

健康安心イノベーションプログラム
「後天的ゲノム修飾のメカニズムを活用した
創薬基盤技術開発」
2010年度～2014年度 5年間
(中間評価)

プロジェクトの概要【公開】

NEDO
バイオテクノロジー・医療技術部
2012年7月9日

1/44

発表内容

公開

1. 事業の位置付け・必要性について (1)NEDOの事業としての妥当性
(2)事業目的の妥当性
2. 研究開発マネジメント (1)研究開発目標の妥当性
(2)研究開発計画の妥当性
(3)研究開発実施の事業体制の妥当性
(4)研究開発成果に係る知財マネジメント
(5)情勢変化への対応
3. 研究開発成果 (1)中間目標の達成度
(2)研究開発項目毎の成果
(3)知財と標準化
(4)成果の普及
(5)成果の最終目標の達成見通し
4. 実用化の見通し (1)成果の実用化可能性
(2)実用化までのシナリオ

2/44

事業の背景(1/3)

- 2003年の全ヒトゲノム解読完了により、疾患と遺伝子の関係が解明されることが期待されたが、ゲノム配列の異常のみで説明がつく疾患はごく一部であった。
- 後天的にゲノムに加わるエピゲノム異常が疾患の原因となることが明らかになってきたが、数年前まではエピゲノムを網羅的に解析することは技術的に困難であった。
- 次世代シーケンサーの性能向上に伴い、エピゲノム解析が飛躍的に加速ははじめ、エピゲノム研究の国際競争が熾烈になってきた。

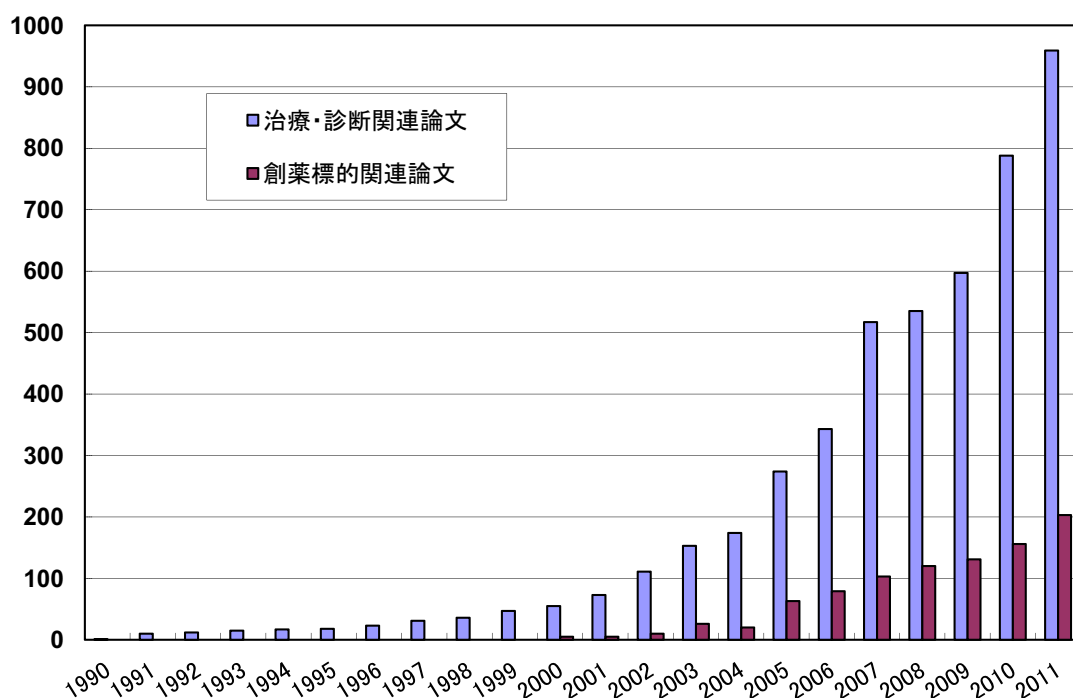
事業の背景(2/3)

- エピゲノム研究は、
 - ✓ 現時点では基礎研究的な要素が強く、短期的な視野での実用化(新規医薬品の開発等)は見込めない
 - ✓ 解析装置の導入・専門的人材育成に要する費用が大きい
 - ✓ 疾患エピゲノム研究には臨床検体を入手する必要がある
- 日本では、製薬企業が独自に研究開発を進めるにはハードルが高いため、大学等の研究機関を中心に研究が進められているのが現状である。

事業の背景(3/3)

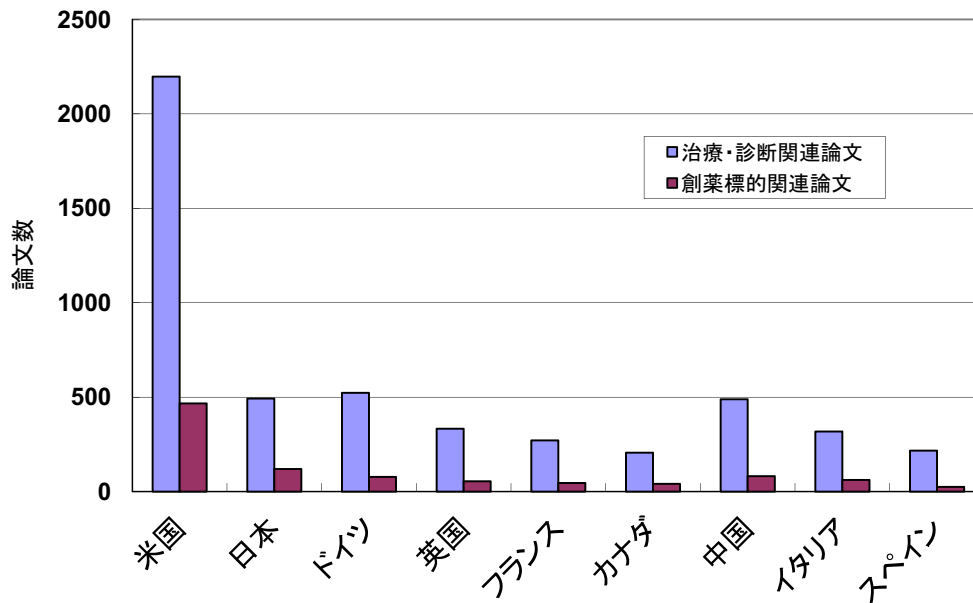
- 欧米では、豊富な資金力を背景に、ベンチャー企業を中心として、基礎研究成果を活用した医薬品や診断法の開発が加速している。
- 日本は、エピゲノムの基礎研究において世界の上位に位置しているものの、これを日本発のエピゲノム創薬に展開する事業基盤が確立されていない。
- 日本の大手製薬企業は、欧米のベンチャー企業と提携してエピゲノム医薬品の開発に着手しているのが現状である。

国内外の研究開発の動向:エピゲノム関連論文の年次推移



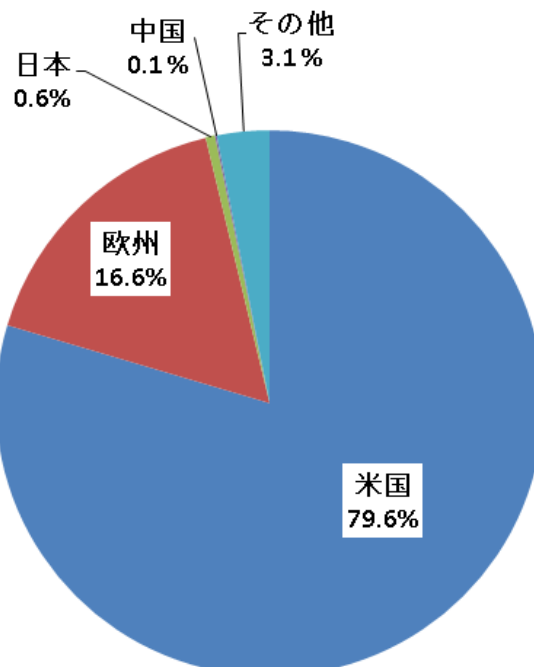
Web of Science®(Thomson Reuters)をもとに作成

国内外の研究開発の動向： エピゲノム関連の国別論文数(2000～2012年)



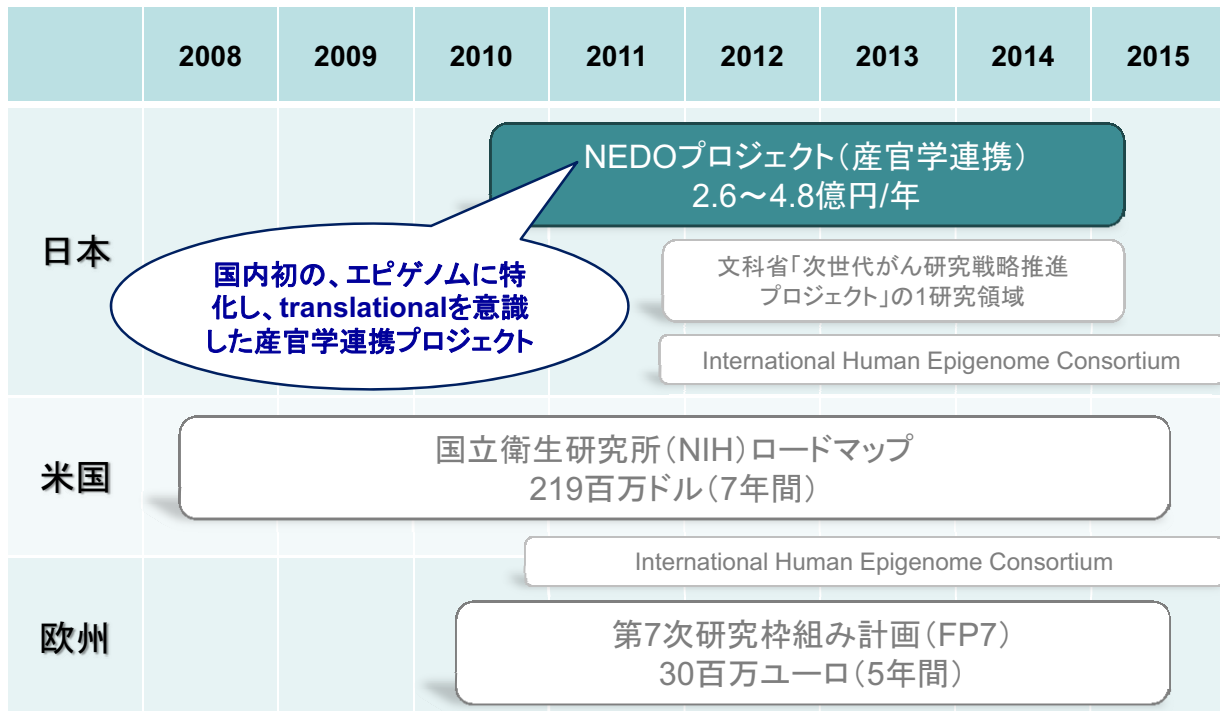
Web of Science® (Thomson Reuters)をもとに作成

国内外の研究開発の動向： エピゲノム関連国際特許の国別出願状況 (2006～2009年 全13,804件)



