

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26430157

研究課題名(和文)新しい方法による標的mRNA切断を応用した新規抗腫瘍核酸医薬の開発

研究課題名(英文)Development of novel anti-tumor therapy target mRNA cleavage using a new method

研究代表者

成田 美和子 (Miwako, Narita)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：30281009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：血液腫瘍性疾患の治療にsgRNAを用いたTRUE gene silence法を用いることを目的とし、様々な腫瘍関連mRNAをtargetとしてsgRNAを作成し、細胞増殖抑制とapoptosis誘導について検討した。数種類の白血病細胞株で、WT1とBcl-2に対するsgRNAの効果が確認された。この効果は培養液中のglucoseの濃度によって変化する事も確認した。これらの検討により、sgRNAの効果を予測するための条件設定を確立する事ができた。

研究成果の概要(英文)：In order to use the TRUE gene silence method using sgRNA for treatment of hematologic malignancies, sgRNA was prepared using various tumor - associated mRNA as a target, and suppression of cell proliferation and apoptosis induction were examined. In several leukemia cell lines, the effect of sgRNA on WT1 and Bcl-2 was confirmed. It was also confirmed that this effect varied depending on the concentration of glucose in the culture medium. We could establish condition setting to predict the effect of sgRNA.

研究分野：血液内科学

キーワード：small guide RNA TRUE gene silencing 白血病

1. 研究開始当初の背景

(1) DNA から転写された直後の tRNA 前駆体の 3' 末端には成熟 tRNA には見られない伸長配列が存在する。この伸長配列が、tRNase Z などのエンドヌクレアーゼによって除去され成熟 tRNA になる。共同研究者の先行研究において、tRNA 前駆体のクローバーの葉様の構造、特にヘアピンループ構造が tRNase Z による切断部位の認識において重要であることが明らかにされ、標的 RNA を切断する新しい方法が開発された。すなわち、標的 RNA と相補的な塩基配列をもつガイド RNA を作成し、標的 RNA との間で tRNA 前駆体に類似した構造の複合体を形成することにより、細胞内の tRNase Z がこの複合体を切断することを見いだした。

(2) 効果的なガイド RNA の構造についての検討も行い、3' -truncated tRNA

5' -half-tRNA (tRNA 前駆体の 5' 側半分の構造のガイド RNA を作成し、tRNA 前駆体の 3' 側半分の構造を有する標的 RNA と結合させる)、hook RNA の他、7塩基の RNA (ヘプタマー) (tRNA 前駆体アクセプターステムの 5' 側半分の 7塩基からなるガイド RNA を作成し、tRNA 前駆体アクセプターステムの 3' 側半分と T ステムのヘアピンループ構造を有する標的 RNA と結合させる) でも、標的 RNA と結合することにより、tRNase Z に認識される複合体を形成するようにデザインすることができることを示した。すなわち、四つ葉のクローバー状構造を示す tRNA 前駆体を切断するはずである tRNase Z が、アクセプターステムの 7塩基と T ステムの 5塩基が相補的である二つ葉状の構造物をも tRNA 前駆体として認識し、7塩基のガイド RNA を用いても標的 RNA を破壊できることを明らかにした (図 1)。

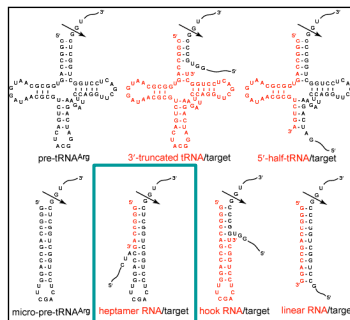


図 1 pre-tRNA 類似複合体を形成する sgRNA には、3' -truncated tRNA、5' -half-tRNA がある。また、tRNase Z が micro-pre-tRNA 類似複合体をも認識して切断することから、heptamer RNA、hook RNA、linear RNA も sgRNA として有用であることが確認されている。なかでも、7 塩基の heptamer RNA は細胞に取り込まれやすい。本検討では、この heptamer RNA を sgRNA として用いた。矢印は tRNase Z の切断部位を示している。

(3) ヘプタマー-sgRNA と 標的 mRNA で形成される複合体は micro tRNA 前駆体様の構造

を示すが、この複合体も tRNase Z に認識され、標的 mRNA が切断されることも明らかにされている。また、我々は、協和発酵キリン・バイオ医薬研究所の協力を得て、標的 mRNA の 2 次構造を加味して、最も効果的な sgRNA をデザインできるソフトウェアを開発しその有用性を検討していた。

2. 研究の目的

(1) 本研究に先行して、2011 年 8 月 29 日に国内特許の申請を完了した (特願 2011-185594)。【発明の名称: ヒト白血病細胞のアポトーシスを誘導するヘプタマー型スモールガイド核酸】。本研究の目的は、全く新しい方法を用いて標的 mRNA を切断することにより白血病等の腫瘍に対する新規核酸医薬を開発することであった。新しい方法とは、人工的 small guide (sg) RNA と細胞内で結合させた標的 mRNA (この結合体が tRNA 前駆体と類似構造をとるように sgRNA をデザインする) を、すべての細胞内に存在するトランスファー RNA 前駆体切断酵素 (tRNase) を用いて切断させ、腫瘍の増殖に関連するタンパクの産生を抑制することにより腫瘍を治療することであった。

(2) 研究期間内に、ヘプタマー-sgRNA を用いて白血病抗原を中心とする腫瘍抗原の mRNA を阻害する方法が、白血病等の腫瘍に対する治療法として応用可能であること、sgRNA による mRNA 切断法を効果的に応用できる腫瘍抗原等の分子を選択し、かつ sgRNA の最も効果的な塩基配列を決定すること、有効な sgRNA について sgRNA ライブラリー用の細胞培養プレートを作成し、細胞傷害性 (MTT) アッセイをベースとした各種腫瘍細胞に対する sgRNA 感受性試験を行うためのキットを作成することが具体的目的であり、これらの検討を行うことにより、ヘプタマー-sgRNA を用いた標的 mRNA 切断法の臨床応用への道を開くことであった。

3. 研究の方法

(1) 腫瘍に対する sgRNA を用いた新しい核酸医薬の開発を目的として、主に白血病等の造血器腫瘍細胞を対象として、腫瘍細胞のアポトーシス・分化の抑制、増殖を促進する因子に対し、網羅的に sgRNA をデザインし、当該 mRNA 発現の抑制、アポトーシスの誘導、細胞増殖の抑制等の検討を行い、有効な sgRNA を選択する。これらの sgRNA ライブラリーを用いた細胞培養プレートを作成し、広範な腫瘍細胞に対する sgRNA 感受性試験を行い、腫瘍の種類毎に有効な sgRNA を選択し、異なる sgRNA の併用効果についての検討も行う。

(2) 各種腫瘍関連遺伝子に対する効果的な sgRNA のデザインと安定化のための RNA 修飾腫瘍細胞のアポトーシス・分化の抑制、増殖を促進する標的 mRNA (腫瘍関連遺伝子 WT1, bcr-abl, aurora kinaseA, hTERT, survivin,

PRAME, proteinase3, Bcl-2, HAGE, Polo-like kinase 1 RHAMM, G250, PARK7 等)の塩基配列において、sgRNA との間で7塩基の相補的配列によりアクセプターステムを形成し、かつその直接の上流で標的 mRNA が5塩基の相補的配列によりTステム(ヘアピンループ構造)を形成するような sgRNA の塩基配列をデザインする。上記の条件に合致した sgRNA のデザインができない場合は、できるだけ類似するようにデザインする。各 sgRNA について、RT/RQ-PCR を用いて標的 mRNA 発現の阻害活性を検討することにより、最適な sgRNA のデザインを決定する。

(3) 各種の白血病細胞株に網羅的に腫瘍関連抗原の sgRNA を加えて培養する。経時的な MTT アッセイによる細胞増殖の抑制、および Annexin V/7AAD 染色した培養細胞をフローサイトメトリーにて解析することにより、sgRNA を介したアポトーシスの誘導について検討する。

(4) in vitro の検討で腫瘍細胞に対する細胞障害活性が認められたsgRNAについては、これらのsgRNAライブラリーを付着させた細胞培養プレートの作成を試みる。96ウエルプレートの各ウエルに各種濃度の sgRNAを加えた培養液を加え乾燥させる。プレート保存に最適な条件を明らかにし、MTT アッセイで各種腫瘍細胞に対する感受性試験を行うためのキットを作成する。このsgRNA感受性キットを用いて、広範な腫瘍細胞についてsgRNA感受性試験を行う。

4. 研究成果

(1) WT1 mRNA を発現している白血病細胞株 K562 において、WT1sgRNA の添加培養により WT1 mRNA の発現が抑制されるか否かを検討した。K562 に WT1sgRNA 添加培養後、細胞より total RNA を抽出し定量 PCR により WT1 mRNA の発現を解析した。対照として EGFP を標的として作成した sgRNA (EGFPsgRNA-3)を用いた。WT1 を標的とした sgRNA は、WT1 mRNA との結合部位の異なる4種類 (WT1sgRNA-2, 3, 4, 5) を用いた。EGFPsgRNA-3 を添加培養した K562 と比較して、WT1sgRNA-2, 3, 5 を添加培養した K562 において WT1 mRNA の発現抑制が認められた。WT1sgRNA-4 を添加培養した K562 においては、WT1 mRNA の発現抑制は認められなかった。

(2) sgRNA の腫瘍細胞の apoptosis 誘導効果は、代表的な造血器腫瘍細胞株である急性前骨髄球性白血病細胞株 HL-60、慢性骨髄性白血病赤白血病型急性転化細胞株 C2F8 において抑制効果が認められた。(図2)しかし、これらの細胞株における抑制効果は再現性を得るための条件設定が難しく、解析に用いやすい細胞株を網羅的に検討した。その結果、急性前骨髄球性白血病由来の NB40 においては安定した結果が得られることが確認された。

(4) 実際の白血病細胞株を用いた検討の前に、

有効sgRNAのスクリーニングと培養条件の細かい検討を行った。その結果、3種類の細胞株において2種類のsgRNAで再現性のある抑制効果を確認することができた。

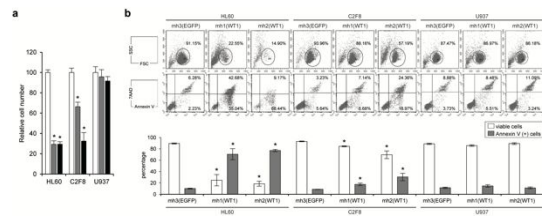
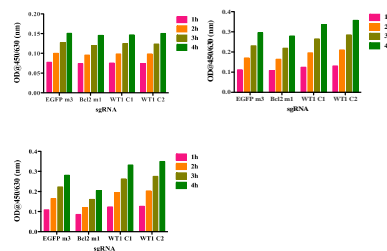


図2 WT1 発現細胞株(HL60, C2F8)に対する WT1 sgRNA のアポトーシス誘導作用. U937 はコントロールとした WT1 低発現株.(a) MTT アッセイによる細胞傷害試験.(b) フローサイトメトリーを用いたアポトーシス誘導試験.

(5) さらに細胞増殖抑制効果、apoptosis 誘導効果を明らかにするために、培養系における glucose 濃度の調整、抗造血管腫瘍剤との併用培養を試みた。target 細胞としては、これまでの検討によって最も安定した結果が得られた NB4 を用いた。glucose 濃度に関しては、当初の予測とは異なり、高濃度の培養系の方が sgRNA による apoptosis 誘導効果、増殖抑制効果が認められ、この点について検討を継続している(図3)。また腫瘍細胞増殖因子抑制作用のある薬剤 (lenalidomide など) 添加では、sgRNA による増殖抑制増強系傾向が認められたが、薬剤そのものによる増殖抑制が優るため、至適薬剤濃度の調整を継続している。

