

学位論文の要約

題目 Development of Cyclic and Hairpin Pyrrole-Imidazole Polyamides for Specific Recognition of Disease-Associated DNA Sequences
(疾患関連 DNA 配列を特異的に認識する環状およびヘアピン型ピロール-イミダゾールポリアミドの開発)

氏名 廣瀬 優希

0. Introduction

DNA は生命の設計図とも言われ、遺伝情報の本質を担う。「DNA⇒RNA⇒タンパク質」の流れはセントラルドグマと言われ、その異常は様々な疾患の原因となる。それらの疾患の治療のため、DNA に結合する分子が多く開発されてきた。本研究で用いたピロール・イミダゾールポリアミド (PIP) はその1つであり、アミド結合でつながった *N*-メチルピロールと *N*-メチルイミダゾールの配列によって塩基配列特異的に DNA の副溝に結合する。その高い特異性・結合能を活かし、特定の遺伝子の転写を制御する薬剤などとして研究が進められてきた。本研究ではがんや神経変性疾患などの疾患に関連する DNA 配列を特異的に認識する PIP の開発と活性評価を行った。以下で各章の詳細を述べる。

1. Control of Forward/Reverse Orientation Preference of Cyclic Pyrrole-Imidazole Polyamides

これまでの研究においては逆平行のピロール-イミダゾール配列を γ -アミノ酪酸 (γ -ターン) でつないだヘアピン型 PIP (hPIP) が主に用いられてきた。一方で2つの γ -ターンを用いて環化された環状 PIP (cPIP) が hPIP と比べて高い結合能と配列特異性を示すことが報告されており、hPIP よりも優れた薬剤としての応用が期待されたが合成効率の悪さから研究があまり進んでいなかった。本研究ではまず cPIP の合成上の課題であった分子内環化反応の改善を行い、縮合剤、塩基、溶媒にそれぞれ FDPP、DIEA、DMF を用いることで従来3日間かかっていた反応を最短18時間に短縮することができた。次にその手法により数種類の cPIP を合成しそれらの DNA 結合能を評価することで cPIP の配列特異

性を向上する設計を確立した。PIP は N 末端が DNA の 5'末端を向くフォワード結合様式 (5'-3'/N-C) で結合すると考えられているが、いくつかの PIP は N 末端が DNA の 3'末端を向くリバース結合様式 (5'-3'/C-N) を好み、意図しない結合を引き起こすことがある。本研究では cPIP の γ -ターン上にアミノ基を導入することで結合様式を制御することを試みた。その結果、アミノ基を持たない cPIP と γ -ターンの β 位にアミノ基を持つ cPIP がわずかな結合様式選択性しか示さなかったのに対し、アミノ基を α 位に導入した cPIP は R 体のものがフォワード、S 体のものがリバース様式で選択的に結合した。この結果は γ -ターン上のアミノ基の位置によって cPIP の結合様式を制御できることを示しており、より配列特異的な cPIP の設計が可能になるだけでなく PIP の標的 DNA 配列の数を拡大できる可能性がある。

2. Strong and Specific Recognition of CAG/CTG Repeat DNA (5'-dWGCWGCW-3') by a Cyclic Pyrrole-Imidazole Polyamide

本研究では cPIP を疾患治療に応用するため、ハンチントン病や筋強直性ジストロフィー I 型などの神経変性疾患の原因となる CAG/CTG 反復配列を標的とした cPIP を開発した。異常伸長した CAG/CTG 反復配列は転写・翻訳されて異常な mRNA やタンパク質を生じる。cPIP が異常伸長した配列に結合して転写を抑制することで異常な mRNA やタンパク質の発現を抑え、病態の改善につながると期待した。まず、PIP による二本鎖 DNA の安定化を測定する DNA 融解温度測定や SPR 測定により、cPIP の強い結合能が示された。 $(\Delta T_m = 51.2\text{ }^\circ\text{C}, K_D = 13\text{ pM})$ また、DNA 融解温度測定により、CAG/CTG 反復配列が形成する A-A もしくは T-T ミスマッチを含むヘアピン構造にも cPIP が強く結合することが示された。さらに、ビオチン化 cPIP とランダム配列を持つ DNA を混合し、cPIP に結合した配列のみを抽出して次世代シーケンシングを行うことにより得られた cPIP の結合モチーフが標的配列とほぼ一致し、cPIP の高い配列特異性が示された。この cPIP が想定通り遺伝子発現を抑制するか調べるため、ハンチントン病患者由来細胞株に cPIP を処理した際の、ハンチントン病の原因となる *HTT* 遺伝子の発現変化を半定量 RT-PCR によって評価した。その結果、cPIP が正常 mRNA の発現には影響を与えずに異常伸長型 mRNA の発現を選択的に抑制することが分かった。これらの結果からこの cPIP は疾患の原因となる異常遺伝子の特異的に抑制する薬剤として期待できる。

