

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：34204

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640093

研究課題名(和文)クロマチン介在性抗がん剤耐性機構に基づく新たな分子標的治療の試み

研究課題名(英文)Development of drug-resistance-overcoming agents targeting histone demethylase JARID1A

研究代表者

水上 民夫(Tamio, Mizukami)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：80367896

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)：最近、抗がん剤耐性の新規原因分子として、ヒストン脱メチル化酵素JARID1Aが同定された。本研究では、新規な抗がん剤耐性克服剤の開発を目的として、JARID1A阻害剤の同定とそれらが開発コンセプトに合致した薬理活性をもつことの証明を課題とした。組換えJARID1Aを用いて32914種の化合物を検索し、291種のヒット化合物を得た。さらに、標的遺伝子の発現レポーター細胞を構築し、ヒット化合物を調査したところ、有効な化合物を35種取得した。今後、JARID1Aの発現により樹立したGefitinib耐性細胞を用いて、耐性克服剤開発のリード化合物としての価値を評価する予定である。

研究成果の概要(英文)：Histone lysine methylation status is well controlled by histone lysine-specific methyltransferases and demethylases. This control plays a crucial role in the epigenetic gene expression and is frequently involved in cell proliferation and survival in cancer. JARID1A is a histone demethylase whose substrates are H3K4me2/me3. JARID1A has been reported as a drug-resistance-causing molecule in 2010; overexpression of JARID1A allowed cancer cells to acquire drug resistance, whereas knockdown of JARID1A expression by RNA interference sensitized drug resistance. These results suggest that JARID1A is an interesting drug discovery target for drug-resistance-overcoming agents. In this study, we attempted to develop JARID1A inhibitors as epigenomic drugs that have drug-resistance-overcoming activity.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

抗がん剤治療は、分子標的抗がん剤の登場により大きく進展したが、抗がん剤耐性の発現は、依然として臨床現場で極めて重要な問題である。2010年にクロマチンが介在するエピジェネティックなメカニズムに基づき、Gefitinibを含む多くの分子標的薬剤やCisplatin等の多種多様な抗がん剤に対してがん細胞に耐性形質を与える分子として、ヒストン脱メチル化酵素(HDM)活性をもつJARID1Aが同定された(Cell 141, 69, 2010)。最近、抗がん剤耐性がん幹細胞の存在に起因するとの仮説が、広く支持され始めているが、JARID1Aはその重要な原因分子である可能性も示唆されている。JARID1Aの過剰発現が薬剤耐性を誘導する分子機構は不明であるが、ヒストンH3の4番目のリシン残基のメチル化状態が遺伝子の転写と相関すること、そしてJARID1Aがこのリシンのメチル化状態を制御する酵素(トリメチル化及びジメチル化したリシン残基を脱メチル化する)であることから、JARID1Aの作用により薬剤耐性化に関わる未知の遺伝子の発現が制御されていると予想される。このようにJARID1Aは抗がん剤耐性克服剤の創薬標的として、斬新性が高く、極めて魅力的であるが、これまでJARID1A阻害剤開発の報告はない。

2. 研究の目的

申請者らはこれまでに、エピゲノム創薬を目指して、LSD1、GASC1などのがん化に関わる多種のHDMの酵素アッセイ系を確立し、阻害剤探索を展開することにより、多様な阻害剤を創製してきた(Ueda et al. J. Am. Chem. Soc. 131, 17536, 2009; Hamada et al. J. Med. Chem. 53, 5629, 2010; Ogasawara et al. Bioorg. Med. Chem. 19, 3702, 2011)。

今回、JARID1Aの酵素アッセイ系を新たに構築し、阻害剤探索を行った結果、ヒドロキサム酸誘導体がJARID1Aの酵素活性を阻害することを発見した。

本申請研究では、本化合物が開発コンセプトに合致した薬理活性をもつことを証明[POC (Proof of Concept)]し、さらに多数の化合物からなるライブラリーをソースとするランダムスクリーニングにより、あらたな阻害構造ファルマコフォアを同定することにより、全く新規な作用メカニズムを有する抗がん剤耐性克服剤の開発を目指す。

