

# 肝内胆管癌特異的融合遺伝子を標的としたPIPの開発

高木恵子<sup>1)</sup>, 高山忠利<sup>1)</sup>, 森口正倫<sup>1)</sup>, 相馬正義<sup>2)</sup>, 藤原恭子<sup>2)</sup>

## Development of the PIP targeting intrahepatic bile duct cancer-specific fusion gene

Keiko TAKAGI<sup>1)</sup>, Tadatoshi TAKAYAMA<sup>1)</sup>, Masamichi MORIGUCHI<sup>1)</sup>,  
Masayoshi SOMA<sup>2)</sup>, Kyoko FUJIWARA<sup>2)</sup>

### 要旨

近年、肝内胆管がん (ICC) 細胞のゲノム中に、特異的な融合遺伝子が存在することが知られるようになった。本研究では配列特異的にDNAに結合する性質を持つPIポリアミドにアルキル化剤を付加した化合物ChB-PIPを合成し、ICC特異的融合遺伝子FGFR2-BICC1を標的とした治療薬の開発を試みている。現在までに、高純度のChB-PIPの合成に成功し、この分子がFGFR2-BICC1融合部位のDNA配列に特異的に結合することを確認している。

### 1. はじめに

肝内胆管がん (ICC) は肝臓に生ずる悪性腫瘍の中で2番目に高い発生頻度を示すが、放射線療法や化学療法による治療効果は低く、外科的切除が困難な場合や再発した場合の有効な治療法は現時点では存在しない。近年、次世代シーケンサーを用いた解析が進み、腫瘍特異的な融合遺伝子が次々と発見されている。融合遺伝子は正常組織には存在しないこと、その転写産物が正常細胞の腫瘍性変換を促進する機能を持つことなどから治療標的として非常に有望であると考えられる。ICCにおいても最近、fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2) が、BicC family RNA binding protein 1 (BICC1) やadenosylhomocysteinase-like 1 (AHCYL1) など、全く異なる遺伝子と融合した異常配列が複数発見されている<sup>1)</sup>。これらの融合遺伝子を発現している腫瘍細胞ではFGFR2下流のシグナル伝達系が亢進していることから、FGFR阻害剤が治療薬として期待できるが<sup>2)</sup>、正常細胞への影響も懸念されるため、融合遺伝子そのものを標的とした治療法の開発が待たれている。そこで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) とアルキル化剤を組み合わせた分子を作成し、融合遺伝子陽性の細胞のみを効果的に殺傷する薬剤の開発を企画した。PIPは高い親和性と特異性で二重らせんDNA副溝に結合する性質を持ち、細胞内に容易に取り込まれ、siRNAよりも安定であることから、新規のゲノム制御薬として有望な分子である<sup>3)</sup>。特定のDNA配列を認識するPIPと、DNA損傷を惹起するアルキル化剤を結合させることで、腫瘍特異的な変異配列だけを変性させ、腫瘍細胞のみを特異的に殺傷できる副作用の少ない薬剤の開発が可能となると考えた。本研究では、ICC特異的な融合遺伝子のうち、Araiらの報告において<sup>1)</sup>、マウス繊維芽細胞株NIH3T3を腫瘍化させる機能が確認されているFGFR2-BICC1融合遺伝子を標的としたChB-PIPを合成し、その解析を行った。

### 2. 対象および方法

#### 1) クロラムブシル付加PIPの合成

FGFR2-BICC1融合遺伝子の融合部分の配列を認識するPIPにアルキル化剤クロラムブシル (ChB) を

1) 医学部外科学系消化器外科学分野

2) 内科学系総合内科・総合診療医学分野  
藤原恭子: fujiwara.kyoko@nihon-u.ac.jp

結合させた分子 (ChB-PIP) を設計し合成した (図1)。合成はペプチド合成器 PSSM8 を用いて行い、脱水縮重反応により ChB を付加した。HPLC による精製と質量分析機による確認の後、実験に使用する。

2) ChB-PIP と標的DNA 結合能のゲルシフトアッセイによる解析

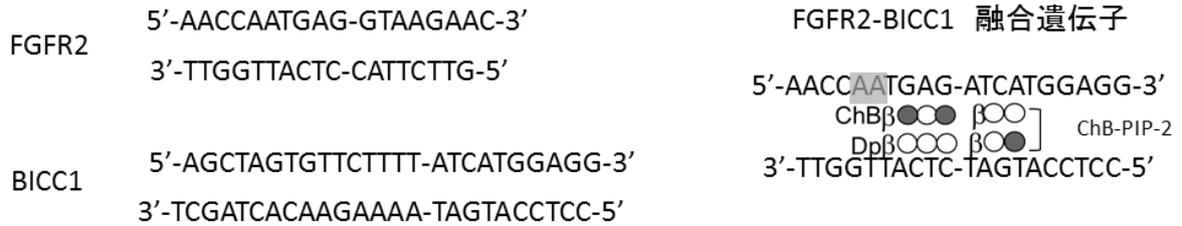
FGFR2-BICC1 融合部の配列を含む20塩基のオリゴ二本鎖DNAにFITC ラベルを付加した分子を作成した。ネガティブコントロールとして全く配列の異なるFITC付加DNAも作成した。これらのDNAと、ChB-PIP もしくはPIP部分の配列が全く異なるネガ

