

論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨の公表

学位規則第 8 条に基づき、論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨を公表する。

フリガナ 氏名	サカモト リョウ 坂本 凌		授与番号 甲 第 1342 号
学 位 の 種 類	博士(薬学)	授 与 年 月 日	2019 年 9 月 25 日
学位授与の要件	本学学位規程第 18 条第 1 項該当者 (学位規則第 4 条第 1 項)		
学位論文の題名	Interferon- α 1 の内在性アンチセンス RNA による interferon- α 1 mRNA 発現制御効果のモルモットシステムを用いた概念実証研究		
審 査 委 員	(主査)北村 佳久 (立命館大学薬学部教授)		木村 富紀 (立命館大学薬学部特別任用教授)
	河野 貴子 (立命館大学薬学部准教授)		
論文内容の要旨	<p>本論文は第 1 章でモルモット interferon-γ1 遺伝子 (<i>cpIFNA1</i>)の同定、第 2 章で感染モルモットにおける interferon-γ1 アンチセンス RNA (IFN-γ1 AS)の抗ウイルス活性の検証について、研究背景、実験方法、実験結果および考察を記述している。そして、本研究から得られた実験結果からアンチセンス RNA の治療メカニズムについて考察し、ヒトのインフルエンザ感染における予防および治療への応用について、まとめている。</p> <p>Interferon-γ1 アンチセンス RNA (IFN-γ1 AS)は、ヒト interferon-γ1 遺伝子 (<i>IFNA1</i>)の mRNA 発現量を調節する重要な因子であることが報告されている。この内在性 AS は、一過性の mRNA 二本鎖形成およびマイクロ RNA-1270 (miR-1270) 依存性 mRNA 分解の阻害によって、<i>IFNA1</i> 遺伝子 mRNA の安定化を引き起こす。そこで、学位申請者はモルモット {一般名 guinea pig (gp) および学名 <i>Cavia porcellus</i> (cp)}の <i>IFNA1</i> 遺伝子を同定し、生体内の IFN-γ1 AS-mRNA 調節経路による自然免疫応答制御効果の概念実証研究を行った。</p> <p>本研究において、学位申請者は正常機能を発現する <i>Mx1</i> 遺伝子を有し、I 型インターフェロン経路による抗ウイルス効果を示すモルモットをインフルエンザ感染モデル動物として用いた。バイオインフォマティクス解析の結果より、ヒト、マウスおよびヒマラヤマモセットの <i>IFNA1</i> 遺伝子に高い相同性を示す 3 つの遺伝子をモルモットの <i>IFNA1</i> の候補遺伝子として絞り込んだ。さらに、これらの候補遺伝子を導入したモルモット線維芽細胞に A 型インフルエンザウイルス (A/PR/8/34)を感染させ、誘導される抗ウイルス作用を指標に、モルモット <i>IFNA1</i> 遺伝子 (<i>cpIFNA1</i>)を決定した。</p> <p>次に、モルモット IFN-γ1 の内在性アンチセンス RNA (gpIFN-γ1 AS)上の mRNA 認識配列からなる antisense oligoribonucleotide (asORN)が、ウイルス感染モルモットの気道において、gpIFN-γ1 mRNA 発現およびインフルエンザウイルス増殖に示す効果を解析した。asORN の <i>in vivo</i> 経肺投与によって gpIFN-γ1 AS/mRNA 発現量は増加し、インフルエンザウイルス力価は低下した。</p> <p>以上のことから学位申請者は、モルモットを用いた概念実証研究によって、内在性アンチセンス RNA は生体においても <i>IFNA1</i> 遺伝子の mRNA 発現量を調節し、IFN-γ1 タンパク質の産生量を増加させ、A 型インフルエンザウイルスの増殖を制限することを明らかにした。さらに、asORN の塩基配列および投与方法を最適化することにより、ヒトインフルエ</p>		
	ンザウイルスの罹患予防および治療に有効な新規の核酸医薬品の開発に資することが期待される。		

論文審査の結果の要旨	<p>本研究は、ヒト interferon-γ 1 (IFNA1) mRNA の発現を転写後性に制御する内在性の interferon-γ 1 アンチセンス RNA (IFN-γ 1 AS)に着目し、その制御機能を利用することで、これまで人為的に調節が不能であった抗ウイルス性自然免疫応答の発現制御を可能にする新規核酸医薬の開発を目的とする。</p> <p>本論文では申請者は、抗ウイルス性自然免疫応答の定量的解析を可能にするモデル動物を選択し、<i>in vivo</i> 条件下に IFN-γ 1 AS-mRNA 調節経路による抗ウイルス性自然免疫応答の制御を証明する概念実証研究を行い、この内在性 AS の機能ドメインが新規核酸医薬の開発のためのリード化合物となりうることを実験的に証明した。</p> <p>具体的には、未報告のモデル動物 <i>IFNA1</i> 遺伝子を同定するとともに、モデル動物 IFNA1 mRNA の発現増大効果を指標に IFN-γ 1 AS の機能ドメインマッピングを実施した。決定したドメインの塩基配列からなる antisense oligoribonucleotide (asORN)を合成し、これをウイルス感染局所に送達させるための drug delivery systemとして生分解性の PLGA ナノ粒子を選択し、この粒子への asORN を封入する至適条件を決定した。モデル動物胎仔線維芽細胞において、モデル動物 IFN-γ 1 AS/mRNA の発現レベルを最大化することを検証した PLGA-asORN をモデル動物に投与したところ、投与量に依存してモデル動物 IFN-γ 1 AS/mRNA の発現レベルは増大し、その結果、感染させたヒト A 型インフルエンザウイルスの力価の有意な低下をもたらすことを証明した。加えて、PLGA-asORN は、ウイルス感染前にあらかじめ投与した場合のみならず、感染後に追加投与した場合にもウイルス力価のさらなる低下をもたらすことが示され、ヒトインフルエンザウイルス感染の予防のみならず、感染後の治療にも有効であることが示唆された。また、バイオインフォマティクス解析を駆使し、この asORN の作用メカニズムとして、モデル動物 microRNA を吸着し、その mRNA 発現阻害作用を阻止する competing endogenous RNA 効果を有する可能性を指摘した。以上の結果は、これまで人為的な発現制御が不可能であった抗ウイルス性自然免疫応答制御を可能にするリード化合物の提供を意味し、新規な抗ウイルス性核酸医薬の開発に資する観点から高く評価ができた。</p> <p>本論文の審査に関しては、2019 年 6 月 15 日(土)16 時 00 分～17 時 00 分にわたって、サイエンスコア 5 階教員会議室において公聴会を開催し、学位申請者による論文内容の説明の後、審査委員による発表内容に関する口頭試問ののちに、公聴会参加者による研究内容に対する質問を受けた。口頭試問ならびに公聴会参加者からの質問は、モデル動物 IFN-γ 1 AS の機能ドメインの作用メカニズム、内在性アンチセンス RNA による遺伝子発現制御機構、asORN によるモデル動物 IFNA1 mRNA 発現制御の <i>in vitro</i> 解析系などに関してであったが、いずれの質問に対しても学位申請者の回答は適切であった。</p> <p>以上の結果を踏まえ、審査委員会は、本論文は本研究科の博士学位論文審査基準を満たしており、博士学位を授与するに相応しい水準に達しているという判断で一致した。</p>
試験または学力確認の結果の要旨	<p>本論文の公聴会は、2019 年 6 月 15 日(土)16 時 00 分～17 時 00 分にサイエンスコア 5 階教員会議室において実施された。</p> <p>学位申請者は、本学学位規定第 18 条第 1 項該当者であり、主査及び副査は、論文内容及び公聴会での質疑応答を通して、学位申請者が十分な学識と、博士学位に相応しい能力を有していることを確認した。</p> <p>以上の諸点を総合し、学位申請者 坂本 凌に対し、本学学位規定第 18 条第 1 項に基づいて、「博士(薬学 立命館大学)」の学位を授与することが適当と判断する。</p>