



Title	膵臓がん治療を目的とするアンチセンス核酸医薬の合成および評価
Author(s)	
Citation	令和3（2021）年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書．2022
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/85615
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

令和3年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな氏	こだま かずき 児玉 和己	学部 学科	薬学部 薬学科	学年	1 年				
ふりがな 共 同 研究者氏名	くにまる りゅうき 國丸 颯生	学部 学科	薬学部 薬学科	学年	1 年				
	ささき ちはる 佐々木 千愛		薬学部 薬学科		1 年				
	しだら はな 設楽 華		薬学部 薬学科		1 年				
	せりざわ ももえ 芹澤 杏萌		薬学部 薬学科		1 年				
アドバイザー教員 氏名	おびか さとし 小比賀 聡	所属	薬学部						
研究課題名	膵臓がん治療を目的とするアンチセンス核酸医薬の合成および評価								
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)								

核酸医薬の一種であるアンチセンス核酸(ASO)は、生体内 RNase H 依存的に標的 mRNA のみを分解する一本鎖 DNA であり、siRNA 同様にタンパク質への翻訳を阻害する。すなわち ASO は、従来の低分子医薬や抗体医薬と異なり、タンパク質の翻訳前に作用できることを意味する。しかしながら siRNA はヌクレアーゼによって分解され、細胞膜透過性も低いという課題を有している。そこで我々は、siRNA と比較して薬物動態に優れている ASO を用いて新たな膵臓がん治療薬の設計・探索及び IGF2BP2 に対する抑制効果とその濃度依存性の評価を行った。その結果設計した ASO のほとんどが IGF2BP2 の発現を有意に抑制しており、濃度依存的な活性の上昇を確認できた。

In silico における IGF2BP2 mRNA の構造解析をもとに IGF2BP2 を標的とする ASO (16 mer) を 23 種設計した。その際、図 1 のように両端 3 mer に Locked Nucleic Acid (LNA, 図 2)、リン酸ジエステル結合部には全てホスホロチオエート修飾 (PS 修飾) を用いた。PS 修飾によって ASO にヌクレアーゼ耐性を持たせることができ、また LNA によって標的 mRNA との結合力を向上させた。RNase H 活性を維持するために配列中央の 10 塩基は DNA を用いた。

DNA 自動合成機を用いてこれら ASO を合成し、HPLC による精製後 LC/MS で純度及び分子量を確認した。これらの ASO をリポフェクションによって膵臓がん細胞 (MIA PaCa-2) に投与し、定量 PCR (qPCR) によって IGF2BP2 の mRNA 量を定量的に評価した。詳細については以下に示す。

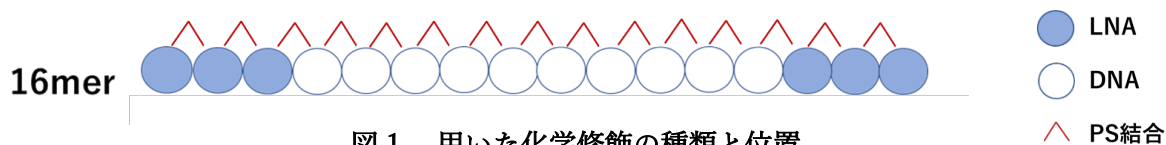


図 1. 用いた化学修飾の種類と位置

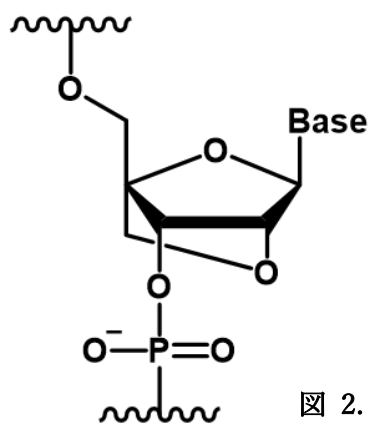


図 2. LNA の構造

○配列設計

①オリゴ核酸の 2 次構造を予測するツール mFold (<http://www.unafold.org/mfold/applications/rna-folding-form.php>)で標的 RNA の高次構造を予測し、二重鎖(ステム)を形成しないループ部位を探索してそれらに相補的な配列を選択した。ループ部位の例を図 3 に示す。

