



# 岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

## 新規がん抑制遺伝子型microRNAの探索と創薬への展開

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2019-01-29 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 中本, 航介 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/75245">http://hdl.handle.net/20.500.12099/75245</a>

氏 名 (本 国 籍)	中本 航介 (愛知県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 6 8 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 3 0 年 3 月 1 3 日
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	新規がん抑制遺伝子型 <b>microRNA</b> の探索と創薬への展開
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 准教授 柳瀬 笑子 副査 岐阜大学 教 授 上野 義仁 副査 静岡大学 教 授 河合 真吾

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

**microRNA (miRNA)** は、20-24 塩基程度の内因性二本鎖 RNA であり、翻訳レベルでタンパク質の発現調節を担う細胞内調節因子である。細胞内で生成した **miRNA** 二本鎖は、**Argonaute** と呼ばれるタンパク質と共に **RNA-induced silencing complex (RISC)** を形成する。続いて、一方の鎖が解離した後に、ガイド鎖が標的 **mRNA** に結合することでタンパク質への翻訳を抑制している。近年、**miRNA** の発現異常が細胞のがん化に関与していることが明らかとなり、がん細胞における **miRNA** の機能解析が盛んに行われている。本研究では、光クロスリンク法により標的 **mRNA** を捕獲可能な新規 RNA プローブの開発と、**miRNA** の創薬応用を指向した **cRGD** コンジュゲートの開発を目的とした。

### 1) 新規光反応性 **miRNA** プローブの開発

塩基部を光反応性分子であるトリフルオロメチルアリルジアジリンで置換した二種類のヌクレオシドアナログを設計・合成した。ヌクレオシドアナログを導入した RNA プローブと相補鎖 RNA との二本鎖 RNA を含む溶液を UV 照射した後、生成物を PAGE 及び MALDI-TOF/MS により解析したところ、RNA プローブと相補鎖 RNA との間にクロスリンクが形成されていることが確認された。続いて、ヌクレオシドアナログとビオチン分子を導入した **miRNA-145** プローブを合成し、その標的 **mRNA** のビオチンラベル化を試みた。**miRNA-145** プローブを細胞へ導入し、UV 照射により標的 **mRNA** をビオチンラベル化した。ラベル化された標的 **mRNA** をアフィニティー精製し、**miR-145** の既知標的遺伝子である **FSCN1 mRNA** の発現量を定量した。その結果、精製 RNA 中の **FSCN1 mRNA** 量が大幅に増加しており、合成した **miRNA-145** と **FSCN1 mRNA** との間にクロスリンクが形成されていることが確認された。一方で、今回合成した **miRNA-145** が標的としない **c-MYC mRNA** 量には変化が見られなかったことから、**miRNA-145** プローブは標的 **mRNA** に選択的にクロスリンク形成をすることが確認された。

## 2) cRGD-コンジュゲートの合成とその遺伝子発現抑制能

miRNA 医薬に適用可能なリガンドコンジュゲート型デリバリーシステムの開発を行った。リガンド分子には、がん細胞で受容体の発現量が増加している cyclic RGD (cRGD) ペプチドを選択し、post-synthetic modification 法により、先ず、cRGD-siRNA コンジュゲートを合成した。本研究では、より簡便に cRGD コンジュゲートの構造を最適化する為、cRGD コンジュゲーションユニット及びスペーサーユニットの 2 種類のアミダイト体を用いて siRNA を合成し、cRGD の導入数及び cRGD 間の距離が細胞内取り込みに与える影響を評価した。その結果、cRGD を連続して導入した siRNA は、細胞導入試薬無しで細胞内へ取り込まれることが確認された。また、連続する cRGD 間にスペーサーユニットを導入することで、細胞内への取り込みが大幅に上昇することが明らかとなった。これは、スペーサーユニットの導入により cRGD が複数のインテグリンと相互作用する多価効果によるものと考えられる。

しかしながら、設計した cRGD-siRNA コンジュゲートは、単独では遺伝子発現抑制能を示さなかった。そこで、cRGD-RNA コンジュゲートの細胞導入効率を向上させる目的で、新たにポリアミン修飾型 cRGD-siRNA コンジュゲートを合成した。その結果、リン酸由来の負電荷を中和したポリアミン修飾型 cRGD コンジュゲートは 250 nM で約 40%の遺伝子発現抑制効果を示し、ポリアミン修飾が siRNA コンジュゲートの導入効率を高めることが明らかとなった。

miRNA 医薬品の開発において、医薬品候補となるがん抑制遺伝子型 miRNA の探索とドラッグデリバリーシステムの開発は極めて重要な研究課題である。本研究で開発した新規光反応性 miRNA プローブは miRNA の標的 mRNA を網羅的にラベル化することが可能であり、医薬品候補となる miRNA の探索において強力なツールとなり得る。また、新たに考案したポリアミン修飾型 cRGD コンジュゲートは、従来のリガンドコンジュゲートを上回る遺伝子発現抑制効果を示し、miRNA 医薬品にも適用可能な新規ドラッグデリバリーシステムとして期待できる。

