

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670577

研究課題名(和文) 消化器癌幹細胞を標的としたエピゲノム創薬の実現

研究課題名(英文) Epigenetic drug discovery for gastrointestinal cancer stem cells

研究代表者

佐藤 太郎 (Sato, Taroh)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座教授

研究者番号：40368303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：消化器癌の創生と維持を担うヒストン脱メチル化酵素(Jarid1B)等の機能につき応用可能なレベルにまで掘り下げて解析し、既に先行している私達のJarid1B阻害剤リード化合物の研究(結晶化から低分子化合物の同定)から発展的に展開し、Jarid1B類似の後天的ゲノム修飾因子として、癌幹細胞に同等(以上)の機能活性を有する低分子化合物をHTSした。将来の臨床応用に向けて、前臨床試験まで基盤を構築した。産学連携としての新しい創薬活動とリンクさせて、我が国初のエピゲノム創薬として具現化させたい。

研究成果の概要(英文)：Although histone modification is shown to be an essential factor for normal stem cell maintenance, the involvement of histone modification factors in cancer initiation and progression has been poorly understood. Using gastrointestinal cancer cells, we elucidated the functional roles of the histone demethylase, an essential epigenetic regulator. Knockdown resulted in the suppression of cancer growth in vitro and in vivo. Using this system, the screening allowed the identification of several compounds as candidates. They justify the rationale for studying the effects of the epigenetic factors in gastrointestinal cancer.

研究分野：腫瘍内科

キーワード：癌 シグナル伝達 トランスレーショナルリサーチ 発現制御 バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

(1) 後天的ゲノム修飾(エピジェネティック制御)の重要性: 発癌過程に於いて、癌遺伝子及び癌抑制遺伝子のジェネティック変化は段階的に蓄積される(多段階発癌)。しかし、癌幹細胞(=腫瘍体積中で数%以下であり、抗癌剤抵抗性の原因)の発生と維持は、ジェネティック変化を基盤としたエピジェネティック変化(後天的ゲノム修飾)に依存している(Nature 2007 他)。消化器癌が癌死亡の過半数をしめ、特に罹患性が就労年齢で高いことを鑑みれば、エピジェネティック制御に照準を合わせた創薬が喫緊焦眉の課題である。本研究では、私達を含む内外の研究成果で特に注目を集めているヒストン脱メチル化酵素(Jarid1B)を含めた因子の機能につき応用可能なレベルにまで一貫して掘り下げて解析し、創薬を『出口戦略』として未来医療に資する。

(2) 万全な準備状況と、後一押しの実現性: 既に私達を含む内外の研究により、難治性の癌幹細胞を標的化するための標的分子として、ヒストン脱メチル化酵素(Jarid1B)の機能を解析し、癌幹細胞の創生と維持を担う重要な機能が明らかにされた(Cell 2010; Cancer Cell 2012 他)。私達は、Jarid1Bが「H3ヒストンの第4リジン残基の脱メチル化反応を触媒する」ことにより、「癌抑制遺伝子(p16/INK4A等)のプロモーター領域のクロマチンを閉じた状態(ヘテロクロマチン)にする結果として癌細胞形質が悪性化する」ことを明らかにした。加えて、siRNAによる阻害実験により、癌幹細胞が根絶化され腫瘍全体の増殖が阻止されることを実験的に確認した(創薬に向けたPOC [Proof-of-Concept]の確認)。さらに、阪大工学部とのJarid1B結晶化を進め、阻害剤ライブラリー(65,000化合物)の検索を実施し、大学をあげて早期探索および創薬の具現化に向けて事業を推進している(以上、本申請のための準備状況)。

本申請では、『癌幹細胞のエピゲノム創薬』がわが国の喫緊焦眉の課題であることを踏まえて、Jarid1B創薬の開発を更に加速するために、癌幹細胞に特異性の高いJarid1B類縁のエピジェネティック制御因子にまでスクリーニングの枠を広げて幅広く展開し、臨床応用のための基盤を構築する。消化器癌の癌幹細胞を標的とするエピゲノム創薬では、阪大は世界拠点の創薬アカデミアである。

