



標的細胞だけでRNAiを引き起こす核酸マシン

Nucleic acid machine for selective RNAi induction

大阪市立大学大学院工学研究科化学生物系専攻
准教授 立花 亮／Tachibana, Akira
教授 田辺 利住／Tanabe, Toshizumi



RNAi医薬とは？

- ・RNAi現象をもとに、現在開発が急がれている医薬
- ・特定のmRNAだけを破壊するため、
これまで有効な医薬のなかった難治性の疾患にも適応できる

非常に有効ではあるが...

- ・細胞へのデリバリーの問題
- ・正常／異常細胞の区別の問題＝副作用の可能性

目標：この問題を克服する



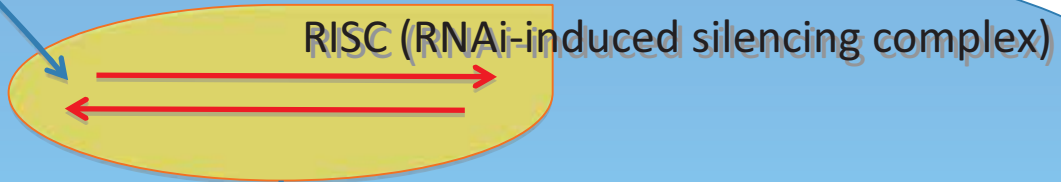
RNAi (RNA干渉)とは

～siRNA導入で細胞内で何が起こるのか？

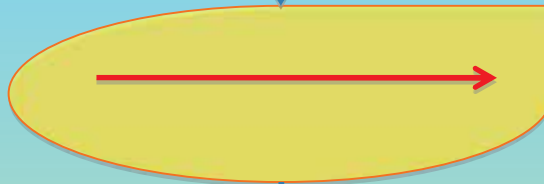
siRNA (guide/passenger)



