

機関番号：32624

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790161

研究課題名（和文） 癌血管内皮細胞を標的とした組織特異的 siRNA 発現システムの開発とその評価

研究課題名（英文） Development of tissue specific siRNA expression system to vascular endothelial cells in cancer

研究代表者

小泉 直也 (KOIZUMI NAOYA)

昭和薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：80433845

研究成果の概要（和文）：

癌血管内皮細胞特異的な標的分子のノックダウン技術を確立するため、RNA ポリメラーゼ II プロモーターにより標的分子の siRNA 配列を含んだ miRNA を発現する VSV-G レンチウイルスベクターを開発し、その評価を行った。その結果、外来遺伝子のノックダウン効果は得られたものの内在性遺伝子の発現をノックダウンすることは難しく、より強力な miRNA 発現カセットの開発と最適化が必要であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

We tried development of novel tissue specific siRNA expression system for cancer gene therapy by VSV-G lentivirus vector. Therefore, we substituted sequence of CCR5-siRNA in endogenous microRNA for driving by tissue specific promoter (RNA polymerase type II). As a result, the siRNA expression system had not worked by RNA polymerase type II promoter. We need further study for the development of tissue specific siRNA expression system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：医療薬剤学、癌遺伝子治療、RNAi、ターゲティング、血管内皮細胞

1. 研究開始当初の背景

癌組織はある一定の大きさに成長した際に、癌組織深部への酸素と栄養運搬のために血管新生を行うことが知られており、この癌新生血管をターゲットとした治療法が注目されている。癌血管は多くの癌細胞への栄養運搬を担っているため、癌血管の崩壊は効率的な癌細胞死を誘導し、癌組織の退縮または増殖能低下を引き起こすことが知られてい

る。しかしながら、癌組織における血管形成については未だ不明な点が多く、癌血管を標的とした特異的治療法は一部の抗体医薬品を除いて、未だ確立されていないのが現状である。近年の研究により、この癌組織中の新生血管の形成には、癌組織近傍に存在する正常血管内皮細胞や基底膜細胞だけでなく、造血幹細胞をはじめとする血液細胞が関与していることが明らかとなりつつある (Blood, 105, 2005)。癌細胞は酸素欠乏状態になるこ

とで SDF1 等のケモカインやサイトカインを分泌し、骨髄中から造血幹細胞を遊離させ、癌組織中に定着させる。癌組織中において造血幹細胞は特定の条件下で血管内皮様細胞へと分化し、癌組織中の新生血管の一部を形成することが報告されている (Blood, 95, 1997, Leuk Res, 31, 2007)。これらの知見は、造血幹細胞が癌組織へのターゲティングに有用なキャリアになるだけでなく、癌新生血管を標的とした治療を行う際のターゲット細胞になることを示している。さらに、癌組織中に存在する血管内皮細胞は、通常の血管内皮細胞とは異なる細胞表面受容体の発現を示し、これら受容体の発現量や機能が亢進していることが報告されていることから (Flk-1, Tie-2, PDGFR, VEGFR など)、マーカー分子に対するプロモーター等を用いることで、特異的な遺伝子または siRNA の発現が可能であり、癌血管細胞を標的とした遺伝子治療への応用が可能になると考えられる。申請者は、カリフォルニア大学ロサンゼルス校の AIDS 研究所 Dong Sung An 博士の研究室において、造血幹細胞への RNA ポリメラーゼ II プロモーターを用いた効率的 siRNA 発現ベクターの開発とその AIDS 遺伝子治療への応用研究を研究テーマとして進めていた。これまでに Dong Sung An 博士の研究室において、レンチウイルスベクターを用いた造血幹細胞への siRNA 導入研究を行っており、アカゲザルにおける AIDS 遺伝子治療研究を報告している。造血幹細胞での外来 siRNA または shRNA の長期的な発現は、内在性の miRNA 機構に影響を及ぼす可能性があることから、外来遺伝子等が造血幹細胞の分化増殖機能に干渉しないことが必須である。Dong Sung An 博士らは siRNA のスクリーニング等により発現カセットの最適化を行い、アカゲザルを用いた研究において、造血幹細胞への siRNA 安定発現と遺伝子導入を行った造血幹細胞が分化能力を保持していることを確認している (PNAS, 2007, 104)。これらの遺伝子発現技術を用いることで臨床応用を見据えたベクターの開発が可能になると考えられる。さらに、造血幹細胞から分化した標的細胞でのみ特異的に siRNA を発現し、目的の遺伝子を効率よくノックダウンする siRNA 発現ベクターを構築している。これは従来の RNA ポリメラーゼ III プロモーター (U6 や H1 プロモーター) ではなく、RNA ポリメラーゼ II プロモーター (組織特異的プロモーター等) を用いて siRNA を発現させることで、標的細胞が造血幹細胞から分化した際に始めて siRNA を発現させることが可能となる。本技術の開発には、プロモーターおよび siRNA 配列の最適化等が必要であるが、すでに RNA ポリメラーゼ II プロモーター (CMV プロモーター) を用いて効率的に siRNA を発現するベクター開発に

