様　式　C－１９、F－１９－１、Z－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　元 年　　５ 月 ２２ 日現在

機関番号：１２５０１
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2017～2018
課題番号：１７K１９４７５

研究課題名（和文）難治性がん克服に向けた転写リプログラミング核酸医薬創成コンセプトの確立

研究課題名（英文）Development of cancer suicide gene therapy using RNA trans-splicing technology

研究代表者
降幡　知巳（Furihata, Tomomi）

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：８０４０１００８

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、がん治療のための転写リプログラミング核酸医薬の開発を目的とした。まず、治療用核酸を構築しヒト大腸がん細胞に発現させたところ、優れた抗がん活性が認められた。さらに、この核酸医薬を細胞内に導入するため、新規脂質素材による非ウイルス型ナノ粒子も設計した。したがって、これらを基に構築される転写リプログラミング核酸医薬は、難治性がんに対する新たな治療オプションとなることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義
最新科学を持ってしても未だ治療が困難ながん種は多く、がん死亡数も年々増加傾向にある。これに対し転写リプログラミング核酸医薬は、その効果ががん特異的に発揮されること等従来治療法とは異なる特徴を有し、さらに従来薬抵抗性の難治性がんに対する効果も期待される。したがって本研究成果は、転写リプログラミング核酸医薬開発の礎としてその更なる研究を促し、ひいては難治性がんの克服に貢献する治療法の開発に貢献するものと期待される。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to develop a cancer gene therapy using RNA trans-splicing technology. We have constructed the therapeutic gene by combining the herpes simplex virus thymidine kinase gene with an RNA trans-splicing molecule targeting cancer-type organic anion transporting polypeptide 1B3. When introduced into human colon cancer cells, the therapeutic gene shows remarkable anti-cancer effects. We have also develop ssPalm-based lipid nanoparticles as a tool for delivery of the therapeutic gene into cancer cells. Collectively, our new cancer gene therapy with RNA trans-splicing technology and ssPalm-based gene delivery system has the potential to become a promising therapeutic option to fight against various cancer types.

研究分野：薬物動態学

キーワード：がん分子標的　核酸医薬　ドラッグデリバリー

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９、ＣＫ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

がん型 organic anion transporting polypeptide 1B3（がん型 1B3）は、肝細胞特異的に発現する OATP1B3 の mRNA バリアントであり、これまでにヒト大腸がん組織・隣接正常組織検体を用いた解析から、がん組織特異的に発現することが明らかとなっている。また大腸がん以外にも肺がん、膵臓がん、食道がん、グリオーマなど種々の難治性がん細胞においてもがん型 1B3 の発現が認められている。したがって、がん型 1B3 は幅広いがんに対する治療標的分子であると考えられる。

一方、転写リプログラミング核酸医薬は、従来、遺伝性希少疾患の治療に向けた開発がなされてきたが、近年ではそのがん治療への応用も期待されている。転写リプログラミング核酸医薬の一つに spliceosome-mediated RNA trans-splicing を生じる RNA trans-splicing molecule (RTM) を用いるものがある。RTM は異なる mRNA 前駆体間におけるスプライシング（トランススプライシング）を引き起こし、標的遺伝子と導入遺伝子の融合 mRNA を産生させる。導入遺伝子として herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-tk)を用いた場合には、RTM により標的遺伝子と HSV-tk が融合し、活性を有する融合 HSV-tk タンパク質が発現する。ついでガンシクロビル（GCV）を作用させることにより、殺細胞効果が認められる。ここで、標的遺伝子としてがん型 1B3 を用いることにより、がん型 1B3 発現細胞特異的な細胞毒性を得ることが可能となる。

転写リプログラミング核酸医薬をがん細胞に導入するには、遺伝子の細胞導入ベクターが必要である。このようなベクターとして、本研究では SS-cleavable pH-activated lipid-like material (ssPalm) に着目した。ssPalm 分子は親水性アミン頭部をもち、2 本の脂溶性足場構造がジスルフィド結合によって接続された脂質様物質である。ssPalm はその脂溶性足場構造によりリポソームを形成し、内部に核酸を封入することができる。ssPalm の特徴はエンドソーム膜破壊能と細胞内での粒子自己崩壊能であり、これらにより効果的に核酸を細胞内に放出できる。したがって、ssPalm を用いることにより、安全かつ効率的にがん細胞へ転写リプログラミング核酸医薬を送達させることが可能となると期待される。

