

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300342

研究課題名(和文)多発性骨髄腫治療用 sgRNA 薬の開発

研究課題名(英文)Development of therapeutic sgRNA for multiple myeloma

研究代表者

梨本 正之(Nashimoto, Masayuki)

新潟薬科大学・公立大学の部局等・教授

研究者番号：30228069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫は2番目に多い血液がんであり、全世界で年間15万人程の患者がこれにより死亡していると見積もられている。新薬の導入により平均生存年数は延びてきているが、ほとんどの患者でこの薬に対して抵抗性を持つ骨髄腫細胞が出現し再発してしまう。骨髄腫は原因も解明されておらず、成功率の低い骨髄移植以外に治療法もないがんである。

我々は、遺伝子発現抑制法TRUE gene silencingを骨髄腫に応用し、患者を治癒に導くことができるsgRNA薬を発見することを長期目標としている。本研究では、sgRNA薬候補の作用機構の一端を解明し、マウスモデルにおけるこのsgRNA薬の腫瘍増殖抑制効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：Multiple myeloma is the second most common hematological malignancy, and it is estimated that about 150,000 people in the world would die of myeloma every year. Although median survival is extended by development of new drugs, drug-resistant myeloma cells emerge in most of the patients, resulting in subsequent relapse of cancer. The cause of multiple myeloma is not known, and bone marrow transplantation is the only way to cure, albeit with a low success rate.

Our final destination is finding therapeutic sgRNAs to cure multiple myeloma based on TRUE gene silencing, which we have developed as a gene expression control technology. In this study, we elucidated partly how the candidate therapeutic sgRNA works, and showed that this sgRNA can reduce a tumor growth rate in a mouse model experiment.

研究分野：RNA治療学

キーワード：核酸治療 多発性骨髄腫 アポトーシス 血液がん TRUE gene silencing sgRNA RNA治療

1. 研究開始当初の背景

1989年に、我々は、哺乳動物細胞のサイトゾル抽出物中に、RNase 65 と名付けた 4 塩基認識 RNA 切断酵素を発見した。これは、tRNA 前駆体切断酵素 tRNase Z の長いタイプである tRNase ZL と 3'末端が欠失した tRNA との RNP 複合体であった。RNase 65 の発見に刺激され、我々は、tRNase ZL の多機能性を研究し続け、この酵素が tRNA 前駆体や micro tRNA 前駆体に類似した RNA 複合体を認識し切断することを示した。さらに、この酵素の性質を利用して、7-30-nt の small guide RNA (sgRNA) を用いて in vitro であらゆる RNA を任意の部位で特異的に切断する方法を開発した(図1)。sgRNA は、5'-half-tRNA、~12-16-nt linear RNA、RNA heptamer および hook RNA の 4 種類に分類される(図2)。

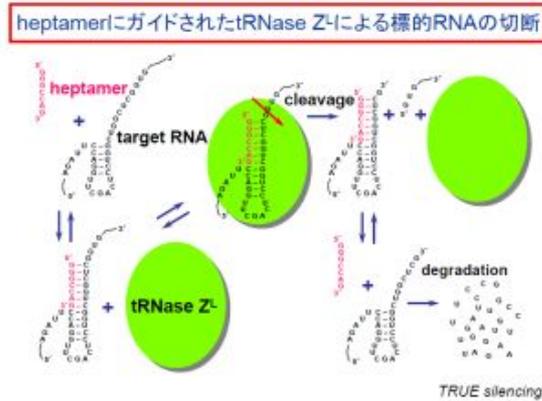


図 1

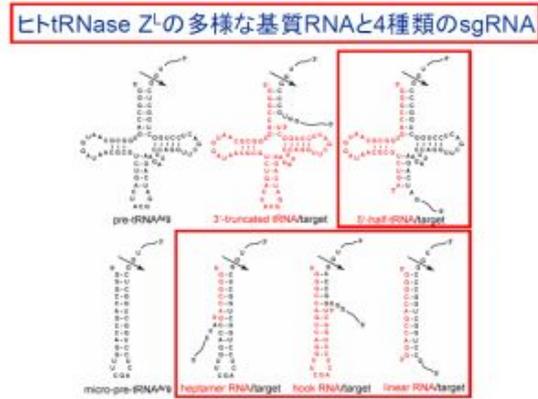


図 2

さらに、我々は、sgRNA を発現プラスミドや合成 2'-O-methyl RNA の形で哺乳動物細胞中に導入することによって、その標的となる mRNA の発現を効率よく抑えることに成功した。具体的には、外来の CAT や luciferase mRNA、内在の Bcl-2、GSK-3 β 、VEGF mRNA の発現抑制を観察してきた。Jurkat 細胞における HIV-1 の発現抑制効果も示すことができた。さらに、この遺伝子発現抑制法は、RNAi 法に匹敵することも示され、TRUE gene silencing (tRNase ZL-utilizing efficacious gene silencing)法と呼ばれている。

最近、我々は、ヒト tRNase ZL が核内だけでなく細胞質も含めて細胞内に広く存在していることを示し、tRNA 前駆体成熟化とは

異なる tRNase ZL の新たな生理学的機能を発見した。TRUE silencing のために人工的にデザインされた sgRNA である 5'-half-tRNA が、実は細胞内にも存在しており、サイトゾル tRNase ZL と共に、PPM1F mRNA などの発現を抑制制御していたのである。ヒト細胞サイトゾル中には、5'-half-tRNA の他にも短い RNA が多数存在することも示され、そのひとつの 28S rRNA 断片も hook 型 sgRNA として細胞内で機能することが示された。さらに、何割かの miRNA も hook 型構造をとりうることも判明し、実際に miR-103 が細胞内において hook 型 sgRNA として機能することも示された。これらの結果は、まだ発見されていない短い non-coding RNA (ncRNA)も含めてさまざまなタイプの ncRNA を sgRNA として、ヒトサイトゾル tRNase ZL が遺伝子発現制御を行っていることを示唆している。TRUE gene silencing 法が実際にヒト細胞内でよく働く理由は、この方法がサイトゾル tRNase ZL の細胞内遺伝子制御機構をうまく利用しているからだと考えられる。

2. 研究の目的

米国のニクソン大統領が「がん征圧戦争」を宣言してから 40 年が経過しているが、残念ながら世界的にもがん患者の死亡率はあまり減少していない。たとえば、多発性骨髄腫は 2 番目に多い血液がんであり、全世界で年間 15 万人程の患者がこれが原因で死亡していると見積もられている。米国ではおよそ 45,000 人の患者があり、毎年新たに 15,000 人程が多発性骨髄腫と診断されていることから、診断からの平均生存年数はわずか約 3 年である。近年、サリドマイドやボルテゾミブなどの新しい薬が導入されてきてはいるものの、多発性骨髄腫は原因も解明されてなく、成功率の低い骨髄移植以外に治療法もないがんである。我々は、TRUE gene silencing 法を多発性骨髄腫に応用し、患者を寛解・治療に導くことができる sgRNA 薬を発見することを長期目標としている。

我々は、すでに「がん治療用 sgRNA 薬スクリーニングシステム」を用いて、ヒト骨髄腫細胞に効率よく apoptosis を誘導する 2 つの heptamer 型 sgRNA (コード番号 13024 と 15540)を見出している。本研究においては、この sgRNA および新たに発見が期待される新規有効 sgRNA の apoptosis 誘導機構を解明し、マウス xenograft モデルにおけるこの sgRNA 薬の腫瘍増殖抑制効果を試験することを目的とする。

本研究の基盤技術である TRUE gene silencing 法は、我々が発明した sgRNA を用いた新たな遺伝子発現制御法であり、基本特許はすでに成立している。本技術が一般的に有効であること、さらに世界を席卷している RNAi 法に匹敵するだけでなく、細胞内導入・副作用・費用等の点で勝ることが示されている。特に、sgRNA として heptamer タイ

プを用いるので、合成費用は siRNA の 10 分の 1 程になり、リポソームなどの細胞内導入試薬なしで裸のまま細胞内に効率よく導入することができる。本技術では、heptamer を用いても 12 塩基相当の特異性を出すことが可能である。

