

平成21年4月 30日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592169
 研究課題名（和文） ヒト細胞における siRNA を介した RNAi の超誘導とその分子シグナルに関する研究
 研究課題名（英文） siRNA-mediated highly potent and specific RNAi in human cultured cells and its signals
 研究代表者
 大和 建嗣（YAMATO KENJI）
 東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師
 研究者番号：50174751

研究成果の概要：

siRNA 創薬のためには、標的遺伝子に対して高い RNAi 活性と特異性を有する配列を選択し、これら siRNA を標的細胞へ効率よく導入しなければならない。現在バイオインフォマティクスを駆使したコンピュータ解析によって理論的に優れた siRNA の設計が可能となっているが、その効果は実際に生きた細胞を用いて検証しなければならない。本研究ではこの目的のために様々な培養細胞からなるシステムを構築した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：①実験腫瘍学, ②RNAi

1. 研究開始当初の背景

ウイルス感染症や癌の“魔法の薬”として siRNA を活用していくためには、標的遺伝子に対して高い RNAi 活性と特異性を有する配列の選択と、これら siRNA の標的細胞への効率よい導入方法を確立しなければならない。siRNA 配列選択は、2本鎖に熱力学的非対称性を導入することによってガイド鎖の RISC への導入効率を向上させるが可能である。また配列特異的な非特異効果 (off-target 効果) を最小限にするために任意のヒト遺伝子に対する相補性を最小限にしなければならない

い。その際 seed 配列と off-target 標的 mRNA のペアリングの安定性が一番問題となる。この目的のためにこれまでヒトゲノム計画によって明らかにされてきたゲノム・遺伝子情報などのバイオインフォマティクスと siRNA 設計アルゴリズムを組み合わせたコンピュータソフトウェアが開発されている。このようにコンピュータを駆使して設計された理論的 siRNA は、実際に細胞をつかった in vitro 実験でその効果を検証されなければならない。その際、標的とする細胞に siRNA がどの程度導入されているかをモニターし、ま

たその効率を最適化しなければならないが、このような目的に適した培養細胞システムはまだない。

2. 研究の目的

siRNA の導入効率の評価方法は、従来 GAPDH, lamin A/C や β -actin などの house keeping gene に対する siRNA を用いて Western blot や RT-PCR により遺伝子の発現抑制効果によって行われてきた。しかし、このような定量的評価法は必ずしも容易ではない。本研究では様々な組織由来のヒト培養細胞株にホタルルシフェラーゼ (FLuc) を導入した細胞パネルを作成し、FLuc siRNA を用いて siRNA の導入方法の最適化、導入方法の定量評価システムを確立する。このシステムの大きなメリットは siRNA 導入効率の異なる細胞系において siRNA の生物活性比較する事が可能となることである。本研究では実際に HPV16 E6E7 癌遺伝子を標的とした siRNA をコンピュータソフトウェアで設計し、この細胞パネルを用いて新しく設計された siRNA の *in vitro* の特異および非特異効果を調べ、その有用性を検証する。

3. 研究の方法

①骨肉腫細胞株 (1 株), 乳癌細胞株 (1 株), 胃癌細胞株 (5 株), 子宮頸癌細胞株 (3 株), 卵巣癌細胞株 (1 株), および不死化正常表皮細胞株 (1 株) など合計 12 細胞株について FLuc 発現プラスミドを導入し、Luc 安定発現細胞株を分離した。

②FLuc (1 種類), ウミシイタケルシフェラーゼ RLuc (1 種類) と HPV16 E6E7 に対する siRNA (10 種類) の設計は、siDirect コンピュータソフトウェアを用いて行った。

③FLuc siRNA を①で作成した細胞パネルに Lipofectamine 2000 あるいは Lipofectamine RNAiMAX を用いて導入し、その導入条件の最適化および siRNA 細胞内導入/RNAi 誘導効率をルシフェラーゼ活性抑制率によって定量化した。

④siRNA のパッシンジャー鎖とガイド鎖による RNAi を検討するために RLuc 発現プラスミドの RLuc cDNA 直下に HPV16 E6E7 遺伝子をセンス方向あるいはアンチセンス方向につないだプラスミドを作成した。これを HeLa 細胞に様々な E6E7 siRNA とともに導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

⑤mRNA 2 次構造の RNAi におよぼす効果を検討するために RLuc 発現プラスミドの RLuc cDNA 直下に標的配列を含む様々な長さの DNA フラグメント (23 bp, 400 bp, 700 bp) を繋ぎ、siRNA の効果を検討した。

⑥HPV 16 E6E7 mRNA の発現は、RT-PCR で解析した。

⑦細胞増殖は 96 ウェルプレートに細胞を播種後 siRNA を導入し、導入後 5 日から 7 日で WST8 発色反応で解析した。

⑧SiHa 細胞を NOD/SCID マウスの皮下に接種し、約 4 週後に皮下腫瘍の形成が見られた。週 1 回、合計 5 回、この腫瘍にアテロコラーゲンと複合体を形成させた siRNA を直接腫瘍内に投与後、マウスを安楽死させ腫瘍重量を計測した。

4. 研究成果

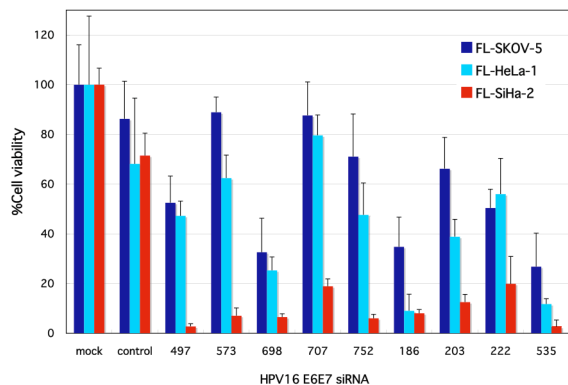
①ルシフェラーゼ発現細胞を用いた siRNA の導入最適化と RNAi 活性の比較

SiHa 子宮頸癌細胞株に FLuc を恒常的に発現させたクローン FL-SiHa-2 を分離した。これらの細胞ではリポフェクタミン 2000 (Lf2000) を用いて FLuc siRNA (5 nM) を導入することにより 95% 以上の高い FLuc 活性の抑制が観察された。さらに FL-SiHa-2 細胞にウミシイタケルシフェラーゼ (RLuc) を恒常的に発現するサブクローン RLE6-FL-SiH-10 を分離し、この細胞において FLuc siRNA と RLuc siRNA を様々な siRNA 導入試薬/方法を検討したが、Lipofectamine RNAiMAX でもっとも良い結果が得られ、FLuc siRNA と RLuc siRNA は、1.6 pM の低濃度でそれぞれの酵素活性を 80% および 70% 抑制した。

これらのクローンを利用して HPV16 E6E7 癌遺伝子を標的とした siRNA 医薬の開発を行っている。siDirect ソフトウェアで設計した 10 種類の siRNA と過去に報告された 6 種類の siRNA の RNAi 活性とその特異性について詳細に検討した。過去に報告された配列に比べ、その活性と特異性において優れた 3 種類の siRNA を報告し、この FLuc 発現細胞パネルがこのような目的に有用である事をしめした。図 1 は、HPV16 陽性子宮頸癌細胞株 FL-SiHa-2 細胞と HPV16 陰性細胞である FL-SKOV-5 と FL-HeLa-1 細胞に FLuc siRNA が 5 nM でほぼ同等の RNAi を来す条件でこれらの細胞に対して種々の E6E7 siRNA の増殖抑制効果を解析した。この実験方法によって 497, 573, 707, 752 および 203 が HPV16 関連癌に特異的な増殖抑制効果を有することが明らかとなった (図 1)。

