

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：82504

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K14756

研究課題名(和文) ミトコンドリアを標的とした塗布型がん治療薬の開発研究

研究課題名(英文) Development of skin-permeable cancer therapeutics targeting mitochondria DNA

研究代表者

山本 清義 (Yamamoto, Seigi)

千葉県がんセンター(研究所)・がん治療開発グループ がん遺伝創薬研究室・研究員

研究者番号：80783521

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)：ミトコンドリアの機能不全は疾患を引き起こす原因の一つと考えられている。皮膚透過可能なミトコンドリア制御化合物は、新たな形態のがん治療薬候補となりうる。そこで我々はピロールイミダゾールポリアミド(PIP)を基としたミトコンドリア機能を制御する塗布薬の開発を行った。そこでミトコンドリア標的と皮膚透過を両立が期待できるPIPのライブラリから、顕著な細胞毒性を示すPIPを見出した。また動物実験よりPIPが皮膚透過すること、角質の除去によって透過がさらに促進されることを明らかにした。本研究によって小分子量のミトコンドリア標的PIPは皮膚を透過して作用する化合物として期待できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の低分子創薬手法では、しばしば治療薬の開発が困難となることがある。PIPはその問題を克服可能な化合物である。また外用剤は内容剤や注射剤と比較して、全身的副作用の軽減や、薬効の持続性、薬用量の調節の容易さなど、患者への負担が軽く有用な剤形であると考えられる。本研究で開発を行った皮膚透過可能なミトコンドリア標的PIPは塗布・貼付薬として皮膚病変や全身投与治療薬への応用が期待できる。またPIPは強酸性条件下においても安定であるため、消化管表面細胞に対する経口薬としての発展も期待でき、本研究の成果が薬剤開発の分野に与えるインパクトは大きく、医療への貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial dysfunction is thought to be one of the causes of disease. Skin-permeable mitochondria-regulating compounds could be candidates for new forms of cancer therapeutics. Therefore, we have developed a mitochondria-regulating application based on pyrrole imidazole polyamide (PIP). From a library of PIPs with both mitochondrial targeting and skin permeability, we identified a PIP that exhibits significant cytotoxicity. Animal experiments revealed that PIPs permeate the skin and that the permeation is further enhanced by the removal of keratin. This study shows that small molecular weight mitochondria-targeted PIPs have potential as compounds that can penetrate the skin.

研究分野：生化学

キーワード：ピロールイミダゾールポリアミド PIP ミトコンドリアDNA ミトコンドリア標的薬

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2.

タンパク質を標的とする従来の低分子創薬手法では、しばしば治療薬の開発が困難となる。その理由として、標的とするタンパク質に薬剤結合部位を見出せないといったものや、標的類似タンパク質との選択性が得られず、目的とする効果のみを得ることができないというものがある。そのため異なるアプローチによる薬剤開発が試みられており、その代表として抗体医薬や核酸医薬のような薬剤が挙げられる。我々はこれらの問題を克服可能な分子として DNA の副溝に DNA 配列選択的に結合可能な化合物 Pyrrole-Imidazole Polyamide (PIP) に着目し研究を行ってきた。これまでにゲノム DNA 上のがんの主要なドライバー遺伝子である KRAS や MYC を標的として、PIP に indole-seco-CBI などのアルキル化剤を結合させた PIP Drug Conjugate (PDC) を合成し、PDC が有力な治療薬候補となりうることを報告した(図1)。ところでミトコンドリア内部は強い酸化ストレスにさらされているため、ミトコンドリア独自の DNA である mtDNA は常に損傷を受けており、それによってミトコンドリア機能不全が誘起され、様々な疾患の原因となると考えられている。そのため mtDNA を標的とした医薬は新たな治療アプローチとして期待されている。我々はミトコンドリアとがんの関係性について研究を行っており、変異 mtDNA を持つミトコンドリアによってがんが誘導されうることを発見した。そこで変異 mtDNA の配列を認識する PIP とミトコンドリア局在シグナルの複合化合物を合成したところ、この化合物が mtDNA ヘテロプラスミーな細胞において変異ミトコンドリア特異的なマイトファジー、さらに変異 mtDNA のみを持つホモプラスミー細胞ではマイトファジー、さらにアポトーシスを誘導することを確認している。ところで現在、外用薬として上市されている抗がん剤はほとんどない。皮膚がんの標準的な治療法は外科的切除によるものであるが、腫瘍の境界や深さの判別が困難な場合がある。軟膏や貼付剤のような外用薬を用いて治療を行うことができれば、判別の必要性がなくなるため、その開発が期待されている。一方塗布薬として使用されるためには薬剤に十分な皮膚透過性がなければならない。以上の研究背景の下、申請者は実際にミトコンドリア標的 PIP が皮膚透過性を持ち、薬剤となるエビデンスを得、さらに広く塗布可能な薬剤となりうるのかという学術的な「問い」を投げかけ、その答えを導き出すため、mtDNA を標的とした分子量 1000 程度の PIP ライブラリの構築、そしてその効果の検討によって、これらの「問い」を明らかにし、ミトコンドリア機能をコントロール可能な塗布・貼付薬候補化合物の開発を計画した。

