

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：34416

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08035

研究課題名(和文) HDAC阻害剤のエピジェネティック制御を利用した遺伝子治療製剤の創製

研究課題名(英文) Development of formulation for gene therapy utilizing epigenetic effect of HDAC inhibitors

研究代表者

長岡 康夫 (Nagaoka, Yasuo)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号：90243039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)阻害剤には、細胞質でのチューブリンアセチル化や核内ヒストンアセチル化の亢進効果に伴う細胞内輸送系や転写の活性化作用がある。我々は、これらの作用により、遺伝子治療におけるHDAC阻害剤の併用が治療用遺伝子の効果を増進することを明らかにしてきた。本研究では、遺伝子治療とHDAC阻害剤を一体化した効率的な遺伝子発現効果を実現する遺伝子治療製剤の創製を目的とした。種々検討の結果、HDAC阻害剤の一種であるSAHAをPEG化した、PEG-SAHAとPEG化ポリリシンとの混合製剤が有効であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Histone deacetylase (HDAC) inhibitors in nature have activity to enhance the gene expression owing to the improvements in the processes of intracellular DNA delivery and intranucleus DNA transcription caused by hyper acetylation of cytosolic microtubules and core histone proteins. We therefore evaluated several types of HDAC inhibitors as enhancer of the gene expression for lipofection. In this study, we developed an efficient formulation for gene therapy in which an HDAC inhibitor, SAHA, is hybridized. The formulation is composed of PEGylated poly-lysine and PEG-SAHA.

研究分野：医薬品化学

キーワード：ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 HDAC ナノ粒子 Vorinostat SAHA 遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

がんの遺伝子治療は、今後の発展が期待される抗がん療法の一つであるが、現状では汎用されるまでには至っていない。その理由として、⑦がん組織への治療用遺伝子 (DNA や RNA) の送達が難しいこと、⑧がん細胞内への効率的な遺伝子導入とその発現が難しいこと、⑨ウイルスベクターを用いる場合は、その取り扱いや投与方法の難しさ、安全性への懸念、抗原性による頻回投与の困難などが挙げられる。そこで、本研究では、通常の医薬品のように容易に投与できるがん遺伝子治療剤の開発を上記の⑦～⑨の問題点を改善することにより進める。

本研究の戦略の中心として、当研究室で以前より築き上げてきたヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤のエピジェネティックな制御作用を活用する。即ち、非ウイルスベクターと HDAC 阻害剤の相乗作用により、がん細胞特異的な高いトランスフェクション効率を実現することにより、上記の問題点⑧と⑨を克服する。その上で、これまでの経験を活かし、正電荷ナノ粒子製剤と HDAC 阻害剤のハイブリッド製剤を構築することにより、⑦の問題点も克服し、汎用性の高い新規遺伝子導入剤の創製と治療法の確立を目指す。

## 2. 研究の目的

亜鉛を活性中心にもつ HDAC は、現在少なくとも 11 種類のアイソザイムが知られており、広く、細胞内に分布している。HDAC はヒストンアセチル転移酵素 (HAT) との相反的作用によりタンパク質のアセチル化を制御している。特に、HDAC の名称の由来でもある、核内のヒストンタンパクのアセチル化状態は転写活性化の制御機構に深く関与しており、これを制御する HDAC の働きは重要である。さらに、多くの転写因子の活性化も、HDAC と HAT による分子のアセチル化状態の制御により調節されていることから、HDAC は細胞内のエピジェネティックな遺伝子発現機構における調節分子として極めて重要な役割を担っている。

HDAC 阻害剤 (HDI) による HDAC の阻害は、相対的な HAT の亢進作用として現れ、ヒストンや転写因子の高アセチル化をもたらす。特に、がん細胞においては、ヒストンタンパク質は低アセチル化状態にあることが知られており、これを、正常なアセチル化状態に戻す HDI の働きにより、細胞増殖抑制遺伝子やアポトーシス関連タンパク質の転写が惹起されることが知られている。

我々は、この HDI のがん細胞特異的な遺伝子発現増強作用が、外部から導入した遺伝子 (プラスミド) においても同様に発揮されることを明らかにしている。この特性ががんの遺伝子治療に応用できることが強く示唆

