

2023年9月19日

報道関係者各位

学校法人甲南学園

発がん性物質が逆に抗がん剤として働く仕組みを解明  
～DNA 四重らせんを狙って安心・安全の薬剤設計へ～

このたび、標記につきまして別紙の通り、プレスリリースを配信いたします。

つきましては、取材ならびに紙面掲載についてご検討いただけますようお願い申し上げます。

《本件に関するお問い合わせ先》

[プレスリリース全体について]

■甲南学園広報部

兵庫県神戸市東灘区岡本 8-9-1

電話 078-435-2314 (直通)

Email : [kouhou@adm.konan-u.ac.jp](mailto:kouhou@adm.konan-u.ac.jp)

[研究内容について]

甲南大学先端生命工学研究所 (FIBER)

○高橋俊太郎 (准教授)

電話 : 078- 303-1397

E-mail : [shtakaha@konan-u.ac.jp](mailto:shtakaha@konan-u.ac.jp)

○杉本直己 (所長・教授)

電話 : 078- 303-1416

E-mail : [sugimoto@konan-u.ac.jp](mailto:sugimoto@konan-u.ac.jp)

本プレスリリース配信先 : 兵庫県教育委員会記者クラブ、神戸市政記者クラブ、大阪科学・大学記者クラブ

以上

## 【概要】

甲南大学先端生命工学研究所 (FIBER) の杉本直己 所長・教授、Das Sinjan 博士研究員、高橋俊太郎 准教授らの研究グループは、DNA の二重らせんに結合するため発がん性が懸念されている色素「クリスタルバイオレット」が、がん遺伝子中の四重らせん構造に特異的に結合することで、抗がん剤として働くことを見出しました。がん細胞の中では、クリスタルバイオレットがDNAの二重らせんより四重らせんに選択的に集まることで、発がん性を上回る抗がん活性が生じたと考えられます。この研究成果によって、安全性が高く副作用が少ない抗がん剤の開発が期待できます。この研究成果は、英国科学誌 Nature 誌の姉妹紙「Scientific Reports」誌（電子版）に掲載されました。なお、本研究は、インドスリバラジビダピト大学マハトマ・ガンジー医学先端研究所 Sudipta Bhowmik 博士との国際共同研究です。

近年医療技術の発展が目覚ましい一方で、我が国では未だがんが死因のトップです。そのため、がん撲滅のための優れた抗がん剤の開発は今世紀最大の課題の一つとなっています。抗がん剤の多くは細胞内の核酸 (DNA や RNA) に作用するため、正常な細胞の核酸も傷つけることで正常な細胞をがん化させてしまう可能性があります。一方で、発がん性が疑われる物質は逆に抗がん剤として機能する可能性を秘めており、抗がん剤の重要な薬剤候補であるとも考えられます。例えば、研究や医療現場で細胞や組織の染色剤などとして用いられてきた色素であるクリスタルバイオレット (別名ゲンチアナバイオレット) は、近年動物実験で発がん性が報告され、現在その使用は海外の一部では禁止され、国内でも限定的な使用に限られております。発がん性のメカニズムとしては、DNA の二重らせん構造に結合することで発がん性を示す可能性が推測されています。そこで今回、FIBER の研究グループは、クリスタルバイオレットと様々ながん細胞で活性化している遺伝子の DNA との相互作用を解析しました。その結果、クリスタルバイオレットが、がん遺伝子の一種である BCL2 の DNA の一部に存在する i-モチーフ型 DNA 四重らせんに特異的に結合することを見出しました。変異体解析や分子動力学計算によって、クリスタルバイオレットは BCL2 遺伝子の i-モチーフ構造中のループ領域と呼ばれる部分に特異的に相互作用していることが示唆されました。クリスタルバイオレットの抗がん特性を調べるために、ヒト乳がん細胞 (MCF-7) にクリスタルバイオレットを添加したところ、BCL2 遺伝子の発現量が有意に減少したことから、クリスタルバイオレットが DNA 四重らせん構造をターゲットとした抗がん剤として働くことが明らかになりました。これまで特定の i-モチーフ型 DNA 四重らせんに結合して遺伝子発現を制御する分子の報告例はほとんどありませんでした。したがって、クリスタルバイオレットは i-モチーフ型 DNA をターゲットとして特定のがん遺伝子の発現を抑えるという新しい作用機序をもつ抗がん剤として作用すると考えられます。本研究成果を元に、クリスタルバイオレットの i-モチーフの選択性をより向上させるような分子設計を施すことにより、発がん性や副作用を抑えた新しい抗がん剤の開発が期待できます。

