

201438127A

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

MYCN遺伝子塩基配列特異的アルキル化による進行神経芽腫に対する

新規薬剤開発に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 高取 敦志

平成27(2015)年 3月

厚生労働科学研究委託費  
革新的がん医療実用化研究事業

MYCN遺伝子塩基配列特異的アルキル化による進行神経芽腫に対する  
新規薬剤開発に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 高取 敦志

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）による委託業務として、千葉県がんセンター研究所 研究員 高取敦志が実施した平成26年度「MYCN遺伝子塩基配列特異的アルキル化による進行神経芽腫に対する新規薬剤開発に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

## 目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
MYCN遺伝子塩基配列特異的アルキル化による進行神経芽腫に対する 新規薬剤開発に関する研究	
高取 敦志	1
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. PIP-secoCBIのデザインと合成	
渡部 隆義	7
2. 培養細胞における生物活性の評価	
篠原 憲一	11
3. in vivoモデルマウスにおける評価	
高取 敦志	15
III. 学会等発表実績	19
IV. 研究成果の刊行物・別刷	21

# I. 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告（総括）

MYCN遺伝子塩基配列特異的アルキル化による進行神経芽腫に対する  
新規薬剤開発に関する研究

業務主任者 高取 敦志 千葉県がんセンター研究所 がん遺伝創薬研究室 研究員

研究要旨

1歳以上で発症する進行期の神経芽腫は難治性でアンメットメディカルニーズの高い腫瘍であり、その進行神経芽腫の治療成績を向上させる治療法の開発が期待されている。本研究課題では、MYCN遺伝子領域に特異的に結合しアルキル化できる化合物（PIP-secoCBI）を設計し、MYCN遺伝子発現を抑制し、かつアルキル化剤の効果により細胞死を誘導する候補化合物を得ることを目的とし、以下の知見を得た。（1）MYCN遺伝子領域に結合できる9bp認識のPIP-secoCBIを3種類設計し、合成・精製した。（2）MYCN遺伝子増幅を持つ神経芽腫由来細胞において著しく低いIC<sub>50</sub>値を示す化合物2を得た。（3）化合物2の処理によりMYCN遺伝子の発現が抑制されアポトーシスによる細胞死を誘導することが明らかとなった。（4）化合物2は神経芽腫細胞による担がんモデルマウスで抗腫瘍効果が確認された。以上の結果から、実用化により近いPIP-secoCBIを得るために化合物の最適化を行い、非臨床POCを得た上で非臨床安全性試験へと研究を今後さらに進めていく上で必要な知見が得られた。

A. 研究目的

小児悪性固形腫瘍の中で最も発生頻度の高い神経芽腫においては、全体の約3分の2が1歳以上で発生し、発見時にすでに病期が進行しているため集学的治療によっても未だ難治性で、現在もなおその長期無病生存率は40%にとどまっている。また、標準治療法と併用できる薬剤も少ないことから、アンメットメディカルニーズの高い腫瘍である。一方で、治療後の晩期合併症も問題となっており、

治癒率向上を目指した新規治療法、特に晩期合併症の軽減が期待できる治療薬の開発が強く望まれている。

がんの発がん機序においては受容体型チロシンキナーゼ（RTK）の関与が知られており、神経芽腫においても例外ではない。RTKの一つであるALK遺伝子変異に依存性をもつ神経芽腫においてはALK阻害剤の有効性が示されているが、ALK阻害剤による増殖抑制効果がみられても他のRTKシグナルなどによる薬剤耐性メカニズムが

働くことが分かってきている。一方、神経芽腫の重要ながん遺伝子であるMYCNは細胞増殖・薬剤耐性に働く種々の遺伝子発現を制御することにより神経芽腫の進展に関わると考えられ、以前からMYCNを標的とした神経芽腫治療法の可能性が模索されてきた。しかし、最近開発された低分子化合物であるJQ1はその標的であるBRD4が制御する他の遺伝子への影響が予想され、一方siRNAを用いた核酸医薬は薬物送達システムが未だ確立されていないなど、臨床応用には問題点が多い。このため小児がん治療に使用でき、かつ現在抱える問題を克服する画期的な薬剤開発が必要である。

