

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 9月 20日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700918

研究課題名（和文）新たな分子標的薬の開発：SELEX法を用いたEGFに対するRNAアプタマーの創製

研究課題名（英文）The development of novel molecular target drug: Identification of RNA aptamer targeting human epidermal growth factor by SELEX

研究代表者

浜井 洋一（HAMAI YOICHI）

広島大学・病院・病院助教

研究者番号：90423384

研究成果の概要（和文）：ビオチンタグ化 epidermal growth factor (EGF) 蛋白質を作製。この EGF 蛋白質を用い、systematic evolution of ligands by exponential enrichment 法 (SELEX 法) にて、ランダム配列をもつ合成オリゴヌクレオチドをもとに EGF に特異的結合する RNA を選別し、抗 EGF アプタマー (RNA アプタマー) を取得した。このアプタマーによる EGF の受容体への結合阻害を検証した。

研究成果の概要（英文）：The biotin tagged epidermal growth factor (EGF) protein was made. The specific RNA aptamer for EGF protein was identified and acquired from synthetic oligonucleotide with random-sequence by systematic evolution of ligands by exponential enrichment (SELEX) method using the biotin tagged EGF protein. This anti-EGF aptamer could interfere with the binding of EGF to the receptor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：消化器外科

科研費の分科・細目：腫瘍学、臨床腫瘍学

キーワード：SELEX法、RNAアプタマー、EGF、分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

(1) RNA はリボザイム、RNA 干渉、アンチセンスといった機能を有しており、これ利用した医薬品や標的分子と特異的に結合するアプタマー医薬品が開発されている。

(2) RNA アプタマーは抗体に変わる分子認識が可能な物質であり、その3次構造により標的分子に結合する。現在、抗 VEGF アプタマーは臨床応用されている。また、文献的にも多くの癌関連物質に対する RNA アプタマーの

報告があり、臨床試験が進行中のものもある。この特定標的に結合するアプタマーは SELEX 法 (Systematic evolution of ligands by exponential enrichment 法) を用い同定し、化学的に合成することが可能である。

(3) Epidermal growth factor (EGF) はそのレセプターに結合することで多様なシグナルを活性化する。その結果として上皮の増殖、分化、腫瘍発生に関与している。現在、EGF レセプターに対する抗体およびチロシンキ

ナーゼ阻害剤は癌治療において臨床応用されているが、そのリガンドであるEGFをターゲットとする薬剤はない。このEGFレセプターからのシグナル伝達を阻害するためには、リガンドであるEGFのレセプターへの結合を阻害することも必要であると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 分子標的薬としてEGFレセプターに対するチロシンキナーゼ阻害剤および抗体がすでに臨床応用されている。しかし、このシグナル伝達のきっかけとなる、EGFのレセプターへの結合を阻害する作用を持つ分子標的薬はない。このEGFの結合阻害は新たな癌治療の標的となりうる。

(2) 核酸治療薬であるRNAアプタマーは抗体に変わる分子認識が可能な物質で、その3次構造により標的分子に結合する。アプタマーは分子標的薬として抗体医薬品と肩を並べるポテンシャルを有している。

(3) 本研究の目的は① SELEX法による抗EGFアプタマー (RNAアプタマー) の創製、② このアプタマーによるEGFの受容体への結合阻害の検証、③ 癌細胞株における腫瘍増殖抑制効果の評価である。

(4) RNAアプタマー作製といった新たな癌治療薬の創製法に対する基礎的研究としての意義があり、また、抗EGFアプタマーを用いたEGFシグナル伝達阻害作用を有する新たな分子標的治療の開発につながる。

3. 研究の方法

(1) ビオチンタグ化EGF蛋白質を作製し、SELEX法により、N50のランダム配列を持つ合成オリゴヌクレオチドをT7RNA増幅法にて増幅させEGF蛋白質と接触させる。EGF蛋白質と結合したもののみ選別し、結合していないRNAは洗浄廃棄する。この過程を15ラウンド繰り返す。これによりEGF蛋白質に高い親和性を持ち、特異的に結合する抗EGFアプタマー (RNAアプタマー) を取得する。