②毒性を誘起する可能性が高い 5'-CG-3'配列を 3 個以上含むものを除いた。

③RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>)を用いて設計した配列の高次構造を予測した。一本鎖核酸については各 ASO の配列を基に解析を実施し、二本鎖核酸については各配列を 5 塩基の DNA 配列で繋ぐことにより解析を行なった (例: ASO + NNNNN + ASO)。

④GGGenome (<https://gggenome.dbcls.jp/ja/>)を用いてオフターゲット効果を予測し、設計した ASO が IGF2BP2 以外に作用しないよう、他の遺伝子に同じ配列が存在しないことを確認した。

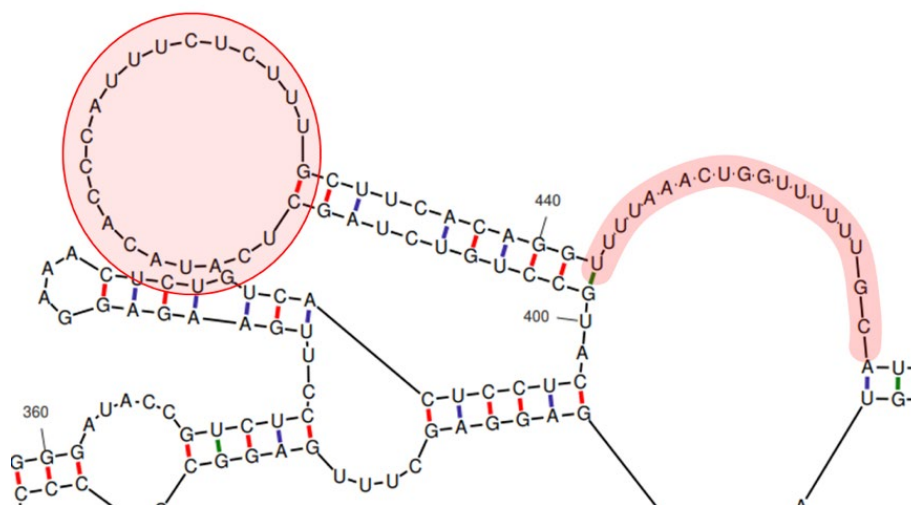


図 3. mFold による RNA の高次構造予測

○オリゴ合成

オリゴヌクレオチドの合成は市販の dG(iBu)、dA(Bz)、dC(Bz)、T、LNA-G(dmf)、-A(Bz)、-C(Bz)、-T のホスホロアミダイトを 0.1 M の無水アセトニトリル溶液として調整し、DNA 自動合成機 (Gene Design ns-8T™)を用いて標準のホスホロアミダイト法に従い、CPG 固相合成によりトリチルオン条件下で行った。全てのオリゴデオキシヌクレオチドについて 1.0 μmol スケールの CPG 担体を用い、活性化剤は Proligo® Reagents, Activator 42™ (5-(ビス-3,5-トリフルオロメチルフェニル)-1H-テトラゾール、0.25 M アセトニトリル溶液)を使用した。LNA のカップリング時間は 5 分で行い、それ以外のプロトコルは一般的な天然の DNA 合成と同条件にて行った。カップリング効率は脱トリチル基の際に生じるトリチルカチオンに由来する光の透過度を積算することにより算出した。

合成したオリゴヌクレオチドは 28%アンモニア水で室温下、1.5 時間処理することで CPG 担体から切り出し、引き続き 55 °C 下、16 時間処理し、塩基部及びリン酸エステル部の脱保護を行った。次に、逆相簡易カラム (Waters, Sep-Pak® Plus C18 Environmental Cartridges)で精製し、さらに逆相 HPLC により精製、純度確認を行った。以下に HPLC 測定条件を示す。

