

京都大学	博士 ( 理学 )	氏名	廣瀬 優希
論文題目	<b>Development of Cyclic and Hairpin Pyrrole-Imidazole Polyamides for Specific Recognition of Disease-Associated DNA Sequences</b> (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)		
(論文内容の要旨)			
<p><b>序論</b></p> <p>DNAは生命の設計図とも言われ、遺伝情報の本質を担っている。本研究で用いられたピロール-イミダゾールポリアミド (PIP) は、アミド結合でつながった<i>N</i>-メチルピロールと<i>N</i>-メチルイミダゾールの構成に基づいて、塩基配列特異的にDNAマイナーグループに強く結合する特性を有している。申請者は、本研究においてがんや神経変性疾患などに関連する遺伝子配列を特異的に抑制するPIPの開発と活性評価を行った。</p> <p><b>1. <u>Control of Forward/Reverse Orientation Preference of Cyclic Pyrrole-Imidazole Polyamides</u></b></p> <p>従来の研究において、逆平行のPIP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。申請者は、まず環状PIP (cPIP) の合成上の課題であった分子内環化反応条件の改善を行い、次に数種類のcPIPを合成した。それらのDNA結合能を比較評価することで、cPIPの配列特異性を向上する設計を確立した。重要なのは、γ-ターン上のα位に導入したcPIPは、<i>R</i>体のものがフォワード、<i>S</i>体のものがリバース様式で選択的に結合することを見出した点である。これらの結果は、γ-ターン上のアミノ基の<i>R/S</i>不斉によって、cPIPの結合様式を制御できることを示している。</p> <p><b>2. <u>Strong and Specific Recognition of CAG/CTG Repeat DNA (5'-dWGCWGCW-3') by a Cyclic Pyrrole-Imidazole Polyamide</u></b></p> <p>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治療にcPIPを応用するため、それらの疾患原因となるCAG/CTG反復配列を標的配列に設定した。cPIPを用いたDNA融解温度測定やSPR測定によって、cPIPの非常に強いDNA結合能が示された (<math>\Delta T_m = 51.2^\circ \text{C}</math>, <math>K_D = 13 \text{ pM}</math>)。また、CAG/CTG反復配列が形成するA-AもしくはT-T mismatchesを含むDNAヘアピン構造に対しても、cPIPが強く結合することが明らかとなった。次いで、ビオチン化したcPIPを合成し、結合したDNAのみを抽出して次世代シーケンシング解析を行うことによって、CAG/CTG反復配列配列に対して優位な結合モチーフを示す解析データが得られた。このcPIPのハンチントン異常遺伝子の発現抑制能を調べた結果、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を確認した。</p>			

### 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

これまでにDNAアルキル化剤を付加したhPIPの配列特異的な遺伝子スイッチとしての応用例が報告されている。申請者は、cPIPにDNAアルキル化能を持つ抗がん剤としてよく知られているクロラムブシル (Chb) を付加したcPIP-Chbを新たに合成した。キャピラリー電気泳動を用いてDNAアルキル化損傷部位を確認することで、合成したcPIP-ChbがhPIP-Chbよりも標的配列周辺で強くDNAをアルキル化することが明らかとなった。また、cPIP-Chbの細胞透過性を解析評価するため、FITCでラベル化したhPIPやcPIPを合成して、細胞取り込み能の比較評価を行った。共焦点顕微鏡による観察の結果、cPIP-FITCは、hPIP-FITCよりも核からのシグナルが弱く、低い細胞取り込み効率が示唆された。さらに、フローサイトメトリーを用いて各種PIP-FITC誘導体の細胞取り込み機構を調べたところ、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。研究の一環として、細胞取り込み改善に向けて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、エンドソームからの放出促進等の検討も進めた。

