

氏 名	ひぐち まいこ 樋 口 麻衣子
学位(専攻分野)	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	博 甲 第 5 3 4 号
学位授与の日付	平成 21 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 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	Functional antisense oligonucleotides for the regulation of genes containing a single point mutation (点突然変異遺伝子選択的発現抑制能を有する高機能性アンチセンス核酸の開発に関する研究)
審 査 委 員	(主査)教授 村上 章 教授 田嶋邦彦 教授 山口政光

論文内容の要旨

様々な疾患の発症機構の解明や、疾患関連遺伝子の探索が進む中、正常遺伝子のわずか1塩基の変異(点突然変異)が、癌をはじめとする様々な疾患発症の引き金となる例が多数報告されてきた。これらの研究成果を基にした新規治療薬や疾患の診断が期待される。これらを背景とし、本論文では、点突然変異遺伝子の発現を選択的に制御する核酸治療薬および変異遺伝子検出ツールへの展開を視野に入れ、新規機能性核酸の開発とその機能解析を論じている。

論文は2部から構成されている。

第1部では、高い配列選択性を有し、標的 RNA の1塩基の違いを認識し得る機能性核酸の開発に関する研究結果について論じている。

第1節では、点突然変異遺伝子に選択的に光架橋するソラレン修飾核酸の開発について論じた。次世代の治療薬として期待されているアンチセンス法や siRNA 法は、塩基配列選択的に遺伝子の発現を制御する有力な手法であるが、遺伝子配列中の1塩基の違いを認識する能力が不十分であり、変異遺伝子だけでなく正常遺伝子をも制御してしまうことを防ぎ得ない。この問題点の解消を目指し、UV光照射により対象疾患遺伝子とのみ特異的に共有結合で架橋し、当該遺伝子を入活性化する光機能性アンチセンス核酸を開発した。具体的には、変異塩基の相補位置となるアデノシンの糖環 2'位へ methylene リンカーでソラレンを修飾したアンチセンス核酸(2'-Ps-met)を合成し、光架橋特性を評価した。2'-Ps-met は架橋効率が低いものの、完全相補配列の RNA と特異的に架橋することがわかった。

第2節では、前節の結果を受け、光架橋効率を向上させるための分子設計について論じている。ヌクレオシドの糖環 2'位へ種々のリンカー分子で修飾したアデノシンを3種合成し、その光架橋特性を評価した。その結果、ethoxymethylene type: 2'-Ps-eom が最も効果的に対象疾患遺伝子の変位箇所を認識し、架橋することを明らかにした。

第3節では新たな分子設計を行い、核酸塩基部へのソラレンの導入を行い、その光架橋特性を論じた。アデノシンの N6 位へ methylene リンカーを介してソラレンを修飾した核酸は1塩基の違いを認識して完全相補配列の RNA と特異的に架橋する高い選択性を示した。

第4節では、RNA中の点突然変異塩基を検出可能な蛍光核酸プローブの開発を行った。前節までに開発した光架橋性アンチセンス核酸の標的RNAを検索プローブである。その結果、2'位に蛍光分子ピレンを修飾したシチジン(Cpy)を導入した核酸プローブ(OMCpy)は標的RNA中の変異を検出するプローブとなる可能性が高いことを示唆している。

第2部では、第1部で開発した新規機能性アンチセンス核酸の癌細胞増殖制御能の評価について論じている。

第5節では、第1部で論じた、最も高い選択性と光架橋効率を示した2'-Ps-eomを用い培養細胞の増殖抑制能を論じている。その結果、2'-Ps-eomはこれまで開発した核酸誘導体の中では最も効果的に、対象遺伝子中の点突然変異箇所を認識し、の選択的発現制御能を確認した。すなわち、癌腫瘍において高頻度で検出される点突然変異K-ras遺伝子を標的とした機能性アンチセンス核酸を合成し、培養細胞を用いて細胞増殖抑制能及びその配列選択性について評価を行った。その結果、点変異陽性細胞においてのみ有意な細胞増殖抑制効果が認められた。また、この系で対象K-ras遺伝子の変異塩基に2'-Ps-eomが架橋していることを生化学的手法で確認しており、本研究で開発したヌクレオシドに光架橋性分子を導入するタイプの機能性アンチセンス核酸は変異遺伝子と選択的に結合し、変異を有する細胞の異常増殖を選択的に抑制可能であることを明らかにした。本手法は新規疾患治療法として非常に期待できると考えられる。

論文審査の結果の要旨

申請者は最先端医療として注目されている核酸医薬による遺伝子治療法開発に取り組んでいる。とりわけ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り、米国で100件近い臨床試験が行われている。しかし、この手法は未だ解決せねばならない多くの問題点を抱えている。本論文で申請者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。高機能化としては光架橋基をヌクレオシド2'位に導入する分子デザインを実施した。こうした分子の合成は大変難しく、申請者は多くの試行錯誤の結果、目的の化合物を得ることに成功している。

開発した新規高機能化アンチセンス核酸を用いた癌細胞制御の試みにおいては、従来不可能であった、遺伝子の1塩基変異によって癌化した細胞の選択的増殖制御に成功している。これらの成果は下記に示す論文として公表されたが、さらに申請者はこれらの業績により1件の国際会議を含む4件の学会、シンポジウムで優秀発表賞を受賞している。申請者の成果が新規性、独自性が高いことの証左であり、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4編の論文、並びに投稿中の論文1編の内容をもとに構成されている。

- (1) M.Higuchi, A.Yamayoshi, T.Yamaguchi, R.Iwase, T.Yamaoka, A.Kobori, A.Murakami. "Selective photo-cross-linking of 2'-O-psoralen-conjugated oligonucleotides with RNAs having point mutations." *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2007, 26, 277-290.
- (2) T.Sakamoto, A.Kobori, M.Shigezawa, Y.Amitani, M.Higuchi, A.Murakami. "Homogeneous fluorescence assays for RNA diagnosis by pyrene-conjugated 2'-O-methyloligoribonucleotides." *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*, 2007, 26, 1659-1664.

- (3) M.Higuchi, A.Kobori, A.Yamayoshi, A.Murakami. "Synthesis of antisense oligonucleotides containing 2'-O-psoralenylmethoxyalkyl adenosine for photodynamic regulation of point mutations in RNA." *Bioorg. Med. Chem.*, 2009, 17, 475-483.
- (4) A.Kobori, K.Takaya, M.Higuchi, A.Yamayoshi, A.Murakami. "Development of a nucleobase-psoralen-conjugated antisense oligonucleotide for selective regulation of point-mutated genes." *Chem.Lett.*, in press.
- (5) M.Higuchi, A.Yamayoshi, K.Kato, A.Kobori, N.Wake, A.Murakami. "Specific regulation of point-mutated K-ras-immortalized cell proliferation by a photo-dynamic antinsense strategy." *Oligonucleotides*, 2009, (Submitted)

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。