

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08410

研究課題名(和文) microRNA補充療法のための革新的短鎖核酸医薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel form of mimic microRNA for microRNA replacement therapy.

研究代表者

大野 慎一郎 (OHNO, Shinichiro)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：90513680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：応募者等が開発した新規核酸医薬Guide hairpin RNA-34a (ghRNA-34a)は、一般的なMimic miRNAと比較して全長が2/3程度まで短縮されており、核酸に対する副作用である自然免疫応答が抑制されていた。また、肺がんモデルマウスを用いた実験から、生体内において腫瘍抑制効果が確認された。さらに、ghRNAは核酸短縮化技術として、汎用性があり、他のmiRNAにも適用出来た。従ってghRNAは、安全性の高いRNA干渉型核酸医薬として有用である。以上の成果は、原著論文としてMolecular Therapy誌に投稿し、掲載された。

研究成果の概要(英文)：The innate cytokine response to nucleic acid is the most challenging problem confronting the practical use of nucleic acid medicine. The degree of stimulation of the innate cytokine response strongly depends on the length of the nucleic acid. In this study, we developed a 30-nucleotide single strand RNA, termed "guide hairpin RNA (ghRNA, ghR)", that has a physiological function similar to that of miRNA and siRNA. The ghR caused no innate cytokine response either in vitro or in vivo. In addition, its structure does not contain a passenger strand seed sequence, reducing the unwanted gene repression relative to existing short RNA reagents. Systemic and local injection of ghR-form miR-34a (ghR-34a) suppressed tumor growth in a mouse model of RAS-induced lung cancer. This novel RNA interference (RNAi) technology may provide a novel, safe, and effective nucleic acid drug platform that will increase the clinical usefulness of nucleic acid therapy.

研究分野：分子病理学

キーワード：核酸医薬 microRNA miR-34a 肺がん

1. 研究開始当初の背景

世界のがん死の原因で最も多いのは肺がんであり、国内のがん統計においても肺がんの罹患数は第3位で死亡数は第1位である。これは肺がんの5年生存率が15%と低いためであり、現在の肺がん治療の限界および革新的な治療法開発の必要性を示している。がんはいくつかの遺伝子変異および分化過程を経て、抗アポトーシス、無限増殖、転移浸潤、薬剤耐性等の様々な能力を獲得した不均一(heterogeneity)な細胞集合体であることから、単一の遺伝子を標的にした医薬の効果は限定的であることが予想できる。microRNA(miRNA)補充療法は、がん化の過程で発現が低下したがん抑制性のmiRNAを外から補充することで、そのmiRNAが標的とする複数のがん遺伝子の発現を抑制するというストラテジーに基づいた革新的な治療法であり、その効果が期待されている。一方で核酸医薬の実用化は、核酸に対する免疫反応が障害となっている。

2. 研究の目的

本来、TLRsおよびRLRsなどのRNA受容体は、レトロウイルスなどの感染の際にRNAゲノムをPathogen-associated molecular patterns (PAMPs)としてパターン認識し、自然免疫系を惹起する役割を担っている。核酸医薬の投与は、単球、樹状細胞、マクロファージ、B細胞などに発現するTLRs, RLRsを活性化し、IL-6, TNF, IFNsなどの炎症性サイトカインの発現を誘導することで、重篤な炎症を副作用として起こす。一方で、miRNAに類似するsiRNAを核酸医薬に応用を試みた研究から、核酸投与による炎症反応は核酸の長さに強く依存していることが知られている。このことから応募者等は、miRNAを短縮化することで、炎症を惹起しない核酸医薬を実現できるか検討を行った。

miR-34aは最も強力な腫瘍抑制活性を有するmiRNAの一つであり、肺がんを含む多くのがんでその発現と予後の関連が示されている。また、このmiR-34aを肺がん細胞株(H1299)にトランスフェクションすると、有意に増殖が抑制されることから、本研究ではmiR-34aをベースにした短縮化の検討を行った。

miRNAは機能的なガイド鎖とパッセンジャー鎖の二本鎖構造である。ガイド鎖が標的mRNAに結合して抑制を行うためパッセンジャー鎖は不要と考えられるが、ガイド鎖の一本では活性をもたないため二本鎖構造が必須である。従って、ガイド鎖を折り曲げたヘアピン型の二本鎖構造を基本形とし、パッセンジャー鎖に相当する配列を削減した。

結果、驚くべきことに通常の二本鎖構造では44ヌクレオチド(nt)のmiR-34aを最短で30ntまで短縮化することができた(図2)。応募者等はこの30ntのmiR-34aを超短鎖型(Guide Hairpin (gh))RNAと名付けて、更

