

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15496

研究課題名(和文)人工修飾型マイクロRNAによるin vivoリプログラミング技術の新構築

研究課題名(英文)New construction of in vivo reprogramming technology by modified microRNA

研究代表者

石井 秀始 (ISHII, Hideshi)

大阪大学・医学系研究科・特任教授(常勤)

研究者番号：10280736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：胎生期に発現する内在性マイクロRNA(既に特許化 [WO2011-102444 等])を医薬品として最適化するために、架橋型修飾(共有結合他)、Drug Delivery System(DDS)搭載する技術 を新構築する。応用範囲は、癌を含む体細胞の直接リプログラミングを個体レベルで誘導、エピゲノムを基盤とした革新的な細胞改変、画期的な疾病制御を具現化。新たなステージの特許戦略を展開して、最適化、企業移転、臨床応用へ加速する。

研究成果の概要(英文)：In order to optimize endogenous microRNAs expressed in embryonic phase as pharmaceuticals, crosslinked modification as covalent bonds and others and drug delivery system (DDS) have been constructed (patented). Applicable range embodies direct reprogramming of somatic cells including cancer cell culture in vitro and animal model in vivo. The innovative cell modification based on the epigenetic control by nucleotide medicine will be valuable for the construction of a new therapeutic strategy and innovative disease control, as well as acceleration to drug optimization and corporative relocation, towards the future clinical application.

研究分野：外科学

キーワード：癌 核酸 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

京都大学 山中伸弥教授は、ES 細胞で特異的に発現している遺伝子を分化細胞に導入して iPS 細胞を誘導した (Cell 2006, 2007)。一方、我々を含む内外の研究で、胎生期に発現するマイクロ RNA は特殊な蛋白質の結合能があり、その性質を利用すれば新しい細胞リプログラミングが可能であることが明らかになった (PNAS 2010; Cell Stem Cell 2011 他; 特許 WO2011-102444 公開済、他 2 件申請中)。一般に RNA の分子安定性 (ヌクレアーゼ耐性) と標的効率 (相補鎖性能) は、架橋型分子修飾 (2'5' 共有結合・S 化・リン酸化等) で実現できる (国際特許: PCT/JP2010/068409; 小比賀ら共同)。このような核酸 シーズを最適化する工程は必須であり、早期の医薬品の実現に向けて加速的に実施。【試作品 (準備状況)】胎生期に発現するマイクロ RNA (miR367, miR200, miR302 の組み合わせ) から架橋型核酸を設計し、約 400 種類の改変型 miR367 試作品を合成、活性を調べた。その結果、天然型に比較して標的蛋白質翻訳を抑制または亢進する候補分子が同定され、特異的な分子機構を解明した (投稿中)。本申請ではこの成功例を踏まえて、miR200 と miR302 に展開し、着実に シーズ最適化を進め、早期の革新的創薬の具現化を加速する。【DDS】本申請で開発する活性型核酸シーズを個体内で安全かつ有効に局所到達させる為に、cRGD 搭載型ミセル (癌幹細胞インテグリンに結合)・リン酸カルシウムミセル (増殖悪性細胞を標的) に内包する基盤研究を重ねてきた (国際特許: PCT/JP2008/070154; 西山ら共同)。世界初で架橋型マイクロ RNA 搭載を逸早く実現し、個体レベルの評価を経て迅速具現化。

2. 研究の目的

胎生期に発現するマイクロ RNA の架橋修飾の最適化 (医薬品を目指した基盤構築)、レポーター細胞 (Luciferase 導入) により活性スクリーニング 活性制御に関わる蛋白質 (Ago 群) の同定 (質量分析) 機能解明 試験管内、および将来の臨床応用に繋げる小動物実験 (発癌・癌移植モデル) を行う。

3. 研究の方法

(1)人工型リボ核酸の開発(シーズ最適化) 準備万端

基盤シーズ (天然型の発見): 申請者らは、胎生期のみで発現する 3 つのマイクロ RNA が、転写因子遺伝子による iPS 細胞に類似したリプログラミングを誘導することを発見した (Cell Stem Cell 2011; PNAS 2010 他)。そのメカニズム解析により、これら胎生期マイクロ RNA は構造的な特徴から特殊な蛋白質 (RNA 結合蛋白質 hnRNP2, FXR1) を Ago2 複合体内にリクルートし、リボソーム内の蛋白質翻訳過程を安定化 (促進) させること

