

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24689005

研究課題名(和文) RNAi 医薬品の実用化に向けた siRNA の細胞内輸送機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of intracellular traffic of siRNA

研究代表者

井上 貴雄 (Inoue, Takao)

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・室長

研究者番号：50361605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,400,000 円

研究成果の概要(和文)：siRNAやアンチセンスに代表される核酸医薬品は、治療のない難治性疾患に対する革新的次世代医薬品として注目されている。しかし、核酸医薬がどのように細胞膜を通過し、細胞内で輸送されているかについては、輸送経路、分子実体とも明らかになっていない。本研究では、核酸医薬の細胞内取り込み・輸送に関わる因子についてスクリーニングを行い、「遺伝子K」と名付けた分子がこの経路に関与することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Oligonucleotide therapeutics, such as siRNA and antisense oligonucleotides, has attracted attention as an innovative medicine for intractable diseases that have no cure. However, it is largely unknown how oligonucleotide therapeutics is incorporated into the cell, and subsequently, transported to the target RNA. In this study, we identified some molecules which are involved in incorporation of oligonucleotides into HEK293 cells.

研究分野：生化学

キーワード：核酸医薬 RNAi siRNA

1. 研究開始当初の背景

siRNA やアンチセンスに代表される核酸医薬品は、これまで“Undruggable”とされてきた分子を標的にすることが可能であることから、治療のない難治性疾患や希少疾患に対する革新的次世代医薬品として注目されている。核酸医薬品は抗体医薬品と同様に高い特異性と有効性が期待される一方で、低分子医薬品と同じく化学合成により製造することができる。また、その物質的性質・機能的性質から、ひとつの製造/開発プラットフォームが完成すれば短期間のうちに新規の核酸医薬品を創出することが可能であり、開発期間の面からも注目される。核酸医薬品に関する最近のトピックとして、2013年に全身投与が可能な核酸医薬品としては初めてKynamro (ApoB-100のmRNAをターゲットとする家族性高コレステロール血症治療薬)が承認/上市されたことが挙げられる。すなわち、修飾核酸技術の進展からこれまで課題とされてきた体内における易分解性の問題が克服され、有効性も著しく上昇したことから、皮下注や静注による核酸医薬品の投与が現実的に可能になってきた。今後は、従来から開発されてきた局所投与型の核酸医薬品に加え、全身投与性の核酸医薬品が次々と誕生すると考えられる。

このように核酸医薬品の開発は国内外で著しく進展しているが、現時点では投与量が非常に多く(上述のKynamroの場合、200mg/週の皮下投与が必要)、高額な治療費や毒性発現の可能性が懸念されている。高投与量になっている要因は、ポリアニオン構造を有するオリゴ核酸が細胞外から細胞内に取り込まれるステップ(膜を通過するステップ)に障害があるためであり、この点をいかに改善するかが核酸医薬品開発における重要な課題となっている。

2. 研究の目的

現在、核酸医薬品の有効性を高めるために、オリゴ核酸に膜との親和性を高める化学修飾や、オリゴ核酸を送達するキャリアを開発する試みが行われているが、「受け手側の細胞において、オリゴ核酸がどのように細胞膜を通過し、細胞の内側に取り込まれるか」といった分子機構や、取り込まれてから細胞内動態の理解はほとんど進んでいない(Fig.1)。本研究では、この分子機構を明らかにするために、siRNAが細胞に取り込まれてから標的mRNAを分解するまでに関わる因子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

siRNAの効果を評価するアッセイ系の確立

現在、開発が進んでいる核酸医薬品の投与方法に関しては、1本鎖オリゴ核酸(アンチセンス)の場合はキャリア等を用いないNakedな状態での投与、2本鎖オリゴ核酸(siRNA, miRNA)の場合はリポソーム等の送達キャリアを用いた投与が一般的である。最近では、2本鎖オリゴ核酸に関してもキャリアなしで効率よく機能する末端修飾が開発され、臨床試験でも良好な結果が得られている(Anylam社 GalNAc-conjugated siRNA)。以上の背景から、本研究では細胞内へのsiRNAの導入にはリポフェクトアミンのような導入試薬を用いず、siRNAをそのまま細胞に添加することとした。メディウム中に添加したsiRNAが細胞質側に到達したことを評価する指標としては、GFP安定発現ヒト細胞にGFPに対するsiRNAを添加し、GFP蛍光の低下を検出するアッセイ系を構築した(Fig.2)。