なる解析を行った。導入濃度、持続時間、タンパク質の発現抑制など詳細に検討した結果、miR-34aとghR-34aでは、主要標的遺伝子(AXL, MET, CDK6)に対する発現抑制活性および肺がん細胞に対する抑制活性に全く差が無かった。これらのことから、標的抑制活性および標的多様性を保持した状態でmiR-34aを短縮化することに成功した。

一方で、短縮化によりどのような利点が生じたかは不明である。miR-34aと全長が約2/3に短縮されたghR-34aとでは、モル濃度を揃えた際の効果が同じであるため、細胞の培養液に添加する、もしくは生体に投与する核酸の重量も約2/3になる。従って、炎症の誘導に限らず核酸に対する副作用は減少することが予想できる。また、一般的に核酸は短いほど細胞への導入効率が高いことから、小さくなった事により、細胞膜透過性および組織浸透性が向上している可能性も考えられる。以上のことから本研究は、短縮型miRNAの自然免疫応答および、その他核酸医薬としての利点を解析することで、miRNA補充療法の実用化を促進する基盤技術として確立させることを目指す。

3. 研究の方法

本研究計画では、短縮型miRNA(ghRNA)に関して以下の項目を検証し明らかにする。

- (1) 炎症性サイトカインの誘導が軽減される可能性について
- (2) 肺がんモデルマウスを用いた生体における腫瘍抑制活性
- (3) パッセンジャー鎖による不要な遺伝子抑制の無効化
- (4) 細胞膜透過性および組織浸透性が向上する可能性について
- (5) miR-34a以外の他のmiRNA配列への応用

炎症性サイトカインの分泌抑制の検証

核酸に対する自然免疫応答は、投与する核酸の長さに強く依存することが知られている。応募者等が開発したghR-34aは、全長が2/3程度まで短縮されていることから、自然免疫応答を誘導しにくい核酸になっていると考えられる。

-1) ヒト単球を用いたin vitro assay

核酸に対する免疫反応は、単球、マクロファージ、樹状細胞によって産生されるIL-6やTNF等の炎症性サイトカインに起因する。ヒト末梢血より単球を分離し、短縮型miR-34aを導入後、炎症性サイトカインの産生をreal-time PCR法およびELISA法を用いて計測する。

-2) マウスを用いたin vivo assay

生体における核酸に対する免疫応答の計測には、野生型(C57BL/6)マウスを用いる。キャリアーには毒性の低いキトサンを用いて、短縮型miR-34aを尾静脈より全身投与する。炎症性サイトカインの産生はELISA法を用いて計測する。

生体内における肺がん抑制の検証

miR-34a は最も強力な腫瘍抑制性 miRNA の一つであり、肺がんに対する抑制活性が複数報告されている。肺がん細胞株を用いた in vitro assay では、通常の miR-34a と同等の増殖抑制活性が ghR-34a に認められているが、生体内における腫瘍抑制能は不明である。従って、肺がんモデルマウスを用いて ghR-34 の腫瘍抑制効果を測定する。肺がんモデルには、100%の確率で肺がんを発症する活性化型変異 KRAS ノックインマウス (KRASG12D マウス) を用いる。また、核酸のキャリアーにはキトサンを用いる。

また、核酸投与の副作用として組織障害を誘発する可能性が考えられる。us-miR-34a の複数回投与による組織障害等の影響は、各種の主要臓器の病理学的観察により検証する。この実験では野生型のマウスを用いる

パッセンジャー鎖の無効化の検証

通常は合成 miRNA は、本体であるガイド鎖と半相補的なパッセンジャー鎖の二本鎖である。ガイド鎖による標的遺伝子の発現抑制を目的に使用されるが、実はパッセンジャー鎖も相補的な配列を有する遺伝子の発現抑制に働く。多くの場合、このパッセンジャー鎖は望まない遺伝子抑制に働くため、副作用の原因になると考えられる。応募者等の考案した短縮法は、その過程でパッセンジャー鎖のシード配列が失われるため、パッセンジャー鎖による遺伝子抑制は無効化されていると考えられる。

短縮型によるパッセンジャー鎖の遺伝子抑制の無効化は、GeneChip 発現解析を用いて網羅的に行う。二本鎖 miR-34a の導入でノックダウンのかかる mRNA 群の中から miR-34a のパッセンジャー鎖 (miR-34a*) の標的遺伝子を miRNA 標的予測アルゴリズム (TargetScanS, miRanda 等) を用いて抽出し、それらが ghR-34a の導入ではどのように変動するか解析する。

細胞膜透過性の計測

核酸は短いほど細胞への導入効率が高くなるのが一般的である。蛍光標識した ghR-34a を肺がん細胞株へ導入した際の取り込み効率を In cell analyzer もしくは Flow cytometer を用いて解析する。蛍光色素には、分子量が小さく分子間相互作用の少ない Fluorescein isothiocyanate (FITC) を用いる。