2. 研究の目的

先行するJarid1B創薬研究から延長線として、類縁化合物研究の消化器癌幹細胞のエピゲノム創薬を迅速に事業展開し、研究期間(2年間)以内に2化合物以上の取得を目標。将来の臨床応用に向けて、前臨床段階まで押し進め基盤を構築(PMDA[医薬品医療機器総合機構]コンサルトまで)。

3. 研究の方法

(1) 消化器癌幹細胞におけるエピゲノム研究

私達を含む内外の研究成果により、Jarid1B(H3ヒストンの第4リジン残基の脱メチル化酵素)の消化器癌幹細胞に於ける役割が明らかになった(Cell 2010; Cancer Cell 2012 他)。すなわち、siRNAを用いたJarid1Bにより、ヒト悪性黒色腫(Cell 2010 他)およびヒト食道と大腸の癌細胞において(Int J Oncol, 2012 他)増殖速度(in vitro)と、免疫不全マウスを用いた造腫瘍性(in vivo)が抑制されることが明らかとなった。さらに、メカニズム研究の結果、Jarid1B阻害により活性酸素増加、セネセンス(細胞老化)が誘導されることが明らかとなった(Int J Oncol, 2012 他)。以上より、創薬に向けたPOC [Proof-of-Concept]を確認できた。さらに、阪大工学部との共同研究で結晶化を進め、低分子リード化合物の取得に成功した。この結晶化とリード化合物は、本申請において癌幹細胞に特異性の高い

Jarid1B の類縁化合物に開発研究を拡充するにあたり、きわめて有用であり、開発競争を有利に展開することができた。

(2) セネセンス（細胞老化）を作用点とする Jarid1B 類縁化合物のスクリーニング

セネセンスを β -Gal 染色を検出系として HTS (High-throughput-Screening) した。すなわち、準備段階として既に Jarid1B のトリメチル化リジン化合物に反応する阻害剤 (NOG:Fe2+:特許申請中) を取得しているため、この化合物構造を参照して、Jarid1B 蛋白質の Gly170, Glu190, Trp208, Phe185, Ser288, Tyr175, Tyr177 に囲まれたポケット領域に結合する新規化合物としてライブラリーを準備し、HTS (High-throughput-Screening) した (阪大と理研社会知創成事業創薬医療技術基盤プログラムの共同)。このために、細胞を 384 穴プレートにて培養し、化合物ライブラリーを添加して β -Gal 染色し、セネセンス誘導活性の高い化合物を同定した。

(3) リード化合物の最適化

取得されたリード化合物から更に類縁の化合物で HTS (High-throughput-Screening) を進めて、化合物の最適化を図った (阪大工学部井上教授との連携した共同研究)。さらに得られた化合物を消化器癌細胞株 (大腸癌 [DLD1, HCT116, RKO 等]、胃癌 [KATOIII, HSC39, MKN45 等]、膵癌 [MIYAPAKA, PANK1 等]) の培養液に添加して細胞増殖、セネセンス (細胞老化誘導) 免疫不全マウスの造腫瘍性を研究した。またエピジェネティック (癌抑制遺伝子 [p16/INK4A 等] のプロモーター領域のクロマチン等) をクロマチン免疫沈降 PCR 法で研究した。もって、取得されたリード化合物の最適化を図った。

(4) 正常と癌の幹細胞に対する効果 (毒性検討)

本研究の創薬の POC [Proof-of-Concept] は、癌抑制遺伝子の不活性化等、癌に於ける異常に焦点をあてている為、正常細胞への影響は理

論上きわめて小さいと予測されるが、将来の臨床応用を鑑みて、シーズ開発の段階から慎重に吟味を重ねることが重要。その目的で、正常の初代培養細胞 (上皮、間葉系) とともに、そこから細胞分離装置 (FACS AriaII) で分取した幹細胞集団 (CD44, CD34, CD133 等) の培養液にリード化合物を添加して細胞死 (AnnexinV)、セネセンス (β -Gal 染色)、エピジェネティック (クロマチン免疫沈降 PCR) を検討した。データを癌幹細胞でも取得し、正常と癌の幹細胞に対する影響を調べた (毒性検討)。

(5) 薬物動態

リード化合物をモデル動物 (マウス) に投与し、臓器毒性 (肝臓、腎臓等) 検討。また血中、臓器内濃度を検討し (HPLC)、薬物動態に関する基本的データを取得した。投与経路も検討した (静脈、腹腔内投与等)。

(6) 治療実験 (マウス)

免疫不全マウスにヒトの消化器癌細胞株 (大腸癌 [DLD1, HCT116, RKO 等]、胃癌 [KATOIII, HSC39, MKN45 等]、膵癌 [MIYAPAKA, PANK1 等]) を移植して腫瘍を形成させた (2~4 週間)。化合物を静脈または腹腔内投与して抗腫瘍効果を研究した (阪大と理研社会知創成事業創薬医療技術基盤プログラムの共同)。腫瘍のサイズ、組織切片の観察を実施。また既存の抗癌剤との併用効果を調べて、『現行の抗癌剤治療に上乘せする形で癌幹細胞を標的化し、総合的に腫瘍の根絶化を図れるかどうか』検討した。

(7) 創薬実現へ

大阪大学は、北大阪バイオクラスター (大阪市内道修町から豊中市・吹田市にまたがる千里丘陵、さらには茨木市・箕面市の丘陵地域に広がる彩都地域) に位置し、理化学研究所生命システム研究センター (本提案の分担者谷口)、医薬基盤研究所、有力製薬企業、ベンチャーが半径 20km の範囲に集中。これら優位な立地条件を最大限に活用し、大阪大学

は産学連携本部 / JAXA、医薬基盤研究所を中心とした創薬連携支援した充実体制、標的作成・評価、蛋白質科学、精密設計、医薬品化のサイクル型組織の構築と、その波及効果としての各大学（東京大学分担者後藤らなど）との連携・参加の確保等、技術組織組合体制が既に出来上がり、人材サポート面からは専攻横断的研究組織が既に設置されている。得られた化合物が特許整備を進め、将来の臨床応用に向けて、前臨床試験まで基盤を構築した（PMDA [医薬品医療機器総合機構] コンサルトまで）。

4 . 研究成果

計画に基づいて研究を推進した。HTS により癌細胞のレベルにおいて重要な活性のある化合物を複数同定した。現在 POC の確認を進めるとともに産学連携で化合物の絞り込みを進めており、知的財産の整備を含めて早期の創薬実現を加速化したい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

- 1) Kano, Y., Konno, M., Kawamoto, K., Tamari, K., Hayashi, K., Fukusumi, T., Satoh, T., Tanaka, S., Ogawa, K., Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. Novel drug discovery system for cancer stem cells in human squamous cell carcinoma of the esophagus. *Oncol. Rep.*, 31(3):1133-1138, 2014.
DOI: 10.3892/or.2013.2952.
- 2) Sueda, T., Kudo, T., Sakai, D., Uemura, M., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Yamamoto, H., Ezoe, S., Matsumoto, K., Doki, Y., Mori, M., Satoh, T. Safety and pharmacokinetics of S-1 in a recurrent colon cancer patient with chronic myeloid leukemia treated with dasatinib: a case report. *Cancer Chemother Pharmacol.* 74(6):1321-1324. 2014.

DOI: 10.1007/s00280-014-2620-8.

- 3) Satoh, T., Gemma, A., Kudoh, S., Sakai, F., Yamaguchi, K., Watanabe, T., Ishiguro, M., Inoshiri, S., Izawa, M., Sugihara, K., Sakata, Y. Incidence and clinical features of drug-induced lung injury in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab: results of a prospective multicenter registry. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 44(11):1032-1039, 2014.
DOI:10.1093/jco/hyu128.

〔学会発表〕(計0件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 太郎 (SATOH Taroh)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授

研究者番号 : 40368303