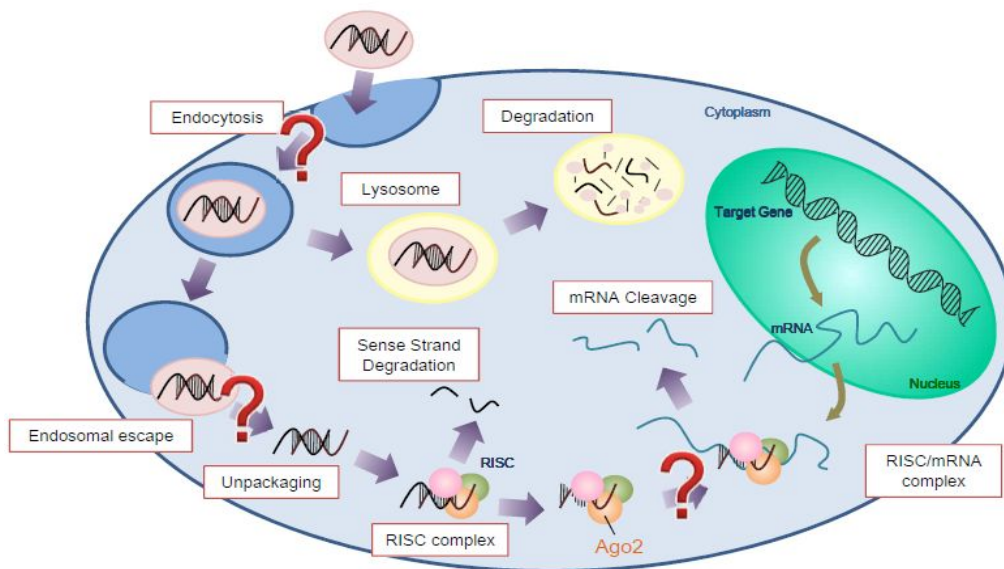


Fig.1 siRNAの細胞内動態

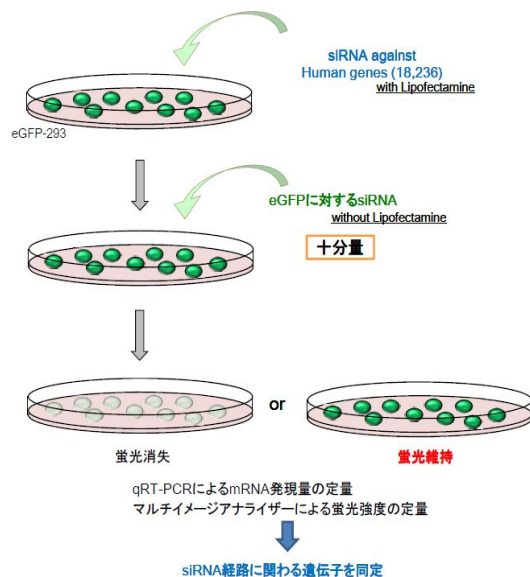


Fig.2 siRNA の効果を評価するアッセイ系

アッセイ用細胞の選択

抗 GFP siRNA の効果による GFP 蛍光の消光を迅速かつ高効率に検出を行うために、GFP 安定細胞としては d2GFP-HEK 細胞を使用した。d2GFP は、eGFP の C 末端に組み込まれた PEST 配列によってユビキチン化が促進されることにより不安定化した GFP タンパク質である。eGFP の半減期が 2 日程度と非常に長寿命であるのに対し、d2GFP の半減期はわずか 2 時間程度である。この d2GFP を CompoZr[®] Targeted Integration Kit (Sigma-Aldrich) を利用して、ZFN を用いたゲノム編集により HEK293 細胞に組み込むことにより、d2GFP-HEK 細胞を樹立した。

【導入用プラスミドの構築】

pEBMulti-Hyg ベクターに d2GFP 配列を組み込んだプラスミド(オペロンに外注)をテンプレートとし、CAG promoter-eGFP-PEST-SV40 部位を増幅させた (Forward primer : acc ggt gct aga att cca ctg ccc cag cga a, Reverse primer : gcg tcg acg gaa gat atc ata cat tga tga gtt)。この増幅断片を pZDonor ベクター(Sigma-Aldrich) の EcoRI-EcoRV 部位に In-Fusion[®] HD Cloning Kit(TaKaRa)を用いて組み込むことにより、pZDonor-d2GFP-Puro プラスミドを構築した。

【d2GFP-HEK 細胞の樹立】

SF Cell Line 4D-Nucleofector X Kit(Lonza)を用いて、HEK293 細胞に pZDonor-d2GFP-Puro プラスミドを導入した。

- HEK293 細胞
- 細胞数 5×10^5 cells/well (94 well plate)
- 1 μ g の pZDonor-d2GFP-Puro プラスミドを導入
- 4D-Nucleofector[™] (Lonza)を使用してエレクトロポレーション

- 12 well plate に播種し、37[°]C, 5%CO₂ で培養
- 72 時間培養後、最終濃度 0.5 μ g/ml ピューロマイシンでセレクション

抗 GFP siRNA の選択

キャリアなしでターゲット遺伝子の発言を効率よく抑制する siRNA として、末端に化学修飾を施した Accell siRNA (Dharmacon)を使用した。Dharmacon 社で販売されている 4 種類の抗 GFP Accell siRNA の中から、最も効率よく d2GFP-HEK 細胞の GFP 蛍光を抑制できるものを qRT-PCR により決定した。

【測定条件】

- d2GFP-HEK 細胞
- 細胞数 1×10^4 cells/well (94 well plate)
- Naked で導入(Accell siRNA Delivery Media)
- 最終濃度 500, 1000nM の siRNA を導入
- 37[°]C, 5%CO₂ で培養
- 18, 24, 48, 72, 96, 120 時間培養後 totalRNA を回収
- 50ng の total RNA を使用し、One Step SYBER PrimeScript RT-PCR Kit(TaKaRa)を用いて qRT-PCR で GFP を定量 (primer set は 2 種類使用)

primer set 1

Forward primer : ctgctgccccgacaacca

Reverse primer : gaactccagcaggaccatgtg

primer set 2

Forward primer : gacgtaaaccggccacaagttc

Reverse primer : ttgccggtggtgcagat

siRNA の活性を抑制するポジティブコントロール遺伝子の選択

一般的に細胞内に siRNA を導入すると、RISC 複合体が形成され、siRNA が一本鎖にほどかれる。そして RISC 複合体に留まった一本鎖 RNA と相補的な配列を持つ mRNA を標的として切断することにより、発現抑制が起こると考えられている。従って、RISC 複合体の形成を抑制することにより RNAi を抑制することができると期待できる。そこで、RISC 複合体の構成因子の一つである Ago2 の発現を、予め抗 Ago2 siRNA を作用させることにより抑制した後に、抗 eGFP siRNA を導入し、GFP 蛍光の消光の有無を確認することにした(Fig.3)。

アッセイ条件

【スクリーニング遺伝子に対する siRNA の導入条件】

- d2GFP-HEK 細胞
- 細胞数 5×10^3 cells/well (384 well plate)
- Lipofection 法 (Lipofectamine RNAiMAX)

- ・ 最終濃度 30nM の siRNA を導入
- ・ 37 °C, 5%CO₂ で培養
- ・ 72 時間培養後、抗 eGFPsiRNA を導入

【eGFP に対する siRNA の導入条件】

- ・ Naked で導入 (Accell siRNA Delivery Media)
- ・ 最終濃度 1 μ M の siRNA を導入
- ・ 37 °C, 5%CO₂ で培養
- ・ 72 時間培養後マルチイメージングアナライザー (In Cell Analyzer 2000) を用いて細胞の GFP の蛍光強度を測定 (n=4)

