

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14994

研究課題名(和文) がん型OATP1B3を応用した先進的がん個別化遺伝子治療の基盤システム創成

研究課題名(英文) Development of a novel RNA trans-splicing molecule for cancer gene therapy targeting to cancer-type organic anion transporting polypeptide 1B3

研究代表者

降幡 知巳 (Furihata, Tomomi)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：80401008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がん型organic anion transporting polypeptide 1B3(がん型OATP1B3)を標的とする新たなspliceosome-mediated RNA trans-splicing (SMaRT)がん遺伝子治療用核酸を構築した。ヒト大腸がんLS180細胞および担がんモデルマウスを用いた解析により、本核酸は優れた抗がん活性を示すことが明らかとなった。したがって、本研究結果は、SMaRTがん遺伝子治療開発推進に向けた基盤的成果となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Spliceosome-mediated RNA trans-splicing, which is mediated by an RNA trans-splicing molecule (RTM), is expected to be a promising tool for cancer gene therapy. RTM leads to trans-splicing between a target mRNA and a suicide gene (such as the herpes simplex virus thymidine kinase) to generate the suicide protein. Therefore, we aimed at development and characterization of an RTM targeting to Ct-OATP1B3 mRNA (hereafter referred to as RTM44-2), which is expressed in various cancer tissues in a cancer-specific manner. To examine the RTM44-2 functionality, we developed LS180 cells stably expressing RTM44-2 (RTM/LS), and cytotoxic assays were performed using ganciclovir (GCV). As a result, GCV significantly reduced the viability of RTM/LS cells. Furthermore, such anti-cancer effects of the RTM-GCV system was also observed in vivo xenograft models. To summarize, our results indicate that the Ct-OATP1B3-targeted gene therapy has a potential to become an effective anti-cancer therapy.

研究分野：薬理学・薬物動態学

キーワード：cancer-type OATP1B3 がん遺伝子治療 がん

1. 研究開始当初の背景

がんの特異的な分子を発現する患者を同定し、その分子を標的として特異的に作用する治療を施行するがん個別化治療は、優れた治療奏効率を達成し、近年大きな成果を挙げている。このようながん個別化治療を進展させるためには、個々の標的分子に対し、その発現特性や患者背景との関連の詳細を明らかとし、さらにその標的に対し優れた特異性を有する作用機序を持つ治療法を確立していく必要がある。

これまでに申請者は、がん特異的に発現する遺伝子産物として、がん型 organic anion transporting polypeptide 1B3(OATP1B3)を同定した。がん型 OATP1B3 は肝特異的薬物トランスポーターOATP1B3 のがん特異的バリエーションである。また、申請者らは、ヒト大腸がん(n=39)において、がん部におけるがん型 OATP1B3 mRNA の発現陽性頻度は極めて高いこと(87%)、さらにその発現は正常部でほとんど認められないこと(陽性は1例のみ)を明らかとしてきた。同様にがん型 OATP1B3 のがん特異的な発現プロファイルは、肺がんや膵がんにおいても認められている。したがって、がん型 OATP1B3 は大腸がんや肺がん、膵がんの個別化治療における新たな分子標的として、極めて有望な発現プロファイルを有すると考えられる。

一方、がんに対する新たな治療法として、近年がん遺伝子治療に大きな期待が寄せられている。このうち herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir (HSVtk/GCV) がん遺伝子治療は最も広く検討がなされてきたがん自殺遺伝子治療法であり、がん細胞に発現させた HSVtk を利用して、細胞内で GCV を代謝活性化することにより殺細胞効果(=抗がん効果)を生じる機序に基づいている。従来法では、正常細胞に対する副作用が問題であったが、最近、Dr. Gruber らは spliceosome-mediated RNA trans-splicing (SMaRT) 技術により、がん特異性を飛躍的に向上させた HSVtk/GCV がん遺伝子治療法 (HSVtk/GCV/SMaRT がん遺伝子治療法) を開発した。SMaRT はトランススプライシング機構を利用した RNA 編集技術であり、標的の一次転写産物の一部を、細胞外より導入した目的の配列と結合させることによって、細胞内に目的タンパク質を発現させることを可能とする。したがって、標的遺伝子としてがん特異的遺伝子を、目的タンパク質として HSVtk を用いることにより、がん特異的に HSVtk を発現させることが可能となる。