NEDO平成21年度「創薬診断分野技術
戦略調査事業」より引用

国内外の研究開発の動向：国家予算規模



NEDOが関与する意義

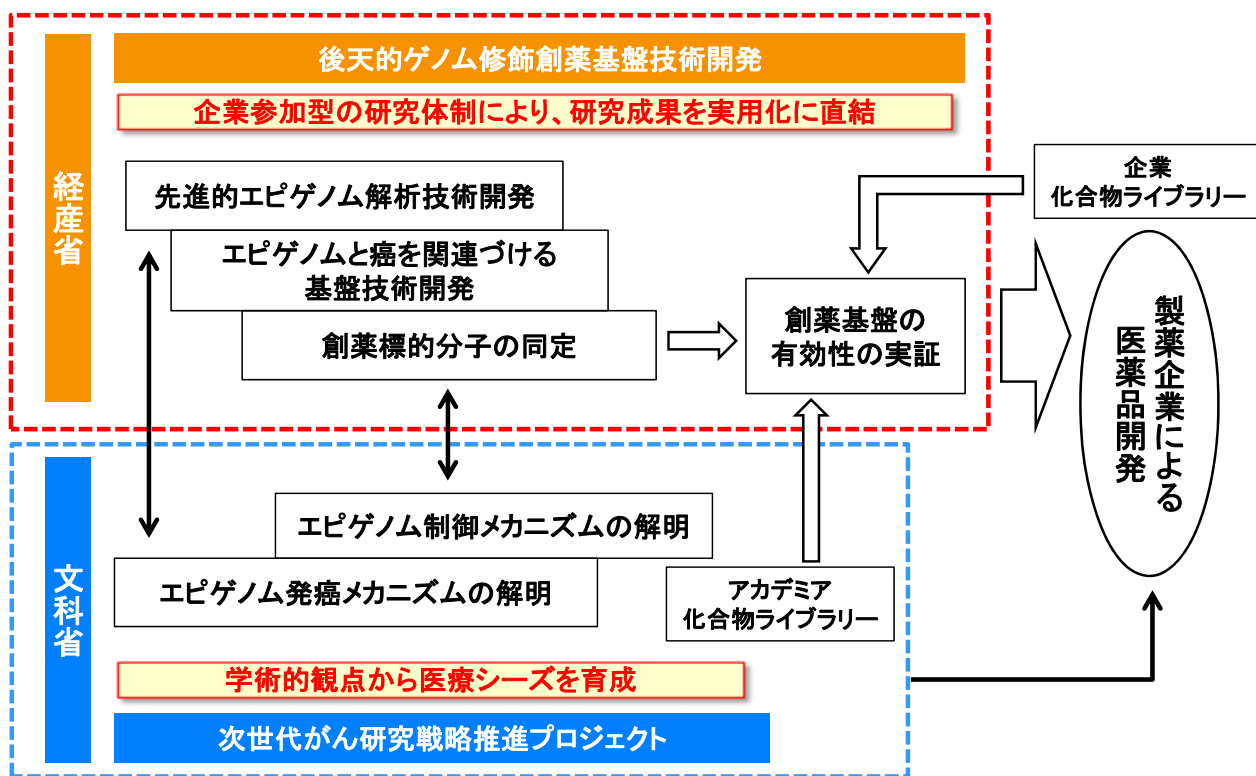
- 日本発の画期的な新薬創製を実現し、日本の医薬品産業の国際競争力を強化するためには、エピゲノムの基礎研究成果を学から民へシームレスに移管する体制が必要である。
- そのためには、産官学一体となった研究開発基盤を国の支援のもとで構築することが不可欠である。

事業の位置付け(1/2)

科学・技術重要施策アクションプラン「ライフイノベーション」



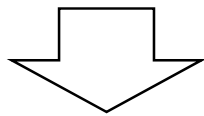
事業の位置付け(2/2)



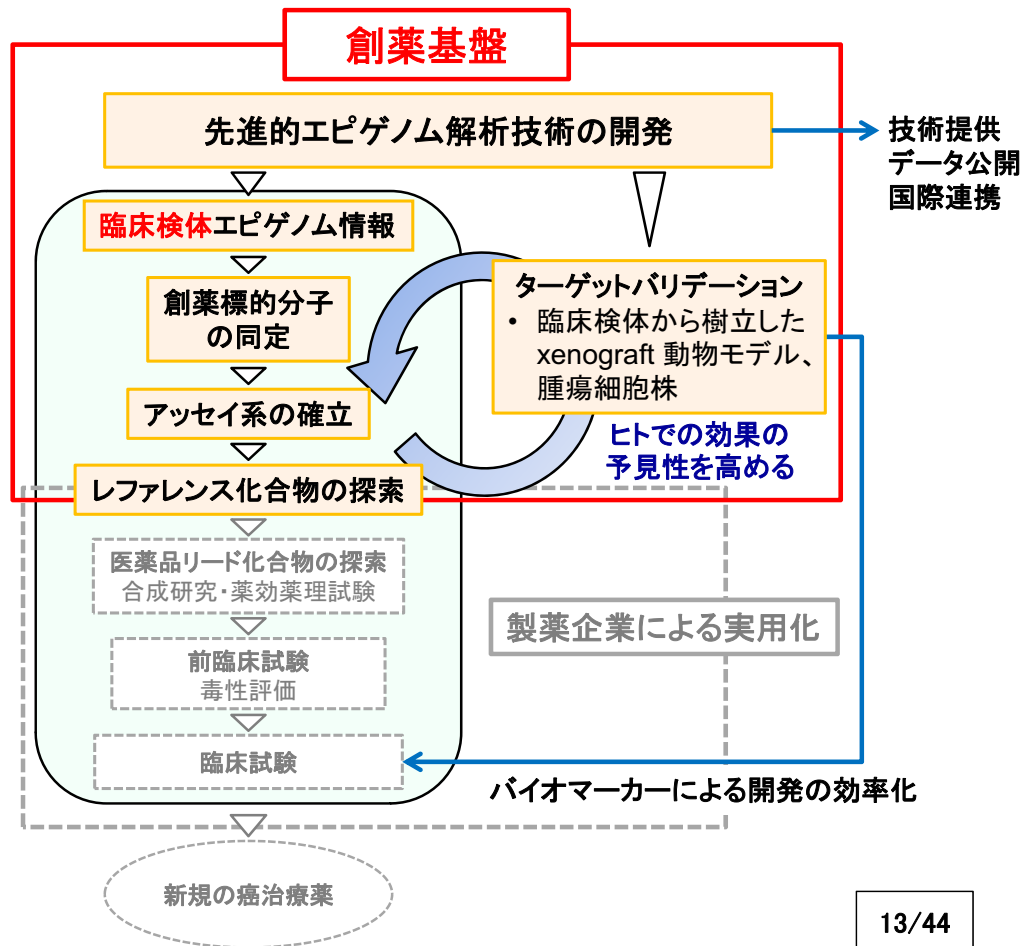
事業の概要

創薬基盤

Chemical genomics
 エピゲノムの創薬標的としての妥当性を、chemical (低分子化合物およびペプチド)を用いて検証することにより、創薬基盤を構築する。



医薬品開発の効率化



実施の効果

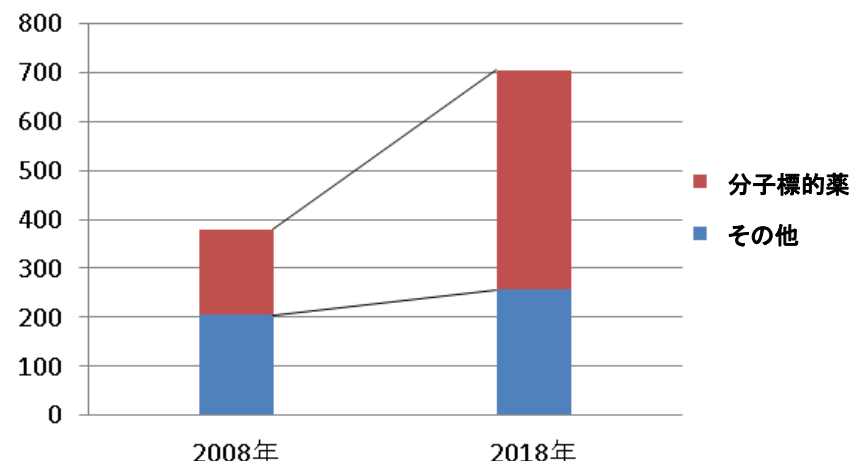
【画期的な治療法の開発】

- エピゲノム治療薬は、治療法のない癌に対する画期的な新薬になり得る。

【医薬品産業の国際競争力強化】

- 癌治療薬市場の今後の成長ドライバーはエピゲノム治療薬を含む分子標的薬であり、2018年の主要7ヶ国における市場規模は、分子標的薬だけで4兆円超と予想されている。
- 現在上市されているエピゲノム癌治療薬の4剤で、2009年度時点の売上高は520億円を超えており、その後も成長が期待されている。

