

がん選択的核酸医薬療法の創出

所属：国立研究開発法人国立がん研究センター 研究所がん RNA 研究分野

助成対象者：吉見 昭秀

共同研究者：無し

本研究の開発目標は、TP53-IR 変異を標的とする ASO を開発し、IR を修正して p53 蛋白質の発現を回復させ、抗腫瘍効果を得ることによって Proof-of-concept (POC) を獲得することである。本研究では、申請者のビッグデータ解析により同定した、Intron retention (IR) を誘導する TP53 遺伝子変異 (TP53-IR 変異) を内因性に発現する細胞株を樹立し、TP53-IR 変異による IR を修正するには、Intronic Splicing Silencer (ISS) を核酸医薬 (ASO) でブロックする戦略を採用した。次に ISS 候補配列に対する ASO を計 13 種類デザインし、それぞれの Intron retention 修正効果を評価した結果、今回注目する TP53-SAV による Intron retention に対して効果的に修正効果を有する標的配列および ASO のデザインに成功した。今後、ASO 治療単独、あるいは現状の治療法と ASO 治療を組み合わせたテイラーメイド医療を創出することにより、様々ながん種において治療成績を改善・向上させることが期待される。

The goal of this study is to obtain proof-of-concept (POC) by developing ASOs targeting intron retention (IR) associated variants (IRAVs) in TP53 to correct the IR and restore p53 protein expression, thereby achieving anti-tumor effects. In this study, we established cell lines expressing an endogenous TP53 gene mutation that induces IR. To correct IR caused by a TP53-IRAV, a strategy of blocking the intronic splicing silencer (ISS) with nucleic acid drugs (ASOs) was adopted. Thirteen ASOs were designed for candidate ISS sequences, and the effectiveness of

each ASO in correcting IR was evaluated. As a result, successful design of target sequences and ASOs effective in correcting IR induced by TP53-IRAV was achieved. In the future, it is expected that by creating tailored medicine combining ASO therapy alone or in combination with current therapies, improvements in treatment outcomes can be achieved for various cancer types.

【背景と目的】

本研究では、TP53-IR 変異（変異によって TP53 自身に IR (intron retention) を誘導するもの）を標的として核酸医薬（ASO）を開発し、IR を修正して p53 蛋白質の発現を回復させ、抗腫瘍効果の Proof-of-concept (POC) を獲得することを目標とする。これまで TP53 遺伝子変異を標的とした特異的治療は臨床的成功の報告例がなく、当該研究課題が達成された場合には様々ながん種において、現状の治療法を変革することが期待される。ASO 治療単独、あるいは現状の治療法と ASO 治療を組み合わせたテイラーメイド医療を創出することにより、様々ながん種において治療成績を改善・向上させることが期待される。約 3.0% のがん患者に TP53-IR 変異が同定されることから、本研究開発が成功した場合には、がん患者全体の全生存率や無再発生存率の向上に寄与することから、大きな臨床的・科学的・社会的インパクトが期待される。

【成果】

① 研究開発項目：TP53-IR 変異細胞株の樹立と解析

本研究では 7 種類の TP53-IR 変異を KI した細胞および、野生型 WT（同一塩基を KI したコントロール）、ヘテロノックアウト (KO)、ホモ KO のコントロール細胞を含めて計 10 種類の Isogenic な細胞株の樹立に成功した。また、これらのスプライシング異常により p53 蛋白質の発現量が低下される

ことが予想されるが、実際に Western blotting で評価したところ、それぞれの細胞株で p53 発現量の低下を認めた（図 1）。また、細胞株から採取した RNA を用いてスプライシング解析および遺伝子発現解析を実施した。RNA sequence に基づくスプライシング解析の結

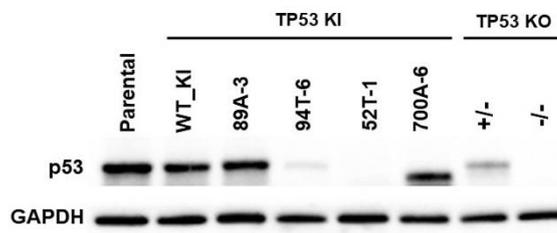


図 1 Western blotting による各 TP53 変異 KI 細胞における p53 発現量の評価。

果、想定する TP53 遺伝子のスプライシング変化が観察された（図 2、図 3）。

以上の検討より、今回樹立された TP53-IR 変異 KI 細胞については、それぞれ p53 に関連した分子生物学的形質が観察され、実際に TP53-IR 変異が TP53 遺伝子機能を喪失させることが確認された。

