

## 《若手研究者紹介》



## RNA 干渉の適用による疾患治療法の開発

高 橋 有 己\* Yuki Takahashi

京都大学大学院薬学研究科

## 1. は じ め に

筆者が研究室に配属され、薬剤学分野における研究生生活を始めてちょうど10年が経過した。配属されてからの学部生・大学院生時代、および1年間のポスドクの後には助教として京都大学大学院薬学研究科の病態情報薬学分野（主宰 高倉喜信教授）で研究生生活を送ってきた。今回は、若手研究者紹介という形で寄稿する機会をいただいたので、筆者が薬剤学という分野で現在までに行ってきた研究について紹介させていただきたい。

## 2. 修 士 課 程

筆者が研究室に配属され、薬剤学における研究を開始したのは2003年の4月であるが、当時は1998年に線虫において発見されたRNA干渉という現象が哺乳類においても適用可能であることが報告される間もない時期であった。RNA干渉は短い2本鎖RNA (siRNA) が塩基配列特異的に相補的な配列を有するmRNAを分解可能な現象であり、その遺伝子発現抑制効果は非常に特異性が高くかつ強力であることから注目を集め始めていた。当時の研究室はいち早くこの現象に着目し、その利用に向けての研究を始めていた。そのような研究室の中で、筆者は*in vivo* RNA干渉の効率的誘導法の開発と癌治療への適用

というテーマのもとで研究を開始した。RNA干渉による遺伝子発現抑制効果は強力かつ特異的であるが、siRNAあるいはsiRNA発現プラスミドDNAが存在する細胞においてのみ誘導されるために、RNA干渉を用いた癌治療の実現にはこれらの分子を癌細胞内へデリバリーすることが必須となる（図1）。筆者がRNA干渉に関する研究を始めた当時は、RNA干渉に関する研究は培養細胞を用いたものがほとんどであり、*in vivo* RNA干渉の効率的誘導についての報告はほとんど存在せず、その方法論についても確立されていなかった。そこで筆者らは既に遺伝子治療の分野において開発されてきたDDS技術を応用することで、*in vivo*において標的細胞への効率的なsiRNAデリバリーが可能になるのではないかと考えた。また、癌細胞において効率的にRNA干渉を誘導可能な方法の開発には、癌細胞内の遺伝子発現量を定量的に評価可能な実験系の利用が非常に有用であると考え、マウス黒色細胞腫B16細胞をモデルの癌細胞とし、ホタルおよびウミシイタケの2種類のルシフェラーゼを安定に発現する細胞株B16/dual Lucを樹立することで癌細胞における遺伝子発現抑制効果についての定量的な評価方法を開発した。この細胞をマウス皮下に移植することにより作製した原発性腫瘍モデルにおいて、ホタルルシフェラーゼを標的とするsiRNAまたはsiRNA発現プラスミドDNA水溶液を腫瘍組織内に注入後に電気パルスを加えることで投与24時間後の標的遺伝子発現を対照群の約30%にまで抑制可能であることを見出した。また、B16細胞において癌細胞の増殖等に関与した遺伝子である $\beta$ -catenin, hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )の発現を抑制することで癌細

\*2008年3月京都大学大学院薬学研究科博士課程修了。  
2008年4月～2009年3月ピッツバーグ大学博士研究員。  
2009年4月より京都大学大学院薬学研究科助教、現在に至る。好きな言葉：一石二鳥。趣味：スポーツ全般。  
連絡先：〒606-8501 京都府京都市左京区吉田下阿達町46-29 E-mail: ytakahashi@pharm.kyoto-u.ac.jp

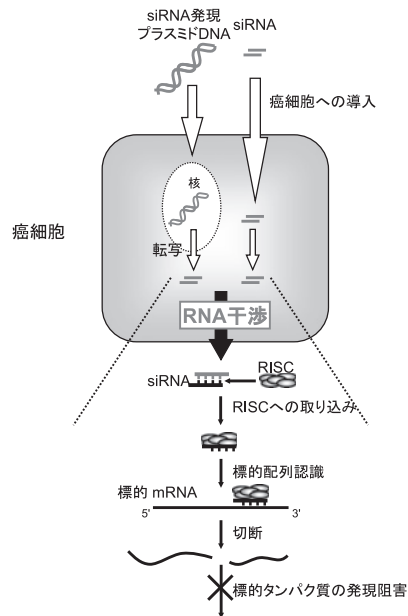


図1 RNA 干渉の誘導による疾患治療

## RNA干渉による癌治療

- ・塩基配列に基づく高い特異性  
- 低い副作用
- ・強力な遺伝子発現抑制効果  
- 高い治療効果
- ・siRNAの低い細胞透過性  
- 癌細胞へのデリバリーの必要性

