

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) テロメア制御因子を標的とした革新的がん治療法の開発
(英語) Development of innovative cancer therapeutics that targets telomere-regulating factors
- 研究開発担当者 (日本語) 公益財団法人がん研究会がん化学療法センター
分子生物治療研究部 部長 清宮啓之
- 所属 役職 氏名： (英語) Division of Molecular Biotherapy, Cancer Chemotherapy Center
Japanese Foundation for Cancer Research
Chief, Hiroyuki SEIMIYA
- 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) 全体の総括、薬効評価、POC 解析
開発課題名： (英語) Project overview, efficacy evaluation, POC analysis
- 研究開発分担者 (日本語) 公益財団法人がん研究会がん化学療法センター
分子生物治療研究部 部長 清宮啓之
- 所属 役職 氏名： (英語) Division of Molecular Biotherapy, Cancer Chemotherapy Center
Japanese Foundation for Cancer Research
Chief, Hiroyuki SEIMIYA
- 分担研究 (日本語) G4 リガンドの合成展開、*in vitro* 評価
開発課題名： (英語) Synthesis of G4 ligands, *in vitro* evaluation
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京農工大学大学院工学研究院生命工学専攻
生命有機化学講座 教授 長澤和夫
- 所属 役職 氏名： (英語) Department of Biotechnology and Life Science
Tokyo University of Agriculture and Technology
Professor, Kazuo NAGASAWA

分担研究 (日本語) 合成致死スクリーニング技術による新たな治療標的探索
開発課題名 : (英 語) Identification of novel therapeutic targets by a synthetic lethal
screening technique

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 吉田化学遺伝学研究室
専任研究員 八代田陽子

所属 役職 氏名 : (英 語) Chemical Genetics Laboratory, RIKEN
Senior Research Scientist, Yoko YASHIRODA

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

テロメアは染色体の末端を安定に保つキャップ構造であり、損傷 DNA の切断端とは厳密に区別されている。ヒト体細胞の DNA 複製のたびに生じる末端複製問題（end replication problem）は、テロメアを徐々に消失させ、最終的には細胞老化や細胞死を誘導するため、発がん抑制に寄与すると理解されている。がん細胞は、テロメア合成酵素テロメラーゼを活性化することによってテロメアを安定に維持するため、無限の分裂増殖が可能である。研究開発代表者の清宮啓之部長（公益財団法人がん研究会）らは、がん細胞のテロメア維持機構を破綻に導く標的分子として、（1）テロメアなどのグアニンに富む反復配列で形成されるグアニン四重鎖、（2）テロメラーゼの機能を促進するポリ(ADP-リボシル)化酵素であるタンキラーゼに着目している。本研究開発では、（1）化学的に安定かつ大量供給が可能な新規合成 G4 安定化化合物 (G4 リガンド) を創製し、その *in vivo* 制がん効果を立証すること、（2）これまでに開発したタンキラーゼ阻害剤を用い、がん分子標的治療モデルを構築することを目標とする。

研究開発分担者の長澤和夫教授（国立大学法人東京農工大学）らは、これまでに合成を行った大環状 6-および 7-オキサゾール化合物群の各種 *in vitro* 評価を実施し、標的 DNA と効率よく相互作用する誘導体を同定した。また、清宮部長らとともに、制がん効果を示す新たな誘導体を明らかにした。これらの結果に基づき、以後の本格的構造展開の指針を取得した。清宮部長らはさらに、これらの化合物群に関して様々なヒトがん細胞株に対する増殖阻害効果と G4 安定化活性の相関解析を実施した。その結果、G4 安定化活性が特に強いリガンドに対して高い感受性を示す細胞株が複数同定された。G4 リガンド高感受性がん細胞としてこれまでに注力してきた神経膠腫幹細胞に G4 リガンドを曝露すると、薬力学的効果の指標となるテロメア DNA の損傷が確認されたのに対し、今回新たに同定された G4 リガンド高感受性がん細胞株では DNA 損傷が軽微であり、新たな制がん作用点の存在が示唆された。

