

# がん治療を目的とした inchworm 型人工核酸の創成と応用

研究代表者

櫻井敏彦 鳥取大学大学院工学研究科 准教授

共同研究者

村田晋一 和歌山県立医科大学医学部 教授



## 1. 研究の背景と達成目標

### (1) 研究の狙い

多様ながん細胞で確認されている遺伝子 1 塩基変異の検出並びに遺伝子治療薬の開発を目的とした新規人工核酸 (inchworm 型 PNA-PEG コンジュゲート; i-PPC) を調製し、遺伝子治療薬あるいは検出プローブとしての可能性について検討することを目的とした。遺伝子変異が原因となり抗 EGFR 抗体薬の薬効が期待できない遺伝子変異性がん細胞の細胞死を誘導する遺伝子治療薬としての可能性について検討するとともに、早期にがん組織周辺の遺伝子変異を認識し、がん転移範囲を遺伝子レベルでイメージングすることのできる新たな核酸プローブの開発を目的とした。

### (2) 研究項目毎の目標

#### ① 遺伝子治療を目的とした機能性 i-PPC の調製と遺伝子発現制御

- 1) 遺伝子変異部を認識する塩基配列の特定、およびシグナル化合物を配した機能性 i-PPC の合成
- 2) 機能性 i-PPC の物性評価～相補鎖形成挙動の解析、細胞内輸送挙動の評価～
- 3) 機能性 i-PPC による細胞内遺伝子発現制御

#### ② 遺伝子レベルイメージングを目的とした機能性 i-PPC の調製と機能評価

- 1) 遺伝子変異性がん細胞を認識する機能性 (蛍光ラベル化) i-PPC の調製と相補鎖形成挙動の解析
- 2) がん転移部のイメージング

## 2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

### (1) 研究結果の概要

#### ① 遺伝子治療を目的とした機能性 i-PPC の調製と遺伝子発現制御

特定のがん細胞に見られる 1 塩基変異を認識し、かつ細胞内輸送可能な機能性 i-PPC をマイクロウェーブにより合成した。この機能性 i-PPC は、機能化されていない i-PPC と比較すると顕著にサイトゾルへリリースでき、細胞内で 1 塩基の違いを認識して遺伝子発現を制御することが可能であった。

#### ② 遺伝子レベルイメージングを目的とした i-PPC の調製と機能評価

がん転移イメージングを目的として、遺伝子変異性がん部位を検出するための蛍光ラベル化 i-PPC を調製した。この機能性 i-PPC は低温領域 (~35°C 以内) で 1 塩基を認識するよう設計されており、現在、検体組織標本のがん転移部の染色プロトコルを確立している。

### (2) 社会、学術へのインパクト

1 塩基を認識する人工核酸の分子構造として、特定の塩基配列に限定されるものの inchworm 型の有用性が提唱できる点は学術的に興味深いと思われる。がんは早期発見による完治率は高い一方で、高齢者の罹患率

は年々増加し、今後も増加傾向が見られる。最新の治療薬では対応できない遺伝子変異性のがん治療分野において、機能性 i-PPC の有用性がわずかながら示せたのではないかと考えている。

### 3. 研究成果

#### ① 遺伝子治療を目的とした機能性 i-PPC の調製と遺伝子発現制御

- 1) マイクロウェーブを用いた固相合成法により、これまで合成が困難であった機能性 i-PPC を比較的高効率で合成することができた。様々なシグナル化合物を配した機能性 i-PPC を合成し、HPLC により分取精製後、高純度な機能性 i-PPC を用いて以下の物性について評価した。
- 2) 融解温度測定により相補鎖形成における熱力学パラメータを算出した結果、生体内温度近傍で 1 塩基認識を可能とする機能性 i-PPC が合成できた。また、機能性 i-PPC のサイトゾルへのリリースについて検討した結果、機能化されていない i-PPC と比較して顕著にサイトゾルへリリースされることが蛍光顕微鏡観察から示された。
- 3) 機能性 i-PPC が細胞内で 1 塩基の違いを認識して遺伝子発現を制御することが示された。

#### ② 遺伝子レベルイメージングを目的とした i-PPC の調製と機能評価

- 1) 検体組織標本を対象としたがん転移部分の遺伝子レベルでの視覚化を目的として、蛍光ラベル化 i-PPC を合成し、相補鎖形成時の熱力学パラメータについて評価した結果、目的の機能性 i-PPC を高純度で得ることができた。
- 2) 作製した検体組織標本に対し、染色プロトコルを確立している。

### 4. 今後の展開

本研究の成果は、生体内温度近傍で1塩基を認識できる人工核酸 (i-PPC) の遺伝子治療薬としての展開について報告しており、今後 SNPs を対象とした幅広い遺伝子疾患への応用が期待される。なお、特許申請に向け本報告書には詳細なデータの記載を一切控えたため、具体性に欠ける点多々ありますことをお詫びいたします。

### 5. 発表実績

- [1] 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、濱下優介、木瀬直樹、櫻井敏彦、第 31 回中国四国地区高分子若手研究会、2016 年 11 月 24, 25 日、とりぎん文化会館(鳥取市)。
- [2] Delivery of antisense PNA-PEG conjugates modified with cell-penetrating signal and regulation of gene expression in cell., T. Sakurai, Y. Hamashita, T. Okuno, N. Kise, The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, September 27(Tue)-29(Thr), 2016, 100th Anniversary Hall (Kumamoto University, Kumamoto)。
- [3] SNPs を認識する人工核酸による細胞内遺伝子発現制御、濱下優介、奥野貴士、木瀬直樹、櫻井敏彦、第 65 回高分子討論会、2016 年 9 月 14~16 日、神奈川大学横浜キャンパス(神奈川県横浜市)。
- [4] 細胞内遺伝子発現制御を目的とした PNA-PEG コンジュゲートの設計と機能評価、濱下優介、木瀬直樹、櫻井敏彦、第 65 回高分子学会年次大会、2016 年 5 月 25~27 日、神戸国際会議場(神戸市)。
- [5] 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、濱下優介、木瀬直樹、櫻井敏彦、第 30 回中国四国地区高分子若手研究会、2015 年 11 月 5, 6 日、にぎたつ会館(松山市)。
- [6] Inchworm 型人工核酸の設計と機能評価、共同研究セミナー、2016 年 7 月 14 日、和歌山県立医科大
- [7] 特許取得準備中