

新規RNA干渉薬の創製と180標識を用いた核酸動態解析に関する研究

濱崎, 智洋

<https://hdl.handle.net/2324/1470551>

出版情報：九州大学, 2014, 博士（薬学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）

濱崎智洋

(様式 9-3)

論文審査の結果の要旨

抗体医薬品に続いて開発が進められているバイオ医薬品として核酸医薬品がある。この中の 1 つである RNA 干渉(RNAi)薬は、生物に元来備わっていて遺伝子の発現を制御するメカニズムである RNAi を利用した医薬品であり、新薬の開発に結びつく可能性があることから近年高い注目を集めている。RNA 干渉医薬品は細胞内で mRNA に作用して遺伝子発現を抑制することから、標的分子の局在・分布を問わず全ての遺伝子を選択的にターゲットとすることができ、低分子化合物やモノクローナル抗体などの従来の医薬品にはない利点があると考えられている。しかしながら、①製造コストが高いこと、②核酸分解酵素による分解を受けやすく、ドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発が併せて必要となること、③二本鎖 RNA を持つウイルスに対する生体防御システムであるトルライク受容体(TLR)を介した免疫応答を引き起こすこと、④標的以外の遺伝子の発現を抑制してしまうオフターゲット効果があることなど解決しなければならない問題が山積している。さらに、核酸を医薬品とする臨床開発において、核酸の吸収・分布・代謝・排泄を明らかにする薬物動態解析が必須である。低分子医薬品の薬物動態解析には質量分析が大きな威力を発揮するが、これに対して、分子量が数千以上と大きく、リン酸残基の影響で正イオンでの検出が困難な核酸は質量分析の感度が低い。このため現状では開発する核酸分子に合わせて放射性同位体標識や蛍光標識、ハイブリダイゼーションを利用した ELISA、RT-qPCR など、独自の分析方法の開発が必要となっており、アンチセンス、アプタマー、siRNA など、多くの種類が存在する核酸医薬品に広く応用可能な動態解析法の開発が期待されている。本論文は、以上の背景のもと、これらの課題を克服し、RNAi に基づいた医薬品を臨床応用するための基礎研究結果を取りまとめたのである。

まず、新規 RNA 干渉薬について 2 つの方法により調製した。新規 RNA 干渉薬は固相合成で一本鎖 RNA として合成し、セルフアニーリングすることで独自構造を形成する。nkRNA (naked RNA の略) はセンス鎖に 1 塩基欠失がある二本鎖ステムを左右のヌクレオチドループで結んだ構造を持ち、PnkRNA (Proline linked naked RNA の略) はループをプロリン誘導体で置換した同様の二本鎖ステム構造を持つ。そこでまず、human GAPDH を標的として新規 RNA 干渉薬を創製し、*in vitro* でこの nkRNA と PnkRNA の遺伝子抑制活性を評価した。その結果、siRNA と同様に細胞内に導入することで human GAPDH の遺伝子発現を強く抑制することがわかり、nkRNA と PnkRNA が独自の構造をもつ新規 RNA 干渉薬であることが示唆された。

次に、*in vivo* で新規 RNA 干渉薬である nkRNA と PnkRNA が臨床応用可能か確認するため、TGF- β 1 を標的とした新規 RNA 干渉薬の薬効を評価した。その結果、TGF- β 1 を標的とした新規 RNA 干渉薬は、細胞を用いた *in vitro* assay で標的遺伝子の発現を抑制し、Dicer により切断されて siRNA に類似した分子になることで遺伝子発現抑制効果を示す可能性が示唆された。また、従来型 RNA 干渉薬である siRNA よりも高い酵素耐性を示したことから生体内安定性が向上していることがわかった。さらに、ワイルドタイプマウスおよび human TGF- β 1 トランスジェニックマウスにおける急性肺障害モデルにおいて、TGF- β 1 を標的とした新規 RNA 干渉薬を経気管投与したところ、肺胞の肥厚・浮腫・炎症性細胞の浸潤といった症状の改善が確認された。難治性肺疾患である肺線維症のモデルマウスにおいても同様に肺胞肥厚やコラーゲン沈着といった症状の改善効果が得られた。これらのモデルマウスにおいて、TGF- β 1 を標的とした新規 RNA 干渉薬は予測したとおりに生体内でも TGF- β 1 の発現を抑制しており、症状改善が新規 RNA 干渉薬投与による TGF- β 1 遺伝子発現抑制の結果であることを示唆していた。一方、二本鎖 RNA で問題となる炎症性サイトカインの分泌といった免疫応答誘導を引き起こさなかったことから、核酸医薬品としての高い安全性が示唆されたこと、今回の動物実験において、新規 RNA 干渉薬は naked の状態で投与されて薬効を発揮していることから、経気管投与することで DDS を用いずに投与可能な核酸医薬品となり得ることが示された。また、よりヒ

