

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：34506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14042

研究課題名(和文)がん細胞特異的mRNAの四重らせん構造に対する分子標的型光線力学療法の創製

研究課題名(英文)Molecularly targeted photodynamic therapy targeting cancer related mRNA G-quadruplex

研究代表者

三好 大輔(MIYOSHI, Daisuke)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・教授

研究者番号：50388758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：低侵襲ながん治療法である光線力学療法(PDT)の問題点を解決するために、がん細胞で特異的に発現している分子のみを標的とできる「分子標的型PDT(MTPDT)」の確立を目的とした。標的として、NRASタンパク質をコードするmRNAが形成する四重らせん構造とした。細胞内外での検討の結果、亜鉛を配位したフタロシアニンは光照射により、NRAS mRNAを特異的に切断し、NRASタンパク質の発現量を低下させた。さらに、ヒト乳がん由来のMCF-7細胞を死滅させることができた。このようなNRAS mRNAの切断は、嫌気状態でも可能であったことから、固形がんへの展開も可能となった。

研究成果の概要(英文)：Ras signaling pathways contributes to aggressive phenotypes of cancer cells. The Ras-targeted therapies for cancer therefore has been recognized to be absolutely effective. On the other hand, it is well known that drug developments targeting Ras is very difficult due to structural feature of Ras protein. In this project, we found that expression of N-Ras was able to be controlled by photo-irradiation with an anionic phthalocyanine, ZnAPC, targeting NRAS mRNA, which forms a G-quadruplex at its 5' UTR region. It was shown that ZnAPC bound G-quadruplex-forming oligonucleotide derived from NRAS mRNA and cleaved it upon photo-irradiation. Consistent with these results, the combination of photo-irradiation and ZnAPC decreased N-Ras expression and drastically reduced cell viability of cancer cells, MCF-7 cells. These results demonstrate that ZnAPC is prominent for a molecular-targeted photodynamic cancer therapy.

研究分野：生体関連化学

キーワード：四重らせん構造 RNA NRAS がん 光線力学療法 分子標的型 フタロシアニン

1. 研究開始当初の背景

PDTで用いられる光感受性物質(国内で認可されているのは2種類のポルフィリン系物質)は、光照射によって三重項励起状態となり、周辺の酸素原子を活性種に変換する。活性酸素種は近傍の生体分子の損傷を引き起こす。このような機構で機能する PDT には次に示す問題点がある。

(1) 現在用いられている光感受性物質は、正常細胞に比べてがん細胞への取り込み効率が4倍程度と特異性が低い。そのため重篤な副作用があり、術後の暗所での生活も必要とされる。

(2) 光感受性物質は、近傍の生体分子に対して非特異的に損傷を引き起こすため、重篤な副作用の原因となる。

(3) 現在用いられているポルフィリン系光感受性物質の励起光は630 nm及び660 nmであり、組織透過性が低く、より長波長で励起可能な光感受性物質が必要である。

これら既存の PDT における問題点を解決するには、がん細胞で特異的に発現している分子のみを標的とできる「分子標的光感受性物質 (Molecular-Targeted Photosensitizer: MTPS)」を用いた「分子標的型 PDT (MTPDT)」を確立することが必要であると着想した。

標的とする生体分子としては、分子標的薬の開発が世界中で繰り返されているものの、その達成が困難であることが知られている、NRAS タンパク質をはじめとするがん関連タンパク質をコードする mRNA が形成する四重らせん構造(以下 G4 と略して示す)とした。特に NRAS タンパク質は、その球状の構造から阻害剤の開発が極めて困難であることから、本研究の MTPDT で、mRNA を標的とし、発現量を抑制することができれば、これまでにない画期的な治療薬の開発につながることを期待できる。

2. 研究の目的

これまでにない分子標的型 PDT を可能にする、分子標的光感受性物質 (Molecular-Targeted Photo-sensitizer: MTPS)を開発する(図1)。そのために、次の二点の課題を遂行した。

