

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

目 次

課題番号

第1分野

20000	13001	アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価	永谷 憲歳	……	1
1009A	13002	子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製	福地 剛	……	5
1008A	13003	新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立	笹岡 俊邦	……	10
1010A	13004	病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発	阿部 章夫	……	15
1006A	13005	糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発	小比賀 聡	……	20
1007A					

第2分野

1011A	23001	慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用	土方美奈子	……	29
1012A	23002	ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法	梨井 康	……	35
1016A	23003	ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用	片野 晴隆	……	42
1013A	23004	血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離	高倉 伸幸	……	47
1014A	23005	BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明	宮里 幹也	……	52
1015A	23006	ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用	小泉 修一	……	57
1018A	23007	トリプトファンによる細胞性免疫の制御	五條 理志	……	61
1019A	23008	気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討	中尾 篤人	……	66
1017A	23009	顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築	赤澤 智宏	……	69

第3分野

1020A	33001	循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリシステムの開発	佐藤 隆幸	……	73
1022A	33002	有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構	崔 吉道	……	77
1021A	33003	組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発	山崎 浩史	……	81

第4分野

1025A	43001	腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究	平原 一郎	……	89
1023A	43002	多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討	三宅 幸子	……	98
1024A	43003	熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究	小出 達夫	……	103

20000	第5分野		
1026A	53001	カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発	西川喜代孝 …… 109
1027A	53002	新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究	河津信一郎 …… 113
1028A	53003	Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究	橋本 雅仁 …… 119
1029A	53004	RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発	清水 博之 …… 124
1030A	53005	薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良	山崎 真巳 …… 132
	第6分野		
1031A	63001	分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計	伊豆津健一 …… 137
1032A	63002	生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用	山岡 哲二 …… 140
1033A	第7分野		
	73001	ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討	和田 誠基 …… 151

糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発

所 属 大阪大学大学院薬学研究科
研究者 小比賀 聡

要 旨

糖部立体配座を固定化した人工核酸（BNA）を用い、標的 RNA との結合親和性、生体内での安定性、RNase H による認識の程度、培養細胞系での標的遺伝子の発現抑制効果を詳細に評価し、BNA が優れたアンチセンス特性を有していることを確認した。

1. 研究目的

近年の分子生物学、遺伝子解析技術の発展に伴い、数多くの疾病に関与している遺伝子配列が明らかにされるようになってきた。また、当初の予定より大幅に早くヒトの全遺伝子の解読が完了することを鑑みても、標的遺伝子の発現を特異的に抑制するアンチセンス医薬品の実用化が達成されることにより、ガンやエイズなどの難治性疾患の治療は飛躍的に発展すると予想できる（Fig. 1）。タンパク質をターゲットとした従来の医薬品開発では当然ながら個々の標的タンパク質ごとにリード化合物の探索、構造の最適化、活性試験、毒性評価等を行っていく必要があった。これに対してアンチセンス医薬品では、標的遺伝子の配列さえ明らかになれば、全く同じ基本原理に沿って化合物（アンチセンス分子）の設計・合成が可能となる。さらに、標的のタンパク質の発現のみを特異的に抑えるため、副作用発現の可能性は一般の医薬品よりもはるかに少ないと考えられる。これからのポストゲノム時代において、ますます遺伝子医薬品開発の必要性が高まることは必至であり、アンチセンス法の実用化に伴い、これまで研究開発に長期間かつ莫大な費用を要していた医薬品開発は大きく様変わりするであろう。さらに、本法はこのような医薬品としての応用ばかりでなく、分子生物学分野等をはじめとする多くの研究分野における極めて有効な研究用ツールとなることも期待できる。

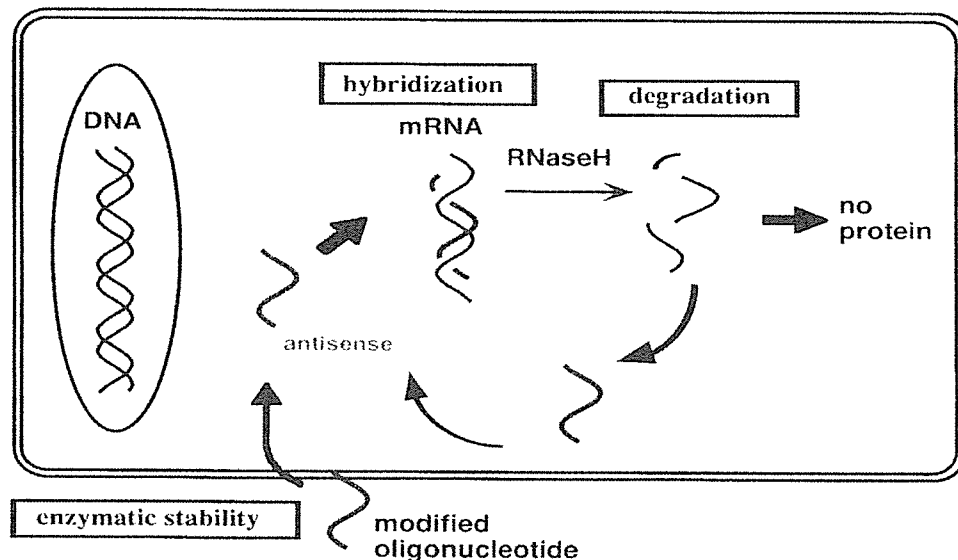


Fig. 1. Antisense strategy.

