

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18043

研究課題名（和文）白金錯体結合PIポリアミドによる神経芽腫に対する新規治療薬剤の開発

研究課題名（英文）Development of a new therapeutic agent for neuroblastoma using platinum complex-bound PI polyamide

研究代表者

植草 省太（UEKUSA, Shota）

日本大学・医学部・研究医員

研究者番号：70746338

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：シスプラチンは放射線増感効果を持つことが知られている。また、PIポリアミドは核DNAに配列特異的に結合する。PIポリアミドを用い、cisplatinをはじめとしたプラチナ製剤の抗腫瘍作用の場である腫瘍細胞の核内へ、効率的に抗腫瘍薬を誘導することで、より強力な抗腫瘍効果を得ることが可能となる。

非特異的遺伝子配列を標的としたPIポリアミドの核内移行性の高さを利用し、シスプラチン類似白金錯体とPIポリアミドを結合させた化合物（PIP-Pt）を神経芽腫細胞株に添加し、その放射線増感効果および抗腫瘍効果を検討した。その結果PIP-Pt添加群で放射線増感効果が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、いまだ予後不良である神経芽腫高リスク群患者に対しての新規治療薬剤の開発を目的とする。今回開発するPIP-Ptは低用量でcisplatinと同等以上の治療効果が望める可能性があることから、抗腫瘍薬の副作用を減じる効果が見込まれる。また、本研究では神経芽腫に対するMYCN遺伝子を標的としたが、横紋筋肉腫におけるPAX3-FOXO1遺伝子等、腫瘍特異的に発現している遺伝子を標的としたPIポリアミドを用いて同様の化合物を作成することで、神経芽腫以外の様々な悪性腫瘍に対する新規抗腫瘍薬の開発へと発展することが期待され、学術的、臨床的に大きな意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：Cisplatin is known to have a radiosensitizing effect. PI polyamide binds to nuclear DNA in a sequence-specific manner. By using PI polyamide to efficiently induce an antitumor drug into the nucleus of tumor cells, which is the field of antitumor action of platinum preparations such as cisplatin, it is possible to obtain a stronger antitumor effect. Taking advantage of the high nuclear translocation of PI polyamide targeting non-specific gene sequences, cisplatin-like platinum complex and PI polyamide compound (PIP-Pt) were bound was added to a neuroblastoma cell line. The radiosensitizing effect and antitumor effect were examined. As a result, the radiosensitizing effect was confirmed in the PIP-Pt-added group.

研究分野：小児外科

キーワード：神経芽腫 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

神経芽腫は脳腫瘍を除く小児固形悪性腫瘍のうち 20%を占め、遠隔転移例や MYCN 遺伝子増幅例、18 か月以降の発症例などの高リスク群においては集学的治療を行っても 5 年生存率が 30%と未だ予後不良である。遠隔転移例や image-defined risk factor (IDRF)陽性例では、手術療法にて完全切除を行うことが困難な例もあり、化学療法および放射線療法が非常に重要となっている。神経芽腫に対する化学療法の key drug として白金製剤が挙げられ、そのうち cisplatin は放射線増感効果を持つ (Sears CR, et al. DNA Repair . 2016;40:35-46.) ため、集学的治療において放射線療法と併用されている。cisplatin は優れた抗腫瘍効果を持ち、神経芽腫における化学療法の中心的役割を担うが、核以外の細胞内小器官にも取り込まれ、その結果腎障害などの重大な副作用を惹起することがある。もし、cisplatin を神経芽腫細胞の核内へ選択的に輸送することが可能であれば、低濃度の cisplatin においても十分な抗腫瘍効果が得られることが期待され、副作用を生じるリスクを減じることが可能となる。

PI ポリアミドは芳香族アミノ酸 N-methylpyrrole (Py) および N-methylimidazole (Im) で構成されるポリアミドであり、核 DNA に配列特異的に結合することが P.B. Dervan らにより報告されている (Cho J, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92(22):10389-92)。Py と Im の組み合わせ次第で、多様な配列の核 DNA に結合させることができ、特別な担体を用いずとも核内に効率良く取り込まれ、安定性が高い。我々は今までに、cisplatin 同様に核 DNA 損傷を誘発する抗がん剤のアルキル化剤 chlorambucil を、横紋筋肉腫特異的融合遺伝子 PAX3-FOXO1 を標的とした PI ポリアミドに結合させた化合物 (ChB-PIP) を合成し (figure 1) chlorambucil よりも低用量で同等以上の抗腫瘍効果を持つことを確認している。

