

化学修飾改変マイクロRNA-143
を用いたがん治療の可能性
—DDSは必要か—

岐阜大学大学院 連合創薬医療情報研究科

赤尾幸博

これまでの遺伝学の流れ

1950年代 DNA 2重らせん構造
ワトソン、クリック

1980年代後半 PCR

1993年—2003年 ヒトゲノム計画

1990年代後半— RNA新大陸

2006年 メローとファイアー博士がRNA干渉
でノーベル賞を受賞する

ヒトゲノム塩基配列の解読で明らかにされたこと

1. ヒトゲノム計画が終了し、タンパク質をコードする遺伝子の総数が約22,000個と見積もられた。この数は予想をはるかに下回る結果であり、ショウジョウバエの遺伝子の数と大きな差はない。

ヒトが持つ複雑な感情、創造力など高度な脳機能を遺伝子の数からは理解することはもはや不可能である。

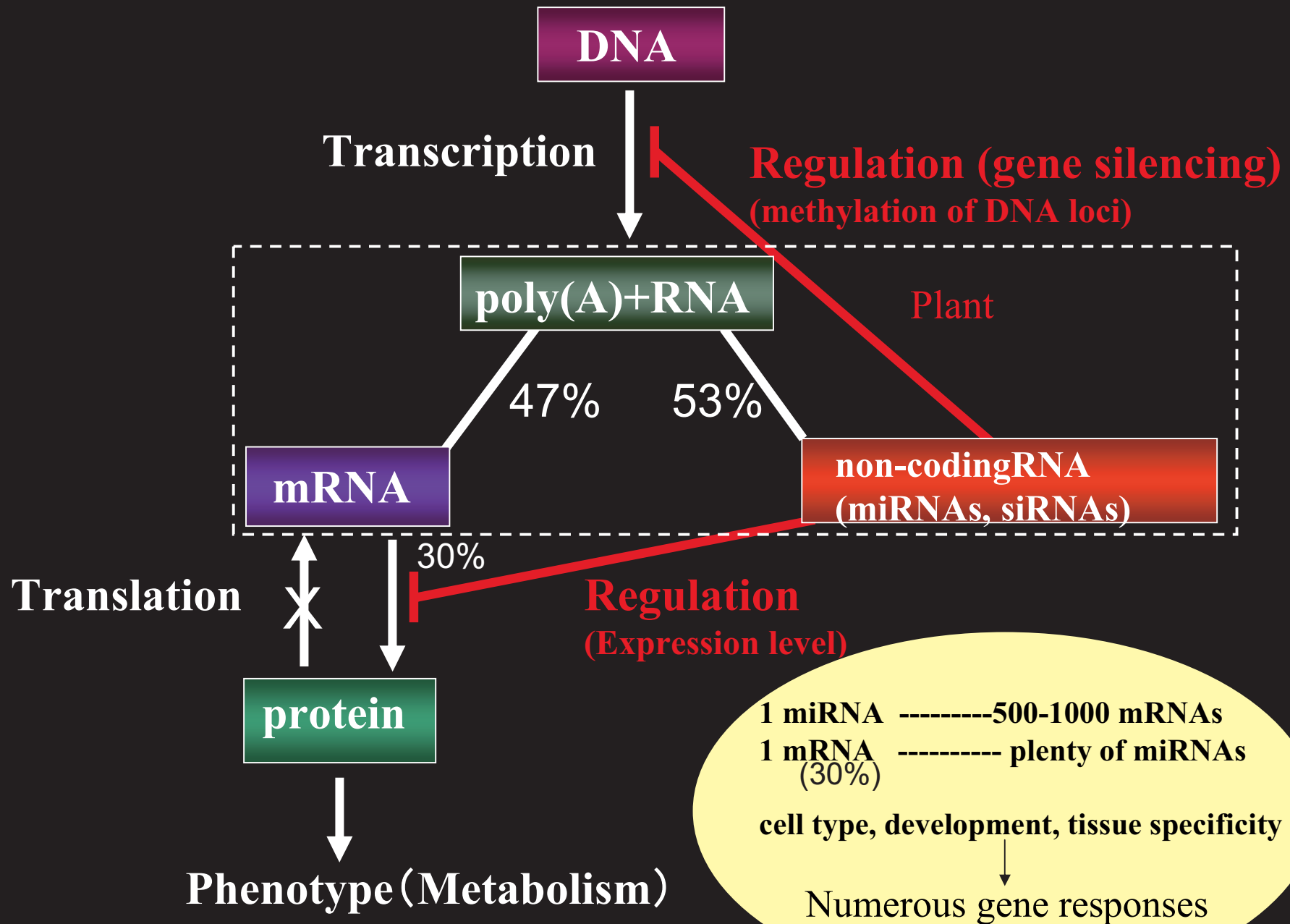
2. 疾病の原因となる遺伝子の構造が明らかになり、発症の解明および創薬へと展開される。

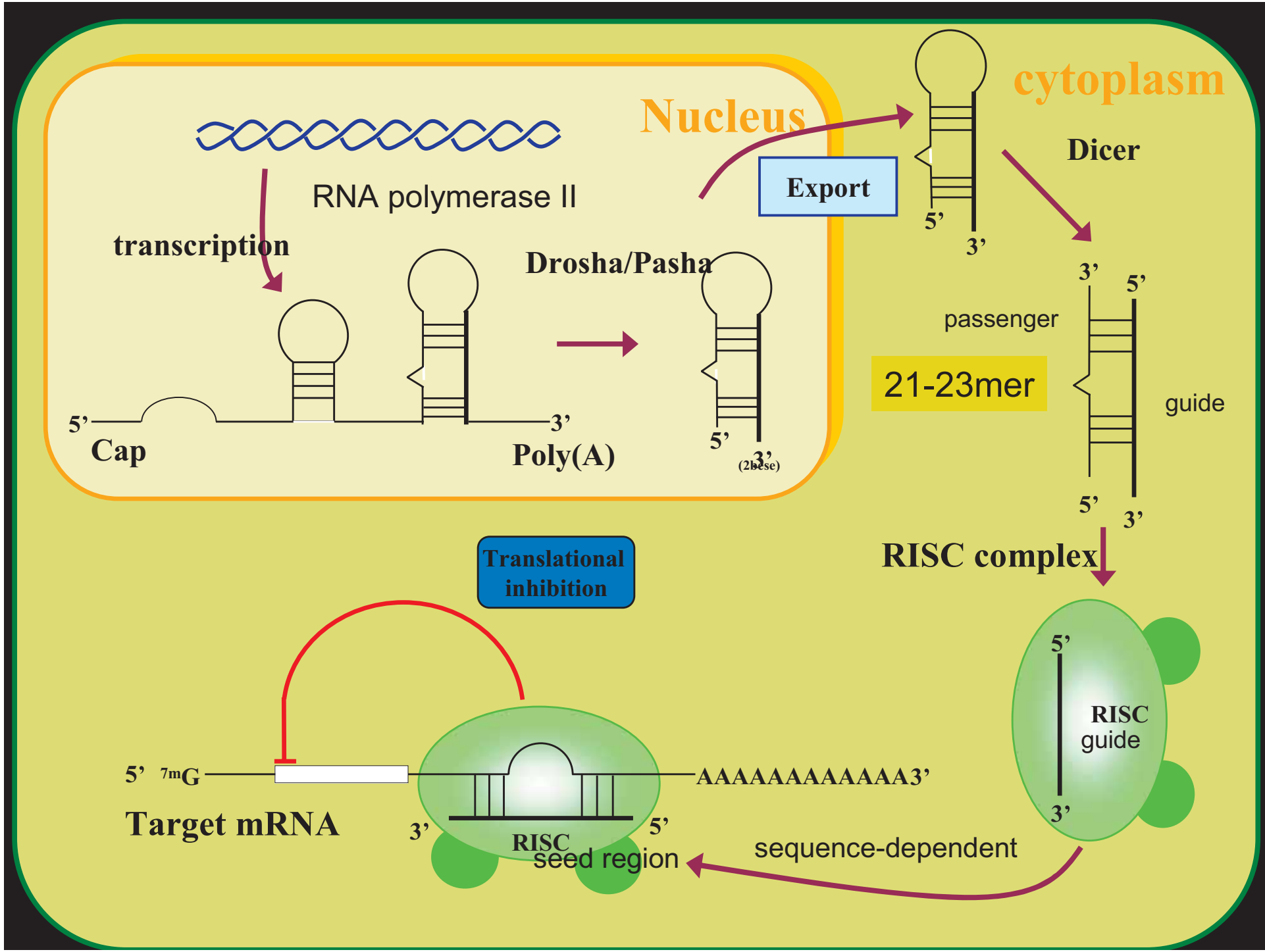
3. ヒトゲノムの98%にもおよぶタンパク質をコードしないnon-coding領域から大量の転写産物が見つかった(ncRNA)。