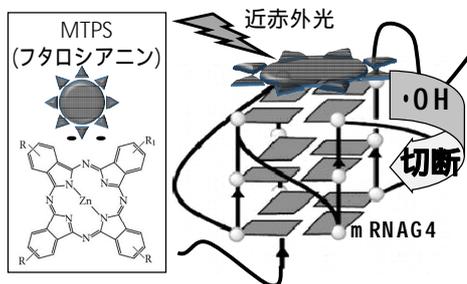


図1. mRNA G4 を標的とした分子標的型 PDT の概略図

(1) がん細胞で高発現する mRNA が形成する四重らせん構造 (mRNAG4) と特異的に結合し、切断できる MTPS をフタロシアン (励起波長: 680 nm) から開発する。

(2) MTPS が、標的 mRNA G4 の切断によるがん細胞の増殖阻害性をもつことを証明する。

3. 研究の方法

まず、がん関連 mRNA に見られる G4 配列のモデルオリゴ RNA を設計した。オリゴ RNA は固相合成し、HPLC を用いて精製した。NRAS mRNA の 5'UTR の全長に対応する RNA は、プラスミドから T7 ポリメラーゼを用いて合成し、アクリルアミドゲルを用いて精製した。MTPS の候補化合物である、フタロシアン類は、研究用のグレードのものを購入し、精製することなく用いた。細胞実験においては、ヒト乳がん由来の MCF-7 細胞を用いた。

オリゴ RNA とフタロシアンの結合は分光学的に検討した。フタロシアンによる光切断は LED を用いて照射した(図2)。産物をゲル電気泳動することで切断能を評価した。細胞内外における活性酸素の検出は、活性酸素に応答して蛍光を発する化合物の蛍光強度の変化を利用した。細胞内での mRNA の発現量は、リアルタイム PCR を用いて定量した。細胞内でのタンパク質の発現量は、ウエスタンブロットを用いて評価した。

NIR LED light for test tubes for cell dishes



図2. 本助成を受けて購入した光照射用 LED 光源装置

4. 研究成果

上記の目的別に得られた成果を記す。

(1) mRNA G4 と特異的に結合し、切断できる MTPS をフタロシアンの開発

まず、中心に異なる金属をもつフタロシアン、ZnAPC、CuAPC、NiAPC、FePAC と NRAS RNA G4 の結合親和性を検討した。その結果、FeAPC 以外のフタロシアンが標的とする NRAS RNA G4 と解離定数 (K_d) が数 μM 程度の親和性で結合することが分かった。一方、FeAPC は NRAS RNA G4 と結合しなかった。さらに、これらのフタロシアンは、二重らせん構造を形成する RNA とは全く結合しないことも分かった。また、大過剰の RNA の二重らせん構造が存在しても、上述のフタロシアンは、NRAS RNA G4 と

の結合親和性を保持した。mRNA の大部分は二重らせん構造を形成していることから、この結合の特異性は、MTPS として極めて重要な特性であると言える。

次に、上記のフタロシアニンの活性酸素 (ROS) 酸性能力を確認した。ROS の蛍光検出プローブである HPF 存在下で、光照射を行ったところ、ZnAPC に関して、顕著な傾向上昇が観察されたことから、ZnAPC の高い ROS さん性能が確認された。一方、FeAPC には ROS 生産能がほとんどないことが分かった。

以上の結果より、ZnAPC を MTPS の候補化合物として、さらなる検討対象とすることとした。一方、結合親和性と ROS 生産能がない FeAPC をコントロール化合物として用いることとした。そこで、ZnAPC をはじめとするフタロシアニンの NRAS RNA の光切断能を検討した。その結果、結合親和性と ROS 生産能をしめした ZnAPC のみが NRAS RNA を光切断することが分かった (図 3)。

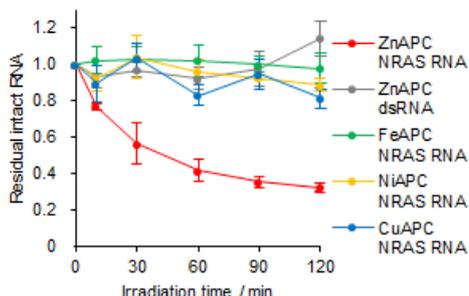


図 3. NRAS RNA G4 の試験管内光切断の結果

(2) MTPS の標的 mRNA G4 の切断によるがん細胞の増殖阻害性

上記の試験管内での結果をもとに、乳がん由来の MCF-7 細胞を用いて ZnAPC の NRAS mRNA の切断能を検討した。その結果、ZnAPC を導入し、光照射をした場合のみ、NRAS mRNA の量が減少した。さらに、NRAS タンパク質の発現量も検討した。その結果、ZnAPC を添加し、光照射を行った場合のみ、発現量が約 40%にまで減少する

