

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590131

研究課題名（和文）

遺伝子導入・発現増強剤としての正電荷ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の開発

研究課題名（英文）

Development of cationic histone deacetylase inhibitors as enhancer of gene transfection and expression

研究代表者

長岡 康夫 (NAGAOKA YASUO)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：90243039

研究成果の概要（和文）：リポフェクション法による、動物細胞内への遺伝子導入技術は、その安全性や実験方法の簡便性から最も汎用されているが、その遺伝子導入・発現効率が比較的低く、改善が求められている。そこで、本研究では遺伝子発現上昇作用が期待されるヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤と既存のリポフェクション試薬とを組み合わせた高効率の遺伝子導入・発現剤の開発を目指した。その結果、従来法の20倍以上に遺伝子発現を増強する薬剤の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：Lipofection is the most versatile transfection methods to transfect genes into mammalian cells, because of its safety and its handiness. However, the expression efficiency of the transfected genes with this method is much lower than that with viral vector. We therefore attempted to develop highly efficient enhancer for lipofection. According to this objective, we accomplished the development of lipofection enhancers which enhance the expression of genes up to 23 times more than that of control. Structure of the enhancer is based on histone deacetylase (HDAC) inhibitors, which increase acetylation level of histone in nucleus resulting in the enhancement of transcription efficiencies. HDAC inhibitors also inhibit a cytosolic isozyme of HDACs, HDAC6, to facilitate transportation of transfected genes to the nucleus. This may also contribute to the enhancement of the transfected gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：リポフェクション、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤、非ウイルスベクター、遺伝子発現、HDAC

1. 研究開始当初の背景

| 遺伝子治療や iPS 細胞技術など、ヒト細胞

内への外来遺伝子導入を基盤とする医療技術の発展が期待されるなか、ウイルスベクターに替わる、安全性が高く効率の良い外来遺伝子細胞内導入法の開発が求められている。この状況下、毒性や抗原性が少ない正電荷コレステロールを主成分とするナノ粒子(NP)を使った方法が注目されており、本研究分担者である服部らも *cholesteryl-3 $\beta$ -carboxyamidoethylene-N-hydroxyethylamine* などの正電荷コレステロールと Tween 80 を構成成分とする正電荷ナノ粒子(NP-OH)が高い遺伝子導入効率を示すことを見出している。しかしながら、本法で導入された DNA の転写・発現効率がウイルスベクターによる DNA 導入時に比べて低いことが問題である。この転写抑制は核内に移行した導入 DNA がヒストンタンパク質と結合し、転写抑制されていることが一因と考えられる。

一方、本研究代表者の長岡や分担者の上里らは、転写活性化作用を有するヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤の開発に成功している。HDAC 阻害剤はヒト細胞核内のヒストンタンパク質のアセチル化を亢進し、ヒストンタンパク質と DNA の相互作用を弱めることにより転写活性化させることが知られている。我々が開発した HDAC 阻害剤には 1 級または 3 級のアミノ基を有するものがあり、いずれも強い HDAC 阻害活性を有することを見出している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は従来の正電荷コレステロールの遺伝子導入機能と正電荷 HDAC 阻害剤の遺伝子発現増強機能とを併せ持つバイファンクショナルな正電荷ナノ粒子遺伝子導入剤の開発である。

バイファンクショナル遺伝子導入・発現増強剤を材料とし、通常のコレステロールと同様に正電荷ナノ粒子を形成する。このナノ粒子に DNA を静電的相互作用により吸着させ、細胞内に取り込ませることができると考えた。細胞内に導入された複合体はエンドソーム内にあるが、このエンドソームが壊れて細胞質内に分散したナノ粒子は生体内酵素で分解され HDAC 阻害剤を遊離する。この HDAC 阻害剤は核内に移行し、ヒストンの高アセチル化をもたらす、同時に核内に移行した外部導入遺伝子の転写活性を増強することが期待される。

本研究では、この HDAC 阻害剤開発の更なる展開として、本化合物群に抗がん剤の DDS としての応用も加味し、生物学的利用率の向上、動態の改善、体内分布の制御、がん細胞への標的化などを旨とする。

## 3. 研究の方法

HDAC 阻害剤をベースとした正電荷脂質

複合体の合成を行うにあたり、HDAC 阻害剤と組み合わせる脂質の選択と、HDAC 阻害剤と脂質との連結部であるリンカーの選択が必要となる。HDAC 阻害剤としては、SAHAをはじめとする、既存のもので、臨床応用までされているものから、我々が独自に開発したもので、構造や活性の異なる種々のものを検討した。脂質としては、炭素鎖の炭素数や分岐の仕方が異なる種々の脂肪酸や、リン脂質などを用いた。リンカーとしては、細胞内の酵素等の働きで生分解し、インタクトな HDAC 阻害剤を再生する構造である必要がある。この様な条件を満たすリンカーとして、ジスルフィド結合を有するものと、エステル結合を有するものを選択した。HDAC 阻害剤 - リンカー - 脂質の結合は、ステップワイズな縮合反応または付加反応により行った。

遺伝子発現効率の評価には、サイトメガロウイルスのプロモーターを持つ、プラスミド DNA に、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子や GFP 遺伝子を導入したものを使用した。遺伝子導入法としては、市販のリポフェクション試薬のプロトコールに従い、これに適宜、当該リポフェクションエンハンサーを添加することにより、その活性を評価した。

遺伝子発現増強の機構を解析するために、フローサイトメトリーと共焦点レーザー顕微鏡を用いた。フローサイトメーターでは、一細胞当たりの遺伝子発現量や、全細胞に対する発現細胞数の割合を換算した。蛍光顕微鏡では、蛍光標識した遺伝子を導入し、その位置の経時変化を観測した。

## 4. 研究成果

本研究の目的であるリポフェクションエンハンサーとして K004 を開発することに成功した。K004 は HDAC 阻害剤に脂肪酸が結合した構造を有し、細胞内でエステル結合が加水分解し、HDAC 阻害剤として働く、いわゆるプロドラッグとしての働きを有する。汎用性の高い市販のリポフェクション試薬である Lipofectamine2000 を用いた時の遺伝子導入・発現効率を CHO-K1 マウス卵巣細胞におけるルシフェラーゼ遺伝子の発現を指標に比べた結果 K004 は一連の誘導体の中で最も活性が高く (Fig. 1)、HCT116 大腸がん細胞においても同様の結果となった (Fig. 2)。

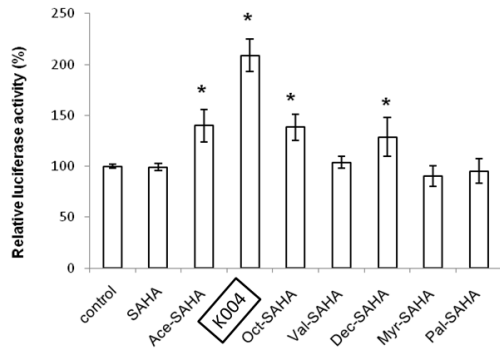


Fig. 1. 種々の誘導体のリポフェクションエンハンサーとしての効果。CHO-K1 細胞に対する Lipofectame2000 による遺伝子導入に対する効果の比較

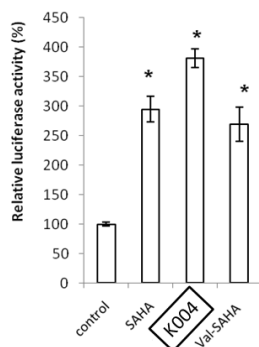


Fig. 2. 種々の誘導体のリポフェクションエンハンサーとしての効果。HCT116 細胞に対する Lipofectame2000 による遺伝子導入に対する効果の比較

さらに、K004 の種々のトランスフェクション試薬に対する効果について比較したところ、Lipofectamine や Lipofectamine2000 や LipofectamineLTX に対しては約 2 倍、FugeneHD に対しては約 3 倍の増強活性を示した。(Fig. 3) Fig. 3 には CHO-K1 細胞を使った結果を示したが、HCT116 細胞においても同様の結果が得られた。

LipofectamineLTX には市販のエンハンサー試薬として Plus Reagent がある。我々の開発した K004 と Plus Reagent の Lipofectamine LTX に対する遺伝子発現増強活性の比較をした。その結果、Fig. 4 に示すように、K004 は単剤での比較で Plus Reagent と同等かやや上回る発現上昇効果をもたらすことがわかった。さらに、K004 と Plus Reagent を組み合わせることに、約 4.5 倍の発現上昇を示すことを明らかにした。

