

「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」(事後評価)
(2010年度～2014年度 5年間)
プロジェクトの概要(公開)

NEDO

ロボット・機械システム部

2015年6月5日

1. 事業の位置付け・必要性
 - (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) 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性
 - (5) 情勢変化への対応等

3. 研究開発成果
 - (1) 目標の達成度と成果の意義
 - (2) 知的財産権等の取得
 - (3) 成果の普及

4. 実用化に向けての見通し及び取組み
 - (1) 成果の実用化の見通し
 - (2) 実用化に向けた具体的取組み

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

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しはじめ、エピゲノム研究の国際競争が熾烈になってきた。

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

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。

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

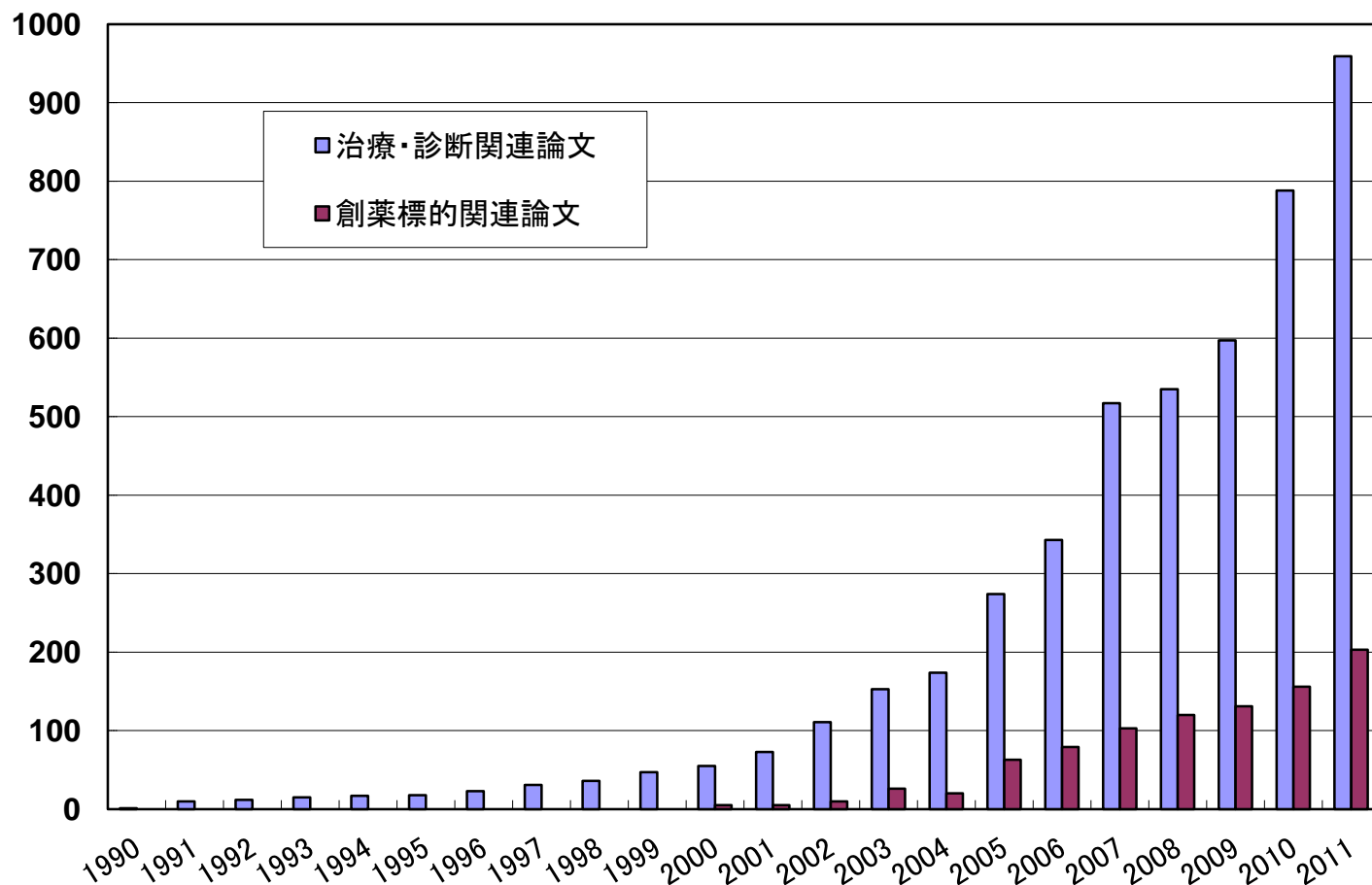
事業の背景(3/3)

- 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。

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

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

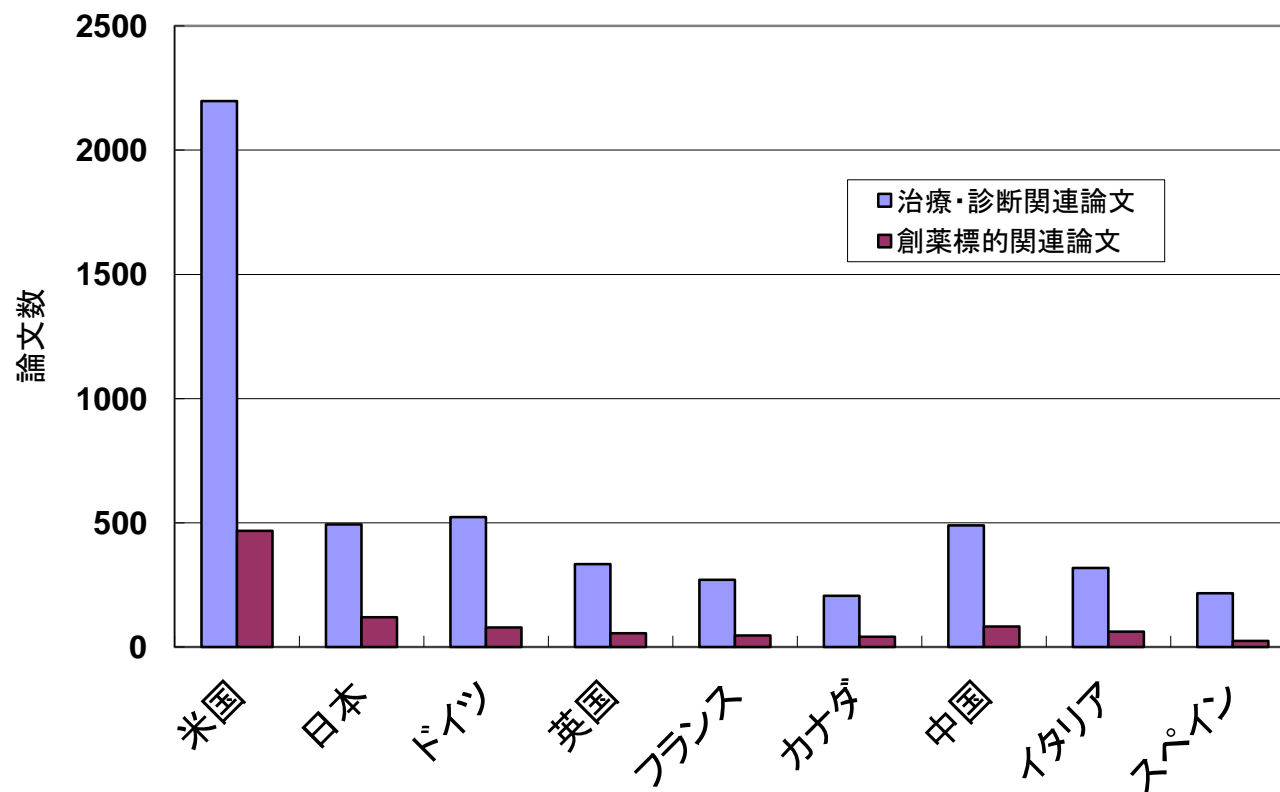


Web of Science®(Thomson Reuters)をもとに作成

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

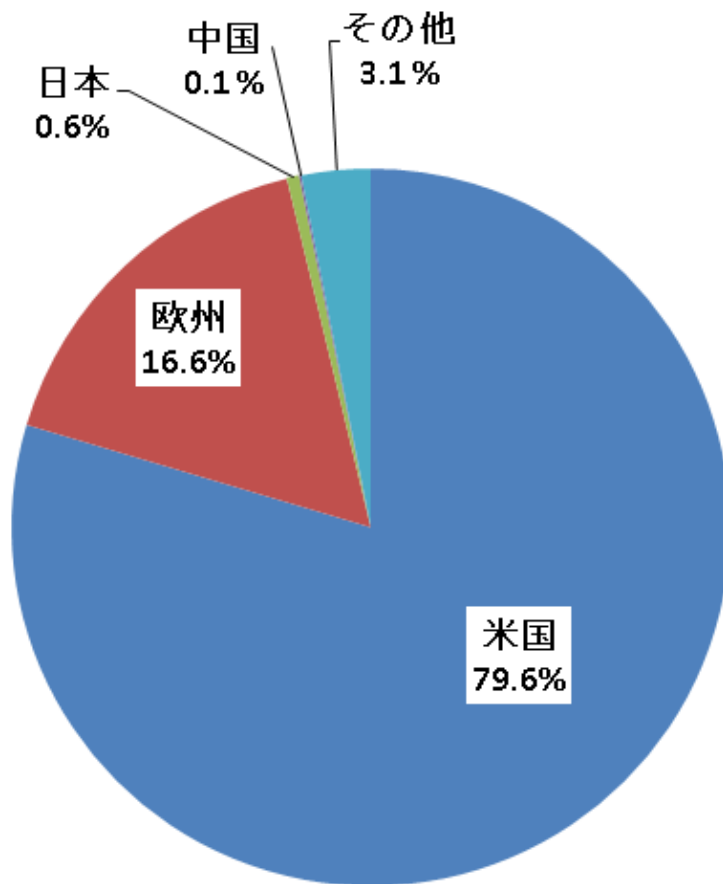
国内外の研究開発の動向： エピゲノム関連の国別論文数(2000～2012年)



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

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

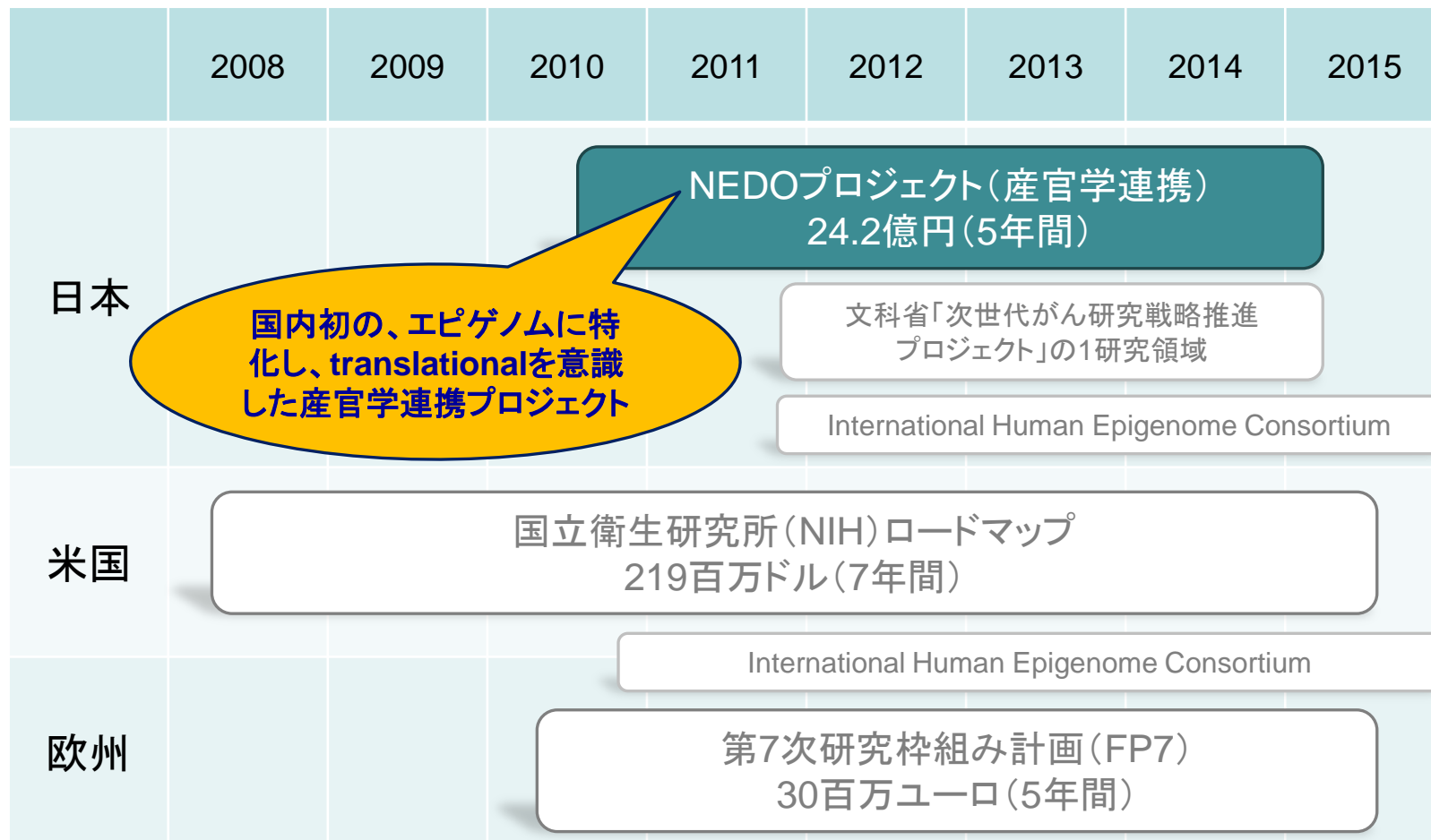
国内外の研究開発の動向：
エピゲノム関連国際特許の国別出願状況
(2006～2009年 全13,804件)



