

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05564

研究課題名(和文) 血中microRNA追跡型遺伝子制御素子の開発

研究課題名(英文) Development of functional molecules for targeting circulating microRNA

研究代表者

山吉 麻子 (Yamayoshi, Asako)

京都大学・白眉センター・特定准教授

研究者番号：70380532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：様々な細胞から放出されるエクソソーム中にmiRNAが含まれることが発見された。血中には、『エクソソームに含まれるmiRNA』だけでなく、『タンパク質との複合体となったmiRNA(RISC)』が多数放出され、ガン細胞の増殖能ならびに転移能を支配するという新たなメカニズムまでもが示されている。従って、血中に放出されるmiRNAの機能を制御することは、血中miRNAが支配する癌の転移メカニズムを防止することに繋がると期待される。そこで本研究では、血中遊離型miRNA(RISC)を標的とする機能性核酸の開発、エクソソーム追跡型miRNA捕捉分子の開発、以上2点の実現を目指し、研究を遂行した。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are nano-sized vesicles that are released from various kinds of cells and delivered to the neighboring or distant cells (recipient cells). Such vesicles are widely distributed in various body fluids including blood. Recently, various kinds of nucleic acids including microRNAs (miRNAs) have been identified in exosomes. It has also been reported that such miRNAs in exosomes circulate in the bloodstream and are transported to work at the recipient cells. According to recent reports, the aberrant expression of miRNAs is associated with most pathological disease processes, including carcinogenesis. Therefore, circulating miRNAs are considered as significant therapeutic targets for cancer therapy, however, there is no report to regulate the function of miRNAs in exosomes. In this study, we try to develop novel drug delivery system using cationized antibody for delivery of anti-miR oligonucleotides to the recipient cells and for functional inhibition of circulating miRNAs.

研究分野：生体機能関連化学

キーワード：核酸医薬 機能性分子開発 microRNA エクソソーム 抗体結合型核酸

1. 研究開始当初の背景

近年、microRNA (miRNA) と呼ばれる小さな RNA に高い関心が寄せられている。miRNA は、ヒトの全遺伝子の 6 割以上もの発現を制御しており、細胞の分化や増殖、さらには発生段階における遺伝子発現の時間的制御といった極めて重要なプロセスに関与していることが明らかとなった。また、microRNA の発現異常が、ガンなどの重篤な疾患の原因にもなることも多く報告されている。

さらに驚くべきことに、様々な細胞から放出されるエクソソーム中に miRNA が含まれることが発見された。エクソソームを介して miRNA は血中を巡り、あらゆる臓器へと輸送され、その細胞の遺伝子発現を制御している。さらに、血中には、『エクソソームに含まれる miRNA (exosomal-miRNA)』だけでなく、『タンパク質との複合体となった miRNA (RISC)』が多数放出され、ガン細胞の増殖能ならびに転移能を支配するという新たなメカニズムまでもが示されている。従って、血中に放出される miRNA の機能を制御することは、血中 miRNA が支配する癌の転移メカニズムを防止することに繋がると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、血中 miRNA の機能制御を行うための新規機能性分子の開発を目指すものである。血中には『エクソソームに内包された形状で存在する miRNA』の他に、『RNA 結合性タンパクと結合して存在する miRNA (RISC)』が多数存在し、その存在比率エクソソーム型が 3 割、RISC 型が 7 割である。そこで本研究では、両者の機能阻害を狙い、以下の 2 つの研究を推進した。

- A) 血中遊離型 miRNA (RISC) を標的とする機能性核酸の開発
- B) エクソソーム追跡型 miRNA 捕捉分子の開発

3. 研究の方法

A) 血中遊離型 miRNA (RISC) を標的とする機能性核酸の開発

miRNA はそれ単独で機能せず、RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれるリボヌクレオプロテインを形成して初めてその機能を獲得する。RISC は miRNA と相補的配列を有する mRNA と結合して遺伝子発現を制御するが、この際、mRNA が miRNA と完全相補的な場合には、mRNA の切断が誘起されることが知られている。近年、MacRae らのグループによって、miRNA と完全相補配列を有する天然型 RNA が RISC に結合した後、RISC から miRNA が解離される現象が見出された。一方で我々は、RISC