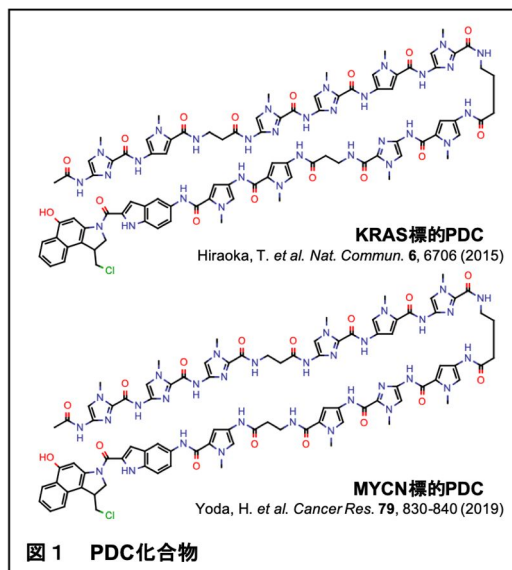


図1 PDC化合物

2. 研究の目的

本研究は mtDNA を標的とした低分子量 PIP ライブラリの構築とその評価及び、mtDNA に作用する塗布型がん治療薬の開発を目的とする。PIP は天然に存在する抗生物質である Netropsin や Distamycin A を模して合成された化合物である。これらの抗生物質は N-methylpyrrole (Py) がアミド結合によって繋がった構造を持ち、DNA の A-T リッチな配列に高い親和性を示す。PIP では一部の Py を N-methylimidazole (Im) に置換することで Im がグアニン塩基を認識し、より自由度の高い DNA 配列を標的可能となった(図2)。これまでの研究で厳密に配列を設計した PIP にアルキル化剤などの薬剤を縮合させた PDC が優れた抗がん作用を示すことを報告してきた。PIP の標的とするゲノム DNA は 30 億塩基対長の非常

