

分野: 生命科学・医学系

キーワード: TRP チャンネル、核酸医薬、がん細胞、SDGs

がん細胞に核酸医薬を効率よく取り込ませる新技術 TRPC3/C6 チャンネル選択的活性化剤 L687 を開発 —核酸医薬によるがん治療の新たな選択肢—

【お読みいただく前に】

アンチセンス核酸医薬(ASO)^{※1}などの核酸医薬^{※2}は、低分子医薬や抗体医薬とは異なり、タンパク質の発現を遺伝子レベルで制御することから、次世代の分子標的医薬として注目されています。しかし、核酸医薬は、一般の医薬品と比べて分子量が大きく親水性であり、細胞表面の脂質の膜となじみにくいことから、細胞内に移行する割合が極めて低くなっています。そのため、せっかくの核酸医薬の機能が細胞内で十分に発揮されず、その汎用性は大きく制限されていました。核酸医薬をがん治療に応用するためには、核酸医薬のがん細胞内移行性を高める技術の開発が喫緊の課題となっていました。

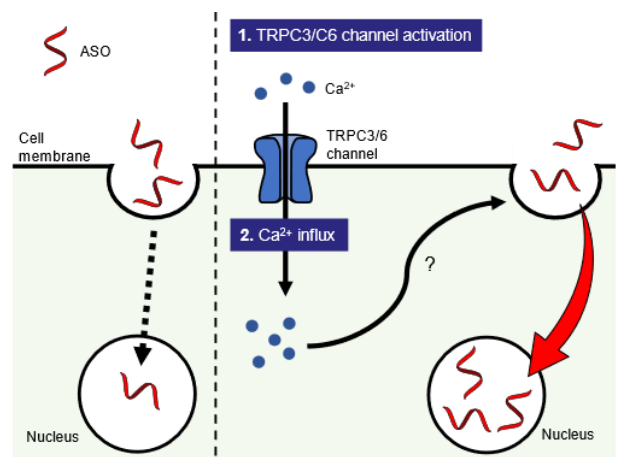
【研究成果のポイント】

- ◆ がん細胞に発現するカルシウム透過型 TRPC3/C6 チャンネル^{※3}を選択的に活性化する新規化合物 L687 の取得に成功
- ◆ L687 の添加により、アンチセンス核酸医薬(ASO)が、がん細胞及びマウス腫瘍内細胞へ効率よく取り込まれることを発見
- ◆ 本研究成果により、ASO を用いる新たながん治療法開発の加速に期待

❖ 概要

大阪大学 大学院薬学研究科生物有機化学分野の小比賀聡教授、大学院生の小橋博斗さん(研究当時)、下條正仁准教授(研究当時)、永田龍特任准教授らのグループは京都大学 大学院工学研究科 合成・生物化学専攻の森泰生教授らの研究グループ、医薬基盤・健康・栄養研究所創薬デザイン研究センターの笠原勇矢副センター長との共同研究で、肺がん等のがん細胞にその役割が不明ながら多く発現するカルシウム透過型 TRPC3/C6 チャンネルに着目し、これを選択的に活性化する化合物 L687 の取得に成功しました。

様々な ASO と L687 を共に種々のがん細胞に添加したところ、ASO はがん細胞内に効率よく取り込まれ、ASO が標的とする遺伝子の発現を



概念図. TRPC3/C6 チャンネルの活性化による ASO の細胞内取り込み増強

Press Release

大きく抑制することを見出しました。ASO と L687 を担がんマウスの腫瘍内に投与した実験でも同様の効果が認められました。

加えて、L687 による ASO の細胞内取り込みの亢進には TRPC3/C6 チャネルを介した細胞内へのカルシウムの流入が必須であり、それにより、がん細胞が細胞外物質を飲食する作用を誘導することが示唆されました。結果として、細胞外の ASO が細胞内に取り込まれることとなります。

研究成果は、国際科学誌 Nucleic Acids Research に、2024 年 4 月 16 日午前 0 時 5 分（協定世界時）／4 月 16 日午前 9 時 5 分（日本時間）にオンライン版で発表されました。

