

Cancer-Specific RNAi System by Using PNA- Peptide Conjugates

李, 恩卿

<https://doi.org/10.15017/1654684>

出版情報：九州大学, 2015, 博士（工学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：全文ファイル公表済

氏 名	李 恩卿		
論 文 名	Cancer-Specific RNAi System by Using PNA-Peptide Conjugates (PNA-peptide コンジュゲートを用いたがん特異的な RNAi システムの開発)		
論文調査委員	主 査	九州大学	准教授 森 健
	副 査	九州大学	教授 片山 佳樹
	副 査	九州大学	教授 後藤 雅宏(工学府)
	副 査	九州大学	准教授 水本 博

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

siRNA はがんなどの疾患治療への応用が期待されている。siRNA を用いるがん治療の利点は、各がん細胞によって異なるシグナル伝達の状態に合わせて、標的とするシグナル伝達タンパク質に特異的な siRNA をオーダーメイドに準備できることである。しかし、siRNA を治療に用いるためには、化学的不安定性、オフターゲット効果、疾患部以外への非選択的な送達などの課題が存在する。これらの問題の中で、本研究では特に非選択的な送達に注目し、これを解決することを目指した。この問題に対して、siRNA の RNAi 効果が、がんを高発現しているプロテアーゼであるカテプシン B によって活性化するシステムを開発した。得られた成果は次の通りである。

上記のがん応答性 RNAi を達成するために、ペプチドとペプチド核酸からなるコンジュゲートを合成し、これと siRNA とのハイブリッドを作製した。ハイブリッドの作製のために、センス鎖を伸張した siRNA を合成し、これとコンジュゲートのペプチド核酸部位をハイブリダイズさせた。コンジュゲートは水溶性に乏しいものの、ハイブリッドの形成により水溶性が向上することを見出した。ハイブリッドの融解温度測定より、生理温度で十分な安定性を有する siRNA の伸張部の鎖長を決定した。このハイブリッドは、ハイブリッドのペプチド部分の立体障害により、RNAi を触媒する dicer に対する反応性を失った。また、コンジュゲートのペプチド部分はカテプシン B により切断されることが分かった。以上より、目的とするがんに応答した RNAi に必要とされる性質をハイブリッドが有することが示された。

次に、実際にハイブリッドを用いたカテプシン B 応答的な RNAi 効果を *in vitro* で評価した。その結果、ハイブリッドはレポーター遺伝子の発現を、通常の siRNA と同程度まで抑制した。一方、カテプシン B に対する基質ペプチドを改変し、応答性を失わせたハイブリッドでは、RNAi 効果の発現が抑制された。さらに、カテプシン B の阻害剤を加えることによっても RNAi 効果は阻害剤濃度依存的に抑制された。以上より、本ハイブリッドが、カテプシン B に応答して RNAi 効果を発現することが示された。

最後に、本ハイブリッドをがん治療に適用するために、カテプシン B に応答して Bcl-2 の発現を抑制し、細胞をアポトーシスに至らせるシステムの開発を行った。siRNA の配列を Bcl-2 に相補的なものに替え、これを先述のコンジュゲートとハイブリッドを形成できた。本システムは、siRNA の配列の末端を伸張した部分とハイブリッドを形成させるため、siRNA の配列によらず作製可能であるという一般性が示された。ハイブリッドを *in vitro* でがん細胞にアポトーシス誘導できるかを確認した。その結果、カテプシン B に応答しない対照のハイブリッドに対して有意な細胞死を誘導

することが分かった。

以上、本研究ではがん細胞で過剰発現しているカテプシン B に応答して、活性化する RNAi システムの開発に成功した。本研究で提案した分子設計は、カテプシン B に限らず、いずれのプロテアーゼにも適用可能と考えられる一般性の高いものであり、生命工学の分野において価値ある業績と認められる。

よって、本研究者は博士（工学）の学位を受ける資格があるものと認められる。