上述の機序から、HSVtk/GCV/SMaRT がん遺伝子治療法において、その効果発現の鍵を握るのは、標的遺伝子である。このことから申請者は、がん特異性・発現量ともに優れたがん型 OATP1B3 は HSVtk/GCV/SMaRT がん遺伝子治療法において極めて有望な標的遺伝子となると考えられる。

2. 研究の目的

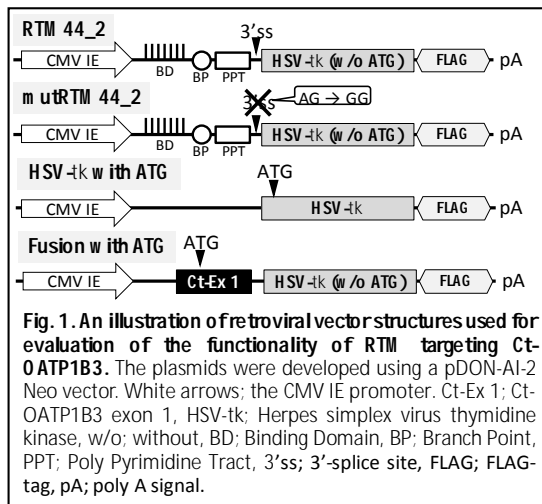
そこで本研究では、がん型 OATP1B3、SMaRT、HSVtk/GCV を融合した、新たながん個別化遺伝子治療法 1B3/HSVtk/GCV/SMaRT がん個別化遺伝子治療 の創出に向けた基盤システムの確立を目的とする。

3. 研究の方法

(1) RNA trans-splicing molecule (RTM) プラスミドの構築

がん型 OATP1B3 特異的 RTM プラスミド (RTM44_open reading frame (ORF) 2 mod HSV-tk (w/o ATG)/pcDNA3.1 D V5-His-Topo (RTM44_2 HSV-tk (w/o ATG)/pcDNA3.1) および RTM44_2 ORF2 mod HSV-tk (w/o ATG)/pAAV-MCS (RTM44_2 HSV-tk (w/o ATG)/pAAV) は Dr. Gruber (Department of Dermatology, EB House Austria, Paracelsus Medical University, Salzburg, Austria) らにより作成した。

これらを鋳型とし、PCR およびライゲーション法、または In-Fusion® HD Cloning Kit (タカラバイオ、滋賀) により、HSV-tk 発現ベクター (HSV-tk with ATG/pDON)、融合 mRNA 発現ベクター (Fusion with ATG/pDON) および RTM44_2 HSV-tk (w/o ATG) 発現ベクター (RTM44_2/pDON) を構築した。また、site-directed mutagenesis 法により 3' -スプライシングサイトに変異を導入した RTM44_2 HSV-tk (w/o ATG) 発現ベクター (mutRTM44_2/pDON) を作成した。作製したベクターの DNA 塩基配列は Eurofins Genomics (東京) に委託し解析した (Fig. 1)。



(2) 細胞培養

ヒト大腸がん由来 HCT116 細胞は Dr. Vogelstein (Johns Hopkins University, Baltimore, MD) より御恵与賜った。ヒト結腸がん由来 LS180 細胞は DS ファーマバイオ

メディカル(大阪)より入手した。ヒト大腸がん由来 SW480 細胞およびヒト大腸がん由来 HT-29 細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA)より購入した。293FT 細胞は Invitrogen (Carlsbad, CA)より購入した。HCT116 細胞および SW480 細胞は、Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (和光, 大阪)に、LS180 細胞は Eagle's minimal essential medium (EMEM) (Wako) に 10% (v/v) 非働化 fetal bovine serum (FBS) および 100 units/mL penicillin G-100 µg/mL streptomycin (Pen/St)を加えた培地で培養した。293FT 細胞は DMEM に 10%FBS および Pen/St を加えたものに G418 sulfate (Wako) を最終濃度 500 µg/mL で添加し培養した。上記細胞は全て、5% CO₂/95% air を気相とした 37 インキュベーターで培養した。