を明らかにした (PNAS 2014 他)。従って本研究では、この胎生期マイクロ RNA (天然型) を基盤シーズとして最適化を進め、蛋白質翻訳アッセイを指標としてより活性の高い人工型リボ核酸の開発を目指す。感度良好なアッセイ系の樹立: シーズの最適化を進める為に、ルシフェラーゼレポーター細胞 (3' 非翻訳領域にマイクロ RNA 結合部位を搭載、膵癌・大腸癌細胞株を使用) を作成、miR369 から試作品の人工型リボ核酸を用いて一次スクリーニングした結果、抑制機能シーズと刺激機能シーズの双方を得た。本申請では、二次スクリーニングを進めるとともに、クラスター計算機を用いて数理的に核酸構造と機能相関を予測する。

機能スクリーニングの実施: miR369 とともに miR302, miR200c からガイド鎖とパッセージャー鎖をそれぞれ 20 種前後、組み合わせで 400 種、合計 1200 種の候補配列を作成 (石井、小比賀ら) スクリーニング (石井、今野、西田、川本ら)。翻訳アッセイを指標として抑制機能、刺激機能に類別化。核酸修飾と機能の対応法則を明らかにする (石井、小関ら)。試作品で構造予測の結果、核酸リボース・リン酸間の結合を保持した形で蛋白質間 (Ago2 平面と hnRNP2・FXR1 複合平面) に挟まれており、この空間を補填する構造が有利である結果が得られているので、この手掛かりから更に詳細に構造を読み解く。計算速度は概ね 103CPU 程度 (パソコン千台分) を得ており、1 次スクリーニングは 2 ヶ月程度の計算エフォートで達成できるスケールで行った。

(2) DDS 搭載

私達を含む内外の研究から、siRNA に関しては搭載可能な DDS としてリン酸カルシウム、ナノ粒子 (癌幹細胞へ集積する cRGD リガンド糖鎖) 等が成功しているの、予備的研究として天然型を搭載した試作品を用いてマウス個体レベルの実験を実施した。その結果、miR302 および miR369 を搭載した粒子を尾静脈投与により、免疫不全マウスに移植した腫瘍内にマイクロ RNA が集積し、in vivo でエピゲノム改変が誘導され、プロモーター領域 DNA の脱メチル化により癌抑制遺伝子が活性化、薬剤感受性が改善した。同時に ES 様転写因子 (Oct3, Sox2, Klf4) の発現、免疫染色により Bcl2 ファミリー依存性アポトーシスが誘導された。

人工型リボ核酸を DDS 搭載: 人工型リボ核酸で二次スクリーニング・最適化が進んだものを DDS 搭載 (リン酸カルシウム、cRGD リガンド糖鎖装着ナノ粒子) (石井、今野、西山ら) 免疫不全マウスした腫瘍に治療を実施。2 ヶ月間観察または腫瘍径 15 ミリ以上で腫瘍を核出、免疫組織解析する (Oct3, Sox2, Klf4, Bcl2 ファミリー, TUNEL アポトーシスアッセイ)。

有効性と有害事象（動物モデル）: 前年度の研究を引き続き進めるとともに、癌幹細胞を標的化した有効性と、非癌組織への有害事象の有無を検討、メカニズム解析を含めて研究する。非癌組織（初代培養細胞）へ3つのマイクロRNA（天然型）を導入しても変化は見られないが、分子レベルでも確認する。現在までの予備的知見の結果、3つのマイクロRNAは癌抑制遺伝子（p16INK4A）のプロモーター領域DNAのメチル化制御にAOF・DNMTを介して関わることが明らかとなったので、メチル化異常を有する癌細胞では効果を発揮し、異常のない非癌細胞では影響がないと予測される。さらに動物個体レベルで臓器への影響を検討（血液・生化学検査、組織検査）。特に、ナノ粒子の排泄経路となる腎と肝の組織を丹念に調べる（H&E、免疫染色、DNA損傷 [H2Ax 等]）。

4. 研究成果

マイクロRNAによるエピゲノム操作でリプログラミングを誘導する研究により、新たなシーズとして核酸医薬品の基盤を構築することができた。このシーズは天然型から人工修飾を施して人工型作製をしたものであり知的財産として価値が高いものである。さらにDDS搭載の開発研究も最適化を踏まえながら推進し、BNA化したマイクロRNAによる細胞の形質の転換と誘導として個体レベルへの画期的な医療を創出するための基礎を築いた。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計14件）

- 1) Nishizawa, Y., Nishida, N., Konno, M., Kawamoto, K., Asai, A., Koseki, J., Takahashi, H., Haraguchi, N., Nishimura, J., Hata, T., Matsuda, C., Mizushima, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Clinical significance of histone demethylase NO66 in invasive colorectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 24(3):841-849, 2017.
- 2) Miyo, M., Konno, M., Colvin, S. H., Nishida, N., Koseki, J., Kawamoto, K., Tsunekuni, K., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. The importance of mitochondrial folate enzymes in human colorectal cancer. *Oncol. Rep.*, 37(1):417-425, 2017.
- 3) Ogawa, H., Konno, M., Kawamoto, K., Nishida, N., Koseki, J., Mizushima, T., Satoh, T., Eguchi, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Fetal hepatocyte derived culture medium elicits adipocyte differentiation to bile duct cell lineages in mouse. *Biomedical, Reports*, 2016. (in Press)
- 4) Noguchi, K., Konno, M., Eguchi, H., Kawamoto, K., Mukai, R., Nishida, N., Koseki, J., Wada, H., Akita, H., Satoh, T., Marubashi, S., Nagano, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. c-Met affects gemcitabine resistance over carcinogenesis in a mouse model of pancreatic cancer. *Oncol. Lett.*, 2016. (in Press)
- 5) Baek, S.J., Sato, K., Nishida, N., Koseki, J., Azuma, R., Kawamoto, K., Konno, M., Hayashi, K., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H., Ogawa, K. MicroRNA miR-374, a potential radiosensitizer for carbon ion beam radiotherapy. *Oncol. Rep.*, 36(5):2946-2950, 2016.
- 6) Colvin, S. H., Nishida, N., Konno, M., Haraguchi, N., Takahashi, H., Nishimura, J., Hata, T., Kawamoto, K., Asai, A., Tsunekuni, K., Koseki, J., Mizushima, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Oncometabolite D-2-hydroxyglurate directly induces epithelial-mesenchymal transition and is associated with distant metastasis in colorectal cancer. *Sci. Rep.*, 6:36289, 2016.
- 7) Sawada, G., Niida, A., Uchi, R., Hirata, H., Shimamura, T., Suzuki, Y., Shiraishi, Y., Chiba, K., Imoto, S., Takahashi, Y., Iwaya, T., Sudo, T., Hayashi, T., Takai, H., Kawasaki, Y., Matsukawa, T., Eguchi, H., Sugimachi, K., Tanaka, F., Suzuki, H., Yamamoto, K., Ishii, H., Shimizu, M., Yamazaki, H., Yamazaki, M., Tachimori, Y., Kajiyama, Y., Natsugoe, S., Fujita, H., Mafune, K., Tanaka, Y., Kellsell, DP., Scott, CA., Tsuji, S., Yachida, S., Shibata, T., Sugano, S., Doki, Y., Akiyama, T., Aburatani, H., Ogawa, S., Miyano, S., Mori, M., Mimori, K. Genomic landscape of esophageal squamous cell carcinoma in a Japanese population. *Gastroenterology*, 150(5):1171-11782, 2016.
- 8) Yokobori, T., Suzuki, S., Miyazaki, T., Sohda, M., Sakai, M., Tanaka, N., Ozawa, D., Hara, K., Honjo, H., Altan, B., Fukuchi, M., Ishii, H., Iwatsuki, M., Sugimachi, K., Sudo, T., Iwaya, T., Nishida, N., Mimori, K., Kuwano, H., Mori, M. Intestinal epithelial culture under an air-liquid interface: a tool for studying human and mouse esophagi. *Dis. Esophagus.*, 29(7):843-847, 2016.
- 9) Miyo, M., Konno, M., Nishida, N.

