

平成18年度

若手研究者奨励研究報告書

目 次

政策創薬総合研究

課題番号

KH13302	再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発	川端健二 …… 1
KH23303	腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究	増田智先 …… 12
KH23304	Toll様受容体 (TLR3) を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用	中道一生 …… 26
KH23306	吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性解明と創薬への応用に関する研究	伊澤晴彦 …… 37
KH23307	アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発	大喜多 肇 …… 50
KH23331	寄生性原虫の生育に必須な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究	中野由美子 …… 60
KH33308	向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究	橋本亮太 …… 66
KH33309	ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測	小林カオル …… 79
KH33310	薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究	田辺公一 …… 92
KH33332	制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディーの基礎的および応用的研究	川上浩司 …… 101
KH53312	LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究	伊豫田 淳 …… 105
KH53313	遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規癌免疫療法の開発	岡田直貴 …… 116
KH53314	PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究	小島伸介 …… 126
KH53315	網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究	梅山 隆 …… 136
KH53333	治療ターゲットとしてのFc γ 受容体を介した Dengue 出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 150
KHC3361	C型肝炎ウイルス粒子産生制御による新規治療法の萌芽的研究	村上恭子 …… 156
KHC3362	高齢化社会に適応する歯の延命化を目指した歯髄・象牙質再生による新しい抜髄治療法の開発	庵原耕一郎 …… 162
KHC3363	HDL形成責任タンパク質ABCA1の代謝制御をターゲットとした新規動脈硬化治療法に関する研究	奥平桂一郎 …… 167

エイズ医薬品等開発研究

KA13701	ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の 解明	藤室雅弘 ……173
KAC3761	論理的創薬手法によるHIV-1プロテアーゼ二量体化を阻害す る低分子化合物の探索	中村寛則 ……186
KAC3762	HIV治療用合成siRNAの新規デリバリーシステムの開発	児玉耕太 ……191

HIV治療用合成siRNAの新規デリバリーシステムの開発

所属 国立大学法人岐阜大学
人獣感染防御研究センター
研究者 児玉 耕太

研究要旨 HIV 治療用 siRNA に HIV ウイルス RNA に結合能を持つような特殊なペプチドをリンカーでつなぐことによって、標的である mRNA の近くにおいて siRNA が放出されるような Delivery System の開発を行い、新規 HIV 治療システムの構築を目指す。

A. 研究目的

siRNA (small interfering RNA) は、低濃度でも効果が期待でき、mRNA を破壊するだけで、ゲノム遺伝子には全く影響を及ぼさないことが知られているため、その臨床応用が盛んに試されているが、生体の分解酵素による分解やデリバリー上の問題点から、その応用は眼内注射と言う特殊な投与経路に留まっている。また、現在、siRNA をコードするプラスミドを用いた遺伝子導入法やオリゴ核酸誘導体を用いた RNAi が試されているが、その実現には標的に到達させるための Delivery System が不可欠となっている。現在までに知られているようなキャリアーはいずれも高分子化合物を利用したものであり、siRNA 一分子をデリバリーするものは未だ実現していない。類似なものには、siRNA を PEG などで修飾し分解耐性を上げる、もしくは核酸誘導体を用いた siRNA 誘導体などが報告されているが、根本的な解決になっていないのが、現状である。このため、siRNA が標的の存在する細胞へ到達するまでは、分解酵素などをブロックし、一旦標的細胞に取り込まれば、標的である mRNA の近くにおいて siRNA が放出されるようなインテリジェンスな Delivery System が開発であればその臨床応用も実現味を帯びてくる。

また、この技術は、siRNA に限らず、デコイ RNA、

アプタマー、アンチセンス、リボザイムと言うあらゆる RNA 医薬技術に応用が可能であるため、次世代に期待されている RNA の医薬応用へのパラダイムシフトを起こすためのブレイクスルーとなる。また、この技術は、siRNA に限らず、デコイ RNA、アプタマー、アンチセンス、リボザイムと言うあらゆる RNA 医薬技術に応用が可能であるため、次世代に期待されている RNA の医薬応用へのパラダイムシフトを起こすためのブレイクスルーとなる。また、HIV 治療においても siRNA の利用も盛んに行われているが、やはり細胞内移行性や分解酵素に対する耐性といった問題で実用化にはいたっていない。また、このようなウイルス疾患は既存の低分子薬剤などでは、ウイルスの増殖をとめることができても、ウイルスを完全に制御することはできないが、siRNA のような遺伝子治療はこのようなウイルスの制御が可能となるため、早急な実用化が望まれている。

このシステムを HIV において構築することができれば、配列特異的に RNA に結合するペプチドは、進化創薬社の技術により、検出が可能であるため、他の様々な疾患に関与する構造 RNA を認識することができるよう設計が可能である。HIV を根治させることができるだけでなく、プリオン病、SARS、インフルエンザなどの難治性の新興感染症など疾患への応用も可能となると考えられる。

B. 研究方法

ペプチドと siRNA をリンカーでつなぐために、両端に接続のための官能基を合成する。リンカーの接続時はペプチドと核酸の両方に影響を与えない緩和な条件で行う必要があるため、抗体や酵素の標識に多用されるマレイミド法を使用する。リンカーの長さについては活性との比較により決定する。活性および薬理評価については、国立感染症研究所エイズ研究センターの武部豊先生の協力のもと検討を行う。合成した核酸誘導体を用いて核酸合成機により合成 siRNA を合成する。

