

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08724

研究課題名(和文) CA19-9を標的とした共有結合DNAアプタマーによる膵癌新規治療法の開発

研究課題名(英文) 000

研究代表者

中村 透 (Nakamura, Toru)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：70645796

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：CA19-9を標的とした共有結合DNAアプタマーを検討したが、糖鎖抗原のheterogeneityが高く検討困難であった。そこでMUC1バリエーション(MUC1/Y)を標的とし、膵癌細胞の発現を確認し、既報のMUC1/Yアプタマー(S11b)を使用した。S11bはMUC1/Yの発現に応じた取り込みを示した。次S11bとsiRNAを結合したDNA aptamer-siRNAを構築し、K-ras抑制したが、十分な効果を示さなかった。未修飾アプタマーはヌクレアーゼで消化され効果が不安定であった可能性を考慮し、様々な修飾を試した。しかし共有結合修飾は修飾自体確認できず、PS修飾は非特異的な効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は細胞表面分子を標識とし、選択的なDNAアプタマーによる癌細胞への核酸阻害剤の取り込みによる新規治療薬開発である。MUC1/Yが膵癌細胞に特異的に発現していることが確認され、またMUC1/Yに対するアプタマーにより細胞内への取り込みが可能であることを確認できた。残念ながらその不安定性から細胞増殖抑制には至らなかったが、DNAアプタマーの不安定性や、PS修飾が非特異的に細胞障害を引き起こすこと、共有結合修飾の適切な評価方法が必要など、問題点が明らかとなった。また本アプローチは癌表面マーカーの選択や発現抑制遺伝子の選択など幅広い可能性があり、今後の治療薬開発の可能性を広げた。

研究成果の概要(英文)：We investigated a covalent DNA aptamer targeting CA19-9, but the heterogeneity of the carbohydrate antigen made it difficult to investigate. Therefore, we targeted the MUC1 variant (MUC1/Y), confirmed its expression in pancreatic cancer cells, and used the previously reported MUC1/Y aptamer (S11b). S11b showed uptake in response to MUC1/Y expression. Next, we constructed a DNA aptamer-siRNA that combined S11b and siRNA to suppress K-ras, but it did not show sufficient effects. Considering the possibility that the unmodified aptamer was digested by nuclease and its effect was unstable, we tried various modifications. However, covalent modification itself could not be confirmed, and PS modification showed nonspecific effects.

研究分野：膵臓外科、膵臓癌研究、肝胆膵外科、消化器外科

キーワード：膵癌 CA19-9 DNAアプタマー

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CA19-9 は膵癌細胞表面の糖鎖抗原で腫瘍マーカーとして頻用され、膵癌の診断ならびに再発や病状進行のサロゲートマーカーとして有用である。しかし CA19-9 自体の癌細胞での役割は解明されておらず、最近 CA19-9 は fibulin-3 蛋白を介して EGFR から MAPK 経路と関連し、膵癌の増殖・浸潤能を促進することが示された (Science.2019;364:1156-62)。また CA19-9 高発現の状態は変異型 K-Ras と共同し悪性度に関連することも示された。一方、DNA アプタマーは細胞表面のレセプターや糖鎖抗原などを標的として結合が可能で、核酸医薬として注目されている。DNA アプタマーは、簡便に合成でき、組織浸透性が高く、免疫原性が低く、人に投与可能である。既に細胞表面抗原の CEA、CA19-9、CA125 といった細胞表面分子に選択的に結合できる DNA アプタマーが研究開発されている (Anal Biochem.2018;561-562:89-95)。

2. 研究の目的

細胞表面の糖鎖抗原である CA19-9 を標的として膵癌細胞に siRNA を選択的に導入する共有結合 DNA アプタマー (Covalently-binding DNA aptamer-siRNA: CDA-si) を開発し、*K-ras*^{G12D} 遺伝子および *fibulin-3* 遺伝子発現を抑制し、膵癌増殖抑制効果を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1. CA19-9 を標的とした共有結合 DNA アプタマーの開発

CA19-9 を標的とした DNA アプタマー配列 (Anal Biochem.2018;561-562:89-95) を骨格とし、結合力を高める共有結合を付加する。

共有結合の修飾は、T 残基を Int-Octadynyl-dU で置き換え、銅触媒によるアジド-アルキン付加を用い、S₀2F 反応性コアを付加する。T 残基修飾の配置で立体構造が変化し蛋白結合を阻害する可能性があるため、配置の検討が重要となる (図1)。

既報の CA19-9 特異的アプタマー配列は 40 mer で、T4、T18、T21、T27、T30 および T39 の T 残基を修飾変更した 6 種を作成する。先行研究で CA19-9 特異的アプタマーは約 20 nM で 20% 程度の結合率を得ている (図2)。本実験は共有結合を付加し結合力を増強する。6 種のアプタマーは、まず circular dichroism 法でスクリーニングし折り畳み構造

に変化がないことを確認する。選別した DNA アプタマーを蛍光標識し、膵癌細胞株で発現した CA19-9 への結合をフローサイトメトリーで確認する。同時に cell lysate の Western blot で細胞内でのアプタマーの CA19-9 への共有結合を確認する。

2. DNA aptamer-siRNA を用いた遺伝子発現抑制の検討

Kras^{G12D} および *fibulin-3* をターゲットとした各 siRNA をデザインし、膵癌細胞株で Knock down 効果を検討し最適な配列を同定する。

方法1で作成した CA19-9 targeting DNA アプタマーと siRNA のキメラ (CA19-9-DNA

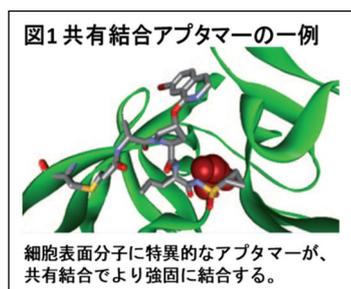
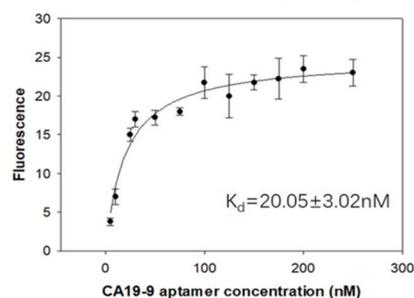
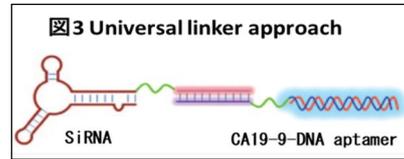


図2 CA19-9 アプタマーの結合能評価



aptamer-siRNA) を“sticky-bridge” universal linker approachで作成する。既報 (Kruspe, Biomedicine.2017;5:45)に従い、DNA アプタマーの5'側にsiRNA配列の UU末端とアニール結合する(図3)。



CA19-9-DNA aptamer-siRNAを膵癌細胞株に投与

し、各蛋白発現をWestern blotで、細胞増殖抑制効果をMTTアッセイで、評価する。その際、EGFRのリン酸化をY1068, Y1148,で、focal adhesion kinaseのリン酸化をY397でそれぞれ標的とした蛍光抗体を用いて評価する。CA19-9-DNA aptamer-siRNAの選択性はCA19-9陰性細胞で評価する。

Kras^{G12D}および*fibulin-3*に対するDNA aptamer-siRNAの同時投与も検討し、in vivo 実験に進む

3. DNA aptamer-siRNA を用いたヒト膵癌同所移植モデルマウス実験

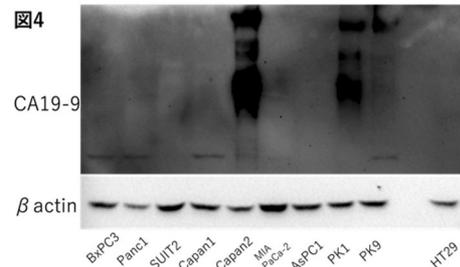
ヒト膵癌細胞株の同所移植モデルマウスを作成し、CA19-9-DNA aptamer-siRNA を ip または iv 投与の後、腫瘍内の取り込み率を蛍光顕微鏡で評価する。

同モデルマウスにおける腫瘍縮小効果を検証し、*Kras*^{G12D}および*fibulin-3* 遺伝子の Knock down 効果ならびに各蛋白発現を Realtime-PCR と免疫染色で評価する。

