

平成22年 6月 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17016033

研究課題名（和文） DNA 配列に基づくテーラーメイド抗癌剤

研究課題名（英文） Tailor-made Antitumor Agents based on DNA Sequence

研究代表者

杉山 弘 (SUGIYAMA HIROSHI)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：50183843

研究成果の概要（和文）：

特異的な遺伝子制御法は、がん治療分野において有望な試みである。N-メチルピロール(Py)-N-メチルイミダゾール(Im)ポリアミドはDNAマイナーグループに特異的に結合する小分子であり、我々は、標的塩基配列と選択的に反応する様々なアルキル化能を持ったポリアミドの設計と合成を進めた。その結果として、配列特異的アルキル化反応による遺伝子制御効果やヒト培養癌細胞における強い細胞増殖阻害活性を確認した。

研究成果の概要（英文）：

Direct regulation of the expression level of a specific gene will provide a promising approach for cancer therapy. N-Methylpyrrole (Py) and N-methylimidazole (Im) polyamides are a new type of small molecules that precisely bind to the minor groove of the DNA duplex in a sequence-specific fashion. We designed and synthesized a series of sequence-specific alkylating Py-Im polyamide conjugates that selectively alkylate target DNA sequences. We have demonstrated that sequence-specific alkylating agents possess gene-silencing activities and a promising potency against human cancer cell lines.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
17年度	9,500,000	0	9,500,000
18年度	9,800,000	0	9,800,000
19年度	9,800,000	0	9,800,000
20年度	8,900,000	0	8,900,000
21年度	8,900,000	0	8,900,000
総計	46,900,000	0	46,900,000

研究分野：領域5 基盤研究に基づく体系的がん治療

科研費の分科・細目：A01 がん化機構を基盤とした分子創薬と分子標的治療・630 計画班

キーワード：Py-Im ポリアミド，テーラーメイド抗がん剤，塩基配列認識，配列特異的アルキル化，遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

がんや遺伝病、老化などの克服のため一番必要とされる新技術は、細胞内に存在する遺伝子の発現を阻害・制御する方法論であり、がんやエイズや遺伝病などの難病治療はもちろんのこと、糖尿病や動脈硬化などの生活

習慣病の治療を目指した遺伝子治療薬の開発が当時盛んに研究されていた。

米国では、これらに関連するバイオベンチャー企業がすでに多数出現していたが、日本国内ではまだその数は少なかった。

2. 研究の目的

本研究は、第一としてこれまでの「がん」の分子生物学的研究から解明された重要な遺伝子配列、例えば、TGF- β などのプロモーター領域を配列選択的にアルキル化することにより、特定遺伝子発現の阻害や制御を試みることである。

第二に、優れた塩基配列特異的アルキル化能を有するピロール(Py)-イミダゾール(Im)ポリアミドを用いて各種がん細胞に対する抗細胞増殖活性と配列特異性の相関を検討する。

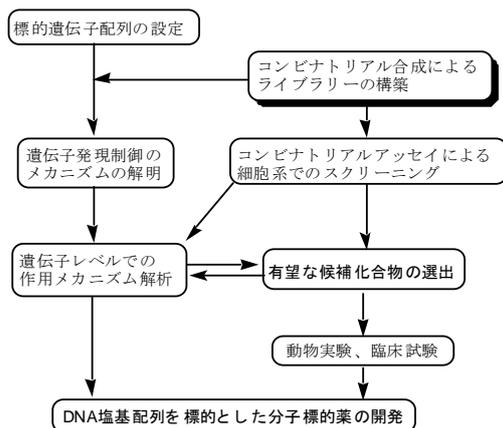
第三に、コンビナトリアルケミストリーの手法を用いて、可能な組み合わせの塩基配列を全て認識できるアルキル化Py-Imポリアミドのプールを一挙に合成し、その中から遺伝子発現や細胞周期の調節を可能にする新しいタイプの抗癌剤を抽出する。

これらの知見を統合することにより、標的となりうる重要遺伝子を決定し、各種がん細胞特有のDNA中の特定配列を分子標的とする、副作用を低減したテーラーメイドの抗癌剤の開発を目的とする。

