

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 19 日現在

機関番号：82504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871150

研究課題名(和文) 変異がん原遺伝子ドライバー核酸配列を標的とした治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of anticancer drug specifically targeting oncogenic driver mutations

研究代表者

渡部 隆義 (Watanabe, Takayoshi)

千葉県がんセンター(研究所)・がん遺伝創薬研究室・研究員

研究者番号：60526060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：新規抗がん剤であるPIP-CBIを用い、様々な変異がん原遺伝子を標的とする薬剤の探索を行った。KRASのコードン12の変異配列を標的とする候補薬剤KR12を元に、KR12の誘導体 KR12- の新規合成を行い、その毒性試験を行った。また他の変異性ドライバーオンコジンを標的とする化合物の合成を行った。その結果、ALK、PIK3CA、MYCに対する変異遺伝子をそれぞれ有する細胞株に対する強い毒性を有する各種PIP-CBIの合成に成功し、その抗腫瘍効果が確認された。以上の結果から、本研究は変異がん原遺伝子ドライバー核酸配列を標的としたPIP-CBIの創薬開発に大きく寄与する結果となった。

研究成果の概要(英文)： We studied novel anticancer drug candidates using alkylating pyrrole imidazole polyamides (PIP) and CBI conjugates which target several mutant deliver oncogene mutations. Based on a candidate agent, KR12 targeting KRAS codon12 mutant DNA sequence, we synthesized a KR12- derivative of KR12 which also showed antitumor activities as seen in KR12. In addition, PIP-CBIs targeting variable mutant driver oncogenes other than KRAS were designed and synthesized. As a result, these PIP-CBIs have strong toxicity to cancer lines bearing target mutant mutations, such as ALK, PIK3CA and MYCN. In conclusion, resulting from the study for two years, great progress of PIP-CBI chemical synthesis has been made and discovered multiple drug candidates which target distinct mutant driver oncogene DNA mutations.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ピロール・イミダゾールポリアミド KRAS 変異型ドライバーオンコジーン

1. 研究開始当初の背景

KRAS 遺伝子のコドン 12 の変異は、化学療法抵抗性の転移を有する大腸癌患者や治療の困難なすい臓がんによくみられる。KRAS のコドン 13 のグリシンがアスパラギン酸に変異を有する(G13D)患者がモノクローナル抗体である cetuximab により有意な予後改善が得られるようになってきている中¹、KRAS 遺伝子のコドン 12 の変異は最も治療薬が必要とされるアンメットな標的がん原遺伝子変異と考えられる。そこでこのコドン 12 の遺伝子をコードする DNA 配列に特異的に結合しその発現を抑制することで新たな難治性の大腸がんやすい臓がんに対する抗がん剤が生み出されることが期待される。

一方、Pyrrole-Imidazole Polyamide(PIP)は天然に存在する抗生物質であるネトロプシンやDESTAMAYCINをモチーフにした人工小分子であり、2本鎖DNAのマイナーグループに配列特異的に結合し、遺伝子の発現を制御することが可能である。また、ベクターやデリバリー試薬なしに細胞の核に取り込まれ、細胞や生体内で安定であり、化合物末端を修飾して様々な小分子化合物との複合体の形成が可能なることから新規遺伝子制御薬、遺伝子転写調節機能研究試薬としての応用が期待されている²。

また、抗生物質デュオカルマイシンやCC-1065は、DNA塩基のアデニンのN3位でアルキル化を引き起こし強い抗がん活性を持つことが報告されているが副作用が強く、臨床応用に至って居ない³。そこでKRASのコドン12の変異配列を標的とするPIPに上記のアルキル化剤をモチーフとしたindole-seco-CBIを縮合することで⁴KRASコドン12の変異配列を持つがん細胞に対する候補薬剤KR12を設計し(図1)、その抗がん活性についての研究を行った。