## 【論文タイトルと著者】

“Theranostic approach to specifically target the interloop region of *BCL2* i-motif DNA by crystal violet”  
S. Das, S. Takahashi, T. Ohyama, S. Bhowmik, and N. Sugimoto, Scientific Reports, 13, 14338 (2023).

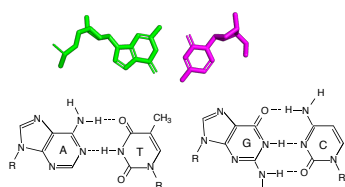
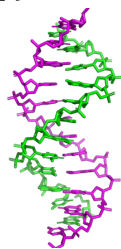
## 【内容説明】

### 背景

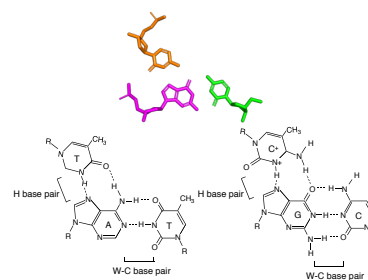
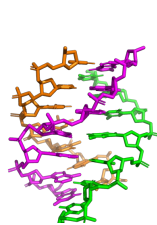
がんは、昨今の医療技術の進歩がありながらも、依然として日本人の死因のトップです。がん細胞が持つ正常な細胞とは異なる特徴として、早くかつ無限に増殖する性質があります。細胞が増殖される際には、遺伝子として用いられる核酸の一種である DNA（デオキシリボ核酸）が複製されることから、DNA の機能を制御する分子が抗がん剤として広く用いられてきました。しかし、健康な正常細胞にも同じように DNA は存在します。抗がん剤や発がん性物質は正常細胞の DNA 二重らせん構造にランダム相互作用した結果、正常細胞をがん化する恐れがあります。このような抗がん剤の副作用を抑えるために、がん細胞に特異的に作用する抗がん剤の開発が求められています。

核酸の標準的な構造は、二重らせん構造です。DNA はアデニン (A)、チミン (T)、グアニン (G)、シトシン (C) の四種類の塩基を持つヌクレオチドと呼ばれる分子が連なってできる鎖状高分子です。2本の DNA 鎖間の、アデニンとチミン、グアニンとシトシンがそれぞれワトソン-クリック型の塩基対 (※1) を形成することで二重らせん構造を形成します (図 1a)。一方、細胞内では四重らせん構造などの非二重らせん構造 (※2) が形成することが甲南大学先端生命工学研究所 (FIBER) などの研究から明らかになってきています (図 1b-c)。細胞内で非二重らせんが形成されると、遺伝子の複製や転写 (※3) といった反応に影響を及ぼします (図 2)。このような非二重らせん構造を形成する配列はがん遺伝子に多く見られることから、これらの非二重らせん構造を制御する分子が新しい抗がん剤として期待されています。そのため、特定の四重らせん構造に結合する分子を見つけ出すことが重要な課題となっています。そこで本研究では、DNA の二重鎖にランダムに結合することで発がん性が懸念されている分子の中から、がん遺伝子の DNA の四重らせん構造に特異的に結合する分子を探索し、その機能を解析する研究を行いました。

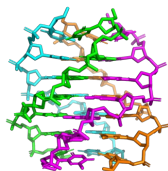
(a) 二重らせん



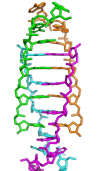
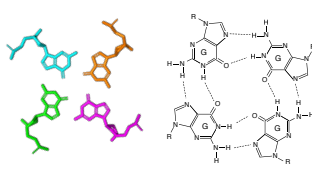
(b) 三重らせん



