

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07710

研究課題名（和文）アミノ基を有するPIP-CBI誘導体の創薬を指向した抗がん剤としての可能性の探求

研究課題名（英文）Exploring the potential of PIP-CBI derivatives with amino groups as anticancer agents for drug discovery

研究代表者

渡部 隆義（WATANABE, TAKAYOSHI）

千葉県がんセンター（研究所）・がん研究開発グループ・研究員

研究者番号：60526060

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトテロメラーゼ転写酵素（hTERT）をコードするDNAの遺伝子配列に結合し発現を抑える遺伝子治療薬であるCCC-030はhTERTが過剰発現している癌細胞に対し抗腫瘍効果を持つ。本研究ではCCC-030の更なる薬効の向上を狙い、アミノ基をCCC-030のN末端に有するNH₂-CCC-030、ターンの位に有するNH₂-CCC-030、N末端及び位の両方に有する2NH₂-CCC-030の3つの誘導体を新規に合成し、その解析を行った。その結果、3つの誘導体はDNAに対する結合力、細胞毒性、動物実験における抗腫瘍効果のいずれにおいても優れた結果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は従来のタンパク質を標的とする抗がん剤とは異なり、癌に特異的な遺伝子配列そのものを標的とするPIP-CBI治療薬に対し更に高い薬効を持たせることに成功した点で意義深い。今回の系では主にhTERTを標的としたPIP-CBIを用いたが、KRASやMIYの増幅配列を標的としたPIP-CBIなどにも応用が利き、未だ治療戦略が定まっていない社会的に問題となっている難治性癌に対する強力な遺伝子治療薬を創薬出来る可能性を高めたと言える。

研究成果の概要（英文）：CCC-030, a gene therapy drug that binds to the gene sequence of DNA encoding human telomerase transcriptase (hTERT) and suppresses its expression, has an antitumor effect of 100-200 nM against cancer cells overexpressing hTERT. In this study, we aimed to further improve the efficacy of CCC-030. Three derivatives are novel: NH₂-CCC-030 with an amino group at the N-terminus of CCC-030, NH₂-CCC-030 with -position on -turn, and 2NH₂-CCC-030 with both the N-terminus and -position was synthesized. These three derivatives showed excellent results in terms of DNA binding power, cytotoxicity, and antitumor effect in animal experiments.

