

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640090

研究課題名(和文) microRNA機能を抑制する新規核酸分子iMIRの開発と治療戦略の確立

研究課題名(英文) Inhibition of microRNA functions by novel nucleic acids, iMIR

研究代表者

恵口 豊 (Eguchi, Yutaka)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：20243206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：miR-16とmiR-21を標的としたiMIR (inhibitor of miRNA)分子のうち、miRNA結合配列をGly-Glyで結合した「Gly-Gly型iMIR」とテレフタル酸(TPA)で結合した「TPA型iMIR」に強い活性を確認した。さらに、miR-122を標的としたRNA型「Gly-Gly型iMIR」と「TPA型iMIR」に強いC型肝炎ウイルス増殖抑制能を見いだした。この活性は免疫応答を介さず、細胞増殖抑制能を示さないため、C型肝炎ウイルス感染に対する核酸医薬治療に利用できる可能性がある。これらの成果をMolecular Therapy-Nucleic Acidsに発表した。

研究成果の概要(英文)：We developed novel nucleic acid iMIR (Inhibitor of miRNA). We constructed various iMIRs targeting miR-16 and miR-21 by joining 3 miRNA-binding sequences (MBS) containing bulge-type imperfect complementarity with amino acid amidites, and found that Gly-Gly-type iMIR and TPA-type iMIR showed strong activity to inhibit miRNA functions, assessed by luciferase reporter assay. We also found that Gly-Gly-type RNA-iMIR and TPA-type RNA-iMIR targeting miR-122 strongly inhibited replication of hepatitis C virus (HCV), and 10-fold more effective than LNAs in inhibiting HCV replication. iMIR treatment of OR6 cells reduced HCV replication without inducing interferon responses or cellular toxicity, suggesting that iMIRs are promising as novel antiviral agents. These results were published in Molecular Therapy-Nucleic Acids (2015, 4, e219).

研究分野：分子生物学、細胞生物学

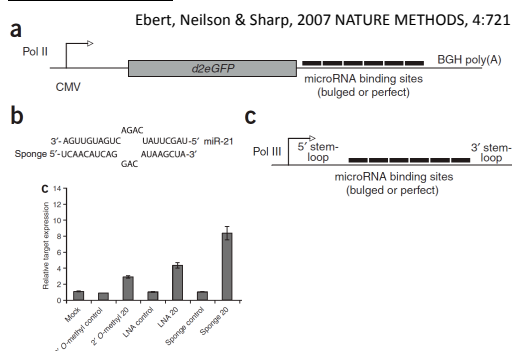
キーワード：iMIR miRNA 核酸医薬 miR-16 miR-21 miR-122 C型肝炎ウイルス アミノ酸アミダイト

1. 研究開始当初の背景

マイクロ RNA (microRNA, miRNA) の発現量や活性の変化がさまざまな疾患に関与していることが、近年非常に注目されている。miRNA の発現量を人為的に調節する核酸医薬の開発は、これらの疾患の治療を目指して急速に進んでいるが、その効率、安定性や副作用の低減など、解決すべき問題も多く指摘されている。現在もっとも注目されている LNA (Locked nucleic acid) 及びその類似物質は、特異性や安定性に優れているが、生体毒性が懸念されている。本研究では、miRNA の活性抑制能を持つ新たな核酸医薬物質として、アミノ酸などの天然化合物をリンカーとして miRNA 結合配列をタンデムに複数結合した新規核酸分子 iMIR (Inhibitor of miRNA : miRNA 阻害剤) を作成し、その活性を検証することを試みた。

2007 年、Phillip Sharp らは、miRNA の相補配列を直列につないだ分子「Sponge」が LNA よりも効率よく miRNA の活性を抑制することを報告した (Nature Methods, 2007 4:721、図 1)。しかし、この技術を合成核酸

図 1 Sponge技術



医薬として利用しようとする、長鎖 RNA による免疫応答は回避できない。一方、我々と株式会社ボナックの研究チームは、逆位反復配列 (inverted repeat) を持つ RNA の中間にアミノ酸残基を導入すると、血中半減期が飛躍的に向上し、免疫応答なしに強い RNAi (RNA 干渉) 活性が得られることを報告した (PLoS One, 2012;7(8):e42655)。この二つの技術を融合し、miRNA の相補配列をアミノ酸等の天然化合物をリンカーとして直列に複数結合した新規核酸分子 iMIR (Inhibitor of miRNA) を合成すれば、miRNA 活性を効率よく抑制できると考えた。

また、miR-122 は、C 型肝炎ウイルスの増殖複製に必須であることが知られており、2'O-methyl RNA oligonucleotide (Science 2005 309 1577) や LNA (Science 2010 327 198) を用いて miR-122 の宿主細胞内濃度を下げると、C 型肝炎ウイルスの増殖が劇的に抑制されることが報告されていた。

2. 研究の目的

本研究では、無修飾の核酸分子を、アミノ酸などの天然化合物をリンカーとして直列に

複数結合した新規核酸分子 iMIR (Inhibitor of miRNA) を用いて、miRNA の活性抑制を目指した。miRNA 結合配列を 1 分子内に複数持ち、また核酸の末端部と中間部に非核酸領域を導入することにより、生体内での安定性が向上し、副作用が低減すると期待される。このような新規核酸分子を多数作成し、miRNA 抑制効率を解析することにより、その基本構造を確立するとともに、C 型肝炎ウイルスの増殖に必要な miR-122 を標的とした iMIR 分子によって、C 型肝炎ウイルスの増殖を抑制することを試みた。これらの情報を総合し、さまざまな疾患の治療戦略に iMIR を使う方法論を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) miR-16 及び miR-21 を標的とした iMIR 分子の解析

miR-16, miR-21 を標的とした iMIR 分子を作成した。4 塩基のループアウトを含む miR-16, miR-21 の相補鎖 (miRNA 結合配列 : MBS) をアミノ酸アミダイトあるいはテレフタル酸アミダイトを用いて 3 コピー結合し、また核酸の末端部にも同様の残基を導入した。核酸部分は、DNA 型と RNA 型を作成し、1 コピー分子と末端の非核酸残基を持たない分子も作成した。合成には、株式会社ボナックの協力を得て、自動核酸合成機を用いた。

各 miRNA 活性を測定できるルシフェラーゼレポーターシステムを導入した HCT116 細胞株または HEK293T 株に、各種 iMIR 分子及びその誘導体をリポフェクションにより導入し、LNA をコントロールとして、その miRNA 活性抑制能を検討した。また、TLR3, TLR7, TLR9 を強制発現している HEK293 細胞株に各種 iMIR を導入し、NF-κB 活性をモニターする SEAPorter アッセイ系を用いて、自然免疫応答の誘導能を解析した。

(2) miR-122 を標的とする iMIR 分子の C 型肝炎ウイルス増殖系における活性

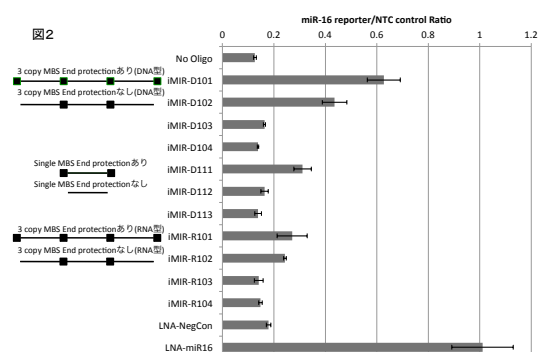
miR-122 を標的とした iMIR 分子を作成し、OR6 細胞株に投入することによって iMIR の C 型肝炎ウイルス増殖系への影響を、LNA をコントロールとして検討した。検討項目として、細胞内の C 型肝炎ウイルスの複製中間体 RNA 量の定量、細胞内の C 型肝炎ウイルスコア抗原の定量、C 型肝炎ウイルスプロモーターをモニターするルシフェラーゼアッセイによる転写活性の定量を行った。

また、interferon-stimulated gene 15 (ISG15) と retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I) の二つの遺伝子の発現量の RT-qPCR による定量により、自然免疫応答の誘導能を解析するとともに、XTT アッセイによって細胞増殖能を解析し、iMIR の副作用について検討した。

4. 研究成果

(1) miR-16 及び miR-21 を標的とした iMIR 分子の解析

miR-16 を標的とする HCT116 細胞を用いた実験系では、miRNA 結合配列をアミノ酸アミダイトの一種である Gly-Gly で結合した「Gly-Gly 型 iMIR」とテレフタル酸 (TPA) アミダイトで結合した「TPA 型 iMIR」に強い活性を確認した。結果の一部を図 2 に示す。



この miRNA 抑制活性は、先行研究で機能が知られている LNA に比べて若干弱い、概ね匹敵すると考えている。miRNA の相補配列の分子数を揃えるために 3 倍量「モノメリック iMIR」を用いた場合と比較したところ、どちらもモノマー分子よりも強い活性を示した。このことは、iMIR 上への RISC complex の協調的な集積メカニズムが存在することを示唆している。また、両端をアミノ酸アミダイトで保護することにより活性が上昇することがわかった。従って、アミノ酸アミダイトは iMIR に核酸分解酵素に対する耐性を付与していると考えられる。この miR-16 を標的とする実験系では、DNA 型 iMIR の方が RNA 型 iMIR よりも強い活性を持っていた。後述するように他の miRNA に対しては、RNA 型 iMIR の方が強い活性を示す場合もあるので、iMIR 分子として DNA 型 iMIR と RNA 型 iMIR のどちらが適しているかは、miRNA の種類による可能性がある。実際、miR-21 を標的とした実験系では、DNA 型 iMIR はあまり強い活性を示さない、RNA 型を好むと考えられる。

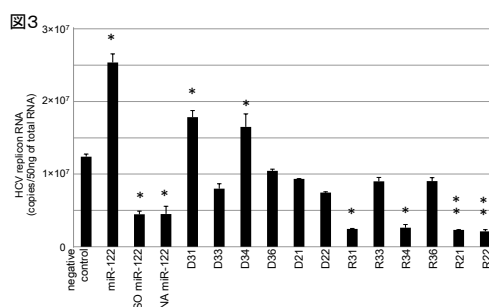
SEAPorter アッセイ系を用いた自然免疫応答の誘導能の解析では、ポジティブコントロールである poly(I:C)や TLR リガンドは強く反応を誘導するのに対して、iMIR は全く自然免疫応答を誘導しなかった。従って、自然免疫応答の誘導のような副作用はほとんどないと結論できる。このように、非天然物である LNA に比べて nuclease 耐性能は劣るものの、天然物を用いた iMIR 分子を改良することも可能であり、iMIR は核酸医薬開発のプラットフォームとして非常に有望であると考えられる。

miR-16 を標的とする HEK293T 細胞を用いた実験系では、HCT116 細胞を用いた場合に比べて、活性が弱かった。従って、iMIR の活性は細胞種に依存する考えられた。細胞

内に存在する miRNA の濃度が iMIR の活性に影響を与える可能性が考えられる。

(2) miR-122 を標的とする iMIR 分子の C 型肝炎ウイルス増殖系における活性

細胞内の C 型肝炎ウイルスの複製中間体 RNA 量の定量、細胞内の C 型肝炎ウイルスコア抗原の定量、C 型肝炎ウイルスプロモーターをモニターするルシフェラーゼアッセイによる転写活性の定量的すべての試験項目において、miR-122 を標的とした iMIR のうち、RNA 型の「Gly-Gly 型 iMIR」と「TPA 型 iMIR」に強い C 型肝炎ウイルス増殖抑制能があることを見いだした。結果の一部を図 3 に示す。iMIR 中の miRNA 結合配列 (MBS)



に 4 塩基のループアウトを含むもの (bulge 型 D21, D22, R21, R22)、3 塩基のミスマッチを含むもの (bubble 型 D31, D34, R31, R34)、完全に相補的なもの (perfect match 型 D33, D36, R33, R36) のうち、R21, R22, R31, R34 に強い活性が見られることから、部分的に非相補的な配列を含む iMIR 分子が強い活性を持つことが示唆された。このウイルス増殖抑制能は先行研究で用いられている LNA よりも少なくとも 8 倍高い活性を示した。また、iMIR 導入後 72 時間後においても高い活性が維持されていること、両端のアミノ酸アミダイトにより exonuclease T に対する耐性度が上昇することを示すことができた。これらのことは、iMIR が通常のオリゴヌクレオチドに比べて、生体内安定性が高いことを示している。一方、DNA 型の iMIR 分子には RNA 型ほど強い活性は観察されなかった。miR-16 に対する iMIR の解析結果と合わせて考えると、RNA 型と DNA 型の違いについては今後の研究課題と考えている。また、上述した miR-16 に対する iMIR と同様、miRNA の相補配列の分子数を揃えるために 3 倍量「モノメリック iMIR」を用いた場合と比較したところ、どちらもモノマー分子よりも強い活性を示した。従って、DNA 型、RNA 型にかかわらず、iMIR 上への RISC complex の協調的な集積メカニズムが存在すると考えられる。また、iMIR が ISG-15 遺伝子や RIG-I 遺伝子の発現を誘導しないことを示し、このウイルス増殖抑制が自然免疫応答を介していないことを明らかにした。さらに、iMIR に細胞増殖抑制能などの副作用がない

ことも明らかにした。これらの iMIR の性質は、miR-122 に対する iMIR が C 型肝炎ウイルス感染に対する核酸医薬治療に利用できることを示唆している。これらの成果をまとめた論文は Molecular Therapy-Nucleic Acids に掲載された。

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)

Saori Itami, Yutaka Eguchi, Takayuki Mizutani, Eriko Aoki, Tadaaki Ohgi, Masahiko Kuroda, Takahiro Ochiya, Nobuyuki Kato, Hiroshi I Suzuki, Norifumi Kawada and Yoshiki Murakami
Control of HCV Replication with iMIRs, a Novel Anti-RNAi Agent.
Molecular Therapy Nucleic Acids, 2015;4:e219

[学会発表] (計 3 件)

・ Keystone Symposia, “RNA Silencing”
2014 年 1 月 31-2 月 5 日、Sheraton Seattle Hotel・Seattle, Washington USA
Novel RNAi agent can control HCV replication

Yoshiki Murakami, Saori Itami, Masahiko Kuroda, Takayuki Mizutani, Takahiro Ochiya, Yutaka Eguchi, Hiroshi Suzuki

・第 72 回日本癌学会 (2013 年 10 月 3 日横浜)

miR-122 に対する iMIR は C 型肝炎ウイルス複製抑制に効果的である

伊丹沙織、村上善基、黒田雅彦、落谷孝広、恵口豊、河田則文

・第 5 回 日本 RNAi 研究会年会 (2013 年 8 月 30 日広島)

shRNA ライブラリーの開発と細胞死関連遺伝子のスクリーニング

恵口豊

6. 研究組織

(1)研究代表者

恵口 豊 (EGUCHI, Yutaka)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20243206

(2)研究分担者

村上 善基 (MURAKAMI, Yoshiki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00397556

(3)連携研究者

鈴木 洋 (SUZUKI, Hiroshi)

東京大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：00587793

落谷 孝広 (OCHIYA, Takahiro)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：60192530

黒田 雅彦 (KURODA, Masahiko)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：80251304