

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6044923号
(P6044923)

(45) 発行日 平成28年12月14日 (2016.12.14)

(24) 登録日 平成28年11月25日 (2016.11.25)

(51) Int.Cl.

F 1

C 0 7 D 4 0 3 / 1 4	(2 0 0 6 . 0 1)	C 0 7 D 4 0 3 / 1 4	C S P
A 6 1 K 3 1 / 4 1 7 8	(2 0 0 6 . 0 1)	A 6 1 K 3 1 / 4 1 7 8	Z N A
A 6 1 P 4 3 / 0 0	(2 0 0 6 . 0 1)	A 6 1 P 4 3 / 0 0	1 1 1
A 6 1 P 3 5 / 0 0	(2 0 0 6 . 0 1)	A 6 1 P 3 5 / 0 0	
A 6 1 P 1 3 / 0 8	(2 0 0 6 . 0 1)	A 6 1 P 1 3 / 0 8	

請求項の数 4 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2012-106382 (P2012-106382)
 (22) 出願日 平成24年5月8日 (2012.5.8)
 (65) 公開番号 特開2013-234135 (P2013-234135A)
 (43) 公開日 平成25年11月21日 (2013.11.21)
 審査請求日 平成27年5月1日 (2015.5.1)

(73) 特許権者 899000057
 学校法人日本大学
 東京都千代田区九段南四丁目8番24号
 (74) 代理人 110000774
 特許業務法人 もえぎ特許事務所
 (72) 発明者 大日方 大亮
 東京都千代田区九段南四丁目8番24号
 学校法人日本大学内
 (72) 発明者 高橋 悟
 東京都千代田区九段南四丁目8番24号
 学校法人日本大学内
 (72) 発明者 福田 昇
 東京都千代田区九段南四丁目8番24号
 学校法人日本大学内

最終頁に続く

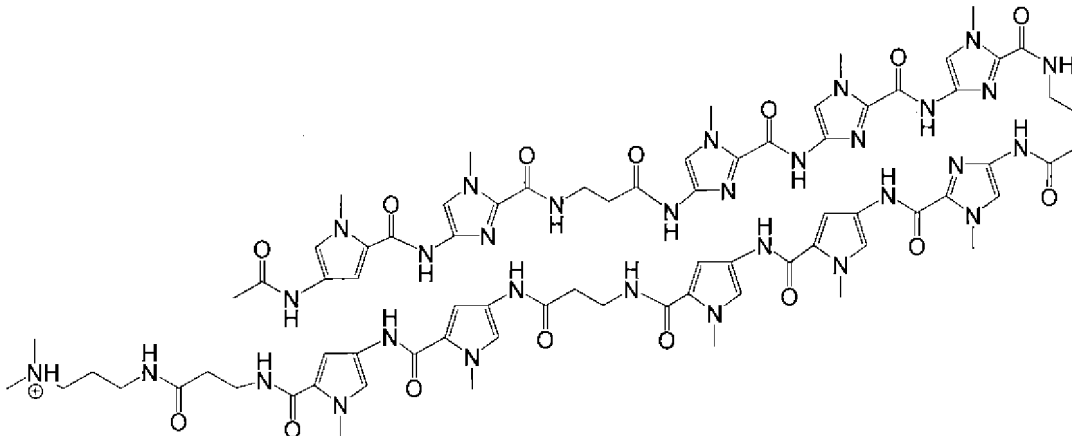
(54) 【発明の名称】 新規P1ポリアミド

(57) 【特許請求の範囲】

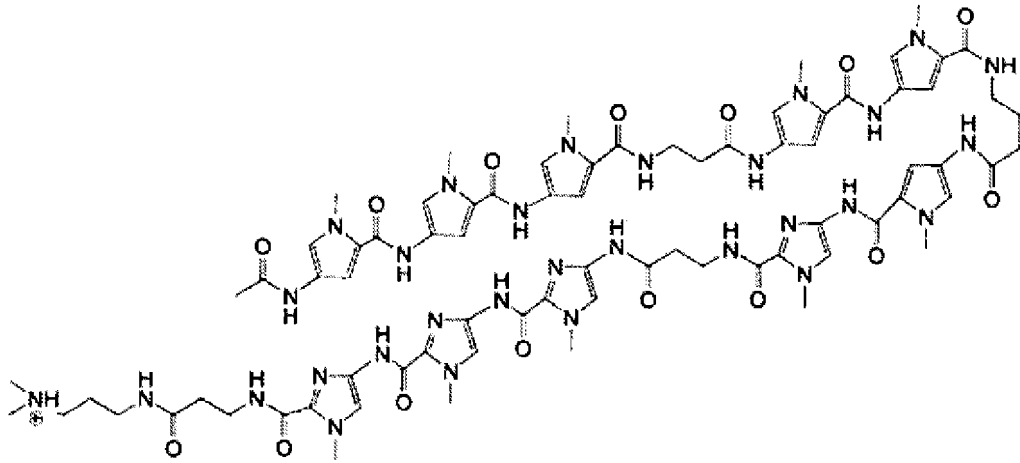
【請求項1】

次の式1~4のいずれかに示されるピロール-イミダゾールポリアミド。

[式1]

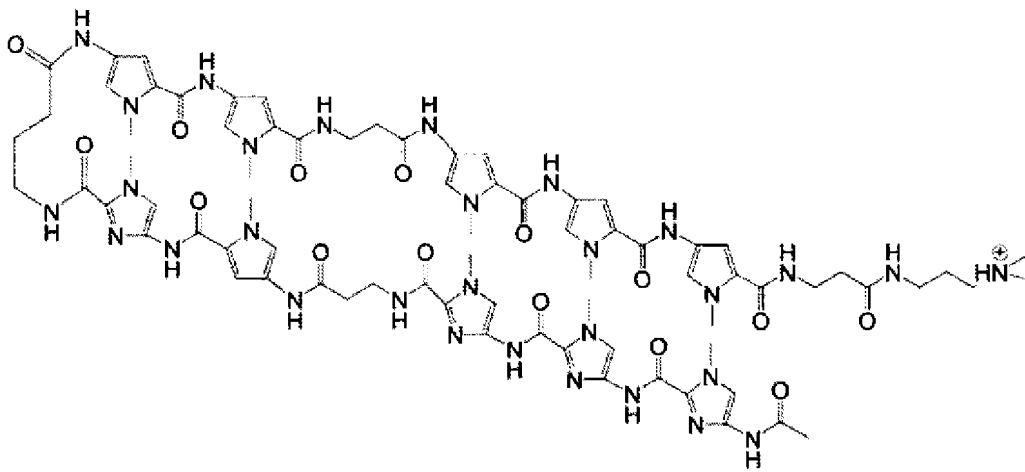


[式2]



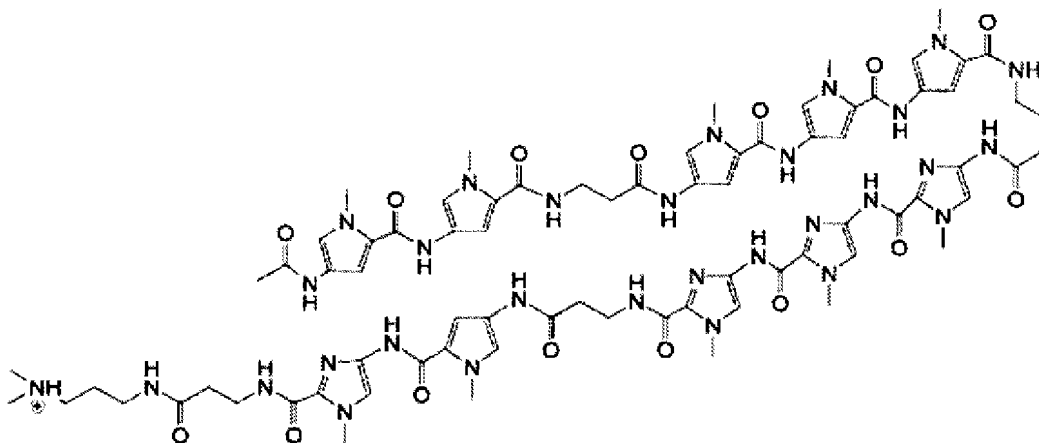
10

[式 3]



20

[式 4]



30

40

【請求項 2】

請求項 1 に記載のピロール - イミダゾール ポリアミドを有効成分として含む、TMPRSS2 遺伝子と ERG 遺伝子との融合遺伝子の発現抑制剤。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のピロール - イミダゾール ポリアミドを有効成分として含む EZH2 遺伝子の発現抑制剤。

【請求項 4】

請求項 1 に記載のピロール - イミダゾール ポリアミドを有効成分として含む前立腺癌の

50

予防または治療剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規のピロール-イミダゾールポリアミド（以下、PIポリアミドと示す場合がある）に関する。さらに詳しくは、アンドロゲン応答遺伝子であるTMPRSS2遺伝子と、転写制御因子であるETS familyに属するERG遺伝子との融合遺伝子の発現を抑制する新規のPIポリアミドに関する。

【背景技術】

【0002】

ステロイドホルモンのひとつとであるアンドロゲンと、この受容体であるアンドロゲンレセプター（Androgen Receptor; AR（以下、ARと示す場合がある））は、前立腺細胞において、その増殖、さらには癌化に密接に関与していることが知られている。

