

令和 5 年 10 月 23 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07408

研究課題名(和文) PIPを用いた変異mtDNAを標的とする選択的がん増殖抑制の検討

研究課題名(英文) Tumor growth suppression by PIP targeting against mutated mtDNAs

研究代表者

越川 信子 (Koshikawa, Nobuko)

千葉県がんセンター(研究所)・がん先進治療開発研究室・主任上席研究員

研究者番号：90260249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、癌細胞に認められる変異ミトコンドリアDNA(mtDNA)を標的としたPIP-TPPを用いて、がん細胞の選択的増殖抑制を目指している。今回標的としたのは肺がんと子宮がんである。ヒト肺癌由来細胞A549では短鎖型PIP-TPPで、A549細胞に老化を誘導した。さらに抗アポトーシス因子の同時投与でがん細胞の増殖を抑制した。また、子宮頸がん由来培養細胞HeLa他、いくつかの癌で認められる、ホモプラスミック変異mtDNAに対して、PIP-TPPを合成した。HeLa細胞、患者由来オルガノイドでは、in vitro, in vivoでPIP-TPP投与によってがん細胞が特異的に増殖抑制が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌治療法は、日々進歩しているが、多くの場合完治が困難である。また、抗がん剤治療などでは副作用の問題が無くならない。さらに、転移が起こるか否かの問題は、払拭されない。我々は、mtDNAの変異部位を標的としてPIP-TPPを合成し、特異的変異mtDNAを持つ細胞の増殖を抑制する事を肺がん細胞・子宮がん細胞において確認した。さらに、正常細胞には影響がないことを見出した。今までの研究から、転移巣において、変異mtDNAの存在率が上昇していることから、PIP-TPPが転移巣の増殖抑制にも効果があると推測される。このように、PIP-TPPは現在の癌治療の持つ問題点を解消する一助となると推察する。

研究成果の概要(英文)：We aim to selectively suppress the growth of cancer cells using PIP-TPP, which targets mutated mitochondrial DNA (mtDNA) found in cancer cells. The targets this time are lung cancer and uterine cancer. Short-chain PIP-TPP induced senescence in A549 cells derived from human lung cancer. Furthermore, co-administration of anti-apoptotic factors suppressed the proliferation of cancer cells. In addition, we synthesized hairpin type PIP-TPP against homoplasmic mutant mtDNA observed in several cancers including HeLa, a cell derived from cervical cancer. In HeLa cells and patient-derived organoid, PIP-TPP administration specifically inhibited the proliferation of cancer cells. Additionally, The inoculated HeLa cells into mice were suppressed that growth by hairpin type PIP-TPP. But Normal human dermal cells had no side effect. These results suggest that PIP-TPP designed to target mtDNA cancer risk variants can be used to treat many cervical cancers.