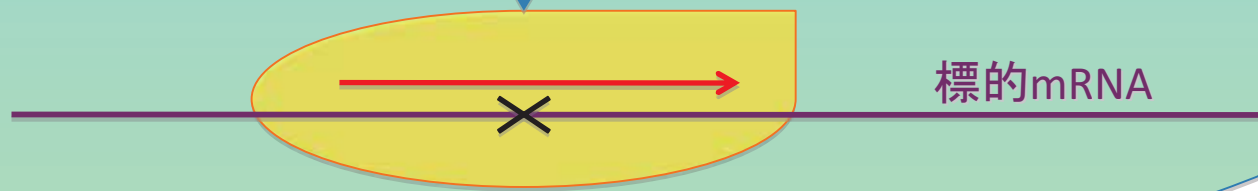
細胞に導入
RISCに取り込まれる



guide鎖だけがRISCに残る



guide鎖に相補的なmRNAを結合する

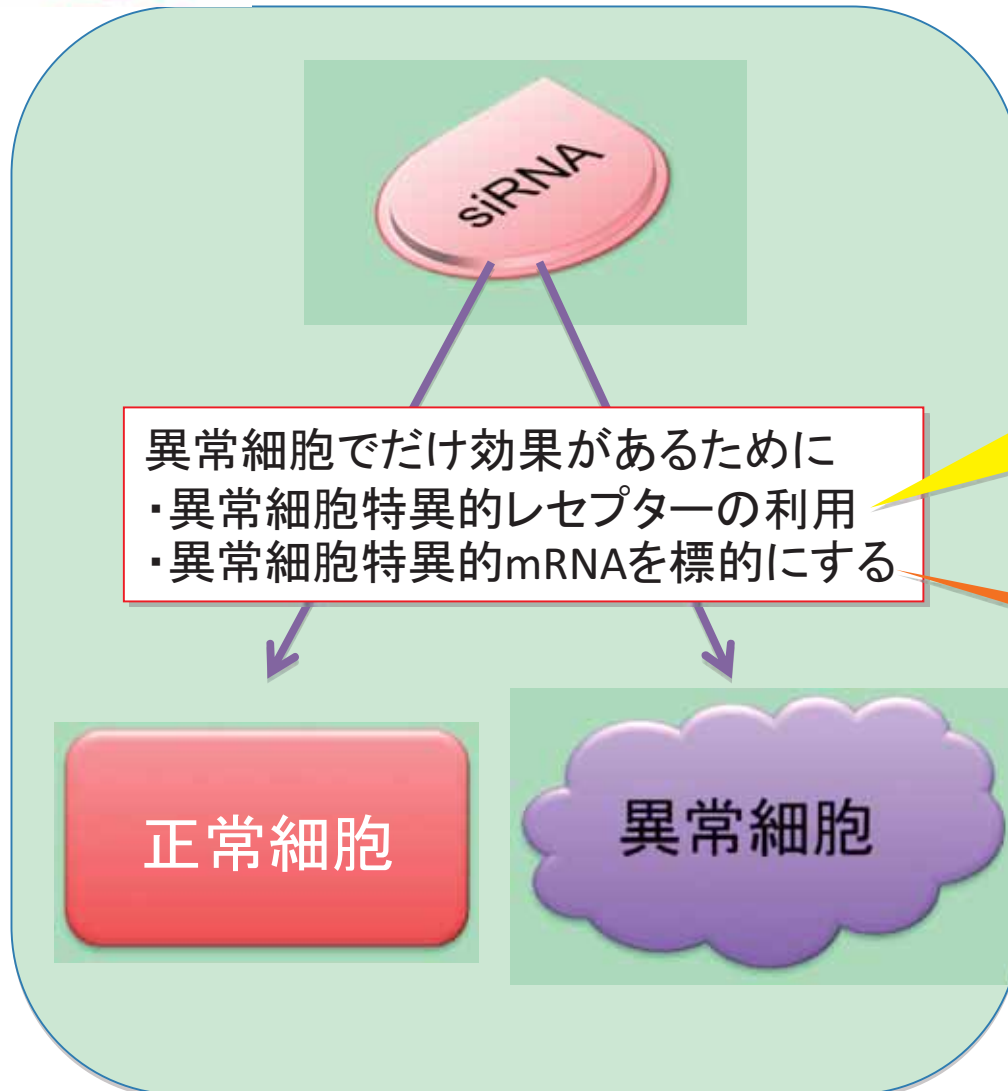


標的mRNA

mRNAを分解する



正常／異常細胞の区別の問題



問題点

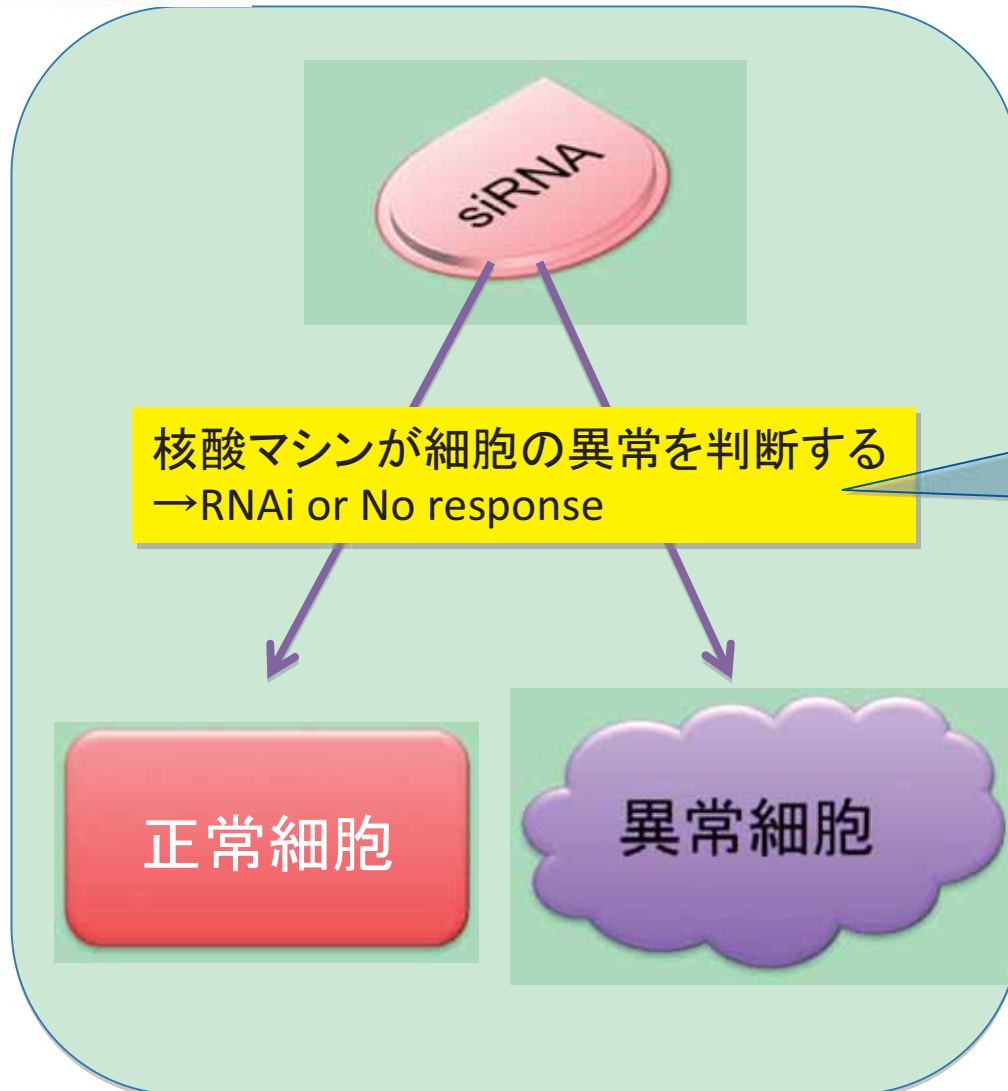
- ・レセプターは「本当に」異常細胞でだけ発現しているのか？
- ・そのようなレセプターは都合よく見つかるのか？