NEDO平成21年度「創薬診断分野技術
戦略調査事業」より引用

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

国内外の研究開発の動向：国家予算規模



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

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。

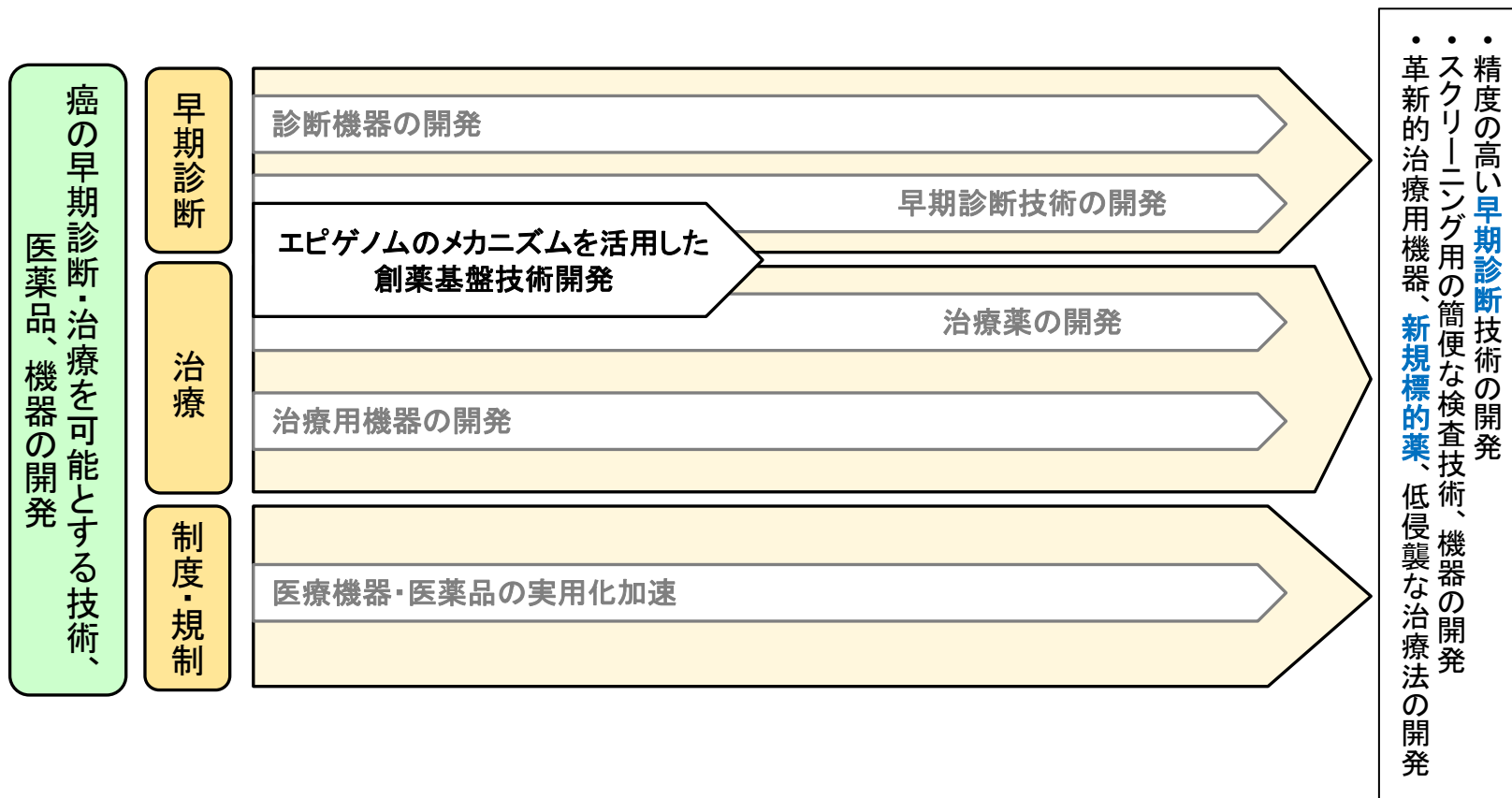
1. 事業の位置付け・必要性について

(2) 事業目的の妥当性

事業の位置付け(1/2)

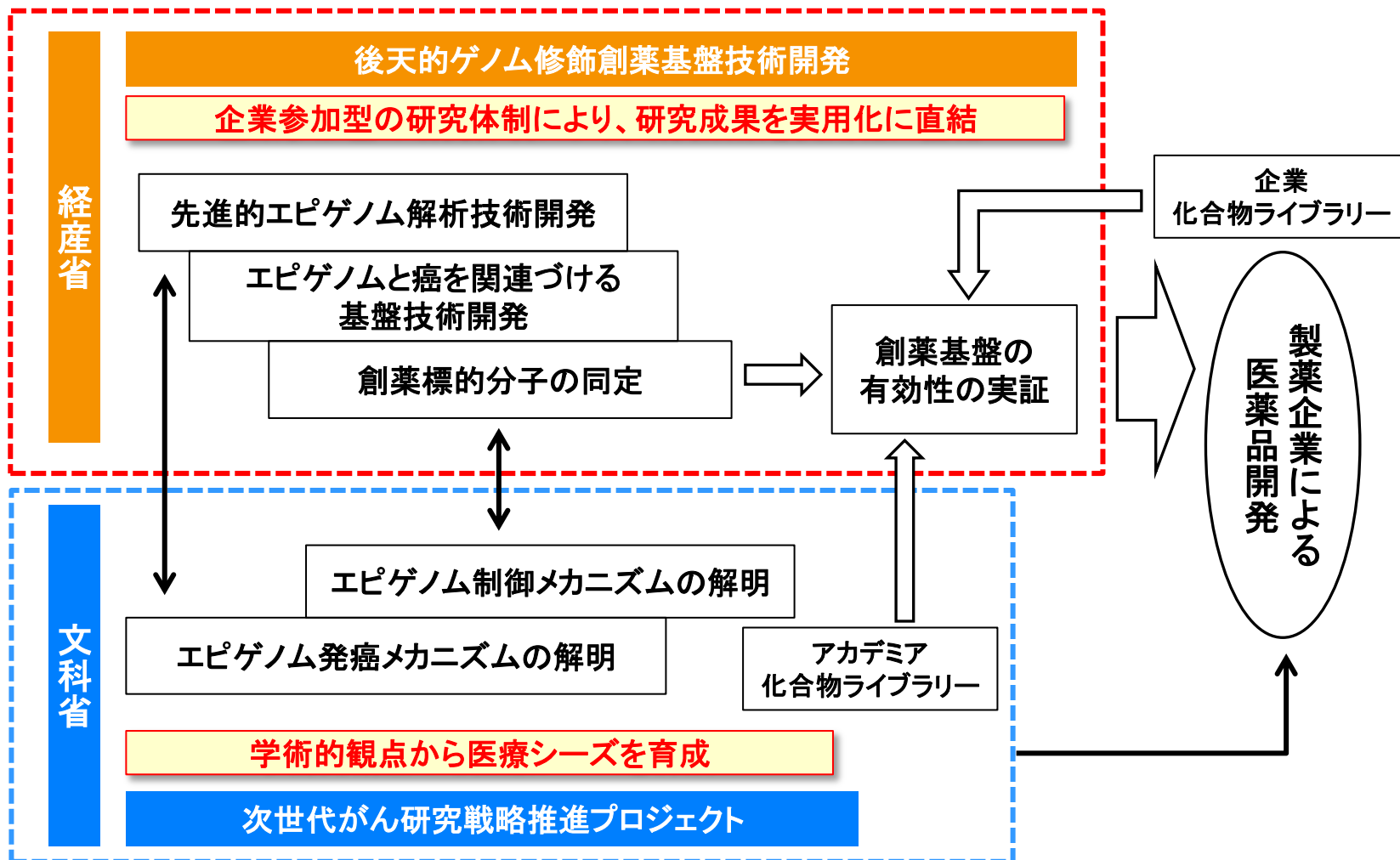
科学・技術重要施策アクションプラン「ライフイノベーション」

2010年 ————— 2015年 —————> 2020年以降



1. 事業の位置付け・必要性について
(2) 事業目的の妥当性

事業の位置付け(2/2)

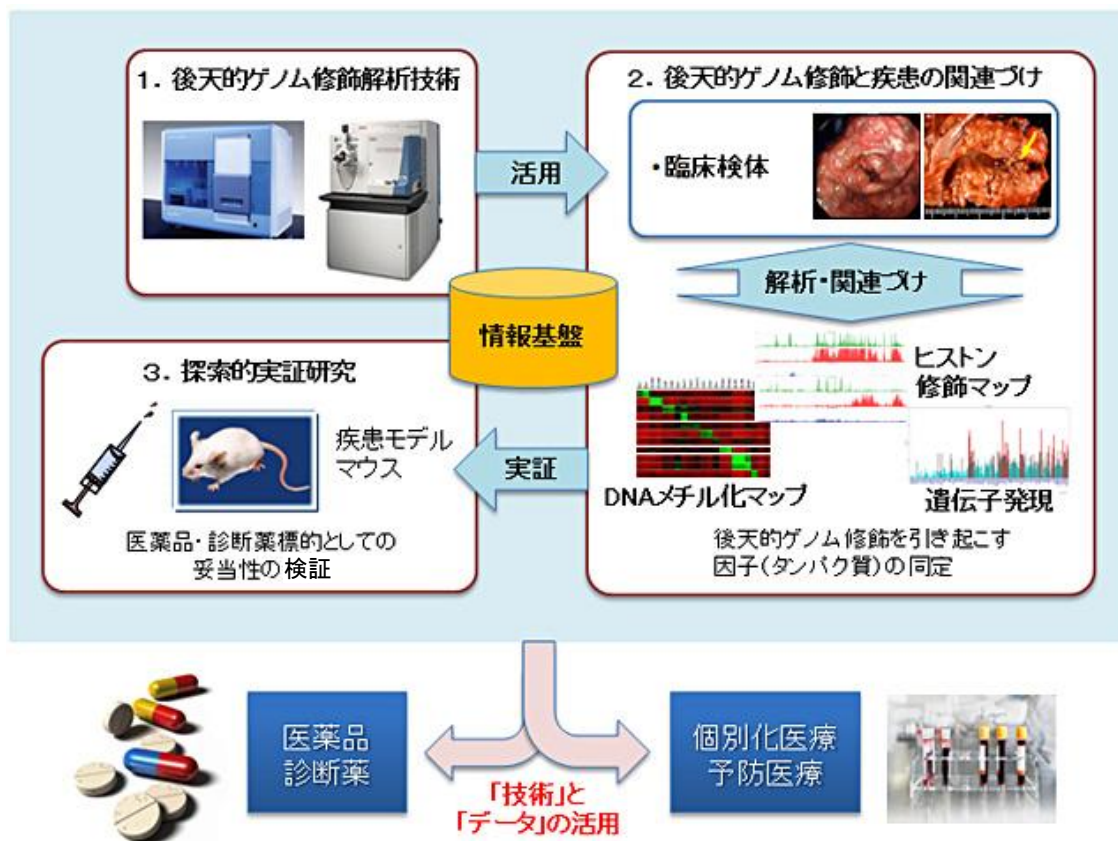


1. 事業の位置付け・必要性について

(2) 事業目的の妥当性

事業の概要

- 後天的ゲノム修飾を網羅的かつ高精度に解析する基盤技術を確立する。
- 疾患特異的な後天的ゲノム修飾を引き起こす因子(酵素等のタンパク質)を同定し、治療標的としての妥当性を検証する。
- 効率的な医薬品・診断薬の開発、個別化医療、予防医療の実現に貢献する。



1. 事業の位置付け・必要性について

(2) 事業目的の妥当性

実施の効果(1/2)

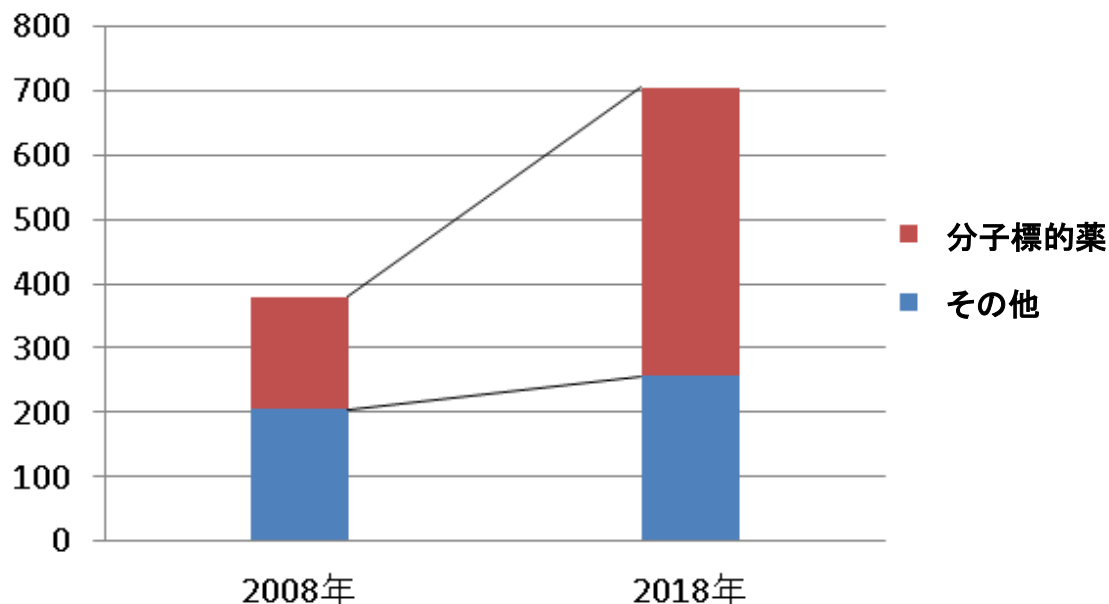
【画期的な治療法の開発】

- 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

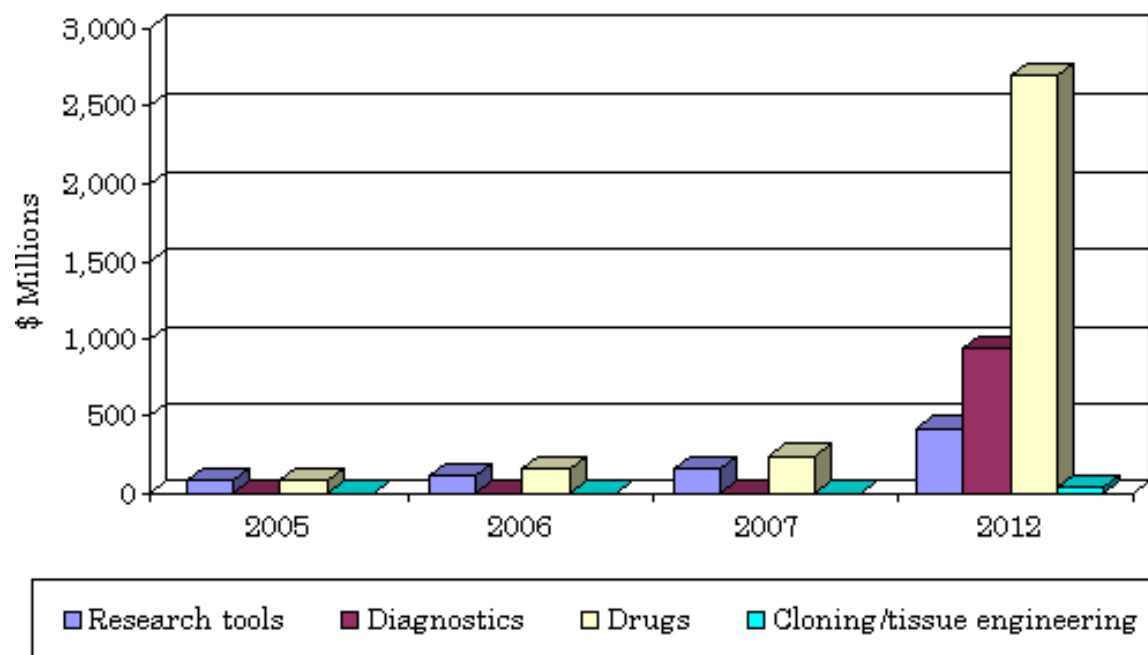
DATAMONITOR フォーカスインサイトより引用

1. 事業の位置付け・必要性について

(2) 事業目的の妥当性

実施の効果(2/2)