研究分野：分子病理学

キーワード：mtDNA PIP-TPP 肺がん 子宮がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア機能不全は、ミトコンドリア病の他、糖尿病を含む生活習慣病、さらに癌という重篤な疾患の原因であるとの報告がなされてきたが、現在でもその論文発表件数は増している。ミトコンドリアは細胞のエネルギー源である ATP の産生工場として重要な働きをしているが、特に呼吸鎖複合体の構成蛋白質の遺伝子をコードしているのは、核内 DNA (nDNA) だけでなく、ミトコンドリア DNA (mtDNA) である。mtDNA には 37 の遺伝子がコードされている。うち、13 個が呼吸鎖複合体の構成遺伝子であり、2 個が rRNA 遺伝子、22 個が tRNA 遺伝子である。これらの mtDNA の変異は、ミトコンドリア病など様々な疾患に関与していることが報告されている。しかし、癌とミトコンドリア機能不全はその関係が注目されているにも関わらず明確な答えがなく論議を醸している。癌とミトコンドリア機能不全に関わる重要な因子が活性酸素種 (ROS) の産生である。ROS は DNA、脂質の損傷などを通して細胞にダメージを与え、癌の起因の一つとされている。2008 年に、我々はマウスLewis肺癌細胞の転移能の異なる細胞株とミトコンドリア DNA を入れ替えた細胞質雑種細胞 (cybrid) を用いた研究から、呼吸鎖複合体中の complex I の病理性 mtDNA 変異によって起こるミトコンドリア機能不全が、ROS 産生を増加し、ある種の核 DNA がコードする遺伝子の発現を誘導し癌の悪性度の進展をもたらすことを発表した (Science 2008 年)。このことから癌と mtDNA の新たな関係が明らかとなった。さらに我々の先行研究で、ヒト肺癌・大腸癌において complex I の mtDNA 変異が原発巣よりも転移巣で多く認められるという知見を得た (Scientific Report 2017 年)。これらの結果から、mtDNA 変異は進行癌の治療の重要な標的と考えられた。1 個の細胞内には 100 から 1000 個以上のミトコンドリアが存在し、mtDNA は 1 個の細胞内に 100 から 10,000 コピー存在する。細胞分裂時にミトコンドリアは不等分配され、変異 mtDNA と正常 mtDNA とが混在すると heteroplasmy の状態で複製されるが、変異 mtDNA コピー数が一定以上になると疾病を発症すると言われている。この変異 mtDNA を標的とすれば、mtDNA に遺伝子変異が見つかった細胞に対して、その変異 mtDNA 配列を認識し、選択的に細胞を排除できる薬剤の創薬開発を行うことが可能と思われた。特に ND 遺伝子だけ見ても、原発巣の約 70%、転移巣の約 90% において非同義変異やナンセンス変異が検出されることから (Scientific Report 2017 年)、変異 mtDNA は極めて有効な治療標的であると考えられた。我々は、塩基配列特異的に DNA に結合する Pyrrole/Imidazole を骨格とするポリアミド (PIP) 化合物を作製し、細胞内への輸送手段を必要とせず細胞内に到達させ、遺伝子発現を操作する方法を開発している (Nature Chem Bio 2012 年)。PIP 化合物は天然化合物ディスタマイシン、デュオカルマイシンといった天然抗生物質を由来として合成された人工化合物である。PIP は N-メチルピロール (Py) と N-メチルイミダゾール (Im) 及び β アラニン (β) の組み合わせにより任意の二本鎖 DNA の副溝を配列特異的に認識するように合成できる。合成した PIP は、配列特異的に DNA と結合することで DNA 複製および DNA 結合蛋白質、例えば転写因子と DNA との結合を阻害し遺伝子発現の制御を行うことが可能であり、かつ、PIP に他の物質を結合することで deliverer としても使用できるというように様々な用途に利用可能である。先行研究から、PIP の毒性は低く、in vivo で副作用はほとんど認められなかった (Nature communications, 2015 年)。この結果から、PIP が核内の DNA に結合し、更に PIP に結合した物質の効果を効率良く各細胞全体に反映されることが示唆された。さらに、我々は PIP にミトコンドリア指向性薬剤である triphenyl-phosphonium (TPP) を結合させることで、ミトコンドリア特異的に PIP を送達できること、変異 mtDNA 特異的な PIP-TPP が変異 mtDNA を有する癌細胞の特異的な細胞死を誘導することを見出した (Cancer Science 2021 年)。

2. 研究の目的

悪性度の高いがん細胞に認められる、変異 mtDNA に対する PIP-TPP を合成し、変異 mtDNA を標的として副作用の少ない、即ち正常細胞には影響がなく、がん細胞に特異的に作用する薬剤候補を作成することを目的とした。

