

ゲノム化学に基づく先進医療開発研究 —抗腫瘍効果を持つピロール・イミダゾール・ポリアミドの開発

藤原恭子^{1,2)}, 福田 昇^{1,3,4)}, 齋藤孝輔^{1,2)}, 上野高浩^{1,3)}, 相馬正義^{1,2)}

Researches to develop advanced medicines based on the chemical genomics : Development of pyrrole imidazole polyamides with anti-tumor activity

Kyoko FUJIWARA^{1,2)}, Noboru FUKUDA^{1,3,4)}, Kosuke SAITO^{1,2)},
Takahiro UENO^{1,3)}, Masayoshi SOMA^{1,2)}

要旨

ピロール・イミダゾール (PI) ポリアミドは配列特異的にDNAに結合する性質を持つ低分子化合物である。高い親和性と特異性で二重らせんDNA副溝に結合し、転写因子結合サイトに対して設計した場合は、競合阻害により転写を抑制する。これまでに我々は腫瘍特異的に発現している遺伝子を標的としてPIポリアミドを作成し、抗腫瘍効果を検討してきた。これらのPIポリアミドのうち、E-box配列を認識し癌遺伝子MYCの下流遺伝子の発現を抑制する分子、インプリンティング疾患Beckwith-Wiedemann症候群において過剰発現している*LIT1*の発現を抑制する分子、前立腺癌において観察される融合遺伝子の生成・発現を抑制する分子が有意な抗腫瘍効果を示している。

1. はじめに

分子標的治療は疾病に関連した分子の発現や機能を抑制する治療法であるが、近年、癌や高血圧など難治性疾患の発症メカニズムが分子レベルで解明されるようになり、多くの薬剤の開発が進んでいる。ヒトゲノムの解読が完了したこと、次世代シーケンサーが開発されたことにより、疾病関連遺伝子変異の探索が容易になったことも分子標的治療薬の開発に拍車をかけている。

日本大学医学部戦略的研究基盤形成支援事業「ゲノム化学に基づく先進医療開発研究拠点」プロジェクトでは、配列特異的なDNA結合能を持つピロール・イミダゾール・ポリアミド (PIポリアミド) を用いて、疾患特異的に発現異常を起こしている遺伝子の転写調節を試みてきた。

PIポリアミドは1996年にカリフォルニア工科大学のDervanらが発見した低分子有機化合物であ

り、その構造やDNAへの結合様式についての解析が現在までに数多くなされている¹⁾。芳香族アミノ酸 *N*-methylpyrrole (Py) および *N*-methylimidazole (Im) で構成され、DNAに配列特異的に結合する性質を持つ。ImとPyの組み合わせ次第で多様な配列のDNAに結合させることが可能であり、遺伝子プロモーター領域の転写因子結合部位を認識するPIポリアミドは、転写因子の結合を競合阻害し、目的遺伝子の転写阻害を行うことが期待できる。特別なDrug Delivery Systemを必要とせず、生体内でも安定であることから、PIポリアミドは新規の転写阻害剤として期待される分子である。

これまでに我々の研究室では、MMP-9抑制PIポリアミドの投与により、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²⁾、酸化低密度リポ蛋白 (LDL) 受容体 (LOX-1) に対するPIポリアミドがヒト血管内皮細胞の酸化LDLの取

1) 難治疾患治療開発プロジェクト

2) 日本大学医学部内科学系総合内科・総合診療医学分野

3) 日本大学医学部内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野

4) 日本大学大学院総合科学研究科

相馬正義 : souma.masayoshi@nihon-u.ac.jp

り込みを抑え、その結果アポトーシスを抑制すること³⁾などについて報告を行ってきた。またTGFβ抑制性PIポリアミドが皮膚の肥厚性瘢痕⁴⁾、高塩食による腎炎⁵⁾、アルカリ性角膜外傷⁶⁾など、多くのTGFβ関連疾患の症状を改善することを確認し、現在、ヒトとゲノム構造の近いマーマセットを用いて、TGFβ抑制性PIポリアミドの前臨床試験を行っている。本紀要では抗腫瘍効果を持つPIポリアミドの開発状況について報告する。

