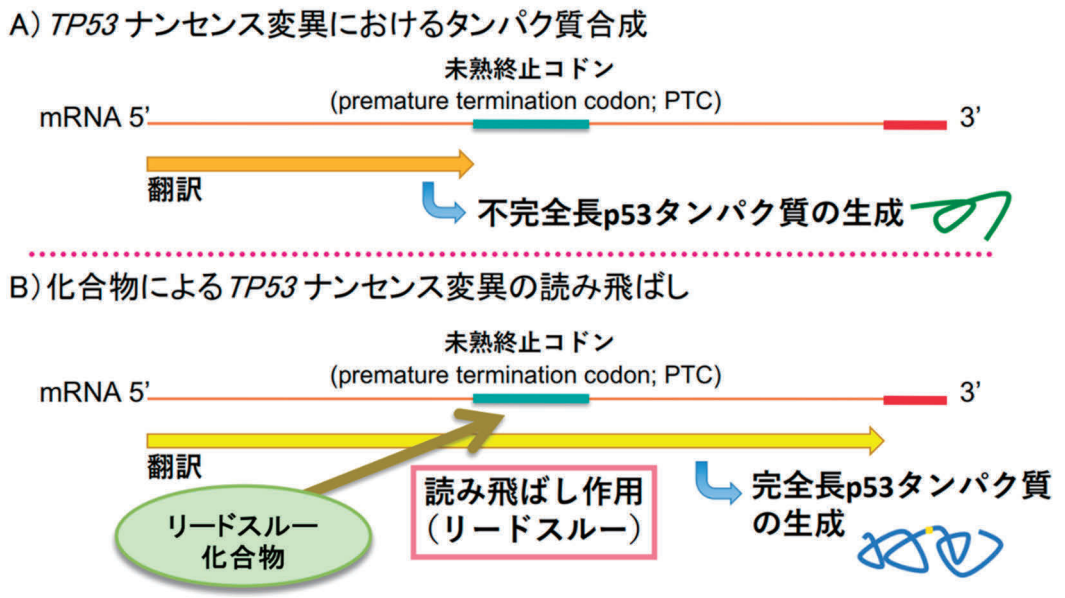
108　リードスルー作用に着目したがん化学療法剤の開発	田口　晃弘

【目的】遺伝性疾患の約 20%はナンセンス変異により、病因となるタンパク質をコードする構造遺伝子上に未熟終止コドン（Premature Termination Codon : PTC）が遺伝的に生じることで、PTC で翻訳が停止する。そのため、機能を持つ完全長タンパク質が産生されず、疾患を発症する。このようなナンセンス変異型遺伝性疾患は約 2,000 種あると考えられており、その一つに「がん」が挙げられる。ヒトで発生するがんの 50%以上はがん抑制遺伝子 *TP53* の変異によるものであり、その内 10%がナンセンス変異に起因する。現在、ナンセンス変異に起因する遺伝性疾患に対する新規治療法候補として、リードスルー薬が注目されている。本剤は、翻訳段階で PTC を読み飛ばす作用（リードスルー作用）を有し、完全長タンパク質を発現させることができる。当該活性を有する化合物として、アミノグリコシド系抗生物質が知られており、近年 *TP53* 遺伝子中にナンセンス変異を有するがん細胞に対して p53 タンパク質発現量を増大させる活性を示すことが報告された。しかし、当該化合物は耳・腎毒性といった副作用の観点から長期投与は困難であると考えられる。一方で、我々は、リードスルー化合物であるネガマイシンを基盤とした遺伝性疾患治療薬の開発を精力的に行い、複数の高活性を有する誘導体の獲得に成功している。そこで、ネガマイシン誘導体による *TP53* ナンセンス変異を標的としたがん化学療法剤の創製を目指した。

【方法】*TP53* ナンセンス変異に対するネガマイシン誘導体のリードスルー活性を *in vitro* レポーターアッセイにより評価した。ネガマイシン誘導体を、*TP53* ナンセンス変異を有する小細胞肺がん細胞（DMS-114 細胞）に添加し、完全長 p53 タンパク質の発現をウェスタンブロッティングにより解析した。また、ネガマイシン誘導体の同がん細胞に対する細胞増殖抑制活性を WST -1 により評価した。

【結果】*in vitro* レポーターアッセイにより複数のネガマイシン誘導体において、*TP53* ナンセンス変異に対するリードスルー活性が認められた。また、DMS-114 細胞において、ネガマイシン誘導体のリードスルー作用により完全長 p53 タンパク質の発現が確認された。さらに、ネガマイシン誘導体は当該細胞に対し、比較的高い細胞増殖抑制活性を示した。従って、ネガマイシン誘導体は *TP53* ナンセンス変異のリードスルー作用に基づく、がん化学療法剤となりうると考えられる。

リードスルー化合物による *TP53* ナンセンス変異の読み飛ばし



108. リードスルー作用に着目したがん化学療法剤の開発

田口　晃弘

東京薬科大学 薬学部 薬品化学教室

Key words：リードスルー，ネガマイシン，がん抑制遺伝子 p53，未熟終止コドン，ナンセンス変異

緒　言

遺伝性疾患の約 20%はナンセンス変異により、病因となるタンパク質をコードする構造遺伝子上に未熟終止コドン（Premature Termination Codon：PTC）が遺伝的に生じることで、PTC で翻訳が停止する。そのため、機能を持つ完全長タンパク質が産生されず、疾患を発症する［1］。このようなナンセンス変異型遺伝性疾患は約 2,000 種あると考えられており、その一つに「がん」が挙げられる。ヒトで発生するがんの 50%以上はがん抑制遺伝子 *TP53* の変異によるものであり、その内 10%がナンセンス変異に起因する［2］。

現在、ナンセンス変異に起因する遺伝性疾患に対する新規治療法候補として、リードスルー薬が注目されている。本剤は、翻訳段階で PTC を読み飛ばす作用（リードスルー作用）を有し、完全長タンパク質を発現させることができる。当該活性を有する化合物として、アミノグリコシド系抗生物質が知られており、近年 *TP53* 遺伝子中にナンセンス変異を有するがん細胞に対して p53 タンパク質発現量を増大させる活性を示すことが報告された［3］。しかし、当該化合物は耳・腎毒性といった副作用の観点から長期投与は困難であると考えられる。

一方で、我々は、リードスルー化合物であるネガマイシン［4］を基盤とした遺伝性疾患治療薬の開発を精力的に行い、複数の高活性を有する誘導体の獲得に成功している［5〜8］。そこで、ネガマイシン誘導体による *TP53* ナンセンス変異を標的としたがん化学療法剤の創製を目指した。本研究では、*TP53* ナンセンス変異に対するネガマイシン誘導体のリードスルー活性を評価した。また、ネガマイシン誘導体は *TP53* ナンセンス変異を有する小細胞肺がん細胞（DMS -114 細胞）において完全長 p53 タンパク質の発現を促した。同がん細胞において、ネガマイシン誘導体は比較的高い細胞増殖抑制活性を示した。従って、ネガマイシン誘導体は *TP53* ナンセンス変異のリードスルー作用に基づく、がん化学療法剤となりうると考えられる。

方　法

1. ネガマイシン誘導体の合成

ネガマイシン誘導体は、文献［5〜8］に記載の方法により合成した。

2. 細胞株および細胞培養

小細胞肺がん細胞 DMS-114（ATCC、Manassas、Virginia）は、*TP53* 遺伝子の 213 番目のコドンにホモ接合性ナンセンス変異（CGA → TGA：R213X）を有する。DMS-114 細胞は、熱不活性化ウシ胎児血清（Nichirei Biosciences Inc.、Japan）を 10%添加した Waymouth's MB 752/1 培地（Gibco、Carlsbad、CA）中で培養した。肺腺がん細胞 H1299（ATCC、Manassas、Virginia）は p53 null である。H1299 細胞および正常ヒト皮膚線維芽細胞 NHDF 細胞は、10%の熱不活性化ウシ胎児血清を添加した RPMI-1640 培地（Nakalai tesque、Kyoto、Japan）で培養した。すべての細胞は、37℃、5% CO_2 の湿潤雰囲気下にて培養した。

3. *TP53*ナンセンス変異含有デュアルレポータープラスミド（pNL-*luc*-*TP53*（R213X_TGA）-*Nluc*）

*TP53*ナンセンス変異リードスルー活性評価用のプラスミドとして、*luc*および*Nluc*遺伝子の間に*TP53*遺伝子を挿入したデュアルレポータープラスミドを構築した。本プラスミドに対し、Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit（New England Biolabs Japan Inc.、Tokyo、Japan）を用いて、プロトコールに従い*TP53*遺伝子の213番目のコドンにTGA変異（c.C637>T）を導入した。

4. デュアルレポータープラスミドを用いたネガマイシン誘導体の*in vitro*リードスルー活性評価

H1299細胞を96ウェルプレートに8,000 cells/wellで播種した。12時間培養後、FuGENE® HD transfect reagent（Promega、USA）を用いて、プロトコールに従いプラスミド（pNL-*luc*-*TP53*（R213X_TGA）-*Nluc*）をトランスフェクションした。12時間培養後、培地を化合物添加（200μM）もしくは未添加培地に交換し、37℃にて48時間培養した。培養後、細胞を回収し、Passive Reporter Buffer（Promega、USA）で溶解した。NanoLuc®およびホタルルシフェラーゼの活性は、Nano-Glo® Dual-Luciferase® Reporter Assay System（Promega、USA）を用いて、プロトコールに従って測定した。リードスルー活性がない場合、PTCで翻訳が終了し、上流のホタルルシフェラーゼが主に発現する。一方、リードスルー活性がある場合、翻訳が進行するため下流のNanoLuc®ルシフェラーゼも発現する。リードスルー活性は、NanoLuc®ルシフェラーゼ活性とホタルルシフェラーゼ活性の比とした。最終的な化合物の活性は、化合物未添加群（PBS）に対する相対的な比として算出した。

5. ウェスタンブロッティング

DMS-114細胞を6ウェルプレートに600,000 cells/wellで播種した。24時間後、培地を化合物添加（200μM）もしくは未添加培地に交換し、37℃にて72時間培養した。回収した細胞にRIPAバッファー（150 mM NaCl、0.1 w/v% SDS、0.5 w/v% デオキシコール酸ナトリウム、1 w/v% NP-40）およびプロテアーゼインヒビターカクテル（EDTAフリー；Nakalai tesque、Kyoto、Japan）を加えて超音波処理し、細胞を破砕した。全タンパク質をPierce™ BCA protein assay（Thermo Scientific™、Stockholm、Sweden）でプロトコールに従い定量し、上清をLaemmli SDSサンプルバッファーで95℃、5分間加熱して変性させた。8～12μgのタンパク質を12.5% e-PAGEL HR（ATTO、Tokyo、Japan）にローディングし、SDSランニングバッファー（25 mM Tris、250 mM Glycine、0.1% SDS）で泳動した。TransBlot Turbo（Bio-Rad Laboratories、CA、USA）を用いて、タンパク質をPVDF膜に転写した。膜は、0.3%のスキムミルクを含むTBS-Tにてブロッキングした。1時間後、PVDF膜を抗p53抗体（DO-1；Santa Cruz、CA、USA）シグナル増強剤HIKARI（Nakalai tesque、Kyoto、Japan）のA液中にて1時間インキュベートした。TBS-Tで3回洗浄後、HRP標識二次抗体（#7076；Cell Signaling Technology、MA、USA）を含むシグナル増強剤HIKARIのB液中にて1時間インキュベートした。ローディングコントロールとしてβ-アクチン（HRP-60008；Proteintech、IL、USA）を使用した。洗浄を3回行い、Chemi-lumi One Ultra（p53検出用）およびL（β-actin検出用）を用い、CCDイメージャー（ImagQuant™ LAS 4000；Cytiva、Tokyo、Japan）にて化学発光を検出した。また、シグナルはImageJで定量化し、完全長p53タンパク質のバンドの強度をβ-アクチンのバンドの強度で除した値を、完全長p53タンパク質の発現量とした。

6. ネガマイシン誘導体の細胞増殖抑制活性評価

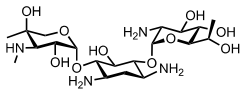
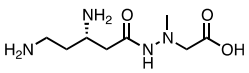
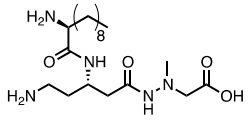
DMS-114細胞、およびNHDF細胞を96ウェルプレートにそれぞれ10,000 cell/well、および3,000 cell/wellで播種した。24時間後、培地を化合物添加（200μM）もしくは未添加培地に交換し、37℃にて72時間培養した。その後、細胞増殖試薬WST-1（Roche Diagnostics K.K.、Switzerland）を添加し、37℃にて1時間インキュベートした。生存細胞により生成された培地中のホルマザン色素の450 nmにおける吸光度（Reference：620 nm）をMultiskan™ FC（Thermo Fisher Scientific Inc.、Japan）により測定した。

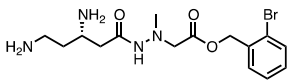
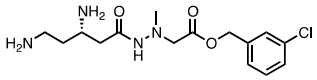
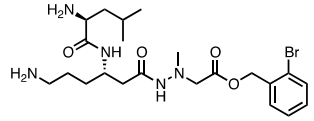
結果および考察

1. *TP53*プラスミドを用いたネガマイシン誘導体の *in vitro* リードスルー活性評価

これまでに獲得しているネガマイシン誘導体のスクリーニングを実施した。*TP53* 遺伝子が欠損している非小細胞肺がん H1299 細胞に対して、*TP53* 遺伝子に R213X（TGA）変異を挿入したデュアルレポータープラスミドを導入し、化合物のリードスルー活性値を評価した。その結果、陽性対照群であるアミノグリコシド系抗生物質 G418 のリードスルー活性 5.20 には及ばないものの、ネガマイシン誘導体 5 種に 1.37～2.62 の活性が認められた（表 1）。なお、ゲンタマイシン、ネガマイシン、TCP-107 および-126 のリードスルー活性は化合物未処理群（陰性対照群）と同等の値であった。

表 1. *TP53*ナンセンス変異に対する *in vitro* リードスルー活性

Compound	Structure	Readthrough Activity a)
Aminoglycoside G418		5.20 ± 0.16
TCP-112		1.37 ± 0.03
TCP-1109		2.63 ± 0.09

Compound	Structure	Readthrough Activity a)
TCP-169		2.62 ± 0.13
TCP-182		2.58 ± 0.01
TCP-199		2.49 ± 0.06

a）化合物未処理群（PBS 添加）に対する化合物（200 μM）のリードスルー活性比。細胞：H1299。N＝3。data mean±SD。

2. DMS-114 細胞における完全長 p53 タンパク質発現評価

表 1 に示した化合物 6 種を *TP53* R213 TGA 変異を有した小細胞肺がん DMS-114 細胞に処理し、ウェスタンブロッティングにより完全長 p53 タンパク質の発現を解析した。化合物を処理すると 50 kDa 付近に完全長 p53 タンパク質のバンドが確認された。これは化合物による p53 ナンセンス変異のリードスルーにより当該タンパク質の産生が促進されたと考えられる。4 種のネガマイシン誘導体 TCP-169、-182、-199 および-1109 は、完全長 p53 タンパク質を発現させた。中でも TCP-199 は、化合物未処理群と比較し、約 9.5 倍完全長 p53 タンパク質を増加させることがわかった。

3. ネガマイシン誘導体のがん細胞増殖抑制活性評価

続いて、ネガマイシン誘導体が DMS-114 細胞の増殖を抑制するかを評価した。TCP-199 処理群では、比較的高い細胞増殖抑制活性を示した（細胞生存率：60%）。同様の手法にて、正常細胞であるヒト皮膚繊維芽 NHDF 細胞での毒性を評価した。その結果、同濃度における TCP-199 の細胞毒性は比較的低いことが確認された（細胞生存率：96%）。一方で、アミノグリコシド系抗生物質 G418 は DMS-114 細胞のみならず、NHDF 細胞においても細胞毒性が確認された。これらの結果から、TCP-199 はがん細胞の増殖を抑制させ、正常細胞の増殖に影響を与えないことが示された。

謝　辞

本研究の遂行にあたり、ご助言頂いた東京薬科大学薬学部薬品化学教室の林良雄教授（現同学生命科学部教授）を始め、ご協力頂いた当研究室の学生の皆様にこの場を借りて深謝したい。

文　献

1） Bidou L, Hatin I, Perez N, Allamand V, Panthier J-J, Rousset J-P. Premature stop codons involved in muscular dystrophies show a broad spectrum of readthrough efficiencies in response to gentamicin treatment. Gene Ther. 2004 Apr;11(7):619-27. PMID: 14973546 DOI: 10.1038/sj.gt.3302211

2） Smeby J, Sveen A, Eilertsen I A, Sanielsen S A, Hoff A M, Eide P W, Johannessen B, Hektoen M, Skotheim R I, Guren M G, Nesbakken A, Lothe R A. Transcriptional and functional consequences of TP53 splice mutations in colorectal cancer. Oncogenesis. 2019 May 15;8(6):35. PMID: 31092812 DOI: 10.1038/s41389-019-0141-3

3） Floquet C, Deforges J, Rousset J-P, Bidou L. Rescue of non-sense mutated p53 tumor suppressor gene by aminoglycosides. Nucleic Acids Res. 2011 Apr;39(8):3350-62. Epub 2010 Dec 10. PMID: 21149266 DOI: 10.1093/nar/gkq1277

4） Hamada M, Takeuchi T, Kondo S, Ikeda Y, Naganawa H. A new antibiotic, negamycin. J Antibiot (Tokyo). 1970 Mar;23(3):170-1. J Antibiot (Tokyo). 1970 Mar;23(3):170-1. PMID: 5453311 DOI: 10.7164/antibiotics.23.170

5） Taguchi A, Hamada K, Kotake M, Shiozuka M, Nakaminami H, Pillaiyar T, Takayama K, Yakushiji F, Noguchi N, Usui T, Matsuda R, Hayashi Y. Discovery of natural products possessing selective eukaryotic readthrough activity: 3-*epi*-deoxynegamycin and its leucine adduct. ChemMedChem. 2014 Oct;9(10):2233-7. Epub 2014 Jul 9. PMID: 25044534 DOI: 10.1002/cmdc.201402208

6） Hamada K, Taguchi A, Kotake M, Aita S, Murakami S, Takayama K, Yakushiji F, Hayashi Y. Structure-activity relationship studies of 3-*epi*-deoxynegamycin derivatives as potent readthrough drug candidates. ACS Med Chem Lett. 2015 May 11;6(6):689-94. PMID: 26101575 DOI: 10.1021/acsmedchemlett.5b00121

7） Taguchi A, Hamada K, Shiozuka M, Kobayashi M, Murakami S, Takayama K, Taniguchi A, Usui T, Matsuda R, Hayashi Y. Structure-activity relationship study of leucyl-3-*epi*-deoxynegamycin for potent premature termination codon readthrough. ACS Med Chem Lett. 2017 Sep 29;8(10):1060-1065. PMID: 29057051 DOI: 10.1021/acsmedchemlett.7b00269

8） Hamada K, Omura N, Taguchi A, Baradaran-Heravi A, Kotake M, Arai M, Takayama K, Taniguchi A, Roberge M, Hayashi Y. New negamycin-based potent readthrough derivative effective against TGA-type nonsense mutations. ACS Med Chem Lett. 2019 Sep 23;10(10):1450-1456. PMID: 31620232 DOI: 10.1021/acsmedchemlett.9b00273