

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591385

研究課題名(和文)腫瘍細胞内 tRNA 前駆体切断酵素を効果的に利用した全く新しい白血病治療法の開発

研究課題名(英文)A unique anti-leukemic therapy using efficiently tRNA precursor cleavage enzyme in leukemia cells

研究代表者

高橋 益廣 (Takahashi, Masuhiro)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：90179531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：血液腫瘍性疾患の治療にsgRNAを用いたTRUE gene silence法を用いることを目的とし、sgRNAをマウスゼノグラフトモデルに投与したin vivoの実験を行い、sgRNAの臨床的有用性についての検討を行った。Bcl-2 mRNAをtargetとしてsgRNAを作成し、Bcl-2を高発現している白血病細胞株をマウスに移植し、移植と同時にsgRNAも投与した。sgRNAを投与したモデルにおいて腫瘍生着率の低下と生存期間の延長が認められた。本研究でデザインしたヘプタマー-sgRNAを用いた腫瘍抗原のmRNAを阻害する方法が白血病等の腫瘍に対する治療法として応用可能であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：TRUE gene silencing is a technology to eliminate specific cellular RNAs by using tRNase ZL and small guide RNA (sgRNA). Here we investigated how WT1-mRNA-targeting sgRNAs affect leukemic cells. We showed that sgRNA can be easily taken up by cells without any transfection reagents, and that the naked sgRNAs targeting the WT1 mRNA can reduce its mRNA levels and WT1 protein amounts in the WT1-expressing leukemic cells. Concomitantly, these sgRNAs efficiently induced apoptosis in these cells but not in WT1-nonexpressing cells. We also demonstrated that the reduction in the WT1 mRNA level is caused by its cleavage by tRNase ZL. Besides, we demonstrated that a heptamer, mh1(Bcl-2), which targets the human Bcl-2 mRNA, can be taken up by cells without any transfection reagents and that it can induce apoptosis of the leukemia cells. Mouse xenograft experiments showed that a median survival of the mh1(Bcl-2)-treated mice was longer than that of the control mice.

研究分野：血液内科学

キーワード：TRUE gene silencing tRNase ZL Bcl-2 small guide RNA 白血病 アポトーシス誘導 細胞増殖抑制 マウス移植実験

1. 研究開始当初の背景

(1) トランスファーRNA (tRNA) は DNA から転写されるが、転写された直後の tRNA 前駆体には、その 3' 末端に成熟 tRNA には見られない伸長配列が存在する。tRNA 前駆体 3' 末端の伸長配列が tRNase Z などのエンドヌクレアーゼによって除去されることにより成熟 tRNA になる。先行研究においては、tRNA 前駆体のクローバの葉様構造、特にヘアピンループ構造が tRNase Z による切断部位の認識に重要であることを明らかにするとともに、標的 RNA を切断する新しい方法を開発した。すなわち、標的 RNA と相補的な塩基配列をもつガイド RNA を作成し、標的 RNA との間で tRNA 前駆体に類似した構造の複合体を形成することにより、細胞内の tRNase Z がこの複合体を切断することを見いだした。

(2) 効果的なガイド RNA の構造についての検討も行い、3'-truncated tRNA、5'-half-tRNA (tRNA 前駆体の 5' 側半分の構造のガイド RNA を作成し、tRNA 前駆体の 3' 側半分の構造を有する標的 RNA と結合させる) hook RNA の他、7 塩基の RNA (ヘプタマー) tRNA 前駆体アクセプターステムの 5' 側半分の 7 塩基からなるガイド RNA を作成し、tRNA 前駆体アクセプターステムの 3' 側半分と T ステムのヘアピンループ構造を有する標的 RNA と結合させる) でも、標的 RNA と結合することにより、tRNase Z に認識される複合体を形成するようにデザインすることができることを示した。すなわち、四つ葉のクローバ状構造を示す tRNA 前駆体を切断するはずの tRNase Z が、アクセプターステムの 7 塩基と T ステムの 5 塩基が相補的である二つ葉状の構造物も tRNA 前駆体として認識し、7 塩基のガイド RNA を用いても標的 RNA を破壊できることを明らかにした (図 1)。

