

機関番号：15101

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2010

課題番号：20200039

研究課題名（和文） RNA アプタマーを用いたがん放射線治療増感剤の分子標的創薬

研究課題名（英文） Molecular targeted drug discovery for cancer cell radiosensitization using RNA aptamars

研究代表者

栗政 明弘 (KURIMASA AKIHIRO)

鳥取大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80343276

研究成果の概要（和文）： DNA-PKcs、ATM、ATR などの DNA 修復に関わるプロテインキナーゼの活性を阻害すると放射線高感受性になる事が知られ、これまでに数多くの阻害剤がスクリーニングされ、新たな抗がん剤が開発されつつある。一方、これらプロテインキナーゼはそれ自身がリン酸化されることにより活性化するため、RNA 工学技術を用いてリン酸化プロテインキナーゼを阻害する RNA アプタマー分子を作製し、分子標的創薬として新しいがん放射線治療増感剤の開発を目指してきた。本研究では、SELEX 法を用いて DNA-PKcs のリン酸化クラスター部位に対する RNA アプタマーの作製を試みた。それらの配列を次世代シーケンスで調べ、DNA-PKcs と特異的に認識するであろう RNA 候補分子を複数個選別した。これらを U2OS 細胞内にトランスフェクションして放射線感受性を検討し、その結果放射線感受性を増幅させるものの存在を確認した。

研究成果の概要（英文）： It is well known that blocking protein kinases related to DNA repair machinery such as DNA-PKcs, ATM, or ATR enhance sensitivity to ionizing radiation (IR). From this point of view, we expect that tumor cell sensitivity against radiotherapy is enhanced by exploiting this mechanism. Protein kinases related to DNA repair machinery are activated by being phosphorylated. Therefore we attempted making the RNA engineering technology, and will develop new radiation sensitization medicine as a molecular target drug for cancer. In this experiment, we are making RNA aptamers against phosphorylated site of DNA-PKcs by SELEX. In this research, we produced RNA aptamers specific to DNA-PKcs phosphorylation site. Furthermore their specific template sequences were analyzed by next-generation sequencing technology, and some that may recognize DNA-PKcs specifically were focused. U2OS cells are transfected with the RNA molecules, we tested whether can increase sensitivity of radiation. In conclusion, we found some RNA molecules that enhance sensitivity of radiation for U2OS cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,600,000	2,880,000	12,480,000
2009年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2010年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
年度			
年度			
総計	24,300,000	7,290,000	31,590,000

研究分野：医歯薬学、放射線影響

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線治療生物学、分子標的創薬、DNA 修復、RNA 工学

1. 研究開始当初の背景

我々の細胞の中に存在する遺伝情報を保持している DNA は、日常的に DNA 損傷を受けている。特に DNA の二重鎖切断損傷 (DNA-DSBs) は致命的な損傷であり、これらは主として非相同性末端結合 (non-homologous end-joining: NHEJ) あるいは相同組換え (homologous recombination: HR) の 2 つの経路によって修復される。

DNA 修復機構や DNA 損傷応答のシグナル伝達経路を制御することは、放射線治療や化学療法へのがん細胞の感受性に影響を及ぼすと考えられている。がん細胞の中には放射線感受性が低く、放射線治療が有効でないものが存在する。このような癌細胞に対して放射線感受性を高める薬剤の開発が、近年数多く試みられてきている。例えば、DNA 修復に関わるキナーゼ分子の触媒活性部位 (ATP ポケット) に結合する低分子化合物がキナーゼ活性を阻害し、DNA 修復能を低下させることが知られている。しかしながら、これらの低分子化合物は特異性が低く、多くの副作用が認められている。

放射線感受性に関与しているプロテインキナーゼは、DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit)、ATM (Ataxia telangiectasia mutated protein kinase)、ATR (ATM-related protein kinase) などが挙げられる。これらは DNA 修復系において、DNA 損傷を感知し、自己リン酸化することにより活性化し、下流のプロテインキナーゼにシグナルを送る。直接放射線照射した細胞において、これらのプロテインキナーゼが欠損した状態では細胞の生存率が低下することが知られている。

近年、RNA の研究が盛んになってきており、RNA の様々な新しい機能が発見されている。RNA は DNA からタンパク質へと遺伝情報を伝達する仲介役としてだけでなく、siRNA や miRNA などの non-coding RNA の遺伝子発現制御を行うもの、リボザイムなどの酵素活性を持つもの、そして複雑な高次構造をとり標的分子に対して特異的に結合する RNA アプタマーといったものが存在する。このような RNA の機能の発見によって RNA 工学技術は著しい進歩を遂げてきている。

