

論文の内容の要旨

氏名：井 口 晃 史

博士の専攻分野の名称：博士（生命科学）

論文題名：ゲノム化学に基づくウイルス感染症に対する新規遺伝子治療薬の開発

医学領域での研究の目的は、癌や腎臓病など未だに治らない病気が多く存在している事実に基づき、病態解明、新規診断法や治療法の開発により、難治性疾患で苦しんでいる患者さんに光明をもたらし、人類を幸福にすることである。しかしながら最近では医学領域だけでの研究では健全な医療を創成するには不十分であり、環境学、生物学、経済学を含めた統合的領域から健全な医療を創成する試みがなされている。

ゲノム化学とは、ゲノムに限らずプロテオミクスをも含む広い範囲のバイオロジーの分野において化学を活用する研究全般を指し、ゲノム創薬、遺伝子診断、バイオチップ、バイオセンサー、バイオ材料などきわめて広い応用分野がある。ヒトの遺伝子構造の解読が完了し、ポストゲノムの時代に入り、ゲノム化学が今後の医療の中核をなすと考えられる。今後人類の共存と発展を育む地球社会システムを形成するためには、医学、環境学、生物学、工学、人口学、経済学などが融合した学問領域での研究が必要である。特に、ゲノム化学に基づくウイルス感染症に対する新規遺伝子治療薬の開発は融合科学として重要である。

新興感染症は局所的あるいは、人物の移動による国際的な感染拡大が公衆衛生上の問題となるような感染症で、病原体としてはウイルス、細菌、スピロヘータ、寄生虫など様々でウイルスによるものとしてはエイズ、エボラ出血熱、ラッサ熱、重症急性呼吸器症候群（SARS）、インフルエンザなどがある。新型肺炎の SARS の原因ウイルスは、従来とは異なるタイプの新たなコロナウイルス（SARS-CoV）であり、一種の人畜感染症であった。これまで SARS に罹患した患者に対し様々な治療が試みられ、その後も SARS-CoV に特異的な新薬やワクチンが広く開発されてきた。しかし効果的な治療薬の開発のためにはさらなる実験的、臨床的研究が必要であり、これには遺伝子治療薬や核酸医薬が有望であると考えられる。インフルエンザの病原体はインフルエンザウイルスである。インフルエンザは毎年継続して感染流行を起こしている。さらに数年から数十年ごとに新型のヒトインフルエンザの出現とその新型ウイルスのパンデミックが起こっている。2009年には豚由来の新型インフルエンザのパンデミックが発生し、大きな問題となった。インフルエンザにはワクチンが製造されている。ワクチンの接種により仮にインフルエンザにかかったとしても軽症で済むとされる。また、インフルエンザには、その増殖を阻害する薬剤が数種類開発され、実際にインフルエンザの治療に利用されている。

遺伝子治療は遺伝子の欠損もしくは異常に基づく患者に対し遺伝子を補充する方法と、特定の遺伝子や蛋白の過剰によってもたらされる疾患に対し遺伝子を抑制する方法に分けられる。前者はいわゆる遺伝子治療で、細胞に遺伝子を導入することにより蛋白を産生させて補充を行う。後者は核酸医薬による遺伝子の制御であり、疾患の責任遺伝子に対し自由に設計出来ることから、新たな治療法として期待されている。遺伝子発現を抑制する核酸医薬は DNA レベルでは、二本鎖 DNA にトリプルヘリックスを形成し、遺伝子発現を抑制するアンチジーン、アンチセンス PNA (peptide nucleic acid) があり、RNA レベルではアンチセンスオリゴ、siRNA、リボザイムなどがある。

リボザイムとは RNA を酵素的に切断する RNA 核酸であり、人工的に作成し、特定の遺伝子発現を抑制出来る。リボザイムはヘアピン型、ハンマーヘッド型などの構造をとり、保存配列に RNA 切断酵素活性があり、標的 mRNA の GUC 配列の直後で切断する。SARS-CoV RNA の二次構造を解析し、リボザイムの切断により RNA 配列を露出するループ構造を標的とした最適な切断部位が選択した。SARS-CoV を標的とした DNA/RNA キメラ型リボザイムの DBT 細胞へのトランスフェクション効率は 60% であり MHV の増殖抑制率は約 60% を示した。これはリボザイムがウイルス活性を抑制したことを示唆した。