最近、千葉県がんセンター研究所では遺伝子配列特異的にDNAをアルキル化できる化合物を開発した。ピロール・イミダゾール・ポリアミド (PIP) はDNA塩基配列認識能に優れ、細胞に処理すると速やかに核内に集積する。そのPIPに配列特異的アルキル化能をもつインドールsecoCBIを標識することにより (PIP-secoCBI)、がん細胞に特異的な遺伝子領域のDNAを低用量でアルキル化することが可能となった。そこで本研究では、この技術を小児がん医療現場に届けるべく、MYCN遺伝子の特異的DNA配列を標的としたPIP化合物の最適化を図ることを目的としている。

## B. 研究方法

①PIP-secoCBI のデザインと合成  
MYCN遺伝子領域において9 bp認識配列を持つPIP-secoCBI の設計を行った。その際、ゲノムデータベースやDNA 配列検索

サーバであるGGRNA などを活用し、RNAポリメラーゼにより転写産物が合成されることが明白なコード領域上であることを確認した上で、PIP が結合しやすい領域であるかどうか検討を行った。

設計したPIP-secoCBIについて、独自に改良した国産ペプチド合成機を用いて合成を行った。合成したPIPについてはHPLC/MSを用いて精製・分析を行った。

### ②培養細胞における生物活性の評価

合成・精製できた化合物による細胞増殖抑制および細胞死の誘導について、神経芽腫由来細胞 (IMR-32、CHP-134、SK-N-BE (2)、NB1、NB9、Kelly、NB69、SK-N-AS) およびその他の細胞 (MCF-7、MDA-MB-231、HT-29、SW-480、Dermal fibroblast) を用いて検討した。IC50の測定は、IncuCyte生細胞イメージングシステムおよびWST法によって得られた細胞生存率により行った。遺伝子発現量はリアルタイムPCR法により測定した。また、細胞死についてはフローサイトメトリーにより解析した。

### ③in vivo モデルマウスにおける評価

神経芽腫細胞 (CHP-134細胞) による担がんマウスを作製し、②で効果が認められた化合物の単回投与試験を行い、抗腫瘍効果の評価を行った。投与は静脈内に0.1 mg/kg 体重で行った。

### (倫理面への配慮)

本研究では動物実験を含んでいるので、千葉県がんセンター動物実験審査委員会 (IACUC) の承認を得た上、千葉県がんセ

ンター動物実験実施要項および厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）に従い、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（文部科学省）、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（環境省）および動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（日本学術会議）を遵守して実験を行った。また本研究は、樹立されたヒト培養細胞株を利用するが、基本的に個人を特定できるヒト組織や細胞を利用していない。

### C. 研究結果

#### ①PIP-secoCBI のデザインと合成

*MYCN*遺伝子領域のうちIntron 1を認識する化合物1、Exon 3を認識する化合物2および3を設計した。このうち化合物1および2の合成を行い、HPLC/MSを用いて精製・分析を行った。

#### ②培養細胞における生物活性の評価

化合物1および2をIMR-32細胞およびDermal fibroblast細胞に処理し、 $IC_{50}$ を求めたところ、化合物1に関しては $IC_{50}$ 値の顕著な差が認められなかった。一方、化合物2の処理では、Dermal fibroblast細胞に比べ、*MYCN*遺伝子の増幅を持つIMR-32細胞において低い $IC_{50}$ 値が得られた。そこで、各種培養細胞に対して0.3 nMから300 nMの濃度で化合物2を処理し、各細胞における $IC_{50}$ 値を求めた。その結果、*MYCN*遺伝子の増幅を持たない神経芽腫由来細胞や神経芽腫以外の培養細胞に比べ、

