

令和元年6月21日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07188

研究課題名（和文）小児悪性軟部肉腫の原因融合遺伝子を標的とした配列特異的治療薬の開発

研究課題名（英文）Targeting the fusion genes using pyrrole-imidazole polyamides in Ewing and synovial sarcoma cells

研究代表者

高取 敦志（Takatori, Atsushi）

千葉県がんセンター（研究所）・がん治療開発グループ・室長

研究者番号：40455390

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は早期の標的治療薬の開発が望まれている骨軟部肉腫に対して、PIP-seco-CBI化合物を応用して融合遺伝子を標的とする新しい治療法の開発を目的とした。複数のPIP化合物を設計・合成し、培養細胞において評価した結果、Ewing肉腫および滑膜肉腫のそれぞれの融合遺伝子の発現を抑制し、細胞増殖を抑制する化合物を取得し、Ewing肉腫および滑膜肉腫の新規治療薬開発の可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

軟部肉腫の中には、融合遺伝子が原因遺伝子として同定されているものも少なくなく、早期の標的治療薬の開発が望まれている。しかし、軟部肉腫の原因となっている融合遺伝子の多くは転写因子の遺伝子座における染色体転座が原因となっているため、分子標的薬の開発の難しさが課題となっている。本研究により、肉腫の融合遺伝子を直接標的とした治療法が可能であることが示され、融合遺伝子を原因とする他のがんへの応用も期待できる。

研究成果の概要（英文）：Ewing and synovial sarcoma, highly aggressive and metastatic tumors in the children and young adults, are caused by fusion genes of EWS-FLI1 and SS18-SSX, respectively. Although the fusion products are attractive protein-level targets, no therapeutic candidates are currently available. We have developed seco-CBI-conjugated pyrrole-imidazole polyamides (PIP-seco-CBIs) that selectively alkylate DNA at specific motifs to induce target gene downregulation and tumor growth inhibition. In this study, we examined the inhibitory effects of different PIP-seco-CBIs as well as PIP conjugated with epigenetic modifiers, SAHA and CTB, in sarcoma cells. Some of the compounds induced cell death with substantially lower IC50 values and effectively suppressed the expression of fusion genes. Additionally, PIP-CTB compounds demonstrated a cell growth inhibitory effect. Our data suggest that PIP compounds can lead to innovative therapeutic candidates for malignant sarcomas harboring fusion oncogenes.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：軟部肉腫 ケミカルバイオロジー ポリアミド化合物 標的治療

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

小児や AYA (思春期と若年成人) 世代に発生するがんはその発生数が少ないことから希少がんに含まれるものが多く、多種多様な原因・年齢で発症することから、成人がんとは異なる治療が必要となる。その対策は特に集学的治療の提供ができる体制の整備が中心となっており、治療法開発支援は十分ではない。また、希少がんはそれぞれの患者数が少なく市場規模が小さいことから、民間主導の新規治療法の開発も進んでいない。骨軟部組織に発生する腫瘍である骨軟部肉腫についても同様であるが、その中には融合遺伝子が原因遺伝子として同定されているものも少なくなく、早期の標的治療薬の開発が望まれている。

最近、研究代表者らは遺伝子配列特異的に DNA をアルキル化できる化合物 (ピロール・イミダゾール・ポリアミド化合物、PIP-*seco*-CBI) を開発した。大腸がんにも認められる KRAS 遺伝子変異や小児がんの一つである神経芽腫の原因となる増幅 MYCN 遺伝子を標的とする化合物の有効性が確認され、臨床応用に向けた開発が進んでいる。一方、染色体転座による融合遺伝子を標的にした化合物の有効性については不明のままであった。

### 2. 研究の目的

Ewing 肉腫は 5~20 才に発生することの多い悪性腫瘍で、そのうち約 85% において EWS-FLI1 融合遺伝子が認められる。一方、滑膜肉腫は 10 代以降に間葉系細胞から発生するといわれる軟部肉腫であり、その原因として主に SS18-SSX1 および SS18-SSX2 融合遺伝子が知られており、特に SS18-SSX1 は滑膜肉腫のおよそ 60% を占め、SS18-SSX2 に比べ予後が悪い。これら軟部肉腫の治療には主に手術療法と化学療法が行われ、それに加えて放射線などの局所治療や集学的な治療が行われるが、転移例に対する治療成績は依然として不良で、有効な治療法は確立されていない。そこで、これら肉腫の治療成績を向上させるために、研究代表者らが神経芽腫に対する PIP-*seco*-CBI 化合物の開発で得た知見を Ewing 肉腫および滑膜肉腫に応用することにより、融合遺伝子を標的とする新しい治療法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) EWS-FLI1 遺伝子標的 PIP-*seco*-CBI 化合物の合成と評価

融合遺伝子のパートナー遺伝子のうち、遺伝子欠損や発現抑制により細胞活動への大きな影響が少なく、治療標的としても副作用が少ないことが予想される遺伝子を選択し、その遺伝子領域の DNA 配列上において特異性の高い標的配列を決定し、化合物を設計する。PIP-*seco*-CBI の合成は国産ペプチド合成機を用い、独自に開発した合成方法により行う。合成した化合物の薬理効果について、mES-1 や SK-ES-1 など EWS-FLI1 融合遺伝子陽性の Ewing 肉腫由来細胞株を用いて細胞増殖抑制および細胞死の誘導について検討し、IC<sub>50</sub> 値を求める。融合遺伝子発現への影響については Western blot 法により解析を行う。

#### (2) SS18-SSX 遺伝子標的 PIP-*seco*-CBI 化合物の合成と評価

SS18-SSX 遺伝子の C 末側のパートナー遺伝子である SSX ファミリー遺伝子を標的とする化合物の設計および合成を EWS-FLI1 遺伝子標的化合物と同様に行う。その化合物の評価を滑膜肉腫由来細胞である HS-SY-11 などを用いて、EWS-FLI1 遺伝子標的化合物に対する評価方法と同様に行う。

#### (3) 融合遺伝子陽性細胞特異的に抗腫瘍効果を示す PIP-SAHA 化合物の同定

京都大学・杉山教授より供与いただいた PIP-SAHA ライブラリー化合物を用いて、Ewing 肉腫由来細胞株において細胞増殖に与える影響を検討し、細胞生存を抑制する効果を示す化合物を探索する。また、Western blot 法によりアセチル化ヒストンへの影響を検討する。一方、PIP-SAHA の効果が弱い場合は、SAHA 以外のエピジェネティクス制御化合物を用いて修飾化合物の合成を行い、その薬理効果について検討することとした。

### 4. 研究成果

#### (1) EWS-FLI1 遺伝子標的 PIP-*seco*-CBI 化合物の合成と評価

異なる 9 bp を認識する PIP-*seco*-CBI 化合物を合成し、Ewing 肉腫の原因遺伝子である EWS-FLI1 遺伝子を導入して作製された Ewing 肉腫モデルマウスの腫瘍由来細胞株 (mES-1 および mES-29 細胞) を用いて、細胞増殖に与える影響について検討した (図 1)。その結果、CCC-004 および CCC-002 により高い増殖抑制効果が観察され、その IC<sub>50</sub> 値は

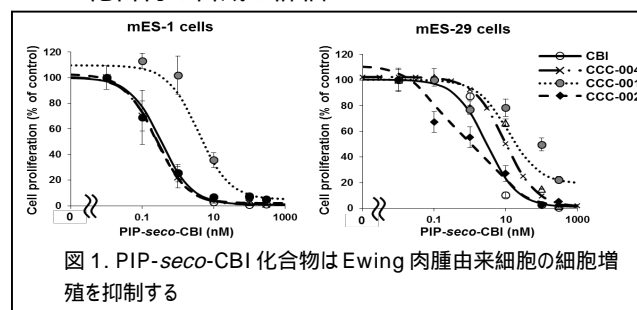


図 1. PIP-*seco*-CBI 化合物は Ewing 肉腫由来細胞の細胞増殖を抑制する

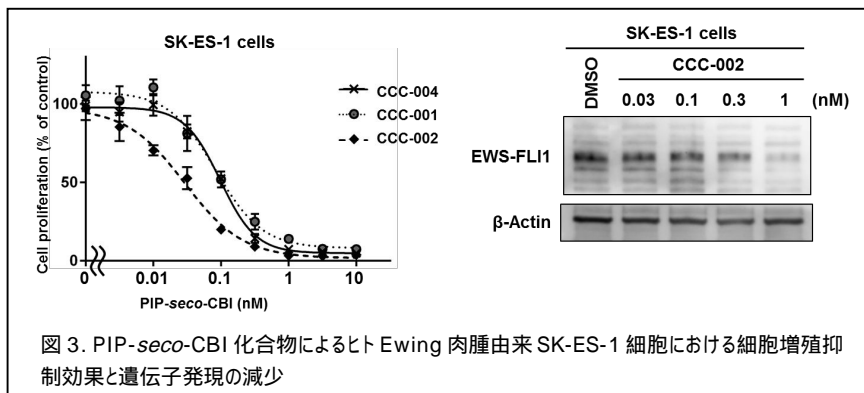
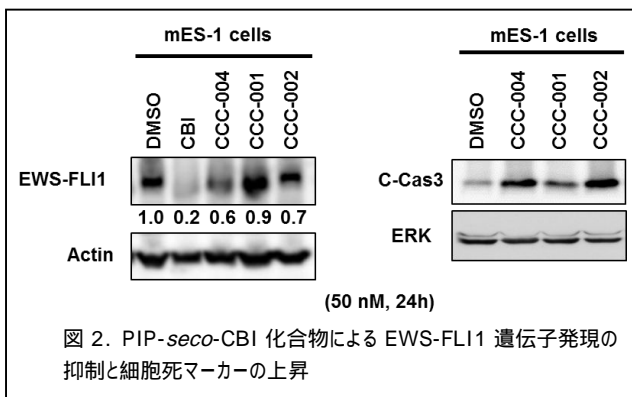
アルキル化剤である CBI と同等であった (表 1)。これらの化合物の EWS-FLI1 融合遺伝子にお

