

# 平成29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 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

昨年度我々は、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。本年度は、これら発現変動があった ncRNA の機能解析とその阻害剤の開発を行った。本年度の解析により、ガン化シグナルによって発現量が増加する ncRNA (CA-ncRNA-2 と命名)と減少する ncRNA (CA-ncRNA-3 と命名)が同定された。CA-ncRNA-2 及び-3 は、長鎖ノンコーディング RNA に分類される。肺癌細胞 H1299 において、CA-ncRNA-2 をノックダウンすると、細胞増殖が顕著に抑制された。細胞周期解析の結果、CA-ncRNA-2 をノックダウンすると、細胞周期の G1 期に停止した細胞数が増加していた。これらの結果から、CA-ncRNA-2 は、細胞周期の G1 期進行を促進することにより、細胞増殖を正に制御する機能を持つことが考えられた。また、CA-lncRNA-3 をノックダウンすると、大腸癌細胞 HCT116 の増殖が顕著に抑制された。細胞周期解析の結果、CA-ncRNA-3 をノックダウンすると、細胞周期の G2/M 期に停止した細胞数が増加していた。これらの結果から、CA-ncRNA-3 は、細胞周期の G2/M 期進行を促進することにより、細胞増殖を正に制御する機能を持つことが考えられた。CA-lncRNA-2 と-3 をノックダウンすると、肺癌細胞及び大腸癌細胞の増殖が顕著に抑制されたことから、本研究で合成した CA-lncRNA-2 と-3 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考えられた。

また、標的遺伝子の 1 塩基変異を敏感に認識できるアンチセンス核酸および siRNA に膜透過ペプチドと NES ペプチドと PEG やコレステロール、ポリアミンなど薬理活性を向上させる機能性分子を結合させたマルチコンジュゲート核酸を合成に成功した。今後、化学合成した核酸医薬を用いて、大腸癌由来細胞を用いてその効果を検証する予定である。

*MUTYH* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が転写を阻害し、ガン化に寄与すると考え、大腸癌を基に解析した。*MUTYH* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化を認める大腸癌で、その発現量は 1/3 に低下する。その結果、大腸癌のイニシエーションに関わる *APC* 遺伝子、プロモーションに関わる *KRAS* 遺伝子に G:C→T:A transversion 変異に生じることを明らかにした

CA-ncRNA 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。ハナショウガ根茎部に含有するゼルンボンを分子標的薬として利用するため、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、各種複合体を合成した結果、良好な抗がん活性を示す化合物を得ることに成功した。その中に強いアポトーシス誘導活性を示す化合物が存在することも明らかとなった。また、マウス胚性腫瘍由来 P19 細胞を使用し、これらの細胞の分化した細胞には結合せず、未分化状態の細胞に結合するペプチドを得た。そして、このペプチドが選択的に未分化状態の細胞に結合することが分かった。さらに、固相合成法により化学的に合成したペプチドのみでも、未分化状態の細胞に結合することが示された。