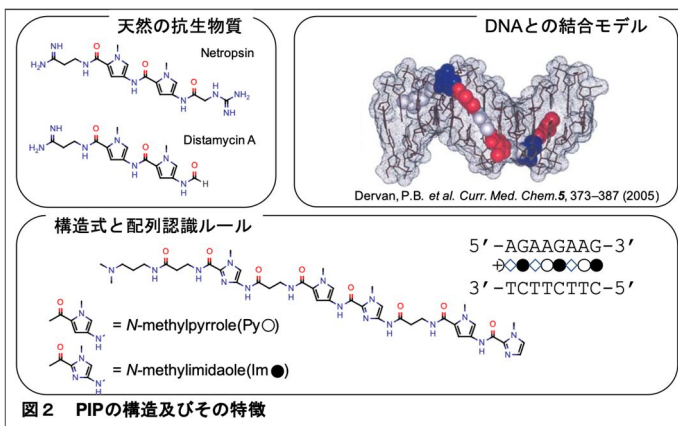


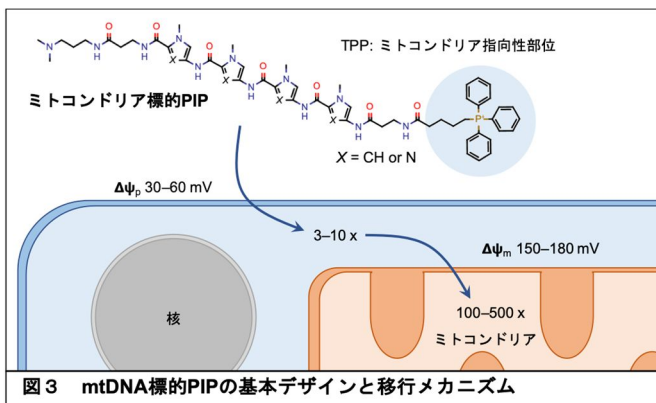
図2 PIPの構造及びその特徴

に巨大なものであり、特異性を高めるため PIP 分子も長く大きなものとならざるを得ない。一方ミトコンドリアが独自に持つ DNA (mtDNA) は 16,569 塩基対と小さく、低分子量の PIP でも十分に配列特異的に作用すると考えられる。そこで低分子量の PIP (分子量 1000 程度) が十分に作用することを示せば、この程度の分子量の化合物は皮膚を透過し、作用することが期待できるによって皮膚を透過することが期待できる。外用剤は内容剤や注射剤と比較して、患者への負担が軽く有用な剤形であると考えられるが、現在外用剤としては上市されている抗がん剤はほとんどない。本研究で開発を行う mtDNA 標的 PIP は塗布・貼付薬として皮膚病変や全身投与治療薬への応用が期待できる。

### 3. 研究の方法

#### 3.1. ミトコンドリア標的小分子量 PIP の設計と合成

PIP の基本構造を図 3 に示す。PIP の C-末端へは一般的な PIP と同様に DNA への親和性を高めるため N,N-dimethyl-1,3-propanediamine (Dp) を導入する。また PIP にミトコンドリア内膜への指向性を付与するため、細胞質 - ミトコンドリア内部間の電位差を利用した。そのため PIP の N-末端へはミトコンドリア指向性基として一般的な Triphenylphosphonium cation (TPP) を導入した構造とした。また、一般的に皮膚透過可能な



最大の分子量は 1000 程度であるとされていることから、上記の 3 つの条件を満たし、塩基配列認識能を得るため、PIP 中の Py、Im ユニット数は 3 または 4 とした 16 種類の PIP からなるライブラリを作成した (表 1) これらのミトコンドリア標的小分子量 PIP は PIP 合成法としてすでに確立された手法である Fmoc 法を用いて合成し HPLC-MS (0.1% 塩酸-アセトニトリル) で分取、確認を行った。

PIP1	Dp-β-Py-Py-Py-Py-β-TPP	PIP6	Dp-β-Im-Im-Py-Py-β-TPP	PIP10	Dp-β-Py-Py-Py-β-TPP	PIP14	Dp-β-Im-Im-Py-β-TPP
PIP2	Dp-β-Py-Py-Py-Im-β-TPP	PIP7	Dp-β-Im-Py-Im-Py-β-TPP	PIP11	Dp-β-Py-Py-Im-β-TPP	PIP15	Dp-β-Py-Im-Py-β-TPP
PIP3	Dp-β-Py-Py-Im-Py-β-TPP	PIP8	Dp-β-Py-Im-Py-Im-β-TPP	PIP12	Dp-β-Py-Im-Im-β-TPP	PIP16	Dp-β-Im-Py-Im-β-TPP
PIP4	Dp-β-Py-Im-Py-Py-β-TPP	PIP9	Dp-β-Py-Py-Im-Im-β-TPP	PIP13	Dp-β-Im-Py-Py-β-TPP		
PIP5	Dp-β-Im-Py-Py-Py-β-TPP						

N-methylpyrrole = ○ N-methylimidazole = ● Triphenylphosphonium (TPP) = ⊕ β-alanine = ◇ N,N-dimethyl-1,3-propanediamine (Dp) = ⊕

表 1 mtDNA標的PIPライブラリ

#### 3.2. ミトコンドリア標的小分子量 PIP の細胞毒性評価

合成した PIP ライブラリの評価は HeLa 細胞および HDF 細胞を用いて評価した。96well プレートに 500cell/well (HeLa 細胞) 1000cell/well (HDF 細胞) の密度で細胞を播種した。翌日、各種 PIP を 0.1 から 50 μM の濃度で添加し、5 日間培養した。その後、WST アッセイによって評価を行った。

#### 3.3. ミトコンドリア標的小分子量 PIP 細胞内局在の解明

12well プレートに 3000cell/well の密度で HeLa 細胞を播種した。翌日、PIP を 20 μM の濃度で添加し、24 時間培養した。その後、DAPI、Mito Tracker® Red、PIP 抗体を用いて細胞を染色、共焦点蛍光顕微鏡で観察を行った。