の機能を阻害するために、RISC 中の miRNA に相補的な配列を有する核酸 (anti-miR 核酸) として 2'-OMe 型 RNA (RISC から切断を受けない RNA 基質) を用いた場合に、RISC から miRNA が解離される現象を見出し、さらにその miRNA の解離効果を促進させることで、RISC の機能を効果的に抑制することに成功した。そこで本研究では、より高い miRNA 解離効果を持つ anti-miR 核酸の新たな設計指針確立のために、天然型 RNA と化学修飾型 RNA の miRNA 解離効果を比較・検証した。

B) エクソソーム追跡型 miRNA 捕捉分子の開発

先述の様に、miRNA の一般的な機能阻害法として、miRNA に相補的な配列を有する核酸 (anti-miR 核酸) を用いた手法が挙げられるが、exosomal-miRNA はエクソソームに内包されているため、*in vivo* に投与された anti-miR 核酸をエクソソーム内に送達するのは困難である。そこで本研究では、exosomal-miRNA を標的とした機能性分子の開発を目指し、エクソソーム表面抗原を認識する抗体 (anti-Exo 抗体) を薬物輸送担体として利用することで、anti-miR 核酸のエクソソーム受容細胞への送達と、exosomal miRNA の機能阻害を実現する新規抗体結合型 anti-miR 核酸 (ExomiR-Tracker) の開発を行った。

4. 研究成果

A) 血中遊離型 miRNA (RISC) を標的とする機能性核酸の開発

RISC は miRNA の Seed 領域において標的 RNA を認識して結合する。この際、標的 RNA と miRNA とが完全相補的な場合にのみ、RISC 中の PAZ ドメインから miRNA の 3'末端がリリースされる。そのため、RISC に標的 RNA が結合し miRNA が解離されるまでに複数の経路が存在すると考えられるが (Fig.1)、どの段階が重要であるか明らかになっていない。そこで我々は種々の anti-miR 核酸を設計し (Fig.2)、各々の miRNA 解離速度を評価した。

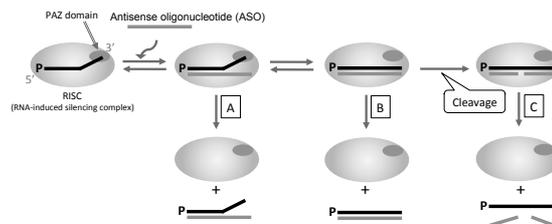


Fig.1 anti-miR 核酸 (ASO) が RISC に結合することによって誘起される miRNA 解離機構 (予測図) A: Seed 領域とのみ相補的な RNA によって誘導される miRNA の解離、B: miRNA と完全相補的な RNA によって誘導される miRNA の解離、C: RISC によって標的 RNA が切断された後に誘導される miRNA の解離

まず、Seed 領域とのみ相補的な anti-miR 核酸 (ASO(Tiny LNA)) の miRNA 解離効果を、*in vitro* Unloading Assay によって評価した。その結果、ASO(Tiny LNA)は miRNA をほとんど解離しないことが明らかになった。この結果より、miRNA の解離を誘導する為には PAZ ドメインから miRNA の 3' 末端がリリースされる必要があることが示された。次に、miRNA と完全相補的で「RISC から切断を受けない ASO (ASO(OMe))」の場合と、「RISC から切断を受ける ASO の場合 (ASO(Wild))」の miRNA の解離速度を評価した。その結果、両者とも経時的に miRNA の解離が進行したが、ASO(Wild)の方がより miRNA 解離速度が速いことが明らかになった。RISC による ASO の切断の有無が miRNA 解離速度に与える影響をさらに詳しく解析するために、RISC から切断を受ける位置のみに 2'-OMe 型 RNA を配置した ASO(10-11 OMe)と、EDTA を添加することで RISC の切断活性を失わせた系 (ASO(Wild) with EDTA) の miRNA 解離速度を評価した。その結果、両者とも ASO(wild) より miRNA 解離速度が遅いことが示されたが、一方で ASO(OMe)よりも miRNA 解離速度が速いことも明らかになった。以上の結果から、より高い miRNA 解離効果を示す anti-miR 核酸を設計するためには、以下の3点が重要であることが明らかになった。1: miRNA の 3' 末端側を PAZ ドメインからリリースさせる(miRNA と完全相補的である)、2: RISC から切断を受ける、3: 基本骨格が天然型 RNA で構成されている。

