

機関番号：3 2 6 6 5

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592281

研究課題名 (和文) 神経芽腫における MYCN 遺伝子を標的とした PI ポリアミドの
抗腫瘍効果に関する研究

研究課題名 (英文)

研究代表者

大橋研介 (OHASHI KENSUKE)

日本大学・医学部・助手

研究者番号：10526065

研究成果の概要 (和文)：神経芽腫は小児固形腫瘍で最も頻度が高く、MYCN 遺伝子の増幅がその予後との関連を指摘されている。MYCN 遺伝子に対して、同遺伝子の転写因子 (SP1 and E2F) を標的とし、MYCN 遺伝子転写を抑制する PI ポリアミドを MYCN 遺伝子増幅神経芽腫細胞株 CHP134 細胞へ投与し、細胞増殖抑制効果、および MYCN 遺伝子の発現抑制効果を確認した。また、神経芽腫細胞移植マウスを用い同様に PI ポリアミドを投与したところ、MYCN 遺伝子の発現が抑制され、腫瘍の増殖は抑制される傾向にあった。今後、神経芽腫に対する新規抗癌薬剤の候補となり得ると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：Neuroblastoma (NB) is the most common pediatric solid tumor. NB has MYCN amplified is poor outcome and down regulation of MYCN expression causes proliferation down-regulated and differentiation in NB. We designed PI polyamide targeting for SP1 and E2F binding site, which are promoter region of MYCN gene. NB cell lines, such as CHP134 cells were cultured in the PI polyamide. NB cell lines were down-regulation of proliferation and of MYCN expression, compared with NB cell lines untreated with PI polyamide. We made xenograft nude mice by using CHP134 cells. In NB xeno-graft mice, was we administrated PI polyamide into the tumor. Then the tumors growth was down-regulated, compared with non-treated group. This PI polyamide could be one of the new therapeutic agents for MYCN gene amplified neuroblastoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,800,000	540,000	2,400,000
平成 22 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成 23 年度	500,000	15,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	975,000	4,870,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・小児外科学

キーワード：MYCN 遺伝子、PI ポリアミド、発現抑制、小児外科

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経芽腫は小児固形悪性腫瘍の中で最も発生頻度の高い腫瘍である。その約 1/4 において MYCN 遺伝子の増幅がみられ、特に進行した腫瘍においては高頻度に発生し、独立した予後不良因子であるとともに、この異常が神経芽腫発生や進展にも関与していると考えられている。また、MYCN 蛋白は転写因子として機能し、MCM7(細胞周期の G1-S 期の調整に関与)、MRP1(薬剤耐性に関与)、ODC(細胞周期の G1 期の進行に関与)などの、腫瘍の細胞周期の不安定化や薬剤耐性に関与する遺伝子の発現調節に関わることも知られている。

(2) 神経芽腫における MYCN 遺伝子発現を抑制すると、腫瘍細胞増殖に対して抑制効果を発揮することが示されている。RNA 干渉の手法では、siRNA の生体内での不安定性などから in vivo での使用やヒトへの応用を考えた場合に、delivery に関する点など未だ十分に解決されていない問題も存在している。他方、我々は臨床応用をも念頭において、投与(標的までの delivery)が容易、かつ生体内での安定性が高い、PI ポリアミドを用いた遺伝子の転写制御についての研究も行ってきた。

(3) PI ポリアミドはピロール基(Py)ならびにイミダゾール基(Im)の組み合わせからなる化学合成物質で、2001 年に Peter B Dervan により Py と Im の任意の組み合わせが特定の DNA 塩基配列を認識できることが報告されたものである。その DNA への結合力は強く、Py/Im ペアが CG、Py/Py ペアが AT または TA、Im/Py ペアが GC を認識・結合する。この性質を応用して特定の塩基配列に対応する様に合成した PI ポリアミドは、その配列特異的に DNA と結合する。そのため、ある標的遺伝子の転写調整領域に対して配列特異的に合成・結合させると、本来の転写因子の同領域への結合を競合的に阻害する。その結果、標的遺伝子の転写、および発現の調節が可能となると考えられる。