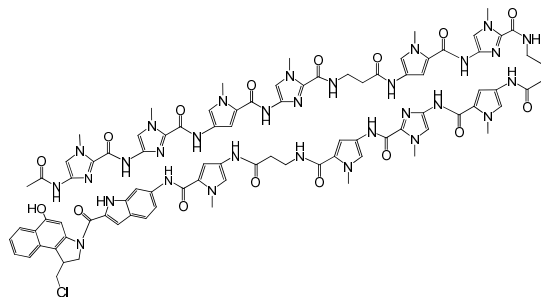


図1. KR12の化学構造式

合成したKR12の抗癌活性を検討するために、KRASのステータスが異なる種々の大腸癌細胞株にKR12を投与し、その生存率を測定した。その結果、右図のようにKRASコドン12の変異配列を持つ大腸がん細胞株SW480()、SW620()、及びLS180()では、IC50が50nM前後で得られたが、KRAS野生型のHT29、Caco-2、SW1463では変異株に比べて細胞増殖抑制効果が低く、変異株に対する選択性が確認された。

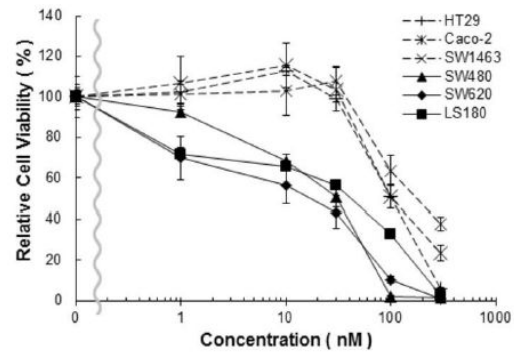


図2. KR12のin vitroにおける抗癌活性

更にIn vivoにおける腫瘍増殖抑制能について検討した。ヌードマウスにKRAS野生型であるHT29、KRAS変異株であるLS180及びSW480のXenograftモデルを作成し、KR12を投与したところ、野生型のHT29では腫瘍増殖抑制能は観測されなかった。しかし、変異株であるLS180及びSW480では劇的な腫瘍抑制能が観測された(図3)。

以上の結果から、KR12は変異性がん原遺伝子であるKRASのコドン12の変異に対する強力な抗癌活性を有することが示された¹。



図3. KR12のin vivoにおける抗癌活性

2. 研究の目的

本研究では上記の研究成果で得られた新規候補薬剤KR12の更なる改良を行い、ドライバーがん原遺伝子であるKRASのコドン12の変異遺伝子に対する特異的アルキル化剤を開発する。即ち、KR12のγターンにアミノアセチル基を導入し肝毒性を軽減させた化合物を合成しその抗癌作用を検討する。また大腸がん

以外のがん遺伝子ドライバー変異を標的とする PIP-CBI を合成し、同様の変異部位特異的なアルキル化を誘導できるかを検証する。

3. 研究の方法

(1) KR12 の合成法の改良

従来の活性化剤 HCTU を使用し PIP に対し 1.2 当量の CBI を加える合成法では収率 20% 以下と非常に収率が悪い。そこで KR12 を効率よく合成する為に試薬の比率を変えた新規の合成法の検討を行った。

(2) KR12- α の合成及び抗腫瘍活性

PIP のターン部位である γ -アミノ酪酸の位にアミノアセチル基を導入することでマウスに対する肝毒性が軽減することが報告されており⁵、KR12 に対してもこのアミノアセチル基を導入することで副作用が軽減されることを期待し、KR12- α の合成を行った。さらに合成した KR12- α の抗腫瘍活性を検討するため、KRAS コドン 12 の変異配列を持つ大腸がん細胞株 SW480 及び KRAS 野生型の HT29 細胞を用いて毒性試験を行った。

(3) ALK を標的とした PIP-CBI の合成及び抗腫瘍活性の検討

KR12 が変異ドライバーオンコジーン KRAS に対する抗腫瘍を示したことから、変異ドライバーオンコジーンである AKL を標的とした PIP-CBI の設計及び合成を行った。ALK 遺伝子は、肺癌の原因となる融合遺伝子を形成し、神経芽腫を活性化し、癌化を促進するドライバーオンコジーン遺伝子である。神経芽腫における ALK 遺伝子変異 F1174L(3522C>A) は、神経芽腫細胞 sk-N-SH, SMS-SAN, KELLY において認められているため、この変異 DNA 配列を認識する PIP-CBI である PIP-AKL(図 4) を合成し、その抗腫瘍活性を検討した。