3. 研究の方法

全年度を通しての達成すべき研究目標として大きく以下の3つを設定した。

- (1) がんの分子生物学的な知見に基づいた標的遺伝子配列の設定とその特異的結合分子の合成。
- (2) コンビナトリアルな固相合成法による効率的な供給法の確立。
- (3) 抗癌剤等の医薬品として有望な候補化合物の選出。



実際に、標的とする遺伝子配列を設定し、配列認識能を有するピロール(Py)-イミダゾール(Im)ポリアミド分子の機能評価(研究代表者)と合成(研究分担者)を行った。

特に、遺伝子発現制御におけるメカニズムをDNAシーケンサー、RT-PCR等を用いて解析することで、がん細胞の細胞増殖阻

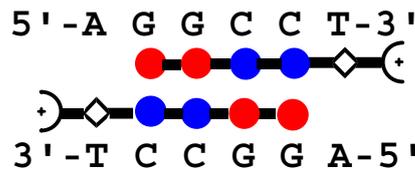
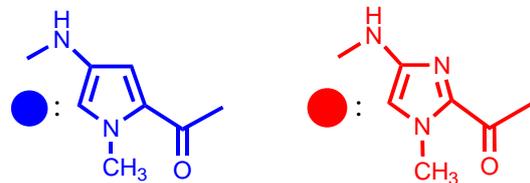
害能や正常遺伝子に対する効果を詳細に調べた。

加えて、様々な特定遺伝子配列を標的とするPy-Imポリアミドを合成し、試験管内蛋白合成系に加え、遺伝子発現の制御能を評価した。同時に、それを培養細胞にも投与し、標的とした遺伝子の発現が抑えられるかについて、RT-PCRを用いて解析を進めた。

4. 研究成果

本研究において、我々はDNA塩基配列特異的アルキル化能を有するピロール(Py)-イミダゾール(Im)ポリアミドを活用した癌細胞特異的な抗癌剤の開発を目指した。

Py-Imポリアミドの研究の進展により得られた化学的、生物学的成果を論文にまとめている。以下に主な研究成果を列記する。



二本鎖DNA構造に対して
塩基認識可能な人工機能分子

(1) Py-Imポリアミドの標的配列特異性

Py-Imポリアミドは、分子内のPyとImの配置によって任意に塩基配列特異性を付与することが可能であり、細胞内生理条件下での高い安定性、良好な細胞・核膜透過性が確認された。また、ペプチド固相合成機を活用する効率的なPy-ImポリアミドのFmoc固相合成法を確立することに成功した。

機能分子設計の検討と機能評価を進めた結果、最大9塩基対配列に対する効率的なアルキル化Py-Imポリアミドの設計と機能評価に成功した。また、bcr-abl転座配列、Aurora kinaseプロモーター配列や、ヒテロメア配列、CAG繰返配列などを標的配列として認識するPy-Imポリアミドの設計・合成にも成功し、それらの生物化学的機能評価により得ら

れた多くの研究成果を報告した。

(2) ヒト培養がん細胞系に対する影響

アルキル化 Py-Im ポリアミドを用いて、配列認識能の違いによる遺伝子発現の抑制と細胞増殖阻害活性に変化が現れることを確認した。実際に、ヒトがん細胞スクリーニングパネル評価を進めて、様々な異なる配列特異性をもつアルキル化ポリアミド間に、配列特異性の差異に由来する細胞増殖阻害活性の差を観察することができた。

(3) 特定遺伝子発現制御に関する評価

Py-Im ポリアミドの様々な培養がん細胞に対する遺伝子発現に対する効果を RT-PCR によって解析し、塩基配列認識能の違いによる遺伝子発現の抑制と活性化に変化が現れることを確認した。特に、TGF- β や p16 のプロモーター配列近傍を標的配列として認識する Py-Im ポリアミドの生物化学的機能評価により得られた研究成果を報告した。

(4) ラットを用いた動物実験評価

TGF- β 遺伝子を標的とした Py-Im ポリアミドを腎疾患型ラットに用いて、生体中の TGF- β 遺伝子発現に与える抑制効果と腎疾患に対する治療効果の相関性の評価を進めた。その結果を論文として報告した。