*MYCN*遺伝子の増幅を持つ神経芽腫由来細胞において著しく低い $IC_{50}$ 値が得られた（リアルタイムPCR法により*MYCN*遺伝子の発現量を測定したところ、化合物2の処理による発現量の減少が認められた。また、フローサイトメトリーによる解析の結果、神経芽腫由来細胞は化合物2の処理によりアポトーシスによる細胞死を起こすことが明らかとなった。

#### ③in vivo モデルマウスにおける評価

培養細胞で得られたデータをもとに、化合物2の腫瘍細胞増殖抑制効果について検討するため、CHP-134細胞による担がんマウスにおいて単回投与試験を行った。その結果、非常に低用量の単回投与であったにもかかわらず、有意な抗腫瘍効果が認められた。

### D. 考察

以前に行った*MYCN*遺伝子配列の8 bpを認識するPIP-secoCBIによる予備的実験において、*MYCN*遺伝子増幅のある神経芽腫由来細胞の増殖抑制および細胞死を起こす化合物が得られていた。PIPおよびCBIは放線菌などの微生物が持つ抗生物質に由来する。それら抗生物質がAT-rich配列に結合するのに対して、PIPは構成要素であるピロール基とイミダゾール基の組み合わせにより、GC-ペアを含む配列を認識することが出来る。またCBIは設計された活性中心の構造により、アデニンのN-3位を特異的にアルキル化する。これにより、CBIによっても配列特異性が高まり、目的遺伝子領域のtemplate鎖の配列を特異的に標的とすることが可能とな



る。そこで本研究課題において、より長いDNA配列を認識するPIPを導入し *MYCN* 遺伝子特異性をさらに高めた 9 bp を認識する PIP-secoCBI を 3 種類設計した。そして、合成・精製した化合物の生物活性の評価を行ったところ、正常細胞や *MYCN* 遺伝子増幅のない細胞に影響を与えることのない低用量で細胞増殖抑制効果をもつ化合物が得られた。また、担がんモデルマウスにおける単回投与試験において体重減少は認められず、低用量で抗腫瘍効果が認められた。

#### E. 結論

本研究課題により、神経芽腫の重要ながん遺伝子である *MYCN* を標的とした治療戦略が可能であるが示された。担がんマウスを用いた投与実験において、体重減少は認められなかったことから、毒性の少ない用量で薬理効果を得ることが可能であると考えられる。今後の研究では、実用化により近い PIP-secoCBI を得るために化合物の最適化を行い、非臨床 POC を得た上で、非臨床安全性試験を実施していくことが必要であると考えられる。

#### F. 健康危険情報

該当事項無し

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Akter J, Takatori A\*, Islam MS, Nakazawa A, Ozaki T, Nagase H, Nakagawara A. Intracellular fragment of NLRR3 (NLRR3-ICD) stimulates ATRA-dependent neuroblastoma differentiation.

Biochem. Biophys. Res. Commun., (2014) 453(1):86-9, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.065.

(\*Corresponding author)

2. Identification of a novel E-box binding pyrrole-imidazole polyamide inhibiting MYC-driven cell proliferation. Mishra R, Watanabe T, Kimura MT, Koshikawa N, Ikeda M, Uekusa S, Kawashima H, Wang X, Igarashi J, Choudhury D, Grandori C, Kemp CJ, Ohira M, Verma NK, Kobayashi Y, Takeuchi J, Koshinaga T, Nemoto N, Fukuda N, Soma M, Kusafuka T, Fujiwara K, Nagase H. Cancer Sci. 2015 Jan 22. doi: 10.1111/cas.12610.
3. Hiraoka K, Inoue T, Taylor R, Watanabe T, Koshikawa N, Yoda H, Shinohara K, Takatori A, Sugimoto K, 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. *in press* [Paper #NCOMMS-14-02930B]
2. 学会発表
  1. Takatori A, Yoda H, Hiraoka K, Shinohara K, Watanabe T, Koshikawa N, Nagase H. Targeting specific DNA sequences by N-methylpyrrole and

