

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 9日現在

機関番号：32723

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590043

研究課題名（和文） 白血病や脳神経疾患の病態解析及び治療に有効な新規 RNAi ベクターの開発

研究課題名（英文） The development of the new RNAi vector system that is effective in analysis and therapy of leukemia and cranial nerve disease.

研究代表者

細野 哲司 (HOSONO TETSUJI)

横浜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：20450554

研究成果の概要（和文）：本研究において、T7 RNA ポリメラーゼを利用した細胞質内で直接 siRNA を発現できる RNAi ベクターの開発を行った。HeLa 細胞又は A549 細胞において、ルシフェラーゼ発現プラスミド pGL3-control によるルシフェラーゼ発現は、T7 RNA ポリメラーゼ発現プラスミド pCMV-T7RNAP と T7 RNA ポリメラーゼによってルシフェラーゼに対する siRNA 発現を誘導するプラスミドベクター pT7-RNAi-Lu のコトランスフェクションによって有意に抑制された。さらに、HeLa 細胞の p53 タンパク質発現は、pCMV-T7RNAP と T7 RNA ポリメラーゼによって p53 遺伝子に対する siRNA 発現を誘導するプラスミドベクター pT7-RNAi-p53 のコトランスフェクションによって有意に抑制された。以上の結果より、本研究において開発した新規 RNAi ベクター系が、期待した機能を有することを確認できた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed the RNAi vector system which expressed siRNA in cytoplasm using T7 RNA polymerase. The co-transfection of pCMV-T7RNAP and pT7-RNAi-Lu significantly suppressed luciferase expression by pGL3-control plasmid in HeLa cells and A549 cells. Moreover, the co-transfection of pCMV-T7RNAP and pT7-RNAi-p53 significantly suppressed p53 protein expression in HeLa cells. Thus, we were able to confirm that the new vector system using T7 RNA polymerase has function to suppress the expression of target gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
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・物理系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー

1. 研究開始当初の背景

RNAi は、高い特異性と簡便性から、標的遺伝子の発現を抑制する手法として、遺伝子の機能解析に利用されている。さらに、がんの進行や増殖に関与する遺伝子を標的とすることによってがん治療の新たな治療法として、発生や再生に関与する遺伝子の発現を調節することによって再生医療や細胞治療の有用な手法として期待されている。

現在、RNAi の遺伝子機能解析及び疾患治療への応用のため、遺伝子導入試薬の開発研究は多数報告されているが、RNAi ベクターの開発研究に関する報告は非常に少ないのが現状である。

2. 研究の目的

RNAi は短い 2 本鎖 RNA (siRNA) を直接細胞内へ導入する、又は siRNA を発現するベクターを細胞内へ導入することで標的遺伝子の発現を特異的に抑制する手法である。近年、siRNA を発現させるベクター (RNAi ベクター) が開発され、遺伝子の機能解析及び疾病の治療へ応用されている。

現在、白血病や脳神経疾患の病態解析及び治療法の開発は非常に期待されている。ところが、白血病細胞や神経細胞は遺伝子導入効率が低いいため、RNAi の利用が困難であると考えられている。

一般に、細胞内に導入されたプラスミドベクターは、細胞質を経由して、核内に到達しなければ遺伝子を発現することが出来ない。ところが、細胞質から核内への移行効率が非常に低い (10^{-4} 以下) ため、導入されたプラスミドベクターの大部分は細胞質に存在し、核へ移行して遺伝子を発現するプラスミドベクターは非常に少ない。そのため、従来遺伝子導入効率が低いと考えられている細胞にも、実際は相当量のプラスミドベクターが細胞内に導入されると推測できる。そこで、細胞質内に存在する RNAi ベクターから直接 siRNA を発現させることが出来れば、遺伝子導入効率が低い白血病細胞や神経細胞の機能解析に利用できる RNAi ベクターと成り得ると考えられる。