ティブコントロールChB-PIPをインキュベートし、20%のポリアクリルアミド1xTAEゲル中で電気泳動時を行った。LAS4000により画像解析を行い、バンドの移動度よりChB-PIP のDNAへの結合能を判定した。

3. 結果

1) FGFR2-BICC1 融合遺伝子認識 ChB-PIP の合成

HPLC による精製後、最終的に0.98mg のChB-PIPを得た。HPLCによる純度の解析から、若干の不純物はあるものの、ChB-PIPが唯一の主要なピークであり、問題なく実験に用いることが出来ると考え、以下の解析を行った。



○=pyrrole, ●=imidazole, β=beta alanin, [ =γ-diaminobutyric acid, Dp=Dimethylaminio)propyl, ChB=クロラムブシル  
 ●○のペアはGCを、○●のペアはCGを認識し、○○はTAもしくはATを認識。  
 β 及び [ もTAもしくはATを認識する。  
 灰色の塩基がクロラムブシル(ChB)によりアルキル化される。

図 1 融合領域認識 ChB-PIP の配列と DNA 認識様式

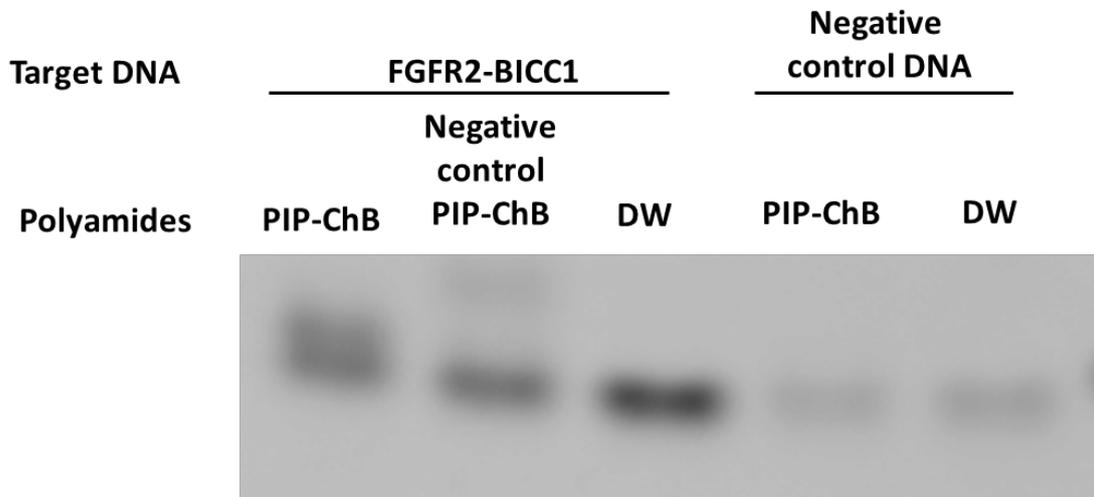


図 2 ゲルシフトアッセイによる ChB-PIP の標的DNA 結合能の検討

## 2) ChB-PIP と標的DNA 結合能の解析

合成したChB-PIPの標的DNAへの結合能をゲルシフトアッセイにより検討した。図2に示す通り、ChB-PIPとともに泳動したFGFR2-BICC1融合部配列DNAはコントロールと比較して明らかにシフトしていたが、ネガティブコントロールChB-PIPにおいてはシフトはみられなかった。また、ChB-PIPによる結合配列を含まないDNA配列に対しては、ChB-PIPは結合能を有さなかった。

## 4. 考察・今後の展望

以上の結果より、FGFR2-BICC1融合遺伝子の融合領域に特異的に結合するChB-PIPを合成できたことが判った。現在のところ、融合遺伝子陽性のICC細胞株が樹立されていないことから、FGFR2-BICC1の発現ベクターを導入したICC細胞株の樹立を試みている。この細胞株に対し、今回合成したChB-PIPを投与し、FGFR2-BICC1陽性細胞に対して特異的に抗腫瘍効果を示すかどうか検討を行う。

## 文 献

- 1) Fibroblast growth factor receptor 2 tyrosine kinase fusions define a unique molecular subtype of cholangiocarcinoma. Arai Y, Totoki Y, Hosoda F, et al. *Hepatology*. 2014 Apr;59(4):1427-34.
- 2) Integrated genomic characterization reveals novel, therapeutically relevant drug targets in FGFR and EGFR pathways in sporadic intrahepatic cholangiocarcinoma. Borad MJ, Champion MD, Egan JB, et al. *PLoS Genet*. 2014 Feb 13;10(2):e1004135.
- 3) Molecular recognition of DNA by small molecules. Dervan PB. *Bioorg Med Chem*. 2001 Sep;9(9):2215-35.