

平成22年 5月19日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20710157
 研究課題名（和文） 人工マイクロRNAの機能を応用した次世代型RNA医薬の開発に向けての研究
 研究課題名（英文） Development of RNA drugs based on artificial microRNAs

研究代表者
 柴田 篤志（SHIBATA ATSUSHI）
 九州大学・大学院医学研究院・学術研究員
 研究者番号：40467890

研究成果の概要（和文）：研究代表者が開発した人工マイクロRNA（miRNA）を応用し、相同性が非常に高い2つの遺伝子（Smad2 および Smad3）それぞれを特異的に認識・抑制するmiRNAを設計した。更に、miRNAの発現を組織特異的に制御が可能なプラスミドベクターを構築し、マウス胚性幹細胞（ES細胞）において実際にmiRNAの発現を制御することに成功した。既にこのES細胞を用いてトランスジェニックマウスを作製し、現在、解析を進めている。

研究成果の概要（英文）：The artificial microRNAs (miRNAs) that can specifically distinguish and suppress two highly homologous genes, Smad2 and Smad3, were designed to study the potential of artificial miRNAs as therapeutic drugs. Additionally, a plasmid-based system for tissue-specific regulation system of miRNA expression was constructed, and this system was confirmed that it functioned in mouse embryonic stem (ES) cells. The transgenic mice having the miRNA regulation system generated from these ES cells are under analyses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子生物学、細胞生物学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム情報科学

キーワード：RNA医薬、miRNA、核酸、生体機能利用、発現制御

1. 研究開始当初の背景
 近年、国内外において siRNA および shRNA による RNA 干渉を利用した RNA 医薬の創

出に向けた研究が盛んに行われているが、未だ医薬品としては殆ど実用化に至っていない。研究代表者が開発した人工 miRNA は、

1) 長期間の遺伝子発現抑制が可能である、2) 遺伝子発現の量的な制御が可能である、3) 組織特異的な遺伝子発現抑制が可能である、4) 複数の異なる標的遺伝子の同時抑制が可能である、5) 発現マーカー遺伝子との共発現が可能である等、siRNA および shRNA の両者の利点を併せ持つのみならず、shRNA と同等の配列特異性を有し、標的配列中の一塩基の違いも識別可能である。すなわちこの人工 miRNA は、遺伝子機能解析および特定の遺伝子を標的とした治療法に対して siRNA および shRNA 以上の有効性を有すると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 研究代表者が開発した人工 miRNA 前駆体におけるミスマッチやバルジ構造の位置を変化させ、アンチセンス鎖の RISC への取り込み効率が最も高い二次構造を決定することを第一の目的とした。

(2) (1)にて得られた結果を利用して、非常に相溶性が高い2つの遺伝子である Smad2 および Smad3 をそれぞれ特異的に識別・抑制可能な人工 miRNA を設計し、これらの人工 miRNA を発現するトランスジェニックマウスを作成して、人工 miRNA の配列特異性ならびに汎用性を探求することを第二の目的とした。

(3) 本研究全体を通じて、人工 miRNA の機能を応用したゲノム創薬に基づく RNA 医薬の実用化へ向けた基盤技術の確立を最終的な目的とした。

3. 研究の方法

(1) 人工 miRNA 前駆体の二次構造の最適化：研究代表者が開発した人工 miRNA 前駆体のステム領域の様々な部位にミスマッチを導入し、人工 miRNA 前駆体の二次構造の変化による標的遺伝子の発現抑制への影響について、ルシフェラーゼアッセイにて評価した。

(2) 相溶性が非常に高い Smad2 および Smad3 を識別可能な人工 miRNA の構築：(1)にて得られた結果に基づき、Smad2 および Smad3 をコードする mRNA の塩基配列中で相溶性が比較的低い領域を標的配列として人工 miRNA を設計・構築した。

(3) 人工 miRNA 発現制御システムの開発：人工 miRNA を遺伝子機能解析および遺伝子治療へ応用する際には人工 miRNA の発現制御が不可欠であるため、Cre-loxP システムを利用することにより人工 miRNA の発現を制御可能な

システムを構築した。また、このシステムに(2)にて構築した Smad2 および Smad3 を標的とした人工 miRNA を組み込んだ。

(4) 人工 miRNA 発現制御システムを導入したマウス ES 細胞の樹立と解析：(3)にて構築した人工 miRNA 発現制御システムをマウス ES 細胞へ導入したトランスジェニック ES 細胞 (miR-Tg ES 細胞) を樹立した。また、miR-Tg ES 細胞中で Cre リコンビナーゼを一過的に発現させ、人工 miRNA の発現をノーザンブロットングにて検出し、人工 miRNA 発現制御についての評価を行った。

(5) 人工 miRNA 発現制御システムを導入したトランスジェニックマウスの作出：(4)にて樹立した miR-Tg ES 細胞をマウス胚盤胞へ注入し、これを仮親の子宮へ移植することにて miR-Tg ES 細胞由来の細胞を有するキメラマウスを作出した。さらに、このキメラマウスを野生型マウスと交配することにより、全身の全ての細胞が人工 miRNA 発現制御システムを有するトランスジェニックマウス (miR-Tg マウス) を作出した。

4. 研究成果

(1) 人工 miRNA 前駆体のステム領域 (26 塩基対) の様々な部位にミスマッチを導入し、これらを用いてルシフェラーゼ遺伝子の発現に対する抑制効果を評価した結果、人工 miRNA 前駆体の二次構造には依存した遺伝子発現抑制効果の増強は見られず、人工 miRNA による遺伝子発現抑制は塩基配列に大きく依存していることが明らかになった。研究代表者が開発した人工 miRNA は内因性の遺伝子に対しても強い抑制効果を示すことから、以降の研究にも本来の二次構造を有する人工 miRNA を用いることとした。ここで得られた成果については、国内の学会ならびに国際学会にて発表した。

(2) マウス Smad2 および Smad3 は非常に高い相溶性を有するが、それぞれの mRNA の塩基配列を比較することにて、相溶性の低い領域を数カ所見いだした。これらの領域を標的配列として人工 miRNA を設計・構築し、Smad2 および Smad3 に対する抑制効果について評価を行い、同時に交差反応の有無についても評価した。その結果、各人工 miRNA は標的遺伝子 (Smad2 または Smad3) の発現を特異的に抑制し、Smad2 と Smad3 の高い相溶性にも関わらず交差反応は観察されなかった (図 1、2)。従って、標的遺伝子に高い相溶性を有する遺伝子群が見いだされる場合には、比較的相溶性の低い領域を標的配列として選択することにより、研究代表者が開発した人工

miRNA を用いて特異的に抑制することが可能であることが示唆された。

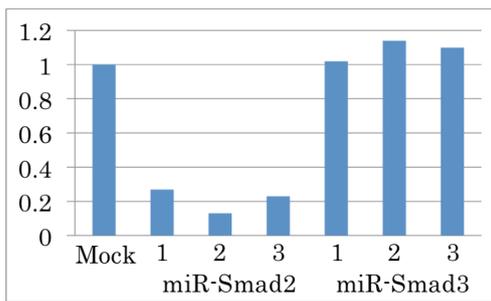


図1. 人工miRNAによるSmad2の抑制

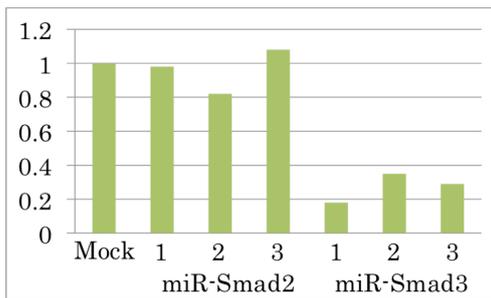


図2. 人工miRNAによるSmad3の抑制

(3) Cre-loxP システムを利用した人工 miRNA 発現制御システムを構築した。このシステムでは、本来の状態では RNA ポリメラーゼ停止モチーフにより人工 miRNA が転写されないが、Cre リコンビナーゼが発現すると2つの loxP 配列間で DNA の組み換えが起こり、RNA ポリメラーゼ停止モチーフが取り除かれて人工 miRNA と EYFP が共発現するように設計した (図3)。

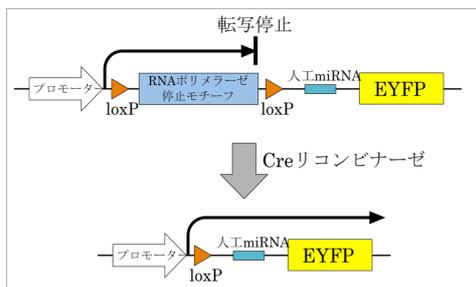


図3. 人工miRNA発現制御システム概念図

この人工 miRNA 発現制御システムを電気穿孔法にてマウス ES 細胞へ導入して G418 を用いた薬剤耐性セクションを行い、人工 miRNA 発現制御システムがゲノム DNA に組み込まれた miR-Tg ES 細胞を作成した。miR-Tg ES 細胞は、通常の状態では人工 miRNA も EYFP も発現しなかったが、Cre リコンビナーゼを一過的に発現させることにより人工 miRNA と

EYFP の発現が誘導された (図4、5)。すなわち、本研究にて構築した人工 miRNA 発現制御システムは設計通りに機能しており、人工 miRNA と EYFP が共発現することから、人工 miRNA が発現している生体組織を簡便に可視化できると考えられる。更に、この人工 miRNA 発現制御システムは導入した人工 miRNA の発現を制御するのみならず、miRNA 以外の機能性核酸 (リボザイムやアプタマー等) の発現制御や、タンパク質をコードしない non-coding RNA の機能解析への応用も可能である。特に non-coding RNA については、近年、最も研究が盛んな領域の一つであり、本研究において開発された人工 miRNA 発現制御システムは、今後、非常に有用なツールとなり得ると考えられる。なお、人工 miRNA 発現制御システムに関する成果は、論文として出版するために、現在、追加実験と原稿の執筆を行っている。

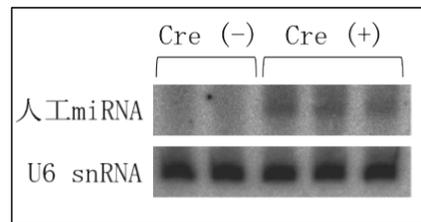


図4. Creリコンビナーゼによる人工miRNAの発現誘導

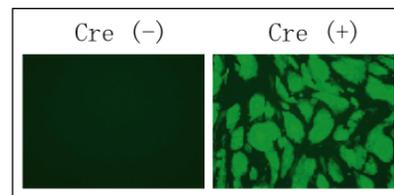


図5. Creリコンビナーゼによる蛍光タンパク質の発現誘導

(4) 上記の(3)にて作成した miR-Tg ES から miR-Tg マウスを作成した。このマウスはゲノム中に人工 miRNA 発現制御システムが組み込まれているが、通常は人工 miRNA を発現しない。そこで、様々な組織で Cre リコンビナーゼを発現する各種 Cre マウスと交配することにより、組織特異的に人工 miRNA と EYFP を共発現するマウスを作成し、現在、人工 miRNA および EYFP の発現、標的遺伝子 (Smad2 および Smad3) に対する抑制効果等について解析を進めている。今後、Smad2 および Smad3 遺伝子を欠損した各種ノックアウトマウスとの比較も行う予定である。

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2件)

- ① Zhu HL, Shibata A, Inai T, Nomura M, Shibata Y, Brock JA, Teramoto N. Characterization of NaV1.6-mediated Na⁺ currents in smooth muscle cells isolated from mouse vas deferens. Journal of Cell Physiology. 査読有、223 巻、2010、234-243.
- ② Teramoto N, Zhu HL, Shibata A, Aishima M, Walsh EJ, Nagao M, Cole WC. ATP-sensitive K⁺ channels in pig urethral smooth muscle cells are heteromultimers of Kir6.1 and Kir6.2. American Journal of Physiology - Renal Physiology. 査読有、296 巻、2009、107-117.

[学会発表] (計4件)

- ① 柴田篤志、金子沙世、寺本憲功、服巻保幸、Stoichiometric Analysis of Short Hairpin RNA in Cultured Cells. 日本分子生物学会、査読無、平成 21 年 12 月 12 日、神奈川県横浜市.
- ② 二井偉暢、岩城明子、佐々木達哉、柴田篤志、福吉由起、佐方功明、野村政壽、服巻保幸、統合失調症関連遺伝子 Grm3 ノックアウトマウスの作出と発現解析. 日本分子生物学会、査読無、平成 21 年 12 月 12 日、神奈川県横浜市.
- ③ Shibata A, Kaneko S, Teramoto N. Stoichiometric Analysis of Short Hairpin RNA in Cultured Cells. Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense Symposium. (査読有)、平成 21 年 11 月 4-5 日、福岡県福岡市.
- ④ 柴田篤志、金子沙世、寺本憲功、miRNA クラスターの介在配列の長さに依存した miRNA の非対称的発現. 日本薬理学会、査読無、平成 21 年 3 月 17 日、神奈川県横浜市.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
特記事項はありません

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 篤志 (SHIBATA ATSUSHI)

九州大学・大学院医学研究院・学術研究員

研究者番号：40467890

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：