移動相 A 液 : [Water/HEIP/TEA]混合液 (100:1:0.1)
 B 液 : MeOH
 グラジエント B 液濃度 : 10–30% (30 min)
 カラム 分析 : Waters XBridge™OSTC18 Column (4.6×50 mm)
 分取 : Waters XBridge™OSTC18 Column (10×50 mm)
 流速 分析 : 1.0 mL/min
 分取 : 3.0 mL/min
 カラム温度 50 °C
 検出 UV (260 nm)

LC/MS で純度確認を行った。以下に LC/MS 測定条件を示す。

移動相 A 液 : [Water/HEIP/TEA]混合液 (100:1:0.1)
 B 液 : MeOH
 グラジエント B 液濃度 : 10–50% (10 min)
 カラム ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C18, 130 Å, 1.7 µm, 2.1×100 mm
 流速 : 0.3 mL/min
 カラム温度 50 °C

○in vitro 試験

①ヒト膀胱がん細胞株 MIA PaCa-2 細胞 (JCRB 細胞バンク)は、Minimum Essential Medium (Thermo Fisher Scientific : 以下 Thermo)、100× MEM Non-Essential Amino Acids (Thermo)、10%FBS (Thermo)を用いて培養した。インキュベーター内で 37°C、5%CO₂の条件下培養した。

①最終濃度が 50 nM となるように ASO を Lipofectamine3000 (Thermo)を用いたトランスフェクションにより MIA PaCa-2 に導入した。

②トランスフェクションから 24 時間後、totalRNA 抽出を行った。RNeasy Plus Micro Kit(QIAGEN)を用い、手順は添付文書に従い実施した。

③SuperScript™ VILO™ Master Mix(Thermo)を用いて cDNA 化を行った。手順は付属の添付文書に従って行なった。テンプレートとする totalRNA 量は 200 ng とした。

④StepOnePlus device (Thermo)、Fast SYBR Green Master Mix (Thermo)を用いて qRT-PCR を行った。なお、定量した IGF2BP2 mRNA、GAPDH mRNA (内部標準用)はそれぞれ個別に反応を実施し、ΔΔCt 法にて解析した。プライマーの配列を表 1 に示す。

⑤活性が良かった 1 種の配列について濃度依存性の評価を行った(最終濃度 5、10、20、50、100 nM)。

表 1. 用いたプライマー配列

Gene		Oligonucleotide sequence (5'→3')
IGF2BP2	Forward Primer	CGGGGAAGAGACGGATGATG
IGF2BP2	Reverse Primer	GGTAGTCCACGAAGGCGTAG
hGAPDH	Forward Primer	GGTCACCAGCGCTGCTTTT
hGAPDH	Reverse Primer	GTAAACCATGTAGTTGAGGTCAATGAAG

【結果】

○配列設計

全 23 種の配列候補を決定した (図 4)。IGF2BP2 の mRNA は 4154 塩基長であり、5'末端の塩基を 1、3'末端の塩基を 4154 とした。IGF2BP2 mRNA 725-740 に結合する ASO は ASO725 のように各 ASO に命名した。

