

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461573

研究課題名(和文) 病因性ミトコンドリアDNA複製遅延によるミトコンドリア関連疾患治療の検討

研究課題名(英文) Study of mitochondria-associated diseases by pathogenic mitochondrial DNA replication delay

研究代表者

越川 信子 (Koshikawa, Nobuko)

千葉県がんセンター(研究所)・がん遺伝創薬研究室・主席研究員

研究者番号：90260249

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリア病の1種である MELAS のミトコンドリアDNA(mtDNA)異常 3243 A>G を標的に、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)化合物を複数作製した。作製した蛍光ラベルしたPIPで、処理後24時間でミトコンドリアに到達していることが判った。しかし48時間後にはミトコンドリアから排出されており、滞留時間が短かった。そこでミトコンドリアでの滞留時間を延長させ、mtDNAへのPIPの結合量を増やすことを考案し、蛍光発色するPIP-TPP化合物を合成し、投与48時間後でもミトコンドリアに局在していることを認めた。

研究成果の概要(英文)：Mitochondrial DNA (mtDNA) mutation 3243 A>G is one of the causes of MELAS. We designed Pyrrole/Imidazole polyamide (PIP) in order to inhibit this gene expression (PIP2). HeLam3243 cybrids have 3243A>G mutation, at different rates. A cybrid was treated with FITC labeled PIP2. Mitochondria were stained by FITC and were visible as dots, so were mtDNAs also stained. But FITC (equal PIP2) was eliminated from mitochondria 48 hours after treatment. In order to extend the residence time of PIP in mitochondria, triphenylphosphonium (TPP) was conjugated with fluorochrome and was introduced to the cybrid with 3243A>G mutation. Mitochondria were stained by TPP conjugated fluorochrome and kept its fluorescence for at least 48 hours on mitochondria. It is suggested that TPP conjugated compound reached mitochondria and remained bound for at least 48 hours post treatment. Then PIP conjugated TPP was synthesized (PIP-TPP). A cybrid with 3243 A>G mutation is being treated with PIP-TPP.

研究分野：腫瘍分子病理学

キーワード：病因性ミトコンドリアDNA ミトコンドリア病 PIポリアミド

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリア病はミトコンドリアの呼吸鎖の機能障害によって引き起こされる多様な疾患群である。この疾患はミトコンドリア DNA (mtDNA) または細胞核内ミトコンドリア関連 DNA の変異によって引き起こされる。多くの症例では複数の内臓器官に影響を及ぼし、重篤な神経症状と筋肉障害をもたらす。ミトコンドリア病はすべての年齢層にわたり発症する可能性がある。特に細胞核 DNA 変異によるものは幼年期に、また mtDNA 変異によるものは幼年後期または成人してから発症するといわれる。多くの患者は一連の独立した症候群 (キーンズ・サイヤー症候群、慢性進行性外眼筋麻痺、乳酸アシドーシスと脳卒中様症状を伴うミトコンドリア脳筋症 (MELAS) 赤色ぼろ線維・ミクローヌス癲癇症候群、運動失調と網膜色素変性症を伴う神経衰弱、精神運動発達遅滞、痙攣、筋緊張低下、筋力低下を伴うリー症候群 (Leigh)、糖尿病) を伴う。しかし症状は多様で、患者を一つのカテゴリーにはまとめられない。その潜在的な患者数は 10 万人当たり 9~16 人と考えられているが、明確な数は不明である。ミトコンドリア病の主な症状は近位筋障害と運動不耐性、心筋症、難聴、視神経萎縮、網膜色素変性、糖尿病があげられる。中枢神経への症状は変動性脳症、癲癇、認知症、偏頭痛、脳卒中様発作、運動失調、痙攣があげられる。このため社会生活を営む上で、患者及び家族にとってその治療、社会活動の参加への大きな足かせとなっていることが問題である。そこで、これらの複合的な症状を軽減させるための根本的な治療法が求められる。