(c) 四重らせん



グアニン四重らせん構造



i-モチーフ

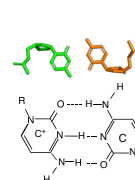


図1 核酸が形成する様々な立体構造 (a) 二重らせん、(b) 三重らせん、(c) 四重らせん (グアニン四重らせんと i-モチーフ)

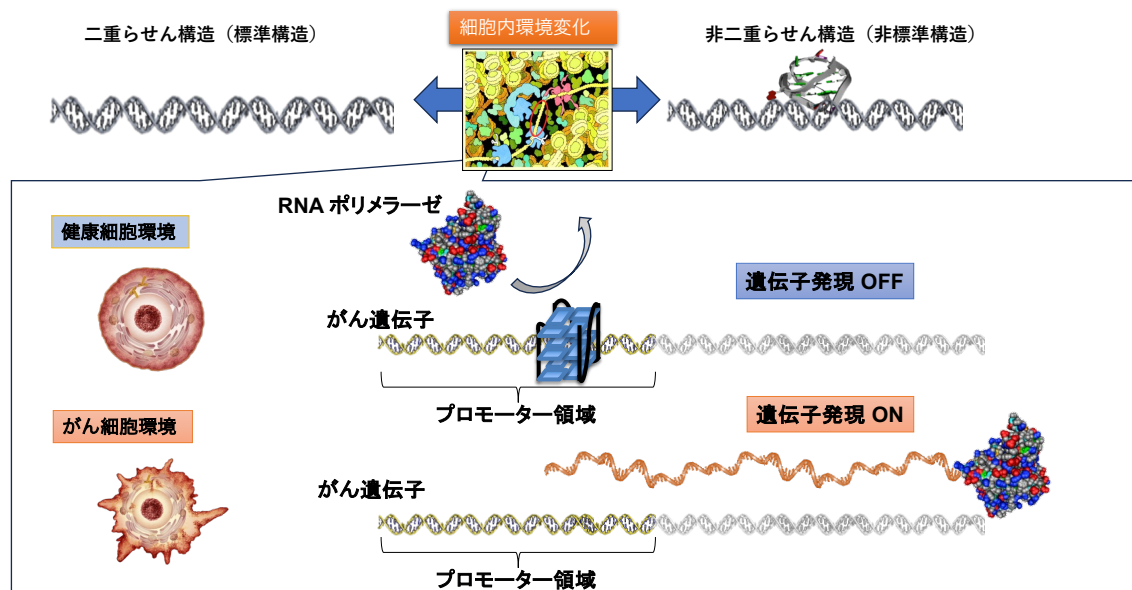


図 2 非二重らせん構造の役割。健康な正常細胞ではがん遺伝子のプロモーター領域などに四重らせん構造が形成することで転写反応が阻害され、遺伝子発現が OFF の状態である一方、がん細胞では細胞内環境の違いにより四重らせん構造が形成されず、がん遺伝子の発現が ON になっている。

## 研究手法と成果

本研究では、四重らせん構造に結合する候補分子として、トリフェニルメタン骨格を有する分子誘導体に着目しました (図 3)。これらの誘導体は正に荷電したアミノ基を持ち、DNA のリン酸骨格と相互作用する他、フェニル基ユニットが回転することで四重らせん構造のループ領域などに立体的に相互作用できる可能性がある化合物と考えられます。

