

腫瘍特異的融合遺伝子を標的とした ピロール・イミダゾール・ポリアミド (PIP) の開発

藤原恭子¹⁾, 渡邊揚介²⁾, 石塚悦昭²⁾, 平野隆幸²⁾,
長崎(前岡)瑛里²⁾, 越永従道²⁾, 福田 昇³⁾, 相馬正義¹⁾

Development of Pyrrole-imidazole Polyamide (PIP) Targeting Tumor Specific Fusion Gene

Kyoko FUJIWARA¹⁾, Yosuke WATANABE²⁾, Yoshiaki ISHIDUKA²⁾,
Takayuki HIRANO²⁾, Eri NAGASAKI-MAEOKA²⁾, Tsugumichi KOSHINAGA²⁾,
Noboru FUKUDA³⁾, Masayoshi SOMA¹⁾

要旨

染色体異常により生じる融合遺伝子は、がんの診断マーカーや治療標的として非常に有望である。我々はこれまでに、配列特異的にDNAに結合する性質を持つピロール・イミダゾール・ポリアミド(PIP)を用いて融合遺伝子を標的とした薬剤の開発を行ってきた。それらのうち、胞巣型横紋筋肉腫(ARMS)特異的融合遺伝子*PAX3-FOXO1*を認識するPIPにアルキル化剤クロラムブシル(ChB)を付加した化合物Rhab-ChB1が、培養腫瘍細胞に対して強い増殖抑制効果を持つ事を確認した。しかしながら、この作用は標的的特異的ではなく、融合遺伝子陰性の細胞に対しても同様の効果を示した。なお、Rhab-ChB1はChBの少なくとも100倍以上低い濃度で細胞障害性を示したことから、新規のアルキル化剤として応用できる可能性が考えられた。

1. 背景

がん細胞では、転座、逆位、欠失などの染色体異常の結果、全く異なる遺伝子が結合した融合遺伝子が形成される現象が知られている。正常細胞には存在せず、がん細胞の増殖や浸潤を促進する機能を持つ場合が多いことから、融合遺伝子は診断マーカーとしても治療標的としても非常に適した分子である。今日までに白血病や前立腺癌、ユーイング肉腫等、様々な腫瘍で融合遺伝子が同定され、EML4-ALK融合遺伝子の非小細胞がんに対してはALK阻害剤が実用化されている。

我々はこれまでに、配列特異的にDNAに結合する性質を持つピロール・イミダゾール・ポリアミド(PIP)を用いて肝内胆管がんや胞巣型横紋筋肉腫(ARMS)特異的な融合遺伝子を標的とした薬剤の開発を行ってきた。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¹⁾。この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。

ARMSにおいては約55%のケースで、転写因子*PAX3*のN末端側と、同じく、転写因子である*FOXO1*のC末端側が融合した*PAX3-FOXO1*が観察される。ARMS全体の5年生存率が50%であるのに対し、*PAX3-FOXO1*陽性患者では8%と低いことも報告されている²⁾。*PAX3-FOXO1*配列を導入したマウスがARMSを発症する³⁾ことから、同融合遺伝子はARMS発症のドライバー遺伝子と言え、治療標的として非常に期待できると考えた。そこで我々は、*PAX3-FOXO1*の融合部を認識するPIPにアルキル化剤クロラムブシル(ChB)を付加したRhab-ChB1を合成し、その機能解析を行った。

1) 内科学系総合内科・総合診療医学分野
2) 外科学系小児外科学分野
3) 内科学系腎臓高血圧内分泌内科学分野
藤原恭子: fujiwara.kyoko@nihon-u.ac.jp

2. 対象および方法

1) ChB付加PIPの合成

Rhab-ChB1のDNA認識様式と構造式を図1A, Bに示す。これに加え, ChBを付加していないPIP配列のみのRhab1も合成した。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, 実験に使用した。