本研究では、神経芽腫の予後不良因子である MYCN 遺伝子を標的とした PI ポリアミドを作成し、cisplatin 類似白金錯体 (Pt) を結合させた化合物 (PIP-Pt) を神経芽腫細胞株に投与する。PIP-Pt が神経芽腫細胞の核 DNA へ取り込まれることを確認し、神経芽腫細胞株での抗腫瘍効果、放射線増感効果を検証する。

2. 研究の目的

本研究は、いまだ予後不良である神経芽腫高リスク群患者に対しての新規治療薬剤の開発を目的とする。培養細胞系の実験で抗腫瘍効果、放射線増感効果を得られた化合物については、ヒト神経芽腫細胞株を免疫不全マウスに移植して作製した腫瘍モデルマウスにおける抗腫瘍効果を検討する。今回開発する PIP-Pt は低用量で cisplatin と同等以上の治療効果が望める可能性があることから、抗腫瘍薬の副作用を減じる効果が見込まれる。また、本研究では神経芽腫に対する MYCN 遺伝子を標的としたが、横紋筋肉腫における PAX3-FOXO1 遺伝子等、腫瘍特異的に発現している遺伝子を標的とした PI ポリアミドを用いて同様の化合物を作成することで、神経芽腫以外の様々な悪性腫瘍に対する新規抗腫瘍薬の開発へと発展することが期待され、学術的、臨床的に大きな意義を持つ。

3. 研究の方法

本研究では研究期間内に MYCN 遺伝子を標的とした PIP-Pt を設計、合成し、ヒト神経芽腫細胞株における抗腫瘍効果および放射線増感効果を培養細胞、腫瘍モデルマウスで検討する。また、PIP-Pt の細胞内局在や細胞死の様式を検討し放射線増感効果の機序を解明する。

(1) MYCN 遺伝子を標的とした PIP-Pt の合成

MYCN 遺伝子を標的とした PI ポリアミドを合成し、cisplatin 類似白金錯体を結合させ、PIP-Pt を合成する。合成はペプチド合成機 (PSSM8) を用いて行い、高速液体クロマトグラフィーによる精製、質量分析装置による分子量の確認後以下の実験に用いる。

(2) PIP-Pt のヒト神経芽腫細胞株を用いた培養細胞系における抗腫瘍効果、放射線増感効果の確認及び至適条件の検討

合成した PIP-Pt をヒト神経芽腫細胞株の培養液に添加し、X線を照射することで抗腫瘍効果、および放射線増感効果を確認する。抗腫瘍効果、放射線増感効果は (a) WST-8 assay、(b) Colony formation assay を行う。X線照射は日立 X線照射装置 (MBR-1520R-3) を用いて行う。ヒト神経芽腫細胞株は MYCN 遺伝子増幅株 (NB1、NB9、Kelly) および非増幅株 (NB69、SK-N-SH、SK-N-AS) を用い、それぞれの細胞株の生物学的背景と PIP-Pt による抗腫瘍効果および放射線増感効果との関係を明らかにする。

(3) WST-8 assay (cell viability の評価)

96 well plate にそれぞれ 1.5×10^4 個の神経芽腫細胞を播種する。24 時間後に 10pM から 10nM の範囲で PIP-Pt を培養液へ添加し、その 24 時間後に 0Gy (非照射) から 10Gy の範囲で放射線を照射する。PBS 添加群を陰性コントロール、cisplatin 添加群を陽性コントロールとする。放射線照射から 24、48、72 時間後に WST-8 assay にて、神経芽腫細胞の cell viability を測定する。最も cell viability が抑制される PIP-Pt の濃度、放射線量の至適条件を検討する。

(3) - Colony formation assay (コロニー形成能の評価)