2. 抗腫瘍効果を持つPIポリアミドの開発

1) E-box 認識PIポリアミドの開発

前癌遺伝子MYCは多くのヒト悪性腫瘍においてゲノムレベルでの増幅や発現レベルの上昇を示すことが報告されている。MYCは basic-helix-loop-helix leucine zipper 型転写因子であり、MAX 蛋白質と二量体を形成し、DNAのE-box配列に結合する。MYCにより発現が制御されている遺伝子は4千以上ののぼり、それらの多くは細胞の成長、増殖、代謝、アポトーシス、分化に関与し、細胞の形質変化を促進している。腫瘍の増殖抑制を目的として、MYCもしくはMYC下流遺伝子の機能や発現量を効果的に制御するために様々なアプローチが試みられてきたが、手技の煩雑さ、生体内への輸送の難しさなどの問題があり実用化には至っていない。

我々は、E-box配列CACGTGを完全にまたは部分的に認識するPIポリアミドを複数作成し(図1A)、そのうちMyc-6がヒト骨肉腫細胞株、慢性骨髄性白血病細胞株に対し増殖抑制効果を示す事を確認した。骨肉腫細胞株MG63においては、1μMより増殖能、コロニー形成能を有意に抑制し(図1B)、5μM以上で細胞移動能を低下させた。マウス皮下にMG63を移植して作成したXenograftの成長もMyc-6の尾静脈投与により有意に抑制された(図1C)。Myc-6による細胞死の様式について検討したところ、Myc-6投与により、初期アポトーシスのマーカーであるphosphatidyl serineの細胞膜外側への露出と、後期アポトーシスのマーカーである切断型Caspase3の出現が観察された。細胞周期の解析においてはMyc-6投与群の細胞ではS期、M期の細胞数の割合が減少し、逆にG0/G1期にある細胞の割合が非投与群と比べて有意に上昇していた。

Myc-6の詳細な作用機序を解明するためにMyc-6

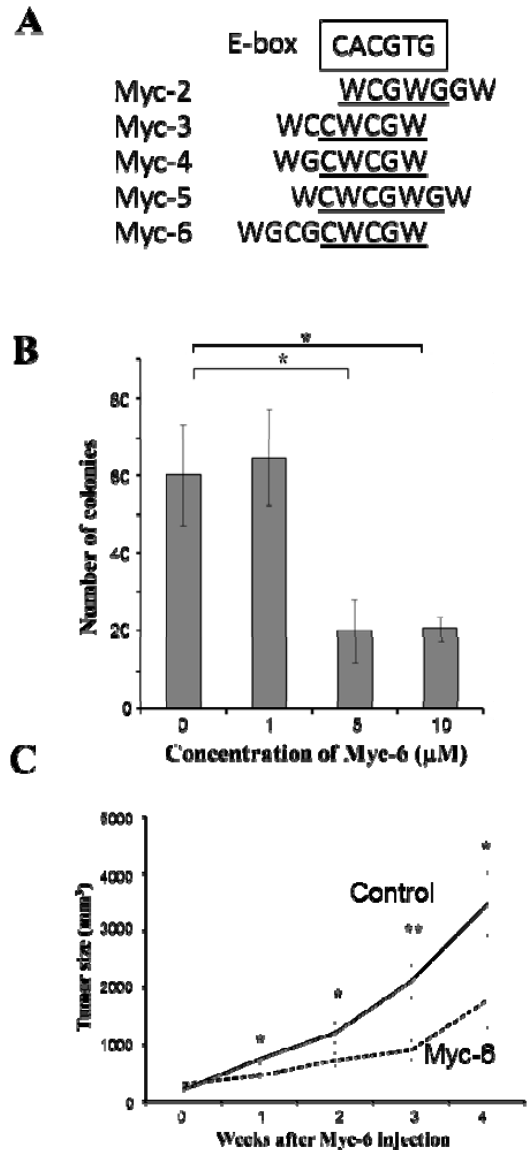


図1 E-box 認識PIポリアミドのデザインと抗腫瘍効果 (A) 各ポリアミドが認識するDNA配列。WはAもしくはT。 (B) ゲル内コロニー形成試験 (C) マウス皮下に移植したヒト骨肉腫細胞の増殖曲線

ポリアミドにより発現が変化する遺伝子についてAffymetrix GeneChip U133 Plusを用いて調べたところ、10μMのMyc-6投与後有意な発現低下を示した14の遺伝子のうち、長鎖non-coding RNAの一つであるMALAT1遺伝子の上流1000bp以内に、E-box類似配列があることが判った。Myc-6がこの配列に特異的に結合することがゲルシフトアッセイにより確認され、またsiRNAによりMG63におけるMALAT1の発現をノックダウンした結果、有意な増殖抑制効果が観察された。この結果よりMALAT1

がMyc-6の直接の標的の一つであり、Myc-6による細胞増殖抑制に関与している可能性が強まった⁷⁾。

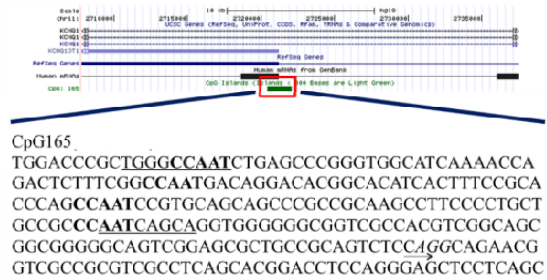
現在、Myc-6と他の抗がん剤との併用プロトコルの確立、MALAT1の発現をより効果的に抑制するポリアミドの開発を目指して引き続き研究を行っている。

2) LIT1抑制PIポリアミドによる腎芽腫細胞株の増殖抑制

Beckwith-Wiedemann症候群(以下、BWS)は臍帯脱出、巨舌、巨体を三主徴とする先天性過形成症候群で5~10%に胎児性腫瘍(腎芽腫、肝芽腫、膵芽腫)を合併する。染色体11p15.5のインプリンティング調整領域(KvDMR, H19DMR)のメチル化異常や欠失、父型対立遺伝子の獲得などの結果、母型片親発現調整遺伝子群の絶対的もしくは相対的な発現低下が起こることにより発生するインプリンティング疾患である⁸⁾。通常状態では抑制されているKvDMR領域の母方対立アリルがBWSでは脱メチル化してLIT1遺伝子が過剰発現し、腫瘍抑制遺伝子p57^{KIP2}を含む周辺遺伝子を抑制しているとされる。そこで我々は、LIT1遺伝子を標的としたPIPを用いてヒトBWS線維芽細胞株におけるLIT1遺伝子の発現を抑制し、p57^{KIP2}遺伝子の再発現効果を検討した。

LIT1遺伝子プロモーター領域に存在するCCAAT boxを認識するPIポリアミド(h-CCAAT1, h-CCAAT3, 以下PI1, 3)を設計・合成し(図2A)、ヒトBWS線維芽細胞株(BWS6, BWS9)および腎芽腫細胞株G401に投与したところ、いずれにおいてもLIT1の発現低下を認めた。G401細胞株を用いた詳細な検討では、PI1とPI3の同時投与により、通常LIT1によりサイレンシングされているp57^{KIP2}の発現上昇が観察され、細胞増殖率の低下も認めた。さらにFACS解析から、PI1, PI3の投与によりアポトーシスが起きていることが確認できた(図1B)。現在免疫不全マウスにG401を皮下注射し作成したXenograftに対するPI1とPI3の効果を解析中である。また、p57^{KIP2}以外のLIT1周辺遺伝子の中にも腫瘍関連遺伝子があることから、それらについても現在検討を行っている。

A



B

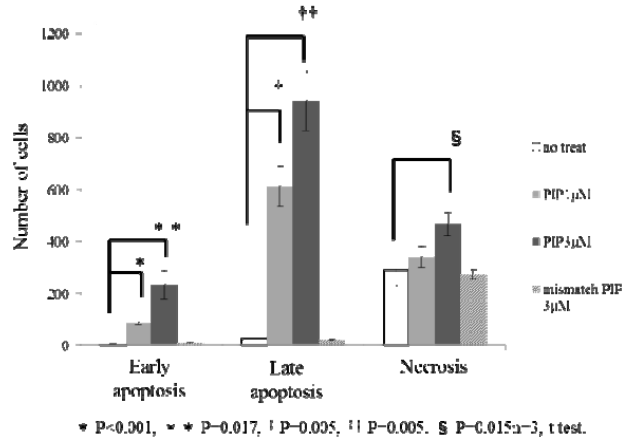


図2 LIT1抑制PIポリアミドのデザインと抗腫瘍効果 (A) LIT1プロモーター上のポリアミド認識部位。太字; CCAAT配列, 下線; ポリアミドの標的配列, 斜字+矢印; 転写開始点 (B) LIT1抑制PIポリアミドによるアポトーシスの誘導効果