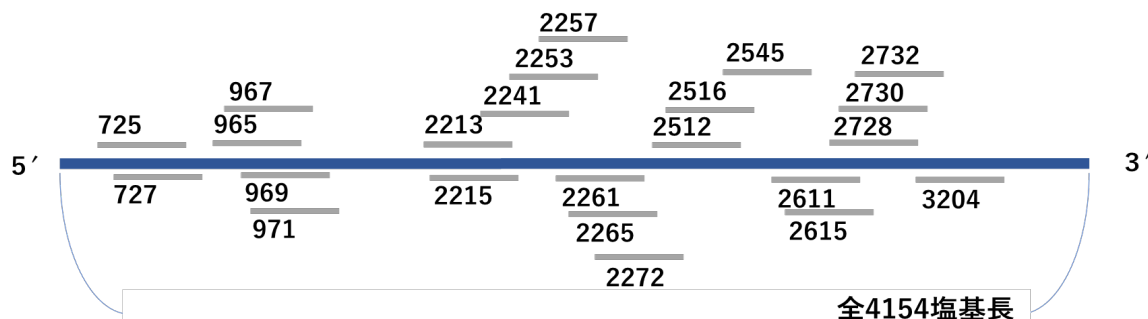


図 4. IGF2BP mRNA と ASO 候補配列の模式図

表 2. 設計した ASO の塩基配列及び Deconvoluted Mass

Name	Sequence	ESI-Mass	
		Calculated Mass	Deconvoluted Mass
725	5'-d(TGAtgttctttatGGT)-3'		
727	5'-d(AGTgatgttctttATG)-3'		
965	5'-d(TTTtcttcaaattT _{5Me} CT)-3'		
967	5'-d(AATtttcttcaaaTTT)-3'		
969	5'-d(T _{5Me} CAattttcttcaAAT)-3'	5224.5	5224.8
971	5'-d(GTTcaattttctt _{5Me} CAA)-3'		
2213	5'-d(AAAatatattaccG _{5Me} CT)-3'	5267.5	5266.8
2215	5'-d(_{5Me} CTAaaatatatta _{5Me} C _{5Me} CG)-3'	5295.5	5294.8
2241	5'-d(TTAgttgagttatTTG)-3'		
2253	5'-d(TAaaaattggagtTGA)-3'		
2257	5'-d(TGAttaaaaattgGAG)-3'		
2261	5'-d(TAAttgattaaaaATT)-3'	5307.5	5306.7
2265	5'-d(TTAataattgattAAA)-3'	5307.5	5308.1
2272	5'-d(AAAaaaattaataATT)-3'		
2512	5'-d(AGAaatgggtgtaTGA)-3'	5414.5	5415.8
2516	5'-d(AAagagaaatgggTGT)-3'	5423.5	5423.0
2545	5'-d(G _{5Me} CAaaaaaccagtTTA)-3'		
2611	5'-d(GAGaagaaggggaGGG)-3'	5514.5	5514.0
2615	5'-d(GATggagaagaagGGG)-3'		
2728	5'-d(_{5Me} CG _{5Me} CttttgttcttTTT)-3'	5228.5	5228.9
2730	5'-d(TT _{5Me} Cgctttgttc _{5Me} CTT)-3'	5228.5	5228.0
2732	5'-d(GTTtcgctttgtT _{5Me} C _{5Me} C)-3'		
3204	5'-d(TG _{5Me} CacacttggacTGT)-3'		

自ら合成した 10 配列については Deconvoluted Mass (多価イオンのスペクトルから変換されたモノアイソトピック質量 [各元素の最も存在度の大きい同位体のみから構成される化学種を想定した質量]) を表 2 に示す。残りの配列は外部発注し、これらを用いて *in vitro* 試験を行った。

○オリゴ合成

代表的なデータ(ASO2728)を一例のみ示す。

図 5 はトリチルモニターのデータであり、トリチルカチオン溶液の発色程度を見るものである。これは自動合成機 (Gene Design ns-8T™) によって ASO が合成された際、どの程度の効率で進んだかを指標として示している。100%前後で推移しており、合成は問題なく進んだと分かる。