(3) レトロウイルスの作製

293FT 細胞に HSV-tk with ATG/pDON, Fusion with ATG/pDON, RTM44_2/pDON または mutRTM44_2/pDON (6 µg) と Retrovirus Packaging Kit Amphi (タカラバイオ) を、Lipofectamine 2000 Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)を用いて導入した。その 48 時間後に培地上清を回収してウイルスを濃縮した。これを DMEM (和光, 大阪)で再懸濁し、遺伝子導入用レトロウイルス溶液 (HSV-tk with ATG-retro, Fusion with ATG-retro, RTM44_2-retro または mutRTM44_2-retro) とした。

(4) 各種遺伝子安定発現 LS180 細胞および SW480 細胞の樹立

LS180 細胞および SW480 細胞に HSV-tk with ATG-retro, Fusion with ATG-retro, RTM44_2-retro または mutRTM44_2-retro を 10% (v/v) の濃度で Polybrene (Sigma-Aldrich)とともに添加してトランスダクションをおこなった。その 7 日後、G418 を添加して細胞の選択をおこない、続いてコロニーフォーメーションによりクローンを単離した。個々のクローンについて、定量的 real-time PCR 法 (後述) を用いて、HSV-tk mRNA 発現が高く、かつ、それぞれの細胞間で HSV-tk mRNA 発現量が同等であるクローンを選び、それぞれ HSV-tk with ATG/LS180#2, Fusion with ATG/LS180#1, RTM44_2/LS180#11, mutRTM44_2/LS180#2, HSV-tk with ATG/SW480#2 および RTM44_2/SW480#4 とした。

(5) Total RNA 抽出および complimentary DNA (cDNA) の合成

各種細胞からの total RNA 抽出は、ISOGEN with Spin Column (ニッポンジーン、東京)を用いてプロトコールどおりにおこなった。cDNA の合成は、抽出した total RNA 1 µg を

テンプレートとし、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (東洋紡, 大阪)を用いてプロトコールどおりにおこなった。

(6) Reverse transcription-PCR (RT-PCR) および direct DNA sequence analysis

HSV-tk mRNA、がん型 OATP1B3/HSV-tk 融合 mRNA および RTM mRNA の発現は、各種細胞の cDNA をテンプレートとして、RT-PCR により解析した。また、内部標準として human glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA の発現解析もおこなった。RT-PCR により得られたがん型 OATP1B3/HSV-tk 融合 mRNA PCR 産物の塩基配列は Eurofins Genomics に委託し解析した。

(7) 定量的 real-time PCR 法

HSV-tk mRNA 発現量は、cDNA をテンプレートとして、KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix (KAPA BIOSYSTEMS, Wilmington, MA) および Eco Real-Time PCR System (Illumina, San Diego, CA) を用いた real-time PCR により解析した。HSV-tk mRNA 発現量は内部標準とした GAPDH mRNA 発現量により補正し、Ct 法を用いた相対定量法を用いて算出した。

ヒト大腸がん由来細胞株 (LS180, HT29, HCT116 および SW480) におけるがん型 OATP1B3 mRNA 発現量は、内部標準として TATA binding box protein (TBP) mRNA を用いる以外は上記と同様に定量をおこなった。

(8) 細胞毒性試験

各種遺伝子安定発現細胞株およびそれらの親細胞 (LS180 細胞および SW480 細胞) に対するガンシクロビル (GCV, 和光) の毒性は、MTS アッセイ (Promega, Madison, WI) を用いて解析した。培地中の最終溶媒 (dimethylsulfoxide, DMSO) 濃度はすべて 0.5% とし、GCV の最終濃度は 0.001 - 100 µM とした。曝露 96 時間後に MTS アッセイをおこなった。同様に培地のみを吸光度を測定し、これをバックグラウンドとして補正した。GCV 曝露細胞の cell viability (%) は、DMSO のみを添加した細胞より得られた吸光度を 100% として算出した。

(9) 担がんマウスを用いた *in vivo* 試験

In vivo における抗腫瘍効果の評価には、SCID Beige マウス (6 週齢、) を用いた。RTM44_2/LS180 #11 または mutRTM44_2/LS180 #2 をマウスの腹側部へ皮内接種し、腫瘍体積が 50 mm³ を超過した時点から GCV (100 mg/kg) または Phosphate-buffered saline (PBS) (-) を 14 日間連続腹腔内投与した。腫瘍体積は GCV または PBS 投与開始日から一日おきに測定し、以下の式を用いて算出した。