アプタマーは *in vitro* や自然界において標的となる様々な分子に対して高親和性を持ち、特異的に結合するように進化したオリゴヌクレオチド (一本鎖 RNA もしくは一本鎖 DNA) である。アプタマーは治療、薬剤の開発、診断などの多くの分野において有用であり、加齢性黄斑変性症の治療に関するアプタマー (Macugen) が開発されている。RNA の高次構造を形成するという特性により、複雑な三次元構造を形成し、それによって抗体の

ように親和性と特異性をもって標的分子に結合する。アプタマーは試験管内で化学的に、短時間で合成可能であり、免疫原性もほとんどないあるいは全くない点が抗体にはない利点である。アプタマーは SELEX 法と呼ばれる 2 つの過程 (選別・増幅) を連続して繰り返し行い、標的分子に対して特異的かつ高親和性であるアプタマー分子を得ることが出来る。

2. 研究の目的

RNA 工学技術を用いて、放射線感受性の低いがんに対する放射線治療増感剤の開発を目指している。RNA 工学技術を用いて DNA-PKcs や ATM などのプロテインキナーゼリン酸化部位を阻害することにより、がん細胞の放射線に対する感受性を増大させる放射線治療増感剤を開発しようと試みた。本研究では、特に DNA-PKcs リン酸化クラスター部位に対する RNA アプタマーの作製を行った。

3. 研究の方法

<SELEX 法>

SELEX 法を 11 ラウンド繰り返し行い、DNA-PKcs-Ser2041 残基、-Ser2056 残基、-Ser2069 残基、-Thr2638 残基、-Thr2647 残基、-Ser4026 残基、-Thr4102 残基リン酸化ペプチドに対する RNA 分子を選別した。アプタマーの選別の確認は転写終了後にナノドロップで計測した RNA 濃度、及び選別終了時における RNA 精製時のエタノール沈殿における白色の沈殿物の有無を目視にて判断した。作製したアプタマー候補群をターゲット部位よりそれぞれ Apt-DNA-PKcs_S2041 他と名付けた。

<シークエンス>

pBluescript SKII(-) の EcoRI 制限酵素部位に、SELEX 法より回収した RNA アプタマー候補分子の鋳型 DNA (DNA-PKcs p-Thr4102 に対するもの) を組み込み、Ligation 反応の後に、transformation を行った。lacZ 部位にアプタマー候補鋳型 DNA 配列がインサートされた白色コロニーを 30 個ピックアップし、振盪培養の後に大腸菌を回収し、アルカリ融解法でプラスミドを精製した。精製したプラスミドを EcoRI で制限酵素処理を行い、アプタマー候補鋳型 DNA 配列が組み込まれているかをアガロース電気泳動法にて確認した。その内の 24 クローンを用いてシークエンスを行い、アプタマー候補鋳型 DNA の塩基配列を調べた。

<Binding Assay>

Binding Assay は DNA-PKcs-Thr4102 残基をターゲットとした RNA アプタマー候補のみを行った。ラジオアイソトープで標識した

RNA アプタマー候補分子を、あらかじめニトロセルロースメンブレンに結合させておいた Thr4102 残基リン酸化ペプチドと Thr4102 非リン酸化ペプチド (control) とをインキュベートし、反応させた。その後、-80 度、48 時間の条件にて感光させ、オートラジオグラフィーを行った。

<次世代シーケンス>

作製した RNA アプタマー候補型 DNA 分子 Apt-DNA-PKcs_S2041、_S2056、_T2609、_T2638、_S4026、_T4102 の次世代シーケンサーを用いたアプタマー配列を解析した。リード数は 1 万 4 千~2 万 3 千であった。異なるターゲット間 (リン酸化部位間) にもかかわらず、共通した同じ配列が複数見られた。シーケンスの結果と照らし合わせると、この配列はベクターを用いたシーケンス解析で確認された Apt-T4102-5、Apt-T4102-3、Apt-T4102-22 と同配列もしくはこれらの配列の亜種であった。これら配列の取得率は非常に高く、Apt-DNA-PKcs_S2041 のサンプルに関して述べると、総リード数の 23.2% が共通して見られた同配列、もしくはそれに非常に似通った配列であった。他のサンプルも同様の結果で、Apt-DNA-PKcs_T2609 では 27.6%、Apt-DNA-PKcs_T2638 では 12.1%、Apt-DNA-PKcs_S4026 では 35.2%、Apt-DNA-PKcs_T4102 では全体の 24.2% を占めていた。これら共通配列は、SELEX 法にて非特異的に選別されているものと考え、以後は各リン酸化ペプチドに対して特異的な配列を有するアプタマーをアプタマー候補とした。

