

令和元年6月18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：16K09978

研究課題名(和文)PIポリアミドによる病因性ミトコンドリアDNA変異関連疾患の治療法の検討

研究課題名(英文)Target therapy of pathogenic mtDNA mutation with PI polyamide

研究代表者

越川 信子(Koshikawa, Nobuko)

千葉県がんセンター(研究所)・がん遺伝創薬研究室・主席研究員

研究者番号：90260249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア病の治療には、タウリンの投与など対処療法が用いられる。近年様々な治療法が検討されているが、未だ根治的な治療法は確立されていない。本課題で用いたピロール・イミダゾール・ポリアミド(PIP)は、特別な送達物質を必要とせず標的とするDNAの副溝に結合することが報告されている。今回は、このPIPにミトコンドリア内への送達物質であるTPPを結合することにより、ミトコンドリア内へPIPを送達貯留させることができた。この方法をより発展させることでミトコンドリア病の原因となるmtDNAの複製抑制がなされていることを明確にすれば、ミトコンドリア病の根本的な治療につながると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアDNA(mtDNA)は、ミトコンドリアの重要な役割である呼吸鎖複合体の蛋白質をコードしている。近年、mtDNAの変異が、ミトコンドリア病や様々な疾患に関与することが報告されているが、その根治的な治療法は見つかっていない。我々はDNAに結合し標的DNAの複製を抑制する機能を持つピロール・イミダゾール・ポリアミド(PIP)にtriphenylphosphonium(TPP)を結合することによってミトコンドリア内膜内にPIPが送達可能であることを見出した。PIP-TPP投与で、mitophagyを引きこすことも観察した。これにより変異mtDNAの割合を減弱できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Various treatments have recently been considered for mitochondrial diseases. However, no definitive cure has been established. As used in this study, pyrrole-imidazole polyamide (PIP) has been reported to reach and bind to the minor groove of targeted DNA without delivery agents. In this case, PIP was able to be delivered and stored in mitochondria by binding Triphenylphosphonium (TPP), which is a delivery substance into mitochondria, to PIP. If we can suppress the replication of mutant mtDNA, which is the cause of mitochondrial disease, by developing this method, we believe that it will lead to fundamental treatment of mitochondrial disease.

研究分野：分子病理学

キーワード：mtDNA 変異 PIポリアミド ミトコンドリア病 MELAS A3243G

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア病はエネルギー代謝異常症であり、その病態や病因遺伝子は多様である。核 DNA 及びミトコンドリア DNA (mtDNA) の異常を併せて現在のところ 250 を超える遺伝子が病因として同定されている。遺伝子診断法が迅速に結果を出せるようになりながらも、遺伝子診断を行えた約 50% の患者でも治療方法がなく、患者本人に留まらずその家族、親族の労力は多大なものがある。核内 DNA に対する介入治療法は様々な遺伝子・ゲノム編集技術等によって開発され、健康な他人のミトコンドリアと入れ替える生殖医療技術も現実のものとなっているが、ミトコンドリア病の主因となる各々の mtDNA 変異を標的にして異常 mtDNA のコピー数を減らすことによる出生後の根本的な症状改善治療法の開発は全くといって良いほどなされていない。1 細胞には 100 から 1000 個以上のミトコンドリアが存在し、その分裂は不当分裂であるため mtDNA は病原変異 mtDNA と heteroplasmy の状態で複製されるが、変異 mtDNA コピー数が一定以上になるとミトコンドリア病を発症する。そのため、核のように homozygous の状態にあることはほとんど無く、変異 mtDNA 複製を減少させ、共存する正常 mtDNA の複製を増加させるように調節することができれば、呼吸鎖複合体の働きを正常に近い状態に戻すことが可能となり、ミトコンドリア病治療薬として開発できる。

