

平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 事業名：革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業
2. 研究開発課題名：タンパク質翻訳を促進する新規ノンコーディング RNA を用いた革新的創薬プラットフォームの構築
3. 研究開発代表者：カルニンチ・ピエロ
4. 研究開発の成果

SINEUP は、2012 年に発表 (Nature, 491:454-7, 2012) された、新規ノンコーディング RNA である。機能領域と結合領域の二つのドメインで構成され、任意の対象 mRNA からのタンパク質翻訳を促進するツールとして使うことができる。機能領域はタンパク質翻訳の効率を向上させる機能を持った配列領域であり、結合領域は対象 mRNA に結合する部分である。本課題においては、研究開発目標として、SINEUP の機能を最大化するために不可欠な領域の抽出を行い、**①設計基礎技術を確立**する。そして、SINEUP が生体内で機能し、疾病治癒等の効果を発揮するツールとなりうることを、**②マウスを用いた動物実験を通して検証・実証**する。これらの研究開発目標は**企業導出を見据え、セールスポイントとなるべき科学的知見を得るための必要な過程として設定**しており、これらを達成することで、本技術を企業導出へと繋げていくことを予定している。上記の研究開発目的を達成するため、以下の 2 つの研究開発項目を設定し、研究を進めている。平成 27 年度に関しては以下の成果を得た。

(1) 効果的 SINEUP 設計のためのプラットフォーム構築と評価

SINEUP の効果を検証するためには、最終的にタンパクの発現量を確認することが必要である。その際、ウェスタンブロット (以下 WB) 法によるタンパクの検出のみではスルーットが低く開発効率が悪い。そこで、イメージングシステム Celigo S を使用し、高スルーットの評価系に対応した実験プロトコル (細胞数、SINEUP 導入タイミング、導入量) を構築することとした。Celigo S は高スルーットなイメージングサイトメーターであり、細胞ごとの GFP による蛍光の強度を測定することができる。本機器を用いて、SINEUP による蛍光タンパク量の増大を Celigo S で高速に測定することにより、新規の高スルーット評価系を構築することができる。条件検討の結果、実験プロトコルを策定し、WB 法による低スルーット評価系と同等に、SINEUP による翻訳増幅を検出できることを確認した。最終的に、タンパク質発現を安定的に 3 倍上昇させる高効率 SINEUP-GFP を本評価系において検出することに成功した (図 1)。このことにより、高スルーットの評価系を確立した。

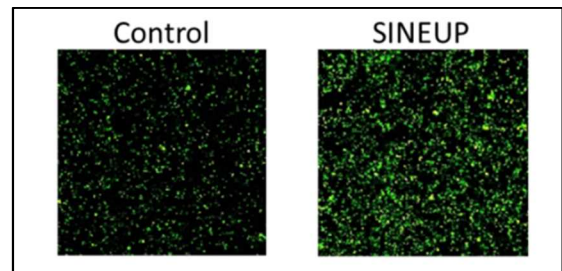


図 1. Celigo S による SINEUP-GFP 高速測定結果。SINEUP を加えた細胞 (右) は、加えていない細胞 (左) に比べて GFP の発現が安定的に 3 倍上昇することを確認

次に、上記において確立したイメージングシステム

Celigo S を用いた評価方法、及びマウス肝臓細胞を用いた WB 法により、マウス肝臓疾患関連遺伝子 X に対する高効率の SINEUP を探索・評価した。当該遺伝子を選んだ理由としては、①X はラット、マウス、ヒトで遺伝子配列がとてもよく保存されていること、②X は組織特異的に発現していること、③X は代謝疾病や肝臓がんなど様々なヒト疾患の原因遺伝子として機能しており、その発現量にともない関連遺伝子の発現が変化するため、他疾患への応用が可能であること、④アニマルモデルが存在すること (肝臓がんには HCC アニマルモデル、また代謝疾病として脂肪肝アニマルモデル等を使用することができ、遺伝子配列がよく保存されているためヒトへの応用が効くこと) から選定した。SINEUP コンストラクトは、6 種類のアンチセンス鎖と 2 種類の長さを変えた SINEUP 領域の組み合わせの 12 種類をデ

ザインした。Hepal-6 株への過剰発現実験の結果、SINEUP 未処理群に対して 1.5 倍以上のタンパク量増加を引き起こす効果のある SINEUP の BD 配列 3 つを WB 法および Celigo S により確認した (図 2)。

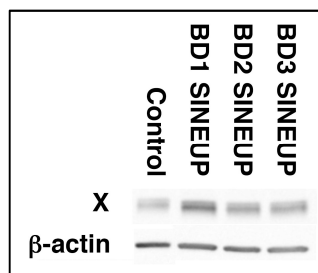


図 2. SINEUP-X のタンパク発現上昇確認実験 (WB 法)。SINEUP を発現した Hepal-6 サンプル (右側 3 レーン) は、コントロール (左側 1 レーン) に比べて X の発現が強くなった。

更に研究を進展させるため、ヒト疾患原因遺

伝子に対する SINEUP の探索・評価を開始した。まず、Celigo S 用 GFP 融

合発現ベクター (標的 mRNA 用) および SINEUP 発現ベクターを構築した。また、他のマウス SINE 配列がより強力な SINEUP 効果を持つか検討するため、マウス SINE エレメントのリストアップを行った。

一部についてはクローニングおよび Celigo S または WB 法による検証を開始した。

(2) マウスを用いた生体臓器における SINEUP の評価

核酸医薬としての有用性を実証するためには、標的臓器での作用や副作用に関する実験的なデータが必要である。そこで、実験対象動物としてマウス、標的臓器を肝臓に設定し、実証実験を行うこととした。これは、マウスが扱いやすいモデル動物であり、肝臓が各種臓器の中で遺伝子導入の行いやすい臓器であることによる。遺伝子導入にはアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用い、マウスの肝臓に遺伝子導入を行う系を構築することとした。AAV は動物に外来遺伝子を導入する上で広く用いられるウイルスベクターである。レポーター遺伝子として GFP を用い、野生型マウス肝臓における導入効率を検討した。肝臓への導入効率が高い事が知られる AAV の血清型 2 を用い、投与後 1 ヶ月、2 ヶ月のマウス肝臓を摘出して、組織切片及び RT-qPCR により遺伝子導入効率を評価した。導入された GFP mRNA の発

現量を qPCR により測定し、ハウスキーピング遺伝子と同程度の発現を確認した。また、組織切片観察による GFP の導入効率の検討の結果、組織切片中の細胞あたり 50%以上の導入効率を達成した。なお、投与後 2 ヶ月では導入した GFP の mRNA 及びタンパクがほとんど検出できなかったことから、投与後 1 ヶ月が評価最適期間であると確定した (図 3)。

次に、マウス遺伝子 X に対す

る SINEUP を野生型マウス肝臓で強制発現する実験を行った。投与一ヶ月後のマウス肝臓および腎臓を摘出し、RT-qPCR 法により SINEUP の肝臓での発現を確認した。また、WB 法により対照群肝臓組織と投与群肝臓組織と比較したタンパク増加量を測定した。平成 27 年度終了時点において、効果について判断するには時期尚早と考えており、さらなる追加実験を行う事としている。また、当該臓器のトランスクリプトーム解析を行うため、CAGE ライブラリを作製した。SINEUP 評価の好対象となる原因遺伝子を持つ病理モデルマウスの選定と実験系の確立については、いくつかの病理モデルを検討対象とした。

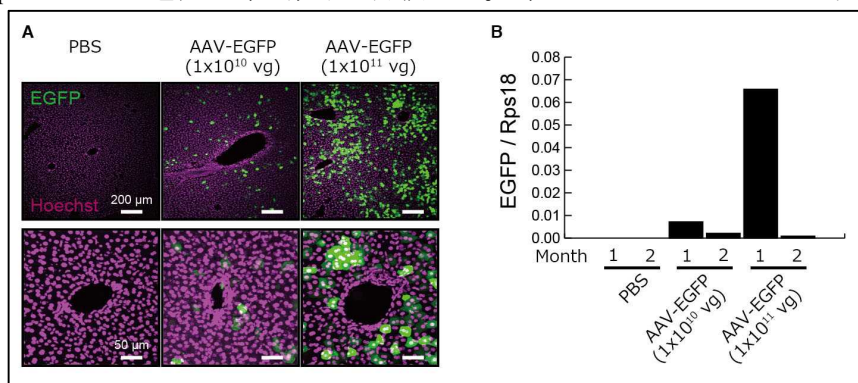


図 3. AAV ベクターによりマウス肝臓に導入された GFP の発現。(A) AAV-EGFP を 1×10^{11} vg で導入された肝臓組織において、GFP による蛍光を検出した (上段右)。下段は上段の拡大図。(B) RT-qPCR による、導入遺伝子の mRNA 発現確認。投与後 1 ヶ月の組織は mRNA が検出されたが、投与後 2 ヶ月の組織は mRNA がほとんど検出されなかった。