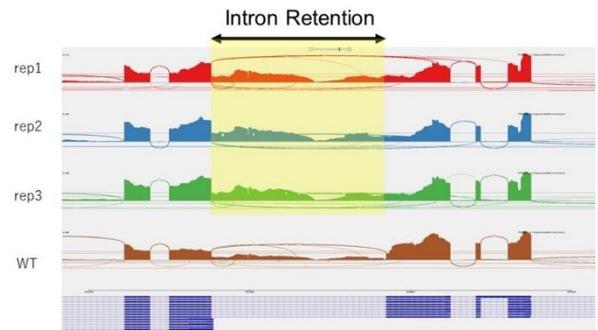


図 2 TP53-IR 細胞 (triplicate) および野生型 WT 細胞由来の RNA-seq データをもとに作成した Sashimi plot。

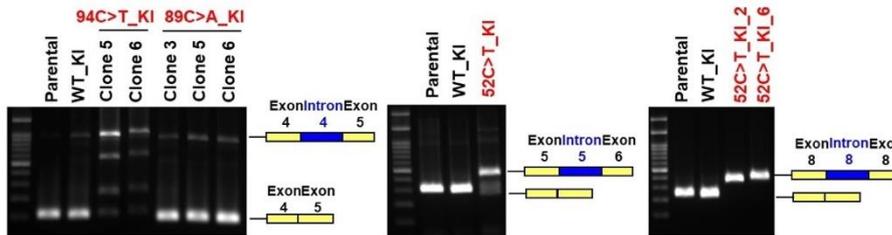


図 3 各 TP53 変異 KI 細胞におけるスプライシング異常の RT-PCR による評価。

② 研究開発項目：IR 修正配列の同定と ASO による修正確認

標的候補配列に対する ASO を計 13 種類デザインし、それぞれの Intron retention 修正効果を RT-PCR および定量 PCR で評価した。その結果、ASO-1（および ASO-2）が中でも効率よく Intron retention を修正することが判明した（図 4）。

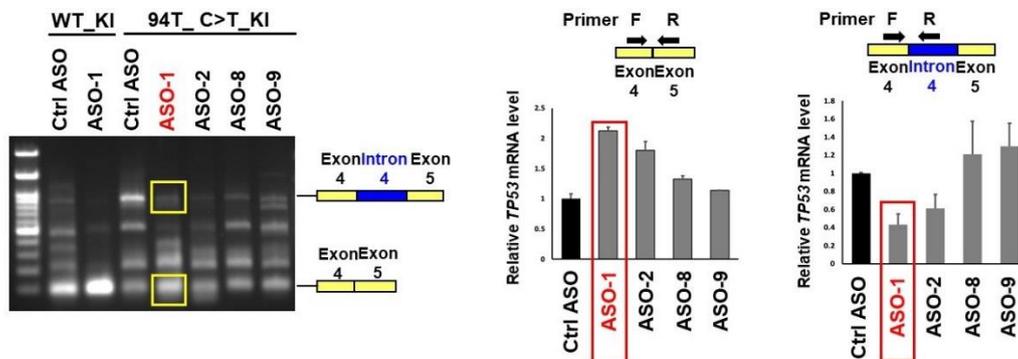


図 4 デザインした ASO の Intron retention 修正効果の比較。

以上より、今回注目する TP53-IR 変異による IR に対して効果的に修正効果を有する標的配列および ASO のデザインに成功したと考えられる。

【今後の展開】

上記の検討により TP53-SAV 変異による p53 機能喪失が確認され、また、TP53-SAV によるスプライシング異常を修正する ASO の標的となる配列が同定された。そこで、現在 TP53-

IR 変異を発現する細胞株を用いた異種移植 (Cell-line Derived Xenograft: CDX) マウスモデルを樹立し、in vivo における ASO 治療による薬効評価を準備中である。今後は、ベストな薬効・薬物動態を得ることができる新しいがん核酸医薬療法の開発に取り組み、知財獲得と企業導出を目指す。

【本助成に関わる成果物】

[口頭発表]

1. 吉見昭秀 「RNA スプライシング異常を標的としたがん治療法」超異分野学会東京大会 2023 基調講演 2023 年 3 月 4 日 招待講演 (東京)
2. 吉見昭秀 「RNA スプライシング異常からがんを理解する」第 3 回 SAMURAI 研究会 2023 年 3 月 18 日 招待講演 (東京)
3. Yoshimi A. Understanding and Targeting Aberrant RNA Splicing in Cancer. Nagoya University Cancer Science, 2023, May 25, Invited Talk (Nagoya, Japan)
4. 吉見昭秀. Targeting cis- and trans-regulations of RNA splicing in cancer. 第 13 回ゲノム創薬・創発フォーラム 2023 年 7 月 20 日 招待講演 (東京)
5. Yoshimi A. Targeting Aberrant RNA Splicing in Cancer. JCA-AACR Joint Symposia, 2023, Sep 23, Chair/Talk (Yokohama, Japan)
6. 吉見昭秀 「スプライシング異常を標的にした新規がん治療法の展開」第 4 回大阪血液学セミナー 2023 年 12 月 01 日 招待講演 (大阪)

[ポスター発表]

1. Yoshida M, Ailiken G, Muto T, Yagishita S, Go A, Yamauchi H, Sakumoto M, Hanzawa M, Shinohara N, Kurikawa M, Kawachi A, Ajiro M, Shiraishi Y, Matsui H, Kamiya Y, Asanuma H, Hamada A, Yoshimi A. Nucleic Acid Therapeutics for Cancers with Intron-associated Variants. 第 24 回 日本 RNA 学会年会 2023 年 7 月 5 日 ポスター発表 (沖縄)