研究分野：ケミカルバイオロジー

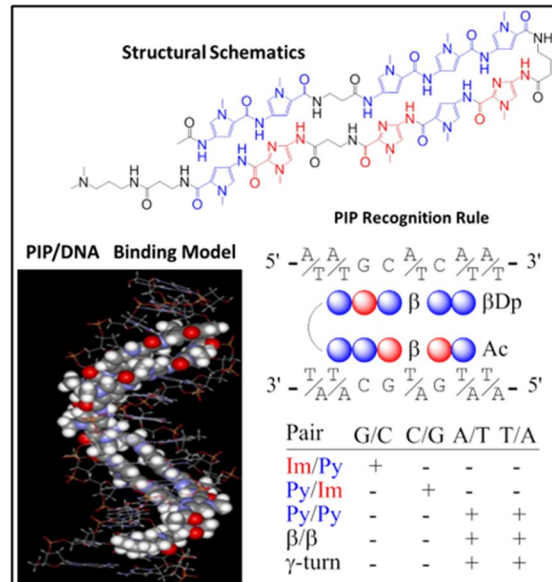
キーワード：PIポリアミド hTERT PIP-CBI アミノ基

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1. PIP-CBIによる抗がん剤の開発

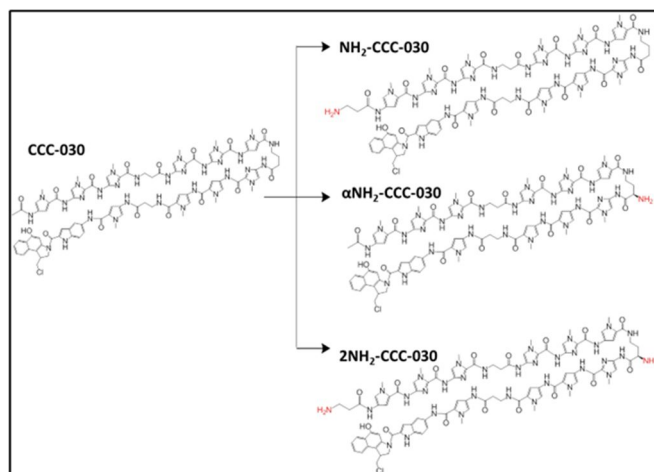
Pyrrole-Imidazole Polyamide (PIP)は右図のように天然に存在する抗生物質デスタマイシンやネトロプシンに由来するピロール(Py)とイミダゾール(Im)及びそれらを連結する直鎖アミノ酸が連なった人工有機分子である。PIPは図1のように分子内のPyとImのペアを変えることで、二本鎖DNAの標的塩基配列に対する高い結合配列選択性を付与することが可能。細胞投与後速やかに核移行し標的DNAに結合、生体内において高い腫瘍集積性を有するといったユニークな特徴を有する。またPIPは通常のペプチドと同様にN末端やC末端、またアミノ酸の側鎖に様々な



機能性分子を導入することが可能であり、当研究グループではこのPIPを核内の標的DNA配列への送達分子として利用したPDCを多数合成し、その機能解析を行っている。特にアルキル化剤CBIをPIPに付加したPIP-CBIが有望な抗がん剤になりうることを見出している。例えば難治性の大腸がんや膵がんで多く見られるKRASのコドン12の変異配列を認識するPIP-CBIはこれらの変異を有するがん細胞に対し、培養細胞、担癌動物実験において腫瘍の増殖抑制効果を示すことを報告し(Nat Commun. 2015, 27, 6, 6706)、近年ではMYCN遺伝子を標的とするPIP-CBI化合物、CCC-002がMYCN遺伝子の増幅変異を有する神経芽腫に対して高い抗腫瘍効果を有することも報告した(Can Res. 2019, 15, 79, 4, 830)。

2. PIP-CBIの誘導体の開発

以上の研究背景から、PIP-CBIは有望な抗がん剤になると考えられるが、一方で化合物そのものの改変については未着手であった。PIP-CBIはPIP部位が標的DNAの塩基配列を認識し、副溝に水素結合によってはまり込み足場を形成した後にCBIによって共有結合が形成され標的遺伝子の発現を抑制するが、このPIP部位にアミノ基を導入することでアミノ基の+電荷とDNAのリン酸部位の-



電荷による静電相互作用によりDNAとの結合力を大きく向上させることが報告されている。そこで申請者は右図のようなPIP-CBIのPIP部位にアミノ基を導入することで迅速且つ強固なPIP-DNA結合による足場形成を促し、アルキル化の効率を向上させることが期待されるPIP-CBI誘導体の開発に取り組んだ。

標的遺伝子としてテロメアの短縮を阻害し、がんの不死化を促すテロメラーゼの活性ユニットであるhTERTは80-90%の癌で高発現し、その短縮はDNA損傷応答、そしてアルキ