<放射線感受性>

次世代シーケンス解析の結果より、リン酸化部位に結合すると期待される RNA アプタマー候補分子を複数個取得できていると判断した。そのうちの Apt-DNA-PKcs_S2041-2、_T2609-1、_T2638-2、_T4102-1、_T4102-2、_T4102-5、_T4102-5 をランダム領域のみ搭載した 2'-フルオロ化 RNA アプタマーの合成を外注委託した。これを U2OS 細胞に Transfection し、放射線を 1Gy、2Gy、3Gy、4Gy 照射することによりその感受性の変化を比較した。6cm dish 3 枚を 1 セットとして 4 回実施した。Transfection 後の放射線照射していない細胞の細胞数を 100% としたところ、4Gy を照射した場合において Apt-DNA-PKcs_T2638-2 及び_S4102-5 導入細胞の死亡率に明らかな有意差 ($p < 0.01$) が見られ、1-4Gy の線量を照射した細胞の生存率の検定の結果、Apt-DNA-PKcs_T2638-2、_S4102-1、_S4102-5 を導入した細胞で明らかな放射線増感作用が見られた。

4. 研究成果

今回の研究では、SELEX 法により選別・

取得した RNA アプタマー候補分子のターゲット分子への結合性及び放射線感受性について検討した。

当初はは得られたアプタマーの鋳型となる DNA をプラスミドベクターにクローニングしてシーケンスを行い配列の確認を行っていた。しかし、これでは非特異的な配列が含まれ、親和性の高いものを逃してしまい、これが Binding Assay の検証の不確かさにもつながっていた。さらに、プラスミドでのクローニングというバイアスとより多くの配列を解析するため、SELEX 法で選び出した分子を次世代シーケンサーで大量のシーケンス解析し、リード数の頻度の高い配列を選び出す必要があった。

次世代シーケンスの解析結果より、RNA アプタマー候補型 DNA 分子 Apt-DNA-PKcs_S2041 は 8 種類、_T2609 は 5 種類、_T2638 は 6 種類、_S4026 は 5 種類、_T4102 は 9 種類のユニークな配列をもつアプタマー候補が得られた。

DNA-PKcs のリン酸化は IR による DSB 修復と細胞生存に重要である。特に 2056 クラスタと 2609 クラスタリン酸化部位は放射線感受性に関連したリン酸化部位であり、この部位に mutation を加えると放射線高感受性になることが報告されている。Apt-DNA-PKcs_S2041-2 がターゲットとしている DNA-PKcs Thr2638 残基は 2609 クラスタに属しているリン酸化部位である。つまり、Apt-DNA-PKcs_T2638-2 が標的部位である DNA-PKcs Thr2638 リン酸化部位に結合し、下流のプロテインキナーゼにシグナルを阻害することによって放射線感受性が増し、細胞の生存率が低下した可能性が考えられる。また、自己リン酸化後の脱リン酸化反応を阻害している可能性も存在する。DNA-PKcs は DNA 損傷部位に結合して自己リン酸化、あるいは他のキナーゼによりリン酸化される。その後に、脱リン酸化されることによりそのコンフォメーションが変化し、DNA 損傷部位から離れることによって修復が進むと言われている。RNA アプタマーにより脱リン酸化が阻害される可能性も考えられる。DNA-PKcs Ser4102 残基に関して述べると、*vivo* における機能的なことはよく分かっていない。Apt-DNA-PKcs_S4102-1、Apt-DNA-PKcs_S4102-5 導入細胞が放射線感受性を示したことから、DNA-PKcs Ser4102 残基は何らかの生理的機能を持っている可能性が考えられる。今後、DNA-PKcs Thr2638 残基及び Ser4102 残基と DNA-PKcs リン酸化 Thr2638 残基及びリン酸化 Ser4102 残基に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングで上記の仮説を検証していく必要がある。

今回の実験で得られた RNA アプタマーの

中に細胞を放射線高感受性にするものが存在する可能性があり、将来的には新しいがん放射線治療増感剤としての利用が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

