

[研究報告書]

平成27年度猪之鼻奨学会研究補助金による研究報告書

1. 分子標的アルキル化剤の機能性の向上を指向した分子設計

千葉県がんセンター研究所 研究員
渡 部 隆 義

はじめに

ピロールイミダゾールポリアミド (PIP) は2本鎖DNAの副溝へ配列特異的に結合することが知られ、標的遺伝子の発現制御薬剤として多く研究が行われている。当研究室ではPIPにDNAのアデニンのN3位にアルキル化を引き起こすindole-seco-CBIを縮合することでPIPのDNA配列認識能とCBIによるDNAのアルキル化を協働的に行うPIP-CBIを開発している。例えば変異性がん原遺伝子であるKRASのコドン12のGAT, GTT変異配列を認識し、特異的に結合するように設計した新規アルキル化剤PIP-CBIはKRASコドン12の変異配列を持つ大腸がん細胞株では、IC50が50nM前後という強力な殺細胞能を有するが、KRAS野生型の細胞では変異株に比べて細胞増殖抑制効果が低く、変異株に対する選択性が確認されている。さらにIn vivoにおける腫瘍増殖抑制能について検討したところ、ヌードマウスにKRAS野生型であるHT29, KRAS変異株であるLS180及びSW480のXenograftモデルを作成し、PIP-CBIを投与すると野生型のHT29では腫瘍増殖抑制能は観測されなかった。しかし、変異株であるLS180及びSW480では有意な腫瘍抑制能が観測された。以上の結果から、PIP-CBIは変異性がん原遺伝子に対する強力な発現抑制能を有することが示された[1]。

上記の研究を元に、本研究ではドライバーオンコジーンを標的とするPIP-CBIに対してγターンにNHAc基を導入したものを導入し細胞毒性の向上を目指すとともに、PIP-CBIにビオチン標

識を導入した誘導体を合成しChemi-seq法による細胞内でのPIP-CBI結合配列認識の検出法の開発を行った。

方 法

PIP-CBI-NHAcの合成

5塩基認識のPIPのγ-アミノ酪酸ターンのα位に-NHAc基を導入するとDNAへの結合力が向上し、特異性が上昇することが報告されている[2]。そこでPIP-CBIにアセトアミド基を導入し、DNAへの結合力の向上を狙ったPIP-CBI-NHAcの合成及び細胞障害活性を検討した。マウスに対する毒性試験を行った。PIP-CBI-NHAcの合成はBoc-γアミノ酪酸を用い通常の固相合成によりPIP-CBIを合成したのちに20% TFA/DCMでγターン部位のBOC基を除去し、フリーとなったNH₂基に無水酢酸を室温で15分間処理することでアセトアミド基を導入した目的化合物PIP-CBI-NHAcを合成した。

細胞培養

ヒト大腸がん由来の細胞株, SW480 (12V/12V) はDulbecco's modified Eagle's培地に不活化10%の牛血清, 100U/mlのペニシリンと100mg/mlのストレプトマイシンを加え維持した。

PIP-CBI-NHAcの細胞毒性試験

合成したPIP-CBI-NHAcの抗腫瘍効果を検討するために、SW480細胞を96穴培養プレート上で培養し、細胞が1 × 10⁵個に達した時点でPIP-CBI及びPIP-CBI-NHAcをそれぞれ0.1nM, 1nM, 10nM, 100nM, 1000nM投与し、投与後48時間後にWSTアッセイによりIC50を測定した。

マウスに対する毒性試験

合成したPIP-CBI-NHAcのマウスに対する毒性を調べるために、ICRマウスに対し、PIP-CBI及

びPIP-CBI-NHAcをそれぞれ3 mg/kgずつ投与し投与後24時間後に剖検し肝機能の影響、栄養マーカーである総タンパク質量、尿素量、トリグリセロイド量を測定した。