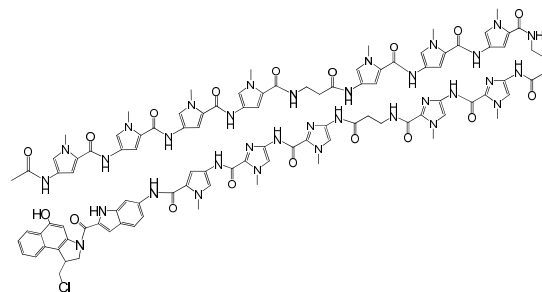


図 4. PIP-ALK の分子構造

(4) PIK3CA を標的とした PIP-CBI の合成及び抗腫瘍活性の検討

PIK3CA 遺伝子の E545K(1633G>A) 変異は、乳がん細胞株 MCF7 で認められているドライバーオンコジーンである。そこで、この変異配列を特異的に認識する PIP-CBI 化合物 PIP-PIK3CA を合成し(図 5)、その抗腫瘍活性を検討した。

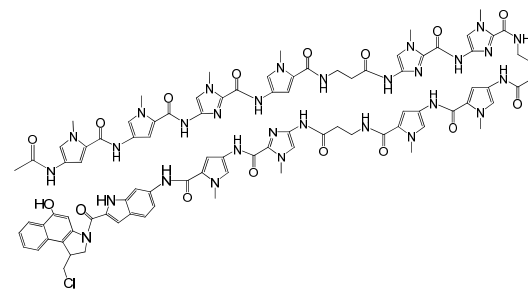


図 5. PIP-PIK3CA の分子構造

(5) MYCN を標的とした PIP-CBI の合成及び抗腫瘍活性の検討

癌細胞特異的な変異として、遺伝子配列の変化を伴わない、遺伝子の増幅がある。小児の神経芽腫などで増幅し、予後不良因子となる MYCN を標的とした PIP-MYCN を合成し(図 6) その抗腫瘍活性を検討した。

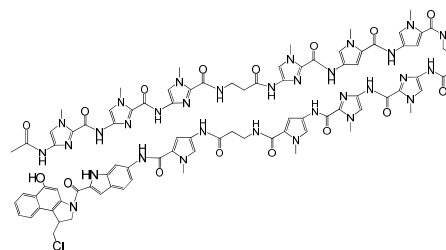


図 6. PIP-MYCN の分子構造

これら実験では一部の細胞や試薬は次世代がん研究シーズ戦略育成プログラムで購入した細胞及び試薬の一部を使用した。

4. 研究成果

(1) KR12 の合成法の改良

ペプチド合成機 PSSM-8 を用いて合成した PIP-COOH を 100 μ l の NMP に溶解し、HCTU の代わりに 5 倍量の PyBOP 及び 10 倍量 DIEA 0.77 μ l を加え 2 時間反応させた。2 時間後、HPLC 及び LCMS にて KR12-COOH が全て KR12-COO-HOBt の活性エステル体に変換されているを確認した後、Indole-*seco*-CBI を 5 当量加え一晩攪拌を続けた。反応後、目的化合物 KR12 を

HPLC 及び LCMS で精製及び同定を行い、エバポレーターにより濃縮、凍結乾燥により粉体として収率 47% で得られた。以上の結果から、PIP1 当量に対し CBI 及び PyBOP を 5 当量、DIEA を 10 当量加えることで KR12 の収率を大幅に向上させることに成功した。

(2) KR12- α の合成及び抗腫瘍活性

標的配列を持つ SW480 では KR12 の IC₅₀ = 57nM に対し、新たに合成した KR12- α では IC₅₀ = 15nM と KR12 よりも高い抗腫瘍活性を示した(図 7)。以上の結果から、KR12- α は KP12 と同等以上の抗腫瘍活性が期待出来るため、現在マウスを用いた in vivo での抗腫瘍活性を行っている。