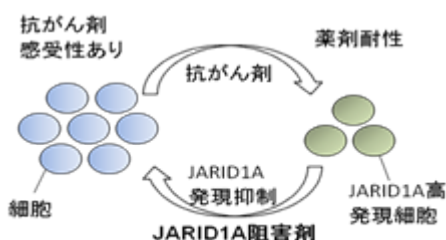


図1. 本申請の概念図

3. 研究の方法

(1) 抗がん剤耐性克服剤のPOC評価系の構築

JARID1A過剰発現による抗がん剤耐性株の樹立

分子標的抗がん剤Gefitinibに感受性を示すヒト肺がん細胞株PC9にFLAGタグ付JARID1Aの発現ベクターを導入することにより、安定形質転換株を樹立し、Gefitinibへの耐性の獲得の有無を調べる。

JARID1A阻害剤の細胞レベル脱メチル化阻害活性の評価系の構築

上記のFLAGタグ付JARID1Aの発現ベクターをPC9に一過的に導入・発現し、H3K4のme2を認識する抗体を用いた細胞免疫染色法にてJARID1Aの脱メチル活性の亢進を確認する。

薬効バイオマーカーとしてのJARID1A標的遺伝子の同定

JARID1A過剰発現により惹起されたGefitinib耐性株において、親株に比べて発現が亢進または低下する遺伝子をマイクロアレイ法によりゲノムワイドに同定する。耐性株において、発現亢進遺伝子の場合はRNA干渉により、また発現低下遺伝子の場合は過剰発現させることにより、耐性の軽減作用を確認できた遺伝子を、薬効バイオマーカーとして選択する。

JARID1A標的遺伝子レポーター系の細胞レベル評価系としての利用

上記の検討で同定するJARID1A標的遺伝子の転写制御領域を連結したルシフェラーゼレポータープラスミドを導入した安定形質転換細胞を樹立し、JARID1Aの過剰発現もしくはRNA干渉によりレポーターの発現変動を観察する。

(2) 新規JARID1A阻害剤の探索・同定

3万種の構造多様性をもつ合成化合物ライブラリーをソースとするランダムスクリーニングを実施し、あらたな阻害構造ファルマコフォアを探索・同定する。

(3) JARID1A阻害剤の抗がん剤耐性克服作用の確認(POC)

上記の(1)の検討で構築するPOC評価系において、JARID1Aの酵素活性を阻害することを発見したヒドロキサム酸誘導体、並びに上記の(2)の検討で同定するJARID1A阻害剤の抗がん剤耐性克服活性を評価する。

4. 研究成果

開発する化合物がコンセプトに合致した薬理活性をもつことの証明は、創薬過程で乗り越えるべき第一関門である。

(1) 抗がん剤耐性克服剤のPOC評価系の構築

JARID1A過剰発現による抗がん剤耐性株の樹立

Gefitinibに感受性を示すヒト肺がん細胞

株 PC9 に FLAG タグ付 JARID1A の発現ベクターを導入し、薬剤耐性株を多数取得した。PC9 に対する Gefitinib の細胞増殖抑制の IC50 は 0.092 μ M であるが、JARID1A 発現ベクターを導入して得られた細胞株の多くは Gefitinib に対して耐性を示し、最高 283 倍の耐性を示すクローンもあった。抗 FLAG 抗体を用いるウエスタンブロット法により、薬剤耐性化したがん細胞中の JARID1A 発現量の増加と薬剤耐性化が関連していることを確認した。

JARID1A 阻害剤の細胞レベル脱メチル化阻害活性の評価系の構築

次に上記の JARID1A の発現ベクターを PC9 に一過的に導入・発現し、細胞免疫染色法による H3K4 の me2 レベルの測定により JARID1A の脱メチル活性の亢進を確認した。すなわち、JARID1A の脱メチル化活性を検出できる、細胞レベルのアッセイ系を構築できた。本系は JARID1A 阻害剤の細胞レベルの脱メチル化阻害活性の評価に有用である。

薬効バイオマーカーとしての JARID1A 標的遺伝子の同定

の検討で樹立した JARID1A 過剰発現により惹起される Gefitinib 耐性株を用い、本細胞株と親株のマイクロアレイ解析により、発現変動遺伝子を同定した。薬剤耐性獲得株で発現抑制が確認された遺伝子群から、JARID1A の RNA 干渉による発現抑制により、RNA 発現量の上昇を確認できた Tissue factor pathway inhibitor 2 (TFPI2) を薬効バイオマーカー候補遺伝子として選択した。

JARID1A 標的遺伝子レポーター系の細胞レベル評価系としての利用

TFPI2 遺伝子の転写制御領域を連結したルシフェラーゼレポーターを導入した HEK293 安定形質転換細胞株を作製した。JARID1A の RNA 干渉による発現抑制により、ルシフェラーゼ発現量の上昇を確認できたクローンを JARID1A 阻害剤の細胞レベルでの評価系とした。