PIP-CBI-biotinの合成

Biotin修飾がなされたPIP-CBI-biotinの合成を行うために、通常の固相合成によりPIP-CBIを合成したのちにN末端にbiotinとPyBOP及びDIEAを加え2時間反応させることで目的化合物PIP-CBI-biotinを合成した。

PIP-CBI-biotinを用いたChem-seq法

1.0×10^{-5} 個のLS180細胞にPIP-CBI-biotinを100nM投与し、24時間後に細胞を破碎しQIAamp DNA Mini KitでDNAを1.5mLチューブに回収する。次にアビジンコーティングされた磁気ビーズに100 μ Lの10mMTris-HCl (pH7.5), 0.5mMEDTA, 1M NaCl, 0.05% Tween20を加え10秒間攪拌する。攪拌後、磁気スタンドに設置し1分間静置後、ピペットで上清を除き、DNAサンプルを加え攪拌した。攪拌後、チューブを60分間転倒混和し、上清を除去し、100 μ Lの10mMTris-HCl (pH7.5), 0.5mMEDTA, 1M NaCl, 0.05% Tween20を加えピペッティングで攪拌した。攪拌後、上清を除去しTE緩衝液を20 μ L加え攪拌しDNA溶液を作成する。作成後、90 $^{\circ}$ C 5分間加熱しDNAとPIP-CBI-biotinを分離させ、PCRにてDNA断片を増幅し、DNAシーケンサーで配列を決定した。

結 果

PIP-CBI-NHAcの抗腫瘍活性及びマウスに対する毒性試験

PIP-CBI-NHAcとPIP-CBIの細胞毒性の比較の為にSW480に対するIC50を求めたところ、それぞれ15nM及び57nMと、PIP-CBI-NHAcの方が高い細胞毒性を得られた。次にPIP-CBI-NHAc及びPIP-CBIのマウスに対する毒性を検討するために、3 mg/kgのPIP-CBI-NHAcとPIP-CBIをそれぞれ尾静脈投与し、24時間後剖検したところ、どちらの化合物を投与したマウスにおいて肝機能障害及び腎機能障害は検出されなかったが、PIP-CBI-NHAcを投与したマウスにおいて栄養マ-

ーカーである総タンパク質量及びトリグリセロイドが有意に減少し摂餌障害を起こしていた。

PIP-CBI-biotinを用いたChem-seq法

合成したPIP-CBI-biotinをLS180細胞に投与し、24時間後に細胞を回収し、ライセートからDNAを精製したものに磁気ビーズを加えたところ、PIP-CBI-biotinが結合したDNA断片が回収された。このDNA断片を次世代シーケンサーにて配列を決定したところ、目的のPIP-CBI-biotinの結合配列が検出された。

考 察

今回合成したPIP-CBI-NHAcは従来のPIP-CBIに比べ高い細胞障害性を示したが、残念ながらマウスに対し栄養障害が観測された。そのため、今後はPIP-CBI-NHAcの持つ高い細胞障害性を保ちつつ、動物への毒性を下げるような誘導体を模索する必要がある。

また、同時に合成したPIP-CBI-biotinを用いることで細胞内でのDNAの標的配列を検出することが可能になった。今後はマイクロアレイ解析とバイオインフォマティクスにより結合配列と遺伝子発現の相関性を検討する。

文 献

- 1) Hiraoka K, Inoue T, Taylor RD, Watanabe T, Koshikawa N, Yoda H, Shinohara K, Takatori A, Sugimoto H, Maru Y, Denda T, Fujiwara K, Balmain A, Ozaki T, Bando T, Sugiyama H, Nagase H. Inhibition of KRAS codon 12 mutants using a novel DNA-alkylating pyrrole-imidazole polyamide conjugate. *Nat Commun* 2015; 6: 6706.
- 2) Yang F, Nickols NG, Li BC, Szablowski JO, Hamilton SR, Meier JL, Wang CM, Dervan PB. Animal toxicity of hairpin pyrrole-imidazole polyamides varies with the turn unit. *J Med Chem* 2013; 56: 7449-57.