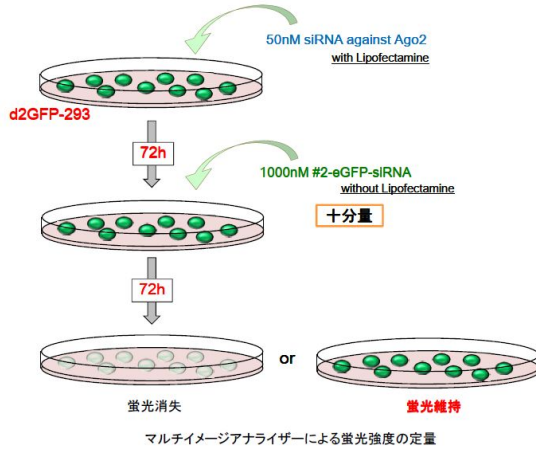


Fig.3 ポジティブコントロールの選定

4. 研究成果

アッセイ用細胞の選択

構築した d2GFP-HEK 細胞及び、eGFP 安定産生細胞である eGFP-HEK 細胞にシクロヘキシミドを作用させタンパク合成を止め、GFP 蛍光の減少を観察した。その結果、eGFP-HEK 細胞では蛍光強度に全く変化がなかったが、d2GFP-HEK 細胞では徐々に蛍光強度が減少し、7 時間後には 50% にまで減少した。この結果から、半減期の短い GFP 安定細胞の樹立が確認できた。(Fig.4)

【測定条件】

- ・ 細胞数 1×10^4 cells/well (96 well plate)
- ・ 37 °C, 5%CO₂ で 24 時間培養後、最終濃度 10 μ g/ml でシクロヘキシミドを添加
- ・ 所定時間毎に In Cell Analyzer で蛍光強度を測定

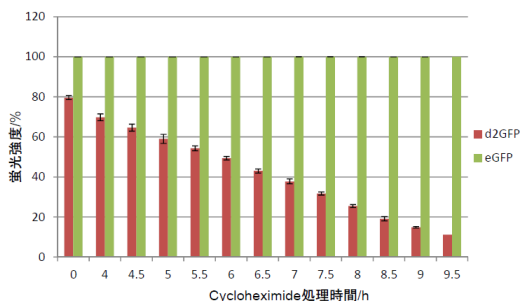


Fig.4 eGFP-HEK と d2-HEK の蛍光強度減少の比較

またこの 2 種類の細胞に実際に抗 eGFP siRNA を導入し、蛍光強度の減少を確認したところ、d2GFP-HEK 細胞の方が蛍光強度の減少が大きかった。このことから、d2GFP-HEK 細胞を用いることで、GFP 蛍光強度の減少を効率的に測定できることが示唆された。(Fig.5)

【測定条件】

- ・ 細胞数 1×10^4 cells/well (96 well plate)
- ・ Naked で導入 (Accell siRNA Delivery Media)
- ・ 最終濃度 1000nM の siRNA を導入
- ・ 37 °C, 5%CO₂ で培養
- ・ 72, 96, 120 時間培養後 In Cell Analyzer で蛍光強度を測定

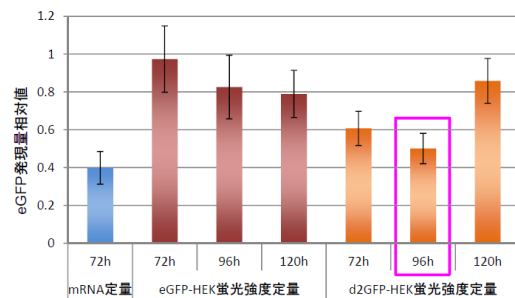


Fig.5 eGFP-HEK と d2-HEK に対する抗 eGFP siRNA の効果の比較

抗 GFP siRNA の選択

Dharmacon 社で販売されている 4 種類の抗 GFP Accell siRNA(#1-#4)のうち、siRNA #1 の配列は、d2GFP-HEK 細胞で発現している d2GFP には適合しなかったため、他の 3 種類の効果を比較した。

その結果、siRNA #2 が最も効率よく d2GFP の発現を抑制することが明らかとなった(Fig.6)。

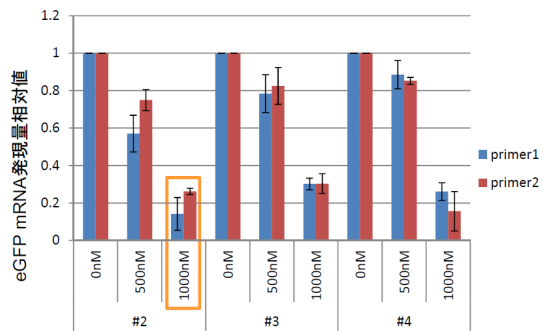


Fig.6 抗 GFP Accell siRNA のスクリーニング

また、Naked で効率よく発現を抑制するためには、最終濃度 1000nM の siRNA を導入し、72 時間の培養が必要であることがわかった(Fig.7)。

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4件)

- 1) Shimo, T., Tachibana, K., Saito, K., Yoshida, T., Tomita, E., Waki, R., Yamamoto, T., Doi, T. Inoue, T., Kawakami, J., Obika, S.: Design and evaluation of locked nucleic acid-based splice-switching oligonucleotides in vitro., *Nucleic Acids Res.*, 42(12), 8174-8187 (2014).
- 2) 井上貴雄: 核酸医薬品開発の動向, 医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス, 45(4), 288-298 (2014).
- 3) 井上貴雄: 核酸医薬品開発の現状, PHARMSTAGE, 14(3), 1-3 (2014).
- 4) 井上貴雄, 吉田徳幸: 核酸医薬品の実用化促進に向けた取り組み, 国立医薬品食品衛生研究所報告, 132, 13-15 (2014).

〔学会発表〕(計16件)

- 1) 井上貴雄: 核酸医薬の実用化に向けたレギュラトリーサイエンス研究への取り組み, 日本化学会第95春期年会(2015.3, 千葉)
- 2) 吉田徳幸, 内藤雄樹, 佐々木澄美, 内田恵理子, 小比賀聡, 内藤幹彦, 佐藤陽治, 井上貴雄: アンチセンス医薬品のオフターゲット効果の安全性評価に関する研究, 日本薬学会第135年会(2015.3, 兵庫)
- 3) 佐々木澄美, 吉田徳幸, 内田恵理子, 内藤幹彦, 佐藤陽治, 井上貴雄: 核酸医薬品の細胞内取り込み機構に関する解析, 日本薬学会第135年会(2015.3, 兵庫)
- 4) 萩原衆子, 山本誠司, 吉田徳幸, 佐々木澄美, 飯村信, 小泉誠, 内藤幹彦, 佐藤陽治, 植村英俊, 井上貴雄: 修飾型オリゴ核酸による自然免疫活性化の評価法に関する研究, 日本薬学会第135年会(2015.3, 兵庫)
- 5) 井上貴雄: 核酸医薬品開発のポイント - 開発の現状・市場動向・課題・レギュラトリーサイエンス -, R & D支援センターセミナー(2015.3, 東京)
- 6) 井上貴雄: 核酸医薬開発とレギュラトリーサイエンス研究, 第18回バイオメディカル研究会(2015.3, 大阪)
- 7) 井上貴雄: 核酸医薬品の安全性確保のための評価技術開発, 創薬基盤推進研究事業研究成果発表会「医薬品・医療機器の実用化促進のための官民共同研究の進捗と展望」(2015.2, 東京)
- 8) 井上貴雄: 日本発核酸医薬の創出に向けて, 抗体医薬・核酸医薬開発コンソーシアムシンポジウム(2015.1, 東京)
- 9) 井上貴雄: 核酸医薬品の開発動向とレギュラトリーサイエンス研究への取り組み, 第19回分子複合医薬研究会(2014.11, 大阪)
- 10) Yoshida, T., Sasaki, K., Obika, S., Sato, Y., Inoue, T.: Evaluation of Off-target Effects of Antisense

Oligonucleotides, 10th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society (2014.10, San Diego)

- 11) 井上貴雄: 核酸医薬品開発の動向と課題, 第27回大阪大学医工情報連携シンポジウム - 創薬と医療から日本の未来を考える - (2014.9, 大阪)
- 12) 井上貴雄: 核酸医薬品の実用化に向けたレギュラトリーサイエンス研究への取り組み, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2014(2014.9, 東京)
- 13) 萩原衆子, 山本誠司, 吉田徳幸, 佐々木澄美, 飯村信, 小泉誠, 佐藤陽治, 植村英俊, 井上貴雄: オリゴ核酸による自然免疫活性化の評価法に関する研究, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム2014(2014.9, 東京)
- 14) 佐々木澄美, 吉田徳幸, 内田恵理子, 佐藤陽治, 井上貴雄: siRNAの細胞内取り込み機構の解析, 第6回日本RNAi研究会(2014.8, 広島)
- 15) 井上貴雄: 核酸医薬開発の動向と課題, 次世代医薬「核酸医薬」創出に向けたStrategy2014(2014.7, 東京)
- 16) 井上貴雄: 核酸医薬品の規制, 第41回日本毒性学会学術年会(2014.7, 兵庫)

6. 研究組織

(1)研究代表者

井上 貴雄 (INOUE, Takao)

国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子細胞医薬部・室長

研究者番号: 50361605