

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21629

研究課題名（和文）高機能性人工核酸を用いたアンチセンス核酸医薬による革新的消化器系癌創薬研究

研究課題名（英文）Development of amido-bridged nucleic acid-modified antisense oligonucleotides to treat gastrointestinal malignancies

研究代表者

神田 光郎（KANDA, Mitsuro）

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：00644668

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）： 予後不良な転移・再発性消化器癌に対するアンチセンス核酸医薬を用いた新規治療薬開発を目的とした。Transcriptome解析を経て癌転移を司る候補分子としてCSRNP3、CPLX1、RNFT2を厳選し、これらに重点を置いてデータ構築した。mRNA二次構造予測システムを用いてデザインしたアンチセンス核酸は、癌種横断的な癌細胞増殖能抑制効果を示した。CSRNP3に対するアンチセンス核酸は、マウス腹膜播種モデルで腫瘍進展を抑制した。CSRNP3ノックダウンによりシスプラチンの抗腫瘍効果が増強した。これら分子の組織中発現度は、胃癌症例の生存期間や転移再発率に相関していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で解析した標的分子群は、試験管内の細胞株でなく治療抵抗性を示した癌の臨床検体から見出したシードである。既存の治療法では制御できなかった状況を克服するための鍵となり得る分子であると考えている。また、悪性腫瘍と標的分子群を関連づける報告はこれまでに皆無であり、新規性が高く、既存の治療薬の標的と異なるため、新しい作用機序を有する治療薬となることが期待される。さらに、アンチセンス核酸医薬開発という明確な創薬コンセプトをもってデータ構築している。個別化治療において重要な、対象選別のためのコンパニオン診断技術の基盤となる発現データも取得した。

研究成果の概要（英文）： We aimed to develop novel therapeutic agents using antisense nucleic acid drugs for metastatic or recurrent gastrointestinal cancers. Through a transcriptome analysis, CSRNP3, CPLX1, and RNFT2 were selected as candidate molecules controlling cancer metastasis. The antisense nucleic acids designed with the secondary structure prediction system showed an inhibitory effects of cell proliferative potential in a variety type of cancers. Antisense nucleic acid against CSRNP3 inhibited tumor progression in mouse peritoneal metastasis models. Moreover, knockdown of CSRNP3 enhanced the antitumor effect of cisplatin in mouse subcutaneous tumor models. Tissue expression levels were correlated with survival and metastatic recurrence rates in patients with gastric cancer.

研究分野：消化器外科学

キーワード：消化器癌 Transcriptome解析 癌治療核酸医薬 高機能性人工核酸 アンチセンス核酸

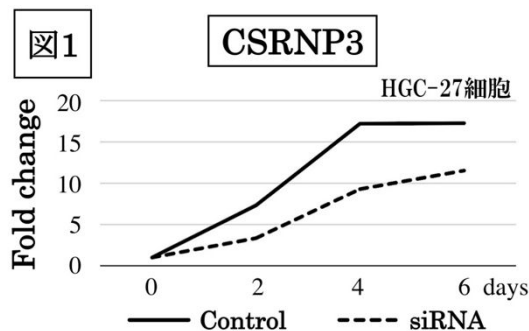
1. 研究開始当初の背景

切除不能・再発性消化器癌はいずれの癌種でも予後不良であり、更なる治療開発が求められている。多くの開発治験にもかかわらず未だに有効性を示す分子標的治療薬は限られており、別の作用機序から癌細胞を制御しうる薬剤の開発が必要である。また、低分子化合物の創薬ターゲット枯渇が叫ばれる中、新たな創薬手法として核酸医薬が近年注目を集めている。

我々は、難治性癌の特徴を司り、新たな治療標的となりうる分子を同定すべく、次世代シーケンサーによる Transcriptome 解析 (HiSeq, Illumina 社) を行った。57749 分子の網羅的発現解析結果をもとに、化学療法不応の転移・再発例の原発巣組織中で有意な発現増加を認める分子の中から核酸医薬での創薬標的候補となる条件を設定し、その全てを満たす候補分子を厳選した。

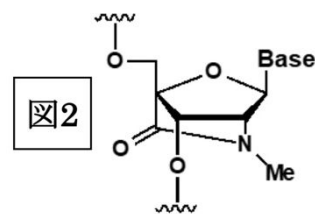
CSRNP3、CPLX1、RNFT2 の 3 分子について 21 種の胃癌細胞株での発現調査を経て、高発現株を対象に特異的 siRNA を用いてノックダウンしたところ、癌細胞増殖能が抑制された (図 1)。

これら結果から新規癌治療標的の有力な候補と考え、本研究構想について国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所創薬デザイン研究センターと協議し、アンチセンス核酸医薬開発研究を開始した。予備調査にていずれの候補分子に対してもアンチセンス核酸配列デザイン可能と判断