生命の複雑さとゲノムに存在するnon-coding領域の増加には明確な相関がみられ、高度な生命現象のしくみはむしろncRNAが担っている可能性さえ示唆されている。

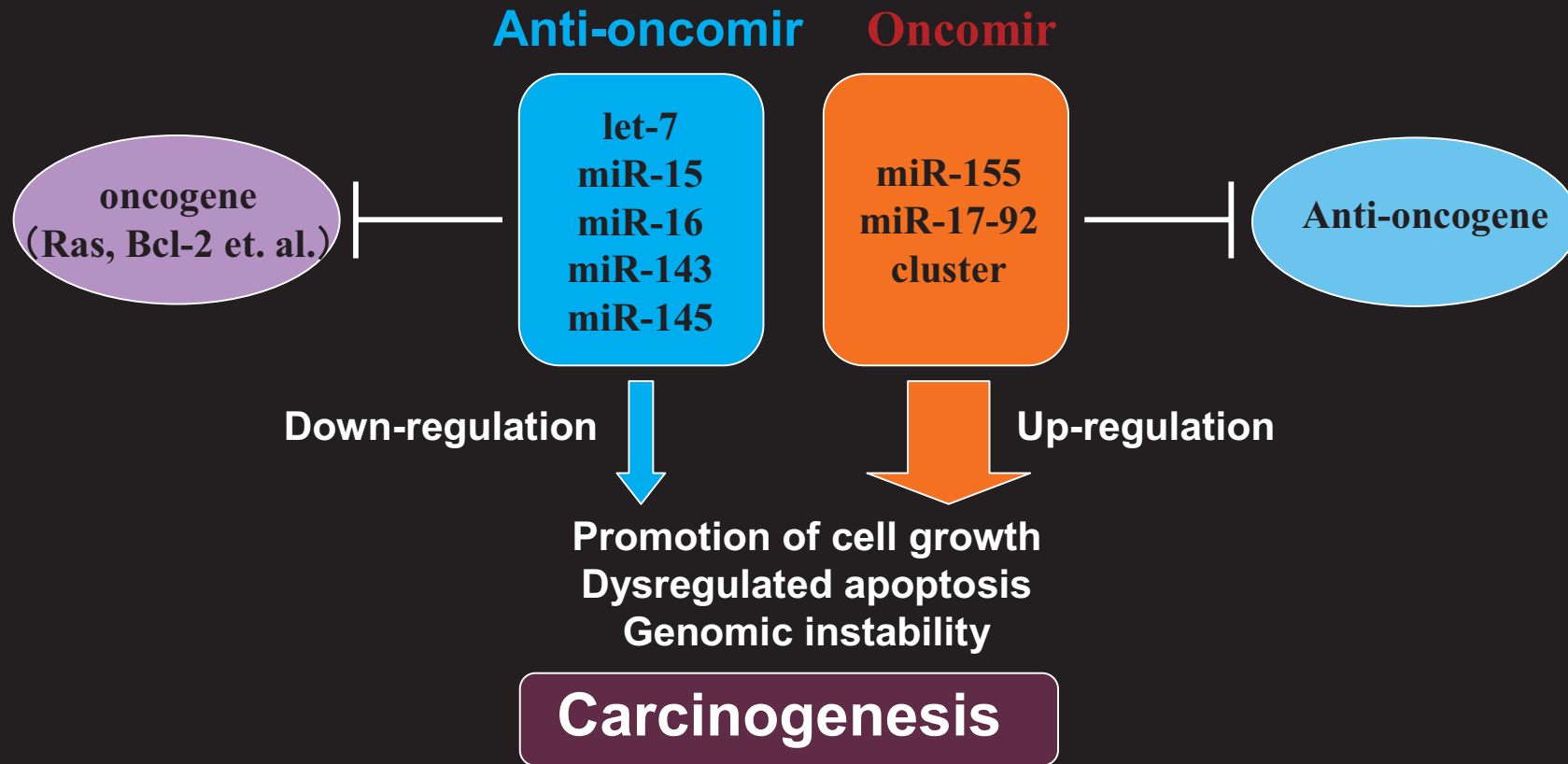
細胞に対する即効的な刺激をしたときの遺伝子発現をトランスクリプトームおよびプロテオームで検証すると約3分の2は相関していない。

RNAのプロセッシングの機序の解明が重要であり、疾患との関連がきわめて深いと考えられる。





癌におけるMicroRNA



従来技術とその問題点

生体に投与する場合、体内にヌクレアーゼが豊富にあるためヌクレアーゼから回避できる核酸の化学修飾または薬剤搬送システムが必要になっている。さらに薬剤搬送システムによる副作用、体内動態が問題となっている。

新技術の特徴とその問題点

- ・ヌクレアーゼに対する安定性を3'側2塩基突出領域にベンゼン-ピリジン化学的修飾を加えることで得られた。
- ・RISCへの取り込みの効率を上げる工夫
 - ① パッセンジャー鎖の配列を変え、構造を変える
 - ② 3'側2塩基突出領域に化学的修飾を加える。

miR-143 data

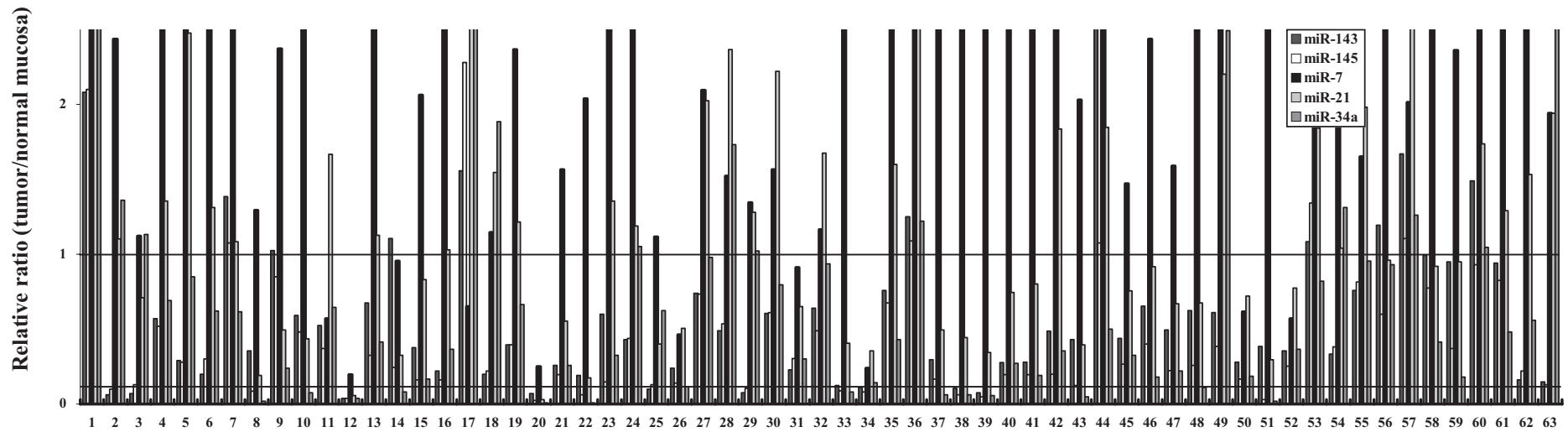
ID hsa-mir-143
Genome context 5:148788674-148788779 [+] intronic
5q32
Sequence UGAGAUGAAGCACUGUAGCUCA