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

2. 研究開発マネジメント

(1) 研究開発目標の妥当性

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

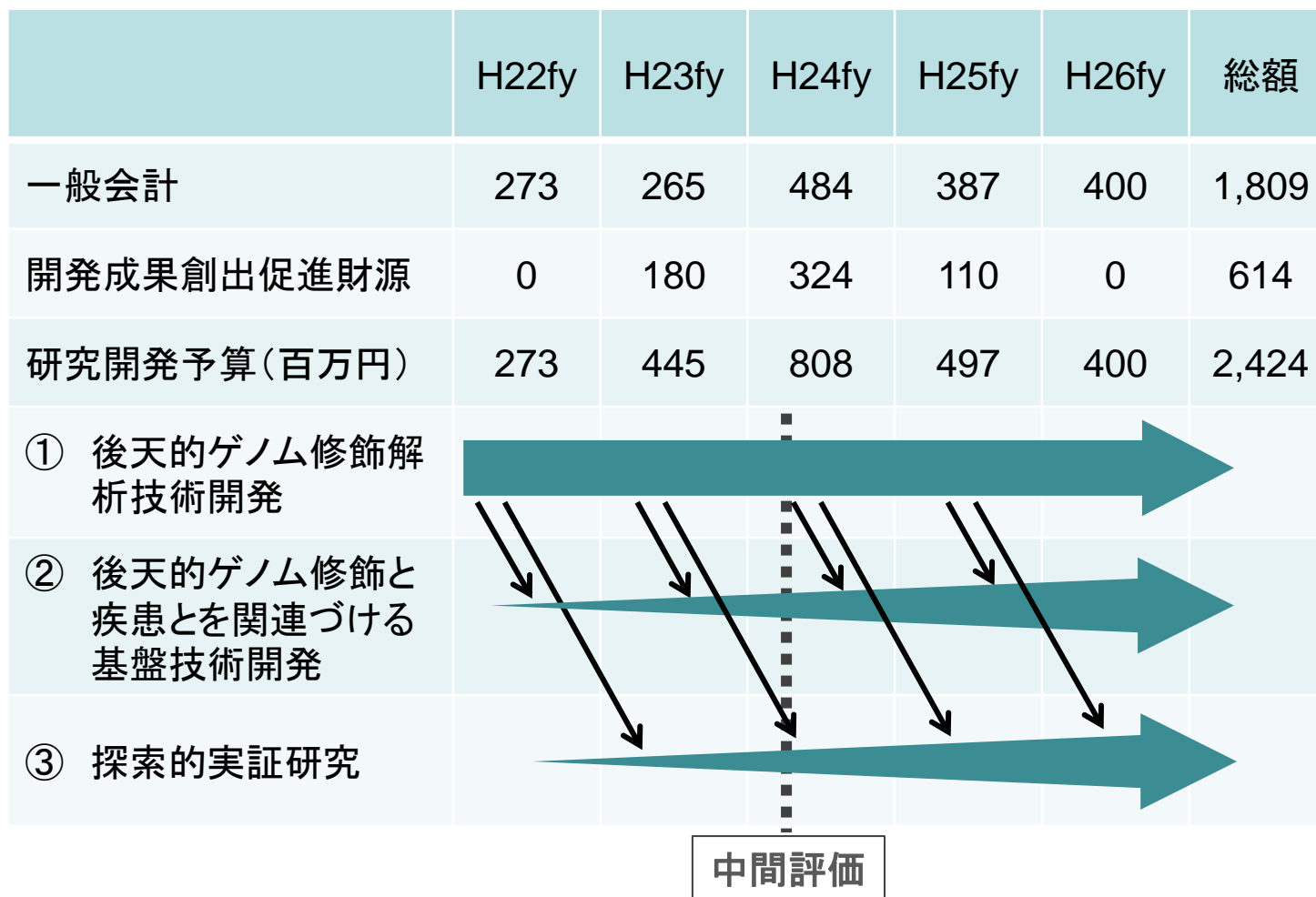
- ① 後天的ゲノム修飾解析技術開発
 - ・ 高感度なエピゲノム解析技術を開発する。
- ② 後天的ゲノム修飾と疾患とを関連づける基盤技術開発
 - ・ エピゲノムを制御する創薬標的分子を同定する。
- ③ 探索的実証研究
 - ・ 創薬標的分子としての妥当性を実証する。

2. 研究開発マネジメント

(2) 研究開発計画の妥当性

研究開発のスケジュールと予算

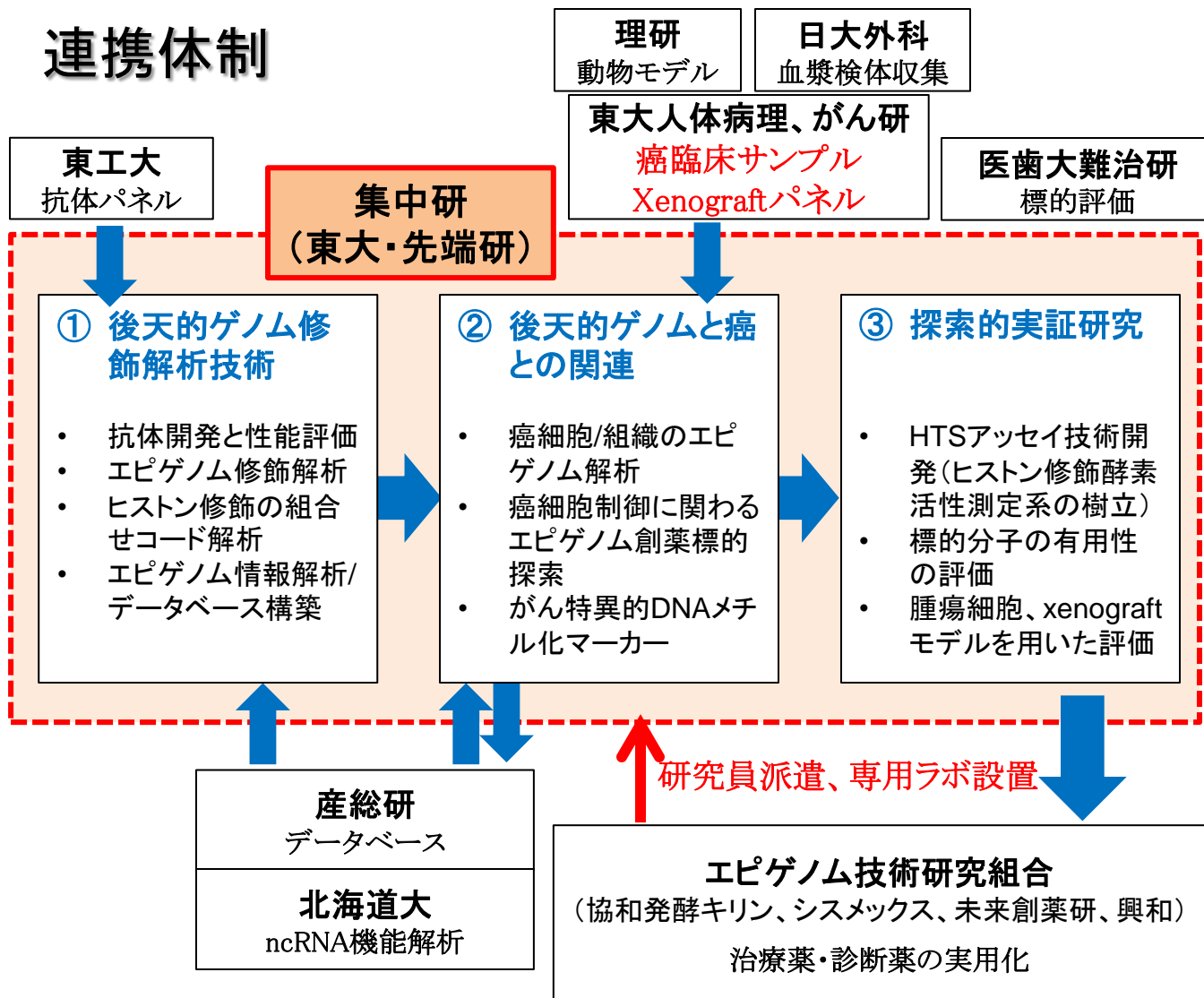
(単位:百万円)



2. 研究開発マネジメント

(3) 研究開発実施の事業体制の妥当性

連携体制



連携研究機関

次世代がんPJ(文科省)
(理研・産総研) P-DIRECT
化合物スクリーニング
天然物スクリーニング

東大理学部
(菅研)
結合ペプチド

理研(横浜)
構造解析

阪大(井上研)
結晶解析

東大(藤谷研)
インシリコ創薬
「京」の利用

産総研(福西) BIRC
計算機創薬

2. 研究開発マネジメント

(4) 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

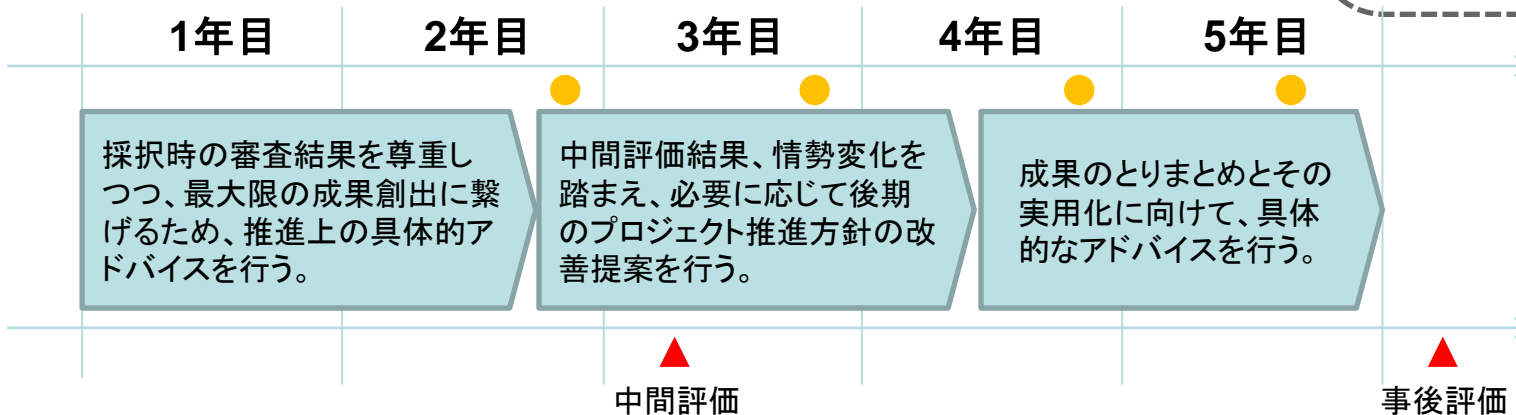
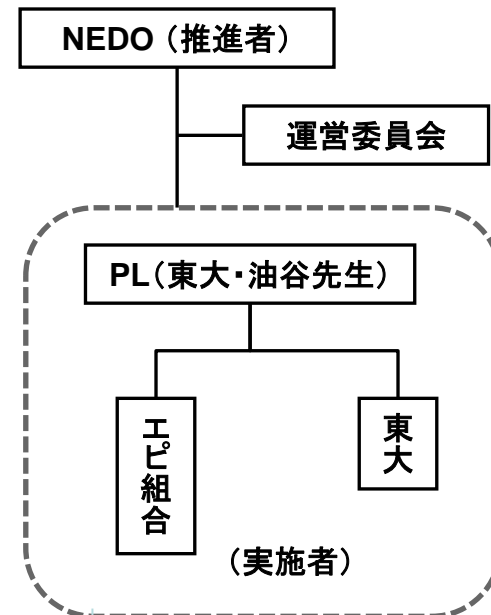
研究開発の運営管理

○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(九州大学)、伊藤武彦(東京工業大学)、久保田健夫(山梨大学)



- 別途、定期的にプロジェクト推進会議を開催し、プロジェクトの進捗、実施計画等の妥当性を確認した。

2. 研究開発マネジメント

(4) 研究開発成果の実用化に向けたマネジメントの妥当性

知財管理

- 「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。

2. 研究開発マネジメント (5) 情勢変化への対応等

中間評価結果への対応(平成24年7月実施)

評価コメント	対応
<ul style="list-style-type: none">◆ 後天的ゲノム修飾の解析方法やその疾患、特にがんとの関連性の解明、創薬標的分子同定などについて、民間だけではできないネットワーク構築や臨床サンプルに基づいた基盤技術開発に成功している。約1年半という短期間で当初の目標を超えた成果をあげており、中間評価時点での設定目標は十分達成され、研究体制も有効に機能している。◆ 一方で、研究開発内容に対して明らかに予算規模が小さく、予算の倍加を望むが、無理であれば特定の技術に優先的に配分する等の対応が必要である。	<p>平成24年度には研究開発項目②、平成25年度には研究開発項目③の推進を主眼に開発成果創出促進財源を配賦した。</p>

2. 研究開発マネジメント (5) 情勢変化への対応等

開発成果創出促進財源の配賦

時期	金額 (百万円)	効果
平成23年8月	180	次世代シーケンサー、サンプル前処理装置を導入しエピゲノム解析の大幅な効率化を図るとともに、膨大なエピゲノム解析データの保存・処理に不可欠なデータサーバーを導入した。この結果、新規創薬標的分子の探索と同定が加速された。
平成24年12月	324	MALDI-TOF型質量分析計を導入しエピゲノム修飾解析効率を飛躍的に向上させるとともに、単細胞セルソーターの導入によって、臨床検体からのがん幹細胞(がん発症・進展の根源となる細胞)の選別を効率的に行うことができるようになった。
平成25年11月	110	Orbitrap Fusion質量分析計の導入し、H3タンパク質のエピゲノム修飾パターン解析法を確立することに成功した。個の結果、新規のがん特異的創薬標的の同定が大幅に加速された。

3. 研究開発成果

(1) 目標の達成度と成果の意義

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がん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14がん種において進めた。◆ 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出した。◆ 標的タンパク質6分子についてアッセイ系を確立した。	達成

3. 研究開発成果

(1) 目標の達成度と成果の意義

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100倍向上させ、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塩基レベル解析系を確立した。◆ 質量分析計を用いて、新規ヒストン修飾を同定し、数十種類のヒストン修飾組み合わせ解析法を確立した。	達成
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">◆ 腫瘍検体バンキングと組織検体を用いたエピゲノム解析を実施し、14がん種2,453検体(当初目標300検体)についてDNAメチル化プロファイリングを行った。◆ 以上の解析により、24種類の腫瘍特異的DNAメチル化マーカーを同定した(国内特許出願14件)。◆ ダイレクトゼノグラフトパネル(膵がん26株、胃がん30株)を樹立し、胃がんゼノグラフト6例について経時的な全エクソン変異解析を、膵がんゼノグラフト4例について経時的遺伝子発現解析を行った。◆ ncRNAをカタログ化して数百の腫瘍特異的ncRNAを同定し、ncRNA医薬標的候補19分子を抽出した。◆ エピゲノム創薬標的候補11分子を抽出した。 (診断マーカー候補24個、ncRNA医薬標的候補19分子、エピゲノム創薬標的候補11分子、計54個(当初目標15個))	達成

3. 研究開発成果

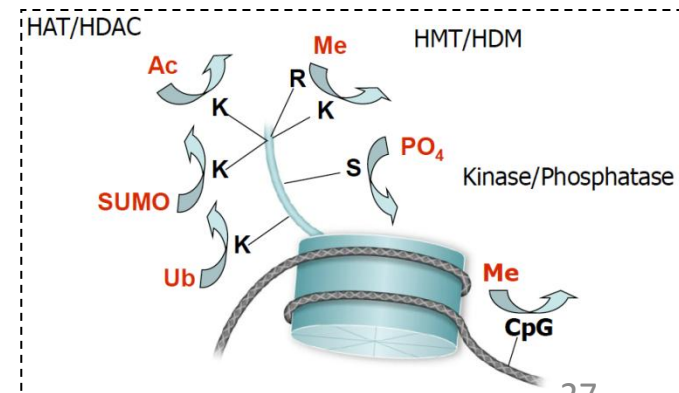
(1) 目標の達成度と成果の意義

研究開発項目毎の達成度(2/2)

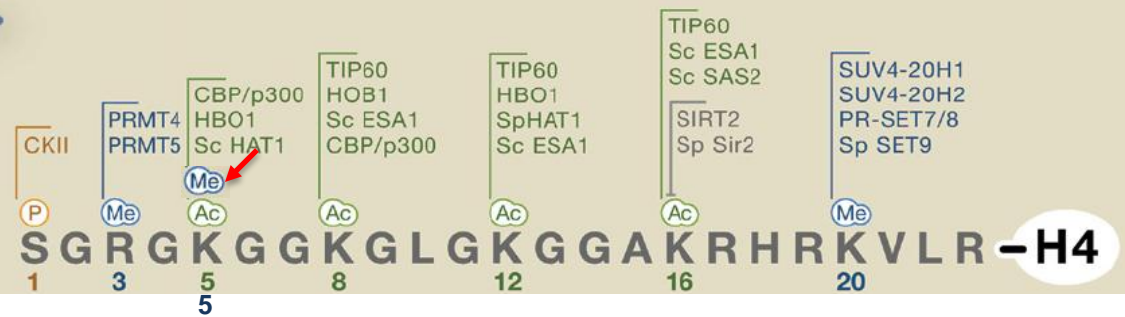
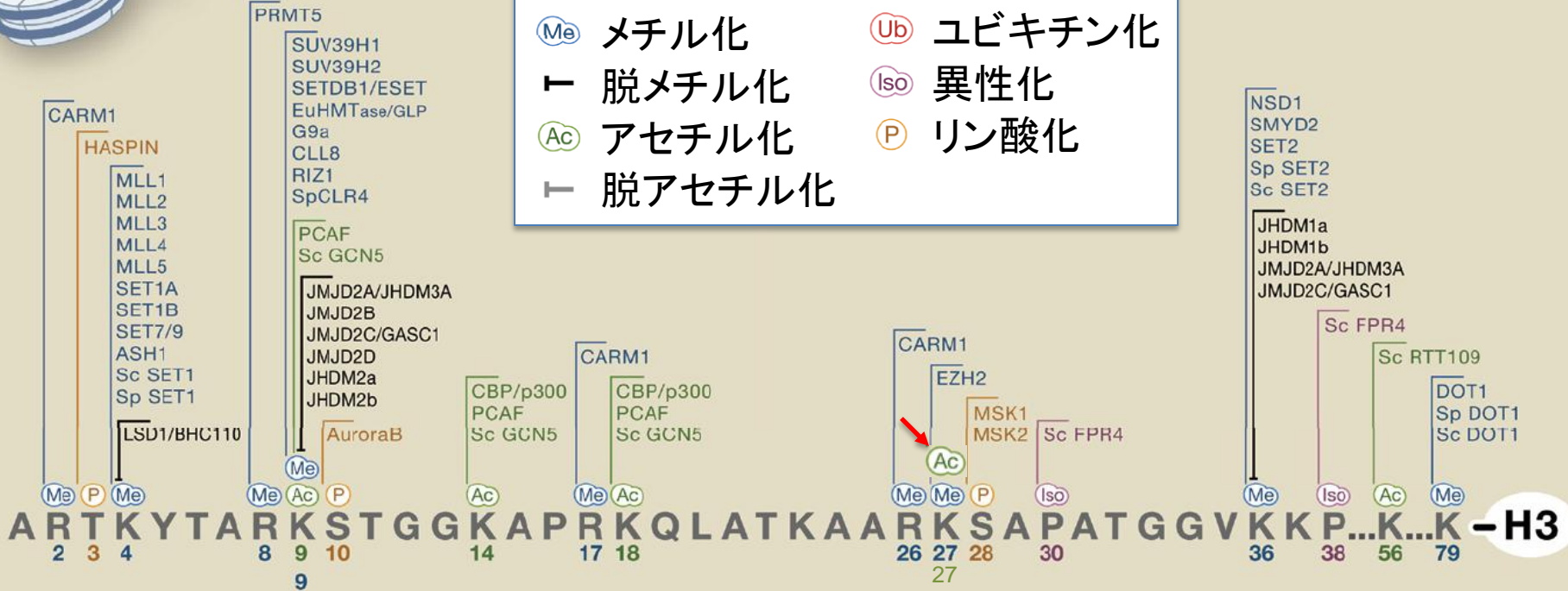
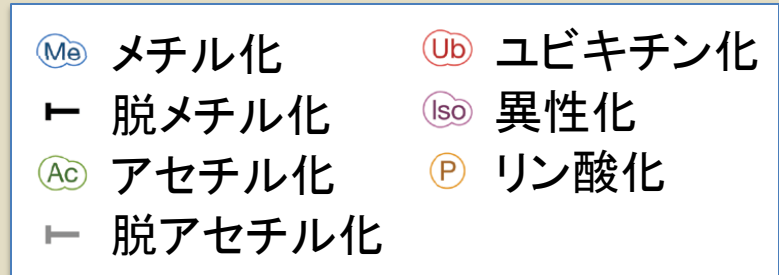
研究開発項目	成果	達成度
③ 探索的実証研究	<ul style="list-style-type: none">◆ 当初、実証的探索研究としてかかげた4標的分子を含めて合計11分子の機能解析を実施した。◆ そのうち6分子についてアッセイ系を樹立し、3分子については<i>in silico</i>手法を用いて活性阻害化合物を得たほか、3分子については従来型のハイスループットスクリーニング、4分子については結合ペプチドスクリーニングにより活性阻害化合物を探索した。	達成
④ 総合調査研究	<ul style="list-style-type: none">◆ 次世代シーケンサー、質量分析装置の開発動向とエピゲノム研究における活用に関して、さらにゲノム・エピゲノム関連データ解析に関して調査を行った。	達成

エピゲノム創薬プロジェクト(2010～2014)

- 新たな創薬分野の開拓
 - DNAメチル化、ヒストンアセチル化に加えて多数の「後天的」修飾は書き換え(治療介入)が可能
 - 制御因子としてのncRNAにも注目
 - **First in class**を目指す
- 疾患として「**がん**」に注力
 - ヒト検体のゲノム・エピゲノム解析による標的探索
 - **個別化医療**に対応するゼノグラフトパネル
- 技術革新の加速化
 - 先進的エピゲノム、タンパク修飾解析技術
 - **オープンイノベーション**体制(集中研)
 - 他の国家プロジェクトとの連携



ヒストンコードと修飾酵素



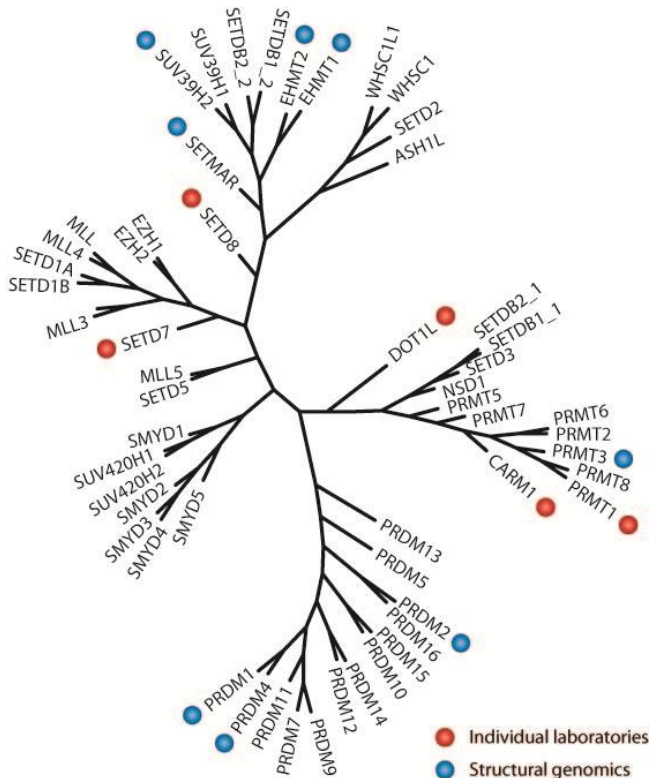
Kouzarides T. 2007

現在でも新たなヒストン修飾が同定されている(↘)
 同一ヌクレオソーム上の修飾の組み合わせが重要

エピゲノム修飾を制御する蛋白

Writer

SETドメイン蛋白



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

1999~

Eraser

脱メチル化酵素

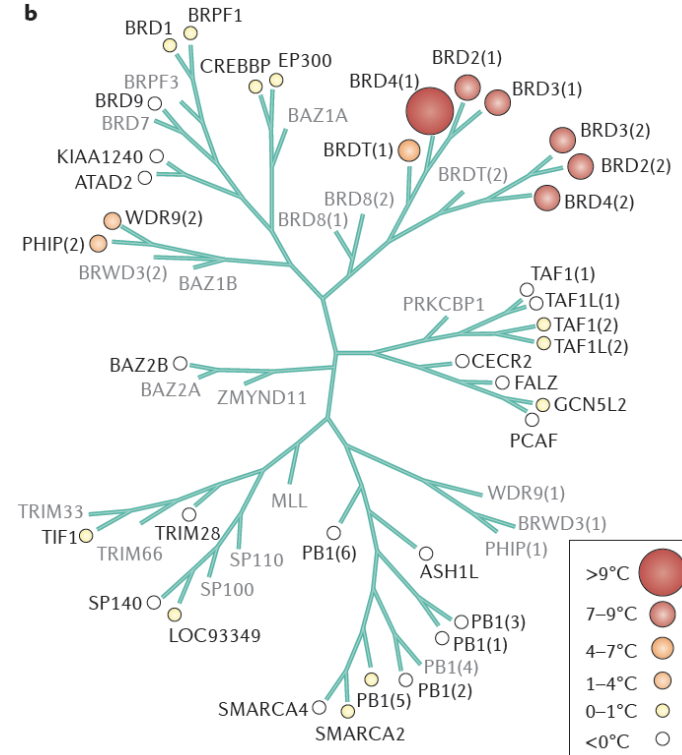
LSD demethylases		
LSD1	AOF2, BHC110, KDM1A	
LSD2	AOF1, KDM1B	
JMJC demethylases		
JMJD7		
HIF1AN		
HSPBAP1		
JMJD5	KDM8	
JMJD4		
JMJD6	PSR, PTDSR	
JMJD8		
FBXL10	JHDM1B, KDM2B	
FBXL11	JHDM1A, KDM2A	
KIAA1718	JHDM1D	
PHF8	JHDM1F	
PHF2	JHDM1E	
HR		
KDM3B		
JMJD1A	JHDM2A, TSGA, KDM3A	
JMJD1C		
JMJD3	KDM6B	
UTX	KDM6A	
UTY		
JMJD2A	JHDM3A, KDM4A	
JMJD2C	JHDM3C, GASC1, KDM4C	
JMJD2B	JHDM3B, KDM4B	
JMJD2D	JHDM3D, KDM4D	
JARID1B	PLU1, KDM5B	
JARID1C	SMCX, KDM5C	
JARID1D	SMCY, KDM5D	
JARID1A	RBP2, KDM5A	
JARID2		
MINA		
NO66		