問題点

- ・発現は「本当に」特異的か
- ・そのmRNAをノックダウンすれば、その細胞は死滅するのか



我々の提案～核酸マシン 正常／異常細胞の区別の問題解決法

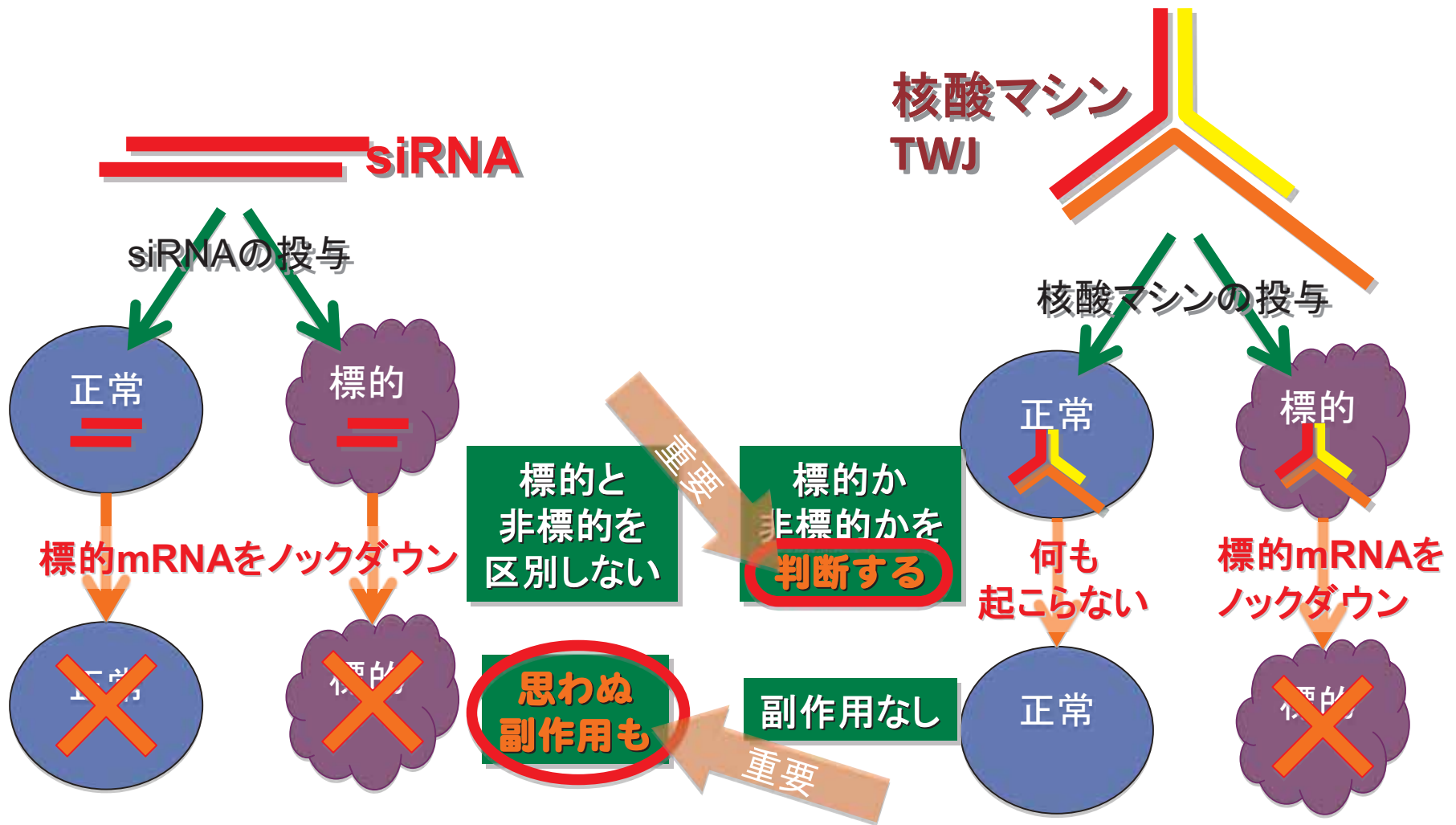


利点

- ・間違えて正常細胞に導入されても働かない
- ・判断と動作対象を区別できる



RNAi(siRNA)医薬品の問題点





核酸マシンの判断アルゴリズム

～さらに複雑にすることも可能

この細胞は異常細胞か？
(異常細胞特異的mRNAがあるか？)

