

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：32645
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17H04067
研究課題名(和文) 新規non-codingRNAであるghRNAの単離同定と疾患応用

研究課題名(英文) Identification of novel non-coding RNA

研究代表者

黒田 雅彦 (Kuroda, Masahiko)

東京医科大学・医学部・主任教授

研究者番号：80251304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：miRNAやlincRNAなどのnon-coding RNA(ncRNA)の異常は疾患の発症に深く関与する。そこで、我々は次世代シーケンサーを用いて、新規のncRNAであるendogenous guide hairpin RNA(eghRNA)の単離に成功した。興味深い事に、eghRNAはmiRNAと同様に、標的配列を有するmRNAの翻訳阻害を示す。また、miRNAのプロセッシングに必須なDICER1とAgo familyを欠失した細胞でも、mRNAの翻訳抑制を示す事が明らかになった。このような新規のncRNAは、疾患のメカニズム研究や新規の医薬品開発に繋がる事が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで疾患に関与するnon-coding RNAは、miRNAやlincRNAしか明らかでなかった。しかし、本研究によって、新たなncRNAとしてeghRNAが単離された。一部のeghRNAは、U1 snRNAの一部から転写されることが示された。また、肺癌で発現が高いeghRNAは、SUV39H1, CDK2AP1, CCL2, ABCC6, METといった腫瘍発症に関連する遺伝子の発現を制御していた。しかし、eghRNAの生理作用は、まだ不明な点も残っている。疾患との関連も今後の検討課題である。しかし、今後次世代シーケンサーの普及により、多くの疾患でのeghRNAの解析が期待される。

研究成果の概要(英文)：Dysfunction of non-coding RNA (ncRNA) such as miRNA and lincRNA are deeply involved in disease development. Therefore, we succeeded in isolating a novel ncRNA, an endogenous guide hairpin RNA (eghRNA), using a next-generation sequencer. Interestingly, eghRNA, like miRNA, exhibits translational inhibition of mRNA with a target sequence. In addition, it was revealed that cells lacking DICER1 and Ago family, which are essential for miRNA processing, also suppressed translation of mRNA. Such novel ncRNAs are expected to lead to disease mechanism research and new drug development.

研究分野：分子病理学

キーワード：non-codingRNA eghRNA 肺癌 siRNA

1. 研究開始当初の背景

分子細胞生物学の進歩は、発がんメカニズムの解明や分子標的医薬品の開発の発展をもたらした。特に近年は、ALK、EGFR など固有のがん細胞のドライバー遺伝子に対する医薬品や免疫 check point 阻害剤の開発が進み、福音をもたらしている。しかしながら、がん細胞集団の多様性から、耐性クローンが出現することで、根治には至っていない。このがん細胞の多様性は、古典的には、Vogelstein が提唱した Chromosomal instability (CIN) によって説明される。しかし、生命の根源である、細胞増殖・分裂機構を利用し、免疫機構から逃れ、永遠に生き延びようとする細胞集団がどのようにして生まれてくるのか。また、CIN の獲得は、偶然なのか、必然なのかこれまでの我々の知識では説明は難しい。このような難題に対する糸口として、我々はゲノムの転写産物である RNA に着目し研究を行ってきた。特に RNA の約 5 割を占める、翻訳されない Non-coding RNA (ncRNA) に注目している。この ncRNA の中で、microRNA (miRNA) の発現制御維持機構が、がんの発生・進展に関与することから、miRNA の補充療法の開発を行ってきた^{1,2,3,4}。

2. 研究の目的

microRNA や lincRNA などの non-coding RNA(ncRNA)の異常は疾患の発生に深く関与する。これらの RNA を標的とする治療戦略は、次世代の分子標的治療薬として期待されている。このような背景の中、研究者らは次世代シーケンサーを用いて、肺がんの発生・進展に関与する新規の ncRNA である endogenous guide hairpin RNA(eghRNA) の単離に成功した。eghRNA は ncRNA の中でも最も短く、Ago を介して標的の mRNA の翻訳に関与する。本研究では、この新規の eghRNA の生理的解析と治療薬を開発する。

3. 研究の方法

(1) eghRNA の網羅的同定と疾患での変異の同定

これまで研究者らは、マウスの肺がん組織やヒト肺がん細胞株を用いて eghRNA の単離、同定の解析を行ってきた。その結果、幾つかのヒト eghRNA が、特異的に標的遺伝子を抑制する可能性を見いだした。この結果は、eghRNA が様々な組織において発現し、組織特異的に遺伝子発現を制御している可能性を示唆するものである。従って、今後の eghRNA の生物学的な意義を深めるためにも、組織における eghRNA の発現の多様性は重要である。さらには、今後の治療応用も考慮し、様々な疾患での解析は意義がある。そこで、本研究項目においては、マウスの各組織 (脳、肺、肝臓、腎臓、食道、胃、消化管、精巣、卵巣)、ヒト組織、がん疾患においての全 RNA 解析を次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析する。