そこで、前立腺癌の治療法のひとつとして、アンドロゲン除去療法が行われてきた。アンドロゲン除去療法は、ARの作用を抑制することにより、前立腺癌の進行を抑制させる方法である。しかし、この治療法では、治療が進むに従って、癌化した前立腺細胞の形質が変化するため効果がなくなり、その後の治療が困難であるという問題があった。

【0003】

近年、正常な前立腺細胞において発現しているアンドロゲン応答遺伝子のTMPRSS2遺伝子が、細胞増殖・分化に関与するとともに、細胞の癌化に重要な役割を果たしているETS familyの遺伝子と融合することによって、前立腺細胞におけるアンドロゲン感受性を変化させ、細胞の癌化や癌の悪性度の進行等に影響を与えていることが報告されている（非特許文献1）。ETS familyの遺伝子としては、ERG遺伝子、ETV1遺伝子、ETV4遺伝子またはETV5遺伝子等が知られており、これらの遺伝子によってコードされるタンパク質は細胞の増殖、細胞周期、アポトーシス等の調節に作用する。

【0004】

また、前立腺細胞において、ARがTMPRSS2遺伝子およびERG遺伝子の塩基配列上に存在するAR結合配列（AR responsive elements; ARE（以下、AREと示す場合がある））と結合する際に、AREに隣接する共通の塩基配列（Break fusion sites）で切断が起こり、互いに結合することで、遺伝子転座が起こることも近年報告されている（非特許文献2）。

すなわち、ARは、TMPRSS2遺伝子とERG遺伝子との融合遺伝子の発現をアンドロゲン依存的に促進させるだけでなく、前立腺癌細胞の発生、増殖に有利な環境を作っている可能性が考えられる。

【0005】

そこで、これらの融合遺伝子や、融合遺伝子の発現によって起こる、ERG遺伝子の過剰発現の有無を調べることにより、前立腺癌を検出する方法や、干渉性RNAやアンチセンス核酸を投与して、これらの遺伝子の発現を不安定化することによって前立腺癌を治療する方法、癌化した細胞に細胞毒性遺伝子産物をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを投与することによって前立腺癌を治療する方法等が開示されている（特許文献1～4）。

しかし、干渉性RNAやアンチセンス核酸は生体内で分解され易く、安定性が低い。また、生体内において細胞毒性遺伝子産物を発現させる方法は、必ずしも安全とはいえず、これらの治療方法は前立腺癌の治療において十分な方法とはいえなかった。

【0006】

本発明者らは、本発明において、前立腺癌の治療に有効であり、かつ、安定で安全な物質を得るためにPIポリアミドに着目した。

PIポリアミドとは、芳香族アミノ酸であるN-methylpyrrole（N-メ

10

20

30

40

50

チルピロール（以下、Pyと示す場合がある）、N-methylimidazole（N-メチルイミダゾール（以下、Imと示す場合がある））で構成される、DNAに配列特異的に結合する物質のことである（非特許文献3）。

このうちIm/PyペアはDNAにおけるG・Cを認識し、Py/PyペアはT・AおよびA・Tを認識する。PIポリアミドはDNAに高い親和性を有し、Im/PyとPy/Pyの組み合わせ次第で、多様な配列のDNAに結合させることができる。また、生体内において分解されず、干渉性RNA等と比べて安定性が高いという利点もある。

【0007】

そこで、腫瘍で高発現している遺伝子を標的とした様々なPIポリアミドが開発されており、抗腫瘍効果を示すことが確認されている（非特許文献4）。

例えば、ヒトの悪性腫瘍において過剰発現が報告されているオーロラキナーゼAおよびオーロラキナーゼBの遺伝子を標的として、これらの発現量を制御することを目的とした、PIポリアミドを含む薬剤等も開示されている（特許文献5）。この文献において、この薬剤の対象となり得る悪性腫瘍のひとつとして前立腺癌を挙げている。しかし、ここで示されている薬剤は、前立腺癌に特異的な遺伝子の発現を制御することを目的とするものではない。従って、前立腺癌の予防、治療等において、より有効かつ安全で安定した薬剤の提供が望まれている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特表2010-505446号公報

【特許文献2】特表2011-518552号公報

【特許文献3】特表2009-507492号公報

【特許文献4】特表2010-532663号公報

【特許文献5】特開2011-26203号公報

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】Tomlins SA et al, Science 310:644-648, 2005

【非特許文献2】Lin C et al, Cell 139:1047-1049, 2009

【非特許文献3】Cho J et al, PNAS 92:10389-10392, 1995

【非特許文献4】Wang X, et al, Cancer Sci 101:759-766, 2010

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

前立腺癌の予防、治療に有用かつ安全で安定した薬剤の提供を課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、アンドロゲン応答遺伝子であるTMPRSS2遺伝子と、転写制御因子であるETS familyに属するERG遺伝子との融合を抑制する新規のPIポリアミドを得るに至った。

本発明者らは、本発明において、このPIポリアミドが、TMPRSS2遺伝子とERG遺伝子との融合遺伝子の発現を抑制し、また、この融合遺伝子の発現に伴って起こるEZH2遺伝子の発現も抑制できるPIポリアミドであることを確認するとともに、前立腺癌の予防、治療等に有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0012】

すなわち、本発明は次の(1)~(5)のPIポリアミド、該PIポリアミドを有効成

10

20

30

40

50

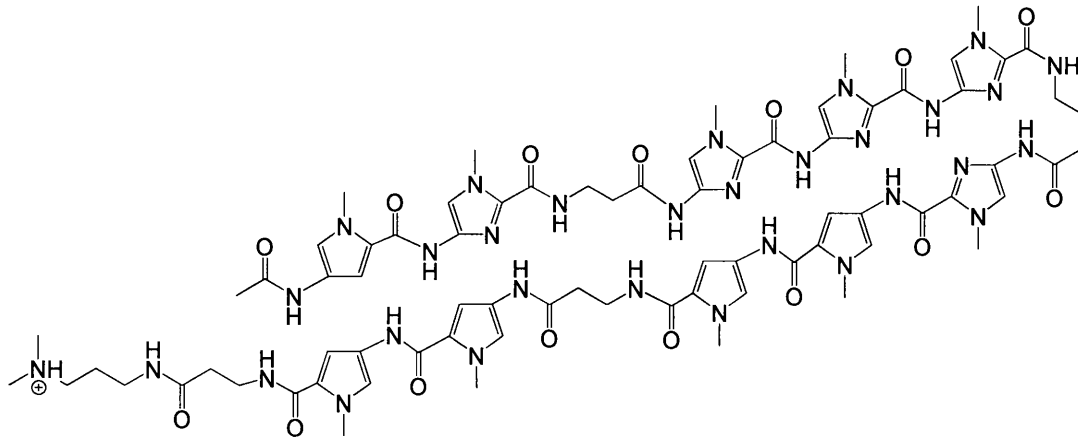
分とする融合遺伝子の発現抑制剤等に関する。

(1) 配列表配列番号 1 に示される塩基配列の全部または一部に結合する P I ポリアミド

。

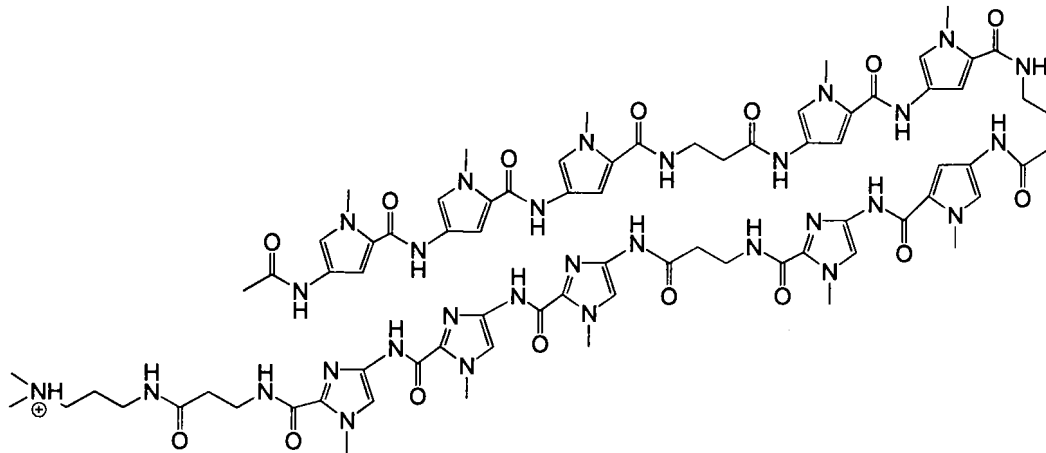
(2) 次の式 1 ~ 4 のいずれかに示される、上記 (1) に記載の P I ポリアミド。

[式 1]