されるため、本研究では、その方法論の確立を目指すことにした。さらに、HDAC 阻害剤プロドラッグ化によるリポソーム製剤化や PEG-HDI 製剤の創製の経験を活かし、遺伝子治療用製剤の開発を行う。これにより、通常の注射剤として頻回投与可能な遺伝子治療剤の開発を目指す。

現在開発されている HDAC 阻害剤は、酵素の活性中心に存在する亜鉛に結合する部位の化学構造の違いから、ヒドロキサム酸型、ベンズアミド型、チオール型、脂肪酸型、エポキシケトン型などに分類されている。これらの型の違いが、阻害活性のアイソザイム特異性に関連していることが知られている。これらの HDI のうち、SAHA (vorinostat) は皮膚 T 細胞リンパ腫に対する経口剤として、FDA で 2006 年に承認されている。我々も既に、多くの種類の HDAC 阻害剤を独自に合成展開しており、それぞれのアイソザイム選択制や活性に特徴がみられる。このように多くのバリエーションを有する HDAC 阻害剤と遺伝子治療との併用効果を細胞レベルや実験動物レベルで検証する。一方の遺伝子治療にも対象とするがんの種類、標的遺伝子の種類が多数あり、どの治療法を選択するかにより、膨大な組み合わせが生じる。そこで、本研究では、臨床レベルまで達している遺伝子治療法を選択し、その治療法が標的とするがん種と遺伝子に絞って、HDAC 阻害剤の構造活性相関を明らかにする。

## 3. 研究の方法

対象とするがん遺伝子治療は既に臨床研究段階にあるものとする。当初の計画としては、乳がんや胃がんに対する CDC6shRNA 遺伝子投与による CDC6 ノックダウン、腎がんや乳がんに対する、INF- $\gamma$  の発現遺伝子導入を基盤とする遺伝子治療とする。これらに対する各種 HDAC 阻害剤の併用効果を培養細胞及び動物実験レベルで明らかにする。一体化剤の開発は、正電荷脂質 HDI プロドラッグを基盤とする。これらの製剤の評価は GFP レポーター遺伝子の発現を指標に行い、その成績が高いものについては、実際の標的遺伝子を使った細胞増殖抑制活性試験や担癌マウスに対する腫瘍増殖抑制効果の評価を行う。その結果を踏まえて、製剤の組成や構造、投与方法等の最適化を行う。

Cell Division Controller 6 (CDC6) は、細胞周期の進行に重要な働きを持つタンパク質で、乳がん細胞などで過剰発現している。CDC6 を RNA 干渉によりノックダウンすることにより、がん細胞は細胞周期停止し、アポトーシス誘導されることが知られており、この方法は、がんの遺伝子治療に応用されている。本研究では、アイソザイム選択性の異なる各種 HDAC 阻害剤をこの遺伝子治療法に併用した時の効果について検証する。

遺伝子治療と HDAC 阻害剤の併用効果の

検証で得られた知見を基にして、さらに、培養細胞レベル、動物実験レベルで実証実験を行い、これにより得られるデータを集める。具体的には、標的とする遺伝子が、がん細胞で選択的に制御されているか、がん細胞においてアポトーシスが誘導されていることが、関連タンパク質の発現制御から説明できるかを確認する。そして、これらの制御の結果として、がん細胞の増殖抑制や、担癌マウスでの腫瘍縮退効果が認められるかを検証する。製剤化に関しては、GFP リポータータンパク質発現を指標に最適化した正電荷脂質 HDAC 阻害剤ナノプレックス製剤に、実際に遺伝子治療用の遺伝子を結合させて、その治療効果を細胞レベルおよび、できれば担癌マウスを用いた試験で検証する。

本実験で検証する内容には、HDAC 阻害剤の種類、標的とするがんや遺伝子の種類、トランスフェクション法の種類、動物への投与方法の種類など、多くのパラメータが存在する。期間終了後も、これらのパラメータを変えながら、最適化された治療法と治療用製剤の創製を目指す。

#### 4. 研究成果

当研究室では、従来の遺伝子導入剤を用いて遺伝子と HDAC 阻害剤を共投与し、抗がん作用が増強することを明らかにしている。HDAC 阻害剤は治療用遺伝子、及びがん細胞由来のがん抑制遺伝子の発現上昇に關与する。そこで本研究では、HDAC 阻害剤で代表的な SAHA を遺伝子と共に内包するミセル型製剤を開発に着手した (Fig.1)。

