

株式会社 Epigeneron

事業実施期間：開始 令和元年8月1日～終了 令和元年12月26日

共同研究・共同事業者

株式会社テクノプロ テクノプロ・R&D 社

研究・事業名

新規抗がん剤のアッセイ方法の開発

交付申請内容

研究・事業の目的及び意義

がん抑制遺伝子のプロモーター領域DNAが高度にメチル化されると、その発現が低下し、がん化が誘導されることが知られている。がん抑制遺伝子の一つであるp16(CDKN2A)は、メラノーマ、大腸がんを含む多くのがん細胞において高度にメチル化されており、それによる発現抑制が発癌に重要な役割を果たすことが明らかとなってきた(図1)。今般、株式会社Epigeneron(以下、Epigeneron社)はこのがん抑制遺伝子p16に着目し、insertional chromatin immunoprecipitation(iChIP)法(図2)を用いて、p16遺伝子プロモーターに結合している蛋白質を網羅的に同定した。iChIP法は、LexA等の外来性DNA結合蛋白質の認識配列を単離対象ゲノム領域に挿入し、アフィニティー精製用タグを付加したLexAを解析対象細胞に発現させることにより単離対象ゲノム領域を標識し、架橋処理・断片化処理の後、タグに対する抗体等を用いてアフィニティー精製を行い、解析対象ゲノム領域を単離する技術であり、Epigeneron社取締役である藤井・藤田が開発した技術である。標的ゲノム領域の単離後に、質量分析解析を行うことで、そのゲノム領域に結合している蛋白質を同定する(図2)。こうして同定した蛋白質群の中から、低分子化合物の良い標的となるような蛋白質に対するsiRNAを用いた機能欠失実験を行い、発現を抑制するとp16遺伝子プロモーターが脱メチル化されるものを複数見出した。このような抗がん剤の創薬ターゲットとなりうる分子(図3)に対する阻害剤を見出すため、high throughput screening(HTS)及びリード化合物スクリーニング用のアッセイ系を株式会社テクノプロ・R&D(以下、テクノプロ社)と共に構築する。上記2社が共同して研究・事業を進めることにより、がん抑制遺伝子の発現を高レベルに保つことで、がんの発生を抑制する新規メカニズムの抗がん剤創出を目指す。

研究・事業の方法及び手段

1. 標的蛋白質の合成

Epigeneron社が発見した抗がん剤の標的となる蛋白質をコードする遺伝子を合成し、テクノプロ社が発現プラスミドに挿入する。次いで、大腸菌蛋白質発現系を用いて、全長および部分長の蛋白質を合成する。意図した蛋白質が産生されていることをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動とクマシーブリアントブルー染色や、免疫ブロット解析により確認する。精製した蛋白質はHTSアッセイ系や、HTS後の各種試験系に使用する。

2. 標的蛋白質に対する阻害剤スクリーニング用結合アッセイ系の構築

上記で合成した蛋白質に加え、市販の標的蛋白質を購入して、HTSに適したアッセイ系を構築する。具体的には、個々の候補蛋白質に対して、理論的に酵素活性阻害と良く相関するような384-well plateを用いたホモジニアスな結合アッセイ系を構築する。アッセイ系構築には、これまでの研究成果により公知となっている知見の文献検索を行うほか、結晶構造解析等から得られた活性中心の立体構造等の情報を駆使する。またスクリーニングに適したアッセイ系とするため、S/N比・S/B比は3倍以上、Z'-factorは0.5以上の数値を目指す。

研究・事業の特徴(新規性、独自性等)

本研究・事業は、Epigeneron社独自の技術であるiChIP法を用いて見出された、これまでにない創薬ターゲットに対する抗がん剤を創出するためのスクリーニング系をEpigeneron社とテクノプロ社と共同で構築することである。

これまでの成果としては、Epigeneron社において、がん抑制遺伝子であるp16遺伝子のプロモーターに特異的に結合している蛋白質をiChIP法を用いて網羅的に同定した。同定された蛋白質のうち5つに対して当該蛋白質の遺伝子をsiRNAによってノックダウンしたところ、プロモーター領域のメチル化が減少した(脱メチル化が促進された)ことを確認した(図3)。こうした解析により、これらの候補蛋白質の機能を阻害することによりp16遺伝子の再発現が誘導できる可能性が示された。

当該蛋白質に対して、その阻害活性を有する化合物を探索することによりp16遺伝子発現を制御する新規メカニズムの抗がん剤創出が可能になると考えられる。

研究・事業により期待される効果

本研究提案は、iChIPを用いて見出された、プロモーター領域をメチル化しがん抑制遺伝子の発現を低下・維持させている蛋白質に対して、新たな薬剤をスクリーニングする方法を開発することを目的としている。本研究・事業において開発される新規薬剤のスクリーニング方法を応用することにより、HTSにおけるヒット化合物の同定、さらにヒット化合物からのリード化合物への合成展開が可能となり、最適な新規開発用化合物の選定の一助となることが期待される。また、リード化合物並びに新規開発用化合物の合成展開については、神戸に所在する研究受託会社の起用を想定しており、本研究・事業における成果は、神戸における創薬研究のエコシステムの構築・維持に寄与するものと考えている。

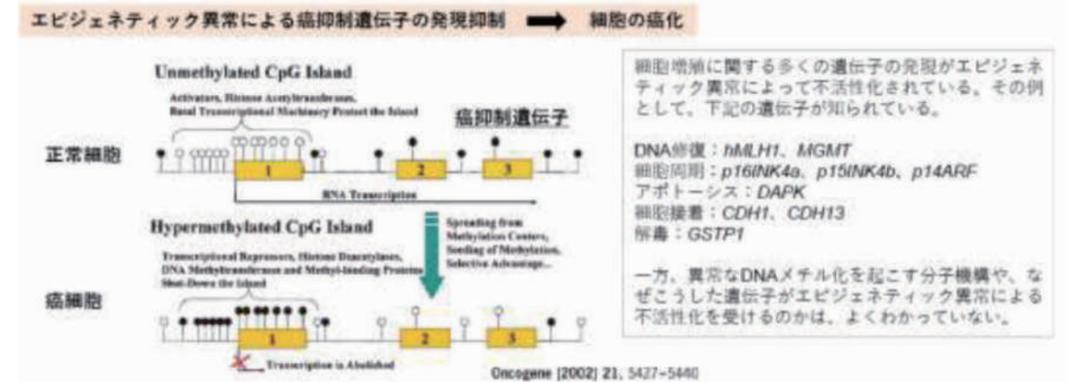


図1. プロモーターのメチル化による p16 がん抑制遺伝子の発現抑制

iChIP法によるDNA結合分子の単離及び同定

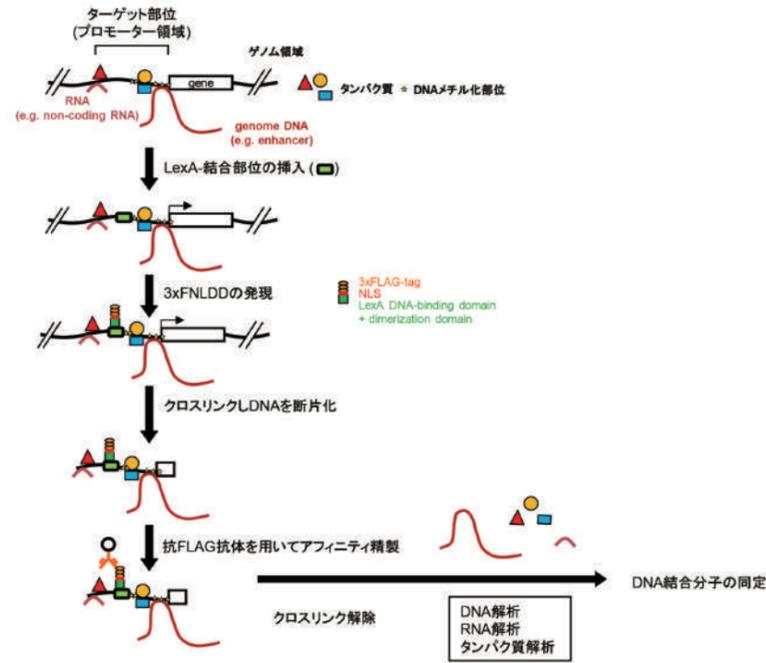
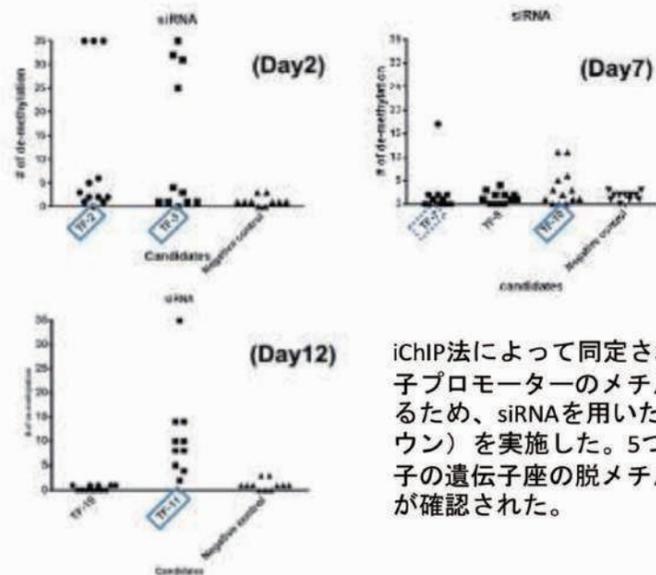