(億ドル) 主要7ヶ国*における癌治療薬の市場予測

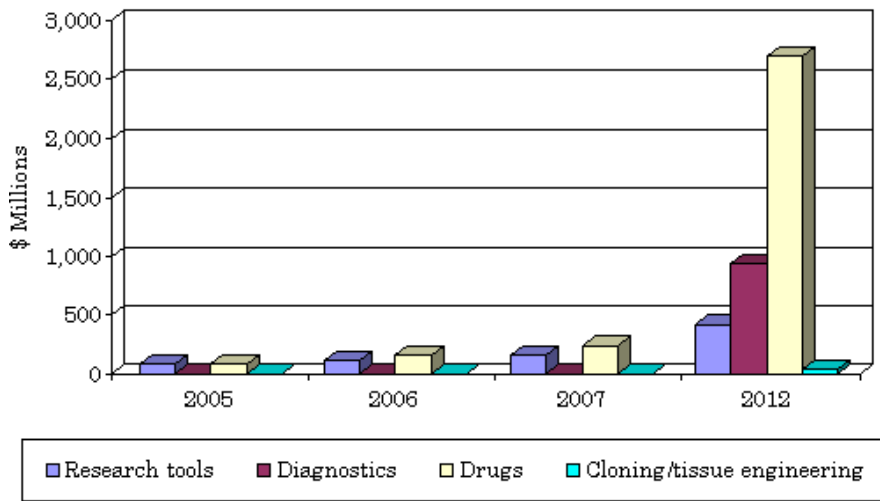


* 日本、米国、カナダ、イギリス、フランス、ドイツ、イタリア

DATAMONITOR フォーカスインサイトより引用

実施の効果

エピゲノム関連製品の世界市場動向



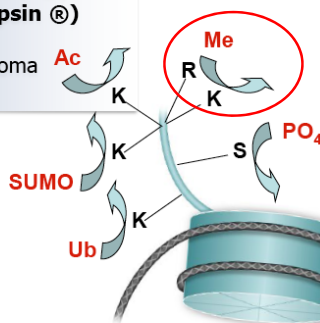
BCC Researchウェブサイトより引用

- 最も研究の進んでいるDNAメチル化酵素及びヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤が、ようやく上市にこぎつけたところ。
- 本プロジェクトが注力するヒストンメチル化酵素及びヒストン脱メチル化酵素をはじめとするエピゲノムを制御する薬剤はまだ存在しない。
- ヒストンメチル化酵素及びヒストン脱メチル化酵素は大きな酵素ファミリーを形成しているため、これらを標的にすることで、より特異性の高い画期的な癌治療薬開発が期待できる。

ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤

Vorinostat (Zolinza®)
 Istodax (Romidepsin®)

Cutaneous T-Cell Lymphoma



DNAメチル化酵素阻害剤

5-Azacitadine (Vidaza®)
 Decitabine (Dacogen®)

Me
 CpG
 Myelodysplastic Syndrome

1. 事業の位置付け・必要性について

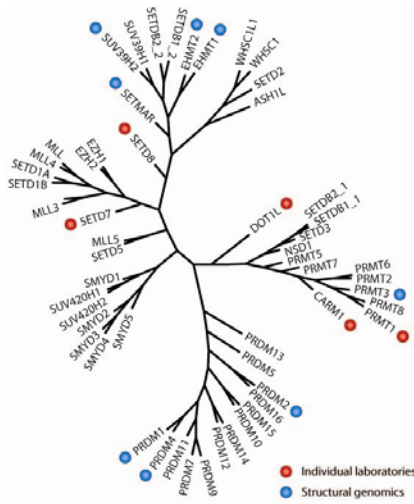
(2) 事業目的の妥当性

公開

ヒストン修飾を制御するタンパク質

Writer (メチル化酵素)

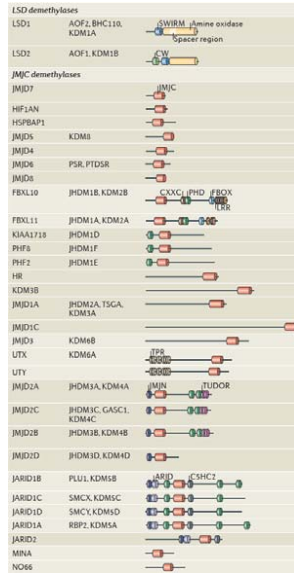
SETドメインタンパク質



Edwards A. 2009.
Annu. Rev. Biochem. 78:541-68

1999年に最初の報告

Eraser (脱メチル化酵素)

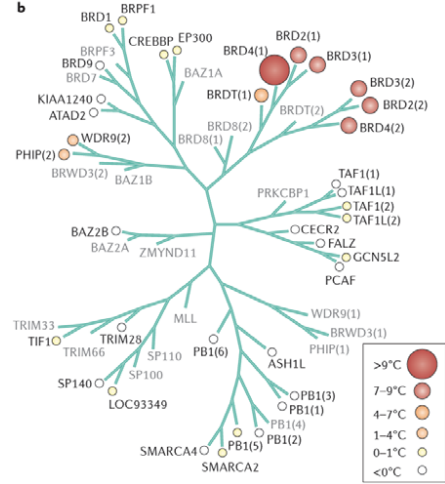


Nat Rev Mol Cell Biol 2012

2004年に最初の報告

Reader (修飾状態認識タンパク質)

Bromoドメインタンパク質



Nat Rev Cancer 2012

事業原簿 8頁

17/44

2. 研究開発マネジメント

(1) 研究開発目標の妥当性

公開

事業の目標

- 後天的ゲノム修飾を制御する薬剤開発を推進するための基盤を構築する。
- 5つ以上の創薬・診断標的分子を同定し、構築した創薬基盤の妥当性を実証する。

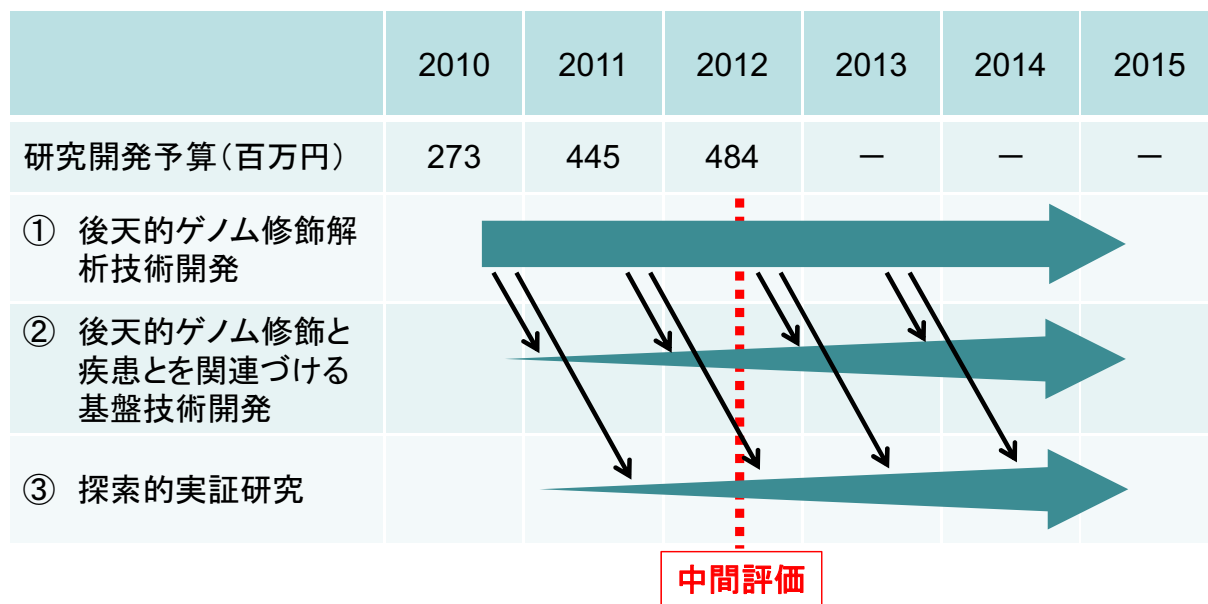
研究開発項目

- ① 後天的ゲノム修飾解析技術開発
 - ・ 高感度なエピゲノム解析技術を開発する。
- ② 後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発
 - ・ エピゲノムを制御する創薬標的分子を同定する。
- ③ 探索的実証研究
 - ・ 創薬標的分子としての妥当性を実証する。

