

令和元年6月19日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05917

研究課題名(和文) がん細胞を標的とした抗EGFR抗体薬-SNP認識型人工核酸の創成と機能評価

研究課題名(英文) Antisense PNA-PEG conjugate targeting a single nucleotide mutation in K-ras gene induces cell apoptosis in pancreatic cancer cells

研究代表者

櫻井 敏彦 (SAKURAI, Toshihiko)

鳥取大学・工学研究科・准教授

研究者番号：10332868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：KRAS遺伝子1塩基変異を標的として、細胞膜透過ペプチドとシステインプロテアーゼ切断シークエンスを導入したinchworm型ペプチド核酸(PNA)-ポリエチレングリコール(PEG) conjugateを合成し、ヒト膵臓腺癌由来がん細胞BxPC-3細胞(KRAS遺伝子野生型)とPANC-1細胞(KRAS遺伝子変異型)への細胞死誘導効果について評価した。この結果、BxPC-3細胞ではフルマッチ型(FM)で、PANC-1細胞ではミスマッチ型(MM)で、優れた細胞死を誘導することが示された。この成果は、KRAS遺伝子1塩基変異を標的とした新規な遺伝子治療薬として利用できることを意味している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

KRAS遺伝子点突然変異はすい臓がん患者の90%、大腸がん患者の40～50%、肺線がんの20～30%、肛門部胆管がんの50%など実に多くの臓器がんで認められており、この変異が原因となって最新の分子標的薬(抗EGFR抗体薬)の薬効が期待できない問題点を引き起こしている。変異型KRASの機能・発現抑制により副作用を伴わないがん治療が期待できるが、現時点ではこのような遺伝子治療薬は開発されていない。本研究ではこれらの遺伝子変異を対象とした新たな人工遺伝子を作製した結果、細胞レベルの評価では一定の薬効特性を示すことが証明された。今後は、具体的な遺伝子治療薬としての展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：For the development of an antisense nucleic acid therapy, we synthesized the inchworm-type peptide nucleic acid (PNA)-polyethylene glycol (PEG) conjugate with oligoarginine (i-PPC(R9)) as a cell-penetrating peptide, and evaluated cell death by i-PPC(R9) for pancreatic cancer cells (BxPC-3 cells) without mutation (wild type: GGT) and PANC-1 cells with a single nucleotide KRAS mutation (mutant type: GAT) of codon 12. As a results, i-PPC(R9) was transported into the cytoplasm of cells, and compared with i-PPC(R9)_AT having a random base sequence consisting of adenine (A) and thymine (T), which is not complementary to the sequence of KRAS codon 12, apoptosis-mediated cell death was induced in BxPC-3 cells (20%) and PANC-1 cells (10%) by full-matched i-PPC(R9) to KRAS codon 12, respectively. It indicated that the gene expression can be controlled by i-PPC(R9) depended on a point mutation of KRAS gene in cancer cells.

研究分野：人工核酸

キーワード：難治性がん疾患 遺伝子治療薬 ペプチド核酸 遺伝子発現制御 KRAS遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト全ゲノムの配列が決定されて以降その機能解析が進められ、既に多くの疾患・疾病遺伝子、癌遺伝子などの病因遺伝子配列が明らかにされている。このゲノム塩基配列中には、およそ 1000 塩基に 1 箇所程度存在する 1 塩基多様性 (SNPs) があり、この遺伝的な多様性が悪性腫瘍、心血管系疾患、慢性肝疾患、眼疾患を含む数多くの遺伝子疾患の発症を引き起こすだけでなく、医薬品の効力・副作用の個人差の原因となる。