❖ 研究の背景

アンチセンス核酸医薬や siRNA などの核酸医薬は、低分子医薬や抗体医薬とは異なり、タンパク質の発現を遺伝子レベルで制御することから、次世代の分子標的医薬として注目されています。遺伝子発現の調節によって疾患関連タンパク質の生成を制御するという機能を有することから、様々ながん疾患にも応用できる可能性があります。しかしながら、核酸医薬は、一般の医薬品と比べて分子量が大きく親水性であり、細胞表面の脂質の膜となじみにくく、その結果、細胞内に移行する割合が極めて低くなっています。そのため、せっかくの核酸医薬の機能が細胞内で十分に発揮されず、その汎用性は大きく制限されていました。核酸医薬をがん治療に応用するためには、核酸医薬のがん細胞内移行性を高める技術の開発が喫緊の課題となっていました。

TRP (Transient Receptor Potential) チャネルはカルシウムをはじめとする無機陽イオンを透過する細胞膜に存在するタンパク質であり、遺伝子の相同性から 6 つのサブファミリーに分かれ合計 28 種類のサブタイプが知られています。それらのうち、トウガラシ成分のカプサイシンによって活性化し、温度センサーとしても機能する TRPV ファミリーに属する TRPV1 チャネルが 2021 年のノーベル生理学・医学賞の対象になったことは記憶に新しいと思います。TRP チャネルは医薬品の標的としては未だ道半ばであり、TRP チャネルを直接活性化または阻害する医薬品はこれまで上市されていません。我々の研究グループでは、TRP チャネルのサブタイプ TRPC3/C6 チャネルに着目し、医薬品の創成を目指して研究開発を続けており、最近、新たに TRPC3/C6 チャネルを選択的に活性化することができる化合物の合成に成功し、L687 と名付けました。

我々は研究の過程から、L687 が TRPC3/C6 チャネルを介してカルシウムを細胞内へ流入させることにより、核酸医薬の細胞内取り込みを促進させるのではないかと仮説を立て、実験を開始しました。

❖ 研究の内容

本研究グループは、まず TRPC3/C6 チャネルが高発現している肺がん由来細胞 A549 の培地に蛍光標識 ASO と L687 を混合して添加し、48 時間後に Hoechst 溶液(細胞核を染色するために用いる溶液)によって染色を行い、蛍光顕微鏡による画像解析を行いました。イメージングでは ASO は赤色、生細胞の核は青色で示されており、L687 存在下で細胞内蛍光標識 ASO 量が増加していることが示されました(図 1)。

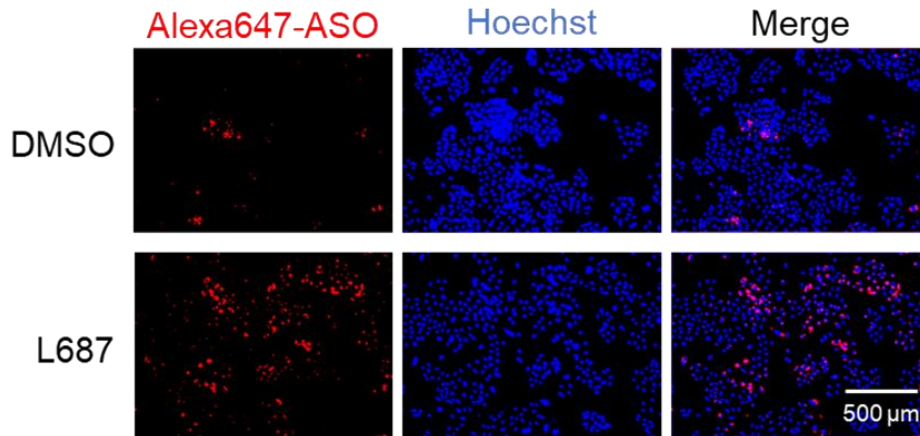


図 1. TRPC3/C6 活性化剤 L687 存在下での細胞イメージング

A549 細胞に Alexa-647 ASO (100 nM) と L687 (30 μ M) を添加し、48 時間後に生細胞の核を Hoechst 溶液で染色し、蛍光顕微鏡を用いて撮影を行った。核は青色、ASO は赤色で表示されている。

A549 細胞ではがん発症に関わっていると考えられる *REST* (RE1-silencing transcription factor) 遺伝子が高発現しています。ASO の取り込み評価で用いた A549 細胞に対して REST 標的 ASO と L687 を添加し、*REST* 遺伝子発現量を解析しました。A549 細胞に REST 標的 ASO (20, 100 nM) と L687 (30 μ M) を添加し 72 時間後、同様に *REST* 遺伝子の発現量を RT-qPCR により解析したところ、L687 の添加により *REST* 遺伝子の発現量が顕著に減少しました。これは L687 により細胞内に取り込まれる REST 標的 ASO 量が 5 倍以上に増加し、*REST* 遺伝子の発現抑制活性が向上したためと考えられました (図 2)。

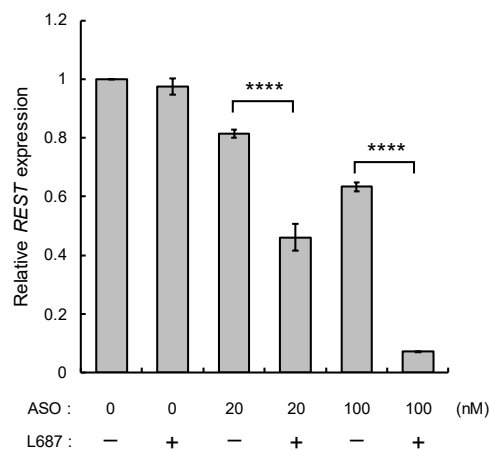


図 2. REST 標的 ASO と L687 存在下での *REST* 発現量評価

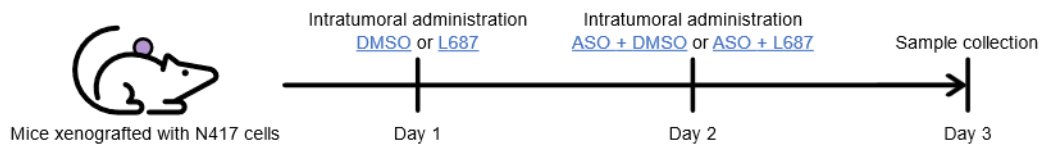
A549 細胞に REST 標的 ASO (20, 100 nM) と L687 (30 μ M) を添加し、72 時間後に回収した細胞から total RNA を抽出し、RT-qPCR による *REST* 発現解析を実施した。内部標準には *GAPDH* を用い、未処理細胞での発現量を基準とした $\Delta\Delta$ Ct 法により *REST* 発現量を算出した (n=3、平均値 \pm SEM)。各群の平均値を Tukey 検定により解析した (****p < 0.0001)。

小細胞肺癌由来 N417 細胞を皮下移植して作成した担がんマウスに対し、SRRM4 (Serine/Arginine repetitive matrix 4) 標的 ASO を用いた腫瘍内投与実験を行いました。SRRM4 は小細胞肺癌及び治療抵抗性前立腺がんにも異常発現しており、その発現抑制は担がんマウスにおいて抗腫瘍効果を示すことから SRRM4 標的 ASO の開発が進められています (ResOU 2019-6-19●生命科学・医学系、【引用情報】