本研究の進展により、アデニン N3 位特異的アルキル化能や HDAC 阻害活性を有する Py-Im ポリアミドを、マウスに対する実験に向けて合成供給することが可能になった。同時に、bcr-abl 転座配列などの特定 DNA 塩基配列を標的とする効率的な Py-Im ポリアミドの様々な誘導体化や分子設計の改良を進めている。本研究からの更なる発展を目指して、機能性 Py-Im ポリアミドによる癌関連遺伝子の制御技術を確認することにより、目的のヒト癌細胞特異的に作用する薬剤としての可能性を追求している。

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 23 件) (全て英文査読有)

- 1) Synthetic Pyrrole-Imidazole Polyamide Inhibits Expression of the Human Transforming Growth Factor- β 1 Gene. Lai, Y.-M.; Fukuda, N.; Ueno, T.; Kishioka, H.; Matsuda, H.; Saito, S.; Matsumoto, K.; Ayame, H.; Bando, T.; Sugiyama, H.; Mugishima, H.; Kim, S.-J. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2005**, *315*, 571-575.
- 2) Specific Adenine Alkylation by Pyrrole-Imidazole CBI Conjugates. Bando, T.; Narita, A.; Sasaki, S.;

Sugiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 13890-13895.

- 3) Development of Gene Silencing Pyrrole-Imidazole Polyamide Targeting the TGF- β 1 Promoter for Treatment of Progressive Renal Diseases. Matsuda, H.; Fukuda, N.; Ueno, T.; Tahira, Y.; Ayame, H.; Zhang, W.; Bando, T.; Sugiyama, H.; Saito, S.; Matsumoto, K.; Mugishima, H.; Serie, K. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2006**, *17*, 422-432.
- 4) Antitumor Activity of Sequence-Specific Alkylating Agents: Pyrrole-Imidazole CBI Conjugates with Indole Linker. Shinohara, K.; Bando, T.; Sasaki, S.; Sakakibara, Y.; Minoshima, M.; Sugiyama, H. *Cancer Science.* **2006**, *97*, 219-225.
- 5) Efficient DNA Alkylation by a Pyrrole-Imidazole CBI Conjugate with an Indole Linker: Sequence Specific Alkylation with Nine-Base-Pair Recognition. Bando, T.; Sasaki, S.; Minoshima, M.; Dohno, C.; Shinohara, K.; Narita, A.; Sugiyama, H. *Bioconjugate Chem.* **2006**, *17*, 715-720.
- 6) Alkylation of Template Strand of Coding Region Causes Effective Gene Silencing. Shinohara, K.; Sasaki, S.; Minoshima, M.; Bando, T.; Sugiyama, H. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 1189-1195.
- 7) Discrimination of Hairpin Polyamides with an α -Substituted- γ -Aminobutyric Acid as a 5'-TG-3' Reader in DNA Minor Groove. Zhang, W.; Bando, T.; Sugiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 8766-8776.
- 8) Synthesis and Biological Properties of Sequence-Specific DNA-Alkylating Pyrrole-Imidazole Polyamides. Bando, T.; Sugiyama, H. *Acc. Chem. Res.* **2006**, *39*, 935-944.
- 9) Sequence-Specific Alkylation of Double-Strand Human Telomere Repeat Sequence by Pyrrole-Imidazole Polyamides with Indole Linkers. Sasaki, S.; Bando, T.; Minoshima, M.; Shimizu, T.; Shinohara, K.; Takaoka, T.; Sugiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 12162-12168.
- 10) DNA Alkylation by Pyrrole-Imidazole *seco*-CBI Conjugates with an Indole Linker: Sequence-Specific DNA Alkylation with Ten-Base-Pair Recognition through Hetelodimer Formation. Minoshima, M.; Bando, T.; Sasaki, S.; Shinohara, K.; Shimizu, T.; Fujimoto, J.; Sugiyama, H. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 5384-5390.
- 11) Detection of CAG Repeat DNA Sequences by Pyrene-Functionalized Pyrrole-Imidazole Polyamides.

Bando, T.; Fujimoto, J.; Minoshima, M.; Shinohara, K.; Sasaki, S.; Kashiwazaki, G.; Mizumura, M.; Sugiyama, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6937-6942.

12) Sequence-Specific Alkylation by Y-shaped and Tandem Hairpin Pyrrole-Imidazole Polyamides. Sasaki, S.; Bando, T.; Minoshima, M.; Shinohara, K.; Sugiyama, H. *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 864-870.

