

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10583

研究課題名(和文) 肝内胆管癌特異的融合遺伝子を標的としたアルキル化剤の開発

研究課題名(英文) Development of the alkylating agent targeting intrahepatic cholangiocarcinoma-specific fusion gene

研究代表者

高木 恵子 (TAKAGI, Keiko)

日本大学・医学部・研究医員

研究者番号：20339328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：肝内胆管癌(ICC)特異的な融合遺伝子をアルキル化し、融合遺伝子を保有する細胞のみを殺傷するクロラムブシル-PIポリアミド(ChB-PIP)の開発を目指した。高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による精製と解析からChB-PIPを作製し、ゲルシフトアッセイで融合遺伝子特異的に結合するChB-PIPの合成を確認した。その後、ICC細胞株に対して一過性発現株を作製した。次に安定株樹立のためトランスフェクション後G418(Geneticin)を用いてセレクションし細胞のスケールアップを行った。融合遺伝子プラスミド導入群は、コントロール群と比較し遺伝子発現量は高発現であり、安定株作製が確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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、融合領域を認識するPIPにアルキル化剤クロラムブシル(ChB)を付加したFGFR2-BICC1融合遺伝子認識ChB-PIPの合成を成功させた。また、融合遺伝子2種のいずれかの存在が確認されているICC細胞株が樹立されていないことから、安定株の作製を成功させた。

研究成果の概要(英文)：We aimed to develop chlorambucil-PI polyamide (ChB-PIP), which alkylates a fusion gene specific for intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) and kills only cells contain the fusion gene. ChB-PIP was prepared by purification and analysis by high performance liquid chromatography (HPLC), and the synthesis of ChB-PIP that specifically binds to the fusion gene was confirmed by gel shift assay. Then, a transient expression strain was prepared for the ICC cell line. Next, in order to establish a stable strain, after transfection, selection was performed using G418 (Geneticin) to scale up the cells. In the fusion gene plasmid-introduced group, the gene expression level was higher than that in the control group, and it was confirmed that a stable strain was produced.

研究分野：消化器外科

キーワード：肝内胆管癌 融合遺伝子 PIポリアミド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、二つの異なる遺伝子が融合した融合遺伝子の存在が、各種の悪性腫瘍で確認されている¹⁾。その多くは腫瘍の発生・進展を促進する機能を持ち、また、正常組織には存在しないことから、腫瘍特異的治療標的として非常に有望である。本研究では、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)²⁾を用いて、肝内胆管癌(ICC)特異的な融合遺伝子をアルキル化し、融合遺伝子を保有する細胞のみを殺傷する機能を持つ薬剤の開発を目指す。

2. 研究の目的

融合領域を認識する PIP にアルキル化剤クロラムブシル(ChB)を付加した ChB-PIP を合成し、標的領域の特異的アルキル化能の有無や、融合遺伝子を発現する細胞に対しての *in vitro* および *in vivo* での抗腫瘍効果を確認し、ICC 治療薬としての可能性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

ICC における存在が報告されている FGFR2-AHCYL1 融合遺伝子と FGFR2-BICC1 融合遺伝子に対して融合部分にまたがるように PI ポリアミドを設計し、ChB を付加する。合成はペプチド合成器 PSSM8 を用いて行い、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。(1) ChB-PIP の標的 DNA 結合能の解析 (Gel shift assay); FITC ラベルを付加した標的 DNA 配列と ChB-PIP をインキュベートし、ポリアクリルアミドゲルによる泳動時のバンドのシフトにより DNA の結合能を判定する。(2) ChB-PIP による配列特異的アルキル化の確認 (熱変性法); ChB はアデニンの N3 をアルキル化するが、この修飾を受けた DNA を 95 で過熱すると変性部位が切断される性質を持つことから、蛍光色素でラベルした標的配列 DNA を ChB-PIP とともにインキュベートし、熱処理後ポリアクリルアミドにて展開する。これにより標的配列特異的なアルキル化の有無を判定する。上記(1)(2)の実験では、negative control として融合部位を認識しないミスマッチ ChB-PIP および、標的配列と異なるミスマッチ DNA 配列を用いる。(2) ではさらに ChB 単独でも実験を行う。これら negative control と比較して融合遺伝子特異的 ChB-PIP の効果を検討する。これらの実験で、標的配列特異的なアルキル化が検証できた分子について次年度 *in vitro* での解析を行う。