## 審査結果の要旨

本研究は、近年注目が高まっている miRNA 医薬品の実用化に向けて行った一連の研究をまとめたものである。

microRNA (miRNA) は 20-24 塩基程度の内因性二本鎖 RNA であり、翻訳レベルでタンパク質の発現調節を担う細胞内調節因子である。近年、miRNA の発現異常が細胞のがん化に関与していることが明らかとなり、とりわけ、がん抑制遺伝子型 miRNA の探索及び医薬品への応用研究が盛んに行われている。しかしながら、miRNA の標的 mRNA への結合パターンはミスマッチを含み多様であり、その機能解析には多くの時間と費用を必要とする。また、miRNA の医薬品への応用においては、組織特異的なデリバリーシステムの開発が不可欠である。

本研究では、光クロスリンク反応により標的 mRNA を捕獲可能な新規 RNA プローブの開発と、miRNA の医薬品応用を目指した cRGD コンジュゲートデリバリーシステムの開発を行った。

先ず、新規光反応性 miRNA プローブの開発を行った。塩基部を光反応性分子であるトリフルオロメチルアリルジアジリンで置換した二種類のヌクレオシドアナログを設計・合成した。アナログを導入した RNA プローブと相補鎖 RNA との二本鎖 RNA を含む溶液を UV 照射した後、生成物を PAGE 及び MALDI-TOF/MS により解析したところ、RNA プローブと相補鎖 RNA との間にクロスリンクが形成されていることが確認された。続いて、アナログとビオチン分子を導入した miRNA-145 プローブを合成し、その標的 mRNA のビオチンラベル化を試みた。miRNA-145 プローブを細胞へ導入し、UV 照射により標的 mRNA をビオチンラベル化した。ラベル化された標的 mRNA をアフィニティー精製し、miRNA-145 の既知標的遺伝子である *FSCN1* mRNA 及び miRNA-145 が標的としない *c-MYC* mRNA 量の発現量を定量した。その結果、精製 RNA 中の *FSCN1* mRNA 量のみが大幅に増加しており、合成した miRNA-145 と *FSCN1* mRNA との間に選択的にクロスリンクが形成されていることが確認された。

続いて miRNA 医薬に適用可能なリガンドコンジュゲート型デリバリーシステムの開発を行った。リガンド分子には、がん細胞で受容体の発現量が増加している cyclic RGD (cRGD) ペプチドを選択し、post-synthetic modification 法により cRGD-siRNA コンジュゲートを合成した。cRGD の導入数及び cRGD 間の距離が細胞内取り込みに与える影響を評価した。その結果、cRGD を連続して導入した siRNA は、細胞導入試薬無しで細胞内へ取り込まれることが確認された。また、連続する cRGD 間にスペーサーユニットを導入することで、細胞内への取り込みが大幅に上昇することが明らかとなった。これは、スペーサーユニットの導入により cRGD が複数のインテグリンと相互作用する多価効果によるものと考えられる。一方、設計した cRGD-siRNA コンジュゲート単独では遺伝子発現抑制能を示さなかった為、cRGD-RNA コンジュゲートの細胞導入効率を向上させる目的で、新たにポリアミン修飾型 cRGD-siRNA コンジュゲートを合成した。その結果、リン酸由来の負電荷を中和したポリアミン修飾型 cRGD コンジュゲートは 250 nM で約 40% の遺伝子発現抑制効果を示し、ポリアミン修飾が siRNA コンジュゲートの導入効率を高めることが明らかとなった。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

#### 【学位論文の基礎となる学術論文】

1) Title: Diazirine-containing RNA photo-cross-linking probes for capturing microRNA targets

雑誌名: *The Journal of Organic Chemistry*, **2014**, 79, 2463-2472

著者: Kosuke Nakamoto, Yoshihito Ueno.

2) Title: Labeling of target mRNAs using a photo-reactive microRNA probe

雑誌名: *Chemical Communications*, **2016**, 52, 6720-6722.

著者: Kosuke Nakamoto, Koichiro Minami, Yukihiro Akao, Yoshihito Ueno.