(4) 我々は MYCN 遺伝子の転写因子である SP1 結合領域の一部とその隣接配列に特異的に結合する PI ポリアミドを既に作製していたため(図 1)、MYCN 遺伝子が増幅している神経芽腫細胞株である NB9 で、予備実験的に MYCN 遺伝子の発現の抑制を real time RT-PCR で確認し、また細胞増殖抑制効果を確認した。しかし、SP1 結合領域への PI ポリアミドのみによる MYCN 発現抑制効果は、siRNA で得られた効果より低く、SP1 以外による MYCN 発現抑制効果も siRNA で得られた効果より低かった。MYCN の転写に関わる領域は SP1 以外にも存在することから、SP1 以外の MYCN 遺伝子の転写因子である E2F に対して、これらの因子が結合する塩基配列に対応する PI ポリアミ

ドを合成し、SP1 のものを含め、単独あるいは重複した投与を工夫することにより、MYCN 増幅神経芽腫細胞において十分な抗腫瘍効果を誘導する研究を in vivo および in vitro の系で企画した。

2. 研究の目的

本研究では以下の項目を検討し、内容を明らかにすることを目的とする。

(1) SP1 結合部位を標的とする PI ポリアミドはすでに合成しているが、同様の合成法により E2F に対応した PI ポリアミドを合成する。
(2) MYCN 遺伝子の増幅を認める神経芽腫細胞株(CHP134、IMR-32、NB9)と MYCN 遺伝子の増幅を認めない神経芽腫細胞株(SK-N-SH)を対象として、PI ポリアミド投与の至適条件(濃度)を決定した上で、単独あるいは重複投与による腫瘍増殖抑制効果を明らかにする。

(3) 神経芽腫細胞株を用いて腫瘍形成ヌードマウスの作製をする。そのマウスに対して PI ポリアミドを投与し生体内において発揮される抗腫瘍効果について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) MYCN 遺伝子に対するポリアミドの設計、合成

MYCN 遺伝子の転写因子である SP1 の結合領域(GGGCGG)に対しては、既にその領域の一部(GGG)とそれに連続する 3 塩基(GGA)に対し結合するように PI ポリアミドを設計・合成している。この設計方法によって他の遺伝子上に存在する SP1 結合部位から MYCN 遺伝子の SP1 部位を差別化することができるため、PI ポリアミドが MYCN SP1 領域のみに対し特異性高く結合するようになる。

MYCN 遺伝子のプロモーター領域には、SP1 以外に異なる転写因子結合領域が存在しているため、これらに対する PI ポリアミドを合成する。すなわち MYCN 遺伝子の転写開始点の -157 塩基の位置に存在する E2F(TTGGCGC)結合を標的とした。合成と設計は、SP1 結合部位における場合と同様に行なう。また薬物動態実験に用いるため、それぞれに FITC で蛍光ラベリングしたものを作成した。

(2) 各種細胞株における MYCN 遺伝子の発現検討

細胞株は神経芽腫細胞株である CHP134、IMR-32、Kelly、NB9(以上 MYCN 増幅細胞)、SK-N-SH(MYCN 非増幅)を使用した。mRNA レベルの MYCN 遺伝子の発現を real time RT-PCR で確認する。すでに MYCN 遺伝子増幅細胞株

である CHP134 と非増幅細胞株である SK-N-SH で実際に MYCN 遺伝子の発現を確認しており、CHP134 は予想通り SK-N-SH に比べ 10 倍以上の発現を示していた。このほかの MYCN 増幅細胞株 (IMR-32, Kelly, NB9) においても同様に MYCN 遺伝子の mRNA レベルの発現を確認する。さらに、蛋白レベルの発現は、Western blotting 法ならびに細胞の免疫組織化学染色を用いて評価を行なう。

