

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501313

研究課題名(和文)PIポリアミドによるMYC下流遺伝子の発現抑制と抗腫瘍効果の検討

研究課題名(英文)Analysis of anti-cancer effect of PI polyamide, which suppress MYC downstream genes

研究代表者

相馬 正義(SOMA, Masayoshi)

日本大学・医学部・教授

研究者番号：30246855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：本課題においては、前癌遺伝子c-MYCの認識配列E-boxに対し、塩基配列特異的転写抑制分子PIポリアミド(PIP)を設計し、その抗腫瘍効果の検討を行った。同PIPは骨肉腫細胞株MG63や白血病細胞株K562の増殖を有意に抑制し、これはApoptosisもしくはG1 arrestを介するとのデータを得た。さらにヌードマウスに皮下移植したMG63の増殖は、PIPの経静脈投与により有意に抑制された。PIPの直接の標的として長鎖non-coding RNA MALAT1がスクリーニングされ、MALAT1のノックダウンによりMG63の増殖が有意に抑制される事を確認した。

研究成果の概要(英文)：Gene amplification and/or overexpression of the transcription factor c-MYC, which binds to E-box (5'-CACGTG-3') present within its numerous target gene promoters, has been observed in many human tumors. In this study, we have designed pyrrole-midazole polyamides (PIP), which could bind to E-box, and investigated their possible effects on human cancer cells. We found that some PIP we designed significantly suppressed growth of osteosarcoma cell MG63 and leukemia cell K562. According to our present results, PIP-treated cells underwent apoptosis and/or G1 arrest. Furthermore, intravenous injection of PIP markedly repressed MG63-derived tumor development in nude mice. Intriguingly, knockdown of the putative PIP target MALAT1 encoding long non-coding RNA remarkably impaired cell growth of MG63 cells. Collectively, our present findings strongly suggest that PIP exerts its tumor-suppressive ability at least in part through the specific down-regulation of MALAT1.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：ピロール・イミダゾール・ポリアミド E-box MYC 抗腫瘍効果

1. 研究開始当初の背景

多くの悪性腫瘍において、前癌遺伝子 c-MYC が増幅もしくは過剰発現していることが報告されている。c-MYC は遺伝子のプロモーターに位置する E-box 配列 (5' -CACGTG-3') を認識し、数千の遺伝子の発現を制御している。それらの遺伝子の多くは細胞の増殖や分化に関与することから、c-MYC の機能や発現を低下させることにより癌細胞の増殖抑制を目指す試みがいくつか報告されているが、実用化に至っていない。ピロールイミダゾール(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、DNA に配列特異的に結合する性質を持つ。Im と Py の組み合わせ次第で多様な配列の DNA に結合させることが可能であり、遺伝子プロモーター領域の転写因子結合部位を認識する PI ポリアミドは、転写因子の結合を競合阻害し、目的遺伝子の転写阻害を行うことが期待できる。特別な Drug Delivery System を必要とせず、生体内でも安定であることから、PI ポリアミドは新規の転写阻害剤として期待される分子である。

そこで、E-box 配列 CACGTG を完全にまたは部分的に認識する PI ポリアミドを複数作成し、ヒト腫瘍細胞株に対する効果を検討したところ、PI ポリアミドの Myc-5 が白血病細胞株 K562 に対して有意な増殖抑制効果を示した。

2. 研究の目的

そこで本課題では、より強い抗腫瘍効果を持つ E-box 認識 PI ポリアミドの開発とその作用機序の解明、さらに同ポリアミドの直接の標的分子の絞り込みによる、新規の標的分子の探索を目的として、以下の研究を行った。

3. 研究の方法

(1) K562 以外の複数の細胞株における、増殖

抑制効果の確認を WST8 アッセイ、コロニー形成試験にて行った。この際、計画書申請段階では合成していなかった新しい E-box 認識 PI ポリアミド Myc-6 についても検討を行った(図 1)。

| | | |
|----------|--|------------------------|
| E-box | CACGTG | 図 1. E-box 認識 PI ポリアミド |
| Myc-2 | <u>WCGWGGW</u> | |
| Myc-3 | <u>WCCWCGW</u> | |
| Myc-4 | <u>WGCWCGW</u> | |
| Myc-5 | <u>WCWCGWGW</u> | |
| Myc-6 | <u>WCGCWCGW</u> | |
| Mismatch | <u>WCWGCWGW</u> | |

(2) 上記の E-box 認識 PI ポリアミドのうち、再現性良く細胞増殖抑制効果を示した Myc-6 について、その作用機序を *in vitro* にて調べた。

細胞死誘導のメカニズム；アポトーシス関連マーカーの検出による検討。

細胞周期への影響；Tali Image based analyzer を用いた解析

(3) *in vivo* における抗腫瘍効果の有無を、マウス Xenograft モデルを用いて確認。

(4) Myc-6 の直接の標的分子をマイクロアレイを用いてスクリーニングし、候補遺伝子については *in vitro* における機能解析を行った。

4. 研究成果

(1) 作成した E-box 配列認識 PI ポリアミドは K562 細胞以外では MG63 をはじめとする骨肉腫細胞株のいくつかに対して、有意な抗腫瘍効果を示したが、メラノーマ、膀胱癌、前立腺癌、肝癌細胞株の中には同ポリアミドによる増殖抑制を示すものが見つからなかった。MG63 細胞株に対しては Myc-6 ポリアミドが最も強い増殖抑制効果を示すことが WST8 アッセイ、コロニー形成試験により確認されたことから、以下の解析を行った。

(2) Myc-6 による細胞死の様式について検討したところ、Myc-6 投与により、初期アポトーシスのマーカーである phosphatidyl

serine の細胞膜外側への露出が上昇することが Annexin V 染色により確認され、さらに後期アポトーシスのマーカーである切断型 Caspase3 の出現がウエスタンブロットングにより観察された。

細胞周期の解析においては Myc-6 投与群の細胞では S 期、M 期の細胞数の割合が減少し、逆に G0/G1 期にある細胞の割合が非投与群と比べて有意に上昇していた。

(3) 免疫不全マウスの皮下に MG63 を移植して Xenograft 作成し、腫瘍が一定のサイズに達した時点で Myc-6 を 1 ヶ月間にわたり週一回の頻度で尾静脈投与を行ったところ、非投与群と比較して有意な腫瘍増殖抑制が確認された。

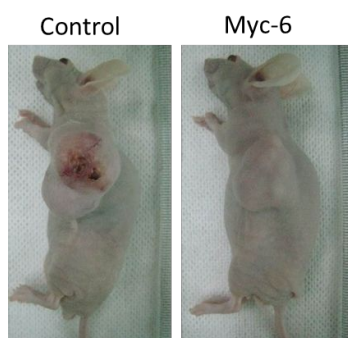
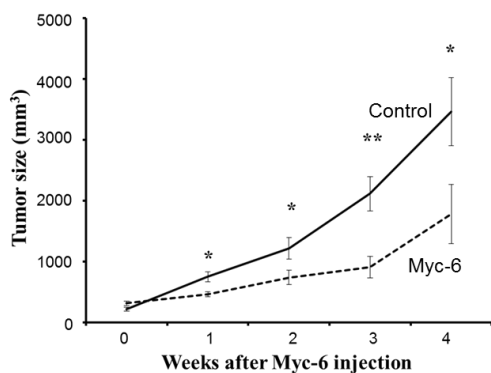


図 2. Myc-6 投与後の腫瘍サイズの変化と代表的な写真

以上の結果から、Myc-6 は *in vitro*, *in vivo* の両方において抗腫瘍効果を持つことが確認できた。

(4) さらに Myc-6 の詳細な作用機序を解明するために、Myc-6 ポリアミドにより発現が変化する遺伝子について DNA マイクロアレイを用いて網羅的に調べたところ、10 μ M の Myc-6 投与後有意な発現低下を示した 14 の遺伝子のうち、長鎖 non-coding RNA の一つ