大腸がんの治療におけるカーステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ (KRAS) 遺伝子一塩基変異は、治療薬の選択を顕著に制限する。従来の化学療法に加え、近年では分子標的薬として抗 EGFR 抗体薬 (アービタックス、ベクティビックス) が用いられている。抗 EGFR 抗体薬は、上皮成長因子受容体 (EGFR) からのシグナルを遮断してがん細胞の増殖を抑制し細胞死を誘導するが、シグナル伝達分子の一つである KRAS 遺伝子に 1 塩基変異が生じるとこのシグナルを遮断できず治療効果が極端に低下する。KRAS 遺伝子の変異は、大腸がん、膵臓がん、肺腺がん、甲状腺がんなど多くのがん細胞において確認され、特に大腸がんでの KRAS 遺伝子変異は約 4 割に上る。さらに KRAS 遺伝子のエクソン 2 (コドン 12, 13) の変異はそのうちの 95% を占めることが大規模追跡調査で報告された。このような SNPs を認識する人工核酸を設計し、細胞機能への作用を明確にすることは、SNPs をターゲットとした遺伝子治療薬への基本技術として重要となる。

上述の背景のもと、申請者らは 1 塩基認識能を増幅する人工核酸の分子設計と機能評価を目的として、ペプチド核酸 (PNA) を用いた新たな人工核酸の分子設計を模索してきた。PNA は、(1) ヌクレアーゼ・プロテアーゼ耐性、(2) DNA/RNA との安定な二重鎖形成能、(3) 高いミスマッチ選択性、(4) 核酸二重鎖への相互作用など、従来の核酸モデルとは大きく異なる優れた特性を示すことから遺伝子治療薬としての展開が図られているものの、長鎖化に伴う溶解性の低下、タンパク質との非特異吸着、細胞膜透過性等の問題点が残る。最大の問題点は、PNA の安定すぎる相補鎖形成能が原因となり、1 塩基認識能が低い点にある。申請者らはこれらの問題点を解決する新たな人工核酸 (polyethylene glycol (PEG) の両末端に PNA を配するコンジュゲート; PNA-PEG コンジュゲート (i-PPC; Fig.1)) を設計し、in vitro においてアンチセンスとして作用し、1 塩基変異に依存したタンパク質発現を制御することを示すこと (Fig. 2: i-PPC によるルシフェラーゼ発現量の抑制効果。1 塩基を認識した発現制御を行っていることがわかる)、また、このメカニズムが両末端の PNA 部の相補鎖形成温度 (T_m 値) の差に依存して生じる特異的な特徴であることを報告した (Fig. 2)。

一方で、上述の評価はすべて in vitro の評価系を用いた実験結果であり、in situ, in vivo の展開を見ていない。i-PPC による細胞内遺伝子発現制御を目標に、i-PPC の細胞内輸送経路を検討した結果、種々のマーカーとの共有性の評価からマクロピノサイトーシスにより細胞内に取り込まれることが示された。細胞内に輸送することはできた一方で、マクロピノソームからリリースされず細胞質に展開できないことが判明した。そこで、マクロピノソームリリースシグナルである R₉-G-HSP ペプチドを混在させることで細胞室内へのリリースを図ったところ、当初の目的通り細胞室内へ輸送できることを報告した。しかしながら、シグナルペプチドを用いた細胞内輸送は、その溶解性が問題となり細胞生存率が 30 % を下回るなど、細胞内輸送方に大きな問題を残している。

2. 研究の目的

本研究では、細胞内で KRAS 遺伝子 1 塩基変異を検出する人工遺伝子の開発を目的として、細胞内取り込み後のサイトゾルへのリリースを可能とするシグナルペプチドを配した i-PPC を設計・合成し、細胞内遺伝子発現制御の可能性について検討することを目的とした。下記に、本申請で検討した項目を列記した。

- (1) 細胞内輸送シグナルペプチドを配した i-PPC の設計と相補鎖形成挙動の評価。
- (2) ルシフェラーゼ発現大腸がん細胞 (ヒト結腸腺癌細胞; HT-29 細胞) への i-PPC 細胞内輸送ならびにルシフェラーゼ発現抑制効果。
- (3) 細胞内輸送シグナルとシステインプロテアーゼ (Cathepsin B) 切断シークエンスを導入した i-PPC によるヒト膵臓腺がん細胞の誘導死。

3. 研究の方法

- (1) i-PPC の合成: i-PPC は Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl) 固相合成法を用いて合成した。

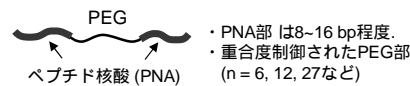


Fig. 1 i-PPCの基本構造

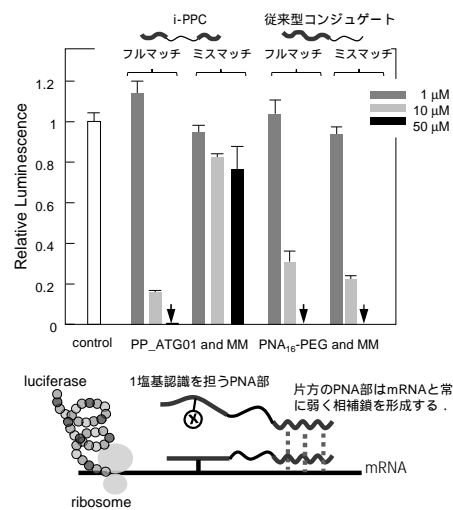


Fig. 2 ルシフェラーゼ発現系を用いた1塩基認識能に起因するi-PPCのアンチセンス効果。

表面アミノ基濃度(0.16 mmol/g)の NovaPEG Rink Amide 樹脂 (Novabiochem) 表面に, Fmoc/Bhoc 基で保護された PNA モノマーを HATU/DIPEA を用いて縮合し, C 末端側の 8-mer からなるオリゴ PNA を合成した. 20% piperidine/NMP により Fmoc 基を脱保護し, その過程は Fmoc 脱保護時に生じる dibenzofulvene を UV でモニタリングした. 次いで, O-(N-Fmoc-2-aminoethyl)-O'-(2-carboxyethyl)-undecaethyleneglycol (Fmoc-NH-PEG₁₂-COOH) を縮合し, さらに N 末端側の 8-mer からなるオリゴ PNA を同様に縮合した. 樹脂からの切り出しと PNA 側鎖保護基の最終的な脱保護は 95 % trifluoroacetic acid (TFA), 2.5 % triisopropylsane (TIS), 2.5 % dichloroethane 混合溶媒で 4°C, 1h 反応させて処理した. 濃縮後, diethyl ether で析出させて粗晶を得た. 得られた i-PPC は ODS カラムを用いた HPLC により精製した.

- (2) 融解温度測定: 相補鎖形成挙動の解析を目的として, 相補的な合成 DNA との融解温度を測定した. i-PPC および合成 DNA 溶液の濃度は UV 分光光度計によって 260nm の吸光度より算出した. 所定の濃度に調整した i-PPC と合成 DNA の溶液を, ペルチエ温度コントローラーを備えた V-730 バイオ UV /可視分光光度計 (JASCO International Co., Ltd.) と石英キャピラリーパイアルを用いて測定した (測定条件: 昇温速度 1°C/min, 測定波長 260 nm, 測定温度域 4 ~ 95°C). 測定で得られた融解曲線より融解温度 T_m 値を見積もり, エンタルピー変化 (ΔH_0), エントロピー変化 (ΔS_0) ならびにギブス自由エネルギー変化 (ΔG_0) などの熱力学的パラメータを算出した.
- (3) 細胞培養および生存率評価 (ATP アッセイ): ヒト結腸腺癌細胞 (HT29 および SW640 細胞) はそれぞれ 10 v/v% ウシ胎児血清 (FBS) を含有した McCoy's 5a 培地ならびに L-15 培地中で継代培養した. ヒト膵臓癌細胞株 (BxPC-3 ならびに PANC-1 細胞) は, 10 % FBS 含有 RPMI-1640 培地中で継代培養した. 細胞は 5 % CO₂ インキュベーター内 37°C で培養し, 4 ~ 5 日ごとに継代した. 培養した細胞を 96 ウェルプレートに 2,500 cell/well となるように最終容量 100 μ l で播種し, 37°C, 5 % CO₂ 存在下で 24 時間前培養した後, 培養培地を所定濃度の i-PPC を含む培地と交換し, 最大で 4 日間培養した. また, 培地交換は 2 日目に行った. 培養後, 100 μ l の CellTiter-Glo 2.0 アッセイ溶液 (Promega 社) を各ウェルに添加し, 10 分後の発光強度をマルチプレートリーダー (Tecan, Männedorf, Switzerland) で測定した.