- ① Anzai K, Sekine-Suzuki E, Ueno M, Okamura M, Yoshimi H, Dan S, Yaguchi SI, Enami J, Yamori T, Okayasu R: Effectiveness of combined treatment using X-rays and a phosphoinositide 3-kinase inhibitor, ZSTK474, on proliferation of HeLa cells in vitro and in vivo. *Cancer Sci.* (in press)
- ② Hisatomi T, Sueoka-Aragane N, Sato A, Tomimasu R, Ide M, Kurimasa A, Okamoto K, Kimura S and Sueoka E: NK314 potentiates anti-tumor activity with adult T-cell leukemia-lymphoma cells by inhibition of dual targets on topoisomerase II α and DNA-dependent protein kinase. *Blood* 117(13):3575-84, 2011
- ③ Nagasawa H, Little JB, Lin YF, So S, Kurimasa A, Peng Y, Brogan JR, Chen DJ, Bedford JS and Chen BP: Differential role of DNA-PKcs phosphorylations and kinase activity in radiosensitivity and chromosomal instability. *Radiat Res* 175: 83-9, 2011.
- ④ Takubo K, Tsuchiya H, Kurimasa A, Arnesen T, Ryoike K, Shiota G. Involvement of N-acetyltransferase human in the cytotoxic activity of 5-fluorouracil. *Anticancer Drugs*. Sep;20(8):668-75, 2009
- ⑤ Inoue T, Nakayama Y, Yamada H, Li YC, Yamaguchi S, Osaki M, Kurimasa A, Hiratsuka M, Katoh M, Oshimura M. SIRT2 down-regulation confers resistance to microtubule inhibitors by prolonging chronic mitotic arrest. *Cell Cycle* 8(8): 1279-91, 2009

〔学会発表〕(計8件)

- ① Kurimasa A, Okuda S, Okada A, Tomimatsu N, Iwabuchi K, Chen DJ.: Live Cell Imaging and kinetics of DNA double-strand breaks (DBSs) foci in cycling U2OS cells. Genomic Instability and DNA repair” in Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology, Keystone, Colorado, USA, 2011年1月30日-2月4日
- ② Tomimatsu N, Mukherjee B, Deland K, Kurimasa A, Porteus M, Bolderson E,

Khanna KK, Burma S.: DNA resection by Exo1 dictates critical DNA repair and damage signaling decisions in response to DNA double-strand breaks. “Genomic Instability and DNA repair” in Keystone symposia on Molecular and Cellular Biology, Keystone, Colorado, USA, 2011年1月30日-2月4日

- ③ 井原誠、小林純也、栗政明弘、小松賢志、工藤崇 DNA二本鎖切断再結合におけるATMと53BP1の役割 日本放射線影響学会、第53回大会、京都テルサ、京都、2010年10月20-22日
- ④ Kurimasa A, Nagayoshi Y, Okuda S, Okada A, Tomimatsu N, Iwabuchi K, Chen DJ. Analysis of novel phosphorylation site of 53BP1 induced by DNA double-strand breaks. A-T International Workshop 2010, Redondo Beach, California, USA, 2010年4月11-14日
- ⑤ Kurimasa A, Nagayoshi Y, Okuda S, Okada A, Tomimatsu N, Iwabuchi K, and Chen DJ. Laser and ionizing radiation induced DSB foci formation: *in vivo* real time imaging using modified 53BP1-GFP fusion protein., “Recent Advances in DNA Repair and Related Studies” 6th NIRS International Open Laboratory Workshop, 放射線医学総合研究所、千葉 2010年3月24日
- ⑥ 奥田沙奈絵、永吉悠里、岡田茜、押村光雄、汐田剛史、栗政明弘 DNA-PKリン酸化部位に対するRNAアプタマーの作製 第68回日本癌学会学術総会 横浜 2009年10月1~3日
- ⑦ 永吉悠里、奥田沙奈絵、岡田茜、押村光雄、汐田剛史、栗政明弘 DNA二本鎖切断により誘導される53BP1新規リン酸化部位の解析 2009年10月1~3日第68回日本癌学会学術総会 横浜
- ⑧ 丹羽太真、がん放射線治療の展開と生物影響の基礎研究、茨城大学理学部量子サイエンスフォーラム 公開シンポジウム 第2回 Quantum Medicine 研究会、平成2009年1月31日、茨城大学理学部(水戸市文京2-1-1)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗政 明弘 (KURIMASA AKIHIRO)

鳥取大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80343276

(2) 研究分担者

丹羽 太貫 (NIWA OHTAURA)

放射線医学総合研究所・重粒子医科学セン

ター・副センター長

研究者番号：80093293

(H20→H21)

岡安 隆一 (OKAYASU RYUICHI)

放射線医学総合研究所・重粒子医科学セン

ター・グループリーダー

研究者番号：50356135

(H22)

(3) 連携研究者

なし