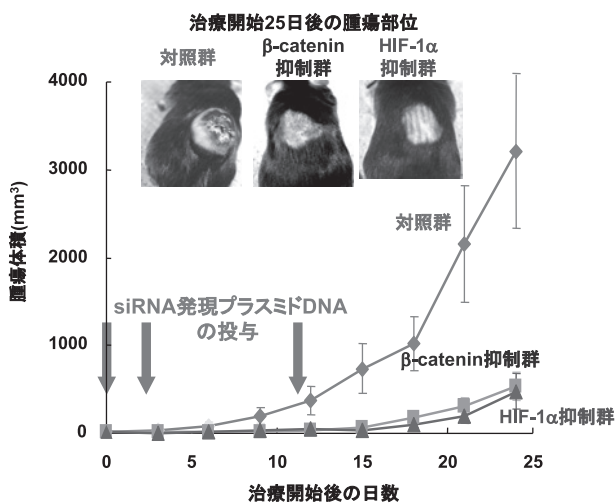


図2 固形腫瘍組織におけるRNA干渉の誘導による治療効果

胞の増殖を抑制可能であることを培養細胞における実験系で見出し、上述の方法を用いて腫瘍組織におけるβ-cateninあるいはHIF-1αの遺伝子発現を抑制することで、腫瘍組織の増殖を大幅に抑制することに成功した(図2)<sup>1)</sup>。

また、構築したB16/dual Luc細胞は簡便かつ定量的にRNA干渉効果を評価可能とする細胞である。筆者らの検討において、種々の濃度のsiRNAをトランスフェクションした後のルシフェラーゼ活性を経時的に評価し、遺伝子発現抑制効果がsiRNAの濃度依存的であることが示されている。RNA干渉による

遺伝子発現抑制効果は、ある時点での最大抑制率を指標に評価されることが多いが、遺伝子発現抑制の結果として表れる効果の観点からは抑制強度のみならず抑制時間も重要である。そこで、薬物速度論解析において用いられるモーメント解析を、B16/dual Luc細胞のルシフェラーゼ活性の経時変化データに当てはめ、AUC<sub>IE</sub>およびMRT<sub>IE</sub>をRNA干渉効果の強度および持続時間の新たな指標として提唱した。また、siRNAおよびsiRNA発現プラスミドDNAによる遺伝子発現抑制効果の定量的比較を行う際にも本方法論は有用であり、1分子あたりの遺伝子発現抑制効果はsiRNA発現プラスミドDNAの方がsiRNAと比較して約50倍強力であることを示した。また、遺伝子発現抑制効果の持続についてMRT<sub>IE</sub>を用いて評価を行ったところ、siRNA発現プラスミドDNAの方が2~3倍有利であった。

### 3. 博士課程

博士課程に進学し引き続きRNA干渉を利用した癌治療法の開発を行った。原発性腫瘍に関する検討においては腫瘍内への直接投与が有効であったが、癌細胞が広範囲に分布する転移癌に対しては経血管投与が有効であると考えた。そこで、肝臓への高効率遺伝子導入法として知られるハイドロダイナミクス法を利用することで、肝臓に転移した癌細胞にも血流を介してsiRNAおよびsiRNA発現プラスミド