13) Requirement of β -Alanine Components in Sequence-Specific DNA Alkylation by Pyrrole-Imidazole Conjugates with Seven-Base Pair Recognition. Bando, T.; Minoshima, M.; Kashiwazaki, G.; Shinohara, K.; Sasaki, S.; Fujimoto, J.; Ohtsuki, A.; Murakami, M.; Nakazono, S.; Sugiyama, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 2286-2291.

14) Pyrrole-Imidazole Hairpin Polyamides with High Affinity at 5'-CGCG-3' DNA Sequence; Influence of Cytosine Methylation on Binding. Minoshima, M.; Bando, T.; Sasaki, S.; Fujimoto, J.; Sugiyama, H. *Nucleic Acids. Res.* **2008**, *36*, 2889-2894.

15) Detection of Triplet Repeat Sequences in the Double-Stranded DNA using Pyrene-Functionalized Pyrrole-Imidazole Polyamides with Rigid Linkers. Fujimoto, J.; Bando, T.; Uchida, S.; Iwasaki, M.; Shinohara, K.; Sugiyama, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 5899-5907.

16) A Novel Gene Silencer Pyrrole-Imidazole Polyamide Targeting LOX-1 Attenuates Restenosis of the Artery after Injury. Yao, E-H.; Fukuda, N.; Ueno, T.; Matsuda, M.; Matsumoto, M.; Nagase, H.; Matsumoto, Y.; Takasaka, A.; Serie, K.; Sugiyama, H.; Sawamura, T. *Hypertension* **2008**, *52*, 86-92.

17) Development of Pyrrole-Imidazole Polyamide for Specific Regulation of Human Aurora Kinase A and B Gene Expression. Takahashi, T.; Asami, Y.; Kitamura, E.; Suzuki, T.; Wang, X.; Igarashi, J.; Morohashi, A.; Shinjima, Y.; Kanou, H.; Saito, K.; Takasu, T.; Nagase, H.; Harada, Y.; Kuroda, K.; Watanabe, T.; Kumamoto, S.; Aoyama, T.; Matsumoto, Y.; Bando, T.; Sugiyama, H.; Yoshida-Noro, C.; Fukuda, N.; Hayashi N. *Chem. Biol.* **2008**, *15*, 829-841.

18) Perylene-Conjugated Pyrrole Polyamide as a Sequence-Specific Fluorescent Probe. Fujimoto, J.; Bando, T.; Minoshima, M.; Kashiwazaki, G.; Nishijima, S.; Shinohara, K.; Sugiyama, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 9741-9744.

19) Cooperative Alkylation of Double-strand Human

Telomere Repeat Sequences by PI Polyamides with 11-Base-pair Recognition Based on a Heterotrimeric Design. Kashiwazaki, G.; Bando, T.; Shinohara, K.; Minoshima, M.; Nishijima, S.; Sugiyama, H. *Bioorg. Med. Chem.* **2009**, *17*, 1393-1397.

20) A Novel Gene Silence, Pyrrole-Imidazole Polyamide Targeting Human Lectin-like Oxidized Low-density Lipoprotein Receptor-1 Gene Improves Endothelial Cell Function. Ueno, T.; Fukuda, N.; Tsunemi, A.; Yao, E. H.; Matsuda, H.; Tahira, K.; Matsumoto, T.; Matsumoto, Y.; Nagase, H.; Sugiyama, H.; Sawamura, T. *J. Hypertens.* **2009**, *27*, 508-516.

21) Determination of Pyrrole-Imidazole Polyamide in Rat Plasma by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Nagashima, T.; Aoyama, T.; Fukasawa, A.; Watabe, S.; Fukuda, N.; Ueno, T.; Sugiyama, H.; Nagase, H.; Matsumoto, Y. *J. Chromatogr. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **2009**, *877*, 1070-1076.

22) Development of a Molecule-Recognized Promoter DNA Sequence for Inhibition of HER2 Expression. Suzuki, T.; Asami, Y.; Takahashi, T.; Wang, X.; Watanabe, T.; Bando, T.; Sugiyama, H.; Fukuda, N.; Nagase, H. *J. Antibiot.* **2009**, *62*, 339-341.

23) Synthesis and Properties of PI Polyamide-SAHA Conjugate. Ohtsuki, A.; Kimura, M. T.; Minoshima, M.; Suzuki, T.; Ikeda, M.; Bando, T.; Nagase, H.; Shinohara, K.; Sugiyama, H. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 7288-7292.