成功している。これらベクターは造血幹細胞から分化する多くの血液細胞には影響を与えず、標的細胞にのみ特異的な siRNA を発現させることが可能な技術であり、新たな癌新生血管研究ならびに癌遺伝子治療研究へと応用することが可能と考えられる。

2. 研究の目的

現在注目される癌治療の標的として、癌組織の増殖に大きく関与することが知られている癌血管内皮細胞がある。癌血管の形成に関しての詳細なメカニズムは未だ不明な点も多いが、一部の癌血管内皮細胞は骨髄中に存在する造血幹細胞から供給されることが報告されている。癌血管へと分化する造血幹細胞に遺伝子導入を行うことができれば、遺伝子導入ベクターの直接投与が困難な癌組織へ治療遺伝子の送達が可能になると考えられる。そこで siRNA (small interference RNA) 配列を miRNA (micro RNA) に組み込み、組織特異的プロモーターによりドライブさせることで、目的細胞でのみ siRNA が発現可能なベクターを開発することを第一の目的とする。さらに、本技術を造血幹細胞に用いることで癌血管内皮細胞に分化した細胞特異的に siRNA を発現させることが可能になると考えられ、本研究課題ではこれらの技術を開発し、これまで遺伝子導入が困難であった癌組織中の血管内皮細胞を標的とした新たな癌遺伝子治療法を確立することを目的とする。本技術の開発は、種々の癌組織への治療が期待できるほか、造血幹細胞と癌組織の分子レベルでの相互関係を明らかにするツールとしても利用可能と考えられる。

3. 研究の方法

本研究は、造血幹細胞から癌血管内皮細胞に分化することで特異的に siRNA を発現させるベクターシステムを開発し、新たな癌遺伝子治療法を確立することを目的としている。本研究を遂行するため、目的分子に対応する siRNA を組み込んだ miRNA を RNA ポリメラーゼ II プロモーターにより発現させ、内在性遺伝子のノックダウン効果を検討する。さらに、ノックダウン効果が得られる最適の条件を検討するため、siRNA を組み込む miRNA の最適化を行う。

(1) CCR5 を標的とした siRNA 発現 miRNA の開発とその評価

遺伝子組み換え技術を用いて、pri-miRNA 122、30a、31、155 中に CCR5 をノックダウン可能な配列を導入した。VSV-G レンチウイ

ルスベクターに上記の miRNA 配列を組み込み、RNA ポリメラーゼ II プロモーターであるユビキチンプロモーターにてドライブし、培養細胞中での CCR5 発現のノックダウン効果を検討した。

(2) CCR5 を標的とした siRNA 発現 miRNA の発現カセット位置の最適化

培養細胞において、miRNA30a に組み込んだ siRNA が CCR5 の発現をノックダウンさせることを明らかとしたが、そのノックダウン効果は低いものであった。そこで、レンチウイルス中の miRNA 組み込み位置を、プロモーター直後およびプロモーター中のイントロン部位に挿入し、ノックダウン効果を検討した。

(3) CCR5 を標的とした siRNA 発現 miRNA の発現プロモーターの最適化

より強力な内在性遺伝子のノックダウン効果を得るため、miRNA 発現プロモーターをユビキチンプロモーターから、より強力な RhMLV プロモーターに変更して、ノックダウン効果を検討した。

(4) CCR5 を標的とした siRNA 発現ウイルス由来 smallRNA の開発とその評価

ヒト由来の miRNA はその発現が過剰になることで、細胞機能の変化が変化することが知られている。そこで、アデノウイルスが発現する smallRNA (VA1RNA) 中に CCR5 に対する siRNA を挿入し、レンチウイルスベクターに搭載した。本ベクターを培養細胞に感染させ、CCR5 発現のノックダウン効果を検討した。

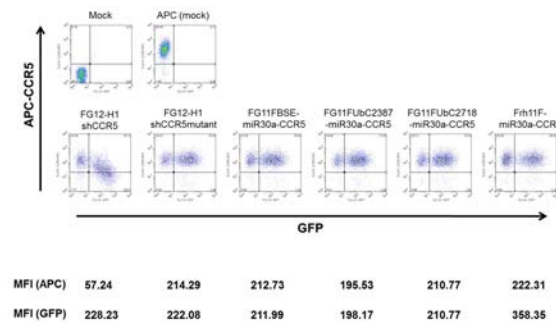
4. 研究成果

モデル分子としてルシフェラーゼ遺伝子を標的とした siRNA を miRNA に組み込み、RNA ポリメラーゼ II プロモーターにて発現させることで、ルシフェラーゼの発現は最大で 80% のノックダウン効果を示すことをこれまで明らかとしている。そこで本研究では、癌血管内皮細胞特異的なプロモーターを用いた標的分子のノックダウンレンチウイルスベクターの開発を目的とし、RNA ポリメラーゼ II プロモーターで発現可能な siRNA 発現カセットの開発を行った。さらにノックダウン効果の最適化を行うため、内在性の miRNA およびウイルス由来の small RNA を用いた新規 siRNA 発現カセットを開発した。その結果、内在性遺伝子のノックダウン効果は RNA ポリメラーゼ II プロモーターではきわめて低いものであった。また、ウイルス由来の small RNA を持ちいた発現カセットにおいても、RNA ポリメラーゼ III プロモーターでは