4. 研究成果

- (1) synDNA との相補鎖形成挙動を検討した結果, シグナルペプチドを持たない i-PPC と比較すると 1 塩基認識能がわずかに低下していることが熱化学パラメータより算出された. これは, 導入したシグナルペプチドとリン酸基の静電的な相互作用が原因と推察された.
- (2) サイトゾルリリースシグナルペプチドを配した i-PPC の HeLa 細胞への取り込み挙動を検討した結果, 24 h 後ではマクロピノソームからサイトゾルへリリースされていないものの 48 h 後にはサイトゾルへリリースされている蛍光像がみられ, シグナルペプチドの有用性が確認できた. 次に細胞内遺伝子発現制御の評価系の構築を目的として, ルシフェラーゼを恒常発現するルシフェラーゼ発現大腸がん細胞 (ヒト結腸腺癌細胞; HT-29_{Luc+}細胞) に, シグナル化 i-PPC (FM 型, MM 型) ならびにシグナルを持たない i-PPC (FM 型, MM 型) を取り込ませ, 細胞数が 500, 1000, 2500 cell/well となるよう 96 well plate に播種した. 所定日数培養した後に WST-8 アッセイにより生細胞数を見積もり, 細胞あたりのルシフェラーゼ発現量を算出した結果を fig. 3 に示す. この結果, 播種細胞 2500 cell/well においてシグナル化 i-PPC_{FM} では 2 日目以降からルシフェラーゼの発現が抑制されはじめ, 4 日目では 40% 程度抑制することがわかった. またシグナル化 i-PPC_{MM} では顕著な抑制がみられないことから, 1 塩基の違いを認識して遺伝子の発現を制御していることが示された. 一方で, このような傾向はシグナルペプチドを持たない i-PPC_{FM}, MM ではみられないことから, シグナルペプチドによるサイトゾルへのリリースが早期の発現抑制につながることを示された.
- (3) KRAS 遺伝子 1 塩基変異を標的として, 細胞膜透過ペプチドとシステインプロテアーゼ切断シーケンスを導入した inchworm 型ペプチド核酸(PNA)-ポリエチレングリコール(PEG) conjugate (signal-i-PPC) を合成し, ヒト膵臓腺癌由来がん細胞 BxPC-3 細胞 (KRAS 遺伝子野生型) と PANC-1 細胞 (KRAS 遺伝子変異型) への細胞死誘導効果について評価した. 細胞死評価は BxPC-3 細胞を 2,500 cells/well となるように 96 well plate に播種し, 1 日前培養した後に 3 μ M signal-i-PPC を添加, 所定時間培養後の生存率を測定した. signal-i-PPC による BxPC-3 細胞の細胞死の誘導効率について, 添加後 1 日目では配列依存的な細胞死はみられなかったが, 4 日目では KRAS 遺伝子と相補的な FM で 42.6% (MM: 13.2%, AT:

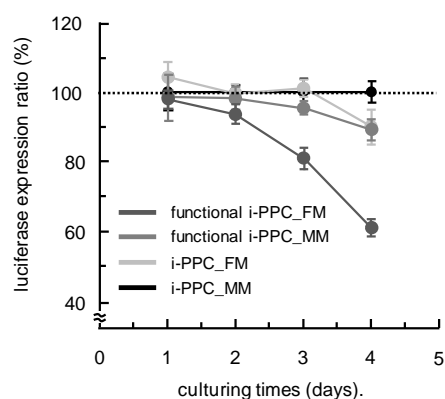


Fig. 3 Gene silencing recognized a single base difference with functional i-PPC.