上記融合遺伝子 2 種のいずれかの存在が確認されている ICC 細胞株が樹立されていないことから、融合遺伝子の発現ベクターを導入した NIH-3T3 細胞を作成し、ChB-PIP の抗腫瘍効果を検討する。ヒト細胞株由来の cDNA を鋳型に FGFR2, AHCYL1, BICC1 の部分配列を PCR で増幅し、それらを結合させて pMXs ベクターに組み込み、融合遺伝子発現レトロウイルスベクター 2 種を作成する。FGFR2-AHCYL1 発現ベクター, FGFR2-BICC1 発現ベクター, 空ベクターをそれぞれ NIH-3T3 に感染させ、3 種の安定発現株を得て、以下の解析に用いる。上記にて作成した融合遺伝子発現細胞に対し、数 nM から 1 μM の範囲の濃度の ChB-PIP を投与し、導入されている融合遺伝子配列に特異的アルキル化が起きているかどうか Ligation mediated PCR 法で確認を行う。アルキル化された DNA 鎖を鋳型として DNA 合成を行った場合、アルキル化された部分で DNA 合成が停止するため、この性質を利用した Ligation mediated PCR 法により、ChB-PIP による標的 DNA のアルキル化の有無や部位を調べる。上記融合遺伝子を安定に発現した NIH3T3 がコントロールの細胞と比較して高いコロニー形成能を示すことが報告されていることから、ChB-PIP 投与による影響を調べる。具体的には細胞増殖能、足場非依存的細胞増殖能、細胞浸潤能についてそれぞれ MTS アッセイ、ゲル内コロニー

形成試験、Matrigel invasion assay にて検証し、ChB-PIP 投与により融合遺伝子安定発現細胞株におけるこれらの機能が抑制されるかどうか検証する。 ChB-PIP 投与により、過剰発現させている融合遺伝子の発現に変化があるかどうか、real time PCR および western blotting により検討を行う。また、これらの融合遺伝子により、RAS/MAPK のシグナル伝達経路が活性化することが判っていることから、ChB-PIP 投与により同シグナル経路が変化するかどうか、関連タンパク質の発現やリン酸化レベルの検討を western blotting 等により行う。

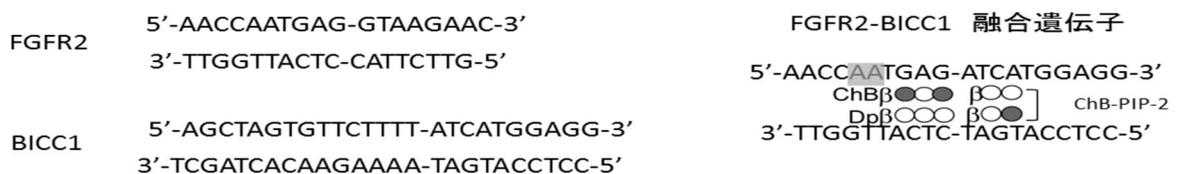
ChB-PI ポリアミドの in vitro における特異的アルキル化能と抗腫瘍効果の確認として平成 29 年度に作成した FGFR2-AHCYL1 発現株もしくは FGFR2-BICC1 発現株をヌードマウス皮下に移植し Xenograft を作成する。腫瘍が 200mm³ に達した時点で 6mg/Kg (体重)の ChB-PIP、同モル濃度の ChB、PIP、溶媒のいずれかを、週 1 回 1 ヶ月間尾静脈投与し、腫瘍サイズを毎週計測し、最終投与日の翌週に安楽死処置を行い、解剖を実施する。各群の匹数は 6 匹以上とする。採取した皮下腫瘍は、半分を凍結保存、残り半分をホルマリン固定し、他臓器転移の有無についても観察・記録する。転移巣があれば同様に組織の凍結保存およびホルマリン固定を行う。ホルマリン固定した皮下腫瘍および転移巣より病理標本を作製し、ChB-PIP 投与の有無により組織像に違いがあるかを解析し、更に融合遺伝子の発現レベルについて抗 FGFR2 抗体を用いて免疫染色により調べる。また、凍結組織より RNA および蛋白の抽出を行い、各融合遺伝子の mRNA および蛋白レベルでの発現量を real-time RT PCR、抗 FGFR2 抗体を用いた western blotting により解析する。以上の実験から、ChB-PIP 投与群において、他の 3 群(ChB 群、PIP 群、溶媒群)と比較して有意な腫瘍組織の増殖抑制、浸潤・転移の抑制、融合遺伝子の発現低下が起こっているかどうかを in vivo にて検討する。

4 . 研究成果

(1)FGFR2-BICC1融合遺伝子認識ChB-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) を結合させた分子 (ChB-PIP) を設計し合成した (図1)。

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

(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。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。