(2) eghRNA の RNA 干渉のメカニズム解析

これまでの解析から、合成した ghRNA は生体内に生理的に存在する RNA 干渉機構によって、遺伝子抑制活性を示すことが明らかになっている。一方、内在性に存在する eghRNA の作用機構は、不明な点が多い。そこで、本研究項目においては、ゲノムから転写された RNA からどのような機構で eghRNA がプロセスされ、最終的に標的遺伝子の翻訳抑制を行うのか明らかにする。具体的には、我々はすでに、Ago1、Ago2、Ago3 の Ago family を欠失した細胞株の樹立に成功している。これらの Ago family 欠損細胞株を用いて eghRNA の標的遺伝子の抑制メカニズムを明らかにしていく。

(3) 遺伝子改変マウスを用いた生理的 eghRNA の機能解析

eghRNA は、我々が世界に先駆けて単離、同定した ncRNA であることから、その生理的な機能解析は行われていない。そこで、eghRNA を欠失した動物を作製し、その生理的機能の解明を目指した。一方ゲノム上の eghRNA の転写領域に関しては、未だ不明な点がある。従って、通常のノックアウトの手法では、eghRNA ノックアウトマウスは作製できないことが推察された。そこで、今回の解析にあたっては、miRNA の解析に使われる miRNA sponge の手法を用いる⁵。具体的には、図 1 に示すような eghRNA が有する seed 配列を 8 個ランダムにしたコンストラクションを作製した。コンストラクションの作製においては、いわゆる標的配列のコアとなる seed 配列のみ有するもの、ミスマッチ配列を導入して miRNA の結合に類似させたもの、全長を有するものを作製する。レポーター遺伝子としてはルシフェラーゼ遺伝子を用いて、遺伝子発現抑制能もモニタリングしていく。

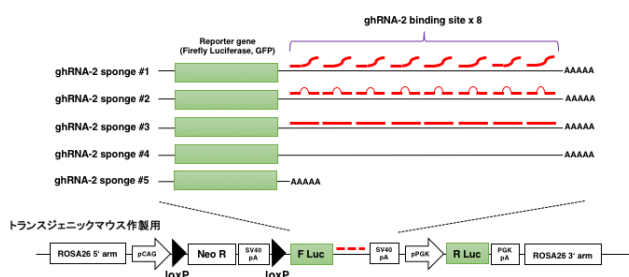


図 1 eghRNA-2 sponge の構築

(4) eghRNA の構造体に類似した癌に対する核酸医薬品の開発

eghRNA の構造の特徴としては、RNA 干渉の活性を有する構造体の中で、最も塩基数が少ないことが特徴である (図 2)。さらに塩基数が少ない点は、自然免疫応答と実際の医薬品開発で有利となる。そこで、活性化型 KRAS 遺伝子の発現により肺がんを自然発症するモデルマウスを用いて、抗 Ras eghRNA の核酸医薬品の開発研究を行った。具体的には、RAS 遺伝子に対する siRNA の塩基配列を eghRNA 構造体にして、さらに核酸を化学修飾して、治療効果の検討を行った。

| | ghRNA | siRNA | miRNA |
|------|--------|-----------------|-----------------------|
| 構造 | 1本鎖RNA | 2本鎖RNA | 2本鎖RNA |
| 塩基長 | 30塩基 | 40塩基 (20塩基対) | 42-46塩基 (21-23塩基対) |
| 標的 | mRNA | mRNA | mRNA |
| 作用機序 | RNA分解 | RNA分解 | 翻訳阻害 |

図 2 RNA 干渉作用を有する 3 つの RNA 構造体の特徴

4. 研究成果

(1) eghRNA の網羅的同定と疾患での変異の同定

マウスの各組織 (肺、肝臓、腎臓)、ヒト組織、がん疾患においての全 RNA 解析を次世代シーケンサーを用いて網羅的に解析した。その結果、図 3 に示すような eghRNA 構造体の単離に成功した。

