦, 朝山 章一郎, 川上 浩良, 生分解性ナノ粒子/DNA 複合体によるエピジェネティクス制御, 第 63 回高分子学会年次大会, 2014 年 5 月 28 日-30 日, (名古屋国際会議場(愛知))
- (4) 浅羽 祐太郎, 草津 舞, 中林 一彦, 朝山 章一郎, 川上 浩良, リポソーム被覆型エピジェネティクスコントロールキャリアによるヒストン修飾制御と細胞分化誘導, 第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2014 年 5 月 25 日-27 日, (東京大学, 伊藤国際学術研究センター(東京))

〔図書〕(計1件)

- (1) 川上 浩良, 化学工業, エピジェネティクス工学に基づく新しい遺伝子操作・治療, 2014, pp.35-41

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

名称: クロマチン構造制御剤

発明者: 川上浩良、朝山章一郎、小鯖翔、浅羽祐太郎、野口太甫、大内みさき、草津舞
権利者(出願人): 公立大学法人首都大学東京

種類: 特許

番号: 特願 2015-024352

出願年月日: 2015/2/10 (優先出願日: 2014/2/10)

国内外の別: 日本

名称: 抗酸化機能を有するエピジェネティックコントロールキャリアによる慢性閉塞性肺疾患(COPD)

発明者: 川上浩良、朝山章一郎、山口翔平、松帆志幸

権利者(出願人): 公立大学法人首都大学東京

種類: 特許

番号: 特願 2015-001502

出願年月日: 2015/1/7

国内外の別: 日本

名称: クロマチン構造を制御する組成物

発明者: 川上浩良、朝山章一郎、碓健一、浅羽祐太郎、野口太甫

権利者(出願人): 公立大学法人首都大学東京

種類: 特許

番号: 特願 2014-512738

出願年月日: 2013/4/24 (優先出願日: 2012/4/24)

国内外の別: 日本

〔その他〕

URL: <http://www.comp.tmu.ac.jp/kawakami-labn/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川上 浩良 (KAWAKAMI,Hiroyoshi)

首都大学東京・都市環境科学研究科・教授

研究者番号 : 10221897