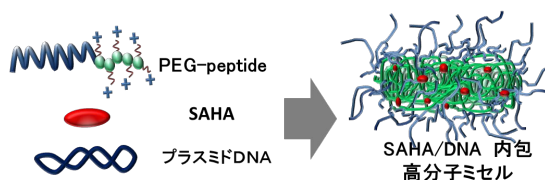


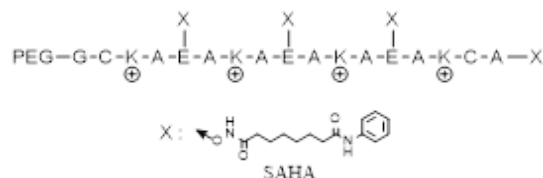
Fig.1 目的の製剤モデル

初めに設計した機能性 PEG-peptide (Fig.2 設計) は、合成段階でジメチルリシンが Fmoc 基を脱離してしまい、Fmoc 法による固相合成による目的化合物の合成に至らなかった。これを受け、PEG 化ポリアスパラギン酸 (PEG-(Asp)<sub>n</sub>) の固相合成後に側鎖カルボキシル基にポリアミン鎖及び SAHA を縮合する方法を試みた (Fig.2 設計)。PEG-(Asp)<sub>5</sub>-SAHA ミセルは SAHA 単体と比べて高い細胞増殖抑制効果を示したが、PEG やアミンの縮合率の推定が困難であり、さらに合成法の検討を進める必要がある。これについては、現在も研究を進めている。

そこで、まずは、PEG 化ポリリジン (PEG-(Lys)<sub>n</sub>) と PEG 化 SAHA の混合型ミセル製

剤の創製の方針を固めて、実験を進めた。PEG-(Lys)<sub>n</sub> 合成過程で PEG の縮合反応や縮合率の推定を改善した上、PEG-SAHA との混合ミセルを作製し、電気泳動、粒径・ゼータ電位測定、細胞試験からミセル形成とその効果について評価した (Fig.3)。

#### 設計



#### 設計

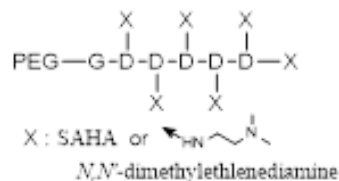


Fig.2 PEG-peptide 製剤の設計

#### 設計

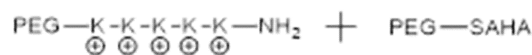


Fig.3 PEG-(Lys)<sub>n</sub> 構造

具体的な合成法と評価方法は次の (1) ~ (5) に示す。

#### (1) PEG-(Lys)<sub>n</sub> と PEG-SAHA の合成

Fmoc-NH-SAL-Resin を出発物質とし、固相合成により Fmoc-Lys(Bn)-OH、Fmoc-Gly-OH、Fmoc-Ala-OH を配列に応じてステップワイズに縮合し、固相上ポリペプチド鎖を形成した。その N 末端に PEG-OSu を用いて PEG2000 鎖を縮合した。樹脂から 90%TFA で PEG-ペプチド鎖を切り出し、凍結乾燥によって回収した。化合物の生成は <sup>1</sup>H-NMR と MALDI-MS で確認した。本合成に関して、固相上で、長鎖のペプチド N 末端に、長鎖の PEG 鎖を縮合することから、その収率が問題になると予測した。そこで、本反応における PEG 鎖の縮合効率を検討した結果、Peptide 鎖の N 末端が Gly の場合や、Lys 残基数が 10 残基以上になる場合、PEG 縮合率が著しく低下することがわかった (Table.1)。この検討結果から、Lys 残基数は 10 以下として、PEG と Lys の間にスペーサーを入れないことにした。

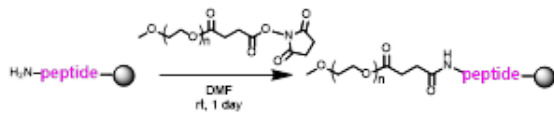
PEG-SAHA の合成については、SAHA を PEG-OSu と一晩反応させ、ジエチルエーテル処理による再沈殿で精製し、目的物を収率 99% で得た。生成は <sup>1</sup>H-NMR と MALDI-MS で確認