ル化剤 CBI による過度のゲノム不安定性は細胞のカタストロフを励起し、多くのがんに対する治療法となる可能性が示唆される。そこでヒトの 5 番染色体上にコードされている hTERT 遺伝子領域に 5 箇所結合するよう設計した hTERT 遺伝子標的化合物 CCC-030 を合成し、hTERT を高発現している 2 種類の乳がん細胞株 MCF7 および MDA-MB-231 を用いて抗腫瘍評価を行った。その結果、hTERT 発現抑制には成功したが、IC₅₀ は 200nM 程度であり既知の PIP-CBI 同様の数 nM という低い IC₅₀ は得られなかった。これは適切な塩基配列に設計出来ていないことが原因の一つであるが、このような塩基配列でも効果が有る誘導体が必要とされる。そこで図 2 のように CCC-030 の N 末端にアミノ基を導入した NH₂-CCC-030、ターン部位である アミノ酪酸の 位に導入した NH₂-CCC-030、そして N 末端および 位の 2 箇所にアミノ基を導入した 2NH₂-CCC-030 の 3 つの誘導体を合成し、MCF-7 を用いた WST アッセイで誘導体の抗腫瘍評価を行った結果、IC₅₀ は CCC-030=208 nM に対し、誘導体では NH₂-CCC-030=46.5nM, NH₂-CCC-030=50.1 nM, 2NH₂-CCC-03 = 19.2 nM といずれも CCC-030 より 5 倍から 10 倍程強い細胞毒性が確認され(図 3)、MDA-MB-231 でも同様であった。また CCC-030 および 3 種の誘導体全てにおいて標的 hTERT タンパク質の発現抑制が確認された。

以上の結果から、PIP-CBI にアミノ基を導入することは細胞毒性、標的タンパク質の発現抑制をそれぞれ向上させることが示され、PIP-CBI 以上の抗がん剤と成り得る可能性が示唆された。

2 . 研究の目的

上記の研究背景から、本研究では CCC-030 および 3 種の誘導体 NH₂-CCC-030、 α NH₂-CCC-030、2NH₂-CCC-030 の DNA との結合親和性や配列認識能、水溶性の比較など化学的物性を解析し、更に正常細胞に対する毒性や動物実験による抗腫瘍活性の比較実験を行い PIP-CBI を更に発展させた有効な抗がん剤開発の可能性を探求することを目的とする。

3 . 研究の方法

合成した化合物の疎水性を調べるため、それぞれの化合物の LogP 値を水オクタノール分配法により測定し、アミノ基の導入による水溶性の変化を調べる。アセトニトリル:水=1:4 の溶媒中の各サンプルの保持時間を測定し、LogP 値が既知の 5 種の標品、酢酸エチル(0.73) アセトフェノン (1.58)、ベンゾニトリル (1.56)、インドール (2.14)、クルクミン (3.29) より検量線を作成し CCC-030,NH₂-CCC-030, α NH₂-CCC-030,2NH₂-CCC-030 の LogP を測定する。

アミノ基の導入により、化合物と DNA の結合親和性がどの程度変化するかを SPR アッセイにより測定する。化合物の C 末端のアルキル化部位 CBI を Dp に置換した非結合型の化合物 CCC-030-Dp、NH₂-CCC-030-Dp、 α NH₂-CCC-030-Dp、2NH₂-CCC-030-Dp をそれぞれ合成し、化合物の結合配列を有するヘアピンオリゴが固定されたピアコアのチップ上に滴下しそれぞれの化合物の結合解離定数 KD を測定する。

アミノ基による DNA の配列選択性が変化するのかをアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)を行い配列認識能の評価する。化合物の結合配である TAGGAGGCA を含む 2 本鎖 DNA に化合物を加え 18 時間アルキル化反応を行い、反応後 1 M のピペリジンを加え 95 で 20 分加熱することによりアルカリ加水分解を引き起こしアルキル化部位で DNA の断片化が起こる。これを標品の DNA 断片と一緒に 20% アクリルアミドゲル電気泳動により切断

配列を判定する。

正常な細胞に対する細胞毒性の評価ヒト繊維芽細胞 HDF 及び乳腺上皮細胞 MCF-10a に対する毒性を確認し癌細胞との毒性の比較を行う。4 種の化合物を正常なヒト線維芽細胞 HDF 及び乳腺上皮細胞 MCF-10 に投与し、IC50 を比較する。