一方、すでに同定したタンキラーゼ阻害剤および先行タンキラーゼ阻害剤を様々ながん細胞株に処理し、増殖阻害効果を検定したところ、いずれの場合もテロメアが非常に短いがん細胞株が最も高い感受性を示した。但し、その GI₅₀ 値（＝細胞増殖を 50% 阻害するのに必要な化合物の濃度）は高く、効果的な制がん効果を発揮させるためには、テロメラーゼ阻害剤等との併用が必要である可能性が支持された。そこで研究開発分担者の八代田陽子専任研究員（国立研究開発法人理化学研究所）らは、タンキラーゼ阻害剤の効果を予測するバイオマーカーの同定およびタンキラーゼ阻害剤との併用により制がん効果を発揮する分子標的治療薬の同定を目指した。具体的には、分子バーコードつきプール型網羅的 shRNA ライブラリーによりヒト遺伝子がノックダウンされたがん細胞のプールを作製し、タンキラーゼ阻害剤と合成致死性（synthetic lethality）を示す候補遺伝子のスクリーニングを実施した。その結果、ノックダウンによりタンキラーゼ阻害剤への感受性が 2 倍以上誘導される遺伝子が多数同定された。

Telomeres, the capping structures that stabilize linear chromosome ends, are distinguished from damaged DNAs. The so-called end replication problem occurs at each DNA synthesis in human somatic cells, which results in gradual telomere shortening and eventual cell senescence or apoptosis. This machinery has been postulated as one of tumor suppressor mechanisms. Because most cancer cells reactivate the telomere-synthesizing enzyme called telomerase to stabilize their telomeres, they can grow infinitely. Dr. Hiroyuki Seimiya (Japanese Foundation for Cancer Research), principal investigator of this research project, focuses on (i) G-quadruplexes, which are formed by guanine-rich repetitive sequences such those in telomeres and (ii) tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase, which enhances function of telomerase, as molecular targets whose manipulation can induce telomere dysfunction in cancer cells. Goals of this research project are (i) to develop novel synthetic G-quadruplex stabilizers (G4 ligands) and verify their anticancer effects *in vivo* and (ii) to develop a molecular cancer therapeutic model with tankyrase inhibitors, which have been developed by this research group.

Prof. Kazuo Nagasawa (Tokyo University of Agriculture and Technology) and co-workers analyzed the physical properties for macrocyclic 6- and 7-oxazole compounds, which have been synthesized so far, and identified G4 ligands that exhibited efficient interaction with telomeric G4 DNA. Then in collaboration with Dr. Seimiya's group, they identified additional novel ligands that showed an antiproliferative effect on cultured cancer cells. These results gave them the direction for further structural development of the macrocyclic compounds for an anticancer activity. Dr. Seimiya and co-workers further analyzed the relationship between antiproliferative effects on various cancer cell lines and physical properties for the above-mentioned compounds, and identified several cell lines that were hypersensitive to potent G4 ligands. While these G4 ligands induced telomeric DNA damage in glioma stem cells, which we have been focused on as G4 ligand-sensitive cancer cells, the same ligands did not induce significant DNA damage in the hypersensitive cell lines identified in the present study. These observations suggest a novel mode-of-action of G4 ligands.

Meanwhile, Dr. Seimiya and co-workers analyzed the effects of several tankyrase inhibitors on the growth of various cancer cell lines. As a result, cancer cells that retained very short telomeres exhibited the highest sensitivities to tankyrase inhibitors. However, the GI_{50} values of these inhibitors were relatively high, which suggests that combination with a telomerase inhibitor or other drugs would be required to gain sufficient efficacy of tankyrase inhibitors. Accordingly, Dr. Yoko Yashiroda (RIKEN) and co-workers performed a genome-wide pooled and barcoded short-hairpin RNA (shRNA) screening to determine synthetic lethal interactions with tankyrase inhibitors. This approach will help to identify predictive biomarkers for the efficacy of tankyrase inhibitors and molecular targeted drugs that enhance the antitumor activity of tankyrase inhibitors. After barcode sequencing of inhibitor-treated and untreated cells, many candidate genes were identified.