(3)PI ポリアミドの至適条件と MYCN 発現抑制ならびに抗腫瘍効果の検討

次に、pilot study として CHP134 に対して、SP1 を標的とする PI ポリアミドを使用し、その投与濃度に関する至適条件と抗腫瘍効果を検討する。この際の PI 化合物のコントロールとして分子量は同等であるがその分子構造から DNA との結合能を有しない PI ポリアミドを用いる。

① 至適条件の決定

過去に扱ってきた多種類の細胞株では、一般にPIポリアミドは細胞培養液に添加し 48 時間後に評価すると、20 μ M以上の濃度ではコントロール化合物においても細胞数の低下が見られ、PIポリアミド自体での細胞毒性が無視できなくなることを観察している。また一方で、標的特異的なPIポリアミドは、500nM以上でGel shift assayにおいて標的DNA配列との結合が観察されていた。そこで、CHP134 をそれぞれ 3×10^4 個撒き、そこにPIポリアミドをさまざまな濃度の範囲(500nM, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 20 μ M)で添加する。その後 48 時間後にWST-8 Assayを施行して、コントロールと比較し有意に細胞数が低下する至適濃度の判定を行う。また、添加後 24 時間の細胞も採取しておきMYCNの発現をreal time RT-PCRにて定量し発現低下に関する評価を行う。これらの評価から、MYCNの発現が抑制され、かつ細胞の増殖が抑制される至適条件 (PIポリアミド濃度) を決定する。

② MYCN 発現低下ならびに細胞増殖抑制に関する時間的経過の確認

至適濃度での PI ポリアミドで処理した後さらに 1 ~ 7 日の間で毎日 real time RT-PCR による MYCN 発現の評価と、WST-8 assay と cell counting による細胞数に関する評価を行い、それぞれの PI ポリアミド処理後の時間的経過に応じた変化 (低下と回復) について確認を行なう。これにより、PI ポリアミドの効果が MYCN 発現に関してはいつから始まり、どの時点で最大となるかが判定される。

(4)E2F に対する PI ポリアミドの検討

SP1 で決定した PI ポリアミド至適添加条件を、作成済みの E2F に対する PI ポリアミドにおいても適用し、前述と同様に MYCN 発現、細胞増殖抑制に関する時間経過を検討する。さらに、合成した PI ポリアミド 2 種を同時に添加して同様の検討を行う。これらの検討では、複数の転写因子に対する PI ポリアミド投与にて、相加あるいは相乗効果が得られることが期待できる。必要に応じ MYCN 蛋白発現についても検討する。

(5)各細胞株における検討

以上の実験・検討にて確認される CHP134 における PI ポリアミドのもたらす効果が、その他の神経芽腫細胞株においても同様に確認される一般性を有するものかについて、IMR-32, Kelly, NB9 などのその他の MYCN 増幅細胞において検討する。また、非増幅の SK-N-SH で効果が低くなるのか否かを確認する。

(6)MYCN 下流遺伝子の発現の検討

既述の検討を行なう際用いた各種の cDNA を使用して、MYCN によりその発現が調節され、かつ、腫瘍形成に関連すると思われる MCM7、MRP1、ODC 遺伝子などの発現の状態についても検討する。

(7)腫瘍形成モデルマウスの作製と PI ポリアミドの効果の検討

①腫瘍形成モデルの作製

すでにCHP134 のヌードマウスへの移植モデルは報告されている (Cancer Res 1976;36:3094)。これに準じて 1×10^6 個に CHP134 を調節した 100 μ l の Hank's balanced salt solution (HBSS) を 6 週齢の雄ヌードマウスの後頸部に移植し、12 週間の飼育により腫瘍形成を肉眼的に確認する。また形成した腫瘍からRNAを抽出し real time RT-PCRでMYCN遺伝子の発現の確認を行う。さらに、HE染色切片を作製して、顕鏡下で腫瘍形態の確認およびMYCN蛋白の抗体を用いて免疫組織化学染色施行し MYCN蛋白の発現の確認を行う。

②腫瘍形成モデルマウスへの PI ポリアミドの投与

腫瘍の大きさが 500mm³になった移植マウスを以下の 3 群に用いる。

・前述してきた PI ポリアミドの中で一番効果のあった組み合わせの PI ポリアミド投与群

・コントロール PI ポリアミド投与群 (mismatch ポリアミド)

・PBS のみを投与群

腫瘍近傍に PI ポリアミドもしくは PBS を投与し、投与後 1 週間まで腫瘍径の確認と腫瘍形態の確認と MYCN 遺伝子の発現の確認を行う。さらに各群間を比較し抗腫瘍効果を検討する。

(4) 研究成果

①これまで CG 配列への結合が困難であったが PI ポリアミド化合物の、Dp 末端とβリンカー部分の設計を工夫することにより CG が多い配列への設計が可能となり、認識配列に対する設計の自由度が高くなった。また、ブロック合成の開発により認識配列が 12 塩基まで延長できるようになった。そのいずれにおいてもピアコア法による分子間相互作用解析により、標的配列を持つ二本鎖 DNA に対する特異的結合能が低下しないことも確認された。これにより E2F、SP1 を標的としたポリアミド化合物の再設計を行った。その結果、PI ポリアミド化合物 (E2F-1:ATGGAAT, Sp1-1:AGGAGGC) に加えて新規に PI ポリアミド (E2F-2:TTGGCGGA, Sp1-2、-3:AGGGCGGC-2 および-3 はβリンカー部分が異なった設計であり認識配列は同じ) の計 5 つの設計・合成に成功した。また、以下に示す実験の結果から効果の認められた SP1-2、E2F-2 および MYCN 遺伝子の標的転写調整因子に対して結合配列を持たない PI ポリアミド化合物であるコントロール PI ポリアミド化合物 (mismatch ポリアミド) を合成した。

②①で作製した PI ポリアミド化合物を用いて神経芽細胞腫の MYCN 遺伝子発現亢進株である CHP134 細胞に対して MYCN 遺伝子上流の転写調整領域を標的とした検討を行った。その結果、E2F-2 および SP1-2 投与群において、非投与群と比べ 5 μM で投与後 72 時間において最も腫瘍細胞増殖抑制効果を認めた。

(E2F2-2 : 約 20%、Sp1-2 : 約 30%、非投与群の比較において) さらに E2F-2 投与群では形態学的な変化としてアポトーシスと考えられる凝縮した細胞や分断化された細胞を一部認めた。しかし、いずれの PI ポリアミド化合物の投与群でも神経突起の伸長等の分化誘導を思わせるような形態学的変化は確認されなかった。

また、同時に得られた細胞から RNA を抽出し、MYCN 遺伝子の発現を real time RT-PCR 法で検討したところ、E2F-2 ポリアミド化合物 5 μM 投与群では非投与群と比較して約 40% の MYCN 遺伝子の発現抑制を認めた。しかし、SP1-2 投与群では MYCN 遺伝子の発現の抑制は認めなかった。

さらに上記で一番細胞増殖抑制効果を認めた SP1-2 (ポリアミド S) と E2F-2 (ポリア

ミド E) を各 2.5 μM ずつ計 5 μM となるように同時投与した。その結果、投与後 72 時間で各 PI ポリアミド化合物単独投与群よりも強い増殖抑制効果 (非投与群と比較して約 40% の増殖抑制効果) および E2F-2 単独投与と同様に形態学的な変化としてアポトーシスと考えられる凝縮した細胞や分断化された細胞を一部に認めた。

同時に得られた細胞から RNA を抽出し、MYCN 遺伝子の発現を real time RT-PCR 法で検討した。その結果、PI ポリアミド化合物の非投与群と比較して約 60% の MYCN 遺伝子の発現抑制効果を認めた。これらの結果より、1 つの遺伝子の転写を調節する二つの異なる転写調節因子の結合を 2 種類の PI ポリアミド化合物を用いて同時に抑制することで腫瘍細胞の増殖抑制と MYCN 遺伝子発現抑制に対する相加的な効果が得られることが確認できた。