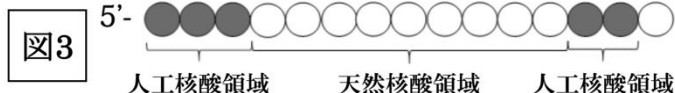


し、アクセス効率を最大化するために mRNA の二次構造予測システムを用いた配列デザインを開始した。自己相補的配列の回避でダイマー形成を防ぎつつ、マウス in vivo 試験で薬効の延長線上にみられる毒性評価を可能とするためマウスとのホモロジーも考慮する。さらに、肝毒性発現リスクが上昇することが知られているモチーフ (TCC/TGC) を回避するとともにオフターゲットを最小化する配列設計を行った。

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所創薬デザイン研究センターのアンチセンス核酸の特徴として、架橋型人工核酸 AmNA (図 2) を両端に導入すること (ギャップマー) により生体内での安定性 (ヌクレアーゼに対する耐性獲得) と標的分子との結合親和性を高めていることが挙げられる (図 3)。さらに、培地に CaCl₂ を添加するだけで特別なデリバリーキャリアがなくともアンチセンス核酸の活性を低濃度かつ短期間で引き出す CEM 法 (Ca²⁺ enrichment of medium 法) を



確立している。独自の人工核酸、CEM 法は他の siRNA などの核酸医薬アプローチに対して大きな優位性である。



2. 研究の目的

早期根治切除例の予後は期待できるものの、転移・再発性となるときわめて予後不良であることは、全ての消化器癌における共通かつ重大な問題点である。全身化学療法は分子標的治療薬を中心に徐々にラインナップを増やしているが、不応・耐性が治療成績の限界を産んでおり、全く別の作用機序を有するアプローチの開発が必要である。従来の低分子医薬や抗体医薬と異なり、アンチセンス核酸医薬は mRNA に相補的な配列をもつオリゴヌクレオチドを用いて特定の標的遺伝子のみを抑制し、疾病の原因タンパク質の発現自体を抑制することが可能であり、次世代の医薬として世界中で注目を集めている。我々は 2016 年より国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所創薬デザイン研究センターと共同研究体制を構築し、胃癌腹膜播種に特化したアンチセンス核酸医薬開発研究を行ってきた。その経験および方法論を発展させ、治療適応を拡大した創薬研究を立案した。

新たな治療標的分子を同定する目的で実施した Transcriptome 解析において転移・再発性胃癌組織中で有意な発現増加を認める分子のうち、(1) The Cancer Genome Atlas (TCGA) などの外部公開データで validation されること、(2) 複数の固形癌で高発現していること、(3) 癌における既報がないこと、(4) 生理的機能喪失が致死性と想定されないこと、(5) 安全性を意識し中枢神経/心での発現が豊富でないこと、(6) 当研究室の pilot data で siRNA でのノックダウンにより細胞増殖能抑制効果が確認できたこと、の全てを満たす標的候補分子を厳選した。本研究では、その中でも CSRNP3 (cysteine and serine rich nuclear protein 3)、CPLX1 (complexin 1)、RNFT2 (ring finger protein, transmembrane 2) の 3 分子に重点を置いてデータ構築した。これら標的に対する優れた阻害効果を有するアンチセンス核酸を創製し、革新的な効果を発揮

する癌治療核酸医薬を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 配列デザイン：国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所創薬デザイン研究センターでは、アクセス効率を最大化する mRNA の二次構造予測システムを確立している。標的分子に対して、候補配列を複数（5～15 配列）デザインし、合成した。
- (2) スクリーニング：アンチセンス核酸を CEM (Ca²⁺ enrichment of medium)法によりトランスフェクションし、標的分子のノックダウン効率を比較評価した。これに基づき、標的ごとに活性の高い配列を選抜した。
- (3) *in vitro* 実験：選抜配列を用いて、癌細胞株に対する細胞増殖阻害能を *in vitro* で調べた。
- (4) メカニズム解明：より有望な標的については、既存情報の少ない候補分子の生態・恒常性維持における役割を調べるため、ノックアウトマウスを樹立し胎生死の有無・成長等を観察した。薬効機序を明確にするために、候補分子阻害による種細胞機能および癌関連細胞内 signaling pathway 等の変化について調べた。
- (5) *in vivo* 実験：候補分子ノックダウンによる、マウス Xenograft モデルにおける造腫瘍能について検討した。
- (6) コンパニオン診断の開発：癌組織検体における標的分子の発現レベルを調べ、特に転移再発に着目しつつ臨床病理学的因子との相関性を解析した。

4. 研究成果

アンチセンス核酸配列デザイン：mRNA の二次構造予測システムを用いて、CSRNP3 に特異的な配列を 15、CPLX1 に特異的な配列を 5、RNFT2 に特異的な配列を 11 デザインし、合成した。

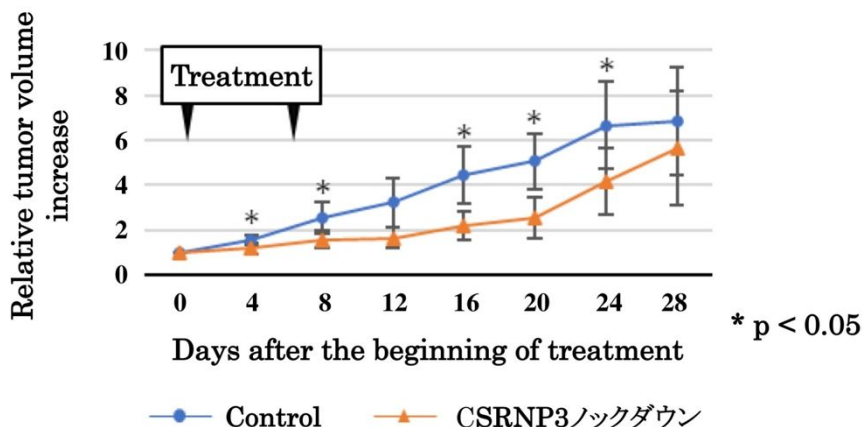
スクリーニング：これら候補アンチセンス核酸配列を CEM (Ca²⁺ enrichment of medium)法により胃癌細胞株にトランスフェクションし、標的分子のノックダウン効率をもとに有望配列を選抜した。

***in vitro* 実験**：選抜配列を用いて、癌細胞株に対する細胞増殖阻害能を *in vitro* で調べたところ、CSRNP3 に対する配列が胃癌細胞株 MKN1 の増殖能を有意に阻害した。CPLX1 に対する配列、RNFT2 に対する配列もそれぞれ胃癌細胞株の増殖能抑制効果を示したが、CSRNP3 に対するアンチセンス核酸に比して軽度であった。

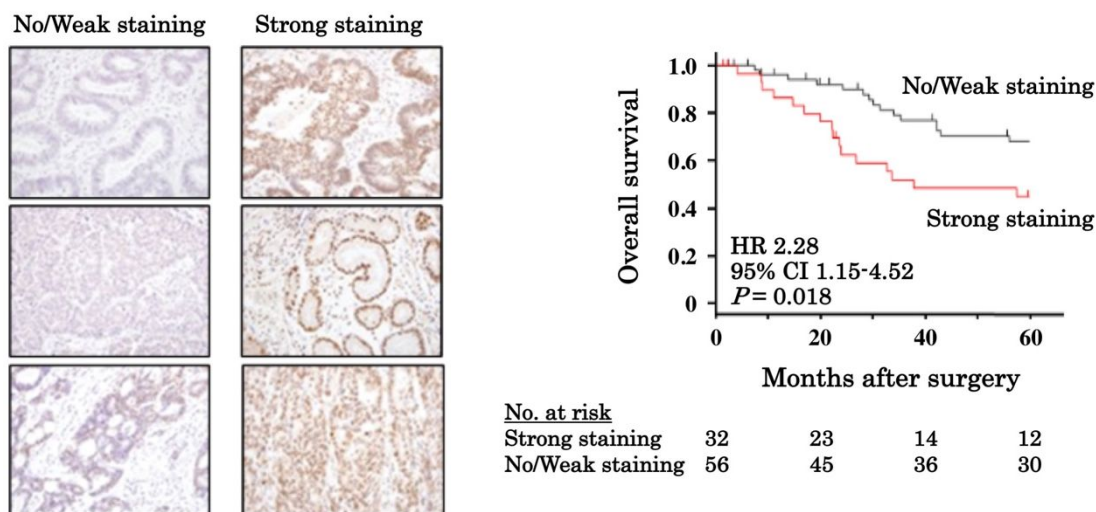
癌種横断的な評価：胃癌でのデータを拡大し、CSRNP3 に対するアンチセンス核酸の食道癌、膵癌、大腸癌、肝癌の細胞株に対する細胞増殖阻害能を *in vitro* で調べたところ、いずれも CSRNP3 高発現細胞株において増殖能阻害効果を発揮した。

機能解析：細胞増殖能以外の癌細胞機能の調節に CSRNP3 がどのように関与するかについても調査した。CSRNP3 のノックダウンによる癌細胞の浸潤能、遊走能は有意な変化を認めず、これら機能への関与は薄いものと考えられた。

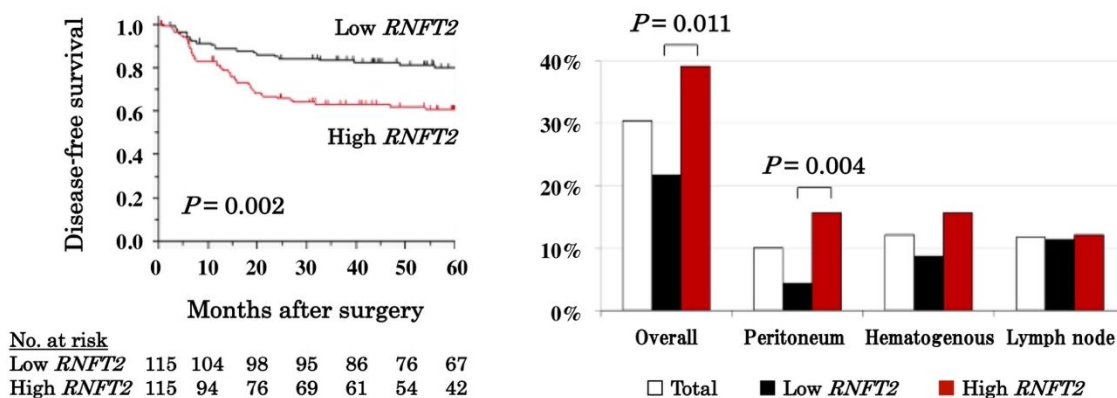
***in vivo* 実験**：CSRNP3 に対するアンチセンス核酸は、*in vivo* 腹膜播種モデルで腫瘍進展を抑制した。さらに、CSRNP3 は殺細胞性抗腫瘍薬の感受性を調節している可能性があり、マウス皮下腫瘍モデルにおいて CSRNP3 ノックダウンのシスプラチン感受性への影響を調査した。その結果、CSRNP3 をノックダウンするとシスプラチンによる抗腫瘍効果が増強されることが明らかとなった（下図）。



発現解析：300例の胃癌臨床検体を対象に胃癌組織中 CSRNP3 mRNA 発現量を調べたところ、いずれも転移性胃癌で有意に発現増加しており、網羅的解析データの再現性が確認された。さらに、免疫組織化学染色法で組織中 CSRNP3 タンパク発現レベルを調べたところ、高発現症例は有意に術後全生存期間が短縮していた（下図）。



ほか：CSRNP3 ノックアウトマウスは胎生死なく成長した。CSRNP3 と同時進行で実験を進めていた RNFT2、CPLX1 についても、その発現が消化器癌進展に関与することを発現解析、シグナル解析、ノックダウン実験によって明らかとしたため、英文論文化した（CPLX1 も投稿済み）。特に RNFT2 の組織中発現は治癒切除術後の早期再発および腹膜播種の発生に強い相関性を示した（下図）。



これらの成果により、新しい消化器癌横断的なバイオマーカーおよび治療標的分子が提案された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masahiro Sasahara, Mitsuro Kanda, Dai Shimizu, Chie Tanaka, Yoshikuni Inokawa, Norifumi Hattori, Masamichi Hayashi, Goro Nakayama, Yasuhiro Kodera	4. 巻 41
2. 論文標題 Tissue RNFT2 Expression Levels Are Associated With Peritoneal Recurrence and Poor Prognosis in Gastric Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 609-617
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.14812	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村俊介, 神田光郎, 清水 大, 服部憲史, 林 真路, 田中千恵, 中山吾郎, 小池聖彦, 藤原道隆, 小寺泰弘
2. 発表標題 胃癌化学療法抵抗性遺伝子CSRNP3の機能解析と治療効果予測バイオマーカーとしての意義
3. 学会等名 第19回消化器外科学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村俊介, 神田光郎, 清水 大, 林 真路, 田中千恵, 中山吾郎, 小池聖彦, 藤原道隆, 小寺泰弘
2. 発表標題 胃癌化学療法抵抗性遺伝子CSRNP3の機能解析と治療効果予測バイオマーカーとしての意義の検討
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中村俊介, 神田光郎, 田中千恵, 清水 大, 猪川祥邦, 高見秀樹, 服部憲史, 林 真路, 中山吾郎, 小池聖彦, 藤原道隆, 小寺泰弘
2. 発表標題 胃癌化学療法耐性遺伝子CSRNP3の機能解析と臨床的意義の検討
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小比賀 聡 (OBIKA Satoshi) (80243252)	大阪大学・薬学研究科・教授 (14401)	
研究分担者	笠原 勇矢 (KASAHARA Yuya) (10740673)	国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・サブプロジェクトリーダー (84420)	
研究分担者	清水 大 (SHIMIZU Dai) (50723037)	名古屋大学・医学部附属病院・助教 (13901)	
研究分担者	田中 千恵 (TANAKA Chie) (50589786)	名古屋大学・医学部附属病院・講師 (13901)	
研究分担者	小寺 泰弘 (KODERA Yasuhiro) (10345879)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------