

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09089

研究課題名(和文) TGF- β 1を標的とするポリアミドによる肝癌治療法の開発

研究課題名(英文) development of liver cancer therapy using polyamide targeting tgfb1

研究代表者

高木 恵子 (TAKAGI, Keiko)

日本大学・医学部・研究医員

研究者番号：20339328

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ラット肝癌細胞に対する実験で、TGF- β 1抑制性PIポリアミド投与後PIポリアミドの濃度とTGF- β 1の発現量の間には有意差が認められなかったが、ヒト肝癌細胞に対する実験では、あるPIポリアミドを用いたところHepG2およびHLF細胞のTGF- β 1 mRNAレベルを用量依存的に減少させ、HepG2コロニー形成を阻害した。PIポリアミドは未処理のコントロール細胞と比較してHepG2細胞の増殖を実質的に阻害しなかったが、HLF細胞の浸潤を有意に抑制し、HLEおよびHLF細胞の増殖も抑制し、HLF細胞球体の形成を有意に阻害した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、肝癌細胞株に対するTGF- β 1抑制性PIポリアミドの機能解析を行い、肝癌治療法の開発を目的としている。ヒトTGF- β 1プロモーターを標的とするPIポリアミド投与後のTGF- β 1発現量を解析し、細胞増殖、浸潤性、TGF- β 1 mRNA発現量に及ぼす影響を検討した。TGF- β 1抑制性PIポリアミドは、肝癌細胞におけるTGF- β 1発現を減少させ、細胞浸潤を抑制した。このことからTGF- β 1抑制性PIポリアミドは肝臓癌治療の新規候補薬となる可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In experiments on rat liver cancer cells, no significant difference was observed between the concentration of PI polyamide and the expression level of TGF- β 1 after administration of TGF- β 1-inhibitory PI polyamide.

However, in experiments on human liver cancer cells, the use of certain PI polyamides dose-dependently decreased TGF- β 1 mRNA levels in HepG2 and HLF cells and inhibited HepG2 colony formation. Although PI polyamide did not substantially inhibit the proliferation of HepG2 cells compared to untreated control cells, it significantly inhibited the invasion of HLF cells, also inhibited the proliferation of HLE and HLF cells, and inhibited the formation of HLF cell spheres formation was significantly inhibited.

研究分野：肝臓癌

キーワード：肝癌細胞 TGF- β 1 PIポリアミド 肝癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝癌は発癌および再発のメカニズムについて不明な点が多く、予後不良の疾患である。Transforming growth factor- (TGF-) は正常線維芽細胞が足場非依存性増殖を獲得する因子として発見されたサイトカインであり、肝癌において浸潤、転移、血管新生に際し、癌の悪性化に対して進的に働くことが報告されている。そのため、TGF- の機能を阻害することにより、癌の進行が抑制されることが期待できる。これまでに我々は配列特異的に DNA に結合するピロールイミダゾール(PI)ポリアミドを用いた遺伝子発現制御薬の開発を行ってきた。

PI ポリアミドはカリフォルニア工科大学のダーバンらにより開発された分子である。この化合物は高い親和性と特異性で二重らせん DNA 副溝に結合し、対応する遺伝子の転写を阻害する。特別なドラッグデリバリーシステムを要せず細胞内に取り込まれ、siRNA よりも安定であることから、新規の遺伝子発現制御薬として有望な分子である。PI ポリアミドの哺乳動物細胞への作用として、研究代表者らは MMP-9 抑制性 PI ポリアミドの投与によりヌードマウス脾臓に移植したヒト大腸癌細胞株の肝転移が減少することを報告した(Cancer Sci.2010; 101: 759-766.)。

2. 研究の目的

PI ポリアミドは、配列特異的に DNA と結合する性質を持つことから、ある標的遺伝子の転写調節領域を認識するよう設計された PI ポリアミドは、本来の転写因子の同領域への結合を競合的に阻害する。これまでの遺伝子発現制御剤である siRNA 等と異なり、生体内において核酸分解酵素による分解を受けずそのままの状態ですら尿中胆汁中に排泄され、また、転写因子と同等の親和力で核酸に結合することから、新規の分子標的治療薬として非常に有望な分子であると言える。以上より、PI ポリアミドを用いた治療戦略は独創的であり、TGF- が癌細胞の遊走・浸潤、血管新生に対し促進的に働くとする既存の研究から、TGF- をターゲットとした PI ポリアミドが肝癌の進展を防ぐことができ大きく期待できる。PI ポリアミドを用いた癌治療薬についてはまだ報告がなく、本研究が成功した場合は TGF- のみならず他の癌関連遺伝子をターゲットとする PI ポリアミドの開発が助長され、抗癌剤の研究・開発が大きく進むと考える。本研究では、肝癌治療法の開発を目的として、ラット及びヒト肝癌細胞株、ラット肝癌モデルに対する TGF- 1 抑制性 PI ポリアミドの機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 細胞実験

AP1 結合サイトを標的配列とし、AP1 結合サイトおよびその近傍を様々な形でカバーする 8~10 塩基認識のポリアミドを複数合成する。

ラット肝癌細胞(Fao 細胞)に TPA 処理をおこない EMT を誘導し、1nM~1 μ M の濃度の TGF- 1抑制性 PI ポリアミド投与する。TGF- および EMT マーカーの発現量を real-time RT PCR を行い PI ポリアミドの効果を調べる。

(2) ヒト TGF- 1 抑制性 PI ポリアミドの設計とヒト肝癌細胞株を用いた機能検証

ヒト TGF- プロモーター領域の転写因子結合サイトを認識する PI ポリアミドを設計する。AP1 結合サイトを標的配列とし、AP1 結合サイトおよびその近傍を様々な形でカバーする 8~10 塩基認識のポリアミドを複数合成する。

ヒト肝癌細胞株 HepG2 および HuH-7 に TPA を投与し、細胞の形態および TGF- の発現量を継続的に調べる。

上記において EMT が誘導され、かつ最も TGF- β 1 の発現量が高かった条件を選び、ヒト TGF- β 1 抑制性 PI ポリアミドによる TGF- β 1 の発現抑制効果を real-time PCR にて調べる。ポリアミド濃度は 1nM ~ 1 μ M とし、最も効果の高かった化合物、濃度を以下の実験に用いる。

ヒト肝癌細胞株に TPA を投与し、TGF- β 1 抑制性 PI ポリアミド投与群、非投与群の間で細胞増殖能、移動能、浸潤能、非足場依存性増殖能を調べる。

(3)動物肝癌モデルを用いた TGF- β 1 抑制性 PI ポリアミドの機能検証

肝癌を誘発させたラットに TGF- β 1 抑制性 PI ポリアミドを投与し、肝癌の発生・進展への影響を検証する。7 週齢の雄ラットを下記の 3 群に分け、それぞれ処理を行う。

1. DEN 投与グループ：イソフルラン (2%) 吸入による麻酔後、N-ニトロソジエチルアミン (DEN)150 mg/kg を滅菌水に溶解し、週 1 回、合計 3 回腹腔内投与を行う。

2. DEN+Vehicle 投与グループ：DEN 150 mg/kg を週 1 回、合計 3 回腹腔内投与を行う。その後、1 週毎 12 週まで溶媒対照(2mg/kg)を尾静脈投与する。

3. DEN+PI ポリアミド投与グループ：DEN 150 mg/kg を週 1 回、合計 3 回腹腔内投与を行う。その後、1 週毎 12 週まで PI ポリアミド(1mg/kg)を尾静脈投与する。

DEN 第 1 回投与日を 0 日とし、第 2 回を 7 日後、第 3 回を 14 日後とする。すべてのグループのラットは 5 頭ずつ第 77 日、第 91 日、第 105 日に炭酸ガスによる安楽死処置を行い血清、肝組織の癌部および非癌部(パラフィンブロック、凍結ブロック)を採取し、癌部・非癌部の切片を作製し、ポリアミド投与の有無により、組織像を検討し、免疫染色で調べる。