図 2. iChIP 法のスキーム

iChIP法によって同定されたタンパク質の機能評価 p16遺伝子座のメチル化への影響を確認



iChIP法によって同定されたタンパク質のp16遺伝子プロモーターのメチル化に対する影響を調べるため、siRNAを用いた機能喪失実験（ノックダウン）を実施した。5つのタンパク質がp16遺伝子の遺伝子座の脱メチル化に関与していることが確認された。

図 3. 候補タンパク質のノックダウンによる p16 遺伝子プロモーターメチル化の解除

実績報告内容

研究・事業の内容及び目標達成状況

①研究・事業の背景:

がん抑制遺伝子のプロモーター領域DNAが高度にメチル化されると、その発現が低下し、がん化が誘導されることが知られている。がん抑制遺伝子の一つであるp16(CDKN2A)は、メラノーマ、大腸がんを含む多くのがん細胞において高度にメチル化されており、それによる発現抑制が発癌に重要な役割を果たすことが明らかとなってきている。株式会社Epigeneron(以下、Epigeneron社)ではこのがん抑制遺伝子p16に着目し、insertional chromatin immunoprecipitation(iChIP)法を用いて、p16遺伝子プロモーターに結合している蛋白質を網羅的に同定した。iChIP法は、LexA等の外来性DNA結合蛋白質の認識配列を単離対象ゲノム領域に挿入し、アフィニティ精製用タグを付加したLexAを解析対象細胞に発現させることにより単離対象ゲノム領域を標識し、架橋処理・断片化処理の後、タグに対する抗体等を用いてアフィニティ精製を行い、解析対象ゲノム領域を単離する技術であり、Epigeneron社取締役である藤井・藤田が開発した技術である。標的ゲノム領域の単離後に、質量分析解析を行うことで、そのゲノム領域に結合している蛋白質の同定が可能な方法である。こうして同定した蛋白質群の中から、低分子化合物の良い標的となるような蛋白質に対するsiRNAを用いた機能欠失実験を行い、発現を抑制するとp16遺伝子プロモーターが脱メチル化されるものを複数見出した。このような抗がん剤の創薬ターゲットとなりうる分子に対する阻害剤を見出すため、high throughput screening (HTS)及びリード化合物スクリーニング用のアッセイ系を株式会社テクノプロ・R&D(以下、テクノプロ社)と共に構築することとし、その研究開発費についての助成を得るべく、令和元年度の神戸医療産業都市推進機構における研究開発助成金申請し採択された。

②研究・事業の内容:

本研究・事業では、Epigeneron社で見出した創薬ターゲットとなりうる分子に対する阻害剤を見出すため、下記の共同研究を実施した。

1. 標的蛋白質の合成

Epigeneron社が発見した抗がん剤の標的となるタンパク質について、市販品の全長タンパク質と部分長タンパク質を使って、その活性を確認した。また、当該抗がん剤の標的となる

タンパク質について全長および部分長タンパク質を合成し、同様の実験を実施するため、当該タンパク質をコードする全長と部分長の2種類の遺伝子を合成し、pGEX系ベクターに導入し、N末端GST融合タンパク質として発現するプラスミドを構築し大腸菌蛋白質発現系によりタンパク質の発現を行い、アフィニティクロマトグラフィーを用いて精製した。意図したタンパク質が産生されていることをSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動とクマシーブリアントブルー染色により確認した。本タンパク質の発現条件、および精製方法を用いて、4L培養スケールからのタンパク質精製を実施した。得られたタンパク質はHTSアッセイ系の構築に使用した。

2. 標的蛋白質に対する阻害剤スクリーニング用結合アッセイ系の構築

上記で合成したタンパク質についてHTSに適し活性阻害と良く相関するような384-wellplateを用いたホモジニアスな結合アッセイ系を構築した。スクリーニングに適したアッセイ系とするため、アッセイ系の目標値はS/N比、S/B比が3倍以上、Z'-factorが0.5以上となるように各タンパク質濃度、基質濃度を最適化した。また、未標識基質を使い、IC50を算出し、出来上がったアッセイ系を評価した。

研究・事業の内容及び目標達成状況

1. 標的蛋白質の合成:

市販成品及びテクノプロにおいて合成した標的タンパク質については、全長タンパク質および部分長のタンパク質を使って活性確認および活性比較を実施した結果、部分長の標的タンパク質が結合活性が最も強く検出された。また、市販品よりも、単位重量当たりの価格が安く、数万化合物のHTSには適しているテクノプロ合成品が得られたため、本研究・事業の目標は達成できたと考えられた。

市販標的タンパク質の活性確認においては、濃度4条件、種類2条件、阻害剤濃度3条件、ビオチン標識ペプチド4条件、反応時間3条件の合計288条件について条件検討を行った。これらの内、反応時間(3時間)、阻害剤濃度(0mM)の条件を固定した32条件についてグラフ化した(図1)。結果、部分長タンパク質(108-286)、GST tag、全長タンパク質(GST)共に、濃度依存的(5nMまで)、ビオチン標識ペプチド濃度依存的な活性上昇が確認された。

また、テクノプロにて合成した全長及び部分長タンパク質の

活性確認の実験においては標的タンパク質濃度4条件、種類8条件、阻害剤濃度3条件、ビオチン標識ペプチド1条件、反応時間3条件の合計288条件について条件検討を行った。これらの内、反応時間(3時間)、阻害剤濃度(0mM)の条件を固定した32条件について検討した。結果、5nMまでの濃度依存的な活性上昇が確認された。

テクノプロで合成した全長タンパク質FLについては保存Bufferの種類検討も実施したが、活性が低いものであった。したがって化合物スクリーニングを実施する目的で本標的タンパク質を利用する場合、活性が強く検出される部分長タンパク質をアッセイ系構築に使うのが最適であると判断した。また、市販品とテクノプロ合成品を比較すると、活性に大きな違いは見られないことから、単位重量当たりの価格が低い、テクノプロ合成品を使うこととした。

2. 標的タンパク質に対する阻害剤スクリーニング用結合アッセイ系の構築

条件検討ロットおよび大量合成ロットの2つのロットにおける標的タンパク質に関してアッセイ系の構築を行った。その結果、どちらのロットでもHTSに耐えるアッセイ系が構築できた。

標的タンパク質の活性確認を行った結果、TLD buffer TLDを用いたスクリーニング実施が最適であると判断した。そこで、アッセイ系構築の条件検討は大量合成ロットの部分長タンパク質を使用した。濃度検討においては濃度8条件、種類1条件、ビオチン標識ペプチド8条件、反応時間3条件の合計192条件について条件検討を行った。結果、どの条件においても標的タンパク質濃度が10nMを超えると活性が下がる傾向が確認されたため、標的タンパク質のKd値は5nMまでで算出することとした。その結果、標的タンパク質のKd値はビオチン標識ペプチドを最高濃度で添加した際に算出された1.16nM付近とし、ビオチン標識ペプチド濃度のKd値は5.20nM付近とした。

標的タンパク質Kd値検討、およびビオチン標識ペプチドKd値検討の結果、アッセイに設定する濃度は以下が最適(1Kd~2Kd)であると考えられる。

標的タンパク質濃度(nM):1.16(付近)~2.32(最高)

ビオチン標識ペプチド濃度(nM):5.2(付近)~10.4(最高)

上記の条件下で化合物が溶解しているDMSOに対してどの程度の耐性を示すか検討した。その結果、0.5%DMSO条件下ではどの条件でも95%以上の活性を示したが、2%DMSOでは67~79%と明らかな活性の低下が確認された。

以上の、実験結果により以下の条件が最適であることが考えられた。

標的タンパク質濃度:1.2nM or 2.4nM

ビオチン標識ペプチド濃度 5.0nM

DMSO濃度 0% or 0.5%

従って、上記の条件をもとに市販の阻害剤の濃度を0.001 μ M~100 μ M 10^{-9} となるような反応液に加えて、阻害剤のIC50を算出したところ、IC50が参考文献に近く、Z'-factorが0.5以上、S/B比が3倍以上の以下の条件がDMSO溶解の阻害剤のスクリーニングには以下の条件が最適であることが確認された。

標的タンパク質濃度 1.2nM

ビオチン標識ペプチド濃度 5.0nM

DMSO濃度 0.5%

上記の条件下でのアッセイ系の評価結果

IC50:9.35 μ M(約0.94x10⁻⁵M)

S/B:15倍

Z'-factor 0.88

大量合成ロットの標的タンパク質についても同様の実験を実施し、HTSに適した条件を検討した。

結果、どの条件においても標的タンパク質濃度が5nMを超えると活性が下がる傾向が確認されたため、標的タンパク質のKd値は2nMまでで算出することとした。その結果、標的タンパク質のKd値はビオチン標識ペプチドを最高濃度で添加した際に算出された0.91nM付近とした。