本研究において、培養細胞実験レベルで多発性骨髄腫細胞に特異的にかつ効率よく apoptosis を誘導する sgRNA 薬の apoptosis 誘導機構が解明され、更に動物実験でも有効であることが示されたならば、直ちに臨床試験を行い治療薬として開発できる可能性がある。これにより、多くの多発性骨髄腫患者の命を救うことができるようになるだろう。さらに、この成功は他のがんに対しても TRUE gene silencing 法が適応できる可能性を示すことになるだろう。

3. 研究の方法

(1) 平成 24 年度

平成 21 年 4 月から 3 年間の JST 育成研究課題「がん治療用 sgRNA 薬スクリーニングシステムの開発」において、現在までに、ヒト骨髄腫細胞株に効率よく apoptosis を誘導する sgRNA を、sgRNA ライブラリーのスクリーニングにより 2 種類 (コード番号 13024 と 15540) 見出している。この 2 つの sgRNA は、それぞれが complex I の 2 つのサブユニットをコードするミトコンドリア mRNA を標的とした heptamer 型 sgRNA であることが、DNA microarray 解析により示唆されている。この sgRNA は、非常に効率よく骨髄腫細胞に apoptosis を誘導することが示されたが、その詳細な誘導機構はまだ不明である。

初年度は、多発性骨髄腫治療用のこの 2 つの有望 heptamer 型 sgRNA に関して、その apoptosis 誘導機構を解析した。また、並行してこの sgRNA より優れた新規 heptamer 型 sgRNA の探索も行った。具体的には以下の実験を行った。

細胞内取込み機構解析：5'末端を標識したコード番号 15540 の heptamer 型 sgRNA (全ヌクレオチドを 2'-O-メチル化)を用いて、共焦点レーザー顕微鏡により RPMI-8226 および KMM-1 細胞内の局在や取込みの経時変化を追跡する。また、この sgRNA の標的がミトコンドリアの mRNA である可能性を考慮し、ミトコンドリアの変化を詳細に解析する。

ROS 誘導試験：sgRNA による骨髄腫細胞の apoptosis 誘導に、reactive oxygen species (ROS) の発生が関係するかを調べるために、ROS 検出用蛍光色素とスカベンジャー (N-アセチルシステイン) を用いた解析を行う。

tRNase ZL 効果の検証：sgRNA13024 と sgRNA 15540 の RPMI-8226 および KMM-1 細胞に対する効率の良い apoptosis 誘導能が、実際に、tRNase ZL

による標的ミトコンドリア mRNA の切断によるものであることを検証するために、2 つの実験を行う。1 つは 3'-RACE で、ミトコンドリア内標的 mRNA の切断部位を RT-PCR と DNA sequencing にて決定する。tRNase ZL 切断部位近傍に見出されることが予想される。2 つ目は、tRNase ZL に対する siRNA を用いて細胞内 tRNase ZL 量を減少させ、その結果としてミトコンドリア内標的 mRNA 量の減少が抑制されることを qRT-PCR により確認する。
新規 heptamer 型 sgRNA の探索：細胞内における tRNase ZL の標的と考えられるミトコンドリア mRNA に対して、sgRNA を数種類新たにデザインし、RPMI-8226 および KMM-1 細胞を用いて増殖抑制効果を検討する。

(2) 平成 25 年度

平成 25 年度は、初年度に見いだされた新規 heptamer 型 sgRNA に関して、その apoptosis 誘導機構の詳細を解析した。また、この新規 sgRNA およびコード番号 13024 と 15540 の sgRNA を用いて、RPMI-8226 や KMM-1 以外のヒト骨髄腫細胞株についても、apoptosis 誘導効果を調べた。

apoptosis 試験：新規 heptamer 型 sgRNA について、flow cytometry 解析、caspase 試験、ROS 誘導試験および DNA fragmentation 解析を行う。

tRNase ZL 効果の検証：新規 sgRNA の apoptosis 誘導能が、実際に tRNase ZL による標的ミトコンドリア mRNA の切断によるものであることを検証するために、平成 24 年度と同様に 2 つの実験を行う。1 つは 3'-RACE で、ミトコンドリア内標的 mRNA の切断部位を RT-PCR と DNA sequencing にて決定する。もう 1 つは、tRNase ZL に対する siRNA を用いて細胞内 tRNase ZL 量を減少させ、その結果としてミトコンドリア内標的 mRNA 量の減少が抑制されることを qRT-PCR により解析する。

