

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501304

研究課題名(和文) 全く新しい方法による標的mRNA切断を応用した腫瘍に対する新規核酸医薬の開発

研究課題名(英文) Development of mRNA ablation using completely new functional nucleic acid constructs

研究代表者

成田 美和子(Narita, Miwako)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：30281009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：新しい方法とはすべての細胞内に存在するトランスファーRNA(tRNA)前駆体切断酵素を働かせて腫瘍の発症や進展に関与するmRNAを切断することである。標的mRNAと結合することによりtRNA前駆体と類似の構造をとるようにデザインしたsmall guide (sg) RNAを腫瘍細胞に導入しtRNA前駆体切断酵素に標的mRNAを切断させる。この方法は我々の共同研究グループが開発した方法である。この方法を用いて、複数の腫瘍増殖に関連するmRNAをターゲットとしてsgRNAの効果を複数の白血病細胞株において確認し報告した。この3年間の結果を踏まえ、今後も同方法による有効な核酸医薬の開発の検討を行う。

研究成果の概要(英文)：TRUE gene silencing is a new method to delete specific cellular RNAs by using tRNAse ZL and small guide RNA (sgRNA) that cleaves a pre-tRNA-like or micro-pre-tRNA-like complex consisting of cellular target RNA. We investigated the possibility that heptamer-type sgRNA can be used as nucleic acid medicine to treat hematological malignancies. We investigated the effect of artificial sgRNAs on mRNAs with high-targeting sgRNAs affect leukemic cells. We confirmed that sgRNA can be taken up by cells without any transfection reagents, and that the naked sgRNAs targeting several tumor-associated mRNA can reduce specific mRNA levels and the amounts of tumor-associated protein in several leukemic cell lines. These sgRNAs efficiently induced apoptosis in these cells. These encouraging findings lead us to follow the possibility that heptamer-type sgRNAs targeting anti-apoptotic mRNAs can be used as RNA medicine against hematological malignancies.

研究分野：血液内科学

科研費の分科・細目：臨床腫瘍学

キーワード：sgRNA mRNA apoptosis tRNaseZL WT1

1. 研究開始当初の背景

tRNA は DNA から転写されるが、転写された直後の tRNA 前駆体には、その 3' 末端に成熟 tRNA には見られない伸長配列が存在する。tRNA 前駆体 3' 末端の伸長配列が tRNase Z などのエンドヌクレアーゼによって除去されることにより成熟 tRNA となる。

tRNase Z による tRNA 前駆体の切断に関するメカニズムとその標的 mRNA 切断への応用については、我々の共同研究グループが以下のことを明らかにした。

tRNA 前駆体は四つ葉のクローバ様構造をしており、そのヘアピンループ構造が tRNase Z による切断部位の認識に重要である。標的 RNA と相補的な塩基配列をもつ sgRNA を作成し、この sgRNA と標的 RNA との間で tRNA 前駆体に類似した構造の複合体を形成することにより、細胞内に普遍的に存在する tRNase Z によってこの複合体を切断することができる。また、sgRNA の構造については、標的 mRNA と tRNA 前駆体類似複合体を形成する 5'-half-tRNA の他、7 塩基の sgRNA (ヘプタマー) でも標的 RNA の発現を阻害することが分かった。ヘプタマー sgRNA と標的 mRNA で形成される複合体は micro tRNA 前駆体様の構造を示すが、この複合体も tRNase Z に認識され標的 mRNA が切断されることも明らかにした。

2. 研究の目的

RNA 前駆体切断酵素を用いて mRNA を破壊するという方は、我々の共同研究グループが開発した全く新しい方法で、世界中の他の研究者からの同様な報告はない。

本法を応用した腫瘍細胞の増殖抑制やアポトーシスについては、すでに我々は予備的な検討を行っており、明らかな増殖抑制やアポトーシスの誘導が認められている。

本研究で用いる sgRNA は標的 RNA と結合して micro tRNA 前駆体様の構造をとるようデザインされた 7 塩基の分子であることから、現在同じ目的で一般的に使用されている 22 塩基前後の siRNA で問題となるとともに、細胞内への移行が優れている。予備的な sgRNA の細胞への添加実験ではインターフェロン産生反応は軽微であるとともに、細胞内への移行が優れている。予備的な sgRNA の細胞への添加実験ではインターフェロンの産生は認められていない。また、7 塩基の分子ではあるが、tRNase Z が作用するためにはステムループ構造を形成する必要があるため、標的 mRNA に対する特異性が高く、オフターゲット効果も軽度であると考えられる。sgRNA は 2-O-methyl 化もしくは locked nucleic acid (LNA) とよばれる修飾を行うことにより、分解酵素に対し耐性を獲得することも確認している。このため、sgRNA が核酸医薬と

して開発できれば、通常の薬剤のように、静脈注射や皮下注、それに局注の可能な製剤が開発されることが想定され、腫瘍の治療成績向上に大きく貢献できるものと考えられる。

本研究の目的は、ヘプタマー sgRNA を用いて腫瘍抗原等の mRNA を阻害する方法が、各種の腫瘍細胞に対する治療法として応用可能であることを明らかにするとともに、sgRNA による mRNA 切断法を効果的に応用できる腫瘍抗原等の分子を選択し、かつ sgRNA の最も効果的な塩基配列を決定することである。また、また有効な sgRNA については、これらの sgRNA ライブラリーを用いた細胞培養系を作成し、MTT アッセイを用いて各種の腫瘍細胞に対し複数の sgRNA の感受性試験を同時に行うなど、本研究をさらに発展させた検討を行うことにより、ヘプタマー sgRNA を用いた標的 mRNA 切断法が確立され、臨床応用への道を開くと考えた。

3. 研究の方法

主に造血器腫瘍細胞を対象として、腫瘍細胞のアポトーシス・分化の抑制や増殖を促進する因子に対して網羅的に sgRNA をデザインし、当該 mRNA 発現の抑制、アポトーシスの誘導、細胞増殖の抑制等の検討を行い、有効な sgRNA を選択した。これらの sgRNA ライブラリーを用いて、腫瘍細胞に対する sgRNA 感受性試験を行った。一部の sgRNA についてはマウスを用いたヒト腫瘍細胞に対する in vivo 感受性試験を行い in vivo における効果を確認した。

まず、腫瘍細胞のアポトーシス・分化の抑制、増殖を促進する標的 mRNA (腫瘍関連遺伝子 WT1, bcr-abl, aurora kinaseA, hTERT, survivin, PRAME, proteinase3, Bcl-2 HAGE, Polo-like kinase 1 RHAMM, G250 PARK7 等) の塩基配列において、sgRNA との間で 7 塩基の相補的配列によりアクセプターシステムを形成し、かつその直接の上流で標的 mRNA が 5 塩基の相補的配列により T システム (ヘアピンループ構造) を形成するような sgRNA の塩基配列をデザインした。各 sgRNA について、RT/RQ-PCR を用いて標的 mRNA 発現の阻害活性を検討することにより、最適な sgRNA のデザインを選別した。

次に、各種の白血病細胞株に網羅的に腫瘍関連抗原の sgRNA を加えて培養した。RT/RQ-PCR を用いて、sgRNA を添加培養した白血病細胞の当該遺伝子の mRNA 発現の阻害を確認するとともに、Western blotting およびフローサイトメトリーを用いて、培養細胞の当該タンパク発現の阻害を確認した。また、sgRNA を添加培養した

白血病細胞について、経時的な MTT アッセイによる細胞増殖の抑制、および Annexin V/7AAD 染色した培養細胞をフローサイトメトリーで解析することにより、sgRNA を介したアポトーシスの誘導について検討した。

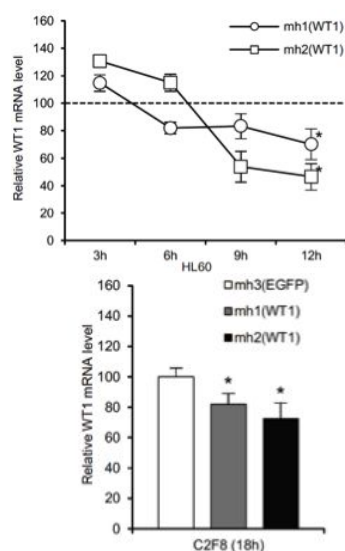
腫瘍細胞に対する細胞障害活性が認められた sgRNA については、マウスゼノグラフモデルを用いた in vivo での検討を行った。ヌードマウスの皮下に移植した人白血病細胞株に対する sgRNA の局所および尾静脈からの投与の効果について検討し、sgRNA の有効性を明らかにした。

4. 研究成果

(1) 他の transfection reagents を用いずに sgRNA が単独で容易に細胞内に取り込まれることを再度確認するため、target とする mRNA に対する sgRNA を FITC で標識し、白血病細胞株数種類に添加培養を行い、EGFP の発光を蛍光顕微鏡にて確認した。

(2) sgRNA を添加培養した細胞株において target となる mRNA の発現レベルを Real-time PCR 法を用いて解析し、抑制されることを確認した。

(3) target となる mRNA に対する複数の sgRNA が、その RNA が関与する腫瘍関連タンパクを発現している複数の細胞株において、増殖抑制的に作用することを、経時的な MTT アッセイによる細胞増殖の抑制、および Annexin V/7AAD 染色フローサイトメトリー解析で同時に確認した。コントロール sgRNA をとしては EGFP に対するものを使用した。



(HL60 と C2F8 に対する WT1 mRNA に対する sgRNA - mh1 および mh2) の増殖抑制効果)(Wanatabe N, Nairta M, Takahashi M et al

Leuk Res. 2013;37(5):580-5)

(4) WT1 および Bcl-2 に対する sgRNA で処理した白血病細胞株より抽出した mRNA を用いた RACE (rapid amplification of cDNA ends)を行い、切断部位の塩基配列を同定することにより、標的 mRNA が、tRNase Z により切断されていることを確認した。

(5) bcl-2 に対する sgRNA については、マウスゼノグラフモデルを用いた in vivo での検討を行った。ヌードマウスの皮下に移植した人白血病細胞株に対する sgRNA の局所および尾静脈からの投与の効果について検討し、sgRNA の有効性を明らかにした。

以上より sgRNA は腫瘍関連 mRNA の発現を抑制し腫瘍の増殖を抑制することが確認された。今後は、sgRNA の種類をさらに増やし、新鮮腫瘍細胞に対する抑制効果を確認する検討を続ける予定である。

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)

Takahashi M, Elbarbary RA, Nakashima A, Abe M, Watanabe N, Narita M, Takahashi M, Tamura M, Yoshida T, Nashimoto M naked RNA heptamer targeting the human Bcl-2 mRNA induces apoptosis of HL60 leukemia cells. Cancer Letters. 2013;328(2):362-8.

Watanabe N, Narita M, Saito A, Yamahira A, Taniguchi T, Furukawa T, Yoshida T, Miyazawa T, Nashimoto M, Takahashi M. Induction of apoptosis of leukemic cells by TRUE gene silencing using small guide RNAs targeting the WT1 mRNA. Leuk Res. 2013;37(5):580-5

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: ヒト白血病細胞のアポトーシスを誘導するヘプタマー型スモールガイド核酸

発明者: 梨本正之、高橋益廣、成田美和子、吉田哲郎、宮澤達也

権利者: 学校法人新潟科学技術学園新潟薬科大学、国立大学法人新潟大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2012/071503

取得年月日: 2012年8月24日

国内外の別: 国際(PCT)

種類:

番号:

出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成田 美和子 (NARITA Miwako)
研究者番号：30281009
新潟大学・医歯学系・准教授

(2) 研究分担者

梨本 正之 (NASHIMOTO Masayuki)
研究者番号：30228069
新潟薬科大学・応用生物科学部・教授

(3) 連携研究者

()

研究者番号：