The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	化学修飾型オリゴ核酸の薬効及び毒性に関する研究
Author(s)	和田, 俊輔
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/52253
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　和田 俊輔　　）	
論文題名	化学修飾型オリゴ核酸の薬効及び毒性に関する研究

論文内容の要旨

近年の分子生物学の飛躍的な発展により、難治性疾患の原因及びその病態に関わる分子が明らかにされてきた。それに伴い、薬剤標的としてタンパク質だけでなくDNAやRNAといった、小分子では標的とすることが困難である分子も候補として挙げられるようになった。このような現状で注目されているのが、核酸医薬である。特にsiRNAやアンチセンス核酸は、それぞれメカニズムは異なるものの、標的RNAの配列特異的な分解、もしくは機能阻害を誘導する。そのため新たな阻害剤として期待が高まっているが、オリゴ核酸を医薬品として応用するには主に3つの克服すべき課題が存在している。①生体内での易分解性、②自然免疫応答などのoff-target効果、③組織特異的な移行性の乏しさである。問題点の①と②を改善すべく、各種人工核酸がオリゴ核酸に導入され、分解や自然免疫応答に関与する分子に認識されるのを阻害することが可能となった。しかし、siRNAでは人工核酸の導入位置により薬効を失ってしまう可能性が高く、人工核酸の導入とそれに伴う薬効や毒性面への影響は詳細に解析されていない。siRNAの薬効に大きく関与しないセンス鎖の化学修飾のみで自然免疫惹起を回避し、薬効を維持できることが重要だと考え、本研究の第一章では、siRNAにおけるセンス鎖の化学修飾が薬効や毒性に与える影響を解析した。当研究室で開発された2’,4’-BNA/LNAを導入した、マウス*Apob*を標的としたsiRNAを2種類設計し(siLNA-1, -2)、RNAi効果やヌクレアーゼ耐性を評価した。ヌクレアーゼ耐性において、2’,4’-BNA/LNAをsiRNAのセンス鎖の5’末端のみならず、3’末端側への導入が非常に有効であり、*in vitro*におけるRNAi効果の喪失も認められなかった。その後、薬効が維持され、ヌクレアーゼ耐性の高かったsiLNA-2に化学修飾として、2’-OMe核酸やホスホロチオアート核酸、コレステロール修飾を追加導入した数種類のsiRNAを設計し、薬効や毒性に与える影響を評価した。ヌクレアーゼ耐性を高めたsiRNAで顕著にRNAi効果の持続性が改善したが、コレステロール修飾を追加導入したsiRNAではRNAi効果の持続性が短縮されることが示された。本研究で使用したsiRNAのアンチセンス鎖の中央には免疫惹起モチーフを含んでおり、人工核酸導入による免疫惹起性の変化についても評価した。その結果、免疫惹起モチーフの対面の配列にホスホロチオアート核酸を導入することで投与初期のIFN-α産生が非修飾型siRNA投与群に比べ有意に低減し、免疫惹起性を強く抑制することが明らかとなった。肝臓におけるIFN応答遺伝子の発現変化を評価した結果、コレステロール修飾が肝臓中のインターフェロン(IFN)応答遺伝子の発現に影響を与えている可能性が示唆された。この結果を受け、非修飾型siRNAとコレステロール修飾のみを施したsiRNAを用意し、コレステロール修飾の影響を*in vivo*で評価したところ、コレステロール修飾型siRNA投与群では肝臓中のIFN応答遺伝子の発現が非修飾型siRNA投与群に比べて有意に高くなった。これらの結果より、コレステロール修飾が肝臓中におけるIFN応答遺伝子の発現亢進に影響していることが示された。第二章ではコレステロール修飾がIFN応答遺伝子の発現を亢進するメカニズムを明らかにすることを目的とした。コレステロール修飾をsiRNAのセンス鎖3’末端、アンチセンス鎖3’末端そして両方の鎖の3’末端に施したsiRNAを用いて野生型マウスで実験を行った。その結果、コレステロール修飾の数に依存してIFN応答遺伝子の発現が有意に増大することが示された。また、siRNAの自然免疫応答に重要となるTLR7をノックアウトしたマウスを使用した評価でも、コレステロール修飾によるIFN応答遺伝子の発現亢進が認められ、TLR7に依存していないことが明らかとなった。さらに、DNAでsiRNAを構成することで、免疫惹起性を不活化したsiRNAを用いてコレステロール修飾の影響を評価した。その結果、コレステロール修飾の有無に関わらずIFN応答遺伝子の発現亢進は認められなかった。これらの結果から、RNAによる自然免疫惹起が生じているときにコレステロール修飾が、その炎症作用に影響を与えていることが示された。また、どの遺伝子も標的とすることがない、ネガティブコントロールsiRNAを用いて、コレステロール修飾が配列に関係なく肝臓におけるIFN応答遺伝子の発現を亢進するか評価した。その結果、コレステロール修飾によるIFN応答遺伝子の発現亢進は認められなかった。2014年のSuiらのグループによる報告では、siRNAの塩基配列やそれに付随する立体構造の変化によりIFN-λ誘導性が変化することを示している。このことから、コレステロール修飾による肝臓における免疫応答の増進はsiRNAの塩基配列が影響している可能性が考えられた。これまでに示された結果から、コレステロール修飾型siRNAによる肝臓でのIFN応答遺伝子の発現上昇には、 (1)コレステロール修飾、(2)RNAによる自然免疫応答、(3)特異的な塩基配列の3つの条件