事業原簿 10頁

18/44

研究開発のスケジュールと予算



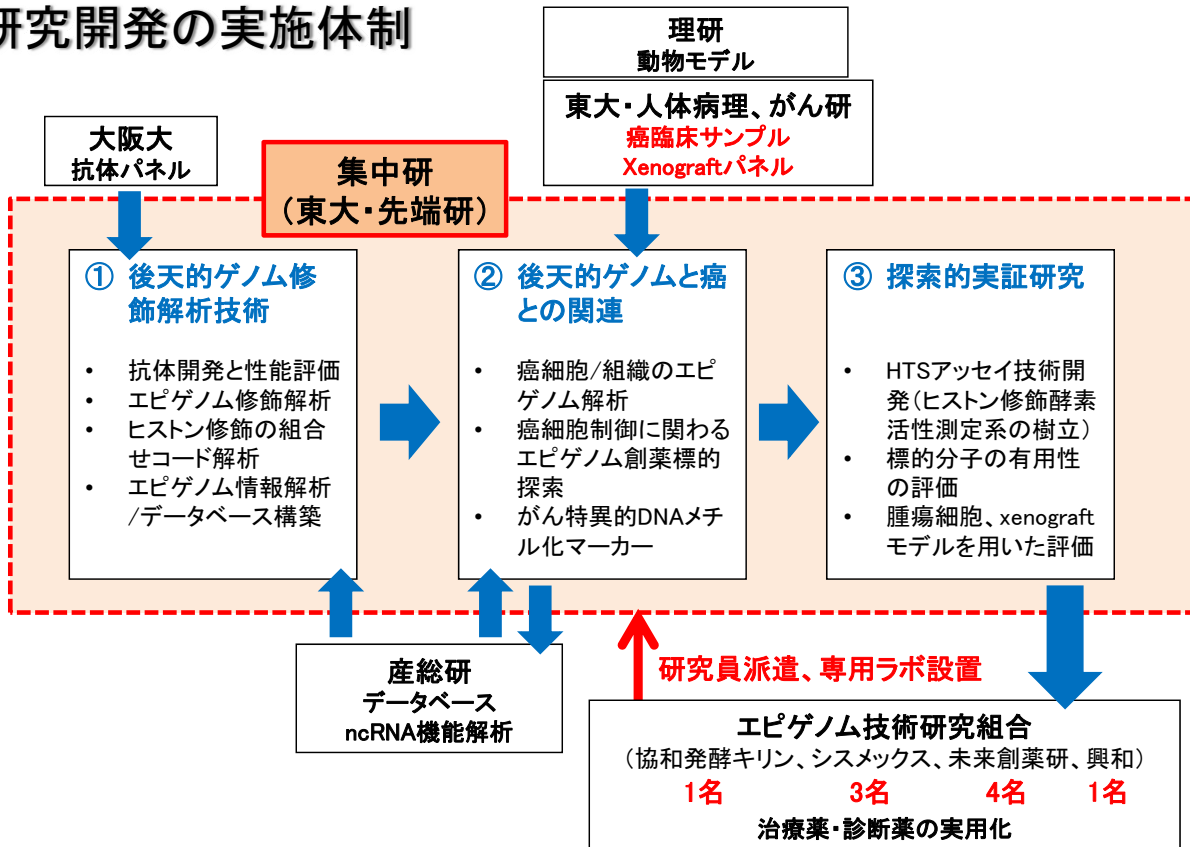
研究開発予算の内訳

(単位: 百万円)

	平成22年度	平成23年度	平成24年度	総額
一般会計	273	265	484	1,022
加速資金	0	180	0	180
総額	273	445	484	1,202

(3) 研究開発実施の事業体制の妥当性

研究開発の実施体制



(3) 研究開発実施の事業体制の妥当性

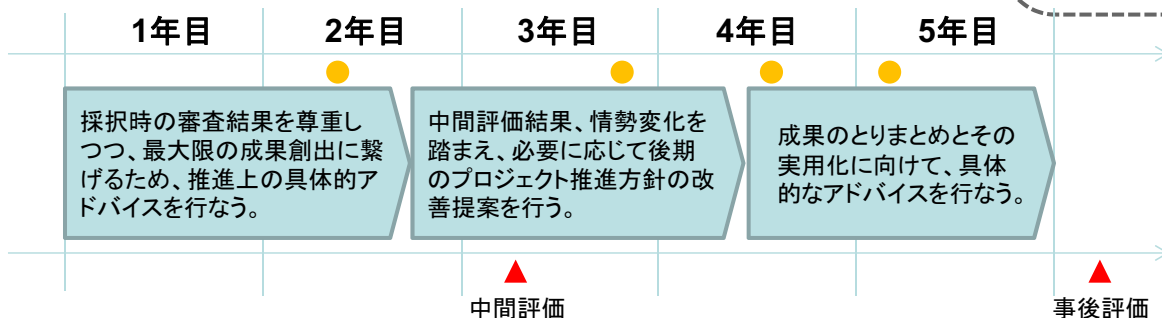
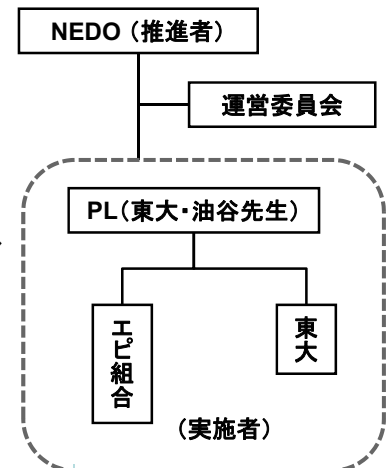
研究開発の運営管理(1/2)

○運営委員会の設置

- ✓ 運営委員会は、中立的な立場から、プロジェクトをより効率的かつ効果的に遂行するため、プロジェクト全体の運営に対する提言をNEDO及びPL・SPLに行なうことを目的としてNEDO内に設置する。
- ✓ 中立性を保つため、プロジェクトに直接携わらない外部有識者で運営委員会を構成するものとする。なお、採択時の審査結果との連続性を担保するため、採択審査委員を複数名、委員に加えることとする。

○運営委員

西村善文(委員長/横浜市立大学)、吉田稔(委員長代理/理化学研究所)、伊藤隆司(東京大学)、伊藤武彦(東京工業大学)、久保田健夫(山梨大学)



➢ 別途、1年目および2年目にプロジェクト推進会議を開催し(計2回)、プロジェクトの進捗、実施計画等の妥当性を確認した。

研究開発の運営管理(2/2)

第1回プロジェクト運営委員会(平成24年3月1日開催)

事業全体に関する委員会コメント

- プロジェクトの構成(研究開発項目、体制等)もよく、概ね順調に進捗しており、今後の成果が期待できる。
- 本プロジェクトが目指すのは創薬基盤技術の構築であり、創薬そのものはまだ先であることを明確にした方がよい。
- 一方で、早い段階から企業ニーズを取り込み、企業と連携して実施することが重要。

各論:委員からのコメント

- Xenograftモデルはvivoを反映する重要なモデル系として期待できるが、早い段階でその有用性を示すことが必要。 ⇒ スライド35
- Non-coding RNAとエピゲノム解析の関連を明らかにすることが必要。 ⇒ スライド36

- 「独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構新エネルギー・産業技術業務方法書」第25条の規定等に基づき、原則として、全て受託先に帰属させるものとする。
- エピゲノム技術研究組合においては、知財に関する規約を定め、実用化に向けた戦略を踏まえて参画企業の権利範囲を明らかにした上で、参画企業とアカデミアの共同で特許出願することを原則としている。

加速財源投入実績

時期	金額 (百万円)	情勢	成果
平成23年8月	180	米国、欧州では、次世代シーケンサーや最新式質量分析装置などを数十～数百台規模で導入しており、我が国の研究成果創出スピードが大きく遅れをとりつつあった。	本加速資金投入により次世代シーケンサー、最新式サンプル前処理装置、超高分解能質量分析計、データサーバを導入し、エピゲノム解析が加速された。

事業全体の達成度

成果	達成度
<ul style="list-style-type: none"> ➤ エピゲノム標識、とくにDNAメチル化の異常パターンが前癌病変である腺腫の段階で既に形成されていることを明らかにし、数十万に及ぶCpGサイトを半定量的に測定可能なマイクロアレイの開発を支援し、スクリーニングマーカーとしてのDNAメチル化マーカー開発を様々な癌種において進めた。 ➤ 数十に及ぶヒストン修飾につき、個別のヒストン分子でどのような修飾が組み合わされているかについて、高感度LC/MS/MSを用いて数十種類の組み合わせパターンが細胞周期を通じてダイナミックに変動することを見いだした。 ➤ 標的タンパク質5分子について、アッセイ系を確立した。 	○

◎ 大幅達成、○ 達成、△ 達成見込み、× 未達

3. 研究開発成果 (1)中間目標の達成度

公開

研究開発項目毎の達成度(1/2)

研究開発項目	成果	達成度
① 後天的ゲノム修飾解析技術開発	<ul style="list-style-type: none">数十万に及ぶCpGサイトを半定量的に測定可能なマイクロアレイの開発を支援した。クロマチン解析の感度を10倍以上向上させ、特異性の高い抗体開発も推進した。全ゲノムバイサルファイトシーケンシングを実施すると共に、DNA脱メチル化に関わるヒドロキシメチルシトシンの局在解析系を確立した。高感度LC/MS/MSを用いて数十種類のヒストン修飾組み合わせパターン検出を可能とした。	○
② 後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発	<ul style="list-style-type: none">アーカイブを用いた組織アレイによる迅速解析手法を構築した。創薬研究に繰り返し利用可能な腫瘍組織試料として xenograft の系統的樹立を行った。スクリーニングマーカーとしてDNAメチル化マーカー開発を様々な癌種において進めた。数千に及ぶncRNAをRNA-seqおよびエクソンアレイによって検討し、腫瘍組織で発現増加し、細胞増殖を亢進させるncRNAを同定した。新たに創薬標的候補として7分子を同定した。	◎

事業原簿 23頁

27/44

3. 研究開発成果 (1)中間目標の達成度

公開

研究開発項目毎の達成度(2/2)

研究開発項目	成果	達成度
③ 探索的実証研究	<ul style="list-style-type: none">細胞周期にともなうヒストン修飾プロファイルを取得した。当初実証的探索研究としてかかげた4標的分子を含めて、合計11分子の機能解析が現時点で進行中である。そのうち5分子の標的分子としての妥当性を検証するために、3分子については<i>in silico</i>手法を用いて活性阻害化合物を得たほか、1分子については従来型のハイスループットスクリーニング、3分子については結合ペプチドスクリーニングにより活性阻害化合物を探索している。	○