Table 1 Sequences of oligonucleotides

| | Seed region | | | | | | | | | | Cleave site | Guide supplementary | | | | | | | | | | 3' region | T _m (°C) | | | |
|-------------------|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----------------|------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----------|------------------------|-----|--|--|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | | | 21 | | |
| microRNA (Luc-mi) | 5' | a | u | u | g | a | a | u | c | u | u | a | a | g | u | u | g | c | u | u | g | c | a | -3' | | |
| ASO (OMe) | 3' | u | a | a | c | u | u | a | g | a | a | u | a | u | c | a | g | a | a | c | g | u | -5' | 69 | | |
| ASO (Wild) | 3' | u | a | a | c | u | u | a | g | a | a | u | a | u | c | a | g | a | a | c | g | u | -5' | 62 | | |
| ASO (OMe 10-11) | 3' | u | a | a | c | u | u | a | g | a | a | u | a | u | c | a | g | a | a | c | g | u | -5' | 63 | | |
| ASO (Tiny LNA) | 3' | u | a | a | c | u | u | a | g | a | a | u | a | u | c | a | g | a | a | c | g | u | -5' | 61 | | |
| ASO (Ctrl) | 3' | u | u | a | u | g | a | g | a | g | u | c | a | a | u | g | u | a | a | u | a | -5' | - | | | |

seq: RNA, AUGC; 2'-OMe RNA, AUGC; LNA
T_m: [microRNA (Luc-mi)]+ASO=2.2 M in 10 mM phosphate buffer (pH 7.0), 100 mM NaCl

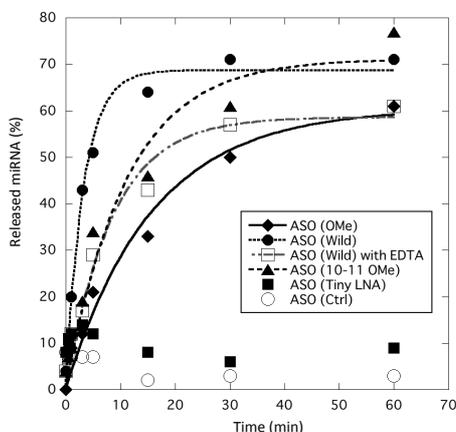


Fig.2 anti-miR 核酸(ASO)による RISC からの miRNA 解離速度 (RISC on beads = 10 fmol. [ASO]_s = 1 μM)