(2) ゲルシフトアッセイにて、抗EGFアプタマーとEGFの結合における、特異性、親和性の確認を行う。さらにリン酸化チロシンEGFR抗体を用いた、抗EGFアプタマーによるEGFRリン酸化阻害の確認を行う。

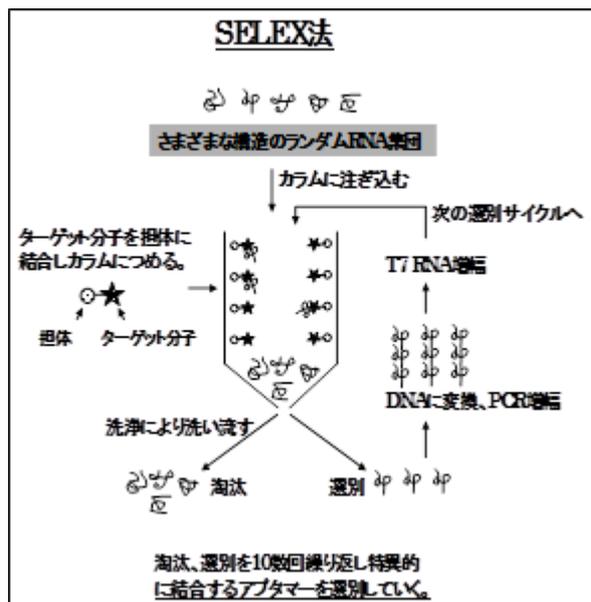
(3) MTTアッセイにて抗EGFアプタマーによる様々な癌細胞株での腫瘍増殖抑制効果の検討を行う。さらに、抗EGFアプタマーと作用機序の異なる抗癌剤およびEGFRに対する分子標的薬との併用において、増殖抑制効果の増強があるかを検証する。

4. 研究成果

(1) ビオチンタグ化EGF蛋白質の作製。EGFタンパク質をコードするcDNAをPinPointTM Xa-1 T-Vectorのクローニングサイトに挿入。大腸菌でビオチンタグ化EGF蛋白質を発現させた。これを精製しビオチンタグ化EGF蛋白質を取得した。

(2) SELEX法を行った。N50のランダム配列をもつ合成オリゴヌクレオチドをPCRにて増幅。T7RNA増幅法を行い、この増幅RNAをEGF蛋白質と結合させる。EGFに結合したRNAのみを回収。Reverse transcriptionにて1st strand DNAを合成し、次に2nd strand DNAを合成する。これをさらにT7プロモーター配列をもつプライマーを用いPCRにて増幅する。再度T7RNA増幅、RNA精製を行い、これを次の選別に使用した。

(3) この一連の淘汰、選別、増幅の操作を15ラウンド繰り返すことによって、EGFに特異的に結合するRNAアプタマー (抗EGFアプタマー) を取得した。



(4) アプタマーの選別

① SELEX法にて得られたRNAのシーケンスを行い、共通配列の検索を行った。

② ゲルシフトアッセイにて、抗EGFアプタマーとEGFとの結合を確認した。

③ リン酸化チロシンEGFR抗体を用いたウェスタンブロット法にて、アプタマーを加えたときのEGFRのリン酸化を定量。抗EGFアプタマーとEGFの結合によるEGFRのリン酸化阻害 (シグナル伝達の阻害) を確認した。

④ ゲルシフトアッセイにてEGFと親和性が高く、EGFRリン酸化を最も阻害する抗EGFアプ

タマーを選別した。

(5) 今後さらに、食道癌、胃癌、肺癌、乳癌細胞株において、抗EGFアプタマーを加えたのちにMTTアッセイを行い、アプタマーによる増殖抑制効果の検討を行う。また、アプタマーと抗癌剤、EGFレセプターに対する分子標的薬剤との併用によって、癌細胞株の増殖抑制の相乗効果の検討を行う。薬剤としては代謝拮抗剤(5FU)、タキサン系薬剤(パクリタキセル、ドセタキセル)、アリキル化剤(シクロフォスファミド)、白金製剤(シスプラチン)、抗癌性抗生物質(エピルピシン)、また、EGFRに対するチロシンキナーゼ阻害剤(Gefitinib, Erlotinib)およびEGFR抗体(Cetuximab)を併用しMTTアッセイを行い、増殖抑制効果を評価する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