3. Evaluation of the DNA Alkylation Property of a Chlorambucil-Conjugated Cyclic Pyrrole-Imidazole Polyamide and Evaluation of the Cellular Uptake of Fluorescently Labeled PIPs

DNA アルキル化剤などの機能性分子を付加した PIP は配列特異的な遺伝子スイッチとして用いられる。そこで本研究では cPIP に DNA アルキル化剤クロラムブシル (Chb) を付加した cPIP-Chb を開発した。まず、キャピラリー電気泳動を用いて cPIP-Chb による DNA アルキル化部位を調べる手法を確立し、cPIP-Chb が標的配列周辺で DNA を hPIP-Chb よりも強くアルキル化することを確認した。また、HPLC と MALDI-TOF MS を用い cPIP-Chb のアルキル化部位の詳細な解析を行ったところ、cPIP-Chb がキャピラリー電気泳動の結果から予測される部位のアデニンの N3 位をアルキル化していることが明らかになった。さらに、cPIP-Chb は前立腺がん細胞に対して高い抗がん活性 (IC₅₀: 93 nM) を示した。しかし、アルキル化評価の結果に反して、その抗がん活性は hPIP-Chb と同程度であった。これは cPIP の細胞透過性の低さが原因と考えられたため、FITC でラベルした hPIP および cPIP を用いて細胞取り込みの評価を行った。共焦点顕微鏡による観察の結果、予想通り cPIP-FITC は hPIP-FITC よりも核からのシグナルが弱く、細胞取り込み効率の低さが cPIP の細胞内活性を低下させていることが示唆された。また、フローサイトメトリーを用いて PIP-FITC の細胞取り込み機構を調べたところ、PIP-FITC が複数のエンドサイトーシス経路を介して細胞に取り込まれていることが示唆された。cPIP-FITC の細胞取り込み改善のため、NMR による構造予測や MD シミュレーションの結果に基づいた疎水性修飾の導入や、エンドソーム脱出の促進についての検討も行った。

4. Anticancer Activities of DNA-Alkylating Pyrrole-Imidazole Polyamide Analogs Targeting RUNX Transcription Factors against p53-Mutated Pancreatic Cancer PANC-1 Cells

上述のように PIP-Chb は配列特異的な DNA アルキル化剤として用いられてきた。例えば、RUNX 転写因子の結合配列を標的とした hPIP-Chb、**Chb-M'** (hPIP-Chb **1**) は RUNX の標的遺伝子の発現を抑制し、p53 依存的なアポトーシスを誘導して抗がん活性を示すことが報告されている。本研究では **1** に加えて、**1** とは異なる結合様式で同じ配列を認識する hPIP-Chb **2-4** の DNA アルキル化能および、p53 変異を持つすい臓がん細胞 PANC-1 に対する抗がん活性を評価した。ま

ず HPLC を用いた DNA アルキル化能の評価を行ったところ、RUNX 結合配列をリバース様式で認識する hPIP-Chb 3 が特に優れたアルキル化能を示した。続いて PANC-1 細胞を hPIP-Chb 1-3 で処理したところ、これらの化合物が PANC-1 細胞のアポトーシスを誘導することが分かった。このメカニズムを調べるため、RT-qPCR およびタンパク質アレイを用いた評価を行った。その結果、hPIP-Chb によって RUNX の標的遺伝子の 1 つで p53 の分解を促進する *BCL11A* の発現が抑制されることと、リン酸化された p53 タンパク質の量が増加することが明らかになり、p53 依存的なアポトーシス経路が活性化されていることが示唆された。また、p53 以外の経路についても評価を行った結果、p53 ファミリーの 1 つである p73 遺伝子の発現の増加が確認され、p73 依存的なアポトーシス経路の寄与が示唆された。最後に、PANC-1 を移植したマウスを用いて活性を評価したところ、hPIP-Chb 2 と 3 (1 mg/kg) が既存薬のゲムシタビン (50 mg/kg) と同等の抗がん活性を示した。特に hPIP-Chb 3 は 5 mg/kg の投与量でも体重減少を引き起こさなかった。これらの結果は RUNX 標的 PIP-Chb が悪性度の非常に高いすい臓がんに対する新たな薬剤として期待できることを示唆している。また、全体の半数のがんが p53 変異を有しており、RUNX 標的 PIP-Chb が p53 変異を持つ PANC-1 細胞に活性を示したことは幅広い種類のがんに応用可能な抗がん剤の開発につながると期待できる。