3. 研究の方法

Pyrrole-Imidazole polyamide (PIP) は、送達物質無しに DNA の副溝に結合しその転写複製を阻害する性質を有し、Triphenylphosphonium (TPP) カチオンは、化合物をミトコンドリア内に送達する性状を有する。そこで、ヘアピン型 PIP と TPP を結合し (PIP-TPP)、標的とする変異ミトコンドリア DNA (mtDNA) を持つ癌細胞の増殖を抑制することを目的として研究を進めた。1 細胞に数百から数千コピーある mtDNA に対応するため、PIP-TPP は長期にミトコンドリア内に貯留することが必要であると考えられる。そこで、PIP-TPP がミトコンドリアに貯留することを確認した。特異的な変異 mtDNA を 100% 持つヒト肺癌由来 A549 細胞を用い、短鎖型 PIP-TPP を合成し、その効果について検討した結果、短鎖型 PIP-TPP と A549 を用いた場合、細胞に senescence を誘導した。さらに、抗アポト

ーシス因子、BclxLの発現が高いことから、BclxL阻害剤 A1145956を同時に投与することで、癌細胞の増殖を抑制し、マウス実験においても腫瘍増殖の抑制傾向が認められた。次に、子宮がん細胞のmtDNAで既知の変異ホットスポットがないため、肥大型心筋症、結腸、乳房、および卵巣に関連するATP6遺伝子のしばしば発癌性であるホモプラスミック変異体(8860G)を標的とするPIPTPP、CCC-h1005を合成した。その結果、CCC-h1005が子宮頸がん細胞株、シスプラチン耐性HeLa細胞、および患者由来の明細胞がんhEa-1細胞でアポトーシスを誘導したが、mtDNA変異体を含まない正常な皮膚線維芽細胞ではアポトーシスを誘導しないこと、重篤な副作用がなく、腫瘍の増殖抑制をHeLa細胞移植マウスで観察した。

4. 研究成果

研究方法に述べたように、ヒト肺癌由来 A549 細胞を用いた実験では、短鎖型 PIP-TPP で細胞に senescence を誘導し、BclxL 阻害剤 A1145956 を同時に投与することで invitro、in vivo の実験で腫瘍増殖の抑制を認めた。この結果は Cancer Science (2022 年)で誌上発表を行った。また、既知の mtDNA のホットスポットのない子宮がんにおいては、ホモプラスミック変異体(8860G)を標的として PIP-TPP を合成し、シスプラチン耐性 HeLa 細胞、患者由来明細胞がん hEa-1 細胞でアポトーシスを誘導したが、正常線維芽細胞には重篤な副作用がなく、in vivo においても HeLa 移植マウスの増殖抑制を観察した。この結果も International Journal of Cancer (2023 年)で誌上発表を行った。PIP-TPP は、ミトコンドリア病 MELAS の代表的な mtDNA 変異 A3243G を標的として、当初合成を行った。Cybrid を用いた A3243G を標的とした研究で、PIP-TPP(CCC018-TPP)が A3243G を持つ細胞内のミトコンドリアに結合することを確認した。この結果を得て、がん細胞における変異 mtDNA に結合すると想定される PIP-TPP を合成したものである。先行研究の中で、がんでは、変異 mtDNA が homoplasmly であることが多いことが観察された。このため、変異 mtDNA を標的とする PIP-TPP によるがん細胞特異的な治療戦略は有効であることが想起される。さらに、がん転移巣に認められる CAF など同様な変異 mtDNA を有することが認められる可能性があり、がん転移巣全体の縮小にも希望が持てると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Koshikawa Nobuko, Yasui Nanami, Kida Yuki, Shinozaki Yoshinao, Tsuji Kohei, Watanabe Takayoshi, Takenaga Keizo, Nagase Hiroki	4. 巻 112
2. 論文標題 A PI polyamide?TPP conjugate targeting a mtDNA mutation induces cell death of cancer cells with the mutation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2504 ~ 2512
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14912	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takenaga Keizo, Koshikawa Nobuko, Akimoto Miho, Tatsumi Yasutoshi, Lin Jason, Itami Makiko, Nagase Hiroki	4. 巻 11
2. 論文標題 MCT4 is induced by metastasis-enhancing pathogenic mitochondrial NADH dehydrogenase gene mutations and can be a therapeutic target	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13302 - 13321
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-92772-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Koshikawa Nobuko, Kida Yuki, Yasui Nanami, Shinozaki Yoshinao, Tsuji Kohei, Watanabe Takayoshi, Lin Jason, Yamamoto Seigi, Takenaga Keizo, Nagase Hiroki	4. 巻 576
2. 論文標題 A linear five-ring pyrrole-imidazole polyamide-triphenylphosphonium conjugate targeting a mitochondrial DNA mutation efficiently induces apoptosis of HeLa cybrid cells carrying the mutation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 93 ~ 99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.08.088	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nagase Hiroki, Watanabe Takayoshi, Koshikawa Nobuko, Yamamoto Seigi, Takenaga Keizo, Lin Jason	4. 巻 112
2. 論文標題 Mitochondria: Endosymbiont bacteria DNA sequence as a target against cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4834 ~ 4843
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15143	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takenaga Keizo, Koshikawa Nobuko, Nagase Hiroki	4. 巻 22
2. 論文標題 Intercellular transfer of mitochondrial DNA carrying metastasis-enhancing pathogenic mutations from high- to low-metastatic tumor cells and stromal cells via extracellular vesicles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Molecular and Cell Biology	6. 最初と最後の頁 1 -16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12860-021-00391-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuji Kohei, Kida Yuki, Koshikawa Nobuko, Yamamoto Seigi, Shinozaki Yoshinao, Watanabe Takayoshi, Lin Jason, Nagase Hiroki, Takenaga Keizo	4. 巻 113
2. 論文標題 Suppression of non small cell lung cancer A549 tumor growth?by an mtDNA mutation targeting pyrrole imidazole polyamide triphenylphosphonium and a senolytic drug	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1321 ~ 1337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15290	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 N.Koshikawa N.Yasui Y.Kida Y.Shinozaki K.Tsuji T.Watanabe K.Takenag H.Nagase	4. 巻 576
2. 論文標題 A PI polyamide-TPP conjugate targeting a mtDNA mutation induces cell death of cancer cells with the mutation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 93-99
