

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) がん細胞の分化制御に関わるエピゲノムを標的とした革新的治療法の開発
(英語) Targeting epigenetic regulator to modulate cancer cell differentiation
- 研究開発担当者 (日本語) 公立大学法人名古屋市立大学大学院医学研究科 遺伝子制御学
教授 近藤 豊
- 所属 役職 氏名： (英語) Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences,
Department of Epigenomics, Professor, Yutaka Kondo
- 実施期間： 平成 28 年 5 月 25 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 膠芽腫の分化制御に関わるエピゲノムを標的とした治療法の開発
開発課題名： (英語) Targeting epigenetic regulator to modulate glioma cell differentiation.
- 研究開発代表者 (日本語) 公立大学法人名古屋市立大学大学院医学研究科 遺伝子制御学
教授 近藤 豊
- 所属 役職 氏名： (英語) Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences,
Department of Epigenomics, Professor, Yutaka Kondo
- 分担研究 (日本語) LSD1 阻害薬を用いた膠芽腫治療法の開発
開発課題名： (英語) Development of LSD1 inhibitor-based treatment for glioblastoma
- 研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター
所属 役職 氏名： エピジェネティクス制御研究ユニット
ユニットリーダー 梅原 崇史
(英語) RIKEN Center for Life Science Technologies, Epigenetics Drug
Discovery Unit, Unit Leader, Takashi Umehara

分担研究 (日本語) 膠芽腫の治療薬の開発とその臨床応用
開発課題名: (英語) Development of novel drugs for glioma treatment

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人 名古屋大学大学院医学系研究科 脳神経外科
所属 役職 氏名: 准教授 夏目 敦至
(英語) Nagoya university Graduate School of Medicine, Department of
Neurosurgery, Associate Professor, Atsushi Natsume

II. 成果の概要 (総括研究報告)

本研究では、膠芽腫形成・分化異常に関わるエピゲノム調節因子の解明とその病態への関与を明らかにし革新的治療法の開発研究を目指す。

分担研究課題①「膠芽腫の分化制御に関わるエピゲノムを標的とした治療法の開発」

長鎖非翻訳 RNA-A (LncA) は膠芽腫幹細胞の維持に必須であるが、その安定性は F タンパク質が結合することにより制御されている。そこで LncA と相互作用する F タンパク質について、LncA と結合する領域の解析を行った。F タンパク質の欠失変異を作製し、F タンパク質が LncA と相互作用するために必要な部位 (T-F 領域) を同定した。さらに膠芽腫幹細胞株において、T-F 領域を CRISPR-Cas9 の技術を用いてコンディショナルに欠失させると、両者の結合が障害され、LncA の発現量が低下するとともに、強い細胞増殖抑制が誘導されることを確認した。次に LncA の欠失変異体を作製し、F タンパク質との結合部位を絞り込んだ。以上の結果から、F タンパク質と LncA の相互作用を阻害する小分子化合物の HTS スクリーニング法の構築を開始した。

分担研究課題②「LSD1 阻害薬を用いた膠芽腫治療法の開発」

取得した LSD1 阻害剤の類縁体を合成し、その活性評価を通して LSD1 に対する阻害活性を上昇させることに成功した。この *in vitro* アッセイのヒット候補化合物について、近藤班との共同研究を通して各種細胞株に対する細胞増殖阻害アッセイを行い、標的疾患細胞株を低濃度で阻害する低分子化合物を取得した。これらの阻害活性が良好な化合物のうち、代表的な 1 種類について今後の薬効試験に向けた予備実験としてマウス IP 投与後の血中濃度試験および脳内移行性試験を行った。血中濃度試験については 30 mg/kg 投与で投与後 24 時間まで薬物血中濃度が持続することを確認した。

分担研究課題③「膠芽腫の治療薬の開発とその臨床応用」

グリオーマ発症マウスモデルから同定し、膠芽腫の悪性化に必要であると考えたヒストン修飾酵素 (HMT1) の機能解析を行った。グリオーマ発症マウスモデルから樹立したがん細胞株に対して siRNA による HMT1 の阻害が強い抗腫瘍効果を示すことを見出した。一方でグリオーマ発症マウスモデルを詳細に解析した結果、ヒト Grade III グリオーマに対応する病態であることが明らかとなった。さらに siRNA による HMT1 の阻害は市販の膠芽腫細胞株に対して抗腫瘍効果が予測どおり得られなかった。恐らく HMT1 は一部の Grade III グリオーマ形成に重要であるが、膠芽腫 (Grade IV) では依存性が必ずしも高くないことが示唆された。

(英語概要)

In this project, we endeavor to develop novel treatments against epigenetic regulators to modulate cancer cell differentiation, which may enhance the malignant behavior of tumor cells.