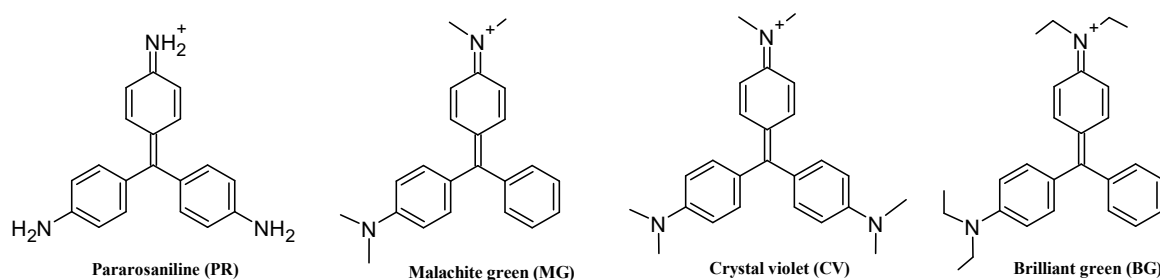


図 3 本研究で検討したトリフェニルメタン骨格を有する化合物 (パラロザニン (PR)、マラカイトグリーン (MG)、クリスタルバイオレット (CV)、ブリリアントグリーン (BR))。

これらの化合物について、配列の異なる様々な四重らせん構造と混合し蛍光測定を行ったところ (図 4)、クリスタルバイオレットの蛍光ががん遺伝子の一種である BCL2 (※4) のプロモーター領域に形成する i-モチーフ型四重らせん構造と混合することで約 300 倍増強することが見出されました。これは二重らせん構造を含む他の DNA 配列にと比較しても際立って強い蛍光値となりました。これらの結果から、クリスタルバイオレットと BCL2 i-モチーフが特異的に結合することが示唆されました。続いて、特異性の原因を突き止めるために、i-モチーフのループ領域 (※5) の塩基を除いた誘導体を合成し、クリスタルバイオレットとの結合を観察したところ (図 5)、2 番目のループ領域の塩基を除いても蛍光強度の変化はほとんど見られなかった一方で、1 番目と 3 番目のループ領域

の塩基を除くと蛍光強度が顕著に減少しました。この結果から、クリスタルバイオレットは BCL2 i-モチーフの 1 番目と 3 番目のループ領域が形成する空間に特異的に結合していることが明らかになりました。クリスタルバイオレットの結合空間は、1 番目と 3 番目のループ領域の塩基同士で水素結合が形成されることで形成されることを分子動力学計算によって確認しました。実際、1 番目と 3 番目のループ領域の塩基を変化させると蛍光強度もそれに応じて変動することから、1 番目と 3 番目のループ領域の塩基配列特異的にクリスタルバイオレットが結合していることが示されました。