| 塩基配列 | 二次構造 | 塩基長 | マウス正常肺組織 | マウス肺がん組織 | ヒト末梢血細胞 |
|---------------------------------|---------------------------------|-----|-------------|--------------|-------------|
| AGCAGAGTGGCGCAGCGGAAGCGTCTGGGC |(((((((.....))))))..... | 31 | 269 (35.0%) | 1521 (69.8%) | 31 (2.5%) |
| CCGCCTGGGAATACCGGTGCTGAGGCT | (((.....))))..... | 29 | 70 (9.1%) | 98 (4.5%) | 242 (19.5%) |
| TAGTGGGGGACTGCGTTCGCGCTCTCCCTG | ..(((((((.....))))))..... | 31 | 43 (5.6%) | 20 (0.9%) | 8 (0.6%) |
| GTGGGGGACTGCGTTCGCGCTCTCCCTGAC | (((.....(((((((.....))))))..... | 31 | 41 (5.3%) | 20 (0.9%) | 0 (0%) |
| TGGGGGGCCCAAGTCTCTCGATCGAGGCC | (((.....))))..... | 31 | 32 (4.1%) | 15 (0.7%) | 223 (18.0%) |
| TTTCGTAGGTGAACCTCGGAAGGATCATTA | (((.....(((((((.....))))))..... | 32 | 28 (3.6%) | 41 (1.8%) | 3 (0.2%) |
| CGTAGGTGAACCTCGGAAGGATCATTA | (((.....))))..... | 28 | 28 (3.6%) | 41 (1.8%) | 3 (0.2%) |
| TCCTGTCTAGTGGCTAGGATTCGGCG | ..(((((((.....))))))..... | 28 | 12 (1.6%) | 11 (0.5%) | 1 (0.1%) |
| CCCTCGGATCGCCCGCGGGGTGGGCC |(((((((.....))))))..... | 29 | 7 (0.9%) | 1 | 2 (0.2%) |
| CGGGGGCCGAGGTGGGATCCGAGGCC | (((.....(((((((.....))))))..... | 28 | 7 (0.9%) | 7 (0.3%) | 1 (0.1%) |
| CAATTTTGCAGCTCTACGAGACTG |(((((((.....))))))..... | 28 | 4 (0.5%) | 9 (0.4%) | 18 (1.4%) |
| ATACAGGACTCTTCGAGCCCTGTAAT | (((.....))))..... | 28 | 4 (0.5%) | 1 | 9 |
| CTGACCCCTTCCCGGGGGGATCGGCG | (((.....(((((((.....))))))..... | 30 | 3 (0.4%) | 2 (0.1%) | 0 |
| AGCAGAGCGCGCAGCGGAAGCGTGTGGGC |(((((((.....))))))..... | 31 | 2 (0.3%) | 7 (0.3%) | 1 (0.1%) |
| AGCAGCGTGGCGCAGCGGAAGCGTGTGGGC | ..(((((((.....))))))..... | 31 | 2 (0.3%) | 11 (0.5%) | 1 (0.1%) |
| AGTGGGGACTGCGTTCGCGCTTCCCTG | (((.....(((((((.....))))))..... | 30 | 1 (0.1%) | 0 | 8 (0.6%) |
| GCGGGCGGTATTCCCATGACCCCGCGGCG | (((.....(((((((.....))))))..... | 31 | 1 (0.1%) | 0 | 0 |
| CGGGTGTCCCGGGGGCGGGGGTTC | (((.....))))..... | 29 | 1 (0.1%) | 0 | 0 |
| GTAAGTGTACTGGAAAGTGCACTGGACGA | (((.....(((((((.....))))))..... | 30 | 0 | 1 | 4 (0.3%) |
| GGCTGGTCCCATGTAAGTGGGTTATCAGAAC | ..(((((((.....))))))..... | 31 | 0 | 0 | 86 (7.0%) |

図 3 ヒトとマウスにおける内在性の ghRNA 様核酸

次にこれらの eghRNA の生理的作用の解明を試みた。具体的には、eghRNA を人工的に合成し、細胞に遺伝子導入を行いマイクロアレイ法での解析を行った。その結果、発現の高い eghRNA は、複数の遺伝子の発現抑制を行うことが示された。特に、肺癌で発現が高い eghRNA は、SUV39H1, CDK2AP1, CCL2, ABCC6, MET といった腫瘍発生に関連する遺伝子の発現を制御していることが明らかになった。

| Gene name | Gene ID | SL4 sequence | Chr. |
|-----------|---------|---|------|
| 1 Rnu1a1 | 19842 | tagtgggggactcggttcgctctcccctg | 11 |
| 2 Rnu1a2 | 111972 | 配列情報無し | 12 |
| 3 Rnu1b1 | 19844 | tagtgggggactcggttcgctctcccctg | 3 |
| 4 Rnu1b2 | 19845 | tagtgggggactcggttcgctctcccctg | 3 |
| 5 Rnu1b3 | 111971 | 配列情報無し | 3 |
| 6 Rnu1b6 | 19847 | tagtggggga ^a ctcggttcgctctcccctg | 3 |

図 4 eghRNA-2 のゲノム情報

(2) eghRNA の RNA 干渉のメカニズム解析

本研究項目においては、Ago family の欠損細胞などを用いて、eghRNA の細胞内でのプロセスの過程を解析した。まずはじめに、生体内の miRNA のプロセッシングに必須な DICER1 と Ago family を CRISPR/Cas9 を用いて欠失した細胞の樹立を行った。その後、これらの樹立した細胞において、eghRNA の活性を検討した。その結果、図 5 に示す様に、egh 構造体は DICER1 欠損細胞でも活性を有することが明らかになった。AXL 遺伝子を標的とする eghR-2 は、DICER1 を欠失した細胞でも、AXL 遺伝子を抑制した。

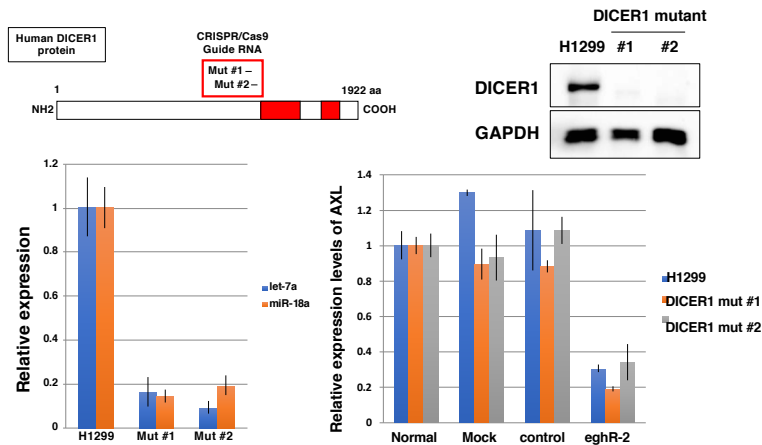


図5 eghRNA 構造体の DICER1 欠損細胞での検討

さらに RNA の抑制に中心的な役割を果たす RISC 複合体の構成成分である Ago2 の eghRNA の関与を検討した。その結果、図 6 に示すように、eghRNA は Ago2 を欠失した細胞においても、標的遺伝子の抑制効果を示した。以上の結果から、eghRNA の RNA 干渉作用は、これまで明らかになっていない未知の構造体が存在している可能性がある。一方、siRNA 医薬品と違い Ago2 に依存しない RNA 干渉作用は、核酸創薬を考慮すると、長所になることも考えられる。

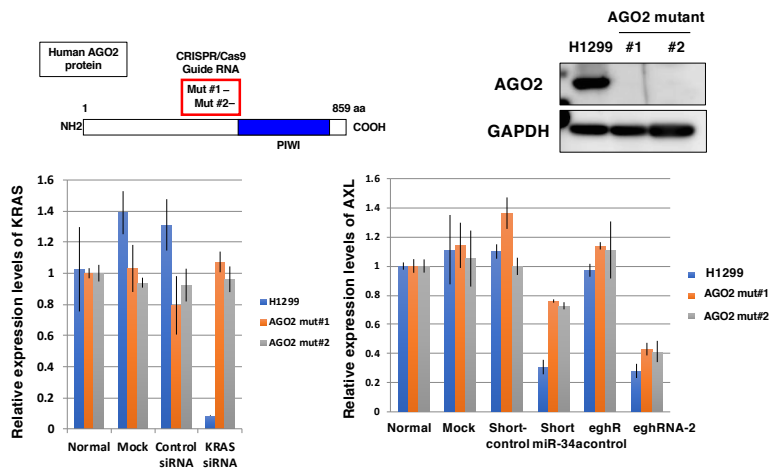


図6 eghRNA 構造体の Ago2 欠損細胞での検討

(3) 遺伝子改変マウスを用いた生理的 eghRNA の機能解析

eghRNA の転写に関しては、ゲノム上、未だ不明な点があることから、通常のノックアウトの手法では、eghRNA ノックアウトマウスは作製できないことが推察された。そこで、今回の解析にあたっては、miRNA の解析に使われる miRNA sponge の手法を用いて、図 1 に示すような eghRNA が有する seed 配列を 8 個ランダムにしたコンストラクションを作製した。今回の検討においては、マウスの ROSA の遺伝子座に挿入するコンストラクションを作製し、ES 細胞への導入を行った。その結果、4 種類の組換え ES 細胞の樹立に成功した。一方この ES 細胞からの germline transmission を 3 回行ったが、いずれの場合も、この変異をもったキメラマウスからは作製出来なかった。そこで現在、ES 細胞を変えて、再度組換え ES 細胞の単離を行っている。既に組換え ES 細胞は 3 クローン得ており、現在 ermline transmission の確認を行っている。

(4) eghRNA の構造体に類似した癌における核酸医薬品の開発

これまでの上記の結果から図 6 に示すような ghRNA の特徴が明らかになってきた。そこで本項目では、この eghRNA の構造を利用した新規核酸医薬品の開発を行った。癌における標的の遺伝子は、原因遺伝子にもかかわらず、未だに分子標的医薬品が開発されていない Ras 遺伝子を選択した。そこで、まず肺癌細胞株 (A549) において、eghRNA 構造体の Ras siRNA の配列決定を行った。その結果、図 7 に示すように 28 塩基の ghRNA を決定した。また、この ghRNA 構造体の Ras siRNA は、通常の 40 塩基の siRNA と同様のノックダウン活性を持つことが明らかになった。さらに、in vitro で腫瘍の増殖抑制が確認された (図 8)。

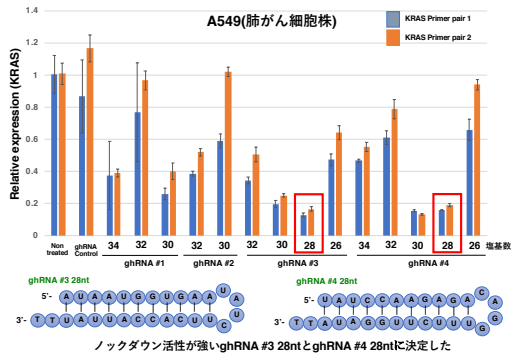


図7 KRASghRNA 構造体の検討

さて、今後の臨床応用を考えると、生体内で安定した核酸が必要となる。これまで、上市された核酸医薬品は、2' 糖部修飾 Fluoro 化と O-Me 化をしており体内毒性が低く、最も一般的な化学修飾である。従ってこの修飾を様々な規則に従って検討し、ノックダウン活性を維持する修飾を検討した。具体的な修飾方法は、①Pyrimidine 骨格 (シトシン・ウラシル) を Fluoro 化、② Pyrimidine 骨格 (シトシン・ウラシル) を Fluoro 化し、Purine 骨格 (アデニン・グアニン) を O-Me 化、③O-Me 化、Fluoro 化の順番で交互に 3 種類の修飾方法を用いた。そして、これらの修飾方法の結果を以下に示す。唯一 ghRNA#3 O-Me Fluoro の順に交互に化学修飾したものだけノックダウン活性を維持していた。同じ修飾をしても配列が違っているとノックダウン活性は減弱した。またこの検討において、KRAS 変異型の細胞株である HCT116 や MIA PaCa-2 においても同様に ghRNA#3 O-Me Fluoro の順に交互に化学修飾したものだけがノックダウン活性を維持するという結果を得ることができた。

図8 KRAS 変異肺癌細胞における増殖抑制

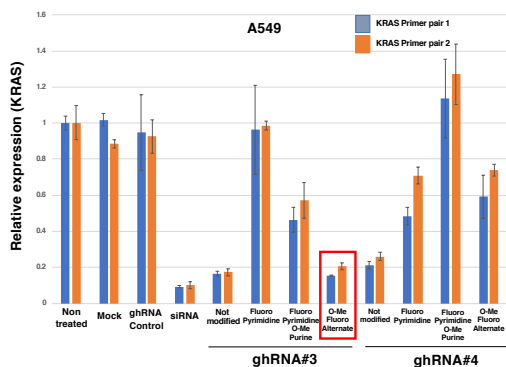
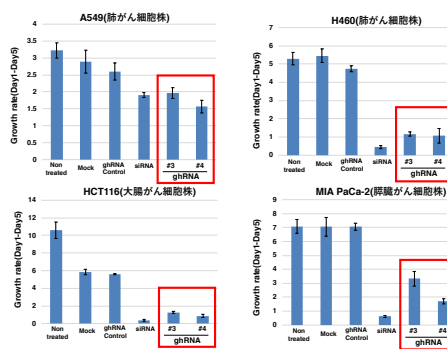


図9 化学修飾 Fluoro 化と O-Me 化の検討

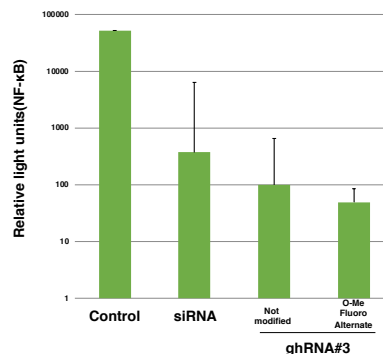


図10 ghRNA に対する自然免疫反応の検討

さらに、これまで我々が明らかにしてきた eghRNA 構造体の自然免疫の応答の優位性を検討した。具体的には、ghRNA に対するパターン認識受容体を介した自然免疫活性化の検討としてルシフェラーゼアッセイを行った。方法としては 2 本鎖 RNA を認識する TLR3 を過剰発現させた細胞に NF-κB のベクターを挿入後に核酸を導入し、24 時間後に測定を行った。図 10 に示すように、siRNA と ghRNA とを比較すると自然免疫応答が抑制され、化学修飾をするとさらにその傾向が強くなることが証明された。

<引用文献>

1. Matsumoto Y, Itami S, Kuroda M, Yoshizato K, Kawada N, Murakami Y. MiR-29a Assists in Preventing the Activation of Human Stellate Cells and Promotes Recovery From Liver Fibrosis in Mice. 24(10):1848-1859, 2016.
2. Ohno S, Itano K, Harada Y, Takanashi M, Sudo K, Ikeda N, Kuroda M. Development of Novel Small Hairpin RNAs That do not Require Processing by Dicer or AGO2. Mol Ther. 24(7):1278-89. 2016
3. Ohno S, Kuroda M. Exosome-mediated targeted delivery of miRNAs. Meth Mol Biol. vol.1448. 2016
4. Ohno S, Takanashi M, Sudo K, Ueda S, Ishikawa A, Matsuyama N, Fujita K, Mizutani T, Ohgi T, Ochiya T, Gotoh N, Kuroda M. Systemically Injected Exosomes Targeted to EGFR Deliver Antitumor MicroRNA to Breast Cancer Cells. Mol Ther. 21(1):185-191. 2013.
5. Wang Z. The concept of multiple-target anti-miRNA antisense oligonucleotide technology. Methods Mol Biol. 676:51-7, 2011

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計20件（うち査読付論文 20件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 20件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Kurata A, Saito A, Hashimoto H, Fujita K, Ohno S, Kamma H, Nagao T, Kobayashi S, Yamashina A, Kuroda M. | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Difference in immunohistochemical characteristics between Takayasu arteritis and giant cell arteritis: It may be better to distinguish them in the same age | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Modern Rheumatology | 6. 最初と最後の頁 1~10 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2019.1570999 | 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 Iida M, Hazama S, Tsunedomi R, Tanaka H, Takenouchi H, Kanekiyo S, Tokumitsu Y, Tomochika S, Tokuhisa Y, Sakamoto K, Suzuki N, Takeda S, Ueno T, Yamamoto S, Yoshino S, Fujita K, Kuroda M, Nagano H. | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 Overexpression of miR-221 and miR-222 in the cancer stroma is associated with malignant potential in colorectal cancer | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Oncology Reports | 6. 最初と最後の頁 1621-1631 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2018.6575 | 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 Higuchi H, Yamakawa N, Imadome K, Yahata T, Kotaki R, Ogata J, Kakizaki M, Fujita K, Lu J, Yokoyama K, Okuyama K, Sato A, Takamatsu M, Kurosaki N, Alba SM, Azhim A, Horie R, Watanabe T, Kitamura T, Ando K, Kashiwagi T, Matsui T, Okamoto A, Handa H, Kuroda M, Nakamura N, Kotani A | 4. 巻 131 |
| 2. 論文標題 Role of exosomes as a proinflammatory mediator in the development of EBV-associated lymphoma | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Blood | 6. 最初と最後の頁 2552~2567 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1182/blood-2017-07-794529 | 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 該当する |
| 1. 著者名 Umehara R, Kurata A, Takanashi M, Hashimoto H, Fujita K, Nagao T, Kuroda M. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Fascin as a Useful Marker for Identifying Neural Components in Immature Teratomas of Human Ovary and Those Derived From Murine Embryonic Stem Cells | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Gynecological Pathology | 6. 最初と最後の頁 1~1 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PGP.0000000000000528 | 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 Kurata A, Yamada M, Ohno S, Inoue S, Hashimoto H, Fujita K, Takanashi M, Kuroda M. | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 Expression level of microRNA-200c is associated with cell morphology in vitro and histological differentiation through regulation of ZEB1/2 and E-cadherin in gastric carcinoma | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Oncology Reports | 6. 最初と最後の頁 91-100 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2017.6093 | 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 Ikehata N, Takanashi M, Satomi T, Watanabe M, Hasegawa O, Kono M, Enomoto A, Chikazu D, Kuroda M | 4. 巻 495 |
| 2. 論文標題 Toll-like receptor 2 activation implicated in oral squamous cell carcinoma development | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 2227 ~ 2234 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.12.098 | 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 Kurata Atsushi, Yamada Masatoshi, Ohno Shin-Ichiro, Inoue Shigeru, Hashimoto Hirotsugu, Fujita Koji, Takanashi Masakatsu, Kuroda Masahiko | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 Expression level of microRNA-200c is associated with cell morphology in vitro and histological differentiation through regulation of ZEB1/2 and E-cadherin in gastric carcinoma | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Oncology Reports | 6. 最初と最後の頁 91 ~ 100 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2017.6093 | 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 Taketani Yukako, Kitamoto Kohdai, Sakisaka Toshihiro, Kimakura Mikiko, Toyono Tetsuya, Yamagami Satoru, Amano Shiro, Kuroda Masahiko, Moore Tara, Usui Tomohiko, Ouchi Yasuo | 4. 巻 7 |
| 2. 論文標題 Repair of the TGFBI gene in human corneal keratocytes derived from a granular corneal dystrophy patient via CRISPR/Cas9-induced homology-directed repair | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 16713 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-16308-2 | 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 該当する |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Hongo-Kohama Masako, Kurata Atsushi, Hashimoto Hirotsugu, Fujita Koji, Horiuchi Hajime, Nagao Toshitaka, Kuroda Masahiko | 4. 巻 36 |
| 2. 論文標題 Vascular Smooth Muscle Cell Maturation Stage and Ki-67 Index are Diagnostic Biomarkers for Pathologic Grade of Ovarian Teratoma | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Gynecological Pathology | 6. 最初と最後の頁 582 ~ 592 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PGP.0000000000000373 | 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 Tanaka H, Hazama S, Iida M, Tsunedomi R, Takenouchi H, Nakajima M, Tokumitsu Y, Kanekiyo S, Shindo Y, Tomochika S, Tokuhisa Y, Sakamoto K, Suzuki N, Takeda S, Yamamoto S, Yoshino S, Ueno T, Hamamoto Y, Fujita Y, Tanaka H, Tahara K, Shimizu R, Okuno K, Fujita K, Kuroda M, Nakamura Y, Nagano H | 4. 巻 108 |
| 2. 論文標題 miR-125b-1 and miR-378a are predictive biomarkers for the efficacy of vaccine treatment against colorectal cancer | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 2229 ~ 2238 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13390 | 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 Hashimoto Hirotsugu, Kurata Atsushi, Kikuchi Hiroyuki, Masuda Yoshio, Fujita Koji, Okuyama Rikiya, Inoue Shigeru, Horiuchi Hajime, Kuroda Masahiko | 4. 巻 67 |
| 2. 論文標題 L-type amino acid transporter 1 expression in esophageal carcinogenesis according to WHO and Japanese classifications of intraepithelial neoplasia | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Pathology International | 6. 最初と最後の頁 247 ~ 255 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12528 | 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 Oikawa Kosuke, Mizusaki Anna, Takanashi Masakatsu, Ozaki Takashi, Sato Fuyuki, Kuroda Masahiko, Muragaki Yasuteru | 4. 巻 485 |
| 2. 論文標題 PRG4 expression in myxoid liposarcoma maintains tumor cell growth through suppression of an antitumor cytokine IL-24 | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 209 ~ 214 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.02.055 | 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 Kumagai K, Takanashi M, Ohno S, Kuroda M, Sudo K | 4. 巻 66 |
| 2. 論文標題 An improved Red/ET recombineering system and mouse ES cells culture conditions for the generation of targeted mutant mice | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Experimental Animals | 6. 最初と最後の頁 125 ~ 136 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.16-0075 | 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 Makino Yojiro, Yoon Jeong-Hwan, Bae Eunjin, Kato Mitsuyasu, Miyazawa Keiji, Ohira Tatsuo, Ikeda Norihiko, Kuroda Masahiko, Mamura Mizuko | 4. 巻 484 |
| 2. 論文標題 Repression of Smad3 by Stat3 and c-Ski/SnoN induces gefitinib resistance in lung adenocarcinoma | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications | 6. 最初と最後の頁 269 ~ 277 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.01.093 | 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 該当する |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Kuroda Masahiko, Oikawa Kosuke, Saito Akira, Kiyuna Tomoharu, Graf HansPeter, Cosatto Eric | 4. 巻 8 |
| 2. 論文標題 Pathological diagnosis of gastric cancers with a novel computerized analysis system | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Pathology Informatics | 6. 最初と最後の頁 5 ~ 5 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/2153-3539.201114 | 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 該当する |

| | |
|---|---------------------------------|
| 1. 著者名 Yamada Yuko, Takanashi Masakatsu, Sudo Katsuko, Ueda Shinobu, Ohno Shin-ichiro, Kuroda Masahiko | 4. 巻 12 |
| 2. 論文標題 Novel form of miR-29b suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 PLOS ONE | 6. 最初と最後の頁 0171957 ~ 0171957 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0171957 | 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 Saito Suguru, Ohno Shin-ichiro, Harada Yuichirou, Oikawa Keiki, Fujita Koji, Mineo Shouchirou, Gondo Asako, Kanno Yoshihiko, Kuroda Masahiko | 4. 巻 23 |
| 2. 論文標題 rAAV6-mediated miR-29b delivery suppresses renal fibrosis | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology | 6. 最初と最後の頁 1345-1356 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-019-01783-w | 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 Ueda Ai, Oikawa Keiki, Fujita Koji, Ishikawa Akio, Sato Eiichi, Ishikawa Takashi, Kuroda Masahiko, Kanekura Kohsuke | 4. 巻 99 |
| 2. 論文標題 Therapeutic potential of PLK1 inhibition in triple-negative breast cancer | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Laboratory Investigation | 6. 最初と最後の頁 1275 ~ 1286 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-019-0247-4 | 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 Ueda Shinobu, Takanashi Masakatsu, Sudo Katsuko, Kanekura Kohsuke, Kuroda Masahiko | 4. 巻 100 |
| 2. 論文標題 miR-27a ameliorates chemoresistance of breast cancer cells by disruption of reactive oxygen species homeostasis and impairment of autophagy | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Laboratory Investigation | 6. 最初と最後の頁 863-873 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-020-0409-4 | 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 Kitamoto Kohdai, Taketani Yukako, Fujii Wataru, Inamochi Aya, Toyono Tetsuya, Miyai Takashi, Yamagami Satoru, Kuroda Masahiko, Usui Tomohiko, Ouchi Yasuo | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Generation of mouse model of TGFBI-R124C corneal dystrophy using CRISPR/Cas9-mediated homology-directed repair | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-58876-w | 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 - |

〔学会発表〕 計24件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 黒田雅彦 |
| 2. 発表標題 リキッドバイオプシーによる肺がんnon-coding RNAの解析 |
| 3. 学会等名 第59回日本肺癌学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大野慎一郎、黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 Up-regulation og BLU tumor suppressor by miR-34 family |
| 3. 学会等名 第59回日本肺癌学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 老川 桂生、大野慎一郎、黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 Establishment of DICER1 syndrome model cells |
| 3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大野慎一郎、老川 桂生、原田裕一郎、黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 Up-regulation og BLU tumor suppressor by miR-34 family |
| 3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 高梨 正勝、上田しのぶ、須藤カツ子、黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 樹状細胞由来エクソソームは内包される分子をT細胞に伝達して免疫機構を活性化する |
| 3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 AIを用いた病理診断の実際 |
| 3. 学会等名 第26回日本外科学会生涯教育セミナー（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 Exosome opens new generation of cell therapy |
| 3. 学会等名 第10回日本RNAi研究会、第5回日本細胞外小胞学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大野慎一郎、三部 芳裕、老川 桂生、原田裕一郎、黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 Mir-34aによるがん抑制遺伝子BLUの発現制御機構 |
| 3. 学会等名 第10回日本RNAi研究会、第5回日本細胞外小胞学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|------------------------------|
| 1. 発表者名 老川 桂生、大野慎一郎、黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 DICER1症候群モデル細胞の樹立 |
| 3. 学会等名 第107回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 エクソソームによる細胞治療、再生医療の応用 |
| 3. 学会等名 第107回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 大野 慎一郎、老川 桂生、原田裕一郎、黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 miR-34によるがん抑制遺伝子BLUの発現誘導 |
| 3. 学会等名 第107回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 梅原 龍之介、倉田 厚、藤田 浩司、高梨 正勝、黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 ヒト卵巣およびマウス胚性幹細胞由来の奇形腫内神経管を同定するマーカー と してのfascinの有用性 |
| 3. 学会等名 第107回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Saito S、Ohno S、 Harada Y、 Oikawa K、 Kanno Y、 Kuroda M |
| 2. 発表標題 AAV-mediated miRNA-29b delivery suppress renal fibrosis |
| 3. 学会等名 第9回日本RNAi研究会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sanbu Y、 Ohno S、 Kuroda M |
| 2. 発表標題 Up-regulation of BLU tumor suppressor by miR-34a |
| 3. 学会等名 第9回日本RNAi研究会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 エクソソームの臨床応用 |
| 3. 学会等名 第33回日本DDS学会学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 核酸医薬の臨床応用 |
| 3. 学会等名 第384回CBI学会講演会 - 核酸医薬 - |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 鶴井 敏光、藤田 浩司、大野 慎一郎、黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 浸潤性乳管癌に出現するlet-7発現細胞の検討 |
| 3. 学会等名 第106回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 三部 芳裕、大野 慎一郎、黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 Mir-34aによるがん抑制遺伝子BLUの発現制御機構 |
| 3. 学会等名 第106回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大野 慎一郎、原田 裕一郎、村上 善基、黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 RNA干渉核酸に働く短鎖ヘアピンRNAの探索と機能解析 |
| 3. 学会等名 第106回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 老川 桂生、浅田 浩太郎、大野 慎一郎、黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 miRNA生成経路を欠損する肺がん細胞株の解析 |
| 3. 学会等名 第106回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 橋本 浩次、倉田 厚、藤原 正親、原 啓、名城 珠希、増田 芳雄、鈴木 良夫、菅間 博、黒田雅彦、堀内 啓 |
| 2. 発表標題 Clinicopathologic Characteristics of solitary pulmonary capillary hemangioma |
| 3. 学会等名 第106回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 齋藤 彰、藤田 浩司、山本 陽一郎、碓 彰一、坂本和彦、永野 浩昭、黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 Digital Pathologyを用いた肝細胞がんの形態学解析による再発予測の検討 |
| 3. 学会等名 第106回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 藤田 浩司、大野 慎一郎、西 洋孝、井坂 恵一、黒田 雅彦 |
| 2. 発表標題 子宮頸部上皮内腫瘍病変に対する新規モノクローナル抗体の開発 |
| 3. 学会等名 第106回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 池畑 直樹、高梨 正勝、上田 しのぶ、里見 貴史、渡辺 正人、長谷川 温、河野 通秀、榎本 愛、黒田 雅彦、近津 大地 |
| 2. 発表標題 Activation of TLR2 regulates CARD10 gene expression by miR-146a-5p in oral squamous cell carcinoma |
| 3. 学会等名 第106回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計2件

| | |
|--------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 落谷孝広、上田 しのぶ、高梨 正勝、黒田 雅彦他 | 4. 発行年 2017年 |
| 2. 出版社 医薬ジャーナル社 | 5. 総ページ数 195 |
| 3. 書名 miRNAの最新知識～基礎領域から診断・治療応用まで～ | |

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 落谷 孝広、松田 大介、原田 結、芝 清隆、高橋 有己、西川 元也、高倉 喜信、遠藤 恒介、田原 栄治、田原 栄俊、下田 麻子、秋吉 一成、瀧澤 俊広、大口 昭英、竹下 俊、齋藤 滋、大塚 蔵高、黒田 雅彦、高梨 正勝他 | 4. 発行年 2017年 |
| 2. 出版社 エヌ・ティー・エス | 5. 総ページ数 282 |
| 3. 書名 パラダイムシフトをもたらすエクソソーム機能研究最前線 | |

〔出願〕 計2件

| | | |
|--|----------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 MUC1に結合することを特徴とするMUC1に対する抗体またはその抗原結合断片 | 発明者 黒田 雅彦、藤田 浩司、大野 慎一郎、原田 裕一郎 | 権利者 東京医科大学 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、2017-200471 | 出願年 2017年 | 国内・外国の別 国内 |

| | | |
|----------------------------------|------------------------------------|---------------|
| 産業財産権の名称 肝細胞がんの再発可能性を試験するシステム | 発明者 黒田 雅彦、齋藤 彰、藤田 浩司、土田 明彦、永川 裕 | 権利者 東京医科大学 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、2017-157027 | 出願年 2017年 | 国内・外国の別 国内 |

〔取得〕 計0件

〔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 |
|-------------------|--|------------------------------------|----|
| 研究 分 担 者 | 須藤 カツ子 (Sudo Katsuko) (50126091) | 東京医科大学・医学部・兼任講師 (32645) | |

