

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659080

研究課題名（和文）センス・アンチセンスRNA複合体を標的とした新規核酸医薬療法の開発

（英文） Development of a novel nucleic acid drug targeting sense/antisense transcript pairs

櫻井 文教（SAKURAI FUMINORI）

大阪大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：70370939

研究成果の概要（和文）：

標的遺伝子のプロモーター領域に相同な配列を有する二本鎖RNAを導入することにより、標的遺伝子の発現を活性化させるRNA activationは、治療への応用が期待されている。本研究では、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）を阻害することで癌の転移を抑制するRECKの発現をRNA activationにより活性化することを試みた。癌細胞に二本鎖RNAを導入したところ、RECKの発現が約6倍に上昇した。さらに、RNA activationによるRECK遺伝子の発現活性化により、MMPの発現および活性が有意に抑制されるとともに、癌細胞の侵潤が約1/5に抑制された。本結果より、RNA activationによるRECK遺伝子の活性化は、癌の転移抑制に向けて有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Recent studies have demonstrated that small duplex RNA complementary to the promoter region of target gene enhances expression of target genes. This phenomenon is designated as “RNA activation”. In this study, we examined whether expression of the matrix metalloproteinase (MMP) inhibitor RECK is activated in the cultured tumor cell lines by transfection with small duplex RNA (dsRNA) complementary to the promoter of RECK gene, leading to the suppression of expression of MMPs and invasion of the tumor cells. Transfection with the dsRNAs significantly elevated RECK expression levels by approximately 6-fold in human tumor cells. Furthermore, the dsRNA-induced elevation of RECK expression resulted in reduction in expression of MMPs and invasion of tumor cells. These results suggest that small duplex RNA complementary to the promoter region of tumor suppressor genes would have the potential as a novel antitumor agent.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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：非コードRNA、核酸医薬、遺伝子発現制御、がん、非翻訳領域、RNA activation

1. 研究開始当初の背景

二本鎖RNAによる遺伝子発現抑制は、今や転写後レベルのみならず、転写レベルでも誘導可能であることが明らかとなり、ますます大きな注目を集めている。一方で近年、2つのグループにより、標的遺伝子のプロモーター領域に相同な配列を有する約21塩基の二本鎖RNAを細胞内に導入することにより、転

写レベルで遺伝子発現が活性化することが報告された。この現象はRNA activation (RNAa)と呼ばれ、新たな遺伝子発現制御機構として注目されている。しかし、いまだ報告例も少なく、そのメカニズムに関してもほとんど明らかになっていないが、標的遺伝子のプロモーター領域より転写される非コードRNAが重要な役割を担っていることが示唆さ

れている。また二本鎖 RNA により標的遺伝子の発現を活性化できれば、それによる疾患の治療も期待できるが、これまでに RNA activation を治療に応用した例はほとんど報告されていないのが現状である。

2. 研究の目的

そこで本研究では、RNAa の治療応用とメカニズム解明を目指して、癌抑制遺伝子である RECK (Reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs) 遺伝子の発現を、RNAa により活性化することを試みた。RECK はマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) を阻害することで Extracellular matrix (ECM) の分解を抑え、癌細胞の浸潤を抑制すること、また多くの癌細胞ではその発現が低下していることが知られている。従って、RNAa により RECK の発現を上昇させることができれば、癌の浸潤・転移を抑制可能であると考へた (Figure 1)。

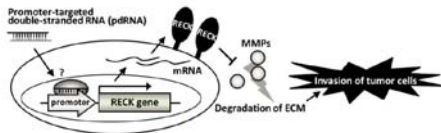


Figure 1 Schematic diagram of transcriptional activation of RECK gene expression by promoter-targeted double-stranded RNAs.

3. 研究の方法

(1) プロモーター領域を標的とした dsRNA の設計

各種癌細胞におけるヒト RECK 遺伝子の転写開始点を 5' RACE 法により明らかにするとともに、同定した転写開始点より上流約 400 塩基の領域に対し、相同な配列を有する 21 塩基の dsRNA を設計した。

(2) 各種培養細胞への dsRNA transfection による RECK の発現活性化

各種ヒト癌細胞 (MDA-MB-231 細胞、A549 細胞、H1299 細胞、HepG2 細胞など) を 12 穴プレートもしくは 24 穴プレートに播種し、24 時間後、RNAiMAX (Invitrogen) を用いて dsRNA を指定の濃度で Transfection した。一定期間培養後、細胞を回収し、Western blotting もしくは Real-time RT-PCR により RECK 遺伝子の発現レベルを検討した。