組織浸透性の計測

低分子医薬と比較して分子量の大きい核酸医薬では、病変組織内部への浸透力が重要な課題の一つと考えられる。本研究における短縮化では、核酸1分子あたりの分子量が約14000から9500まで減少しているため、組織内部への浸透力が高くなることが予想される。キトサンをキャリアーとして FITC 標識 ghR-34a を肺がんモデルマウスへ投与し、肺がん組織への核酸の浸透を蛍光顕微

鏡もしくは In cell analyzer を用いて解析する。

他の miRNA 配列への応用の検証

本研究では、腫瘍抑制 miRNA として知られる miR-34a を元に短縮化の可能性を検討し、ghR-34a を開発した。一方で、2,500種類を超えるヒトの miRNA の中には、様々な疾患に対して有効な miRNA が存在する。miRNA 補充療法に適した他の miRNA に短縮化技術が応用可能か検討し、技術の汎用性を明らかにする。

候補となる miRNA は、miR-34a と並んで強力な腫瘍抑制活性を有する let-7 family、コラーゲンなどを標的とし線維症の治療に応用が期待できる miR-29 family などが考えられる。各々の miRNA に関して評価系を構築し、短縮化の検討を行う。最終的には短縮化の法則性を同定し、最短の形状を予測するアルゴリズムの構築を目指す。

4. 研究成果

核酸に対する自然免疫応答は、投与する核酸の長さに強く依存することが知られている。応募者等が開発した Guide hairpin RNA-34a (ghR-34a) (初年度までは us-miR-34a と呼称していたものは、内在性の二本鎖 miR-34a と比較して全長が 2/3 程度まで短縮されていることから、自然免疫応答を誘導しにくい核酸になっている。生体内における核酸に対する免疫応答の計測には、野生型 (C57BL/6) マウスを用いた。2015年度は、尾静脈からの全身投与し、血液中の炎症性サイトカインの産生を ELISA 法にて計測した。2016年度は、眼球への硝子体注射による局所投与にて、生体内でも炎症性サイトカインの誘導抑制が見られることを確認した。2017年度は、ghRNA に種々の化学修飾を付加し、RNA 分解酵素耐性および RNA 干渉活性の増強の検討を行った。miR-34a は最も強力な腫瘍抑制性 miRNA の一つであり、肺がんに対する抑制活性が複数報告されている。従って、肺がんモデルマウスを用いて ghR-34a の腫瘍抑制効果を測定した。生体内における有意な腫瘍抑制効果がみられ、実験の再現性の確認がとれた。ghRNA が核酸短縮化技術として、汎用性があることを調べるために、他の miRNA に適用出来るか検証した。let-7a, miR-29b の配列から ghRNA (gh-let-7a, ghR-29b) を作成し、各々の標的遺伝子である HMGA2, TGFB3 の抑制効率で評価した。その結果、gh-let-7a, ghR-29b 共に通常の本鎖の形態と同等の抑制活性が認められた。以上の成果は、原著論文として Molecular Therapy 誌に投稿し、掲載された。また、第19回米国遺伝子治療学会年会 (ASGCT 2016 Annual Meeting, Washington, DC, USA) にて発表を行った。

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 2件)

1. Development of Novel Small Hairpin RNAs That do not Require Processing by Dicer or AGO2. Ohno SI, Itano K, Harada Y, Asada K, Oikawa K, Kashiwazako M, Okuyama H, Kumagai K, Takanashi M, Sudo K, Ikeda N, Kuroda M. *Mol Ther.* 2016 Jul;24(7):1278-1289. doi: 10.1038/mt.2016.81. Epub 2016 Dec 2. (査読有り) IF. 6.227
2. Focus on Extracellular Vesicles: Development of Extracellular Vesicle-Based Therapeutic Systems. Ohno S, Drummen G, Kuroda M. *Int. J. Mol. Sci.* 2016, 17(2), 172; doi:10.3390/ijms17020172 (査読有り) IF. 2.86

〔学会発表〕(計 12件)

1. 第76回日本癌学会学術総会 2017年9月28～9月30日 「Mir-34aによるがん抑制遺伝子BLUの発現制御機構 Up-regulation of BLU tumor suppressor by miR-34a」大野慎一郎、三部芳裕、弓野梨紗、老川桂生、原田裕一郎、黒田雅彦
2. 第9回日本 RNAi 研究会 広島プリンスホテル 2017年8月30～9月1日 「Up-regulation of BLU tumor suppressor by miR-34a.」 三部芳裕、大野慎一郎、黒田雅彦
3. 第6回 医薬工シンポジウム 東京薬科大学 平成29年度6月17日 「RNA干渉に働く短鎖ヘアピンRNAの探索と機能解析 Search and characterization of novel hairpin RNAs acting on RNA interference」 大野慎一郎、原田裕一郎、村上善基、黒田雅彦
4. 第106回日本病理学会総会 新宿京王プラザホテル 平成29年4月27日～平成29年4月29日 「RNA干渉に働く短鎖ヘアピンRNAの探索と機能解析」 Search and characterization of novel hairpin RNAs acting on RNA interference 大野慎一郎、原田裕一郎、村上善基、黒田雅彦
5. 第2回日本核酸医薬学会 東京理科大学 葛飾キャンパス図書館大ホール 2016年11月15～11月17日 「副作用の少ない短鎖核酸医薬の開発」 大野慎一郎、原田裕一郎、老川桂生、黒田雅彦
6. 第8回日本 RNAi 研究会 広島プリンスホテル 2016年8月31～9月2日 「新規ヘアピン型RNA干渉核酸の探索と機能解析」 Searching and functional analysis of novel