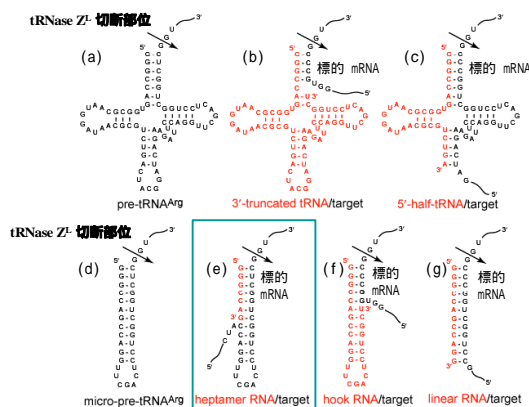


図 1 種々の sgRNA の構造
矢印は tRNase Z^L による切断部位を示す。
灰色文字部分が sgRNA の配列を示す。
a) pre-tRNA の構造
b) 3'-truncated tRNA と標的 mRNA との間で形成された pre-tRNA 様複合体
c) 5'-half-tRNA と標的 mRNA との間で形

成された pre-tRNA 様複合体

d) micro-pre-tRNA の構造
e) heptamer RNA と標的 mRNA との間で形成された micro-pre-tRNA 様複合体
f) hook RNA と標的 mRNA との間で形成された micro-pre-tRNA 様複合体
g) linear RNA と標的 mRNA との間で形成された micro-pre-tRNA 様複合体

(3) ヘプタマー-sgRNA と標的 mRNA で形成される複合体は micro tRNA 前駆体様の構造を示すが、この複合体も tRNase Z に認識され、標的 mRNA が切断されることも明らかにされている。また、我々は、協和発酵キリン・バイオ医薬研究所の強力を得て、標的 mRNA の 2 次構造を加味して、最も効果的な sgRNA をデザインできるソフトウェアを開発し、その有用性を検討していた。

2. 研究の目的

(1) 本研究と関連して、2011 年 8 月 29 日に国内特許の申請を完了した (特願 2011-185594) 【発明の名称：ヒト白血病細胞のアポトーシスを誘導するヘプタマー型スモールガイド核酸】。本研究の目的は、全く新しい方法を用いて標的 mRNA を切断することにより白血病等の腫瘍に対する新規核酸医薬を開発することであった。新しい方法とは、人工的 small guide (sg) RNA と細胞内で結合させた標的 mRNA (この結合体が tRNA 前駆体と類似構造をとるように sgRNA をデザインする) を、すべての細胞内に存在するトランスファーRNA 前駆体切断酵素 (tRNase) を用いて切断させ、腫瘍の増殖に関連するタンパクの産生を抑制することにより腫瘍を治療することであった。

(2) 研究期間内に、ヘプタマー-sgRNA を用いて白血病抗原を中心とする腫瘍抗原の mRNA を阻害する方法が、白血病等の腫瘍に対する治療法として応用可能であることを明らかにすること。また、sgRNA による mRNA 切断法を効果的に応用できる腫瘍抗原等の分子を選択し、かつ sgRNA の最も効果的な塩基配列を決定すること。有効な sgRNA については、これらの sgRNA ライブラリーを固相化した細胞培養プレートを作成し、細胞傷害性 (MTT) アッセイで各種腫瘍細胞に対する sgRNA 感受性試験を行うためのキットを作成し、各種の腫瘍細胞に対し多数の sgRNA 感受性試験をスクリーニングテストとして確立すること。以上の検討を行うことにより、ヘプタマー-sgRNA を用いた標的 mRNA 切断法を確立することにより、本法の臨床応用への道を開くことであった。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍に対する sgRNA を用いた新しい核酸医薬の開発を目的として、主に白血病等の造血器腫瘍細胞を対象として、腫瘍細胞のアポ

トース・分化の抑制、増殖を促進する因子に対し、網羅的に sgRNA をデザインし、当該 mRNA 発現の抑制、アポトーシスの誘導、細胞増殖の抑制等の検討を行い、有効な sgRNA を選択する。これらの sgRNA ライブラリーを固相化した細胞培養プレートを作成し、広範な腫瘍細胞に対する sgRNA 感受性試験を行い、腫瘍の種類、また症例ごとに有効な sgRNA を選択し、異なる sgRNA の併用効果についての検討も行う。同時に、マウスを用いたヒト腫瘍細胞に対する *in vivo* 感受性試験を行い、核酸医薬としての要件を備えた sgRNA を開発する。