### 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-lncRNA 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-2 及び-3 のゲノム DNA 構造や作用機構を解明する。さらに、個体におけるこれら lncRNA の生理機能まで踏み込んで解明する予定である。得られた知見に基づき、CA-lncRNA-2 及び-3 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-2 及び-3 阻害剤の探索を行う。また、CA-lncRNA-2 及び-3 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-2 及び-3 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	2018 年 1 月
Molecular Cancer Research	学術論文	2017 年 10 月
Molecular and Cellular Biochemistry	学術論文	2017 年 9 月
Anticancer Research	学術論文	2017 年 4 日
第 40 回日本分子生物学会	学会発表 (ポスター)	2017 年 12 月 8 日
第 40 回日本分子生物学会	学会発表 (ポスター)	2017 年 12 月 2 日
近畿大学サイエンスネットワーク 2017・第 7 回院生サミット	学会発表 (ポスター)	2017 年 9 月 2 日
近畿大学サイエンスネットワーク 2017・第 7 回院生サミット	学会発表 (ポスター)	2017 年 9 月 2 日
近畿大学サイエンスネットワーク 2017・第 7 回院生サミット	学会発表 (ポスター)	2017 年 9 月 2 日
第 54 回化学関連支部合同九州大会	学会発表 (ポスター)	2017 年 7 月 1 日
第 54 回化学関連支部合同九州大会	学会発表 (ポスター)	2017 年 7 月 1 日
第 54 回化学関連支部合同九州大会	学会発表 (ポスター)	2017 年 7 月 1 日
第 69 回日本細胞生物学会	招待講演	2017 年 6 月 14 日
EMBO conference -chromatin and epigenetics-	学会発表 (ポスター)	2017 年 5 月 4 日
Nucleic Acid Therapeutics	学術論文	2017 年 6 月
Expert Opin. Drug Delivery	学術論文	2017 年 9 月
中分子医薬開発に資するペプチド・核酸・糖鎖の合成・高機能化技術(分担執筆)	著書	2018 年 2 月 28 日
マクマリー・生物有機化学 (共訳)	訳書	2018 年 1 月 10 日
近畿大学産業理工学部研究報告 かやのもり	学内紀要	2017 年 7 月 15 日 (2017, 26, 1-10)
近畿大学産業理工学部研究報告 かやのもり	学内紀要	2017 年 12 月 15 日 (2017, 27, 41-45.)
第 44 回核酸化学国際シンポジウム	学会発表 (ポスター)	2017 年 11 月 14-16 日
13th Annual Meeting Oligonucleotide Therapeutics Society	学会発表 (ポスター)	2017 年 9 月 24 日
12th International scientific conference on bioorganic chemistry	招待講演	2017 年 9 月 18 日
All Russian Conference with International Participation	学会発表 (口頭)	2017 年 7 月 24 日

"Biotechnology for the Future of Medicine"		
第 3 回日本核酸医薬学会年会	学会発表（ポスター）	2017 年 7 月 12 日
特許庁	特許出願	2017 年 9 月
特許庁	特許出願	2017 年 9 月
Elsevier	著書	2017 年 8 月
日本薬学会第 138 年会	学会発表（ポスター）	2018 年 3 月 27 日
日本薬学会第 138 年会	学会発表（ポスター）	2018 年 3 月 27 日
日本薬学会第 138 年会	学会発表（ポスター）	2018 年 3 月 27 日
日本薬学会第 138 年会	学会発表（ポスター）	2018 年 3 月 27 日
日本薬学会第 138 年会	学会発表（ポスター）	2018 年 3 月 27 日
日本薬学会第 138 年会	学会発表（ポスター）	2018 年 3 月 27 日
日本薬学会第 138 年会	学会発表（ポスター）	2018 年 3 月 27 日
日本薬学会第 138 年会	学会発表（口頭）	2018 年 3 月 26 日
日本薬学会第 138 年会	学会発表（口頭）	2018 年 3 月 26 日
日本化学会第 98 春季年会 2018	学会発表（ポスター）	2018 年 3 月 21 日
第 19 回 生体触媒化学シンポジウム	学会発表（ポスター）	2017 年 12 月 21 日
第 19 回 生体触媒化学シンポジウム	学会発表（ポスター）	2017 年 12 月 21 日
第 59 回天然有機化合物討論会	ポ学会発表（ポスター）	2017 年 9 月 20 日
第 61 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会	学会発表（口頭）	2017 年 9 月 9 日
Nucleic Acid Therapeutics	学術論文	2017 年 4 月
日本外科学会	学術論文	2018 年 3 月
第 41 回日本遺伝カウンセリング学会	口頭 （10 件）	2017 年 6 月 24 日
第 41 回日本遺伝カウンセリング学会	ポスター （9 件）	2017 年 6 月 24 日
6 <sup>th</sup> InSiGHT	ポスター	2017 年 7 月 6 日
第 23 回日本家族性腫瘍学会	口頭 （5 件）	2017 年 8 月 5 日
第 76 回日本癌学会	口頭	2017 年 9 月 30 日
The 1 <sup>st</sup> International Cancer Research Symposium	口頭	2018 年 3 月 10 日
The 1 <sup>st</sup> International Cancer Research Symposium	ポスター	2018 年 3 月 10 日
特許出願		2017 年 12 月 4 日