

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07048

研究課題名(和文)新規RNA干渉核酸の探索および機能解析

研究課題名(英文)Exploration and functional analysis of novel RNA-interfering nucleic acids.

研究代表者

大野 慎一郎 (Ohno, Shin-ichiro)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：90513680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者等は、過去の核酸医薬の研究開発から、短いヘアピン構造のRNA(ghRNA)に、RNA干渉活性がある事を発見した。本研究では細胞内に発現する内在性ghRNAの探索を行った。結果、Transfer RNAおよびSmall nuclear RNAなどの細胞内で高発現するnon-coding RNAの一部が分断され、ghRNA様の構造になることを明らかにした。また、そのghRNAは何らかの機構により細胞内で安定的に存在し、相補的な配列を有するmRNAの発現を抑制した。これは広く知られているmicroRNAとは異なる生成過程を経た、新規のRNA干渉機構であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

microRNAによるRNA干渉核酸は、発生・分化および各種疾病の発症などに関与する重要な機構であることがよく知られている。本研究で発見された内在性ghRNAによるRNA干渉も各種の生命現象に関与している可能性が高く、分子生物学領域に与える影響は大きいと考えられる。また、何らかの疾病の発症に関与することも考えられ、今後の研究の発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Applicants discovered that RNA with a short hairpin structure (Guide hairpin RNA: ghRNA) has RNA interference activity from past research and development of nucleic acid drugs. As a result, it was clarified that some of the non-coding RNAs that are highly expressed in cells such as transfer RNA and small nuclear RNA are disrupted and have a ghRNA-like structure. In addition, the ghRNA was stably present in the cell by some mechanism and suppressed the expression of mRNA having a complementary sequence. This is considered to be a novel RNA-interfering nucleic acid that has undergone a production process different from that of the widely known microRNA.

研究分野：RNA interference, RNA activation

キーワード：RNA interference microRNA Non-coding RNA

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムプロジェクトの完了を待たずして、転写産物の網羅的な解析の重要性が叫ばれた結果、理化学研究所を主体にした FANTOM プロジェクトが 2000 年に始動した。その成果として、2005 年に Science 誌に発表された論文は、各種組織・細胞における転写産物の約半分は、タンパク質をコードしていないノンコーディング RNA であるという、衝撃的な内容であった。線虫とヒトのゲノムサイズを比較すると、線虫は約 103Mb に対してヒトでは約 2851Mb と当然にヒトの方が長い。一方で、線虫とヒトの遺伝子数を比較すると、線虫の遺伝子数が 23,590 個に対して、ヒトの遺伝子数は 26,808 個と大きな差は無い。このことは生物が進化の過程で獲得したのは、遺伝子間の調節領域であり、ノンコーディング RNA であることを示している。ノンコーディング RNA は、進化・発生に限らず、恒常性維持や疾病などにも深く関与することは明らかであり、現在に至るまで発現および機能解析が盛んに行われているが、その全貌は依然として不明なままである。

疾患の原因となる遺伝子を直接治療標的にすることが可能な核酸医薬は、次世代の分子標的治療薬として期待されている。これまでに応募者等は、RNA 干渉型核酸医薬を実用化するには、短縮化による免疫応答の回避が必須と考え、核酸の二次構造に関して様々な検討を行った。結果、RNA 干渉効果を保ちながら 30 塩基まで短縮化することに成功した。この短縮型 **mimic miRNA** は、RNA 干渉を誘導する無修飾核酸として最短であり、**in vivo** および **in vitro** の実験から免疫応答を誘導しにくい核酸であることが明らかとなった。また、この短縮化技術は他の **miRNA** や **siRNA** にも広く応用できたことから、この短縮化核酸を **Guide Hairpin RNA (ghRNA)** と名付け、副作用の少ない核酸医薬のプラットフォームとして、臨床応用を目指している (**Ohno et al., Mol Ther. 2016 Aug;24(7):1278-89**、国際特許 **WO2015099122 A1, WO2016009809 A1**)。一方で、このような短いヘアピン構造の RNA に、RNA 干渉活性があるという報告はなく、仮に生体内で類似の構造をとるノンコーディング RNA が存在するのであれば、新規の RNA 干渉核酸として機能していることが予想された。

2. 研究の目的

これまで我々は、副作用を軽減した核酸医薬を開発する目的で RNA 干渉核酸の最小構造体を検討してきた。その結果、約 30 塩基の一本鎖ヘアピン構造に、強い RNA 干渉活性があることを見いだした。この短鎖型ヘアピン構造の核酸は、免疫応答が軽減されており、かつパッセンジャー鎖による不要な RNA 干渉が無く、副作用の少ない核酸医薬の基盤技術として臨床応用が期待される。一方で、約 30 塩基ほどの短い一本鎖ヘアピン構造体に、十分な強さの RNA 干渉活性があるという報告はこれまでに無く、生体内における解析はされていない。そこで生体内における短鎖ヘアピン構造体の探索をした結果、動物種間で保存された RNA 干渉活性を有する新規 RNA 干渉核酸を複数同定した。本研究は、新規 RNA 干渉核酸である短鎖ヘアピン RNA の発現および機能解析を行い、その生理的意義を明らかにすることを目的とした。このような、人工的開発物から類似の生体物質を探索するアプローチは非常に独創的であり、既存の技術による網羅的スクリーニングでは見つからない現象に到達することが期待された。

3. 研究の方法

本研究計画では、内在性 **ghRNA** に対して、以下の項目を検証した。

- (1) 次世代シーケンスデータより、**ghRNA** 様の二次構造をとる短鎖核酸を探索する
- (2) 同定した **ghRNA** の RNA 干渉活性を検証する
- (3) RNA 干渉に関わる遺伝子の欠損細胞株を用いて、**ghRNA** の生成過程および作用機構を明らかにする
- (4) **ghRNA-1** の標的遺伝子から、生理的機能を解析する
- (5) 疾患における内在性 **ghRNA** の発現変動を解析し、疾病への関与の可能性を検討する

以上より、内在性 **ghRNA** の発現、生成機序、作用機構、そして生理的意義を明らかにすることを目指した。

(1) **ghRNA** 様二次構造の短鎖ノンコーディング RNA の探索

既に、ヒト末梢血細胞、ヒト肺がん細胞、マウス肺がん組織、マウス肺正常組織より抽出した短鎖 RNA の次世代シーケンスデータを、RNA 二次構造予測アルゴリズム (**Centroid Fold**) で解析し、いくつかの **ghRNA** 様二次構造の短鎖ノンコーディング RNA を同定している。今後は、サンプル数を増やし、内在性 **ghRNA** の同定数を増やすとともに、種間で保存されている **ghRNA** の選別などを進める。

(2) 同定した内在性 **ghRNA** の **RNA** 干渉活性の検証

同定した内在性の **ghRNA** の **RNA** 干渉活性は、ルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーターアッセイで検証する。任意の **ghRNA** の相補配列をルシフェラーゼ遺伝子の 3' UTR に連結し、合成 **ghRNA** をトランスフェクションした際の **RNA** 干渉を発光抑制により検出する。

(3) 内在性 **ghRNA** の生成機構・作用機構の解析

当研究室では、**RNA** 干渉に重要な **Argonaute family (AGO1, AGO2, AGO3, AGO4)**、**GW182**、**DICER1** 等の欠損細胞株を樹立している。これらの細胞株における **ghRNA** の **RNA** 干渉活性を計測することで、生成および作用機構の解析を行う。また、**RNA** 免疫沈降法による直接的な解析も行う。

(4) 内在性 **ghRNA** の生理的機能の解析

合成した **ghRNA** を細胞へトランスフェクションし、マイクロアレイアッセイで標的遺伝子を同定する。さらにマイクロアレイの結果から、**Gene Ontology** もしくは **KEGG pathway** 解析により、生理的機能の傾向を捉える。特に重要な標的遺伝子のノックダウンは、リアルタイム PCR で厳密に測定し確認する。

(5) がんにおける内在性 **ghRNA** の発現および機能解析

肺がんモデルマウス組織の **ghRNA** 解析から、がんと正常組織で発現に差がある **ghRNA** が見つかっている。このような **ghRNA** に関しては、がん関連遺伝子に絞って解析し、がんの発症もしくは進行に關与する可能性の検討を行う。

4 . 研究成果

はじめに、細胞から **RNA** を抽出し短鎖 **RNA** の次世代シーケンスを行った。その中から 30塩基前後の配列情報を抽出し、**RNA** 二次構造予測アルゴリズム (**Centroid Fold**) により、ヘアピン構造をとる **ghRNA** 様二次構造の短鎖ノンコーディング **RNA** を複数同定した。同定した内在性 **ghRNA** は、**Transfer RNA** および **Small nuclear RNA** 等の高発現 **Non-coding RNA** の一部が何らかの機構により、決まった箇所で切断され、各種 **RNA** 分解酵素から保護される形で安定して存在しているものであった。同定した内在性 **ghRNA** の **RNA** 干渉活性を調べるために、人工的に合成した内在性 **ghRNA** を細胞へ導入し、マイクロアレイにより **mRNA** の発現変動の解析を行った。結果、内在性 **ghRNA** の導入により、発現が抑制される **mRNA** が多数同定された。また、その結果は、**Real-time PCR** 法により再確認された。同定した内在性の **ghRNA** の **RNA** 干渉活性は、ルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポーターアッセイで検証した。内在性 **ghRNA** の相補配列をルシフェラーゼ遺伝子の 3'UTR に連結し、合成 **ghRNA** をトランスフェクションした際の **RNA** 干渉を発光抑制により検出した。

以上のことから、内在性 **ghRNA** は生体内に存在し、新規の **RNA** 干渉機構として働いている可能性が示唆された。また、内在性 **ghRNA** が制御する遺伝子の中には、がんを含む各種疾患に關与する遺伝子もあり、新規 **RNA** 干渉機構である **ghRNA** の疾患への關与が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 大野慎一郎、黒田雅彦 | 4. 巻 269 (5) |
| 2. 論文標題 多様な核内マイクロRNAの機能 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 医学のあゆみ | 6. 最初と最後の頁 337-341 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Saito S, Ohno SI, Harada Y, Oikawa K, Fujita K, Mineo S, Gondo A, Kanno Y, KurodaM. | 4. 巻 23 (12) |
| 2. 論文標題 rAAV6-mediated miR-29b delivery suppresses renal fibrosis. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol. | 6. 最初と最後の頁 1345-1356 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10157-019-01783-w | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 大野慎一郎、老川桂生、原田裕一郎、黒田雅彦 |
| 2. 発表標題 miR-34 familyによる3p21.3領域に存在するがん抑制遺伝子の発現誘導 |
| 3. 学会等名 第108回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大野慎一郎、老川桂生、原田裕一郎、黒田雅彦 |
| 2. 発表標題 The novel lncRNA expressed from the promoter of tumor suppressor BLU induces BLU expression via the miR-34-AGO complex. |
| 3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 大野慎一郎、老川桂生、原田裕一郎、黒田雅彦 |
| 2. 発表標題 miR-34によるがん抑制遺伝子BLUの発現誘導 |
| 3. 学会等名 第107回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大野慎一郎、三部 芳裕、弓野 梨紗、老川桂生、原田裕一郎、黒田雅彦 |
| 2. 発表標題 Up-regulation of BLU tumor suppressor by miR-34a |
| 3. 学会等名 第10回日本RNAi研究会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 大野慎一郎、老川桂生、原田裕一郎、黒田雅彦 |
| 2. 発表標題 miR-34によるがん抑制遺伝子BLUの発現誘導 |
| 3. 学会等名 第77回日本癌学会総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-----------|---|--------------------------------------|----|
| 研究 分担者 | 熊谷 勝義 (Kumagai Katsuyoshi) (20567911) | 東京医科大学・医学部・助教 (32645) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 黒田 雅彦 (Kuroda Masahiko) (80251304) | 東京医科大学・医学部・主任教授 (32645) | |
| 研究分担者 | 原田 裕一郎 (Harada Yuichirou) (80570168) | 東京医科大学・医学部・助手 (32645) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |