

## 博士論文（要約）

治療・診断技術応用可能な機能性人工核酸の創製

村上 和由

## 【序論】

近年、様々な生物種由来の機能性 RNA の発見と機能性発現のための分子機構の解明が進む一方で、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。翻訳を受ける messenger RNA (mRNA) に一定の長さの相補的なアンチセンス核酸を導入することでその mRNA からの発現が抑制される。相補性に基づきアンチセンス核酸が結合すると mRNA 上の機能配列やタンパク質コード配列がマスクされ、スプライシングなどの RNA 加工や、リボソームによる翻訳反応が阻害され、タンパク質の発現量を低下させることができる。一方、相補性に基づかず標的に結合する機能性 RNA としては、RNA アプタマーが知られている。アプタマーは、折りたたまれて独特の構造を形成し、標的分子を立体的に認識することで結合する。これらの機能性 RNA の性質は、すでに治療薬や検出用の分子プローブ等として利用され始めており、さらに多数の機能性 RNA の応用研究が進められているところである。

本研究では、それぞれ異なる標的認識機構を持つアンチセンス法および、アプタマー法を応用し、近年着目されているそれぞれの発展的応用を可能にする新知見の発見やシーズの創出を目指した。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た。高親和性および高特異性を特徴とする人工核酸 LNA によるマスキング法の有効性やアンチセンス鎖の設計指針となる手がかりを得た。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可能性を検討する新規 RNA アプタマーの取得を行った。

## 【結果】

### 1. microRNA ターゲット部位マスキング法による遺伝子発現制御

microRNA (miRNA) は、近年注目されている短い non-coding RNA (ncRNA) の一種であり、RISC と呼ばれるタンパク質複合体がそれぞれの miRNA を取り込むことで、miRNA の相補配列部位に基づく標的 RNA の認識、結合が可能と

なり、その mRNA 上からの遺伝子発現を制御する。miRNA による遺伝子発現制御機構は、細胞の分化、恒常性の維持、がんを初めとする多くの疾患に関与することが明らかになっており、それぞれの miRNA をターゲットとした疾患治療法の開発に期待がかけられている。miRNA ターゲット部位マスキング法(以後、マスキング法と記述する)は、miRNA のターゲットとなる標的遺伝子の mRNA にアンチセンス鎖を結合させることで、miRNA の結合を阻害し、その miRNA がターゲットとする特定の mRNA の翻訳制御を阻害することが出来ることを期待している。この方法は、mRNA の配列情報に基づき容易に阻害 RNA が設計出来ることや、天然の核酸と同一もしくは類似するものを用いることから副作用が極めて低い創薬の開発が期待できる。しかし、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設計は依然として課題が多い状況であり、現状では効果的なマスキング核酸を製作する統一的な指針がない。先行研究では、いくつかの人工核酸がそれぞれの条件下で評価されているが、一般的な 2'-OMe 修飾型の人工核酸を含め、その他の優れた人工核酸を評価する余地が依然として残されている。

そこで、本研究では、人工核酸として高親和性および高特異性を持つ Locked Nucleic Acid (LNA) を応用したマスキング効果について検証し、その設計指針を提案することを目的とした。

### LNA による miRNA マスキング効果の検証

miRNA 作用部位を持つタンパク質遺伝子 mRNA に対する相補的な LNA の導入により翻訳抑制が起こることを示すため、従来型修飾オリゴ核酸 (2'-OMe 修飾型 RNA) によるマスキング法およびそれに部分的に LNA を導入した核酸 (LNA 含有オリゴ核酸) によるマスキング効果を比較した。また、同時に miRNA に対するアンチセンス法 (Anti-miRNA) も比較対象に加えた。培養細胞を用いたターゲット遺伝子発現レポーター評価系により、Anti-miRNA およびこの miRNA の mRNA 上のターゲット部位に相補的な LNA 含有オリゴ核酸ではルシフェラーゼ活性の低下を認めたが、2'-OMe 修飾型 RNA では認められなかった。次に、全領域を LNA にしたマスキング核酸を用いて、miRNA が mRNA に結合する mRNA 上のシード配列領域 (8 塩基) を最低限の標的とした場合の有効な最短の長さを検討したところ、10 塩基で十分なマスキング効果が生じることを確認した。さらに、シード配列結合領域以外の部位についても、マスキング効

果が発生することを認めたことから、設計領域にはシード領域に縛られない自由度が存在することも明らかになった。

#### LNA によるマスキング効果と Tm 値の関係性

マスキング効果に影響を与える要因を調べるために、核酸同士の親和性の高さを調べる際に評価される融解温度 (Tm) を測定した。各 LNA とターゲット部位を保持する RNA との間の Tm を測定したところ、マスキング効果を示した LNA の Tm 値は高く、示さなかった LNA の Tm 値は低かった。従って、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。

## 2. 細胞外小胞を認識するアプタマーの創製

細胞外小胞は、体液に分泌される脂質二重膜小胞である。分泌された細胞由来の DNA、miRNA/mRNA およびタンパク質を内包するため、疾病のバイオマーカーとして注目されている。これまで、細胞外小胞を生体試料から単離する方法として、超遠心法、ゲルろ過、免疫沈降、フィルターによる分離、密度勾配遠心法などが報告されているが、これらは、細胞外小胞を適切に単離できるものの、大型の装置が必要であったり操作が煩雑であったりするなど改良すべき点がある。

そこで、本研究では、簡便な診断システム構築の可能性を追求するための題材として細胞外小胞を特異的に認識する RNA アプタマーの単離を試みた。

#### 細胞外小胞を認識する RNA アプタマーの単離

293T 細胞から精製した細胞外小胞を標的としたアプタマー取得のため、ランダム配列およびプライマー領域を含む RNA ライブラリーから、細胞外小胞に結合したアプタマーをニトロセルロースフィルター上に捕捉する選択手法を採用する SELEX 法を実施した。ライブラリーは完全に独立した 2 ラインを使用し、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結合 RNA プールの配列解析したところ、一定の配列の濃縮が確認された。

出現頻度の上位配列に対し、モチーフ検索および二次構造予測を行ったところ、非保存性のステムおよび保存性が高いループからなる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、表面プラズモン (SPR) 解析により細胞外小胞への結合活性を確認した。

## 細胞外小胞結合性 RNA アプタマーの性状解析

得られた2種類のアプタマーは、どちらもグアニンに富む特徴的な配列であり、予測プログラムにより四重鎖構造を形成することが推定された。このことを検証するために、円偏光二色性 (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の増加とともに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四重鎖の特徴と一致する波形が観察された。

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、カリウムイオン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には、共通して四重鎖が存在することが強く示唆された。

### 【結論・展望】

マスキング法の研究において、得られた結果を総合し、短い鎖長で高い親和性や特異性を有する効果的な LNA の設計指針を提示することができた。今後は、治療薬の創製に向けた最初のステップとして、設計した LNA を用いて特定の miRNA が制御する内在性タンパク質の翻訳を実際に調節できることを示す等の検証が必要であると考えられる。

細胞外小胞に結合する RNA アプタマーの取得に成功し、細胞外小胞に基づいた診断分野に対して核酸という新しいシーズを創出することができた。今後は診断技術開発を目指し、検出系とアプタマーを組み合わせ、細胞外小胞を認識あるいは分離する技術の研究が求められる。

以上、本研究から得られた成果は、治療および診断学分野に対し、機能性人工核酸の有用性を示すことができた。今後、本成果の実用化が期待される。