

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 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：82606

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2022

課題番号：22K20809

研究課題名(和文)肉腫を標的とした新規核酸医薬療法の非臨床POC獲得

研究課題名(英文)Obtained pre-clinical POC for a novel nucleic acid drug therapy targeting sarcoma

研究代表者

河知 あすか(Kawachi, Asuka)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・医員

研究者番号：80818162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,100,000円

研究成果の概要(和文)：Exon Skippingを誘導するASOとして、計9種類のASOを設計した。それぞれ、Donor siteならびにExon Super Enhancerを標的とした。ASOに蛍光色素をタグ付けしていることから、トランスフェクション翌日に蛍光色素陽性細胞のみをソートした。しかしながら、いずれASOを用いてもExon skippingが誘導されていることを確認することができなかった。ESE部位は、公開データベースを参照とした。今後の研究の成功のためには、正確なESE部位の同定ならびに、ASOが核内へ移行していることを確認するなどの改善が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

残念ながら、今回の研究では研究の目標としたExon skippingを誘導するASO配列の同定することができなかった。実際に研究が実装された場合には、これまで治療標的が実施不可能とされてきた融合転写因子を標的とする核酸医療につながる可能性があるため、今後も研究を続ける意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We attempted to design ASOs using two representative Ewing's sarcoma cell lines. We designed ASOs that induce Exon Skipping by targeting the Exon5 and Exon7 donor sites. 24 hours after transfection of the ASOs, RNA was isolated, and PCR was used to confirm whether Exon Skipping was generated. The amplicons obtained were wild-type only due to their size. Since the ASOs were tagged with a fluorescent dye, only fluorescent positive cells were sorted the day after transfection. Next, we designed a total of seven ASOs targeting the Exon super enhancer (ESE) and the Donor site of Exon3. However, we could not confirm that Exon skipping was induced by any of the ASOs, and the ESE sites were referred to a public database. A total of 9 different ASOs were tried, but they did not have the expected effect on EWS-FLI1. For the success of future studies, it is necessary to improve the identification of the exact ESE site and to confirm that ASOs are transferred into the nucleus.

研究分野：Sarcoma

キーワード：Oligonucleotide therapy EWS-FLI1

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

Ewing 肉腫は、骨ないし軟部組織由来の高悪性度肉腫で、小児から若年男性に好発する。発症頻度は、小児悪性腫瘍のうち、2%程度で、希少がんに分類される。多くは限局例(85%)で診断されるが、約2割程度で初診時より転移を伴う症例が存在する。限局例に対する標準治療は2003年に確立された。殺細胞性抗がん剤治療による全身治療と、外科的切除ないし放射線治療による局所療法を組み合わせた集学的治療により、5年生存率は70-80%である。一方で、再発例や転移例の治療は殺細胞性抗がん剤のみで、5年生存率が20-30%程度と標準治療が確立されていない。しかしながら、この20年間、新規治療は開発されていない。Ewing 肉腫は、分子生物学的に、RNA 結合タンパク質をコードする EWSR1 遺伝子と、転写因子をコードする ETS family 遺伝子の転座により生じるキメラ遺伝子に特徴づけられ、EWSR1 の再構成の証明が病理学的診断に手がかりとなる。EWSR1 の融合パートナー (FLI1, ERC, ETV1 など) 並びに、breakpoint は多岐に渡るが、最も一般的なものは EWSR1 の Exon 7 と FLI1 の Exon 6 が融合した EWS-FLI1 (約 50%) である。その機能は、EWS の活性化ドメインと、FLI1 の DNA 結合部位が融合することにより、異常活性化転写因子としての働きを示す。Ewing 肉腫は、その他の遺伝子変異を伴う頻度が極めて低いことから、このキメラ遺伝子単独で、遺伝子発現のリプログラミングを生じさせ、腫瘍表現型を誘導していると考えられている。細胞株実験では、この融合遺伝子を siRNA でノックダウンすると、アポトーシスの誘導と、腫瘍の増殖の抑制が確認されている。この異常活性化転写因子の機能を制御するために、転写因子自体とその機能を標的とした化合物の合成が試みられたが、これまで成功に至っていない。

一方で、近年 COVID-19 の mRNA 型ワクチンなどで話題となっているように、核酸医薬の臨床応用が注目を浴びている。Antisense Oligonucleotide (ASO) は良性神経疾患などではすでに臨床応用が進み、いくつかの ASO がアメリカ食品医薬品局 (FDA) あるいは日本の医薬品医療機器総合機構 (PMDA) により承認をうけている。例えば脊髄性筋萎縮症に対する nusinersen や、Duchenne 型筋ジストロフィーに対する eteplirsen の投与によって臨床的効果がえられている。そこで、本研究では EWSR1 を標的とした ASO を Ewing 肉腫の治療に応用可能か? を目的として、研究計画を立案した。

2. 研究の目的

本研究は、融合遺伝子の発現抑制を目的として、EWSR1 に対して、Exon skipping を起こす antisense oligonucleotides (ASO) を設計し、EWS-ETS の未熟 mRNA の分解の誘導を試みる。In vitro および in vivo で腫瘍増殖抑制効果が認められた場合には、EWSR1 遺伝子再構成を有するその他の肉腫への応用も試みることを、研究の目標とした。

3. 研究の方法

Ewing 肉腫の代表的細胞株2種類を用いて、ASO の設計を試みた。まず最初に、それらが有する融合型キメラ遺伝子である EWS-FLI1 の配列を確認した。これは EWS-FLI1 はその融合ポイントが多岐にわたること、多種類の transcription variant を有することが報告されているためである。用いた細胞株はともに、EWSR1 遺伝子の Exon1-7 と FLI1 遺伝子の 6-10 が融合していることが配列上確認された (Type1 EWS/FLI1)。次に、Exon skipping を生じた結果 Frame shift が生じる Exon として、Exon5 と Exon7 を標的として ASO を設計した。それぞれの 5' 端末側に推定される Donor site を標的として ASO をデザインし、それぞれの Ewing 肉腫にトランスフェクションした。トランスフェクション 24 時間後に RNA を抽出し、cDNA に変換したのち、標的部位前後 100bp を挟んだ位置に設計したプライマーを用いて PCR を実施し、電気泳動にて、標的 Exon が Skipping されているかを確認した。期待する結果としては、Skipping した転写物と、Skipping されていない転写物でサイズ 100-200bp 程度異なるため分離が可能であり、これを検出することであった。しかしながら、得られたアンプリコンサイズは、Skipping されていない転写物に該当するもののみであった。なお、トランスフェクション効率については、ASO に蛍光色素をタグ付けしていることから、トランスフェクション翌日に蛍光色素陽性細胞のみをソートしているため、少なくとも細胞質内の ASO の存在は確認をしている。つぎに、Exon super enhancer (ESE) を標的とした ASO と、ならびに Exon3 の Donor site を標的とした ASO を計7種類設計した。しかしながら、いずれの ASO を用いても、同様の方法で評価を行ったが Exon skipping が誘導されていることを確認することができなかった。ESE 部位は、配列モチーフを元に推定されている公開データベースを参照とした。複数のデータベースでそれぞれ異なる部位が ESE 標的と報告されており、精度は高いとは言えない。今回の実験では、計9種類の ASO を試したが、期待する EWS-FLI1 への効果は得られなかった。

4．研究成果

計 9 種類の ASO を設計したが、いずれも期待する Exon Skipping を確認することが出来なかった。今後の研究の成功のためには、正確な ESE 部位の同定ならびに、ASO が核内へ移行していることを確認するなどの改善が必要であると考えられた。

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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|