神経芽腫細胞株に対し (a) で得られた至適条件で PIP-Pt の添加、放射線照射を行い、コロニー形成能力を評価する。

(4) PIP-Pt の細胞内局在についての検討

我々はすでに、FITC ラベルした PI ポリアミドがマウス生体内において主要臓器へ分布し、神経芽腫細胞株の培養細胞系において核内へ局在することを確認している。しかし、cisplatin 類似白金錯体を付加した状態の PIP-Pt では FITC ラベルが不可能なため、細胞分画キットを用い、神経芽腫細胞株における PIP-Pt の核内局在を確認する。

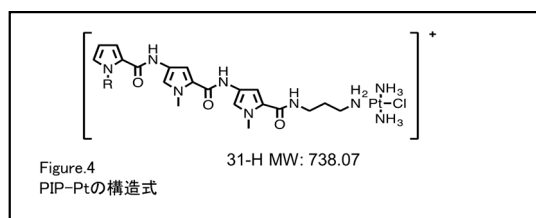
PIP-Pt を添加し 24 時間培養した神経芽腫細胞から、細胞分画キット (Subcellular Proteome Extraction Kit) を用いて細胞質、細胞膜、オルガネラ、核、細胞骨格マトリックスを連続して順次分画抽出する。その後、各抽出液中の PIP-Pt 量を高速液体クロマトグラフィーで定量し、PIP-Pt の核内局在を確認する。

(5) PIP-Pt の抗腫瘍効果、放射線増感効果による細胞死様式の評価

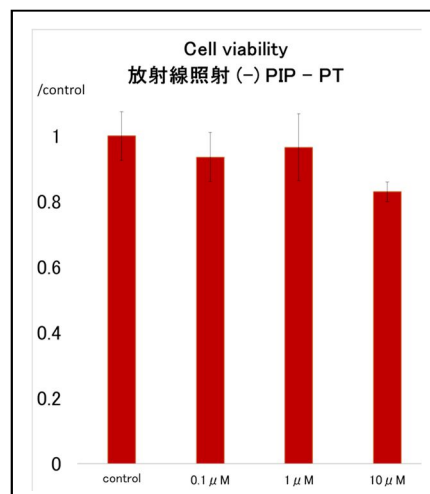
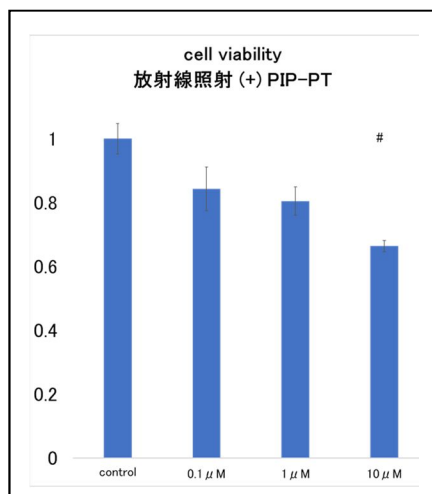
PIP-Pt 投与により抗腫瘍効果、放射線増感効果を認めた場合、細胞死の様式に変化が見られるかを検討する。PIP-Pt を投与し放射線照射した神経芽腫細胞を核染色剤 Hoechst 33258 で染色しクロマチンの凝集したアポトーシス小体を蛍光顕微鏡で観察し、アポトーシス細胞数を定量する。また、Annexin V と Propidium iodide で二重染色し、フローサイトメトリーで早期アポトーシス細胞、後期アポトーシス細胞の割合を定量する。

