

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K15671

研究課題名(和文) 遺伝子発現制御にかかわる新規RNAの作用機序の解明

研究課題名(英文) Analysis for functions of novel small RNAs in the gene expression

研究代表者

原田 裕一郎 (Harada, Yuichirou)

東京医科大学・医学部・助手

研究者番号：80570168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：私はがん特異的に発現する分子(タンパク質など)に着目し、がん細胞のみを排除する治療薬(分子標的薬)として、がん特異的タンパク質に対するsmall-RNAを協同して開発してきた。その結果、これまで構造とは異なる新規のsmall-RNAを見出してきた。今回、この新規small-RNAによる遺伝子発現制御(RNA干渉)のメカニズムの解析をおこなった。この新規small-RNAによる遺伝子発現制御のDicer1への依存性は新規small-RNAの種類により大きく異なることが示唆された一方、Ago2では新規small-RNAの種類によらず大きく依存していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の新規RNAの研究により、一点目として遺伝子発現制御に関わる新たなRNAが存在する可能性が示された。この研究により、これまで機能不明でマイクロRNAとは異なる構造を持つRNAが遺伝子発現に関わっていることが示唆され、この新規RNAが遺伝子発現を抑制することから未解明の遺伝子発現機構が存在することが示された。二点目としては今回、新規RNAが遺伝子発現を抑えることを見出した。今後この新規RNAによる遺伝子制御を明らかにすることで、この新規RNAを分子標的薬としてさらに効果が高く副作用の少ない精緻な薬剤とすることが期待される。

研究成果の概要(英文)：I focused on molecules (proteins) that are specifically expressed in cancer. And I have collaborated to develop small-RNA for cancer-specific proteins as a cancer therapeutic drug (molecular target drug) that eliminates only cancer cells. As a result, a novel small-RNA different from the conventional structure was found, and I have analyzed the mechanism of gene expression regulation (RNA interference) by novel small-RNA. While it is suggested that the dependence of Dicer1 on gene expression regulation by this novel small-RNA differs greatly depending on the small-RNA, it seems to be highly dependent on Ago2 regardless of the type of this novel small-RNA.

研究分野：分子生物学

キーワード：RNA干渉 small RNA

1. 研究開始当初の背景

人類にとってがんの克服は大きな夢である。これまでのがん治療は大きく3つに分類される。第一に外科的手術による腫瘍の除去、第二に放射線によるがん細胞を破壊、第三に薬剤によりがん細胞を死滅させる化学療法である。これまで化学療法に用いられる薬剤(抗がん剤)の多くは、がん細胞特有の非常に早い細胞分裂に着目したものであった。がん細胞の細胞周期は非常に早い、正常細胞では比較的ゆっくりとした周期の細胞が多いため、その細胞周期を停止させることによりがん細胞では多くの細胞死などが引き起こされることでがん細胞を死滅させる。しかし、この細胞周期を停止させる抗がん剤はがん細胞特異的な作用ではないために、正常な細胞にも影響を及ぼし副作用が強く現れる場合がある。近年、分子標的薬と呼ばれるがん細胞特異的な分子(タンパク質)あるいは、がんの増殖の鍵となる分子(ドライバー遺伝子)をターゲットにした医薬品が注目されている。がん細胞の膜表面に比較的によく発現する分子に対する抗体医薬(リツキサンなど)や、がん細胞で活性化している細胞増殖カスケードのシグナル分子に対する低分子化合物(イマニチブ)が代表的なものである。そして、現在さらに分子標的薬として注目を集めているのがRNAである。この分子標的薬としてのRNAは元来、細胞が持つRNA干渉(RNAi)を利用した医薬品である。このRNAi機構によって、標的分子mRNAと相補的配列を持つRNAが、標的mRNAを細胞内のシステムを用いて分解する。このRNAiを用いた治療薬の最大の利点は、医薬品としてのRNA、さらに標的分子の分解システムが元来、細胞の持つ生理的機構であるため副作用が極めて小さいことが予想される点である。

2. 研究の目的

RNAi機構の中でも、特に内在性の遺伝子発現抑制性RNA(マイクロRNA;miRNA)への注目が高まっている。miRNAはnon-coding RNAの一つで、生体内のRNAi機構によって遺伝子発現を抑制しており、特定のがんで発現の高い遺伝子発現を特異的に抑制することができる。外来性に合成されたmiRNAをがん細胞へ導入することでその増殖を抑えることが報告されている。しかし、外来性に導入されるRNAの大きさ(塩基数)に応じた細胞の炎症反応誘起が起こることが知られている。そこで、その炎症反応を抑えながら遺伝子発現抑制効果は維持したRNA開発を試みた。その結果、本来は二本鎖で44塩基(センス鎖22+アンチセンス鎖22)のmiRNA-34a(miR-34a)を末端にループ構造を持たせることで30塩基の一本鎖にまで減少させることができ、これをghRNA(ghR-34a)とした。このghR-34aは内在性のmiR-34aと比較して同等の遺伝子発現抑制や細胞増殖抑制を持ちながら、炎症反応の誘起は減少することが示された。そして、これまでの網羅的な細胞内RNAの解析より今回開発した短縮化した新規構造RNAと同様な立体構造を持つRNAの存在が示唆されている。従って今後はこの新たなghRNAの探索とその標的mRNAの解析も同時におこなう予定である。また同時に、このghRNAは構造および塩基数がオリジナルのmiRNAとは大きく異なることから、その作用機序が通常のRNAiと異なる可能性が考えられる。そこで、このghRNAによる遺伝子発現抑制のメカニズムを解明する必要がある。これらの本研究によりさらに細胞の炎症反応を抑えたghRNAを開発するための有用な知見となることが期待される。

