



ユーザーレビュー : GeneTools 社 Morpholino アンチセンス

核酸医薬のがん治療への応用の可能性



国立がん研究センター 研究所 がん RNA 研究ユニット
独立ユニット長 吉見昭秀様

① 核酸医薬の臨床実装

核酸医薬は、新型コロナウイルスに対するワクチンをはじめ、現在注目を集めている新しい創薬手法の一つです。特に、標的とする遺伝子の mRNA に相補的な配列を持つ Antisense Oligonucleotide (ASO) は、開始コドン上流を標的として狙うことによる特定のタンパク質の翻訳阻害や、スプライスジャンクションあるいはスプライス調整タンパク質の結合部位を狙うことによる特定の遺伝子のスプライシングの調整・改変が可能です。後者のスプライシングを阻害・調整するケースでは、一般的に mRNA 前駆体の Exon と Intron の境界領域を標的として ASO (最近では splice switching oligonucleotide : SSO と呼ばれることも多くなってきました) を設計することにより、目的の Exon をスキップさせるなどの使い方が主流です。例えば、Duchenne 型筋ジストロフィーではジストロフィン遺伝子の Exon の欠失変異により Frameshift が起こり、同遺伝子の C 末端側が機能を失って、タンパク質が分解されてしまうことが病因となっています (図-1)。SSO 医薬品である eteplirsen は、ジストロフィンの Exon 51 へのスプライシング因子の結合を阻害することにより Exon 51 skipping を促し、In-frame に戻すことによって、ジストロフィン遺伝子の機能・発現に重要な C 末端を保持したタンパク質の発現を回復させます。

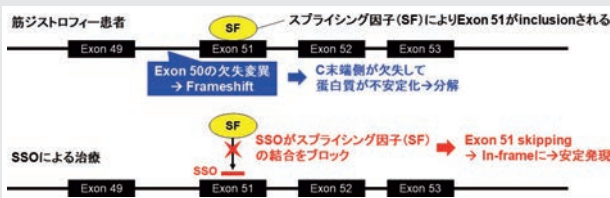


図-1 Duchenne 型筋ジストロフィーに対する核酸医薬

特に、Duchenne 型筋ジストロフィーや脊髄性筋萎縮症などの良性神経疾患で SSO の臨床実装が進んでおり、すでにいくつかの SSO がアメリカ食品医薬品局 (FDA) あるいは日本の医薬品医療機器総合機構 (PMDA) により患者さんへの使用が承認されています。例えば脊髄性筋萎縮症に対する nusinersen や、Duchenne 型筋ジストロフィーに対する eteplirsen の投与によって臨床的な効果が得られています。

② がんにおけるスプライシング異常

一方、最近はがんにおけるスプライシング異常も注目を集めています。きっかけになったのは、京都大学の小川誠司先生らのグループによる遺伝子解析の結果です。同研究により、造血器腫瘍である骨髄異形成症候群においてはスプライシング因子をコードする遺伝子に頻繁に遺伝子変異 (以下 SF 変異) が同定されることが初めて明らかになりました (2011 年 *Nature* 誌¹⁾)。その後、SF 変異は様々ながんを高頻度に見られることがわかり、SF 変異によるスプライシング異常、あるいはミスプライシングのがんの発症や維持に重要な役割を果たしていることがわかってきました。

③ SSO のがん治療への応用の可能性

SF 変異によるミスプライシングはグローバルに (複数の遺伝子の mRNA 前駆体に) 配列特異的に誘導され、その中でもミスプライシングによる機能喪失が分子生物学的に大きく病態形成に寄与するイベントがこれまでもいくつか同定されてきました。このような病理学的に重要なイベントは、変異をきたしているスプライシング因子ごとに、あるいはがん種ごとに異なっており、それぞれの組み合わせによって丹念に解きほぐしていく必要がありますが、SF 変異を有するがんに対する治療法開発の一つとして、病理学的に重要なミスプライシングイベントを SSO によって修正する手法が考えられます。

例えば代表的な SF 変異として *SRSF2* 遺伝子の遺伝子変異があります。このような SF 変異はいわゆる hotspot を持つことが特徴であり、特定のアミノ酸に影響を及ぼします。*SRSF2* 遺伝子の場合には 95 番目のプロリンがヒスチジンに置換される P95H 変異が多く、この点突然変異が配列特異的に 500~1,000 程度の遺伝子にグローバルにスプライシング異常をきたすことが明らかになりました (図-2)。詳細な解析により、こうしたスプライシング異常の中でも *INTS3* 遺伝子に生じる Intron retention はその変化が非常に強く、タンパク質発現量が大きく低下します。私たちは *INTS3* タンパク質の機能喪失により *SRSF2* 変異を有する白血病においては血球分化が阻害され、白血病発症を誘導することを明らかにしましたが (Yoshimi, A., et al., *Nature*, 2019²⁾)、このような病態に重要な働きをするスプライシング異常を SSO で特異的に修正することができれば新しいがん治療法の開発につながると考えられます。

