

論文の内容の要旨

論文題目 治療・診断技術応用可能な機能性人工核酸の創製

氏名 村上 和由

<序論>

これまで医薬品の素材と言えれば低分子化合物が主流であったが、近年、抗体医薬が登場し、さらに核酸を主とする医薬品が出現している。その医薬品になりえる機能性の人工核酸には、細胞膜上の標的に作用する低分子化合物や抗体とは異なり、遺伝子に直接作用させることが可能である等の様々な利点がある。それにより、疾患に関連するタンパク質の発現を転写や翻訳レベルで制御することが可能となり、すでに知られている疾患に対するより効果的な医薬品として、あるいはアンメットメディカルニーズを満たす医薬品として活用されることが期待される。

機能性人工核酸は、標的を認識する様式に基づき、2種類に分けられる。まず、抗体のように標的の配列を認識するタイプとして、RNA干渉の原理を利用したsiRNAや、mRNAやmiRNAに相補的に結合し遺伝子発現を調節するアンチセンス法が知られている。これらは、従来の医薬品ではなしえなかったRNAを創薬のターゲットとすることができる。もう一方は、低分子化合物のように、受容体や疾患の原因となるタンパク質の立体構造を認識するアプタマーである。すでに治療薬として使用されている実績があり、また、検出用の分子プローブ等の開発も進められている。このように機能性人工核酸は、独自の特性だけでなく低分子医薬や抗体医薬の利点も併せ持つため、これまで解決できなかった諸問題に対し有効な手段となり得るだろう。

そこで、本研究では、近年着目している医療分野における諸問題に対し、機能性人工核酸による知見の集積やデバイスの提供を目的とした。素材は同じ核酸だが、標的の認識様式により塩基配列認識型および立体構造認識型に分類されるという機能性核酸の特徴に基づき、第一にアンチセンス法の1つmiRNA-masking法による遺伝子発現制御に関する研究、第二に診断技術への応用を想定した細胞外小胞を認識するアプタマーの創製に関する研究

を実施した。

<miRNA-masking 法による遺伝子発現制御>

miRNA は、遺伝子発現を調整し、細胞の分化、代謝や様々な疾患に関与しているため、創薬のターゲットとして注目されている。細胞内で生合成された後、miRNA は標的の mRNA の 3'-UTR に結合し、翻訳を抑制する。

この miRNA と mRNA との結合をアンチセンス鎖で阻害することで、遺伝子発現を調整し、疾患を治療する研究が進められている。その方法の一つである miRNA-masking 法は、人工核酸を mRNA の 3'-UTR に結合させ、miRNA の結合を阻害するという方法である。現在、機能、製造および安全面等の改良のために、全長の短縮や毒性の低減が課題となっている。

それに対し、新しいタイプの人工核酸を使用することが有効な戦略のひとつであると考えられるが、筆者はその候補として LNA (locked nucleic acid) に着目した。LNA は、2'位の炭素に結合した酸素と 4'位の炭素がメチル基を介して架橋構造を形成する、RNA 誘導体の人工核酸である。非常に高い配列特異性と親和性、さらに低毒性であることを特徴としている。本研究は、LNA による miRNA-masking 法にて標的の翻訳抑制が阻害されることを示し、続いて短縮化、毒性およびマスキング効果と親和性の関係等の評価を行った。

LNA によるマスキング効果について

培養細胞を使用したレポーターシステムにより、mRNA 上の miRNA 結合領域全体を覆う LNA のマスキング効果を評価した。一般的な 2'-O メチル修飾型の RNA とそれに部分的に LNA を導入した RNA をそれぞれ培養細胞に導入したところ、前者はマスキング効果を認めなかったのに対し、後者ではそれを認めた。LNA の導入により、マスキング効果が生じたと考えられる。

有効な LNA の長さについて

LNA の有効性を認めたため、全塩基を LNA とし、マスキング効果を示す最短の長さを決定することを試みた。同様のレポーターシステムにて、まず、miRNA におけるシード配列に対応する mRNA 上の領域 (8 塩基) に結合する LNA について評価を行ったが、マスキング効果は認められなかった。次に、LNA をその 8 塩基から 12 塩基まで 1 塩基ずつ延長した LNA を作成し評価したところ、10 塩基からその効果を認めた。従って、本研究での最短の鎖長は、10 塩基であること明らかとなった。

LNA の毒性について

LNA を治療薬へ応用するならば、毒性の評価が必須である。培養細胞に添加する LNA の濃度を増加 (100 nM、300 nM および 500 nM) させ、強制発現させたルシフェラーゼの活性を調べることで、細胞毒性を評価した。その結果、コントロールの人工核酸では、ルシフェラーゼ活性が劇的に減少したのに対し、LNA ではその減少量は低かった。また、500 nM という高濃度の LNA におけるルシフェラーゼ活性は、300 nM のものと同程度であった。従

