

論文

Gapmerアンチセンス核酸による変異癌遺伝子KRAS (G12D) の選択的発現制御

Selective Regulation of Mutant Oncogene KRAS (G12D) by Gapmer Antisense Nucleic Acids

塩浜 康雄¹⁾
Yasuo Shihama

藤田 崇史²⁾
Takashi Fujita

神武 洋二郎³⁾
Yojiro Kotake

Constantinos
Demonacos⁴⁾

Marija Krstic-
Demonacos⁵⁾

Gianpiero Di
Leva⁵⁾

藤井 政幸⁶⁾*
Masayuki Fujii

■Abstract

KRAS mutation is positive in 45% of colon cancer patients, 35% of lung cancer patients, 95% of pancreas cancer patients, and 15% of melanoma patients and the patients do not benefit from anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) chemotherapy and antibody therapy to have poor prognosis for survival. KRAS mutations in codons 12 and 13 were present approximately in 40% of colorectal cancers. It is highly challenging to target mutant KRAS gene by synthetic small nucleic acids and can be a breakthrough for undruggable cancers.

In the present study, we investigated silencing efficiencies of mutant KRAS(G12D) gene by gapmer antisense oligonucleotides (ASO) using HeLa with wild type KRAS and PK-45H with G12D mutation in both alleles. ASOs targeting mutant KRAS (G12D) with 11nt and 9nt phosphorothioate gap silenced KRAS(G12D) expression in 81% and 73% efficiency in PK-45H, respectively but affected very little on the wild type KRAS expression in HeLa.

Key Words; Mutant KRAS Positive Cancer, Nucleic Acid Therapeutics, Gapmer Antisense Oligonucleotides

背景

KRAS 遺伝子は癌ドライバー遺伝子の一つで、上皮成長因子受容体 (EGFR) の細胞増殖シグナルを受けて、細胞増殖を進めるアクセルとしての機能を持っている。KRAS 遺伝子に変異が生じると恒常的に KRAS 遺伝子が活性化

された状態となり、EGFR からのシグナルの有無にかかわらず、癌は増大を続ける。現在、分子標的薬や抗体医薬などの EGFR 阻害薬が先進癌治療薬として効果を発揮しているが、KRAS 遺伝子に変異がある癌では EGFR からのシグナルを遮断しても KRAS 遺伝子は恒常的に活性化された

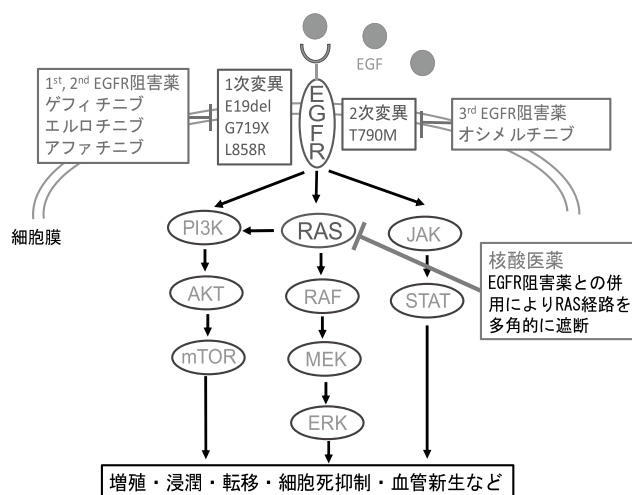


図1. EGFRシグナル経路とEGFR阻害薬

- 1) 近畿大学産業理工学部生物環境化学科 博士研究員
- 2) 近畿大学産業理工学部生物環境化学科
- 3) 近畿大学産業理工学部生物環境化学科 教授
- 4) マンチェスター大学 教授
- 5) サルフォード大学 教授
- 6) 近畿大学産業理工学部生物環境化学科 教授 mfuji@fuk.kindai.ac.jp

状態なので、EGFR 阻害薬は効果がない¹⁻³⁾。(図1)

KRAS 遺伝子の変異は大腸癌の45%、肺癌の35%、膵臓癌の95%、メラノーマの15%等、多くの癌に高頻度に見られる。その変異はエクソン2、3、4のいずれかに多く、中でもエクソン2のコドン12とコドン13に頻度高く現れる。そして、いずれも G12D、G12V、G12S、G12C、G13D、G13V などの1塩基だけが変異する点突然変異であり、この1塩基だけの変異を識別して正常な野生型 KRAS 遺伝子には影響を与えず変異 KRAS 遺伝子だけを抑制することは至難の業である⁴⁾。

一方、核酸医薬は病気の原因となっている遺伝子を直接の標的として、配列特異的にその発現を制御することで病気を治療する新しい概念の医薬として近年大きな注目と期待を集めている。2018年9月現在、世界で6つの核酸医薬が承認され、多くの候補物質について臨床試験が実施されている⁵⁻⁶⁾。

核酸医薬は標的 RNA にワトソンクリック型塩基対を形成することにより塩基配列特異的に結合するため、1塩基変異を識別することが可能で、変異 KRAS 依存性癌治療に威力を発揮する⁷⁻⁹⁾。

本研究では野生型 KRAS 遺伝子には影響を与えず、変異 KRAS 遺伝子の発現だけを選択的に抑制することができる精密な核酸医薬を開発することを目的として、Gapmer アンチセンス核酸を用いて各種細胞内での野生型 KRAS 遺伝子と変異型 KRAS (G12D) 遺伝子に対する発現制御能を評価した。

細胞培養

実験には KRAS 遺伝子に変異を持たない子宮頸癌由来細胞株 HeLa 細胞、KRAS 遺伝子に G12D 変異を有する肺癌由来細胞株 T3M-10 および膵臓癌由来細胞株 PK-1、PK-59、PK-45H を用いた。細胞株は非働化済 FBS 10 % (v/v)、ペニシリン (100 U/ml) およびストレプトマイシン (100 μg/ml) を含む培地を用いて、5% CO₂ 存在下 37°C で培養した。なお、HeLa 細胞は MEM 培地、T3M-10 細胞は Ham F-10 培地、PK-1、PK-59、および PK-45H 細胞は RPMI-1640 培地をそれぞれの培養に使用した。

Gapmer アンチセンス核酸の導入

細胞株は Gapmer アンチセンス核酸導入の前日よりペニシリンおよびストレプトマイシン不含の培地で培養し、Gapmer アンチセンス核酸導入の18時間前に12ウェルプレート (IWAKI) へ1ウェルあたり 8×10^4 個の細胞を播種した。Gapmer アンチセンス核酸の導入には Lipofectamin 2000TM (Thermo Fisher Scientific) を用いて、添付説明

書の手順に従って行った。Gapmer アンチセンス核酸の導入より24時間後に細胞を回収し、野生型および変異 KRAS (G12D) 遺伝子発現の変化を解析した。なお、導入に用いた Gapmer アンチセンス核酸はジーンデザイン株式会社より購入したものを使用した。

RT-qPCR法による野生型および変異KRAS(G12D) 遺伝子発現解析

回収した細胞より RNeasy mini kit (Qiagen) を用いて Total RNA を抽出し、DNaseI (Thermo Fisher Scientific) 処理を行った後、Oligo (dT) 20 primer および ReverTra Ace (TOYOBO) を用いて逆転写反応を行った。合成した cDNA は Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master Mixes および AriaMx リアルタイム PCR システム (Agilent) を用いて解析を行い、野生型および変異 KRAS (G12D) 遺伝子発現量を内在性コントロールに 18S rRNA 遺伝子を用いた $\Delta\Delta\text{CT}$ 法により定量解析した。

qPCR に用いたプライマーは以下のとおりである。

Human KRAS WT 解析プライマー:

Forward 5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTGG-3'

Reverse 5'-TTGGATCATATTCGTCCACAA-3'

Human KRAS G12D 解析プライマー¹⁰⁾

Forward 5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCAGA-3'

Reverse 5'-TTGGATCATATTCGTCCACAA-3'

18S rRNA 解析プライマー¹⁰⁾

Forward 5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3'

Reverse 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'

コロニー形成アッセイを用いたGapmer アンチセンス核酸の評価

Gapmer アンチセンス核酸の導入から24時間後、HeLa および PK-45H 細胞を回収し、12ウェルプレートへ1ウェルあたり 1×10^4 個の細胞を播種した。培養から7日目に細胞を 0.5 % Crystal violet 染色液で染色し、フラットベッドスキャナ (brother) を用いて 1200 dpi の解像度で画像の取り込みを行った後、ウェルを締める細胞コロニーの面積について画像解析ソフト (ImageJ) を用いて算出した。

結果と考察

ヒト KRAS 遺伝子 (ACCESSION NC_000012) の mRNA (ACCESSION XM_006719069) の 227G > A 変異を含む 21bp の領域を標的とする下記の Gapmer アンチセンス核酸

(ASO) を用いて、各種細胞中における野生型KRASおよび変異KRAS (G12D) に対する発現抑制効果を18S rRNAを比較対象としたRT-qPCR法により評価した。

標的配列 227G>A-mRNA 219-239 (下線部) :
5'-AUAUAAACUU GUGGUAGUUG GAGCUGAUGG
CGUAGGCAAG AGUGCCUUGA-3'

Gapmerアンチセンス核酸は下記のとおりである。

Anti-KRASwt-ASO-GAP-PS

5'-(Cm)(Cm)(Um)(Am)(Cm)g[^]c[^]c[^]a[^]c[^]a[^]c[^]a[^]g[^]c[^]t[^]c(Cm)
(Am)(Am)(Cm)(Um)-3'

Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS11

5'-(Cm)(Cm)(Um)(Am)(Cm)g[^]c[^]c[^]a[^]t[^]c[^]a[^]g[^]c[^]t[^]c(Cm)
(Am)(Am)(Cm)(Um)-3'

Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS9

5'-(Cm)(Cm)(Um)(Am)(Cm)(Gm)c[^]c[^]a[^]t[^]c[^]a[^]g[^]c[^]t[^]c(Cm)
(Cm)(Am)(Am)(Cm)(Um)-3'

Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS7

5'-(Cm)(Cm)(Um)(Am)(Cm)(Gm)(Cm)c[^]a[^]t[^]c[^]a[^]g[^]c[^](Um)
(Cm)(Cm)(Am)(Am)(Cm)(Um)-3'

Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS5

5'-(Cm)(Cm)(Um)(Am)(Cm)(Gm)(Cm)(Cm)a[^]t[^]c[^]a[^]g[^](Cm)
(Um)(Cm)(Cm)(Am)(Am)(Cm)(Um)-3'

capital letters = RNA, small letters = DNA, Nm = 2'-OMe RNA, ^ = phosphorothioate

Gapmerアンチセンス核酸はいずれも5'-末端から10番目に変異部位が位置する配列を有し、Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS11の中央11塩基分はホスホロチオエートDNA、両端5塩基ずつは2'-OMeRNAから成る21塩基Gapmerである。同様に、Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS9、-PS7、-PS5はそれぞれ中央のホスホロチオエート

DNA部分がそれぞれ9塩基、7塩基、5塩基となっており、その両側は2'-OMeRNAから成る21塩基Gapmerである。Anti-KRASwt-ASO-GAP-PSは野生型KRAS mRNAとはフルマッチでハイブリッド形成するが、変異型KRAS mRNAとは227番目の位置でミスマッチ (A : C) を形成する。一方、Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS11、-PS9、-PS7、-PS5はいずれも変異型KRAS mRNAとはフルマッチでハイブリッド形成するが、野生型KRAS mRNAとは227番目の位置でミスマッチ (G : U) を形成する。アンチセンス核酸による標的RNAのRNaseH依存的サイレンシング機構ではRNaseHがDNA/RNAまたはホスホロチオエートDNA/RNAのハイブリッド2本鎖を認識してRNA鎖を切断する。したがって、上記のGapmerアンチセンス核酸が標的mRNAとハイブリッドを形成すると、RNase Hはそれぞれの中央部分を認識して、mRNAを切断する。この時のホスホロチオエートDNA/RNA塩基対の長さやミスマッチの存在がRNase活性にどのような影響を及ぼすか、その結果として遺伝子発現制御効果にどのような影響が表れるかを検証した。

変異KRAS(G12D)遺伝子発現抑制効果

Gapmerアンチセンス核酸Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS11とAnti-KRASwt-ASO-GAP-PSを用いて子宮頸癌由来細胞株HeLa細胞、KRAS遺伝子にG12D変異を有する肺癌由来細胞株T3M-10および膵癌由来細胞株PK-1、PK-59、PK-45Hに発現する野生型KRAS遺伝子 (図2a) および変異KRAS(G12D)遺伝子 (図2b) のmRNA発現量をRT-qPCRを用いて定量した。コントロールASOにはヒトゲノム中には作用する配列を持たないことが知られている配列のGapmer核酸を用いた。アンチセンス核酸の細胞導入にはサーモフィッシュサイエンティフィック社のLipofectamine 2000™を用い、導入後24時間後のmRNA

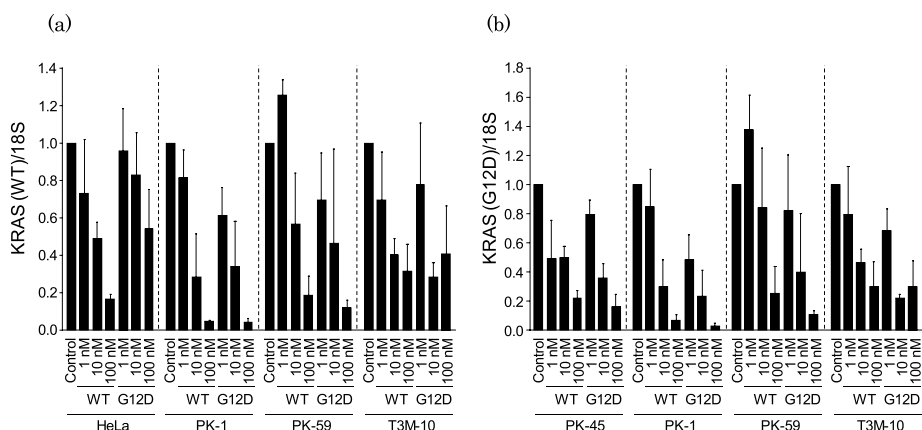


図2. Anti-KRASwt-ASO-GAP-PSとAnti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS11による野生型KRAS (a) および変異KRAS(G12D) (b)

を定量した。HeLaは対立遺伝子の両方に野生型KRAS遺伝子を、PK-45Hは対立遺伝子の両方に変異KRAS(G12D)を、T3M-10、PK-1、PK-59は対立遺伝子の一方にだけ変異KRAS(G12D)を有している。

図2(a)に示す通り、HeLa細胞ではAnti-KRASwt-ASO-GAP-PS(ASO WT)が野生型KRAS遺伝子の発現を濃度依存的に強く抑制しており、Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS11(ASOG12D)は野生型KRAS遺伝子の発現にほとんど影響していない。PK-1細胞、PK-59細胞、T3M-10細胞のいずれでもAnti-KRASwt-ASO-GAP-PS(ASO WT)とAnti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS11の両方が野生型KRAS遺伝子の発現を濃度依存的に抑制している。

Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS11およびAnti-KRASwt-ASO-GAP-PSによる変異KRAS(G12D)遺伝子mRNAの発現抑制効果を定量した結果を図2(b)に示す。

PK-1細胞、PK-59細胞、T3M-10細胞のいずれでもAnti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS11(ASOG12D)によって野生型

KRAS遺伝子への影響は小さく、変異KRAS(G12D)遺伝子の発現を強く抑制していることが分かる。

Gapmerアンチセンス核酸のGap領域の長さとは変異KRAS(G12D)遺伝子発現抑制効果

次に、中央のGap領域を11塩基、9塩基、7塩基、5塩基と変化したAnti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS11、Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS9、Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS7、Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS5を用いて野生型KRAS mRNA (図3(a)) および変異型KRAS(G12D)mRNA (図3(b)) の発現抑制効果を評価した。図3(a)に示す通り、Anti-KRASwt-ASO-GAP-PSは濃度依存的に野生型KRAS遺伝子の発現を抑制したが、その他のアンチセンス核酸Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS11、Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS9、Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS7、Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS5はいずれも野生型KRAS遺伝子の発現にはほぼ効果を示さなかった。

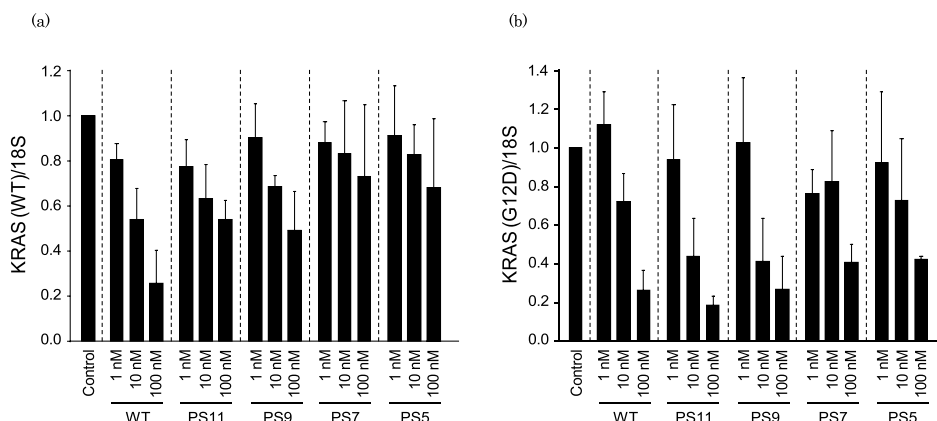


図3. Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS11、-PS9、-PS7、-PS5による野生型KRAS (a) および変異KRAS(G12D) (b)の発現抑制効果

また、図3(b)に示す通り、Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS11とAnti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS9は濃度依存的に変異型KRAS(G12D)遺伝子の発現を抑制したが、Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS7とAnti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS5は変異KRAS(G12D)遺伝子に対して弱い抑制効果しか効果を示さなかった。すなわち、Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS11とAnti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS9は野生型KRAS遺伝子に比べて変異KRAS(G12D)遺伝子を選択的に強く抑制しており、Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS7とAnti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS5はいずれも野生型と変異型のどちらの遺伝子にも抑制効果をほとんど示さなかった。これはこの2つのアンチセンス核酸の中央のGap領域が狭すぎたためにRNase HがmRNAを切断する活性が低下したためと考えられる。とりわけ、ミスマッチを有する

野生型KRAS遺伝子に対してはその影響が顕著に表れたと考えられる。

細胞増殖抑制効果

野生型アンチセンス核酸Anti-KRAS wt-ASO-GAP-PSと2種類のAnti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS11およびAnti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS9を用いてHeLa細胞およびPK-45H細胞の増殖抑制効果をコロニーアッセイにより評価した。図4(a) (b)に示す通り、Anti-KRAS wt-ASO-GAP-PSは野生型KRAS遺伝子を有するHeLa細胞の増殖を24時間後に68%抑制したのに対して、PK-45H細胞の増殖は22%しか抑制しなかった。一方、Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS11は両方のアルレに変異KRAS(G12D)遺伝子を有するPK-45H細胞の増殖を93%抑制したのに対して野生型

KRAS遺伝子を有するHeLa細胞の増殖は31%しか抑制しなかった。同様にAnti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS9はPK-45H細胞の増殖を90%抑制したのに対して野生型KRAS遺伝子を有するHeLa細胞の増殖は13%しか抑制しなかった。以上の結果より、Anti-KRAS wt-ASO-GAP-PSはHeLa細胞の増殖を選択的に抑制し、Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS11

およびAnti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS9はPK-45H細胞の増殖を選択的に抑制することを見出した。この結果は図3 (a) (b)に示したAnti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS11とAnti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS9による選択的変異KRAS(G12D) mRNAの発現抑制効果とよく一致するものであった。

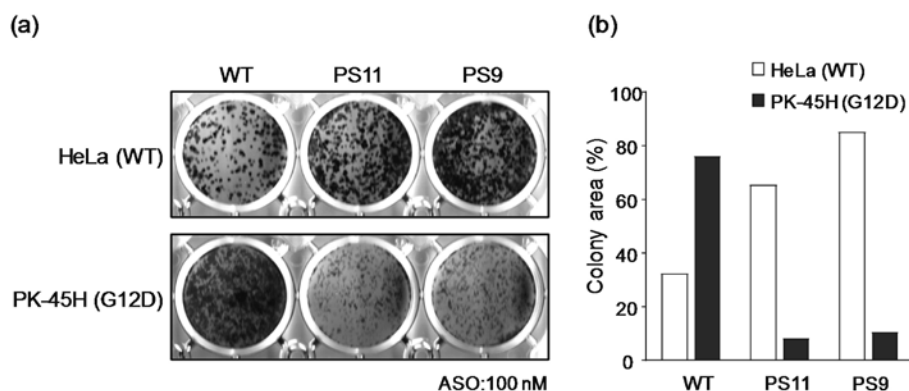


図4. Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS11とAnti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS9による細胞増殖抑制効果

結論

以上のとおり、Anti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS11とAnti-KRAS(G12D)-ASO-GAP-PS9は野生型KRAS遺伝子の発現にあまり影響を与えることなく、変異KRAS(G12D)遺伝子を選択的に強く抑制することが分かった。今後は引き続き変異KRAS依存性の肺腺癌、粘液腺腫、膵臓腺管癌などへの応用展開を図ると同時に、siRNAを用いる遺伝子発現制御を評価し、その分子設計により変異KRAS(G12D)遺伝子の選択的制御を達成したい。また、*in vivo*での効果が確認できれば製薬会社と連携し、前臨床試験、臨床試験へと進み、世界初の変異KRAS依存性癌治療薬の開発を実現したい。世界では年間1500万人が癌に罹患し820万人が死亡している。大腸癌だけでも世界で69.4万人、国内で5.1万人が死亡し、その約36%が変異KRAS依存性である。本研究結果により多くの命が救える可能性が広がる。

謝辞

本研究は科学研究費補助金No.22550159、近畿大学学内助成金 KD201704および近畿大学学内助成金 KD14より資金的援助を受けて行われた。

参考文献

1. 国立研究開発法人国立がん研究センター「2018年のがん統計予測」
URL : http://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/short_pred.html
2. 「ドライバー遺伝子異常とがん個別化医療」大津敦
日本病院薬剤師協会

3. 「がんの分子標的治療と耐性シグナル」矢野聖二 生化学 第85巻 第6号 pp.475-483 (2013)
4. 「肺癌のドライバー遺伝子変異と分子標的薬」前門戸任 日本内科学会雑誌 第103巻 第6号 pp.1314-1321 (2014)
5. 平成25年度規制動向調査報告書「核酸医薬品の開発と規制の動向」公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
6. Oligonucleotide conjugates for therapeutic applications. Winkler J. *Ther. Deliv.*, **2013**, 4(7), 791-809.
7. The Chemistry and Biology of Oligonucleotide Conjugates. R.L. Juliano, Xin Ming, and Osamu Nakagawa, *Acc. Chem. Res.*, **2012**, 45(7), 1067-1076.
8. Controlled Intracellular Localization and Enhanced Antisense Effect of Oligonucleotides by Chemical Conjugation. Takanori Kubo, Zhivko Zhelev, Bakalova Rumiana, Hideki Ohba, Keiko Doi and Masayuki Fujii, *Org. & Biomol. Chem.*, **2005**, 3, 3257-3259.
9. Silencing of *BCR/ABL* Chimeric Gene in Human Chronic Myelogenous Leukemia Cell Line K562 by siRNA-Nuclear Export Signal Peptide Conjugates. Yasuhiro Shinkai, Shinichi Kashihara, Go Minematsu, Hirohumi Fujii, Madoka Naemura, Yojiro Kotake, Yasutaka Morita, Koichiro Ohnuki, Alesya A. Fokina, Dmitry A. Stetsenko, Vyacheslav V. Filichev and Masayuki Fujii. *Nucleic Acid Therapeutics*, **2017**, 27(3), 168-175.
10. Exosomes facilitate therapeutic targeting of oncogenic KRAS in pancreatic cancer. Sushrut Kamberkar, Valerie S. LeBleu, Hikaru Sugimoto, Sujuan Yang, Carolina F. Ruivo, Sonia A. Melo, J. Jack Lee & Raghu Kalluri, *Nature*, **2107**, 546, 498-503.