10

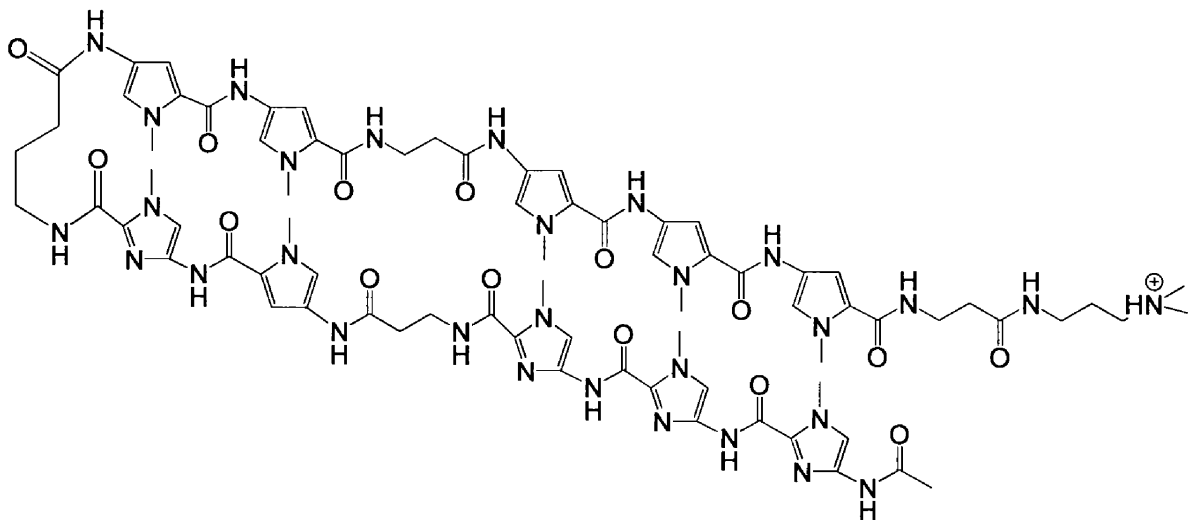
[式 2]



20

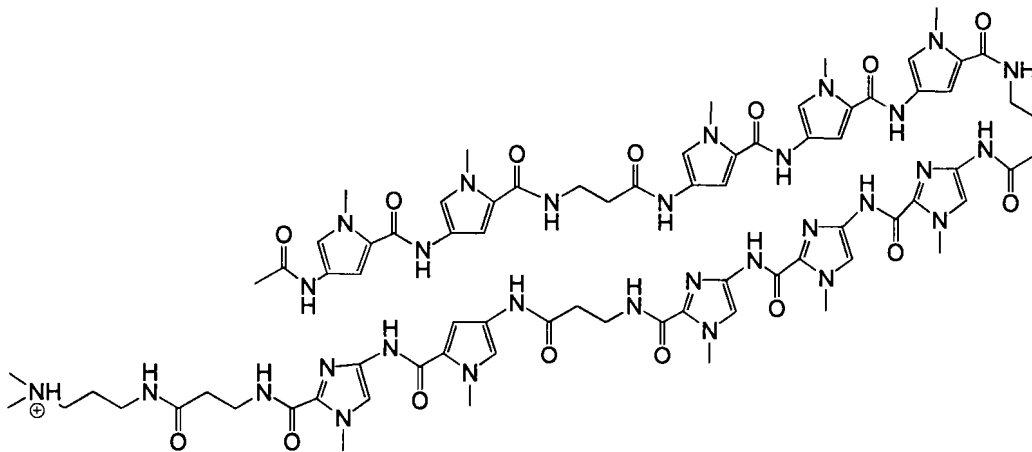
30

[式 3]



40

[式 4]



10

(3) 上記(1)または(2)に記載のPIポリアミドを有効成分として含む、TMPRSS2遺伝子とERG遺伝子との融合遺伝子の発現抑制剤。

(4) 上記(1)または(2)に記載のPIポリアミドを有効成分として含むEZH2遺伝子の発現抑制剤。

(5) 上記(1)または(2)に記載のPIポリアミドを有効成分として含む前立腺癌の予防および/または治療剤。

【発明の効果】

【0013】

20

本発明のPIポリアミドを提供することによって、前立腺癌の予防、治療に有用かつ安全で安定した薬剤を開発することが容易となる。生体内での安定性が高く、組織、細胞への移行性も高い、本発明のPIポリアミドを有効成分とする薬剤は、前立腺癌の予防、治療に効果的な薬剤となり得る。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】TMPRSS2遺伝子およびERG遺伝子における共通の塩基配列(配列表配列番号1)に対するPIポリアミド(1)の結合の様子を模式的に示した図である。

【図2】TMPRSS2遺伝子における共通の塩基配列(配列表配列番号1)に対するPIポリアミド(2)~(4)の結合の様子を模式的に示した図である。

30

【図3】TMPRSS2遺伝子およびERG遺伝子における共通の塩基配列(配列表配列番号1)、AREの塩基配列(配列表配列番号2)および各PIポリアミドの結合部位を示した図である(実施例)。

【図4】PIポリアミドにおけるDNA Binding Assayの結果を示した図である(実施例)。

【図5】PIポリアミドを導入した細胞における融合遺伝子またはERG遺伝子の発現の検討結果を示した図である(試験例1)。

【図6】PIポリアミドを導入した細胞における細胞増殖能の評価結果を確認した図である(試験例2)。

【図7】細胞遊走能の評価における各PIポリアミドを導入した細胞の顕微鏡写真を示した図である(試験例3)。

40

【図8】PIポリアミドを導入した細胞における細胞遊走能の評価結果を確認した図である(試験例3)。

【図9】PIポリアミドを導入した細胞におけるEZH2遺伝子の発現量の検討結果を示した図である(試験例4)。

【発明を実施するための形態】

【0015】

本発明の「PIポリアミド」には、配列表配列番号1に示される塩基配列の全部または一部を認識して結合するPIポリアミドであればいずれのものも含まれる。

この配列表配列番号1に示される塩基配列は、TMPRSS2遺伝子に含まれる塩基配

50

列、および E R G 遺伝子に含まれる塩基配列であって、これらの遺伝子に共通の塩基配列である。

【 0 0 1 6 】

本発明の「 P I ポリアミド」は、例えば、配列表配列番号 1 に示される塩基配列が T M P R S S 2 遺伝子上に 2 つ以上複数連続して、または、複数近接して存在する場合に、5' 側に存在する配列表配列番号 1 に示される塩基配列の全部または一部と、その下流に存在する配列表配列番号 1 に示される塩基配列の全部または一部とをいずれも認識して結合する P I ポリアミドであってもよい。

【 0 0 1 7 】

このような本発明の「 P I ポリアミド」は、 T M P R S S 2 遺伝子に含まれる配列表配列番号 1 に示される塩基配列の全部または一部および / または E R G 遺伝子に含まれる配列表配列番号 1 に示される塩基配列の全部または一部を認識して結合することにより、 T M P R S S 2 遺伝子と E R G 遺伝子との融合遺伝子の発現を抑制するための P I ポリアミドとして利用することもできる。

また、本発明の「 P I ポリアミド」は、本発明の「 P I ポリアミド」が結合する前に、 T M P R S S 2 遺伝子と E R G 遺伝子が融合してしまった場合でも融合遺伝子に結合することで、その後の E R G 遺伝子の過剰発現を抑制することも可能である。

【 0 0 1 8 】

このような本発明の「 P I ポリアミド」として、例えば、次の式 1 ~ 式 4 に示される P I ポリアミドを挙げることができる。このうち式 1 に示される P I ポリアミド (1) は、配列表配列番号 1 に示される塩基配列の全部を認識して結合する P I ポリアミドである。図 1 に、この P I ポリアミド (1) の T M P R S S 2 遺伝子および E R G 遺伝子における共通の塩基配列 (配列表配列番号 1) に対する結合の様子を模式的に示した。

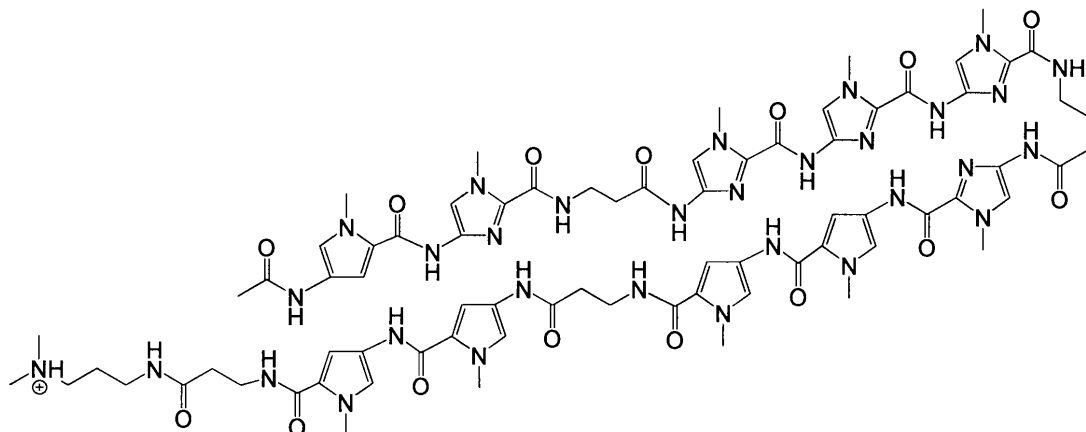
【 0 0 1 9 】

また、式 2 に示される P I ポリアミド (2)、式 3 に示される P I ポリアミド (3) および式 4 に示される P I ポリアミド (4) はいずれも配列表配列番号 1 に示される塩基配列の一部を認識して結合する P I ポリアミドである。これらのポリアミドはいずれも T M P R S S 2 遺伝子上に 2 つ並んで存在する配列表配列番号 1 の塩基配列を 1 分子で認識できる P I ポリアミドである。図 2 に、これらの P I ポリアミドの T M P R S S 2 遺伝子における共通の塩基配列 (配列表配列番号 1) に対する結合の様子をそれぞれ模式的に示した。

本発明の「 P I ポリアミド」は、これらの式 1 ~ 式 4 に示される P I ポリアミドに限らず、上記のような特性を有する「 P I ポリアミド」であればいずれのものであってもよく、従来知られている方法により、独自に設計して作製した「 P I ポリアミド」も含まれる。

【 0 0 2 0 】

[式 1]



10

20

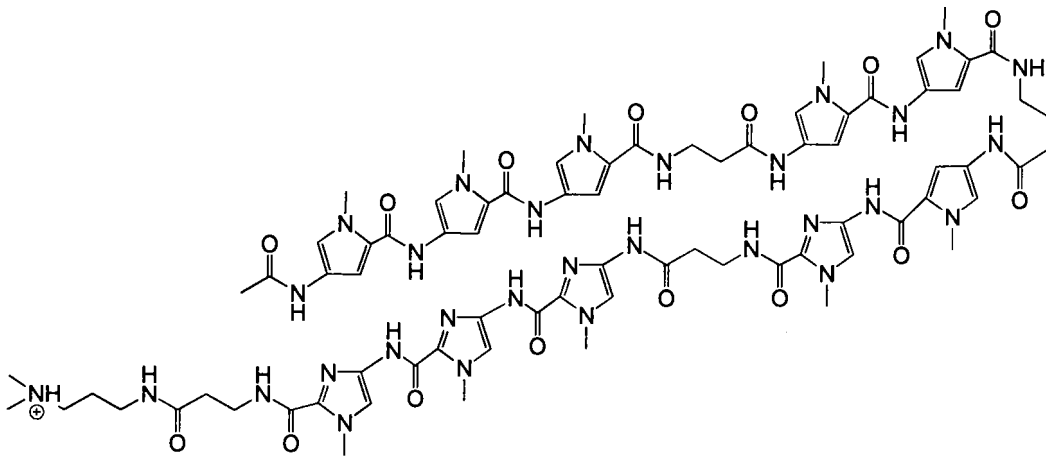
30

40

50

【 0 0 2 1 】

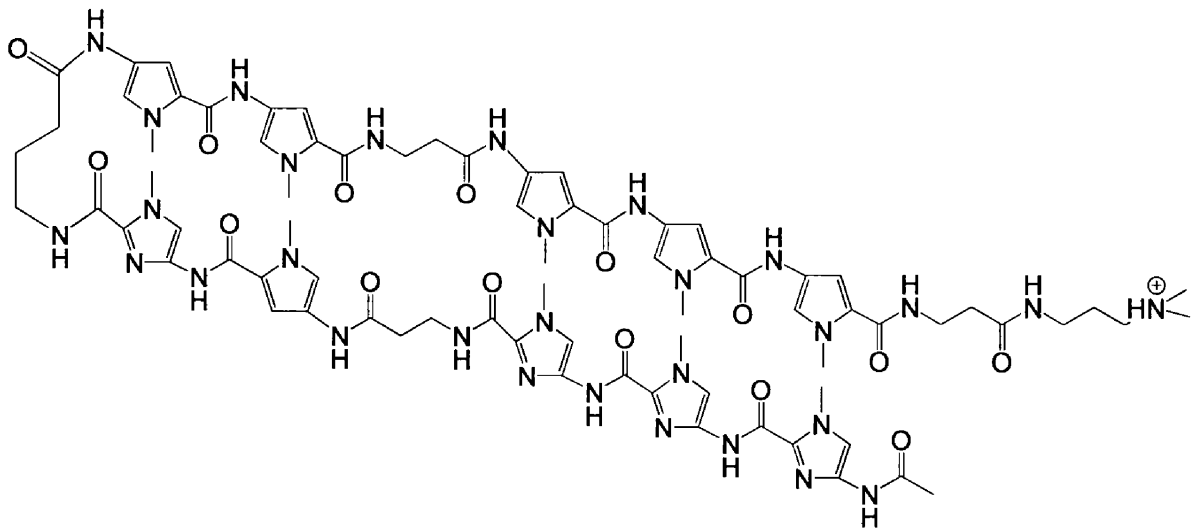
[式 2]



10

【 0 0 2 2 】

[式 3]

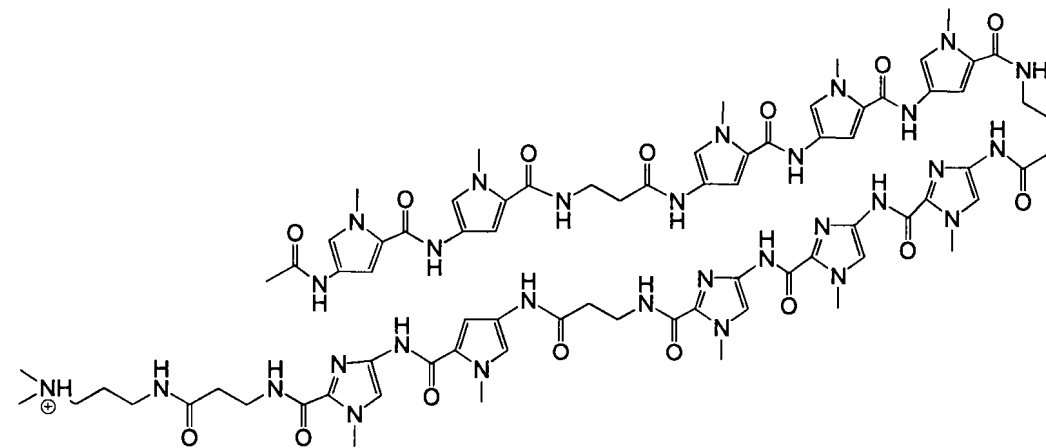


20

30

【 0 0 2 3 】

[式 4]



40

【 0 0 2 4 】

本発明の「TMPRSS2遺伝子とERG遺伝子との融合遺伝子の発現抑制剤」とは、
本発明のPIポリアミドを有効成分として含む剤であって、TMPRSS2遺伝子と、E

50

R G 遺伝子との融合を抑制し、これらの融合遺伝子の発現を抑制する剤のことをいう。

ここで、「発現抑制」とは、例えば、前立腺癌細胞等の「T M P R S S 2 遺伝子と E R G 遺伝子との融合遺伝子の発現」が起こる細胞に本発明の該発現抑制剤を付与した場合に、本発明の該発現抑制剤を付与しない場合と比べて、これらの融合遺伝子の発現が低下する状態のことをいう。この融合遺伝子の発現の低下には、融合遺伝子がまったく発現しない場合も含まれる。

このような本発明の「T M P R S S 2 遺伝子と E R G 遺伝子との融合遺伝子の発現抑制剤」は、本発明の P I ポリアミドを有効成分として含む剤であればよく、本発明の P I ポリアミドのみからなる剤でも、その他薬学的に許容される成分等を含む剤であっても良い。

10

有効成分として含まれる P I ポリアミドは、T M P R S S 2 遺伝子に含まれる配列表配列番号 1 に示される塩基配列の全部または一部および / または E R G 遺伝子に含まれる配列表配列番号 1 に示される塩基配列の全部または一部を認識して結合する P I ポリアミドであることが特に好ましい。

【 0 0 2 5 】

本発明の「E Z H 2 遺伝子の発現抑制剤」とは、本発明の P I ポリアミドを有効成分として含む剤であって、E Z H 2 遺伝子の発現を抑制する剤のことをいう。

E Z H 2 遺伝子は、T M P R S S 2 遺伝子と E R G 遺伝子との融合遺伝子が発現することにより、E R G 遺伝子が過剰発現したこととに伴って、発現量が増加する遺伝子であり、アンドロゲン非依存的に前立腺癌細胞の増殖に作用することが示唆されている。

20

ここで、「発現抑制」とは、例えば、前立腺癌細胞等の「E Z H 2 遺伝子の発現」が起こる細胞に本発明の該発現抑制剤を付与した場合に、本発明の該発現抑制剤を付与しない場合と比べて、E Z H 2 遺伝子の発現が低下する状態のことをいう。この E Z H 2 遺伝子の発現の低下には、E Z H 2 遺伝子がまったく発現しない場合も含まれる。

このような本発明の「E Z H 2 遺伝子の発現抑制剤」は、本発明の P I ポリアミドを有効成分として含む剤であればよく、本発明の P I ポリアミドのみからなる剤でも、その他薬学的に許容される成分等を含む剤であっても良い。

【 0 0 2 6 】

本発明の「前立腺癌の予防および / または治療剤」とは、本発明の P I ポリアミドを有効成分として含む剤であって、前立腺癌の予防、前立腺癌の治療、または前立腺癌の予防および治療に有用な剤のことをいう。

30

このような本発明の「前立腺癌の予防および / または治療剤」は、本発明の P I ポリアミドを有効成分として含む剤であればよく、本発明の P I ポリアミドのみからなる剤でも、その他薬学的に許容される成分等を含む剤であっても良い。

このような本発明の剤は、前立腺癌を発症する可能性が高いヒトに発症前に投与したり、前立腺癌を発症した後に、癌の進行を抑制したり、癌を完寛させたりすることを目的として投与することができる。

【 0 0 2 7 】

以下、実施例、試験例をあげて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

40

【実施例】

【 0 0 2 8 】

< P I ポリアミドの作製 >

1 . P I ポリアミドの設計

T M P R S S 2 遺伝子および E R G 遺伝子に存在する共通の塩基配列 (B r e a k f u s i o n s i t e s) (配列表配列番号 1) の全部または一部に結合するように、次の (1) ~ (4) の 4 つの P I ポリアミドをそれぞれ設計した。

また、これらとの比較のために、T M P R S S 2 遺伝子および E R G 遺伝子に存在する共通の塩基配列 (配列表配列番号 1) の全部または一部に結合しない P I ポリアミド (コントロール) も設計した。

50

【 0 0 2 9 】

図3にTMPRSS2遺伝子およびERG遺伝子の塩基配列における共通の塩基配列、AREの塩基配列(配列表配列番号2)および各PIポリアミドの結合部位を示した。

図3において、赤色のアンダーラインで示された箇所がTMPRSS2遺伝子およびERG遺伝子の塩基配列における共通の塩基配列であり、青色のアンダーラインで示された箇所がAREの塩基配列であり、緑色のアンダーラインで示された箇所が各PIポリアミドの結合部位である。

また、下式における各記号は次の意味を示す(Ac:アセチル、Py:ピロール、Im:イミダゾール、: -アラニン、: -酪酸、Dp:N,N-ジメチル-1,3-プロパンジアミン)。

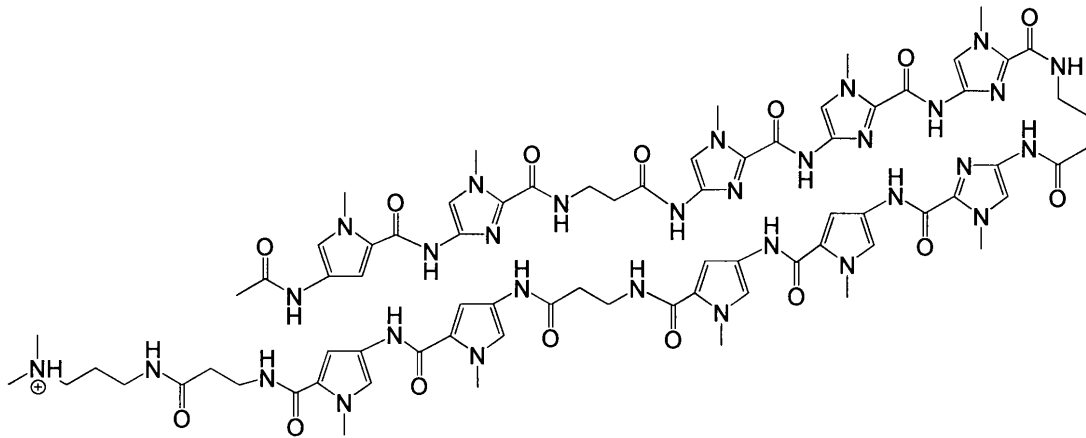
【 0 0 3 0 】

PIポリアミド(1)

図3に、PI polyamide(1)として緑色のアンダーラインで示した塩基配列(表1、PIポリアミド(1))を標的塩基配列として認識するように、AcPyImImImPyPyPyImPyPyDpのPIポリアミドを設計した。このPIポリアミドは以下の式(式1)に示されるものであり、化学式は $C_{75}H_{94}N_{31}O_{15}$ 、分子量は1669.75であった。

【 0 0 3 1 】

[式1]



【 0 0 3 2 】

PIポリアミド(2)

図3に、PI polyamide(2)として緑色のアンダーラインで示した塩基配列(表1、PIポリアミド(2))を標的塩基配列として認識するように、AcPyPyPyPyPyPyImImImImDpのPIポリアミドを設計した。このPIポリアミドは以下の式(式2)に示されるものであり、の化学式は $C_{76}H_{95}N_{30}O_{15}$ 、分子量は1668.76であった。

【 0 0 3 3 】

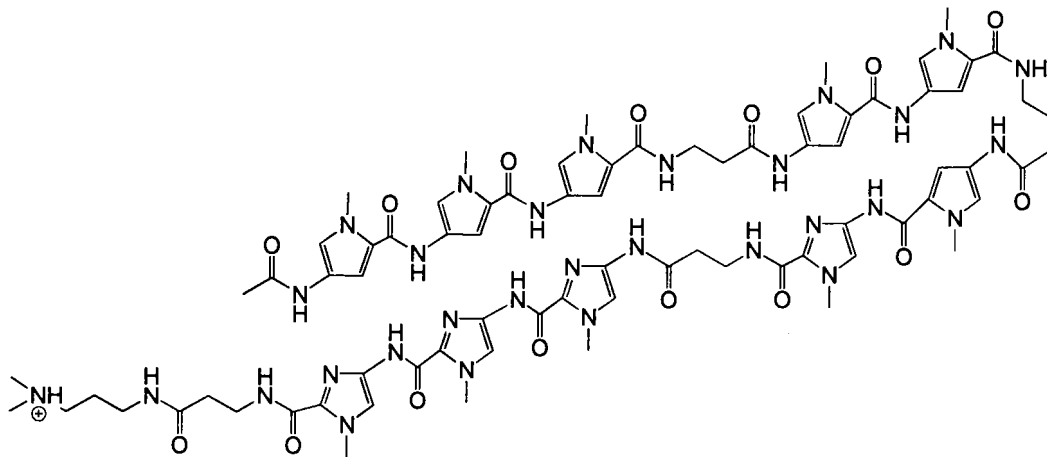
[式2]

10

20

30

40



10

【0034】

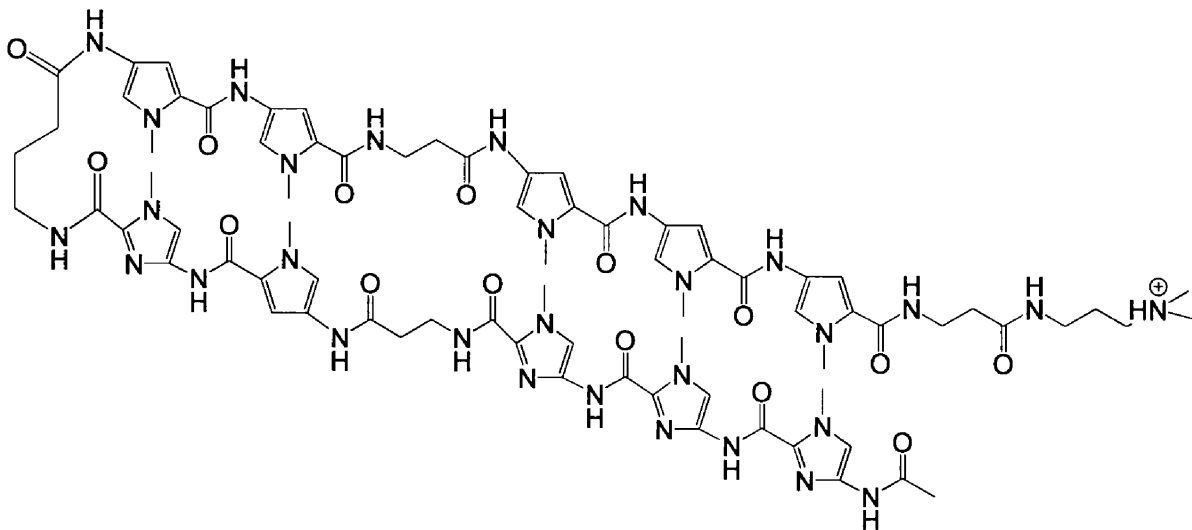
PIポリアミド(3)

図3に、PI polyamide(3)として緑色のアンダーラインで示した塩基配列(表1、PIポリアミド(3))を標的塩基配列として認識するように、AcImImImPyImPyPyPyPyDpのPIポリアミドを設計した。このPIポリアミドは以下の式(式3)に示されるものであり、化学式は $C_{76}H_{95}N_{30}O_{15}$ 、分子量は1668.76であった。

20

【0035】

[式3]



30

【0036】

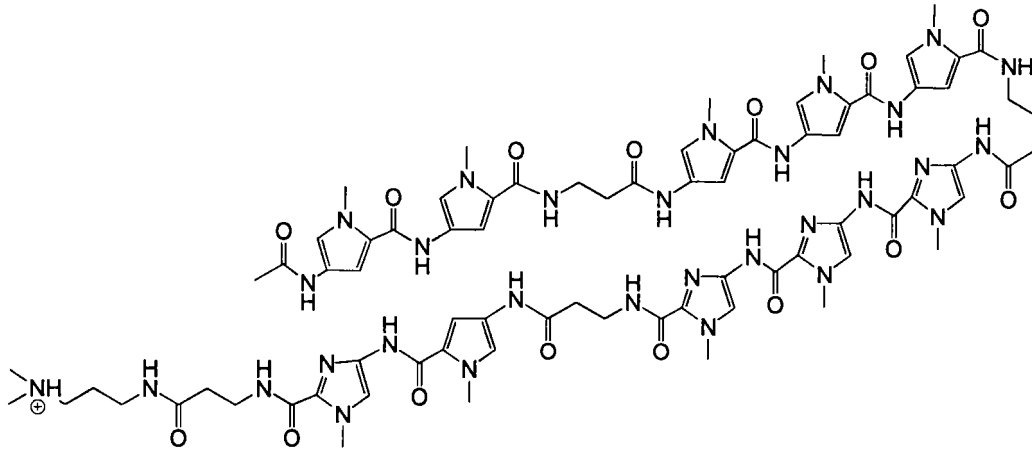
PIポリアミド(4)

図3に、PI polyamide(4)として緑色のアンダーラインで示した塩基配列(表1、PIポリアミド(4))を標的塩基配列として認識するように、AcPyPyPyPyImImImPyImDpのPIポリアミドを設計した。このPIポリアミドは以下の式(式4)に示されるものであり、化学式は $C_{76}H_{95}N_{30}O_{15}$ 、分子量は1668.76であった。

40

【0037】

[式4]



10

【 0 0 3 8 】

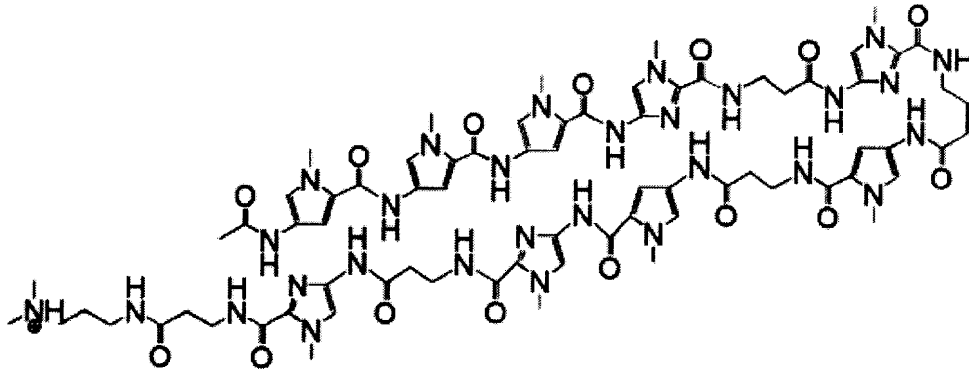
P I ポリアミド (コントロール)

T M P R S S 2 遺伝子および E R G 遺伝子に存在する共通の塩基配列 (配列表配列番号 1) の全部または一部に結合しない P I ポリアミド (コントロール) として、表 1、P I ポリアミド (コントロール) に示した塩基配列を標的塩基配列として認識するように A c P y P y P y I m I m P y P y I m I m D p の P I ポリアミドを設計した。この P I ポリアミドは以下の式 (式 5) に示されるものであり、化学式は $C_{73}H_{94}N_{29}O_{15}$ 、分子量は 1617.71 であった。

20

【 0 0 3 9 】

[式 5]



30

【 0 0 4 0 】

【表 1】

PI ポリアミド	標的塩基配列	配列番号
PI ポリアミド (1)	5' -w c c c w c w w- 3'	3
	3' -w g g g w g w w- 5'	4
PI ポリアミド (2)	5' -w w g w g g g- 3'	5
	3' -w w c w c c c- 5'	6
PI ポリアミド (3)	5' -g g g w w g w- 3'	7
	3' -c c c w w c w- 5'	8
PI ポリアミド (4)	5' -w g g g w w g w- 3'	9
	3' -w c c c w w c w- 5'	10
PI ポリアミド (コントロール)	5' -w c w c g w g w- 3'	11
	3' -w g w g c w c w- 5'	12

w=A or T

【0041】

2. PI ポリアミドの合成

< HCTUを用いたピロールイミダゾールポリアミドの合成 >

HCTU (ペプチド研究所製) を縮合活性化剤として、上記 1. で設計した PI ポリアミド (1) ~ (4) (4 種) および PI ポリアミド (コントロール) をそれぞれ合成した。

【0042】

1) 試薬の調製

(1) モノマー

Fmoc PyCOOH (Wako, 20 mg)、Fmoc ImCOOH (Wako, 40 mg)、Fmoc - Abu - OH (Nova Biochem, 17.5 mg) および Fmoc - Ala - OH (Nova Biochem, 17.5 mg) をそれぞれ、合成する PI ポリアミドごとに必要なカップリング分用意し、レジンに対して Fmoc ImCOOH を 2 当量、それ以外を 4 当量ずつ秤量し、1.5 mL のエッペンドルフチューブに移した。さらに HCTU を Fmoc ImCOOH のチューブに 45 mg、それ以外のチューブには 22.5 mg をそれぞれ加えた。また、NMP (Nacal Tesque 製) を Fmoc ImCOOH のチューブに 500 μ L、それ以外のチューブには 250 μ L 加えボルテックスおよび 1 時間静置し完全に溶解させた。

(2) 合成用試薬

合成機による合成のために、表 2 に記載の試薬を調製して用いた。

【0043】

【表 2】

1 サンプルあたりに必要な合成機用試薬

Activater (縮合試薬)	DIEA (N, N-ジイソプロピルエチルアミン)	3 mL
Deblock (Fmoc 基脱保護用)	30% Piperidine / DMF Piperidine	7.5 mL
	NMP	17.5 mL
Wash (洗浄用溶媒)	NMP	200 mL

10

20

30

40

50

【0044】

3. レジンの調製

Fmoc - Ala - Wang - Resin (Peptide Institute 製) を Small Libra Tube (HiPep 研究所製) に 40 mg (0.04 mmol) 取り、ペプチド合成機にセットした。これに NMP 1 mL を加え、20 分間膨潤させた。

【0045】

4. ペプチド合成 (自動)

上記 1. で調製した DIEA を縮合活性化剤として合成機 (PSSM-8; 島津製作所製) にインストールした。また、先に準備しておいた各モノマーの入ったチューブを C 末端から順番通りに合成機内ラックに配置した。PSSM-8 の合成プログラムをセットし、合成機をスタートさせ、 $H_2NACPyImImImImPyPyPyImPyPyPyResin$ 、 $H_2NACPyPyPyPyPyPyPyImImImImResin$ 、 $H_2NACImImImPyImPyPyPyPyPyResin$ 、 $H_2NACPyPyPyPyImImImPyImResin$ または $H_2NACPyPyPyImImPyPyImImResin$ まで、次の (1) ~ (4) の反応サイクルを繰り返すことで自動合成を行った。

【0046】

反応サイクル

(1) カップリング処理を、上記活性化剤を用いて NMP 中で 30 分間行った。
 (2) 余剰のモノマーおよび活性化剤を除くため、1 mL の NMP によるレジンの洗浄を 5 回繰り返した。
 (3) Fmoc 脱保護溶液 (30% Piperidine / NMP) を 1 mL 加え 3 分間反応させ、溶液を除去後、再び同じサイクルを繰り返した。
 (4) Fmoc 脱保護溶液を除くため 1 mL の NMP によるレジンの洗浄を 5 回繰り返し (1) に戻った。目的産物が得られるまでこのサイクルを繰り返した。

【0047】

5. 精製

合成機からレジンを取り出し、洗浄、乾燥の後、ネジ式キャップのエッペンドルフチューブに移した。これに N, N - Dimethylpropanediamine (Nacalai Tesque 製, 2 mL) を 500 μ L 加えてヒートブロックにより 55 で一晩加熱することにより、レジンからポリアミドの切り出しを行った。反応液を Libra Tube に移し、濾過によりレジンを取り除き、レジンに付着している残りの反応液を NMP 1 mL およびメタノール 1 mL で回収した。

溶媒を留去後、HPLC (0.1% AcOH : $CH_3CN = 100 : 0 \sim 0 : 100$, 30 min) で分取精製した。分取精製の後、凍結乾燥をして、上記 1. で設計した PI ポリアミド (4 種) および PI ポリアミド (コントロール) をそれぞれ得た。

【0048】

6. DNA Binding Assay

上記 5 において生成した PI ポリアミド (1) ~ (4) (4 種) について、次の 1) および 2) の工程による DNA Binding Assay により、TMPRSS2 遺伝子および ERG 遺伝子への結合をそれぞれ確認した。また、PI ポリアミド (コントロール) についても同様に、各遺伝子への結合の有無を調べた。

【0049】

1) TMPRSS2 遺伝子および ERG 遺伝子の共通の塩基配列 (配列表配列番号 1) と同じ塩基配列を含む TMPRSS2 オリゴ DNA に FITC をラベルした分子 (47 bp)、および同塩基配列を含む ERG オリゴ DNA に FITC をラベルした分子 (59 bp) を作成し、終濃度 1 μ M の各オリゴをアニーリングバッファー (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 200 mM NaCl) 中で 100 に熱し、その後 2 時間かけて段階的に 30 まで冷却した。これにより、各オリゴ DNA は自己アニーリン

