

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業
(英語) Basic Science and Platform Technology Program for Innovative Biological Medicine
- 研究開発課題名： (日本語) 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
(英語) Establishing innovative drug development platform with the novel non coding RNA enhancing protein translation
- 研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター
副センター長 カルニンチ・ピエロ
- 所属 役職 氏名： (英語) Piero Carninci (Deputy Director, RIKEN Center for Life Science Technologies)
- 実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日～平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

（和文）

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 28 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 を用いることによって病状改善等の効果が見込まれる、ヒト疾患原因遺伝子のリストアップを行った。選定にあたり、①ハプロ不全型の疾患原因遺伝子であることが報告されていること、②肝臓で主に発現しており、肝臓の疾患であること、③企業から商業ベースでの興味を惹起しやすいと思われること（潜在市場が大きいと思われること）、の 3 点を選定基準として設定した。上記 3 点を満たすと思われる遺伝子 10 個を候補として選び、それぞれについて SINEUP コンストラクトを 3~5 個程度設計した。そのうち、12 個を実際にプラスミドとして構築し、SINEUP の効果を、ヒト胚性腎細胞（以下 HEK293）、ヒト神経芽細胞およびマウス肝癌細胞を用い、評価を行った。その結果、2 遺伝子分、5 個の SINEUP について、活性を認めた。現在は、残りの SINEUP に関して、評価を続けている。

SINEUP 効果を持つ他のマウス SINE を検証するため、ゲノム上から他のサブファミリーに属する SINE B2 を抽出した。選定にあたっては、その SINE 領域近傍に遺伝子のアンチセンス鎖が配置されているものを優先した。次に選定した SINE 領域をクローニングし、GFP を標的遺伝子とした SINEUP 発現ベクターを作製した。HEK293 を用い、SINEUP の効果を評価した。その結果、As-Uchl1 由来（オリジナル SINEUP）の SINEUP コンストラクトと同程度の翻訳促進効果をもつ SINE B2 エlement を 16 個中 11 個得た。

RNA の立体構造は、その機能を解明する上で非常に重要である。SINEUP の立体構造を同定する実験として icSHAPE 法を実施した。平成 28 年度末までに、実験最終ステップ（次世代シーケンサーライブラリーを作成中）に到達しており、平成 29 年度の早い時期にそのデータを解析する予定である。

これらの成果から、SINEUP の機能はマウス SINE B2 エlement で普遍的なことが明らかとなった。また、得られた SINEUP コンストラクトは、企業導出の際の有力なプロダクトとなることが期待される。icSHAPE の結果から予測される RNA 二次構造は、特許取得の際にも用いる予定である。

（2）マウスを用いた生体臓器における SINEUP の評価

H27 年度中に引き続き、マウス肝臓に導入された SINEUP-Hnf4a の影響について解析を

行った。その結果、SINEUPの肝臓での発現量は非常にわずかであり、Hnf4aのタンパク量の変化に関して有意な効果を検証することはできなかった。その原因として、SINEUPの発現に用いたCMVプロモーターが生体内でサイレンシングを受けている可能性が考えられた。そこで、検証期間を1ヶ月から1週間に短縮した実験を行った。その結果、マウス肝臓においてSINEUPの発現を確認し、ウェスタンブロット法において、Hnf4aの有意な翻訳量上昇を確認した。現在、このサンプルに対してCAGE法による全トランスクリプトーム解析を行っている。なお、1週間しかSINEUPをマウス生体に導入できない制限は、今後の病理モデル構築に障害となる。そこで、プロモーターを置換することを考え、肝臓特異的なプロモーター4種類を用いたルシフェラーゼによるレポーター実験を行うべく、発現用プラスミドを構築した。

マウスにおいて実現可能な、動物実験モデルの構築に着手した。先行研究を渉猟した結果、有望なモデルとして、糖尿病モデル、高コレステロール血症モデル、非アルコール性脂肪肝炎モデルの3つを選択し、検討することとした。系のセットアップの容易さ、コスト等を総合的に考慮した結果、高コレステロール血症モデルを第一候補とすることとし、実施の準備を開始した。高コレステロール血症に関与する遺伝子の調査を行い、いくつかの遺伝子を対象遺伝子としてリストアップした。現在これらの遺伝子に対応するSINEUPを設計し、プラスミド構築を行っている。

