

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 8 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：25670028

研究課題名(和文) 動脈硬化症に関連する長鎖ノンコーディングRNAの探索と核酸創薬

研究課題名(英文) The identification of long-noncoding RNAs associated with the formation of atherosclerotic plaques and their therapeutic manipulation strategy

研究代表者

小比賀 聡 (Obika, Satoshi)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80243252

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：動脈硬化は死因の上位を占め、既に形成してしまった動脈硬化を縮退させる治療法が切望されている。本研究は、動脈硬化の治療法開発を目的として、動脈硬化形成過程で中心となるマクロファージの極性化・泡沫化に關与する長鎖ノンコーディングRNA(lncRNA)の探索を行った。マウスよりマクロファージを回収する方法を確立することに成功した。また様々な因子を用いて、マクロファージのM1型およびM2型への変換を試み、これに成功した。さらに、この極性転換に伴って変動するlncRNAを同定することにも成功した。これらのlncRNAを制御することで、今後動脈硬化症の治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：It has not yet been established a therapeutic strategy to reduce atherosclerotic lesions and plaques. We here tried to identify a novel long-noncoding RNA (lncRNA) associated with plaque formation and progression. We initially established an isolation methodology of monocytes from mice and handling of differentiated polarized macrophages. From these isolated primary cells, we prepared complementary DNAs and analyzed up- or down-regulated lncRNAs. We observed significant changes in expression for some lncRNAs upon polarization. We further invested whether oligonucleotide-based therapeutics can be a potential therapeutic strategy for manipulating lncRNA function. These findings would further enable us to develop a therapeutic strategy to treat atherosclerosis.

研究分野：核酸医薬

キーワード：ノンコーディングRNA 核酸医薬 動脈硬化 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) は、200塩基長以上のタンパク質に翻訳されない RNA として認識され、近年のマイクロアレイやシーケンサーの技術革新とあいまって、探索、機能・生合成・制御機構の解明が加速している。現時点ではその機能のほとんどは未解明であるが、一部の lncRNA について個別に機能解析が行われた結果、多くが転写を受けた後も核内に滞留し、i) 細胞ストレスや温度などの刺激依存的に発現量を調節し、遺伝子の転写等を活性化するシグナル分子、ii) 転写因子に結合し、転写を抑制するなどのデコイ分子、iii) クロマチン修飾因子などをリクルートするガイド分子、iv) 核内構造体(核小体、核スペックルなど)の構成要素として機能していることが明らかとなってきた。多数の新規 lncRNA が見出される中で、癌、神経疾患、糖尿病を含む様々な疾患関連 lncRNA も見出されている。一方、申請者らにおいては動脈硬化性疾患の発症頻度の高い遺伝性高コレステロール血症患者に対して高い脂質低下効果を示すアンチセンス医薬の開発に成功してきた。この方法は換言すれば、コレステロールという環境因子を取り除くことによって動脈硬化発症を間接的に予防する手法と言える。しかしながら、一度形成した動脈硬化プラークを縮退させるにはより積極的な手法が必要であるがそのような方法はまだ無い。

2. 研究の目的

動脈硬化は死因の上位を占め、既に形成してしまった動脈硬化を縮退させる治療法が切望されている。長鎖ノンコーディング RNA (lncRNA) は、近年様々な疾患関連との関連が示唆されている。そこで本研究では動脈硬化を安定化・縮退するための新しい方法論として、本疾患に関わる lncRNA を探索し、制御することにより動脈硬化症を治療する方法を探索する。すなわち、動脈硬化形成過程で中心となるマクロファージの性質を悪化させうる lncRNA を探索し、これらの活性を制御する独自の人工核酸を開発し、動脈硬化抑制の可能性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

単球の単離、マクロファージへの分化誘導および極性化

動脈硬化の発症には炎症と免疫応答が密接に関連する。本研究では、まずマウスより単球を単離し、マクロファージへ分化誘導を行った。マクロファージには M1 型と M2 型といった亜型の存在が認識されており、本研究では C57Bl/6J マウスの大腿骨や頸骨より単離した骨髄より前駆細胞を精製し、M0 型へとまずは誘導を行った。これを各種条件にて M1 型および M2 型マクロファージに極性化を試みた。極性化の成否については、各種マーカーの発現量を定量 PCR あるいは ELISA を用い

て検討した。

LncRNA の探索

lncRNA は、単一の構造体の名前ではなく、転写の様式の様々に異なる転写産物の集合体である。例えば、タンパク質をコードする DNA のアンチセンス鎖から転写される場合には「Natural antisense RNA」と呼ばれ、タンパク質をコードする DNA の上流 (<1000bp) から転写されている場合には「Bidirectional lncRNA」と呼ばれる。高密度タイリングマイクロアレイなどの技術により多くの新規 lncRNA が見出され、近年 lncRNA のデータベースも整理されつつあるが (<http://lncrnadb.com/>)、未だその機能についてはほとんど解明されていない。本研究においては、まず PCR アレイを用いて既知の lncRNA のうち M1 型マクロファージと M2 型マクロファージの極性転換に伴う lncRNA の発現量変化をモニタリングした。具体的には、極性化したマクロファージそれぞれを培養し、細胞から RNA 抽出を行い、逆転写を行ったのちに、PCR アレイを用いて定量的に各 lncRNA の発現量を評価した。

新規人工核酸の開発

当研究グループにて開発を進める糖部架橋型人工核酸 (BNA) は、オリゴヌクレオチドの形で用いることにより標的 RNA の効率的な阻害が可能である。種々の新規化学修飾をほどこした BNA を設計、合成し、その機能を物理化学的あるいは生物学的に評価した。

マクロファージによるオリゴ核酸の取り込みに関する検討

培養マクロファージに対する BNA 搭載型オリゴ核酸の有効性を検討するために、オリゴ核酸のマクロファージ内取り込みについて蛍光標識を導入した核酸を用いて細胞内挙動を観察した。

4. 研究成果

単球の単離、マクロファージへの分化誘導および極性化

単球の単離に先駆けて、マクロファージの分化誘導のためのコンディション培地の作成を実施した。具体的には、L929 細胞を 4.7×10^5 個 75cm^2 flask に播種し、55 mL の DMEM, High Glucose, HEPES (Gibco)+10%FBS, 1%Pen/Strep で 7 日間培養を行ったのちに、得られた培地を $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターで処理し、 -20°C 保存した。ついで、7 週齢の C57Bl/6J マウスの大腿骨を単離切開し、RPMI1640 をもちいて単球を洗い出した。これらからマクロファージへの分化を行うべく、マクロファージ分化用培地 (RPMI 1640 medium +10%FBS + 1% Glutamax + 1% Pen/Strep + 10%L929 condition medium) で培養し、マクロファージへの分化を行った。得られた BMM を mouse recombinant IFN 及び、IL-4 含有

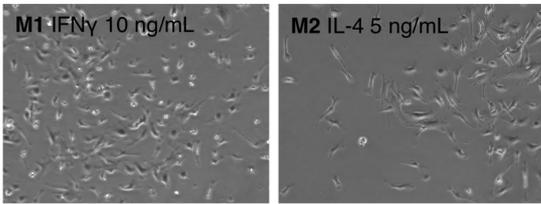


図 2 極性化刺激後の細胞の様子

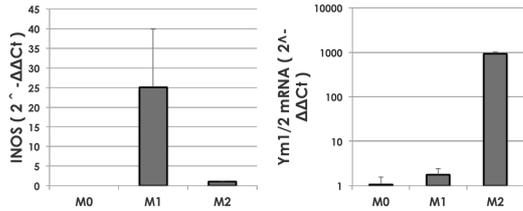


図 2 マーカー遺伝子の発現解析

培地で 2 日間培養し、M1/M2 マクロファージのマーカである Arginase I, Arginase II, Ym1/2, INOS の mRNA を確認した。結果、浮遊状態が極性化に伴い接着細胞へと変化した様子を確認し、明らかな細胞の形態変化を認めた(図 1)。さらに、マーカー遺伝子についても解析を行ったところ、Arginase I, Arginase II については、発現量が少なく、正確な解析ができなかった。一方で、図 2 に示すように INOS や Ym1/2 遺伝子の発現量については特徴的な傾向が見出された。このほか、幾つかのマーカー遺伝子について検討を行ったが、これに準じる結果となり、マウス大腿骨単球より極性化マクロファージを単離することに成功した。

LncRNA の探索

上述のようにマクロファージの単離に成功したため、続いてこれらの極性化マクロファージについて M1⇄M0⇄M2 の間で発現量が変動する lncRNA の探索を PCR アレイをもちいて約 90 種の既知 lncRNA (機能については多くが未知) をスクリーニング評価した。興味深いことに、極性化誘導に伴って発現量が大きく増加あるいは減少する lncRNA が見出された。これらについては、今後これらについて阻害や過剰発現系を用いて、詳細な機能解明を進めていきたい。

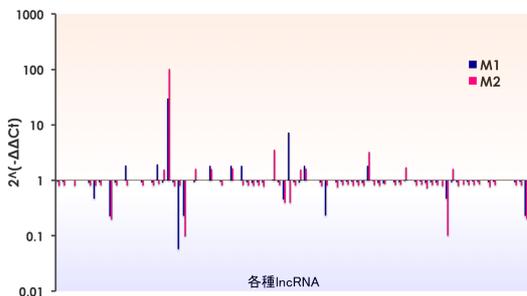


図 3 lncRNA の発現量

新規人工核酸の開発

人工核酸技術を用い、lncRNA の多彩な機能を増強あるいは阻害する方法には幾つか考えられる。我々は当研究グループが開発を進めてきたアンチセンス法をうまく利用することによってこれを効率的に達成できると考えた。アンチセンス法とは lncRNA に相補的なオリゴヌクレオチドを利用し、生体内で相補鎖を形成させることで lncRNA の機能を制御する方法である。機序は主に 2 種あり、1) 立体障害機構と 2) RNase H による機構である。これまで我々は BNA の様々な疾患関連 mRNA に対する高いノックダウン活性を証明してきた。本研究においては、新たに lncRNA を標的としたアンチセンス核酸構造の最適化を目的として、lncRNA の重要な機能に注目した。すなわち、lncRNA は様々なタンパク質との複合体 (RNP) を形成し、その機能を発揮していることが知られているため、アンチセンス核酸には高い相補鎖形成能ともにより効率的に RNAP 構造形成を阻害する機能が求められる。そこで、本研究では BNA のうちリボースの 2' 位に様々な官能基を導入することが可能な AmNA に着目し、2' 位の置換基を様々な改変した AmNA 誘導体を作成し、その基本的なアンチセンス活性ならびに体内動態について解析した。結果、より立体的に嵩高い置換基を導入した AmNA 誘導体については RNase H による認識を受けにくいことが明らかとなった。このことは、すなわち大きな置換基を持つ AmNA 誘導体は、RNA-タンパク質 (RNP) 複合体形成を強く阻害することを示している。これらの新規 BNA 誘導体を用いることによってより効率的に lncRNA の活性を制御することができるだろう。

マクロファージによるオリゴ核酸の取り込みに関する検討

これまでアンチセンス核酸の体内動態の制限のため主に肝臓を標的としたアンチセンス核酸の研究が主であった。しかしながら、我々の BNA をはじめとした様々な化学修飾技術の進展に伴い腎臓、がん組織、筋組織など様々な臓器へ対応することが可能となってきた。一方、マクロファージについてはアンチセンスがどれくらい効率的に取り込まれ機能を発揮するかほとんど情報がない。lncRNA を高効率に阻害・活性化するアンチセンス核酸を探索するにはマクロファージを

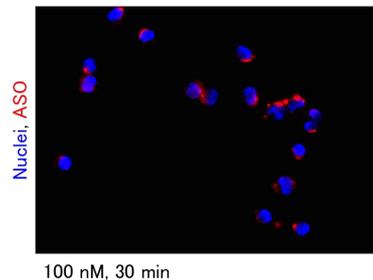


図 4. マクロファージへの核酸取り込み

用いたスクリーニング探索をより効率的に行うための洗練された評価系が必要となる。このような評価系の構築を目指し、本研究では、マクロファージへのアンチセンス核酸の導入効率について検討を行った。マクロファージへと誘導した単球に、Cy3 という蛍光色素で標識したアンチセンス核酸を添加し、一定時間後に細胞内に取り込まれたアンチセンスを評価したところ予想を超える量のアンチセンス核酸が細胞内に移行していることを見出し(図4) マクロファージへの核酸移行性に関する重要な知見を得た。

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 2 件)

1. Yamamoto, T., Yahara, A., Waki, R., Yasuhara, H., Wada, F., Harada-Shiba, M. and Obika, S. (2015) Amido-bridged nucleic acids with small hydrophobic residues enhance hepatic tropism of antisense oligonucleotides in vivo. *Org. Biomol. Chem.*
2. Mitsuoaka, Y., Fujimura, Y., Waki, R., Kugimiya, A., Yamamoto, T., Hari, Y. and Obika, S. (2014) Sulfonamide-Bridged Nucleic Acid: Synthesis, High RNA Selective Hybridization, and High Nuclease Resistance. *Org. Lett.*, **16**, 5640-5643.

[学会発表](計 0 件)

[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

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b>

007/

6. 研究組織

(1)研究代表者

小比賀聡(OBIKA SATOSHI)

研究者番号：80243252

(2)研究分担者

山本剛史(YAMAMOTO TSUYOSHI)

研究者番号：80636994

(3)連携研究者

()

研究者番号：