20.1%) と, FM で優位な細胞死がみられた (Fig. 4 a) . これは signal-i-PPC が 1 塩基変異を認識して遺伝子の発現を抑制したことを示している . また i-PPC_FM を添加後 4 日目では 44.7% (MM: 6.3%, AT: 12.3%) となり, Cathepsin B 切断シークエンスを導入しても細胞死の誘導効率を向上させるには至らなかった (Fig. 4 b) . これは, 切断後の i-PPC がエンドソームあるいはリソソームからリリースされにくいことが当研究グループの先行研究から示唆されており, サイトゾルへのリリース効率が細胞死誘導の効率を律する可能性が推察された .

この結果, BxPC-3 細胞ではフルマッチ型(FM)で, PANC-1 細胞ではミスマッチ型(MM)で優位な細胞死を誘導することが示された . この成果は, KRAS 遺伝子 1 塩基変異を標的とした新規な遺伝子治療薬として利用できることを意味している .

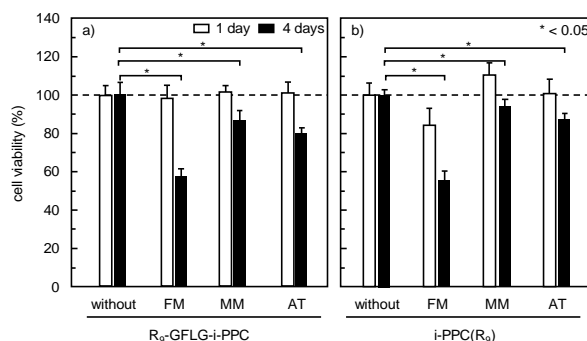


Fig. 4 a) R₉-GFLG-i-PPC ならびに b) i-PPC(R₉) による BxPC-3 細胞の細胞死誘導効率.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- 1) N. Kise, S. Goi, T. Sakurai, Reductive coupling of hydantoins with benzophenones by low-valent titanium: Synthesis of 4-substituted 1H-imidazol-2(3H)-ones and unusual two-to-two coupled products, *Tetrahedron*, 79(9) 992-1001, 2018. [査読有り]
DOI: 10.1016/j.tet.2018.01.022..
- 2) ペプチド核酸を用いたメディカルアプリケーション, 櫻井敏彦, 日本分析化学会誌「ぶんせき」第 5 巻 pp.174-183, 2018. [査読有り]
URL: <http://www.jsac.or.jp/bunseki/201805.html>
- 3) N. Kise, Y. Hamada, T. Sakurai, Electroreductive coupling of aromatic ketones, aldehydes, and aldimines with α,β -unsaturated esters: Synthesis of 5-aryl substituted γ -butyrolactones and lactams, *Tetrahedron*, 73(8), 1143-1156, 2017. [査読有り]
DOI: 10.1016/j.tet.2017.01.013.
- 4) N. Kise, Y. Hamada, T. Sakurai, Electroreductive Intermolecular Coupling of Uracils with Aromatic Ketones: Synthesis of 6-Substituted and cis-5,6-Disubstituted 5,6-Dihydro-1,3-dimethyluracils and Their Transformation to 6-Substituted 1,3-Dimethyluracils, trans-5,6-Disubstituted 5,6-Dihydro-1,3-dimethyluracils, *Journal of Organic Chemistry*, 81(12), 5101-5119, 2016. [査読有り]
DOI: 10.1021/acs.joc.6b00670.
- 5) N. Kise, Y. Hamada, T. Sakurai, Electroreductive Intermolecular Coupling of Coumarins with Benzophenones: Synthesis of 4-(2-Hydroxyphenyl)-5,5-diaryl- γ -butyrolactones, 2-(2,2-Diaryl-2,3-dihydrobenzofuran-3-yl)acetic Acids, and 4-(Diarylmethyl)coumarins, *Journal of Organic Chemistry*, 81(22), 11043-11056, 2016. [査読有り]
DOI: 10.1021/acs.joc.6b02056.
- 6) N. Kise, T. Tuji, T. Sakurai, Stereoselective intramolecular coupling of barbituric acids with aliphatic ketones and O-methyl oximes by electroreduction: radical cyclization mechanism supported by DFT study, *Tetrahedron Letters*, 57(16), 1790-1793, 2016. [査読有り]
DOI: 10.1016/j.tetlet.2016.03.035.

[学会発表] (計 11 件)

- 1) 濱下 優介, 木瀬 直樹, 櫻井 敏彦, Inchworm 型人工核酸による遺伝子変異性がん細胞の誘導死効果, 第 68 回高分子学会年次大会, 2019 年 .
- 2) Y. Hamashita, N. Kise, T. Sakurai, Development of Gene Therapeutic Agent Targeting Point Mutated KRAS Gene, The 12th SPSJ International Polymer Conference (IPC2018), 2018.
- 3) 櫻井敏彦, Inchworm 構造をもつ生体高分子の機能展開 - 病理診断から遺伝子治療薬まで -, 高分子研究会 (東広島), 2018 年 .
- 4) 濱下優介, 木瀬直樹, 櫻井敏彦, PNA-PEG コンジュゲート型人工核酸による細胞内遺伝子発現制御, 第 32 回中国四国地区高分子若手研究会, 2017 年 .
- 5) 本田 怜, 木瀬直樹, 櫻井敏彦, ヒポキサンチンを有するペプチド核酸モノマーの合成, 第 32 回中国四国地区高分子若手研究会, 2017 年 .
- 6) 櫻井敏彦, 舩山 渉, 木瀬直樹, 細胞培養を目的としたアテロコラーゲン-プロテオグリカン 3 次元構造体の作製と機能評価, 第 65 回高分子学会年次大会, 2016 年 .
- 7) 濱下優介, 木瀬直樹, 櫻井敏彦, 細胞内遺伝子発現を目的とした PNA-PEG コンジュゲートの設計と機能評価, 第 65 回高分子学会年次大会, 2016 年 .

- 8) 櫻井敏彦, 舩山渉, 木瀬直樹, 細胞外マトリックスからなる 3 次元培養基材による細胞分化への影響, 第 65 回高分子討論会, 2016 年 .
- 9) 濱下優介, 奥野貴士, 木瀬直樹, 櫻井敏彦, SNPs を認識する人工核酸による細胞内遺伝子発現制御, 第 65 回高分子討論会, 2016 年 .
- 10) T. Sakurai, Y. Hamashita, N. Kise, T. Okuno, Delivery of antisense PNA-PEG conjugate modified with cell-penetrating signal and regulation of gene expression in cell, ISNAC2016, 2016.
- 11) 濱下優介, 木瀬直樹, 櫻井敏彦, 膜透過シグナルを有する PNA-PEG コンジュゲートの合成と細胞内遺伝子発現制御, 第 31 回中国四国地区高分子若手研究会, 2016 年 .

〔図書〕(計 2 件)

- 1) 櫻井敏彦, (株)シーエムシー出版, 再生医療・創薬のため 3 次元細胞培養技術, 2018 年, pp.103-112 .
- 2) 櫻井敏彦, 丸善プラネット, ナノテクノロジーが拓く未来の医療, 2018 年, pp.27-49 .

※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。