幼少時に発症する症例の主立った mtDNA 変異に着目すると、MELAS では 3243、3271、13515、Leigh では 3243、8344、8993、9176、11778、13515 など、多彩な変異が認められる。中でも 3243 A から G : A>G (MT-TL1 遺伝子) の変異は、母系遺伝をする代表的な MELAS の他、糖尿病を引き起こす遺伝子変異として知られる。特に日本人の糖尿病患者約 700 万人の内、約 1% にこの 3243A G 変異が認められるとの報告が有る (N Engl J Med 330:962-968, 1994)。症状の多様性、患者個々による症状の軽重があるなか、mtDNA 異常に共通点がみられることは、これらの異常 mtDNA 数を抑制することが患者の QOL をあげることにつながると期待される。mtDNA は細胞内の完全な二重の生体膜内部に多数存在しており、いわゆる heteroplasmy の形で存在する。従って変異 mtDNA の複製速度を下げることによって、相対的に正常 mtDNA の数を増加させることにより、病状の緩解が期待される。MELAS において、機能喪失したミトコンドリアの構造遺伝子のコドンに核内遺伝子コドンに置き換えた遺伝子を核ゲノムに導入し、酸化リン酸化機能がある程度回復したという報

告がなされた。しかしこれは 1 細胞に数千個存在するという mtDNA の治療ではなく、例えば MELAS の 3243A>G 変異は上記のような治療戦略は適用できない病原性変異であり、他の mtDNA 変異を持つ症例においても同様のことがいえる。そこで求められるのは、いかに変異を持つ mtDNA を減らせるかということである。

2. 研究の目的

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。PIP 化合物は Peter B. Dervan、杉山らにより天然化合物ジスタマイシン、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 アラニン () 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。即ち、Py/Im ペアが GC、Py/Py ペアが AT または TA、Im/Py ペアが GC を認識する。合成した PIP は、配列特異的に DNA と結合することで DNA 結合蛋白質と 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、様々な研究に利用可能である。しかし、実験室レベルで合成が困難なため限られた研究室からのみ研究成果が発表されている。永瀬 (研究分担者) らは、この PIP の自動合成技術を確認し、任意の標的遺伝子の転写調節領域に対して配列特異的に PIP 化合物を合成し、これが任意の転写調節領域に結合し、本来の転写因子の同領域への結合を阻害することを示した。また、PIP 化合物は、これまでの遺伝子発現制御薬であるアンチセンス、リボザイム、siRNA 等と異なり、生体内においても核酸分解酵素によって分解されず、そのままの状態ですら尿中胆汁中に排泄される。このような特性から、新規の DNA への強い配列特異的結合能と共に、新規の分子標的治療薬として期待がもてる。さらに PIP 化合物は、特別な輸送担体を必要とせず DNA 特異的に結合するという特異性を有しており、しかも合成方法の向上によって安定して供給でき、比較的安価に質の高い合成物を供給できる。2015 年、我々は KRAS D12G 変異に対する新規ポリアミドアルキル化剤の作製により、同変異を持つがん細胞においてその増殖を抑制することを、*in vitro*、*in vivo* で観察しこれを明らかにした (Nature Communications, Hiraoka et al, 2015)。また、薬物動態を調べた結果、通常の薬物と同様にふるまうことが確認され、動物実験において安全性の高さが確認された。この PIP 化合物を応用し、変異 mtDNA の複製を特異的に遅延する方法を開発すれば、このミトコンドリア病という難治性疾患を持つ患者にとって有効な治療手

段になると期待でき、その意義は大きいと考えられた。さらに、PIP 化合物は種々の薬剤とコンジュゲートを作製できるため、ミトコンドリア病で問題となる ROS の高発現に対し、抗酸化剤を、また、既に治療に使用されている taurine の効率的、低濃度処理を局所的に起こすことも可能となる。この方法を用いることにより、核内・核外の変異ミトコンドリア遺伝子の制御による治療法の開発を検討することを意図した。