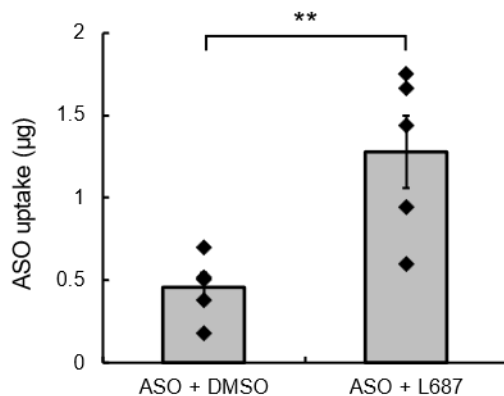
Press Release

参照)。SRRM4 標的 ASO 投与前にあらかじめ L687 (1.5 μg) を腫瘍内投与しておき、1 日後に SRRM4 標的 ASO (10 μg) と L687 (1.5 μg) を混合して腫瘍内投与し、さらに 1 日後に腫瘍を摘出しました。腫瘍細胞への ASO の移行量は、ASO 配列特異的定量法 ELOSA (enzyme-linked oligosorbent assay) にて解析し、並びに *SRRM4* 遺伝子の発現抑制効果は RT-qPCR にて評価しました (図 3A)。腫瘍内細胞に蓄積した SRRM4 標的 ASO 量を算出したところ、SRRM4 標的 ASO + 溶媒のみの群 (0.46 μg) と比較して SRRM4 標的 ASO + L687 群 (1.28 μg) では、SRRM4 標的 ASO 移行量が 2.78 倍に増加しました (図 3B)。その後、RNA 抽出を行い、RT-qPCR により *SRRM4* 遺伝子の発現量を解析したところ、SRRM4 標的 ASO + 溶媒のみの群に比べて SRRM4 標的 ASO + L687 群では *SRRM4* 遺伝子の発現量が約 40% 減少していました (図 3C)。L687 と ASO の併用は *in vivo* においても有効であることが示唆されました。

A



B



C

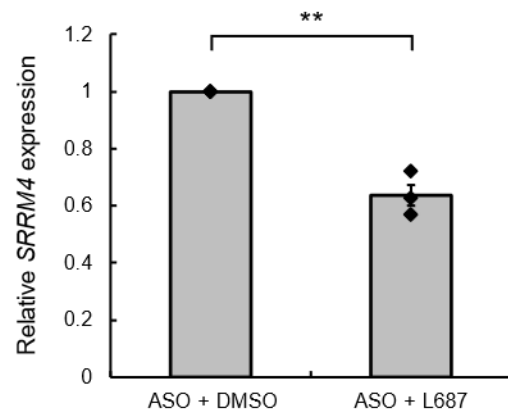


図 3A. 小細胞肺癌を移植したマウス腫瘍内投与の実験方法

N417 細胞 (5.0×10^5 cells) を BALB/c Slc-nu/nu 7 週齢のマウスの左腰部に対して皮下移植し、3~4 週間後に ASO と L687 の投与を開始した。最終投与日の次の日をエンドポイントとした。

図 3B. ELOSA による腫瘍内 ASO 量評価

N417 担がんマウスを用いた抗腫瘍効果評価におけるエンドポイントにて採取した腫瘍に対して、臓器全体の ASO 移行量を ELOSA により評価した ($n=5$, 平均値 \pm SEM)。各群の平均値を t 検定により解析した (** $p < 0.01$)。

図 3C. 腫瘍内 *SRRM4* 発現量解析

腫瘍の一部を切り出し、total RNA を抽出後、RT-qPCR による解析を実施した。内部標準には *GAPDH* を用い、ASO + DMSO 群の腫瘍における発現量を基準とした $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法により *SRRM4* 発現量を算出した ($n=3$, 平均値 \pm SEM)。各群の平均値は t 検定により解析した (** $p < 0.01$)。

❖ 本研究成果が社会に与える影響(本研究成果の意義)

本研究では、アンチセンス核酸 ASO と TRPC3/C6 チャネル活性化剤 L687 を併用することで、*in*

Press Release

vitro(試験管内での試験)と *in vivo*(生体内での試験)の両方で ASO の細胞内取り込みが促進され、標的遺伝子の発現抑制活性が向上することを見出しました。これまでの核酸医薬は、その適応範囲が肝臓に発現する遺伝子を標的とするものか、局所投与を余儀なくされるものに限定されており、特にがん疾患を適応症とする核酸医薬で市場販売の開始に至ったものではありませんでした。本研究成果により、がん疾患を適応症とする核酸医薬の開発が大きく進展するものと期待しています。

❖ 特記事項

研究成果は、国際科学誌 *Nucleic Acids Research* に、2024 年 4 月 16 日午前 0 時 5 分 (協定世界時) / 4 月 16 日午前 9 時 5 分 (日本時間) にオンライン版で発表されました。

タイトル: "A novel transient receptor potential C3/C6 selective activator induces the cellular uptake of antisense oligonucleotides."

