

多発性骨髄腫治療用 sgRNA 薬候補の作用機構の解明

1. 研究の目的

多発性骨髄腫は難治性血液がんであり、全世界で年間15万人程の患者がこれにより死亡していると見積もられている。我々は、遺伝子発現抑制技術であるTRUE gene silencing (tRNase ZL-utilizing efficacious gene silencing)法を骨髄腫に応用し、患者を寛解・治癒に導くsgRNA薬を発見することを長期目標としている。

tRNA前駆体切断酵素tRNase ZLを利用するこの技術は、がんなどの疾病に対する治療法としての可能性を秘めている。この技術の基盤は、この酵素がtRNA前駆体やmicro-tRNA前駆体に類似したRNA複合体を認識し切断することができ、7-30ヌクレオチドのsmall guide RNA (sgRNA、※CRISPR/Cas法のものとは異なる)を用いてあらゆるRNAを任意の部位で特異的に切断することができる特性にある。

これまでに、sgRNA薬H15540とH15603が培養細胞系でヒト骨髄腫細胞に効率よくapoptosisを誘導すること、sgRNA薬H12960がマクロファージの性質をM1状態の方向に遷移させヒト骨髄腫細胞を移植した免疫不全マウス局所投与実験において腫瘍の増殖を抑えることを示した。

本研究では、これらのsgRNA薬について、細胞内標的RNAを特定し作用機構を明らかにすること及びマウス全身投与実験における腫瘍増殖抑制効果を確認することを目的とする。

2. 研究の計画

(1) transcriptome 解析

骨髄腫細胞に効率よくapoptosisを誘導するsgRNA薬H15540とH15603、およびマクロファージをM1状態に遷移させることが示されたsgRNA薬H12960の細胞内標的RNAをDNAマイクロアレイによるtranscriptome解析により探索する。

(2) マウス xenograft 実験

骨髄腫細胞標的sgRNA薬H15540の静脈投与による腫瘍増殖抑制効果を解析するために、ヒト骨髄腫細胞株(KMM-1)を皮下に移植したマウスxenograft実験を実施する。sgRNA薬には、2'-Oメチル修飾、2'-メトキシエチル修飾、ホスホロチオエート修飾、LNA修飾などを施したものを使用する。

3. 研究の成果

(1) transcriptome 解析

- ① sgRNA薬H15540あるいはH15603（それぞれ2'-Oメチル修飾、あるいは2'-Oメチル修飾およびホスホロチオエート修飾を施した化学合成RNA）を、ヒト骨髄腫細胞株RPMI-8226を培養している培地中に裸のまま添加し、36時間後に細胞から全RNAを抽出した。この全RNAを用いてDNAマイクロアレイによるtranscriptome解析を行った（各サンプル群の数は2）。

sgRNA薬を添加しない対照細胞と遺伝子発現レベルを比較した結果、sgRNA薬H15540（2'-Oメチル修飾RNA）を添加した細胞では28個の遺伝子の発現が1.5倍以上増加し、31個の遺伝子の発現が1.5倍以上減少した。また、sgRNA薬H15540（2'-Oメチル修飾およびホスホロチオエート修飾RNA）を添加した細胞では247個の遺伝子の発現が1.5倍以上増加し、71個の遺伝子の発現が1.5倍以上減少した。

同様に、sgRNA薬H15603（2'-Oメチル修飾RNA）を添加した細胞では59個の遺伝子の発現が1.5倍以上増加し、145個の遺伝子の発現が1.5倍以上減少した。また、sgRNA薬H15603（2'-Oメチル修飾およびホスホロチオエート修飾RNA）を添加した細胞では27個の遺伝子の発現が1.5倍以上増加し、99個の遺伝子の発現が1.5倍以上減少した。

- ② DNAマイクロアレイによるtranscriptome解析により、骨髄腫細胞に効率よくapoptosisを誘導するsgRNA薬H15540の細胞内標的mRNAの有効候補の1つとしてND6 mRNAが見出されている。このmRNAに関して、qRT-PCR解析を実施し、実際に、ヒト骨髄腫細胞株RPMI-8226のND6

mRNAレベルを40%程減少させることを確認した。また、化学合成されたこのmRNAの部分配列を持つRNAが、sgRNA薬H15540の存在下においてtRNase ZLにより予想部位で切断されることも確認できた。これらの成果は、本研究の目的であるsgRNA薬の作用機構解明に向けての大きな前進である。

(2) マウス xenograft 実験

SCID/NODマウスに移植するためのヒト骨髄腫細胞株KMM-1の大量培養が困難を極めたことと、これに関連してSCID/NODマウス皮下への生着が成立しなかったことが原因で、sgRNA薬H15540の静脈投与による腫瘍増殖抑制効果を解析することができなかった。KMM-1細胞の代わりに、大量培養が比較的容易なヒト骨髄腫細胞株RPMI-8226を用いてSCID/NODマウスの皮下への生着を試みたが、これも成立しなかった。

4. 研究の反省・考察

(1) transcriptome 解析

sgRNA薬H15540 (2'-Oメチル修飾RNA) の細胞内標的RNAの候補が31個、sgRNA薬H15540 (2'-Oメチル修飾およびホスホロチオエート修飾RNA) の細胞内標的RNAの候補が71個見いだされた。また、sgRNA薬H15603 (2'-Oメチル修飾RNA) の細胞内標的RNAの候補は145個、sgRNA薬H15603 (2'-Oメチル修飾およびホスホロチオエート修飾RNA) の細胞内標的RNAの候補は99個見いだされた。sgRNA薬の化学修飾の違いにより、発現が減少する遺伝子の数が変動するという結果は興味深く、sgRNA薬の作用機構の解明につながることを期待される。今回の結果を踏まえて、今後、sgRNA薬の作用機構の全体像を明らかにしていきたいと思う。

(2) マウス xenograft 実験

① 当研究室にて10年以上研究に用いていたヒト骨髄腫細胞株KMM-1の増殖速度が著しく減少したため、国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB細胞バンクより新たにKMM-1細胞を取得したが、この細胞株も安定に増殖しなかった。そこで、理化学研究所バイオリソース研究センターより別のKMM-1細胞株を取り寄せて、5種類の異なるロットのウシ胎児血清を用いて培養試験をしたところ、1つのロットのウシ胎児血清で良好な細胞増殖が観察された。しかしながら、少数のSCID/NODマウスを用いてこのKMM-1細胞の生着試験を行ったが生着は成立しなかった。当研究室ではこれまでに同様のマウスxenograft実験で生着が成立しており、今回の不生着の原因は未だに不明である。

② また、SCID/NODマウスにヒト骨髄腫細胞を移植するために必須な米国コーニング社の試薬マトリゲルの入手が様々な世界情勢のために遅れて、マウスxenograft実験の実施が遅れたことも、研究実施期間内にsgRNA薬H15540の静脈投与による腫瘍増殖抑制効果を解析することができなかった理由の1つである。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

① Nashimoto M. (2022) TRUE Gene Silencing. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 5387.

(2) 口頭発表

なし

(3) 出版物

なし