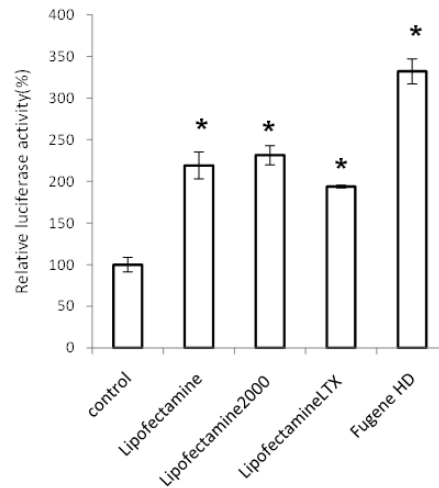


Fig. 3. 種々のリポフェクション試薬に対する K004 の効果 (CHO-K1 細胞を使った結果)

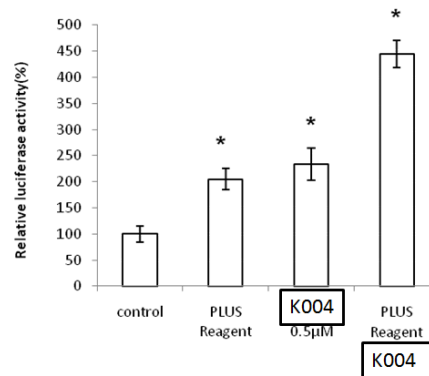


Fig. 4. K004 の LipofectamineLTX Plus Reagent に対する効果 (CHO-K1 細胞を使った結果)

K004 は HDAC 阻害剤の亜鉛結合部位である、ヒドロキسام酸基に脂肪酸をエステル結合した構造を有する。このことから、K004 自体は HDAC 阻害活性は有しない。細胞内で脂肪酸との結合が加水分解されることではじめて HDAC 阻害剤としての活性を有することになる。そこで、本当に K004 が HDAC 阻害剤として細胞内で機能しているかを確認するため、核内のヒストン H3 のアセチル化状態の変化を Western blotting 法により分析した。(Fig. 5) その結果、24 時間後には、明らかに、K004 を添加した細胞では添加していない細胞に比べて、アセチル化ヒストン H3 の量が増加していることが見て取れる。また、細胞質基質内のチューブリンのアセチル化も亢進していることがわかるが、これは、微小管による DNA の輸送の活性化を示唆する結

果で、K004 による遺伝子発現増強効果が、単に核内の転写活性化だけではなく、細胞質基質内の DNA 輸送系の活性化にも起因する可能性も示された結果である。

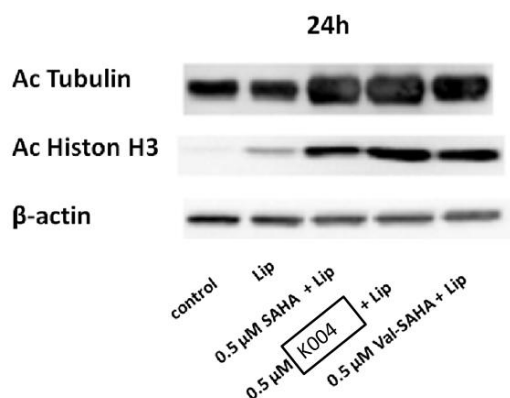


Fig. 5. Western blotting によるアセチル化ヒストン H3 タンパク質とチューブリンタンパク質の検出

K004 の作用の解析として、さらに、フローサイトメーターを用いた一細胞当たりの発現定量を行った結果、細胞当たりの発現量が顕著に上昇していることが明らかになった。

以上の結果は主に K004 についてのものであるが、我々は、K004 をさらに改良した K005 を開発し、Lipofectamine2000 による遺伝子発現活性を最高で 23 倍まで上昇させることに成功している。(特願 2012-052395)

さらに、HDAC 阻害剤に脂質を結合させた誘導体のがん細胞に対する効果を実証し HDAC 阻害剤プロドラッグとしての DDS への応用も今後期待される。(雑誌論文 2)

以上のように、本研究課題による、HDAC 阻害剤をベースとした遺伝子発現増強剤の研究が、K004 と K005 という 2 種類のエンハンサーの開発に結びついた。今後もこれらの化合物の効果の実証を進め、広く応用されて行くことを期待している。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Y. Hirata, M. Hirata, Y. Kawaratani, M. Shibano, M. Taniguchi, M. Yasuda, Y. Ohmomo, Y. Nagaoka, K. Baba, S. Uesato.  
Anti-tumor activity of new orally bioavailable 2-amino-5-(thiophen-2-yl) benzamide-series histone deacetylase inhibitors, possessing an aqueous

soluble functional group as a surface recognition domain.

Bioorg. Med. Chem. Lett., 22(5), 1926-1930. (2012) (査読有)

- ② Y. Hattori, Y. Nagaoka, M. Kubo, H. Yamasaku, Y. Ishii, S. Uesato, Y. Maitani, Antitumor effect of liposomal histone deacetylase inhibitor-lipid conjugates in vitro, Chem. Pharm. Bull. 59(11), 1386-1392 (2011) (査読有)
- ③ Y. Ishii, Y. Hattori, T. Yamada, S. Uesato, Y. Maitani, Y. Nagaoka, Histone Deacetylase Inhibitor Prodrugs in Nanoparticle Vector Enhanced Gene Expression in Human Cancer Cells  
Euro. J. Med. Chem., 44 (11) 4603-4610 (2009). (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 長岡康夫, 吉野宏美, 小林真理子, 置田裕子, 中野宏樹, 上里新一  
ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤とその誘導体のリポフェクションに及ぼす影響  
日本薬学会第 132 年会 2012 年 3 月 28 日-31 日 (北海道大学) 要旨 31P2-am151
- ② H. Yoshino, M. Kobayashi, H. Okita, H. Nakano, S. Uesato, Y. Nagaoka  
Histone Deacetylase Inhibitors as Lipofection Enhancer  
8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS11) (29 Nov-2 Dec, 2011), Abstract p. 122 (2P-141). 京王プラザホテル (東京)
- ③ 吉野宏美、置田裕子、中野宏樹、服部喜之、米谷芳枝、上里新一、長岡康夫  
類型の異なるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤がリポフェクション効率におよぼす影響  
日本薬学会 131 年会 (グランシップツインメッセ静岡) 2011 年 3 月 28-31 日
- ④ 置田裕子、中野宏樹、吉田耕平、吉野宏美、上里新一、服部喜之、米谷芳枝、長岡康夫  
リポフェクション効率向上効果を有するプロドラッグ化ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤  
日本薬学会 131 年会 (グランシップツインメッセ静岡) 2011 年 3 月 28-31 日

- ⑤ H. Nakano, S. Uesato, Y. Nagaoka  
Acyl Suberoylanilide Hydroxamic Acid  
as Lipofection Enhancer  
11th Tetrahedron Symposium (22-25  
June 2010, Beijing, China) (北京大学)  
要旨 C DPSB. 56
- ⑥ H. Okita, Y. Ishii, S. Uesato, Y.  
Hattori, Y. Maitani, Y. Nagaoka  
Prodrugs of Histone Deacetylase  
Inhibitor K-182 Enhanced Expression  
of Genes Transfected with Cationic  
Cholesterol-Based Nanoparticle  
Vector  
11th Tetrahedron Symposium (22-25  
June 2010, Beijing, China) (北京大学)  
要旨 C DPSB. 55
- ⑦ 中野宏樹、置田裕子、石井佑太、長岡康  
夫、上里新一、服部喜之、米谷芳枝  
新規遺伝子発現増強剤 DDTS-K-182  
日本薬学会第130年会(岡山大学) CD  
要旨集 28P-pm075 2010年3月28-30  
日

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: 遺伝子発現増強剤  
発明者: 長岡康夫、上里新一  
権利者: 学校法人関西大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2012-052395  
出願年月日: 平成24年3月9日  
国内外の別: 国内

○取得状況(計1件)

名称: メイラード反応阻害剤  
発明者: 長岡康夫、河原 秀久、山本 秀樹、  
芝田 隼次、小幡 齊、上里 新一  
権利者: 学校法人関西大学  
種類: 特許  
番号: 特許第 4897229 号  
取得年月日: 平成24年1月6日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

<http://pharm.life-bio.kansai-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

長岡 康夫 (NAGAOKA YASUO)  
関西大学・化学生命工学部・教授  
研究者番号: 90243039

(2) 研究分担者

服部 喜之 (HATTORI YOSHIYUKI)  
星薬科大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 90350222

上里 新一 (UESATO SHINICHI)  
関西大学・化学生命工学部・教授  
研究者番号: 50111969