抗生物質であるデュオカルマイシン A とディスタマイシン A が協同的な DNA のアルキル化能

を有していることをヒントとし、PI ポリアミドは分子設計され、DNA のマイナーグループを認識していることから発見された化学合成物質である。任意の二本鎖 DNA に塩基特異的に結合し、ターゲット遺伝子プロモーターに結合するよう設計すると、転写因子の結合を阻害し遺伝子発現を抑制する。PI ポリアミドの結合を TGF- β 1 に依存して進行性腎障害を示す高血圧ラット遺伝子の TGF- β 1 DNA と二本鎖 RNA で測定した。そして、インフルエンザウイルスの増殖に重要なパンハンドルの二本鎖 RNA 部位への PI ポリアミドの結合を測定した。

ピアコアアッセイで TGF- β 1 ポリアミドの RNA 結合が DNA 結合親和性よりも 2 log 低い結合親和性であることが示された。dsDNA と dsRNA に対する TGF- β 1 ポリアミドの結合に対する gel mobility shift assays が示された。TGF- β 1 ポリアミド (5 から 100 \cdot M) は適度な dsDNA に結合したのに対して、ミスマッチポリアミドは適度な DNA に対して結合しなかった。TGF- β 1 ポリアミドとミスマッチポリアミドの (5 から 100 \cdot M) の濃度では適度な dsRNA のはっきりとしたゲルシフトは観察されなかった。インフルエンザ A 型ウイルスの PA ポリアミドは RNA 結合が DNA 結合よりも 1 log 低い結合親和性であることが示された。PA ポリアミド (0.1 から 200 \cdot M) は適度な dsDNA に対し結合したのに対して、いくつかの濃度の PA PI ポリアミドは適度な dsRNA に対して明らかなゲルシフトは観られなかった。

ラット TGF- β 1 dsDNA と dsRNA を標的とする PI ポリアミドの分子模型図は CFF 力場変数を用いて Discover Program によって行い、dsDNA と dsRNA の構造体は標準的な結合の長さ及び角度を用いた Program の Insight II Builder Module を用いて構築した。ラット TGF- β 1 ポリアミドは B 型の dsDNA のマイナーグループに確りと挿入した。理想的な A 型の dsRNA へは推定されるマイナーグループに緩やかに合体した。PI ポリアミドは標的とする dsDNA よりも標的とする dsRNA への低い結合能力を持っていることを示唆した。この研究で報告されたピアコアアッセイでは PI ポリアミドは標的 dsRNA に対する PI ポリアミドの結合定数は TGF- β 1 ポリアミドと標的 RNA との間がとても弱いことを示し、DNA との結合 Kd 値が 10^{-9} M であったのに比較し、RNA に対しては Kd 値は 10^{-7} M であった。この結果は TGF- β 1 ポリアミドが DNA 結合親和性より 2 log 低い親和性で RNA に結合することを示していた。二本鎖 DNA に結合し、遺伝子発現を抑制する PI ポリアミドがインフルエンザウイルスのような RNA ウイルスの抗ウイルス薬になる可能性があるかどうかを検討し、これまでの二本鎖 DNA をターゲットとしていた PI ポリアミドが二本鎖 RNA に塩基配列特異的に結合する事を今回初めて明らかにした。現行の PI ポリアミドでは RNA への結合親和性は低いため、インフルエンザ A ウイルスの標的としたパンハンドルの幹領域への PI ポリアミドはインフルエンザの実際の医療の発展には難しいだろう。今後、アルキル化剤の添付や化学的に構造変化させた PI ポリアミドの化学合成が必要かもしれない。核酸医薬は核酸分解酵素により速やかに生体内で分解されるが、PI ポリアミドは生体内で安定であり、DDS なしに細胞に取り込まれ、様々な遺伝子をターゲットとして自由に分子設計出来、遺伝子発現を抑制出来る。そこで、PI ポリアミドを基盤とした様々な機能分子が新たに設計されることが期待される。

本研究は微生物学、環境学、化学、医学の領域に基づき、新興ウイルス感染症である SARS、インフルエンザに対し、ゲノム化学に基づきリボザイム、PI ポリアミドの開発について纏めたものである。