B) エクソソーム追跡型 miRNA 捕捉分子の開発

蛍光標識した ExomiR-Tracker を培養細胞上清に添加し共焦点レーザー顕微鏡により観察したところ、エクソソーム表面タンパク質のうち、CD63 を抗原とする抗体を用いた ExomiR-Tracker が細胞内に導入され、細胞質に局在することが確認された (速報作成中)。また、細胞内に取り込まれた標的 miRNA に対する機能阻害効果をルシフェラーゼレポーターアッセイにより評価したところ、細胞内に導入された ExomiR-Tracker は標的 miRNA の機能を配列特異的に阻害することが示された。以上の効果は培養細胞系だけでなく、*in vivo* でも確認された。以上の結果は、極微量で高度な機能を発揮し、生体制御系に大きな役割を果たしている exosomal-miRNA を標的とした機能性分子の開発に成功したことを示すものである。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Jumpei Ariyoshi, Daiki Momokawa, Nao Eimori, Akio Kobori, Akira Murakami, and Asako Yamayoshi*: Development of novel antisense oligonucleotides for the functional regulation of RNA-induced silencing complex (RISC) by promoting the release of microRNA from RISC, *Bioconjugate Chemistry*, 26 (12), 2454-2460 (2015). (selected as "ACS Editors' Choice")
2. Yuta Sugihara, Yuki Nakata, Asako Yamayoshi, Akira Murakami, and Akio Kobori*: Cross-linking antisense oligodeoxyribonucleotides with a photoresponsive α -chloroaldehyde moiety for RNA point mutations, *Journal of Organic Chemistry*, 81 (3), 981-986 (2016).
3. Jumpei Ariyoshi, Nao Eimori, Akio Kobori, Akira Murakami, Hiroshi Sugiyama, and Asako Yamayoshi*: Characterization of the releasing profile of microRNA from RISC using anti-miRNA oligonucleotides, *Chemistry Letters*, 46 (1), 143-5 (2017).
4. Asako Yamayoshi*, Daisuke Miyoshi*, Yu-ki Zouzumi, Yohei Matsuyama, Jumpei Ariyoshi, Naohiko Shimada, Akira Murakami, Takehiko Wada, and Atsushi Maruyama*: Selective and robust stabilization of triplex DNA structures using cationic comb-type copolymers, *Journal of Physical Chemistry*, 121 (16), 4015-4022 (2017).
5. Yuta Sugihara, Yuki Nakata, Asako Yamayoshi, Akira Murakami, and Akio Kobori: Inhibition effect of photoresponsive α -haloaldehyde-conjugated

- oligonucleotides on the gene expression in HeLa cells stably expressing GFP, *Chemistry Letters*, 46 (8), 1265-1268 (2017)
6. Jumpei Ariyoshi, Yohei Matsuyama, Akio Kobori, Akira Murakami, Hiroshi Sugiyama, and Asako Yamayoshi*: Effective anti-miRNA oligo- nucleotides show high releasing rate of microRNA from RNA-induced silencing complex (RISC), *Nucleic Acid Therapeutics*, 27(5), 303-308 (2017).
 7. Hiroka Sugai, Ikuhiko Nakase, Seiji Sakamoto, Akihiro Nishio, Masahito Inagaki, Masaki Nishijima, Asako Yamayoshi, Yasuyuki Araki, Satoru Ishibashi, Takanori Yokota, Yoshihisa Inoue, and Takehiko Wada: Peptide Ribonucleic Acid (PRNA)-Arginine Hybrids. Effects of Arginine Residues Alternatingly Introduced to PRNA Backbone on Aggregation, Cellular Uptake, and Cytotoxicity, *Chemistry Letters*, 47 (3), 381-384 (2018).

[学会発表] (計 24 件)