miR-145 data

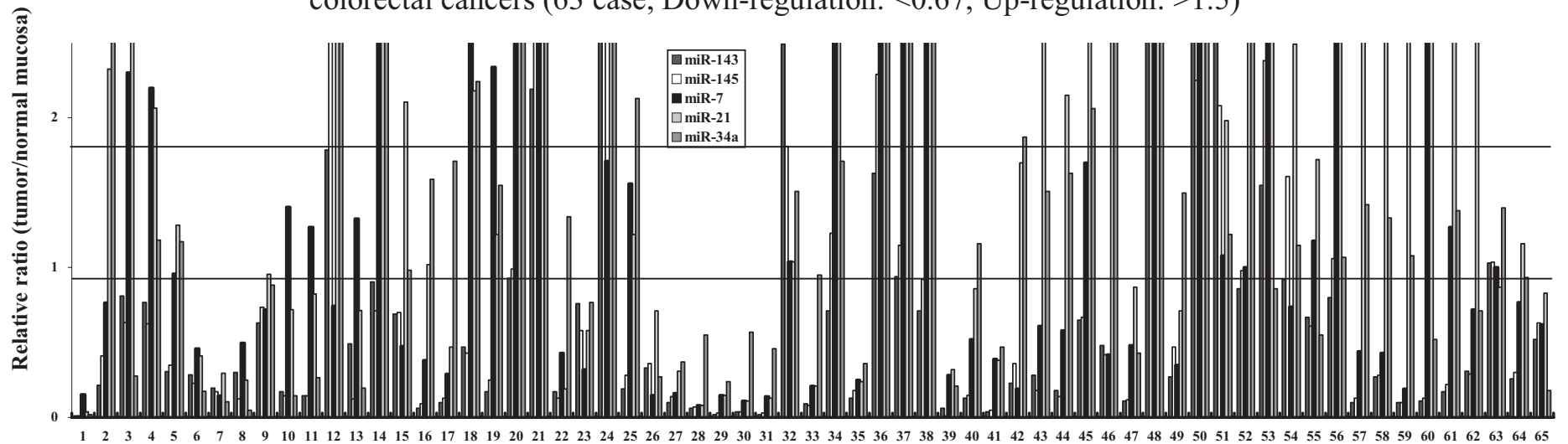
ID hsa-mir-145
Genome context 5:148790402-148790489 [+] intronic?
5q32
Sequence GUCCAGUUUCCCCAGGAAUCCCUU

- MiR-143 and -145 are located approximately 1.7 kb apart from each other at 5q32, which suggests that both are transcribed as the same primary miRNA

Expression of miR-143 , -145 and -34a in human advanced colorectal cancer and adenoma tissues evaluated by TaqMan[®] Real-time PCR assay

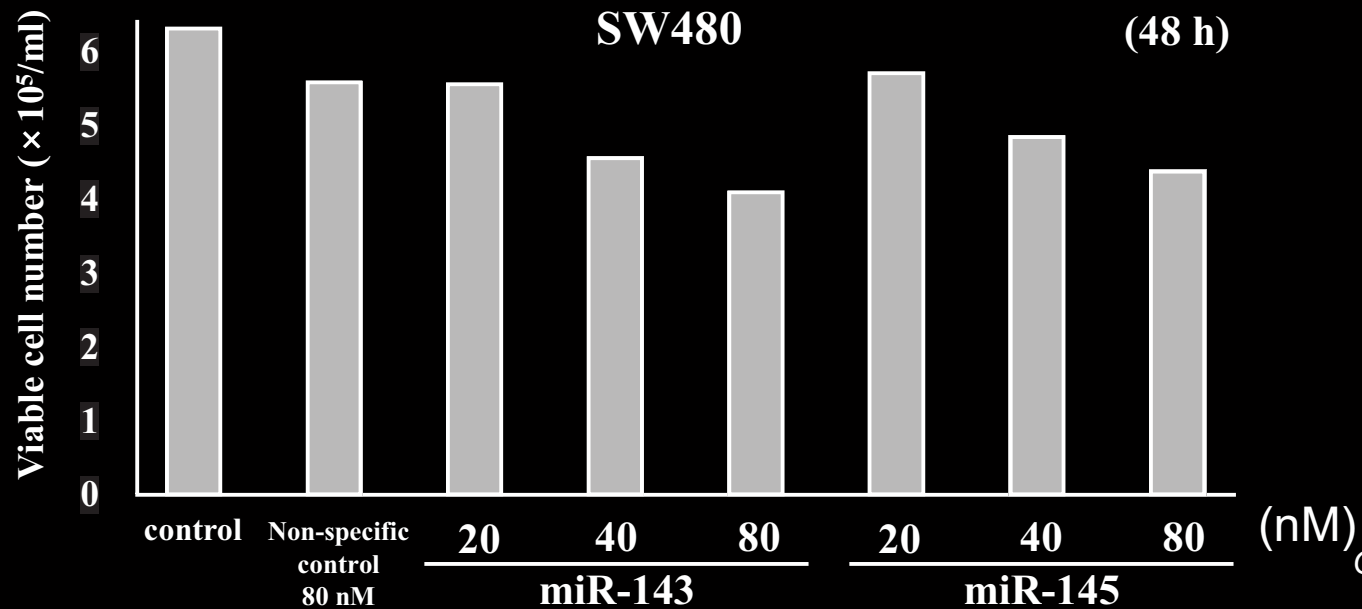
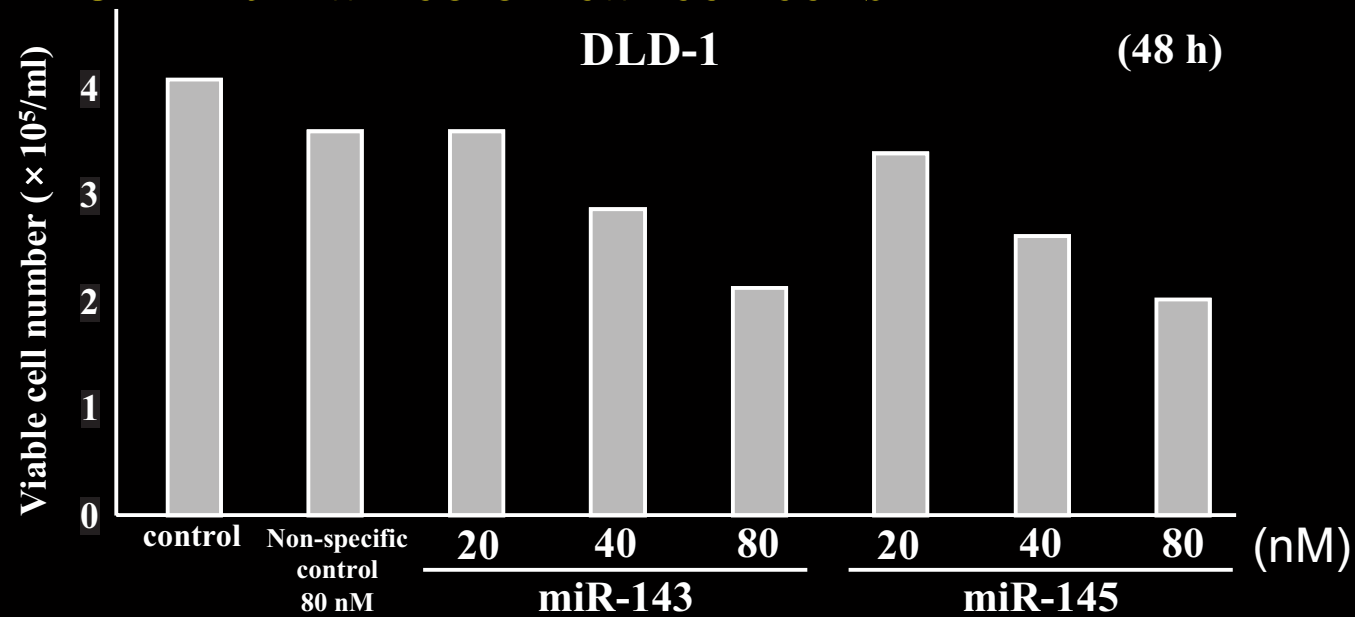


colorectal cancers (63 case, Down-regulation: <0.67 , Up-regulation: >1.5)