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 0 件、国際誌 2 件）

1. Takahiro Nakamura, Sachiko Okabe, Haruka Yoshida, Keisuke Iida, Yue Ma, Shogo Sasaki, Takao Yamori, Kazuo Shin-ya, Ichiro Nakano, Kazuo Nagasawa, Hiroyuki Seimiya, Targeting glioma stem cells in vivo by a G-quadruplex-stabilizing synthetic macrocyclic hexaoxazole. *Sci. Rep.*, 2017, in press (2017/5/3 受理) . (謝辞有)
2. Tetsuo Mashima, Yoko Taneda, Myung-Kyu Jang, Anna Mizutani, Yukiko Muramatsu, Haruka Yoshida, Ayana Sato, Noritaka Tanaka, Yoshikazu Sugimoto, Hiroyuki Seimiya, mTOR signaling mediates resistance to tankyrase inhibitors in Wnt-driven colorectal cancer. *Oncotarget*, 2017, in press (2017/5/3 受理) . (謝辞有)

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 核酸の『かたち』を標的とした革新的がん治療薬の開発, 口頭, 清宮啓之, ジャパン・キャンサーリサーチ・プロジェクト平成 28 年度 企業向け成果発表会 目指すはひとつ 命のために～アカデミアと企業で未来を描く～, 2017/3/3, 国内.
2. PARP ファミリー酵素を標的とする抗がん剤の開発, 口頭, 清宮啓之, CBI 学会 2016 年大会招待講演, 2016/10/25, 国内.
3. グアニン 4 重鎖リガンド誘導性のテロメア機能不全と複製ストレスによる神経膠腫幹細胞のターゲティング, 口頭, 岡部幸子, 新家一男, 清宮啓之, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/8, 国内.
4. Telomere maintenance system as an anticancer therapeutic target, 口頭, 清宮啓之, 第 75 回日本癌学会学術総会 JCA-Mauvernay Award 受賞講演, 2016/10/7, 国内.
5. がん創薬にむけたテロメア研究の進歩, 口頭, 清宮啓之, 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会教育講演, 2016/7/29, 国内.
6. 四重鎖核酸とがん, 口頭, 清宮啓之, 第 6 回 HiHA Workshop 招待講演, 2016/7/8, 国内.
7. 神経膠腫幹細胞に対するグアニン四重鎖リガンドの制がん作用機序, 口頭, 岡部幸子, 新家一男, 清宮啓之, 第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2016//6/1, 国内.
8. Synthesis of cyclic polyoxazole compound and evaluation of its selective bindings to G4 and i-motif, 口頭, Shadi Sedghi Masoud, Yue Ma, Adrien Marchand, Valerie Gabelica, Kazuo Nagasawa, 日本化学会第 97 回春季年会, 2017/3/19, 国内.
9. テロメアグアニン四重鎖のトポロジー制御を志向したリガンドの創製と機能評価, 口頭, 馬悦, 佐々木捷悟, 長澤和夫, 日本化学会第 97 回春季年会, 2017/3/17, 国内.
10. Topology selective stabilization of G-quadruplex by small molecules, 口頭 長澤和夫, ACBI シンポジウム, 2017/1/21, 国外.
11. Identification and Selective Stabilization of G-quadruplex by Small Molecules, 口頭, 長澤和夫, 第 39 回日本分子生物学会大会, 2016/12/2, 国内.

12. Development of small molecule binding selectively to i-motif DNA structure, ポスター, Shadi Sedghi Masoud, Iida Keisuke, Kazuo Nagasawa, The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2016/9/28, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. DNA の形を標的とした新しい創薬へ, 清宮啓之, 第 6 回東京都医学総合研究所シンポジウム (一般向けの講演会) 「DNA とゲノム: 二重らせん構造を超えて」, 2016/12/16, 国内.
2. 非 B 型 DNA のケミカルバイオロジー, 長澤和夫, 第 6 回東京都医学総合研究所シンポジウム (一般向けの講演会) 「DNA とゲノム: 二重らせん構造を超えて」, 2016/12/16, 国内.

(4) 特許出願

公開対象なし