3. 研究の方法

ミトコンドリア病、MELAS の遺伝子変異 3243A>G は tRNA^{Leu(UUR)} を標的として PI ポリアミド(PIP)を合成した。また、PIP に FITC 標識した FITC-PIP を作製し、3243 A>G 変異 DNA を異なる割合でもつ HeLa 細胞由来の cybrid HeLamt3243 55%、HeLamt3243 82%、HeLamtN44 (HeLa 細胞の正常 mtDNA を有する)細胞に対し、同 PIP を処理し細胞内の PIP の動態を観察した。また、HeLamt3243 55%に対し PIP 処理を長期間行い、異常 mtDNA の発現変化の有無を検討した。3243 A>G 変異 DNA をもった DNA では、制限酵素 Apal による切断部位が生じる。そこで 3243 A>G 変異を同定するため、細胞から RNA を抽出し PCR で増幅後、Apal で切断されたバンドの有無により異常 DNA の有無を判定した。

4. 研究成果

ミトコンドリア病に関連する病因性mtDNA

部分を標的としたPIP化合物の作製 標的遺伝子としてMELASのmtDNA病原性変異塩基 3243 A>Gを含む領域数カ所を選び出し、我々の開発した手法によりPIP化合物を複数合成した。

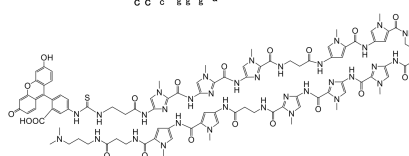
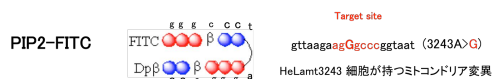
[標的候補となる塩基配列と変異 tRNA^{Leu(UUR)} (3230-3304) 3243A>G 変異]

gttaagatggcag(A/G)gcccggtaatcgcataaaa
cttaaaactttacagtcagaggttcaattcctc

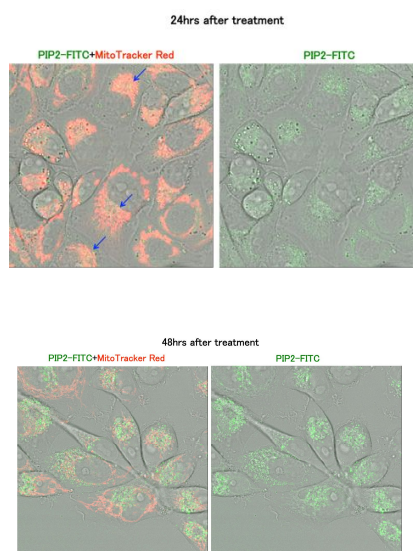
標的塩基 (tggcagGgccc: 変異ミトコンドリア DNA 配列) に対して合成する PIP 化合物の候補の構造 (hairpin 型) を複数作製した。

PIP 化合物のミトコンドリアへの局在の検討

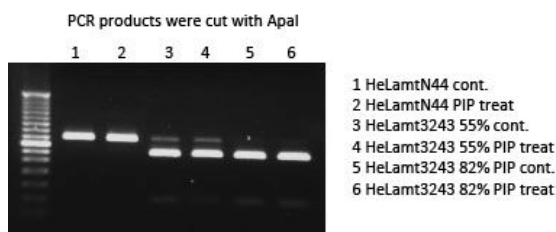
正常型ミトコンドリア DNA 塩基配列に対する PIP 化合物を作製し FITC 修飾した。



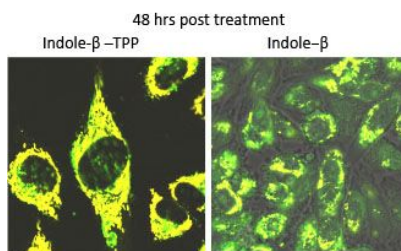
作製した蛍光ラベルしたPIPのうち1種類で、処理後24時間でミトコンドリアに到達しており、mtDNAにも達しているドット上のマージ像が観察された。