トの病態を反映していると考えられる human TGF- β 1 トランスジェニックマウスにおける急性肺障害モデルでも薬効が確認されたことから、臨床でも効果を発揮する可能性が示された。以上の結果から、3つの動物モデルを用いて、TGF- β 1 を標的とした新規 RNA 干渉薬 nkRNA と PnkRNA の肺疾患治療薬としての有用性が示された。従って、新規 RNA 干渉薬は、RNAi 医薬品候補として有望であることがわかった。

一方、核酸医薬品の臨床開発に必要な核酸の薬物動態を解析する手法として、 ^{18}O 標識を用いた核酸動態解析に関する研究を行った。DNA や RNA などを用いた核酸医薬品のトレーサーとして蛍光標識体や放射性同位体標識体がよく用いられているが、蛍光標識体はその発色基の疎水的な性質に由来する未標識体との非等価性、放射性同位体標識体は被ばくリスクといった欠点がある。そこで、これらの欠点を克服し、臨床応用可能な核酸体内動態解析法を開発するため、化学的等価性が高く安全な安定同位体による標識の検討を行った。まず、フォスフォロアミダイトを用いた固相合成において、酸化工程で用いる酸素供与体に ^{18}O -water を用いることで核酸の各リン酸基の酸素に ^{18}O 標識を導入する方法で ^{18}O 標識 RNA を合成した。合成した ^{18}O 標識 RNA の質量分析の結果から ^{18}O 標識が導入されていることが確認された。標識は生理的条件に近い条件で安定であり、 ^{18}O 標識体と未標識体の電気泳動度、 T_m 値(分子の半分が壊れる温度)、CD スペクトル(円偏光二色性スペクトル)、RNAi 活性は差が無く、両者の物理化学的性質や生物学的性質は同一であることがわかった。血清に濃度既知の ^{18}O 標識 RNA を添加し、同位体比質量分析計で $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ 比の測定を行ったところ、 $\delta^{18}\text{O}$ 値(サンプルと標準海水との $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ 比の相対的な差)と核酸濃度の間に高い直線性が認められた。また、マウスに ^{18}O 標識 RNA を投与して経時的に採血を行うことで血中の ^{18}O 標識 RNA 濃度を測定することができた。さらに、 ^{18}O 標識 RNA をトランスフェクションした A549 細胞を同位体顕微鏡で観察したところ、核の周辺に ^{18}O のシグナルが認められ、トランスフェクションした ^{18}O 標識 RNA がエンドソームに集積していることが視覚化できた。以上の結果から ^{18}O 標識核酸はアンチセンス、アプタマー、siRNA、miRNA といった核酸医薬品のトレーサーとして優れた性質を持っていることが示された。この結果は、同位体比質量分析計や同位体顕微鏡を用いることで核酸類の動態解析や細胞内局在解析に応用可能であることを示した。本研究で提案した解析手法は RNA 医薬品の臨床開発研究に貢献することが期待される。

本研究は、新規 RNA 干渉薬を創製することで、これまで核酸医薬品開発で問題となっていた多くを克服することを実証した。また、新規 RNA 干渉薬が、疾患動物を用いた実験においても有効性を発揮することを示した。さらに、臨床試験で必要となる核酸類の体内動態を追跡する新たな方法を開発した。このような結果は薬学領域、特に核酸医薬品の臨床開発において有益な知見を与えるものであり、申請者は博士(薬学)の学位を取得するのにふさわしいと判断した。