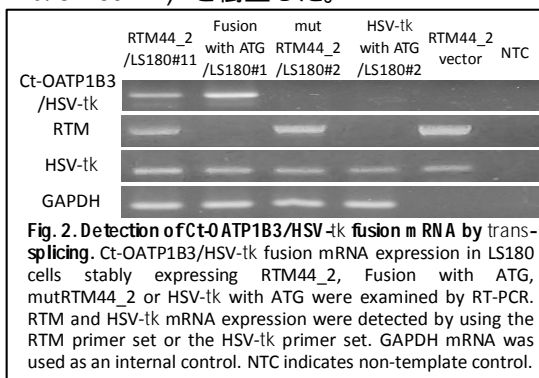
腫瘍体積(mm³) =
 長径(mm) × [短径(mm)]² × 0.5
 さらに、GCV または PBS 投与開始日の腫瘍体積を基準 (=1) とした相対腫瘍体積も算出した。また、投与終了翌日に解剖ハサミを用いて腫瘍組織を摘出し、腫瘍重量を測定した。

(10) 統計解析

得られたデータは Williams test または Tukey-Kramer test によるパラメトリック多重比較検定または Student's t-test をおこなった。統計計算には Excel 統計ソフト Statcel 4 (OMS、Tokyo) を用いた。

4. 研究成果

ヒト大腸がん由来細胞株を用いてがん型 OATP1B3 mRNA の発現量解析を qPCR によりおこない、がん型 OATP1B3 mRNA 高発現細胞株として LS180 細胞を、低発現細胞株として SW480 細胞を同定した。これら細胞を用い、各種遺伝子安定発現細胞 (RTM44_2/LS180#11, mutRTM44_2/LS180#2, HSV-tk with ATG/LS180#2, Fusion with ATG/LS180#1, RTM44_2/SW480#4, mutRTM44_2/SW480mix, HSV-tk with ATG/SW480 #2 および Fusion with ATG/SW480mix) を樹立した。



続いて、がん型 OATP1B3 mRNA 前駆体を標的としたトランススプライシングによりがん型 OATP1B3/HSV-tk 融合 mRNA が産生されるか明らかとするため、RT-PCR によりこれら安定発現細胞におけるがん型 OATP1B3/HSV-tk 融合 mRNA 発現を解析した (Fig. 2、LS180 細胞の結果のみ示す)。その結果、RTM44_2/LS180#11 および RTM44_2/SW480#4 細胞において、融合 mRNA と考えられるバンドの発現が認められた。一方、mutRTM44_2/LS180#2 および mutRTM44_2/SW480mix 細胞においてはこのバンドの発現は認められなかった。ここで得られた PCR 産物の塩基配列を DNA シークエンスにより解析した結果、がん型 OATP1B3 exon 1 の塩基配列と HSV-tk の塩基配列が繋がっていることが明らかとなった。また、RTM44_2/LS180#11, mutRTM44_2/LS180#2, RTM44_2/SW480#4 および

mutRTM44_2/SW480mix 細胞において、コントロールである RTM44_2/pDON ベクターと同位置に BD mRNA の発現が認められ、さらに、すべての安定発現細胞株において HSV-tk mRNA の発現が認められた。

上記の結果より、RTM44_2 安定発現細胞においてトランススプライシングを介したがん型 OATP1B3/HSV-tk 融合 mRNA の発現が認められたことから、これら安定発現細胞を用いて GCV の細胞毒性発現を解析した (Fig. 3、LS180 細胞の結果のみ示す)。その結果、GCV 曝露濃度 1, 10 および 100 μM において、RTM44_2/LS180#11 細胞の生存率 (%) はそれぞれ GCV 非曝露時の 54.8 ± 6.0, 28.9 ± 6.6 および 13.8 ± 3.0 であり、Fusion with ATG/LS180#1 および HSV-tk with ATG/LS180#2 細胞と同等の GCV による濃度依存的な細胞毒性が認められた。さらに、RTM44_2/LS180#11, Fusion with ATG/LS180#1 および HSV-tk with ATG/LS180#2 細胞において、それぞれの EC₅₀ 値を算出したところ、1.15 (95% CI = 0.71 to 2.16), 0.84 (95% CI = 0.64 to 1.13) および 0.16 (95% CI = 0.08 to 0.31) であった。