２．研究の目的

本研究では、がん型 1B3 を標的とする RTM を開発し、それを効率的にがん細胞に送達できる ssPalm ナノ粒子を設計することにより、難治性がんに有効な転写リプログラミング核酸医薬の創成基盤を確立することを目的とする。

３．研究の方法

（１）がん型 1B3 標的転写リプログラミング核酸医薬の構築

がん型 1B3 を標的とするトランススプライシング誘発核酸配列は、がん型 1B3 のイントロン１領域より同定した。まず一次スクリーニングでは、本領域をライブラリー化し、各配列のトランススプライシング活性を split green fluorescent protein system を用いて網羅的に解析した。次に、候補群を対象に、がん型 1B3 遺伝子のイントロン領域を導入しておいた human embryonic kidney (HEK)293 細胞を用いて、がん型 1B3 遺伝子に対するトランススプライシング活性をスクリーニングした。最も高い活性を示した配列を HSV/tk 遺伝子を有するプラスミドに導入することによりがん型 1B3 標的転写リプログラミング核酸医薬を構築した。以降、これを RTM44 とする。また、対照として、部位特異的遺伝子変異導入法により転写リプログラミング活性を失活させた RTM44 も構築した（RTM44mut）。

（２）がん型 1B3 標的転写リプログラミング核酸医薬の効果検証

RTM44 または RTM44mut をがん型 1B3 陽性ヒト大腸がん LS180 細胞または SW480 細胞に安定的に導入した。これら細胞を RTM44/LS180、RTM44mut/LS180 および RTM44/SW480 とする。なお、LS180 細胞と SW480 細胞はそれぞれがん型 1B3 発現陽性・陰性細胞である。これら細胞におけるがん型 1B3 と HSV-tk の融合 mRNA およびタンパク質の発現は、reverse transcription-PCR 法およびウエスタンブロッティング法により解析した。これら細胞に対する RTM44 の効果は、GCV 曝露（0.001、0.01、0.1、1、10、および 100 µM）による細胞毒性試験（WST-8 アッセイ）により検証した。対照には溶媒であるジメチルスルホキシド（DMSO、0.5%）を用いた。これら化合物の曝露時間は 96 時間とした。

また、RTM44/LS180 および RTM44mut/LS180 をヌードマウスに移植し、大腸がんモデルマウスを作成した。このマウスに GCV（100 mg/kg/day）または Phosphate-buffered saline (PBS)を１日１回１４日間腹腔投与し、経時的に腫瘍体積を推算することで、*in vivo* における RTM44 の効果を検証した。各マウスの腫瘍組織内におけるがん細胞のアポトーシスは TdT-mediated dUTP nick-end labeling(TUNEL)法により検出した。

（３）がん細胞/組織への遺伝子送達活性に優れた ssPalm ナノ粒子設計

ssPalm 粒子の調製・導入条件（ssPalm 分子種、脂質組成比、脂質/封入核酸比および封入核酸添加量）は、ルシフェラーゼ（Luc）遺伝子を封入した粒子をヒト食道がん TE14 細胞に導入し、その後 72 時間の累積発光強度を評価することで最適化した。ssPalm による核酸導入の細胞間差を検討するため、ヒトグリオーマ由来細胞株 AM-38、ヒト大腸がん由来細胞株 LS180 を用いて同様の検討を行った。

また、マウス CT26 細胞を BALB/c マウスに移植して担癌マウスを作成し、上記で最適化した Luc 封入 ssPalm 粒子を腫瘍内に 2 μg/25 μL/mouse の条件で投与した。その 120 時間後、ルシフェリン（3 mg）を腹腔内投与し、in vivo luciferase imaging system（IVIS）を用いて Luc の腫瘍内発現を解析することにより、ナノ粒子のがん組織への核酸送達能を検証した。