事業原簿 23頁

28/44

①後天的ゲノム修飾解析技術開発の概要

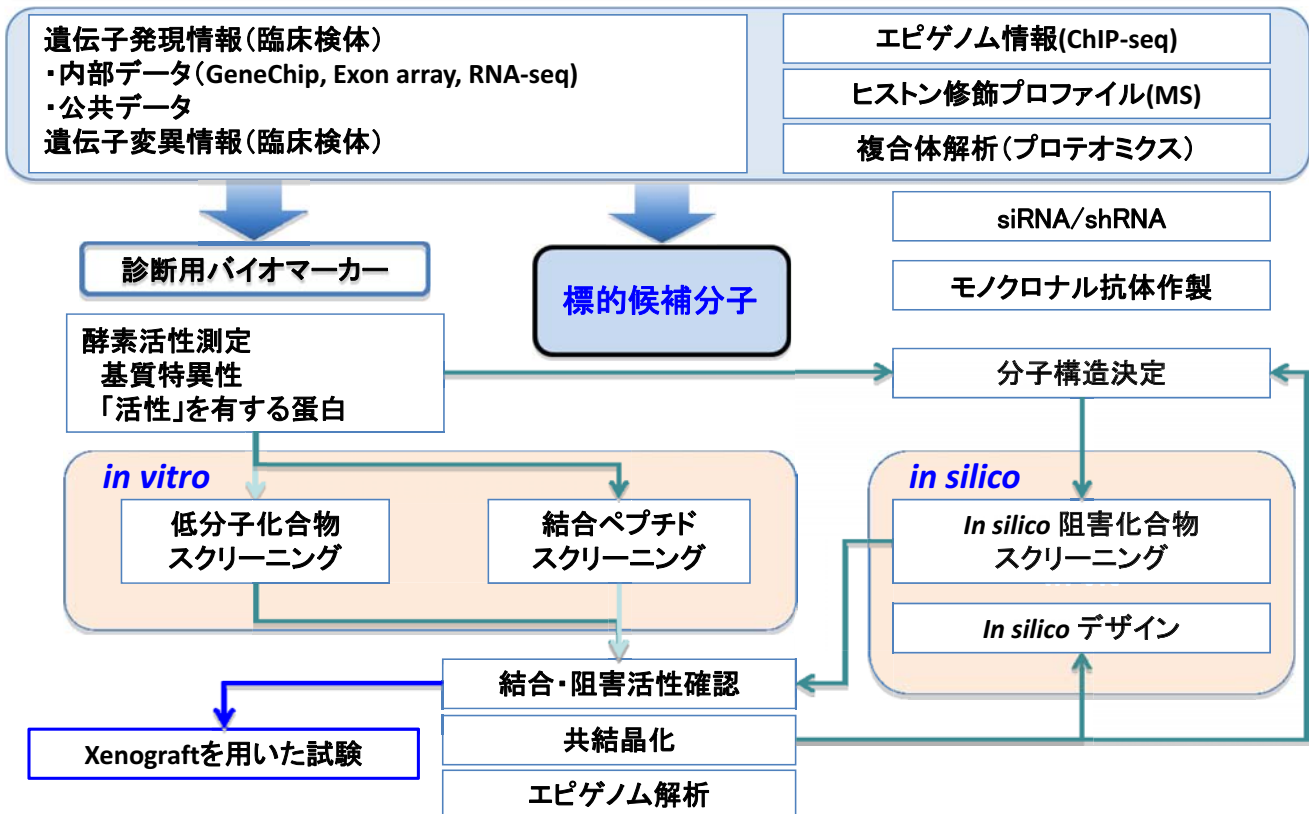
(1) 後天的ゲノム制御に関わるヒストン修飾等についての高感度かつ網羅的な解析技術の開発

- ① DNAメチル化の網羅的解析技術開発(東大先端研)
 - ・ メチル化アレイの高密度化
 - ・ ヒドロキシメチルシトシンの検出系
- ② 高感度エピゲノム解析技術開発(東大分生研)
 - ・ ChIP-seq解析の高感度化
- ③ 修飾ヒストン抗体パネルの研究開発(阪大)
 - ・ 特異的モノクロナル抗体の作成
- ④ ヒストンテール修飾の系統的解析技術開発(東大先端研)
 - ・ 質量分析によるヒストン修飾組み合わせ解析法

(2) エピゲノム情報解析基盤技術の開発(産総研)

- ・ データベース構築
- ・ 新規ncRNAの同定

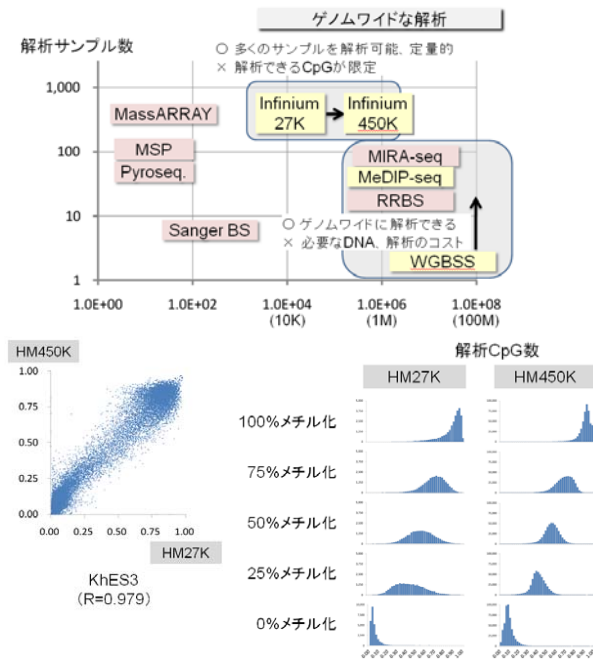
②後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発 及び ③探索的実証研究の概要



(2) 研究開発項目毎の成果
① 後天的ゲノム修飾解析技術開発

DNAメチル化の網羅的解析技術開発

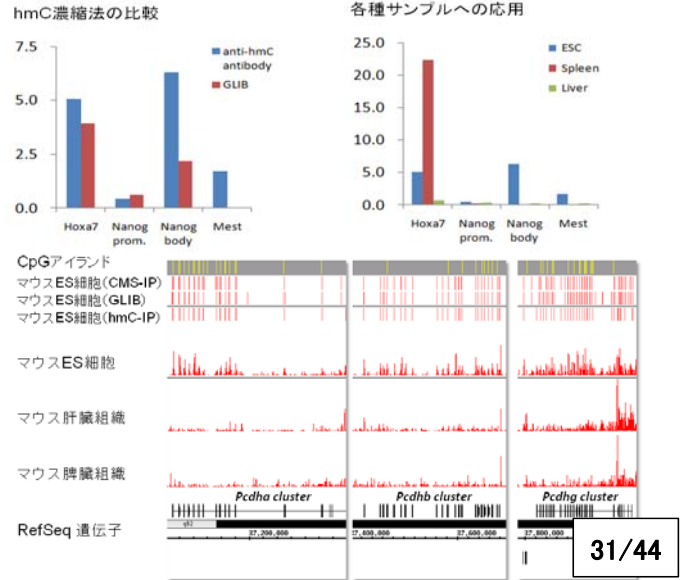
DNAメチル化は癌化に際してダイナミックに変動することが知られ、**定量性を有した網羅的解析技術**が求められる。Infiniumアッセイの高密度450Kアレイ開発に際してプローブデザインに協力した。



ハイドロキシメチルシトシンの検出系

ハイドロキシメチルシトシン (hmC) は脱メチル化プロセスに関わるDNA修飾として近年注目されている。バイサルファイト変換法のみではメチルシトシン (mC) との判別が不可能なため、抗hmC抗体を用いた免疫沈降 (hmDIP) のゲノムワイドな検出系を確立した。

以下にhmDIP法により、マウスES細胞のhmC修飾領域を濃縮した。ビオチン付加グルコースを反応させて回収するGLIB法と比較しても、遜色ない濃縮効率であり、ES細胞以外にマウス正常臓器のゲノムDNAでも検出した。



(2) 研究開発項目毎の成果
① 後天的ゲノム修飾解析技術開発

修飾ヒストン抗体パネルの研究開発 (大阪大学)

微量検体のエピゲノム解析のためには、高い特異性と親和性を有する抗体が必要である。高い再現性を保証するためにはポリクロナル抗体に対して同等あるいは高性能なモノクロナル抗体の開発が必須である。

親和性: 表面プラスモン共鳴 (BIAcore) による測定で pM レベルの低い解離定数を示す抗体は高い親和性を持つ。生細胞内での抗体の抗原への結合時間を FRAP (光褪色後蛍光回復法) により測定した結果は、*in vitro* の親和性を反映した。

特異性: 点変異体や組換え体、修飾ペプチドなどを用いて詳細に解析した。

少数細胞集団における細胞周期の同定が可能となり、これらの抗体は薬効の評価等に应用できると考えられる

Name	Residue	Modification	Subclass	Allowance	Occlusion
CMA400 (9C5)	H4(21-29)	unmodified	IgG2b-κ	K20-modified	
CMA401 (11D2)	S1	phospho	IgM-κ		
CMA405 (4A7)	K5	acetyl	IgG1-κ		K8-acetyl
CMA408 (72A9)	K8	acetyl	IgG1-κ	K5-acetyl K12-acetyl	
CMA412 (50B3)	K12	acetyl	IgG1-κ	K8-acetyl K16-acetyl	
CMA416 (1B2)	K16	acetyl	IgG1-κ	K12-acetyl K20-acetyl, K20-methyl	
CMA420 (6D6)	K20	acetyl	IgG2a-κ	K16-acetyl	
CMA421 (15F11)		monomethyl	IgG1-κ	K16-acetyl	
CMA422 (2E2)		dimethyl	IgG1-κ		K16-acetyl
CMA423 (27F10)		trimethyl	IgG1-κ	K16-acetyl	

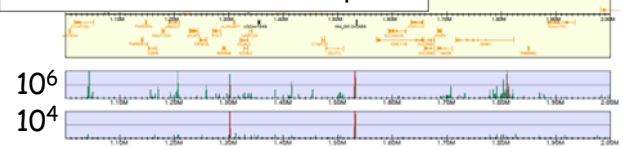
表 H4 特異的抗体クローン

エピゲノム解析の高感度化 (東京大学)

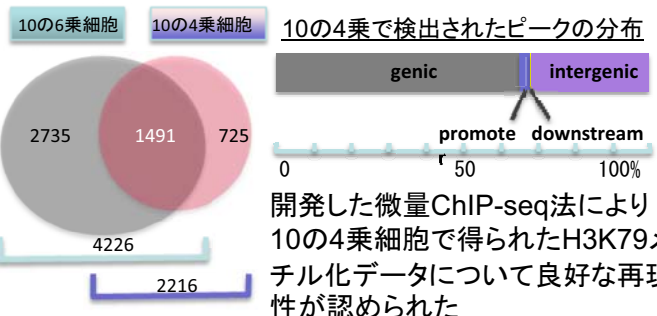
クロマチンとタンパクとの結合プロファイルを取得するために、現行の ChIP-seq 解析では 10 の 7 乗を超える細胞を必要とする。創薬、診断等への応用を考えた場合に微量組織、微量細胞での解析技術の開発が望まれる。