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14912	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuji K, Kida Y, Koshikawa N, Yamamoto S, Shinozaki Y, Watanabe T, Lin J, Nagase H, Takenaga K.	4. 巻 113
2. 論文標題 Suppression of non-small-cell lung cancer A549 tumor growth by an mtDNA mutation-targeting pyrrole-imidazole polyamide-triphenylphosphonium and a senolytic drug	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 1321-1337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15290	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Jihang Yao , Keizo Takenaga, Nobuko Koshikawa, Yuki Kida , Jason Lin , Takayoshi Watanabe , Yoshiaki Maru , Yoshitaka Hippo , Seigi Yamamoto , Yuyan Zhu , Hiroki Nagase	4. 巻 152
2. 論文標題 Anticancer effect of a pyrrole-imidazole polyamide-triphenylphosphonium conjugate selectively targeting a common mitochondrial DNA cancer risk variant in cervical cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int. J. Cancer	6. 最初と最後の頁 962-976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.34319	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 山本清義、辻航平、越川信子、木田裕貴、渡辺隆義、リン ジェイソン、竹永啓三、永瀬浩喜
2. 発表標題 変異mtDNA標的PIP-TPPとBcl-xL阻害剤の併用による非小細胞肺癌A549腫瘍のSenotherapy
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 喬いく銘、木田裕貴、越川信子、竹永啓三、永瀬浩喜
2. 発表標題 DNAジャイレース阻害剤-TPP複合体によるmtDNA複製阻害を介した癌細胞のアポトーシスの誘導
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 喬いく銘、木田裕貴、越川信子、竹永啓三
2. 発表標題 DNAジャイレース阻害剤-TPP複合体によるmtDNA複製阻害を介した癌細胞の細胞死の誘導
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 J. Lin, I. Hosoya, S. Sakuma, Y. Kida, T. Watanabe, S. Yamamoto, A. Takatori, N. Koshikawa, H. Nagase
2. 発表標題 Characterization of Cancer Genome-wide Binding of Pyrrole-Imidazole Polyamide-Vorinostat Conjugates by Machine Learning
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本清義、越川信子、木田裕貴、渡部隆義、Lin Jason、竹永啓三、永瀬浩喜
2. 発表標題 非小細胞肺癌を標的とした変異mtDNA標的PIP-TPPとBcl-xL阻害剤の併用療法の開発
3. 学会等名 先端モデル動物支援 若手支援技術講習会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本清義、越川信子、木田裕貴、渡部隆義、Lin Jason、竹永啓三、永瀬浩喜
2. 発表標題 変異mtDNA標的PIP-TPPとBcl-xL阻害剤の併用による非小細胞肺癌A549腫瘍のSenotherapy
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永瀬浩喜、越川信子、山本清義、辻航平、木田裕貴、竹永啓三
2. 発表標題 ミトコンドリアDNA変異を標的にした薬剤候補によるがん細胞老化、細胞死、老化細胞除去誘導
3. 学会等名 日本癌学会学術総会（第79回）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 辻 航平、竹永 啓三、木田 裕貴、越川 信子、永瀬 浩喜
2. 発表標題 mtDNAを標的としたPIポリアミド-TPPによるA549肺がん細胞の細胞老化と老化細胞除去の誘導
3. 学会等名 日本癌学会学術総会（第79回）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nagase H, Koshikawa N et al
2. 発表標題 A strategy for therapeutic targeting in pathological cells with mutant mitochondrial DNA using mitochondria targeted minor groove binders
3. 学会等名 ASGCT 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹永啓三、越川信子、永瀬浩喜
2. 発表標題 肺癌における転移促進性mtDNA ND遺伝子変異による乳酸トランスポーターMCT4の特異的発現促進
3. 学会等名 第28回日本癌病態治療研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 越川信子、竹永啓三、永瀬浩喜
2. 発表標題 肺癌における転移促進性mtDNA ND遺伝子変異による乳酸トランスポーターMCT4の特異的発現促進
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐久間誠、辻航平、渡部隆義、越川信子、竹永啓三、永瀬浩喜
2. 発表標題 mtDNA変異を標的にした修飾PIポリアミドによるROS産生亢進と細胞増殖の抑制
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nobuko Koshikawa, Kohei Tsuji, Keizo Takenaga, Hiroki Nagase
2. 発表標題 Retardation of Tumor cell growth by PI polyamide-drug conjugates targeting mtDNA mutation
3. 学会等名 The 24th JFCR-ISCC Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 辻航平、越川信子、竹永啓三、永瀬浩喜
2. 発表標題 mtDNA変異を標的としたPyrrole-Imidazole-Polyamide修飾化合物による腫瘍増殖抑制効果の検討
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 二重膜構造細胞内小器官DNA標的薬	発明者 永瀬浩喜 渡部隆義 越川信子 安井七海	権利者 順天堂大学
産業財産権の種類、番号 特許、2019-053528	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	竹永 啓三 (Takenaga Keizo) (80260256)	千葉県がんセンター(研究所)・がん遺伝創薬研究室・特任 研究員 (82504)	
研究分担者	永瀬 浩喜 (Nagase Hiroki) (90322073)	千葉県がんセンター(研究所)・がん遺伝創薬研究室・研究 所長 (82504)	辞退
研究分担者	渡部 隆義 (Watanabe Takayoshi) (60526060)	千葉県がんセンター(研究所)・がん研究開発グループ・研 究員 (82504)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関