(2) 各種腫瘍関連遺伝子に対する効果的な sgRNA のデザインと安定化のための RNA 修飾
腫瘍細胞のアポトーシス・分化の抑制、増殖を促進する標的 mRNA (腫瘍関連遺伝子 WT1, bcr-abl, aurora kinaseA, hTERT, survivin, PRAME, proteinase3, Bcl-2, HAGE, Polo-like kinase 1 RHAMM, G250, PARK7 等) の塩基配列において、sgRNA との間で 7 塩基の相補的配列によりアクセプターステムを形成し、かつその直接の上流で標的 mRNA が 5 塩基の相補的配列により T ステム (ヘアピンループ構造) を形成するような sgRNA の塩基配列をデザインする。上記の条件に合致した sgRNA のデザインができない場合は、できるだけ類似するようにデザインする。各 sgRNA について、RT/RQ-PCR を用いて標的 mRNA 発現の阻害活性を検討することにより、最適な sgRNA のデザインを決定する。

(3) sgRNA による各種腫瘍細胞の細胞増殖抑制およびアポトーシス誘導についての検討
各種の白血病細胞株や新鮮白血病細胞に網羅的に腫瘍関連抗原の sgRNA を加えて培養する。RT/RQ-PCR を用いて、sgRNA を添加培養した白血病細胞の当該遺伝子の mRNA 発現の阻害を確認するとともに、Western blotting およびフローサイトメトリーを用いて、培養細胞の当該タンパク発現の阻害を確認する。また、sgRNA を添加培養した白血病細胞について、経時的な MTT アッセイによる細胞増殖の抑制、および Annexin V/7AAD 染色した培養細胞をフローサイトメトリーで解析することにより、sgRNA を介したアポトーシスの誘導について検討する。

(4) sgRNA による標的 mRNA 切断部位の確認
標的腫瘍関連遺伝子に対する sgRNA で処理した白血病細胞株より抽出した mRNA を用いた RACE (rapid amplification of cDNA ends) を行い、切断部位の塩基配列を同定することにより、標的 mRNA が、tRNase Z により切断されていることを確認する。

(5) sgRNA ライブラリーを固相化した細胞培養プレートによる sgRNA 感受性試験
in vitro の検討で腫瘍細胞に対する細胞障害

活性が認められた sgRNA については、これらの sgRNA ライブラリーを固相化した細胞培養プレートを作成する。すなわち、96 ウエルプレートに各ウエルに各種濃度の sgRNA を加えたメジウムを加え乾燥させる。プレート保存に最適な条件を明らかにし、MTT アッセイで各種腫瘍細胞に対する感受性試験を行うためのキットを作成する。この sgRNA 感受性キットを用いて、広範な腫瘍細胞について sgRNA 感受性試験を行う。

(6) sgRNA の腫瘍細胞傷害活性についてのマウスゼノグラフトモデルを用いた検討

sgRNA 感受性キットで腫瘍細胞に対する細胞障害活性が認められた sgRNA については、マウスゼノグラフトモデルを用いた *in vivo* での検討を行う。ヌードマウスの皮下に移植したヒト白血病細胞株に対する sgRNA の局所および尾静脈からの投与の効果について検討し、sgRNA の有効性を明らかにする。次いで、SCID マウスで作製したヒト AML モデルマウスを用いて、sgRNA を投与することにより、白血病を予防的および治療的に抑えることができることを明らかにする。また、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) を発現するように遺伝子組み換えされたヒト白血病細胞を移植し、全身の蛍光をモニターすることによりゼノグラフトモデルシステムがうまく機能することを確認するとともに、sgRNA の *in vivo* での抗腫瘍効果を明らかにする。さらに、NOD/SCID マウスに患者新鮮 AML 細胞を移植した AML モデルマウスについても、sgRNA 投与の有効性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 白血病細胞株 (K562) における WT1sgRNA による WT1 mRNA の発現抑制

