

研究種目：基盤研究（S）  
研究期間：2007～2011  
課題番号：19109001  
研究課題名（和文）包括的トランスクリプトーム解析による新たなゲノム医学，創薬研究  
研究課題名（英文） New genome medicine and drug discovery based on the comprehensive transcriptome analysis  
研究代表者  
辻本 豪三（TSUJIMOTO GOZOH）  
京都大学・薬学研究科・教授  
研究者番号：80172013

研究代表者の専門分野：医歯薬学  
科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学  
キーワード：miRNA、上皮細胞、がん、分化

#### 1. 研究計画の概要

(1) 近年トランスクリプトーム中には従来考えられていたよりも複雑多様な転写物が存在し、それら転写物が生物学的機能を有している可能性があり、中でも機能調節には蛋白質をコードしないRNA

(non-protein-coding RNA; ncRNA) の関与が最も注目されている。バイオインフォマティクス解析によりncRNAはヒト、マウスで数千から一万以上存在することが示されつつあり、ncRNAは蛋白質をコードするRNA

(coding RNA; cRNA) に対してアンチセンスDNAやsiRNAとして機能し得る構造を持つ場合が多い。ncRNAを含む包括的トランスクリプトーム解析研究は疾病の分子メカニズムや医薬品の作用機構に新たな次元の理解を導くことが予測される。本研究では、バイオインフォマティクスにより生物学的に機能が予測されるncRNA（特にmiRNA）にcRNAを含めた包括的トランスクリプトーム解析用マイクロアレイDNAチップを用い、特にがん関連機能RNA（群）、中でもmiRNAを抽出するとともにその生物学的意義を検証することを目的とする。

(2) 国内外で、臨床トランスクリプトーム解析がなされており、一部の疾患では個人化医療の実現に臨床応用されようとしている。しかしながら、すべての研究はcRNAのみを対象とするDNAチップ解析研究であり、生物

学的機能がほとんど未知であるncRNA、特にmiRNAをも含めた包括的トランスクリプトーム解析は未だ世界に例を見ない。

#### 2. 研究の進捗状況

(1) 包括的RNAの中でも最近注目されている機能未知のncRNAであるmiRNAに特化した研究を行って来た。まず解析の為にプラットフォーム並びにツール開発として、miRNA標的遺伝子予測システムの開発、更にはそれを具体的に解析する高感度miRNAマイクロアレイの開発を行った。更に、これらの解析プラットフォーム確立の元、miRNAの機能探索の為に、特にがん発症に関係する各種細胞の分化に於けるmiRNAの探索ならびにその機能解析を行った。平成21年度から、これらの研究成果に基づき病気、特にがんにおけるmiRNAの機能解析、更には核酸医薬品の開発を見据えた長鎖RNAオリゴを用いた核酸医薬に向けた研究を進めている。

① miRNA標的遺伝子予測システムの開発：miRNAとmRNAの発現の相関性と既存miRNAターゲット予測プログラムとを組み合わせた新規方法論の開発を行った。16種類のヒト培養細胞で、miRNA（凡そ150種類）とmRNA（凡そ25,000種類）の発現プロファイルをとり、miRNAとmRNAの発現の相関性と既存miRNAターゲット予測プログラムとを組み合わせた新規方法論の開発に成功した。本手法は特許

申請を行い、更に以下の生物学研究に活用すると共に、他の研究者に供与している。

② 細胞分化に関わる miRNA の探索：miRNA の機能を探索する為に細胞分化の前後で発現が変動する miRNA の探索を行った。培養細胞をモデルとして、大腸がん細胞株 T84 細胞を用いた上皮形成モデル、白血病細胞株 K562 細胞も用いた巨核球系細胞への分化モデル、ラット副腎髄質由来細胞株 PC12 細胞を用いた神経分化モデルを各々解析研究した。

③ がんの包括的トランスクリプトーム解析：上記のシステムを活用、発展させ医学応用研究として、平成 21 年度よりがんの分子標的医薬の反応性を予測する研究（乳がんのハーセプチン感受性予測）を開始している。

④ 長鎖合成 RNA オリゴを用いた核酸医薬開発の基盤研究：任意の遺伝子をノックアウトできる siRNA は新たな医薬品として期待されている。近年、新たに効率の良い長鎖 RNA の合成法の開発が開発され、大量合成も容易で且利点も多く長鎖 RNA を用いた核酸医薬の実用性が高まってきている。そこで長鎖 RNA を用いた miRNA ならびに siRNA の医薬品開発を見据えた基盤研究を行った。結果、合成 shRNA は短鎖 siRNA より活性が高く、off-target 効果、インターフェロン応答が更に減じることが明らかとなった。

### 3. 現在までの達成度

① 当初の計画以上に進展している。

(理由) 当初の予定では miRNA 等の ncRNA が生理機能調節に意義あるか否かが全く予想されない状況であったが、この 3 年間急速な全世界の研究進捗により、発生や分化等の生命現象のみならず、がんの発生、増殖、細胞周期制御等にも深く関与することが明らかとなった。本研究はこのような周辺状況の急速な進展にも支えられ、また高速シーケンサーの導入により詳細な発現量変動がデジタルモニターできる技術的支援により、当初の計画がより具体的な形をなした。特に、上皮分化モデルを最初テーマとして取り上げ、そのアプローチの汎用性を検証証明出来た事から、臨床試料の解析も可能となり、人の病気としては“がん”におけるより詳細な分子診断や核酸医薬へのヒントが与えられた。短期間にここまで達成できたことは望外の喜びである。

### 4. 今後の研究の推進方策

(1) 包括的 DNA トランスクリプトーム解析の基盤整備は既に完了している。このプラットフォームを用いて、

① 食道がんの特異的に発現する miRNA の同定  
② 同定された miRNA の機能解析と標的遺伝子検索  
③ 以上の研究より食道がんの悪性度に関連する miRNA を同定しバイオマーカーとしての有用性を確認すると共に、その機能解析を行い新しい診断・治療法の開発の基盤とする。上記研究は期間内に終了する。

### 5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 64 件)

① Ruike Y, Imanaka Y, Sato F, Shimizu K, Tsujimoto G. Genome-wide analysis of aberrant methylation in human breast cancer cells using methyl-DNA immunoprecipitation combined with high-throughput sequencing. *BMC Genomics*. 11: 137, 2010. 査読有

② Ichimura A, Ruike Y, Terasawa K, Shimizu K, Tsujimoto G. miR-34a inhibits cell proliferation by repressing MEK1 during megakaryocytic differentiation of K562. *Mol Pharmacol*. 2010 Mar 18. [Epub ahead of print] 査読有

[学会発表] (計 30 件)

① 市村敦彦、類家慶直、寺澤和哉、辻本豪三：慢性骨髄性白血病細胞株 K562 において TPA 刺激により誘導される miRNA および標的遺伝子探索、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会 (BMB2007)、神奈川県横浜市、2007/12/11

[その他]

HP : <http://gdds.pharm.kyoto-u.ac.jp/>