

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：「がん関連遺伝子産物の転写後発現調節を標的とした治療法の開発」
(がん抑制遺伝子の翻訳抑制機構を標的とした核酸医薬の開発)
2. 研究開発代表者： 夏目 徹 (国立研究開発法人産業技術総合研究所
創薬分子プロファイリング研究センター)

3. 研究開発の成果

多くの癌に於いて癌抑制遺伝子の変異が見つかっており、癌抑制遺伝子の機能不全が癌化の一つの原因として考えられる。しかしながら、癌に於いて全ての癌抑制遺伝子に変異が起こっているわけではなく癌抑制遺伝子自身には変異が無くその発現量のみが低下している例も報告されている。この事から、変異の無い癌抑制遺伝子の発現を増強させる事ができれば細胞の癌化抑制が可能であると考えられる。我々はこれまでに、質量分析を用い特定の mRNA の翻訳を抑制しているタンパク質の同定技術及び、同定した翻訳抑制タンパク質と mRNA の結合についてアンチセンスオリゴを用いて阻害し、目的のタンパク質の発現を増強させられる技術=Up-Sense-Oligo (USO) 技術を開発している。本研究においては、USO 技術を用いて変異の無い癌抑制遺伝子の発現を増強、癌細胞の癌抑制機構を回復させ癌を抑制するという、癌抑制遺伝子 mRNA の制御を標的とした核酸医薬の開発を行うこととした。5年間の研究計画では、マウスを用いた動物実験により開発した薬剤の薬効を確認する事を目指した。

我々はまず USO の標的癌抑制遺伝子として、発現増加させることによりがんの抑制が期待でき、また、mRNA レベルでの負の制御が存在考えられる p53 遺伝子を選択した。p53-mRNA 翻訳抑制タンパク質が結合すると考えられる p53-mRNA-3' UTR 領域及び比較用のコントロール RNA を合成、合成した RNA に免疫沈降のための分子タグを化学的に付加、細胞ライゼートと混ぜ合わせ免疫沈降法により RNA 結合タンパク質を精製、質量分析を用いそれぞれの RNA に結合するタンパク質を網羅的に同定し、p53-mRNA-3' UTR 領域特異的に結合するタンパク質群を同定した。次に、同定したタンパク質群の中から RNAi を用いた解析により mp53-mRNA の翻訳を抑制しているタンパク質として X を同定した。その後、mRNA と X の結合領域について p53-mRNA の欠損変異体を用いた実験により決定、両者の結合を阻害するアンチセンスオリゴ USO1 を設計し合成した。合成した USO1 を p53 が正常であるがん細胞、MCF7 細胞にトランスフェクトした結果、USO1 が、p53 タンパク質を顕著に増加させる活性を持つこと、p53 により誘導される事が知られている細胞周期を停止及び細胞死を引き起こす事も明らかとした。この活性は、p53 のノックダウンにより相殺されること、また、p53 に変異のある細胞においては効果が見られない事からも、USO1 の持つ細胞周期を停止及び細胞死誘導活性は我々のコンセプト通り p53 の発現増加によるものであると考えられる。我々はさらに USO1 について、動物レベルでの薬効を確認するために理化学研究所の協力のもと、担がんモデルマウスを用いた動物実験による薬効評価を行った。具体的には、ヌードマウスの皮下に、(1) USO1 を導入したヒト MCF7 がん細胞、(2) ネガティブコントロールとして Mock の MCF7 がん細胞、(3) p53 タンパク質を増加させる活性を持たない USO2 を導入した MCF7 がん細胞をそれぞれ移植、一定期間後に皮下に形成された腫瘍を採材してその重量を測定することにより生体内 (in vivo) がん形成能における USO1 の効果の確認する実験を行った。その結果、USO1 導入 MCF7 細胞を移植したマウス群において、採材された腫瘍組織重量の有意な低下が見られた。この結果は、動物実験レベルでの USO1 の抗腫瘍効果を示すものである。以上、我々は p53 の発現量を増加させる活性をもつ USO1 の創生に成功、マウスを用いた動物実験により開発した薬剤の薬効を確認するという初期設定目標を達成できたと考えている。