上記の成果から、病理モデル動物実験を行うための実験環境は、着実に整いつつあると考える。今後は、病理モデル動物実験を強力に推進していく。

(英文)

SINEUP is a novel class of non-coding RNA that was first reported in 2012 (Nature, 491: 454-7, 2012). It consists of two domains, an effector domain (ED) and a binding domain (BD), and can be used as a tool to enhance protein translation from any mRNA of interest. The ED is functional region of SINEUP which is essential for translation upregulation and BD binds to the target mRNA. In this project, we will extract the minimum essential domain for maximizing the function of SINEUP. In addition, we will **(1) establish the basic SINEUP design technology,** and **(2) demonstrate that the SINEUP works *in vivo* and will confirm its therapeutic application using mice experimental models.** These research and development goals are **essential to obtain scientific knowledge for technology transfer.** We are planning to connect this technology to business derivation by achieving these goals. To achieve the above research and development goals, we set up the below-mentioned two research-development items and are conducting research. The following results were obtained in FY2016:

(1) Construction and evaluation of platform for effective SINEUP design

We listed up genes, which are responsible for human disease and are expected to have an effect such as improvement of disease condition by using SINEUP. In the selection, we set criteria as: (1) A gene that is reported as a causative gene of haploinsufficiency disease. (2) It is mainly expressed in liver and disease is affecting liver. (3) Holds promise to attract companies' interest (the potential drug market seems to be large). Ten genes that seemed to satisfy the above three points were selected as candidates and about 3 to 5 SINEUP constructs were designed for each. Of these, 12 were actually constructed as plasmids and the effect of SINEUP was evaluated using human embryonic kidney cells (hereinafter

referred to as HEK 293), human neuroblastoma cells and mouse liver hepatoma cells. As a result, SINEUP activity was observed for 2 genes, 5 number of SINEUP. Currently, we continue to evaluate the remaining SINEUPs.

In order to survey SINEUP effect of other mouse SINE, SINE B2 sequences belonging to different sub-families were extracted from various natural AS long non-coding RNAs of mouse. Next, the selected SINE region was cloned into a SINEUP expression vector targeting EGFP, and HEK 293 cells were used to evaluate the effect of SINEUP. As a result, 11 out of 16 SINE B2 elements tested here upregulated EGFP translation post-transcriptionally, a characteristic SINEUP effect first found in As-Uchl 1 (original SINEUP).

The two-dimensional structure of RNA is very important to elucidate its function and mechanism of action. The *in vivo* click selective 2'-hydroxyl acylation and profiling experiment (icSHAPE) was carried out to identify the functional structural domains of SINEUP in HEK 293 cell. By the end of FY2016, we have reached the final experiment step (creating next-generation sequencer libraries), and we plan to analyze the data as early as in FY2017.

Aforementioned experiments using mouse SINE B2 elements revealed the universality of SINEUPs and expanded the number of experimentally verified SINEUP family members. Furthermore, it is expected that the obtained SINEUPs will be powerful product for companies. The RNA secondary structure derived from icSHAPE data will also be used for patent acquisition.

(2) Evaluation of SINEUP activity in living organ using mouse

The effect of SINEUP-Hnf4a introduced into the mouse liver has been studied since FY2016. We found that the SINEUP expression level in liver was very low, and any significant change in Hnf4a protein amount could not be confirmed. It is considered that the CMV promoter used for expression of SINEUP may be silenced *in vivo*. Then, an experiment in which the verification period was shortened from one month to one week was conducted. As a result, the expression of SINEUP was confirmed in mouse liver, and a significant translation increase of Hnf4a was verified by Western blotting. Whole transcriptome analysis of samples using CAGE is currently undergoing. A restriction that SINEUP can be introduced into mouse only for one week has come up as an obstacle for future pathological model construction. Therefore, to find an optimum promoter, a luciferase reporter experiment using four types of liver-specific promoters will be performed. For this purpose, the expression vectors were constructed.

We began construction of an animal experiment model system that can be realized in mice. After careful review of previous studies, we nominated three promising diseases models; diabetes, hypercholesterolemia, and nonalcoholic steatohepatitis model. As a result of comprehensive consideration of ease of setup of the system, cost, etc., we decided to select the hypercholesterolemia model as the first candidate and started preparation. We investigated genes involved in hypercholesterolemia and listed several promising target genes. Currently, SINEUPs for these genes are being designed and plasmids are under construction.

Based on the above results, we believe that the experimental environment for conducting pathological animal model experiments is steadily being prepared. In the future, we will strongly work towards utilizing this setup for realization of SINEUP therapeutic studies.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 1 件）

1. Schein A, Zucchelli S, Kauppinen S, Gustincich S, Carninci P. Identification of antisense long noncoding RNAs that function as SINEUPs in human cells. Scientific Reports. 2016, 6, Article number 33605.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. SINEUPs, a new class of translation regulatory RNAs—From function to future gene therapy、口頭、Takahashi Hazuki, Nitta Kazuhiro, Schein Aleks, Hon Chung Chau, Sharma Harshita, Zucchelli Silvia, Gustincich Stefano, Carninci Piero、Cold Spring Harbor Laboratory meeting: The Biology of Genomes、1 Bungtown Road Cold Spring Harbor, NY 11724-2213、アメリカ、2016/5/13、国外
2. High throughput screening system for SINEUP non-coding RNAs to promote translation of therapeutic targets、ポスター、Takahashi Hazuki, Nitta Kazuhiro, Kozhuharova Ana, Suzuki Ana Maria Masae, Sharma Harshita, Ohyama Takako, Zucchelli Silvia, Gustincich Stefano, Carninci Piero、RNA2016、The International Conference Center in Kyoto、京都、2016/6/28、国内（国際学会）
3. Development of *in vitro* and *in vivo* evaluation systems for novel non-coding RNA, SINEUP, to enhance translation level of target genes as a nucleic acid medicine、ポスター、Nitta Kazuhiro, Takahashi Hazuki, Nakano Masayuki, Suzuki Ana Maria, Kozhuharova Ana, Sharma Harshita, Kataoka Yosky, Zucchelli Silvia, Gustincich Stefano, Carninci Piero、第 22 回 遺伝子細胞治療学会（JSGCT2016）、虎ノ門ヒルズ 5F、東京、2016/6/28、国内
4. SINEUPs: a new class of natural and synthetic antisense long non-coding RNAs that activate translation、口頭、Zucchelli Silvia, Bon Carlotta, Fasolo Francesca, Abraham Tettey Matey, Chiara Santulli, Takahashi Hazuki, Cotella D, Jones Michael H, Santoro Claudio, Carninci Piero, Gustincich Stefano、7th Non-Coding RNA & RNAi Therapeutics Conference, Hyatt Boston Harbor, MA、アメリカ、2016/9/14、国外
5. Development of *in vitro* and *in vivo* evaluation systems for novel non-coding RNA, SINEUP, to enhance translation level of target genes as a nucleic acid medicine、ポスター、Nitta Kazuhiro, Takahashi Hazuki, Nakano Masayuki, Suzuki Ana Maria Masae, Kozhuharova Ana, Sharma Harshita, Kataoka Yosky, Zucchelli Silvia, Gustincich Stefano, Carninci Piero、第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜、2016/11/30、国内
6. SINEUPs: a new class of natural and synthetic antisense long non-coding RNAs that activate translation、口頭、Zucchelli Silvia, Bon Carlotta, Fasolo Francesca, Abraham Tettey Matey, Chiara Santulli, Takahashi Hazuki, Cotella D, Jones Michael H, Santoro Claudio, Carninci Piero, Gustincich Stefano、Noncoding RNAs: From Disease to Targeted Therapeutics (J5)、Fairmont Banff Springs, Banff, Alberta, カナダ、2017/2/5、国外
7. Development of *in vitro* and *in vivo* evaluation systems for novel non-coding RNA, SINEUP, to enhance translation level of target genes as a nucleic acid medicine、ポスター、Nitta Kazuhiro, Takahashi Hazuki, Nakano Masayuki, Chinzei Mariko, Suzuki Ana Maria Masae, Kozhuharova Ana, Sharma Harshita,

Kataoka Yosky, Zucchelli Silvia, Gustincich Stefano, Carninci Piero, AsiaTIDES: Oligonucleotide & Peptide Therapeutics、The Westin Miyako Kyoto、京都、2017/2/21、国内（国際学会）

3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし