

平成28年度 学内研究助成金 研究報告書

研究種目	<input type="checkbox"/> 奨励研究助成金	<input type="checkbox"/> 研究成果刊行助成金
	<input checked="" type="checkbox"/> 21世紀研究開発奨励金 (共同研究助成金)	<input type="checkbox"/> 21世紀教育開発奨励金 (教育推進研究助成金)
研究課題名	革新的統合ノンコーディング RNA 研究による分子標的薬の開発	
研究者所属・氏名	研究代表者：産業理工学部 生物環境化学科 准教授 神武 洋二郎 共同研究者：産業理工学部 生物環境化学科 教授 藤井 政幸 産業理工学部 生物環境化学科 教授 森田 資隆 農学部 バイオサイエンス学科 教授 北山 隆 理工学部 生命科学科 教授 田村 和朗	

1. 研究目的・内容

本研究では、miRNA、siRNA、lncRNA を含む**新規ガン関連ノンコーディング RNA (Cancer Associated non-coding RNA: CA-ncRNA)** を探索し、その作動原理と生理機能を解明する。さらに得られた成果を基に、ノンコーディング RNA を標的とした、従来とは異なる作用機序を持つ**ガン治療薬開発へと展開するための研究基盤を確立する。**

2. 研究経過及び成果

本年度我々は、マイクロアレイ解析により、ガン化シグナル（活性型 H-RAS 変異体）によって、複数の ncRNA の発現が変動することを明らかとした。これら発現変動があった ncRNA を、CA-ncRNA 候補とした。その中の一つ、PANDA は、ガン化シグナルによって発現量が顕著に増加する。PANDA は long non-coding RNA (lncRNA) に分類される。本研究の結果、PANDA はヒト骨肉腫細胞で特異的に高発現しており、骨肉腫細胞の増殖を促進する機能を持つことが明らかとなった。その作用機構として、PANDA は CDK インヒビター p18 の転写を抑制し、細胞周期の G1 期を促進することが明らかとなった。これらの結果から、PANDA は、骨肉腫治療薬の分子標的となりうるということが考えられた。さらに本研究により、ガン化シグナルによって発現量が減少する新規 lncRNA が同定された (CA-lncRNA-1 と命名)。CA-lncRNA-1 は、ヒト肺癌細胞の増殖を促進する機能を持つことが示唆された。その作用機構として、CA-lncRNA-1 はガン抑制遺伝子である CDK インヒビター p15 の転写を抑制し、細胞周期の G1 期を促進することが明らかとなった。さらに我々は、CA-lncRNA-1 を効率的に阻害する、siRNA オリゴとアンチセンス DNA オリゴの合成に成功した。CA-lncRNA-1 はがん抑制遺伝子 p15 の転写を抑制すること、ヒト肺癌細胞の増殖を促進する機能を持つ可能性があることから、ガン遺伝子である可能性が高いと考えられる。従って、本研究で合成した CA-lncRNA-1 を阻害する siRNA オリゴ、アンチセンス DNA オリゴは、遺伝子医薬のリード化合物になりうると思われた。

また、ヒトの疾患と関連するノンコーディング RNA をサイレンシングするための小分子核酸であるアンチセンス核酸や siRNA 核酸の化学修飾およびコンジュゲートの合成とそれらを用いる遺伝子サイレンシング評価を行った。siRNA 核酸の効果を高めるためにその化学修飾を行い、レポーター遺伝子としての EGFP 遺伝子のサイレンシング効果を子宮頸癌細胞 HeLa を用いて評価した。その結果、siRNA のアンチセンス鎖 (ガイド鎖) 5'-末端に正電荷を有する siRNA 修飾体では RISC 形成後に Ago2 との複合体が不安定化し、全く遺伝子サイレンシング効果が発揮されないことを見出した。非特異的なオフターゲット効果を回避する上で有用な知見となった。アンチセンス核酸、siRNA 核酸の機能向上のためのコンジュゲート合成法について検討し、新規ケモエンザイマティック法により核酸のマルチコンジュゲート合成を可能にする新手法を見出した。この方法により合成できる核酸は核酸医薬として大きな可能性を秘めている。

また、CA-lncRNA の機能を制御する化合物探索用のライブラリー構築のため、機能性ペプチド及び天然低分子の探索を行った。その結果、分化した細胞には結合せず、未分化のマウス胚性腫瘍由来 P19 細胞に特異的に結合するペプチドを同定した。さらに、ハナショウガ根茎部に主成分として含有するセスキテルペン・ゼルンボン分子標的薬として利用するため、各種アクティブサイトに相互作用すると思われるゼルンボンの共役二重結合を保存した誘導化法を開発した。この手法を用いてターゲットとなる生理活性物質との複合体を合成し、良好な評価結果を得ることに成功した。

また、今後 CA-lncRNA のゲノム DNA 解析も重要な課題である。本年度は、ゲノム DNA を対象としたリアルタイム PCR (SYBR Green) による新規の遺伝子コピー数解析法を確立した。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

引き続き、本研究で明らかとなったガン化シグナルによって発現変動する CA-ncRNA 候補遺伝子の機能解析を行っていく予定である。また本研究で機能が明らかとなった CA-lncRNA-1 及び PANDA のゲノム DNA 構造や生理機能、作動原理を解明する。さらに得られた知見に基づき、CA-lncRNA-1 及び PANDA 阻害剤のスクリーニング系を確立し、本研究グループによって作成されたペプチドライブラー、天然低分子ライブラリーの中から、CA-lncRNA-1 阻害剤の探索を行う。また、CA-lncRNA を標的としたアンチセンス DNA/siRNA オリゴとペプチド/糖鎖をコンジュゲートし、新規遺伝子医薬を化学合成する。これら CA-lncRNA-1 阻害剤、新規遺伝子医薬の抗ガン作用は、培養細胞及びマウスを用いて評価する予定である。

4. 成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
Anticancer Research	学術論文	2017年4月
Anticancer Research	学術論文	2017年1月
Cytotechnology	学術論文	2016年8月
Anticancer Research	学術論文	2016年4月
日本農芸化学会 2017 年度大会	口頭	2017年3月18日
第20回バイオ治療法研究会	口頭	2016年12月10日
J.I.S.R.I. e-ASIA 2016	口頭(ポスター)	2016年12月7日
The 2nd International Symposium of Chemistry and Biology of RNA Interference	口頭	2016年9月30日
第15回近畿大学環境科学研究会	口頭	2016年8月8日
12th International Congress of Cell Biology	口頭(ポスター)	2016年7月24日
第53回化学関連支部合同九州大会	口頭(ポスター)	2016年7月2日
第53回化学関連支部合同九州大会	口頭(ポスター)	2016年7月2日
第53回化学関連支部合同九州大会	口頭(ポスター)	2016年7月2日
第53回化学関連支部合同九州大会	口頭(ポスター)	2016年7月2日
第68回日本細胞生物学会大会	口頭(ポスター)	2016年6月17日
第68回日本細胞生物学会大会	口頭(ポスター)	2016年6月17日
第68回日本細胞生物学会大会	口頭(ポスター)	2016年6月17日
Nucleic Acid Therapeutics	学術論文	2017年6月(2月受理)
Expert Opinion. Drug Delivery, Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids	学術論文	2016年10月
Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids	学術論文	2016年7月
日本薬学会医化学部会 Med Chem News,	学術論文	2016年4月
近畿大学産業理工学部研究報告 かやのもり	学術論文	2016年7月
近畿大学産業理工学部研究報告 かやのもり	学術論文	2016年12月
China Patent 2310709638	特許	2016年12月14日
European Patent No. 2594	特許	2016年5月25日
ロシア科学アカデミー	招待講演	2016年11月1日
ロシア科学アカデミー	招待講演	2016年7月24日
The 2nd International Symposium of Chemistry and Biology of RNAi	口頭	2016年9月30日

第 43 回国際核酸化学シンポジウム	口頭 (ポスター)	2016 年 9 月 27 日
第 43 回国際核酸化学シンポジウム	口頭 (ポスター)	2016 年 9 月 27 日
XXII International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids	口頭	2016 年 8 月 18 日
第 2 回日本核酸医薬学会年会	口頭 (ポスター)	2016 年 11 月 15 日
第 53 回化学関連支部合同九州大会	口頭 (ポスター)	2016 年 7 月 2 日
第 53 回化学関連支部合同九州大会	口頭 (ポスター)	2016 年 7 月 2 日
日本農芸化学会 2017 年度大会	口頭	2017 年 3 月 20 日
日本農芸化学会 2017 年度大会	口頭	2017 年 3 月 19 日
日本農芸化学会 2017 年度大会	口頭	2017 年 3 月 19 日
日本農芸化学会 2017 年度大会	口頭	2017 年 3 月 18 日
日本農芸化学会 2017 年度大会	口頭	2017 年 3 月 18 日
日本農芸化学会 2017 年度大会	口頭	2017 年 3 月 18 日
日本農芸化学会 2017 年度大会	口頭	2017 年 3 月 18 日
日本農芸化学会 2017 年度大会	口頭	2017 年 3 月 18 日
日本農芸化学会 2017 年度大会	口頭	2017 年 3 月 18 日
第 18 回生体触媒化学シンポジウム	口頭 (ポスター)	2016 年 12 月 21 日
第 60 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会	口頭	2016 年 10 月 29 日
第 60 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会	口頭	2016 年 10 月 29 日
Nucleic Acid Ther.	学術論文	2017 年 3 月