(3) RECK の発現活性化による MMP の発現抑制に関する検討

各種ヒト癌細胞に dsRNA を 100nM で Transfection し、3 日間培養した。その後、細胞を洗浄したのち新たに培地を加え、24 時間培養したのち培地を回収した。回収した培地をゼラチンゼイモ泳動プレキャストゲルにアプライして MMP-2 および MMP-9 発現量を検討した。

(4) RECK の発現活性化による癌細胞の浸潤

抑制に関する検討

ヒト乳癌細胞株である MDA-MB-231 細胞に dsRNA を 100nM で Transfection した。Transfection 3 日後に細胞を回収し、BD Biocoat Matrigel Invasion Chamber を用いて癌細胞の浸潤能を評価した。

4. 研究成果

(1) プロモーター領域を標的とした dsRNA の設計

まず A549 細胞および MDA-MB-231 細胞における RECK 遺伝子の転写開始点について検討した。その結果、データベース (DBTSS ; <http://dbtss.hgc.jp/>) に登録されている転写開始点と比較して、50 塩基程度下流の位置に多くの転写開始点が同定された。その今回はデータベースに登録されていた転写開始点を +1 とし、その下流 400 塩基の範囲内に dsRNA を 8 種類設計した。設計指針としては、GC 含量が 70% を超えないようにした。RECK 遺伝子のプロモーター領域の配列および dsRNA の標的配列を Figure 2 に示す。

```

RECK368
CTGAGGGTAC ATGAAGGAGA GAAGCCCTT TGGTTCGCC TTGACTAAG CCCTTGTCT CAGGTGAAC
RECK281
TGCAGTGTGA TCTTAGTAA GGTCACTTC CTCTCTAC TCAGTGGCC GAAACCTCAG GAGGTGGCAG
RECK249
AGGTTTCTA ATGACTCTCC CAGCTCTGAC ATCTCTGAC TCACTCTGG GAGAAGCTGG GCTGCTGGAC
RECK207
TCCATGAGGAGA AGCCGACACA CAGTTGGGCC ATACAAAGA GCCCTGGTAC GGGGCAAGTT CCGGCCCCG
RECK168
GGAGTTTTC GAAACACTGT GAGGCGAGGG GCGGGGCTTG AGCGGGCCGC AGCGACTGAC CAAAGGCCG
RECK82
GGCGCTGGG GCGGGCCCTC GCGCGAGCGG
RECK43
GGCGCTGGG GCGGGCCCTC GCGCGAGCGG
TSS

```

Figure 2. Sequence of RECK promoter region and target sequences of the dsRNAs.

(2) 各種培養細胞への dsRNA transfection による RECK の発現活性化

設計した 8 種類の dsRNA を MDA-MB-231 細胞に導入したところ、RECK-82 においてタンパク質レベルにおいて約 6 倍の RECK 遺伝子の発現レベルの上昇が観察された。また RECK-82 による RECK タンパク質の増加は、他の癌細胞 (H1299, A549 細胞) においても観察された。しかし、HepG2 細胞では見られなかった。さらに RECK mRNA レベルにおいても検討したところ、約 2 倍の上昇が観察された。以上に結果より、プロモーター領域に相同な配列を有する二本鎖 RNA を Transfection することにより、RECK 遺伝子の発現を活性化できることが明らかとなった。

次に RECK-82 による RECK 遺伝子発現活性化が Off-target によるものか否かについて検討した。RECK-82 の配列に対する Scramble 配列 2 種類および 4 塩基置換した Mismatch 配列 2 種類を設計し、MDA-MB-231 細胞に導入したところ、Scramble 配列および Mismatch 配列では RECK 遺伝子の発現活性化は全く観察されなかった。さらに Off-target の要因として二本鎖 RNA によるインターフェロン (IFN) 応答の誘導が報告されている。そこで RECK-82 を Transfection したのち、Interferon-stimulating gene (ISG) の発現変動を Real-time RT-PCR により検討したと

ころ、有意な発現変動は観察されなかった。また Type I IFN の Inducer である poly I:poly C を加えたところ、ISG の発現誘導は観察されたが、RECK 遺伝子の発現活性化は見られなかった。以上の結果より、RECK-82 による発現活性化は Off-target によるものではないことが示唆された。