が必要であると考えられた。この条件(1)、(2)から炎症とコレステロールが関連するメカニズムの関与が強く示唆された。そして、コレステロールのホメオスタシスを握るliver X receptor (LXR)が自然免疫応答に関与し、炎症性の遺伝子の発現に変化を与えることが報告されていることから、LXRとコレステロール修飾型siRNAが相互作用するか評価した。その結果、コレステロール修飾型siRNAはLXRと微弱に相互作用することが示された。また、コレステロール修飾型siRNA投与群ではLXRに制御されるいくつかの遺伝子の発現がPBS投与群もしくは非修飾型siRNA投与群と比較して、抑制されていることが示された。このことから、コレステロール修飾型siRNAがLXRに対してアンタゴニスト様の活性を示すことが示唆された。その結果、LXRが有するIFN応答遺伝子の転写因子であるSTAT1ホモダイマーのIFN応答遺伝子への結合を阻害する働きを減弱させていると考えられた。次に問題③の改善において、これまでに様々なデリバリー担体が開発されてきた。しかし、核酸に対し目的の機能を付与する上で最も単純な方法はヌクレオチドもしくはオリゴ核酸に対して、その目的の機能に合う分子をコンジュゲートさせることである。特にアンチセンス核酸の体内動態を変化させ、肝臓特異的に送達する分子としてコレステロールなどの脂質系分子が汎用されている。しかし、クッパー細胞などの非実質細胞への局在が多く、肝実質細胞での薬効改善に成功していない。そこで、本研究の第三章ではコレステロールコンジュゲートにおけるリンカー部分の化学構造に着目して、コレステロールコンジュゲート型アンチセンス核酸の肝臓移行量や細胞指向性を制御できるかを試みた。5種類のリンカーを作成し、Pcsk9を標的としたアンチセンス核酸にコレステロールを結合させた。これらのアンチセンス核酸をマウスに投与し、各種評価を行った。その結果、予想通り、アンチセンス核酸の肝臓移行量はリンカーの化学構造の違いにより大きく変化した。また、5’側のコンジュゲート体と3’側のコンジュゲート体で、リンカーが同じでも3’-コンジュゲート体の肝臓移行量が5’-コンジュゲート体より多いことが明らかとなった。Triethyleneglycolリンカーでは薬効の改善が唯一認められた。一方、肝臓移行量が多いにも関わらず、薬効が改善されないリンカーも認められた。これについて、FISH法を用い、アンチセンス核酸の細胞局在を評価すると、非実質細胞への移行が多くなっていることが明らかとなった。一方、薬効が認められないが肝実質細胞への局在が多いリンカーが存在した。このことから、細胞内でリンカー部位を切断する重要性が考えられた。そこで、リンカーとアンチセンス核酸を繋ぐリン酸部位をホスホロチオアート結合からホスホジエステル結合に変更し、内在性のヌクレアーゼに切断されるように設計した。このコレステロールコンジュゲート型アンチセンス核酸と従来型のコレステロールコンジュゲート体を用いて実験を行ったところ、ホスホジエステル結合に変更したコレステロールコンジュゲート体では顕著な薬効の改善が認められた。このことから、細胞内でコレステロールコンジュゲート部位を切り離す手法が必要であることが示された。毒性面においては、高濃度(600 μM>)でコレステロールコンジュゲート型アンチセンス核酸を投与すると、播種性血管内凝固症候群様の症状もしくは劇症性肝炎を呈することが示された。このことから、高用量のコレステロールコンジュゲート型アンチセンス核酸を高濃度で投与する場合、血中の薬物濃度が顕著に高くならない投与経路を選択する必要性が示された。本研究の成果により、今後、薬効を最大限に高め、安全性を向上させた化学修飾型の核酸医薬が創成できるものと期待される。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　和田　俊輔　）		
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主 査　教 授	小比賀　聡
	副 査　教 授	土井　健史
	副 査　教 授	宇野　公之