Nat Rev Mol Cell Biol 2012

2004~

Reader

Bromoドメイン蛋白

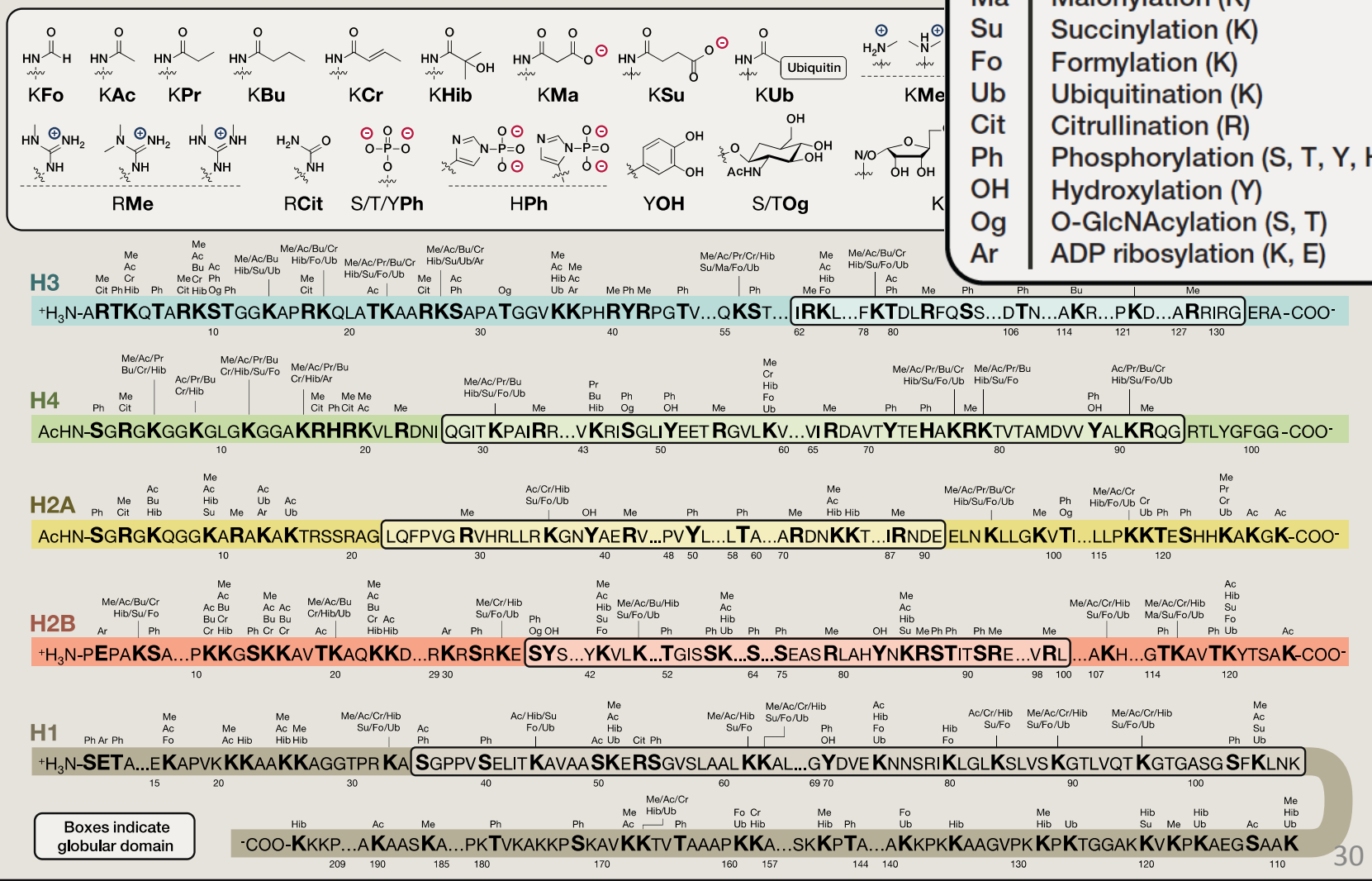


Nat Rev Cancer 2012

SnapShot: Histone Modifications

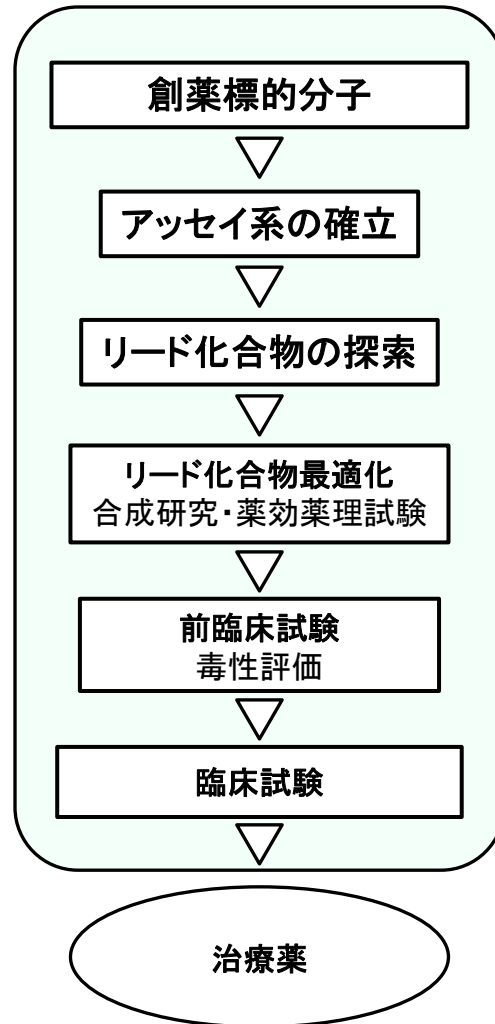
He Huang,¹ Benjamin R. Sabari,² Benjamin A. Garcia,³ C. David Allis,² and Yingming Zhao¹
¹Ben May Department of Cancer Research, The University of Chicago, Chicago, IL 60637, USA
²Laboratory of Chromatin Biology and Epigenetics, The Rockefeller University, New York, NY 10021, USA
³Department of Biochemistry and Biophysics, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, USA

- Me Methylation (K, R)
- Ac Acetylation (K, S, T)
- Pr Propionylation (K)
- Bu Butyrylation (K)
- Cr Crotonylation (K)
- Hib 2-Hydroxyisobutyrylation (K)
- Ma Malonylation (K)
- Su Succinylation (K)
- Fo Formylation (K)
- Ub Ubiquitination (K)
- Cit Citrullination (R)
- Ph Phosphorylation (S, T, Y, H)
- OH Hydroxylation (Y)
- Og O-GlcNAcylation (S, T)
- Ar ADP ribosylation (K, E)



事業の位置付け・必要性について
事業目的の妥当性

従来の創薬プロセス



標的分子の枯渇?
エピゲノム創薬

10~15年

開発期間が長い
先進的技術の活用

臨床試験の成功率が低い
ヒト腫瘍パネル

事業の位置付け・必要性について
事業目的の妥当性

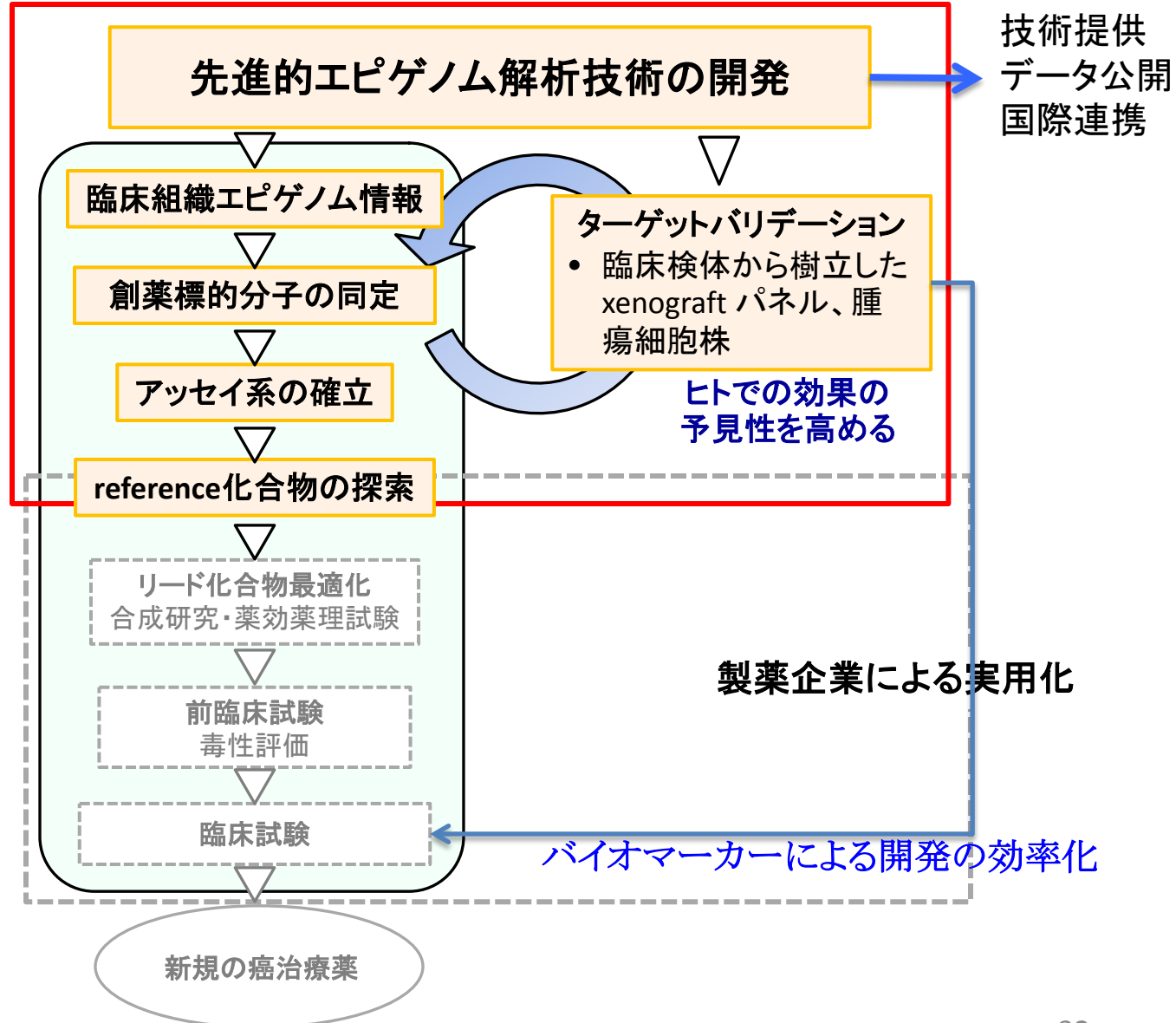
オープンイノベーション体制

事業の概要

臨床検体を用いたサイクル型のターゲットバリデーションにより確度の高い創薬標的分子を選択

Chemical genomics
標的分子に作用する低分子(化合物およびペプチド)を用いてメカニズム解明

医薬品開発の効率化及び加速



エピゲノム分野でのファーストインクラスの創薬を目指す

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

①「後天的ゲノム修飾解析技術開発」

- (1) エピゲノム解析技術開発
- (2) ヒストン修飾解析の微量化、高感度化に関する研究開発
- (3) エピゲノム情報解析基盤技術の研究開発

②「後天的ゲノム修飾とがんとを関連づける基盤技術開発」

ヒト組織のエピゲノム解析に基づいた病態解明および標的としての検証実験

③「探索的実証研究」

- (1) エピゲノム修飾を再現性よく定量的に解析するハイスループットアッセイ技術の開発
- (2) 探索的実証研究

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

①「後天的ゲノム修飾解析技術開発」

- (1) エピゲノム解析技術開発
- (2) ヒストン修飾解析の微量化、高感度化に関する研究開発
- (3) エピゲノム情報解析基盤技術の研究開発

②「後天的ゲノム修飾とがんとを関連づける基盤技術開発」

ヒト組織のエピゲノム解析に基づいた病態解明および標的としての検証実験

③「探索的実証研究」

- (1) エピゲノム修飾を再現性よく定量的に解析するハイスループットアッセイ技術の開発
- (2) 探索的実証研究

① 後天的ゲノム修飾解析技術開発

主たる研究成果

- DNAメチル化とヒドロキシメチル化の分布
- 第6の塩基「ヒドロキシメチルシトシン」の塩基レベル解析
DNA脱メチル化の臨床的意義の解明
TAB-seq法の確立
- ChIP-seq解析の高感度化、再現性向上(モノクロナル抗体開発)
修飾の局在解明、修飾検出アッセイ系の樹立
- エピゲノム修飾因子と相互作用する因子の検出
shRNAライブラリーおよびCRISPR/Cas9によるスクリーニング
Barcode化 Y2H-Seq法によるインタラクトーム解析
- 新規ヒストン修飾の同定(質量分析)
- ヒストン修飾の組み合わせ解析法を確立(質量分析)
特異的なヒストン修飾部位の特定(エピゲノム創薬の特異性を追求)
ChIP-MSの確立
- 大規模エピゲノムデータ解析基盤構築



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

ハイドロキシメチルシトシンの検出系

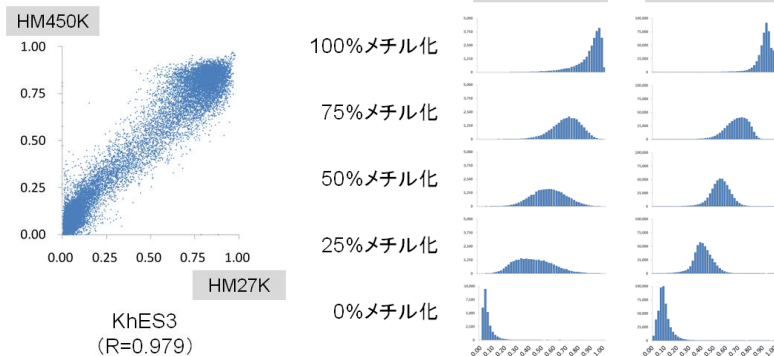
癌化に際してダイナミックに変動するDNAメチル化を定量的かつ網羅的に解析する技術が求められる。