hairpin-forming small RNA 大野慎一郎、原田裕一郎、村上善基、黒田雅彦

7. 第105回日本病理学会総会 仙台国際センター 平成28年5月12日～平成28年5月14日 「肺がんにおけるArgonauteファミリーの機能解析」 Functional analysis of Argonaute family in lung cancer 大野慎一郎、浅田浩太郎、老川桂生、原田裕一郎、黒田雅彦
8. ASGCT 19th Annual Meeting 2016, Marriott Wardman Park, Washington, DC, USA. May 4-7 2016, Development of novel Dicer- and Ago2-independent small hairpin RNAs. Shin-ichiro OHNO, Karen ITANO, Yuichirou HARADA, Koutaro ASADA, Keiki OIKAWA, Mikie KASHIWAZAKO, Hikaru OKUYAMA, Katsuyoshi KUMAGAI, Masakatsu TAKANASHI, Katsuko SUDO, Norihiko IKEDA, Masahiko KURODA.
9. 第7回日本 RNAi 研究会 広島プリンスホテル 2015年8月26～28日 「副作用を軽減した短鎖型核酸医薬の開発」 大野慎一郎、板野華連、浅田浩太郎、老川桂生、柏迫幹絵、高梨正勝、黒田雅彦
10. 第12回日本病理学会カンファレンス 2015 六甲山ホテル 平成27年7月24日～平成27年7月25日 「副作用を軽減した短鎖型核酸医薬の開発」 大野慎一郎、板野華連、浅田浩太郎、老川桂生、柏迫幹絵、高梨正勝、黒田雅彦
11. 第104回日本病理学会総会 名古屋国際会議場 平成27年4月30日～平成27年5月2日 「肺がん治療を想定した副作用の少ない短鎖型新規核酸医薬の開発」 大野慎一郎、板野華連、原田裕一郎、浅田浩太郎、老川桂生、柏迫幹絵、高梨正勝、須藤カツ子、池田徳彦、黒田雅彦
12. AACR Annual Meeting 2015, Philadelphia, Pennsylvania, USA. April 18-24 2015, Development of novel form of mimic microRNA for lung cancer therapy. Shin-ichiro OHNO, Karen ITANO, Yuichirou HARADA, Koutaro ASADA, Keiki OIKAWA, Mikie KASHIWAZAKO, Masakatsu TAKANASHI, Katsuko SUDO, Norihiko IKEDA, Masahiko KURODA.

〔図書〕(計 1件)

1. Ohno S, Kuroda M. Exosome-mediated targeted delivery of miRNAs. Federico, Maurizio (Ed.) *Lentiviral Vectors and Exosomes as Gene and Protein Delivery Tools*. *Meth Mol Biol.* vol.1448 doi:10.1007/978-1-4939-3753-0 (査読

有り) IF 1.29

()

〔産業財産権〕

研究者番号：

出願状況(計 0件)

(4)研究協力者

()

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 2件)

名称：「遺伝子発現制御のための発現抑制核
酸分子およびその用途」
発明者：黒田雅彦、大野慎一郎
権利者：学校法人東京医科大学
種類：特許
番号：W02016009809 A1
取得年月日：2016
国内外の別：国内、国外

名称：「遺伝子発現制御のための人工ミミック
miRNAおよびその用途」
発明者：黒田雅彦、大野慎一郎
権利者：学校法人東京医科大学
種類：特許
番号：W02015099122 A1
取得年月日：2015
国内外の別：国内、国外

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.tokyo-med.ac.jp/molpathol/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大野 慎一郎 (OHNO, Shinichiro)
東京医科大学・医学部・講師
研究者番号：90513680

(2)研究分担者

黒田 雅彦 (KURODA, Masahiko)
東京医科大学・医学部・主任教授
研究者番号：80251304

原田 裕一郎 (HARADA, Yuichirou)
東京医科大学・医学部・助手
研究者番号：80570168

熊谷 勝義 (KUMAGAI, Katsuyoshi)
東京医科大学・医学部・助教
研究者番号：20567911

(3)連携研究者