我々はさらにこれらの配列の中で 752 について *in vivo* での有効性を検討した。子宮頸癌細胞株を免疫不全マウスの皮下に摂取して腫瘍を形成させ、この腫瘍内にアテロコラーゲンと混和した E7 siRNA を直接注射し、その効果をみた。siRNA/アテロコラーゲン複合体は、有為に腫瘍増殖を抑制し、将来の子宮頸癌治療薬への応用の可能性を示した。

図1 HPV16 陽性および陰性癌細胞株に対する HPV16 E6E7 癌遺伝子に対する siRNA の増殖抑制効果



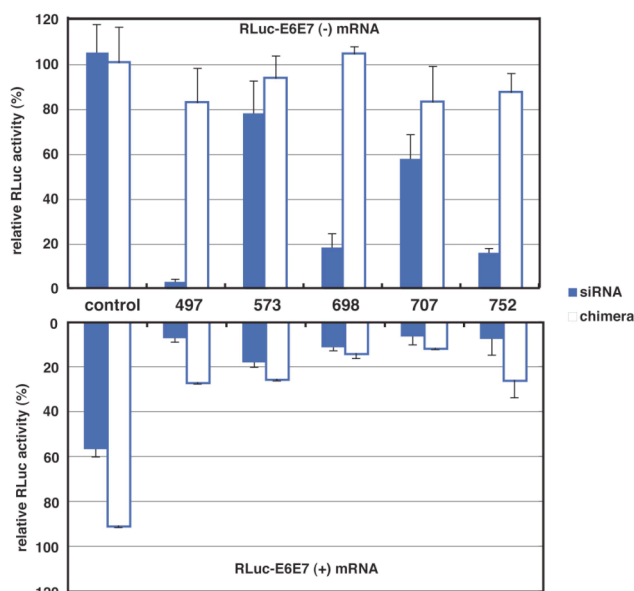
さらに様々なヒト培養細胞における siRNA の導入効率の最適化と評価のために、現時点で骨肉腫細胞株 (1 株), 乳癌細胞株 (1 株), 消化管腺癌細胞株 (5 株), 子宮頸癌細胞株 (3 株), 卵巣癌細胞株 (1 株), および不死化表皮細胞株 (1 株) など合計 12 細胞株について Luc 安定発現細胞株を分離した。それぞれのルシフェラーゼ発現細胞クローンについて FLuc siRNA と Lipofectamine RNAiMAX による RNAi を調べた結果, 多くの細胞で 40 pM 以下でも強力な luciferase 抑制効果を示した。これは FLuc siRNA ガイド鎖の RISC への高い取り込み効率, この RISC の有する高い酵素活性, FLuc mRNA への高いアクセス性などを反映しているものと考えられた。このように FLuc siRNA はいずれの細胞においても高い RNAi 活性を示した。これらの細胞で lamine A/C や癌遺伝子などの内因性遺伝子に対する siRNA の効果を検討したが, 発現を 1/3 以下に抑制するために必要な siRNA 濃度は細胞株毎, 遺伝子毎で異なり, 多くの場合 FLuc に比べて 100~2000 倍高い濃度の siRNA を必要とした。これは mRNA の 2 次構造や結合因子などの違いから siRNA に対する感受性に差があるのかもしれない。また細胞株間で FLuc siRNA による RNAi 活性に 10~50 倍の違いが見られたが, siRNA の取り込み/RISC 形性能の違いによる可能性が示唆された。現在, 細胞内 siRNA と RISC 上のガイド鎖のコピー数の定量を real time PCR を用いて行うところである。本システムを用いて現在 2 つの癌遺伝子を標的とした RNAi 創薬の研究を進めている。

②パッセンジャー鎖による RNAi

siRNA の配列構造の重要性をしるために RLuc 発現プラスミドの RLuc cDNAc 直下に HPV16 E6E7 遺伝子をセンス方向 (RLuc-E6E7(+)) あるいはアンチセンス方向につないだプラスミド (RLuc-E6E7(-)) を作成した。図 2 青棒グラフが示すように, 熱力学的非対

称性を有する E6E7 siRNA 配列 (497, 573, 698, 707, 752) は全て効率よく RLuc-E6E7(+) の発現を抑制し, RISC にガイド鎖が取り込まれている事が示唆された。しかし同時に RLuc-E6E7(-) の抑制を示す配列 (497, 698, 752) もあり, 熱力学的非対称性だけではパッセンジャー鎖を介する RNAi は抑制できず, siRNA 配列設計において両鎖に対する off-target 配列の存在を考慮する必要があることが明らかとなった。さらにこのパッセンジャー鎖を介する RNAi を回避するために, 西郷等によって報告された 2 本鎖 RNA-DNA キメラ (パッセンジャー鎖の 8 塩基とガイド鎖の 6 塩基を DNA に変換したもの) が有効である事を明らかにした (図 2 白棒グラフ)。

図 2 siRNA によるガイド鎖とパッセンジャー鎖を介する RNAi と RNA-DNA キメラを用いたパッセンジャー鎖を介する RNAi の抑制



③mRNA 2 次構造による RNAi への影響の可能性

HPV16 E7 癌遺伝子に対する siRNA を癌細胞が発現している E7 mRNA と RLuc-E7 mRNA に対する効果を比較したところ, 内因性 E7 mRNA に対して有効であるにも関わらず RLuc 融合 mRNA に対して効果のないものがあり, siRNA の効果は, RISC 形成だけではなく, mRNA の二次構造が重要であることが示唆された。

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 3 件)

1. Yamato, K., Yamada, T., Kizaki, M., Ui-Tei, K., Natori, Y., Fujino, M.,

Nishihara, T., Ikeda, Y., Nasu, Y., Saigo, K., and Yoshinouchi, M. New highly potent and specific E6 and E7 siRNAs for treatment of HPV16-positive cervical cancer. **Cancer Gene Ther.** 15:140-153 (2008) 査読有り

2. Ui-Tei, K., Naito, Y., Zenno, S., Nishi, K., Yamato, K., Takahashi, F., Juni, A. and Saigo, K. Functional dissection of siRNA sequence by systematic DNA substitution: short interfering DNA-RNA chimera with a DNA seed arm is a powerful tool for mammalian gene silencing with virtually no off-target effect. **Nucleic Acids Res.** 36: 2152-2162 (2008) 査読有り

7. Nakazato, T., Sagawa, M., Yamato, K., Xian, M., Yamamoto, T., Suematsu, M, Ikeda, Y., and Kizaki, M. Myeloperoxidase (MPO) is a key regulator of oxidative stress-mediated apoptosis in myeloid leukemic cells. **Clin. Cancer Res.** 13: 5436-5445 (2007) 査読有り

[学会発表] (計 3件)

1. 大和建嗣, 吉野内光夫, 山田健人 Potent and specific E6 and E7 siRNAs for treatment of HPV16-positive cervical cancer 第66回日本癌学会総会 平成19年9月 パシフィコ横浜

2. 大和建嗣, 吉野内光夫, 山田健人 2本鎖RNA-DNAキメラによるHPV16 E6E7特異的RNAiの誘導 Induction of HPV16 E6E7-specific RNAi in cervical cancer cells by double strand RNA-DNA chimeras 第67回日本癌学会総会 平成20年9月名古屋

3. 程久美子、内藤雄樹、善野修平、西賢二、大和建嗣、従二綾、田中愛、西郷薫 部分的DNA置換によるsiRNA配列の機能解析：シード領域をDNAに置換したsiRNAはoff-target効果がないDNA-modified siRNA is responsible for significantly reduced off-target effect 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会(BMB2008) 平成20年12月神戸

[産業財産権]

○出願状況 (計 1件)

名称：ヒトパピローマ16型遺伝子を標的とする二本鎖核酸分子およびそれを含む医薬
発明者：大和建嗣，名取幸和，山田健人，吉野内光夫

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2008/058289

出願年月日：2008年4月30日

国内外の別：国際出願

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大和建嗣 (YAMATO KENJI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：50174751

(2) 連携研究者

九州歯科大学・歯学部教授・西原達治