



Title	細胞内移行性アプタマーによるアンチセンス核酸の細胞内デリバリー及び細胞内標的に対するアプタマー創製に関する研究
Author(s)	田中, 敬介
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/82177
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、 〈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

論文内容の要旨

氏 名 (田 中 敬 介)

論文題名

細胞内移行性アプタマーによるアンチセンス核酸の細胞内デリバリー及び細胞内標的に対するアプタマー創製に関する研究

論文内容の要旨

ヒトの体内には疾患への関与が解明されていながら創薬標的にすることができていない数多くの標的候補分子が存在する。特に、細胞内には細胞内タンパク質だけでなく核酸分子も有望な標的として存在する。そのため、これらを標的とした医薬品を創成するための様々な創薬方法が研究されている。これまでに細胞外タンパク質、膜タンパク質を標的とした創薬として大きな成功を収めている抗体では、その分子サイズによって細胞内タンパク質への適応が困難である。細胞内の分子を標的とした創薬として、低分子化合物と抗体の中間の分子量を有する中分子創薬の研究がなされている。細胞内の核酸分子を標的とした中分子としては、核酸分子であるアンチセンス核酸 (ASO) やsiRNAなどが挙げられる。一方、細胞内タンパク質を標的とした中分子としては、ペプチドやアプタマーが挙げられる。

ASO、siRNAについては近年盛んに研究が行われ、複数の医薬品が上市されている。しかしながら、様々な疾患へ広く適応するためには対象臓器へのデリバリーが課題である。安定性や血中滞留性向上のために現在広く用いられている人工核酸を導入したASO、siRNAは肝臓、腎臓へ集積し、それ以外の臓器の疾患への適応が困難となっている。この課題に対して、膜タンパク質に対するリガンドをASO、siRNAへコンジュゲートし、リガンドのエンドサイトーシスを利用し、標的膜タンパク質が発現している臓器への特異性を高める方法が注目されている。しかし、現状、上市に至っているのは肝臓を標的としたリガンドをコンジュゲートしたもののみであり、その他の臓器を標的とした有用なリガンドの開発が求められている。

ペプチド、アプタマーは抗体よりも分子量が低く、抗体と同程度の結合親和性、特異性を有していることから、細胞内タンパク質を標的とした中分子創薬として期待されている。しかし、最低でも数kDaの分子量を有するため、細胞内へ受動拡散しないことなど、医薬品として用いるためには様々な課題が存在している。

本研究では、これらの課題を解決するために、細胞内移行性を有するアプタマーを利用することを考えた。アプタマーとは一本鎖のDNA又はRNAからなる分子であり、立体構造を形成し、標的分子に特異的に結合する。アプタマーはランダムな配列を有するライブラリの中から、目的の機能を有する配列を選別する形で創製される。本研究で着目した細胞内移行性アプタマーとは、膜タンパク質に結合しエンドサイトーシスされることで、細胞内へと移行する機能を有するアプタマーである。この細胞内移行性アプタマーをASOにコンジュゲートすることで、ASOの細胞内への輸送を試みた。どのような特徴を有する膜タンパク質を標的とすることで、高い細胞内移行、ASO活性の向上に繋がるか不明であることがリガンド開発における課題の一つであると考えた。そのため、培養細胞そのものを標的とし、細胞内移行性を指標としてアプタマーの創製を行なった。これにより、標的タンパク質を指定することなく、細胞内移行性の高いアプタマーを創製することが可能である。その際、異なる種類の人工核酸を導入したライブラリを作製し、それぞれからアプタマーを得ることで、細胞内移行性の向上に有用な人工核酸についても検討した。その結果、トリプトファンのアミノ酸側鎖構造を有する人工核酸を導入したアプタマーが最も高い細胞内移行性を有していた。このような構造を有する人工核酸が、タンパク質との結合親和性向上に有用であることは過去に報告があり、今回の結果も膜タンパク質との結合親和性が向上した結果であると考えられる。創製したアプタマーにASOをコンジュゲートし、ASOによる標的RNA分解活性を測定した。予想とは異なり、アプタマーをコンジュゲートしたASOによる標的RNA分解活性は、何もコンジュゲートしていないASOと比較して向上しなかった。これは細胞内へ移行したアプタマーがリソソームに集積することが要因であると考え、エンドソーム脱出を促進する分子としてクロロキンを同時に添加しASOの活性を評価した。その結果、アプタマーをコンジュゲートしたASOは何もコンジュゲートしていないASOに比べて、高い標的RNA分解活性を示した。以上の結果より、本研究で行なったアプタマー創製方法によって、標的膜タンパク質を指定することなく、細胞内移行性の高いアプタマーを創製することに成功した。また、アプタマーによるASOの活性向上には細胞内移行性だけでなく高いエンドソーム脱出能が重要であることが示された。今後、それらの機能を有するアプタマーの創製方法を開発することでさらなる改善が期待できる。