免疫沈降実験で超音波処理による DNA の物理的断片化は重要なステップであるが、少数細胞を用いた際に DNA 断片効率の低下が見られた。また、微量 DNA から増幅する際にバイアスがもたらされる。

H3K79メチル化のChIP-seq解析



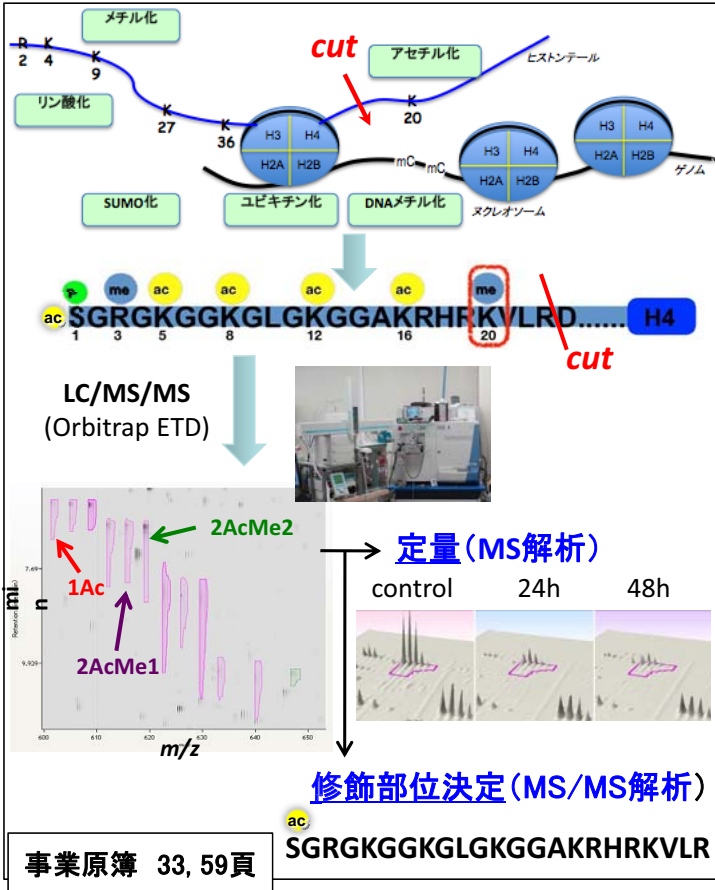
10の6乗と4乗で検出されたピークの重なり



開発した微量ChIP-seq法により 10の4乗細胞で得られたH3K79メチル化データについて良好な再現性が認められた

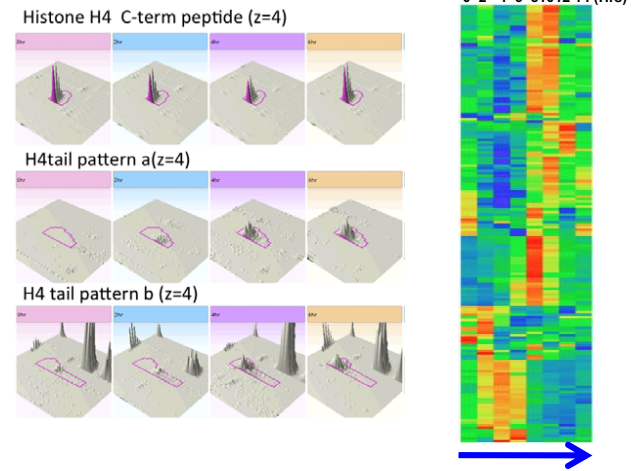
(2) 研究開発項目毎の成果
① 後天的ゲノム修飾解析技術開発

ヒストンテール修飾の系統的解析技術開発及びその検証



ヒストンH4テールの修飾組み合わせパターン変化を比較定量する技術を確認した。ヒストンをプロテアーゼ処理しH4テールを切り出す。それを質量分析計で測定しMSで定量を、MS/MSで修飾位置の決定を行う手法で解析する。

解析例: 細胞周期でのヒストンH4テールの修飾組み合わせの変化



C末端のペプチドでタンパク量のノーマライズを行い、ヒストンテールのそれぞれの修飾組み合わせパターンの経時的変化を解析する。

(2) 研究開発項目毎の成果
① 後天的ゲノム修飾解析技術開発

エピゲノム情報解析基盤技術の研究開発(産業技術総合研究所、東京大学先端研)

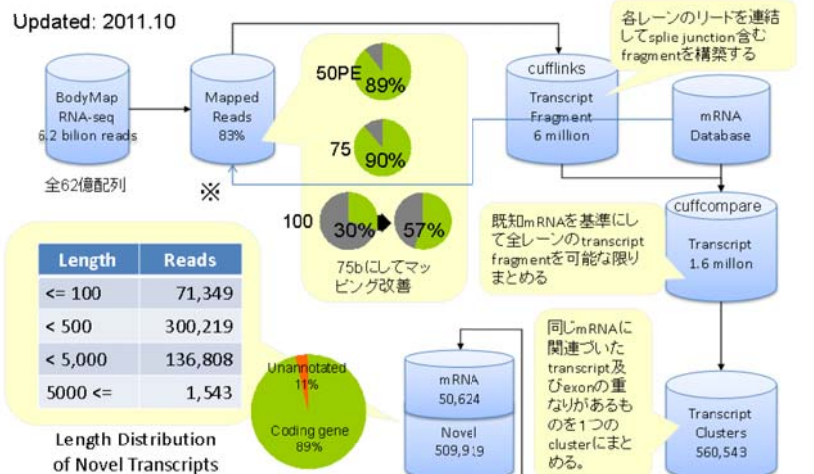
既存エピゲノム情報の網羅的収集

多数のエピゲノム情報が世界の研究機関から公開されており、発表論文の補遺等として散在するデータもあり、本プロジェクトに有用と思われるデータを網羅的に収集し、内部データベースに追加した。現時点で、10種のデータを追加しており、今後も継続して追加する予定である。

新規lincRNA候補の情報学的抽出

エピゲノム制御因子として注目される長鎖のncRNAを検出するために、Illumina BodyMapおよび本プロジェクトで取得した様々なヒト組織のRNA-seqデータに対する独自の解析パイプラインを開発した。これによって、新規のlincRNA候補396個が得られた。

BodyMap RNA-seq Data Analysis Pipeline



Splice junctionを考慮したマッピング精度向上のため 東大谷研の上田氏提案の手法を利用



(2) 研究開発項目毎の成果

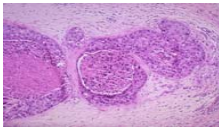
② 後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発

臨床検体の収集と病理解析(東京大学)

がん臨床検体のバンキング

- ・ 包括的エピゲノム解析のための高質な検体収集
- ・ 多数症例解析のためのがん組織アレイの作成

顕鏡による腫瘍部の確認 胃癌組織アレイの構築例



エピゲノム関連分子の探索によるがんのサブグループ化

- ・ 修飾ヒストン抗体を用いた臨床正常、がん組織の評価

正常諸臓器の組織、各種癌(食道癌、胃癌、大腸癌、肺癌3、肝細胞癌、膵癌、甲状腺癌)の組織アレイを用いて研究開発項目①-(1)-③の成果である修飾ヒストン抗体パネル25種類による染色条件を施行。

肝癌に対する多様な修飾ヒストン抗体に対する免疫染色

症例間、同一症例でもその部位によって染色性が異なる。一部では組織型や予後との相関が認められた。



Xenograft パネルの研究開発(がん研究会)

膵がん及び胃がん臨床検体の収集と Xenograft モデルの樹立

【目的】 エピゲノム修飾異常とがんとの解明に、腫瘍組織及び対照正常組織をペアとした臨床検体を収集する。加えて、手術症例から得られる検体のみでは採取量に限界があり、詳細な解析は極めて困難であるため、繰り返し使用可能な標準化されたサンプルの供給を可能とする Direct Xenograft モデルを樹立し、評価する。

がん種	年度	累積症例数	樹立数	成功率 (%)	腫瘍・正常組織をペアとして収集した累積検体数
膵がん	H18 ~ H21	47	13	28	
	H22	(+35) 82	27	33	
	H23	(+51) 133	34	26	(+46) 59
	H24	(+11) 144	34	24	
胃がん	H22	47	16	34	
	H23	(+54) 101	21	21	(+26) 60
	H24	(+28) 129	21	16	

【結果】 腫瘍及び正常組織をペアとした難治性がんの臨床検体は、膵がん及び胃がんでそれぞれ 59、60症例収集した。また、Direct Xenograft モデルの作成は、おのおの 144、129症例試み、34及び21ラインの樹立に成功し、各がん種で年間5ライン以上樹立するという当初の研究計画を遥かに上回る成果であった。

Direct Xenograft モデルの樹立と維持

Direct Xenograft はヒトがん検体を直接移植する動物モデル系で、生体内がん組織の性質を最も忠実に再現可能。

臨床検体

継代移植法

膵がん34及び胃がん21ラインは全て継代移植可能。膵がんXeno-6の継代6回目の腫瘍は、

- ・ 移植率: 5匹/5匹 = 100%
- ・ 生着率: 13ヶ所/15ヶ所 = 87%

凍結保存法

12ラインの膵がんXenograft 凍結腫瘍組織を融解し、NOD/SCID マウスへ移植した結果、

- ・ 移植率: 19匹/20匹 = 95%
- ・ 生着率: 48ヶ所/57ヶ所 = 84%

患者の肝転移巣

10X

初代の腫瘍

10X

10代目の腫瘍

10X

1) 膵がんの Xenograft の腫瘍は、患者組織型を維持

2) 抗ヒト及び抗マウスクラス I 抗体による染色パターンから、ヒトの間質はマウスの間質に置換。

35/44

(2) 研究開発項目毎の成果

② 後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発

エピゲノム制御の特異性を規定する非コードRNAの解析(東京大学先端研、産業技術総合研究所、協和発酵キリン)

ncRNA機能に基づいた特異性の高いエピゲノム制御技術の開発 ncRNAを介したエピゲノム修飾機構の破綻が癌化、癌の病態変化に重要な役割を果たしている可能性が想定される。エピゲノム制御を標的とした医薬品開発を目指す上で、エピゲノム制御の特異性を規定するncRNAの作用機構の解明は重要である。

