

## がん原遺伝子 KRAS に対する テーラーメイド治療のための siRNA 開発

代表研究者

程 久美子

東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻 准教授



### 1. 研究目的

siRNA (small interfering RNA) を用いた RNA 干渉 (RNAi) 法は、目的とする遺伝子を特異的に抑制できる優れた手法として広く利用されている。しかしながら、哺乳類細胞で有効な siRNA の塩基配列は極めて限定的であり、主要な遺伝子の中には既存の方法で抑制することが困難なものが多い。がんの原因遺伝子の 1 つである KRAS はさまざまながん原遺伝子の中でも最も主要な遺伝子の 1 つとされており、膵臓がんの 95%、大腸がんでは 45%、肺がんでは 35% が KRAS の変異によるものである。しかし、KRAS は従来の RNAi 法では抑制することが難しい塩基配列をもつ。また、がん細胞では極めて限られた 3 ヶ所の部位にそれぞれ 1 塩基置換が見られアミノ酸に変異が生じる (図 1)。その塩基置換のパターンは個人によって異なっている。本研究は、このような技術的困難に挑戦し、申請者らの RNAi 研究の基盤的知見に基づいて、KRAS を例として 1 塩基の変異を識別して特異的に抑制するテーラーメイド型 siRNA を開発することを目的とする。

### 2. 研究内容

近年の次世代シーケンス技術の進展により、医療の中で遺伝子解析を実施することが可能となり、2019年6月には日本国内において「がんゲノム医療」の遺伝子検査が保険収載となった。がんゲノム医療とは、がん患者のがん組織を用いて多

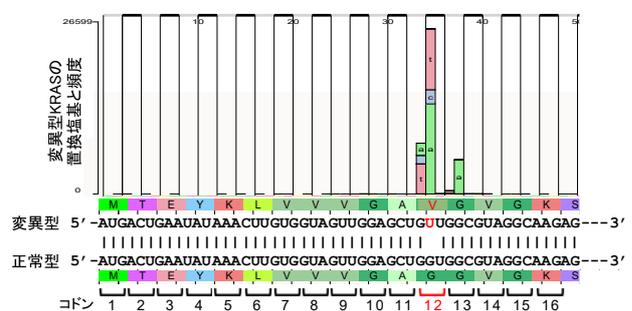


図 1 変異型 KRAS における特異的塩基置換と正常型 KRAS とコドン 12 の 2 塩基目に変異がある変異型 KRAS 遺伝子の配列比較

数の遺伝子を同時に調べ (がん遺伝子パネル検査)、変異をもつ遺伝子を特定して一人一人の体質や病状にあわせた治療を行う医療である。しかしながら、遺伝子パネル検査の臨床試験報告によると、検査を実施した全患者のうち、有効な治療法が選定できた患者は全体の 10% 程度にとどまる。このことは、がんゲノムの解析により、疾患の原因が遺伝子レベルで理解できる段階に到達したにも関わらず、多くの場合、その治療法は存在しない、という矛盾した状況であることを意味する。本研究は、そのような状況を打破すべく、がん原遺伝子を対象とし、塩基変異 (塩基置換、遺伝子融合など) をもつがん原遺伝子であればどのような遺伝子であっても、正常遺伝子と区別して特異的に抑制するという高精度のパーソナライズド技術を開発する研究である。

## 2-1 代表的ながん原遺伝子である KRAS を例として、それらの点突然変異遺伝子を正常型と区別して抑制する siRNA を開発した。

研究代表者らは、先行研究において、哺乳類細胞で有効な siRNA は一定の配列規則性をもつことを明らかにした。応募者らの方法は現在、世界的に最もスタンダードな方法の 1 つとして広く利用されている。しかし、KRAS をはじめとする多くの疾患関連遺伝子においては、1 塩基変異がみられる部位は限定されており、従来法による siRNA の設計は難しい。そこで、RNAi の分子メカニズムを念頭に、全く新しい発想に基づいた次世代型 siRNA 設計法を構築し、「正常型 KRAS には影響を与えず、1 塩基しか違いがない変異型 KRAS のみを特異的に抑制できる siRNA の配列設計」を完成させた。

## 2-2 変異型 KRAS のみを特異的に抑制する siRNA の効果を、変異型 KRAS を発現する膵臓がん由来培養細胞を用いて解析した。

ヒト膵がん由来の AsPC-1 (35G>A ホモ)、PANC-1 (35G>A ヘテロ) 細胞は KRAS 遺伝子のコドン 12 の 2 塩基目に変異をもつ細胞株である。これらを用いて設計した当該変異特異的 siRNA の有効性を検討した。野生型の KRAS をもつ BxPC-3 細胞は、変異型 KRAS に対する siRNA を導入しても、細胞増殖の速度に異常は認められなかった。一方で、AsPC-1 および PANC-1 細胞は変異型 KRAS に対する siRNA を導入すると細胞増殖がきれいに抑制された。このことから、AsPC-1 および PANC-1 細胞は KRAS 遺伝子に変異したことによってがん化しており、異常な細胞増殖が起こっているが、変異型 KRAS に対する特異的 siRNA によって変異型 KRAS の発現のみを抑制すると異常な増殖が停止すると考えられた。このことから、今回開発した変異型 KRAS 特異的な siRNA は内在性の変異に対しても有効であると考えられた。

本研究で開発した siRNA のように、正常遺伝子には影響をあたえず、変異がある遺伝子のみを標的とする医薬品は、従来手法では開発困難であった。一方で、塩基変異によるアミノ酸置換をもつタンパク質を原因とする疾患はがんを含めて非常に多く、本研究手法でターゲットとできるがん原遺伝子は数 100 種類存在する。また、ヒトの疾患に関連している遺伝子異常は 60,000 以上存在し、そのうち約半数は 1 塩基変異によって引き起こされる。さらに、1 塩基変異を区別できれば、融合遺伝子を正常遺伝子と区別して抑制する手法の構築も可能であり、数 10 種類の疾患の原因となる融合遺伝子を特異的に抑制する手法としても利用可能である。したがって、当手法は、がんに限らず様々な遺伝性疾患をターゲットとすることが可能な RNA のプラットフォーム技術としての展開可能性があり、本研究の有用性は極めて高い。First in class (画期的医薬品) とは、新規性・有用性が高く、化学構造も従来の医薬品と基本骨格から異なり、従来の治療体系を大幅に変えるような独創的医薬品を指し示す言葉であるが、本手法は、将来的に、まさに First in class となりえる手法の開発といえる。

## 3. 発表 (研究成果の発表)

Takahashi T, Ui-Tei K. Mutual regulation of RNA silencing and the IFN response as an antiviral defense system in mammalian cells. *Int. J. Mol. Sci.* 21, E1348. 2020.

Komori C, Takahashi T, Nakano Y, Ui-Tei K. TRBP-Dicer interaction enhances HIV-1 TAR RNA translation via TAR microRNA processing, repressing host-cell apoptosis. *Biol. Open.* 9, bio050435, 2020.

Takahashi T, Nakano Y, Onomoto K, Yoneyama M, Ui-Tei K. LGP2 virus sensor enhances apoptosis by upregulating apoptosis regulatory genes through TRBP-bound miRNAs during viral infection. *Nucleic Acids Res.* 48, 1494–1507, 2020.

Tian S, Terai G, Kobayashi Y, Kimura Y, Abe H, Asai K, Ui-Tei K. A robust model for quantitative prediction of the silencing efficacy of wild-type and A-to-I edited miRNAs. *RNA Biology* 17, 264-280. 2020.

Takahashi T\*, Nakano Y\*, Onomoto K, Murakami F, Komori C, Suzuki Y, Yoneyama M, Ui-Tei K. \*same contribution LGP2 virus sensor regulates gene expression network mediated by TRBP-bound microRNAs. *Nucleic Acids Res.* 46, 9134-9147.

Yoshiaki Kobayashi, Kanji Shiga, Shen Tian, Kumiko Ui-Tei Systematic 2'-O-methyl modification revealed that siRNA seed region consists of two functionally different regions. 日本核酸医薬学会第5回年会 (大阪 2019)