一方、GCV 曝露濃度 1, 10 および 100 μM において、RTM44_2/SW480#4 細胞の生存率 (%) はそれぞれ GCV 非曝露時の 86.9 ± 2.7, 65.4 ± 0.2 および 49.4 ± 2.5 であり、Fusion with ATG/LS180#1 および HSV-tk with ATG/LS180#2 細胞と同様に GCV による濃度依存的な細胞毒性が認められた。しかしながら、RTM44_2/SW480#4 細胞の毒性は、RTM44_2/LS180#11 と比べ、著しく低い程度であった。なお、mutRTM44_2/LS180#2, mutRTM44_2/SW480mix, 遺伝子導入していない LS180 および SW480 細胞においては、GCV による細胞毒性は認められなかった。

In vitro において RTM44_2 のトランススプライシングによる GCV 細胞毒性発現が認められたことから、つづいて、RTM44_2/LS180#11 または mutRTM44_2/LS180#2 細胞を接種し、作製した担がんマウスを用いて *in vivo* における RTM44_2 および GCV による抗腫瘍効果解析をおこなった (Fig. 4)。RTM44_2/LS180#11 担がんマウスにおいて、投与開始 14 日後の PBS 投与群 (n=3) の相対腫瘍体積が 10.1 ± 1.8 倍であったのに対し、GCV 投与群 (n=6) では 2.4 ± 0.7 倍であり、GCV 投与による腫瘍増殖の顕著な抑制が認められた。一方、mutRTM44_2/LS180#2 担がんマウスでは、投与開始 14 日後の GCV 投与群 (n=5) の相対腫瘍体積は 9.6 ± 1.5 倍であり、GCV 投与による腫瘍増殖の抑制は認められなかった。

また、投与終了 1 日後に腫瘍を摘出し、腫瘍重量 (g) を測定したところ、RTM44_2/LS180#11 担がんマウスにおいて、PBS 投与群の腫瘍重量は 0.66 ± 0.17 であったのに対し、GCV 投与群の腫瘍重量は 0.15 ± 0.04 であり、GCV 投与による腫瘍重量の減少が認められた。一方、mutRTM44_2/LS180#2 担がんマウスでは GCV 投与群の腫瘍重量は 0.40

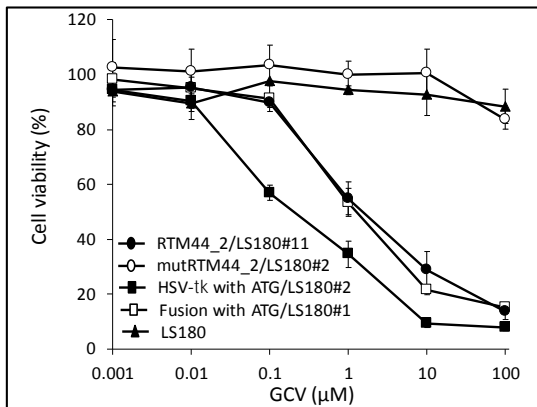


Fig. 3. Effect of RTM 44_2 mediated trans-splicing targeting to Ct-OATP1B3 on cell viability. LS180 cells stably expressing RTM44_2, mutRTM44_2, HSV-tk with ATG or Fusion with ATG were treated with GCV (0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 or 100 μM) or 0.5% DMSO (a vehicle of GCV) for 96 hours. Cell viability was determined by MTS assay and expressed as a percentage of the viable control cells (100%). LS180 or SW180 cells were used as a non-transfection control. Data are expressed as the mean ± S.D. of three independent determinations, each performed in triplicate.

