

平成26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	分子標的創薬、細胞医療基盤技術の開発	
研究者所属・氏名	研究代表者：藤井政幸 共同研究者：森田資隆、神武洋二郎、山田康枝、北山隆	

1. 研究目的・内容

本研究では核酸化学、天然物有機化学、遺伝子工学、細胞生物学、細胞工学の手法を駆使して、その技術融合のもとに分子標的創薬および細胞医療基盤技術を確立することを目的とする。具体的には、疾病の原因遺伝子を標的とする遺伝子医薬、ガン関連タンパク質および lncRNA を標的とする分子標的薬、ペプチドライブラリーを利用した体性幹細胞の選択的分離とその神経細胞への分化誘導を行う。

2. 研究経過及び成果

(1) 新規遺伝子医薬の開発

藤井と北山が小分子核酸(アンチセンス DNA, siRNA)とペプチドや糖鎖などの核酸コンジュゲート(遺伝子医薬)を化学合成し、山田と森田がヒト細胞を用いて疾病原因遺伝子を標的としたガン抑制効果を評価することを目指した。ヒトアルゴノートの結晶構造、RISC ローディング複合体の形成、RISC への siRNA の積み込み、RISC の成熟等の一連の機構に基づいて siRNA の化学構造を最適化すべく研究を行い、センス鎖の副作用を完全に抑制することに成功した。

(2) 新規遺伝子導入剤の開発

藤井と北山が化学合成した両親媒性ペプチドとその誘導体を用いて、山田と森田が siRNA やプラスミド DNA を細胞内に毒性なく導入する技術を開発することを目指した。ヒト子宮がん細胞由来株 HeLa 及びヒト神経芽細胞腫株 SK-N-SH に GFP を安定発現させ、GFP の siRNA の導入を効率を見ることで、新規遺伝子導入剤の効果を検討した。既存の遺伝子導入剤である lipofectamine および新規に合成した両親媒性ペプチドの導入効率を検討した。新規に合成した両親媒性ペプチドが siRNA を導入し、GFP の発現を抑えることを見出した。

(3) 長鎖ノンコーディング RNA の機能解析

上記(1)で藤井と北山が化学合成した核酸コンジュゲートやその他の化学修飾核酸を用いて、神武が標的の lncRNA をサイレンシング(機能抑制)し、その機能を解明することを目指した。神武らが発見したガン化シグナルによって発現変動する新規長鎖ノンコーディング RNA (CA-lncRNA-1) の発現を抑制する siRNA オリゴの合成に成功した。ヒト骨肉腫細胞 U2OS において、合成した siRNA オリゴを用いて CA-lncRNA-1 をノックダウンすると、U2OS 細胞の死細胞数が増加した。さらに、細胞周期解析を行った結果、CA-lncRNA-1 ノックダウンにより、U2OS 細胞は細胞周期の G1 期に停止することが分かった。この結果から、CA-lncRNA-1 は骨肉腫細胞 U2OS の細胞死を抑制する機能と、細胞周期の G1-S 期移行を促進する機能を持つことが考えられた。また我々は CA-lncRNA-2 の発現を抑制する siRNA オリゴの合成に成功した。この siRNA を用いたノックダウン実験により、CA-lncRNA-2 は大腸癌の足場非依存的増殖を促進する機能を持つことが明らかとなった。

(4) 分子標的抗ガン医薬の開発

神武が機能解明したガン関連タンパク質の機能構造に基づき、北山が化学合成した生理活性化合物を用いて、神武が抗癌活性を評価することを目指した。神武らによるヒト臨床癌検体を用いた解析により、転写因子である YB-1 が、正常肺組織と比較して、非小細胞肺癌部位で高発現していることを明らかとした。また、培養ヒト肺癌細胞を用いた解析により、YB-1 は肺癌細胞の増殖を促進する機能を持つことを明らかとした。さらに、YB-1 を阻害する siRNA オリゴを合成し、その抗ガン活性を評価した結果、合成した siRNA オリゴは、肺癌細胞 A549 及び HCT116 の増殖を顕著に抑制する活性があることが明らかとなった。また、反応多様な天然物を用いた多面的な反応検討の結果、新規骨格の構築および合成法の確立に成功した。

(5) 体性幹細胞分離技術の開発

様々な細胞に分化する前の幹細胞を分取するシステムの構築を目指し、幹細胞を模した細胞として、神経細胞に分化するマウス胚性腫瘍由来 P19C6 細胞、および P19 細胞、心筋細胞に分化するマウス胚性腫瘍由来 P19CL6 細胞を培養した。これらの多分化能と自己複製能を有する未分化な細胞から、特異的な細胞マーカーを探索した。方法としては、ファージディスプレイ法を用いて、分化した細胞には結合せず、未分化な細胞のみを特異的に認識して結合するペプチドの探索を試みた。その結果、未分化状態の P19 細胞に結合するペプチド配列：A-L-P-S-T-S-S-Q-M-P-Q-L を提示しているファージペプチドが得られた。このファージペプチドを用いた蛍光イムノアッセイにより、このファージペプチドが選択的に未分化状態の P19 細胞に結合することが分かり、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 P19 細胞に結合するということが示された。そして、このペプチドを担体に固定したカラムを作製し、これを用いて未分化細胞を分離するシステムの開発を行い、ターゲット細胞上に提示されている幹細胞特有のマーカー分子（幹細胞マーカー）の探索を試みた。しかし、カラムからの溶出の際に得られるタンパク質量を調べたところ、期待される数値が得られなかった。

(6) 細胞分化誘導技術の開発

(5) で森田が分離した体性幹細胞や iPS 細胞と藤井が合成した DNA/RNA コンジュゲートと北山が化学合成した生理活性化合物を用いて、山田が神経細胞等への分化誘導技術を開発することを目指した。神経芽細胞腫 SK-N-SH にレチノイン酸、NGF, BDNF 添加して、神経細胞へ安定に分化できる条件を決定した。

3. 本研究と関連した今後の研究計画

(1) 新規遺伝子医薬の開発

RNA 干渉ルートの詳細なメカニズムを解析すると同時に、siRNA の化学構造の最適化、新たな多重コンジュゲートの合成法の開発を進めながら、新規な多機能 siRNA を開発する。

(2) 新規遺伝子導入剤の開発

新規両親媒性ペプチドは一種類しか検討していないため、今度は他の 2 種類と使用濃度を検討する予定である。

(3) 長鎖ノンコーディング RNA の機能解析

ガン細胞増殖を促進する機能を有する CA-1ncRNA-1 及び-2 の作用機序を解明する。具体的には、CA-1ncRNA-1 及び-2 の標的遺伝子及び結合タンパク質を同定し、標的遺伝子の転写制御機構を明らかとする。また、高解像度タイリングアレイを用いて、ガン化に関与する新規長鎖ノンコーディング RNA を網羅的に同定する。

(4) 分子標的抗ガン医薬の開発

神武らが機能解明したガン関連タンパク質 YB-1 の作用機序を解明し、その知見に基づいて、化学合成により YB-1 阻害剤を開発する。

(5) 体性幹細胞分離技術の開発

ファージディスプレイ法を用いて、様々な種類のペプチド配列が提示されたコンビナトリアル・ペプチドライブラリーから、神経細胞や心筋細胞に分化する前の未分化な幹細胞などを特異的に認識して結合するペプチドの探索を網羅的に行い、様々な幹細胞に特異的に結合するペプチド分子のデータベースの構築を目指す。そして、単離されたペプチドを担体に固定したカラムを作製し、これを用いて未分化細胞を分離するシステムの開発を行い、ターゲット細胞上に提示されている未分化細胞特有のマーカー分子（幹細胞マーカー）を特定し、幹細胞のシグナル解析を行うツールの開発を目指す予定である。

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)
藤井政幸		
Nucleic Acids Research, Symp. Ser.,	学術論文	2014年11月
Nucleic Acids Research, Symp. Ser	学術論文	2014年11月
Proceedings of the XXI Round Table on Chemical Biology of Nucleic Acids	Proceeding	2014年9月
第51回化学関連支部合同九州大会	学会発表	2014年6月
第51回化学関連支部合同九州大会	学会発表	2014年6月
第51回化学関連支部合同九州大会	学会発表	2014年6月
第51回化学関連支部合同九州大会	学会発表	2014年6月
EMBO Conference, Chemical Biology 2014	学会発表	2014年8月
XXI Round Table on Chemical Biology of Nucleic Acids	学会発表	2014年8月
アンチセンス・遺伝子・デリバリーシ ンポジウム2014	学会発表	2014年9月
第4回CSJ化学フェスタ2014	学会発表	2014年10月
The 41 st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry	学会発表	2014年11月
The 41 st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry	学会発表	2014年11月
日本化学会第95春季年会	学会発表	2015年4月
森田資隆		
シーエムシー出版	著書	2014年10月
技術情報協会	著書	2014年4月
シーエムシー出版	著書	2014年4月
第8回バイオ関連化学シンポジウム	ポスター	2014年9月
第13回近畿大学環境科学研究会	口頭	2014年8月
第51回化学関連支部合同九州大会	ポスター	2014年6月
神武洋二郎		
Genes Cells	学術論文	2014年6月
Cytotechnology	学術論文	In press
生化学	学術論文	2015年4月(予定)
第51回化学関連支部合同九州大会	学会発表	2014年6月28日
第51回化学関連支部合同九州大会	学会発表	2014年6月28日
2014年度日本農芸化学会西日本支部大 会	学会発表	2014年9月18日
第73回日本癌学会学術総会	学会発表	2014年9月27日
The 1st International Symposium of Chemistry and Biology of RNA Interference	学会発表	2014年11月4日
第18回バイオ治療法研究会	学会発表	2014年12月13日
日本農芸化学会2015年度大会	学会発表	2015年3月28日
北山 隆		
<i>Biol. Pharm. Bull.</i>	雑誌	2014年10月

株式会社シーエムシー出版	著書	2014年8月
フォトポリマー懇話会第204回例会	口頭	2014年7月
第58回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会(依頼講演)	口頭	2014年9月
第58回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会(2件)	口頭	2014年9月
日本農芸化学会関東支部2014年度支部大会(1件)	口頭(ポスター)	2014年10月
Active Enzyme Molecule 2014(1件)	口頭(ポスター)	2014年12月
日本化学会第95春季年会(7件)	口頭(内ポスター5件)	2015年3月