続いて、細胞内タンパク質を標的とした中分子創薬においてアプタマーを利用する際の課題について考察し、その

課題及び細胞内移行性の課題を解決可能なアプタマー創製方法を考案した。タンパク質を標的とした従来のアプタマー創製方法の多くはリコンビナントタンパク質を用いて試験管内の系で実施される。しかし、細胞内は塩濃度、分子密度、夾雑タンパク質の存在など、試験管内の系と条件が大きく異なる。この細胞内条件と選別時の条件の解離をなくすことが、細胞内タンパク質を標的としたアプタマー創製を行うためには必要であると考えた。新たなアプタマー創製方法として、タグ標識された標的タンパク質を細胞に発現させ、その細胞とライブラリをインキュベートした後に、細胞を破碎しタグによる標的タンパク質の回収を行う方法を考案した。これにより細胞内に移行し、かつ標的タンパク質に結合した配列のみが選別される。本研究では標的タンパク質としてbeta-cateninを選択し、この方法によるアプタマー創製を試みた。前項の結果より細胞内移行性の向上に有用であった人工核酸の導入、タグによる標的タンパク質回収の際の非特異的な結合の抑制を行うことで、アプタマーの創製に成功した。創製したアプタマーは細胞内移行性を有することと、リコンビナントbeta-cateninへの結合活性を有することが明らかになった。考案した細胞内標的タンパク質に対するアプタマー創製方法はこれまでにない方法であり、今回の結果は細胞内タンパク質を標的としたアプタマーの創製につながる大きな成果である。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (田 中 敬 介)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 小比賀 聡
	副 査 教授 井上 豪
	副 査 教授 大久保 忠恭

論文審査の結果の要旨

アンチセンス核酸やsiRNAなどの核酸医薬の大きな課題として細胞内移行性の低さがあげられる。その解決策の一つとして、低分子リガンドを核酸医薬の末端に結合させ細胞表面のレセプターを介した取り込み向上を狙う戦略が注目されている。本戦略の成功例として、肝臓において発現が認められるアジアロ糖タンパク受容体のリガンドとなるGalNAcを結合させた核酸医薬が知られている。GalNAcを結合させた核酸医薬は肝臓で高い有効性を示し、実際に医薬品としての利用も進んでいる。しかし、肝臓以外の臓器へのデリバリーはまだ限定的である。申請者は、細胞内移行性アプタマーを創製し、核酸医薬の細胞内移行性向上に向けた研究に取り組んだ。また、細胞内移行性アプタマー自身を細胞内標的の機能阻害剤として利用するための新たな基盤技術構築を行なった。その結果、以下に示す優れた成果を得た。

1) Cell-internalization SELEXによって、細胞内移行性に優れたアプタマーを創製した。また、その過程において人工核酸の一種であるU^{TP}を導入したライブラリの利用が有効であることを見出した。

2) 見出したアプタマーをアンチセンス核酸に結合させアンチセンス核酸の機能解析を行なった結果、アプタマー結合型アンチセンス核酸を細胞に添加するだけでは十分な効果が見られなかったが、リソソームを破壊する低分子化合物を添加することによりアンチセンス活性が大きく向上することを明らかにした。

3) これらの知見に基づき、リソソームに集積しないアプタマー取得のための新たなSELEX手法を考案した。本手法により得られたアプタマーをアンチセンス核酸に結合させたところ、アンチセンス活性の向上が認められた。

4) 一方、細胞内移行性と細胞内標的に対する結合親和性を併せ持つアプタマーを取得するための新たなアプタマー選別手法を考案し、細胞内に存在するbeta-cateninを標的としたアプタマーの開発を行なった。その結果、得られたアプタマーは高い細胞内移行性を示すとともに、beta-cateninに対する十分な結合能を有していることを確認した。

以上、本論文は、細胞内移行性に優れた人工核酸アプタマーを核酸医薬のキャリアーとして利用するための基盤技術を生み出すとともに、細胞内に存在するタンパク質を標的としたアプタマー開発に新たな道筋をつけたものであり、核酸医薬・核酸化学領域の発展に大いに貢献するものである。これらのことから本論文は、博士(薬科学)の学位論文に値するものと認める。