

論文

siRNA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 siRNA

塩浜 康雄¹⁾
Yasuo Shihama藤田 崇史²⁾
Takashi Fujita神武 洋二郎³⁾
Yojiro Kotake岡田 齊⁴⁾
Hitoshi Okada藤井 政幸^{5)*}
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. In colorectal cancer patients, 90 % of KRAS mutations are found in codons 12 and 13 of exon 2. 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 of mutant KRAS(G12D) gene by siRNAs using HeLa cell with wild type KRAS and PK-45H cell with G12D mutation in both alleles. Four types of siRNAs, siRNAG12D(13), G12D(10), G12D(8), G12D(2), targeting mutant KRAS (G12D) mRNA at different positions neighboring the mutation point were investigated. The results indicated siRNAG12D(13) suppressed KRAS(G12D) expression by 90.9% at 100 nM and 75.1% at 1 nM while siRNAG12D(13) suppressed wild type KRAS expression by 55.4% at 100 nM and 23.3% at 1 nM, respectively. It is interesting that siRNAG12D(8) and siRNAG12D(2) suppressed both KRAS(G12D) and wild type KRAS strongly and the selectivity was quite low. It is also to be pointed out that siRNAG12D(10) which has a mutation point adjacent to the cleavage site of the target mRNA suppressed both mutant KRAS(G12D) and wild type KRAS only weakly and did not discriminate the mutant KRAS(G12D) from wild type KRAS.

Key Words: Mutant KRAS Positive Cancer, Nucleic Acid Therapeutics, siRNA

背景

KRAS 遺伝子は上皮成長因子受容体 (EGFR) のシグナルを受けて、細胞増殖を促進する。KRAS 遺伝子に変異が生じると恒常的に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、細胞は増殖を続ける。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%など高頻度に見られる。現在、分子標的薬、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 遺伝子変異陽性癌では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ており、EGFR阻害薬は効果がなく化学療法抵抗性となる¹⁻³⁾。

大腸癌においてはKRAS 遺伝子の変異はその約90%が第2エクソンの第12コドンと第13コドンに集中しており、G12D, G12V, G12C, G12S, G13D, G13Vなどの1塩基変異である。この1塩基変異を区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医薬を開発することは至難の業である⁴⁾。しかしながら、核酸医薬は標的mRNAを配列特異的に識別することが可能で、変異KRAS陽性癌治療に効果を発揮すると期待される⁵⁾。本研究では変異点を含む領域で標的配列を変えた数種のsiRNA⁶⁾を用いて野生型KRAS 遺伝子には影響せず、変異KRAS 遺伝子の発現を選択的に抑制する核酸医薬を探索し、難治性の化学療法抵抗性癌に治療の道を拓くことを目指した。

実験

2.1 細胞培養

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 (227G>A) 変異を有する膵癌由来細胞株PK-45Hを用いた。HeLa細胞はMEM培地 (Sigma-Aldrich)、PK-45H細胞はRPMI-1640培地

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研究科産業理工学専攻生物環境化学コース

3) 近畿大学産業理工学部生物環境化学科教授

4) 近畿大学医学部生化学教室教授

5) 近畿大学産業理工学部生物環境化学科教授 mfujii@fuk.kindai.ac.jp

(Merck KGaA) へそれぞれ非働化済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 μ g/ml) を添加して, 5% CO₂存在下37°Cで培養を行った。

2.2 siRNAの導入

HeLa細胞およびPK-45H細胞はsiRNA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, siRNA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。siRNAの導入にはLipofectamin 2000 TM (Thermo Fisher Scientific Inc.) を使用して, 添付説明書の手順に従って行った。siRNA導入より24時間後に細胞を回収し, 野生型および変異型KRAS(G12D)遺伝子発現量をRT-qPCR法を用いて解析した。なお, siRNAはジーンデザイン株式会社で合成したものを使用した。

2.3 RT-qPCR法による野生型および変異型KRAS(G12D)遺伝子発現解析

siRNA導入から24時間後に細胞を回収し, RNeasy mini kit (Qiagen) を用いてTotal RNAを抽出した。回収したTotal RNAは, DNaseI (Thermo Fisher Scientific Inc.) 処理後, 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KRASおよび変異型KRAS(G12D)遺伝子発現量について内在性コントロールに18S rRNA遺伝子を用いて $\Delta\Delta$ 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通りである。

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⁷⁾

Forward 5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCAGA-3'

Reverse 5'-TTGGATCATATTCGTCCACAA-3'

Human NRAS 解析プライマー⁸⁾

Forward 5'-CAGGTGCGGGAGAGAGGC-3'

Reverse 5'-GCACCATAGGTACATCATCCGA-3'

Human HRAS 解析プライマー⁸⁾

Forward 5'-GGGGCAGTCGCGCCTGTGAA-3'

Reverse 5'-CCGGCGCCACCACCACCAG-3'

18S rRNA解析プライマー⁷⁾

Forward 5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3'

Reverse 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'

2.4 コロニー形成アッセイによる細胞増殖能解析

HeLa細胞およびPK-45H細胞をsiRNA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, siRNA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 1×10^4 個の細胞を播種した。翌日, それぞれの細胞へsiRNAの導入を行い, 6時間後に培地交換を行った。siRNA導入から5日後, 細胞をメタノールを加えた0.5 % Crystal Violet染色液で固定・染色した。12ウェルプレートを十分に風乾した後, 12ウェルプレート底面をフラットベッドスキャナ (brother) を用いて1200 dpiの解像度で画像を取り込み, 各ウェルの細胞コロニーがしめる面積を画像解析ソフト (ImageJ) を用いて算出した。

2.5 統計解析

実験結果の統計解析にはStudentのt検定を使用した。

3. 結果と考察

3.1 変異型KRAS(G12D)遺伝子に対するsiRNAのデザイン

まず, ヒトKRAS遺伝子 (ACCESSION NM_004985.4) におけるc.227G>A変異を含む領域を標的配列として, 変異型KRAS遺伝子に対して4種類, 野生型KRAS遺伝子に対して2種類のsiRNAをデザインした (図1)。G12D(13), G12D(10), G12D(8), G12D(2)は変異型KRAS(G12D)遺伝子を標的とするsiRNAであり, その相補鎖が変異型KRAS mRNAへ結合した際に, 塩基置換 (c.227G>A) 部位がG12D(13)では結合配列の13番目, G12D(10)では10番目, G12D(8)では8番目, G12D(2)では2番目にそれぞれ位置するデザインとした。また, WT(13)およびWT(10)は野生型KRAS遺伝子とマッチするsiRNAであり, G12D(13)およびG12D(10)の配列とそれぞれ1塩基のみ異なるデザインとなっている。G12D(13), G12D(10), G12D(8), G12D(2)は該当する位置で野生型KRAS mRNAとU-G mismatchesを, WT(13), WT(10)は該当する位置で変異KRAS(G12D) mRNAとC-A mismatchesを有することになる。

3.2 KRAS標的siRNAを用いた変異型KRAS(G12D)遺伝子発現抑制効果

野生型KRAS発現株であるHeLa細胞および変異型KRAS遺伝子発現株であるPK-45H細胞をそれぞれ用いて, 野生型KRAS遺伝子とマッチするsiRNAである

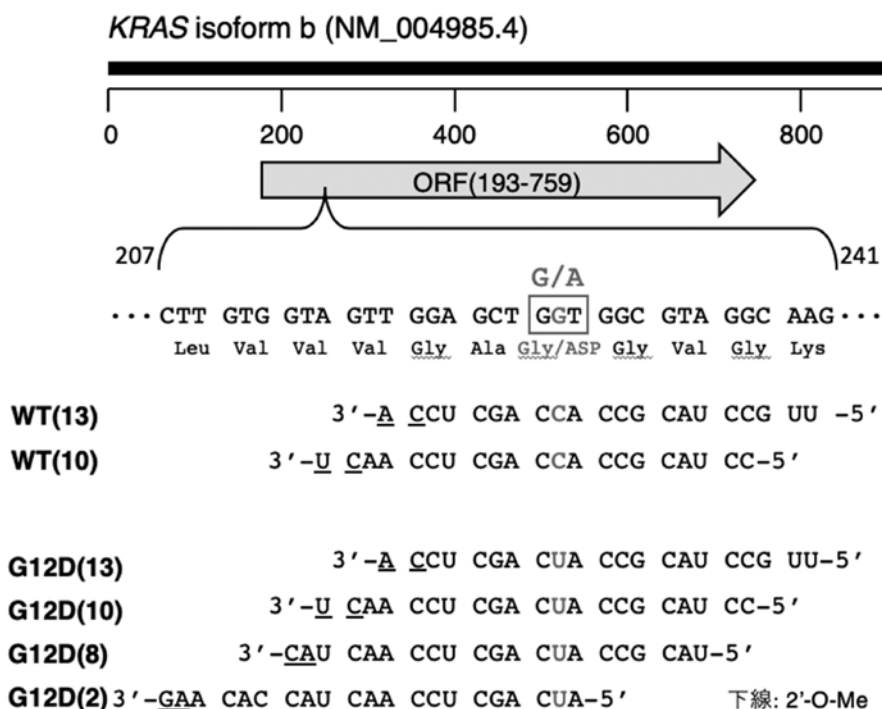


図1. KRAS WTおよびG12D mRNA配列とsiRNAデザイン

WT(13)およびWT(10), 変異型KRASとマッチするsiRNAであるG12D(13), G12D(10), G12D(8), G12D(2)のKRAS遺伝子発現抑制効果をRT-qPCR法により評価した。具体的には, siRNAをLipofectamine 2000™を用いてHeLa細胞およびPK-45H細胞へそれぞれ導入し, 24時間後のKRAS, NRAS, およびHRAS遺伝子発現の変化をRT-qPCR法に

より評価した。なお, ネガティブコントロールにはヒトゲノムに相同配列の見られないEGFPに対するsiRNAを使用した。HeLa細胞における遺伝子発現抑制効果の結果を表1に, PK-45H細胞における遺伝子発現抑制効果の結果を表2にそれぞれまとめた。

また, 表1及び2の結果をsiRNA-WT(13)およびWT(10)に

表1. HeLa細胞における遺伝子発現抑制効果

	KRAS(WT)			NRAS			HRAS		
	1 nM	10 nM	100 nM	1 nM	10 nM	100 nM	1 nM	10 nM	100 nM
Control	-1.6	9.6	15.1	9.3	-9.9	11.7	-7.6	-4.3	17.6
WT(13)	34.9	69.9	87.6	-52.4	-65.4	-71.6	-48.6	-23.2	-29.5
WT(10)	25.9	34.5	61.5	16.9	19.6	30.8	-1.3	20.2	24.9
G12D(13)	23.3	48.0	55.4	-17.6	-30.5	-29.6	-18.5	-5.9	-14.1
G12D(10)	18.5	14.5	5.9	9.0	3.6	8.6	-18.2	-8.7	-7.5
G12D(8)	53.6	73.7	88.0	11.9	25.0	47.7	-7.9	-22.8	4.1
G12D(2)	38.1	69.1	81.9	3.3	42.3	51.0	-16.2	11.1	17.6

数値はLipofectamin 2000™のみを添加した時の値を基準(0%)とした抑制効果(%)

表2. PK-45H細胞における遺伝子発現抑制効果

	KRAS(G12D)			NRAS			HRAS		
	1 nM	10 nM	100 nM	1 nM	10 nM	100 nM	1 nM	10 nM	100 nM
Control	13.6	11.9	16.0	12.7	-26.0	-21.8	23.3	6.8	-3.3
WT(13)	55.9	60.7	75.3	14.1	-44.2	5.1	35.1	-17.5	40.3
WT(10)	16.1	18.2	30.6	27.5	9.3	6.7	28.1	27.0	25.2
G12D(13)	75.1	85.6	90.9	17.3	-13.3	23.5	39.8	31.0	45.6
G12D(10)	13.3	26.3	32.7	30.5	3.7	16.3	31.5	17.1	3.7
G12D(8)	89.6	92.1	95.9	40.0	39.7	52.7	20.8	24.4	29.1
G12D(2)	82.2	88.1	92.4	19.0	2.5	35.4	20.9	7.0	23.6

数値はLipofectamin 2000™のみを添加した時の値を基準(0%)とした抑制効果(%)

よる結果 (図2) と G12D(13), G12D(10), G12D(8), G12D(2) による結果 (図3) にそれぞれグラフ化した。

図2に示す通り, siRNA-WT(13)およびWT(10)によるHeLa細胞に発現するKRAS(WT), NRAS(WT), HRAS(WT)遺伝子 (図2-A) およびPK-45Hに発現するKRAS(G12D), NRAS(WT), HRAS(WT)遺伝子 (図2-B) の抑制効果を評価したところ, WT(13)はKRAS(WT)の発現を87.6%抑制したが, WT(10)による抑制効果は61.5%で, それよりもやや弱かった。一方, WT(13)はKRAS(G12D)の発現を75.3%抑制したのに対して, WT(10)は30.6%しか抑制しなかった。すなわち, WT(13)はKRAS(WT)とKRAS(G12D)両方の発現を強く抑制し, その選択性は低いことが分かった。しかし, WT(10)は変異KRAS(G12D)に対してKRAS(WT)をより選択的に抑制したと言える。また, WT(13)およびWT(10)はともにNRASおよびHRASの発現にはほとんど影響しなかった。

siRNA-G12D(13), G12D(10), G12D(8), G12D(2)によるHeLa

細胞に発現するKRAS(WT), NRAS, HRAS遺伝子 (図3-A) およびPK-45H細胞に発現するKRAS(G12D), NRAS, HRAS遺伝子 (図3-B) の抑制効果を評価したところ, G12D(13)はKRAS(G12D)の発現を90.9% (100 nM), 85.6% (10 nM), 75.1% (1 nM) と強く抑制したのに対して, KRAS(WT)の発現抑制効率は55.4% (100 nM), 40.8% (10 nM), 23.3% (1 nM) と低下しており, KRAS(G12D)への選択性が高いことがわかった。G12D(8)およびG12D(2)はKRAS(G12D)の発現をそれぞれ95.5% (100 nM), 92.1% (10 nM), 89.6% (1nM)および92.4% (100 nM), 88.1% (10 nM), 82.2% (1 nM) と強く抑制し, KRAS(WT)の発現もそれぞれ88.0% (100 nM), 73.7% (10 nM), 53.6% (1 nM)および81.9% (100 nM), 69.1% (10 nM), 38.1% (1 nM) とかなり強く抑制した。したがって, G12D(8)およびG12D(2)のKRAS(G12D)への選択性は高くはないと言える。さらに, G12D(10)の変異KRAS(G12D)の発現抑制効果は32.7% (100 nM), 26.3% (10 nM), 13.3% (1 nM) と非常に弱く, KRAS(WT)に対する発現抑制効果も5.9% (100 nM),

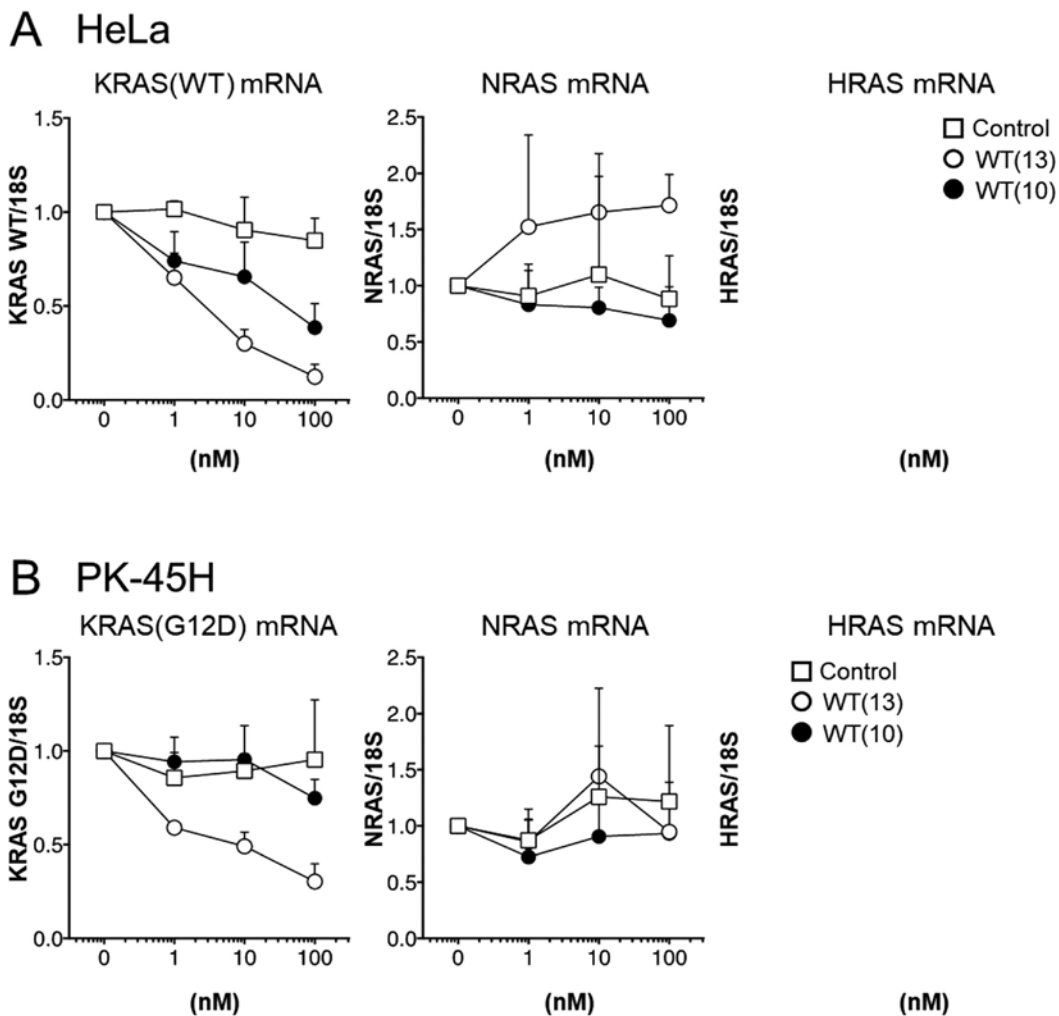


図2. siRNA-WT(13)およびsiRNA-WT(10)のKRAS(WT), KRAS(G12D), NRAS, HRAS遺伝子発現抑制効果 (A : HeLa細胞, B : PK-45H細胞)

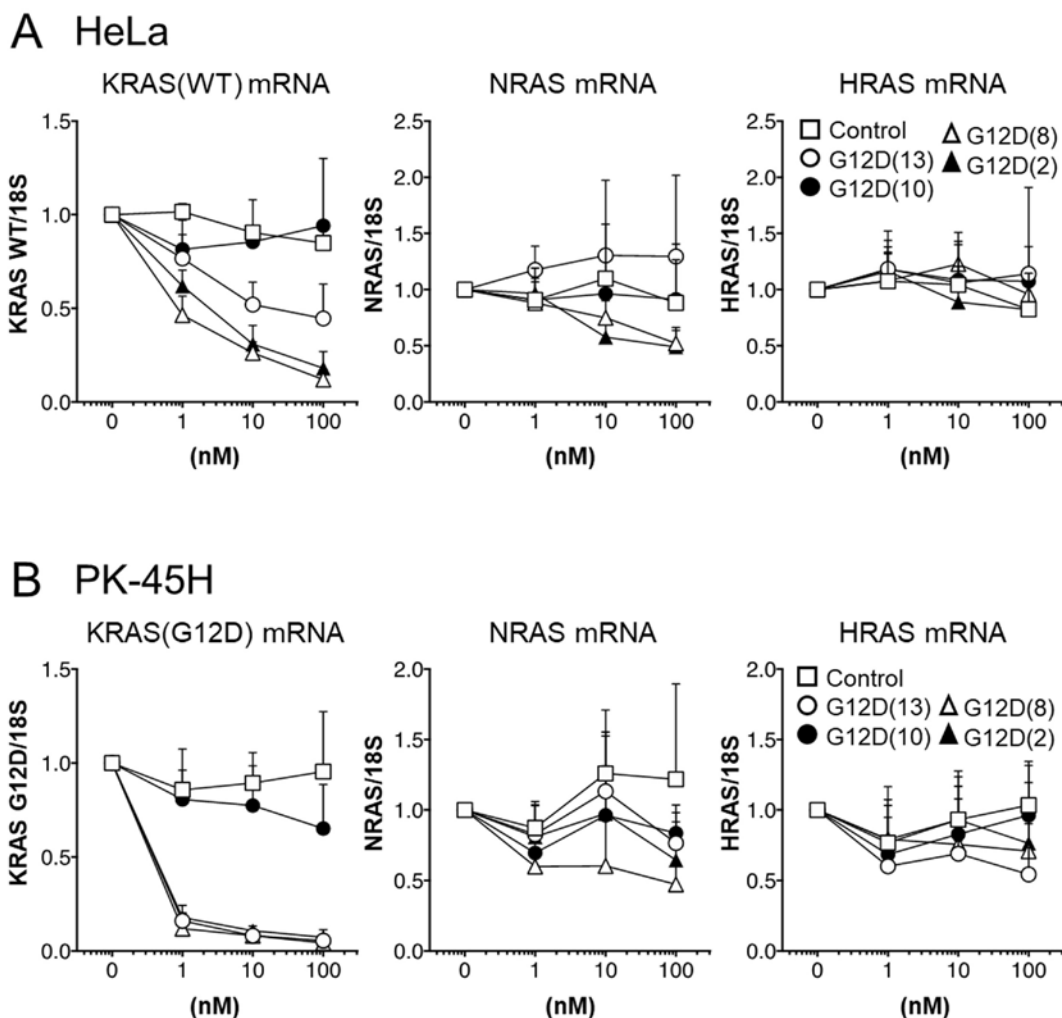


図3. siRNA-G12D(13), G12D(10), G12D(8), G12D(2)によるKRAS(WT), KRAS(G12D), NRAS, HRAS遺伝子発現抑制効果 (A: HeLa細胞, B: PK-45H細胞)

14.5% (10 nM), 18.5% (1 nM) と非常に弱かった。

以上のとおり、数塩基ではあるが、標的配列がずれることによってsiRNAの効果が大きく左右される結果となった。この結果はWT(10)による発現抑制効果がWT(13)による効果よりも弱かったという傾向と一致している。また、siRNAによるRNA干渉機構ではガイド鎖5'-末端から10番目と11番目の間で標的RNAを切断することが知られており⁹⁾、切断部位の隣にミスマッチを有するG12D(10)によるKRAS(WT)の発現抑制効果が最も低かったことは予想外であり、興味深い。

さらに、G12D(13), G12D(10), G12D(8), G12D(2)によるNRASおよびHRASの発現抑制効果はいずれの場合もほとんど効果がないか、または、非常に弱いものであった。その中でもG12D(8)はPK-45H細胞およびHeLa細胞におけるNRAS遺伝子をそれぞれ52.7% (100 nM), 39.7% (10 nM), 40.0% (1 nM) および47.7% (100 nM), 25.0% (10 nM), 11.9% (1 nM) と弱いながら抑制効果を示した。KRAS, NRAS,

HRAS遺伝子の各標的配列は約80%の相同性を有しており、ある程度のミスマッチがある場合でも発現抑制効果を示す場合があり、また、ミスマッチの位置によりその効果に差が生じることを示す結果であると解釈できる。

3.3 KRAS標的siRNAを用いた細胞増殖抑制効果

前述したsiRNAによるKRAS遺伝子発現抑制実験において、WT(13)が野生型KRAS遺伝子の発現、G12D(13)が変異型KRAS遺伝子の発現をそれぞれ効果的に抑制した。そこでWT(13)およびG12D(13)の細胞増殖抑制効果について、HeLa細胞およびPK-45H細胞をそれぞれ用いたコロニーアッセイ法により評価した。コロニーアッセイはHeLa細胞およびPK-45H細胞へWT(13)およびG12D(13)をそれぞれ導入し、その細胞を5日間培養した後、クリスタルバイオレット染色を行い、細胞のウェルをしめる面積よりsiRNAの細胞増殖抑制効果の評価した。ネガティブコントロールには前述の実験と同様にヒトゲノムに相同

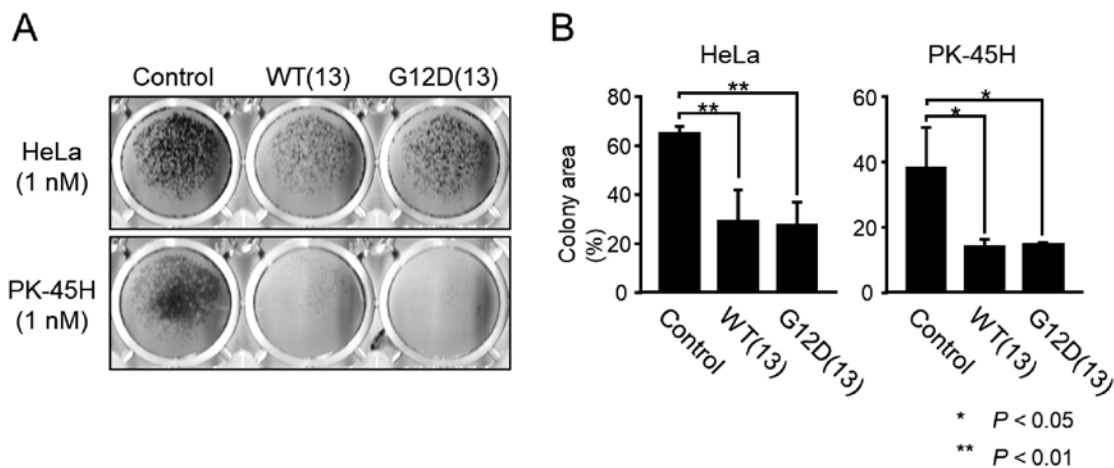


図4. HeLa(WT)およびPK-45H(G12D)を用いたsiRNAによる細胞抑制効果
 (A) コロニー形成アッセイ (n = 3) (B) ウェルの細胞を占める面積をImageJソフトを用いて半定量解析 (n = 3)

配列の見られないEGFPに対するsiRNAを使用し、細胞のウェルをしめる面積はImageJソフトウェアで算出した。その結果、コントロールsiRNAと比較してWT(13)およびG12D(13)のいずれも、HeLa細胞およびPK-45H細胞の増殖を有意に抑制し、両者ともにPK-45H細胞の増殖をより強く抑制していることが明らかとなった。前述の遺伝子発現抑制実験では、WT(13)およびG12D(13)はそれぞれ野生型KRASおよび変異型KRAS遺伝子発現へ指向性を持った発現抑制を示したが、その一方で、WT(13)による変異型KRAS遺伝子発現への影響、およびG12D(13)による野生型KRAS遺伝子発現への影響が見られ、今回の結果はそれを反映している可能性が考えられる。

3.4 考察

本研究では、ヒトKRAS遺伝子におけるc.227G>A変異を含む21塩基領域を標的配列として、野生型KRAS遺伝子に対して2種類、変異型KRAS遺伝子に対して4種類、合計6種類のsiRNAをデザインし、そのKRAS遺伝子抑制効果および細胞増殖抑制効果についてそれぞれ検証を行った。その結果、KRAS遺伝子発現抑制実験においては、標的とする塩基配列の5'-末端側より13番目に変異が位置するWT(13)が野生型KRAS遺伝子の発現を、G12D(13)が変異型KRAS遺伝子の発現をそれぞれ効果的に抑制した。しかし、WT(13)は変異型KRAS遺伝子発現をほぼ同等の強さで抑制し、野生型と変異型の選択性は低かった。その一方、G12D(13)の野生型KRAS遺伝子発現に対する影響は小さく、野生型に対して変異型を選択的に抑制したと言える。前述の通り、G12D(13)は野生型KRAS mRNAとU-Gミスマッチを、WT(13)は該当する位置で変異KRAS(G12D) mRNAとC-Aミスマッチを有しており、ミスマッチペアの違いが効果に影響している可能性がある。さらに、細胞

増殖抑制実験においては、WT(13)およびG12D(13)はHeLa細胞およびPK-45H細胞のいずれに対しても効果的な細胞増殖抑制効果を示したが、両者ともに特にPK-45H細胞に対してより強い増殖抑制効果を示した。これはHeLa細胞では野生型KRAS遺伝子の活性がもともと低いために、そのmRNAをサイレンシングしても細胞増殖に与える影響が小さく、PK-45H細胞では変異KRAS(G12D)の活性が高いために、そのmRNAをサイレンシングした時に細胞増殖に大きく影響が表れたためと考えることができる。

謝辞

本研究の一部は日本学術振興機構科学研究費補助金基盤研究(C) No. 22550159, No. 25410182, および近畿大学学内研究助成金21世紀研究開発奨励金共同研究助成金KD1704およびKD14により実施しました。ここに謝意を表します。

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, 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 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) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. S. M. Elbashir, W. Lendeckel, T. Tuschl, *Genes Dev.* **2001**, 15, 188.
- 7) Exosomes facilitate therapeutic targeting of

- oncogenic KRAS in pancreatic cancer. Sushrut Kamerkar, Valerie S. LeBleu, Hikaru Sugimoto, Sujuan Yang, Carolina F. Ruivo, Sonia A. Melo, J. Jack Lee & Raghu Kalluri, *Nature*, **2017**, 546, 498-503.
- 8) Down-regulation of K-ras and H-ras in human brain gliomas. Lymbouridou R, Soufla G, Chat-zinikola AM, Vakis A, Spandidos DA. *Eur J Cancer*. **2009**, 45(7), 1294-303.
- 9) Asymmetric RNA duplexes mediate RNA interference in mammalian cells Xiangao Sun, Harry A Rogoff and Chiang J Li, *Nature Biotechnology* **2008**, 26(12), 1379-1382.