

## 平成29年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	核酸医薬による変異 K-RAS 遺伝子発現制御と革新的抗癌薬の開発	
研究者所属・氏名	研究代表者：産業理工学部・藤井政幸 共同研究者：医学部・岡田斉、産業理工学部・神武洋二郎	

### 1. 研究目的・内容

本研究では核酸医薬を用いて変異 KRAS 遺伝子の発現を選択的に抑制することにより、あるいは、抗変異 KRAS 核酸医薬とセツキシマブ等のモノクローナル抗体医薬やエルロチニブ等の分子標的薬との併用により革新的な変異 K-RAS 依存性がんの治療薬開発を目指す。

1 塩基変異を敏感に認識できる核酸医薬を化学合成し、大腸がん由来細胞 SW48 及び HCT116 中に発現する変異 KRAS 遺伝子の発現制御効果を評価する。次に、3次元培養法により癌細胞の増殖抑制効果を評価し、さらに、LSL-KRAS マウスモデルを用いて in vivo 試験を行う。

### 2. 研究経過及び成果

1. 変異 K-RAS 遺伝子を標的とする核酸医薬の化学合成

1 塩基変異を敏感に認識できるアンチセンス核酸および siRNA に膜透過ペプチドと NES ペプチドと PEG やコレステロール、ポリアミンなど薬理活性を向上させる機能性分子を結合させたマルチコンジュゲート核酸を合成した。今回は変異 KRAS 遺伝子(G12D: GGT→GAT)を標的とする下のアンチセンス核酸および siRNA 核酸を合成した。

アンチセンス核酸：  
 Anti-KRAS(G12D)(227G>A)-ASO-GAP-PS ; 5'- ccuacGsCsCsAsTsCsAsGsCsTsCcaacu -3'

siRNA 核酸：  
 Anti-KRAS(G12D)(227G>A)-siRNA10 AS; 5'-CCUACGCCAUCAGCUCCAAcu-3'  
 Anti-KRAS(G12D)(227G>A)-siRNA10 S; 5'-UUGGAGCUGAUGGCGUAGGca-3'

これらの化合物は HPLC 及び質量分析スペクトルにより同定した。

現在、さらにこれらの核酸医薬の化学修飾体及びコンジュゲート体の合成を進めている。

2. 核酸医薬による大腸がん由来細胞 SW48 及び HCT116 の増殖抑制効果の評価

上で化学合成した核酸医薬を用いて、大腸癌由来細胞 SW48 及び HCT116 中に発現する変異 K-RAS 遺伝子(G12D: GGT→GAT, G13D: GGC→GAC)の発現制御効果の評価を現在進行中である。評価はリアルタイム PCR による標的 mRNA の定量とウエスタンブロッティングによる変異 KRAS タンパク質の定量により行う。その結果を踏まえて、高い効果を示した核酸医薬に対して 3次元培養法を用いて、大腸がん由来細胞 SW48 及び HCT116 の増殖抑制効果を評価する。

3. 核酸医薬による LSL-KRAS (G12D) モデルマウスでの癌増殖抑制効果の評価

LSL-KRAS (G12D) マウスモデルを用いて、KRAS 変異 (G12D) すい臓がんモデルマウスを確立することに成功した。現在、マウス系で評価するためには核酸医薬を大量に合成する必要があるため、スケールアップした合成を行っている。同時に、その核酸医薬を用いて組織特異的に変異 KRAS の発現を誘導可能な LSL-KRAS (G12D) モデルマウスを用いて in vivo 試験を実施するための準備を整えている。KRAS シグナル経路の活性化・不活性化の評価は KRAS 下流のシグナル分子およびリン酸化の定量により行い、細胞死、細胞増殖等の組織学的変化は免疫染色を用いて評価する。さらに、現在、研究室で繁殖中の LSL-KRAS (G12D) マウスモデルに発症する腫瘍に対する EGFR 阻害抗がん薬、抗 EGFR モノクローナル抗体医薬セツキシマブおよび分子標的薬エルロチニブと核酸医薬との併用による同様の抗癌活性を評価する。

### 3. 本研究と関連した今後の研究計画

本年度、標的配列と核酸医薬の配列を確定できたので、その結果を踏まえて、高い効果を示した核酸医薬に化学修飾とコンジュゲーションにより細胞膜透過性の向上、標的遺伝子抑制効果の向上、標的外遺伝子への影響の低減を図る。

合成した核酸医薬と EGFR 阻害抗癌薬、抗 EGFR モノクローナル抗体医薬セツキシマブおよび分子標的薬エルロチニブとの併用による同様の抗癌活性を細胞系（神武）、モデルマウス系（岡田）で評価する。核酸医薬により EGFR 経路のうちの RAS/RAF/MAPK 経路を遮断するとともに、EGFR 阻害薬により RAS 経路以外の PI3K/AKT/MTOR 経路や JAK/STAT 経路を遮断することにより治療効果が向上すると期待できる。藤井、神武、岡田の3者で綿密に協議しながら、化学合成→細胞系評価→マウス系評価を繰り返し、核酸医薬の機能最適化と既存化学療法薬とのベストミックスを探索し、変異 K-RAS 依存性癌の革新的な治療薬を開発する。

### 4. 成果の発表等

発表機関名	種類（著書・雑誌・口頭）	発表年月日(予定を含む)
Nucleic Acid Therapeutics	学術誌	2017, Vol. 27, No. 3: 168-175. (2017年6月)
Expert Opinion Drug Delivery	学術誌	2017, Vol. 14, No. 9, 1077-1089.
Anticancer Research.	学術誌	2018, 38(1):77-81. (2018年1月)
Molecular Cell Biochemistry.	学術誌	2018, 442(1-2):39-45. (2018年5月)
Molecular Cancer Research	学術誌	2017 Oct;15(10):1388-1397. (2017年10月)
Anticancer Research.	学術誌	2017 Apr;37(4):1603-1608. (2017年4月)
International Journal of Cancer.	学術誌	2018 Apr 15;142(8):1627-1639. (2018年4月)
近畿大学産業理工学部研究報告 かやのもり	学内紀要	2017年7月15日 (2017, 26, 1-10)
近畿大学産業理工学部研究報告 かやのもり	学内紀要	2017年12月15日 (2017, 27, 41-45.)
「第5版マクマリー・生物有機化学」(丸善出版)	著書（共訳）	2018年1月10日
「中分子医薬開発に資するペプチド・核酸・糖鎖の合成・高機能化技術」(株シーエムシー出版)	著書（分担執筆）	2018年2月28日
All Russian Conference with International Participation "Biotechnology for the Future of Medicine"	招待講演（ロシア科学アカデミーシベリア支所）	2017年7月24日
13th annual meeting Oligonucleotide Therapeutics Society	学会発表（口頭）	2017年9月25日
12th International scientific conference on bioorganic chemistry, 8th Russian symposium "Proteins and peptides"	学会発表（口頭）	2017年9月18-22日
第3回日本核酸医薬学会年会	学会発表（ポスター）	,2017年7月12-14日
第44回核酸化学国際シンポジウム	学会発表（ポスター）	2017年11月14-16日