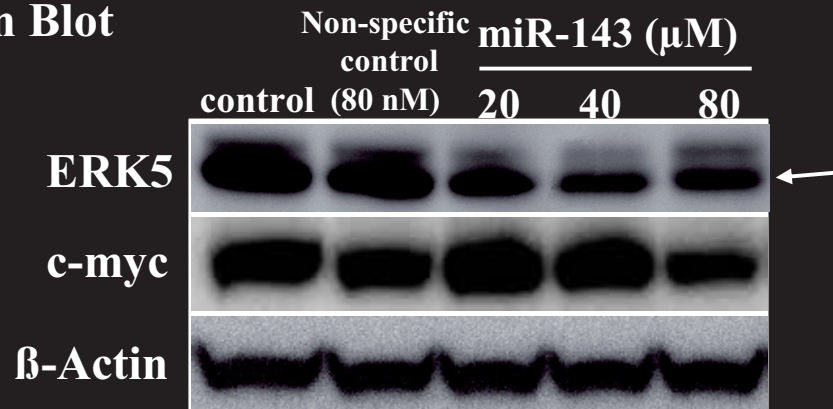
colorectal adenoma (65 case, Down-regulation: <0.67 , Up-regulation: >1.5)

Number of viable cells at 48 h after transfection with mature miR-143 or -145 in human colon cancer cells

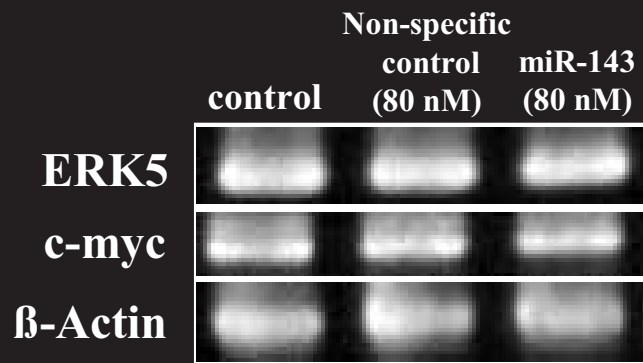


Expression of ERK5 are translationally inhibited by the transfection with mature miR-143 in DLD-1 cells and ERK5 positively contributes to cell growth

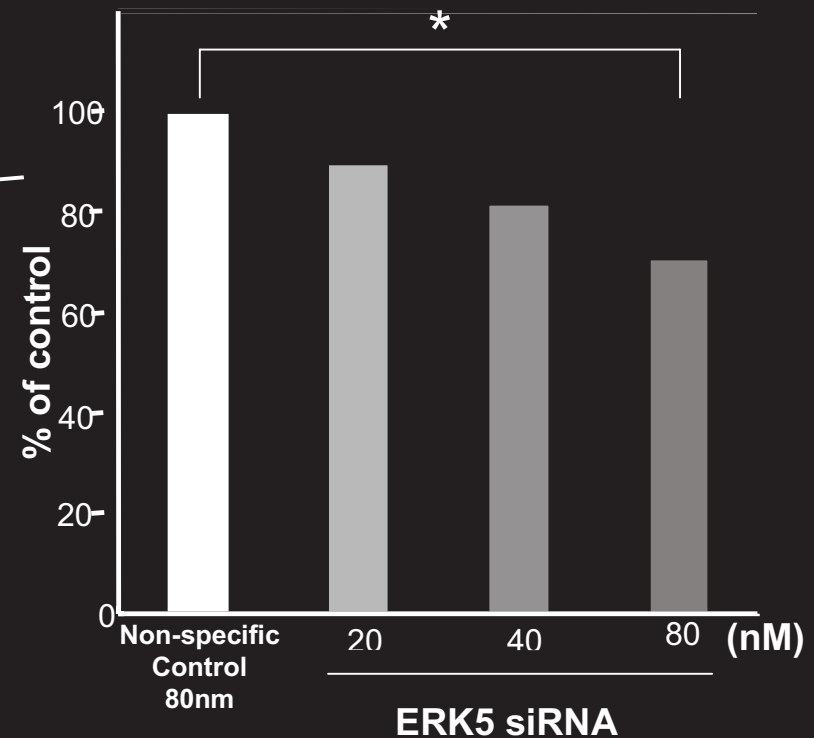
Western Blot



RT-PCR



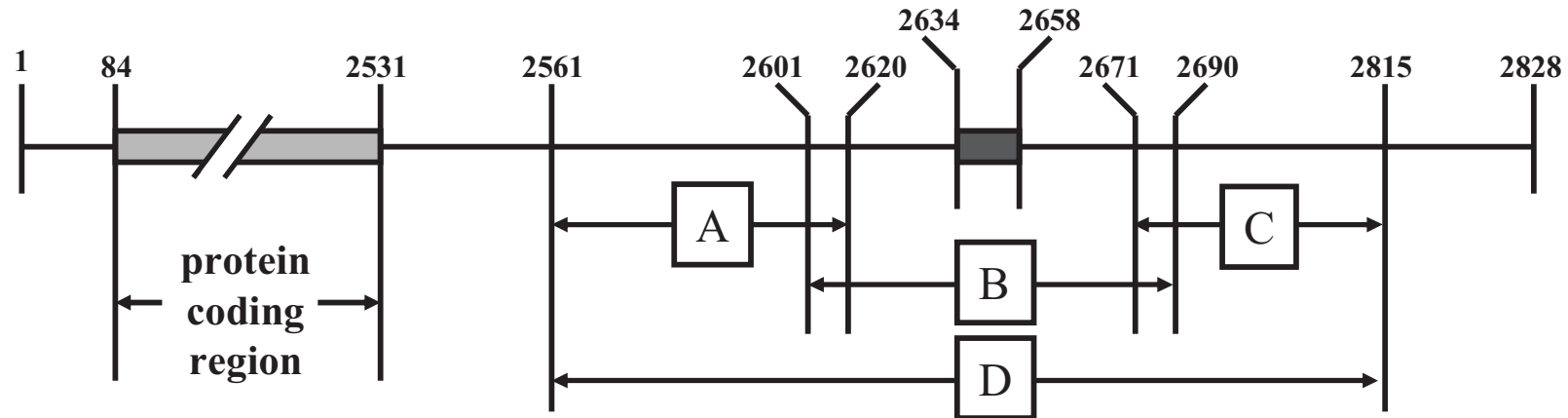
Growth inhibition by siRNA for ERK5



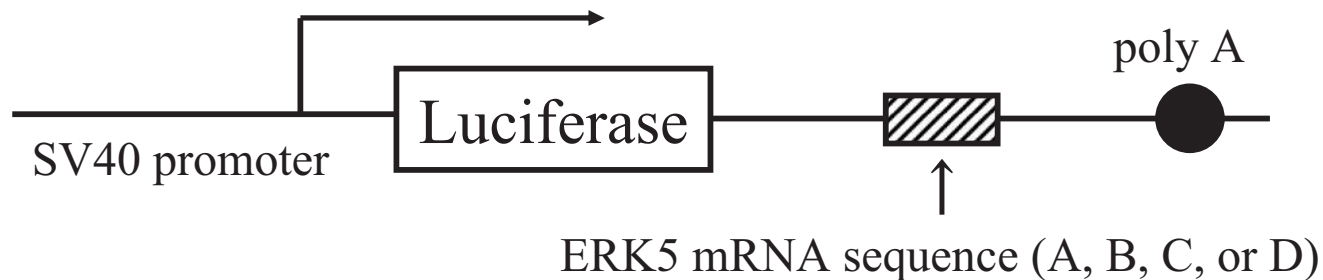
Determination of the target of miR-143 on ERK5 3'UTR