論文審査の結果の要旨

核酸医薬開発において、人工核酸の導入は生体内で薬効を発揮するために必要不可欠である。しかし、オリゴ核酸中の人工核酸導入位置による薬効や毒性への影響は半経験的な理解に留まっている。また、人工核酸の使用により、アンチセンス核酸では肝臓を起因とする疾患に対して一定程度の成果を挙げているが、さらなる組織特異的な薬物送達による腎毒性などの毒性低減や低用量化が求められている。本研究では、種々の人工核酸や化学修飾の導入による薬効や毒性、肝臓蓄積量に及ぼす影響を詳細に解析し、以下に示す興味深い知見につながった。

１） RNAiメカニズムを利用するsiRNAにおいて、センス鎖のみの化学修飾で薬効を最大限に発揮し、自然免疫応答などの毒性を抑制できる手法が望まれていたが、2’,4’-BNA/LNAをセンス鎖の3’及び5’末端付近に用いることで、飛躍的な薬効持続性の改善につながった。

２） siRNAのアンチセンス鎖に免疫惹起配列が含まれる場合、その部位への人工核酸導入でsiRNAのRNAi効果が喪失する場合が多いが、今回、免疫惹起配列の対面に存在する塩基を人工核酸に置換することで、その自然免疫応答を抑制できることが明らかとなった。

３） siRNAに対するコレステロール修飾が肝臓におけるインターフェロン応答遺伝子の発現を促進することを見出した。また、そのメカニズムとして、コレステロール修飾部位がLXRと相互作用することで、LXRのSTAT1に対するネガティブフィードバック様の機構を阻害している可能性を示唆した。

４） 肝臓特異的な送達と用量の低減に向けて、コレステロールコンジュゲート型アンチセンス核酸のリンカー部位に着目し研究を行った結果、リンカーの化学構造が肝臓移行性に大きく寄与しており、さらに、肝臓における細胞局在にも影響することを見出した。また、コレステロールコンジュゲート型アンチセンス核酸の薬効を改善するうえで、コンジュゲート部位の切断が重要であることを示した。

５）コレステロールコンジュゲート型アンチセンス核酸を高濃度で投与した際の毒性を詳細に解析し、リンカーの化学構造により毒性強度が変化することを見出した。

以上の研究成果は、siRNAやアンチセンス核酸といった核酸医薬の研究開発に対し、極めて大きなインパクトを与え得るものであり、博士(薬科学)の学位論文として相応しいものであると判断した。