以上のことから、本研究では細胞質内で直接 siRNA を発現できる RNAi ベクターを開発することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、T7 RNA ポリメラーゼを発現するプラスミドベクター pCMV-T7RNAP 及び T7 RNA ポリメラーゼによって標的遺伝子に対する siRNA 発現を誘導するプラスミドベクター pT7-RNAi-p53 (がん抑制遺伝子 p53 が標的遺伝子) を用いた新規ベクターシステムを開発する。

そこで、pCMV-T7RNAP 及び pT7-RNAi-p53 を作製した後、pCMV-T7RNAP と pT7-RNAi-p53 を用いた新規ベクターシステムが p53 遺伝子発現を抑制するのかを、従来型 RNAi ベクターが機能する HeLa 及び A549 細胞を用い、ウエスタンブロット法により、p53 タンパク質発現抑制効果を確認する。

続いて、白血病細胞 (HL-60) 及び神経細胞 (PC12) においても新規ベクターシステムの p53 タンパク質発現抑制効果を検討する。さらに、HL-60 細胞の増殖に関与することが明らかとなっているがん遺伝子 c-myc を標的遺伝子として、新規ベクターシステムによる HL-60 の増殖抑制効果を検討する。

4. 研究成果

遺伝子組換えによって、T7 RNA ポリメラーゼを発現するプラスミドベクター pCMV-T7RNAP を作製した。次に、T7 RNA ポリメラーゼによってルシフェラーゼに対する siRNA 発現を誘導するプラスミドベクター pT7-RNAi-Lu、がん抑制遺伝子 p53 に対する siRNA 発現を誘導するプラスミドベクター pT7-RNAi-p53、がん遺伝子 c-myc に対する siRNA 発現を誘導するプラスミドベクター pT7-RNAi-Myc、スクランブル (ネガティブコントロール) の siRNA 発現を誘導するプラスミドベクター pT7-RNAi-lacZ、T7 プロモーターのみ有するプラスミドベクター pT7ter を作製した。H1 プロモーターによってルシフェラーゼに対する siRNA 発現を誘導するプラスミドベクター pHM5-H1-Lu、がん抑制遺伝子 p53 に対する siRNA 発現を誘導するプラスミドベクター pHM5-H1-p53、スクランブル (ネガティブコントロール) の siRNA 発現を誘導するプラスミドベクター pHM5-H1-lacZ 及び H1 プロモーターのみ有するプラスミドベクター pHM5-H1 は、以前の研究により組換え保持していたものを使用した。

はじめに、培養 HeLa 細胞及び A549 細胞へルシフェラーゼ発現プラスミド pGL3-control と RNAi ベクターをコトランスフェクトし、T7 RNA ポリメラーゼを用いた新規 RNAi ベクター系が機能するか確認した。HeLa 細胞において、pGL3-control によるルシフェラーゼの発現を pCMV-T7RNAP と pT7-RNAi-Lu のコトランスフェクションは有意に抑制した (図 1)。この結果は、A549 細胞においても同様であった。

次に、T7 RNA ポリメラーゼを用いた新規 RNAi ベクター系が内因性遺伝子産物の発現を抑制できるかを確認するため、培養 HeLa 細胞及び A549 細胞へ RNAi ベクターをトランスフェクトし、p53 タンパク質の発現抑制効果をウエスタンブロット法により

確認した。培養 HeLa 細胞に pCMV-T7RNAP と pT7-RNAi-p53 をコトランスフェクトすると、p53 タンパク質の発現は有意に抑制された (図 2)。