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。Gene bodyも含めた多数検体解析が可能になった。(Genomics 2011)

bisulfite処理+全ゲノム解析へと移行中である。

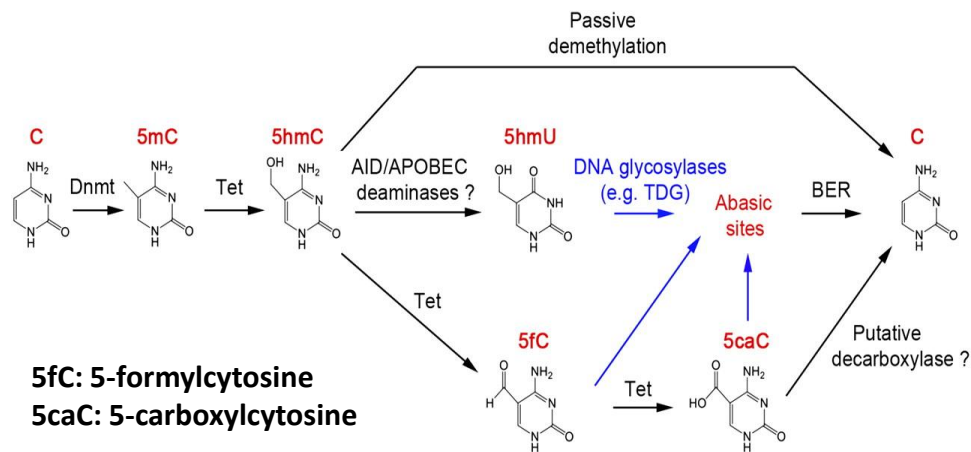
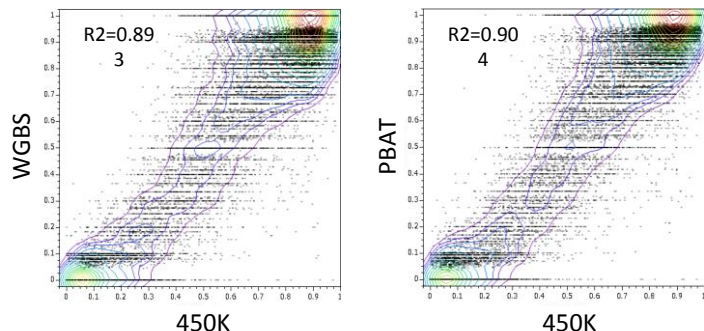
メチルシトシンは安定な修飾と考えられてきたが、ハイドロキシメチルシトシン(hmC)は脱メチル化プロセスに関わるDNA修飾として近年注目され、「第6の塩基」とまでいわれている。現行のバイサルファイト変換法のみではメチルシトシン(mC)との判別が不可能なため、抗hmC抗体を用いた免疫沈降(hmDIP)のゲノムワイドな検出系を確立した。さらにTAB-seqによる一塩基レベルの検出系の樹立を進めた。

27Kと450Kアレイの比較



WGBSと450Kアレイの比較

Read depth > 10



5fC: 5-formylcytosine
5caC: 5-carboxylcytosine

hmC解析法

1) 免疫沈降ベースの手法

- hmC-IP
- CMS-IP (Bisulfite Tx + IP)
- GLIB (Glucosylation + IP)

2) 一塩基解像度の検出法

- Oxidative Bisulfite Sequencing (oxBS-Seq)
- Tet-Assisted Bisulfite Sequencing (TAB-Seq)

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

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（阪大）

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活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	

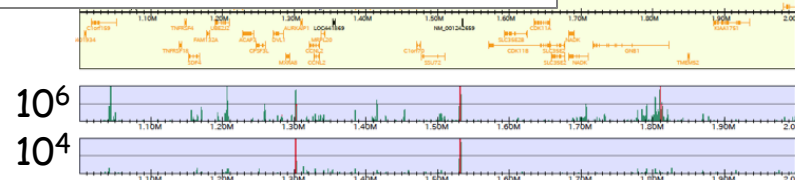
表 H4特異的抗体クローン

エピゲノム解析の高感度化(東京大学)

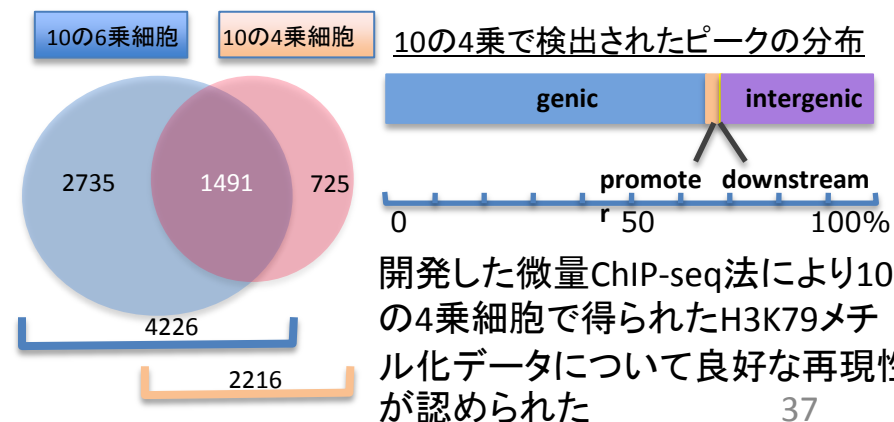
クロマチンとタンパクとの結合プロファイルを取得するために、現行のChIP-seq解析では10の7乗を超える細胞を必要とする。創薬、診断等への応用を考えた場合に微量組織、微量細胞での解析技術の開発が望まれる。

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



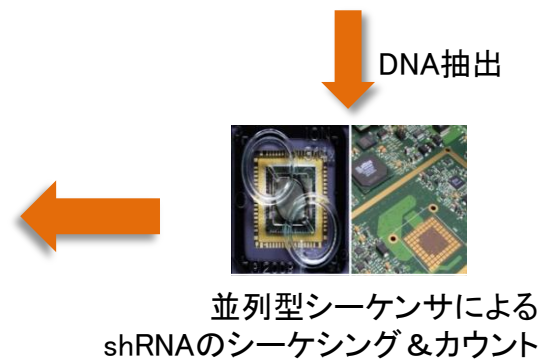
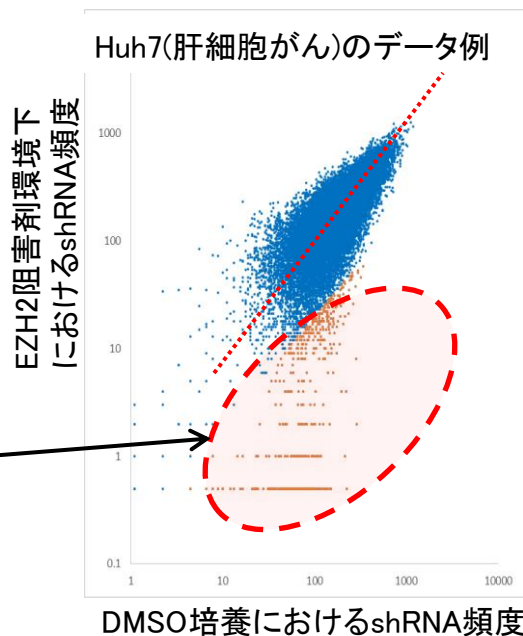
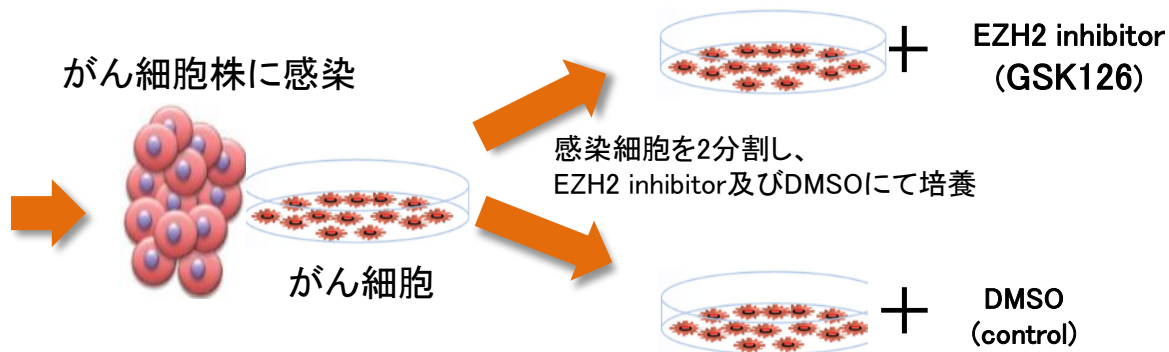
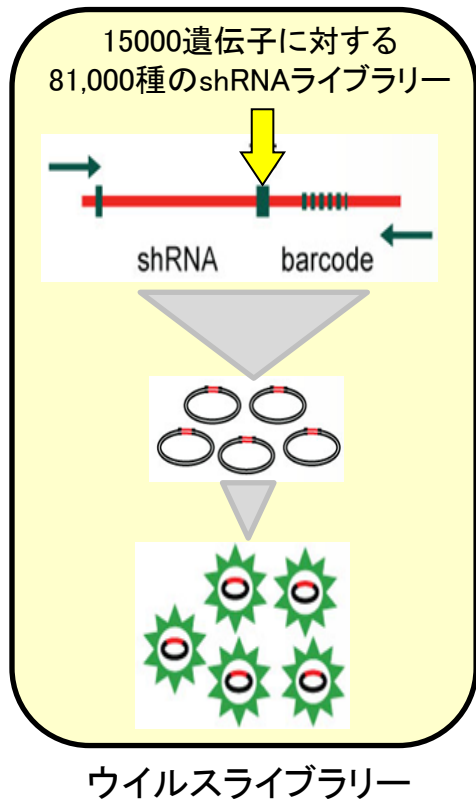
10の6乗と4乗で検出されたピークの重なり



① 後天的ゲノム修飾解析技術開発

エピゲノム創薬標的探索のためのFunctional Genomicsスクリーニング

ヒストンメチル化酵素EZH2阻害剤に対するFunctional Genomicsスクリーニング

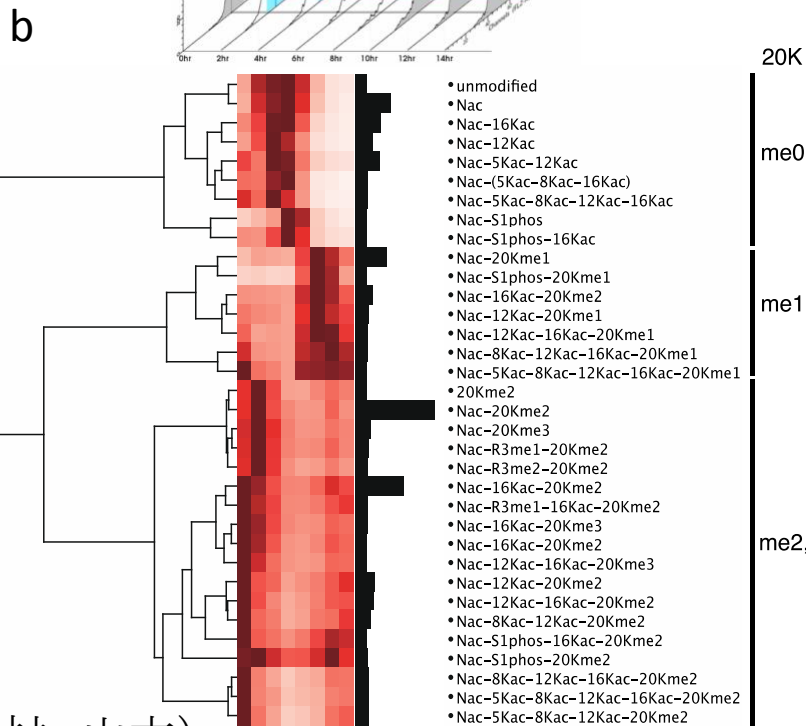
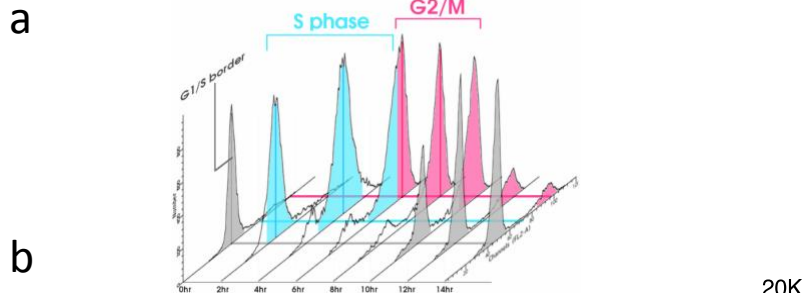


- EZH2阻害剤とsynthetic lethalityを呈する遺伝子群
- EZH2シグナル経路にある遺伝子群

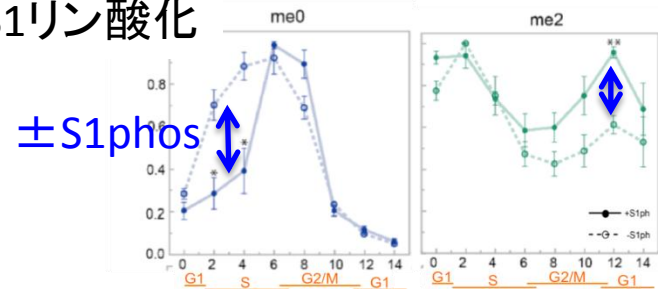
① 後天的ゲノム修飾解析技術開発

ヒストンテール修飾の系統的解析技術開発

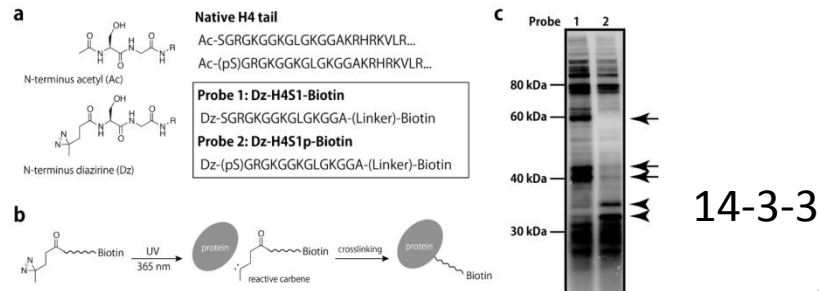
LC-MSによる細胞周期特異的なH4テール修飾プロファイルの検出



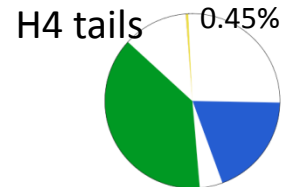
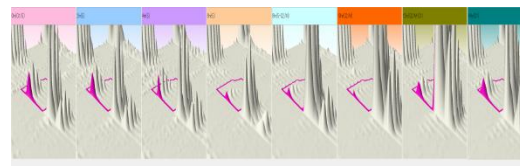
H4K20S1リン酸化