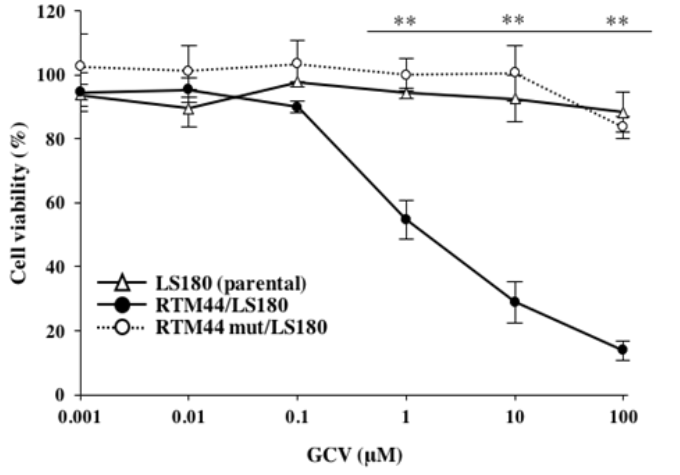

図１. *In vitro* におけるRTM44の抗腫瘍効果解析.
RTM44/LS180、RTM44mut/LS180、親 LS180細胞に GCV（0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 or 100 μM）または0.5% DMSOを96時間曝露した．細胞毒性はDMSO曝露時を100%とした際の相対細胞生存率で評価した．統計解析はTukey-Kramer test により行った（**、$P < 0.01$）．

４．研究成果

（１）がん型 1B3 のイントロン１ライブラリーに対する一次スクリーニングを行ったところ、トランススプライシング活性を有する三種の配列が同定された。続いてこれら三種の配列を対象に、がん型 1B3 遺伝子に対するトランススプライシング活性を定量的 PCR 法により評価し、最もその活性が高い配列を同定し、RTM44 とした。

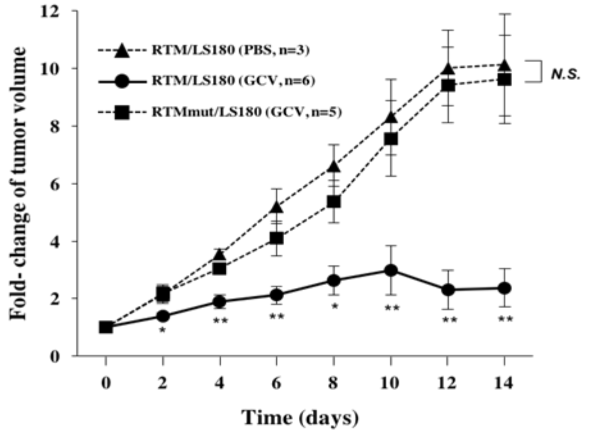

図２. *In vivo* におけるRTM44の抗腫瘍効果解析.
RTM/LS180 または RTMmut/LS180 による担癌マウスに GCV（100mg/kg/day）または生理食塩水（PBS）を14日間投与した．グラフは初回投与直前腫瘍体積に対する相対腫瘍増大比を示す．統計解析はTukey-Kramer test により行った（*、$P < 0.05$ **、$P < 0.01$, *N.S.*、not significant）．

（２）そこで RTM44 または RTM44mut を安定的に導入した RTM44/LS180 細胞および RTM44mut/LS180 細胞を用いて、それらの抗がん活性の検証を行った。また、これらの親 LS180 細胞も比較として用いた。まず、RTM44/LS180 細胞および RTM44mut/LS180 細胞における mRNA およびタンパク質発現解析を行ったところ、がん型 1B3 mRNA と HSV-tk mRNA の融合 mRNA、およびタンパク質の発現が認められた。一方、これらの融合遺伝子産物の発現は RTM44mut/LS180 細胞では認められなかった。がん型 1B3 mRNA 陰性の SW480 細胞および RTM44/SW480 細胞を用いて同様の解析も行ったが、これら細胞では融合 mRNA の発現は認められなかった。

次に、これら細胞に GCV または DMSO を曝露したところ、図１に示すとおり、RTM44/LS180 細胞に GCV を曝露した群では DMSO 曝露群と比べ強い細胞毒性が認められたが、RTM44mut/LS180 細胞や親 LS180 細胞ではいずれの群でも細胞毒性は認められなかった。また、RTM44/SW480

