

労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

（総括・分担）研究報告書

子宮頸部高度異型上皮に対する RNAi 治療開発

分担研究者 大和 建嗣 筑波大学医学医療系 消化器内科 研究員

#### 研究要旨

HPV16感染に関連した高度異型上皮の治療のための、HPV16 E6E7を標的としたRNAi医薬開発を目指した研究をおこなう。我々は、これまでの研究でHPV16関連癌細胞株の増殖抑制に有効なsiRNA配列を見いだした。しかし、siRNAは、その最大の弱点として非特異的細胞増殖抑制効果を有する。この副作用の発現機構を、オフターゲット効果、miRNA生成抑制およびインターフェロン反応などから解析検討した。レンチウイルスによるAGO2レベルの増加とsiRNAによるノックダウンを用いて、siRNAの非特異的細胞増殖抑制は、miRNAの抑制ではなく、オフターゲット効果が原因であること示唆した。また一部の配列はインターフェロン反応を引き起こし、これらも細胞毒性に関与している可能性を示した。

#### A. 研究目的

子宮頸部高度異型上皮は、HPV16型など高リスク HPV が原因の前癌病変である。高度異型上皮は、E6 および E7 を高発現し、これらの抑制で病変が排除できるため RNAi 治療の理想の治療標的ある。これまで E6E7 に対する遺伝子発現抑制活性の強い siRNA 配列を見いだした。siRNA は、その配列特異性ばかりではなく、様々な機序を介して臨床応用における問題となる非特異反応を引き起こす。AGO2 は、siRNA による標的遺伝子の抑制（特異効果）とオフターゲット効果（非特異効果）の双方において中心的役割を果たしている。本年度の研究では AGO2 レベルをコントロールすることによって siRNA による RNAi 活性と非特異的増殖抑制効果にどのような影響を

検討した。

#### B. 研究方法

ヒトAGO2 cDNAのコドン最適化後、化学合成し、pcDNA3およびpLenti6.3にサブクローニングした。AGO2レンチウイルスは、パッケージングプラスミドとともにAGO2/pLenti6.3を293FT細胞に導入して作成した。HuH-7肝臓癌細胞株、HeLa由来細胞株（HeLa細胞、FL-HeLaホタルルシフェラーゼ安定発現細胞）、SiHa由来細胞株（ホタルルシフェラーゼ（FLuc）・ウミシイタケルシフェラーゼ（RLuc）-E6(RLE6-FL-SiHa-10) および FLuc・RLuc-E7安定発現細胞（RLE7-FL-SiHa-2）にレンチウイルスを用いてヒトAGO2を導入後し、ブラシジンにより選択した。

siRNAは、コントロール(siCont1, siCont2)、FLuc ( siFLuc ) およびHPV16 E6E7 を標的にしたもの(siE6-497, siE7-573, siE7-752)を化学合成したものをを用いた。また、これらのDNA修飾体、dsRDC(ガイド鎖5'端よりnt 1-6およびその相補部分をDNA化したもの)、idRNA(ガイド鎖5'端よりnt 3-8およびその相補部分をDNA化したもの)をLipofetamineRNAiMAXを用いて導入した。RNAi活性および細胞毒性はそれぞれルシフェラーゼアッセイとWST8アッセイにより解析した。miR-21およびmiR-24は、stemloop RT-PCRで定量した。インターフェロン反応遺伝子(IFNbeta, OAS1, GIP2, MX1, IFIT1)の発現は、定量的RT-PCRで解析した。

(倫理面への配慮)

患者由来のサンプルは使用しておらず倫理面での問題はない。

### C. 研究結果

#### AGO2蛋白と非特異細胞毒性

HeLa細胞およびHuH-7細胞にレンチウイルスでAGO2を導入すると、いずれの細胞でもsiFLuc, siE6-497, siE7-573, siE7-752の細胞毒性を増強した。またAGO2ノックダウンによってこれらsiRNAによるHeLa細胞における細胞毒性が緩和された。

#### AGO2のオフターゲット効果およびmiRNA発現への影響

HeLa細胞において高レベルのAGO2導入は、siE6-497およびsiE7-573のオフ

ターゲット効果を増強した。また、AGO2導入した細胞では、siRNA導入によるmiR-21およびmiR-24発現低下が全く見られなかったが、siRNAの細胞毒性は却って増強していた。

#### siRNAによるインターフェロン反応遺伝子発現への影響

HeLa細胞にsiRNA (siCont1, siCont2, siFLuc, siE6-497, siE7-573, siE7-752)とこれらのDNA修飾体を導入した後に、IFNbeta, OAS1, GIP2, MX1およびIFIT1の発現を解析した。これらの中でdsRDC-Cont1, siE7-573, siE7-752, dsRDC-E7-752によって6倍程度のIFNbeta mRNAの誘導が見られ。

### D. 考察

siRNAは、配列依特異的な遺伝子ノックダウン効果と非特異効果の両方を引き起こす。非特異効果には、シード配列を介したオフターゲット効果、AGO2競合によるmiRNA生成抑制、自然免疫活性化および機序のよくわかっていない細胞毒性がある。AGO2は、miRNA生成とオフターゲット効果に中心的役割を果たしている。このAGO2レベルを増加させると、siRNAの細胞毒性とオフターゲット効果を増強し、siRNAによるmiRNAレベル低下を解消した。反対に、AGO2ノックダウンは、siRNAの細胞毒性を緩和した。以上から、siRNAによる細胞毒性は、単純なmiRNA発現抑制ではなく、オフターゲット効果が関与している可能性が示唆された。さらに一部のsiRNAとdsRDCにおいてIFNbetaの軽

度の発現誘導が観察された。この siRNA と dsRDC にはこれまで知られている TLR 活性化配列はない。この反応の誘導機構と細胞毒性の関連との関連について検討予定である。

#### E. 結論

siRNA の非特異効果である細胞毒性の発現機構がこれまで不明であったが我々の研究によって一部オフターゲット効果が関係していることが示唆された。このように siRNA を用いた核酸治療においてこのオフターゲット効果の回避は重要で、siRNA シード領域の DNA 修飾 ( dsRDC , idRNA ) によって改善できる。今後 siRNA による自然免疫の活性化について検討する。

#### G. 研究発表

##### 1 . 論文発表

Saito R1, Suzuki H, Yamada T, Endo S, Moriwaki T, Ueno T, Hirose M, Hirai S, Yamato K, Mizokami Y, Hyodo I.

Predicting skin toxicity according to EGFR polymorphisms in patients with colorectal cancer receiving antibody against EGFR. *Anticancer Res.* 33:4995-8, 2013

Ueno, T, Endo, S. Saito, R., Hirose, M., Hirai, S., Suzuki, H., Yamato, K., and Hyodo, I. The Sirtuin Inhibitor Tenovin-6 Upregulates Death Receptor 5 and Enhances Cytotoxic Effects of 5-Fluorouracil and Oxaliplatin in Colon Cancer Cells. *Oncol Res.* 21: 155–164, 2013

##### 2 . 学会発表

上野 卓教, 遠藤慎治, 齋藤梨絵, 廣瀬充明, 平井 祥子, 鈴木英雄, 大和建嗣, 兵頭一之介 大腸癌細胞株における sirtuin 阻害剤 tenovin-6 の抗腫瘍効果 第 7 2 回日本癌学会学術総会 平成 2 5 年 1 0 月横浜

H. 知的財産権の出願・登録状況なし