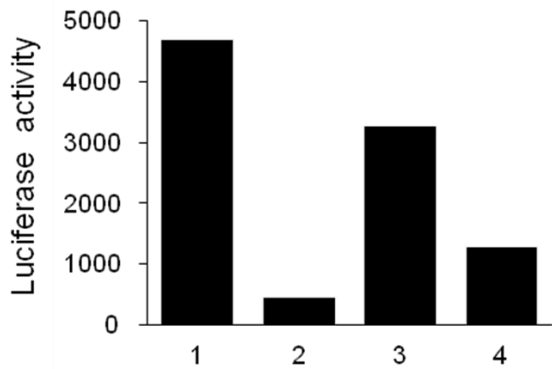


図 1 HeLa 細胞における T7RNA ポリメラーゼを利用した新規 RNAi ベクター系によるルシフェラーゼ発現抑制効果

1. pGL3-control+pHM5-H1
2. pGL3-control+pHM5-H1-Lu
3. pGL3-control+pCMV-T7RNAP+pT7ter
4. pGL3-control+pCMV-T7RNAP+pT7-RNAi-Lu

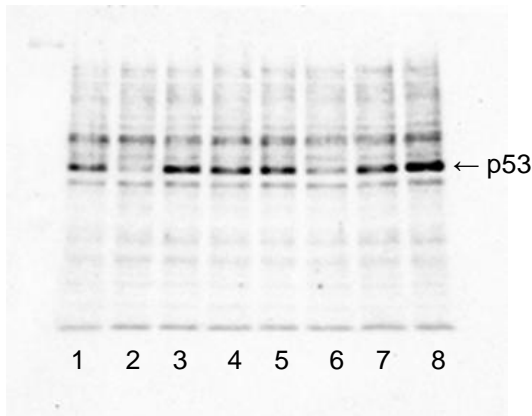


図 2 HeLa 細胞における T7RNA ポリメラーゼを利用した新規 RNAi ベクター系による p53 タンパク質の発現抑制効果

1. pHM5-H1
2. pHM5-H1-p53
3. pHM5-H1-lacZ
4. pCMV-T7RNAP
5. pCMV-T7RNAP+pT7ter
6. pCMV-T7RNAP+pT7-RNAi-p53
7. pCMV-T7RNAP+pT7-RNAi-lacZ
8. None transfected

以上の結果から、本研究において開発した T7 RNA ポリメラーゼを利用した新規 RNAi ベクター系は、培養 HeLa 細胞及び A549 細

胞において、標的遺伝子の発現を有意に抑制することが確認された。

今後は、前骨髄性白血病細胞 HL-60 へ新規 RNAi ベクターをトランスフェクトし、p53 タンパク質の発現抑制効果を確認したい。また、新規 RNAi ベクターを用いて、HL-60 細胞の増殖に関与している c-myc タンパク質の発現を抑制することにより、HL-60 細胞の増殖を抑制することができるか確認したい。

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)

- ① Yasuda S, Hasegawa T, Hosono T, Satoh M, Watanabe K, Ono K, Shimizu S, Hayakawa T, Yamaguchi T, Suzuki K, Sato Y: AW551984: a novel regulator of cardiomyogenesis in pluripotent embryonic cells, *Biochem J*, 2011, 344-355, 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 細野哲司、大柳龍太郎、鈴木将也、平元岳、大崎英幸、榎本圭太、大川原正、鈴木啓太郎：「新規トポイソメラーゼ阻害薬(CNTD)によるトポ I 阻害様式の検討」、日本薬学会第 133 年会、横浜、2013 年 3 月
- ② 細野哲司、鈴木将也、榎本圭太、大川原正、鈴木啓太郎：「水酸基を多く含む新規トポイソメラーゼ阻害薬の開発」、日本薬学会第 132 年会、札幌、2012 年 3 月
- ③ 野口貴史、細野哲司、大川原正、大塚雅巳、鈴木啓太郎：「低毒性トポイソメラーゼ阻害抗がん薬の開発」、第 54 回日本薬学会関東支部大会、東京、2010 年 10 月

[図書] (計 2 件)

- ① 細野哲司、他、廣川書店、やさしい微生物学、2011、135(67-76, 107-115)
- ② 細野哲司、他、廣川書店、第 4 版 新しい微生物学、2011、473(180-214)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細野 哲司 (HOSONO TETSUJI)
 横浜薬科大学・薬学部・講師
 研究者番号：20450554