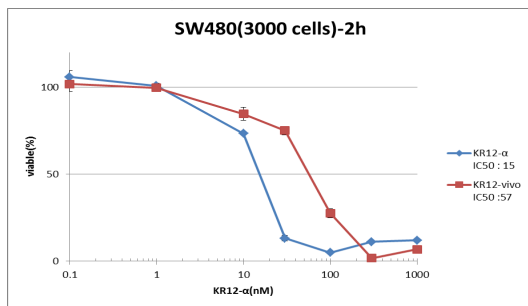


図 7. KR12- α の in vitro における抗腫瘍活性

(3) ALK を標的とした PIP-CBI の合成及び抗腫瘍活性の検討

PIP-ALK を投与すると、F1174L 変異を有する神経芽腫乳がん細胞で高い細胞増殖抑制効果を示した。この実験は医薬基盤で購入した細胞及び試薬の一部を使用した。Kelly 細胞株では IC₅₀ = 0.09 nM, SK-N-SH 細胞では IC₅₀ = 0.13 nM と極めて高い抗腫瘍活性を示したのに対し、野生型の神経芽腫である IMR32 細胞株では IC₅₀ = 0.46 nM, SK-N-AS 細胞株では IC₅₀ = 2.6 nM, F1174L 変異を有さない乳癌細胞 ALMDA-MB-231 細胞株の IC₅₀ = 7.5 nM であった(図 8)。以上のことから、PIP-ALK は、F1174L 変異を持つ癌細胞株に対して特異的に増殖抑制を示した。

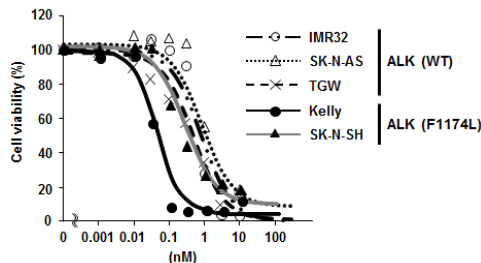


図 8. PIP-ALK の抗腫瘍活性

(4) PIK3CA を標的とした PIP-CBI の合成及び抗腫瘍活性の検討

PIK3CA 遺伝子の E545K(1633G>A)の変異は有する乳がん細胞株である MCF7 に対して、PIP-PIK3CA は IC₅₀ = 53.8nM であった。一方 PIK3CA 遺伝子が野生型である乳がん細胞株である MDA-MB-231 に対して、IC₅₀ が >100nM と顕著な差を示した(図 9)。以上の結果から、PIK3CA 遺伝子の E545K 変異癌細胞株に対して作成された、PIP-PIK3CA は腫瘍増殖抑制効果を示すことが明らかになった。

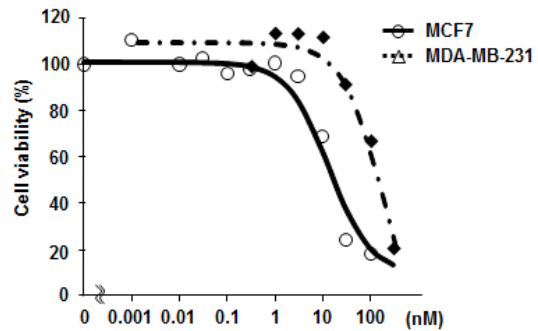


図 9. PIP-PIK3CA の抗腫瘍活性

(5) MYCN を標的とした PIP-CBI の合成及び抗腫瘍活性の検討

IMR32 細胞で IC₅₀ = 14.2 nM, TGW 細胞で 29.7 nM, MB69 細胞で 77.0 nM, MCF7 細胞で 958.9 nM, HT29 細胞で 159.3 nM, HDF 細胞で 116.2nM と特に MYCN 増幅を伴う神経芽腫細胞で増殖抑制が見られる結果であった。(図 10)

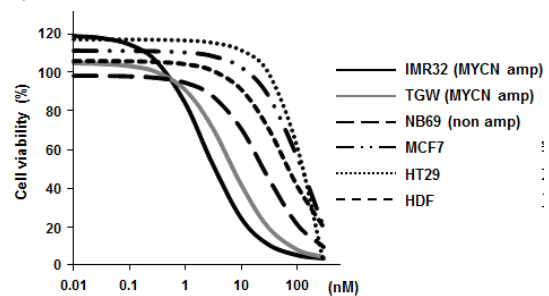


図 10. PIP-MYCN の抗腫瘍活性

以上の結果から、PIP-MYCN は MYCN 増幅を伴う神経芽腫細胞で特に高い抗腫瘍活性を示し、他の癌種や正常組織由来の細胞株では効果が低いことが明らかとなった。

上記の各研究により、本研究では、KR12 を元に肝毒性の低下が期待される誘導体 KR12-a の合成及びその抗腫瘍活性を確認した。さらに KRAS 以外の変異ドライバーオンコジーン ALK、PIK3CA、MYCN に対する PIP-CBI を新規に合成しその抗腫瘍活性を確認し、本研究課題は変異がん原遺伝子ドライ

パー核酸配列を標的とした PIP-CBI の創薬開発に大きく寄与する結果となった。

<引用文献>

M. Rokita, *et al.*, Overexpression of epidermal growth factor receptor as a prognostic factor in colorectal cancer on the basis of the Allred scoring system, *OncoTargets and Therapy* 6, 2013.