1. 山吉 麻子, 有吉 純平, 小堀 哲生, 村上 章 「RISC の microRNA 保持機構を標的とした機能性核酸の開発」第 15 回遺伝子・デリバリーシンポジウム、京都薬科大学、2015 年 5 月 1 日
2. 山吉麻子, 小西諒, 松山洋平、有吉純平、小堀哲生、村上章 「RISC の microRNA 保持機構を標的とした機能性核酸の開発」生化学会第 61 会近畿支部例会、立命館大学、2015 年 5 月 16 日
3. 有吉 純平、榮森 奈緒、小西 諒、小堀 哲生、村上 章、山吉 麻子 「核酸ドラッグの RISC に対する結合親和性評価法の開発」第 25 回 バイオ・高分子シンポジウム、東京工業大学大岡山キャンパス、2015 年 7 月 23 日
4. Ariyoshi Jumpei, Eimori Nao, Konishi Ryo, Akio Kobori, Akira Murakami, Asako Yamayoshi, "Development of novel RISC inhibitors for promoting release of microRNA from RISC (II) The effects of chemical modifications of oligonucleotides on releasing of microRNA from RISC", The 42nd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2015 (ISNAC2015), Eagle Himeji, Japan, September 23, 2015.
5. Ariyoshi Jumpei, Konishi Ryo, Eimori Nao, Akio Kobori, Akira Murakami, Asako Yamayoshi, "Development of novel functional oligonucleotides for regulation of RISC functions (II) The structural insight of ASO on release of miRNA from RISC", 第一回日本核酸医薬学会, Kyoto Terusa, Japan, November 31, 2015.
6. Kishimoto Yusuke, Rie Tamura, Chie Muramatsu, Akio Kobori, Eishi Ashihara, Akira Murakami, Asako Yamayoshi, "Development of a novel RNAi therapeutic method for malignant tumor using cationized antibody", 第一回日本核酸医薬学会, Kyoto Terusa, Japan, November 31, 2015.
7. Nao Eimori, Ariyoshi Jumpei, Akio Kobori, Akira Murakami, Asako Yamayoshi, "Development of novel functional oligonucleotides for regulation of RISC function (III) Design of peptide-oligonucleotide conjugates for the release of microRNA from RISC", 第一回日本核酸医薬学会, Kyoto Terusa, Japan, November 31, 2015.
8. Kodai Yoshimoto, Kyosuke Kishimoto, Akio Kobori, Akira Murakami, Asako Yamayoshi, "Development of transcriptional inhibitor with a specific binding affinity to HEXIM1", 第一回日本核酸医薬学会, Kyoto Terusa, Japan, November 31, 2015.
9. 有吉 純平、榮森 奈緒、小堀 哲生、村上 章、山吉 麻子 「病原性リボヌクレオプロテインの活性制御を目指した機能性核酸分子の開発」第 5 回 4 大学連携研究フォーラム、京都工芸繊維大学 60 周年記念館記念ホール、2015 年 11 月 25 日
10. Ariyoshi Jumpei, Eimori Nao, Konishi Ryo, Akio Kobori, Akira Murakami, Asako Yamayoshi, "Novel inhibitors targeting microRNA: Peptide-oligonucleotide conjugates for promotional releasing of microRNA from RISC" THE INTERNATIONAL CHEMICAL CONGRESS OF ACIFIC BASIN SOCIETIES 2015, Hawaii Convention Center, U.S.A., December 16, 2015.
11. Asako Yamayoshi, Kodai Yoshimoto, Akio Kobori, Akira Murakami,

- "Development of novel anti-HIV drugs that mimic functions of non-coding RNA" THE INTERNATIONAL CHEMICAL CONGRESS OF ACIFIC BASIN SOCIETIES 2015, Hawaii Convention Center, U.S.A., December 16, 2015.
12. 有吉 純平、榮森 奈緒、小西 諒、小堀 哲生、村上 章、山吉 麻子「RISC 機能の制御を目指した遺伝子発現制御素子の開発 (IV)アンチセンス核酸の化学構造が RISC からの microRNA 解離効果に与える影響」日本化学会第 96 春季年会、同志社大学京田辺キャンパス、2016 年 3 月 26 日
 13. Konishi Ryo, Ariyoshi Jumpei, Matsuyama Yohei, Nakamura Hiromi, Akio Kobori, Akira Murakami, Asako Yamayoshi, "Development of a novel system for evaluation of binding affinities between RISC and antisense oligonucleotides" The 96st Annual Meeting of Chemical Society of Japan, Doshisha University, Japan, March 26, 2016.
 14. Kishimoto Yusuke, Rie Tamura, Chie Muramatsu, Akio Kobori, Eishi Ashihara, Akira Murakami, Asako Yamayoshi, "Development of a novel drug delivery system for targeting microRNA" The 96st Annual Meeting of Chemical Society of Japan, Doshisha University, Japan, March 26, 2016.
 15. Asako Yamayoshi*, (Invited Lecture) The 2nd International Symposium of Chemistry and Biology of RNA Interference, "Development of novel inhibitors for the functional regulation of microRNA"
 16. A. Yamayoshi*, Y. Kishimoto, R. Tamura, C. Muramatsu, A. Kobori, E. Ashihara, A. Murakami, Novel drug delivery system for targeting circulating microRNA, The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, p336-337, 2016.
 17. A. Yamayoshi*, Y. Kishimoto, R. Tamura, C. Muramatsu, A. Kobori, E. Ashihara, A. Murakami, Development of novel drug delivery system for targeting circulating microRNA, XXII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (XXII IRT), p551-552, 2016.
 18. J. Ariyoshi, N. Eimori, A. Kobori, A. Murakami, A. Yamayoshi*, Novel functional oligonucleotides for the regulation of RISC by promotional release of microRNA from RISC, XXII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (XXII IRT), p433-434, 2016.
 19. Asako Yamayoshi* (Invited Lecture) : Development of novel antibody-oligonucleotide conjugates for targeting exosomal microRNA, 1st Minisymposium on Material Biology, Kanagawa, Japan, October 17, 2017
 20. 山吉麻子*、有吉純平、小西諒、小堀哲生、芦原英司、村上章、杉山弘、「血中 microRNA を標的とした遺伝子制御分子の開発」、日本化学会 第 97 春季年会 (2017)
 21. Asako Yamayoshi, Tsuyoshi Yamada, Yasuyuki, Akira Murakami, Takehiko Wada, Kazuhiko Nakatani, and Hiroshi Sugiyama: Cross-linking behavior of psoralen-conjugated oligonucleotides toward epigenetic DNA modification, The 44nd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Tokyo, Japan, November 15, 2017.
 22. Asako Yamayoshi, Ryo Konishi, Akio Kobori, Eishi Ashihara, and Akira Murakami: Development of novel drug delivery system for targeting circulating microRNA, The 44nd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Tokyo, Japan, November 15, 2017.
 23. Asako Yamayoshi, Ryo Konishi, Akio Kobori, Eishi Ashihara, and Akira Murakami, and Hiroshi Sugiyama: Development of novel drug delivery system for targeting circulating microRNA, : Development of novel drug delivery system for targeting circulating microRNA, The 44nd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Tokyo, Japan, November 15, 2017.
 24. 山吉麻子 (招待講演) : 遺伝子発現のエピジェネティック制御機構の支配を目指した機能性核酸の創製、第 98 回日本化学会春季年会・特別企画 女性科学者が拓く生命化学、千葉県、2018 年 3 月 20 日

