

Title	Development and Brain Imaging of Repeat DNA-binding Molecules
Author(s)	村上, 英太郎
Citation	大阪大学, 2022, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/87828
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 (村上 英太郎)	
論文題名	Development and Brain Imaging of Repeat DNA-binding Molecules (リピートDNA結合分子の開発及び脳イメージング)
論文内容の要旨	
<p>Chapter 1</p> <p>2011年、ALS/FTDの最も頻度の高い原因として、<i>C9orf72</i>遺伝子領域のイントロンにおけるGGGGCC (G4C2) リピートの異常伸長であることが報告された。G4C2リピートが介在する発症メカニズムや、異常伸長したリピート配列の分子機構は、解明されていない。G4C2リピートは、G-四重鎖を形成することが知られており、この構造に結合する分子も多く報告されている。一方で、G4C2 repeat の相補配列である G2C4 repeat に結合する低分子に関する研究はほとんどない。</p> <p>G2C4/G2C4モチーフおよびG2C4 repeatのDNAに結合する低分子、DQGを報告した。結合様式を明らかにするため、シトシンとの水素結合が期待できる <i>N,N'</i>-diheteroaryl guanidine誘導体を設計した。DQGや設計した誘導体 D3iQG、D1iQG、Q3iQGを用いて結合を比較し、G2C4/G2C4に対する構造的な結合要因が抽出された。</p> <p>得られた結合に関わる分子構造情報を元に、新規結合分子1,3-di(quinazolin-2-yl)guanidine(DQzG)を設計した。DQzGは、DQGよりもG2C4への結合親和性が高く、また、NMR解析により、シトシンと水素結合を形成していることが示唆された。</p> <p>G2C4リピート結合分子の生物学的な影響を調べるために、G4C2/G2C4リピートの転写に対する影響を調査した。DQzGが、転写過程で形成されるヘアピン構造に結合し、転写を阻害することを期待した。転写反応により産出したRNA量は変化していないことが明らかになり、DQzGはリピートの転写に影響しないことが示唆された。</p> <p>Chapter 2</p> <p>ハンチントン病は、<i>HTT</i>遺伝子中のCAGリピートの異常伸長により、脳線条体の神経細胞が欠落して発症する。異常伸長機構として、CAGリピートが形成するCAG/CAGヘアピン構造が、ミスマッチ修復酵素により不完全な修復を受けた結果、リピートが伸長するモデルが提案されている。低分子ナフチリジン-アザキノロン(NA)は、CAG/CAGモチーフに対して2分子が協同的に結合し、安定な複合体構造を形成することが明らかになっている。2020年には、ハンチントン病モデルマウスの脳線条体へNAを直接投与することで、伸長したCAGリピートが短縮することが報告された。</p> <p>NAは血液脳関門(BBB)を透過できないため、ハンチントン病モデルマウスの線条体へ直接投与をしている。しかし、個体への侵襲性により、NAによる運動機能改善などの治療効果を確認するには至っていない。そこで、BBBを経由しない脳への送達法である経鼻投与を用いることにした。一方で、脳内の薬物分布を解析する技術の開発が課題であった。そこで、低分子薬物の脳内への送達と脳内動態の解析を一挙に解決する方法として、経鼻投与と組織透明化/3次元イメージング技術を組み合わせた、蛍光標識低分子を用いた経鼻投与-組織透明化全脳イメージングシステムの開発に取り組んだ。</p> <p>脳実質への直接投与により、設計した蛍光標識低分子NA-Alexa594が、組織透明化全脳イメージングにより検出可能であることを明らかにした。</p> <p>さらに、経鼻投与による脳への送達を試みた。投与直後、血管内や嗅球に存在し、投与から一日後に嗅球付近でNA-Alexa594が検出され、経鼻投与による脳への送達が可能であることを明らかにした。また、経鼻投与を用いた分子の脳内分布を経時的に追跡したところ、2種類以上の送達経路の存在が確認された。</p> <p>未修飾NAの経鼻投与による脳への送達の検出を試みた。MSイメージングを用いて、脳実質投与でのNAの検出可能であったが、経鼻投与による脳への送達は、確認されなかった。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (村上 英太郎)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	中谷 和彦
	副 査	教授	深瀬 浩一
	副 査	教授	鈴木 孝禎

論文審査の結果の要旨

申請者は、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)/前頭側頭型認知症 (FTLD) の原因となる異常伸長 GGCCCC (G2C4) リピート DNA に結合する化合物の創製ならびに全脳イメージングを用いた CAG リピート結合分子の薬物動態解析に関する研究に取組み、以下の成果を上げている。

(1) G2C4 リピート DNA 結合分子の創製

C9orf72 遺伝子の GGGGCC (G4C2) リピートの異常伸長は、一部の ALS 及び FTLD 発症の原因となることが報告されており、G4C2 リピート及びアンチセンス鎖である G2C4 リピートに結合する化合物は、発症に関わるリピート不安定性や毒性リピート RNA への転写を抑制する可能性を持つ。申請者は、シトシンとの水素結合及び核酸塩基とのスタッキングを考慮し、グアニジンに 2 つのキノリン環を導入した 1,3-di(quinoline-2-yl)guanidine (DQG) を設計・合成した。二つの連続した C-C ミスマッチを含む G2C4/G2C4 モチーフ及び G2C4 リピートと DQG の結合を二本鎖融解温度測定、表面プラズモン共鳴法などにより評価し、DQG がこれらの DNA に結合することを明らかにした。また種々の DQG 誘導体を用いた構造活性相関解析により、DQG よりも高い結合親和性を示す化合物 1,3-di(quinazolin-2-yl)guanidine (DQzG) を見出した。さらに DQzG が結合した G2C4/G2C4 モチーフ複合体の NMR 解析により、DQzG とシトシンが水素結合を介して結合していることを示した。

(2) 全脳イメージングを用いた CAG リピート結合分子の薬物動態解析

ハンチントン病の原因となる CAG リピートに結合しリピート短縮を誘導する低分子ナフチリジン-アザキノロン (NA) は、血液脳関門 (BBB) を通過できないために、投与方法が侵襲性の高い定位脳手術による直接投与に限定されている。申請者は、BBB を介さずに NA を脳内へと送達するため、非侵襲的な投与方法である経鼻投与を行い、投与後の化合物の脳内動態を組織透明化とライトシート型蛍光顕微鏡 (LSFM) を活用した 3 次元イメージングによりマウス全脳を解析した。実験系構築のために、灌流固定可能な 1 級アミノ基と LSFM で蛍光検出可能な Alexa594 を導入した NA 誘導体 (NA-Alexa) を設計・合成し、定位脳手術により直接投与した後、組織透明化を行い LSFM による全脳イメージングを行なった結果、マウス脳内の NA-Alexa を検出することに成功した。本手法を用いた経鼻投与後の NA-Alexa の全脳イメージングにより、少なくとも脳内へと送達されるルートが 2 つ以上あることを明らかにした。

上記の成果は、リピート配列の異常伸長により発症する ALS/FTLD に関わるリピート DNA に結合する新たな低分子の実験結果を提示し、新たな分子設計に繋がる重要な知見を提供するものである。また、低分子の脳内における薬物動態を解析する新たな手法を確立し、経鼻投与後の薬物動態を追跡できることを実証しており高く評価できる。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。