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を合成できたと判断した。

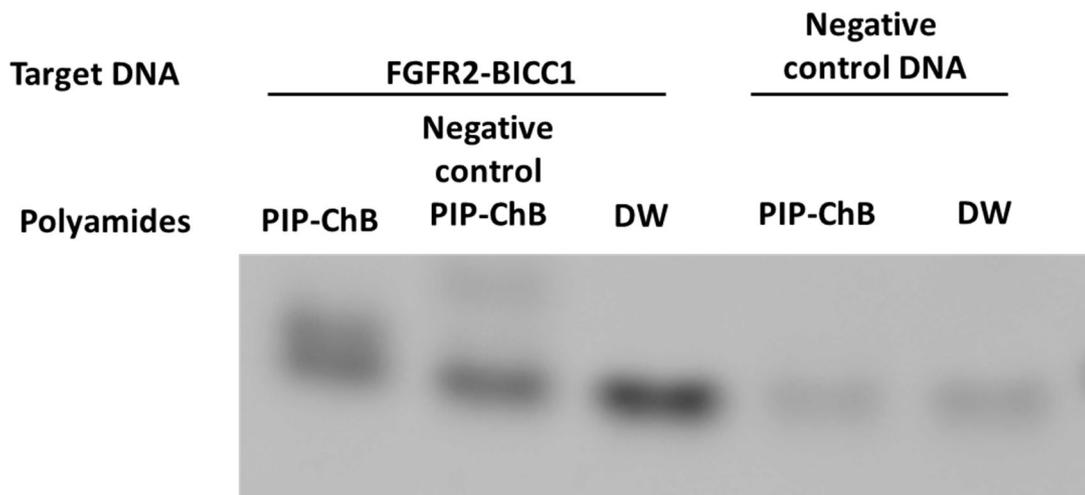


図 2 ゲルシフトアッセイによるChB-PIPの標的DNA結合能の検討

(3)一過性融合遺伝子発現株の作成

3 × 10⁵ cells/mlのICC細胞株Huh28、TKKKに対して遺伝子導入試薬リポフェクタミン3000(Thermo Fisher)を用いてトランスフェクションを行った。その後、RN easy Mini kit(Qiagen)を用いRNAを抽出し、遺伝子発現量をreal-time PCRを行い測定した。その結果、コントロール群と比べ、融合遺伝子プラスミド導入群の遺伝子発現量はHuh28株、TKKK株共に有意に高発現であった (p<0.01)。これにより一過性発現を確認することができた。

(4)融合遺伝子安定株の作成

一過性発現を確認することができたため、安定株の樹立に取りかかった。安定株樹立のため、3 × 10⁵ cells/mlのHuh28、TKKK株にリポフェクタミン3000による遺伝子導入を行った後にG418(Geneticin)を用いてセレクションを行い、ある程度の大きさになったG418耐性コロニーを回収した。回収した細胞は、96wellプレートのスモールスケールより徐々にスケールアップをした。それら細胞よりRNAを抽出後、Real time PCRによりコントロール群と融合遺伝子プラスミド導入群との遺伝子発現量を測定した。Huh28株においては、細胞の発育に時間がかかったり、その他の問題で遅延はしたが、コントロール群と比較して、融合遺伝子プラスミド導入群での遺伝子発現量は有意に高発現であった(p<0.01)。再実験を行ってもコントロール群と比較して、融合遺伝子プラスミド導入群で遺伝子発現量は高発現であった。これによりHuh28株において安定株の作製が確認できたと考えられた。

TKKK株においてもHuh28株と同様にセレクションを行い、ある程度の大きさになったG418耐性コロニーを回収し、96wellプレートのスモールスケールよりスケールアップを試みた。繰り返し実験を行ったが細胞が育たずTKKK株での安定株作製実験は断念した。

(5) ウエスタンブロットによる安定株発現の確認

次に、Huh28株でのウエスタンブロットによる安定株発現の確認を行うため、蛋白を回収後ソニケーションを行いARVOにより蛋白質定量を行った。繰り返し行ったが、蛋白質が十分量回収できず実験が進まなかった。

ICC細胞株の発育速度がゆっくりであったためなかなか細胞が育たない中、途中でインキュベーターが故障し細胞が死滅したため再度やり直しを行った。また、real time PCR器械も壊れたため、修理、実験やり直しを行い時間が超過してしまった。

しかし、FGFR2-BICC1融合遺伝子の融合領域に特異的に結合するChB-PIP合成は成功し、ICC株(Huh28株)での安定株の作製を行えたのは収穫だったと思われる。

今後は、合成に成功したChB-PIPを用いて、ICC安定株に対する様々な機能抑制の評価を行っていきたい。

<引用文献>

- 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) Molecular recognition of DNA by small molecules. Dervan PB. Bioorg Med Chem. 2001 Sep;9(9):2215-35.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

肝内胆管癌特異的融合遺伝子を標的としたPIPの開発 http://www.med.nihon-u.ac.jp/research_institute/bulletin/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	緑川 泰 (MIDORIKAWA Yutaka) (10292905)	日本大学・医学部・准教授 (32665)	
研究分担者	尾崎 俊文 (OZAKI Toshinori) (40260252)	千葉県がんセンター(研究所)・発がん研究グループ DNA損傷シグナル研究室・室長 (82504)	
研究分担者	藤原 恭子 (FUJIWARA Kyoko) (40595708)	日本大学・歯学部・准教授 (32665)	