肝癌を誘発させたラットに TGF- β 1 抑制性 PI ポリアミドを投与し、生存率を調べる。

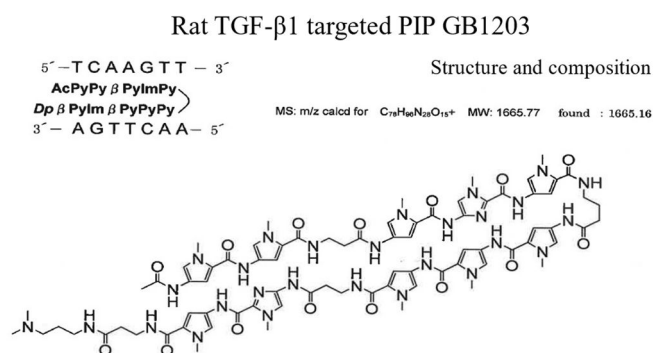
実験(3)と同じ 3 群に分けて 15 頭ずつ処理を行い、生存解析を行うため第 120 日まで観察する。第 120 日まで生存しているものについては、実験(3)と同様に安楽死処置を行う。

DEN はラット肝癌モデル作製のために比較的頻用される化学物質である。今回のプロトコールと類似した文献(Ref.1,2)によると、DEN 腹腔内投与後 84 日の時点で、直径 3mm 以上の肝癌が発生することが判っている。現在までに PI ポリアミド投与後、ラットにおける副作用は認めていない。実験(3)では、文献的に前癌病変が出現しているとされる第 77 日より比較を行う。実験(3)では、文献によると 120 日までに DEN 投与グループおよび DEN+溶媒対照投与グループで生存率 0%となるため、それまでの観察日数が必要と考えられる。

Ref.1 Hepatology 2009;49:1944-1953. Ref.2 J.Clin.Biochem.Nutr. 2011;49:31-35.

4. 研究成果

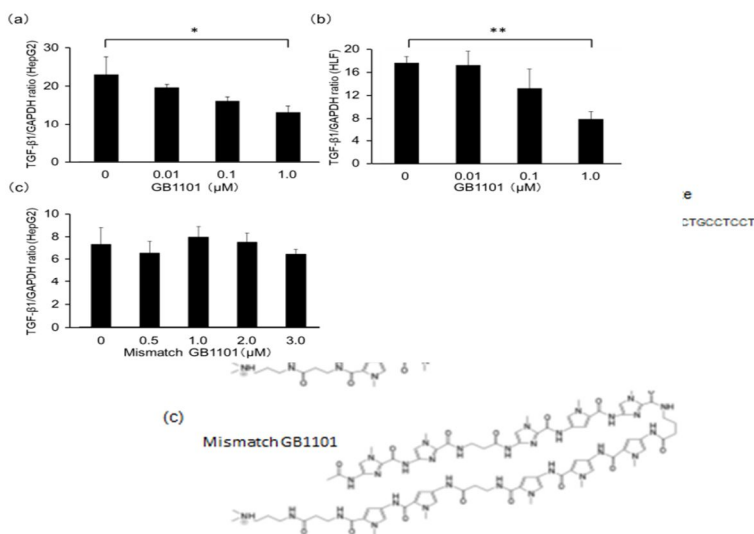
(1) ラット TGF- β 1 抑制性 PI ポリアミドの設計



PI 結合サイトおよびその近傍を様々な形でカバーする 8~10 塩基認識のポリアミドを複数合成した中から、ポリアミド GB1203 を使用した。左に示すのは GB1203 の構造である。

ラット肝癌細胞(Fao 細胞)に 1nM ~ 1 μ M の濃度の TGF- β 1 抑制性 PI ポリアミド(GB1203)を投与し、TGF- β 1 および EMT マーカーの発現量を real-time RT PCR を行い TGF- β 1 の発現量を検討したが、有意な差は認められなかった。