S1phos結合タンパク質の同定



H4R3me2K20me2



(川村, 山本) Time after release

S期、M期に特徴的なリン酸化の検出、光クロスリンクによるヒストン結合タンパク同定、ジメチルアルギニンを含む修飾検出、ヒストン修飾同定支援ツールの開発を実施した。

① 後天的ゲノム修飾解析技術開発

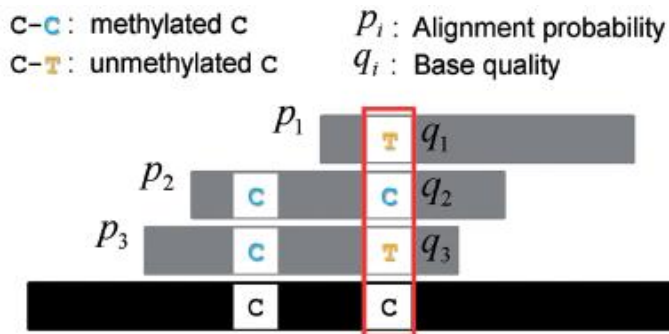
腫瘍組織検体を用いたDNAメチル化解析

DNAメチル化変化の高精度検出技術の開発

Bisulfite-Seqデータ解析パイプラインBisulfighter

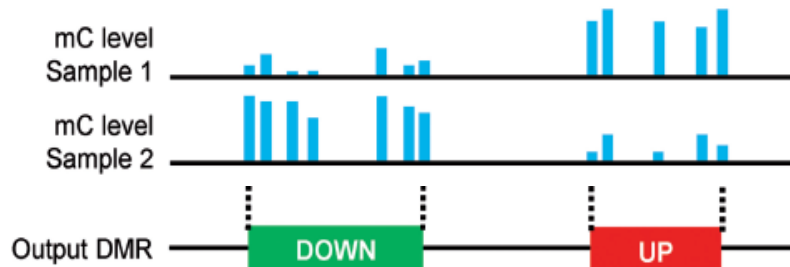
[Saito et al, Nucleic Acids Res, 2014]

機能1: Bisulfite-SeqリードのマッピングとDNAメチル化率の推定



→高感度かつ偽陽性の低いメチル化C検出性能を実現

機能2: 検体間の比較によるメチル化変化領域の検出



→新規統計モデルにより高精度な変化検出を実現

GalaxyによるBisulfighter解析の共有

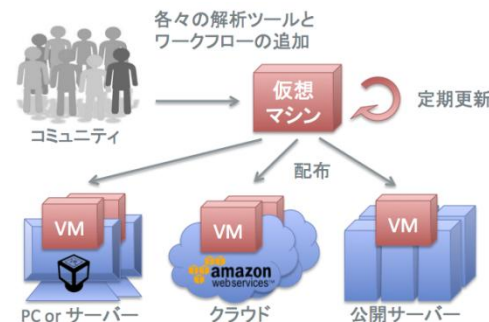
Galaxy Project (Johns Hopkins Univ 他)

- Webベースの統合データ解析環境
- ツールを組み合わせる解析フローを構築し、実行することが可能



Galaxy環境の仮想化と共有(先端研)

- 仮想環境にGalaxyと関連ツールをパッケージ化することで、計算基盤を問わず解析フローが再現可能
- Galaxy利用者コミュニティでひとつの仮想環境を管理することで、異なる研究機関でツールと解析フローを含む実行環境そのものを共有可能



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

①「後天的ゲノム修飾解析技術開発」

- (1) エピゲノム解析技術開発
- (2) ヒストン修飾解析の微量化、高感度化に関する研究開発
- (3) エピゲノム情報解析基盤技術の研究開発

②「後天的ゲノム修飾とがんとを関連づける基盤技術開発」

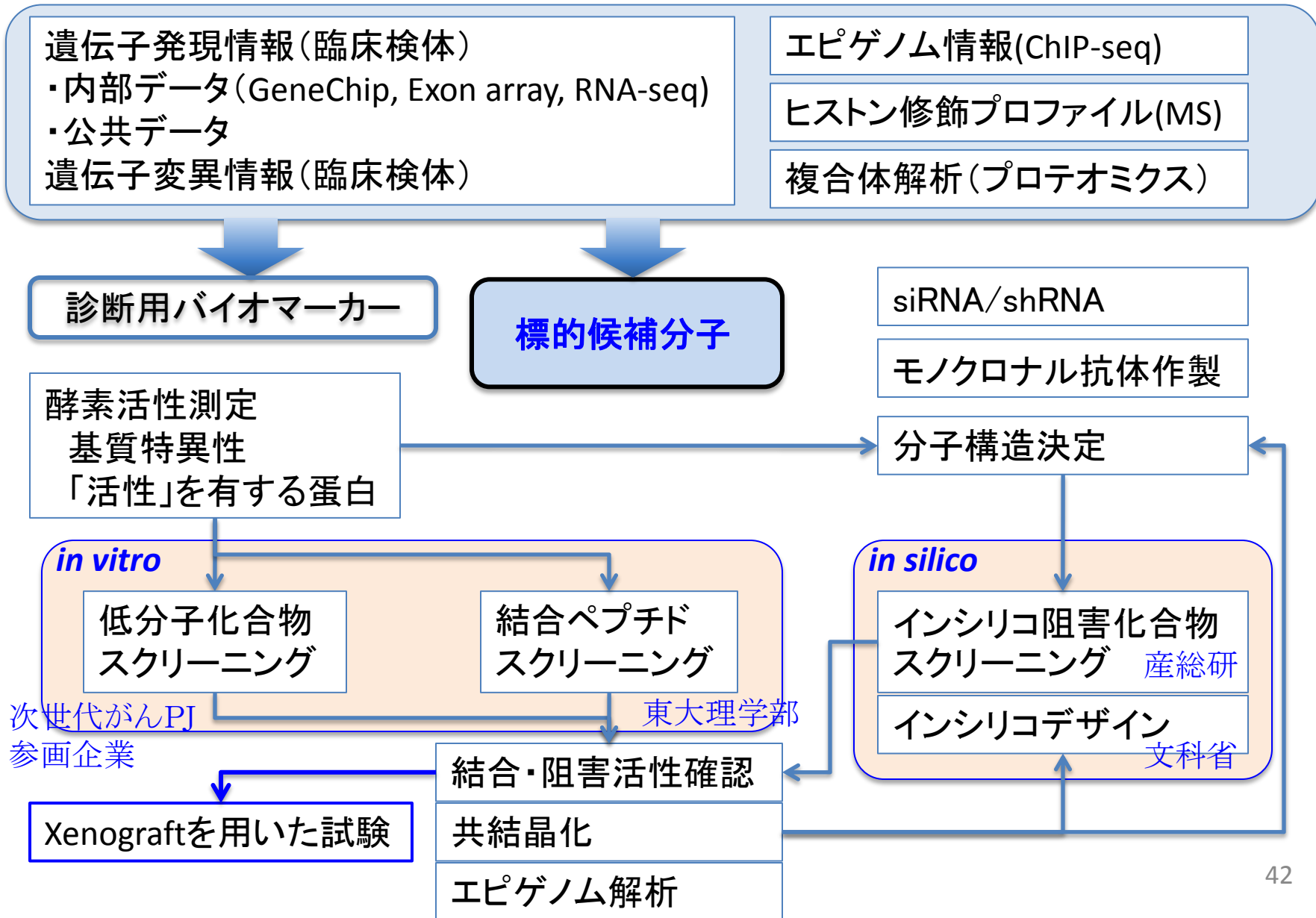
ヒト組織のエピゲノム解析に基づいた病態解明および標的としての検証実験

③「探索的実証研究」

- (1) エピゲノム修飾を再現性よく定量的に解析するハイスループットアッセイ技術の開発
- (2) 探索的実証研究

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

③ 探索的実証研究



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

主たる研究成果

- 腫瘍検体バンキングと組織検体を用いたエピゲノム解析を実施
 - DNAメチル化プロファイリング
 - ヒドロキシメチル化領域の同定
 - 組織検体を用いたエピゲノム解析
- ダイレクトゼノグラフトパネルを樹立し、継代時の組織像の維持を確認した。胃がんゼノグラフト6例は経時的に全エクソン変異解析を行った
 - 遺伝子変異の明らかになったゼノグラフト株パネルの樹立
- 腫瘍特異的DNAメチル化マーカーの同定(特許出願14件)
 - 血中メチル化DNAの検出による早期診断
- エピゲノム情報及びRNA-seqデータからのncRNAをカタログ化し、腫瘍特異的ncRNAを同定した(特許出願1件)。
 - 核酸医薬によるエピゲノム制御への可能性
- エピゲノム創薬標的候補11分子、ncRNA7種19分子を抽出した。
 - 探索的実証研究において標的として妥当性を評価

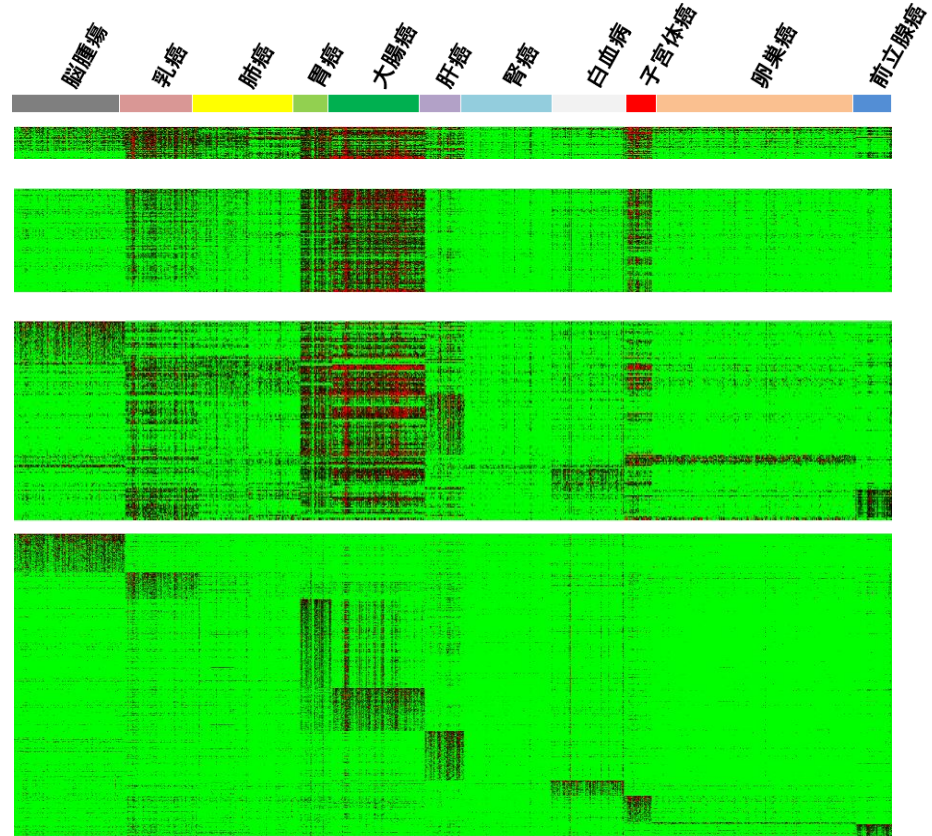
癌診断メチル化マーカーに関する研究開発(シスメックス、東大先端研)

がん診断マーカーとしての血中遊離メチル化DNA

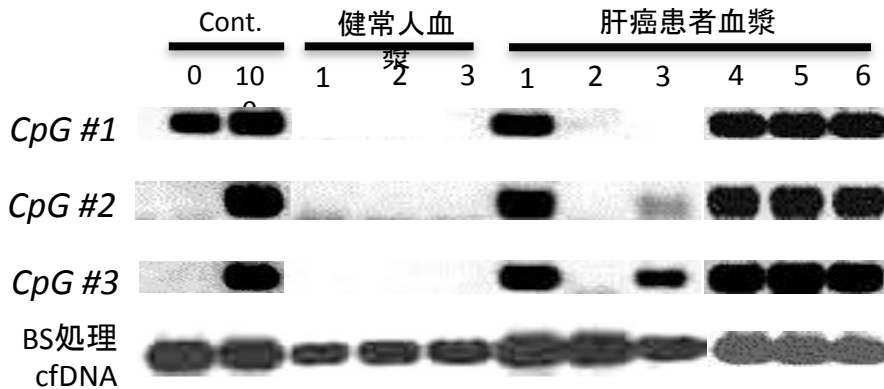
がん早期診断マーカーに求められる条件

- DNAは通常採血で採取可能(糞便を回収する必要がない)、比較的安定である
- スクリーニング検査の特異度が低いと無駄な二次検査が必要となる
- 多くの腫瘍を網羅的にスクリーニングできる検査となりうる(現行の腫瘍マーカーは特定の癌腫に特異的)
- 異常メチル化パターンは大腸腺腫で既に形成されている(Yagi AJP 2012)

腫瘍特異的メチル化マーカーの探索



血漿遊離DNAのメチル化検出



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

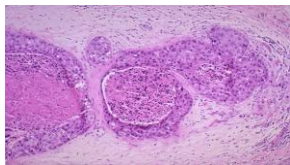
2. 「Xenograft パネルの研究開発」(がん研究会、東京大学)

① 「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良質な検体収集
- ・ 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