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

様々な hPIP-Chb 誘導体が配列特異的な DNA アルキル化剤として開発されている。特に、RUNX 転写因子の結合配列を標的とする Chb-M' と呼ばれる誘導体は、多くの RUNX 関連遺伝子の発現を抑制し、p53 依存的なアポトーシスを誘導することが報告されている。本研究では Chb-M' とは異なる結合様式で同じ標的配列を認識する新規 hPIP-Chb 誘導体を合成し、それらの DNA アルキル化能、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 Chb-M' と比較評価した。HPLC を用いて DNA アルキル化能の評価を行ったところ、新しく合成した誘導体の一つに優れたアルキル化能を見出した。これらの誘導体が PANC-1 細胞のアポトーシスを誘導することが明らかとなり、抗がん性に関するメカニズムを解析した。その結果、hPIP-Chb によって RUNX の関連遺伝子の 1 つで p53 の分解を促進する *BCL11A* の発現が抑制されていることと、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った。また、PANC-1 を移植したマウスを用いて活性を評価したところ、新しく合成した誘導体 (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すことを確認した。また過剰な誘導体の投与量 (5 mg/kg) でもマウスの体重減少が確認されなかった。ヒトの約半数のがん細胞は p53 変異を有しており、p53 変異を持つ PANC-1 細胞において RUNX 標的 PIP-Chb 誘導体が有効性を示したことは重要であり、幅広い種類のがんに対する抗がん剤としての応用が期待される。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

DNAからタンパク質の流れはセントラルドグマとも言われ、遺伝子発現の異常は様々な疾患の原因となる。それらの疾患治療を目指し、様々なDNA結合性分子が開発されてきた。申請者は、ピロール-イミダゾールポリアミド (PIP) の高いDNA塩基配列特異的な結合性を活かし、特定遺伝子の転写を制御する薬剤開発を目指して研究を進めた。

2つの $\gamma$ -ターンを用いて環化された環状PIP (cPIP) は、高い結合能と配列特異性を示すことが報告されていたが、合成効率の低さが問題であった。申請者は、縮合剤、塩基、溶媒等の反応条件の改善を行い、従来3日間かかっていたcPIPの合成時間を最短18時間に短縮することに成功した。

また従来、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たが、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った。申請者は、 $\gamma$ -ターン上の $\alpha$ 位にアミノ基を導入したcPIPによって、DNA結合様式の制御を可能にした。この制御機構によって、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と考える。

申請者の開発したcPIPが、異常伸長した配列に結合して転写を特異的に抑制することで、異常なmRNAやタンパク質の発現を抑えられた点は重要である。加えて、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*遺伝子の遺伝子発現変化の評価結果から、cPIPは疾患原因となる異常遺伝子を特異的に抑制する薬剤として期待できる。

cPIP-Chbは前立腺がん細胞に対して高い抗がん活性 ( $IC_{50}$ : 93 nM) を示し、そのアルキル化部位は、HPLCとMALDI-TOF MSを用いて詳細に解析された。キャピラリー電気泳動の結果からも、アデニンのN3位をアルキル化していることが確認された。

Chb部分のDNAアルキル化に起因するアポトーシスのメカニズムを調べるため、RT-qPCRやタンパク質アレイを用いた評価が行われており、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ている。また、p53以外の経路について、p53ファミリーの1つであるp73遺伝子の発現の増加も確認され、p73依存的なアポトーシス経路の寄与も示唆されている。これらの解析評価の結果は、RUNX関連遺伝子を標的とするhPIP-Chb誘導体が、悪性度の高いすい臓がんに対する新たな薬剤の可能性を示唆している。

以上の研究において、申請者は様々ながん疾患や神経変性疾患に関連する遺伝子配列を特異的に認識する各種PIP誘導体の開発と活性評価、解析研究を行った。本研究は、様々な疾患に対するPIP誘導体の応用や、細胞内でのPIP誘導体の作用メカニズム解析を進める基盤となる学術的な知見を与えるものと考えられる。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、令和6年1月16日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

要旨公表可能日： 年 月 日以降