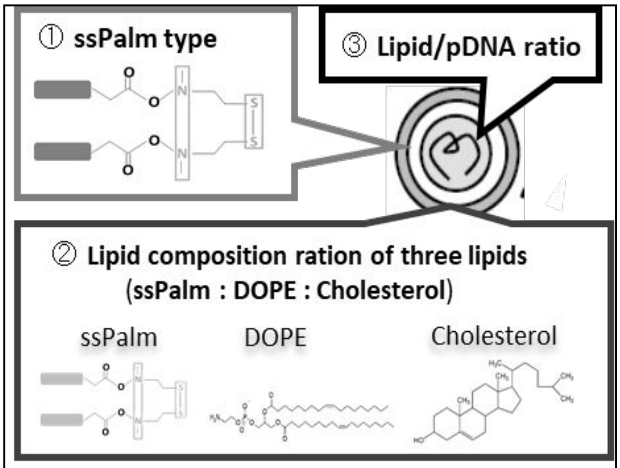

図３. ssPaLmの模式図と最適化項目
ssPalmは脂質様素材であり、DOPEやコレステロールなどのヘルパー脂質とナノ粒子を形成する．①－③は最適化項目を示す．

細胞でもGCV曝露による細胞毒性は認められなかった。したがって、GCVによる細胞毒性は、融合遺伝子の発現に依存していると考えられた。

そこで次にRTM44/LS180またはRTM44mut/LS180担がんマウスを作成し、これらマウスにGCVまたは生理食塩水（PBS）を投与した。その結果、GCVを投与したRTM44/LS180担がんマウスにおいて、腫瘍成長抑制効果（抗腫瘍効果）が認められた（図２）。この効果が認められたマウスの残存腫瘍部を摘出し、TUNEL法を行ったところ、多くのアポトーシス陽性細胞が検出された。一方、PBSを投与したRTM44/LS180担がんマウスおよびGCVを投与したRTM44mut/LS180担がんマウスでは、抗腫瘍効果は認められなかった。

（３）一方、核酸医薬開発と並行して、核酸をがん細胞へと送達するためのssPalmナノ粒子構築にも取り組んだ。

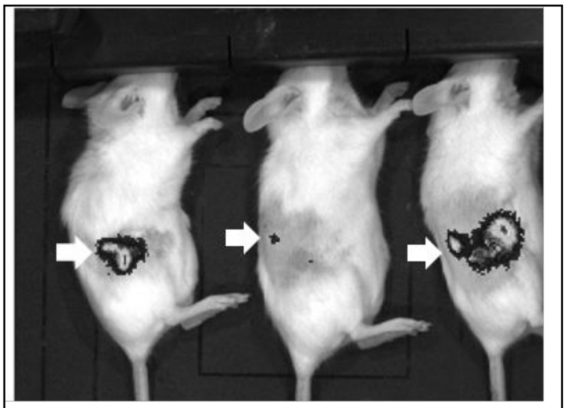

図４．ssPal.mナノ粒子によるがん組織への*in vivo*核酸送達
CT26細胞をBalb/cマウスに移植し、担癌マウスを作成した．腫瘍が50 mm^{3}に達した所でルシフェラーゼ遺伝子を封入したssPalmナノ粒子を腫瘍内投与し、その120時間後にルシフェリンを腹腔内投与し、IVISによりルシフェラーゼ遺伝子の発現解析をおこなった（矢印がその発現を示す）．

まず、ヒト食道がんTE14細胞を用い、この細胞への遺伝子導入に最適なssPalm粒子の調製・導入条件を検討した。ssPalm分子種・脂質組成比・脂質/pDNA比のスクリーニングをおこない、それぞれの最適値を同定した（図３）。続いて、細胞への核酸導入能を明らかとするため、最適化した粒子とLipofectamine3000（市販の遺伝子導入試薬）を用いてLucプラスミドをTE14細胞に導入し、その発光強度を比較した。その結果、ssPalm粒子はLipofectamine3000の２倍以上の発光強度を示した。また、他のがん細胞に対するssPalm粒子の核酸送達能を解析するため、２種類のがん細胞を追加して同様の解析を行った。Luc発光強度を比較したところ、ヒトグリオーマ由来細胞株AM-38においてTE14細胞以上の、ヒト大腸がん由来細胞株LS180においてTE14細胞と同程度の発光強度が認められた。

次に、ssPalmナノ粒子の*in vivo*核酸がん組織送達能を解析するため、マウス大腸がんCT26細胞による担癌マウスを作成した。このマウスの腫瘍部にLucプラスミドを封入したssPalmナノ粒子を直接投与したところ、投与後120-160時間をピークに腫瘍内でLucの発現が認められた（図４）。

以上、本研究では、がん型1B3遺伝子に対して特異的なトランススプライシングを誘発する核酸配列RTM44を同定した。さらに*in vitro*および*in vivo*におけるRTM44の抗がん活性の検証の結果、RTM44はトランススプライシング依存的かつGCV依存的に抗がん活性を有することが明らかとなった。また、本研究では、がん細胞への核酸送達に優れたssPalmナノ粒子を設計した。本ssPalmナノ粒子は、ヒト大腸がん、食道がん、グリオーマに対して高効率に核酸を送達することが可能であり、さらに、本粒子は*in vivo*においても核酸をがん組織へと送達させることが可能であることが明らかとなった。これら成果はがん型1B3標的転写リプログラミング核酸医薬創成に向けた基盤であり、今後、これらをさらに改良・発展させていくことにより、難治性がんに対して有効な治療法の開発につながることが期待される。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　1　件）

1. Sun Y, Hofbauer JP, Harada M, Wöss K, Koller U, Morio H, Stierschneider A, Kitamura K, Hashimoto M, Chiba K, Akita H, Anzai N, Reichelt J, Bauer JW, Guttmann-Gruber C, Furihata T. Cancer-type organic anion transporting polypeptide 1B3 is a target for cancer suicide gene therapy using RNA trans-splicing technology. 2018, 433:107-116. doi: 10.1016/j.canlet.2018.06.032. 査読有

〔学会発表〕（計　5　件）

1. Hanae Morio, Yuchen Sun, Manami Harada, Ulrich Koller, Anna Stierschneider, Josefina Piñón Hofbauer, Christina Gruber, Hidetaka Akita, Naohiko Anzai, Kan Chiba, Tomomi Furihata. Cancer-type organic anion transporting polypeptide 1B3 is a promising target for spliceosome-mediated RNA trans-splicing based suicide gene therapy. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology （2018年）

2. 森尾花恵、安西尚彦、降幡知巳．がん特異的遺伝子 Cancer-type OATP1B3 標的型 RNA trans-splicing 分子によるがん遺伝子治療の基盤構築．第 76 回日本癌学会学術総会（2017 年）

3. 降幡知巳、孫雨晨、原田まなみ、Hofbauer P Josefina，Gruber Christina、秋田英万、安西尚彦．がん特異的遺伝子産物 cancer-type OATP1B3 を標的とした分子標的遺伝子治療法開発．日本がん分子標的治療学会 第１回シーズ・ニーズ(SN)ワークショップ（2017 年）

4. 森尾花恵、降幡知巳、孫雨晨、原田まなみ、秋田英万、Ulrich Koller、Anna Stierschneider、Josefina Pion Hofbauer、Christina Gruber、千葉寛、安西尚彦．がん特異的遺伝子 Cancer-type OATP1B3 標的型 RNA trans-splicing 分子によるがん遺伝子治療の基盤構築．第 136 回日本薬理学会関東部会 （2017 年）

5. 井手秀行、孫雨晨、原田まなみ、森尾花恵、秋田英万、Ulrich Koller、Anna Stierschneider、Josefina Pion Hofbauer、ChristinaGruber、千葉寛、安西尚彦、降幡知巳．がん特異的遺伝子 Cancer-type OATP1B3 を標的とした RNA trans-splicing 分子によるがん自殺遺伝子治療の基盤確立．2017 年度生命科学系学会合同年次大会 （2017 年）

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計　0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：　秋田　英万
ローマ字氏名：　　Akita Hidetaka
所属研究機関名：　千葉大学
部局名：　大学院薬学研究院
職名：　　教授
研究者番号（8 桁）：80344472

(2)研究協力者
研究協力者氏名：金田　篤志
ローマ字氏名：　Kaneda　Atsushi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。