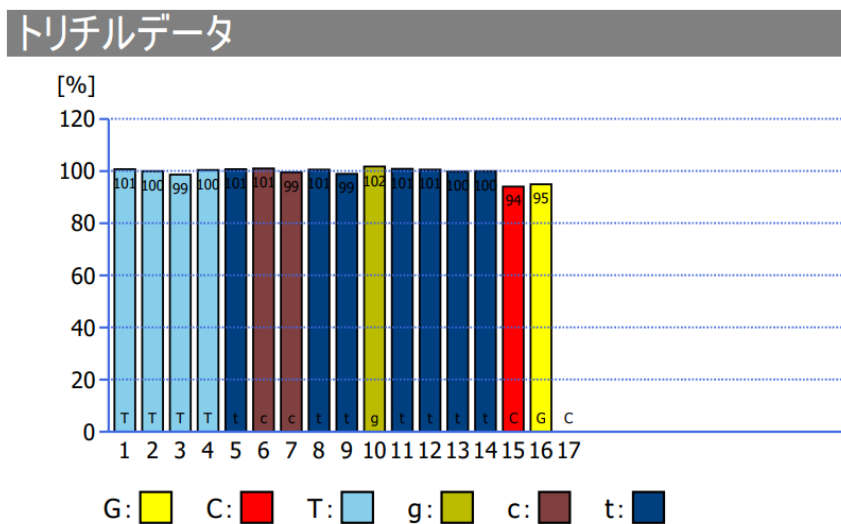


図 5. ASO2728 合成時のトリチルデータ

図 6 は LC 結果であり、純度の指標となる。5-6 分の間に単一のピークが見られることから、合成した ASO がほとんど不純物なく精製されたことが分かる。

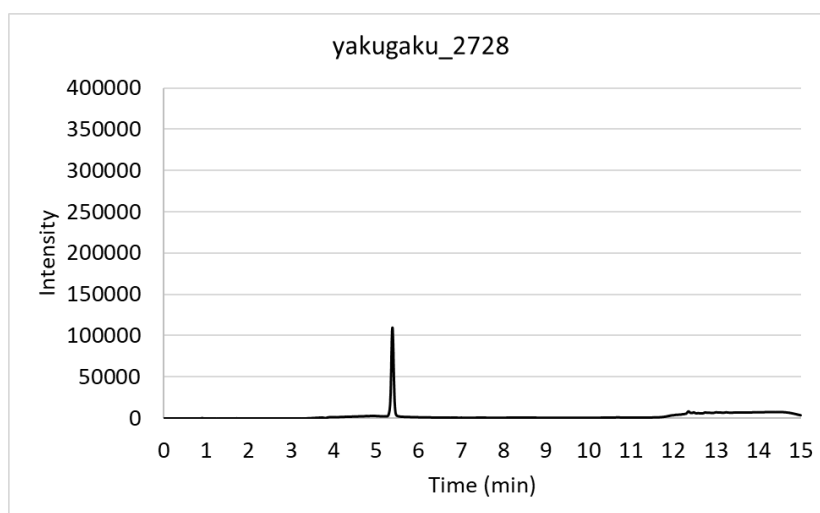


図 6. ASO2728 LC 結果

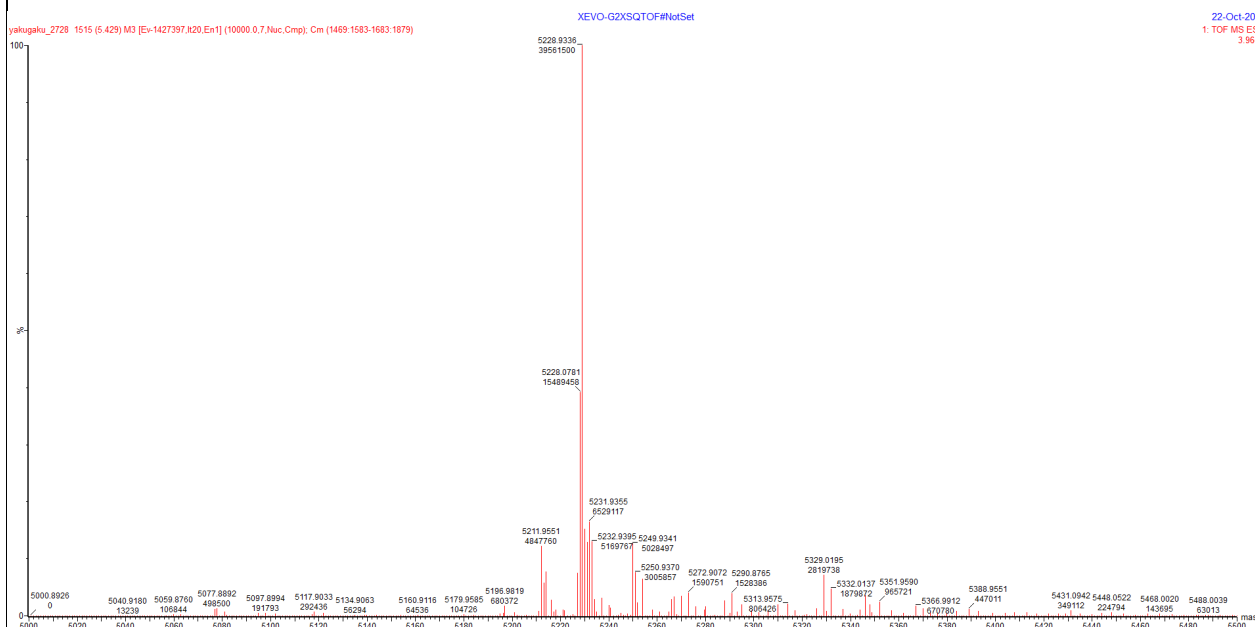


図 7. ASO2728 MS 結果

図 7 は MS 結果である。計算質量が 5228.5、MS によって得た Deconvoluted Mass が 5228.9 より LC 結果で見られた単一の物質が確かに設計した ASO であることが確認できる。