[学会発表] (計 17 件)

1) 杉山 弘, DNAを中心としたケミカルバイオロジー, 第3回ケモゲノミクス研究会, 京都, 2005年5月

2) H.Sugiyama, "A Sequence-Specific DNA Alkylating Polyamide, Toward a Tailor-Made Antitumor Agent" Albany 2005: Conversation 14, Albany, USA, June, 2005.

3) H.Sugiyama, Selective Gene Silencing by Alkylating Pyrrole-Imidazole Polyamide" KEYSTONE SYMPOSIA, Taos, New Mexico, USA, April, 2006

4) 板東 俊和, 杉山 弘, DNA配列を標的とするアルキル化ピロール-イミダゾールポリアミドの開発, 第10回がん分子標的治療研究会総会, 東京, 2006年6月

5) 杉山 弘, DNAの塩基配列と構造を読む分子, 平成18年度科学交流フォーラムー医学を支

える生命科学の最前線一，静岡，2007年1月

- 6) 杉山 弘，DNAを分子標的とした薬剤の設計，日本薬学会北陸支部平成19年度特別講演会，金沢，2007年7月
- 7) H.Sugiyama，“Chemistry that Controls DNA Structure and Function” East China University of Science and Technology, Shanghai, China, August, 2007
- 8) H.Sugiyama，“Chemical biology that controls DNA structure and function”，The 5th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Tokyo, November, 2007
- 9) 板東 俊和，杉山 弘，特定DNA塩基配列を標的とする機能性ポリアミドの開発、薬学会第128年会、横浜、2008年3月
- 10) H. Sugiyama，“Chemical biology that controls DNA structure and function”，International Symposium on Molecular Recognition of DNA: Biological Applications, Tokyo, September, 2008
- 11) H. Sugiyama，“Pyrrole-Imidazole Polyamide as a Genetic Switch”，Chemical Biology 2008, Heidelberg, Germany, October, 2008
- 12) H. Sugiyama，“Chemical Biology that Controls DNA Structure and Function”，10th KAIST-KYOTO Chemistry Symposium, Daejeon, Korea, December, 2008
- 13) H. Sugiyama，“Synthesis and Biological Properties of Sequence-Specific DNA-alkylating Pyrrole-Imidazole Polyamides”，The Next Generation Japanese Technology Showcase, New York, USA, January, 2009
- 14) 杉山 弘，遺伝子発現を制御するPIポリアミド，「生体調節のケミカルバイオロジー」シンポジウム，前橋市，2009年3月
- 15) 板東 俊和，杉山 弘，塩基配列特異的アルキル化能を有する機能性PIポリアミド設計，第28回メディシナルケミストリーシンポジウム，東京，2009年11月
- 16) H.Sugiyama “Design and Construction of DNA Nanostructures for Integration of Molecules”，International Symposium Watching Biomolecules in Action : Single Molecule Biology Symposium, Osaka, December, 2009
- 17) 杉山 弘，人工遺伝子スイッチによる細胞

制御，日本化学会第90春季年会，大阪，2010年3月

〔図書〕（計2件）

- 1) R.F. Weaver 著，杉山 弘・井上 丹・森井 孝 監訳，化学同人，ウィーバー分子生物学 第4版，2008，1022.
- 2) 齋藤 烈，杉山 弘，中谷和彦，化学同人，ゲノム化学—医学、分子生物学への応用と展開，2007，214.

3)

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：標的遺伝子特異的ヒストン修飾制御剤

発明者：永瀬 浩喜，杉山 弘

権利者：学校法人日本大学

種類：特願

番号：第2008-172795号

出願年月日：2008年7月1日

国内外の別：国内

○取得状況（計1件）

名称：インターストランドクロスリンク剤の合成方法

発明者：杉山 弘

権利者：科学技術振興機構

種類：特許

番号：第4061819号

取得年月日：2008年1月11日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

（研究業績・論文リスト参照）

<http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/chembio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 弘 (SUGIYAMA HIROSHI)

京都大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：50183843

(2) 研究分担者

板東俊和 (BANDO TOSHIKAZU)

京都大学・大学院理学研究科・准教授

研究者番号：20345284