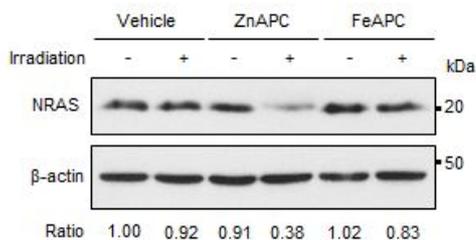


図 4. MTPDT による NRAS タンパク質の発現量の抑制

ことが示された (図 4)。

これらの結果を受けて、ZnAPC と光照射による MCF-7 細胞の増殖阻害について検討した。その結果、ZnAPC を導入し光照射を行った場合、24 時間後の細胞生存率が 5%にまで減少することが示された。

さらに本研究では、ZnAPC による光切断機構についても検討した。ZnAPC と NRAS RNA G4 複合体の蛍光寿命観察と、嫌気環境 (溶液内の溶存酸素がほとんどなくなっている環境)での光切断能、さらに NRAS RNA と同じ配列をもつ NRAS DNA に対する光切断能を検討した結果から、ZnAPC は光照射によって得たエネルギーを NRAS RNA G4 に対して直接受け渡し、RNA の水素引き抜きを介して、RNA 鎖を切断することが示唆された。この切断機構であれば、直接相互作用している分子のみの光切断が可能である。さらに、腫瘍組織内部の低酸素状態においても高い光切断のを保持できることも期待できる。

以上のように、本研究では、ZnAPC ががん悪性化のカギを握る NRAS タンパク質をコードする NRAS mRNA の G4 構造と特異的に結合することを見出した。これを MTPS として、NRAS タンパク質の発現量を特異的に抑制し、さらのがん細胞を死滅させることが可能な、MTPDT (分子標的型光線力学療法) の確立に成功した。このように、本研究では、当初の目的を十分に達成したと言える。

MTPDT はこれまでに例がなく、NRAS を標的にする医薬品候補化合物の開発されていないことから、今後の展開が大いに期待できる成果として、本研究は、Nature Communications 誌に掲載され (2018 年 6 月 11 日公開) 全国紙、ほぼ全国の地方紙、さらには海外向けのメディア、海外の新聞各紙、科学的ウェブサイトなどで紹介されるなど、社会的にも大きな反響を得られた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

An anionic phthalocyanine decreases NRAS expression by breaking down its RNA G-quadruplex

Keiko Kawauchi, Wataru Sugimoto, Takatoshi Yasui, Kohei Murata, Katsuhiko Itoh, Kazuki Takagi, Takaaki Tsuruoka, Kensuke Akamatsu, Hisae Tateishi-Karimata, Naoki Sugimoto, Daisuke Miyoshi

Nat. Commun. **9**, 2271 (2018). DOI: 10.1038/s41467-018-04771-y

Metal sensitive and DNA concentration

dependent structural rearrangement of short oligonucleotide into large suprastructures, J. Shankaraswamy, Shikhar Tyagi, Anju Singh, Daisuke Miyoshi, Sarika Saxena, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, in press (2018).

