JAIST Repository
https://dspace.jaist.ac.jp/

Title	外部刺激応答性人工核酸による遺伝子発現制御と免疫賦活化に関する研究
Author(s)	滋野，敦夫
Citation	
Issue Date	2014-03
Type	Thesis or Dissertation
Text version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/10119/12097
Rights	
Description	Supervisor:藤本　健造，マテリアルサイエンス研究科，博士

JAIST
JAPAN
ADVANCED INSTITUTE OF
SCIENCE AND TECHNOLOGY

Japan Advanced Institute of Science and Technology

氏　　名	滋 野 敦 夫
学 位 の 種 類	博士（マテリアルサイエンス）
学 位 記 番 号	博材第 341 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 24 日
論 文 題 目	Studies on the regulation of gene expression and immune activation by stimuli responsive artificial nucleic acid.（外部刺激応答性人工核酸による遺伝子発現制御と免疫賦活化に関する研究）
論文審査委員	主査　藤本　健造　北陸先端科学技術大学院大学　教授
	高木　昌宏　同　教授
	大木　進野　同　教授
	平塚　祐一　同　准教授
	小比　賀聡　大阪大学　教授

論文の内容の要旨

In recent years, tailor-made therapy that provides the optimum treatment for each individual has been attracting attention. Nucleic acids are becoming increasingly important as tailor-made therapeutic molecules mainly for the ease with which the specificity for a vast range of targets of these drugs is achieved. Therefore, many researchers in academia and pharmaceutical companies are paying attention to the development of nucleic acid based drugs. In particular, stimuli responsible nucleic acid drugs have a great potential for organ specific therapy. In this study, the author suggests the high photo-responsible antisense oligonucleotides and radiation trigger of artificial CpG oligonucleotide (CpG ODN).

Antisense oligonucleotides are valuable tools for selectively inhibiting target gene expression. Recently, Higuchi et al. reported that a photocrosslinkable oligonucleotide containing psoralen moiety at the 2′ position of adenosine effectively and specifically inhibits the expression of the codon 12 point-mutated K-ras (G12V) gene in living cells. Because of the specific and irreversible complexation between photoreactive AS-ODN and the target mRNA, the regulation of gene expression was achieved with a low concentration of AS-ODN (IC_{50} = 50 nM) and UV irradiation. This method has the potential to provide a location-specific drug that can regulate gene expression by photoirradiation at the desired location in the body; however, the requirement of relatively long photoirradiation because of the low photoreactivity of AS-ODN may cause undesired toxicity to healthy cells. In this study, the author tried to develop other photoresponsive AS-ODNs using a photoresponsive nucleoside analogue, 3-Cyanovinylcarbazole nucleoside (^{CNV}K), which can quickly photocrosslink to the pyrimidine base in complementary RNA strands with only a few seconds of photoirradiation. ^{CNV}K was incorporated into antisense oligonucleotides (^{CNV}K-ASs), and the author evaluated the photoreactivity and the sequence selectivity to mutated K-ras oligoRNAs, as well as the regulation of the function of K-ras mRNA. In this result, the ^{CNV}K-AS is quickly and selectively photocrosslinked to ORNs having mutated K-ras sequences by a few seconds of photoirradiation and

the selectivity can be enhanced by adopting the mutated pyrimidine base as the photocrosslinking site of ^{CNV}K. The ^{CNV}K-AS clearly photocrosslinks to its target mRNA in a sequence selective manner and then the mRNA function is clearly regulated with only 1 second of photoirradiation suggesting that ^{CNV}K-AS have the potential to be effective photodynamic antisense drugs that act at desired locations around the body with a few seconds of photoirradiation. Moreover, the author successfully demonstrated that ^{CNV}K-AS that target GFP mRNA, effectively regulate GFP expression in a stable cell line expressing the GFP gene in a photo-responsive manner and that the expression level of GFP can be controlled temporally by 10 seconds of 366 nm irradiation. These photoreactive antisense oligonucleotides can be effective in the spatiotemporal regulation of endogenous gene expression in living cells.

CpG ODNs are short single-stranded synthetic DNA molecules that induce TLR9 mediated-immune activation. The author has synthesized disulfide crosslinking tethered CpG oligonucleotide (S-S CpG) as a radiation-trigger immune activator. The S-S CpG had an alkyl chain and two CpG DNA units were connected by an X-ray-sensitive disulfide bond. X-irradiation of Raw cells, to which S-S CpG was administered, resulting in an induced Ifnb mRNA expression because of the reductively-cleaved CpG immune activation. Thus, S-S CpG are promising as radiation-trigger immune activators that are applicable to drugs.

論文審査の結果の要旨

本論文では外部刺激応答性人工核酸による遺伝子発現制御と免疫賦活化に関する研究についてまとめたものであり、以下の点で非常に有用かつ独創的な内容であった。

秒単位の光照射によりピリミジン塩基と選択的に光架橋可能な人工核酸である3-cyanovinylcarbazole (^{CNV}K)をアンチセンス核酸と組み合わせることで、細胞外の系において点変異型 K-ras mRNA (コドン 12.GGU>GUU)の機能を光照射によって制御することに成功した。本手法を用いることで、１秒間の光照射により ^{CNV}K を用いたアンチセンス核酸は、標的の変異型 mRNA に対して塩基配列選択的に光架橋し、その逆転写反応を約 97%という高効率で阻害可能であることを見出した。１秒という短時間の光照射で制御可能な遺伝子発現制御の手法として位置づけることができる。

次に、内在性 GFP 遺伝子の発現を秒単位の光照射によって細胞内で抑制できることを実証した。^{CNV}K を含むアンチセンス核酸を用いることで、10 秒の光照射で細胞系において遺伝子発現制御が可能であることを見出した。さらに、既存のアンチセンス核酸の多くは、IC_{50} が uM オーダーであるのに対して、^{CNV}K を用いたアンチセンス核酸は、低濃度（約 80 nM）でも遺伝子発現が制御可能であることを見出した。異なる自己構造を持つと予測される GFP mRNA 中の４つの標的配列に対して、それぞれ対応する ^{CNV}K を含むアンチセンス核酸を用いて評価した実験において、全ての系において光による遺伝子発現制御が可能であることも見出した。^{CNV}K が、光架橋反応によって非平衡反応系で標的配列と光架橋するため、遺伝子発現制御が標的 mRNA の自己構造に依存しなかったのではと考えられる。また、光照射のタイミングによっても内在性遺伝子発現の制御が可能であることも実証しており、分子生物学や医学の分野において有用であると考えられる。

また、放射線によって免疫賦活活性の制御が可能な、核酸を基盤とした免疫賦活剤の設計・合成にも成功した。CpG DNA と呼ばれる特殊な配列を有する短鎖の DNA は、細胞内の核酸受容体に認識されることで免疫応答反応を誘導することが報告されている。そこで、低線量（20Gy）の放射線照射により開裂可能なジスルフィド結合で 2 つの CpG DNA を架橋させることで、核酸認識受容体に認識されないジスルフィドクロスリンク CpG DNA とし、細胞内に導入した後で放射線照射によってジスルフィド結合を開裂させることで、免疫賦活剤として制御・機能させることが可能であることを見出した。放射線照射によって部位特異的に免疫応答反応が制御できる新手法論の開発に成功したと考えられる。

以上、本論文は、外部刺激応答性人工核酸によって、数秒の光照射による遺伝子発現制御及び放射線による免疫賦活化を可能としてものであり、極めて有用かつ独創的なものであり、学術的、産業的に貢献するところが大きい。よって博士(マテリアルサイエンス)の学位論文として十分価値あるものと認めた。