

Title	アンチセンス核酸の細胞内取り込みと標的RNA分解機構に関する研究
Author(s)	堀, 真一郎
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56181
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (堀 真 一 郎)

論文題名

アンチセンス核酸の細胞内取り込みと
標的RNA分解機構に関する研究

論文内容の要旨

細胞内の標的RNAに対して相補的な配列を持つ一本鎖の核酸はアンチセンス核酸 (antisense oligonucleotide, ASO) と定義され、標的遺伝子の発現のみを特異的に抑制できることから、研究ツールとして幅広く利用されている。また、2', 4' -BNA/LNAなどの核酸修飾技術の発展により、ASOは特別なDDSツールが無くとも全身投与で薬効を示せるようになったことから、近年では医薬品としての応用にも注目が集められている。しかしながら、臨床応用が注目される一方で、ASOは*in vitro*での細胞への導入法によって活性の高い配列が異なることが指摘されており、ASOの*in vivo*における活性を適切に予測できる*in vitro*評価系はまだ確立されていないのが現状である。また、ASOがどのように細胞内へ取り込まれ、標的RNAに結合するまでにどのような分子が関与しているのか、また、標的RNAは切断を受けた後、どのように分解処理されているのかといったASOの分子機構についても未だ不明な点が多く残されている。

このような背景を元に、本研究では、まず、生体内で有効なASOをより効率的に単離できる*in vitro*評価系の確立を目指し、培地にCaCl₂を添加するだけでASOの活性を引き出せることを発見し、本手法をCEM (Ca²⁺ enrichment of medium) 法と命名した。また、CEM法は様々な細胞株において、従来のfree-uptake法よりも低濃度かつ短期間でASOの活性が評価できる汎用性の高い手法であることを示した。さらに、異なる複数のASOを用いて、各導入法や*in vivo*肝臓における活性と比較した結果、CEM法は、従来のリポフェクション法と比較して、free-uptake法で導入した際の活性や*in vivo*活性と高い相関を示したことから、CEM法はASOの自然な取り込み経路を促進することでASOのノックダウン(KD)活性を向上させていることが示唆されると共に、生体内で有効なASOを効率良く取得できるスクリーニング法としても有用であることが示された。

次に、各種導入法で取り込まれたASOの細胞内局在を解析した結果、CEM法で導入されたASOはfree-uptake法で見られた細胞内局在と類似していたが、その蛍光強度はより強く、ASOの取り込み量が増加していることが示唆された。また、フローサイトメトリーで細胞内に取り込まれたASOを定量解析した結果、細胞内取り込み量の有意な増加が認められた。さらに、CaCl₂を添加するタイミングを変化させ、ASOのKD活性を評価したところ、ASOと同時にCaCl₂を添加した場合にのみKD活性の向上が認められた。これらの結果から、CEM法は、主にfree-uptake法に類似した細胞内取り込み経路を促進していることが明らかとなった。次に、CEM法が効果を示す条件において、培地中のカルシウム濃度が増加することにより、粒子形成などの変化が起きているのか検証するため、動的光散乱法や透過型電子顕微鏡を用いた解析を行った。その結果、CEM法が効果を示す条件下では、血清に含まれる15 nm程度の粒子が集合した100 nm程度の粒子が形成されていることが明らかとなり、この粒子の集合体の存在がCEM法の鍵となっている可能性が示唆された。また、興味深いことに、ASOの存在の有無にかかわらず、その平均粒子径に全く変化が見られなかったことから、これらの粒子の集合体はASOとは独立して存在していることが示唆された。そこで、CEM法はオリゴ核酸の骨格構造や電荷に依存せず、2', 4' -BNA/LNA修飾ASO以外のオリゴ核酸にも効果を示すのか検討を行ったところ、CEM法は、中性電荷のPMOや2重鎖のsiRNAに対しても広く有効な手法であることが明らかとなった。また、それと同時に、CEM法は、オリゴ核酸に共通の細胞内取り込み経路に作用していることが示唆された。次に、CEM法とshRNAライブラリーを利用した分子スクリーニングを実施したところ、標的遺伝子の発現低下によってASOの効果を減弱させたと思われる候補遺伝子が複数得られた。これらの候補遺伝子の中には、ASOの細胞内取り込みや活性発現に重要な因子が含まれていると予想される。