した。

(2) 混合ミセルの作製

PEG-(Lys)<sub>n</sub> とプラスミド DNA (pDNA) と共に 10mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.4) に分散させた。この時 PEG-SAHA は 2.0 μM、N/P 比は 1、2、4、6、8、10、20 に調整した。(N/P 比: PEG-(Lys)<sub>n</sub> のアミノ基と核酸のリン酸基のモル比)

Table.1 PEG 縮合条件の検討



entry	peptide	yield (%)	ratio(PEG : Lys) <sup>a</sup>
1	Lys	99	1:1
2	Gly-Lys	44	0.5:1
3	(Lys) <sub>2</sub>	74	1:2
4	(Lys) <sub>5</sub>	92	1:5
5	Gly-(Lys) <sub>5</sub>	54	0.3:5
6	βAla-(Lys) <sub>5</sub>	70	1:5
7	(Lys) <sub>10</sub>	47	0.7:10
8	βAla-(Lys) <sub>10</sub>	33	0.5:10
9	(Lys) <sub>20</sub>	41	0.3:20

<sup>a</sup> determined by <sup>1</sup>H-NMR

(3) ミセル形成評価試験

(a) 電気泳動による蛍光色素排除試験

0.8%のアガロースゲルを用いて(2)に示した N/P 比 (1、2、4、6、8、10、20) で作製したミセルをそれぞれ電気泳動した。紫外線照射時のエチジウムブロマイド蛍光強度を比較した結果 (Fig. 4) N/P 比 8 以上で蛍光の減少が確認できた。これは、N/P 比 8 以上では、ミセル中の DNA が強固に保持されていて、電気泳動によるクーロン力では DNA が泳動されなかったことを示している。

(b) 粒径分布と表面ゼータ電位

DNA 最終濃度を 33.3 μg/ml に調整し、N/P 比 1、2、4、6、8、10、20 でそれぞれのミセルを作製した。光散乱電気泳動(ELS)法により粒子の安定性の指標となるゼータ電位を測定した結果、N/P 比の増大により負電荷から 0 へ収束傾向を示した。また動的光散乱(DLS)法により粒径を測定した結果、60 ~ 200nm 付近に粒径分布が存在した。

(4) トランスフェクション実験

ヒト大腸がん細胞 HCT-116 にミセル製剤を添加し、24 時間後の遺伝子発現効率を評価するため、pDNA 内に組み込まれているレポータータンパク (GFP) の発現を Western Blotting により確認した。その結果、GFP の発現上昇

が観測されたことから、本製剤により、DNA の導入がされていることが確認された。

(5) 細胞増殖抑制試験

HCT-116 細胞を用いて、ミセル製剤添加後の細胞生存率を WST-8 法で確認した (Fig.5)。既存の遺伝子導入試薬と同様の効果が得られた。また PEG(Lys)<sub>n</sub> 単体に毒性は見られなかった。

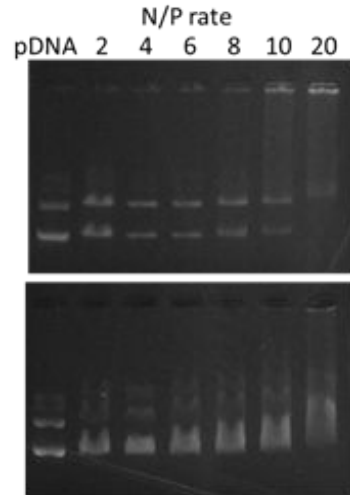


Fig.4 エチジウムブロマイド蛍光

上: PEG-(Lys)<sub>5</sub> / pDNA

下: PEG-(Lys)<sub>5</sub>+PEG-SAHA / pDNA

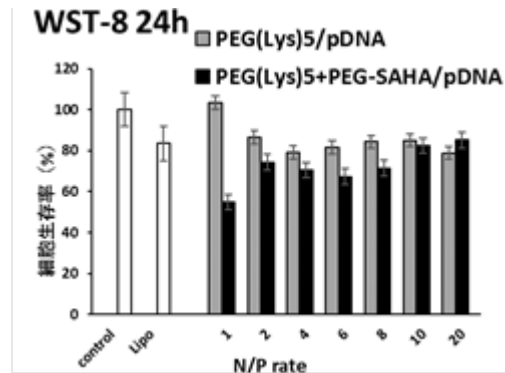


Fig.5 薬剤添加 24 時間後の細胞生存率 (%)

