

3. 前立腺がん特異的融合遺伝子の生成を抑制するPI ポリアミドの開発

1) 背景

近年、腫瘍細胞において、全く異なる遺伝子が融合した融合遺伝子が形成されていることが知られるようになった。特に、次世代シーケンサーの発達により、比較的発生頻度の低い融合遺伝子も発見が可能となり、様々な癌種に特異的な融合遺伝子が発見されている。正常細胞には存在せず、さらにその転写産物が正常細胞の腫瘍性変換を促進する機能を持つ場合があることから、融合遺伝子は腫瘍マーカーとしても、治療標的として非常に有望であるといえる。

前立腺においてもアンドロゲン応答遺伝子である Trans membrane protease serine2 (TMPRSS2) と E26 transformation specific (ETS) family 遺伝子の融合した遺伝子の存在が確認されている。これらの融合遺伝子が細胞の癌化・悪性化、およびアンドロゲン感受性の変化に関与することから、その詳細や機能や生成機序についての研究が精力的になされている。本来 ETS family 遺伝子はアンドロゲン応答性を持たないが、TMPRSS2 と融合した結果、アンドロゲン刺激に応じて発現亢進を示すようになる。ETS family 遺伝子は癌原遺伝子であり、この family に属する ERG, ETV1, ETV4, ETV5 等は細胞増殖、細胞周期、アポトーシスの制御に関わっている。TMPRSS2 との融合によりアンドロゲン応答性にこれらの細胞機能が亢進することが、TMPRSS2-ETS 融合遺伝子による前立腺癌の発生・悪性化の機序であると考えられる。

融合遺伝子の生成や染色体転座においては、アンドロゲンレセプター (AR) が重要な働きを担う。遺伝子融合に先立ち、アンドロゲンレセプター (AR) がゲノム上の AR 結合配列に結合し、特定配列を切断する。その後 DNA 修復機構の働きにより、切断部分が融合するが、この際異なった領域の染色体と融合することで染色体再配列が発生する。

TMPRSS2 と ETS ファミリー遺伝子の一つである ERG は、ともに共通配列 TG(T or A) GGG(A or T) を持

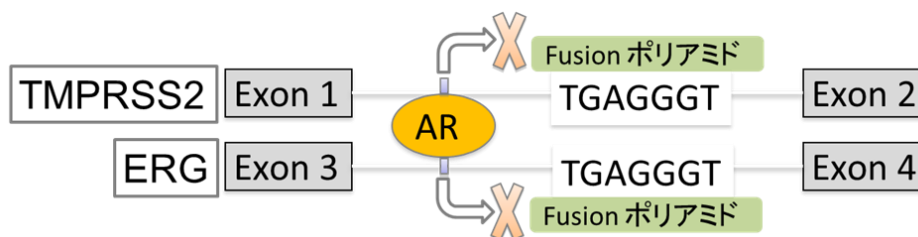


図1 Fusion ポリアミドの設計部位

つが、この配列を AR が切断し再融合する際に TMPRSS2-ERG 融合遺伝子が生成されると報告されている。そこでこの特定配列に結合し、TMPRSS2-ERG 融合遺伝子の発生を抑制する PI ポリアミドを設計し(図1)、融合遺伝子の生成抑制効果について検討を行った。

2) 結果

図に示す通り、TMPRSS2 と ERG の共通切断領域を認識する PI ポリアミド (Fusion ポリアミド) を設計し、ペプチド合成機 PSSM8 を用いて合成した。HPLC による精製および純度の確認、質量分析による分子量の確認を行い、さらにゲルシフトアッセイにて、標的 DNA 配列に対する特異的結合能を確認した後、同ポリアミドを以下の実験に用いた。

前立腺癌細胞株 LNCaP は通常 TMPRSS2-ERG 融合遺伝子を持たないが、アンドロゲン刺激により融合遺伝子が生じる性質を持つ。前立腺癌細胞株 LNCaP に対し、Fusion ポリアミドもしくは

negative control ポリアミド存在下でアンドロゲン刺激を行い、融合遺伝子の生成を FISH 方法により解析したところ、Fusion ポリアミド投与群において、TMPRSS2-ERG 遺伝子の生成個数が明らかに低下していた。また、TMPRSS2-ERG 遺伝子の転写産物の量も Fusion ポリアミド投与群において明らかに低下していることが real-time PCR により確認できた。この融合遺伝子は、融合していない ERG の発現を誘導することが知られているが、Fusion ポリアミドの投与により、ERG の発現も抑えられた。細胞機能への影響を調べたところ、Fusion ポリアミド存在下では、アンドロゲン刺激下による LNCaP 細胞の増殖能および浸潤能が低下することが MTS assay、Cell migration assay にてそれぞれ確認できた。

さらに、*in vivo* における Fusion ポリアミドの効果を調べるために、LNCaP 細胞を免疫不全マウス皮下に移植し、腫瘍が一定のサイズに達した時点で、尾静脈より Fusion ポリアミドもしくは Negative control ポリアミドの投与を行った。週 1 回、1 ヶ月間の投与を行い、腫瘍サイズを経時的に観察した結果、Fusion ポリアミド投与群においてはコントロールと比較して、腫瘍増殖の有意な抑制が観察された¹⁾。

3) 考察・今後の展望

本研究の結果より、前立腺癌において、Fusion ポリアミドが TMPRSS2-ERG の生成および発現を抑制し、培養系における細胞増殖、遊走能、生体における腫瘍増殖能を抑制することが証明できた¹⁾。ポリアミドを投与したマウスにおいては健康被害も観察されず、安全性にも問題がなかったことから、Fusion ポリアミドは新規の前立腺癌治療薬候補として期待できる。本ポリアミドは「新規 PI ポリアミド（前立腺がん特異的融合遺伝子 TMPRSS2-ERG の形成を抑制させ、抗腫瘍作用を示すポリアミド） 特願 2012-106382（2012/6/8），出願人；日本大学、発明者；大日方大亮、高橋悟、福田昇、藤原恭子」として特許申請中である。

引用文献

1) Obinata D, Ito A, Fujiwara K, Takayama K, Ashikari D, Murata Y, Yamaguchi K, Urano T, Fujimura T, Fukuda N, Soma M, Watanabe T, Nagase H, Inoue S, Takahashi S : _Pyrrole-imidazole polyamide targeted to break fusion sites in TMPRSS2 and ERG gene fusion represses prostate tumor growth. Cancer Sci,105(10):1272-8,2014.10.