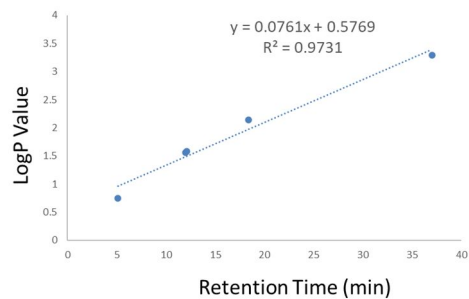
動物実験における化合物の抗腫瘍効果の検討

受精鶏卵の漿尿膜 (CAM) を用いた動物実験における化合物の抗腫瘍効果を検討する。hTERT が高発現している MCF7 はマウスに生着しにくく、適切な評価系の構築が困難であった。そこで当研究室で確立した CAM モデルの評価系で実験を行う。10 日間孵卵した受精鶏卵に窓を開け、CAM に MCF7 を移植し 72 時間後に化合物を 0.3mg/kg ずつ投与し、更に 72 時間後に腫瘍の大きさを比較する。

4. 研究成果

CCC-030, NH2-CCC-030, aNH2-CCC-030, 2NH2-CCC-030 の水溶性の測定

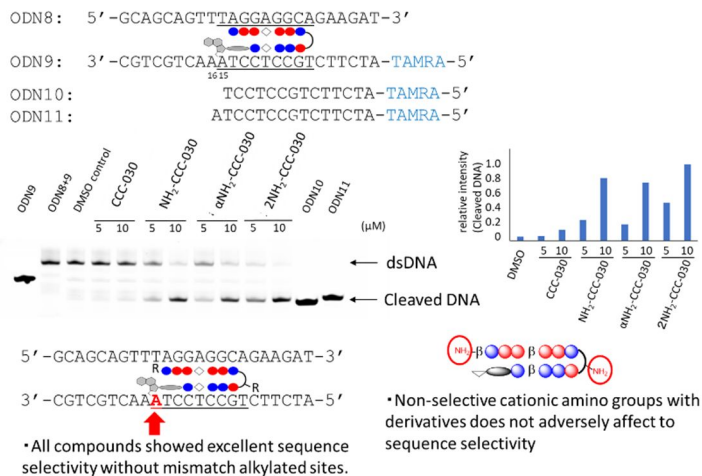
化合物の疎水度を示す LogP 値を測定するため、酢酸エチル (0.73) アセトフェノン (1.58) ベンゾニトリル (1.56) インドール (2.14) クルクミン (3.29) の 5 種の標品のアセトニトリル：水=1：4 の溶媒中の HPLC による保持時間(t)を測定し、検量線を作成したところ、左図に示すような検量線 $\text{LogP} = 0.0761t + 0.577$ ($R^2 = 0.97$) が得られた。次に CCC-030, NH2-CCC-030, aNH2-CCC-030, 2NH2-CCC-030 の保持時間を測定した結果、それぞれ 34.3 分、18.2 分、18.1 分及び 13.1 分であった。以上の結果と検量線からそれぞれの LogP を測定すると CCC-030 = 3.19、NH2-CCC-030 = 1.96、aNH2-CCC-030 = 1.95、2NH2-CCC-030 = 1.57 が得られ、アミノ基の導入により大幅に水溶性が向上することが示された。



Sample	retention time	LogP
酢酸エチル	5.1	0.75
アセトフェノン	12.0	1.56
ベンゾニトリル	12.1	1.58
インドール	18.4	2.14
クルクミン	37.0	3.29
CCC-030	34.3	3.19
NH2-CCC-030	18.2	1.96
aNH2-CCC-030	18.1	1.95
2NH2-CCC-030	13.1	1.57