N-methylimidazole polyamides provides insights for the development of novel diagnostic and therapeutic drugs. The 28th International Mammalian Genome Conference 2014 年 10 月 26 日-29 日  
アメリカ・バーハーバー

2. Efficient Gene Silencing by PI Polyamide with Aliphatic/Aromatic Amino Acid Pairings Targeting MMP-9. T. Watanabe, N. Koshikawa, T. Ozaki, T. Bando, H. Sugiyama, H. Nagase. 日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25 日-27 日、日本・横浜

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
特許出願中 1 件
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

## II. 委託業務成果報告（業務項目）

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告（業務項目）

PIP-secoCBIのデザインと合成

担当責任者 渡部 隆義 千葉県がんセンター研究所 がん遺伝創薬研究室 研究員

研究要旨

ピロール・イミダゾール・ポリアミド (PIP) は DNA 塩基配列認識能に優れ、細胞に処理すると速やかに核内に集積する。その PIP に配列特異的アルキル化能をもつインドール secoCBI を標識することにより (PIP-secoCBI)、特別な送達技術を要さずに核内 DNA に結合し、DNA 副溝のアデニンをアルキル化することができる。本研究では、*MYCN* 遺伝子領域に特異的に結合しアルキル化できる PIP-secoCBI を設計し、生物活性の評価に供する化合物の合成・精製を行った。

A. 研究目的

1 歳以上で発症する進行期の神経芽腫は集学的治療によっても未だ難治性で標準治療法と併用できる薬剤も少ないことから、アンメットメディカルニーズの高い腫瘍である。最近、当研究所では遺伝子配列特異的に DNA をアルキル化できる化合物を開発した。PIP は DNA 塩基配列認識能に優れ、細胞に処理すると速やかに核内に集積する。その PIP に配列特異的アルキル化能をもつインドール secoCBI を標識することにより、がん細胞に特異的な遺伝子領域の DNA を低用量でアルキル化することが可能となった。

PIP-secoCBIは、二本鎖DNA副溝に配列特異的に結合し、遺伝子領域のtemplate鎖のアデニンをアルキル化することによりmRNA転写反応を阻害することが可能である。PIPおよびCBIは放線菌などの微生物

物が持つ抗生物質に由来する。それら抗生物質がAT-rich配列に結合するのに対して、PIPは構成要素であるピロール基とイミダゾール基の組み合わせにより、GC-ペアを含む配列を認識することが出来る。またCBIは設計された活性中心の構造により、アデニンのN-3位を特異的にアルキル化する。これにより、CBIによっても配列特異性が高まり、目的遺伝子領域のtemplate鎖の配列を特異的に標的とすることが可能となる。

以前の予備的実験から、*MYCN*遺伝子配列の8 bpを認識するPIP-CBIによる処理で、*MYCN*遺伝子増幅のある神経芽腫由来細胞において、細胞増殖の抑制および細胞死の誘導が認められた。しかし、8 bp認識のPIP-secoCBIは*MYCN*遺伝子領域においても複数の結合配列をもち、遺伝子特異性が十分高いとは言えない。そこで本研

究では、*MYCN*遺伝子を標的としたPIP化合物の最適化を図ることを目的としている。

## B. 研究方法

9 bp の認識配列を持つ PIP-secoCBI の設計を、以下の点に留意して行った。

- ①調節領域ではなく、RNA ポリメラーゼにより転写産物が合成されることが明白なコード領域を標的とする。
- ②ヌクレオソームなどの二次的な構造を取りにくい領域をデータベースを参考に予想し、PIP が結合しやすい領域を絞り込む。
- ③DNA配列を迅速に検索できるウェブサーバであるGGRNAなどを活用し、PIP-secoCBIのオフターゲットについて確認を行う。

設計したPIP-secoCBIについて、国産ペプチド合成機を用い独自に改良した手法にて合成を行った。合成したPIPについてはHPLC/MSを用いて精製・分析を行った。

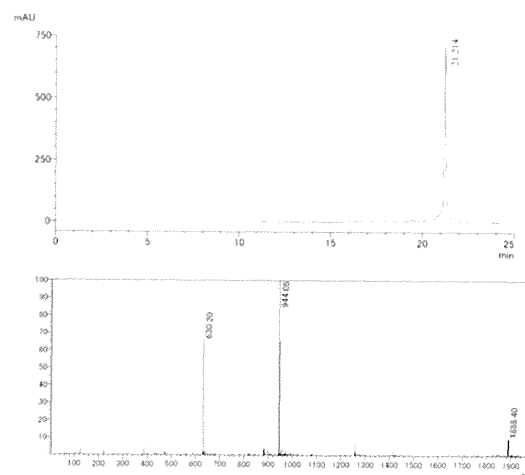
### (倫理面への配慮)

本研究は、樹立されたヒト培養細胞株を利用するが、基本的に個人を特定できるヒト組織や細胞を利用していない。

## C. 研究結果

*MYCN*遺伝子領域のうちIntron 1を認識する化合物 1、Exon 3を認識する化合物 2 および 3 を設計した。それぞれの結合領域についてゲノム情報データベースで検索したところ、ヌクレオソーム構造を取りにくい領域であることが確認された。また、GGRNA等により類似配列について検索した

ところ、いずれのPIP-secoCBI も*MYCN*遺伝子領域において他に結合領域を持たないことを確認した。そこで、まず化合物 1 および 2 の合成を行い、HPLC及びLC-MSを用いて精製・分析を行った（下図）ところ、目的化合物が得られたことが確認された。



図：LC-MSによる化合物 1 の精製・分析

## D. 考察

以前に行った *MYCN* 遺伝子配列の 8 bp を認識する PIP-secoCBI による予備的実験において、*MYCN* 遺伝子増幅のある神経芽腫由来細胞の増殖抑制および細胞死を起こす化合物が得られていた。そこで、PIP化合物の最適化を図ることを目的として、より長い DNA 配列を認識する PIP を導入し *MYCN* 遺伝子特異性をさらに高めた 9 bp を認識する PIP-secoCBI を 3 種類設計した。いずれも *MYCN* 遺伝子領域で結合部位を 1 カ所だけ持つことから、認識配列を 1 bp 伸ばしたことにより、配列特異性が高まったと考えられる。また、9 bp の結合配列の内、5 bp 以上が GC ペアであったことから、高い配列特異性を獲得す

るために GC ペア数が重要であることが示唆された。

#### E. 結論

*MYCN* 遺伝子領域に特異的に結合しアルキル化できる新規候補薬剤 PIP-secoCBI を 3 種類設計し、生物活性の評価に供する化合物の合成・精製を行い、目的化合物が得られた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Identification of a novel E-box binding pyrrole-imidazole polyamide inhibiting MYC-driven cell proliferation. Mishra R, Watanabe T, Kimura MT, Koshikawa N, Ikeda M, Uekusa S, Kawashima H, Wang X, Igarashi J, Choudhury D, Grandori C, Kemp CJ, Ohira M, Verma NK, Kobayashi Y, Takeuchi J, Koshinaga T, Nemoto N, Fukuda N, Soma M, Kusafuka T, Fujiwara K, Nagase H. *Cancer Sci.* 2015 Jan 22. doi: 10.1111/cas.12610.

##### 2. 学会発表

1. Efficient Gene Silencing by PI Polyamide with Aliphatic/Aromatic Amino Acid Pairings Targeting MMP-9. T. Watanabe, N. Koshikawa<sup>1</sup>, T. Ozaki, T. Bando, H. Sugiyama, H. Nagase. 日本癌学会学術総会 2014 年 9 月 25 日-27 日、日本・横浜
2. Takatori A, Yoda H, Hiraoka K,

Shinohara K, Watanabe T, Koshikawa N, Nagase H. Targeting specific DNA sequences by N-methylpyrrole and N-methylimidazole polyamides provides insights for the development of novel diagnostic and therapeutic drugs. The 28th International Mammalian Genome Conference 2014 年 10 月 26 日-29 日  
アメリカ・バーハーバー

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
特許出願中 1 件
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告（業務項目）

培養細胞における生物活性の評価

担当責任者 篠原 憲一 千葉県がんセンター研究所 がん遺伝創薬研究室 客員研究員

研究要旨

治癒率向上を目指した進行神経芽腫の新規治療法、特に晩期合併症の軽減が期待できる治療薬の開発が強く望まれている。本研究では、*MYCN* 遺伝子領域を標的とした PIP-secoCBI の候補化合物に対して、培養細胞を用いた生物活性の評価を行い以下の知見を得た。(1) *MYCN* 遺伝子増幅を持つ神経芽腫由来細胞において著しく低い IC<sub>50</sub> 値を示す化合物 2 を得た。(2) 化合物 2 の処理により *MYCN* 遺伝子の発現が抑制されアポトーシスによる細胞死を誘導することが明らかとなった。以上の結果から、担がんモデルマウスを用いた評価を行う候補化合物を得た。

A. 研究目的

小児悪性固形腫瘍の中で最も発生頻度の高い神経芽腫においては、全体の約3分の2が1歳以上で発生し、発見時にすでに病期が進行しているため集学的治療によっても未だ難治性で、治癒率向上を目指した進行神経芽腫の新規治療法、特に晩期合併症の軽減が期待できる治療薬の開発が強く望まれている。

がんの発がん機序においては受容体型チロシンキナーゼ (RTK) の関与が知られており、神経芽腫においても例外ではない。RTKの一つであるALK遺伝子変異に依存性をもつ神経芽腫においてはALK阻害剤の有効性が示されているが、ALK阻害剤による増殖抑制効果がみられても他のRTKシグナルなどによる薬剤耐性メカニ

ズムが働くことが分かってきている。一方、神経芽腫の重要ながん遺伝子である*MYCN*は細胞増殖・薬剤耐性に働く種々の遺伝子発現を制御することにより神経芽腫の進展に関わると考えられ、以前から*MYCN*を標的とした神経芽腫治療法の可能性が模索されてきた。しかし、最近開発された低分子化合物であるJQ1はその標的であるBRD4が制御する他の遺伝子への影響が予想され、一方siRNAを用いた核酸医薬は薬物送達システムが未だ確立されていないなど、臨床応用には問題点が多い。このため小児がん治療に使用でき、かつ現在抱える問題を克服する画期的な薬剤開発が必要である。

本研究は、核内集積性およびDNA塩基配列特異的アルキル化能をもつPIP-

secoCBIを神経芽腫治療法に応用するために、候補化合物の抗腫瘍効果について培養細胞を用いて検討することを目的とした。

## B. 研究方法

細胞は神経芽腫由来細胞 (IMR-32、CHP-134、SK-N-BE(2)、NB1、NB9、Kelly、NB69、SK-N-AS) およびその他の細胞 (MCF-7、MDA-MB-231、HT-29、SW-480、Dermal fibroblast) を用いた。PIP-secoCBIの候補化合物の48時間処理による細胞増殖抑制はIncuCyte生細胞イメージングシステムおよびWST法によって検討し、得られた細胞生存率によりIC<sub>50</sub>を解析した。遺伝子発現量はリアルタイムPCR法により測定した。また、細胞死についてはフローサイトメトリーにより解析した。

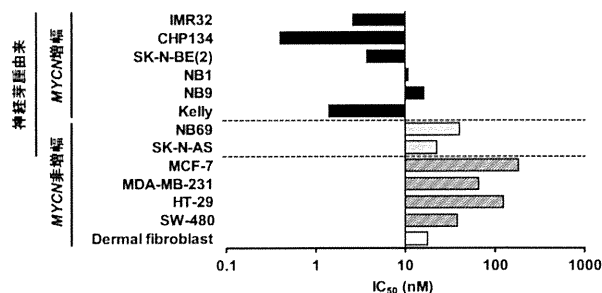
### (倫理面への配慮)

本研究は樹立されたヒト培養細胞株を利用し、基本的に個人を特定できるヒト組織や細胞を利用していない。

## C. 研究結果

化合物1および2をIMR-32細胞およびDermal fibroblast細胞に処理し、IC<sub>50</sub>を求めたところ、化合物1に関してはIC<sub>50</sub>値の顕著な差が認められなかった。一方、化合物2の処理では、Dermal fibroblast細胞に比べ、MYCN遺伝子の増幅を持つIMR-32細胞において低いIC<sub>50</sub>値が得られた。そこで、各種培養細胞に対して0.3 nMから300 nMの濃度で化合物2を処理し、各細胞におけるIC<sub>50</sub>値を求めた。その結果、

MYCN遺伝子の増幅を持たない神経芽腫由来細胞や神経芽腫以外の培養細胞に比べ、MYCN遺伝子の増幅を持つ神経芽腫由来細胞において著しく低いIC<sub>50</sub>値が得られた(下図)。リアルタイムPCR法によりMYCN遺伝子の発現量を測定したところ、化合物2の処理による発現量の減少が認められた。また、フローサイトメトリーによる解析の結果、神経芽腫由来細胞は化合物2の処理によりアポトーシスによる細胞死を起こすことが明らかとなった。



図：各種培養細胞における化合物2のIC<sub>50</sub>

## D. 考察

以前に行ったMYCN遺伝子配列の8 bpを認識するPIP-secoCBIによる予備的実験において、MYCN遺伝子増幅のある神経芽腫由来細胞の増殖抑制および細胞死を起こす化合物が得られていた。PIPおよびCBIは放線菌などの微生物が持つ抗生物質に由来する。それら抗生物質がAT-rich配列に結合するのに対して、PIPは構成要素であるピロール基とイミダゾール基の組み合わせにより、GC-ペアを含む配列を認識することが出来る。またCBIは設計された活性中心の構造により、アデニンのN-3位を特異的にアルキル化する。これにより、CBIによっても配列特異性が高まり、目的遺伝子領域のtemplate鎖の配



列を特異的に標的とすることが可能となる。そこで本研究において、より長いDNA配列を認識する PIP を導入し *MYCN* 遺伝子特異性をさらに高めた 9 bp を認識する PIP-secoCBI の候補化合物の生物活性の評価を行ったところ、正常細胞や *MYCN* 遺伝子増幅のない細胞に影響を与えることのない低用量で細胞増殖抑制効果をもつ化合物が得られた。その際、*MYCN* 遺伝子発現は抑制され、細胞は化合物処理後 48 時間後にアポトーシスで細胞死を起こすことが明らかとなった。

#### E. 結論

本研究により、*MYCN* 遺伝子増幅のある神経芽腫細胞において、より低濃度で細胞増殖抑制効果および細胞死の誘導をおこす候補化合物が得られた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Hiraoka K, Inoue T, Taylor R, Watanabe T, Koshikawa N, Yoda H, Shinohara K, Takatori A, Sugimoto K, 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.* in press [Paper #NCOMMS-14-02930B]

##### 2. 学会発表

1. Takatori A, Yoda H, Hiraoka K, Shinohara K, Watanabe T,

Koshikawa N, Nagase H. Targeting specific DNA sequences by N-methylpyrrole and N-methylimidazole polyamides provides insights for the development of novel diagnostic and therapeutic drugs. The 28th International Mammalian Genome Conference 2014年10月26日-29日  
アメリカ・バーハーバー

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
特許出願中 1 件
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）  
委託業務成果報告（業務項目）

in vivoモデルマウスにおける評価

担当責任者 高取 敦志 千葉県がんセンター研究所 がん遺伝創薬研究室 研究員

研究要旨

1 歳以上で発症する進行期の神経芽腫は難治性でアンメットメディカルニーズの高い腫瘍であり、その進行神経芽腫の治療成績を向上させる治療法の開発が期待されている。本研究では、*MYCN* 遺伝子領域を標的とした PIP-secoCBI 候補化合物のモデルマウスでの生物活性を評価することを目的とした。その結果、化合物 2 の投与は神経芽腫細胞による担がんマウスにおいて有意な抗腫瘍効果を示すことが確認された。

