The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	動脈硬化症の治療を目的とした新規アンチセンス薬の開発とその副作用克服に向けた薬物送達技術に関する研究
Author(s)	和田, 郁人
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69524
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　郁人　　）	
論文題名	動脈硬化症の治療を目的とした新規アンチセンス薬の開発と その副作用克服に向けた薬物送達技術に関する研究

論文内容の要旨

本研究では、動脈硬化症の治療を目的として、悪玉として知られるlow density lipoprotein（LDL）や善玉とされるhigh density lipoprotein（HDL）に着目した新規治療薬の開発研究を行った。

一つ目のアプローチとして、重度の高LDLコレステロール（LDL-C）血症を呈する家族性高コレステロール血症（FH）を対象として、LDL-Cの低下を目的とした研究を行った。FHは、若年のうちから冠動脈疾患を発症する遺伝性疾患であるが、スタチンなどの強力な脂質低下薬がある現在においても十分に治療できない患者が多く存在するため、新なタイプの薬の開発が望まれる。そこで本研究では、proprotein covertase subtilisin/kexin type 9（PCSK9）を標的としたアンチセンス薬の開発に着手した。PCSK9はLDL受容体を分解へと誘導するタンパク質であるが、その機能喪失型変異の保有者は非保有者と比べて、LDL-C値が28%低く冠動脈疾患の発症率が88%も低いことが示されていることから、優れた薬剤標的と考えられている。実際に、当研究室では、抗PCSK9アンチセンス薬がLDL-C低下効果をマウス実験にて実証していることから、本研究では臨床応用化に向けたヒトPCSK9に対するアンチセンスの最適化を行った。まず、ヒトPCSK9 mRNAのコード領域に対して当研究室で開発された架橋型人工核酸であるlocked nucleic acid（LNA）またはamido-bridged nucleic acid（AmNA）修飾を有するgapmer型アンチセンス分子を計180分子設計し、ヒト肝がん由来細胞株Huh-7を用いてCEM（Ca^{2+} enrichment of medium）法による配列スクリーニングを行った。なお、CEM法は、*in vivo*活性を精度高く予測可能な当研究室で確立した*in vitro*評価系である。スクリーニングより得られたアンチセンス分子を、ヒトと遺伝子相同性の高いカニクイザルに対して投与を行ったところ、10 mg/kgの投与後にLNA修飾体、AmNA修飾体ともに顕著なPCSK9低下並びに、それに伴うLDL-C低下（最大60%低下）を認めた。一方で、得られたアンチセンス分子は有効用量においてもカニクイザルやラットにおいて腎障害を誘導したことから、安全性に関してはさらなる設計の最適化を必要とした。この腎障害は、アンチセンス分子が蓄積しやすいとされる近位尿細管上皮細胞に集中して観察されたため、腎臓への移行性を軽減することで回避可能な副作用であると考えられた。この戦略を可能にする分子として、コレステロールと*N*-acetylgalactosamine（GalNAc）に着目した。コレステロールはその脂溶性により血中滞留性を向上する。GalNAcは肝実質細胞表面に発現するアシアロ糖タンパク質受容体のリガンドとして知られ、当研究室ではアンチセンス分子にコンジュゲートすることで肝実質細胞における遺伝子発現抑制効果を10倍以上に向上させることに成功している。この2分子を1分子のアンチセンス分子へコンジュゲートすることで、腎蓄積を回避するとともに肝実質細胞移行性の向上により低用量化が期待された。実際に、マウスに対して静脈内投与を行ったところ、これらの分子をコンジュゲートすることで肝臓における活性は10-20倍に向上することが示され、コレステロールとGalNAcの2分子をコンジュゲートすることで非コンジュゲート体と比較して腎蓄積率を50分の1にまで低減することに成功した。一方で、GalNAcのみでも腎蓄積率を10分の１と十分に低減できることが明らかとなり、さらに、実用化を考えた場合単一分子のコンジュゲートは合成の観点からも有利と考えられたため、GalNAcコンジュゲートを抗ヒトPCSK9アンチセンス薬へ応用し、活性及び腎毒性について評価を行った。その結果、0.3 mg/kgの単回投与でもカニクイザルに対して顕著なLDL-C低下並びにPCSK9低下効果を示し、有効用量を10-30分の1にまで削減することに成功した。これは腎蓄積率を考慮すると有効用量における腎臓への蓄積量は100-300分の1と計算でき、実際に、有効用量の10倍量の投与においても腎臓への障害は全く認められなかった。以上より、本研究では、最終的に強力なLDL-C低下効果を有し、かつ、従来型より広い安全域を有する抗ヒトPCSK9アンチセンス薬の開発に成功した。