乳酸アシドーシスと脳卒中様症状を伴うミトコンドリア脳筋症 (MELAS) はミトコンドリア病において最も多い疾病であり、その原因としては mtDNA の A3243G (MT-TL1 遺伝子 tRNA^{Leu} の構造遺伝子) 変異が最も多くを占めこの変異は糖尿病でも認められる。この mtDNA 変異はミトコンドリア呼吸鎖複合体 complex I の機能を低下させ、ROS の産生を上昇させ、その結果、多様な症状を引き起こすが、患者個々による症状の軽重があるなか、mtDNA 異常に共通点がみられることは、これらの異常 mtDNA の複製速度を抑制し異常 mtDNA の割合を減少させることが患者の QOL をあげることに貢献すると期待される。我々は、塩基配列特異的に DNA に結合する Py/Im を骨格とする PIP 化合物を作製し、細胞内への輸送手段を必要とせず細胞内に到達させ、遺伝子発現を操作する方法を開発している (Nature Chem Bio 2012)。PIP 化合物は Peter B. Dervan、杉山らにより天然化合物ジスタマイシン、デュオカルマイシンといった天然抗生物質を由来として合成された人工化合物である。PIP は N-メチルピロール (Py) と N-メチルイミダゾール (Im) 及び アラニン () の組み合わせにより任意の二本鎖 DNA の副溝を配列特異的に認識するように合成できる。合成した PIP は、配列特異的に DNA と結合することで DNA 結合蛋白質、例えば転写因子と DNA との結合を阻害し、遺伝子発現の制御を行うことが可能であり、かつ、PIP に他の物質を結合することで carrier としても使用できるというように様々な用途に利用可能である。PIP が核内に独自に誘導されることは実証されているが、ミトコンドリア内膜内に入り込むことができるかは不明である。ミトコンドリアは二重膜に包まれ、mtDNA はその内膜内に存在する。そこで、PIP のみでミトコンドリア内膜内に到達できない場合は、カチオン性脂質である triphenylphosphonium (TPP) によって導入できることが、先行研究で明らかとなっている。そこで、PIP-TPP を複数合成し、ミトコンドリア内膜内に PIP が貯留するかを確認する。さらに、PIP-TPP 処理によって mitophagy の増加の有無、呼吸鎖複合体の再活性化を測定する。また、変異 mtDNA の割合が変化するか否かを検討した。

2. 研究の目的

ミトコンドリア病は、7500 人に 1 人の割合で発症する難治性疾患である。その原因としてミトコンドリア DNA (mtDNA) と核内ミトコンドリア関連遺伝子の変異が挙げられる。ミトコンドリア病の治療としては、現在タウリンの投与など対処療法がほとんどであり、根治的な治療は未だ確立されていない。一方、ピロール (Py) ・イミダゾール (Im) ・ポリアミド PI

polyamide(PIP)は放線菌などが産生する天然抗生物質から発想されて合成された低分子化合物で、塩基配列特異的に DNA に結合する Py/Im を骨格とする。PIP は細胞内への輸送手段を必要とせず細胞内に送達され、標的とする DNA に結合する。それによって、標的 DNA の複製を抑制することが可能である。そこで、mtDNA、核内ミトコンドリア関連遺伝子の変異に対して PIP または修飾 PIP が結合し、変異遺伝子の複製を抑制し、その結果疾病の症状緩和に導けるか否かを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

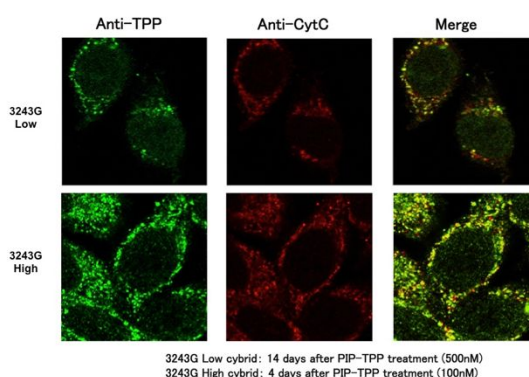
MELAS の A3243G 変異 mtDNA を 0HeLa 細胞に異なる割合で導入された cybrid・HeLa mt3243 (変異 mtDNA 含有率 82% (HeLamt3243 high) および 55% (HeLamt3243 low)、野生型 3243A を持つ HeLamtHeLa(HeEB1)を用いた。A3243G 変異に相当する DNA 配列を標的として、hairpin 型、あるいは直鎖型の PIP を複数合成した。合成した PIP にミトコンドリア向性カチオン Triphenylphosphonium (TPP)を結合した (PIP-TPP)。合成した PIP-TPP の DNA 配列特異的結合力を Biacore assay により検討した。細胞の増殖変化を WST assay、また PIP-TPP の細胞内局在変化を抗 TPP 抗体、抗 cytochrome C 抗体を用い、Mitophagy 発現を抗 LC3 抗体、抗 cytochrome C 抗体を用い免疫蛍光染色を行うことにより検出した。さらにミトコンドリア膜電位の変化は JC1assay により検討した。変異 mtDNA と野生型 mtDNA の割合の変化は、gDNA を抽出し、制限酵素 ApaI を用いた RFLP 法を用いて行った。

