

論文審査の結果の要旨

氏名 村上 和由

本論文は、治療・診断技術応用可能な機能性人工核酸の創製についての結果と考察を含む研究論文であり 4 章から構成されている。第 1 章は本研究全体の背景、第 2 章にはマスキング法による遺伝子発現制御に関する研究背景、実験材料と実験手法および実験結果、第 3 章には細胞外小胞を認識するアプタマーの創製に関する研究背景、実験材料と実験手法および実験結果、第 4 章にはそれらの考察が述べられており、さらに、参考文献および図・表が記載されている。審査結果の要旨は以下の通りである。

核酸の人工合成技術や、核酸アプタマーの取得技術等が向上したことにより、核酸を創薬に応用する流れ、すなわち、機能性人工核酸の医工学的研究が加速している。機能性 RNA 分子が標的分子に作用する分子機構は、核酸に対する相補性塩基対形成に基づくものと、相補性に基づかないもの 2 種類に分類できる。相補性に基づく作用機構を利用した応用方法としては、アンチセンス法が知られる。一方、相補性に基づかず標的に結合する応用方法としては、アプタマー法が知られている。アンチセンス法の一つマスキング法に関し、様々な先行研究はあるものの、より高い効果を示す、あるいは低毒性化が期待されるマスキング核酸の研究は依然として課外が多く残されており、効果的なマスキング鎖を作製する統一的な見解は得られていない。他方、核酸分子があまり着目されていない分野を開拓することも、核酸研究の課題の一つと言え、アプタマーの機能性に基づいた新しい診断システム構築の可能性を追求することは基礎研究および臨床応用に対し有意義な研究の一つとなりうる。

学位申請者は、アンチセンス法に関しては、RNA の弱点を解消する方法として有望な人工核酸を用いた miRNA ターゲット部位のマスキング法の研究を実施し、一方、アプタマー法に関しては、これまでのターゲット分子種を拡張する可能性を模索するため、細胞外小胞に基づいた診断分野への応用の可能性を検討する新規 RNA アプタマーの取得を実施した。

アンチセンス法について、miRNA の翻訳抑制の制御法に関して、Locked Nucleic Acid (以下、LNA と略) を用いた microRNA ターゲット部位マスキング法により効果的に標的タンパク質の発現を阻害できることが明らかになった。有効な LNA の最短の長さについて、mRNA 上のシード配列結合領域に対し 10 塩基以上あれば十分なマスキング効果が現れることを確認した。意外なことに、シード配列結合領域を含まない近傍領域に対してもマスキング効果が生じることを認めた。また、Tm 解析により、マスキング効果は、LNA と mRNA との高親和性に起因することが示唆された。他方、毒性について、高濃度 (500 nM) の LNA を培養細胞に導入しても内部標準遺伝子の発現量が 300 nM

の系と比較し低下しなかったことから、LNA の細胞毒性は強くはないと推察された。また、リン酸基がチオール修飾された LNA についても、非修飾の LNA と同様に有意なマスキング効果が得られることが明らかとなった。

アプタマー法について、細胞外小胞に結合する前例のない RNA アプタマーを 2 種類取得した。完全に独立した 2 種類のライブラリーを用いた 10 ラウンドの SELEX 法の後、次世代シーケンサーにより配列を解析した。得られた配列の出現頻度上位 50 クローンにおいて、非保存性のステムおよび保存されたループからなる構造的特徴を認めた。それに基づき短縮型アプタマー MO-1 および MO-2 を合成し細胞外小胞に対する結合活性を認めた。CD スペクトル解析により、MO-1 および MO-2 は、四重鎖構造を形成することが示唆され、四重鎖構造を形成することで細胞外小胞に対する結合活性が増大することを見出した。そして、MO-1 はエクソソームが多数を占める細胞外小胞の集団を認識していることが推察された。

得られた実験結果を踏まえ、マスキング法による miRNA ネットワークの解析、および抗細胞外小胞 RNA アプタマーを用いた医療応用例も提案している。

本論文は、マスキング法に供する LNA の設計指針を提示したことに加え、細胞外小胞に対する RNA アプタマーを初めて創出したという点でも、関連領域に貢献する成果であると判断された。

なお、第 2 章は宮岸真との共同研究であり、第 3 章は、宮岸真、山崎和彦、Jing Zhao との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断された。

したがって、審査員一同、博士（生命科学）の学位を授与できると認めた。

以上 1 8 9 9 字