である *MALAT1* 遺伝子上流 1000bp 以内に、E-box 類似配列があることが判った。Myc-6 がこの配列に特異的に結合することがゲルシフトアッセイにより確認され、また siRNA により MG63 における *MALAT1* の発現をノックダウンした結果、有意な増殖抑制効果が観察された(図 3)。この結果より *MALAT1* が Myc-6 の直接の標的の一つであり、Myc-6 による細胞増殖抑制に関与している可能性が強まった。

現在、Myc-6 と他の抗がん剤との併用プロトコルの確立、*MALAT1* の発現をより効果的に抑制するポリアミドの開発を目指して引き続き研究を行っている。

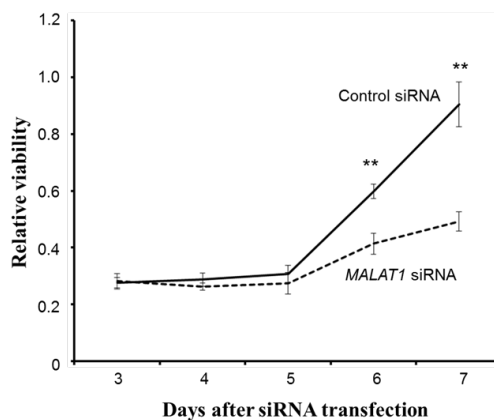


図 3. *MALAT1* ノックダウンによる細胞増殖能の変化 (Day 4 以降の観察では、培地交換と siRNA transfection を 1~2 回追加で行っている)

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 1 件)

Taniguchi M, Fujiwara K, Nakai Y, Ozaki T, Koshikawa N, Toshio K, Kataba M, Oguni A, Matsuda H, Yoshida Y, Tokuhashi Y, Fukuda N, Ueno T, Soma M, Nagase H. Inhibition of malignant phenotypes of human osteosarcoma cells by a gene silencer, a pyrrole-imidazole polyamide, which targets an E-box motif Original Research Article. FEBS Open Bio 2014 Apr 4

(4): 328-334 (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

1. 谷口真史、藤原恭子、永瀬浩喜、大幸俊三、吉田行弘、大幸英至、小島敏雄、徳橋泰明: ヒト骨肉腫における hTERT 遺伝子を標的とした遺伝子発現抑制薬ピロールイミダゾールポリアミドの開発. 第26回日本整形外科学会基礎学術集会, 群馬, 2011.10.20-21

2. Fujiwara K, Taniguchi M, Soma M and Nagase H: Development of a novel E-box binding PI polyamide inhibiting cell-proliferation. 第2回日中がん研究シンポジウム, 千葉, 2012.5.9-11

3. 藤原恭子: E-box 認識 PI ポリアミドによる抗腫瘍効果の検討. 第22回癌病態治療研究会, 東京, 2013.6.27-28

4. 藤原恭子、相馬正義、永瀬浩喜: 抗腫瘍効果を持つ E-box 認識ピロール・イミダゾール・ポリアミドの開発. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜, 2013.10.3-5

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

相馬 正義 (SOMA, Masayoshi)

日本大学・医学部・教授

研究者番号: 30246855

(2) 研究分担者

福田 昇 (FUKUDA, Noboru)

日本大学・総合科学研究科・教授

研究者番号: 40267050

(3) 研究分担者

上野 高浩 (UENO, Takahiro)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号: 40386008

(4) 研究分担者

藤原 恭子 (FUJIWARA, Kyoko)

日本大学・医学部・助教

研究者番号: 40595708

(5) 連携研究者

永瀬 浩喜 (NAGASE, Hiroki)

千葉県がんセンター・研究局・研究所長

研究者番号: 90322073