しかし、MYCN 増幅神経芽細胞腫細胞株である IMR32 細胞、NB9 細胞および、MYCN 非増幅神経芽細胞腫細胞株である SK-N-SH 細胞、NB69 細胞においては、CHP134 細胞に対して得られた細胞増殖抑制効果以上の効果は認めなかった。

続いて in vivo での PI ポリアミド化合物の抗腫瘍効果を確認するためにヌードマウスへ神経芽細胞腫細胞株 (CHP134 細胞) の移植を行い、前述の方法で xenograft モデルの作成を行ったところ、径 5mm 程度の腫瘍形成を肉眼的に確認できた。得られた腫瘍組織から HE 染色切片を作成し検鏡的にも腫瘍の形成を確認した。形成した腫瘍を移植されたマウスに対して in vitro の実験において最も効果のあった組み合わせである E2F-2 と Sp1-2 の同時投与による In vivo での抗腫瘍効果を検討した。

腫瘍の大きさが 200mm³ になった移植マウスを以下の 2 群に分けて検討した。

・E2F-2 と Sp1-2 の同時投与群

・コントロール PI ポリアミド (mismatch ポリアミド) 投与群

いずれの群でも尾静脈に PI ポリアミド化合物 (6mg/kg) を 1 週間ごとに投与した。連日の腫瘍径の確認と腫瘍形態の確認を行った。さらに腫瘍組織を摘出し、HE 染色切片での腫瘍の形態の確認と腫瘍組織より RNA を抽出して real time RT-PCR で MYCN 遺伝子の発現を確認した。これらで得られた結果は群間で比較し、抗腫瘍効果を検討した。

その結果、初回投与から 2 週以降のマウスでは腫瘍径の増殖抑制傾向と MYCN 遺伝子の RNA 発現の抑制傾向を認めた。しかし顕鏡下では腫瘍内容などに壊死などの変化は認めなかった。さらに抗腫瘍効果はばらつきが多く、PI ポリアミド化合物自体の効果の安定性への追及や既存の抗腫瘍薬剤、他の神経芽腫

での腫瘍関連遺伝子を標的とした PI ポリアミド化合物との併用投与もしくは MYCN 遺伝子に関わる他の転写調整因子を標的とした PI ポリアミド化合物を検討することが今後の課題であると考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 12 件)

1. 川島弘之, 杉藤公信, 植草省太, 池田太郎, 越永従道, 永瀬浩喜: 神経芽腫における SLC16A5 遺伝子 promoter 領域のメチル化の検討. 第 46 回日本小児外科学会総会, 大阪, 2009. 6
2. 植草省太, 杉藤公信, 川島弘之, 古屋武史, 草深竹志, 永瀬浩喜: MYCN 遺伝子を標的としたピロールイミダゾール (PI) ポリアミドによる神経芽腫細胞の抗腫瘍効果の検討: 第 13 回神経芽腫研究会, 東京, 2009. 8
3. 植草省太, 杉藤公信, 川島弘之, 吉澤信輔, 古屋武史, 大橋研介, 池田太郎, 越永従道, 草深竹志, 麦島秀雄, 永瀬浩喜: 神経芽腫, 肝芽腫における 5D52 領域のメチル化異常の検討. 第 25 回日本小児がん学会, 千葉, 2009. 11
4. 川島弘之, 杉藤公信, 植草省太, 古屋武史, 大橋研介, 池田太郎, 越永従道, 草深竹志, 麦島秀雄, 永瀬浩喜: 神経芽腫における新規予後因子, 癌関連遺伝子の探索. 第 25 回日本小児がん学会, 千葉, 2009. 11
5. 川島弘之, 杉藤公信, 植草省太, 古屋武史, 池田太郎, 越永従道, 永瀬浩喜: 神経芽腫における *NR4A3* 遺伝子のメチル化解析. 第 47 回日本小児外科学会総会, 名古屋, 2010. 6
6. 植草省太, 杉藤公信, 吉澤信輔, 川島弘之, 古屋武史, 益子貴行, 大橋研介, 井上幹也, 池田太郎, 越永従道, 永瀬浩喜: *MYCN* 遺伝子を標的としたピロールイミダゾール (PI) ポリアミドによる神経芽腫細胞の抗腫瘍効果の検討. 第 47 回日本小児外科学会総会, 名古屋, 2010. 6
7. 川島弘之, 杉藤公信, 植草省太, 古屋武史, 池田太郎, 越永従道, 草深竹志, 永瀬浩喜: 神経芽腫における ZNF206 遺伝子のメチル化解析. 第 110 回日本外科学会総会, 名古屋, 2010. 4
8. 植草省太, 杉藤公信, 吉澤信輔, 川島弘之, 古屋武史, 益子貴行, 大橋研介, 井上幹也, 池田太郎, 越永従道, 草深竹志, 永瀬浩喜: *MYCN* 遺伝子を標的としたピロールイミダゾール (PI) ポリアミドによる

- る神経芽腫細胞の抗腫瘍効果の検討. 第 110 回日本外科学会総会, 名古屋, 2010. 4
9. Kawashima H, Sugito K, Uekusa S, Furuya T, Muroi S, Igarashi J, Ikeda T, Koshinaga T, Nagase H: EXON5-CPG ISLAND HYPOMETHYLATION OF THE ZNF206 GENE, ASSOCIATED WITH NEURONAL DIFFERENTIATION IN MICE AND DEVELOPMENT OF NEUROBLASTOMA IN HUMAN. 42th International Society of Paediatric Oncology, Boston, 2010. 10
 10. Uekusa S, Sugito K, Kawashima H, Furuya T, Inoue M, Ikeda T, Koshinaga T, Nagase H: INHIBITION OF MYCN GENE TRANSCRIPTION BY PYRROLE-IMIDAZOLE POLYAMIDE IN NEUROBLASTOMA CELLS. 42th International Society of Paediatric Oncology, Boston, 2010. 10
 11. 川島弘之, 杉藤公信, 吉澤信輔, 植草省太, 古屋武史, 池田太郎, 越永従道, 永瀬浩喜: 神経芽腫における *NR4A3* 遺伝子の DNA 低メチル化と予後. 第 26 回日本小児がん学会, 大阪, 2010. 12
 12. 植草省太, 杉藤公信, 吉澤信輔, 川島弘之, 古屋武史, 大橋研介, 井上幹也, 池田太郎, 越永従道, 藤原恭子, 永瀬浩喜: *MYCN* 遺伝子を標的としたピロールイミダゾール (PI) ポリアミドによる神経芽腫細胞移植マウスにおける抗腫瘍効果の検討. 第 111 回日本外科学会定期学術集会, 東京, 2011. 05

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称:

SEQUENCE-SPECIFIC EXPRESSION REGULATOR WHICH TARGETS AT MYC DOWNSTREAM GENE, AND METHOD FOR DETERMINING TARGET OR TARGETS OF MYC DOWNSTREAM GENE

発明者:

NAGASE Hiroki, RAJEEV Mishra, KIMURA Makoto, WATANABE Takayoshi, KAWASHIMA Hiroyuki, UEKUSA Shota

権利者: NIHON UNIVERSITY

種類: A61K 31/787, A61K 31/4178, A61P 35/00, C07D 403/14

番号: S2010-1169-N0

出願年月日: 平成 21 年 9 月 15 日 (2009. 9. 15)

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋 研介 (OHASHI KENSUKE)

日本大学・医学部・助手

研究者番号: 10526065

(2)研究分担者

杉藤 公信 (SUGITO KIMINOBU)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：10328750

永瀬 浩喜 (NAGASE HIROKI)

千葉県がんセンター研究所・所長

研究者番号：90322073