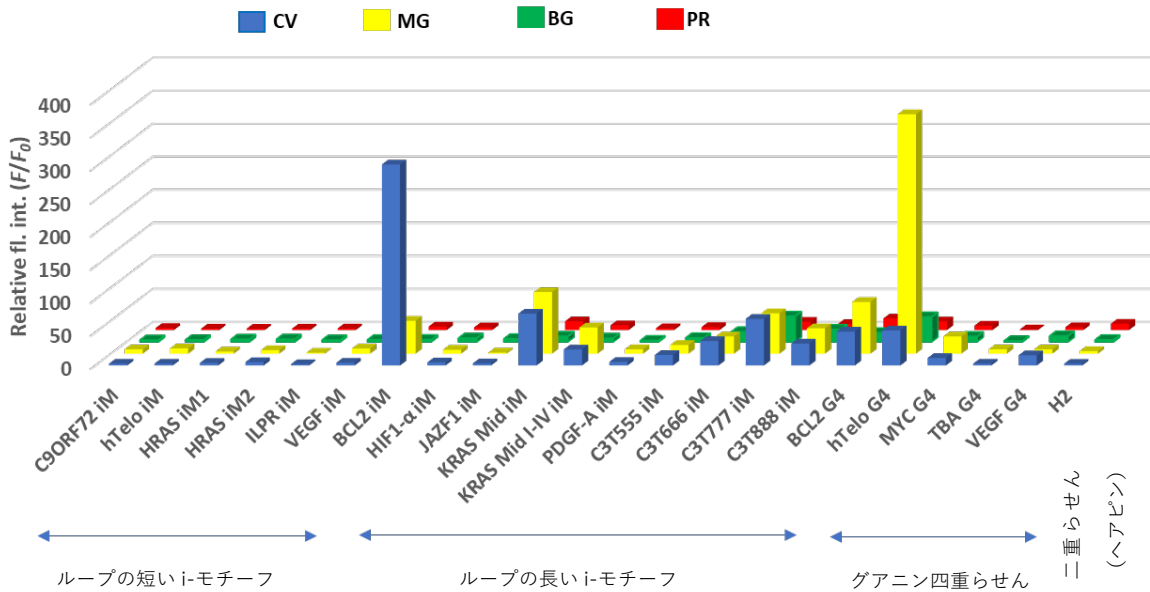


図4 様々な遺伝子に由来する非二重らせん構造を形成する DNA と各種トリフェニルメタン化合物と混合した際の蛍光強度測定の結果。

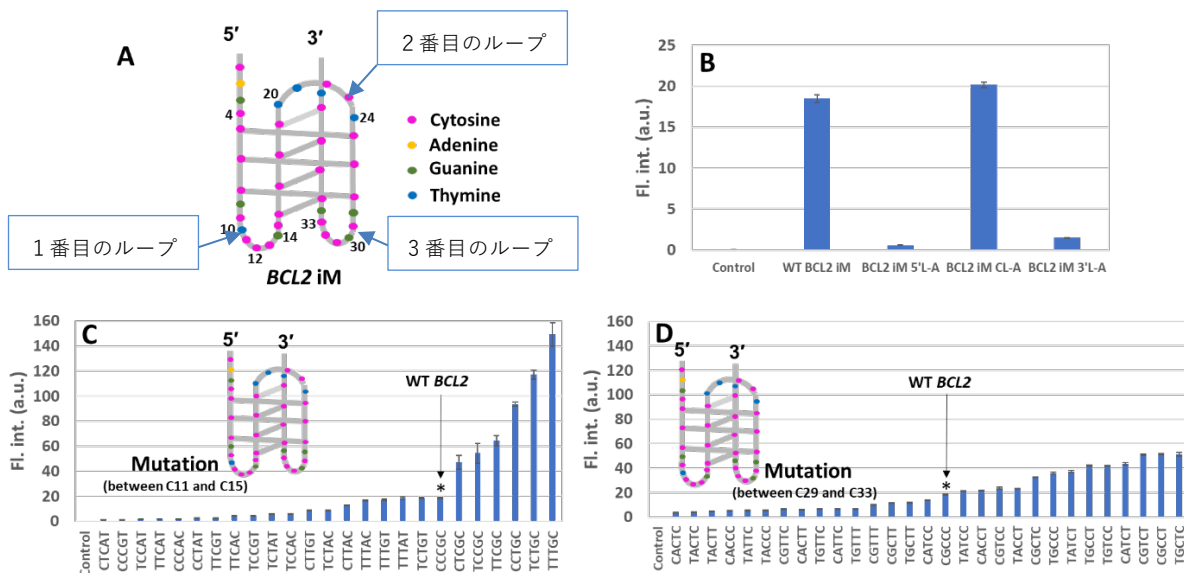


図5 (A) BCL2 i-モチーフ構造の模式図。(B) 野生型 (WT) BCL2 i-モチーフ配列とその 5'ループ (5'L-A)、中央ループ (CL-A)、3'ループ (3'L-A) のループ配列を欠損させた i-モチーフに対するクリスタルバイオレットの蛍光応答。(C) 5'ループの系統的変異、(D) 3'ループの系統的変異。

最後に、クリスタルバイオレットをヒト乳がん細胞（MCF-7）にクリスタルバイオレットを添加し、24 時間培養した後の mRNA 量を定量 PCR により測定したところ、BCL2 遺伝子の発現量が有意に減少したことが確認されました（図 6）。この結果から、クリスタルバイオレットが BCL2 遺伝子のプロモーター領域の i-モチーフと結合することでその構造を安定化し、転写因子の結合が阻害されることで BCL2 遺伝子の転写が抑制されたと考えられます。したがって、クリスタルバイオレットは BCL2 の発現を抑制する抗がん剤として働くことが明らかになりました。

