

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：27102
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K10080
研究課題名（和文）テロメアDNAを標的とした新規癌治療薬の開発（臨床試験前データの取得）

研究課題名（英文）Development of novel anticancer agent targeting telomere DNA

研究代表者
富永 和宏（Tominaga, Kazuhiro）

九州歯科大学・歯学部・特別研修員

研究者番号：40188793
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：我々はテロメアDNA構造に高い結合特異性をもつ環状アントラキノン（cyclic anthraquinone；cAQ）が、培養細胞レベルで正常細胞よりも癌細胞に対して強い増殖抑制効果を示すことを確認してきた。今回cAQの抗腫瘍効果および安全性について個体レベルで検討した。cAQはマウス個体レベルでも抗腫瘍効果を示し、かつCDDPと比較して正常組織への毒性が低く、安全性の高い新たな抗腫瘍薬開発に貢献することが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義
癌による死亡者数は年々増加しており、様々な新規癌治療薬が開発されているが、有効で、副作用が少ないという理想的な薬剤の開発に至っていないのが実情である。テロメラーゼは正常細胞では少なく、癌細胞で極めて高率に発現していることから新たな抗癌剤開発の標的として期待され、さまざまな化合物が開発されている。本研究ではテロメラーゼを標的とした新規化合物cAQについて、In vitroおよびIn vivoの系で癌に対する抗腫瘍効果および安全性について検討してきた。その結果、cAQは新規癌治療薬として有望であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We have previously confirmed that cyclic anthraquinones (cAQs) with high binding specificity to telomeric DNA structures exhibit potent growth inhibitory effects against cancer cells compared to normal cells at the cultured cell level. In this study, we investigated the antitumor effects and safety of cAQs at the organismal level. cAQs exhibited antitumor effects in mice, and showed lower toxicity to normal tissues compared to CDDP, suggesting their potential contribution to the development of safe and novel antitumor drugs.

研究分野：顎顔面外科

キーワード：テロメア テロメラーゼ 4本鎖DNA構造 4本鎖DNA 抗癌剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

テロメラーゼは細胞の不死化に大きく関連し、あらゆる癌の 80%以上に高発現しているが、正常な細胞にはほとんど発現が無い。テロメア DNA の 3' 末端は 4 本鎖構造 (G-quadruplex) を有していることが近年明らかとなったが、連携研究者である竹中らは G-quadruplex に特異的に結合するアントラキノン (AQ) の置換基を連結させた環状 AQ (cAQ) の合成に成功し、申請者らとともにそのテロメラーゼ活性阻害作用を確認した(図 1)。現在、申請者らはこの物質がきわめて高い選択性を持って癌細胞と結合し、抗腫瘍効果を発揮することを明らかにしており、新規癌治療薬として極めて有望であると考えている。

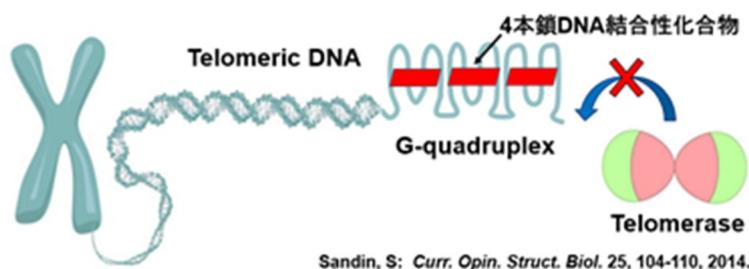


図 1. 4 本鎖 DNA 結合性化合物

4 本鎖 DNA 結合性化合物は 4 本鎖構造を安定化させテロメア反復配列をほどけなくすることで、テロメラーゼによるテロメアの伸長を阻害し抗癌効果を発揮する。

2. 研究の目的

テロメア DNA の 3' 末端側には相補鎖と対をなさない 1 本鎖部分がはみ出しており、この部分は G-quadruplex をなしている。テロメラーゼはこの G-quadruplex と結合し、活性を発現するので、この部分に特異的、競合的に結合できる化合物はテロメラーゼの活性を阻害でき、細胞の増殖を抑制すると考えられる。本研究で用いた cAQ は、4 本鎖の内テロメア DNA の 3' 末端に特徴的なハイブリッド型 G-quadruplex に特異的に結合する。この cAQ の抗腫瘍効果を *in vitro* および *in vivo* の系で確認し、新規癌治療薬開発の一助とすることが研究目的である。

3. 研究の方法

in vivo の系では cAQ の抗腫瘍効果について細胞レベルで検討した。環状アントラキノン (cyclic anthraquinone; cAQ) 誘導体は、九州工業大学の竹中らから供与を受けた。ヒト口腔癌由来細胞株 Ca9-22、SAS、HSC-2、KB および不死化ヒト細胞株 HeLa、HEK293 およびヒト正常上皮角化細胞ならびにマウス大腿骨から調整した骨髄細胞を用いた。細胞増殖試験は血球計数板による直接計測および WST-8 法により行った。遺伝子の発現は各細胞から調製した全 RNA を逆転写し、PCR およびリアルタイム PCR 法にて解析した。cAQ-mBen が細胞内で G4 DNA を認識できるかどうかを検討するために、蛍光寿命イメージング顕微鏡を使用した G4 結合剤競合アッセイを行った。G4 DNA は、G4 構造を選択的に認識する G4 蛍光プローブである o-BMVC を使用し、細胞は HeLa 細胞を用いた。

In vivo の系では cAQ の抗腫瘍効果および毒性についてヌードマウスを用いた個体レベルで検討した。5 週齢 KSN/Slc ヌードマウスの背部皮下に SAS 細胞を移植した担癌モデルにおいて、0.003 mmol/kg の cAQ、0.03 mmol/kg の CDDP または生理食塩水を隔日で計 5 回腹腔内投与し、抗腫瘍

効果を検討した。一方、非担癌マウスでも担癌モデルと同様の薬物投与を行い、毒性について生化学的及び病理組織学的に解析した。また、cAQの毒性についてラットを用いて検討した。ラットに対して麻酔下にcAQを尾静脈から投与して安全性の検討を行った。なお麻酔はイソフルランを吸入麻酔として使用した。本研究は、九州歯科大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

4. 研究成果

In vitroの系で検討した全てのcAQは用量依存的に細胞増殖を抑制した。中でもcAQ-mBenのID50値による細胞増殖抑制効果は、各細胞株におけるTERT遺伝子のmRNA発現レベルと高い関連性を示した。さらにcAQ-mBenによる細胞増殖抑制効果は、CDDPとの比較において、ヒト正常角化細胞やマウス骨髄細胞と比べて癌由来細胞株に対し、強い細胞増殖抑制効果を示した。蛍光寿命イメージング顕微鏡を使用したG4結合剤競合アッセイにおいては、HeLa細胞をcAQ-mBenで前処理した結果、核内のo-BMVC焦点の数が65%減少していた。これは、cAQ-mBenが細胞内でG4 DNAに結合できることを示していた。

In vivoの系ではcAQおよびCDDP投与群において、いずれも有意な抗腫瘍効果を認めた。一方、CDDP投与群では体重が減少し、血清生化学検査から腎臓および肝臓の機能異常が示唆されたが、cAQ投与群では対照群との相違を認めなかった。またCDDP投与群では腎臓、肝臓および精巣に既知の異常所見を認めたが、cAQ投与群による組織学的変化を認めなかった。ラットを用いた毒性実験では、投与後14日まで一般状態の観察および体重測定を行った結果、生理食塩水を尾静脈に投与した対照群と比較して明らかな異常を示さなかった。cAQはマウス個体レベルでも抗腫瘍効果を示し、かつCDDPと比較して正常組織への毒性が低く、安全性の高い新たな抗腫瘍薬開発に貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hikaru Fukuda, Shinobu Sato, Ph. D Tingting Zou, Sen Higashi, Osamu Takahashi, Manabu Habu, Masaaki Sasaguri, Kazuhiro Tominaga, Shigeori Takenaka, Hiroshi Takeuchi	4. 巻 Volume 50
2. 論文標題 Substituent effects of cyclic naphthalene diimide on G-quadruplex binding and the inhibition of cancer cell growth	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 128323
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2021.128323	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 Hikaru Fukuda, Tingting Zou, Satoshi Fujii, Shinobu Sato, Daiki Wakahara, Sen Higashi, Ting-Yuan Tseng, Ta-Chau Chang, Naomi Yada, Kou Matsuo, Manabu Habu, Kazuhiro Tominaga, Hiroshi Takeuchi, Shigeori Takenaka	4. 巻 7
2. 論文標題 Cyclic anthraquinone derivatives, unique G-quadruplex binders, selectively induce cancer cell apoptosis and inhibit tumor growth	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pnasnexus/pgad211	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 福田 晃、土生 学、高橋 理、笹栗 正明、吉岡 泉、富永 和宏、竹内 弘
2. 発表標題 異なる置換基を有する環状ナフタレンジイミド誘導体の4本鎖DNA結合能および癌細胞増殖阻害効果
3. 学会等名 第77回日本口腔科学会
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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