PEG-ペプチドの設計において、これまで立体障害の小さい Gly をスペーサーとして配置することで PEG と peptide の縮合効率が高まると予測していたが、実際には縮合率が低下することが判明した。原因は、Gly のアミノ基の水素が分子内のカルボニル基と水素結合し、求核性の低下あるいは立体障害を生じたことが考えられる。

DNA、PEG-ペプチド、PEG-SAHA 複合体ミセル製剤の評価では、エチジウムブロマイドの蛍光消失とゼータ電位の結果から、高 N/P 比においてミセル形成が促進されることが示唆された。しかしながら、細胞増殖抑制試験の結果では N/P 比の高さと細胞毒性は比例しておらず、N/P 比 4~8 で効果を示した。また

EPR 効果を期待するには粒径の制御・評価が重要であるが、今回の測定では試料の調整条件によるばらつきも大きく、課題が残る。以上のことから、ミセル形成の評価法を今後さらに検討する必要がある。

本研究では、PEG-(Lys)<sub>n</sub> と PEG-SAHA による遺伝子内包ミセルの形成、及びがん細胞増殖抑制効果の可能性を示した。PEG-peptide を基盤とする様々な機能を付与した高性能遺伝子ベクターへの発展を今後期待している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Kuroi, K. Sugimura, A. Kumagai, A. Kohara, Y. Nagaoka, H. Kawahara, M. Yamahara, N. Kawahara, H. Takemori, H. Fuchino, The Importance of 11 -OH, 15-oxo, and 16-en Moieties of 11 -Hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-olic Acid in Its Inhibitory Activity on Melanogenesis, *Skin Pharmacol Physiol.*, 30(4), 205-215 (2017). 査読あり doi: 10.1159/000475471.

Y. Itoh, Y. Nagaoka, Y. Katakura, H. Kawahara, H. Takemori, Simple chronic colitis model using hypopigmented mice with a Hermansky-Pudlak syndrome 5 gene mutation, *Pigment Cell Melanoma Res.*, 29(5), 578-82 (2016). 査読あり doi: 10.1111/pcmr.12504.

Y. Kawaratani, T. Matsuoka, Y. Hirata, N. Fukata, Y. Nagaoka, S. Uesato, Influence of the carbamate fungicide benomyl on the gene expression and activity of aromatase in the human breast carcinoma cell line MCF-7, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 39(1), 292-2991 (2015). 査読あり doi: 10.1016/j.etap.2014.11.032.

〔学会発表〕(計 4 件)

T. Inada, M. Katsuragi, G. Kimura, T. Sumiyoshi, Y. Nagaoka, Design and synthesis of PEGylated peptide micellar formulation for cancer gene therapy, The 12th International Symposium in Science and Technology 2017, Penang Malaysia 2017 年 8 月 13 日

相原浩人、西村伶、木村元気、住吉孝明、長岡康夫、IFN- $\gamma$  発現遺伝子を用いたが

ん遺伝子治療に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の併用効果, 日本薬学会第 136 年会 (横浜) 2016 年 3 月 26 日

G. Kimura, H. Aihara, H. Kamijo, M. Katsuragi, Y. Fukushima, S. Uesato, T. Sumiyoshi, Y. Nagaoka, Design and Synthesis of PEGylated Hydroxamic Acid-Type Histone Deacetylase Inhibitor Prodrugs Having Targeting Ability to Cancer Tissues, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015) (Honolulu, USA), 2015 年 12 月 15 日

R. Nishimura, H. Aihara, M. Katsuragi, Y. Fukushima, S. Uesato, T. Sumiyoshi, Y. Nagaoka, Combination of Histone Deacetylase Inhibitors and Lipofection-Mediated INF- $\gamma$  Gene Therapy, The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2015) (Honolulu, USA) 2015 年 12 月 15 日.

〔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

<http://pharm.life-bio.kansai-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

長岡 康夫 (NAGAOKA, Yasuo)

関西大学・化学生命工学部・教授

研究者番号: 90243039