1. ヒトの「ncRNA検索システム」の確立(図1)
2. 大腸癌細胞株を用いた細胞種特異的ncRNAの同定(図1)
3. 選択的RNAプロセッシングによるncRNA機能多様化機構の発見(図2):ヒト核内RNA制御因子のRNA干渉ライブラリーを用いて、乳癌細胞の転移能獲得に関わるncRNAをモデルRNAとしてスクリーニングを実施した結果、RNA結合蛋白が同定された。
4. ncRNAと相互作用するエピゲノム制御因子の発見(図3)

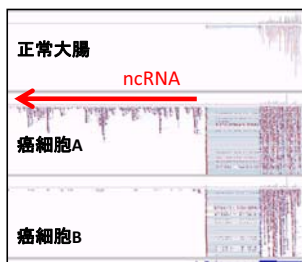


図1 ncRNA検索システムによる細胞種特異的非コードRNAの同定

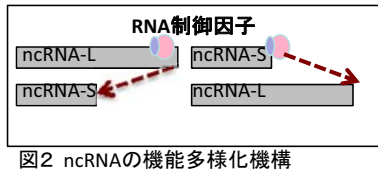


図2 ncRNAの機能多様化機構

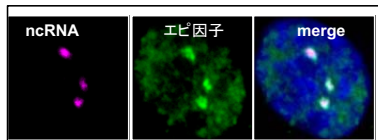
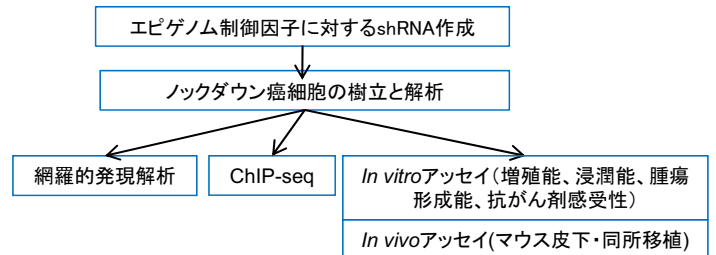


図3 ncRNAとクロマチン再構築因子複合体の共局在

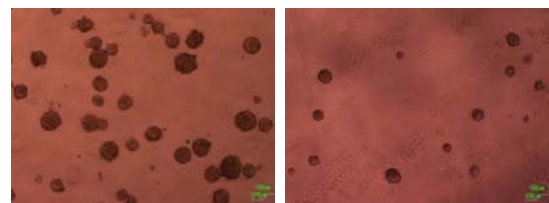
エピゲノム治療標的候補遺伝子の探索

(東京大学先端研、東京大学附属病院、未来創薬研、興和)

shRNAを用いた治療標的候補遺伝子の探索



EPI08発現抑制による大腸癌腫瘍形成能の減弱効果



Control

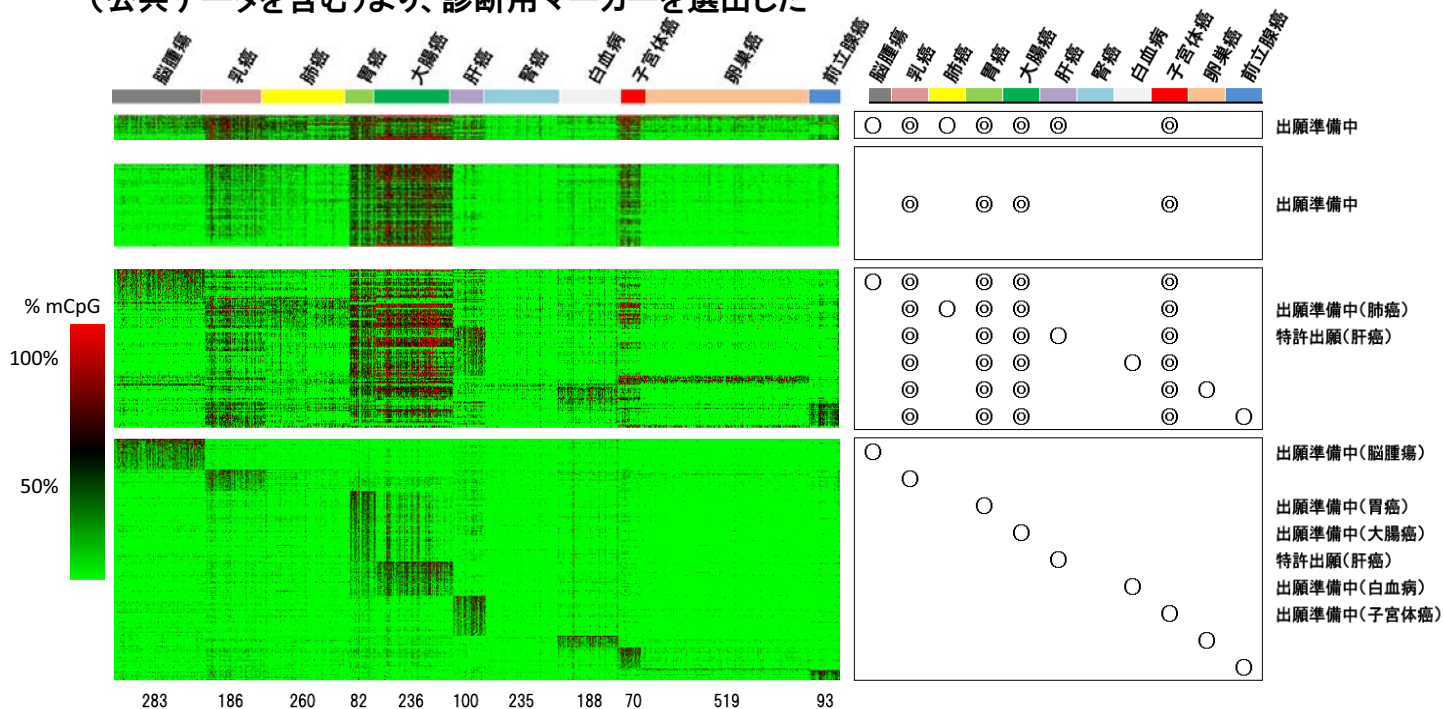
EPI08- KD

EPI08を含めて新たな創薬標的因子として7遺伝子、を同定し、合計11遺伝子について検証を進めている

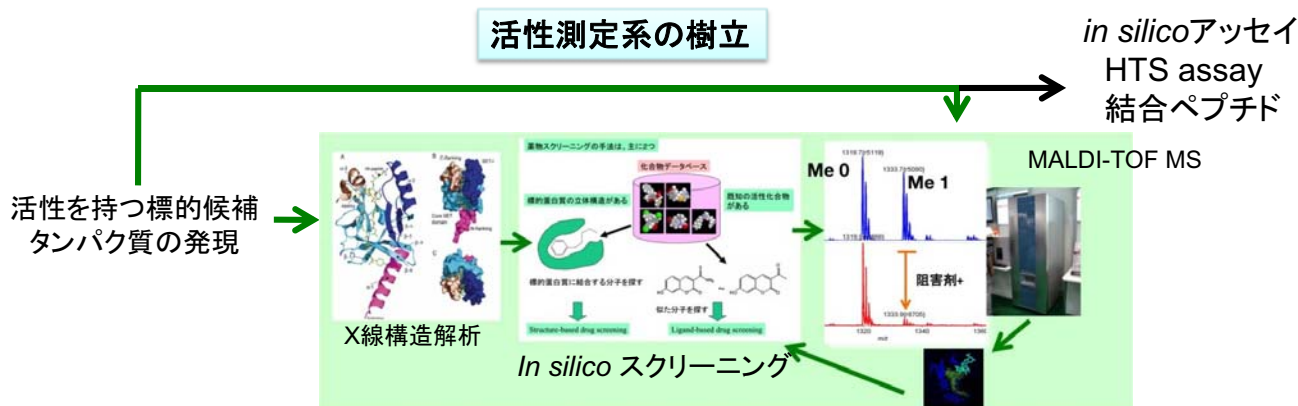
② 後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発

癌診断メチル化マーカーに関する研究開発

11癌腫の癌組織2,341例、非癌部組織479例、正常組織19例、正常血液93例のメチル化データ(公共データを含む)より、診断用マーカーを選出した



③ 探索的実証研究

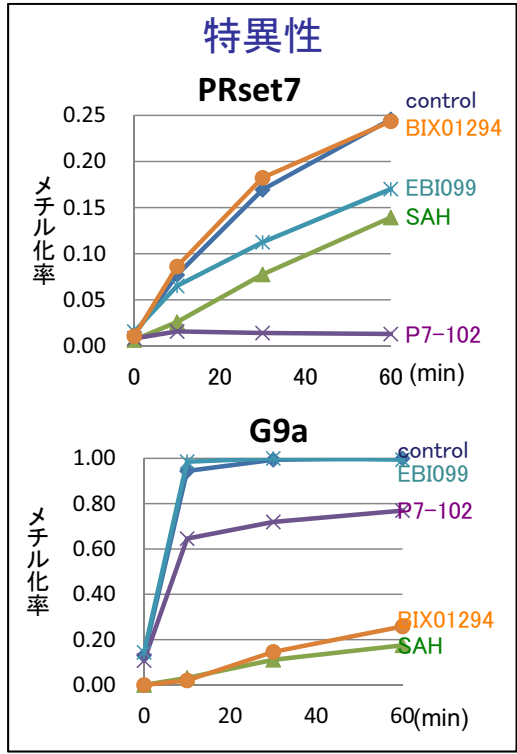
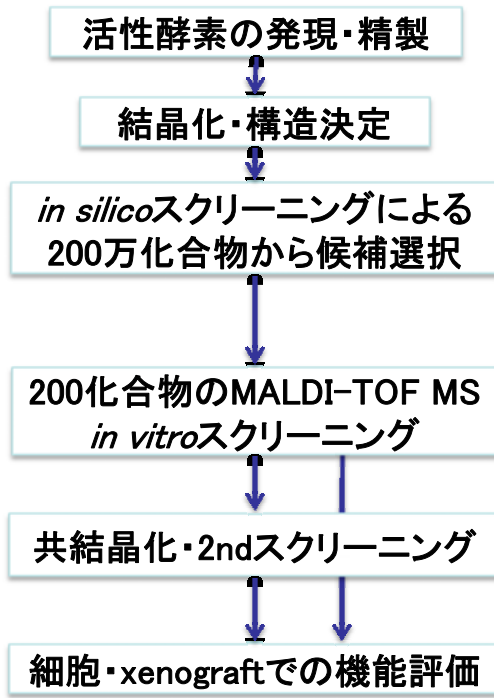
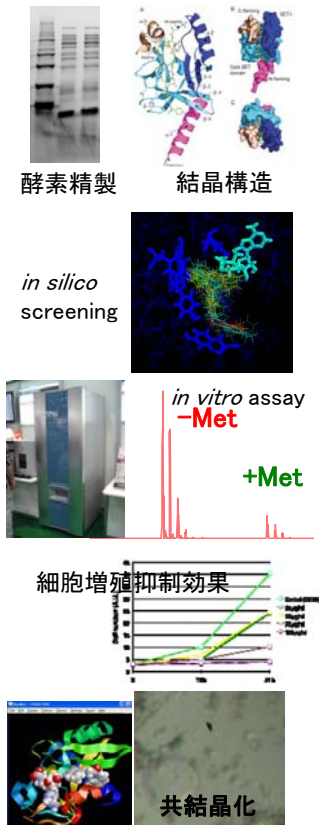