4. 研究成果

【結果】1. CA19-9 を標的とした共有結合 DNA アプタマーの開発

膵癌細胞株における細胞表面糖鎖抗原 CA19-9 の発現を CA19-9 monoclonal antibody (Thermo Fisher) を用い Western blot (WB) で検討した。結果 CA19-9 のバンドはブロードであり、細胞株によって、細胞表面糖鎖の配列が異なり heterogeneity が高いことが理由として挙げられた(図 4)。共有結合 DNA アプタマーの開発には共有結合を示すバンドシフトの検出が必要のため、CA19-9 での実験の遂行はさらなる検討が必要であった。そこで、シングルバンドで検出され、Aptamer が論文で既に報告されている膜タンパクである MUC1 isoform (MUC1/Y) をターゲットとして追加し並行して実験することとした。



【結果】2. MUC1/Y を標的とした共有結合 DNA アプタマーの開発

MUC1/Y は MUC1 のスプライシングバリエーションで、7 exon のうち exon2 の一部を欠損し、腫瘍細胞でのみ発現し、シグナル伝達に関与し発癌に寄与し、既に MUC1/Y に結合する DNA Aptamer (S11b) の配列が報告されている (Huma Khan, et al, Pharmaceuticals;2021,13 (8) 1239)。

MUC1/Y の膵癌細胞株での発現状況 (WB)

PK1, PK9, AsPC1, MIA PaCa-2, SUI2, Capan2, Capan1 が発現亢進、BxPC3 と Panc1 のみが低下していた(図 5)。細胞免疫染色では Capan1 が最も良好に発現していた(図 6)。取り込み実験を含めた Aptamer 実験では Capan1 を positive control に BxPC3 を negative control とした。

MUC1/Y アプタマー (S11b) の膵癌細胞における選択的核酸を取り込み実験

Aptamer S11b の 5' 末端に Cy3 の蛍光分子を修飾した蛍光 Aptamer を使用し評価した(図 7)。Capan1 は 7 割程度の細胞内取り込みを示し、BxPC3 はほとんど取り込みを認めなかった。

S11b と siRNA を結合した DNA aptamer-siRNA による *K-ras*^{G12D} 遺伝子発現抑制実験

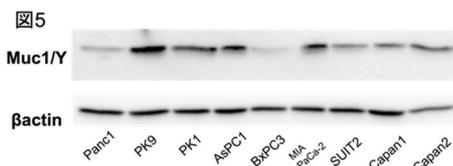
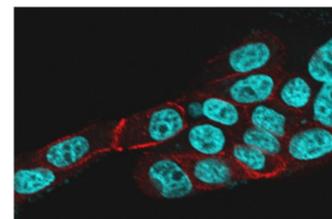
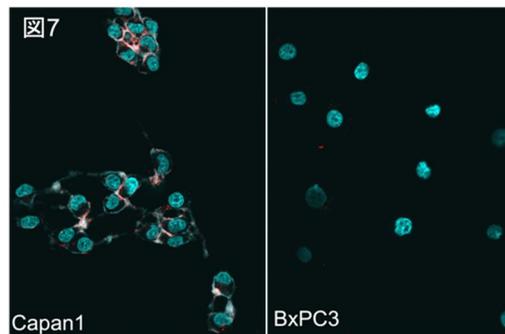


図6 CAPAN-1 (400倍)

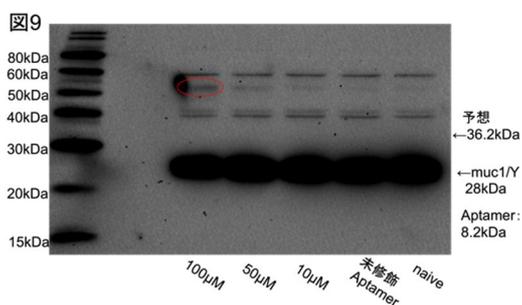
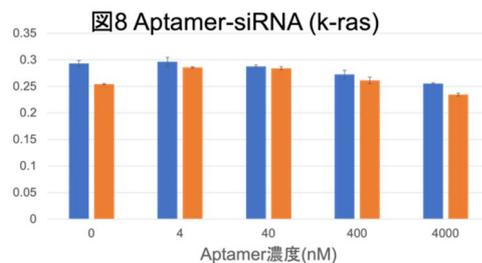