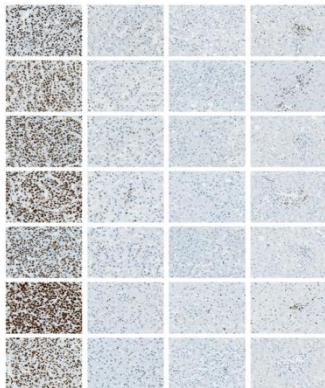
エピゲノム関連分子の探索によるがんのサブグループ化

- ・ 修飾ヒストン抗体を用いた臨床正常、がん組織の評価

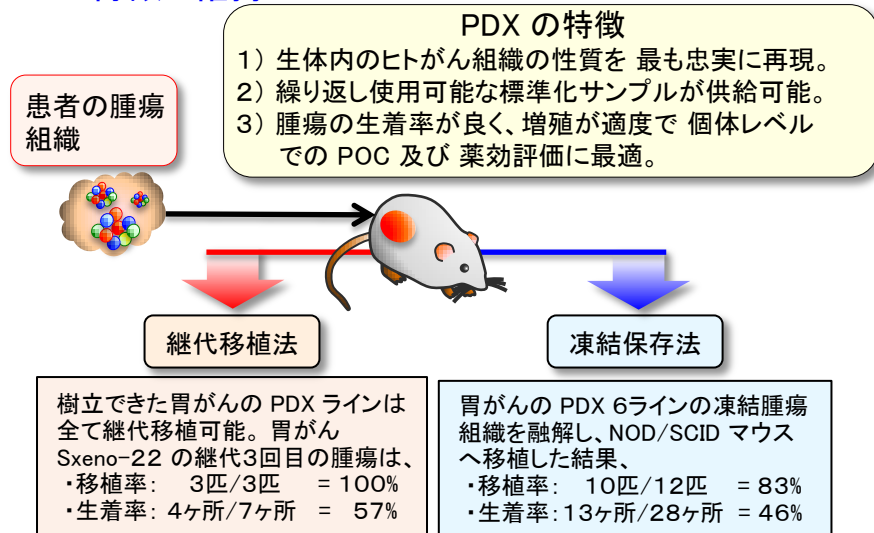
正常諸臓器の組織、各種癌(食道癌、胃癌、大腸癌、肺癌、肝細胞癌、膵癌、甲状腺癌)の組織アレイを用いて研究開発項目①-(1)-③の成果である修飾ヒストン抗体パネル25種類による染色条件を実施

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。



胃がん 及び 膵がん臨床検体の収集と PDX モデルの樹立
PDXの特徴と維持 (癌研究会)

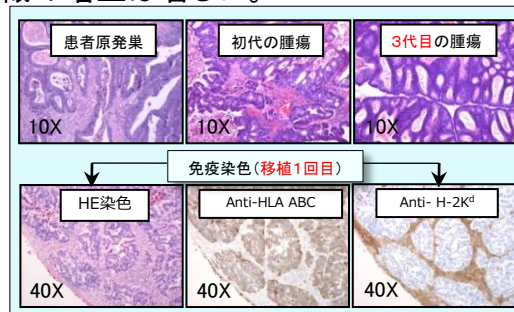


PDX の特徴

- 1) 生体内のヒトがん組織の性質を 最も忠実に再現。
- 2) 繰り返し使用可能な標準化サンプルが供給可能。
- 3) 腫瘍の生着率が良く、増殖が適度で 個体レベルでの POC 及び 薬効評価に最適。

胃がんの PDX ラインの腫瘍組織は、膵がんの場合と同様に、継代を繰り返しても、患者の組織型を維持している。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き換わっている。スキルス型の進行胃がんでは、間質組織の増生は著しい。

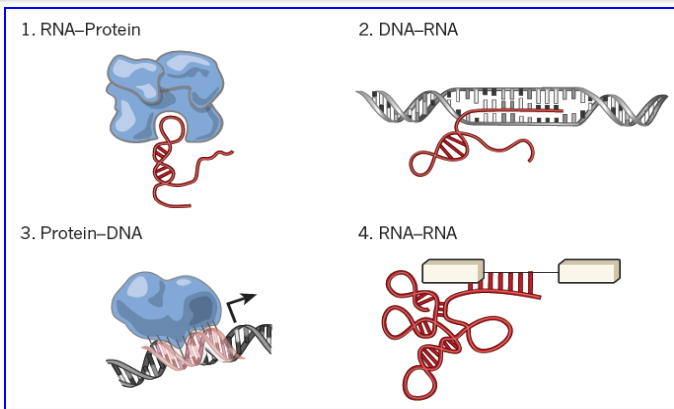
進行胃がん
非スキルス型



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

非コードRNAによるエピゲノム制御



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)

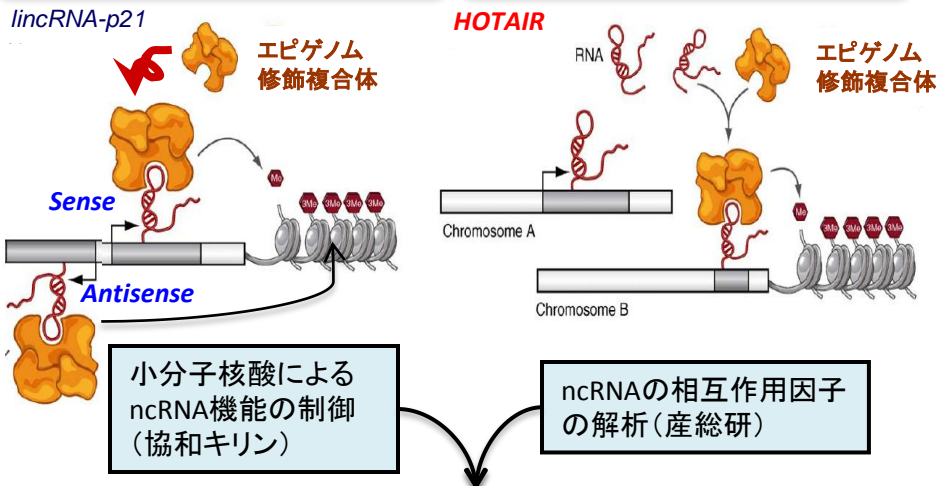
ncRNA機能に基づいた特異性の高いエピゲノム制御技術の開発
ncRNAを介したエピゲノム修飾機構の破綻が癌化、癌の病態変化に重要な役割を果たしている可能性が想定される。エピゲノム制御を標的とした医薬品開発を目指す上で、エピゲノム制御の特異性を規定するncRNAの作用機構の解明は重要である。

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)

非コードRNAはエピゲノム修飾の部位特異性を規定する

① 疾患関連プロモーターncRNA

② エピゲノム因子結合ncRNA



遺伝子特異的なエピゲノム制御法の確立

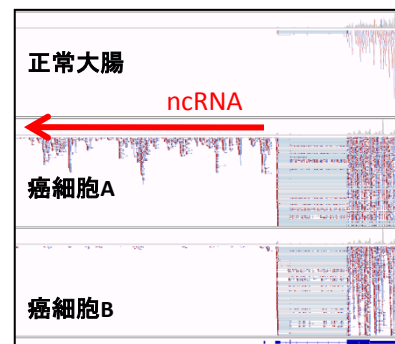


図1 ncRNA検索システムによる細胞種特異的非コードRNAの同定

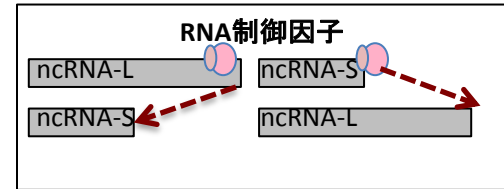


図2 ncRNAの機能多様化機構

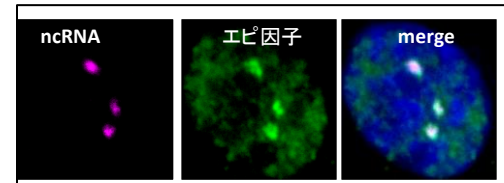


図3 ncRNAとクロマチン再構築因子複合体の共局在

核内複合体を構成するRNAについて配列解析を進めている

(野中、宮澤、近藤、大澤、廣瀬)

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

①「後天的ゲノム修飾解析技術開発」

(1) エピゲノム解析技術開発

(2) ヒストン修飾解析の微量化、高感度化に関する研究開発

(3) エピゲノム情報解析基盤技術の研究開発

②「後天的ゲノム修飾とがんとを関連づける基盤技術開発」

ヒト組織のエピゲノム解析に基づいた病態解明および標的としての検証実験

③「探索的実証研究」

(1) エピゲノム修飾を再現性よく定量的に解析するハイスループットアッセイ技術の開発

(2) 探索的実証研究

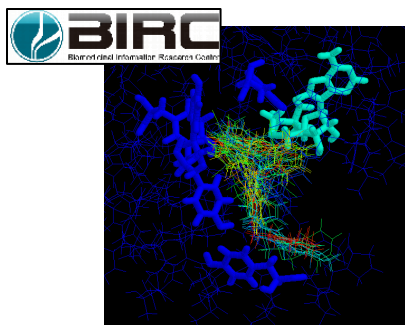
③ 探索的実証研究

主たる研究成果

- 細胞周期に伴うヒストン修飾プロファイルを取得
- 6候補分子についてアッセイ系を樹立した
- *In silico*デザインにより、阻害化合物を3分子に対して取得し、さらに共結晶化を進めた
- *In vitro*スクリーニングとして、4分子に対して結合ペプチド、3分子については化合物ライブラリーをスクリーニング終了あるいは実施中

*in silico*スクリーニング

理論計算による薬物スクリーニング



(産総研福西らとの共同研究)

*in vitro*スクリーニング

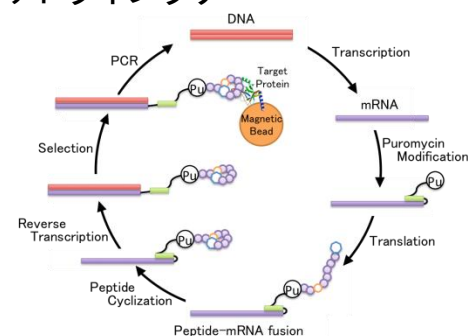


次世代がん研究シーズ
戦略的育成プログラム

- 理化学研究所天然化合物バンク
- 産業総合研究所天然物ライブラリー

参加企業の自社化合物ライブラリー

ペプチドライブラリー



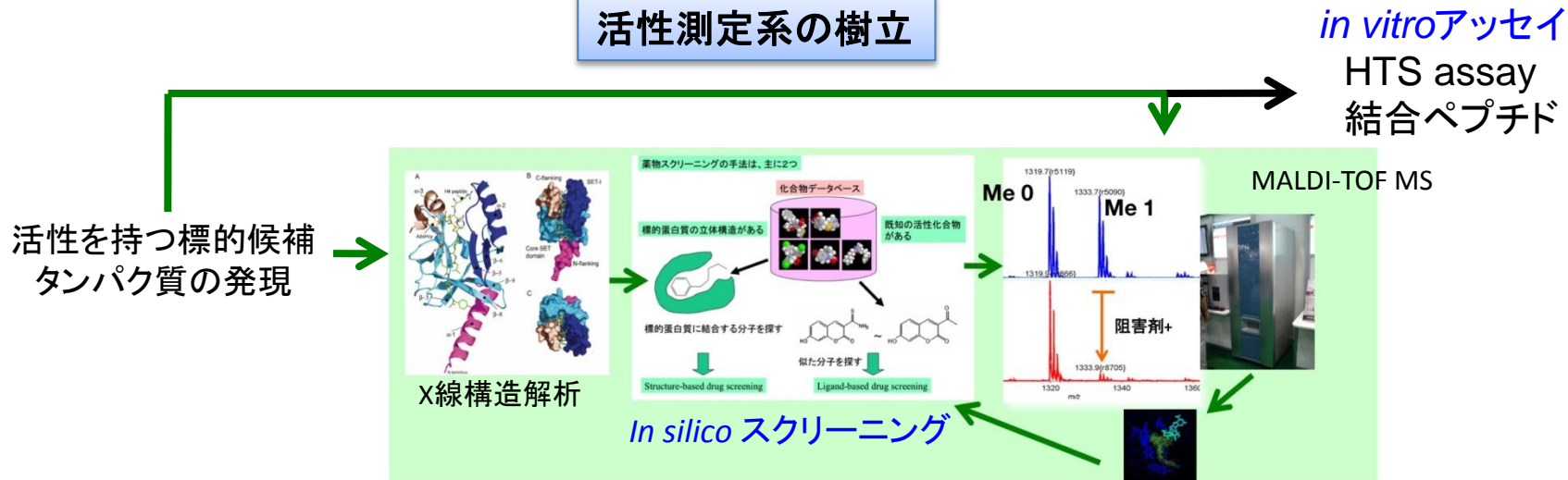
(東大理学部菅研究室との共同研究)

これらの化合物を用いたケミカルゲノミクスによる標的分子の検証を進める

研究開発項目毎の成果

③ 探索的実証研究

活性測定系の樹立



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</i> , <i>in vitro</i>
G9a (H3K9)	MALDI-TOFMS	<i>in silico</i> , <i>in vitro</i>
EZH2 (H3K27)	α -screening	<i>in vitro</i> (HTS)
JMJD1A(H3K9脱メチル)	MALDI-TOFMS/TR-FRET	<i>in vitro</i> (HTS)
EPI#05	autoradiography	<i>in silico</i> , <i>in vitro</i>
EPI#07	HTRF	<i>in vitro</i> (HTS)

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のHTSスクリーニングや結合ペプチドのスクリーニングも実施した。

3. 研究開発成果

(2) 知的財産権等の取得 及び (3) 成果の普及

		H22fy	H23fy	H24fy	H25fy	H26fy	H27fy	合計
特許出願	国内	0	1	4	2	6	1	14件
	外国	0	0	1	0	4	-	5件
	PCT	0	0	1	5	0	-	6件
論文(査読付き)		22	33	29	36	39	-	159件
学会発表		18	52	39	29	29	-	167件

4. 実用化に向けての見通し及び取り組み

(1) 成果の実用化の見通し 及び (2) 実用化に向けた具体的取り組み

- 多数のがん選択的なDNAメチル化マーカーを抽出し、一部を特許出願した。
- プロジェクト参画企業により、臨床血液検体を用いた検証、既存のメチル化マーカーとの性能比較を開始した。
- メチル化関連酵素は、分子ファミリー自体が比較的近年同定されたことに加えて多様であることから、優先的に阻害剤開発を進めるべくアッセイ系を構築し、参画企業での独自化合物ライブラリースクリーニングへの展開を開始した。
- 立体構造が決定されている分子については、*in silico*での化合物デザインから結合化合物をスクリーニングして加速化をはかる一方、独自に立体構造決定を進め、標的分子からリード化合物同定までのプロセス短縮を目指している。