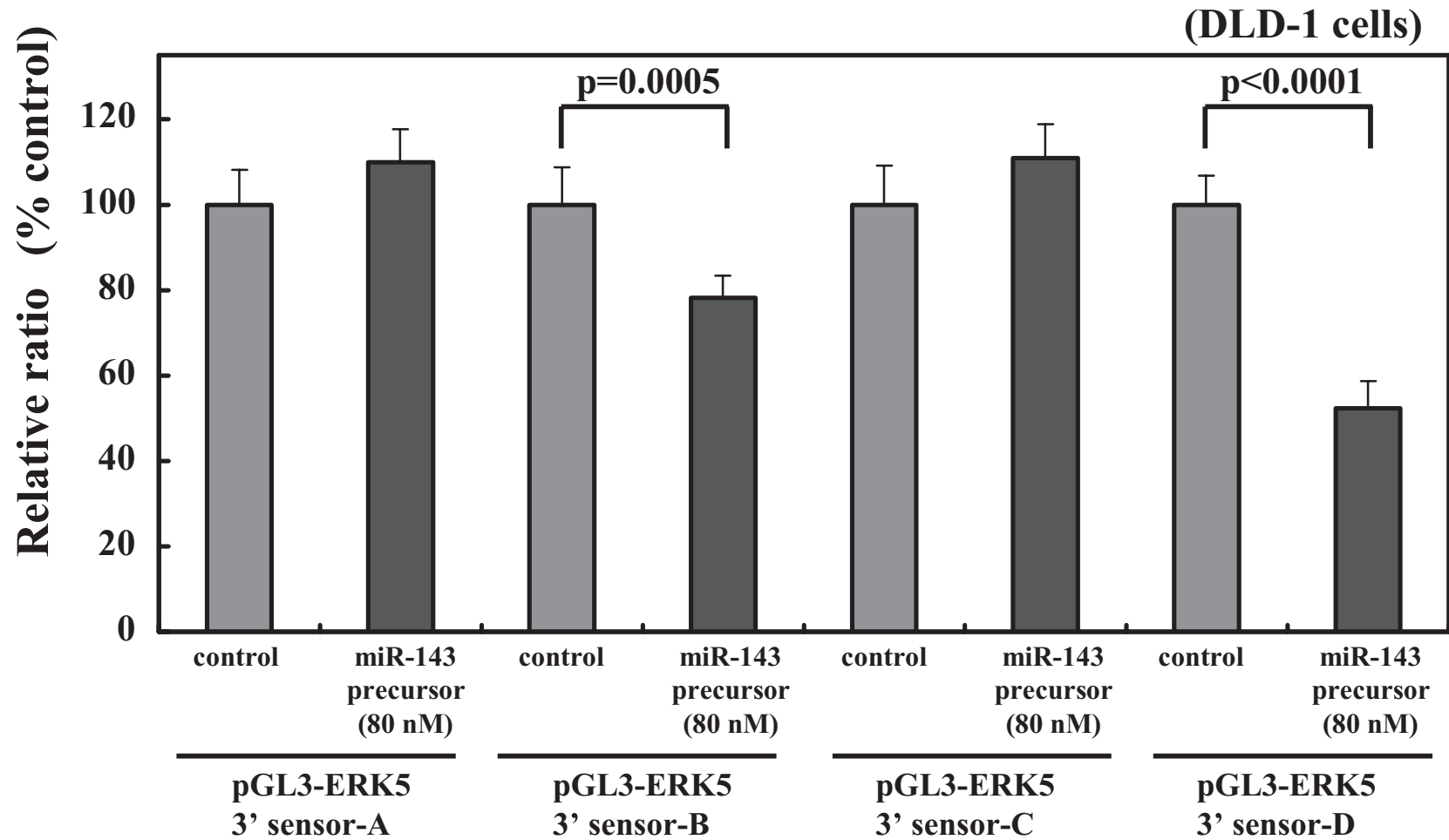
(B) ERK5 mRNA

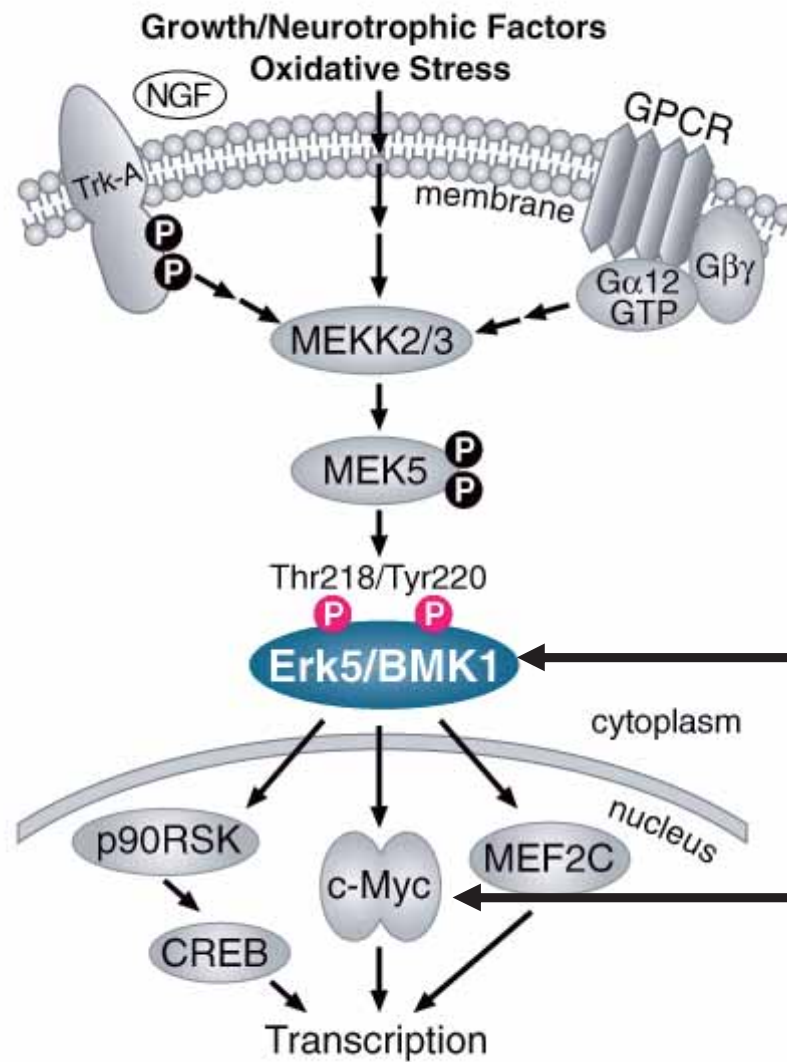


(C) pGL3-ERK5 3' sensor



Luciferase activities in the sensor vectors with or without target region

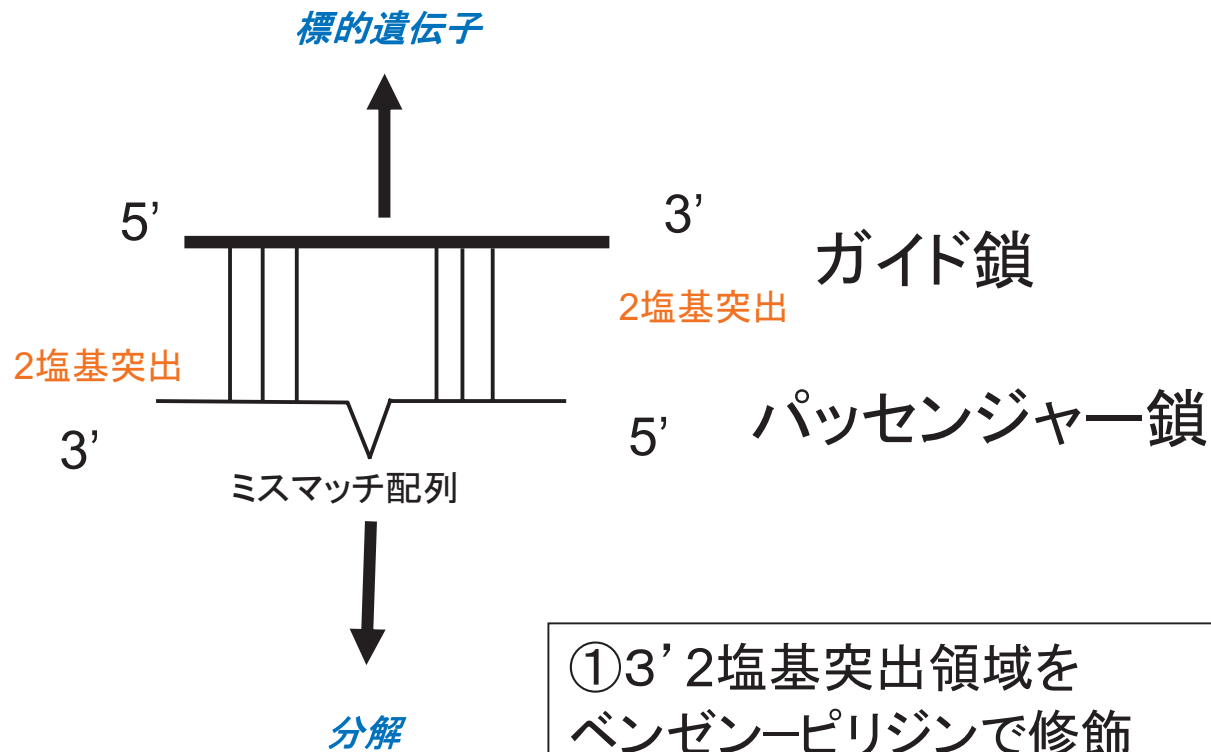




miR-143

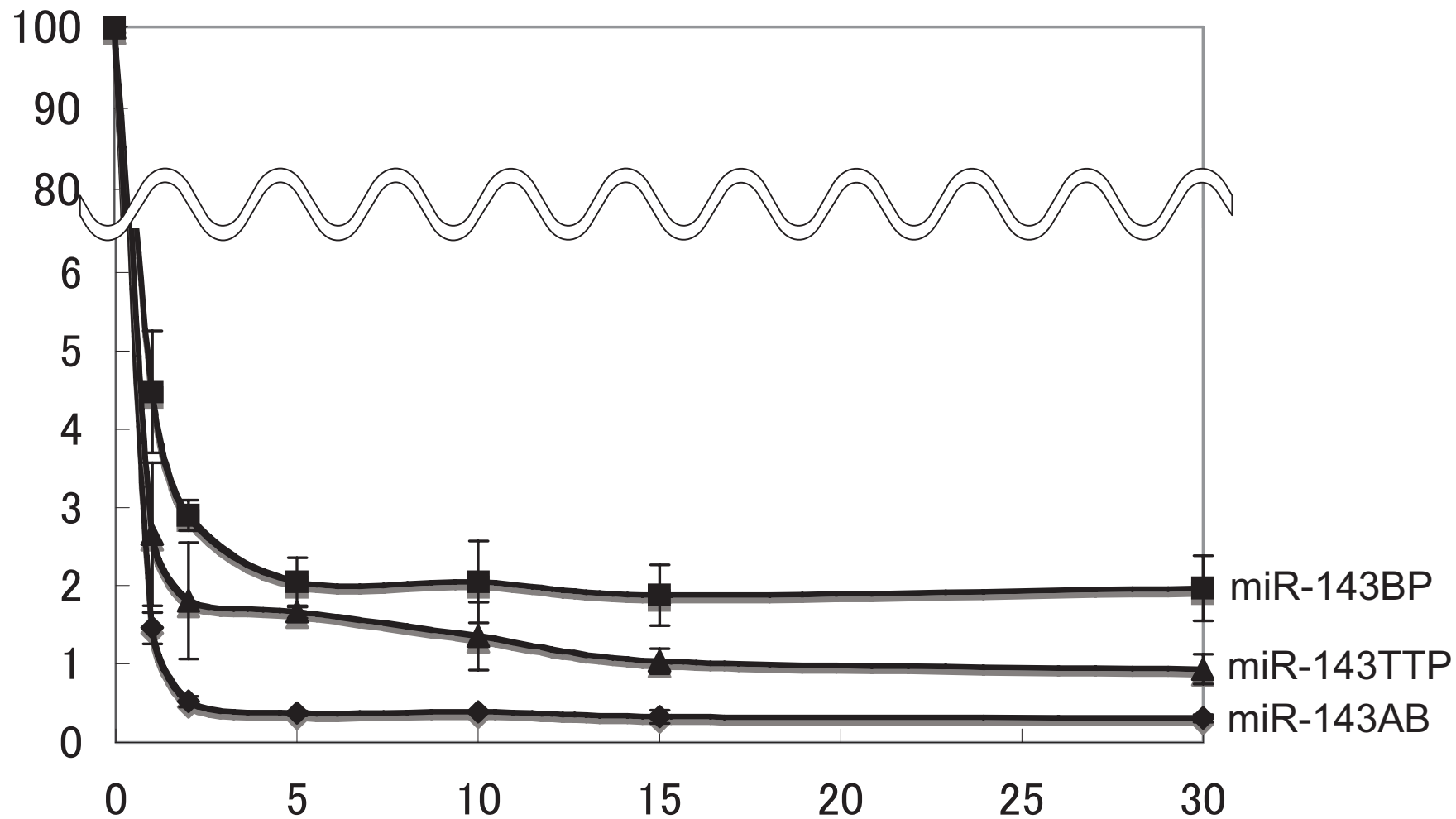
miR-145

成熟型マイクロRNA

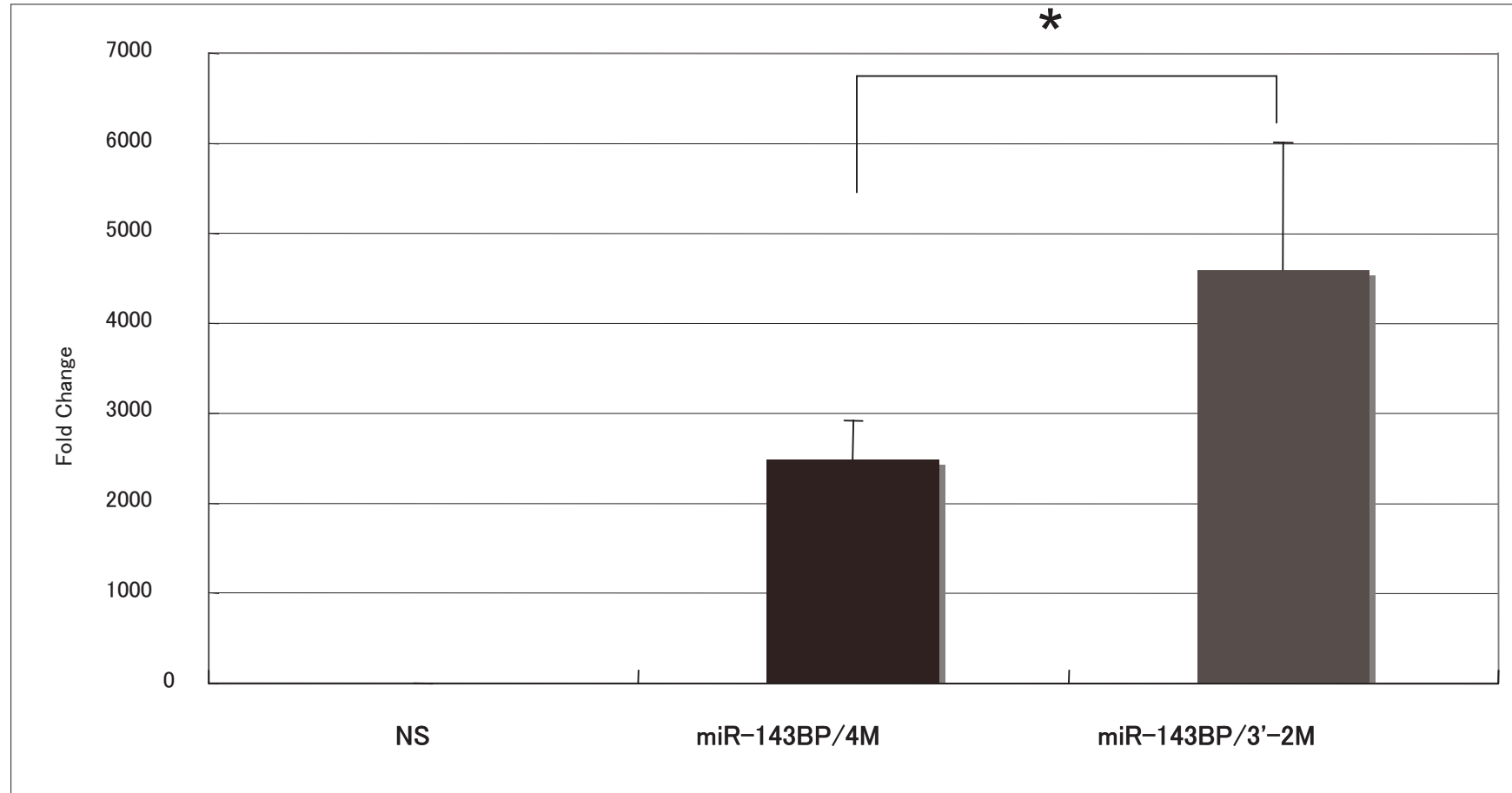


- ① 3' 2塩基突出領域をベンゼン-ピリジンで修飾
- ② 活性を上げるためにパッセンジャー鎖の塩基配列を変える

miR-143 decay evaluated by Real-time RT-PCR in FCS-containing medium



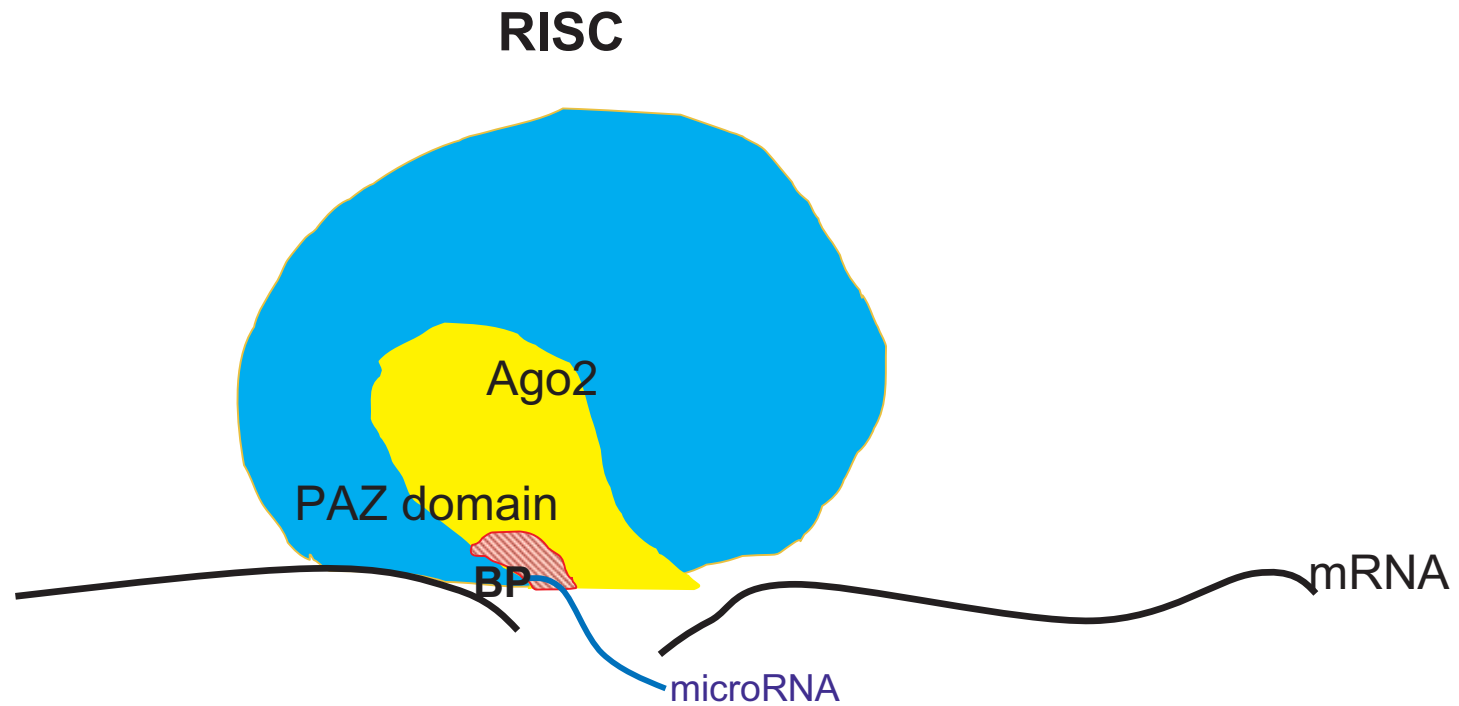
Synthetic miR-143BP was efficiently incorporated into RISC



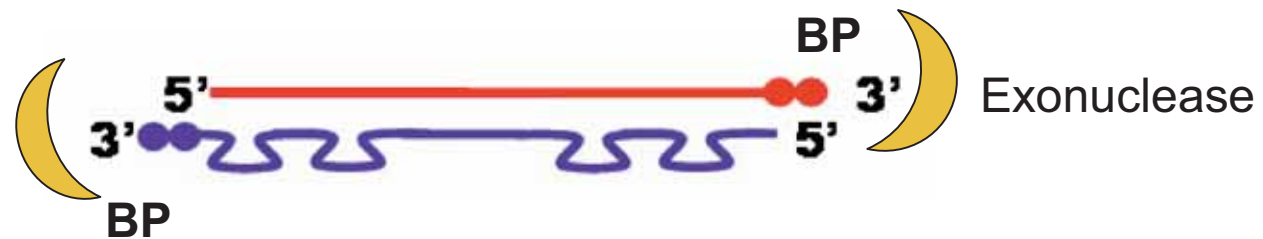
Ago-associated miR-143

Possible machinery of the efficient incorporation of BP-modified miR-143 into Ago2 of RISC and nuclease-stability

①

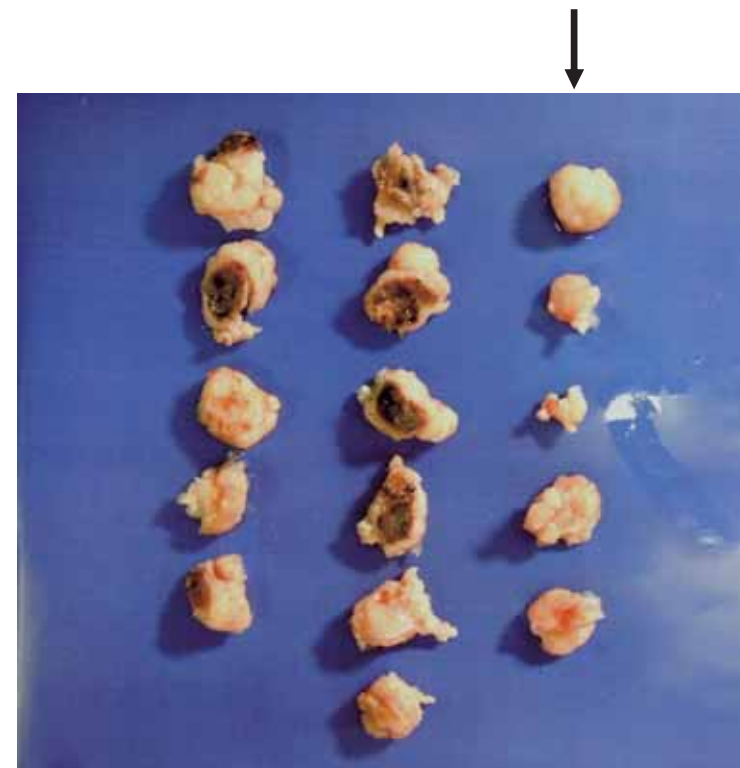
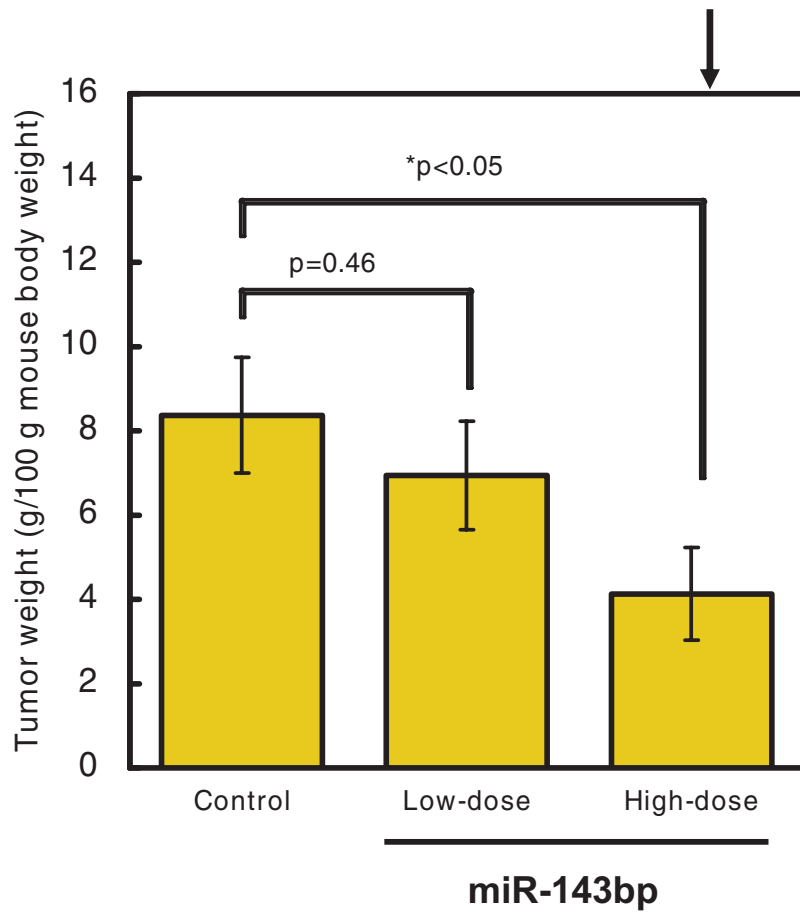


②



Intravenous injection of chemically modified miRNA-143 exhibited a growth-inhibitory effect against the xenografted human colon cancer DLD-1 tumor in nude mice

Intravenous injection (Liposome entrapped(LipoTrust)): 50 $\mu\text{g/a}$ mouse weekly 5 times (high-dose), low-dose; 25 $\mu\text{g/a}$ mouse

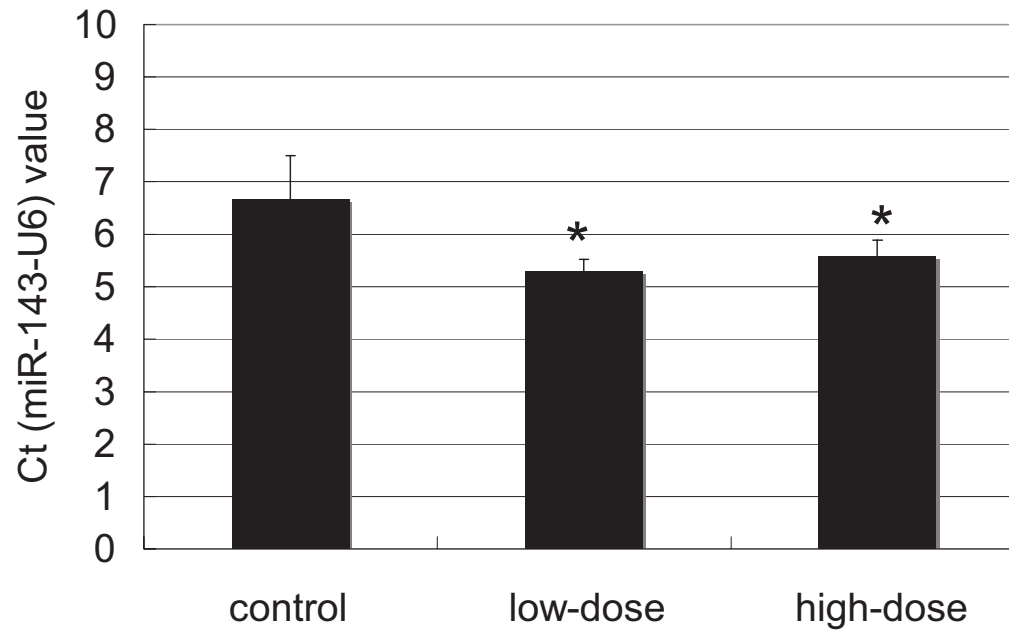


Control **Low-dose** **High-dose**
miR-143bp

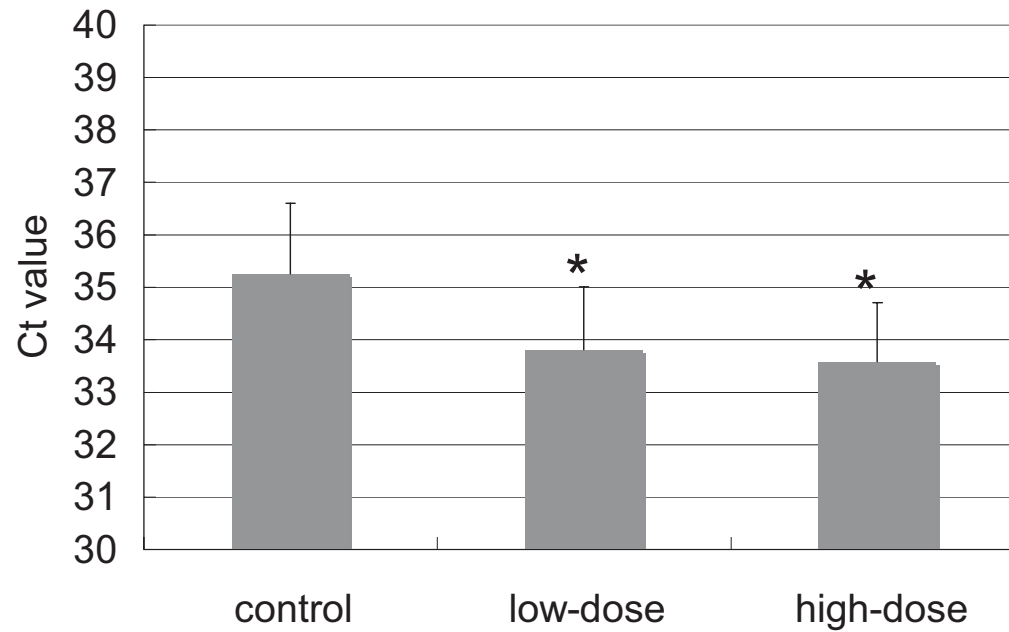
(at 7 weeks after treatment)

Levels of miR-143 after the treatment

Tumor



Serum



要約

- ・miR-143 -145は消化管腫瘍ではがん抑制遺伝子として働いている。
- ・低下しているがん細胞にmiR-143 -145をアゴニストとして導入し、発現をあげれば腫瘍縮小効果が期待できる。

問題点

- ・ヌクレアーゼに安定であればがん細胞に取り込まれるチャンスが増大する。(薬剤搬送システム:DDS)
- ・細胞内に取り込まれるような工夫
- ・RISCへの取り込みの効率を上げる工夫
 - ① パッセンジャー鎖の配列を変え、構造を変える
 - ② 3'側2塩基突出領域に化学的修飾を加える。化学的修飾したmiRNAががんの治療薬として応用される可能性が示された。

本技術に関する知的財産権

特願2006-266918

マイクロRNA生成の検出方法と癌の診断・治療およびマイクロRNA生成調整剤

特願2008-242263

マイクロRNA-143誘導体を含む医薬

企業への期待

RNA医薬への展開を考えている企業との共同研究を希望

お問い合わせ

岐阜大学産官学融合本部

知財戦略室

知財マネージャー

丸井肇宛

TEL : 058

- 293 - 3193

Email :

marupon@gifu-u.ac.jp