2) ゲルシフトアッセイによるRhab-ChB1の標的DNA結合能の解析

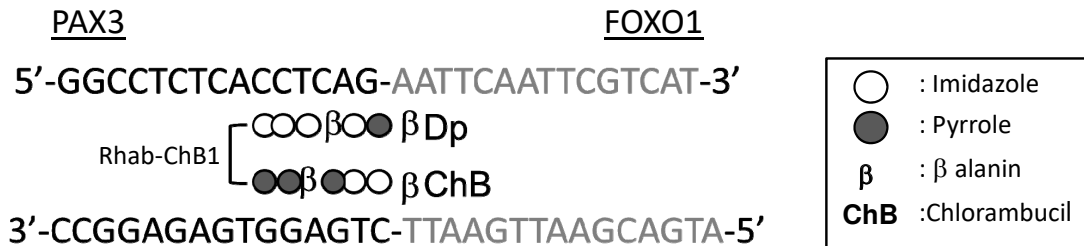
*PAX3-FOXO1*融合部の配列を含む20塩基の二本鎖DNAにFITCラベルを付加した分子を作成した。ネガティブコントロールとして, 全く配列の異なるFITC付加DNAも作成した。これらのDNAと, Rhab-ChB1またはRhab1を37°Cで1時間インキュ

ベートした後, 20%のポリアクリルアミド1xTAEゲル中で電気泳動時を行い, 移動度の違いを解析した。

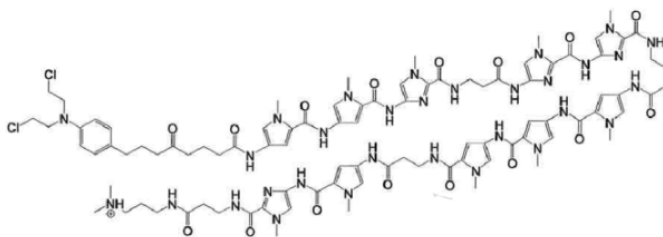
3) 細胞生存率の検討

細胞を1000細胞/wellの密度で96 well plateに播種し, 24時間後にRhab-ChB1, Rhab1またはChBのみを0.001 μM ~ 1 μMの範囲で投与した。細胞は, *PAX3-FOXO1*陽性細胞としてARMS細胞株のCRL2061およびNRS-1, 陰性細胞として胎児型横紋筋肉腫細胞株のRMS-YM および大細胞肺癌細胞株NCI H460の4種類を用いた。NRS-1以外の細胞株については, 6または7日目の時点でWST8 assayを行い, 細胞生存率を解析した。NRS-1については, 薬剤投与後14日目の時点で細胞数の計数を行った。

A



B



C

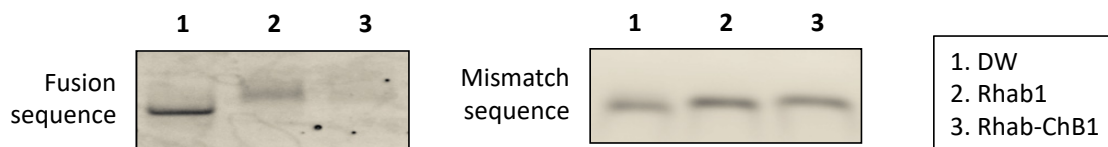


図1 Rhab-ChB1 の設計

A. *PAX3-FOXO1*の融合領域を認識するChB付加PIP (Rhab-ChB1)を設計した。

B. Rhab-ChB1の化学構造。

C. Rhab-ChB1の標的配列特異的なDNA結合能をゲルシフトアッセイにより確認した。

4) 細胞周期の解析

CRL2061細胞を 8×10^4 細胞/wellの密度で6well plateに播種し、24時間後に $1 \mu\text{M}$ Rhab-ChB1, Rhab1またはChBを投与した。その後12,24,48時間目に細胞を回収し、エタノール中 4°C で12時間以上固定した。その後、Propidium Iodideを用いて核内DNAを染色し、フローサイトメーターにて細胞周期の分布を解析した。

3. 結果

1) Rhab-ChB1と標的DNA結合能の解析

ゲルシフトアッセイの結果、Rhab-ChB1もしくはRhab1とともに泳動したPAX3-FOXO1融合部配列DNAは、コントロールと比較して明らかな泳動度の遅れを示し、両PIPが標的DNAに対して結合することが判った。一方、PAX3-FOXO1融合部の配列を含まないDNAに対しては、どちらのPIPも結合能を示さなかった。

2) Rhab-ChB1投与後の細胞生存率の変化

Rhab-ChB1投与後の細胞生存率を解析したとこ

ろ、 $0.01 \mu\text{M}$ 以上の投与で顕著な生存率の低下を認めた。一方、ChBの付加されていないRhab1および、ChB単体の投与では生存率の変化は確認できなかった。なお、この結果はPAX3-FOXO1陽性細胞(図2A)、陰性細胞(図2B)いずれにおいても観察され、融合遺伝子特異的な効果ではなかった。

3) Rhab-ChB1の細胞障害性の機序の検討

Rhab-ChB1投与による細胞生存率の低下が細胞死の誘導によるものか、あるいは増殖抑制によるものかを確認するために、フローサイトメーターにて細胞周期の分布を調べた。解析の結果、Rhab-ChB1投与細胞では、G2/M期の細胞の割合が増えたが、死細胞画分であるsub-G1の割合には変化がみられなかった(図3)。

4. 考察

合成したRhab-ChB1は、PAX3-FOXO1融合部のDNA配列に特異的に結合することを確認した。Rhab-ChB1は、 $0.01 \mu\text{M}$ 以上の濃度で細胞の生存率を顕著に低下させること、また、それはG2/Mアレ