○in vitro 試験

ASO を導入していない NT の IGF2BP2 発現量を 1 として、ASO を導入した細胞における IGF2BP2 発現量を評価した。この時、GAPDH を内部標準として Ct 値の補正を行なった。結果を図 8 に示す。

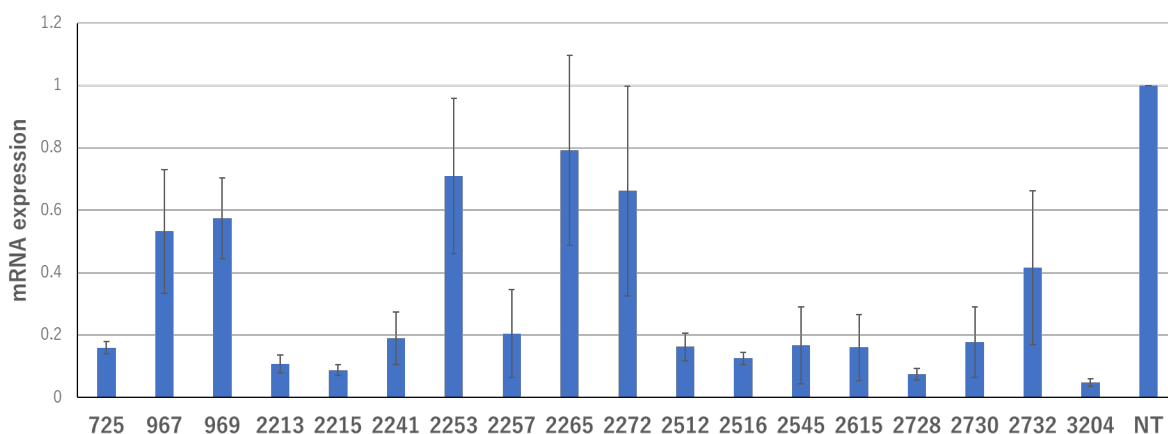


図 8. ASO 導入による MIA PaCa-2 細胞内の相対的 IGF2BP2 発現量

時間の都合により実験を行えなかった 5 種を除き、23 種中 18 種の結果を示した。棒グラフはそれぞれの発現量を示す平均値、エラーバーは 3 回の実験による標準誤差を示す。データを得られた 18 種だけでも、ほとんどの ASO が IGF2BP2 の発現量を有意に減少させていた。また、20%以下にまで発現量を減少させた配列も多く見られた。