しかし48時間後にはミトコンドリアから排出されており、滞留時間が短いことが判った。そこでミトコンドリアでのPIPの貯留量を増やすため、50日間1 μMを連続投与した。半定量 PCR 後、Apal 制限酵素による切断実験で、変異 mtDNA の顕著な量的変動は認められなかった。



この結果は、PIPのミトコンドリア内での滞留濃度の低さのためではないかと推察した。そこで、mtDNA へのPIPの結合量を増やすには、ミトコンドリア内のPIP濃度を高い状態を維持することが必要ではないかと思われた。そのために脂溶性カチオンである triphenylphosphonium (TPP)をPIPにコンジュゲートすることを勘案した。TPPは膜電位の違いから、細胞膜に比べミトコンドリア内膜に50-100倍の結合能を示す物質であり、小分子のミトコンドリアへの送達に用いられている。そこで、蛍光発色する構造をPIPに結合した化合物(Indole-β-TPP)を作製した。同化合物をHeLa mt3243 82%細胞に投与したところ、投与2時間めからミトコンドリアに局在し始め、48時間後でミトコンドリアに完全に局在していることを認めた。そこで、TPPにPIPをコンジュゲートした化合物を作製し、HeLamt3243 55%のcybridに長期間48時間毎に新鮮化合物を投与し変異mtDNA量の変化があるか否かを現在検討中である。



赤：Mitotracker 緑：Indole-β merge：黄色

48時間処理で、Indole-β-TPP では完全にミトコンドリアと merge しているのに対し、Indole-β では核にも入っていることが観察される。

mtDNA は1細胞内に数千コピーが存在する。その中で変異 mtDNA の割合が高い場合、臨床症状が現れるとされている。そこで、この変異 mtDNA の割合を減少させ、相対的に正常 mtDNA 量を増加することにより、症状の緩和が可能であると考えられる。今回、PIP がミトコンドリアに送達されたことは明らかとなった、しかし、そのミトコンドリアでの滞留時間(貯留量)の短さが、変異 mtDNA 減少までに至らなかったと考えられる。そこで、TPP に PIP を結合させた化合物により、より大量の PIP を長時間ミトコンドリア内に滞留させることによって、変異 mtDNA 減少を誘導

することを企画した。TPP は明らかにミトコンドリアに到達し、かつ、48時間を経て完全にミトコンドリア局在していることから、PIP の結合により、TPP-PIP はミトコンドリア内に長期に局在することが想定される。現在行っている PIP-TPP の長期処理による変異 mtDNA への PIP の結合とその影響に期待したい。さらに、Indole-TPP に MELAS に大量投与し効果を得ている taurine を結合し、低濃度で 3243 A>G を持つ細胞での complex I, II, III 活性が正常に近づくか否かを検討したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Hiraoka K, Inoue T, Tayler RH, Watanabe T, Koshikawa N, Yoda H, Shinohara K, Takatori A, Sugimoto H, Naru I, Denda T, Fujuwara K, Balmain A, Ozaki T, Bando T, Sugiyama H, Nagase H: Inhibition of KRAS codon12 mutants using a novel DNA-alkylating pyrrole-imidazole polyamide conjugate. Nature Communications, 27:1-8, 2015. Doi:10.1038/ncomms7706

〔学会発表〕(計 1 件)

K Hiraoka, T Inoue, H yoda, A Takatori, T Watanabe, N Koshikawa, T Ozaki, H Nagase: A novel alkylating pyrrole-imidazole polyamide, KR12, specifically recognized mutant KRAS genes and potently induces cell death. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2015. April 22, 2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pref.chiba.lg.jp/gan/kenkyu/o/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

越川信子 (KOSHIKAWA Nobuko)

千葉県がんセンター研究所・がん遺伝創薬研究室 主席研究員

研究者番号：90260249

(2) 研究分担者

渡部隆義 (WATANABE Takayoshi)

千葉県がんセンター研究所・がん遺伝創薬研究室 研究員

研究者番号：60526060

永瀬浩喜 (NAGASE Hiroki)

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
研究者番号： 90322073

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()