(2) ヒト TGF- β 1 抑制性 PI ポリアミドの設計

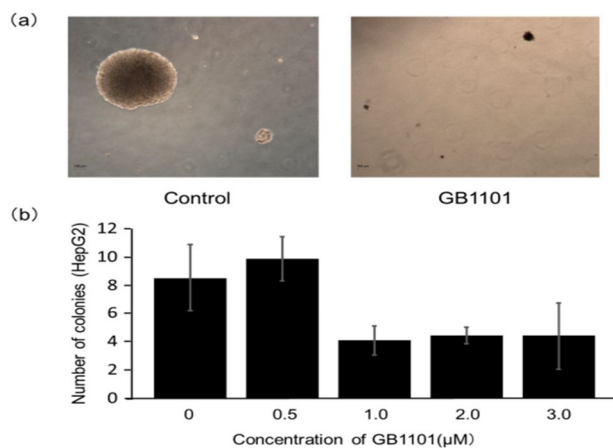


次に、AP1 結合サイトを標的配列とし、AP1 結合サイトおよびその近傍を様々な形でカバーする 8~10 塩基認識のポリアミドを複数合成した。その中から、GB1101 を使用した。a) GB1101 は、ヒト TGF- β 1 プロモーター領域 (四角で囲んだ部分) の転写開始点の上流にある FSE2 部位 (-1383~-1376) の近くの DNA 配列に結合するように設計した。(b) は GB1101 の構造および (c) はミスマッチ PI ポリアミドの構造である。

(3) HepG2 および HLF における GB1101 の効果

GB1101 投与後、HepG2 および HLF 細胞における TGF- β 1 mRNA の発現を評価した。GB1101 投与により用量依存的に TGF- β 1 mRNA 量が減少し、1 μ M GB1101 投与では、未処理の対照細胞と比較して HepG2 で(* $p < 0.05$) (a) および HLF 細胞で(** $p < 0.01$) (b) における TGF- β 1 mRNA レベルを有意に低下させた。対照的に、ミスマッチ PI ポリアミドは、コントロールと比較して HepG2 細胞における TGF- β 1 mRNA 量を変化させなかった。(c)

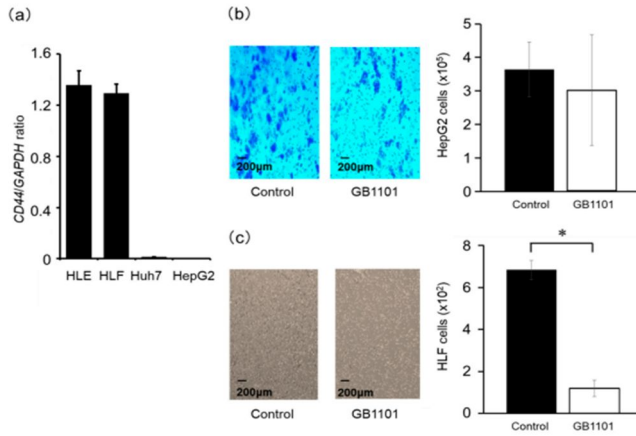
(4) 肝癌細胞(HepG2)における GB1101 の増殖抑制効果の検討



GB1101 投与により肝癌細胞の増殖を抑制できるかどうかを検討した。HepG2 細胞で GB1101 投与、非投与によるコロニーフォーメーションアッセイでは、直径 100 μ m を超えるコロニーの数を、GB1101 投与後 14 日目に測定した(a,b)。コロニーの平均数は、コントロールで 8.3 ± 2.3 、ポリアミド 0.5 μ M 投与で 9.6 ± 1.5 、1 μ M

投与で 4.0 ± 1.0 、2 μ M で 4.3 ± 0.6 、および 3 μ M で 4.3 ± 0.3 だった。コロニー形成はポリアミド投与 1~3 μ M で抑制されているように見えたが、統計的に有意差は認めなかった。しかし、これらの結果は、GB1101 が TGF- β 1 転写を阻害することによって HepG2 細胞の増殖を抑制できることを示唆した。

