

TGF- β 1抑制性PIポリアミドによる肝癌治療法の開発

高山忠利¹⁾, 高木恵子¹⁾, 森口正倫¹⁾, 藤原恭子²⁾

Development of PI polyamide targeting TGF- β 1 for liver cancer treatment

Tadatoshi TAKAYAMA¹⁾, Keiko TAKAGI¹⁾, Masamichi MORIGUCHI¹⁾,
Kyoko FUJIWARA²⁾

要旨

新規遺伝子制御薬ピロール・イミダゾール・ポリアミド(PIP)を用いてTGF- β 1の発現抑制を試み、ヒト肝癌細胞株(HepG2)に対する抗腫瘍効果を培養系で検討した。TGF- β 1抑制性PIP投与により、TGF- β 1の発現レベルが有意に抑制された($p < 0.05$)。また、ゲル内コロニー形成試験において肝癌細胞の足場非依存性の増殖が有意に抑制され($p < 0.05$)、Matrigel invasion アッセイでも細胞の浸潤を抑制する機能が示された。本研究結果より、TGF- β 1をターゲットとしたPIPは、肝癌治療薬候補として期待できると思われる。

1. はじめに

Transforming growth factor- β (TGF- β) は正常線維芽細胞が足場非依存性増殖能を獲得する際に必要な因子として発見され、肝癌を含む様々な癌において浸潤、転移、血管新生に際し促進的に働くことが知られている。従って、TGF- β の機能を阻害することにより、癌の進行を抑制することが期待できる。これまでに我々は配列特異的にDNAに結合するピロール・イミダゾール・ポリアミド(PIP)を用いた遺伝子発現制御薬の開発を行ってきた。カリフォルニア工科大学のダーバンらにより開発されたPIPは(Ref.1)、高い親和性と特異性で二重らせんDNA副溝に結合し、プロモーターの転写因子結合サイトを認識するように設計した場合は、下流の遺伝子の転写を阻害する事が可能である。特別なドラッグデリバリーシステムを要せず細胞内に取り込まれ、siRNAよりも安定であることから、新規の遺伝子発現制御薬として有望な分子である。PIPの哺乳動物細胞への作用を検証した研究として、代表者らは、MMP-9抑制性PIPの投与により、ヌードマウ

ス脾臓に移植したヒト大腸癌細胞株の肝転移が減少することを報告している(Ref.2)。また、酸化低密度リポ蛋白(LDL)受容体(LOX-1)に対するPIPがヒト血管内皮細胞の酸化LDLの取り込みを抑え、その結果アポトーシスを抑制するとの報告がある(Ref.3)。本研究においては、TGF- β 1抑制性PIPを設計し、ヒト肝癌細胞株に対する抗腫瘍効果を検討した。

2. 対象および方法

FSE2(脂肪特異性配列2)近傍にTGF- β 1抑制性PIPであるGB1101(図1)を作製し、ヒト肝癌細胞株(HepG2)に対する遺伝子発現量および機能を検討した。

1) 遺伝子発現量の検討

HepG2を10cmシャーレに 2×10^5 細胞/ml培養し、TGF- β 1抑制性PIPを $0.5 \mu\text{M} \sim 5 \mu\text{M}$ 濃度で投与し、24時間後RNAを採取し、real-time RT-PCRによりTGF- β 1の発現量を調べた。

1) 日本大学医学部外科学系消化器外科学分野
2) 日本大学医学部内科学系総合内科学分野
高山忠利: takayama.tadatoshi@nihon-u.ac.jp