4. 研究成果

MELAS A3243G を標的として、まず、ヘアピン型の PIP-TPP を合成した。これを HeLamt3243 low 細胞に最長 63 日間投与し、継代ごとに gDNA を採取し、COII 遺伝子量と actin 量の比、RFLP 法で変異 DNA と正常 DNA との比を比較した。その結果、投与 63 日目で採取した gDNA において、DMSO コントロールを投与した細胞に比べ、COII 遺伝子量、すなわち mtDNA 量が増加傾向にあった。また、RFLP 法においても正常型 mtDNA コピー数が増加傾向にあったが、いずれも有意差は認められなかった。そこで、細胞毒性がやや高いと期待されるヘアピン型・直鎖の短鎖型 PIP-TPP を再合成した。ヘアピン型 PIP-TPP では、まず Biacore assay を行って 3243G を含む DNA 配列と 3243A の正常型 DNA 配列への結合能を比較した。その結果 3243G を含む合成 DNA 配列に正常型合成 DNA 配列の約 60 倍の結合力があることが判った。また、PIP-TPP がミトコンドリア内膜内に送達、貯留されているかを調べるため、抗 TPP 抗体 (英国 ケンブリッジ大学 Dr.M. Murphy よりご供与) と抗 Cytochrome C 抗体での共染色を行い confocal 顕微鏡によって観察したところ、ミトコンドリア内膜内に存在する Cytochrome C と merge して染色されたことから、PIP-TPP がミトコンドリア内膜内に送達されていると考えられた。また、4 日間、14 日間の PIP-TPP 処理で同様な merge 像が得られたことから、PIP-TPP がミトコンドリア内膜内に貯留していることが窺えた (図 1)。

mtDNA は 1 細胞内に数百から数千個存在することから、PIP-TPP の効果が現れるには、長期間のミトコンドリア内膜内への貯留が必須であると考えられることから、この結果は mtDNA に PIP-TPP が影響を与える期待がもてるものであった。PIP-TPP の細胞増殖に対する効果を検討するため、ヘアピン型 PIP-TPP では 3000 個の細胞に対して

図 1



種々の濃度の PIP-TPP を 2 日間投与し、また、直鎖の短鎖型 PIP-TPP では 1000 個の細胞に対し種々の濃度の PIP-TPP を 5 日間投与し、WST assay を行った(図 2)。

その結果、両 PIP-TPP において、HeLam3243 high 細胞で最も細胞増殖抑制が強く、ついで HeLam3243 low であり、HeEB1 ではほとんど影響を与えなかった。複製を抑制された mtDNA を持つミトコンドリアは、mitophagy によって排除されると想定し、PIP-TPP 処理による影響を検討した。HeLam3243 high 細胞に 52 時間 PIP-TPP を処理した結果、未処理細胞、HeEB1 細胞では観察されなかった mitophagy が観察された(図 3)。

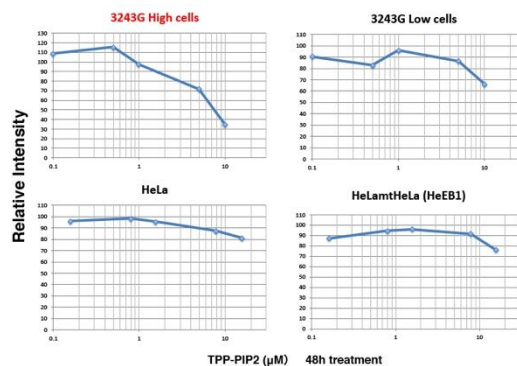
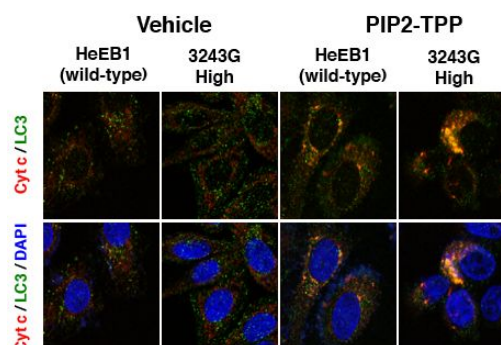


図 3

さらに、ミトコンドリア膜電位の変化を調べるため、JC1 assay を行った結果、HeLam3243 high 細胞で膜電位の低下を認めた。直鎖型 PIP-TPP は、ヘアピン型 PIP-TPP よりも分子量が小さく、合成が簡便な上、ミトコンドリア内膜内に送達されるのも容易であると考えられる。しかし、その働きは、ヘアピン型に比べると、効力が若干劣る傾向であった。しかし、この緩慢な効果が変異型 mtDNA のみに効果を与えるのに有効である可能性がある。今後は、このヘアピン型、直鎖型 PIP-TPP 双方を用いて長期処理による変異 mtDNA のコピー数の相対的減少を目指したい。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Yoda H, Inoue T, Shinozaki Y, Lin J, Watanabe T, **Koshikawa N**, Takatori A, Nagase H. Direct Targeting of MYCN Gene Amplification by Site-Specific DNA Alkylation in Neuroblastoma. *Cancer Research* doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-1198, 2018.
2. Inoue T, Shimozato O, Matsuo N, Mori Y, Shinozaki Y, Lin J, Watanabe T, Takatori A, **Koshikawa N**, Ozaki T, Nagase H. Hydrophobic structure of hairpin ten-ring pyrrole-imidazole polyamides enhances tumor tissue accumulation/retention in vivo. *Bioorg Med Chem*. 26(9) 2337-2344, 2018
3. **Koshikawa N**, Akimoto M, Hayashi JI, Nagase H, Takenaga K. Association of predicted pathogenic mutations in mitochondrial ND genes with distant metastasis in NSCLC and colon cancer. *Scientific Reports* 7(1):15535, 2017. doi: 10.1038/s41598-017-15592-2.
4. Lin J, Watanabe T, Shinozaki Y, Takatori A, **Koshikawa N**, Sugiyama H, Horton P, Nagase H. et al. Identification of Binding Targets of a Pyrrole-Imidazole Polyamide KR12 in the LS180 Colorectal Cancer Genome. *Plos One* 11(10): e0165581, 2016

〔学会発表〕(計 9 件)

- 1 Lin Jason, 養田裕行, 平岡桐子, 井上貴博, Krishnamurthy Sakthisri, 渡部隆義, 高取敦志, **越川信子**, 杉山弘, 宮野悟, 永瀬浩喜: ピロールイミダゾールポリアミドを用いたゲノム・

エピゲノム制御への取り組み. 第 10 回日本エピジェネティクス研究会年会. 2016 大阪 ポスター

2 篠崎喜脩, 越川信子, 高取敦志, 渡部隆義, Lin Jason, 平岡桐子, 養田裕行, 井上貴博, 松尾仁以奈, 服部あすか, 永瀬浩喜: ピロールイミダゾールポリアミドを足場とした DNA 関連化学反応制御. 平成 28 年度先端モデル動物支援プラットフォーム若手支援技術講習会. 2016 蓼科 ポスター

3 永瀬浩喜, 高取敦志, 渡部隆義, 平岡桐子, 井上貴博, 越川信子, 篠崎喜脩, Lin Jason, 養田裕行, 松尾仁以奈, 服部あすか: ガンゲノムの薬剤送達. 第 75 回日本癌学会学術集会. 2016 横浜 口演

4 Lin Jason, Hiraoka K, Yoda H, Watanabe T, Kuo T, Shinozaki Y, Takatori A, Koshikawa N, Horton P, Nagase H: Development and Evaluation of a Crosslink-free Chem-seq Platform to Identify Genomic Binding Targets of Pyrrole-imidazole polyamides. 新規医薬ピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドの創薬開発国際シンポジウム. 2017 東京 ポスター

5 永瀬浩喜, 高取敦志, 越川信子, 渡部隆義, 井上貴博, Krishnamurthy Sakthisri, Lin Jason, 篠崎喜脩: ピロール・イミダゾール・ポリアミドによる標的ゲノム領域におけるエピジェネティクスへの容喙. 第 30 回モロシヌス研究会. 2017 熊本 口演

6 越川信子, 渡部隆義, 篠崎喜脩, 高取敦志, 安井七海, Lin Jason, 山田勇磨, 原嶋秀吉, 永瀬浩喜: PI ポリアミドによる病理性ミトコンドリア DNA 変異関連疾患の治療. ConBio2017. 2017 神戸 口演

7 安井七海, 越川信子, 渡部隆義, 篠崎喜脩, 高取敦志, Lin Jason, 永瀬浩喜: PI ポリアミド修飾化合物によるミトコンドリア標的遺伝子配列のコピー数減少の検討. 第 27 回日本癌病態治療研究会 2018 千葉 ポスター

8 安井七海, 越川信子, 渡部隆義, 篠崎喜脩, 高取敦志, Lin Jason, 竹永啓三, 永瀬浩喜: TPP を用いたピロールイミダゾールポリアミドのミトコンドリア DNA への導入と DNA 複製への影響. 第 77 回日本癌学会学術総会. 2018 大阪 ポスター

9 越川信子, 竹永啓三, 篠崎喜脩, 安井七海, 永瀬浩喜: TPP 修飾新規 PI ポリアミドによる変異 mtDNA 含有細胞の細胞死の特異的誘導. 第 77 回日本癌学会学術総会. 2018 大阪 ポスター

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 二重膜構造細胞内小器官 DNA 標的薬
発明者: 永瀬浩喜・渡部隆義・越川信子・安井七海
権利者: 千葉県
種類:
番号: 特願 2019-053528
出願年: 2019
国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:

種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.pref.chiba.lg.jp/gan/kenkyujo/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：渡部 隆義
ローマ字氏名：Watanabe Takayoshi
所属研究機関名：千葉県がんセンター研究所
部局名：がん研究開発グループ
職名：研究員
研究者番号（8桁）：60526060

(2)研究分担者

研究分担者氏名：永瀬 浩喜
ローマ字氏名：Nagase Hiroki
所属研究機関名：千葉県がんセンター研究所
部局名：がん遺伝創薬研究室
職名：研究所長
研究者番号（8桁）：90322073

(2)研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

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。