Subproject ① Targeting epigenetic regulator to modulate glioma cell differentiation

A lncRNA-A, plays pivotal roles in maintaining the self-renewal properties of glioma stem cells. Targeting LNCA is effective strategy for glioblastoma treatment. We found that a novel protein, Prot-F, can stabilize the LNCA in glioma cells. Therefore, first we examined the region within Prot-F that interacts with LNCA using a series of Prot-F deletion mutants and found that Prot-F bound LNCA at the T-F regions. Indeed, conditional deletion of the T-F regions of Prot-F using CRISPR-Cas9 system in glioma cells showed that impaired the interaction between LNCA and Prot-F, which resulted in decreasing of LNCA coupled with strong inhibition of glioma cell growth. Next, we determined the region within LNCA that interacts with Prot-F using a series of LNCA deletion mutants. Based on the results, we started to construct the high throughput screening assay for the discovery of the potent small molecular inhibitors against the interaction between LNCA and Prot-F.

Subproject ② Development of LSD1 inhibitor-based treatment for glioblastoma

We succeeded to increase LSD1-inhibitory activities through chemical synthesis of derivatives of LSD1 inhibitors that we had obtained before, and evaluation of their potencies. We further performed proliferation rate inhibition assays using several cancer cell lines, and obtained new compounds that inhibit a targeted cancer cell line at low concentrations among the hit candidates which were identified by the *in vitro* assays. Among these compounds, we picked up one representative LSD1-inhibitory compound for near-future pharmacodynamics/-kinetics analyses, and validated its concentrations in blood and in brain after *i.p.* injection into mice. In this fiscal year, we confirmed that concentration of the compound in mouse blood lasts after 24 hours in the case of 30 mg/kg *i.p.* injection.

Subproject ③ Development of novel drugs for glioma treatment

We examined the contribution of HMT1 to the glioblastoma tumorigenesis, of which extreme overexpression was identified in our glioma mouse model. Inhibition of HMT1 with siRNA showed strong growth inhibition in mouse glioma-derived tumor cells. We also found that the tumors in our glioma mouse model are consistent with human grade III glioma. However, inhibition of HMT1 with siRNA showed minimal effect on cell growth in glioblastoma cell lines (grade IV), suggesting that HMT1 contributes to tumorigenesis of grade III glioma, while grade IV glioblastoma rarely depends on HMT1.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 2 件、国際誌 5 件）