WT1 mRNA を発現している白血病細胞株 K562 において、WT1sgRNA の添加培養により WT1 mRNA の発現が抑制されるかどうかを検討した。K562 に WT1sgRNA 添加培養後、細胞より total RNA を抽出し、cDNA を合成し、リアルタイム定量 PCR により WT1 mRNA の発現を解析した。今回の検討では、対照として EGFP (enhanced green fluorescent protein) を標的としてデザインした sgRNA (EGFPsgRNA-3) を用いた。WT1 を標的とした sgRNA は、WT1 mRNA との結合部位の異なる 4 種類 (WT1sgRNA-2, 3, 4, 5) を用いた。EGFPsgRNA-3 を添加培養した K562 と比較して、WT1sgRNA-2, 3, 5 を添加培養した K562 において、WT1 mRNA の発現抑制が認められた (図 2)。WT1sgRNA-4 を添加培養した K562 においては、WT1 mRNA の発現抑制は認められなかった (図 2)。

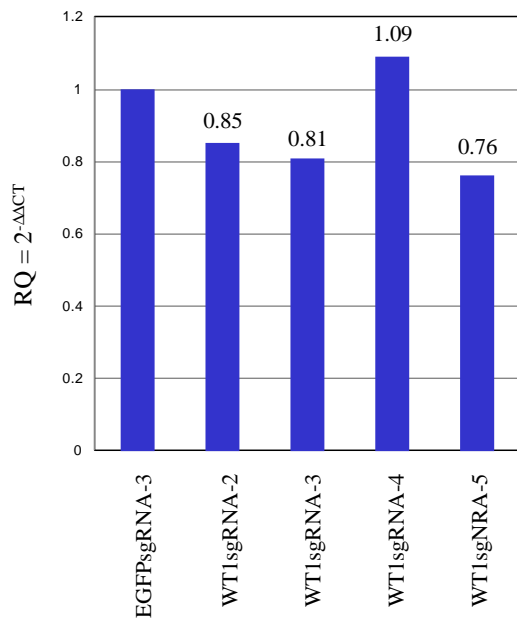


図 2 白血病細胞株 (K562) における WT1sgRNA による WT1 mRNA の発現抑制

sgRNA を添加培養した K562 における WT1 mRNA の発現量を示す。対照である EGFPsgRNA-3 を添加培養した K562 における WT1 mRNA の発現量を 1 としている。K562 に各々の sgRNA を添加培養した後、total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA としたものを鋳型にして、各種プライマーを用い、SYBR Green I 法によりリアルタイム定量 PCR を行なった。

(2) 白血病細胞株 (K562) における WT1sgRNA による WT1 タンパクの発現抑制と細胞周期の変化

K562 における WT1sgRNA による WT1 mRNA の発現抑制と同時に、WT1 タンパクの発現抑制についても検討した。K562 に WT1sgRNA 添加培養後、細胞内染色を行ない、フローサイトメトリーにより WT1 タンパクの発現を解析した。EGFPsgRNA-3 を添加培養した K562 と比較して、WT1sgRNA を添加培養した K562 において、WT1 タンパクの発現抑制が認められた。WT1 mRNA の発現抑制が認められなかった WT1sgRNA-4 による WT1 タンパクの発現抑制は、WT1 mRNA の発現抑制が認められた WT1sgRNA-2, 3, 5 による WT1 タンパクの発現抑制と比較して弱かった (図 3)。また、WT1 タンパク染色と同時に細胞周期解析を行ない、WT1sgRNA による WT1 タンパクの発現抑制と細胞周期の関連について探った。フローサイトメトリーによる細胞周期の解析は、DNA を染色することで G0/G1 期 (2n)、S 期 (2-4n)、G2/M 期 (4n) などの細胞数の変化により評価した。WT1sgRNA の添加培養による WT1 タンパクの発現抑制が認められた K562 において、G2/M 期の細胞数の減少が認められた (図 3)。

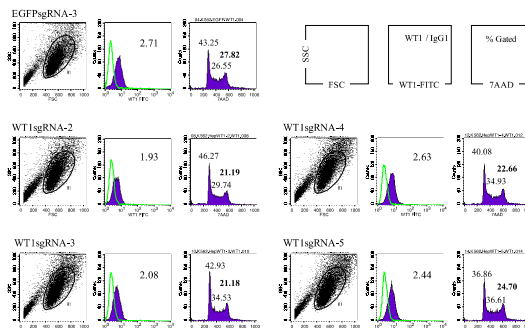


図 3 白血病細胞株 (K562) における WT1sgRNA による WT1 タンパクの発現抑制と細胞周期の変化

sgRNA を添加培養した K562 における WT1 タンパクの発現量と細胞周期を示す。K562 に各々の sgRNA を添加培養した後、WT1 タンパク染色と各染色を行ない、フローサイトメトリーにより解析した。

