The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	RNAスプライシングを制御可能なアンチセンス核酸の配列設計と評価系に関する研究
Author(s)	下, 剛典
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69511
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　（下　剛典）	
論文題名	RNAスプライシングを制御可能な アンチセンス核酸の配列設計と評価系に関する研究

論文内容の要旨

RNAスプライシングは遺伝性疾患の有望な創薬標的の一つである。RNAスプライシングを自在に制御可能な技術として、核酸医薬品の一種であるsplice-switching oligonucleotides（SSO）を用いた戦略が知られる。SSOの作用機序は、pre-mRNAに結合するスプライシング因子を競合阻害する事であるから、RNAに対する結合力を高める目的で修飾核酸をSSOに導入する場合が多い。そこで他の修飾核酸と比較してRNAに対する結合力の高い糖部架橋型核酸（架橋型核酸）をSSOに導入すれば、効率よくスプライシングを制御できると考えた。しかし、架橋型核酸をSSOに導入した報告例はわずかしかなく、適切な配列設計について知られていなかった。そこで、架橋型核酸導入SSOの配列設計を検討した。本研究では疾患モデルをDuchenne型筋ジストロフィー（DMD）とした。DMDは男児に1:3500から5000人の割合で発症する重篤な遺伝性筋疾患である。原因遺伝子として*DMD*遺伝子が明らかとなっている。DMD患者はフレームシフトを伴う欠失変異を有している場合が多く、スプライシング制御の一つエキソンスキッピング（ES）療法によってフレームシフトを回復すれば、治療が可能である。ESはスプライシングの過程でエキソンを読み飛ばす事を指す。エキソンの認識に関与するスプライシング因子をSSOによって競合阻害する事で人工的にESを惹起できる。

本研究においては、ES活性の評価に際して新規評価系細胞株を計3種樹立した。1つめは、*DMD*遺伝子断片を安定発現する細胞株である。qPCR法と組み合わせる事によって簡便かつ精度の高いES活性の比較を実施する評価系を構築した。2つめは、*DMD*遺伝子断片と3色の蛍光タンパク質を利用してES活性を評価する細胞株である。ハイコンテントスクリーニング（HCS）システムと組み合わせる事により、細胞の剥離やcDNA合成、PCR等の操作が不要になり、一層迅速なES活性の評価が可能になった。従来、DMD研究においてES活性の評価には、初代培養筋芽細胞とRT-PCRを組み合わせた評価系が使用されていた。しかし、初代培養細胞筋芽細胞は*DMD*遺伝子の発現を惹起するために分化を誘導する必要があり、ES活性の評価に長時間を要する点が課題であった。樹立した2種類の評価系細胞株を用いる新規の評価系は、この課題を解決した有望な系である。一方で、*DMD*遺伝子断片を用いていたため、全長のジストロフィンタンパク質の発現回復効果を評価する事ができなかった。そこで、3つめの評価系細胞株として、培養細胞であるRD細胞の*DMD*遺伝子をCRISPR/Cas9システムによりゲノム編集したDMDモデル細胞株を樹立した。DMDモデル細胞株は、DMD患者の遺伝子欠失変異を模倣しており、タンパク質レベルにおいてもES活性の評価が可能である。DMD患者における*DMD*遺伝子の欠失領域は多岐に渡り、稀な欠失領域も多く報告されている。今後、様々な遺伝子欠失領域を有する患者に対してES療法を適用する事が望ましいが、稀な遺伝子欠失になるほど既存の評価系で使用する初代培養筋芽細胞の入手は困難となりうる事が予想された。DMDモデル細胞株は、この課題を解決する有望な系である。