核酸マシンが
判断する

No

Yes

作動せず

RNAi作動

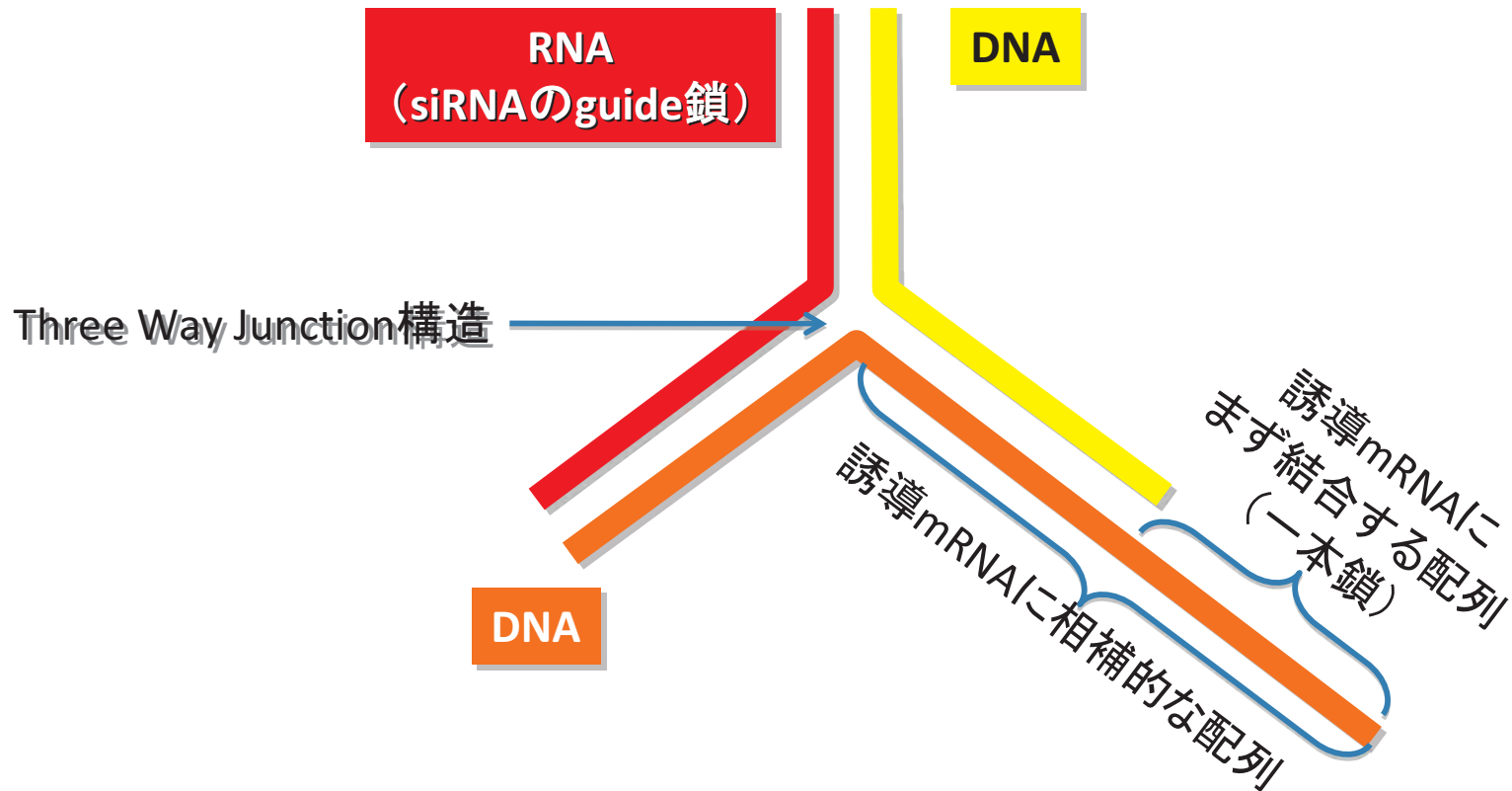
細胞は生存

細胞は死滅

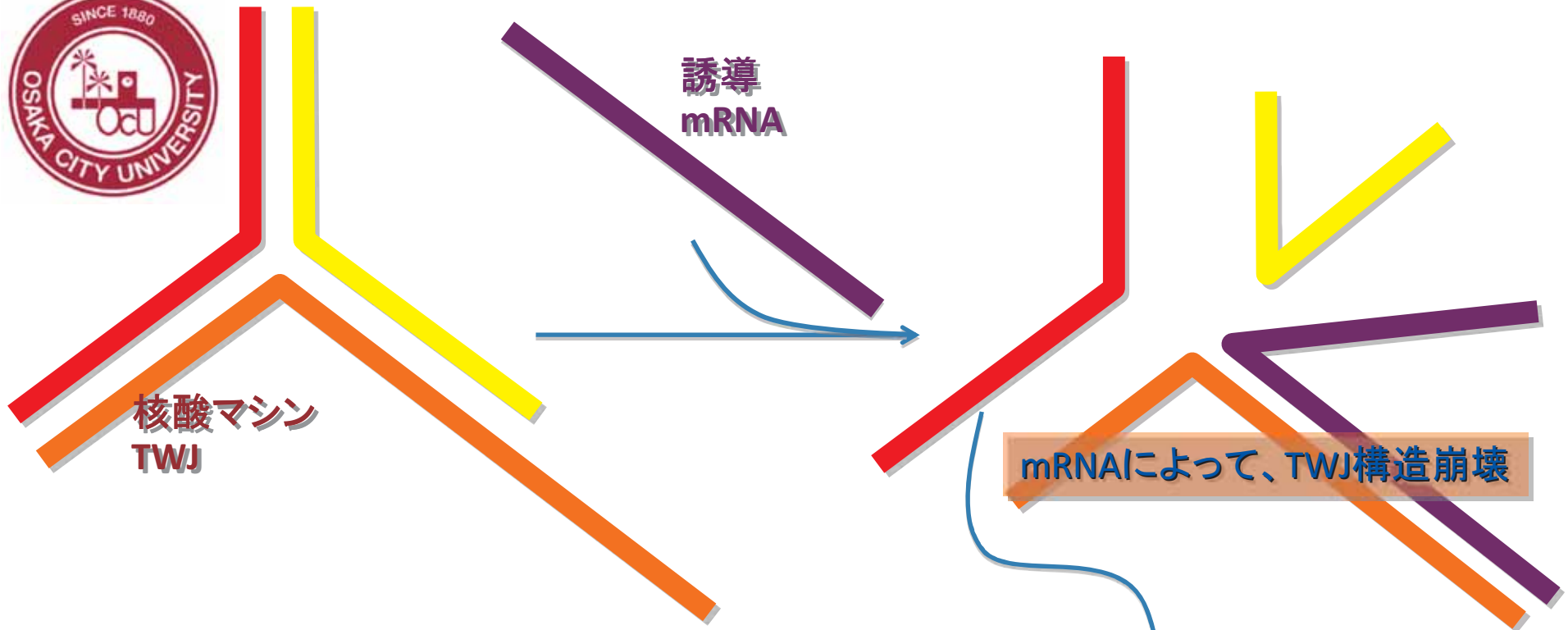


核酸マシンの構造

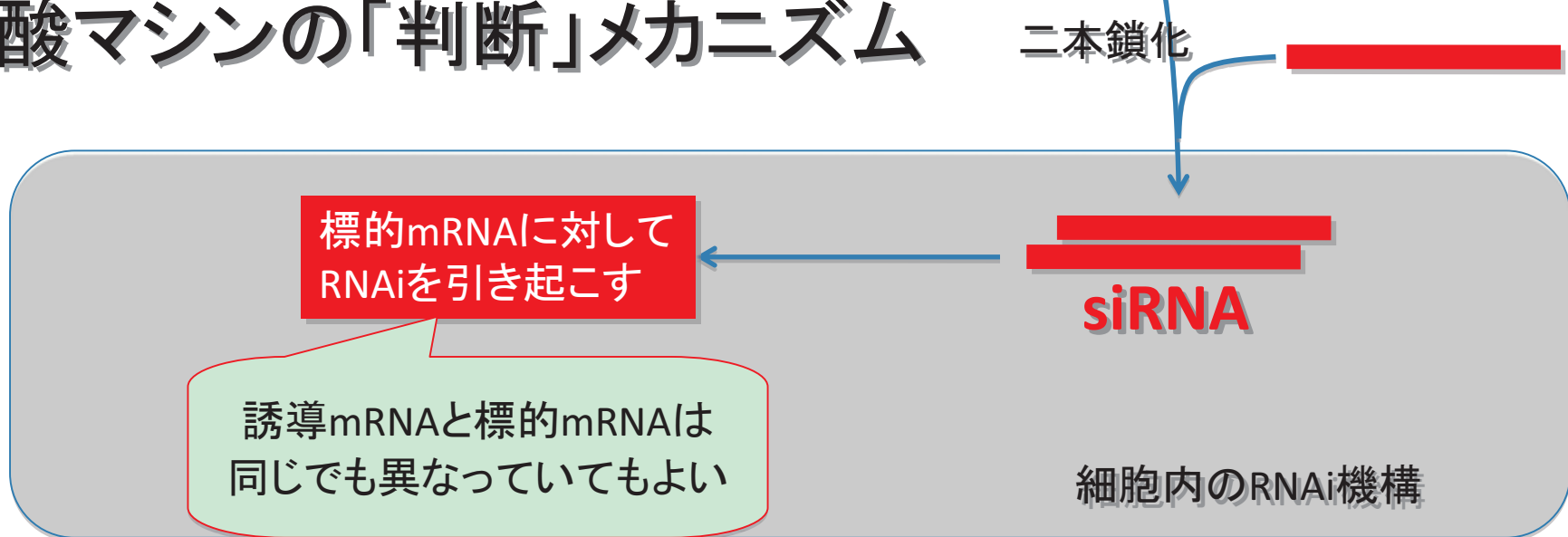
一本のRNAと二本のDNAから構成



誘導mRNAはRNAiの標的mRNAと同じでも異なってもかまわない

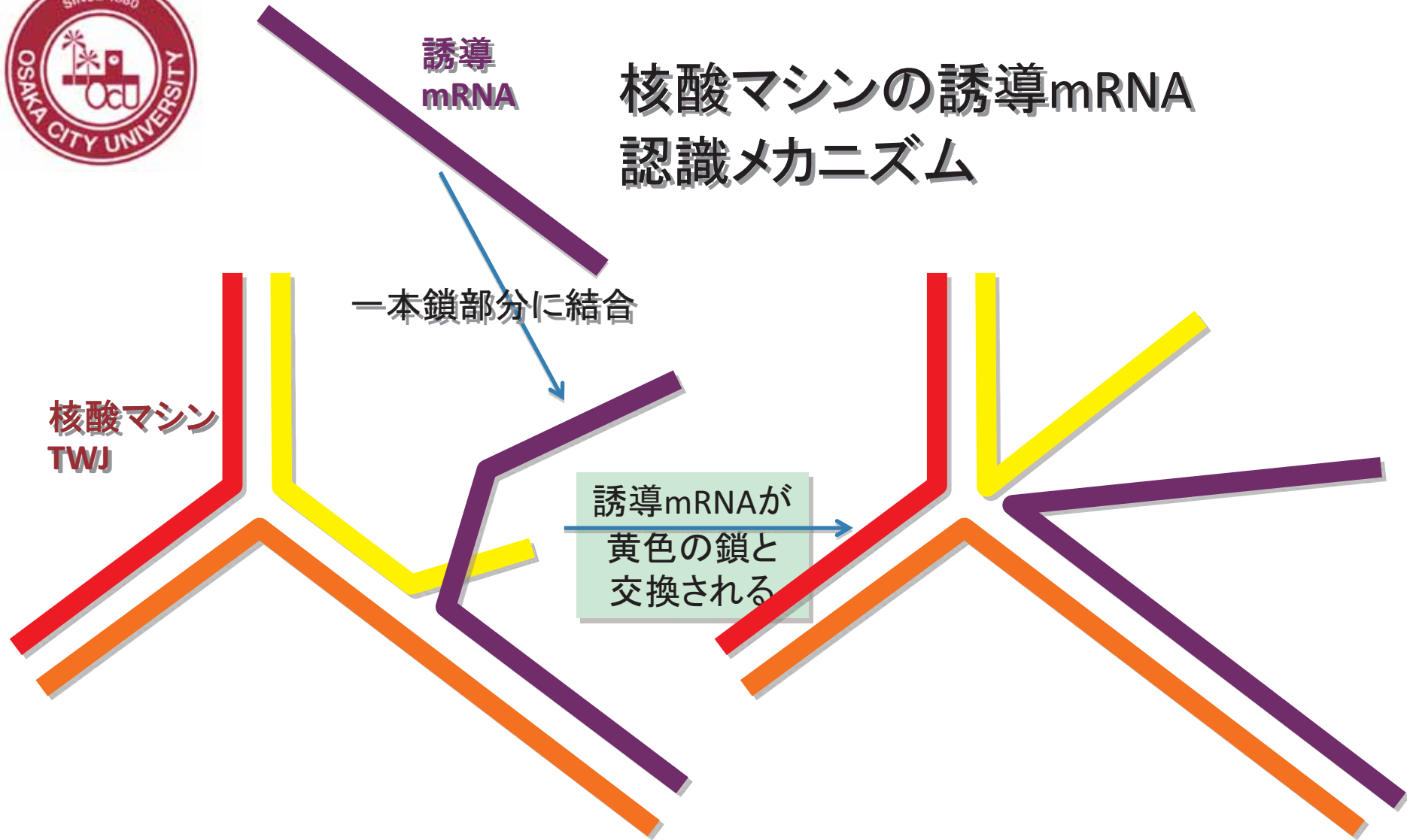


核酸マシンの「判断」メカニズム