樹立したアッセイ系

標的分子	活性測定法	スクリーニング手法
PR-SET7 (H4K20)	MALDI-TOFMS	<i>in silico, in vitro</i>
G9a (H3K9)	MALDI-TOFMS	<i>in silico, in vitro</i>
EZH2 (H3K27)	α -screening	天然物ライブラリー
JMJD1A (H3K9脱メチル)	MALDI-TOFMS	<i>in vitro</i>
EPI05 (ヒストンメチル化)	autoradiography	<i>in silico, in vitro</i>

従来型のハイスループットアッセイに加えIT技術を用いた*in silico*、MALDI-TOF/MS質量分析計での活性測定での*in vitro*スクリーニングを行い化合物スクリーニングを行った。また、立体構造不明の場合には活性蛋白を用いた阻害化合物、結合ペプチドのスクリーニングも実施中である。

実証例: PR-SET7阻害剤スクリーニング



PR-SET7を特異的に阻害し、細胞増殖を抑制する化合物が得られ (EBI099)、その構造を元に2nd in silicoスクリーニングを進めた。その結果さらに阻害活性の高い化合物(P7-102)が得られている。

事業原簿 59頁

39/44

3. 研究開発成果

(3) 知財と標準化 及び (4) 成果の普及

	平成22年度	平成23年度	合計
国内特許出願	0	1*	1件
論文 (査読付き)	20	33	53件
学会発表	18	53	71件

* 国際出願予定

(5) 成果の最終目標の達成見通し

事業全体の達成見通し

最終目標 (平成26年度末)	達成見通し
<ul style="list-style-type: none"> ➤ 同定したエピゲノム創薬・診断標的候補の15分子に対してアッセイ法を構築し、5分子については創薬・診断の標的としての妥当性を実証することを目指す。 ➤ 臨床検体のエピゲノム解析技術の開発、改良により、現行の100倍以上の感度を目指す。 	達成見込み

(5) 成果の最終目標の達成見通し

研究開発項目毎の達成見通し(1/2)

研究開発項目	最終目標 (平成26年度末)	達成見通し
① 後天的ゲノム修飾解析技術開発	後天的ゲノム修飾の組み合わせコードを測定し系統的にマッピングするため、新たなヒストン修飾解析用抗体、ヒストン修飾酵素用抗体からなる抗体パネルを作成するとともに、質量分析法等を活用して、現在の100倍程度の高感度解析技術を開発し、微量検体での解析法を確立する。また、後天的ゲノム修飾解析データから有用な情報を効率的に選抜する、新たな標準的情報処理技術を確立する。	達成見込み
② 後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発	後天的ゲノム修飾と複数種類の癌とを関連づける後天的ゲノム修飾異常を同定するため、5種類程度の癌について解析を行い、疾患発症に関わる後天的ゲノム修飾異常を引き起こす原因因子等を同定するとともに、15個程度の創薬・診断標的候補分子を選定する。	達成見込み

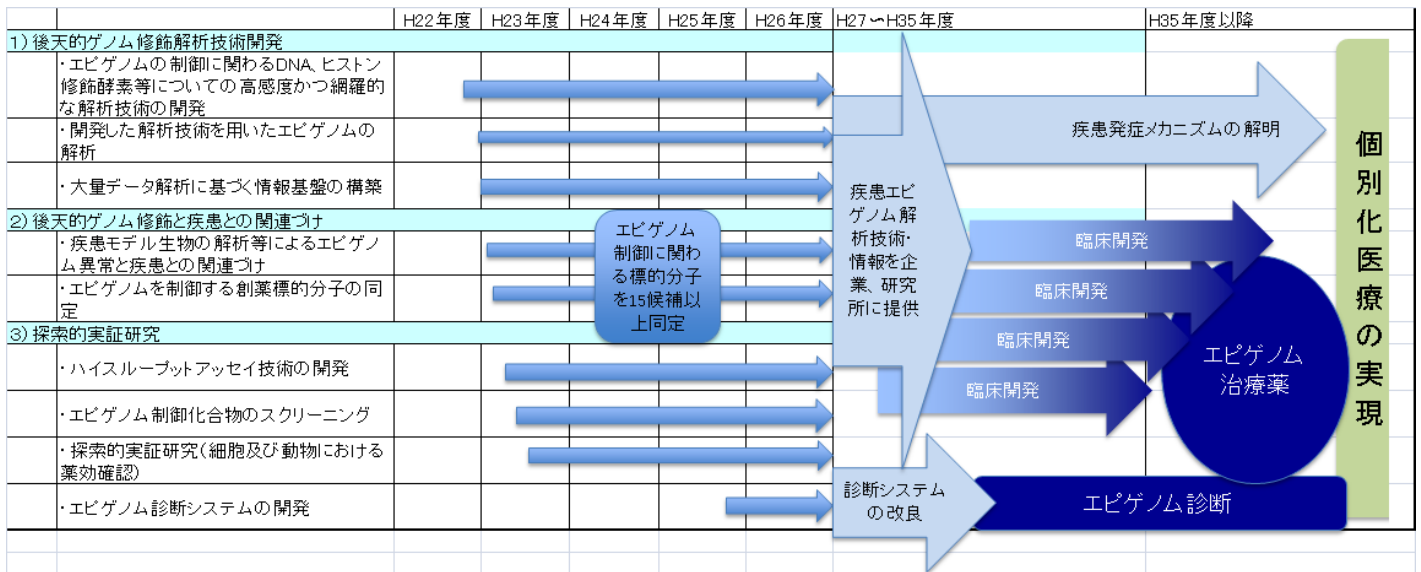
(5) 成果の最終目標の達成見通し

研究開発項目毎の達成見通し(2/2)

研究開発項目	最終目標 (平成26年度末)	達成見通し
③ 探索的実証研究	研究開発項目②で選定した15個程度の創薬・診断標的候補分子に対する高感度なハイスループットアッセイ法を構築し、そのうち5種類の標的候補分子について創薬・診断の標的としての妥当性を検証することにより、本事業で開発した後天的ゲノム修飾解析基盤技術の有用性を実証する。	達成見込み

4. 実用化の見通し

(1) 成果の実用化可能性 及び (2) 実用化までのシナリオ



Back-up

(2) 研究開発項目毎の成果

④ 総合調査研究

エピゲノム解析に用いられる先進的技術動向についての調査

次世代シーケンサー(NGS)技術

2007年後半より実用化されたNGS技術はハイスループット化、低コスト化が急速に進み、エピゲノム解析を実用化した。とりわけ、200～300塩基までの短鎖の配列を大量に読み取る装置の開発が進んだほか、反応時間が短いパーソナル機の開発、さらに蛍光色素を用いずに半導体シーケンサーが開発された。



HiSeq

Miseq

Ion Proton

一方、1分子シーケンサーの開発が進んでおり、Heliscopeは短鎖であればRNAの配列決定も可能。ポリメラーゼがとりこむ蛍光標識dNTPをリアルタイムに測定するPacBio社は数10kbに及ぶ配列決定を行える。さらにはナノポアシーケンシング技術はDNAの修飾の読み取りも原理的には可能と考えられ、エピゲノム解析への応用に関する期待が大きい。



Oxford Nanopore

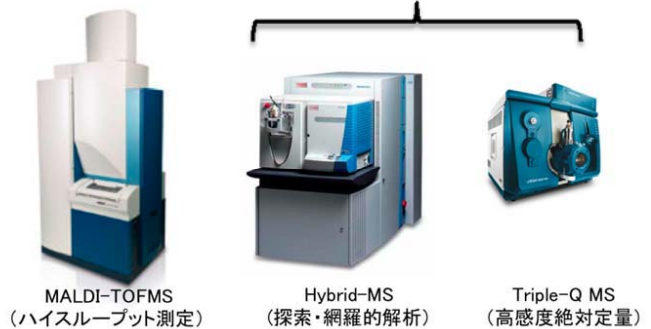
PacBio RS

プロテオミクスに用いられる質量分析計

ここ数年はTriple-Q MSの高感度化・ダイナミックレンジの向上、Hybrid-MSのスキャン速度の高速化が進んでいる。ヒストン修飾組み合わせ解析には高速・高分解能・高感度が要求される。

MALDI-TOF MS

LC-MS

MALDI-TOFMS
(ハイスループット測定)Hybrid-MS
(探索・網羅的解析)Triple-Q MS
(高感度絶対定量)

MALDI-TOF MS: 高分子量タンパク質やペプチドなど複雑性の低い試料をハイスループットで測定可能
Hybrid-MS: バイオマーカー探索などの網羅的タンパク質同定に用いられ、四重極、イオントラップ、TOF MSなどを組み合わせている。
Triple-Q MS: 近年バイオマーカータンパク質の絶対定量に応用されつつある。