- Sueda, T., Noguchi, K., Matsui, H., Colvin, H., Kawamoto, K., Koseki, J., Haraguchi, N., Nishimura, J., Hata, T., Gotoh, N., Mastuda, F., Saatoh, T., Mizushima, T., Shimizu, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Metabolic adaptation to nutritional stress in human colorectal cancer. *Sci. Rep.*, 6:38415, 2016.
- 10) Konno, M., Ishii, H., Koseki, J., Tanuma, N., Nishida, N., Kawamoto, K., Nishimura, T., Nakata, A., Matsui, H., Noguchi, K., Ozaki, M., Noguchi, Y., Shima, H., Gotoh, N., Nagano, H., Doki, Y., Mori, M. Pyruvate kinase M2, but not M1, allele maintains immature metabolic states of murine embryonic stem cells. *Regen. Therap.*, 1, 63-71, 2015.
- 11) Ogawa, H., Wu, X., Kawamoto, K., Nishida, N., Konno, M., Koseki, J., Matsui, H., Noguchi, K., Gotoh, N., Yamamoto, T., Miyata, K., Nishiyama, N., Nagano, H., Yamamoto, H., Obika, S., Kataoka, K., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. MicroRNAs induce epigenetic reprogramming and suppress malignant phenotypes of human colon cancer cells. *PLoS One*, 10(5):e0127119, 2015.
- 12) Konno, M., Koseki, J., Kawamoto, K., Nishida, N., Matsui, H., Dewi, DL., Ozaki, M., Noguchi, Y., Mimori, K., Gotoh, N., Tanuma, N., Shima, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Embryonic microRNA-369 controls metabolic splicing factors and urges cellular reprogramming. *PLoS One*, 10(7): e0132789, 2015.
- 13) Noguchi, K., Eguchi, H., Konno, M., Kawamoto, K., Nishida, N., Koseki, J., Wada, H., Marubashi, S., Nagano, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Susceptibility of pancreatic cancer stem cells to reprogramming. *Cancer Sci.*, 106(9):1182-1187, 2015.
- 14) Hasegawa, S., Nagano, H., Konno, M., Eguchi, H., Tomokuni, A., Tomimaru, Y., Wada, H., Hama, N., Kawamoto, K., Kobayashi, S., Marubashi, S., Nishida, N., Koseki, J., Gotoh, N., Ohno, S., Yabuta, N., Nojima, H., Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. Cyclin G2: A novel independent prognostic marker in pancreatic cancer. *Oncol. Lett.*, 10(5):2986-2990, 2015.

〔学会発表〕(計7件)

- 1) 石井秀始、今野雅允：多能性幹細胞の種差に関わる内在性因子、第16回日本再生医療学会総会、2017年3月9日、仙台国際センター(宮城)

- 2) 石井秀始：Overcoming therapy-resistant cancer stem cells、15th World Congress on CANCER THERAPY, BIOMARKER & CLINICAL RESEARCH、2016年12月5日、DoubleTree by Hilton Hotel(アメリカ)
- 3) 石井秀始：NEW STRATEGY FOR OVERCOMING MULTIFACETED THERAPY-RESISTANT CANCER STEM CELLS、第47回高松宮妃癌研究基金国際シンポジウム、2016年11月9日、パレスホテル東京(東京)
- 4) 今野雅允、三代雅明、西田尚弘、川本弘二、小関準、土岐祐一郎、森正樹、石井秀始：大腸癌の飢餓ストレスに適応した代謝変化、第75回日本癌学会学術総会、2016年10月8日、パシフィコ横浜(神奈川)
- 5) 石井秀始：Innovative Medicine for Metabolic Reprogramming of Intractable Cancer Stem Cells、第46回高松宮妃癌研究基金国際シンポジウム、2015年11月18日、パレスホテル東京(東京)
- 6) 石井秀始、土岐祐一郎、森正樹：難治性消化器癌幹細胞の可視化とシステムの理解、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月10日、名古屋国際会議場(愛知)
- 7) 石井秀始：癌医療における機能性核酸の応用、第7回日本RNAi研究会、2015年8月26日、グランドプリンスホテル広島(広島)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：がんを検出、又はがんの進行期を判定する方法

発明者：石井秀始、西田尚弘、森正樹、土岐祐一郎、今野雅允、川本弘二、小関準、江口英利、瀧口修司、水島恒和、大房健

権利者：同上

種類：特許

番号：特願2016-162203

出願年月日：平成28年8月22日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 秀始 (ISHII, Hideshi)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任教授(常勤)

研究者番号：10280736

(2) 研究分担者

今野 雅允 (Konno, Masamitsu)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座助教

研究者番号：80618207

西田尚弘 (Nishida, Naohiro)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50588118

川本 弘一 (Kawamoto, Koichi)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教(常勤)
研究者番号：30432470

小関準 (Koseki, Jun)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教(常勤)
研究者番号：20616669

(3)連携研究者

森 正樹 (Mori, Masaki)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70190999

小比賀 聡 (Obika, Satoshi)
大阪大学・大学院薬学系研究科・教授
研究者番号：80243252

西山 伸宏 (Nishiyama, Nobuhiro)
東京工業大学・化学生命科学研究所・教授
研究者番号：10372385