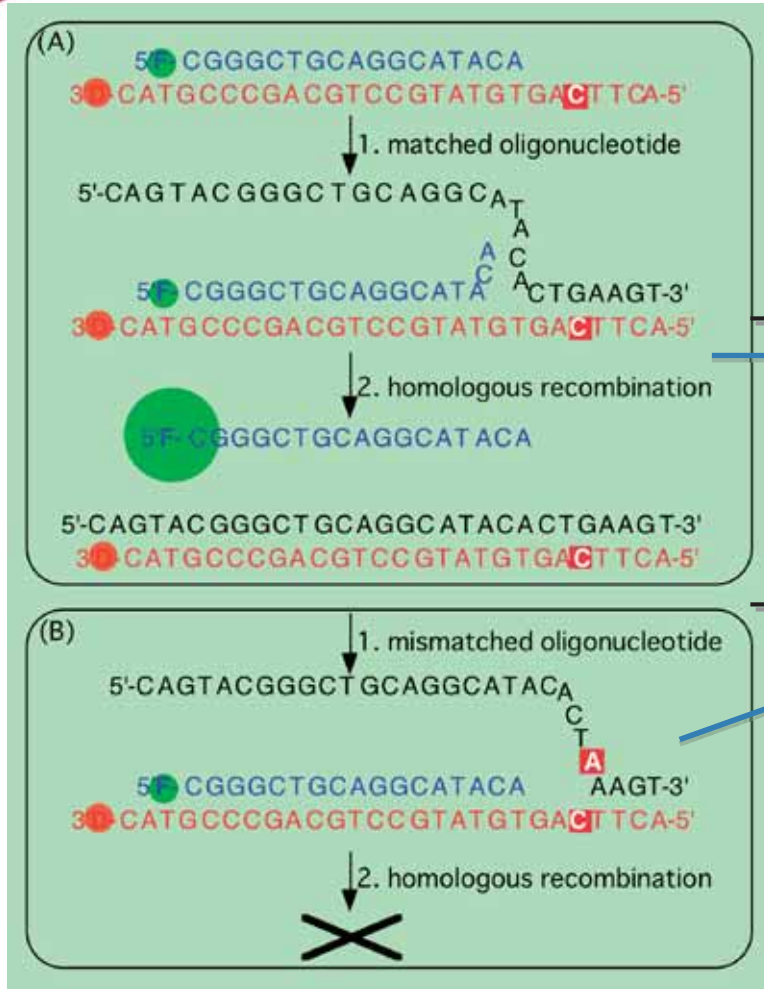
核酸マシンの誘導mRNA 認識メカニズム



誘導mRNAの一本鎖部分への結合が律速段階であり、
その後の鎖交換反応は速やかに起こる

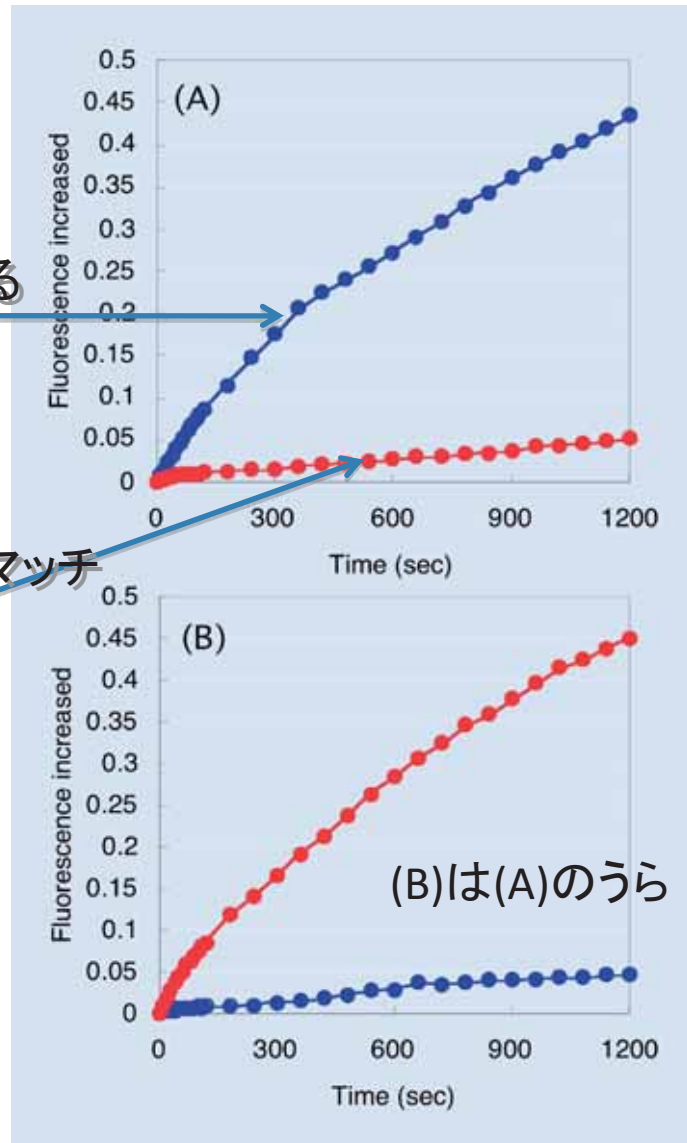


核酸マシンの誘導mRNA認識メカニズム ～SNPsが認識できる～



一致している

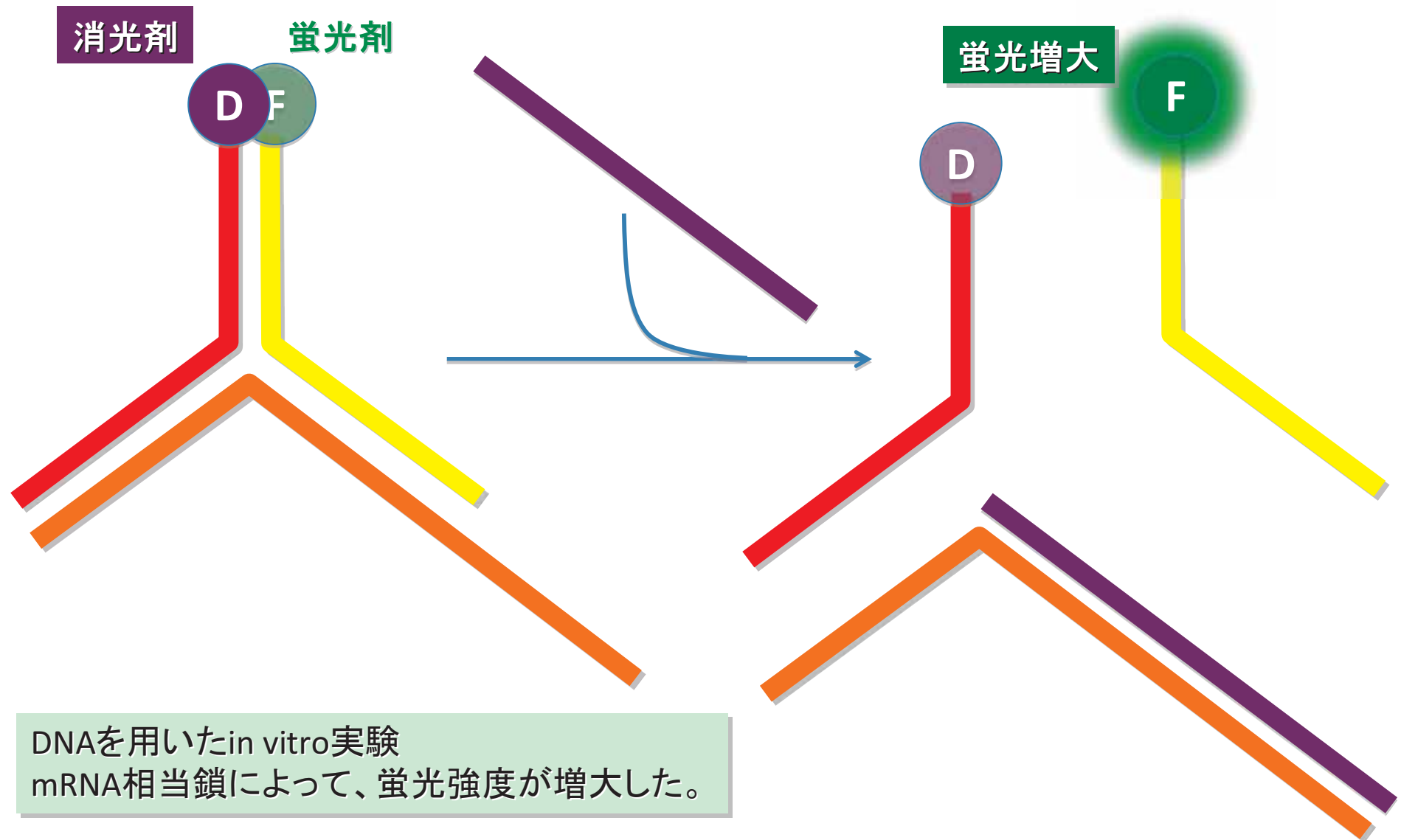
一塩基ミスマッチ



全長は誘導mRNAに相補的であっても、一本鎖部分にミスマッチがあると鎖交換反応はほとんど起こらない

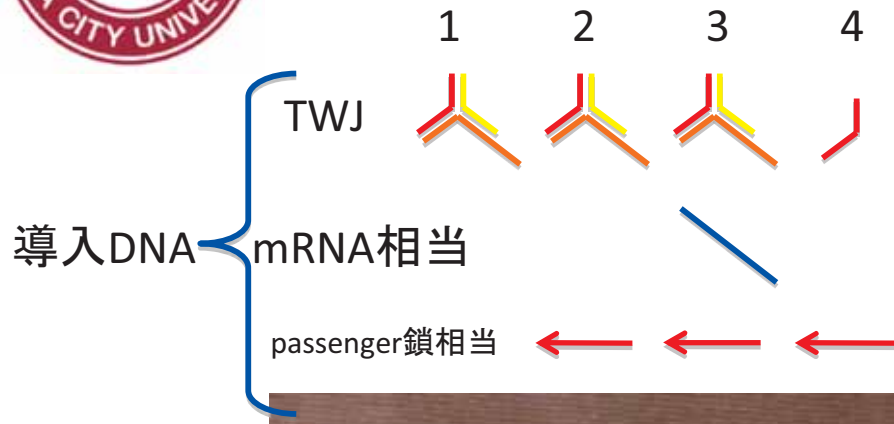


mRNA相当鎖によってTWJ構造が崩壊する

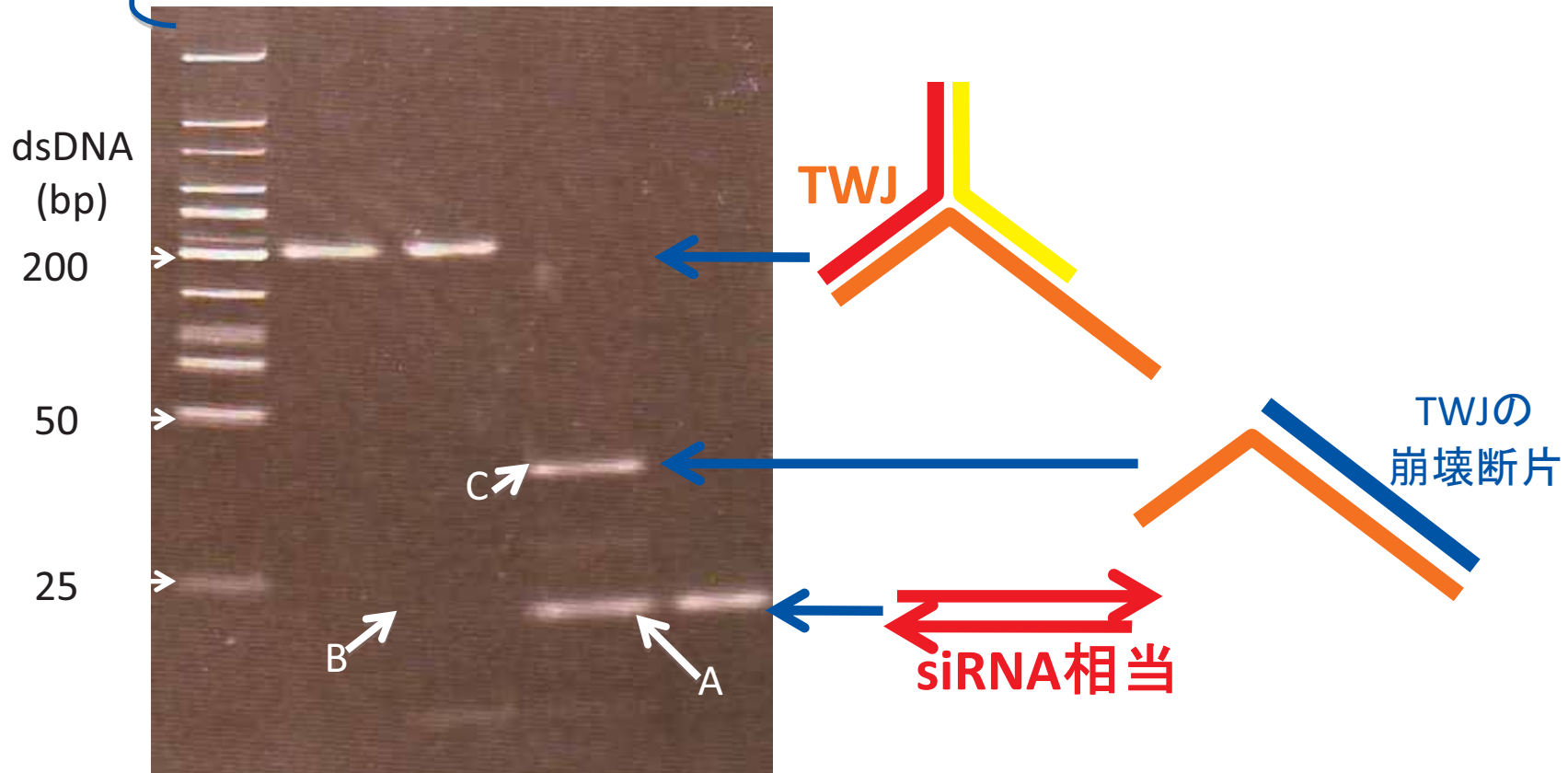




mRNA相当鎖によってTWJ構造が崩壊する2

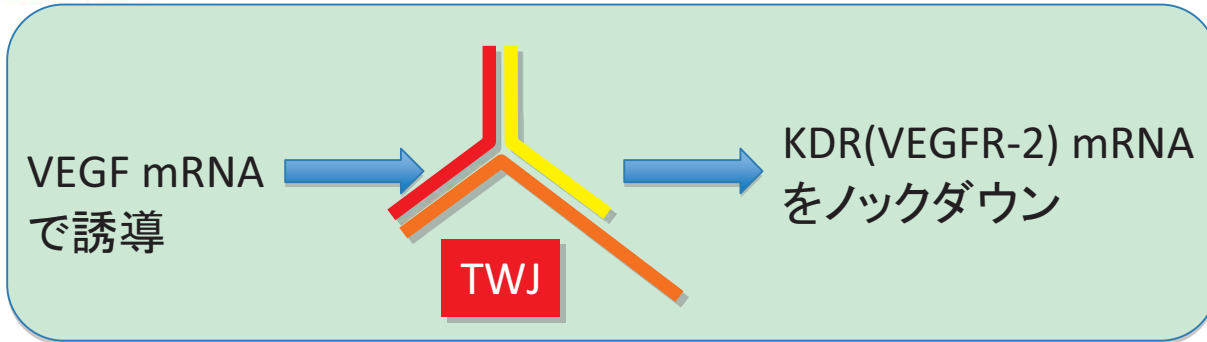


lane1: TWJ
lane2: TWJ+passenger鎖相当(mRNAがない)
lane3: TWJ+mRNA相当+passenger鎖相当
lane4: siRNA相当鎖(最大量のポジコン)