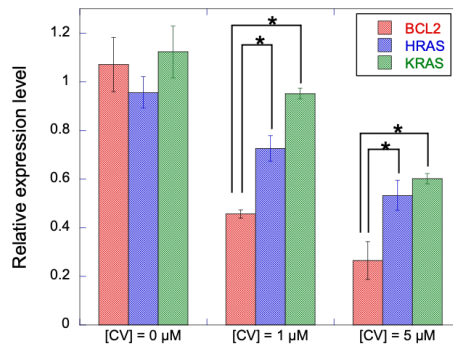


図 6 濃度の異なるクリスタルバイオレット（CV）添加 24 時間後の  $\beta$ -アクチン mRNA に対する MCF-7 細胞内の BCL2、HRAS、KRAS mRNA の相対発現量を qRT-PCR で測定した結果。

### 展望・研究の波及効果

本研究で検討したクリスタルバイオレットは、古くから細胞や組織の染色剤として使われてきたほか、医薬品として抗真菌剤および寄生虫駆除剤として用いられてきました。しかし近年、動物実験によりクリスタルバイオレットの発がん性が指摘されました。このような発がん性を示す原因の一つとして、クリスタルバイオレットが DNA の二重らせん構造に非特異的に結合することが推測されます。そのため、現在海外では使用が禁止されたり、国内でもその使用は施行医および施設の責任のもと、必要最小量の使用にとどめることが望ましいとされているなどしています。一方、本研究によってクリスタルバイオレットが四重らせん構造に特異的に結合することで抗がん剤として機能したことから、クリスタルバイオレットが医薬品として新たな側面を見出すことができました。今後はクリスタルバイオレットの構造を基盤とし、DNA とランダムに結合しにくい化学修飾を施すことで、副作用の少ない優れた抗がん剤の開発が期待できます。本研究が明らかにしたように、薬剤として敬遠される発がん性を有する化合物のうち、DNA 四重らせん構造に結合することで思いも寄らぬ抗がん活性を発揮する例が他にも存在する可能性があります。したがって、本研究の成果は新しい抗がん剤の開発指針としても有効な手段となると考えられます。

### 研究支援

本研究は、日本学術振興会（JSPS）科研費 22H04975（基盤研究(S)）、18KK0164（国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)））、19K05723（基盤研究(C)）、JSPS 研究拠点形成事業 JPJSCCA20220005、甲南学園平生太郎基金科学研究奨励助成金、伊藤忠兵衛基金、旭硝子財団研究助成の支援を受けました。

## 【用語解説】

### 1、ワトソン・クリック型塩基対（※1）

1953年に英国の研究者であるジェームズ・ワトソンとフランシス・クリックが提唱した二重鎖を形成する塩基対構造のこと。

### 2、非二重らせん構造（※2）

核酸はワトソン・クリック型塩基対以外にも様々な塩基対を形成することができる。4つのグアニンがフーグスティーン型と呼ばれる塩基対を形成することで四重らせん構造（グアニン四重らせん）をとったり、シトシン同士でフーグスティーン型塩基対を形成することでi-モチーフ型四重らせんをとることができる。

### 3、複製や転写（※3）

細胞分裂時にDNAがコピーされる反応を複製、DNAの遺伝情報がRNAに写される反応を転写と呼ぶ。いずれもポリメラーゼという酵素がワトソン・クリック塩基対の法則に従って鋳型となるDNAからDNAやRNAを合成する。一次元的に反応が進行するため、合成途中に四重らせん構造があるとポリメラーゼの障害物となり、反応が停止する。

### 4、BCL2（※4）

細胞のアポトーシス（自発的な細胞死）を抑える遺伝子。正常な細胞は増殖が終わった細胞は新陳代謝のため自発的にアポトーシスを起こす。一方がん細胞ではBCL2の発現が高く、アポトーシスが抑えられており、際限なく細胞分裂を起こす。

### 5、ループ領域（※5）

一続きのDNA（あるいはRNA）配列で四重らせん構造形成に関わる塩基の間にある配列。四重らせん構造形成によって輪のような形になるのでループと呼ばれる。