



Title	糖部架橋型人工核酸搭載アンチセンス分子による脂質異常症治療のための基盤構築
Author(s)	山本, 剛史
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59408
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 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

【18】

氏名	山本剛史
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第25177号
学位授与年月日	平成24年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	糖部架橋型人工核酸搭載アンチセンス分子による脂質異常症治療のための基盤構築
論文審査委員	(主査) 教授 小比賀 聡 (副査) 教授 土井 健史 教授 高木 達也 教授 堤 康央

論文内容の要旨

冠動脈疾患や動脈硬化症の発症の主な危険因子として知られている高コレステロール血症（とりわけ高低比重リポタンパク質コレステロール（Low Density Lipoprotein-Cholesterol: LDL-C）血症）や高トリグリセリド血症（高TG血症）などの脂質異常症に対する安全で有効な治療薬の開発を目指し、糖部架橋型人工核酸（Bridged Nucleic Acid, BNA）類縁体（2',4'-BNA/LNA及び2',4'-BNA^{NC}）を分子内に搭載したホスホロチオアートアンチセンスの薬効、並びに毒性について*in vitro*及び*in vivo*での評価を進めた。また、アンチセンス医薬の薬効を高める方法論についても検討した。

まず、高コレステロール血症（高LDL-C血症）治療薬の開発を目指し、BNA搭載ホスホロチオアートアンチセンスを用いてLDL受容体を直接的に制御する因子（Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin type 9, PCSK9）の阻害を試みた。マウス及びヒト由来の培養細胞に対するトランスフェクション実験に於いてBNA搭載アンチセンスは非常に効率よくPCSK9のmRNA及びタンパク質量を低下させた。マウスに対するBNA搭載アンチセンスの単回投与実験ではデリバリー担体を利用せずとも高率に肝臓内PCSK9のmRNAを抑制することを見出した。また皮下、腹腔内、静脈内のいずれの投与経路に於いても同程度の

mRNA抑制効果が得られることを見出した。さらに動脈硬化食負荷マウスに対する反復投与実験に於いては非常に強力なLDL-Cの低下及びHDL-C（High Density Lipoprotein-Cholesterol）の上昇を達成した。また毒性については目立った肝及び腎毒性は認められなかったが、2',4'-BNA/LNAを搭載したアンチセンスの一部において肝臓毒性の緩徐な発現が認められた。以上の検討から、BNA搭載ホスホロチオアートアンチセンスが非常に効率よく高コレステロール血症を改善することを見出した。また2',4'-BNA^{NC}を搭載したアンチセンスPCSK9阻害薬の脂質異常改善効果を世界で初めて実証し、この薬効が2',4'-BNA/LNAを搭載したものよりも強力であることを示した。

他方で高TG血症の治療薬の開発を目指し、リポタンパク質の代謝に関わるApolipoprotein C-III（ApoC-III）を標的としたBNA搭載アンチセンスの開発を試みた。高脂肪食負荷マウスに対する反復投与実験では抗ApoC-IIIアンチセンスが、ApoC-IIIのmRNAのみならずタンパク質及び血清TGをも大幅に低下させることを見出した。また2',4'-BNA^{NC}を搭載したApoC-IIIアンチセンスが2',4'-BNA/LNAを搭載したものと同等の血清TG低下作用を有していることを見出した。さらに効果的なアンチセンスを選別するために9本の短鎖BNA搭載アンチセンスを設計し、*in vitro*スクリーニングを敢行した。*In vitro*評価にて優れたアンチセンス効果を示したアンチセンスを選定し、マウスに対して適用した結果、単回投与で血清TG抑制効果が約1週間持続するような非常に優れたアンチセンスを選択することが出来た。一方で、中には致死性の急性期毒性を発現するものも認められた。上述した抗PCSK9アンチセンスの検討結果も勘案して総合的に判断すると、配列自体が毒性の発現に大きな影響を与えていると言え、今後動物を用いた毒性実験の結果がヒトへ外挿できるかどうかや安全性の高い配列の信頼のおける選択法の開発が必要であると考えられる

アンチセンスの薬効をさらに高めるためにはどのような工夫が必要なのかを見出すために、詳細なアンチセンスの作用メカニズムの解明を目指した。デザインの異なるApolipoprotein B（ApoB）に対するアンチセンスを14種用意し、*in vitro*に於ける効果を比較した。本検討結果から①鎖長は13-16mer程度が良い、②gapmer構造である必要性は低い、③鎖の内部はエンドヌクレアーゼ対策が必要、④RNase Hを誘導できる天然型DNAなどを5塩基以上連続させる必要がある、並びに⑤鎖の末端は2',4'-BNA/LNAなどの修飾があればホスホロチオアート化は不要といったアンチセンス分子のデザインに関する重要な情報を得ることができた。またアンチセンスの薬効を高めるにはアンチセンス分子の触媒的回転効率を高める必要があると仮説を立て、検証を試みた。試験管内において相補鎖標識RNA及びRNase Hがアンチセンスに対して過剰な条件では短鎖アンチセンスが長鎖アンチセンスを上回る効率で標的の相補鎖標識RNAを切断することを見出した。このことからRNase Hによる切断の回転効率を上げる分子設計やアンチセンスを効率よく細胞に導入するための工夫によって、さらにアンチセンス効果を高めることが可能であることが示唆された。また、mRNA上のアンチセンス標的部を挟むようなプライマーを用いてApoB mRNAの定量的RT-PCRを行う「on-qPCR」と、標的を挟まないようなプライマーセットを用いて定量的RT-PCRを行う「off-qPCR」を用いた検討によって、処置したアンチセンス分子の多くが細胞内小器官や細胞外に留まり、機能していないことが推測され、アンチセンスの投与量と実効量に大きな解離があることが示唆された。これらのことから、より良いアンチセンス医薬を開発するにはアンチセンスの代謝回転を上昇させる工夫とアンチセンスを細胞内へ効率よく送達する工夫が功を奏すると考え

られる。これらの工夫によって、アンチセンスの薬効をさらに上昇させることが可能であると期待している。

本研究ではBNA搭載ホスホロチオアートアンチセンスが脂質異常マウスに対して鋭敏な脂質改善効果を与えることを見出し、臨床薬としての開発の大きな一歩となった。同時にアンチセンス分子の毒性問題の解消に加えて、体内動態特性の最適化、鎖長の短鎖化、アンチセンスの代謝回転を上昇させる工夫、並びにアンチセンスを細胞内へ効率よく送達するデリバリーの工夫などによってさらに効果の高い新しいコンセプトのアンチセンス医薬を作り出すことが可能になることを示唆する結果となった。

論文審査の結果の要旨

高コレステロール血症や高トリグリセリド血症は冠動脈疾患及び動脈硬化症の危険因子として広く知られている。申請者は、これら脂質異常症の治療薬開発を目指したアンチセンス医薬の開発を進めた。また、アンチセンス法の基盤研究についてもあわせて実施した。

まず、高コレステロール血症の治療標的としてPCSK9を選択し、これに対するアンチセンス分子を用いたin vitro, in vivoでの薬効評価、並びに安全生評価を実施したところ、架橋型人工核酸BNAを搭載したアンチセンス分子が非常に効率よくPCSK9遺伝子の発現を抑制し、さらにLDLレセプター量を有意に増加させることを明らかにした。さらに、デリバリー担体を利用しなくとも、BNAアンチセンス分子がマウスにおいてLDLコレステロール値を低下させることを見いだした。投与方法としては、腹腔内、皮下、静脈内投与を検討したが、そのいずれにおいても高い薬効を示した。一部のアンチセンス分子においてはマウスへの長期投与によって、若干の肝毒性発現が認められたものの、アンチセンス分子の化学修飾法を検討することで、回避可能であることを明らかとした。

一方、高トリグリセリド血症の治療標的としてはApoCIIIを選択し、同様の手法により、優れた血清トリグリセリド低下効果を見いだしている。アンチセンス分子の配列を綿密に設計することで、マウスへの単回投与において、一週間薬効が持続するという結果は特筆すべき点である。

さらに、アンチセンス法の基盤研究として、薬効発現に強く影響する因子の同定を独自の手法を駆使して実践し、RNaseH活性を引き出すための分子設計をはじめとした重要な知見を見いだしている。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として十分価値があるものと認める。