#### 3.4. ミトコンドリア標的小分子量 PIP の皮膚透過検証

マウス背部皮膚の毛を剃り、24 時間後剃った部分に DMSO (5%ラウロカプラム) PIP (DMSO、5%ラウロカプラム) を 30 μg/cm<sup>2</sup> となるように塗布した。24 時間後マウスを安楽死させた後、背部の皮膚を採取し、パラフィン封入、切片を作成した。切片を DAPI お

よび、TPP 抗体で染色し共焦点蛍光顕微鏡で観察を行った。

#### 4. 研究成果

##### 4.1. 結果

##### 4.1.1. ミトコンドリア標的小分子量 PIP の細胞毒性評価

合成した PIP ライブラリ化合物のうちどの化合物が効果を示すかどうかを WST アッセイによって評価した。その結果を図 4 に示す。まず 16 種類の PIP 化合物を 1 μM から 20 μM の濃度で HeLa 細胞を処理し、検討を行った (図 4 左)。PIP 化合物のうち、PIP1、3、10 が顕著な効果を示した。一方 PIP9 は低濃度では逆に細胞を増殖させる効果があることが示された。そこでこれらの 4 種類の PIP について 0.1 μM から 50 μM までの濃度で HeLa 細胞と HDF 細胞を用いてより詳細な毒性の検討を行った (図 4 右) 高濃度においては、すべての細胞が障害を受けた。この時 PIP を処理した細胞としていない細胞の形態を比較すると、処理した細胞は薄くなり、また顆粒状の構造が観察される老化細胞特有の形態が見られた。この変化は以前に我々が開発したミトコンドリア標的 PIP においても観察されており、今回合成した PIP でも同様の機序で作用していることが示唆された。一方 PIP9 では 1~10 μM の濃度では HeLa 細胞、HDF 細胞共に逆に細胞の増殖を濃度依存的に促す結果が得られた。また PIP3 は HeLa 細胞だけを選択的に障害することが示された。

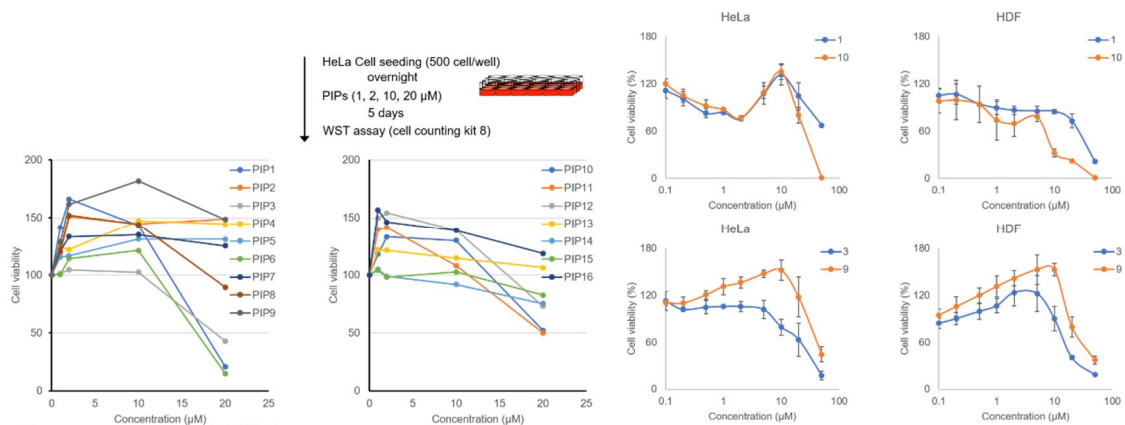


図4 PIPライブラリの細胞毒性評価

##### 4.1.2. ミトコンドリア標的小分子量 PIP 細胞内局在の解明

前述の結果より当初の期待通り PIP がミトコンドリアに作用し効果を示していることが示唆されたが、実際に PIP が細胞内でどのように分布しているかどうか免疫染色によって明らかにした。図 5 より WST アッセイ

