

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10930

研究課題名(和文) PAX3-FOX01陽性横紋筋肉腫に対するアルキル化PIポリアミドの抗腫瘍効果

研究課題名(英文) Anti-tumor effect of alkylating pyrrole-imidazole polyamide targeting rhabdomyosarcoma specific fusion gene PAX3-FOX01

研究代表者

古屋 武史 (FURUYA, Takeshi)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：20568539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、配列特異的にDNAに結合する性質を持つピロール・イミダゾール・ポリアミド(PIP)を用いて、胞巣型横紋筋肉腫(ARMS)特異的融合遺伝子PAX3-FOX01を認識する薬剤の開発を試みた。解析の結果、融合遺伝子配列を認識するPIPにアルキル化剤クロラムブシル(ChB)を付加した化合物Rhab-ChB1が、培養腫瘍細胞に対して強い増殖抑制効果を持つ事を確認した。この作用は標的特異的ではなく、Rhab-ChB1は融合遺伝子陰性の細胞に対しても増殖抑制効果を示したが、ChB単体よりも100倍以上低い濃度で作用することから、新規のアルキル化剤として応用できる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Alveolar rhabdomyosarcoma (ARMS) is one of the typical subtypes of rhabdomyosarcoma (RMS), and is characterized by a frequent chromosomal translocation. This translocation results in the formation of fusion gene including PAX3-FOX01, which possess tumor promoting functions. In the present study, we have synthesized pyrrole-imidazole polyamides (PIP) recognizing PAX3-FOX01 fusion site and conjugated them with alkylating agent chlorambucil. That molecule (Rhab-ChB1) could specifically bind to DNA with PAX3-FOX01 fusion site sequence, but not to negative control DNA. Rhab-ChB1 showed strong growth suppressing effect, not only on fusion gene positive cells, but also on fusion gene negative cells. Flow cytometry analysis elucidated that the treatment with Rhab-ChB 1 provoked G2/M arrest. Since the effective concentration of Rhab-ChB1 was almost 100 times lower than that of ChB itself, Rhab-ChB1 may be developed as a new effective alkylating agent.

研究分野：医歯薬学

キーワード：医学 臨床外科学 小児腫瘍学 横紋筋肉腫 ピロール・イミダゾール・ポリアミド CBI

### 1. 研究開始当初の背景

横紋筋肉腫は未分化間葉系細胞より発生する悪性腫瘍で、軟部肉腫では最も頻度の高い疾患である。発生率は100万人あたり4.5人、年間90例の新規発症があり、小児悪性腫瘍全体の7位を占める。横紋筋肉腫はそのほとんどが小児例であり、全体の2/3が6歳以下とされるが、手術療法、放射線療法、化学療法などを組み合わせた集学的治療がなされているにも関わらず5年生存率は65~80%と他の小児悪性疾患に比べ劣る。

とくに胞巣型横紋筋肉腫 (Alveolar Rhabdomyosarcoma: ARMS) 中でも PAX3-FOXO1 [t(2;13)(q35;q14)] 融合遺伝子を有する症例は非常に予後不良である。転写因子 PAX3 の N 末端側と、同じく転写因子である FOXO1 の C 末端側が融合した PAX3-FOXO1 は ARMS の約 55% のケースで観察され、ARMS 全体の 5 年生存率が 50% であるのに対し、PAX3-FOXO1 陽性患者では 8% と低い<sup>1)</sup>。

融合遺伝子は転座、逆位、欠失などの染色体異常により、全く異なるゲノム領域が融合することで形成される。正常組織には存在せず、その転写産物が正常細胞の腫瘍性変化を促進する機能を持つことから、融合遺伝子は診断マーカーとしても治療標的として非常に有望である。

今日までに白血病や前立腺癌、ユーイング肉腫等、様々な腫瘍で融合遺伝子が同定され、EML4-ALK 融合遺伝子の非小細胞がんに対しては ALK 阻害剤が実用化されている。PAX3-FOXO1 配列を導入したマウスが ARMS を発症する<sup>2)</sup> ことから、同融合遺伝子は発癌のドライバー遺伝子と言え、ARMS の治療標的として非常に期待できるが、現時点でこれを標的とした治療法は開発されていない。