次ページへ続く

著者 : 吉見昭秀

国立がん研究センター 研究所 がん RNA 研究ユニット 独立ユニット長

研究室 Web : https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/cancer_rna/index.html

研究室 Twitter : @YoshimiLab

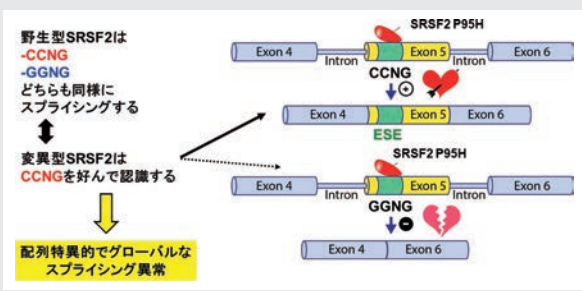


図-2 変異型 SRSF2 によるミスプライシング

そこで、私たちは独自の配列予測システムを用いて2種類の配列を標的としたSSOをそれぞれ作製し、INTS3遺伝子にIntron retentionを有するSRSF2^{P95H}変異細胞に投与してみました。その結果、図-3に示すようにSSO#1によってINTS3遺伝子のIntron retentionを修正することに成功しました。また、その結果、INTS3タンパク質の発現が回復し、血球細胞の分化ブロックが解除されました。

このように、SSOはがんの病態に重要な働きをするスプライシング異常を修正することにより、そのタンパク質の本来の機能を回復させ、がん治療に応用できる可能性があります。核酸医薬開発はがんに限らず様々な疾患に活用が期待されている分野であり、病態形成の鍵となるスプライシング異常を同定してSSO開発を進めていくことが私たちの課題だと考え、日々研究を進めています。



図-3 SSOによるINTS3スプライシング異常の修正

4 参考文献

1. "Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia" Yoshida, K., *et al.*, *Nature*, **478** (7367), 64~69 (2011). [PMID: 21909114]
2. "Coordinated alterations in RNA splicing and epigenetic regulation drive leukaemogenesis" Yoshimi, A., *et al.*, *Nature*, **574** (7777), 273~277 (2019). [PMID: 31578525]

こちらのレビューはフナコシ Web でも
ご覧いただけます。

Web ページ番号

699



GENETOOLS, LLC

Web ページ番号

699



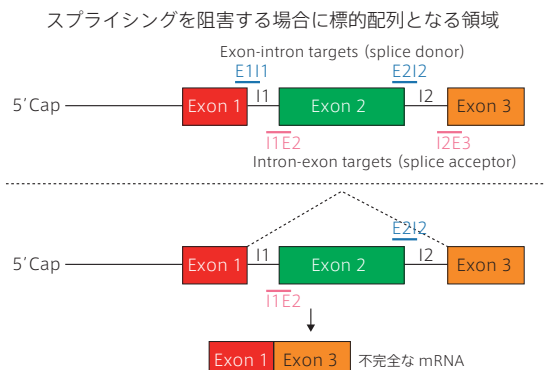
エキソンスキッピングにも!

Morpholino アンチセンスオリゴ 合成受託サービス

細胞毒性のない、第三世代のアンチセンスオリゴです。RNA とのアフィニティが強く、標的 mRNA の二次構造に関わらず、目的配列に特異的に結合します。RNase 依存または RISC 依存のオリゴと異なり、翻訳阻害と核におけるプロセッシング (mRNA のスプライシング) の双方を標的とすることができます。標的に対するアンチセンスオリゴの配列設計を GeneTools 社にて無料で行います。

使用例：mRNA のスプライシング阻害

pre-mRNA のエキソンとイントロンの境界領域を標的配列としてスプライシングを阻害し、mRNA の成熟を不完全にします。タンパク質の翻訳を阻害する場合と比較して、より高い濃度のモルフォリノオリゴが必要ですが、ノーザンブロットングや RT-PCR といった RNA レベルでの解析により阻害効果を確認できます。特定のスプライシングバリエーションに対する発現阻害も可能です。



最も効果を期待できる標的配列は、エキソン2-イントロン2 (E2I2) または、イントロン1-エキソン2 (I1E2) の領域で、結果としてエキソン2の欠失が起こります。

価格

品名	Morpholino Antisense Oligo, Classic (18~25 mers)	
包装	300 nmol	1,000 nmol
価格	¥75,000	¥169,000

※配列設計の有無による価格差はありません。

■標識追加料金

包装	300 nmol	1,000 nmol
価格	¥25,000	¥38,000

※標識の種類については、フナコシ Web をご覧ください。

ご注文方法

詳細は当社受託・特注品担当までお問い合わせ下さい。
[メーカー：GTL]