

氏 名	やまよし あさこ 山 吉 麻 子
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 3 2 2 号
学 位 授 与 の 日 付	平成 15 年 7 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規程第3条第3項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科 機能科学専攻
学 位 論 文 題 目	Photodynamic Antisense Regulation of Human Cervical Carcinoma Cell Growth using Psoralen-conjugated Oligonucleotides (光架橋性アンチセンス核酸を用いた遺伝子発現制御法に関する研究) (主査)
審 査 委 員	教 授 村上 章 教 授 遠藤 泰久 教 授 山口 政光 助教授 山岡 哲二

論文内容の要旨

ヒトゲノムプロジェクトがDNAのドラフトシーケンスを明らかにした現在、遺伝子の効果的なノックアウト法開発は多くの難治性疾患の治療につながることが期待される。標的遺伝子に対して核酸断片（アンチセンス核酸）を結合させて特定の遺伝情報の発現を制御するアンチセンス法は、近年注目を集めている遺伝子ノックアウト法の1つである。現在行われているアンチセンス核酸医薬の臨床試験はホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド（S-Oligo）を用いてなされているが、標的遺伝子との低い二重鎖形成能、タンパク質との非特異的結合などの問題点が挙げられる。またS-Oligoに代わるいくつかの核酸誘導体も報告されてはいるものの、実用化までには至っていない。本論文は『光照射によって標的遺伝子と架橋する機能性アンチセンス核酸』を分子設計し、アンチセンス効果を向上させることを目的とする、新規アンチセンス法（Photodynamic Antisense Regulation ; PDAR）を提唱している。

論文は3部から構成されている。

第1部は機能性アンチセンス核酸の分子設計と合成である。アンチセンス核酸に導入した機能性分子は皮膚病の光線治療にも用いられているPsoralen誘導体であり、核酸への導入箇所並びに用いる核酸の構造に着目してその機能を論じている。導入位置は核酸の5'末端並びに中央部の糖環2'位であるが、いずれも光架橋性能に影響を与えていない。また核酸の構造として直鎖型に加え、ヘアピン型核酸も合成し、両者の光架橋性能および結合選択性の違いを論じている。開発されたアンチセアンチセンス核酸はいずれも対象とする遺伝子（mRNA）との結合選択性が高く、副作用の少ない薬剤としての可能性が論じられている。

第2部では光架橋性核酸を培養ガン細胞の増殖制御に適用した結果が論じられている。ガン細胞の増殖を制御するために種々の制ガン剤が使用されているが、これらは重篤な副作用をもたらす場合がある。本論文で採用された癌治療の概念は強力な薬剤でガン細胞を死滅させるのではなく、遺伝子発現の流れを穏やかなしかし効果的な薬剤で遮断し、細胞が自ら死を選ぶように誘導するもの（アポトーシス誘導）である。アポトーシスを経由する形での癌治療法は現在注目を集めている手法であるが、確立にいたっていない。論文では子宮頸ガン細胞を対象とし、遺伝子中に存在するヒトパピローマウイルスゲノムの発現をPDAR法により制御する手法を採用し、上述の癌治療概念の妥当性を評価している。本論文では光照射の結果、従来法の1～2%程度のアンチセンス分子濃度で顕著にガン細胞の増殖を制御すること成功し、さらにその制御機構が当初想定し

て機構に基づいていることを明らかにしている。

第3部では第2部までの結果に基づき、計算科学の手法と細胞生物学との手法を融合させた、新たなアンチセンス核酸の分子設計法を提唱している。本法によって設計されたアンチセンス分子はほぼ60%の確度でアンチセンス効果を発揮した。本研究はさらなるプログラムの改良が必要としながらも、今後のアンチセンス遺伝子治療法の発展に必要な手法であると論じられている。

論文審査の結果の要旨

申請者は21世紀の医療として注目されているアンチセンス遺伝子治療に取り組んでいる。アンチセンス法は疾患に関わるRNAの発現を選択的に制御することで疾患治療を行う手法であるが、アンチセンス分子の作用濃度並びに分子設計法の確立に問題を抱えている。本論文では従来から用いられてきているアンチセンス分子の高機能化を行い、それを合成化学、生化学および細胞生物学的評価している。高機能化の試みは3種類論じられているが、いずれもアンチセンス核酸の対象RNAとの結合選択性向上に顕著な成果を上げている。一方、計算科学的手法に基づくアンチセンス分子の分子設計法は、細胞を用いた実験結果との対比がなされており、十分な整合性を報告している。これらの分子設計法は先に述べた高機能化アンチセンス分子の設計にも利用可能であり、将来の両者の融合が期待され、今後その重要性を増すものと考えられる。

高機能化アンチセンス核酸を用いたガン細胞制御の試みにおいては、従来とは異なった概念での制御を実施している。すなわち強力な制ガン剤を用いるのではなく、穏やかな機能を持つアンチセンス核酸でガン細胞に自発的な死をもたらすという概念を提唱している。その結果は、従来法に比べ数%ほどの作用濃度で有効に機能させうることを示しており、この概念がアンチセンス法の臨床応用に有効であることを示唆している。本論文のこれらの概念・手法はいずれも新規性、独自性が高く今後の展開が期待される。

本論文は審査を経て掲載された以下の2編の論文、並びに国際会議で発表された内容をもとに構成されている。

- (1) Murakami A., Yamayoshi A., Iwase R., Nishida J., Yamaoka T. and Wake N. Photodynamic antisense regulation of human cervical carcinoma cell growth using psoralen-conjugated oligo(nucleoside phosphorothioate). *European Journal of Pharmaceutical Science*, **13**, 25-34 (2001)
- (2) Yamayoshi A., Iwase R., Yamaoka T. and Murakami A. "Psoralen-conjugated oligonucleotides with hairpin structure as a novel photo-sensitive antisense molecule" *Chemical Communications*, 2003, 1370-1371.
- (3) Murakami, A., Yamayoshi, A., Iwase, R., Nishida, J., Yamaoka, T. and Wake, N. Photodynamic antisense regulation of human cervical carcinoma cell. in "Biomedical Polymers and Polymer Therapeutics" (Ed) Kluwer Academic, Plenum Publishers. , 389-395 (2001).

以上、本論文は遺伝子治療の発展に不可欠な遺伝子制御法について新規かつ有効な概念を提唱しており、学術的価値が高いことを各審査委員が一致して認めた。