(3) tRNaseZL と small guide RNA (sgRNA) を用いることで siRNA よりもさらに target を絞った RNA 治療が可能であることを target RNA を WT1 とし、WT1 を高発現している白血病細胞株を用いて検討した。sgRNA 処理により WT1 タンパク現低下と WT1 mRNA の切断を明らかにした (図 4-8)。

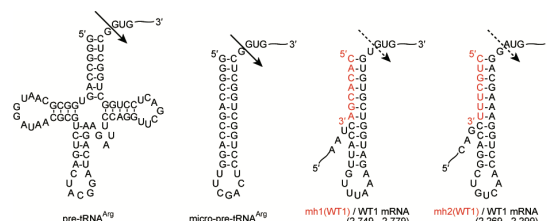


図 4 pre-tRNA, micro-pre-tRNA, それに 2 種類の WT1 ヘプタマー mh1(WT1)/mh2(WT1) と WT1 mRNA の推定結合物の構造. 実線と破線矢印はそれぞれ tRNase ZL による実際および推定切断部位を示す。

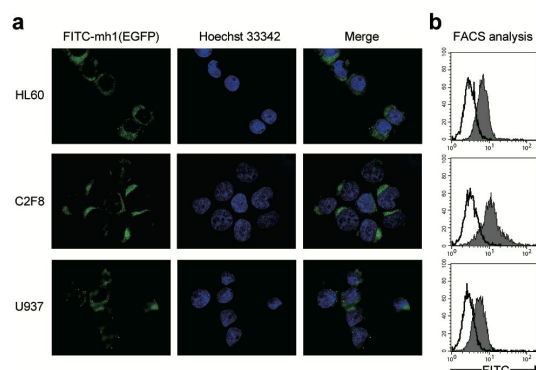


図 5 導入試薬を使用しないヘプタマー-sgRNA の標的細胞への導入. FITC で標識したヘプタマー-EGFP sgRNA の導入による検討. (a) 蛍光顕微鏡 and flow cytometry (b) フローサイトメトリー.

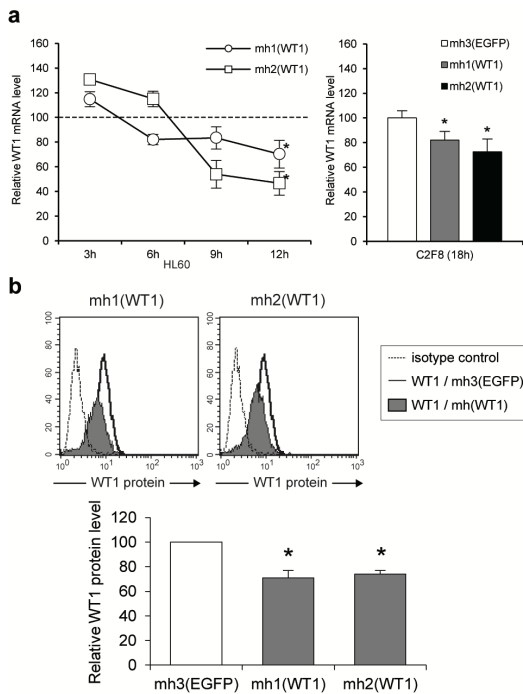


図6 ヘプタマーWT1 sgRNAによるWT1遺伝子発現の抑制. 標的細胞としてHL60とC2F8細胞を使用した。(a) Real-time PCR解析により検討したmRNAレベルの発現抑制。(b) フローサイトメトリー解析により検討したタンパクレベルでの発現抑制

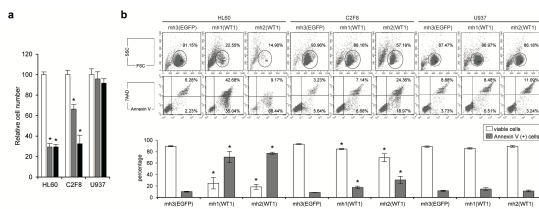


図7 WT1発現細胞株(HL60, C2F8)に対するWT1 sgRNAのアポトーシス誘導作用. U937はコントロールとしたWT1低発現株。(a) MTTアッセイによる細胞傷害試験。(b) フローサイトメトリーを用いたアポトーシス誘導試験.

