

論文内容要旨

報告 番号	甲 創 第 7 号	氏 名	田良島 典子
学位論文題目	化学修飾核酸の酵素認識に基づく遺伝子発現抑制デバイスの創製		
<p>アンメットメディカルニーズに挑む新たな創薬手法として、ペプチド・核酸・抗体などを利用したバイオ医薬研究が注目を集めている。その一翼を担う核酸創製の分野では、RNA 干渉 (RNA interference, RNAi) の発見や non-coding RNA が制御する多彩な生命現象が明らかになったことから、特に RNA を対象とした創薬に大きな期待が寄せられている。しかし、核酸分子は生体内でヌクレアーゼ (核酸分解酵素) により容易に分解されてしまうこと、また自然免疫応答の誘導 (副作用の主たる要因) 等が問題となり、これまでに承認された核酸医薬品は僅か3品目に留まっている。</p> <p>ところで RNAi 機構による遺伝子発現抑制法には化学合成した small interference RNA (siRNA) を用いる方法の他に、short-hairpin RNA (shRNA) を発現するプラスミド DNA を利用する方法がある。後者の方法は、shRNA の恒常的な発現による RNAi 効果の持続性が期待できる。しかし、巨大なプラスミドを細胞核内へ導入することの難しさに加え、CpG モチーフに起因する自然免疫応答の賦活化が懸念されるため創薬への応用が難しい。本研究では、これらの問題点を解決する核酸創薬の新技术として、intelligent shRNA expressing device (iRed) による遺伝子発現抑制法を開発した。iRed とはプラスミド DNA から shRNA 発現に必要な部分 (U6 プロモーター + shRNA コード領域) をテンプレートとし、“化学修飾”を施したヌクレオシド三リン酸体 (4'-チオヌクレオシド三リン酸: dSNTP) 存在下にて PCR を行なうことにより“最小化”した DNA 分子である。この“化学修飾”と“最小化”により、shRNA 発現プラスミドの長所である RNAi 効果の持続化を活かしつつ、自然免疫応答という欠点を克服出来ると期待した。</p> <p>まず、4 種類の dNTP のうち 1 種類のみをそれぞれ dSNTP に置換して PCR を行なうことにより、U6 プロモーターならびに shRNA コード領域のみを増幅し、<i>firefly luciferase</i> 遺伝子を標的とした iRed を構築した。得られた iRed の RNAi 効果をプラスミドおよび shRNA と比較したところ、iRed はこれらと遜色ない遺伝子発現抑制効果を発揮することが明らかとなった。この時、C 残基を 4'-チオヌクレオチドに置換した dSC iRed において最も高い RNAi 効果が観察された。また、期待される自然免疫応答回避能を評価した結果、iRed は炎症性サイトカインならびに I 型インターフェロンを全く誘起しないことが明らかとなった。</p> <p>iRed のさらなる生体内安定性および機能向上のため、第 2 世代環状型 iRed を開発した。すなわち iRed の二本鎖両末端をクリックケミストリーにより環状化した分子である。まず、両末端部での選択的なクリックケミストリーを可能とするため、四本の水素結合によってペアを形成する第 3 番目の人工塩基対 (ImN^N:NaO^O) を開発した。Im:Na 塩基対間に働く水素結合のドナーおよびアクセプターの並びを適切に設計することにより、ImN^N:NaO^O 塩基対は PCR においても天然型 Watson-Crick 塩基対と干渉することなく、1 サイクルあたり 99.5%以上の精度で増幅可能であることが明らかとなった。続いて開発した ImN^N:NaO^O 塩基対を利用して PCR により増幅した DNA 二本鎖両末端部選択的にアジド基およびエチニル基を導入した。これを足がかりと CuAAC 反応により、第 2 世代環状型 iRed の構築に成功するとともに遺伝子発現抑制を誘起することに成功した。</p>			