

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07767

研究課題名（和文）増幅遺伝子領域を標的とした革新的がん治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of amplified gene-selective alkylator as a novel cancer therapeutic agent

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 がん先進治療開発研究室・室長

研究者番号：40455390

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：発がんの原因となる増幅遺伝子を標的とした薬剤開発は、がんドライバー遺伝子異常の中でも遅れている現状があり、画期的な治療法開発が必要とされている。本研究では増幅遺伝子においてPIP化合物による選択的DNA傷害が増幅領域ゲノムDNAにもたらす変化を明らかとした。DNA損傷応答関連タンパク質阻害剤と化合物の併用が抗腫瘍効果を増強したことから、増幅遺伝子陽性がんに対する新しい治療戦略を立てる上で重要な知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん分子標的薬開発ではキナーゼ阻害剤の開発が進んできた一方で、小分子化合物では標的としにくい undruggableな転写因子などに対する薬剤開発は十分ではない。本研究をさらに進めることで、増幅遺伝子を直接傷害することによって起こるゲノム構造変化を明らかにし、種々の増幅がん遺伝子を標的とした新しい治療法開発につなげることができれば、個々の発がん原因を考慮した治療選択が可能となる個別化医療を日本から提案できるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Copy number amplification of oncogenes is involved in tumor development although targeting amplified genomic sequences has been a therapeutic challenge. We have developed an alkylating pyrrole-imidazole polyamide compound (PIP-seco-CBI), that sequence-selectively targets the amplified MYCN gene in MYCN-amplified neuroblastoma cells. In this study, we found that, after the compound treatment, DNA damage was increased at the amplified region where DNA damage repair-related proteins were accumulated. Inhibition of DNA damage response pathways induced an accumulation of DNA damage by the PIP compound and sensitized MYCN-amplified neuroblastoma cells to the compound, suggesting a novel amplification-targeting therapeutic strategy for cancers with oncogene-amplifications.

研究分野：腫瘍生物学 実験動物学

キーワード：増幅遺伝子 ピロール・イミダゾール・ポリアミド化合物 アルキル化剤 ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

あらゆる癌腫で c-myc や HER2 など様々ながん遺伝子の増幅が発がんの主因となることが知られており、増幅遺伝子が形成する異常な染色体構造である double minutes (二重微小染色体) は全がん症例の約 1.4%に認められることが報告されている。一方で、増幅遺伝子産物を直接標的とする治療法の開発は困難なままである。その中で、がん細胞においてコピー数の増加が認められる遺伝子領域を標的とした CRISPR-Cas9 の処理により、G2 期で細胞周期が停止し、細胞増殖が抑制されることが報告された。また、高濃度のヒドロキシ尿素で DNA 合成を阻害すると腫瘍細胞において増幅遺伝子のコピー数が減少し細胞老化および増殖抑制を誘導することも報告されている。それにもかかわらず、増幅遺伝子を標的とした薬剤開発は、がんドライバー遺伝子異常の中でも点突然変異に比べ遅れている現状があった。例えば、小児がんの一つである神経芽腫では ALK 活性化突然変異に対するキナーゼ阻害剤の開発が行われ臨床で検証されている一方で、難治性の進行神経芽腫で増幅が認められる MYCN は以前から治療標的としての可能性が模索されてきたが未だ臨床応用までの課題は多く、増幅遺伝子に対する画期的な治療法開発が必要とされている。

低分子化合物では標的としにくい undruggable な転写因子などに対する薬剤開発を目指して、研究代表者らは遺伝子配列に選択的に結合する化合物であるピロール・イミダゾール・ポリアミド (PIP) のがん治療への応用に取り組んできている。PIP はゲノム DNA の副溝において DNA 配列に選択的に結合する性質をもち、直接生体内に投与でき、特別な送達技術を要せずに腫瘍に集積する特徴をもつことから、DNA を標的とした薬剤開発への応用が期待されている化合物である。

2. 研究の目的

PIP は DNA 塩基配列認識能に優れ、細胞に処理すると速やかに核内に集積する。その PIP にアルキル化剤であるインドール seco-CBI を結合し配列選択的アルキル化能をもたせることにより、正常細胞に影響を与えることのない低用量で腫瘍内のがん細胞に特異的な遺伝子領域の DNA をアルキル化することが可能となった。そこで研究代表者らはこれまでに難治性神経芽腫の 25%に認められる MYCN 遺伝子増幅を例とし、増幅遺伝子領域に選択的に結合する PIP-seco-CBI (MYCN-A3) により結合部位のゲノム構造を変化させ遺伝子発現を抑制し、かつアルキル化剤の効果により細胞死を誘導するという治療戦略を検討してきた。その中で、MYCN および MET 遺伝子増幅ゲノム領域で特異的な構造変化が起きていることを示す現象が観察され、その結果は CRISPR/Cas9 による増幅遺伝子選択的 DNA 傷害によって再現されたことから、増幅遺伝子領域を直接標的とする治療戦略の可能性が示された。

そこで本研究では、PIP-seco-CBI や CRISPR/Cas9 による遺伝子増幅領域における DNA 傷害がもたらすゲノム構造変化について明らかにする(目的 1)とともに、発がんに関連する他の増幅遺伝子の同定(目的 2)とそれに対する増幅遺伝子選択的 DNA 傷害の効果を検討し(目的 3)、増幅がん遺伝子を標的とした新しいがん治療法の開発につなげることを目指した。

3. 研究の方法

目的 1：増幅遺伝子選択的 DNA 傷害によるゲノム構造変化

PIP-seco-CBI および CRISPR/Cas9 によるゲノム構造の変化を明らかとするため、増幅 MET 遺伝子の遺伝子増幅領域における DNA 傷害の影響について CRISPR/Cas9 を用いた検討を行った。WST アッセイや ATP アッセイにより細胞生存率を調べるとともに、RT-qPCR や Western blot により遺伝子発現への効果を検討した。増幅領域における DNA 傷害部位は FISH 法により観察するとともに、集積するタンパク質の有無を ChIP-qPCR により調べた。また、DNA 損傷応答関連タンパク質に対する阻害剤と PIP-seco-CBI の併用効果について、*in vitro* および *in vivo* 実験により検討した。

目的 2：標的化が可能な増幅遺伝子の同定

ALK 遺伝子などの増幅が認められる細胞株を用いて、増幅遺伝子に選択的に結合する PIP-seco-CBI を合成し、DNA 傷害がもたらす影響を発現解析、FISH 法などにより検討した。ALK 遺伝子については増幅陽性の細胞株に限られるため十分な検討ができないことが予想された。そこで神経芽腫において認められる点突然変異も対象に含め、ALK 遺伝子異常が神経芽腫において PIP-seco-CBI の標的となるかどうかについて検討した。

目的 3：増幅遺伝子選択的 PIP-seco-CBI の合成および薬理解析

標的化が可能である増幅遺伝子に配列選択的に結合する PIP-seco-CBI の設計・合成を行った。PIP-seco-CBI の DNA 配列選択的結合およびアルキル化について表面プラズモン共鳴 (SPR) 法、DNA 熱安定性解析および high-resolution denaturing PAGE 法により検討した。細胞で細胞増殖抑制効果および増幅遺伝子の傷害効果が認められた化合物については、さらに担がんマウスモデルによる抗腫瘍効果の評価を行った。

4. 研究成果

目的 1: 増幅遺伝子選択的 DNA 傷害によるゲノム構造変化

MET 遺伝子増幅陽性の胃がん由来 MKN45 細胞において、MET 遺伝子内の異なる 2 か所に設計した CRISPR/Cas9 を導入したところ、いずれの crRNA においても細胞死の誘導が観察された。そこで MET 遺伝子に標的配列を持つ PIP-seco-CBI を MKN45 細胞に処理したところ、細胞死誘導および MET 遺伝子の発現抑制が確認された。細胞死が誘導されるよりも低い濃度の実験条件下において MET 遺伝子領域におけるゲノム DNA を FISH 法により観察したところ、FISH プロブシグナルの減弱が確認された。これらの結果から、MET 遺伝子増幅ゲノム領域選択的に DNA 傷害を誘導することにより、MYCN 遺伝子の場合と同様にプロブの結合が抑制されるようなゲノム構造変化が惹起され、遺伝子発現の抑制と細胞死の誘導につながることを示唆された。

PIP-seco-CBI によるゲノム DNA における変化をさらに明らかとするため ChIP-qPCR を行い、ゲノム傷害部位において集積するタンパク質について検討した。その結果、神経芽腫細胞の増幅 MYCN 遺伝子の PIP-seco-CBI アルキル化部位において DNA 損傷応答 (DDR) に関連するタンパク質の集積が確認される一方で、H2AX も観察された。この結果から増幅遺伝子において DNA 修復反応は惹起されているが、DNA 損傷が蓄積している状態が示唆された。そこで、PIP-seco-CBI 化合物と DDR 関連タンパク質の阻害剤との併用効果について検討したところ、MYCN 増幅神経芽腫細胞には PARP 阻害剤との併用効果を示す細胞群と ATR 阻害剤との併用効果を示す細胞群が存在することが分かってきた。実際、神経芽腫細胞を用いた xenograft モデルにおいて投与実験を行った結果、ATR 阻害剤との併用により PIP-seco-CBI 化合物の抗腫瘍効果が増強されることが明らかとなった。本研究により増幅遺伝子を原因とする腫瘍に対する新しい治療戦略を立てる上で重要な知見が得られた。