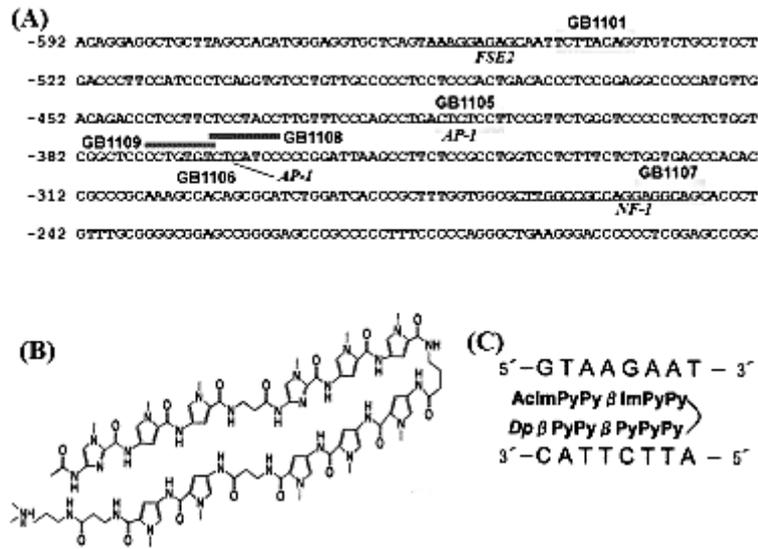


図1 TGF-β1抑制性PIPの設計

A) ヒトTGF-β1遺伝子プロモーターの配列と設計済みもしくは予定のPIPの配置。下線部は転写因子結合部位、転写因子はイタリックで示す。灰色のマーカーもしくは太い灰色線はPIPの認識部位。(B) GB1101の構造式。(C) GB1101によるDNA認識様式。

2) 培養系での機能検証

0.5μM～3μMのTGF-β1抑制性PIP存在下および非存在下でHepG2の培養を行い、ゲル内コロニー形成試験により足場非依存性の増殖能、Matrigel invasion アッセイにより細胞浸潤能を評価した。

3. 結果

1) TGF-β1抑制性PIPを0.5μM～5μM濃度で投与した結果、5μMの濃度でHepG2におけるTGF-β1の

発現レベルが有意に抑制された ($P < 0.05$) (図2A)。

2) ゲル内コロニー形成試験において、TGF-β1抑制性PIP投与後14日に100μm以上の大きさのコロニーを計測した結果、1μM以上の濃度がコロニー形成を有意に抑制した ($P < 0.05$) (図2B)。また、Matrigel invasion アッセイでは2μMのTGF-β1抑制性PIP投与によりコントロールと比べて細胞の浸潤を抑制した。

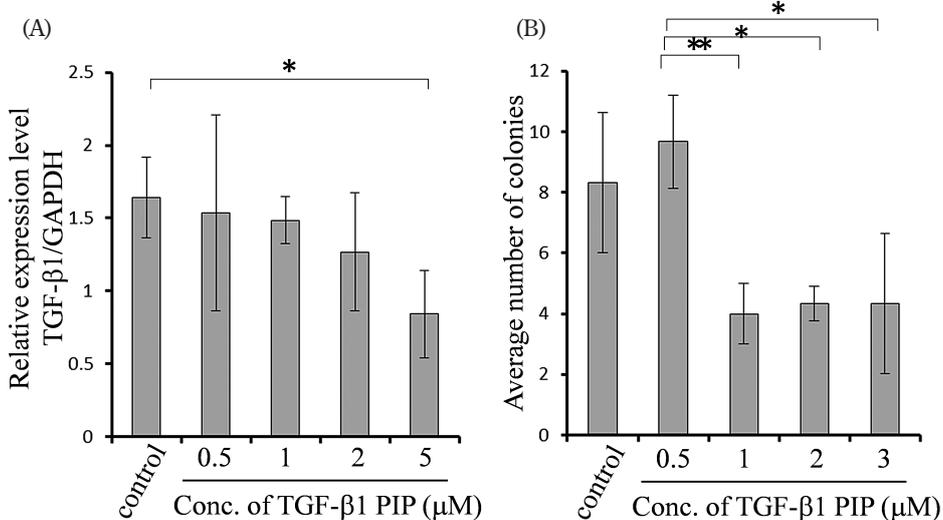


図2 肝癌細胞株HepG2に対するTGF-β1 PIPの効果
(A) Real time PCRによるTGF-β1 mRNA発現量の定量。(B) 足場非依存性コロニー形成能の定量。

4. 考 察

TGF- β 1プロモーターをターゲットとしたPIPは、TGF- β 1の発現を抑制し、肝癌細胞の足場非依存性の増殖と浸潤を抑制する機能を有すると考えられた。TGF- β が癌細胞の遊走・浸潤、血管新生に対し促進的に働くとする既存の研究から、TGF- β 1をターゲットとしたPIPは肝癌の治療薬候補として期待できると思われる。

文 献

- 1) Dervan PB. Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorg Med Chem* 2001; **9**: 2215-2235.
- 2) Wang X, Nagase H, Watanabe T, et al. Inhibition of MMP-9 transcription and suppression of tumor metastasis by pyrrole-imidazole polyamide. *Cancer Sci.*2010; **101**: 759-766.
- 3) Ueno T, Fukuda N, Tsunemi A, et al. A novel gene silencer, pyrrole-imidazole polyamide targeting human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 gene improves endothelial cell function. *J Hypertens.* 2009; **27**: 508-516.