P. B. Dervan, Molecular recognition of DNA by small molecules, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9, 9, 2001

Dale L. Boger, *et al.*, An Efficient Synthesis of 1,2,9,9a-Tetrahydrodicyclopropa[c]-benz[e]indol-4-one (CBI): An Enhanced and Simplified Analog of the CC-1065 and Duocarmycin Alkylation Subunits, *The Journal of Organic Chemistry*, 60, 1271, 1995

K. Shinohara, *et al.*, Alkylation of template strand of coding region causes effective gene silencing, *Nucleic Acids Research*, 34, 4, 2006

Fei. Yang, *et al.*, Animal Toxicity of Hairpin Pyrrole-Imidazole Polyamides Varies with the Turn Unit, *Journal of Medicinal Chemistry*, 56, 7449, 2013

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Igarashi J, Fukuda N, Inoue T, Nakai S, Saito K, Fujiwara K, Matsuda H, Ueno T, Matsumoto Y, Watanabe T, Nagase H, Bando T, Sugiyama H, Itoh T, Soma M, Preclinical Study of Novel Gene Silencer Pyrrole-Imidazole Polyamide Targeting Human TGF- β 1 Promoter for Hypertrophic Scars in a Common Marmoset Primate Model. *PLoS One*, e0125295, 2015 査読有り

Hiraoka K, Inoue T, Taylor RD, Watanabe T, Koshikawa N, Yoda H, Shinohara K, Takatori A, Sugimoto H, Maru Y, Denda T, Fujiwara K, Balmain A, Ozaki T, Bando T, Sugiyama H, Nagase H, Inhibition of KRAS codon 12 mutants using a novel DNA-alkylating pyrrole- imidazole polyamide conjugate, *Nature Communication*, 6, 6706, 2015 査読有り

Mishra R, Watanabe T, Kimura MT, Koshikawa N, Ikeda M, Uekusa S, Kawashima H, Wang X, Igarashi J, Choudhury D, Grandori C, Kemp CJ, Ohira M, Verma NK, Kobayashi Y, Takeuchi J, Koshinaga T, Nemoto N, Fukuda N, Soma M, Kusafuka T, Fujiwara K, Nagase H, Identification of a novel E-box binding pyrrole- imidazole polyamide inhibiting MYC-driven cell proliferation. *Cancer Science*, 105, 421, 2014 査読有り

Obinata D, Ito A, Fujiwara K, Takayama K, Ashikari D, Murata Y, Yamaguchi K, Urano T, Fujimura T, Fukuda N, Soma M, Watanabe T, Nagase H, Inoue S, Takahashi S. Pyrrole-imidazole polyamide targeted to break fusion sites in TMPRSS2 and ERG gene fusion represses prostate tumor growth. *105, 1272*, 2014 査読有り

Tsunemi A, Ueno T, Fukuda N, Watanabe T, Tahira K, Haketa A, Hatanaka Y, Tanaka S, Matsumoto T, Matsumoto Y, Nagase H, Soma M. A novel gene regulator, pyrrole-imidazole polyamide targeting ABCA1 gene increases cholesterol efflux from macrophages and plasma HDL concentration. *J Mol Med*, 92, 509, 2014 査読有り

〔学会発表〕(計1件)

Takayoshi Watanabe, Nobuko Koshikawa, Toshinori Ozaki, Toshikazu Bando, Hiroshi Sugiyama, and Hiroki Nagase, Efficient Gene Silencing by PI Polyamide with β -crossed Formation Targeting MMP-9 Promoter. 第73回日本癌学会学術総会、平成26年9月25-27日、横浜

6 . 研究組織

(1)研究代表者

渡部隆義 (WATANABE, Takayoshi)
千葉県がんセンター(研究所)・がん遺伝創薬研究室・研究員
研究者番号: 60526060