3) 前立腺がん特異的融合遺伝子の生成を抑制するPIポリアミドの開発

前立腺において染色体再配列によりアンドロゲン応答遺伝子TMPRSS2と癌原遺伝子ERGが融合し、生じた融合遺伝子は、細胞の癌化・悪性化、およびアンドロゲン感受性の変化に関与することが報告され、注目されている。この融合はアンドロゲンレセプター(AR)がゲノム上のAR結合配列に結合して両遺伝子共通の特定配列を切断し、染色体再配列を起こすことで生じることが判っている⁹⁾。

そこで、切断される特定配列に結合し、TMPRSS2-ERG融合遺伝子の発生を抑制するPIポリアミドを設計し、細胞増殖/遊走能に与える影響を、前立腺癌細胞(LNCaP細胞)を用いて検討した。LNCaP細胞のゲノム上には通常の状態では融合遺伝子が存在しないが、アンドロゲン刺激により組み換えが起こり、融合遺伝子が生じる。

まず最初にLNCaP細胞に対し、切断配列に特異的に結合するPIポリアミド (Fusionポリアミド) を1ないし 5 μ M加え、アンドロゲン刺激を行ったところ、TMPRSS2-ERG 遺伝子の発現低下、ERG 蛋白量の低下を確認した。また、Fusionポリアミド添加による細胞増殖能、および遊走能の低下がMTS assay, Cell migration assayにて確認された。さらにヌードマウスにLNCaP細胞を皮下注射して腫瘍を形成し、Fusionポリアミドを尾静脈より投与したところ、非投与群と比較して有意な腫瘍体積減少を確認した。以上の結果より、切断配列に結合するFusionポリアミドは融合遺伝子およびERGの発現を抑制し、さらに細胞増殖能、遊走能を抑え、*in vivo*においても抗腫瘍効果を持つ事が確認できた。また生体投与によりマウスに明確な健康上の変化が観察されなかったことから、Fusionポリアミドの安全性が高い事が証明された。

3. 今後の展望

これまでに、上記で紹介したPIポリアミドが有意な抗腫瘍効果を持つ事が確認できたため、現在、その作用機序や副作用について主に*in vivo*での解析を行い、実用化に向けたデータを集めている。また、これらの研究と並行して、より高い殺細胞効果と腫瘍特異性を兼ね備えたPIポリアミドの開発を目指して、腫瘍特異的な配列変異やゲノム増幅を認識するPIポリアミドにアルキル化剤などをコンジュゲートした分子を作成し、機能解析を行っている。

参考文献

- 1) Dervan PB. Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorg Med Chem.* 2001 Sep; 9(9): 2215-35.
- 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 Mar; 101(3): 759-66.
- 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 Mar; 27(3): 508-16.
- 4) Washio H1, Fukuda N, Matsuda H, et al. Transcriptional inhibition of hypertrophic scars by a gene silencer, pyrrole-imidazole polyamide, targeting the TGF- β 1 promoter. *J Invest Dermatol.* 2011 Oct; 131(10): 1987-95.
- 5) Matsuda H, Fukuda N, Ueno T, et al. Transcriptional inhibition of progressive renal disease by gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeting of the transforming growth factor- β 1 promoter. *Kidney Int.* 2011 Jan; 79(1): 46-56.
- 6) Chen M1, Matsuda H, Wang L, et al. Pretranscriptional regulation of Tgf- β 1 by PI polyamide prevents scarring and accelerates wound healing of the cornea after exposure to alkali. *Mol Ther.* 2010 Mar; 18(3): 519-27.
- 7) Taniguchi M, Fujiwara K, Nakai Y, et al. Inhibition of malignant phenotypes of human osteosarcoma cells by a gene silencer, a pyrrole-imidazole polyamide, which targets an E-box motif. *FEBS Open Bio.* 2014 Mar 13; 4: 328-34.
- 8) Weksberg R, Nishikawa J, Caluseriu O, et al. Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ1OT1. *Hum Mol Genet.* 2001 Dec 15; 10(26): 2989-3000.
- 9) Lin C, Yang L, Tanasa B, et al. Nuclear receptor-induced chromosomal proximity and DNA breaks underlie specific translocations in cancer. *Cell.* 2009 Dec 11; 139(6): 1069-83.