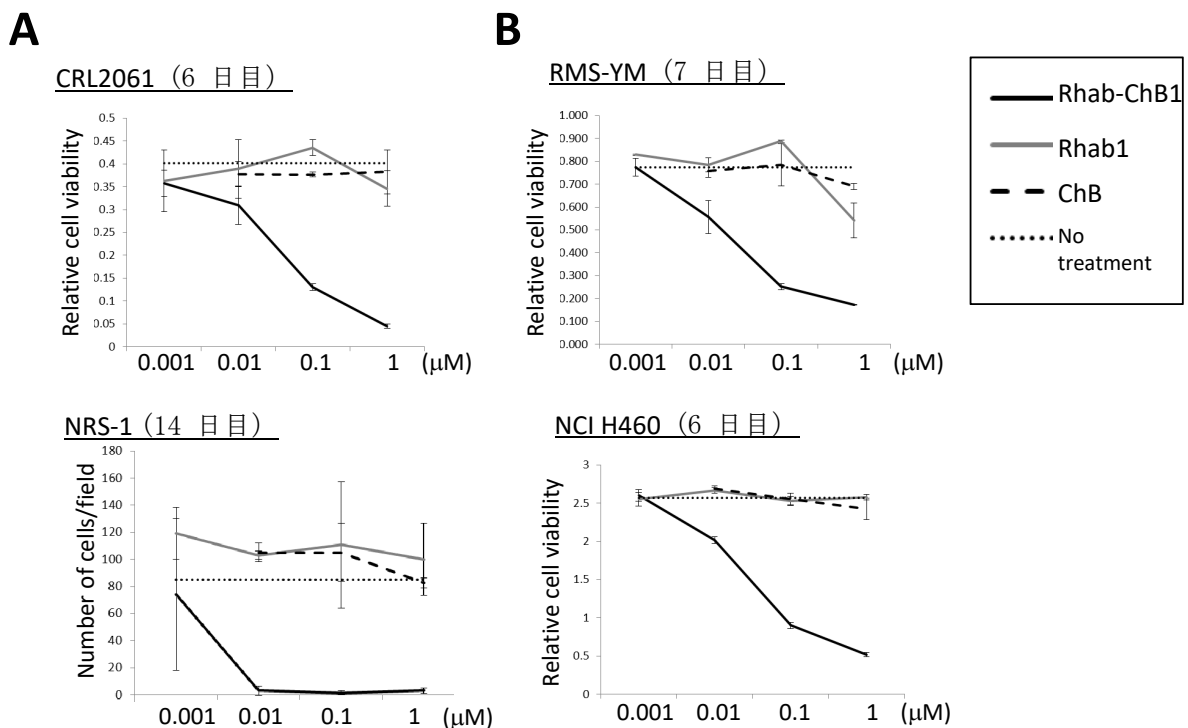


図2 Rhab-ChB1投与後の細胞生存率の解析

細胞に $0.001 \mu\text{M}$ ~ $1 \mu\text{M}$ の濃度のRhab-ChB1, Rhab1, ChBを投与し、6~14日目のいずれかの時点での生存率の検討を行った。PAX3-FOXO1融合遺伝子陽性細胞(A)および陰性細胞(B)いずれにおいても、Rhab-ChB1は $0.01 \mu\text{M}$ 以上の濃度で顕著な生存率の抑制効果を示した。

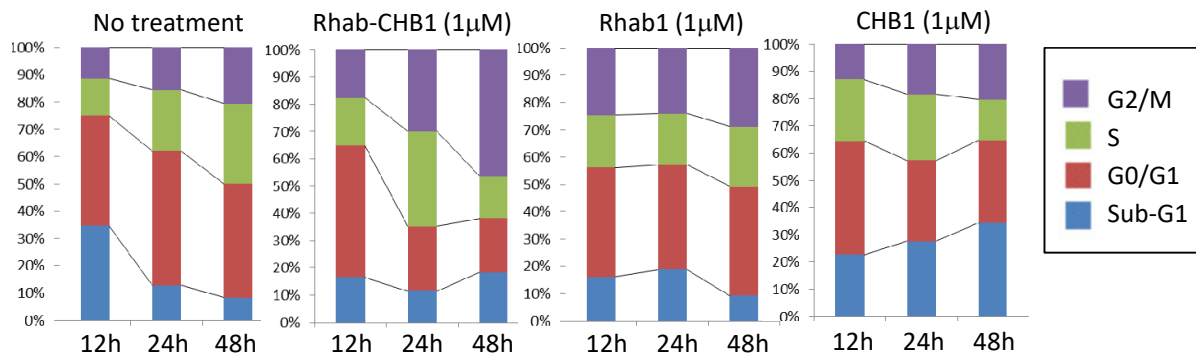


図3 Rhab-ChB1 投与後の細胞周期の検討

CRL2061細胞に1µMのRhab-ChB1, Rhab1, ChBを投与し、12, 24, 48時間目の時点での細胞周期の状態をフローサイトメトリーにて解析した。Rhab-ChB1投与細胞においては、死細胞画分(sub-G1)の上昇は見られなかったが、G2/M期の細胞の比率が顕著に上昇していた。

ストの誘導によるものであることが判った。しかしながら、Rhab-ChB1の効果は、*PAX3-FOXO1*融合遺伝子の有無にかかわらず、調べた全ての細胞に対して観察され、非特異的な現象であった。今後、認識DNA配列をずらしたPIPを設計するなどして、特異的な*PAX3-FOXO1*の再合成を試みる必要がある。なお、Rhab-ChB1はChB単体と比べて、少なくとも100倍以上低い濃度で細胞障害性を発揮したことから、配列特異性は無いものの、従来ChBよりも効果の高いアルキル化剤として利用可能であるか、検討を行っていく。

文 献

- 1) Dervan PB. *Bioorg Med Chem.* 2001; 9(9):2215-2235.
- 2) Sorensen PHB et al. *J Clin Oncol.* 2002; 20(11):2672-2679.
- 3) Keller C et al. *Cancer Research* 2005; 65(17):7530-7532.