10

20

30

40

50

グし、ヘアピン状の2本鎖を形成する。

2) 上記1)のヘアピン状の2本鎖DNAを含む溶液15 μ lに0.2 mMのPIポリアミド(1)~(4)またはPIポリアミド(コントロール)をそれぞれ5 μ l混合し、37 で1時間インキュベートして混合液を得た。

3) 上記(2)の混合液を5-20% アクリルアミドゲル(TBE バッファー)にて電気泳動しLAS 4000(GEヘルスケア・ジャパン製)にて泳動像を観察し、泳動度の違いから結合の有無を判定した。

【0050】

その結果、図4に示したようにTMPRSS2 オリゴDNAにおいても、ERG オリゴDNAにおいても、本発明のPIポリアミド(1)を加えた場合(図4、Polyamide(1))はPIポリアミド(コントロール)を加えた場合(図4、Polyamide(Control))やPIポリアミドを加えていない溶媒のみの場合(図4、Vehicle)と比べて泳動の遅れが見られ、PIポリアミド(1)がTMPRSS2 オリゴDNAおよびERG オリゴDNAのいずれにも結合することが確認できた。PIポリアミド(2)、PIポリアミド(3)およびPIポリアミド(4)においても、PIポリアミド(1)の結果と同様の結果が得られた。

10

【0051】

[試験例]

次の試験例1~4により、本発明のPIポリアミドによる、前立腺癌細胞(LMCA P)に対する効果を確認した。なお、各試験例における共通の試料として、次の試料を同様に調製して使用した。

20

【0052】

<試料>

1. PIポリアミド

実施例と同様の方法によって合成したPIポリアミド(1)~(4)(4種)およびPIポリアミド(コントロール)を使用した。

これらの各PIポリアミドを蒸留水に溶解したものを、細胞を培養している培地に添加することで細胞への導入を行った。

【0053】

2. 前立腺癌細胞LNCaP

ATCC(American Type Culture Collection)より入手したヒト前立腺癌細胞LNCaP(ATCCナンバー:CRL-174)を用いた。

30

【0054】

3. 培地

(1) フェノールレッド含有培地

フェノールレッド含有RPMI-1640培地(SIGMA-Aldrich製、カタログナンバーR7509)500mLに、チャコール処理を行った牛血清(FBS)を50mL添加したものをフェノールレッド含有培地として用いた。

(2) フェノールレッド非含有培地

フェノールレッド非含有RPMI-1640培地(SIGMA-Aldrich製、カタログナンバーR8758)500mLに、チャコール処理を行った牛血清(FBS)を12.5mL添加したものをフェノールレッド非含有培地として用いた。

40

【0055】

4. DHT(デヒドロテストステロン)(和光純薬)

エタノール(EtOH)で、100nMに溶解したDHTをアンドロゲン刺激のために用いた。

【0056】

[試験例1]

融合遺伝子またはERG遺伝子の発現の検討

50

RT-PCRにより、PIポリアミド(1)~(4)をそれぞれ導入した細胞における融合遺伝子の発現、およびERG遺伝子の過剰発現の有無を検討した。比較として、PIポリアミド(コントロール)を導入した細胞においても同様に検討した。

1) PIポリアミドの導入およびcDNAの調製

各PIポリアミドを1µMまたは5µMとなるように添加した上記3.(2)のフェノールレッド非含有培地でLNCaP細胞を3日間培養した。その後、上記4.のDHT(100nM)を培地内に添加し、アンドロゲン刺激を加えた。

この細胞から、アイソゲン(ニッポンジーン製)を用いてマニュアルに従って、RNAを抽出した後、PrimeScript(登録商標) Reverse Transcriptase(TaKaRa製)を用いてcDNAを調製した。

10

【0057】

2) RT-PCR

上記1)で調製したcDNAをそれぞれ鋳型DNAとして、表3に示したプライマーにより、各PIポリアミドを導入した前立腺癌細胞における融合遺伝子またはERG遺伝子の発現の有無を調べた。このRT-qPCRにおいて、Power SYBR(登録商標) Green PCR Master Mix(アプライドバイオシステム製)を使用した。

【0058】

【表3】

プライマー

20

増幅対象	プライマーの塩基配列(5'-3')	配列番号
融合遺伝子	AGCGCGGCAGGTTATTCCA	13
	ATCATGTCCTTCAGTAAGCCA	14
ERG遺伝子	TTATCAGTTGTGAGTGAGGACCA	15
	AAGTCTGTCCATAGTCGCTGG	16
GAPDH遺伝子 (内部標準)	GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA	17
	GTGGTTCGTTGAGGGCAATG	18

30

【0059】

その結果、図5に示したように、本発明のPIポリアミド(1)を導入した細胞においては(図5、Polyamide(1)1µM、5µM)、アンドロゲン刺激を与えても、導入したPIポリアミドの濃度依存的にTMPRSS2遺伝子とERG遺伝子との融合遺伝子(図5、TMPRSS2-ERG)およびERG遺伝子(図5、ERG)の発現が抑制されることが確認できた。一方、PIポリアミド(コントロール)を導入した細胞においては、いずれの遺伝子の発現も抑制されなかった(図5、Polyamide(Control))。PIポリアミド(2)、PIポリアミド(3)およびPIポリアミド(4)においても、PIポリアミド(1)の結果と同様の結果が得られた。

【0060】

40

[試験例2]

細胞増殖能の評価

各PIポリアミドを導入した細胞、および、比較としてPIポリアミド(コントロール)を導入した細胞を培養し、MTSアッセイによって各細胞の増殖能を検討した。

すなわち、このLNCaP細胞を全部で5000細胞となるように96ウェルプレートに播き、各PIポリアミドを1µMまたは5µMとなるように添加した上記3.(2)のフェノールレッド非含有培地で3日間培養した。その後、上記4.のDHT(100nM)を培地内に添加し、アンドロゲン刺激を加えた。刺激後、それぞれ24時間、48時間または96時間培養した。指定された刺激時間後、各細胞にMTS試薬(Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Prolife

50

ration Assay, Promega, Madison WI)を10 μ l添加して1時間インキュベートした。その後、各細胞の吸光度(490nm)を測定し、培養後の細胞数を調べることで、細胞増殖能を評価した。

【0061】

その結果、図6に示したように、PIポリアミド(コントロール)を導入した細胞(図6、Polyamide(Control))に対し、本発明のPIポリアミド(1)を導入した細胞(図6、Polyamide(1)1 μ M、5 μ M)では、96時間培養した段階で有意に増殖が抑制されることが確認できた(図6、* : p < 0.05)。PIポリアミド(2)、PIポリアミド(3)およびPIポリアミド(4)においても、PIポリアミド(1)の結果と同様の結果が得られた。

10

【0062】

[試験例3]

細胞遊走能の評価

各PIポリアミドを導入した細胞、および、比較としてPIポリアミド(コントロール)を導入した細胞を培養し、Cell Cultuer Insertと、8.0 μ m pore size PET filter(Becton Dickinson製)を用いてCell migration アッセイによって各細胞の遊走能を検討した。

すなわち、培養皿にPBSで10 μ g/mlに希釈したフィブロネクチン(Sigma製)を30分間作用させ、下層フィルターを作成した後、下層チャンバーに上記3.(1)のフェノールレッド含有培地RPMI 1640培地を700 μ l加えた。

20

各PIポリアミドを5 μ Mとなるように添加した添加した上記3.(1)のフェノールレッド含有培地で3日間培養したLNCaP細胞を5 \times 10⁴細胞ごとに分け、各細胞を300 μ lの上記3.(1)のフェノールレッド含有培地に懸濁したものをそれぞれ上層チャンバーに加えた。これを、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下で24時間培養した後、フィルターを剥がした。

下層フィルター上の細胞を30分間メタノールで固定した後、PBSで洗浄し、Gimsa's stain solution(Muto Pure Chemicals製)で30秒間インキュベートした。その後、細胞を200倍率の顕微鏡で観察し、細胞数を数えることで、細胞遊走能を評価した。

【0063】

図7に各PIポリアミドを添加した細胞の顕微鏡写真を示した。また、各PIポリアミドを添加した細胞における遊走した細胞数を図8に示した。その結果、図7および図8に示したように、本発明のPIポリアミド(1)を導入した細胞においては(図7、8、Polyamide(1))、PIポリアミド(コントロール)を導入した細胞(図7、8(Polyamide(Control)))に比べて、細胞の遊走能(浸潤能)が顕著に抑制されることが確認できた(図8、*** : p < 0.00001)。PIポリアミド(2)、PIポリアミド(3)およびPIポリアミド(4)においても、PIポリアミド(1)の結果と同様の結果が得られた。

30

【0064】

[試験例4]

EZH2遺伝子の発現量の検討

前立腺癌の進行に作用するポリコーム群タンパク質であるEZH2をコードする遺伝子についても、本発明の各PIポリアミドを導入した細胞における遺伝子の発現量を検討した。比較として、PIポリアミド(コントロール)を導入した細胞においても同様に検討した。

40

【0065】

1)PIポリアミドの導入およびcDNAの調製

各PIポリアミドを1 μ Mまたは5 μ Mとなるように添加した上記3.(2)のフェノールレッド非含有培地でLNCaP細胞を3日間培養した。その後、上記4.のDHT(100nM)を培地内に添加し、アンドロゲン刺激を加えた後、さらに2日間(48時間

50

) 培養した。

この細胞から、アイソゲン（ニッポンジーン製）を用いてマニュアルに従って、RNAを抽出した後、PrimeScript（登録商標）Reverse Transcriptase（Takara製）を用いてcDNAを調製した。

【0066】

2) RT-qPCR

上記1)で調製したcDNAをそれぞれ鋳型DNAとして、配列表配列番号19（EZH2 RT-qPCR fw、フォワードプライマー）および配列表配列番号20（EZH2 RT-qPCR rev、リバースプライマー）に示したプライマーにより、各PIポリアミドを導入した前立腺癌細胞におけるEZH2遺伝子の発現量を調べた。このRT-qPCRにおいて、Power SYBR（登録商標）Green PCR Master Mix（アプライドバイオシステム製）を使用した。

10

【0067】

その結果、図9に示したように、本発明のPIポリアミド(1)を導入した細胞においては(図9、Polyamide(1) 1 μM、5 μM)、導入していない細胞(図9、Polyamide(Control))に比べてEZH2遺伝子の発現が抑制されることが確認できた。

【産業上の利用可能性】

【0068】

本発明のPIポリアミドを提供することによって、前立腺癌の予防、治療に有用かつ安全で安定した薬剤を開発することが容易となる。また、前立腺癌に限らず、TMPRSS2遺伝子とERG遺伝子との融合遺伝子の発現を原因とする疾病や、EZH2遺伝子の発現を原因とする疾病等に対し、これらの遺伝子の発現を制御できる効果的な薬剤の提供も可能となる。

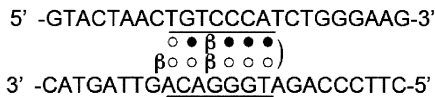
20

【図1】

TMPRSS2



ERG

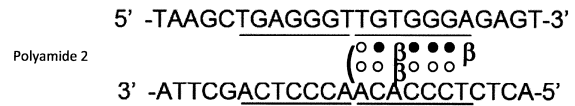


Polyamide(1)

○: N-methylpyrrole (Py), ●: N-methylimidazole (Im), β: Beta-alanine

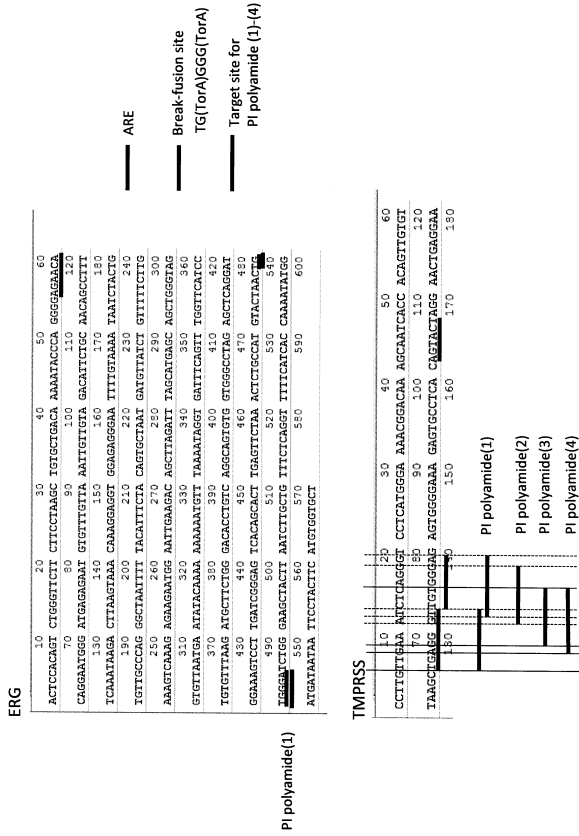
【図2】

TMPRSS2

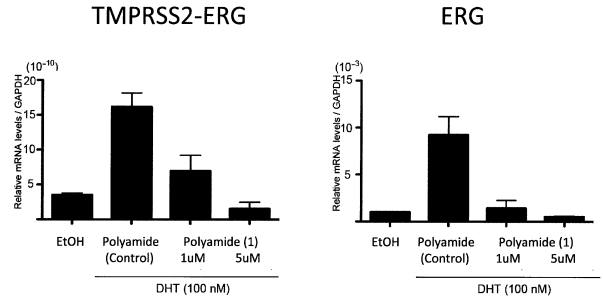


○: N-methylpyrrole (Py), ●: N-methylimidazole (Im), β: Beta-alanine

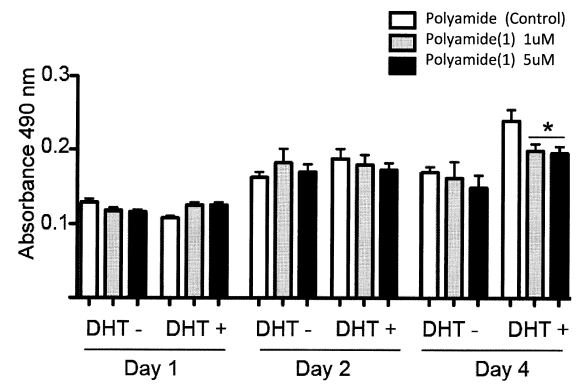
【 3 】



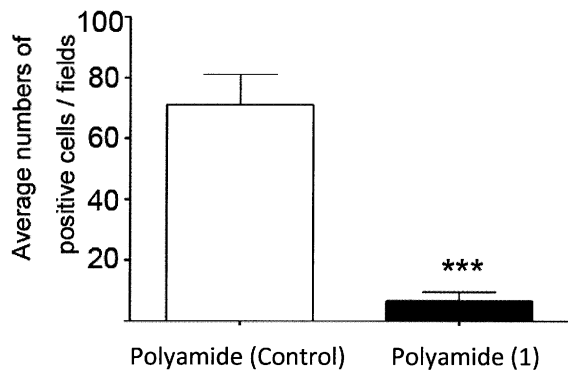
【 5 】



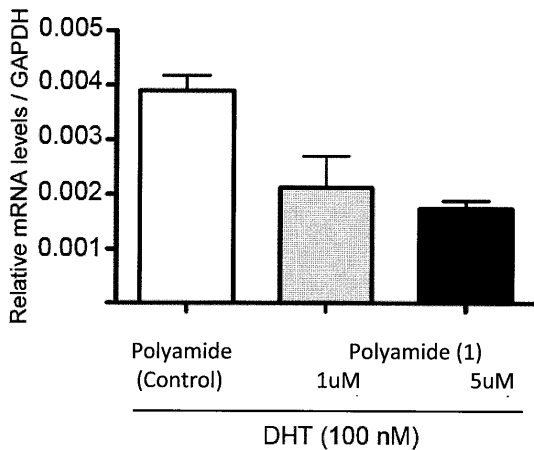
【 6 】



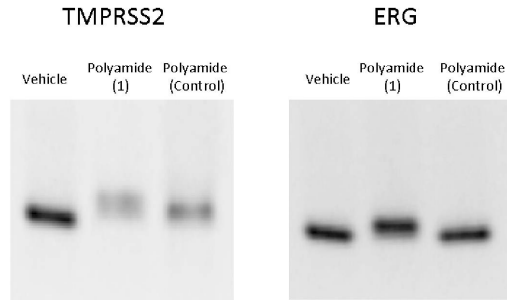
【 8 】



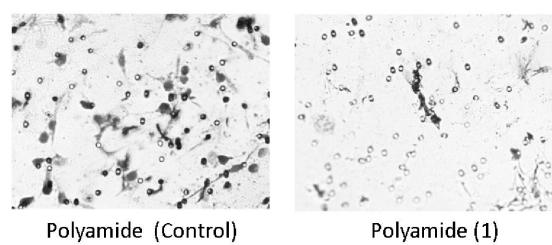
【 9 】



【 4 】



【 7 】



【配列表】

0006044923000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

特許法第30条第2項適用 「第7回 日本大学先端バイオフォーラム プログラム・抄録集」 「27th Annual EAU Congress 2012」掲載アドレス(平成24年1月24日掲載) <http://www.uroweb.org/events/abstracts-online/?AID=36305> 「第21回 泌尿器科分子・細胞研究会 プログラム・抄録集」 私立大学戦略的研究基盤形成支援事業 「ゲノム化学に基づく先進医療開発研究拠点」平成23年度報告会 プログラム 「日本泌尿器科学会雑誌 Vol.103 No.2 総会特集号 MARCH 2012」(平成24年3月20日 社団法人日本泌尿器科学会 発行)

(72)発明者 藤原 恭子
 東京都千代田区九段南四丁目8番24号 学校法人日本大学内

審査官 伊藤 佑一

(56)参考文献 米国特許出願公開第2009/0042965 (US, A1)
 Christian DOSE et al., Next Generation Hairpin Polyamides with (R)-3,4-Diaminobutyric Acid Turn Unit, Journal of the American Chemical Society, 2008年, Vol.130, pp.6859-6866
 Nicholas G. NICKOLS et al., Suppression of Androgen Receptor-mediated Gene Expression by a Sequence-specific DNA-binding Polyamid, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007年, Vol.104, No.25, pp.10418-10423

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 0 7 D
 A 6 1 K
 C 0 8 G
 C a p l u s / R E G I S T R Y (S T N)