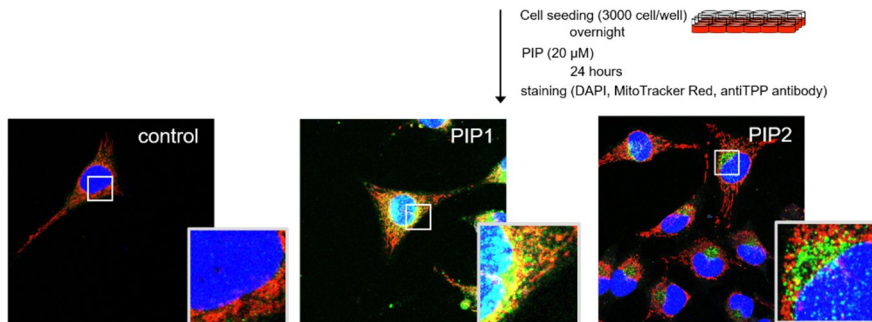


図5 PIPの細胞内局在

で効果の高かった PIP1 では PIP を示す緑色の蛍光が赤色で示されたミトコンドリアとはほぼ同一の場所に観察されており、確かに PIP1 がミトコンドリアに局在し作用していることが明らかになった。一方 WST アッセイで効果の見られなかった PIP2 はミトコンドリアへの局在が見られず、核近傍へ集積されてしまっていることが明らかになった。

##### 4.1.3. ミトコンドリア標的小分子量 PIP の皮膚透過検証

上記よりミトコンドリア標的小分子量 PIP はミトコンドリアに局在し、作用することで細胞障害性を有していることが明らかとなった。そこで次に今回の目的である PIP の皮膚透過が可能かどうかを検証した。毛を剃ったマウス背部に PIP1 (DMSO, 5%ラウロカプラム) を 30 μg/cm<sup>2</sup> で塗

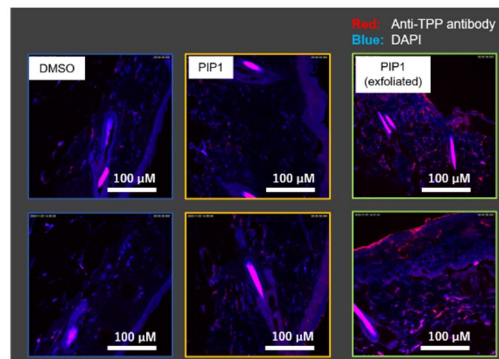


図6 PIPの皮膚透過

布し、24 時間後の皮膚を免疫染色した結果を図 6 に示した。毛根部を中心に PIP を示す赤色の蛍光が観察されており、ミトコンドリア標的小分子量 PIP が皮膚透過能を持つことが明らかとなった。また皮膚透過をさらに促進するため、除毛剤でマウス皮膚の角質を除去したのち PIP で処理を行った。その結果を図 6 右に示した。角質を除去することにより PIP の浸透性が大幅に向上し、毛根から離れた深い部分にも PIP 由来の赤色蛍光が観察された。

#### 4. 2. 考察・結果

本研究では、がんの発生の原因の一つと考えられるミトコンドリアを標的とする PIP に塗布薬として利用可能ながん治療薬の開発を目指し、皮膚透過能を付与した薬剤の開発を試みたものである。ミトコンドリア DNA に結合し、かつ皮膚透過能を持つという二つの項目を達成するため、16 種類からなる PIP ライブラリを合成し、その効果について検討を行った。WST アッセイの結果より、PIP1、3、10 が顕著な細胞障害効果を示し、PIP9 は逆に増殖を促進する効果があることが示された。また免疫染色実験より細胞障害効果を示した PIP のミトコンドリア局在性が明らかになったことから今回合成した PIP がミトコンドリアに作用し効果を示している可能性が示された。以前の研究より、ミトコンドリア標的 PIP はミトコンドリア DNA に結合し、ミトコンドリアの呼吸に必要なたんぱく質の生成を阻害することでミトコンドリアの酸化ストレスを増大させ、それによって細胞死を誘導していることが明らかとなっている。本研究で合成した PIP も処理によって以前の研究で観察されたようにミトコンドリア酸化ストレスによる細胞死が引き起こされたものと考えられる。またマウスを使った実験より PIP はそのままでは皮膚透過能力は低いものの除毛クリームで角質を除去するという簡単な手法によって大幅に透過力が高まることが明らかとなった。以上より本研究において合成されたミトコンドリア標的小分子量 PIP は皮膚を透過し、ミトコンドリアに作用してがん選択的な細胞死を誘導する薬剤としての発展が期待できることを示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------