(5) 肝癌細胞の CD44 発現、HepG2 および HLF 細胞の浸潤能力に及ぼす GB1101 の影響

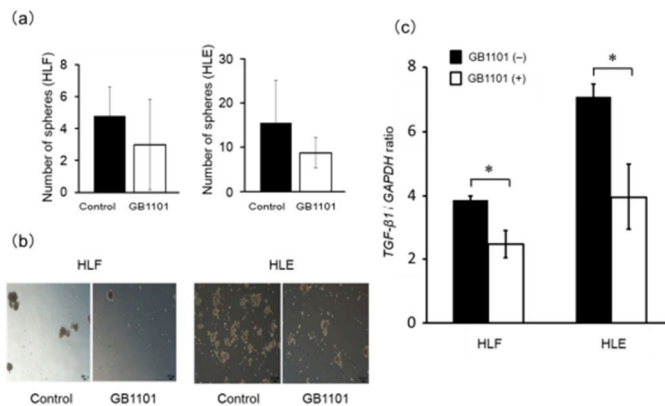


HLE および HLF 細胞は CD44mRNA を高度に発現しましたが、Huh7 および HepG2 細胞では低発現であった(a)。

次に、CD44 低発現である HepG2 および高発現である HLE 細胞の浸潤能力に対する GB1101 の影響を調べた。コントロールと比べ、

HepG2 細胞に対して GB1101 は浸潤阻害を示さなかったが(b)、3 μM GB1101 の投与は HLF 細胞の浸潤を有意に(p<0.01)抑制し(c)、GB1101 が TGF- 1 の抑制とともにがん幹細胞形成を特異的に阻害することを示唆した。

(6)HLE および HLF 細胞の球体形成に対する GB1101 の効果



1 μM GB1101 処理による HLF,HLE 細胞の球体形成アッセイでは、球体形成数は統計的に有意差を認めなかったが(a)、GB1101 投与により球体形成能が抑制される傾向がみられた(b)。さらに、GB1101 は HLF,HLE 球形細胞

における TGF- 1 の発現量をそれぞれ有意に抑制した(p<0.05)。このことは、GB1101 が肝臓がん幹細胞を阻害し、肝癌細胞の増殖を抑制できることを示し、GB1101 が肝臓癌治療の新規治療薬となる可能性を示唆した。

(7) ラット肝癌モデルを用いた TGF- 1 抑制性 PI ポリアミドの機能検証は継続した時間が取れず、施行できなかった。その実験に代わり、低分化の肝癌細胞株である HLE、HLF に対して TGF- 1 抑制性 PI ポリアミドの効果が認められたことから、ヒト肝癌で予後不良症例について TGF の高発現が認められることを予測し、ヒト肝癌肝外再発 20 症例および大腸癌肝転移 20 症例を選別し、それら癌部および非癌部より RNA を抽出し TGF の発現検討を行った。非癌部と比べて癌部での TGF の高発現を予測したが、40 症例で有意な差は認められなかった。研究途中で PCR 装置と PC が故障したため、新規に購入した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takagi Keiko, Midorikawa Yutaka, Takayama Tadatosh, Abe Hayato, Fujiwara Kyoko, Soma Masayoshi, Nagase Hiroki, Miki Toshio, Fukuda Noboru	4. 巻 25
2. 論文標題 Effects of Pyrrole-Imidazole Polyamides Targeting Human TGF- 1 on the Malignant Phenotypes of Liver Cancer Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 2883
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules25122883	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高木恵子、緑川泰、阿部勇人
2. 発表標題 Pyrrole-imidazole polyamide may be a new drug candidate for treatment of liver cancer
3. 学会等名 第56回日本肝癌研究会
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	緑川 泰 (MIDORIKAWA Yutaka) (10292905)	国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・病院 総合外科部・部長 (82611)	
研究分担者	阿部 勇人 (ABE Hayato) (10838478)	日本大学・医学部・助教 (32665)	
研究分担者	福田 昇 (FUKUDA Noboru) (40267050)	日本大学・医学部・教授 (32665)	削除：2023年10月18日

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
---------	---------