

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791675

研究課題名(和文)ピロール・イミダゾールポリアミドを用いた前立腺癌関連融合遺伝子発現抑制の検討

研究課題名(英文)Efficacy of novel pyrrole-imidazole (PI) polyamides targeting of TMPRSS2-ERG gene fusion for prostate cancer cells

研究代表者

大日方 大亮 (Obinata, Daisuke)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：20624886

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：前立腺癌の悪性化、増殖に影響を与えている前立腺癌特異的融合遺伝子TMPRSS2-ERGの発現を抑制する化合物を作製し検討した。遺伝子配列特異的に結合し、生体内での安定性が高いピロールイミダゾールポリアミドを用いた。アンドロゲン刺激や放射線照射などの遺伝子ストレスによってのみTMPRSS2-ERGが発現することが知られている前立腺癌細胞株LNCaPに対しアンドロゲン刺激と共に作製したポリアミドを投与したところ、有意に融合遺伝子の発現が抑制され、細胞増殖能、遊走能が抑制されていた。またアンドロゲンレセプターの活性に影響を与えている転写協調因子が結合する配列特異的ポリアミドの設計を行った。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel compounds, which controls a prostate specific fusion gene TMPRSS2-ERG. By using Synthetic pyrrole-imidazole (PI) polyamides, that recognize and attach to the minor groove of DNA with high affinity and specificity, we examined the effects of a TMPRSS2-ERG translocation break points-targeted PI polyamide on prostate cancer. Human prostate cancer cell line LNCaP which has TMPRSS2-ERG by DHT stimulation or genotoxic stress was used for analysis. Treatment of this polyamide showed the repression of chromosomal translocation and TMPRSS2-ERG expression in LNCaP. In addition, this polyamide decreased cell growth rate and cell migration. Moreover, we designed polyamides targeting for androgen receptor coregulator binding motif.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・泌尿器科学

キーワード：遺伝子 癌 発現制御 前立腺癌

### 1. 研究開始当初の背景

前立腺癌の発癌課程において染色体再配列によりアンドロゲン応答遺伝子 TMPRSS2 と癌原遺伝子 ETS family が融合し、細胞の癌化、または癌の悪性度およびアンドロゲン感受性が変化することが報告され、注目されている (Tomlins SA et al, Science, 2005)。これは、前立腺細胞において、AR が TMPRSS2 および ETS family 内にある AR 結合配列 (ARE) と結合する際に、遺伝子が ARE に隣接する共通の塩基配列で切断され、そこで互いに結合すること (遺伝子転座) により発生することが報告されている (Lin C et al, Cell 139:1047-1049, 2009)。AR はリガンド依存性核内受容体である。AR はリガンド (アンドロゲン) と結合後核内に移行し、AR 転写補助因子と協調しながら標的遺伝子のプロモーターおよびエンハンサー領域内の ARE に結合し、標的遺伝子の発現を調節する。AR 転写補助因子は GATA2, Oct1, FoxA1 があるが、この中で私は、Oct1 が AR の転写活性を増強させ、前立腺癌の予後に影響を与えることを報告した (Obinata D et al, Int J Cancer, 2011 in press)。つまり、Oct1 等の転写補助因子は AR の感受性/転写活性を増強させ、アンドロゲン除去療法下の低アンドロゲン状態においても、AR 依存性の癌原遺伝子を発現させる働きがあると推測される。

PI ポリアミドは芳香族アミノ酸 N-methylpyrrole および N-methylimidazole で構成される分子であり、多様な配列の DNA に配列特異的に結合することが報告されている (Cho J et al. PNAS, 1995)。Im/Py ペアは G・C を、Py/Py ペアは T・A および A・T を認識する。PI ポリアミドと DNA への結合は、DNA 結合蛋白と DNA の結合に相当する親和性を持ち、組み合わせ次第で、多様な配列の DNA に結合させることができる。この PI ポリアミドを各遺伝子のプロモーター領域の転写因子結合部位に結合させることで、遺伝子特異的な発現抑制が可能である。siRNA に比べ、安定性が優れ、分子標的治療薬として大きく期待される化合物であり、腫瘍で高発現している遺伝子を標的とした PI ポリアミドが抗腫瘍効果を持つ事が複数の細胞株にて確認されている (Wang, et al, Cancer Sci, 2010)。

### 2. 研究の目的

(1) 融合遺伝子発現に関わる上記の共通塩基配列に特異的に結合する PI ポリアミドを開発し、融合遺伝子生成の抑制を試みることで、前立腺癌における新規治療薬としての可能性について検討する。

(2) AR 転写協調因子結合配列特異的 PI ポリアミドを設計する。

### 3. 研究の方法

(1) 前立腺癌特異的融合遺伝子 TMPRSS2-ERG 発現に関わる ARE 近傍の共通塩基配列に結合する特異的 PI ポリアミドを作製し、同配列への結合能を Gel mobility shift assay にて検討した。

(2) ヒト前立腺癌細胞株 LNCaP (TMPRSS2 融合遺伝子を発現していないことで知られている) を作製した PI ポリアミドを投与した群とネガティブコントロール用に作製した PI ポリアミドを投与した群に分け、Dehydrotestosterone (DHT) を用いたアンドロゲン刺激を行い、それぞれの群で染色体の転座が起きる頻度を FISH にて解析し、融合遺伝子の発現は DNA に対しては PCR を、mRNA に対しては RT-qPCR を用いて検討した。

(3) LNCaP を用いて、作製した PI ポリアミドを投与した群とネガティブコントロール用に作製した PI ポリアミドを投与した群に分け、細胞増殖能、遊走能を MTS assay および Cell migration assay を用いて検討した。

(4) 設計した PI ポリアミドの生体における影響について、LNCaP を接種したヌードマウスに同ポリアミドを経静脈的投与し検討した。

(5) 配列解析ソフト TRANCEFAC を用いて、あるアンドロゲン応答遺伝子の転写調節領域内に存在する ARE 近傍にある AR 転写協調因子結合配列をいくつか抽出し、新たな PI ポリアミドを作製する。

### 4. 研究成果

(1) Gel mobility shift assay において、標的配列と、その配列を変異させた配列を用いて、結合能を評価した。コントロールと比較し、設計した PI ポリアミドは標的配列に有意に結合能を有することを確認した。また変異配列への結合は認められなかった。以上より設計した PI ポリアミドは配列特異的に標的配列に結合することが確認できた。

(2) DHT 刺激をした LNCaP が融合遺伝子 TMPRSS2-ERG を新規に発現することを、既報を参考に PCR を行い、その産物をアガロースゲルに泳動し、確認した。続いて、染色体転座の有無を調べるために TMPRSS2, ERG をそれぞれ標識した FISH 解析を行った。LNCaP 細胞に DHT 刺激ならびに、設計した PI ポリアミドの投与を行い、48 時間後に解析を行った結果、PI ポリアミドはコントロール群と比べ有意に染色体転座を抑制した。さらに、同様の方法で TMPRSS2-ERG 遺伝子の発現を検討したところ、コントロール群と比べ有意に減少

していた。PI ポリアミドを用いた融合遺伝子の抑制は国内外ともに初の試みであり、本成果は融合遺伝子を抑制させる新規薬剤の開発に向けて重要なデータと考えられた。

(3)TMPRSS2-ERG 融合遺伝子の標的遺伝子で、前立腺癌の悪性化に關与する ERG の発現について、RT-qPCR を用いて解析した。ERG の発現は設計したポリアミド投与群において有意に抑制されていた。続いて、LNCaP のアンドロゲン刺激下における細胞増殖能を検討したところ、有意に抑制されていた。Cell migration assay においても設計したPI ポリアミド投与群では有意に細胞遊走能を抑制していた。以上より、標的とする配列は前立腺癌の融合遺伝子発生に重要である事に加え、細胞増殖能および遊走能に影響を及ぼすことが認められ、同配列を標的とするポリアミドは前立腺癌細胞特有の融合遺伝子の発現を抑制させ、細胞増殖能および遊走能を抑制している事が考えられた。