± 0.06 であった。

以上、本研究により、*in vitro*において RTM_2/HSVtk はがん細胞内がん型 OATP1B3 pre-mRNA に対しトランスプライシングを誘発すること、そこで産生したがん型 1B3/HSVtk は GCV 代謝活性化能を有すること、さらに *in vivo*においても RTM_2/HSVtk と GCV に起因する抗腫瘍効果が認められることが明らかとなった。したがって、がん型 OATP1B3 を標的とした 1B3/HSVtk/GCV/SMaRT が個別化遺伝子治療はがん治療へと応用できる可能性が十分にあると考えられる。

今後、搭載する自殺遺伝子の改良やより高効率なトランスプライシング誘発 RTM の作製、腫瘍組織への遺伝子デリバリーシステムの構築等をおこなうことにより、がん特異性の高い新たながん遺伝子治療が確立すると期待される。また、がん型 OATP1B3 は大腸がんばかりでなく、肺がんや膵臓がんにも高く発現することから、本治療法は幅広いがんへも応用が可能となると期待される。さらに、本遺伝子治療は、その薬効発現機序から、抗がん剤抵抗性がんに対しても効果的であると考えられる。

以上のことから、本研究遂行により得られた成果は、1B3/HSVtk/GCV/SMaRT が個別化遺伝子治療の礎となると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者に下線)

[学会発表](計3件)

1. Harada M, Furihata T, Sun Y, Akita H, Anzai N, Koller U, Stierschneider A, Hofbauer JP, Gruber C, Chiba K. Development and preclinical evaluation of a novel RNA trans-splicing molecule for cancer

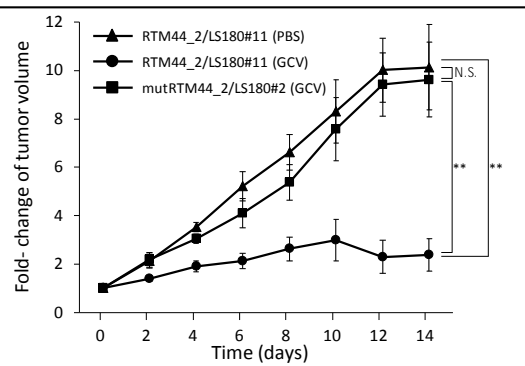


Fig. 4. Effect of RTM 44_2 mediated trans-splicing targeting Ct-OATP1B3 on xenograft tumor growth in vivo.

Effects of GCV treatment on the growth of pre-established RTM44_2/LS180#11 or mutRTM44_2/LS180#2 xenograft. Tumors were established in 6 weeks old female SCID Beige mice by intradermal flank injection of 5.0×10^5 RTM44_2/LS180#11 or mutRTM44_2/LS180#2 cells. After the tumor exceeded 50 mm^3 , the mice received daily GCV (100 mg/kg) or PBS by intraperitoneal injection for 14 days (RTM44_2/LS180#11 (PBS); n = 3, RTM44_2/LS180#11 (GCV); n = 6, mutRTM44_2/LS180#2 (GCV); n = 5). Statistical differences were evaluated by one-way ANOVA, followed by Tukey-Kramer test (**; p < 0.01, N.S.; not significant). Data are expressed as the mean ± S.E. (n = 3 - 6). Statistical differences were evaluated by Student's t-test (**; p < 0.01).

gene therapy targeted to cancer-type organic anion transporting polypeptide 1B3. 第22回日本遺伝子細胞治療学会学術集会 2016年7月28-30日、虎ノ門ヒルズフォーラム(港区・東京都)

2. Furihata T. Cancer-type organic anion transporting polypeptide 1B3: current knowledge of expression profile, functional insights, and clinical perspectives. 日本薬物動態学会第31回年会 (JSSX-KASP joint symposium) 2016年10月13-15日、キッセイ文化ホール(松本市・長野県)
3. 井手秀行、孫雨晨、原田まなみ、下里修、上條岳彦、山口直人、千葉寛、秋田英万、安西尚彦、降幡知巳 新規がん診断分子候補 Ct-OATP1B3 mRNA はがん由来エキソソームに内包される. 第39回日本分子生物学会年会 2016年11月30日-12月2日、パシフィコ横浜(横浜市・神奈川県)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

降幡 知巳 (FURIHATA, Tomomi)
千葉大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号: 80401008

(2) 研究分担者

下里 修 (SHIMOZATO, Osamu)
千葉県がんセンター(研究所)・発がん研

究グループ DNA 損傷シグナル研究室・上
席研究員
研究者番号： 30344063