① Hamai Y, Hihara J, Emi M, Aoki Y, Miyata Y, Okada M, Airway stenting for malignant respiratory complications in esophageal cancer. *Anticancer Research*, 査読有、32巻、2012, 1785-90, URL:

<http://ar.iijournals.org/content/32/5/1785.long>

② Emi M, Hihara J, Hamai Y, Aoki Y, Okada M, Kenjo M, Murakami Y. Neoadjuvant chemoradiotherapy with docetaxel, cisplatin, and 5-fluorouracil for esophageal cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 査読有、69巻、2012, 1499-505, DOI: 10.1007/s00280-012-1853-7

③ Hamai Y, Hihara J, Emi M, Aoki Y, Okada M. Esophageal reconstruction using the terminal ileum and right colon in esophageal cancer surgery. *Surgery Today*, 査読有、42巻、2012, 342-50, DOI: 10.1007/s00595-011-0103-7

[学会発表] (計8件)

① 青木義朗、迫川賢士、檜原 淳、恵美 学、浜井洋一、岡田守人、田代 聡、5-Fluorouracilの抗腫瘍効果におけるribonucleotide reductase-1の役割、第66回日本食道学会学術集会、2012/6/22、軽井沢

② 青木義朗、迫川賢士、檜原 淳、恵美 学、浜井洋一、岡田守人、田代 聡、5-Fluorouracil作用時のDNA障害におけるribonucleotide reductase-1の役割に関する検討、第112回日本外科学会定期学術集会、2012/4/12、千葉

③ Hihara J, Hamai Y, Emi M, Aoki Y, Sakogawa K, Miyata Y, Okada M, Neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced esophageal cancer: analysis of pattern of recurrence and prognostic factors for survival, European Multidisciplinary Cancer Congress, 2011/9/23, Sweden, Stockholm

④ 迫川賢士、青木義朗、浜井洋一、恵美 学、檜原 淳、岡田守人、田代 聡、食道癌細胞株における抗癌剤感受性とDNA二本鎖切断の修復に関する検討: 2剤併用効果について 第111回日本外科学会定期学術集会、2011/5/26、東京

⑤ Hamai Y, Hihara J, Emi M, Aoki Y, Okada M, Results of neoadjuvant chemoradiotherapy with docetaxel and 5-FU followed by esophagectomy for locally advanced esophageal cancer, 35th ESMO Congress, 2010/10/9, Italy, Milan

⑥ Hamai Y, Hihara J, Emi M, Aoki Y, Okada M, Surgical outcome of esophageal reconstruction using the terminal ileum and right side colon for esophageal cancer, 12th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus, 2010/9/3, Japan, Kagoshima

⑦ Hihara J, Hamai Y, Emi M, Aoki Y, Okada M, Clinical result of neoadjuvant chemoradiotherapy for resectable esophageal cancer, 9th International Conference of the Asian Clinical Oncology Society, 2010/8/25, Japan, Gifu

⑧ 青木義朗、檜原 淳、迫川賢士、恵美 学、浜井洋一、岡田守人、田代 聡、食道癌細胞株における抗癌剤感受性とDNA二重鎖切断の修復に関する検討、第110回日本外科学会定期学術集会、2010/4/8、名古屋

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜井 洋一 (HAMAI YOICHI)
広島大学・病院・病院助教
研究者番号: 90423384

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

檜原 淳 (HIHARA JUN)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・講師

研究者番号：10322744

恵美 学 (EMI MANABU)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：30464308

青木 義朗 (AOKI YOSHIRO)

広島大学・病院・医科診療医

研究者番号：70557074