(2) 新規 JARID1A 阻害剤の探索・同定

研究協力者とともに Alpha Screen 法により、High Through-put Screening (HTS) 系を構築し、32914 化合物の HTS により、291 化合物の 1 次ヒットを取得した。

(3) JARID1A 阻害剤の抗がん剤耐性克服作用の確認 (POC)

JARID1A の酵素活性を阻害することを発見したヒドロキサム酸誘導体は、(1) ので樹立した Gefitinib 耐性細胞に対して耐性を見かけ上解除する活性を示したが、単剤でも本細胞の増殖を弱いながら阻害した。本結果は、JARID1A が耐性原因分子としてだけでなく、細胞がん化の原因分子として働いている可能性を示唆しており、さらなる検討が必要である。

(2) で取得した 291 化合物の 1 次ヒット

を (1) の の TFPI2 ルシフェラーゼレポーター細胞に供した結果、レポーター発現を亢進させる、すなわち細胞レベルで有効な化合物を 35 種取得することに成功した。これらの 35 種の化合物は構造的に多様であり、またレポーター細胞に対する活性も様々であった。今後、(1) ので樹立した Gefitinib 耐性細胞に対して耐性を解除する活性を有するか検討の予定である。耐性克服活性を確認できた化合物については、今後、JARID1A 阻害の特異性の解析、阻害様式・作用部位の解析を進め、さらには担がん動物実験を予定している。担がん動物モデルで有効性を示す薬剤は、今後の JARID1A を標的とする抗がん剤の耐性克服剤の開発の重要なリード化合物として期待される。

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2件)

Itoh Y, Sawada H, Suzuki M, Tojo T, Sasaki R, Hasegawa M, Mizukami T, Suzuki T: Identification of Jumonji AT-Rich Interactive Domain 1A Inhibitors and Their Effect on Cancer Cells. ACS Med Chem Lett. 2015 Apr 23;6(6):665-70. doi: 10.1021/acsmedchemlett.5b00083. eCollection 2015. (査読あり)

Mino K, Nishimura S, Ninomiya S, Tujii H, Matsumori Y, Tsuchida M, Hosoi M, Koseki K, Wada S, Hasegawa M, Sasaki R, Murakami-Yamaguchi Y, Narita H, Suzuki T, Miyata N, Mizukami T: Regulation of Tissue Factor Pathway Inhibitor-2 (TFPI-2) Expression by Lysine-Specific Demethylase 1 and 2 (LSD1 and LSD2). Biosci Biotechnol Biochem. 2014 Jun;78(6):1010-1017. doi: 10.1080/09168451.2014.910104. (査読あり)

[学会発表](計1件)

松森康真、西村諭、二ノ宮将吾、辻井寛士、土田美江、細井美穂、三野光識、長谷川慎、佐々木隆造、水上民夫: Lysine-specific demethylases (LSD1, LSD2) による TFPI2 (tissue factor pathway inhibitor 1) 発現の制御 第 38 回日本分子生物学会学術集会神戸ポートアイランド(神戸) 2015 年 12 月 3 日

[その他]

ホームページ等

<http://www.nagahama-i-bio.ac.jp/research/%E6%95%99%E5%93%A1%E3%81%AE%E7%B4%B9%E4%BB%8B%EF%BC%88%E6%B0%B4%E4%B8%8A-%E6%B0%91%E5%A4%AB%EF%BC%89/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

水上 民夫 (MIZUKAMI, Tamio)
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・
教授
研究者番号：80367896

(2)研究協力者

佐々木 隆造 (SASAKI, Ryuzo)
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・
客員教授
研究者番号：60077378

長谷川 慎 (HASEGAWA, Makoto)
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・
教授
研究者番号：10367899

永井 信夫 (NAGAI, Nobuo)
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・
教授
研究者番号：90260281

和田 修一 (Wada, Shuichi)
長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・
准教授
研究者番号：20378607

鈴木 孝禎 (SUZUKI, Takayoshi)
京都府立医科大学医学研究科医薬品化学
講座・教授
研究者番号：90372838

宮田 直樹 (MIYATA, Naoki)
名古屋市立大学大学院薬学研究科薬化学
分野・教授
研究者番号：50114674

吉田 稔 (Yoshida, Minoru)
理化学研究所基幹研究所吉田化学遺伝学
研究室・主任研究員
研究者番号：80191617

伊藤 昭博 (Itoh, Akihiro)
理化学研究所基幹研究所吉田化学遺伝学
研究室・専任研究員
研究者番号：40391859