〔図書〕（計 3 件）

1. 有吉純平、山吉麻子*: 核酸医薬品における開発の現状と安全性評価、miRNA を標的とした核酸医薬品の開発と安全性評価、先端治療技術の実用化と開発戦略、pp 49-53, 情報科学協会、(2017)
2. 山吉麻子*: siRNA、miRNA-mimic、anti-miR 核酸の設計指針、中分子医薬開発に資するペプチド・核酸・糖鎖の合成・高機能化技術、pp. 189-198、シーエムシー出版、(2018)
3. Yamayoshi A., Kobori A., Murakami A., *Photo-dynamic antisense regulation by photo-cross-linkable antisense oligonucleotides*, Asanuma. A. (eds) *Phoregulation of DNA/RNA functions*, Pan Stanford Publishing Pte. Ltd., in press.

〔産業財産権〕

○出願状況（計 3 件）

名称：エクソソームの miRNA の機能を抑制することができる複合体、がんの増殖及び／又は転移抑制剤

発明者：山吉麻子、村上章、芦原英司、小堀哲生

権利者：京都大学、京都薬科大学

種類：物質特許

番号：PCT/JP2017/005994

出願年月日：2017 年 2 月 17 日

国内外の別： 国外

名称：ターゲットの分析方法およびターゲット分析チップ

発明者：村上章、小堀哲生、山吉麻子、野田雄一郎

権利者：京都工芸繊維大学、株式会社アークレイ

種類：物質特許

番号：PCT/JP2017/001280

出願年月日：2017 年 2 月 15 日

国内外の別： 国外

名称：ターゲット分析チップおよびターゲット分析方法

発明者：村上章、小堀哲生、山吉麻子、野田雄一郎、近藤正幸

権利者：京都工芸繊維大学、株式会社アークレイ

種類：物質特許

番号：PCT/JP2016/051925

出願年月日：2016 年 1 月 26 日

国内外の別： 国外

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等：

http://www.hakubi.kyoto-u.ac.jp/jpn/02_

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山吉 麻子 (YAMAYOSHI, Asako)

京都大学・白眉センター・特定准教授

研究者番号：70380532

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

杉山 弘 (SUGIYAMA, Hiroshi)

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：50183843

(4) 研究協力者

該当者なし