4. 研究成果

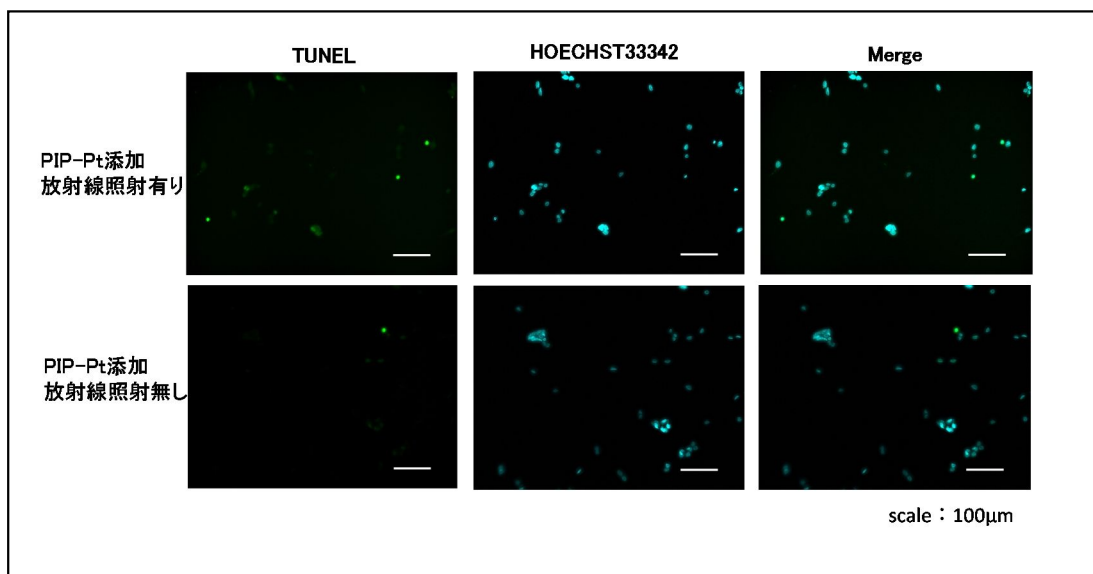
非特異的遺伝子配列を標的とした PI ポリアミドの核内移行性の高さを利用し、cisplatin 類似白金錯体を結合させた化合物 (PIP-Pt) を神経芽腫細胞株に投与し、その放射線増感効果および抗腫瘍効果を検討したところ、PIP-Pt 添加群でコントロール群と比べ、放射線照射 24 時間後で放射線増感効果が確認された。



PIP-Pt 至適条件が確認されたところで今年度は放射線照射の至適条件の検討およびその結果の再現性を得るべく至適条件での検討を再試行した。1 Gy, 5 Gy, および 10 Gy の放射線照射、照射後 12 時間、24 時間、48 時間、72 時間で比較したところ、5 Gy の放射線照射、PIP-Pt $10 \mu\text{M}$ 添加群でコントロール群と比べ、有意差をもって放射線照射 24 時間後の cell viability の低下を認めた (66%、 $p < 0.05$)。



引き続き PIP-Pt の抗腫瘍効果、放射線増感効果による細胞死様式の評価を試みた。前述の至適条件から PIP-Pt を 10 μ M 添加し添加 24 時間後に 5 Gy の放射線照射し検討した。照射 24 時間後、TUNEL 法にて断片化 DNA を標識し、放射線増感効果による細胞死様式の変化を確認した。その結果、PIP-Pt 添加群において、放射線照射後の TUNEL 陽性率は 73.6%であったことから PIP-Pt を用いた放射線照射増感効果による細胞死はアポトーシスの誘導によるものが示唆された。



次に MYCN 遺伝子を標的とした PI ポリアミドに対し cisplatin 類似白金錯体を結合させた PIP-Pt を作成し神経芽腫細胞に対する抗腫瘍効果をシスプラチン単独投与と比較検討したところ、優位な差は得られなかった。また、同様に作成した PIP-Pt における放射線増感効果を検討したところ、放射線増感に一定の効果を認めたものの再現性を得ることはできなかった。また、MYCN 遺伝子を標的とした PIP-Pt の細胞内局在について、細胞分画キットを用いて分画抽出し、各抽出液中の PIP-Pt の量を高速液体クロマトグラフィーを用いて定量したところ、細胞内局在に一定の傾向を得られなかった。細胞内局在の再現性や、非特異的遺伝子配列を標的とした PIP-Pt において得られた抗腫瘍効果及び放射線増感効果を安定して得られなかった原因は、分子量増大による溶解不良の影響が大きいと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 植草 省太、日高 綾乃、土方 浩平、加藤礼保納、長崎瑛里、細川 崇、石橋直也、上原 秀一郎、越永 従道
2. 発表標題 白金錯体結合Pyrrole-Imidazole Polyamidを用いた神経芽腫に対する新規抗腫瘍薬の検討
3. 学会等名 第61回日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------