他方で、善玉として知られるHDLに着目して新たな動脈硬化治療戦略の模索を行った。HDLの善玉としての作用は幾つか挙げられるが、最も重要な作用としてコレステロール逆転送系がある。これは、抹消に溜まったコレステロールを回収し肝臓へと運搬する作用（RCT）であるが、RCTが活発なほど冠動脈疾患のリスクが低いことが疫学的にも示されている。本研究では、RCTの際に肝臓においてHDLの形成に関与し、抹消においてはHDLにコレステロールを渡すATP-binding cassette protein A1（ABCA1）というタンパク質に着目し、RCT活性化を目的としてABCA1の発現を増加

させるようなnatural antisense transcript（NAT）阻害戦略について検証を行った。NATはDNA二重鎖のうちmRNAと相補的な鎖から転写される長鎖非コードRNAでmRNAの転写調節や翻訳調節を担うことが明らかにされつつある。まず、データベースを用いた探索から、ABCA1 mRNAに対するNATの候補となるABCA1-ASをヒト及びマウスで見つけ出し、これと相補的なgapmer型オリゴ核酸を設計し阻害を試みた。その結果、本戦略により、マウスマクロファージ様細胞株であるj774.1細胞においてABCA1の遺伝子発現、タンパク質発現ともに最大2倍程度の増加を認めた。さらに、^{3}H標識コレステロールを用いた実験からRCTの指標となる細胞からのコレステロール排出率を算出したところ、有意な活性化が認められた。以上より、HDLのRCTを活性化させる方法としての本戦略の有効性が細胞レベルで示され、動脈硬化症の新たな治療戦略に成り得る可能性を示す有益な知見を得ることに成功した。

以上の本研究から、LDLとHDLの二つの視点から動脈硬化症の治療に関する有意義な知見が得られ、今後の新たな治療戦略として期待された。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　和田　郁人　）			
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	斯波　真理子

論文審査の結果の要旨

申請者である和田郁人氏は、悪玉コレステロールとして知られるlow density lipoprotein（LDL）や善玉とされるhigh density lipoprotein（HDL）に着目し、架橋型人工核酸を搭載した核酸医薬を用いることで動脈硬化症に対する新規治療薬を開発すべく精力的に研究を行い、以下に示す成果を得た。

１）重度の高LDLコレステロール（LDL-C）血症を呈する家族性高コレステロール血症（FH）の治療には、LDL-Cを低下させることが重要である。申請者は、LDL受容体を分解へと誘導するタンパク質であるproprotein covertase subtilisin/kexin type 9（PCSK9）を標的としたアンチセンス薬の開発を進めた。架橋型人工核酸を搭載したアンチセンス分子を設計し、ヒト肝がん由来細胞株Huh-7を用いてスクリーニングを実施した。得られたアンチセンス分子をカニクイザルに対して投与し、顕著なPCSK9量の低下並びにそれに伴うLDL-C低下を確認した。

２）得られたアンチセンス分子に腎毒性が認められたことから、さらなる設計の最適化を実施した。申請者は、腎障害は腎臓への移行性を軽減することで回避可能であると考え、コレステロールと*N*-acetylgalactosamine（GalNAc）の両分子を1つのアンチセンスへコンジュゲートすることで、腎蓄積を回避するとともに肝実質細胞移行性の向上による低用量化を狙った。実際、マウスにおいて肝臓における活性は10-20倍に向上すること、腎蓄積率は50分の1にまで低減することを見出した。

３）さらに検討を重ねた結果、GalNAcのみでも腎蓄積率を10分の１に低減できることが明らかとなったため、GalNAcコンジュゲートを抗ヒトPCSK9アンチセンス薬へ応用し、活性及び腎毒性について評価した。その結果、0.3 mg/kgの単回投与でもカニクイザルに対して顕著なLDL-C低下並びにPCSK9低下効果を示し、有効用量を10-30分の1にまで低下させることに成功した。

４）肝臓においてHDLの形成に関与し、抹消においてはHDLにコレステロールを渡すATP-binding cassette protein A1（ABCA1）というタンパク質に着目し、ABCA1の発現を増加させるようなnatural antisense transcript（NAT）阻害戦略について検証を行った。その結果、ABCA1に対するNATを標的としたアンチセンス分子を用いることで、マウスマクロファージ様細胞株j774.1細胞においてABCA1の遺伝子発現、タンパク質発現ともに最大2倍の増加を認めた。さらに、細胞からのコレステロール排出についても有意に増加していることを確認した。

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、創薬研究とし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。