目的 2: 標的化が可能な増幅遺伝子の同定

MYCN 遺伝子の増幅が知られている神経芽腫においては、受容体型チロシンキナーゼである ALK 遺伝子も増幅により発がんに関与することが報告されている。そこで、ALK 遺伝子に標的配列を持つ PIP-seco-CBI を合成し、ALK 遺伝子増幅陽性細胞においてその効果を検討した。その結果、細胞増殖抑制効果が観察され、ALK 遺伝子発現の抑制が確認された (図 1, 2)。ALK 遺伝子に対する FISH 法による観察では FISH シグナルの減弱が認められたことから、これらの結果から ALK 遺伝子についても標的化できる可能性が示された。

一方、遺伝子増幅モデル構築の一環として、がん患者由来細胞株における増幅遺伝子の有無について qPCR 法および FISH 法により検討し、研究資源の確保を進めてきた。その中で以前細胞株を用いた検討により標的となることを確認した MET 遺伝子について、増幅陽性子宮頸がん由来細胞を取得した。この細胞を用いて MET 標的化合物の効果について検討を行ったところ、細胞死誘導や遺伝子発現の抑制を確認したことから、今後もこの細胞を用いて MET 遺伝子増幅に対する研究を進める予定である。

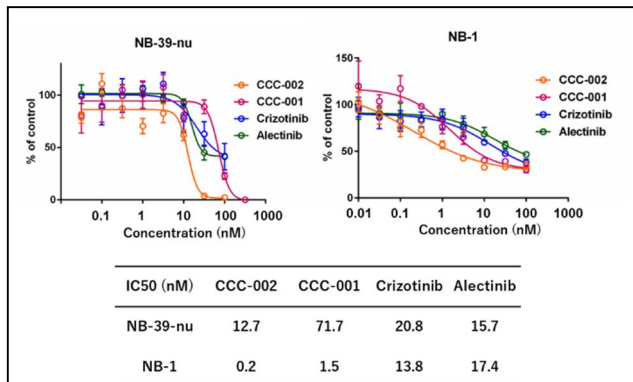


図 1. ALK 遺伝子増幅神経芽腫細胞である NB-39-nu および NB-1 細胞を化合物 (CCC-002 および CCC-001) または ALK 阻害薬 (クリゾチニブおよびアレクチニブ) で 72 時間処理した。IC50 は WST アッセイの結果より算出した。ALK 増幅細胞における化合物の増殖抑制効果は ALK 阻害薬よりも高い。

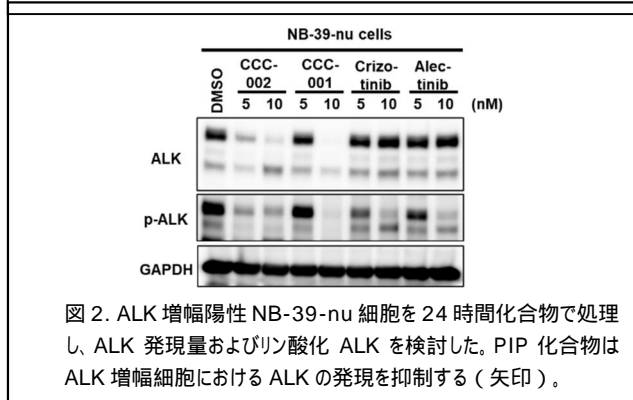


図 2. ALK 増幅陽性 NB-39-nu 細胞を 24 時間化合物で処理し、ALK 発現量およびリン酸化 ALK を検討した。PIP 化合物は ALK 増幅細胞における ALK の発現を抑制する (矢印)。

目的 3：増幅遺伝子選択的 PIP-seco-CBI の合成および薬理解析

ALK 遺伝子異常のある神経芽腫細胞において PIP-seco-CBI 化合物による標的化を検討するため、神経芽腫において頻度が高く悪性度も高い遺伝子異常である F1174L 変異に着目し、F1174L 変異標的化合物を設計・合成した。配列選択的な結合について明らかとするためにミスマッチ化合物も合成し、変異配列をもつオリゴ DNA を用いた SPR 法により比較検討したところ、ALK 標的化合物はミスマッチ化合物に比べ ALK 変異配列遺伝子に対する解離定数が低く、配列選択的結合能が高いことが確認された。さらに、ALK 変異配列への結合後に配列選択的に DNA アルキル化が起きているかどうかについて、high-resolution denaturing PAGE 法により検討した。その結果、ALK 遺伝子配列を持つオリゴ DNA に対して ALK 遺伝子標的 PIP-seco-CBI 化合物は結合部位のアデニン塩基における DNA 切断を起こすことが示された。SPR 法の結果と併せて、この化合物は ALK 遺伝子配列に選択的に結合し、化合物設計で標的としたアデニン塩基に対してアルキル化を起こすことが明らかとなった。この化合物の抗腫瘍効果を確認するため神経芽腫由来細胞を用いた担がんマウスにおける投与試験を行ったところ、投与による副作用は認めず、腫瘍増殖を有意に抑制する結果となった。以上の結果から ALK 遺伝子異常についても PIP-seco-CBI 化合物による標的化が可能であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ota Y, Yoda H, Inoue T, Watanabe T, Shinozaki Y, Takatori A, Nagase H	4. 巻 16(9)
2. 論文標題 Targeting anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene alterations in neuroblastoma by using alkylating pyrrole-imidazole polyamides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0257718
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0257718	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Krishnamurthy S, Yoda H, Hiraoka K, Inoue T, Lin J, Shinozaki Y, Watanabe T, Koshikawa N, Takatori A, Nagase H	4. 巻 112(3)
2. 論文標題 Targeting the mutant PIK3CA gene by DNA-alkylating pyrrole-imidazole polyamide in cervical cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1141-1149
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14785	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 頼 笑疑、養田裕行、篠崎喜脩、渡部隆義、永瀬浩喜、高取敦志
2. 発表標題 Development of Novel Therapies Targeting the Amplified MYCN Gene in Neuroblastoma
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 太田陽子、養田裕行、井上貴博、渡部隆義、篠崎喜脩、永瀬浩喜、高取敦志
2. 発表標題 神経芽腫のALK遺伝子変異を標的としたアルキル化ピロール・イミダゾールポリアミド化合物の抗腫瘍効果
3. 学会等名 第63回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名	高取 敦志、Sakthisri Krishnamurthy、養田 裕行、井上 貴博、平岡 桐子、Jason Lin、渡部 隆義、越川 信子、永瀬 浩喜
2. 発表標題	Targeting the mutant PIK3CA gene by DNA-alkylating pyrrole imidazole polyamide in cervical cancer
3. 学会等名	第80回日本癌学会学術集会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	高取敦志、太田陽子、養田裕行、井上貴博、渡部隆義、篠崎喜脩、永瀬浩喜
2. 発表標題	神経芽腫のALK遺伝子異常を標的とした新規治療薬開発
3. 学会等名	第67回 日本実験動物学会総会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	高取敦志、永瀬浩喜
2. 発表標題	Targeting the amplified ALK gene by using a pyrrole-imidazole polyamide alkylator against neuroblastoma
3. 学会等名	第24回 日本がん分子標的治療学会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	太田陽子、養田裕行、井上貴博、渡部隆義、篠崎喜脩、永瀬浩喜、高取敦志
2. 発表標題	Evaluation of alkylating pyrrole-imidazole polyamides for novel therapy of neuroblastoma with ALK gene aberration
3. 学会等名	第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名 高取敦志、養田裕行、渡部隆義、篠崎喜脩、永瀬浩喜、丸喜明、筆宝義隆
2. 発表標題 Development of a novel therapeutic strategy targeting amplified genomic region of oncogenes in solid cancers
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡部隆義、高取敦志、篠崎喜脩、木田裕貴、越川信子、永瀬浩喜
2. 発表標題 Investigation of antitumor effect of PIP-CBI derivatives containing amino group
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高取敦志、養田裕行、渡部隆義、篠崎喜脩、永瀬浩喜
2. 発表標題 神経芽腫のMYCN遺伝子特異的DNA傷害とPARP阻害剤の併用効果
3. 学会等名 第61回日本小児血液・がん学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高取敦志、養田裕行、井上貴博、渡部隆義、越川信子、永瀬浩喜
2. 発表標題 神経芽腫の増幅MYCN遺伝子を標的としたPIポリアミドDNAアルキル化剤の抗腫瘍活性と安全性
3. 学会等名 第32回モロシヌス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高取敦志、永瀬浩喜
2. 発表標題 PARP inhibitors enhance cell death induced by sequence-specific alkylation of the amplified MYCN gene in neuroblastoma cells
3. 学会等名 第23回 日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高取敦志、養田裕行、渡部隆義、篠崎喜脩、永瀬浩喜
2. 発表標題 Novel therapeutic strategy for neuroblastoma by a combination of PARP inhibition and site-specific DNA damage within the amplified region of the MYCN gene
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高取敦志
2. 発表標題 神経芽腫のMYCN遺伝子増幅領域を標的とした革新的治療薬の開発
3. 学会等名 第151回小児血液腫瘍免疫懇話会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 United States Patent	発明者 永瀬浩喜、杉山弘、 板東俊和、高取敦志	権利者 CHIBA PREFECTURE
産業財産権の種類、番号 特許、US 10,751,421 B2	取得年 2020年	国内・外国の別 外国

〔その他〕

-

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	渡部 隆義 (Watanabe Takayoshi) (60526060)	千葉県がんセンター(研究所)・がん研究開発グループ・研究員 (82504)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関