3. 研究の方法

miRNA による RNA 干渉 (RNAi) には大きく二つの RNase 活性を持つ酵素が必要である。一つは細胞質に運ばれた miRNA 前駆体を部分的に切断することにより miRNA を生成する Dicer、もう一つはプロセシングされた miRNA を取り込み標的の mRNA と結合して mRNA を分解する Argonaute(Ago)ファミリータンパク質である。Ohno et al., (2016)では、Dicer1 および Ago2 それぞれの単一欠損細胞株において生体内の miRNA と異なり、ghR-34a の遺伝子発現抑制は失活しなかった。従って ghR-34a の作用活性には Dicer1、Ago2 の他の RNase 活性を持つタンパク質の関与が考えられる。そこで、本研究ではこの ghRNA の作用機序を解明するために Dicer1、Ago2 以外にも RNAi に必要な分子 (Ago1, 3, 4 など) を CRISPR/Cas9 システムにより欠損した細胞株を作製する。これら RNAi に働く Dicer1、Ago1~4 を単独もしくは複数個の組み合わせで欠損したがん細胞株を作製する。これらの細胞に ghRNA を導入して標的 mRNA 量、タンパク質量の検討し標的遺伝子の抑制を検証する。さらに Dicer、Ago 以外の ghRNA と相互作用するタンパク質を見出すため、ghR-34a のゲルシフトアッセイで結合タンパク質を確認し、ghR-34a をリガンドするタンパク質精製と質量分析により結合分子を明らかにする。これらの検証により ghRNA に作用する分子の全体像を明らかにし作用機序について解明を進める。

また、今回開発した新規構造の ghRNA に相当する RNA が細胞内に存在しているのかについて検証していく。これまでに、他の実験系での得られた網羅的 RNA のシーケンス解析から 30 塩基前後の解析結果を抽出し、一部を検証したところ ghRNA とよく似た構造を取りうる RNA 配列が複数見出されている。今後は、これまでに得られたシーケンス結果をさらに全体的に解析し他に同様な形状を取る RNA を探索していく。さらに、先に計画した Dicer または Ago ファミリー欠損細胞の網羅的 RNA シーケンス解析をおこない、こちらでも同様に ghRNA を探索する。その結果から Dicer / Ago 正常細胞と欠損細胞での ghRNA の発現プロファイルの違いを検証する。これによって、ghRNA と Dicer および Ago の ghRNA の生成への関与について検討する。

4. 研究成果

本研究では短縮型 miRNA (ghRNA) による遺伝子発現の抑制機序を解明することを目的としている。短縮型 miRNA(ghRNA)の機能や作用機序を解析するため、まずは細胞内での内在性 ghRNA の探索をおこなった。その結果、がん細胞内で転写された RNA の網羅的解析から small-RNA に相当すると思われる長さの RNA を選別し、さらにその配列情報を基に二次元構造予測から本研究の対象とする ghRNA になりうる RNA 配列を細胞内に複数見出した。さらに、今回見出した ghRNA が標的とする遺伝子も勘案し検討した結果、内在性 ghRNA として U1 snRNA の一部と考えられる RNA (仮称; U1-p01) およびその標的として PSAP を選定し、以後解析することとした。

そこで、人工合成した U1-p01 をがんの培養細胞に導入したところ、細胞内の PSAP が有意に減少することを確認した。この結果から、RNA の網羅的解析と RNA の 2 次構造予測から推定された内在性 ghRNA が RNA 干渉を引き起こす RNA として機能していることが示唆された。これにより、これまで知られていた RNA 干渉を起こす RNA に新しい RNA (ghRNA) が加わるかもしれない。さらに、この ghRNA の機能解析のため、Dicer1 および Ago1~4 欠損細胞を CRISPR/Cas9 に作製した。これら Dicer1 または Ago2 欠損細胞株を用いて、合成 U1-p01 の細胞導入による PSAP の発現抑制から作用機序の解析を試みた。その結果、Dicer1 欠損では U1-p01 による PSAP の発現抑制は Dicer1 に依存していることが明らかとなった。一方、Ago 欠損では U1-p01 による PSAP

の発現抑制は Ago2 欠損細胞で大きく減少した。これらの結果から、今回、見出した U1 snRNA の一部の RNA (U1-p01) は Dicer1 及び Ago2 による RNA 干渉経路で機能することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------