我々はこれまでに、配列特異的に DNA に結合する性質を持つピロール・イミダゾール・ポリアミド (PIP) を用いて腫瘍細胞特異的に発現している分子を標的とした薬剤の開発を行ってきた。PIP は高い親和性と特異性で二重らせん DNA 副溝に結合する性質を持ち、ピロールとイミダゾールの組み合わせ次第で、様々な配列の DNA を標的とすることができる。細胞内に容易に取り込まれ、siRNA よりも安定であることから、新規のゲノム制御薬として有望な分子である<sup>3)</sup>。また、PIP にアルキル化剤等の薬剤を結合させることで、標的遺伝子特異的に DNA 損傷を惹起することも技術的には可能であり、近年開発が進んでいる。

塩基配列特異的な結合能を持つ PIP にアルキル化剤を結合させることで、融合遺伝子陽性の腫瘍においては組織特異的に化学療法を行える可能性が高い。治療後の後遺症や生活の質が重視される小児疾患においては特に有用であると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、PAX3-FOXO1 の融合部を認識する PIP にアルキル化剤クロラムブシル (ChB) を付加した分子を合成し、その治療薬としての有効性の検討を行った。

具体的には、PAX3-FOXO1 融合遺伝子を有するヒト ARMS 細胞株 (SJCRH30, NRS-1) を解析対象とし、PAX3-FOXO1 結合部位を標的としたアルキル化 PIP を用いることでより高い抗腫瘍効果が得られるかということと、副作用の軽減が可能であるかについて検討を行った。さらに、その作用機序についても詳細な解析を試みた。

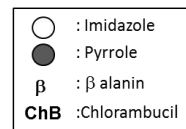
### 3. 研究の方法

#### (1) ChB 付加 PIP の合成

PAX3-FOXO1 の融合部を認識する PIP に ChB を結合させた Rhab-ChB1 分子を合成した (図 1A、B)。コントロールとして、ChB を付加していない PIP 配列のみの Rhab1 も合成した。

合成はペプチド合成器 PSSM8 を用いて行い、脱水縮重反応により ChB を付加した。HPLC による精製と質量分析機による確認の後、実験に使用した。

#### A



#### B

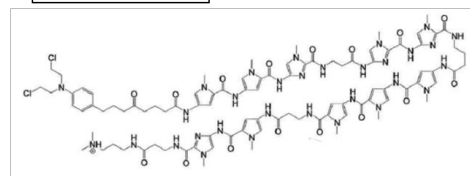


図 1. Rhab-ChB1 の設計

- A. PAX3-FOXO1 の融合領域を認識する ChB 付加 PIP (Rhab-ChB1) を設計した。  
 B. Rhab-ChB1 の化学構造。

#### (2) Rhab-ChB1 の標的 DNA 結合能の解析

PAX3-FOXO1 融合部の配列を含む 20 塩基の二本鎖 DNA および、ネガティブコントロールとして全く配列の異なる二本鎖 DNA に FITC ラベルを付加した分子を作成した。

これらの DNA と、Rhab-ChB1 または Rhab1 を 37 °C で 1 時間インキュベートした後、20% のポリアクリルアミド 1xTAE ゲル中で電気泳動時を行い、LAS4000 を用いてバンドの位置を確認し、移動度の違いを解析した。

### (3) 細胞生存率の検討

細胞株は *PAX3-FOXO1* 陽性細胞として ARMS 細胞株の CRL2061 および NRS-1、陰性細胞として胎児型横紋筋肉腫細胞株の RMS-YM および大細胞肺癌細胞株 NCI H460 の 4 種類を用いた。

細胞を 1000 細胞/well の密度で 96 well plate に播種し、24 時間後に Rhab-ChB1、Rhab1 または ChB のみを 0.001  $\mu\text{M}$  ~ 1  $\mu\text{M}$  の範囲で投与した。NRS-1 以外の細胞株については6または7日目の時点で WST8 assay を行い、細胞生存率を解析した。

NRS-1 については薬剤投与後 14 日目の時点で細胞数の計数を行った。

### (4) 細胞周期の解析

CRL2061 細胞を  $8 \times 10^4$  細胞/well の密度で 6 well plate に播種し、24 時間後に 1  $\mu\text{M}$  の Rhab-ChB1、Rhab1 または ChB を投与した。その後 12、24、48 時間目に細胞を回収し、エタノール中 4 で 12 時間以上固定した。その後、Propidium Iodide を用いて核内 DNA を染色し、フローサイトメーターにて細胞周期の分布を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) Rhab-ChB1 と標的 DNA 結合能の解析

ゲルシフトアッセイの結果、Rhab-ChB1 もしくは Rhab1 とともに泳動した *PAX3-FOXO1* 融合部配列 DNA は、コントロールと比較して明らかな泳動度の遅れを示し、両 PIP が標的 DNA に対して結合することが判った。一方、*PAX3-FOXO1* 融合部の配列を含まない DNA に対しては、どちらの PIP も結合能を示さなかった(図 2)。

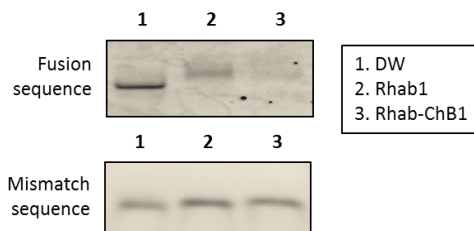


図 2. Rhab-ChB1 の標的結合能の解析

Rhab-ChB1 の標的配列特異的な DNA 結合能をゲルシフトアッセイにより確認した。

### (2) Rhab-ChB1 投与後の細胞生存率の変化

Rhab-ChB1 投与後の細胞生存率を解析したところ、いずれの細胞においても、0.01  $\mu\text{M}$  以上の投与で顕著な生存率の低下を認めた。

一方、ChB の付加されていない Rhab1 および、ChB 単体の投与では生存率の変化は確認できなかった。なお、この結果は *PAX3-FOXO1* 陽性細胞 (図 3A)、陰性細胞 (図 3B) のどちらにおいても観察され、融合遺伝子特異的な効果ではなかった。

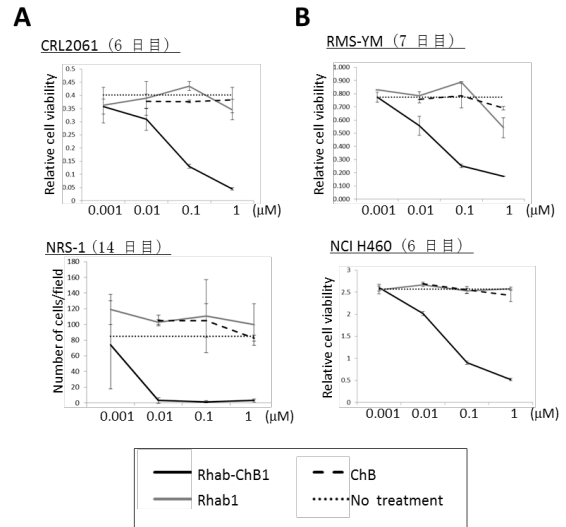


図 3. Rhab-ChB1 投与後の細胞生存率の解析

細胞に 0.001mM ~ 1mM の濃度の Rhab-ChB1、Rhab1、ChB を投与し、6~14 日目のいずれかの時点での生存率の検討を行った。*PAX3-FOXO1* 融合遺伝子陽性細胞 (A) および陰性細胞 (B) いずれにおいても、Rhab-ChB1 は 0.01mM 以上の濃度で顕著な生存率の抑制効果を示した。

### (3) Rhab-ChB1 の細胞障害性の機序の検討

Rhab-ChB1 投与による細胞生存率の低下が細胞死の誘導によるものか、あるいは増殖抑制によるものかを確認するために、フローサイトメーターにて細胞周期の分布を調べた。

CRL2061 細胞に 1  $\mu\text{M}$  の Rhab-ChB1、Rhab1、ChB のいずれかを添加し、12 時間 ~ 48 時間

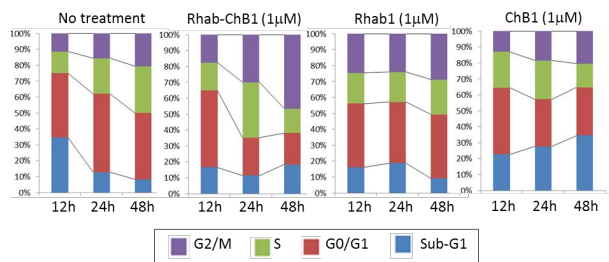


図 4. Rhab-ChB1 投与後の細胞周期の検討

CRL2061 細胞に 1mM の Rhab-ChB1、Rhab1、ChB を投与し、12、24、48 時間目の時点での細胞周期の状態をフローサイトメーターにて解析した。Rhab-ChB1 投与細胞においては、死細胞画分 (sub-G1) の上昇は見られなかったが、G2/M 期の細胞の比率が顕著に上昇していた。