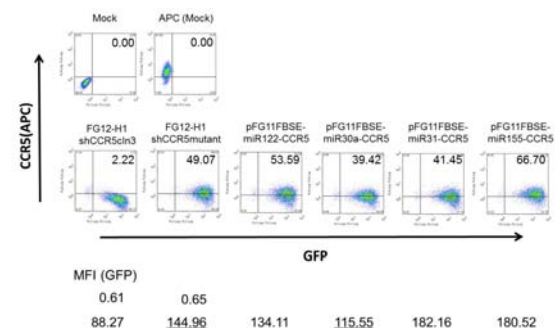
効率的な標的分子のノックダウンが可能であったが、RNA ポリメラーゼ II プロモーターではノックダウン効果は得られなかった。通常、shRNA の発現に使用される RNA ポリメラーゼ III プロモーターは、RNA ポリメラーゼ II プロモーターの 10 倍以上の RNA 合成機能を持つといわれていることから、発現カセットのさらなる効率化と RNA 合成機能を増強させることが本研究の課題になることが示唆された。以下、検討した研究結果を列記する。

Lentivirus vector	Promoter	Product of RNA	
FG12H1shCCR5clin3	H1	Anti-CCR5shRNA	(Positive)
FG12U6shCCR5clin3	U6	Anti-CCR5shRNA	(Positive)
FG12H1shCCR5mutant	H1	Mutant-CCR5shRNA	(Negative)
RNA polymerase II promoter			
FG11BSE-Pri-miR122-CCR5	UbiC	miRNA122/CCR5	
FG11BSE-Pri-miR30a-CCR5	UbiC	miRNA30a/CCR5	
FG11BSE-Pri-miR31-CCR5	UbiC	miRNA 31/CCR5	
FG11BSE-Pri-miR155-CCR5	UbiC	miRNA155/CCR5	
Change of insert position of miRNA			
FG11F-Ubc2387Pri-miR30a-CCR5	UbiC	miRNA30a/CCR5	
FG11F-Ubc2718Pri-miR30a-CCR5	UbiC	miRNA30a/CCR5	
Change of promoter (RhMLV)			
FRh11F-Pri-miR30a-CCR5	RhMLV	miRNA30a/CCR5	

表 1 作製したレンチウイルスベクター



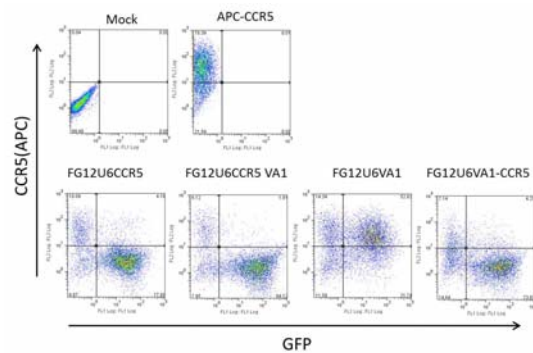
(1) CEMNKCCR5 細胞における各種レンチウイルスベクターによる CCR5 発現低下 (miRNA の違いによるノックダウン効果の違い)



(2) CEMNKCCR5 細胞における各種レンチウイルスベクターによる CCR5 発現低下 (miRNA の挿入位置およびプロモーターの違い)

Lentivirus vector	Promoter	Product of RNA
FG12U6CCR5	U6	Anti-CCR5shRNA
FG12U6CCR5 VA1	U6	Anti-CCR5shRNA + VA1
FG12U6 VA1	U6	VA1
FG12U6VA1CCR5	U6	VA1-CCR5shRNA

表2 作製した VA1-CCR5shRNA 発現レンチウイルスベクター



- (3) 293TCCR5 細胞における各種レンチウイルスベクターによる CCR5 発現低下 (U6 プロモーターによる VA1-CCR5 発現効果)

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1件)

Shimizu S, Hong P, Arumugam B, Pokomo L, Boyer J, Koizumi N, Kittipongdaja P, Chen A, Bristol G, Galic Z, Zack JA, Yang O, Chen IS, Lee B, An DS.、A highly efficient short hairpin RNA potently down-regulates CCR5 expression in systemic lymphoid organs in the hu-BLT mouse model.、Blood、査読有、8 (2010) 1534-1544

[学会発表] (計1件)

小泉直也、Suree Tom、清水佐紀、渡辺善照、安東星：HIVイメージングシステムの開発、第26回日本DDS学会、2010年6月18日、大阪府大阪市 大阪国際交流センター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小泉 直也 (KOIZUMI NAOYA)
昭和薬科大学・薬学部・助教