他の骨髄腫細胞株への効果：MTT 試験と flow cytometry 解析により、ヒト骨髄腫細胞株 U266 や Oda などに対しても apoptosis を誘導するかどうかが解析を行う。

(3) 平成 26 年度

最終年度は、平成 25 年度までの解析により、最も効率の良かった 3 種類の heptamer 型 sgRNA に関して、ヒト骨髄腫細胞 KMM-1 を SCID/NOD マウスの皮下に移植したマウス xenograft モデルを用いて個体レベルでの腫瘍増殖抑制効果を試験した。具体的には以下の流れで実験を行った。

SCID/NOD マウスの皮下に、マトリゲルを用いてヒト骨髄腫細胞株 (KMM-1) を移植する。

骨髄腫細胞が生着したマウスを選択し、4

つのグループに分け、それぞれのグループのマウスに生理食塩水、あるいは3種類の有効 sgRNA を皮下に局所投与する。さまざまな投与回数プロトコールで試験する。

その後、毎日皮下の腫瘍の体積を計測し、体積が 1,500 mm³ を超えたらマウスを安楽死させ、腫瘍を摘出する。

摘出した腫瘍細胞内の標的 mRNA 量や残存 sgRNA 量などの解析を行う。また、腫瘍体積の増加率グラフや生存率グラフなどの解析も行う。

これらの解析結果を総合的に分析し、それぞれの sgRNA について多発性骨髄腫治療用 sgRNA 薬としての可能性を検討する。

4. 研究成果

(1) 平成 24 年度

初年度は、2 つの有望 heptamer 型 sgRNA (H13024 と H15540) に関して、そのアポトーシス誘導機構を解析した。この 2 つの sgRNA は、それぞれが complex I の 2 つのサブユニットをコードするミトコンドリア mRNA を標的とした heptamer 型 sgRNA であることが、DNA マイクロアレイ解析により示唆されていた。

3'末端を Alexa 標識した H15540 の heptamer 型 sgRNA を用いて、共焦点レーザー顕微鏡によりヒト骨髄腫細胞 RPMI-8226 および KMM-1 内の局在を解析したところ、sgRNA の一部はミトコンドリアに移行することが示された。

3'-RACE 法を用いてミトコンドリア内標的 mRNA の切断部位を RT-PCR と DNA シークエンシングにて決定することにより、この切断がこれらの sgRNA によりガイドされた tRNase ZL によるものであることが示唆された。

sgRNA による骨髄腫細胞のアポトーシス誘導に活性酸素種の生成が伴うことが示された。

以上の結果より、この 2 つの sgRNA は、細胞に取り込まれた後、一部がミトコンドリアに移行しミトコンドリア mRNA の切断を誘導し、活性酸素種の生成を引き起こすことによりアポトーシスを誘導することが示唆された。

また、より優れた heptamer 型 sgRNA の探索を行い、H3252 が上の 2 つの sgRNA と同等のアポトーシス誘導能を示すことを見出した。

(2) 平成 25 年度

平成 25 年度は、前年度に新たに見出された heptamer 型 sgRNA (H3252) に関してそのアポトーシス誘導機構を解析した。

この sgRNA のアポトーシス誘導能が、実際に tRNase ZL による標的 mRNA の切断

によるものであることを検証するために、3'-RACE 法により標的 mRNA の切断部位を RT-PCR と DNA sequencing にて決定した。その結果、3'末端配列が tRNase ZL による切断予想部位の少し上流に対応することが示され、この標的 mRNA の切断が tRNase ZL によるものであることが示唆された。

また、コード番号 H11247 と H15860 の heptamer 型 sgRNA について、flow cytometry 解析、caspase 試験および DNA fragmentation 解析を行った結果、これらの新規 sgRNA がヒト骨髄腫細胞に効率よくアポトーシスを誘導することが示された。

更に、4 つの heptamer 型 sgRNA (H11247、H13024、H15540、H15860) に関して、MTT 試験と flow cytometry 解析により、ヒト骨髄腫細胞株 KMS-12-BM、KMS-12-PE、KMS-11、RPMI-1788、Oda に対してもアポトーシスを効率よく誘導することが示された。

(3) 平成 26 年度

最終年度は、平成 25 年度までの解析により、最も効率の良かった 3 種類の heptamer 型 sgRNA に関して、ヒト骨髄腫細胞株 KMM-1 を免疫不全 SCID/NOD マウスの皮下に移植したマウス xenograft モデルを用いて、個体レベルでの腫瘍増殖抑制効果を試験した。

具体的には、コード番号 H11247、H15860、H15540 の 3 種類の heptamer 型 sgRNA を試験した。KMM-1 細胞が皮下に生着した SCID/NOD マウスにそれぞれの sgRNA 薬を 1 日 1 回、5 日間局所投与し、その後の腫瘍体積の増加を 1,500 mm³ に到達するまで観察した。その結果、生理食塩水を投与した対照群マウスと比較して、sgRNA 薬を投与した何れのマウス群においても腫瘍の増殖抑制が観察された。特に、コード番号 H15540 の heptamer 型 sgRNA 薬は際立った効果を示した(図 3)。今後は、この H15540 の heptamer 型 sgRNA を用いて、全身投与による腫瘍増殖抑制試験や、他の抗がん剤との併用試験を行っていく予定である。また、がんの微小環境を形成するマクロファージを標的とした sgRNA 薬の開発も行う予定である。

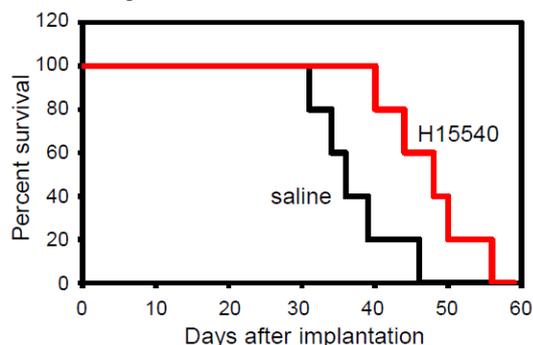


図 3

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Masayuki Takahashi, Reyad A. Elbarbary, Norihiro Watanabe, Atsushi Goto, Daichi Kamiya, Yoshihiro Watabe, Takayoshi Uchiyama, Miwako Narita, Masuhiro Takahashi, Yoshiaki Takahashi, Noriko Ishihara, Tatsuya Miyazawa, Tetsuo Yoshida, Mitsuoki Kawano, Masato Tamura, and Masayuki Nashimoto. (2014) Screening of a heptamer-type sgRNA library for potential therapeutic agents against hematological malignancies. *Leukemia Research* **38**, 808–815
DOI: 10.1016/j.leukres.2014.03.021.

〔学会発表〕(計3件)

Masayuki Nashimoto, Development of a Therapeutic sgRNA for Multiple Myeloma Based on TRUE Gene Silencing, 14th International Myeloma Workshop, 2013年4月5日, 国立京都国際会館(京都府京都市)

梨本正之、血液がん治療用 heptamer 型 sgRNA の探索、Biotech 2013 アカデミックフォーラム、2013年5月9日、東京ビッグサイト(東京都江東区)

梨本正之、多発性骨髄腫治療用 sgRNA 薬の開発、第18回バイオ治療法研究会学術集会、2014年12月13日、アルファあなぶきホール(香川県高松市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

梨本 正之 (NASHIMOTO, Masayuki)
新潟薬科大学・健康自立総合研究機構・教授
研究者番号：30228069

(2)研究分担者

川野 光興 (KAWANO, Mitsuoki)
新潟薬科大学・応用生命科学部・助教
研究者番号：00455338