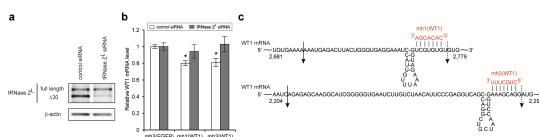


図8 WT1 sgRNAのWT1発現抑制におけるtRNase Z¹関与の確認。(a) tRNase Z¹ siRNAの作用確認。(b) tRNase Z¹ siRNAによるヘプタマーWT1 sgRNAのWT1発現抑制の減弱。(c) 3' RACE解析によるtRNase Z¹切断部位の同定

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12件)

- Narita M, Kanda T, Abe T, Uchiyama T, Iwabuchi M, Zheng Z, Liu A, Kaifu T, Kosugi S, Minagawa M, Itoh K, Takahashi M Immune responses in patients with esophageal cancer treated with SART1 peptide pulsed dendritic cell vaccine. *Int J Oncol.* 査読あり 2015;46(4):1699-709.
- Narita M, Masuko M, Takahashi M Five years molecular remission with an increase of WT1-specific CTLs after cessation of WT1 peptide vaccination in a patient with CML. 査読あり *Int J Med Sci* (in press).
- Iwabuchi M, Narita M, Uchiyama T, Iwaya S, Oiwa E, Nishizawa Y, Hashimoto S, Bonehill A, Kasahara N, Takizawa J, Takahashi M Enhancement of antigen-specific CTL inducing ability in the leukemic plasmacytoid dendritic cell line (PMDC11) by lentiviral vector-mediated transduction of caTLR4 gene. 査読あり *Mol Med Rep.* 2015;12(2):2443-50.
- Takahashi M, Elbarbary RA, Watanabe N, Goto A, Kamiya D, Watabe Y, Uchiyama T, Narita M, Takahashi M, Takahashi Y, Ishihara N, Miyazawa T, Yoshida T, Kawano M, Tamura M, Nashimoto M Screening of a heptamer-type sgRNA library for potential therapeutic agents against hematological malignancies. *Leuk Res.* 査読あり 2014;38(7):805-15.
- Narita M, Nishizawa Y, Iwaya S, Oiwa E, Iwabuchi M, Uchiyama T, Matsuyama A, Masuko M, Takahashi M Ustekinumab improves psoriasis without suppressing tumor antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *International Archives of Allergy and Immunology Int Arch Allergy Immunol.* 査読あり 2014;165(1):52-60.
- Yamahira A, Narita M, Iwabuchi M, Uchiyama T, Iwaya S, Ohiwa R, Nishizawa Y, Yokoyama Y, Hashimoto S, Takizawa J, Sone, Takahashi M. Activation of the Leukemia Plasmacytoid Dendritic Cell Line PMDC05 by Toho-1, a Novel IDO Inhibitor. 査読あり *Anticancer Res.* 2014;34(8):4021-8.
- Uchiyama T, Satoh N, Narita M, Yamahira A, Iwabuchi M, Furukawa T, Sone H, Takahashi M. Direct effect of dasatinib on proliferation and cytotoxicity of

- natural killer cells in in vitro study. Hematol Oncol. 査読あり 2013;31(3):156-63.
8. Watanabe N, Narita M, Saito A, Yamahira A, Taniguchi T, Furukawa T, Yoshida T, Miyazawa T, Nashimoto M, Takahashi M. Induction of apoptosis of leukemic cells by TRUE gene silencing using small guide RNAs targeting the WT1 mRNA. Leuk Res. 査読あり 2013;37(5):580-5.
 9. Takahashi M, Elbarbary RA, Nakashima A, Abe M, Watanabe N, Narita M, Takahashi M, Tamura M, Yoshida T, Nashimoto M naked RNA heptamer targeting the human Bcl-2 mRNA induces apoptosis of HL60 leukemia cells. Cancer Letters. 査読あり 2013;328(2):362-8.
 10. Narita M, Saito A, Kojima A, Iwabuchi M, Satoh N, Uchiyama T, Yamahira A, Furukawa T, Sone H, Takahashi M. Quantification of BCR-ABL mRNA in Plasma/Serum of Patients with Chronic Myelogenous Leukemia. Int J Med Sci 査読あり 2012;9(10):901-908.
 11. Yamahira A, Narita M, Kayoko Ishii K, Jayathilake RMC, Iwabuchi M, Satoh N, Uchiyama T, Taniguchi T, Hashimoto S, Kasahara N, Faure E, Boganc B, Takizawa J, Sone H, Takahashi M. Enhancement of antigen presenting ability in the leukemic plasmacytoid dendritic cell line (PMDC05) by lentiviral vector-mediated transduction of CD80 gene. Leuk Res 査読あり 2012;36(12):1541-6.
 12. Shiga A, Ishihara T, Miyashita A, Kuwabara K, Kato T, Watanabe N, Kondo C, Yokoseki A, Takahashi M, Kuwano R, Kakita A, Nishizawa M, Takahashi H, Onodera O. Alteration of POLDIP3 Splicing Associated with Loss of Function of TDP-43 in Tissues Affected with ALS. PLoS ONE 査読あり 2012;7(8):e43120.

〔学会発表〕(計6件)

1. Takahashi Masuhiro, Uchiyama Takayoshi, Iwaya Shunpei, Nishizawa Yoshinori, Oiwa Eri, Narita Miwako. Antigen presenting exosomes secreted by leukemic plasmacytoid dendritic cell line. The 18th ECCO & 40th ESMO European Cancer Congress(ECC2015) 2015年9月26日 ウィーン(オーストリア)
2. Takahashi Masuhiro, Uchiyama Takayoshi, Iwaya Shunpei, Oiwa Eri, Nishizawa Yoshinori, Hashimoto Shigeo, Bonehill Aude, Kasahara Noriyuki, Narita Miwako. Leukemic plasmacytoid dendritic cell line transduced with caTLR4 gene as a

- potent antigen presenting cells for immunotherapy. International Society of Cellular Therapy 21th Annual Meeting 2015年5月28日 ラスベガス(米国)
3. Takahashi M, Iwabuchi M, Uchiyama T, Iwaya S, Oiwa E, Nishizawa Y, Hashimoto S, Aude B, Kasahara N, Narita M caTLR4 gene-transduced leukemic plasmacytoid dendritic cell line (PMDC11) as a potent antigen presenting cells for immunotherapy. 2014年樹状細胞シンポジウム 2014年9月15日ツール(フランス)
 4. Takahashi M, Iwabuchi M, Satoh N, Uchiyama T, Iwaya S, Oiwa E, Nishizawa Y, Hashimoto S, Bogan B, Faure-Kumar E, Kasahara N, Narita M Potentiation of antigen-specific CTL generation by caTLR4 gene transduction into leukemic plasmacytoid dendritic cell line (PMDC11). アメリカ免疫学会 2014年5月4日 ピッツバーグ(米国)
 5. Takahashi M, Iwabuchi M, Satoh N, Uchiyama T, Iwaya S, Oiwa E, Nishizawa Y, Hashimoto S, Narita M Efficient generation of antigen-specific CTLs by caTLR4 gene transduced leukemic plasmacytoid dendritic cell line (caTLR4-PMDC11). 第43回オーストラリア免疫学会 2013年12月3日 ウェリントン(ニュージーランド)
 6. Takahashi M, Iwabuchi M, Yamahira A, Satoh N, Uchiyama T, Hashimoto S, Bonehill A, Faure-Kumar E, Kasahara N, Narita M Enhancement of antigen-specific CTL inducing ability in the leukemic plasmacytoid dendritic cell line (PMDC11) by lentiviral vector-mediated transduction of caTLR4 gene. 第15回国際免疫学会 2013年8月23日 ミラノ(イタリア)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: ヒト白血病細胞のアポトーシスを誘導するヘプタマー型スモールガイド核酸
 発明者: 梨本正之/高橋益廣/成田美和子/吉田哲郎/宮澤達也
 権利者: 新潟薬科大学/新潟大学
 種類: 国際特許
 番号: PCT/JP2012/071503
 出願年月日: 平成24年8月24日
 国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 益廣 (TAKAHASHI, Masuhiro)
 新潟大学・医歯学系・教授
 研究者番号: 90179531