著者名: Hiroto Kohashi, Ryu Nagata, Yusuke Tamenori, Tomorrow Amatani, Yoshifumi Ueda, Yasuo Mori, Yuuya Kasahara, Satoshi Obika and Masahito Shimojo

DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkae245>

なお、本研究は、日本医療研究開発機構 (AMED) 「先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業」、「創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS)」などの支援のもとで行われました。

【引用情報】

難治性肺がん治療に大きな前進となる新しい核酸医薬を開発!

https://resou.osaka-u.ac.jp/ja/research/2019/20190619_1

Shimojo M, Kasahara Y, Inoue M, Tsunoda SI, Shudo Y, Kurata T, Obika S. A gapmer antisense oligonucleotide targeting *SRRM4* is a novel therapeutic medicine for lung cancer. *Sci Rep* **9**, 7618 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43100-1>

Yoshida M, Oda C, Mishima K, Tsuji I, Obika S, Shimojo M. An antisense amido-bridged nucleic acid gapmer oligonucleotide targeting *SRRM4* alters *REST* splicing and exhibits anti-tumor effects in small cell lung cancer and prostate cancer cells. *Cancer Cell Int* **23**, 8 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12935-022-02842-1>

❖ 用語説明

※1 アンチセンス核酸医薬 (ASO)

標的とする RNA (mRNA、pre-mRNA、microRNA など) に対して相補的な塩基配列を有する人工合成した核酸分子であり、標的 RNA に結合して機能の制御を行う。既存の低分子医薬や抗体医薬では標的にすることが難しい細胞内の RNA を直接標的にすることが可能であり、次世代の医薬品として注目されている。

※2 核酸医薬

一般に核酸あるいは人工核酸が十数~数十塩基からなるオリゴ核酸で構成され、通常化学合成により製造される。アンチセンス核酸医薬 (ASO)、2 本鎖のオリゴ核酸からなり標的 RNA を触媒的に切断する

Press Release

機能を持つ siRNA、細胞表面に発現する抗原タンパク質と結合しその機能制御を担うアプタマー、免疫賦活作用を持つ CpG オリゴなどが代表例であり、近年、その臨床開発及び実用化が大きく進んでいる。

※3 TRPC3/C6 チャンネル

TRP (Transient Receptor Potential) チャンネルのサブタイプ。TRP は、脂質膜に発現し、6 回膜貫通型 TRP タンパク質群のホモあるいはヘテロ 4 量体からなる多様な陽イオンチャンネルである。TRP チャンネルの活性化と開口は、温度変化、pH の変化、機械刺激、内在性や外界の天然化学物質などによって惹起され、多くが高い Na⁺ 及び Ca²⁺ 透過性を示す。様々な組織に TRP チャンネルは分布する。

【小比賀教授のコメント】

本研究では、アンチセンス核酸 ASO と TRPC3/C6 チャンネル活性化剤 L687 を併用することで、*in vitro* と *in vivo* の両方で ASO の細胞内取り込みが促進され、標的遺伝子の発現抑制活性が向上することを見出しました。本研究成果により、がん疾患を適応症とする核酸医薬の開発が大きく進展するものと期待しています。

❖ SDGs目標



❖ 参考 URL

薬学研究科 生物有機化学分野 HP

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b007/index.html>

❖ 本件に関する問い合わせ先

大阪大学 大学院薬学研究科 特任准教授 永田 龍 (ながた りゅう)

TEL: 06-6879-8197 FAX: 06-6879-8204

E-mail: nagata-r@phs.osaka-u.ac.jp