一方、ASOが細胞内に取り込まれた後、標的RNAはRNase H1による切断を受けた後、その切断産物は細胞内で直ぐに消失することから、それらは細胞内のヌクレアーゼによって急速に分解処理を受けていると考えられている。しかしながら、これまでにその分解メカニズムの詳細は明らかにされていなかったことから、RNAの分解に必要な細胞内の5' エキソヌクレアーゼに着目し、それらの発現を抑制することで、ASOの標的となるpre-RNAやmRNAの3' 切断産物量がどのように変化するか検証を行った。その結果、核内に局在するXRN2が主要な5' エキソリボヌクレアーゼとして、ASO

の標的pre-mRNAの3'切断産物ほぼ全て、および、mRNAの3'切断産物の少なくとも一部の分解を担っていることが明らかとなった。また、RNase H1やXRN2の発現が大幅に低下しているにもかかわらず、mRNAに対するKD効果や切断断片量の変化はわずかであったことから、mRNAを標的とした分解経路は複数存在することが示唆された。

以上のように、本研究において、生体内でより少量で有効なASOを効率的に取得できる *in vitro* 評価系を開発すると共に、ASOが細胞内に取り込まれ、活性を発現するための作用機序に関して新たな知見を得ることができた。さらに、ASOによる標的RNAの分解に重要なヌクレアーゼを明らかにすると共に、RNase H1以外の未知の分解機構を示唆する知見を得ることができた。今後、これらの知見を元に、ASOによる標的遺伝子の分解機構の詳細がさらに明らかになることで、ひいては、より有効性や安全性の高いASO医薬品の開発に繋がっていくことが期待される。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (堀 真一郎)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 小比賀 聡
	副 査	教授 土井 健史
	副 査	教授 八木 清仁

論文審査の結果の要旨

堀真一郎君は、核酸医薬の中でも研究開発が最も進んでいるアンチセンス核酸 (ASO) が現在抱えている課題、すなわち、*in vivo*における活性を適切に予測できる*in vitro*評価系がまだ確立されていない点、ASOがどのように細胞内へ取り込まれ標的RNAに結合するまでにどのような分子が関与しているのか、さらに標的RNAが切断を受けた後どの様に分解処理されているのかが不明であるという点に着目し研究を行い、以下に示す非常に優れた成果を得た。

1) 生体内で有効なASOをより効率的に単離できる*in vitro*評価系の確立を目指し、培地にCaCl₂を添加するだけでASOの活性を引き出せることを発見し、本手法をCEM (Ca²⁺ enrichment of medium) 法と命名した。CEM法は様々な細胞株において、従来のfree-uptake法よりも低濃度かつ短期間でASOの活性が評価できる汎用性の高い手法であることを示すとともに、従来のリポフェクション法と比較して、*in vivo*活性との相関が高いことを明らかにした。

2) 動的光散乱法や透過型電子顕微鏡を用いた解析を行い、CEM法が効果を示す条件下では、血清に含まれる15 nm程度の粒子が集合した100 nm程度の粒子が形成されていることを見出し、この粒子の集合体の存在がCEM法の鍵となっている可能性を明らかにした。

3) CEM法とshRNAライブラリーを利用した分子スクリーニングを実施し、標的遺伝子の発現低下によってASOの効果を減弱させたと思われる候補遺伝子を複数得ることに成功した。これらの候補遺伝子の中には、ASOの細胞内取り込みや活性発現に重要な因子が含まれていると期待される。

4) ASOが細胞内に取り込まれた後、標的RNAはRNase H1による切断を受け、その切断産物は細胞内で直ぐに消失する。その分解メカニズムの詳細を精査した結果、核内に局在するXRN2が主要な5' エキソリボヌクレアーゼとして、ASOの標的pre-mRNAの3' 切断産物ほぼ全て、および、mRNAの3' 切断産物の少なくとも一部の分解を担っていることを明らかにした。また、RNase H1やXRN2の発現が大幅に低下しているにもかかわらず、mRNAに対するKD効果や切断断片量の変化はわずかであったことから、mRNAを標的とした分解経路は複数存在することを提唱した。

以上の研究成果は、博士 (薬科学) の学位論文に値するものと認める。