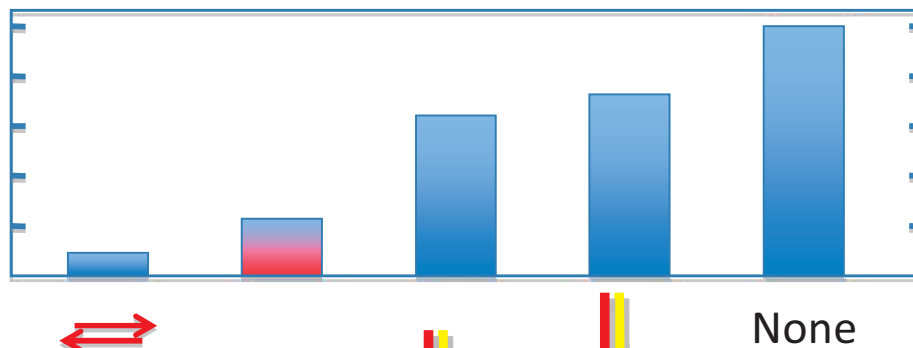


ヒト乳ガン細胞MCF-7での検証



MCF-7はVEGF, KDRとも発現
VEGF, KDRはガンの成長、
ガン組織への血管新生など
に関与

KDR mRNAの相対値



siRNA

設計されたTWJ

一本鎖部分がない

一本鎖部分が異なる配列

VEGF mRNAに反応して、KDR mRNA
をロックダウンできるか？
VEGF mRNAに反応できない一本鎖
部分を持つTWJはKDR mRNA量はそ
れほど下がらないのに対して、反応
するTWJはsiRNAに近い量にまで下
がっていた。



実験事実のまとめ

- 一本鎖部分にSNPsを認識させることができた。
- 核酸マシンTWJは誘導mRNAによって構造が崩壊した。
- 誘導mRNAが存在しない場合や配列が異なる場合、
RNAiを引き起こさなかった。
- 実際に細胞内で、核酸マシンが機能することがわかった。



核酸マシンの特長1

- ・一塩基置換が識別できる

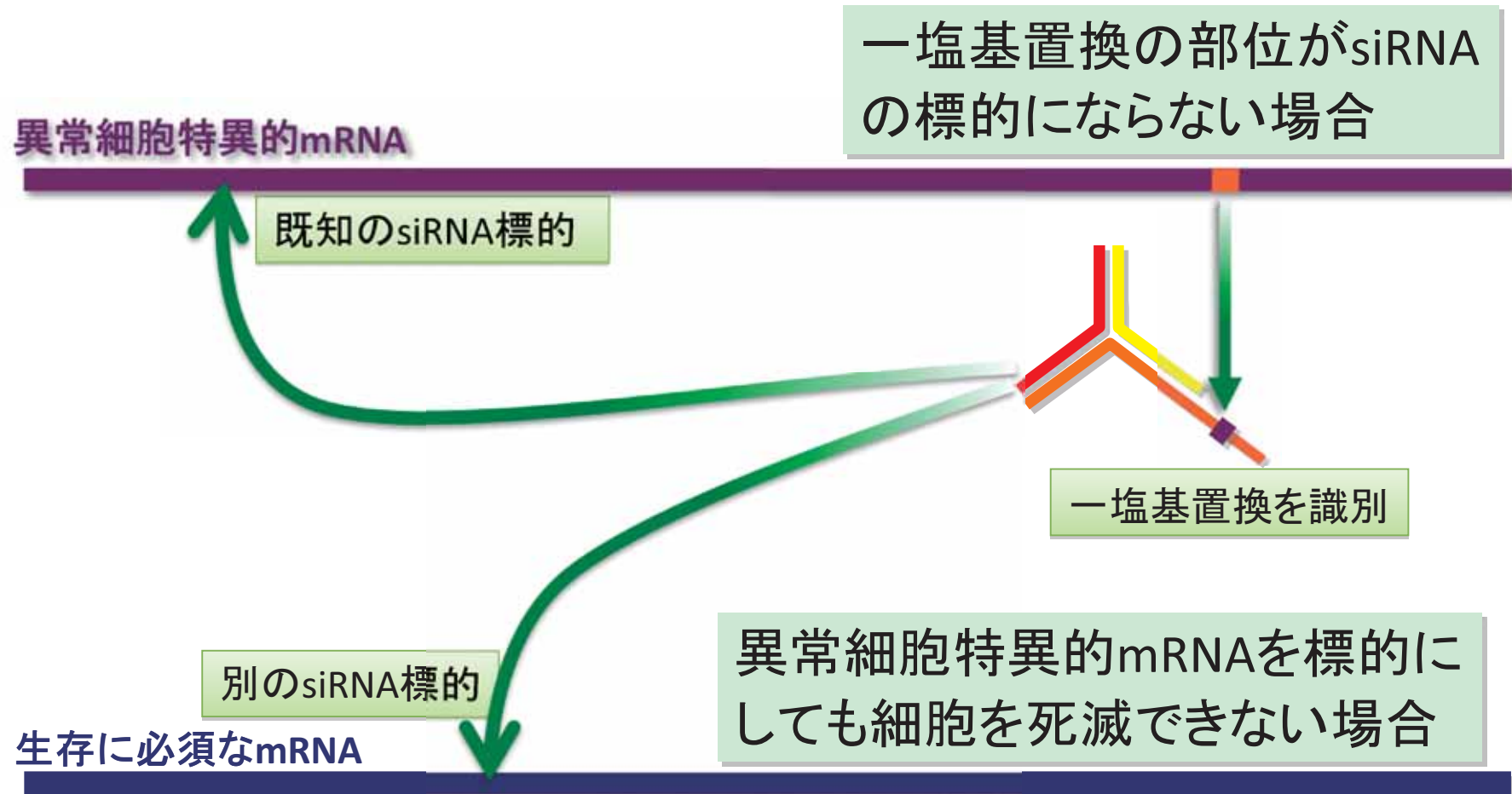
ガンの一塩基変異に対応

オーダーメイド医療
個人のSNPsに対応できる

mRNAの非翻訳領域の一塩基置換にも対応



核酸マシンの特長2 認識と標的を別々のものを選択できる





核酸マシンの想定される用途

- RNAi医薬品
- バイオテクノロジー研究用ツール
- 上記以外に、遺伝子発現を条件によって抑制することから、細胞状態の制御ができる可能性がある。さらには、それを利用した再生医療の分野にも応用可能である。



核酸マシンの想定される業界

- 想定されるユーザー
RNAi医薬およびその関連企業
バイオテクノロジー関連企業
試薬薬品企業



実用化に向けた課題

- 様々な例を試す必要がある。
- 実用化に向けて、核酸マシンの精度を向上できるよう配列選択法を確立する必要あり。



企業への期待

- 本技術を応用できる実際の標的候補を共同で研究することを希望。
- RNAi医薬の副作用低減の効果を共同で研究することを希望。



本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : オリゴヌクレオチド構造体および
遺伝子発現制御方法
- 出願番号 : 特願2008-178693
- 出願人 : 公立大学法人大阪市立大学
- 発明者 : 立花 亮、田辺 利住



お問い合わせ先

**大阪市立大学新産業創生研究センター
コーディネーター 渡辺 敏郎**

TEL 090-3266-6499/06-6605-3469

FAX 06-6605-3552

e-mail watanabt@ado.osaka-cu.ac.jp

toshirowatanabe@hi-ho.ne.jp

URL <http://www.ado.osaka-cu.ac.jp/sangaku/>