A. 研究目的

*MYCN* 遺伝子増幅がある進行性神経芽腫は放射線や大量化学療法併用自家末梢血細胞移植などの集学的治療によっても難治性で、その治療成績を改善させるブレイクスルーとなる新規治療法が期待されている。*MYCN* 遺伝子を標的とした PIP-secoCBI は、*MYCN* 遺伝子発現を抑制し、*MYCN* 遺伝子増幅のある神経芽腫細胞において細胞増殖抑制効果を示し、細胞死の誘導を惹起した。そこで本研究では、細胞レベルでの評価により効果が認められた化合物について、神経芽腫細胞による担がんマウスを用いた抗腫瘍効果の評価を行うことを目的とした。

B. 研究方法

担がんマウスは、 $5 \times 10^6$  個の神経芽腫細胞（CHP-134細胞、*MYCN* 遺伝子増幅）をメスの BALB/c-nu マウス（5-7 週齢）の皮下に移植し作製した。腫瘍形成の確認後、培養細胞における生物活性評価で効果が認められた化合物 2 を静脈内に 0.1 mg/kg 体重で単回投与した。その後、経時的に腫瘍サイズと体重の測定を行った。

（倫理面への配慮）

本研究では動物実験を含んでいるので、千葉県がんセンター動物実験審査委員会（IACUC）の承認を得た上、千葉県がんセンター動物実験実施要項および厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成 18 年 6 月 1 日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）に従い、研究機関等における

動物実験等の実施に関する基本指針（文部科学省）、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（環境省）および動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（日本学術会議）を遵守して実験を行った。また本研究は、樹立されたヒト培養細胞株を利用するが、基本的に個人を特定できるヒト組織や細胞を利用していない。

### C. 研究結果

培養細胞で得られたデータをもとに化合物 2 の腫瘍増殖抑制効果について検討をおこなったところ、非常に低用量における単回投与であったにもかかわらず、CHP-134細胞による担がんマウスにおいて有意な抗腫瘍効果が認められた。また、投与後の体重減少は認められず、化合物の生体に対する毒性は低いことが示唆された。

### D. 考察

抗がん作用をもつアルキル化剤のマウスへの投与は、体重減少を伴う毒性を示すことが多い。CBI についても、単独投与により著しい体重減少を起こすことが分かっている。本研究において合成した *MYCN* 遺伝子配列を標的とした PIP-secoCBI の投与を行ったマウスにおいては、体重減少を全く認めなかった。一方、腫瘍増殖は対照群に比べ有意に抑制されたことから、この化合物は正常細胞や *MYCN* 遺伝子増幅のない細胞に影響を与えることのない低用量において細胞増殖抑制効果をもつことが示唆される。

### E. 結論

担がんマウスを用いた投与実験によって、化合物 2 が毒性の低い用量で薬理効果を持つことが示されたことから、増幅した *MYCN* 遺伝子を標的とする治療戦略の開発につながると考えられる。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Akter J, Takatori A\*, Islam MS, Nakazawa A, Ozaki T, Nagase H, Nakagawara A. Intracellular fragment of NLRP3 (NLRP3-ICD) stimulates ATRA-dependent neuroblastoma differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2014) 453(1):86-9, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.065. (\*Corresponding author)

#### 2. 学会発表

1. Takatori A, Yoda H, Hiraoka K, Shinohara K, Watanabe T, Koshikawa N, Nagase H. Targeting specific DNA sequences by N-methylpyrrole and N-methylimidazole polyamides provides insights for the development of novel diagnostic and therapeutic drugs. The 28th International Mammalian Genome Conference 2014 年 10 月 26 日-29 日  
アメリカ・バーハーバー

### G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

#### 1. 特許取得

特許出願中 1 件

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし