

平成 30 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・岡田斉教授、 産業理工学部・神武洋二郎教授	

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

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状態なので、EGFR 阻害薬は効果がない。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。

(1) 変異 KRAS(G12D)遺伝子発現抑制効果

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 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。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 塩基対の長さとの mismatches 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。

その結果、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ことが判明した。また、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った。

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

中央の Gap 領域を 11 塩基、9 塩基、7 塩基、5 塩基と変化させた 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 および変異型 KRAS(G12D)mRNA

の発現抑制効果を評価した。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。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。

(3) 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。その結果、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 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。

(4) LSL-KRAS (G12D) モデルマウス評価系の確立

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の準備として、核酸コンジュゲートの合成、機能評価、およびスケールアップ合成を行っている。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

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、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。特に、コンジュゲート型アンチセンス核酸、siRNA を用いて機能向上を図ることを目指す。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 mRNA 発現定量および細胞増殖抑制効果により評価する。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→遺伝子発現抑制評価→細胞増殖抑制評価→マウス系でのがん抑制評価を繰り返し、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 KRAS 依存性癌の革新的な治療薬を開発する。一般に、癌ドライバー遺伝子には 1 塩基変異が多く見出されており、本研究成果により、核酸医薬が 1 塩基変異を区別して変異型遺伝子のみを抑制できることが示されれば、EGFR(T790M)変異陽性肺癌などの KRAS 遺伝子以外の癌ドライバー遺伝子変異陽性癌にも応用できる可能性が高い。さらに、in vivo での効果を確認して、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。本研究成果により多くの命が救える可能性が広がる。

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)
Chemistry An Asian Journal	学術誌	2019 Jan 2. doi: 10.1002/asia.201801757 (2019年1月)
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
第55回化学関連支部合同九州大会	学会発表(ポスター)	2018年6月30日
日本核酸医薬学会第4回年会	学会発表(ポスター)	2018年7月9日-11日
Advances in Noncanonical Nucleic Acids 2018	招待講演	2018年10月25日-27日
The 45th International Symposium of Nucleic Acid Chemistry	学会発表(ポスター)	2018年11月7日-9日
The 45th International Symposium of Nucleic Acid Chemistry	学会発表(口頭)	2018年11月7日-9日
The 45th International Symposium of Nucleic Acid Chemistry	学会発表(口頭)	2018年11月7日-9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
All Russian Conference with International Participation "Biotechnology for the Future of Medicine"	招待講演	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 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
PLOS ONE	学術誌	12(3):e0173713 (2017 年 3 月)
<i>Int J Cancer</i>	学術誌	142(8) 1627-1639 (2018 年 4 月)
Genes Cells	学術誌	23(9):767-777 (2018 年 9 月)
第 22 回日本がん分子標的治療学会	学会発表(ポスター)	2018 年 5 月 16 日
第 22 回日本がん分子標的治療学会	学会発表(口頭)	2018 年 5 月 17 日
第 22 回日本がん分子標的治療学会	学会発表(口頭)	2018 年 5 月 17 日
第 18 回日本抗加齢医学会総会	招待講演	2018 年 5 月 29 日
第 91 回日本生化学会大会	学会発表(ポスター)	2018 年 9 月 24 日
第 91 回日本生化学会大会	学会発表(ポスター)	2018 年 9 月 24 日
第 91 回日本生化学会大会	学会発表(ポスター)	2018 年 9 月 24 日
第 77 回日本癌学会学術総会	学会発表(ポスター)	2018 年 9 月 29 日
第 80 回日本血液学会	学会発表(口頭)	2018 年 10 月 14 日
第 76 回日本癌学会学術総会	学会発表(口頭)	2017 年 9 月 29 日
第 76 回日本癌学会学術総会	学会発表 (ポスター)	2017 年 9 月 29 日
第 76 回日本癌学会学術総会	学会発表 (ポスター)	2017 年 9 月 29 日
第 76 回日本癌学会学術総会	学会発表 (ポスター)	2017 年 9 月 29 日
第 90 回日本生化学会大会	学会発表 (ポスター)	2017 年 12 月 6-9 日
第 21 回日本がん分子標的治療学会	学会発表 (ポスター)	2017 年 6 月 14-16 日
Molecular and Cellular Biochemistry	学術誌	442(1-2):39-45 (2018 年 5 月)
Anticancer Research	学術誌	38(1):77-81 (2018 年 1 月)
Molecular Cancer Research	学術誌	15(10):1388-1397 (2017 年 10 月)
Anticancer Research	学術誌	37(4):1603-1608 (2017 年 4 月)
第 41 回日本分子生物学会	学会発表 (ポスター)	2018 年 11 月 30 日
第 41 回日本分子生物学会	学会発表 (ポスター)	2018 年 11 月 28 日
近畿大学サイエンスネットワーク 2018・第 8 回院生サミット	学会発表 (ポスター)	2018 年 9 月 16 日
近畿大学サイエンスネットワーク 2018・第 8 回院生サミット	学会発表 (ポスター)	2018 年 9 月 16 日
EMBO Workshop Cellular signalling and cancer therapy	学会発表 (ポスター)	2018 年 9 月 16 日
25th Biennial Congress of the	学会発表 (ポスター)	2018 年 7 月 1 日

European Association for Cancer Research		
第 55 回化学関連支部合同九州大会	学会発表 (ポスター)	2018 年 6 月 30 日
第 55 回化学関連支部合同九州大会	学会発表 (ポスター)	2018 年 6 月 30 日
第 55 回化学関連支部合同九州大会	学会発表 (ポスター)	2018 年 6 月 30 日
第 40 回日本分子生物学会	学会発表 (ポスター)	2017 年 12 月 8 日
第 40 回日本分子生物学会	学会発表 (ポスター)	2017 年 12 月 2 日
近畿大学サイエンスネットワーク 2017・第 7 回院生サミット	学会発表 (ポスター)	2017 年 9 月 2 日
近畿大学サイエンスネットワーク 2017・第 7 回院生サミット	学会発表 (ポスター)	2017 年 9 月 2 日
近畿大学サイエンスネットワーク 2017・第 7 回院生サミット	学会発表 (ポスター)	2017 年 9 月 2 日
第 54 回化学関連支部合同九州大会	学会発表 (ポスター)	2017 年 7 月 1 日
第 54 回化学関連支部合同九州大会	学会発表 (ポスター)	2017 年 7 月 1 日
第 54 回化学関連支部合同九州大会	学会発表 (ポスター)	2017 年 7 月 1 日
第 69 回日本細胞生物学会	招待講演	2017 年 6 月 14 日
EMBO conference-Chromatin and Epigenetics.	学会発表 (ポスター)	2017 年 5 月 4 日