図3 glucose 濃度を上げるにつれ、対照の EGFP sgRNA に比して WT1、Bcl-2 sgRNA に増殖抑制効果が認められた。(EGFP-m3 v.s. Bcl-2-m1, for 3h, $p < 0.001$, EGFP-m3 v.s. Bcl2-m1, for 4h, $p < 0.0001$)



(6) 以上の検討結果をもとに、NB4 をベースとして、glucose 濃度、腫瘍細胞増殖因子抑制剤の調整を行うことで、最も sgRNA の効果を確認しやすい培養プレートを作成することを継続している。sgRNA を用いた研究は近年国内外の施設でも始められており、効果判定の一助になる結果が得られたと思われる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Arisa Haino, Tatsuya Ishikawa, Mineaki Seki, and Masayuki

Nashimoto. TRUE Gene Silencing: Screening of a Heptamer-type Small Guide RNA Library for Potential Cancer Therapeutic Agents. Journal of Visualized Experiments 2016、査読有、2;(112) e53879.

doi: 10.3791/53879.

Tamura M, Kawano M, Sato M, and Masayuki Nashimoto. Involvement of an intracellular vesicular transport process in naked-sgRNA-mediated TRUE gene silencing. Mol. Med. Rep. 2015、査読有 12(4):6365-6369. doi: 10.3892 /mmr.

Shibasaki Y, Seki Y, Tanaka T, Miyakoshi S, Fuse K, Kozakai T, Kobayashi H, Ushiki T, Abe T, Yano T, Moriyama M, Kuroha T, Isahai N, Takizawa J, Narita M, Koyama S, Furukawa T, Sone H, Masuko M. The association of level of reduction of Wilms' tumor gene 1 mRNA transcript in bone marrow and outcome in acute myeloid leukemia patients. Leuk Res. 2015 査読有、39(6):667-71. doi: 10.1016 /j.leukres.2015.03.021

Iizuka S, Oridate N, Masayuki Nashimoto, Fukuda S, and Tamura M. Growth inhibition of head and neck squamous cell carcinoma cells by sgRNA targeting the cyclin D1 mRNA based on TRUE gene silencing. PLoS ONE 2014、査読有、9(12):e114121. doi: 10.1371

/journal.pone.0114121.

Takahashi M, Elbarbary RA, Watanabe N, Goto A, Kamiya D, Watabe Y, Uchiyama T, Narita M, Takahashi M, Takahashi Y, Ishihara N, Miyazawa T, Yoshida T, Kawano M, Tamura M, Nashimoto M Screening of a heptamer-type sgRNA library for potential therapeutic agents against hematological malignancies. Leuk Res. 2014、査読有、38(7):808-15. doi: 10.1016 /j.leukres.2014.03.021.

[学会発表](計1件)

Takahashi Masuhiro, Uchiyama Takayoshi, Iwaya Shunpei, Oiwa Eri, Nishizawa Yoshinori, Hashimoto Shigeo, Bonehill Aude, Kasahara Noriyuki, Narita Miwako. Leukemic plasmacytoid dendritic cell line transduced with caTLR4 gene as a potent antigen presenting cells for

immunotherapy. International Society of Cellular Therapy 21th Annual Meeting 2015年(米国)

出願状況(計0件)

取得状況(計1件)

名称: Heptamer type small guide nucleic acids inducing apoptosis of human leukemia cells

発明者: Masayuki Nashimoto, Miwako Narita 他

権利者: Niigata University, Niigata University of Pharmacy and Applied Life Sciences

種類: 特許

番号: US 9,617,538 B2

取得年月日: 2017年4月11日

国内外の別: 国外(米国)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成田美和子 (NARITA Miwako)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 30281009

(2) 研究分担者

梨本正之 (NASHIMOTO Masayuki)

新潟薬科大学・健康自立総合研究機構・教授

研究者番号: 30228069