

令和 4 年 4 月 9 日現在

機関番号：33101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16001

研究課題名(和文)新規gymnosis関連分子Ly6aの解析とメカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of lymphocyte antigen 6 complex, locus A (Ly6a) and elucidation of gymnosis mechanism

研究代表者

高橋 昌幸 (Takahashi, Masayuki)

新潟薬科大学・健康・自立総合研究機構・助教

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)：1本鎖核酸医薬は細胞内にキャリア分子を使用せずに取り込まれる。しかし、多くの1本鎖核酸は細胞内ではエンドソームに取り込まれてしまい治療効果を発揮することができない。1本鎖核酸医薬の治療効果を上げるためには1本鎖核酸の細胞内取り込みや細胞内輸送メカニズムを解明することが重要であると考えられる。今回申請者及び研究協力者たちはlymphocyte antigen 6 complex, locus A (Ly6a)が上記のメカニズムに関与するか否かを明らかにするための解析を行った。我々の研究により、Ly6aは1本鎖核酸の細胞内取り込みには関与しないが、細胞内輸送に関与することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1本鎖核酸医薬は細胞内にキャリア分子を使用せずに取り込ませることができる。しかし、大多数の1本鎖核酸医薬は細胞内ではエンドソームに取り込まれてしまい治療効果を発揮することができないという問題点もある。それを解決するためには1本鎖核酸の細胞内取り込みメカニズムや細胞内輸送メカニズムを解明することが重要であると考えられる。本研究により上記のメカニズムにLy6aが一部関与していることを明らかになった。よって本研究は、将来的にアンチセンス核酸のような核酸医薬の治療効果増強に繋がる重要な研究だと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Single stranded oligonucleotides (ssOligos) can be taken up by living cells without carrier molecules, a large part of incorporated ssOligos are trapped in the endosomes and do not exert therapeutic effects. To improve their therapeutic effects, it would be important to elucidate the mechanism of cellular uptake and intracellular trafficking of ssOligos. In this study, we investigated how Ly6a affects cellular uptake and intracellular trafficking of ASOs. Fluorescence microscopic analysis suggested that most of naked ASOs are trafficked to the lysosomes via the endosomes. The data obtained from flow cytometry and fluorescence microscopy together showed that although the Ly6a level barely affects the total cellular uptake of ssOligos, it appears to affect the intracellular trafficking of ssOligos

研究分野：核酸医薬

キーワード：核酸医薬 Ly6a

### 1. 研究開始当初の背景

2019年の現時点において8種類の核酸医薬がFDAによって認可されている。この内の、7種類は1本鎖構造の核酸医薬である。申請者は過去に核酸医薬に関する研究に携わっており、学部から大学院博士後期課程において、血液がん治療用1本鎖核酸開発に関わる研究に従事していた。申請者はtRNase Z<sup>L</sup>の酵素活性を応用した遺伝子発現抑制法のTRUE(tRNase Z<sup>L</sup>-utilizing efficacious) gene silencing法を基盤とした疾病治療研究に関わっており、数種類の血液がん治療薬候補sgRNA(small guide RNA)薬を発見している(M.takahashi, et al. 2014, *Leukemia Research*)。申請者も関わっていた1本鎖構造の核酸医薬は裸のまま細胞内に取り込まれる。この現象はgymnosisとも呼ばれており、そのメカニズムは不明であった。申請者は、詳細が不明であるgymnosisメカニズムの解明は、基礎分野や創薬開発分野の発展のために重要であると考え、そのメカニズム解明に関する研究を行うことになった。その結果、細胞膜に一部局在しているSIDT2(systemic RNA interference deficient (SID-1) protein transmembrane family members 2)という分子が裸の1本鎖核酸の細胞内取り込みに関与することを見出し、gymnosisメカニズムの一部解明を行うに至った(M.takahashi, et al. 2017, *RNA Biology*)。さらに同じSIDT familyであるSIDT1(systemic RNA interference deficient (SID-1) protein transmembrane family members 1)もgymnosisに関与することを見出し、論文投稿段階にまで至っている。

### 2. 研究の目的

申請者は、既にgymnosisに関与しており、ユビキタスな発現を示すSIDT2をノックダウンさせた場合に、発現が上昇している遺伝子がgymnosisに関与しているのではないかと考え、内在性SIDT2をノックダウンさせたMEF(Mouse embryonic fibroblast)のDNAマイクロアレイ解析を行うことになった。その結果、Ly6a(Lymphocyte antigen 6 complex, locus A)という遺伝子の発現が上昇していることが判明した。マウスLy6aは、マウスのリンパ球や造血幹細胞に多く発現しているが、その機能に関しては不明なところが多い分子である。今回申請者は予備実験として、このLy6aを培養細胞であるMEFに過剰発現させ、裸の蛍光1本鎖核酸の細胞内取り込みを観察することになった。その結果、Ly6aを過剰発現させた細胞は核酸の細胞内取り込みが上昇したことが確認された(図1A,B)。よって、Ly6aはgymnosisに関与することが予想されたため、本研究ではLy6aの詳細な解析を行いgymnosisと関与するかを明らかにし、これまでよく知られていなかったLy6aの新しい機能の解明を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究の目的はLy6aがgymnosisに関与するか否かを明らかにし、知られていなかったLy6aの機能を解明することである。まずLy6aの細胞内局在解析を行い、細胞膜上に局在しているか否かを明らかにする。次にMEF等のマウス培養細胞内の内在性Ly6aノックダウン条件下において、蛍光標識1本鎖核酸の細胞内取り込みの違い、同様にmiRNAを標的にした裸のアンチセンス核酸の効果にどのような変化が見られるかも解析する。同じ実験をLy6a過剰発現条件下でも実施する。また、Ly6aによる核酸の細胞内取り込みがエンドサイトーシスと関係を持つか、阻害剤を用いて核酸取り込みやアンチセンス効果を観察する。そして、Ly6aとユビキタスな発現を示すgymnosis関連分子SIDT2に、どのような関係性があるかを解析するために、Ly6aとSIDT2の発現制御を行い、核酸取り込みやアンチセンス効果を観察する。以下に詳細な研究方法・計画、研究体制・計画通りに進まない場合の対応を記述する。

[研究方法・計画(年度計画は、図2の年次計画も参照)]

令和2年度:(1)Ly6aの細胞内局在解析

Ly6aが裸の1本鎖核酸の細胞内取り込みに関与するのであれば、少なくとも細胞膜

上に局在していると考えられる。それを確認するために、MEF 等のマウスの培養細胞の細胞膜に Ly6a が局在しているかをビオチン・ストレプトアビジンによるプルダウンアッセイや、EGFP タグ付き Ly6a を用いて解析する。

#### 令和2年度:(2)内在性 Ly6a ノックダウン細胞における、細胞内への1本鎖核酸の取り込み及び裸のアンチセンスオリゴの効果解析

培養細胞の内在性 Ly6a を siRNA によってノックダウンさせる。その培養細胞を PBS で洗浄し、蛍光標識した1本鎖 2'-O-メチル化オリゴを裸のまま導入する。その裸の蛍光標識1本鎖核酸の細胞内導入効率が、ネガティブコントロールの培養細胞に導入された蛍光標識1本鎖核酸とどのような違いが見られるのかを共焦点顕微鏡を用いて観察する。同様の条件で、miRNA-16 を標的にした裸の1本鎖アンチセンスオリゴのアンチセンス効果にもどのような違いが見られるのかを qPCR を用いて解析する。

#### 令和2年度:(3)Ly6a 過剰発現細胞における、細胞内への1本鎖核酸の取り込み及び裸のアンチセンスオリゴの効果解析

(2)と同様の内容の実験を Ly6a 過剰発現条件下の培養細胞で行う。この実験に関しては、前述したように、既に蛍光標識1本鎖核酸の細胞内取り込みに関しては予備実験を行っているため、アンチセンス効果の確認解析を中心に行う。予備実験の再現性の確認も行う。

#### 令和3年度:(4)Ly6a が関与する1本鎖核酸の細胞内取り込みがエンドサイトーシスであるかを明らかにするための解析

(2)、(3)と同じ方法で、内在性 Ly6a ノックダウン細胞、Ly6a 過剰発現の細胞を準備する。それらの条件にさらにエンドサイトーシス阻害剤を添加した状態の細胞を準備し、その細胞における1本鎖核酸細胞内導入効率と miRNA-16 を標的にしたアンチセンスオリゴのアンチセンス効果を解析し、Ly6a が関与する gymnosis がエンドサイトーシスであるかを明らかにする。

#### 令和3年度:(5)Ly6a と gymnosis 関連分子の SIDT2 との関係性を明らかにするための解析

(1)から(4)の実験によって、Ly6a が gymnosis に関与することが明らかになった場合、Ly6a を介する裸の1本鎖核酸の細胞内取り込み経路は、SIDT2 と同じ経路なのか、並行経路であるかを明らかにするために、Ly6a と SIDT2 を同時に過剰発現もしくはノックダウンすることで発現制御を行い、蛍光標識1本鎖核酸の取り込み及びアンチセンス効果にどのような影響が出るかを共焦点蛍光顕微鏡や qPCR を用いて解析する。

#### 4. 研究成果

1本鎖核酸医薬は細胞内にキャリア分子を使用せずに取り込ませることができる。しかし、大多数の1本鎖核酸医薬は細胞内ではエンドソームに取り込まれてしまい治療効果を発揮することができないという問題点もある。1本鎖核酸医薬の治療効果を上げるためには1本鎖核酸の細胞内取り込みや細胞内輸送メカニズムを解明することが重要であると考えられる。今回申請者及び研究協力者たちは lymphocyte antigen 6 complex, locus A (Ly6a)が上記のメカニズムに関与するか否かを明らかにするための解析を行った。共焦点顕微鏡解析の結果から Ly6a は1本鎖核酸の細胞内取り込みには関与しないが、フローサイトメトリー解析の結果から細胞内輸送に関与するという非常に重要な結果を得ることができた。よって本研究は、将来的にアンチセンス核酸のような核酸医薬の治療効果増強に繋がる重要な

研究だと考えられる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Masayuki Takahashi, Mineaki Seki, Masayuki Nashimoto, Tomohiro Kabuta	4. 巻 2021
2. 論文標題 Perturbing the Normal Level of SIDT1 Suppresses the Naked ASO Effect	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 記載なし
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2021/2458470	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 MasayukiTakahashi, MineakiSeki, MasayukiNashimoto	4. 巻 573
2. 論文標題 A naked antisense oligonucleotide with phosphorothioate linkages is taken up intracellularly more efficiently but functions less effectively	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 140-144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.08.035	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋 昌幸, 関 峰秋, 梨本 正之, 株田 智弘
2. 発表標題 SIDT1の発現レベル変化によるASOの効果抑制について
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------