

学位論文要約

氏 名 濱下 優介

題 目 核酸医薬への応用を目指したinchworm型ペプチド核酸の合成と機能評価

遺伝子内の1塩基多型 (SNPs) は生命に関わる大きな疾病・疾患，治療薬に対する間接的な問題点の原因となるため，その作用機序に応じた様々な治療法に関する研究が進められている．特にがん遺伝子の1塩基変異はがんの進行過程で生じる重大な遺伝子変異であるだけでなく，最新の分子標的薬 (抗EGFR抗体薬) を無効にしてしまうなど新規抗がん剤の開発が急務となっている．変異型タンパク質の発現抑制を作用機序とする核酸医薬の優位性が明確となる中でSNPを標的とした核酸分子の開発は困難で，臨床に進行できる成果が得られていないのが実情である．

本論文は，生体内温度で1塩基の違いを認識できる新たな核酸分子として，ポリエチレングリコール (PEG) の両末端に8塩基のペプチド核酸 (PNA) を配したinchworm型PNA-PEG conjugate (i-PPc) を提唱し，1塩基変異を認識した*in vitro*から細胞内での遺伝子発現制御ならびにその認識機構の解明，最終的には遺伝子変異性がん細胞への核酸医薬としての展開についてまとめた．

第1章では，本研究の背景および目的について記述した．

第2章では，i-PPcの分子構造に関する概念を述べ，無細胞タンパク質発現系を用いたi-PPcによる遺伝子発現抑制，熱力学パラメーターの算出による1塩基認識機構について述べた．ここでは，i-PPcにより1塩基の違いを認識してルシフェラーゼの発現を抑制する結果が得られ，この機構はi-PPcがmRNAに対してアンチセンス的に作用していること，またこの機構がi-PPcの両末端に配されたPNA部の相補鎖安定性の違いが寄与していることが示された．

第3章では，i-PPcによる細胞内遺伝子発現抑制について述べた．本章ではi-PPcがマクロピノサイトーシス経路で細胞内の取り込まれるものの，マクロピノソームからサイトゾルにリリースされない問題点を踏まえ，細胞膜透過シグナルペプチド (R₉) をi-PPcの中央に導入したi-PPc(R₉) を新たに合成し，樹立したルシフェラーゼ恒常発現ヒト結腸癌細胞 (HT-29-Luc⁺細胞) 内への細胞輸送ならびにルシフェラーゼ発現抑制について検討した．この結果，i-PPcは顕著な細胞毒性を示すことなく，細胞内でも1塩基変異を認識した遺伝子発現抑制が可能であることを報告した．一方で，i-PPc(R₉) の熱安定性評価を行った結果，アルギニン側鎖のグアノジノ基と核酸のリン酸基の静電的相互作用が原因で37°Cにおけるi-PPcの1塩基認識能が低下することも明らかになった．

第4章では，がん遺伝子の1塩基変異を標的とした治療戦略について述べた．現在創薬の主体となっている，増殖シグナルを阻害する低分子化合物の探索を踏まえ，発現抑制を作用機序とする核酸医薬の優位性について言及した．

第5章では，がん遺伝子1塩基変異を標的としてi-PPcによる細胞死誘導を評価した結果，細胞内遊

離型のi-PPcにおいて塩基配列依存的に細胞死を誘導し、かつこの作用機序はアポトーシスであることを報告した。この成果から、i-PPcはがん遺伝子の1塩基変異を標的とした核酸医薬となり得る可能性を提示した。

第6章では、組織化した遺伝子変異性がん細胞を対象としたi-PPcによる細胞死誘導について検討した。遺伝子変異性がん細胞のスフェロイド化条件を策定し、形成されたスフェロイドに細胞内遊離型i-PPcを投与したところ、塩基配列依存的に細胞死を誘導することを見出した。この細胞死誘導は二次元培養と比較すると効果的に作用したことから、細胞内遊離型i-PPcはがん細胞の組織形態にかかわらず細胞死を誘導することを報告した。

第7章では、本研究で得られた知見を総括した。

以上の成果により、本論文で提唱するinchworm型PNA-PEG conjugate (i-PPc) が生体内環境条件下で1塩基の違いを認識した遺伝子発現制御を可能とする新規な人工核酸であり、遺伝子の1塩基変異を標的とした核酸医薬として展開できることを示した。今後は、SNPを作用機序とするその他の遺伝子病に対する医薬としての展開が期待される。