また、ASO2728 について濃度依存性の評価を行ったところ、**図 9** に示す結果が得られた。今回は 5~100 nM の濃度領域で検討を行なった。この範囲ではおよそどれも IGF2BP2 の発現を 20%程度にまで抑制していたが、その活性は濃度が高くなるにつれ IGF2BP2 の発現量が低下していることから濃度依存性が確認できた。

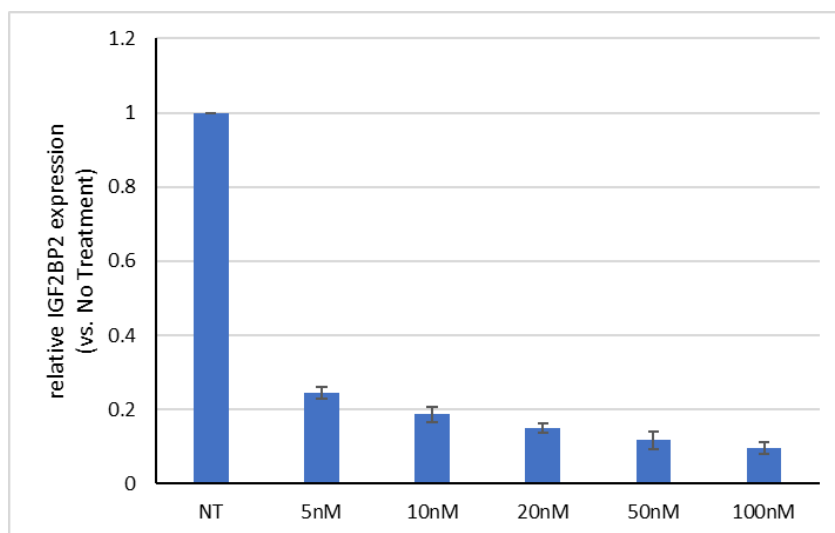


図 9. ASO2728 の濃度変化による IGF2BP2 発現量の変化

【考察】

IGF2BP2 の発現量が NT と比較して 40%を上回る配列は 6 種類あった。これらの活性が他の配列より劣った理由として、ダイマーを形成することによる安定化が比較的大きいことを考えた。ダイマー形成時に放出すると予測されるエネルギーの値を**表 3** に示す。2265 を除き、5 種類とも 0.00 kcal/mol であった。また、発現量が 0.1 程度まで減少している 3204 は 2.90 kcal/mol 安定化することから、ダイマー形成による安定化は原因の 1 つと推定されるが大きな要因としては考えにくい。

また、mFold による RNA の高次構造予測は複数あり、標的とした 16 塩基からなる配列が必ずループとなるとは限らない。実際 ASO967、969 が結合すると考えたループ部位は 4 番目に取りやすいと予測される高次構造に基づいていた。したがって、標的部位が二重鎖を形成しており活性が他より低くなったことも理由の 1 つであると考察する。

さらに、同じ 40 塩基程度からなるループ部位に結合すると予測した ASO2253、2257、2265 の 3 種における活性の差を考える。ASO2257 のみ活性が高かった理由には、ループのちょうど中央部に結合することが考えられる。ループの両端に近い部分より立体的な障害も少なく mRNA に結合できたと考える。

以上よりダイマー形成による安定化及び RNA の高次構造、あるいはその他の要因が複合的に結果に影響していると推定される。今後は IGF2BP2 の発現量低下による細胞死、細胞増殖抑制の有無を検討したい。また、16 mer という長さ、用いる人工核酸の変更に伴う活性の変化についても精査し、新たな膀胱がん治療薬につなげていきたい。

表 3. 各 ASO におけるダイマー形成時放出されるエネルギー値

ASO 番号	ダイマー形成時放出されるエネルギー値 (kcal/mol)
725	0.00
967	0.00
969	0.00
2213	1.90
2215	1.90
2241	2.00
2253	0.00
2257	0.00
2265	3.90
2272	0.00
2512	0.10
2516	0.00
2545	1.30
2615	0.00
2728	0.00
2730	0.00
2732	0.00
3204	2.90