

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 14 日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18853

研究課題名(和文)1本鎖核酸の細胞内への取り込みメカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the uptake of single-stranded oligonucleotides into living cells

研究代表者

高橋 昌幸 (Takahashi, Masayuki)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所 疾病研究第四部・流動研究員

研究者番号：30743778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：核酸医薬候補の一つである1本鎖RNA及び人工核酸は細胞内に導入する際にリポフェクション試薬等のキャリアを必要としないという特徴(gymnosisとも呼ばれている)を持つ事が知られている。本研究の目的は、gymnosisの解明を行うことである。本研究によって、HeLa細胞においてSIDT2ノックダウン条件下では1本鎖核酸の細胞内への取り込みが減少し、またアンチセンス効果が弱まることが明らかになった。SIDT2高発現条件下では1本鎖核酸細胞内への取り込みが上昇することが分かったが、変異型SIDT2では観察出来なかった。よって、SIDT2は1本鎖核酸の細胞内への取り込みに関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Single-stranded oligonucleotides (ssOligos) are efficiently taken up by living cells without the use of transfection reagents. This phenomenon called 'gymnosis' enables the sequence-specific silencing of target genes in various types of cells. Several antisense ssOligos are used for the treatment of human diseases. However, the molecular mechanism underlying the uptake of naked ssOligos into cells remains to be elucidated. We showed that the uptake of naked ssOligos into cells is significantly downregulated by knockdown of SIDT2. Furthermore, knockdown of SIDT2 inhibited the effect of antisense RNA mediated by gymnosis. Overexpression of SIDT2 enhanced the uptake of naked ssOligos into cells, while a single amino acid mutation in SIDT2 abolished this effect. Our findings highlight the mechanism of extra- and intracellular RNA transport and may contribute to the further development of nucleic acid-based therapies.

研究分野：分子生物学

キーワード：SIDT2 Gymnosis 核酸医薬

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初から現在までに、医薬品として承認されている核酸医薬は6種類あり、その中の4種類がアンチセンス核酸である (C. A. Stein, et al. 2017, Molecular Therapy)。アンチセンス核酸は1本鎖の構造を持ち、細胞内にリポフェクション試薬等のキャリア分子を用いずに導入することができ、そして効果を発揮する。このリポフェクション試薬等を用いない1本鎖核酸の細胞内導入現象は *gymnosis* (ギリシャ語で裸を意味する) (以下 *gymnosis*) とも呼ばれている (C. A. Stein, et al. 2010, N.A.R.)。核酸医薬の中で最も多く認可されているアンチセンス核酸は、開発する上でいくつか解決すべき問題点が存在している。

アンチセンス核酸には導入されにくい組織が存在し、また人体に投与された後、肝臓、腎臓、脾臓、骨髄、固形癌等に集積しやすいことが知られている。これは細胞膜の構造によるものだと考えられているが、その詳細は明らかになっていない。また、アンチセンス核酸は肝毒性を示してしまう副作用が存在することが知られている。肝臓に蓄積しやすい傾向があることが1つの理由だと考えられるが、詳細はまだ不明な点が多い。申請者は、これらのようなアンチセンス核酸の問題点には少なくとも *gymnosis* が関与しているのではないかと予想している。

しかし、この *gymnosis* メカニズムの詳細な分子機構は判明していなかった。よって *gymnosis* メカニズムを解明することは、アンチセンス核酸が導入されにくい組織が存在する理由や、集積しやすい臓器が存在する理由の解明、肝毒性等の副作用を示さないアン

チセンス核酸医薬の開発に繋がり、さらには効率よく細胞内に導入できる核酸医薬の技術開発にも発展させることができると考えられる。

そこで申請者は *gymnosis* メカニズム解明に関する研究を行うことを考えた。

2. 研究の目的

今回申請者は、RNA トランスポーターとして機能する、または機能し得る唯一のグループとして知られている *C.elegans* の systemic RNA interference deficient (SID-1) protein と、そのオルソログである SID-1 transmembrane family members 1, 2 (SIDT1, SIDT2) に注目した。そこで、本研究ではリポフェクション試薬を使用しない1本鎖 RNA 及び人工核酸の細胞内導入機構が SIDT1, SIDT2 と関与するかどうかの解析を行う事を目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、SIDT1 と SIDT2 の発現制御に関する解析を行い、*gymnosis* メカニズムの解明を行うことを目的とする。具体的には内在性 SIDT1 と SIDT2 ノックダウン条件下、SIDT1 と SIDT2 過剰発現条件下における、細胞内に取り込まれる標識した 2'-O-メチル化1本鎖核酸に対する影響を明らかにするための実験を行う。次に細胞内に取り込まれるアンチセンスオリゴのアンチセンス効果に関しても、内在性 SIDT1 と SIDT2 ノックダウン条件下、SIDT1 と SIDT2 過剰発現条件下において、どのような影響を与えるかということについて解析を行う。それらの実験を行い SIDT1 が *gymnosis* に関

与するか否かを明らかにする。また、細胞内のSIDT1及びSIDT2の発現制御を行うことで、gymnosisにどのような影響を与えるかということについての解析を行う。そして、gymnosisメカニズムの解明を目指す。

4. 研究成果

まず申請者は、細胞においてユビキタスな発現を示すSIDT2が1本鎖核酸の細胞内の取り込み及びアンチセンス効果にどのような影響を及ぼすかを解析するための研究を行った。内在性SIDT2、SIDT1のHeLa細胞における発現を調べたところ、SIDT2 mRNAは高い発現を示すが、SIDT1 mRNAはほとんど検出されないことがRT-PCRの結果から明らかにされた。またSIDT2はHeLa細胞においては、蛍光顕微鏡解析によって主にリソソーム上に局在しており、ビオチン化タンパク質とストレプトアビジンによるプルダウンアッセイによって、一部分が細胞膜上にも局在していることが見出された。

次に2'-O-メチル化1本鎖核酸の細胞内の取り込みがSIDT2と関与しているかを確認したところ、HeLa細胞の内在性SIDT2を、SIDT2を標的としたsiRNAを用いてノックダウンした細胞では、蛍光標識した2'-O-メチル化1本鎖核酸の細胞内への取り込みはネガティブコントロールsiRNAと比較して減少することが観察された。また、HeLa細胞内の内在性SIDT2をノックダウンした場合に、miRNA-16を標的とした2'-O-メチル化1本鎖アンチセンスオリゴのアンチセンス効果にどのような影響を及ぼすのかを確認したところ、内在性SIDT2ノックダウン条件下の細胞は、ネガティブコントロールの細胞と

比較して、アンチセンス効果が弱まることも明らかになった。

また、SIDT2を組み込んだpCI-neoプラスミドをトランスフェクションし、SIDT2を過剰発現させたHeLa細胞に蛍光標識した2'-O-メチル化1本鎖核酸をgymnosisで導入したところ、ネガティブコントロールである空ベクターをトランスフェクションした細胞と比較して、多くの1本鎖核酸が細胞内に取り込まれるということも明らかになった。さらに、申請者は2本鎖RNAの取り込み活性が欠失した変異型SIDT2(S564A SIDT2)及び、2本鎖RNAの結合活性が欠失した変異型SIDT2(F154T SIDT2)を組み込んだpCI-neoプラスミドベクターを作製し、前述の実験と同様の解析を行った。その結果、野生型SIDT2を過剰発現させた細胞では、前述した実験結果と同様に、蛍光標識した2'-O-メチル化1本鎖核酸の細胞内への取り込みが上昇することが確認されたが、2つの変異型SIDT2(S564A SIDT2及びF154T SIDT2)を過剰発現させた細胞では、蛍光標識した2'-O-メチル化1本鎖核酸の細胞内への取り込みが空ベクターと変わりがないということが明らかになった。このことからSIDT2を介したgymnosisにはSIDT2のトランスポート活性とRNA(核酸)結合活性が必要であることが示唆された。そして更に申請者は、SIDT2がエンドサイトーシスに及ぼす影響を明らかにするために、野生型SIDT2を過剰発現させた細胞に、エンドサイトーシスの活性実験に使用されるRhodamine B及びRhodamine B dextranを導入させる実験を行うことにした。その結果、空ベクターをトランスフェクションした細胞と野生型SIDT2を過剰発現させ

た細胞のどちらも非選択的エンドサイトーシスを活性化させないことが明らかになった。以上のように申請者は、今までその分子メカニズムに不明な点が多かった *gymnosis* が、SIDT2 と関与していることを見出すことができ、*gymnosis* メカニズムの一部を解明するに至り、筆頭著者として論文を執筆し発表することができた。(研究業績(1) 1, M.Takahashi, et al. 2017, RNA Biology)。

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 1 件)

Masayuki Takahashi, Viorica Raluca Contu, Chihana Kabuta, Katsunori Hase, Yuuki Fujiwara, Keiji Wada, and Tomohiro Kabuta, SIDT2 mediates *gymnosis*, the uptake of naked single-stranded oligonucleotides into living cells, *RNA Biology*, 査読有, 2017, in press, doi: 10.1080/15476286.2017.1302641.

[学会発表] (計 1 件)

高橋 昌幸、Viorica Raluca Contu、和田 圭司、株田 智弘、裸の 1 本鎖オリゴの細胞内への取り込みメカニズム(口頭発表)、日本 RNA 学会、2015 年、査読有、北海道札幌市(ホテルライフオート札幌)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋昌幸 (Takahashi, Masayuki)

国立精神・神経医療研究センター 神経研究所 疾病研究第四部・流動研究員

研究者番号：30743778