を組み合わせた S11b DNA-Aptamer-siRNA を作成。Aptamer-siRNA の sense 鎖、antisense 鎖をアニーリングし、膀胱癌細胞での抑制効果を検討した。Capan-1 細胞に対し、Aptamer + siRNA(kras)では kras のノックダウン効果も乏しく、細胞増殖抑制効果も乏しい結果であった(図 8)。未修飾の Aptamer ではヌクレアーゼで消化されるため不安定性による効果減弱の可能性を考慮し、次に安定した DNA アプタマーの作成を行った。



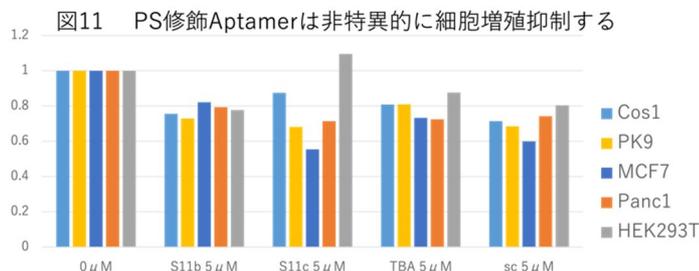
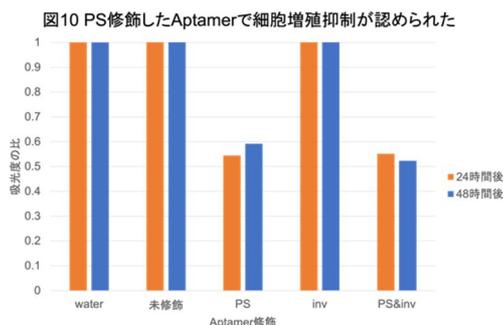
共有結合アプタマーの作成

共有結合修飾は、T 残基を Int-Octadynyl-dU で置き換え、銅触媒によるアジド-アルキンによる S02F 反応性コアを付加する。5'-GGCAACATACTGTAAAGCTCAGGAC-3' T8, T19, T8/19 に warhead を導入した。共有結合によるバンドシフトを確認したが、予想していた箇所への band shift を確認できなかった(図 9)。抗体と Aptamer が結合する箇所が共通であることが原因で band を確認できなかった可能性が考えられるため、Aptamer が結合しないと思われる C 末端に mic タグを付けた muc1/Y タンパクを作成し、抗 myc tag 抗体を用いたウェスタンブロットで band shift を確認した。MUC1/Y myc-his の DNA 配列を vector(pcDNA3.1)に組み込み HEK293T にトランスフェクションさせ WB を行った。しかし、28kDa 以外のバンドが多数出現してしまい、これ以上の検討は困難であると判断した。そこで、DNA アプタマーの他の修飾による安定化を試みた。



S11b PS 修飾を行なったアプタマーの検討

PS 修飾、invert T, PS 修飾+invert T の 3 種類の安定性を持たせたアプタマーを作成し、細胞増殖抑制効果を検討した。PK-9 細胞では PS 修飾が有効な細胞増殖抑制効果を発揮した(図 10)。しかし、その後の検討で PS 修飾は非特異的な細胞増殖抑制効果であることが判明した。S11b, S11c, TBA(トロンピンに対するアプタマー), scramble(コントロールアプタマー) にそれぞれ PS 修飾を行い、様々な細胞株で増殖抑制効果を検討した。その結果、どの配列を持つアプタマーであっても、PS 修飾により、コントロール配列であっても細胞増殖抑制効果を確認する結果であった(図 11)。



以上の結果から、共有結合修飾

に関しては、バンドシフトを確認する手法を新たに考案する必要がある。また PS 修飾は非特異的な細胞増殖抑制効果を確認した。これまでの既報によるアプタマーを用いた実験系では、コントロール配列や、off target effect を考慮した研究が行われておらず、本研究でコントロール実験の重要性を改めて確認した。期間内に有効な結果に到達できなかったが、今後の基礎データとしたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	平野 聡 (Hirano Satoshi) (50322813)	北海道大学・医学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	平岡 圭 (Hiraoka Kei) (10719587)	北海道大学・医学研究院・客員研究員 (10101)	
研究分担者	Y A N G J A Y (Yang Jay) (60897619)	北海道大学・医学研究院・客員教授 (10101)	

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