次に RECK-82 による RECK 遺伝子発現活性化プロファイルについて検討した。まず Dose-response について検討したところ、発現活性化は約 6nM から認められ、100nM まで上昇した。また発現の経日的変化について検討したところ、Transfection 4 日目にピークを迎えたのち、徐々に発現は低下していった。しかし、発現活性化は 1 週間程度持続していた。

これまでに RNA activation による標的遺伝子の発現活性化には、Argonaute (Ago) タンパク質が関与することが報告されている。そこで RECK-82 による RECK 遺伝子発現活性化においても Ago タンパク質が関与するか検討した。Ago1 および Ago2 を siRNA でノックダウンしたのち、RECK-82 を導入したところ、RECK の発現レベルに有意な差は見られなかった。以上の結果より、RECK-82 による遺伝子発現活性化においては Ago タンパク質は関与しないことが示唆された。

なお dsRNA Transfection 後の細胞生存率についても検討したが、有意な細胞生存率の減少は観察されなかった。

(3) RECK の発現活性化による MMP の発現抑制に関する検討

RECK は MMP の発現や活性を阻害することが知られている。そこで RECK-82 によって RECK 遺伝子の発現を活性化することにより、MMP の発現や活性を阻害可能か検討した。まず RECK-82 を Transfection 後の MMP-9 mRNA レベルについて検討したところ、Control dsRNA 群と比較し、RECK-82 では MMP-9 mRNA 発現量が約 20% に減少していた。次にゼラチンゼイモグラフィにより MMP-2 および MMP-9 量について検討したところ、MDA-MB-231 細胞では Pro MMP-9 量が、A549 細胞では Pro MMP-2 量が有意に減少していた。以上の結果より、RECK-82 により RECK 発現量が上昇することによって、MMP 量を抑制可能であることが示された。

(4) RECK の発現活性化による癌細胞の浸潤抑制に関する検討

RECK-82 により MMP 量を抑制することから、次に MMP 量を抑制することで、癌細胞の浸潤能を抑制可能か Matrigel Invasion Assay にて検討した。その結果、RECK-82 群では浸潤した MDA-MB-231 細胞数が Control dsRNA 群と比較し、15% 以下に減少

していた。以上の結果より、RECK-82 により RECK の発現量を上昇させることで、癌細胞の浸潤能を抑制可能であることが示された。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

1. 南條有紀、櫻井文教、谷野文仁、立花雅史、水口裕之. プロモーター領域を標的とした二本鎖 RNA による RECK 遺伝子の発現活性化.. アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2011. 2011.9.1-2. (大阪)
2. 南條有紀、櫻井文教、谷野文仁、立花雅史、水口裕之. プロモーター領域を標的とした二本鎖 RNA による RECK 遺伝子の発現活性化. 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会 2011.10.22 (神戸)
3. 櫻井文教、南條有紀、立花雅史、水口裕之. プロモーター領域を標的とした二本鎖 RNA による RECK 遺伝子の発現活性化に関する検討. 第 28 回日本 DDS 学会学術集会 2012. 7. 4-5. (札幌)
4. Fuminori Sakurai, Yuki Nanjo, Hitoshi Goto, Fumihito Tanino, Masashi Tachibana, Kazufumi Katayama, Hiroyuki Mizuguchi. Activation of RECK gene expression by targeting promoter region with small duplex RNAs. Oligonucleotide Therapeutic Society 8th Annual Meeting 2012. 2012. 10-28-31. (USA, Boston)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/bunshisei-butugaku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 文教 (SAKURAI FUMINORI)

研究者番号 : 70370939

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

小比賀 聡 (OBIKA SATOSHI)

研究者番号 : 80243252

(5) 研究協力者

水口 裕之 (MIZUGUCHI HIROYUKI)
大阪大学大学院薬学研究科・教授

立花 雅史 (TACHIBANA MASASHI)
大阪大学大学院薬学研究科・助教

形山 和史 (KATAYAMA KAZUFUMI)
大阪大学大学院薬学研究科・助教

後藤 平 (GOTO HITOSHI)
大阪大学大学院薬学研究科・大学院生

南條 有紀 (NANJO YUKI)
大阪大学大学院薬学研究科・大学院生

谷野 文仁 (TANINO FUMIHITO)
大阪大学大学院薬学研究科・大学院生