1. Sato S, Katsushima K, Shinjo K, Hatanaka A, Ohka F, Suzuki S, Naiki-Ito A, Soga N, Takahashi S, Kondo Y. Histone deacetylase inhibition in prostate cancer triggers miR-320-mediated suppression of the androgen receptor. *Cancer Res.* 2016, 76, 4192-204.
2. Fujii S, Shinjo K, Matsumoto S, Harada T, Nojima S, Sato S, Usami Y, Toyosawa S, Morii E, Kondo Y, Kikuchi A. Epigenetic upregulation of ARL4C, due to DNA hypomethylation in the 3'-untranslated region, promotes tumorigenesis of lung squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016, 7, 81571-87.
3. Murakami-Tonami Y, Ikeda H, Yamagishi R, Inayoshi M, Inagaki S, Kishida S, Komata Y, Jan Koster, Takeuchi I, Kondo Y, Maeda T, Sekido Y, Murakami H, Kadomatsu K. SGO1 is involved in the DNA damage response in MYCN-amplified neuroblastoma cells. *Sci Rep.* 2016, 6, 31615.
4. Katsushima K, Natsume A, Ohka F, Shinjo K, Hatanaka A, Ichimura N, Sato S, Takahashi S, Kimura H, Totoki Y, Shibata T, Naito M, Kim HJ, Miyata K, Kataoka K, Kondo Y. Targeting the Notch-regulated non-coding RNA TUG1 for glioma treatment. *Nat Commun.* 2016, 7, 13616.
5. 新城恵子、近藤 豊, 脳腫瘍におけるエピゲノム異常と治療への展望
実験医学増刊. 2016, 34, 1599-604.
6. 勝島啓佑、近藤 豊, 長鎖非翻訳 RNA を標的としたがん治療薬の開発
腫瘍内科. 2017, 19, 4, 454-61.
7. Niwa H, Umehara T, Structural insight into inhibitors of flavin adenine dinucleotide-dependent lysine demethylases. *Epigenetics.* 2017, 1-10.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 膠芽腫に対する新規エピゲノム治療法の開発, 口頭, 近藤 豊, 第 20 回日本がん分子標的治療学会, 2016/06/01, 国内.
2. Inhibition of Histone Deacetylase Induces miRNA-mediated Androgen Receptor Suppression in Prostate Cancer, 口頭, Kondo Y, The 35th Sapporo International Cancer Symposium 2016, 2016/06/24, 国内.
3. Targeting the Notch-regulated Non-coding RNA, TUG1, as an Effective Treatment in Glioma, ポスター, Katsushima K, Natsume A, Ohka F, Shinjo K, Ichimura N, Hatanaka A, Shibata T, Miyata K, Kataoka K, Kondo Y, The 35th Sapporo International Cancer Symposium 2016, 2016./06/24,25, 国内.
4. Development of a New Anti EZH2/PRC2 Inhibitor, ポスター, Shinjo K, Dohi N, Katsushima K, Ohnuki T, Ito A, Yoshida M, Kondo Y, The 35th Sapporo International Cancer Symposium 2016, 2016./6/24,25, 国内.

5. Interaction between Microenvironment and Epigenetics in Human Cancers, 口演, Kondo Y, Frontiers Seminar and Mini-Symposium on Cancer Epigenomics, 2016/07/21, 国外.
6. Targeting Long Non-coding RNA as an Effective Treatment for Glioma, 口演, 近藤 豊, 第 89 回日本生化学会大会, 2016/09/27, 国内.
7. Targeting Non-coding RNA as a Novel Therapeutics for Human Cancers, 口演, Kondo Y, 11th Asian Epigenomics Meeting 2016, 2016/10/01, 国外.
8. 非翻訳 RNA を標的とした新規がん治療法の開発, 口演, 近藤 豊, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/06, 国内.
9. ポリコームタンパク複合体を標的とした新規治療薬の開発, 口演, 新城恵子, 土肥名月, 勝島啓佑, 伊藤昭博, 大貫哲男, 吉田 稔, 近藤 豊, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/06, 国内.
10. Notch シグナルにより誘導される長鎖非翻訳 RNA TUG1 を標的としたグリオーマ治療薬の開発に関する研究, 口演, 勝島啓佑, 夏目敦至, 大岡史治, 新城恵子, 市村典久, 畑中彬良, 柴田龍弘, 宮田完二郎, 片岡一則, 近藤 豊, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/07, 国内.
11. Targeting non-coding RNA as a new paradigm in human glioma treatment, 口演, Kondo Y, AACR New Horizons in Cancer Research, 2016/11/03, 国外.
12. Targeting Epigenome as a Novel Treatment for Glioma, 口演, Kondo Y, 3rd Taiwan Epigenomics Symposium and International Conference on Systems Biology, 2017/03/17, 国外.
13. Precision medicine for brain cancers Asia Consortium, 口頭, 夏目敦至, 2016/6/11, 国内.
14. Temporal/spatial heterogeneity in lower grade gliomas, 口頭. 夏目敦至, 日本癌学会, 2016/10/7, 国内.
15. 成人、小児脳腫瘍における分子病理診断と個別化医療への展望, 口頭, 夏目敦至, 第 9 回岡山脳腫瘍フォーラム, 2016/11/09, 国内.
16. 分子夾雑に基づく脳腫瘍細胞解析と脳腫瘍分子診断, 口頭. 夏目敦至, 日本化学会, 2017/3/16, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. がん研究の最先端, 近藤 豊, 名古屋市立大学最新医学講座オープンカレッジ, 2016/11/11, 国内.
2. 小児脳腫瘍の種類と治療について, 夏目敦至, 東海脳腫瘍患者の会, 2017/3/18, 国内.

(4) 特許出願

公開対象なし