構造とその熱力学的安定性, 三好大輔
日本核酸化学会誌(創刊号), **1**, 13-19(2017)

DNA G-Wire Formation Using an Artificial Peptide is Controlled by Protease Activity, Kenji Usu, Arisa Okada, Shungo Sakashita, Masayuki Shimooka, Takaaki Tsuruoka, Shu-ichi Nakano, Daisuke Miyoshi, Tsukasa Mashima, Masato Katahira and Yoshio Hamada *Molecules*, **22**, 1991 (2017). DOI: 10.3390/molecules22111991

Selective and Robust Stabilization of Triplex DNA Structures Using Cationic Comb-type Copolymers, A. Yamayoshi, D. Miyoshi, Y. Zouzumi, Y. Matsuyama, J. Ariyoshi, N. Shimada, A. Murakami, T. Wada, A. Maruyama *J. Phys. Chem. B.* **121**, 4015-4022 (2017). DOI: 10.1021/acs.jpcc.7b01926

Highly Sensitive Telomerase Assay Insusceptible to Telomerase and Polymerase Chain Reaction Inhibitors for Cervical Cancer Screening Using Scraped Cells, H. Yaku, Y. Yoshida, H. Okazawa, Y. Kiyono, Y. Fujita, D. Miyoshi *Anal. Chem.*, **89**, 6948-6953 (2017). DOI: 10.1021/acs.analchem.6b04777

Unexpected Position-Dependent Effects of Ribose G-Quartets in G-Quadruplexes, J. Zhou, S. Amrane, F. Rosu, G.F. Salgado, Y. Bian, H. Tateishi-Karimata, E. Largy, D. N. Korkut, A. Bourdoncle, D. Miyoshi, J. Zhang, H. Ju, W. Wang, N. Sugimoto, V. Gabelica, and J. Mergny *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 7768-7779 (2017). DOI: 10.1021/jacs.7b00648

Cell and Molecular Mechanics in Health and Disease, Keiko Kawauchi, Hideaki Fujita, Daisuke Miyoshi, Evelyn K. F. Yim, and Hiroaki Hirata *BioMed Research International*, **2017**, Article ID 2860241 (2017). DOI: 10.1155/2017/2860241

Effects of trimethylamine N-oxide and urea on DNA duplex and G-quadruplex, Y. Ueda, Y. Zouzumi, A. Maruyama, S. Nakano, N. Sugimoto, D. Miyoshi

Sci. Tech. Adv. Mater., **17**, 753-759 (2016). DOI: 10.1080/14686996.2016.1243000

A reversible B-A transition of DNA duplexes induced by synthetic cationic copolymers, Nonoka Yamaguchi, Yu-ki Zouzumi, Naohiko Shimada, Shuichi Nakano, Naoki Sugimoto, Atsushi Maruyama, Daisuke Miyoshi *Chem. Commun.*, **52**, 7446-7449 (2016). (Highlighted as the cover) DOI: 10.1039/C6CC02237E

[学会発表](計42件)

DNA and RNA G-quadruplexes: structure, function, and ligand under cell-mimicking molecular crowding conditions, Daisuke Miyoshi, International Conference on Current Trends in Materials Science and Engineering (CTMSE 2018), N. Bose National Centre for Basic Sciences, Kolkata, India, 2018/1 (招待講演)

What is the canonical structure of nucleic acids in cells? Daisuke Miyoshi Institute Seminar, National Institute of Technology, Nagaland, Nagaland, India, 2018/1 (招待講演)

グアニン四重鎖の形成にプロリンが与える影響, 安井 貴俊、杉本 渉、三好 大輔、川内敬子
生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会)、神戸ポートアイランド 2017/12

Cell nucleus-mimicking system with synthetic cationic polymers, Daisuke Miyoshi 1st Minisymposium on Material Biology, Tokyo institute of Technology Suzukakedai campus, 2017/10 (招待講演)

DNA and RNA G-quadruplexes: Structure, Stability, Function, and Ligand under Cell-mimicking Molecular Crowding Conditions, Daisuke Miyoshi, Yu-ki Zouzumi, Yoshiki Imagawa, Wataru Sugimoto, Takatoshi Yasui, and Keiko Kawauchi A3 Foresight 9th Meeting, Hotel Monterey Yokohama, 2017/9 (招待講演)

細胞夾雑模倣系の構築と細胞内活性分子設計指針の構築, 三好 大輔・杉本 直己
分子夾雑の生命化学 第一回公開シンポジウム, 東京大学 鉄門記念講堂, 2017/9 (招待講演)

細胞の分子クラウディング環境における核酸の四重らせん構造とそれを標的とした機能性分子の開発, 三好大輔

49th Seminar, Japanese Association of Scientists in Singapore, JST シンガポール, 2017/8 (招待講演)