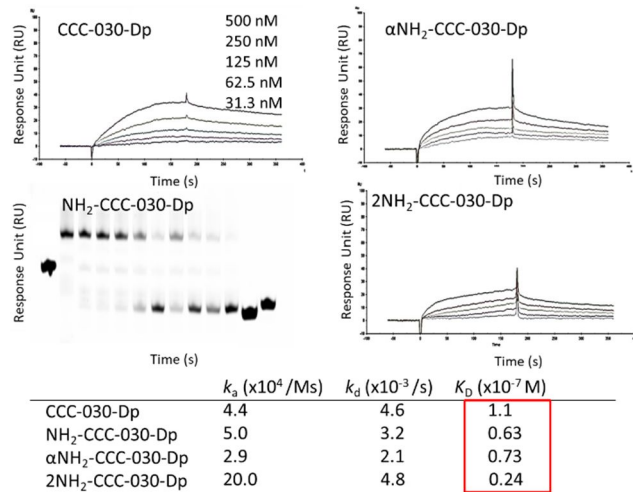
SPR アッセイによる化合物の DNA への結合親和力 KD 値の測定

ピアコアによりそれぞれの化合物の KD 値を測定した結果、CCC-030-Dp = 1.1×10^{-7} M, NH2-CCC-030-Dp = 6.3×10^{-8} M, aNH2-CCC-030-Dp = 7.3×10^{-8} M, 2NH2-CCC-030-Dp = 2.4×10^{-8} M となり、アミノ基を導入したことにより誘導体の結合力は 2-5 倍程度強くなることが示された。



PAGE アッセイによる DNA 配列認識能の評価

下図のように CCC-030 及び 3 つの誘導体の切断部位は全て A18 のポジション 1 箇所のみであり、切断能の強さも CCC030 より誘導体の方が強い切断能を有する結果が示された。これによりアミノ基の導入による DNA への非特異結合は否定され、更にアルキル化能が向上することも示された。



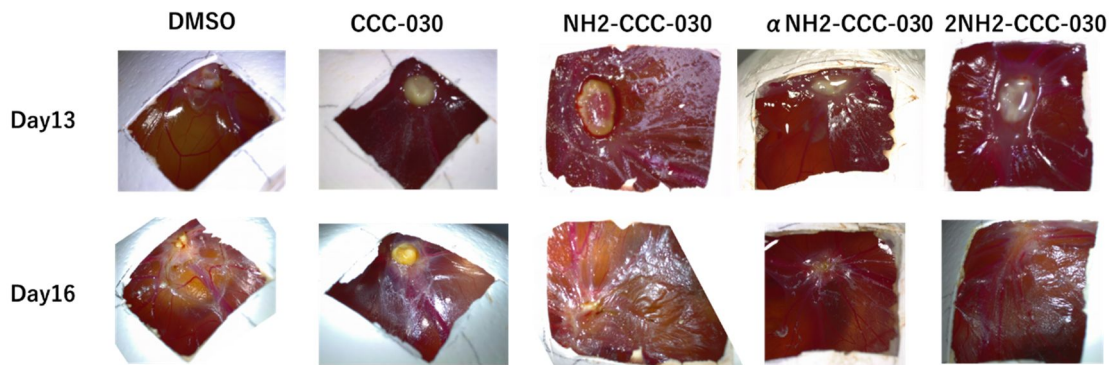
Binding affinity: 2NH₂-CCC-030-Dp > NH₂-CCC-030-Dp \approx α NH₂-CCC-030-Dp > CCC-030-Dp

正常な細胞に対する細胞毒性の評価

4 種の化合物を正常な乳腺上皮細胞 MCF-10 及びヒト線維芽細胞 HDF に投与し、72 時間後に IC₅₀ を測定したところ、MCF-10 における IC₅₀ は CCC-030 >1000 nM, NH₂-CCC-030 >1000 nM, NH₂-CCC-030 = 921 nM, 2NH₂-CCC-030 = 423 nM, HDF における IC₅₀ は CCC-030 >1000 nM, NH₂-CCC-030 >1000 nM, NH₂-CCC-030 > 1000 nM, 2NH₂-CCC-030 = 525 nM と乳癌細胞株である MCF-7 や MDA-MB-231 に比べ細胞毒性の大幅な低下が見られた。

CAM モデルにおける抗腫瘍効果の比較

CAM に MCF7 を移植し 72 時間後に化合物を 0.3mg/kg ずつ投与し、更に 72 時間後に腫瘍の大きさを比較したところ、CCC-030 ではあまり顕著な抗腫瘍効果は観測されなかったが、NH₂-CCC-030 及び NH₂-CCC-030 では腫瘍の縮小が観測され、2NH₂-CCC-030 では顕著な腫瘍の縮小が観測された。



5. 結語

以上の結果から、hTERT を標的とする抗がん剤 CCC-030 に比べてアミノ基を導入した 3 種の誘導体 NH₂-CCC-030、NH₂-CCC-030、2NH₂-CCC-030 は水溶性が高く、標的 DNA 配列に対し高い結合力や配列選択性を保持したまま強力なアルキル化能を有し、更に CAM モデルにおける強力な抗腫瘍効果を示し、アミノ基を導入することが PIP-CBI の抗がん剤の開発に有用であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hiroki Nagase, Takayoshi Watanabe, Nobuko Koshikawa, Seigi Yamamoto, Keizo Takenaga, Jason Lin	4. 巻 112-2
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 Tsuji K, Kida Y, Koshikawa N, Yamamoto S, Shinozaki Y, Watanabe T, Lin J, Nagase H, Takenaga K.	4. 巻 113-4
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 Ota Y, Yoda H, Inoue T, Watanabe T, Shinozaki Y, Takatori A, Nagase H.	4. 巻 30-16-9
2. 論文標題 Targeting anaplastic lymphoma kinase (ALK) gene alterations in neuroblastoma by using alkylating pyrrole-imidazole polyamides	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 pone.0257718
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0257718	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 N, Kida Y, Yasui N, Shinozaki Y, Tsuji K, Watanabe T, Lin J, Yamamoto S, Takenaga K, Nagase H.	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 Biochem Biophys Res Commun	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 Nobuko Koshikawa, Nanami Yasui, Yuki Kida, Yoshinao Shinozaki, Kohei Tsuji, Takayoshi Watanabe, Keizo Takenaga, Hiroki Nagase	4. 巻 0
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 1-9
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 Akiko, Matsuo Niina, Lai Xiaoyi, Inoue Takahiro, Yoda Hiroyuki, Lin Jason, Shinozaki Yoshinao, Watanabe Takayoshi, Koshikawa Nobuko, Takatori Atsushi, Nagase Hiroki	4. 巻 12
2. 論文標題 Use of DNA alkylating pyrrole imidazole polyamides for anti cancer drug sensitivity screening in pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 5821 ~ 5832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.5359	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yao Jihang, Takenaga Keizo, Koshikawa Nobuko, Kida Yuki, Lin Jason, Watanabe Takayoshi, Maru Yoshiaki, Hippo Yoshitaka, Yamamoto Seigi, Zhu Yuyan, Nagase Hiroki	4. 巻 152
2. 論文標題 Anticancer effect of a pyrrole imidazole polyamide triphenylphosphonium conjugate selectively targeting a common mitochondrial <sc>DNA</sc> cancer risk variant in cervical cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of 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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Krishnamurthy Sakthisri, Yoda Hiroyuki, Hiraoka Kiriko, Inoue Takahiro, Lin Jason, Shinozaki Yoshinao, Watanabe Takayoshi, Koshikawa Nobuko, Takatori Atsushi, Nagase Hiroki	4. 巻 112
2. 論文標題 Targeting the mutant <i>PIK3CA</i> gene by DNA alkylating pyrrole imidazole polyamide in cervical cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1141 ~ 1149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14785	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 渡部隆義
2. 発表標題 Investigation of antitumor effect of PIP-CBI derivatives containing amino group
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会 (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	高取 敦志 (Takatori Atsushi) (40455390)	千葉県がんセンター (研究所) ・ がん治療開発グループ がん先進治療開発研究室・室長 (82504)	
研究分担者	越川 信子 (Koshikawa Nobuko) (90260249)	千葉県がんセンター (研究所) ・ がん遺伝創薬研究室・主任 上席研究員 (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
---------	---------