培養後解析を行ったところ、Rhab-ChB1 投与細胞では、G2/M 期の細胞の割合が増えていることが判った。

一方、死細胞画分である sub-G1 の割合には変化がみられなかった (図 4)。

ChB 単体を投与した場合は、時間とともに sub-G1 が増える傾向にあったが、G2/M 期の細胞の増加は Rhab-ChB1 投与細胞ほど顕著ではなかった。また、ChB を付加していない Rhab1 投与細胞においては sub-G1, G2/M とともに時間ごとの変化は観察されなかった、

#### (4) 考察

本研究では合成した Rhab-ChB1 が PAX3-FOXO1 融合部の DNA 配列に特異的に結合できることを確認した。また、培養細胞に投与した場合、Rhab-ChB1 は 0.01  $\mu$ M 以上の濃度で細胞の生存率を顕著に低下させること、またそれは G2/M アレストの誘導によるものであることが判った。

しかしながら、Rhab-ChB1 による細胞の増殖抑制効果は PAX3-FOXO1 融合遺伝子の有無にかかわらず、調べた全ての細胞に対して観察され、非特異的な現象であった。

今後、認識 DNA 配列をずらした PIP を設計するなどして、特異的な PAX3-FOXO1 の再合成を試みる必要がある。また本研究期間中には合成に成功しなかったが、PIP と結合させた際に、より高い標的特異性を示す別のアルキル化剤 CBI についても、引き続き検討を行いたい。

なお、Rhab-ChB1 は ChB 単体と比べて少なくとも 100 倍以上低い濃度で細胞障害性を発揮したことから、配列特異性は無いものの、従来の ChB よりも効果の高いアルキル化剤として利用できる可能性が示唆された。今後、治療薬として開発可能であるか、更なる検討を行っていく計画である。

#### <引用文献>

Sorensen PH, Lynch JC, Qualman SJ, Tirabosco R, Lim JF, Maurer HM, Bridge JA, Crist WM, Triche TJ, Barr FG. PAX3-FKHR and PAX7-FKHR gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyo- sarcoma: a report from the children's oncology group. J Clin Oncol. 2002; 20(11):2672-2679.

Keller C, Capecchi MR. New genetic tactics to model alveolar rhabdomyosarcoma in the mouse. Cancer Research 2005; 65(17): 7530-7532.

Dervan PB. Molecular recognition of DNA by small molecules. Bioorg Med Chem. 2001; 9(9):2215-2235.

#### 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)

藤原恭子、渡邊揚介、石塚悦昭、平野隆幸、長崎(前岡)瑛里、越永従道、福田昇、相馬正義、腫瘍特異的融合遺伝子を標的としたピロール・イミダゾール・ポリアミド (PIP) の開発、日本大学医学部総合医学研究所紀要、査読無、5 巻、2017、25-28

[http://www.med.nihon-u.ac.jp/research\\_institute/bulletin/2017/index.html](http://www.med.nihon-u.ac.jp/research_institute/bulletin/2017/index.html)

[学会発表](計 2 件)

Fujiwara K, Watanabe Y, Soma M, Nagase H. Development of pyrrole-imidazole polyamide targeting rhabdomyosarcoma specific fusion gene. Nihon University Interfaculty Symposium, Tokyo, 2017.2

渡邊揚介、杉藤公信、平野隆幸、石塚悦昭、星玲奈、吉澤信輔、植草省太、川島弘之、金田英秀、古屋武史、越永従道、藤原恭子、ヒト胞型横紋筋肉腫における PAX3-FOXO1 を標的としたアルキル化 Pyrrole-Imidazole polyamide の抗腫瘍効果の検討、第 116 回日本外科学会定期学術集会、大阪、2016

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

特になし。

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

古屋 武史 (FURUYA, Takeshi)  
日本大学・医学部・助教  
研究者番号：20568539

##### (2) 研究分担者

杉藤 公信 (SUGITO, Kiminobu)  
日本大学・医学部・研究医員  
研究者番号：10328750

植草 省太 (UEKUSA, Shota)  
日本大学・医学部・助手  
研究者番号：70746338

越永 従道 (KOSHINAGA, Tsugumichi)  
日本大学・医学部・教授  
研究者番号：70205376

藤原 恭子 (FUJIWARA, Kyoko)  
日本大学・医学部・助教  
研究者番号：40595708