ビオチン標識ペプチド濃度検討においては標的タンパク質濃度が5nMを超えると活性が下がる傾向が確認されたため、活性が下がらない最高濃度の2nMで算出することとした。従って、ビオチン標識ペプチドのKd値は4.36nM付近とした。

標的タンパク質濃度およびビオチン標識ペプチド濃度検討の結果、大量合成ロットの標的タンパク質はそれぞれの濃度が低くても十分な測定値が検出されることが確認できた。また条件検討ロットの標的タンパク質を使用して阻害剤のIC50を算出したところ、標的タンパク質量が低いほど阻害剤の影響を受けやすいことが確認された。そのため、大量合成ロット標的タンパク質に関してはタンパク質、ビオチン標識ペプチドの両者において、以下に示すように1/2Kd付近に設定して阻害剤のIC50を算出することにし、阻害剤のIC50は参考文献より低く算出され、Z'-factorが0.5以上、S/B比が3倍以上の以下の条件が最適であることが確認された。

標的タンパク質濃度 0.45nM

ビオチン標識ペプチド濃度 2.2nM

DMSO濃度 0.5%

上記の条件下でのアッセイ系の評価結果

IC50:5.94 μ M(約0.59x10⁻⁵M)

S/B:8.7倍

Z'-factor 0.92

今後の展開

本研究・事業によって得られたアッセイ系を用いて、市販品の標的タンパク質の阻害活性を有する化合物をスクリーニングする。その後、活性があると判断された化合物を用いてin vitroにおける薬効薬理試験を実施する。活性がある化合物が得られなかった場合には、当該アッセイを用いたHTSにより化合物をスクリーニングしていく。

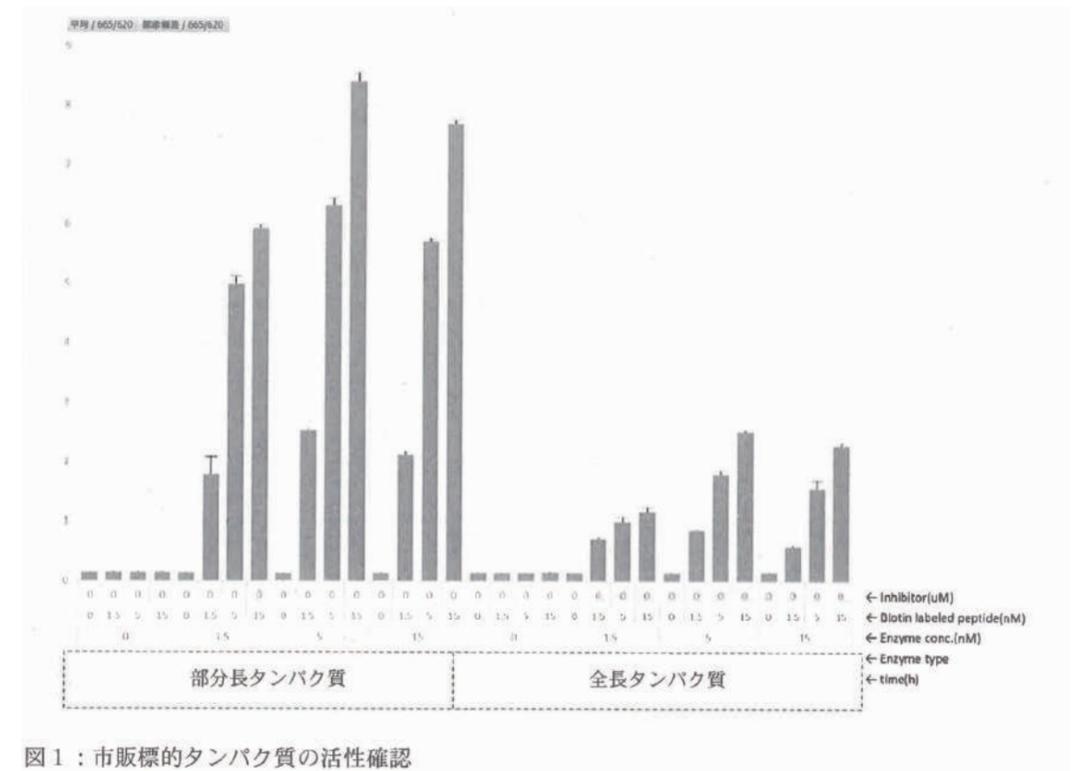


図1：市販標的タンパク質の活性確認