以上の評価系を用いて、架橋型核酸導入SSOの配列設計を検討した。まず架橋型核酸としてlocked nucleic acid（LNA）を選択し、43種類のLNA導入SSOを用いて標的とした*DMD*遺伝子エキソン58を効率よくスキップするSSOの標的配列をスクリーニングした。結果、エキソン-イントロンジャンクションにES活性の高い標的配列を見出した。見出した標的配列に基づいて、LNA導入SSOのLNA導入割合、塩基長に関する検討を行った。結果、LNA導入SSOの最適な配列設計は他の修飾核酸を導入したSSOの配列設計と大きく異なる事が分かった。LNA導入SSOの塩基長を検討する中で、RNAに対する結合力が極めて高くなるよう設計した塩基長の長いLNA導入SSOはES活性が低減する事、また自己高次構造を形成する事が分かった。そこで、自己高次構造の形成を抑制する戦略として、塩基部修飾核酸を導入した。グアニン塩基は核酸の高次構造形成に関与する事が多いため、グアニン塩基の結合力を低減する塩基部修飾核酸をSSOに導入すれば自己高次構造形成の抑制ができると考えた。検討の結果、塩基部修飾核酸の導入によりLNA導入SSOの自己高次構造の形成を抑制でき、ES活性が向上した。つまりRNAに対する結合力が極めて高いLNA導入SSOは自己高次構造を形成する事で、標的RNAに対するアクセスが制限され、ES活性が低減していた事が示された。また、塩基部修飾核酸の導入によって自己高次構造の形成を抑制すれば、ES活性の回復が可能になる事が分かった。次に、LNA以外の架橋型核酸をSSOに導入してES活性を評価した。当研究室で合成に成功した新規架橋型核酸のAmido-bridged nucleic acid（AmNA）やGuanidine

bridged nucleic acid (GuNA) をSSOに導入し、LNA導入SSOとES活性を比較した。結果、AmNA導入SSOはLNA導入SSOに比較してES活性が向上した。一方、GuNA導入SSOは配列設計に応じてES活性が大きく変化した。以上からSSOに適した架橋型核酸を選定し、配列設計を検討する必要性が示唆された。一方、エキソン毎にESの難易度が異なる事が知られている。そこで、*DMD*遺伝子エキソン50や51に対しても架橋型核酸導入SSOがES活性を示すか検討を行った。*DMD*遺伝子エキソン51を標的とする21種類のLNA導入SSOを検討したが、ES活性を示すSSOを見出す事ができなかった。先行研究から、2'-OMe RNAやPMOを導入したSSOを複数同時に使用するカクテル法によってES活性が向上する事が知られていた。そこで、LNA導入SSOにもカクテル法を適用した所、非常に高いES活性を示し、LNA導入SSOに対してもカクテル法を適用可能である事を初めて見出した。

本研究においてはES活性の評価に適した評価系を複数構築して、架橋型核酸導入SSOの配列設計について検証した。これらを通じて、架橋型核酸のSSOへの利用可能性を見出す事ができた。今後、これらの知見に基づいて、有効性の高いSSOが開発され、疾患治療薬として応用されていく事が期待される。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　下　剛典　）			
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	辻川　和丈

論文審査の結果の要旨

RNAスプライシングの制御が可能となれば、多くの遺伝性疾患の有効な治療法につながることから、核酸医薬品の一種であるスプライス制御オリゴヌクレオチド（SSO）に注目が集まっている。SSOは標的である遺伝子のpre-mRNAに結合し、スプライシング因子とpre-mRNAとの相互作用を阻害することで機能を発揮する。そこで、申請者である下 剛典氏は、RNAとの結合親和性に優れた架橋型人工核酸を搭載することによりSSOの機能向上が可能になるという考えのもと、Duchenne型筋ジストロフィー（DMD）を対象疾患としたSSOの配列設計・機能評価に関する研究を精力的に進め、以下に示す興味深い成果を得た。

１）SSOの機能を簡便かつ精度よく評価することを目的とし、*DMD*遺伝子断片を安定発現する細胞株、*DMD*遺伝子断片に加え3色の蛍光タンパク質の発現を利用して活性を評価する細胞株、培養細胞の*DMD*遺伝子をCRISPR/Cas9システムによりゲノム編集したDMDモデル細胞株の計３種の新規評価系細胞株の樹立に成功した。また、各細胞株の特性に応じたSSO評価系の構築に成功した。

２）配列長や修飾位置、修飾数の異なる架橋型人工核酸搭載SSOを数十種類設計し、上記の評価系を用いて活性の評価を行った。その結果、従来とは異なるSSOの設計指針を提唱するに至った。また、SSOの自己高次構造形成が活性低下につながることを見出し、自己高次構造形成を抑制するための核酸塩基部修飾をSSOに施すことで、活性回復が認められることを実験的に示した。

３）複数種類の架橋型人工核酸に対し、SSOへ導入した際の活性向上効果について検証し、人工核酸ごとに最適な導入数や位置などが異なるという興味深い知見を得た。

以上、本論文にまとめられた研究成果は学術的にはもちろんのこと、今後の創薬研究においても非常に意義深いものであり、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。