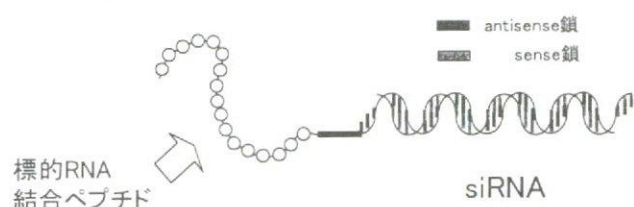


Fig.1 peptide conjugated siRNA

ペプチドと siRNA の末端の一方をアミノ基、もう一方をチオール基とし、N-succinimidyl maleimido-carboxylate などによってそれらをつなぐ。合成された化合物の電荷が0になっていることを SDS-PAGE などによって確認を行う。合成された化合物が標的とする構造 RNA に特異的に結合していることを Biacore ならびに R I ラベルした化合物によるバインディングアッセイにより確認する。

(倫理面への配慮)

HIV などの取り扱いを行う際は、国立感染症研究所の運用基準に従い、特に以下の件について注意を払い実験を行うようにする。

- ・前室を設置し、前室の前後の扉を同時に開けない。
- ・床等の表面波、容易に水洗・燻蒸が可能な構造。
- ・足等で又は自動で操作可能な手洗い設備。
- ・給排気設備。
- ・排気は、原則として、実験室・建物内の他の部屋に再循環されない。

・排水は、遺伝子組換え生物等の不活化後に排出できる設計。

・原則として、研究用安全キャビネットを設置し、キャビネット内で操作。

・実験室内に高圧滅菌器を設置。

・専用の作業衣を着用。廃棄等の前に遺伝子組換え生物等を不活化。

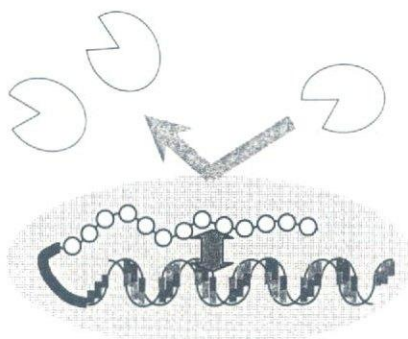
・原則として、実験室に出入りしない。(注：キャビネット操作時)

・「P3 レベル実験中」の表示。

・レベルの拡散防止措置を執る。

C. 研究結果

今年度は主に siRNA とペプチドのコンジュゲート分子の合成を行った。antisense の 5' 末端をアミン修飾された RNA を外注し、まず、そのアミノ基に末端がスクシニル基とマレイミド基が入っている PEG リンカーのカップリングを行った。PEG リンカーの方を 50 当量入れることにより、RNA と完全に反応させ、アクリルアミドゲルを用いて精製を行った。反応進行の確認は MALDI-TOF-MS を用いて行った。次に RNA 結合ペプチドの C 末端側にシステインを導入したものと、リンカーのマレイミド基とのカップリングを行った。ペプチドの方を 20 当量入れ、完全にリンカー結合 RNA が消失するまで反応を行った。このコンジュゲート分子はペプチドの効果により、通常の RNA よりも減衰しているため、アクリルアミドゲル上で大幅に上にシフトする。よって、この反応の進行も MALDI-TOF-MS とアクリルアミドゲルを用いて確認を行った。また、ペプチドが RNA に結合していることを確認するため、コンジュゲート分子を ProteinaseK と反応させ、ペプチド部を加水分解したところ、コンジュゲート分子がアクリルアミドゲル上でもとの位置にもどった。これはすなわちペプチドと RNA が確実にコンジュゲートしていることを意味する。現在、この分子の標的 RNA に対する分子間相互作用と HIV 感染モデル系での試験を行っている。



分解酵素の接近をブロック

Fig.2 生体内での分解阻止モデル

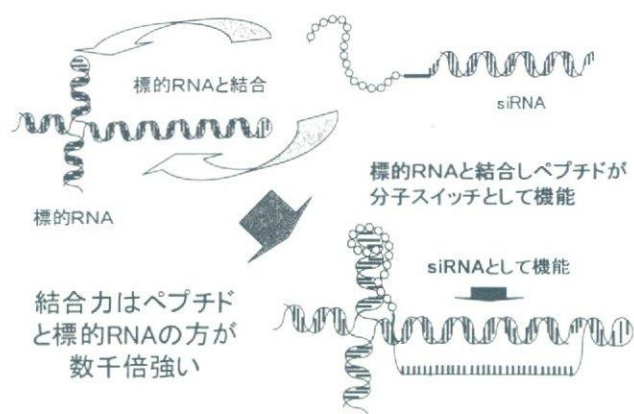


Fig.3 ナノスイッチ型 siRNA の作用機序

D. 考察

今年度の研究により目的とする分子の合成法の確立には成功した。これらの結果とモデル系での結果を踏まえて、リンカーの長さ等の検討を行う予定である。

E. 結論

現在、コンジュゲート siRNA を大量合成中であり、終了し次第、HIV モデル感染系での評価を行う予定であるため、次年度も研究を行う必要がある。

F. 研究発表

該当なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

平成18年度

政策創薬総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成19年7月31日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社