核酸の高次構造を標的にする機能性分子の医療展開, 三好大輔

神戸医療産業都市クラスター交流会, 甲南大学, 2017/7 (招待講演)

細胞の分子クラウディング環境が制御する核酸の構造多様性 ナノメディシン

セミナー2017, 三好大輔

甲南大学ポートアイランドキャンパス, 2017/2 (招待講演)

核酸の高次構造を標的とした新しい機能性分子の開発 ~医薬品、イメージング、機能性食品~, 三好大輔

メディカル ジャパン 2017 大阪 関西広域連合研究成果企業化促進セミナー, インテックス大阪, 2017/2 (招待講演)

Pseudo-cellular environmental systems for design of functional molecules, D. Miyoshi

10th Anniversary International Symposium on Nanomedicine (ISNM2016), Auditorium at National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, 2016/11 (招待講演)

RNA 四重鎖構造を標的とする低分子化合物の抗がん作用, 杉本 渉, 村田耕平, 松野仁志, 安井貴俊, 三好大輔, 川内敬子

第 39 回 分子生物学会年会, パシフィコ横浜 2016/11

細胞の分子クラウディングによって誘起される核酸の構造多様性, 三好大輔

先端ケミカルバイオロジー研究会, 京都大学物質-細胞統合システム拠点, 2016/6 (招待講演)

〔図書〕(計 1 件)

Chapter 6. Assays for Telomerase Activity toward Applications of Cancer Diagnosis G-Quadruplex Structures, Formation and Role in Biology Hidenobu Yaku, Daisuke Miyoshi Nova Science Publishers (2016). ISBN: 978-1-63485-550-1

〔その他〕

報道関連等: 2018 年 6 月 11 日に記者会見を行い 2018 年 6 月 11 日~20 日ごろの朝日新聞、毎日新聞、産経新聞、日本経済新聞、

日刊工業新聞、神戸新聞、The Japan Times、等国内外の新聞紙で研究成果が紹介された
<https://www.asahi.com/articles/ASL6C6THPL6CPLBJ003.html>

<https://mainichi.jp/articles/20180612/k00/0m/040/152000c>

<https://www.sankei.com/west/news/180611/wst1806110063-n1.html>

<https://www.nikkei.com/article/DGXMZO3166076012062018CR8000/>

<https://www.nikkan.co.jp/articles/view/00476939>

<https://www.kobe-np.co.jp/news/iryuu/201806/0011344595.shtml>

<https://www.japantimes.co.jp/news/2018/06/18/national/science-health/konan-university-team-effectively-curbs-production-cancer-linked-protein/#.WyyXkaf7QuU>

等他多数

研究成果を社会に向けて発信した核酸の高次構造を標的にする機能性分子の医療展開, 三好大輔

神戸医療産業都市クラスター交流会, 甲南大学, 2017/7

研究成果を社会に向けて発信した核酸の高次構造を標的とした新しい機能性分子の開発 ~医薬品、イメージング、機能性食品~, 三好大輔

メディカル ジャパン 2017 大阪 関西広域連合研究成果企業化促進セミナー, インテックス大阪, 2017/2

報道関連等: Web site 「BIO IMPACT」で研究成果が紹介された

<http://bioimpact.jp/news/detail/459904>

報道関係等: 神戸新聞で研究成果が紹介された

2016 年 6 月 11 日神戸新聞

<http://www.kobe-np.co.jp/news/iryuu/201606/0009175660.shtml>

研究成果が王立化学会 Chem. Commun. 誌の表紙として掲載された

Issue 47, 2016

Chem. Commun., 2016, 52, 7411-7411

10.1039/C6CC90253G

研究代表者ホームページ

<http://www.pi.konan-u.ac.jp/miyoshi/>

研究代表者データベース

http://researchers.adm.konan-u.ac.jp/html/91_ja.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三好 大輔 (MIYOSHI, daisuke)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・教授
研究者番号：50388758

(2)研究分担者

川内 敬子 (KAWAUCHI, Keiko)
甲南大学・フロンティアサイエンス学部・講師
研究者番号：40434138