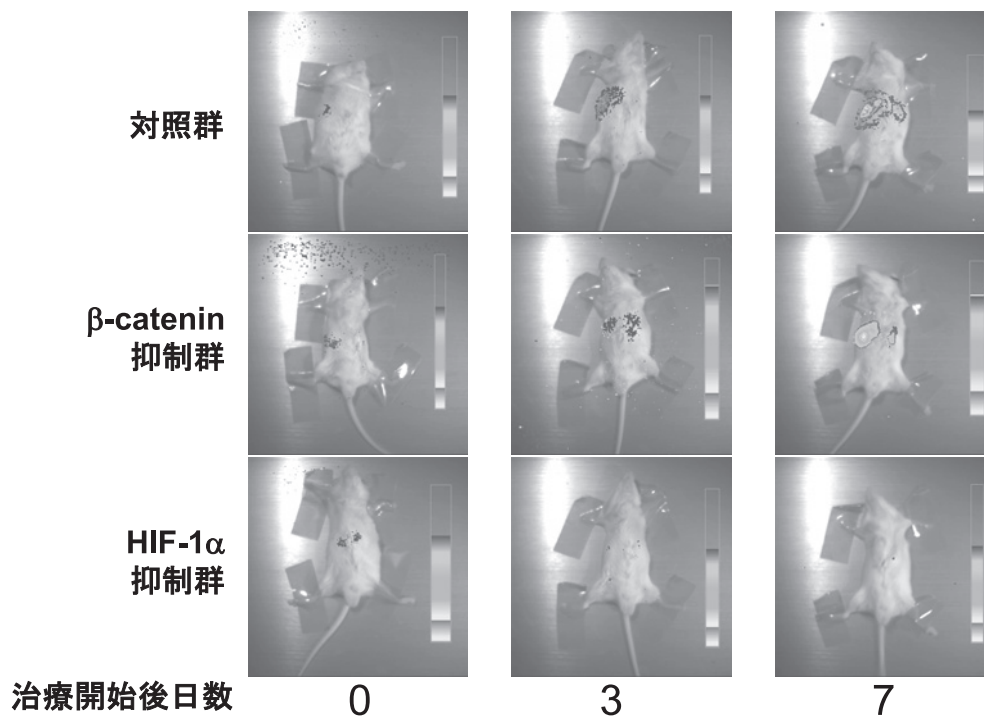


図3 肝転移腫瘍における RNA 干渉の誘導による治療効果

DNA をデリバリー可能ではないかと考えた。その結果、ルシフェラーゼ遺伝子で標識した B16/dual Luc 細胞を門脈内に移植することで作成した実験的肝転移モデルマウスにおいて、肝臓中癌細胞での標的遺伝子発現を有意に対照群の 40~50% 程度にまで抑制可能であることを見出した。そこで、マウス結腸癌細胞株 Colon26 細胞を門脈より移植することで作製した肝転移腫瘍モデルを用いて  $\beta$ -catenin または HIF-1 $\alpha$  を標的とする siRNA 発現プラスミド DNA の癌細胞増殖抑制効果について調べた。培養 Colon26 細胞を用いた *in vitro* の系においては  $\beta$ -catenin を標的とする siRNA 発現プラスミド DNA の方が HIF-1 $\alpha$  を標的とする pshRNA より強力な癌細胞増殖抑制効果を示した。両 siRNA 発現プラスミド DNA の物性は同じであり肝臓中の癌細胞へのデリバリー効率は同程度であることから、 $\beta$ -catenin を標的とする siRNA 発現プラスミド DNA の方が肝転移性腫瘍モデルにおいて高い癌細胞増殖抑制効果を示すと考えられた。しかしながら  $\beta$ -catenin を標的とする siRNA 発現プラスミド DNA の投与では癌細胞増殖抑制効果はほとんど認められなかった一方で、HIF-1 $\alpha$  を標的とする siRNA 発現プラスミド DNA を投与したところ癌細胞の増殖を効率よく抑制可能であった (図 3)。このことから、肝臓中の癌細胞内の遺

伝子発現抑制以外の要因が肝臓における RNA 干渉の誘導による癌細胞増殖抑制効果に関与していると推察された。HIF-1 $\alpha$  は低酸素条件下で誘導され、VEGF に代表される癌細胞の転移・増殖を促進する遺伝子の転写を亢進する遺伝子であるが、正常細胞においても低酸素状態によって誘導される遺伝子であり、正常細胞におけるその発現の誘導によっても癌細胞の増殖・転移を亢進しうる。より詳細な検討を行ったところ、癌細胞の肝臓への転移によって肝臓構成細胞においても HIF-1 $\alpha$  の発現が亢進すること、肝臓構成細胞における HIF-1 $\alpha$  の発現のみを抑制した場合においても癌転移・増殖を有意に抑制したことから、肝臓構成細胞における HIF-1 $\alpha$  の発現が癌転移を促進することが明らかとなった。その一方、癌細胞および肝臓構成細胞の両細胞群での HIF-1 $\alpha$  の発現を抑制することで、肝臓構成細胞における HIF1 $\alpha$  の発現を抑制した場合より顕著に癌細胞増殖が抑制されたことから、肝臓に到達した癌細胞および肝臓構成細胞の両者における HIF-1 $\alpha$  の発現が癌転移・増殖を促進することが明らかとなった。以上の結果から HIF-1 $\alpha$  を標的とすることで、癌細胞のみならず肝臓構成細胞も標的細胞となりえること、および HIF-1 $\alpha$  を標的とした RNA 干渉が肝転移抑制に有効であることが示された<sup>2)</sup>。



博士課程に進学したということで、もうひとつのテーマとしてインターフェロン (IFN) を遺伝子の形で投与する、IFN 遺伝子治療に関する研究も行うことになった。研究テーマが増えたことに伴い、そのテーマの遂行のために4回生、修士課程の院生を直接指導する機会をいただいたが、そのことによって助教になった後の研究指導につながるいい経験となった。幅広い研究テーマに興味を持つきっかけにもなり、その後の研究生活の幅を広げるのにも非常に役立ったのではないかと思われる。

博士課程に進学して1年目の春に早速アメリカ遺伝子治療学会 (ASGT) で発表する機会を与えていただいた。このときの演題が口頭発表に採択され、英語で口頭発表するという貴重な経験をすることができた。博士課程に進学した当初からアカデミアに行きたいという希望を持っていたが、博士課程在学中に海外の学会に積極的に参加させていただいたこともあり、博士課程の2年目には卒業後には海外で研究を行ってみたいと思うようになっていた。病態情報薬学分野の西川元也准教授に Pittsburgh 大学の Wen Xie 博士を紹介していただいた。Xie 博士の研究のメインテーマは、遺伝子発現の制御因子として働く核内受容体による生理機能の解析であった。RNA 干渉とはまた別の機構で働く遺伝子発現制御機構であり、他の遺伝子発現制御機構について習得するいい機会と考え Xie 博士の研究室にお世話になることに決めた。

#### 4. 留 学 時 代

2008年の3月に博士課程を修了し、4月よりアメリカの Pittsburgh 大学薬学部の Xie 博士の Center for Pharmacogenetics に postdoctoral associate としてお世話になった。渡米後、大学との雇用関係の締結から始まり、実験を行うのに必要な、動物実験・放射性物質取り扱い・感染性サンプル取り扱いに関する講習を受けた後に研究を開始した。

核内受容体は細胞質または核内に存在し、各種ホルモンや一部の脂肪酸など脂溶性の高い物質をリガンドとする受容体であり、リガンドを認識した後特定の遺伝子の DNA 配列に結合してその遺伝子発現を調節する。初期に同定された核内受容体の配列をもとに配列の相同性から多数の核内受容体スーパーファミリーがクローニングされたが、そのリガンド

および生理機能については未だ明らかとされていない受容体が多数存在し、オーファン核内受容体と呼ばれている。AKR1B7 (aldo-keto reductase family 1, member 7) は AKR スーパーファミリーの一員であり、過酸化脂質の解毒に関して重要な役割を果たすことが示唆されている酵素である。その遺伝子発現の調節について核内受容体の関与が示唆されており、小腸における AKR1B7 の発現が Liver X Receptor (LXR) によって誘導されることが既に報告されていた。一方、pregnane X receptor (PXR) および constitutive androstane receptor (CAR) は異物に対してセンサーとして働き、外因性および内因性有害物質の解毒に関与する核内受容体であることから、AKR1B7 の発現調節への関与が考えられたが、その詳細については不明であった。そこで筆者らは PXR および CAR による AKR1B7 の発現調節への関与についてマウスモデルを用いて検討を行った。PXR のアゴニスト、PCN あるいは CAR のアゴニストである TCPOBOP をマウスに投与することで、肝臓中、あるいは小腸における AKR1B7 の mRNA 発現が上昇した。また、PXR KO マウスにおいては、PCN の投与による AKR1B7 の mRNA 発現の上昇は認められなかった一方で、TCPOBOP の投与による AKR1B7 の発現上昇が観察された。CAR KO マウスにおいては逆の結果が観察された。また、PCN を投与したのち、マウス小腸中の過酸化脂質の指標である Malondialdehyde (MDA) 量を測定したところ、PCN の投与により MDA 量は減少した。よって、PXR の活性化により酵素活性を有した AKR1B7 が誘導されることが示唆された。AKR1B7 のプロモーターは PXR あるいは CAR によって活性化された。また、プロモーター中の塩基配列について調べたところ、3つの Direct Repeat (DR) 4型の核内受容体結合配列を見出した。発見した DR4 は PXR-RXR および CAR-RXR ヘテロダイマーと結合可能であった。また、プロモーター中の DR4 に変異を導入したところ PXR および CAR による活性化は消失した。以上の結果については幸運にも論文にまとめることができた<sup>3)</sup>。

別のテーマとして、Sulfotransferase 2 (SULT2) と呼ばれるトランスポーターをノックアウトしたマウスを創製することでその生理機能について明らかにすることを旨とする研究を開始した。ノックアウト

マウスの創製は一般的に数年かかることが多く、筆者は標的遺伝子のノックアウトに用いるプラスミド DNA の作成と ES 細胞への導入までを済ませて引き継いでいる。2009 年 4 月から京都大学の薬学部助教として赴任することが決まり、1 年間のアメリカ留学生生活を終えて帰国することとなった。

## 5. 助教時代

原発性腫瘍モデル、あるいは転移性腫瘍モデルいずれの場合においても癌細胞の増殖の抑制に成功したが、癌細胞の根絶は非常に困難であった。効果的な腫瘍増殖の抑制が可能であった原発性腫瘍モデルにおいても癌細胞の根絶は困難であり肺への癌細胞の転移も観察された<sup>4)</sup>。その大きな原因はデリバリー効率率が十分ではないために、デリバリーされなかった一部の生存した癌細胞が再び増殖してしまったためと考えられる。そこで、より効果的な治療法の開発にはより多数の標的細胞において RNA 干渉を誘導可能なデリバリーに関する方法論の開発が必要と考え、現在さらに効率的に RNA 干渉を誘導可能な方法の開発について研究を行っている。また、RNA 干渉の誘導による抗腫瘍効果を癌免疫療法などの他の手法との併用による、癌細胞の根絶方法の開発についても検討を行う予定である。RNA 干渉を疾患治療に直接適用するだけでなく、他の手法との併用の可能性についても検討しており、前述の IFN 遺伝子治療と RNA 干渉による遺伝子発現抑制効果を併用することで、IFN 遺伝子治療を改善可能であることも見出している<sup>5)</sup>。今後は、併用の最適化についてさらに研究したいと考える。

筆者が着任した年は薬学部の 6 年制教育がスタートして初めての 4 回生が研究室に配属される年であった。配属された 6 年制学生については研究科全体でも当然初めてのこともあり、教育のカリキュラムも試行錯誤しているような状況であった。そのような状況において、教員として実務実習の事前学習、とくに Objective Structured Clinical Examination (OSCE) に関する教育に携わらせていただき、教員生活をスタートするに当たり薬学部における教育に

ついて考えるいい機会となった。一方で、6 年制学生は、4 回生時には OSCE および Computer Based Testing (CBT) の準備期間、5 回生時は計 22 週間にわたる病院実習・薬局実習、6 回生時には国家試験とそのための試験準備期間があるために、4 年制学生に比べて研究に使える時間が減少するが、効果的に研究指導を行うことで効率的に研究を進めてもらえればと考える。

## 6. おわりに

以上、薬剤学の研究に関わるに至った経緯とその後の研究生活について、振り返った。今後は、既存の DDS の概念にとらわれず、より効果的に RNA 干渉を誘導可能な方法の開発を行っていきたいと考える。今回振り返ってみると、今までに多くの方々にお世話になってきたことを改めて実感したので、それらの方々に感謝しつつ、筆者の方からも何かをお返ししながら研究を続けていけたらと思う。

## 引用文献

- 1) Y. Takahashi, M. Nishikawa, Y. Takakura. Suppression of tumor growth by intratumoral injection of short hairpin RNA-expressing plasmid DNA targeting  $\beta$ -catenin or hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , *J. Control. Release*, **116**, 90–95 (2006).
- 2) Y. Takahashi, M. Nishikawa, Y. Takakura. Inhibition of tumor cell growth in the liver by RNA interference-mediated suppression of HIF-1 $\alpha$  expression in tumor cells and hepatocytes, *Gene Ther.*, **15**, 572–582 (2008).
- 3) M. J. Liu, Y. Takahashi, T. Wada, J. He, J. Gao, Y. Tian, S. Li, W. Xie, The aldo-keto reductase Akr1b7 gene is a common transcriptional target of xenobiotic receptors pregnane X receptor and constitutive androstane receptor, *Mol. Pharmacol.*, **76**, 604–611 (2009).
- 4) Y. Takahashi, M. Nishikawa, T. Suehara, N. Takiguchi, Y. Takakura, Gene silencing of  $\beta$ -catenin in melanoma cells retards their growth but promotes the formation of pulmonary metastasis in mice, *Int. J. Cancer*, **123**, 2315–2320 (2008).
- 5) Y. Takahashi, E. Vikman, M. Nishikawa, M. Ando, Y. Watanabe, Y. Takakura, Persistent interferon transgene expression by RNA interference-mediated silencing of interferon receptors, *J. Gene Med.*, **12**, 739–746 (2010).