って、この LNA の細胞毒性は低いと考えられる。

マスクング効果と親和性の関係性について

マスクング効果に影響を与える要因を調べるために、LNA と相補鎖との親和性の高さを調べる際に行われる融解温度 (T_m) を測定した。各 LNA とその結合領域を有する 22 塩基の RNA を反応させて T_m を測定したところ、マスクング効果を示した LNA の T_m 値は高く、示さなかった LNA の T_m 値は低かった。この結果は、マスクング効果が LNA と mRNA との高親和性に起因することを示唆する。

<細胞外小胞を認識するアプタマーの創製>

細胞外小胞は、細胞から分泌され、血液、唾液、尿等に見られる脂質二重膜小胞である。そのサイズや生合成経路により、エクソソームとマイクロベシクルの 2 種類に分類される。DNA、miRNA/mRNA およびタンパク質を含むため、バイオマーカーとして注目されている。例えば、卵巣癌、肺癌、膵臓癌、腎不全などの疾患の診断としての有用性が報告されている。細胞外小胞を生物学試料から単離する方法として、超遠心、ゲルろ過、免疫沈降、filtration、および密度勾配遠心が報告されている。しかし、これまでのところ最適で統一された方法はなく、バイオマーカーとして診断に応用するための簡便でマイルドな単離方法が望まれている。

アプタマーとは、標的に特異的に結合する人工核酸であり、1990年代に 2 つの研究室により報告された。アプタマーは分子進化工学的 (in vitro selection法、または SELEX法) に作り出され、一般的に原子、分子、核酸およびタンパク質を標的とし、治療薬や検出用試薬として応用される。近年、細胞膜上の受容体に結合するアプタマーを取得するために生細胞を標的とした Cell-SELEX も報告されている。

細胞外小胞の形状は、タンパク質、脂質および糖質等を二重膜に保持する構造であり、細胞に似ている。そのため、Cell-SELEX のように、表面上の受容体等の標的に結合するアプタマーを取得できるのではないかと考えた。また、様々な情報を含み、細胞よりも安定しているため有用なバイオマーカーとなりえる。

細胞外小胞に対するアプタマーについて、これまでのところ前例は無いが、取得できれば新たな診断技術の構築に寄与できるはずである。そこで、本研究では、細胞外小胞に対する 2'-F 化型修飾塩基を含む RNA アプタマーの単離、性状および構造解析を試みた。

RNA アプタマーの単離

ランダム配列およびプライマー領域を含む DNA プールを出発点とし、基本的に筆者が以前実施したニトロセルロースフィルターを使用する方法に従ってセレクションを実施した。ランダムプールは完全に独立した 2 ラインを使用し、293T 細胞から精製した細胞外小胞を標的とした。10 サイクルのセレクションの後、次世代シーケンサーにより解析し、配列の濃縮を認めた。

上位配列に対し、モチーフ検索および 2 次構造予測を行ったところ、先端に保存性の高

いループを保有するステム構造が特徴として見つかった。その情報に基づき短縮型のオリゴヌクレオチド2種類を合成し、細胞外小胞への結合活性をフィルターバインディングアッセイおよび表面プラズモン（SPR）解析により確認した。

RNA アプタマーの構造解析および親和性に与える影響

得られたそれぞれのアプタマーは、どちらもグアニンに富む配列であり、四重鎖（G-quadruplex）構造予測プログラムを使用したところ、G-quadruplex 形成の可能性が示唆された。Circular dichroism（CD）スペクトル解析を行ったところ、緩衝液中のカリウムイオン濃度を増加させると、どちらのアプタマーも 260 nm におけるシグナルが上昇し、240 nm におけるシグナルが低下するという平行型 G-quadruplex の形成を示唆する波形が見られた。

次に、緩衝液中のカリウムイオン濃度を調整し、細胞外小胞に対する親和性の変化を SPR 解析により測定したところ、濃度依存的な親和性の向上を認めた。従って、それぞれのアプタマーは、G-quadruplex を形成することで、細胞外小胞に対し強固に結合すると示唆された。

<総括>

miRNA-masking法の研究では、LNAの有効性を示し、mRNAと高親和的に結合することがマスキング効果に影響するとの有益な知見を得た。抗細胞外小胞アプタマーの研究では、セレクションが成功し、短縮型アプタマーを2種類創製した。これらの研究成果は、機能性人工核酸による治療および診断分野において、有用な知見および分子ツールを提供するものとする。