ける結合配列の有無を検索したところ、いずれの化合物においても結合配列が存在することを確認した。一方、融合遺伝子上に結合配列を持たない化合物 CCC-001 の IC<sub>50</sub> 値は他の化合物よりも高いことが示された。また、CCC-004 および CCC-002 処理により融合遺伝子の発現が抑制され、アポトーシスのマーカーの上昇が確認されたことから、これらの化合物は融合遺伝子の発現を抑制し細胞死を誘導していることが示唆された (図2)。これらの化合物の効果はヒト Ewing 肉腫細胞株 SK-ES-1 細胞においても確認された (図3)。

表 1. Ewing 肉腫由来細胞における PIP-*seco*-CBI 化合物 IC<sub>50</sub> 値 (nM)

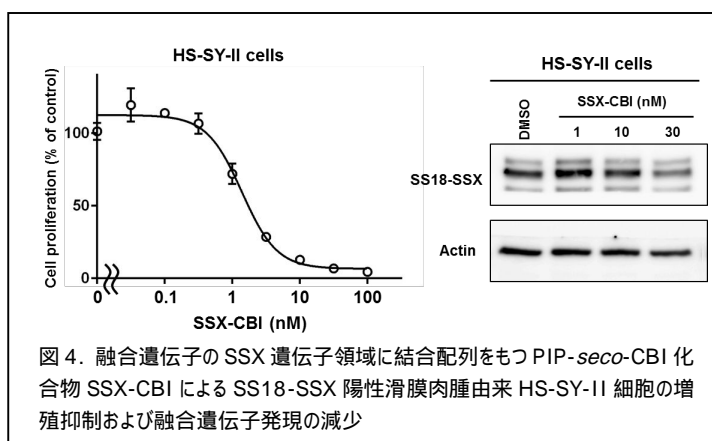
PIP- <i>seco</i> -CBI	Target seq	Binding site in EWS-FLI1	mES-1	mES-29
CBI	NA		0.22	3.1
CCC-004	WCCWGCWWA	Yes (EWS:2, FLI1:1)	0.26	30.0
CCC-001	WGCWCCWCA	No	6.0	98.1
CCC-002	WGGCWCCCA	Yes (EWS:1)	0.27	1.6

SK-ES-1 細胞における融合遺伝子の breakpoint をダイレクトシーケンス法により同定し、CCC-004 および CCC-002 の標的配列が SK-ES-1 細胞の EWS-FLI1 融合遺伝子に含まれることを確認した。これらの結果から、融合遺伝子配列を認識する PIP-*seco*-CBI 化合物を応用することにより、軟部肉腫の新規治療薬開発の可能性が示された。



## (2) SS18-SSX 遺伝子標的 PIP-*seco*-CBI 化合物の合成と評価

滑膜肉腫の原因遺伝子である SS18-SSX 融合遺伝子の DNA 配列上において特異性の高い標的配列 9 bp を認識する PIP-*seco*-CBI 化合物である SSX-CBI を設計・合成し、滑膜肉腫由来細胞を用いた *in vitro* の評価系において、その薬理効果について検討した。その結果、HS-SY-II 細胞における IC<sub>50</sub> 値が 1.4 nM であり、強い細胞傷害活性を示すことが分かった (図4)。この化合物による SS18-SSX 融合遺伝子発現への影響を検討したところ、Western blot 法により融合遺伝子発現の抑制が認められたことから、この化合物は SS18-SSX 融合遺伝子を標的とする候補化合物であることが示された。



## (3) 融合遺伝子陽性細胞特異的に抗腫瘍効果を示す PIP-SAHA 化合物の同定

PIP-SAHA ライブラリー化合物を用いた実験において、融合遺伝子陽性細胞における IC<sub>50</sub> 値が PIP-*seco*-CBI 化合物に比べ高い結果となった。また、SAHA との比較においても PIP-SAHA による増殖抑制効果は弱く、ヒストン H3K27 アセチル化のレベルも低いことが示された。肉腫細胞において PIP-SAHA によるヒストンのアセチル化が強く起こらないことから、ヒストン脱アセチ

ル化酵素阻害剤である SAHA 以外のエピジェネティクス制御化合物を検討することとし、ヒストンアセチル化酵素活性化剤である CTB による修飾化合物の合成を行い、その薬理効果について検討した。その結果、PIP-CTB は CTB よりも低い濃度で増殖抑制効果を示した(図 5)。PIP-CTB が標的とした遺伝子は細胞増殖および増殖関連シグナルの制御に関わる遺伝子であることが予想されることから、PIP-CTB 標的遺伝子を明らかにすることが今後の重要な検討課題となる。

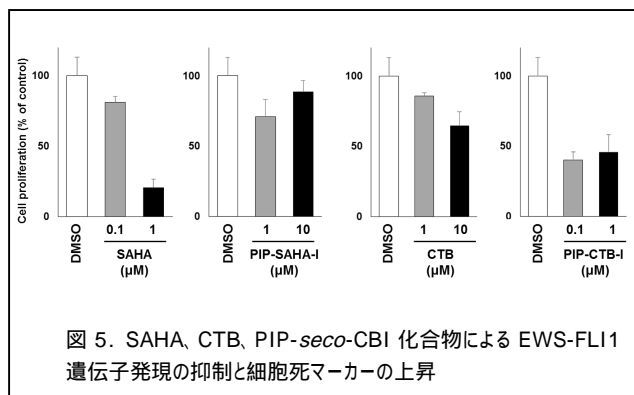


図 5. SAHA、CTB、PIP-*seco*-CBI 化合物による EWS-FLI1 遺伝子発現の抑制と細胞死マーカーの上昇

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 3 件)

Lin J, Hiraoka K, Watanabe T, Kuo T, Shinozaki Y, Takatori A, Koshikawa N, Chandran A, Otsuki J, Sugiyama H, Horton P, Nagase H (2016). Identification of Binding Targets of a Pyrrole-Imidazole Polyamide KR12 in the LS180 Colorectal Cancer Genome. PLoS One. 11(10):e0165581. doi: 10.1371/journal.pone.0165581.

Sheikh A, Takatori A, Hossain MS, Hasan MK, Tagawa M, Nagase H and Nakagawara A. Unfavorable neuroblastoma prognostic factor NLRR2 inhibits cell differentiation by transcriptional induction through JNK pathway. Cancer Science., 2016, 107(9):1223-32, doi: 10.1111/cas.13003.

Inoue T, Shimozato O, Matsuo N, Mori Y, Shinozaki Y, Lin J, Watanabe T, Takatori A, Koshikawa N, Ozaki T, Nagase H (2018) Hydrophobic structure of hairpin ten-ring pyrrole-imidazole polyamides enhances tumor tissue accumulation/retention in vivo. Bioorg Med Chem. doi: 10.1016/j.bmc.2018.03.029.

### 〔学会発表〕(計 4 件)

高取敦志、岩田慎太郎、平岡桐子、クリシュナムーティ サクティシリ、養田裕行、渡部隆義、篠崎喜脩、田中美和、中村卓郎、永瀬浩喜、EWS-FLI1 融合遺伝子を標的とした PI ポリアミド DNA アルキル化剤による Ewing 肉腫の治療戦略、第 75 回日本癌学会学術総会、2016  
高取敦志、平岡桐子、養田裕行、クリシュナムーティ サクティシリ、井上貴博、篠崎喜脩、渡部隆義、越川信子、永瀬浩喜、がん遺伝子を標的としたピロール・イミダゾール・ポリアミド DNA アルキル化剤による治療戦略、平成 28 年度先端モデル動物支援 若手技術講習会、2016

Shintaro Iwata, Sarcoma Study in the Far East -Result of Japanese group studies-, 1<sup>st</sup> Birmingham Oncology and Arthroplasty Meeting, 2016

太田陽子、養田裕行、渡部隆義、平岡桐子、クリシュナムーティ サクティシリ、篠崎喜脩、岩田慎太郎、田中美和、中村卓郎、永瀬浩喜、高取敦志、PI ポリアミド DNA アルキル化剤による Ewing 肉腫の EWS-FLI1 融合遺伝子標的治療薬開発、第 60 回日本小児血液・がん学会学術集会、2018

### 〔図書〕(計 0 件)

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：岩田 慎太郎

ローマ字氏名：(IWATA, shintaro)

所属研究機関名：国立研究開発法人国立がん研究センター

部局名：中央病院

職名：医員

研究者番号 (8 桁)：90549685

(2)研究協力者

研究協力者氏名：渡部 隆義

ローマ字氏名：(WATANABE, takayoshi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。