(4)雄ヌードマウスの右腋窩に LNCaP を接種し、一定のサイズまで増大した事を確認後、週一回経静脈的に PI ポリアミドの投与を行い、腫瘍サイズを測定した。投与開始から 4 週間後に評価したところ、コントロールと比べ、有意に腫瘍サイズの縮小が得られた。また、PI ポリアミド投与によるヌードマウスの死亡は認められなかったことより安全性が高く、有効な薬剤であることが考えられた。上記結果より、設計したPI ポリアミドは前立腺癌の予防、治療に有用かつ安全で安定したマテリアルになり得る可能性が示唆された。

(5)AR 転写協調因子 Oct1 が結合する DNA 配列をいくつか候補を挙げ、PI ポリアミドを設計。そのうち、3 種類のポリアミドを作製し、ゲルシフトアッセイにて結合能を認めた。今後は設計したポリアミドが前立腺癌細胞に与える影響について LNCaP を用いて解析する予定である。

## 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)

[学会発表](計 7 件)

1. 大日方大亮, 藤原恭子, 伊藤亜希子, 村田保貴, 高山賢一, 浦野友彦, 福田昇, 相馬正義, 永瀬浩喜, 井上聡, 高橋悟: ピロール・イミダゾール (PI) ポリアミドを用いた前立腺癌に關連する融合遺伝子発現抑制の検討. 第 100 回日本泌尿器科学会総会, 横浜, 2012 年 4 月 21 日.

2. D. Obinata, K. Fujiwara, K. Takayama, T. Urano, H. Nagase, S. Inoue, S. Takahashi: TMPRSS2-ERG 融合遺伝子発現を標的としたピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドは前立腺癌細胞の増殖を抑制させる. 第 71 回日本癌学会学術総会, 札幌, 2012 年 09 月 19 日
3. Obinata D, Fujiwara K, Ito A, Murata Y, Takayama K, Urano T, Murata T, Fujimura T, Fukuda N, Soma M, Inoue S, Takahashi S.: Pyrrole-Imidazole (PI) polyamide targeting of TMPRSS2-ERG gene fusion effects prostate cancer cell migration and progression. 15<sup>th</sup> International congress on Hormonal Steroids and Hormones & Cancer. Kanazawa, November 16, 2012.
4. 伊藤亜希子, 大日方大亮, 藤原恭子, 村田保貴, 芦荻大作, 高山賢一, 浦野智彦, 福田昇, 永瀬浩喜, 相馬正義, 井上聡, 高橋悟: ピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドを用いた、前立腺癌新規遺伝子治療薬の検討. 第 101 回日本泌尿器科学会総会, 北海道, 2013 年 4 月 27 日
5. 大日方大亮, 藤原恭子, 伊藤亜希子, 村田保貴, 芦荻大作, 山口健哉, 高山賢一, 浦野友彦, 藤村哲也, 福田昇, 永瀬浩喜, 相馬正義, 井上聡, 高橋悟: ピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドを用いた、前立腺癌新規遺伝子治療薬の開発. 第 14 回ホルモンと癌研究会, 東京, 2013 年 7 月 12 日
6. 大日方大亮, 藤原恭子, 高山賢一, 浦野友彦, 永瀬浩喜, 相馬正義, 井上聡, 高橋悟: 前立腺癌特異的融合遺伝子 TMPRSS2-ERG の生成を抑制するピロール・イミダゾール(PI)ポリアミドの開発. 第 72 回日本癌学会学術総会, 東京, 2013 年 10 月 14 日
7. Daisuke Obinata, Kyoko Fujiwara, Kenichi Takayama, Tomohiko Urano, Hiroki Nagase, Noboru Fukuda, Masayoshi Soma, Satoshi Inoue, Satoru Takahashi: The efficacy of Pyrrole-imidazole (PI) polyamide targeted to TMPRSS2 and ERG gene fusion for prostate cancer. The 18th Korea-Japan Cancer Research Workshop, Gifu, 2013.11.30

〔産業財産権〕

出願状況（計 1 件）

名称：新規 P I ポリアミド

発明者：大日方大亮，高橋悟，福田昇，藤原  
恭子

権利者：日本大学

種類：特許

番号：特開 2013-234135

出願年月日：2012 年 5 月 8 日

国内外の別：国内

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

大日方 大亮 (OBINATA DAISUKE)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：2 0 6 2 4 8 8 6