しかし、天然のオリゴヌクレオチド類は生体内での安定性の低さや、標的となる mRNA との結合親和性の問題からアンチセンス法への適用が困難であるとされている。これらの問題を解決するために、世界中で多くの化学修飾型オリゴヌクレオチド類の開発研究が活発に展開されている。

我々は、従来の化学修飾型オリゴヌクレオチドとは全く異なる新たなコンセプトに基づき、新規な糖部立体配座固定型人工核酸（BNA）を設計した。一般に、核酸の糖部立体配座は N 型と S 型の平衡状態で存在することが知られており、RNA では N 型を、DNA では S 型を取りやすいとされている。この糖部立体配座の違いにより、形成される二重鎖らせん構造は大きく異なり、RNA（N 型立体配座）では A 型らせん構造を、DNA（S 型立体配座）では B 型らせんを形成する（Fig. 2）。そこで、オリゴヌクレオチド類の糖部立体配座を予め RNA と同じ N 型に固定化することができれば、mRNA との二重鎖形成時にエントロピー的に有利となり、安定な二重らせんが形成できるのではないかと容易に考えられる。このような観点から我々は、糖部立体配座を N 型に固定化した新規なヌクレオシド類縁体（BNA モノマー）の開発研究を推進し、世界に先駆けその合成に成功するとともに、これを導入したオリゴヌクレオチド類（BNA）が相補鎖 RNA と極めて強固に二重鎖を形成することを見い出してきた。その二重鎖形成能が現時点において世界で最も高いものであったことから、この BNA は、現存する種々の化学修飾型オリゴヌクレオチド類の中でも非常に優れたアンチセンス候補化合物であると考えられる。

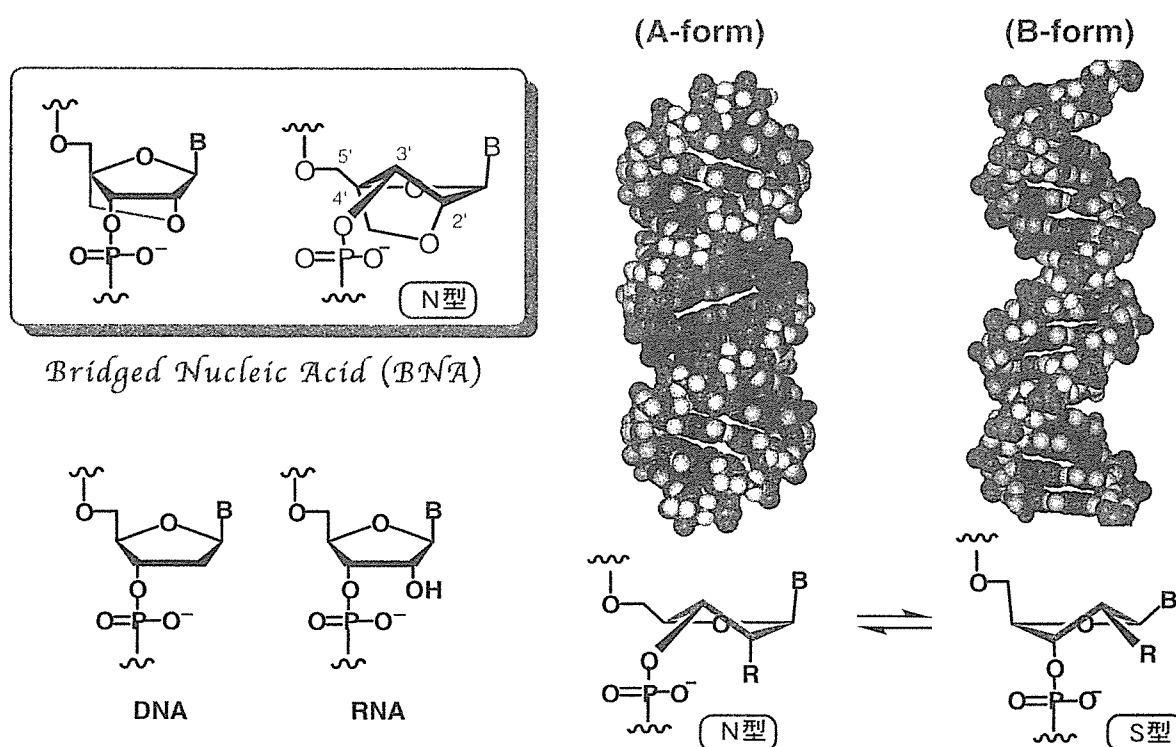


Fig. 2. Structure of BNA and conformation of nucleotides.

本研究では、細胞間接着因子 ICAM-1 遺伝子を標的とし設計・合成したアンチセンス BNA 分子の化学的特性について検討するとともに、アンチセンス分子として必要とされる種々の特性（mRNA との高い結合親和性、生体内での安定性、RNase H の賦活化）について詳細に評価を行なった。さらに、培養細胞系等において標的遺伝子の発現抑制効果を検討することにより、実用的なアンチセンス医薬品の開発を目指した。

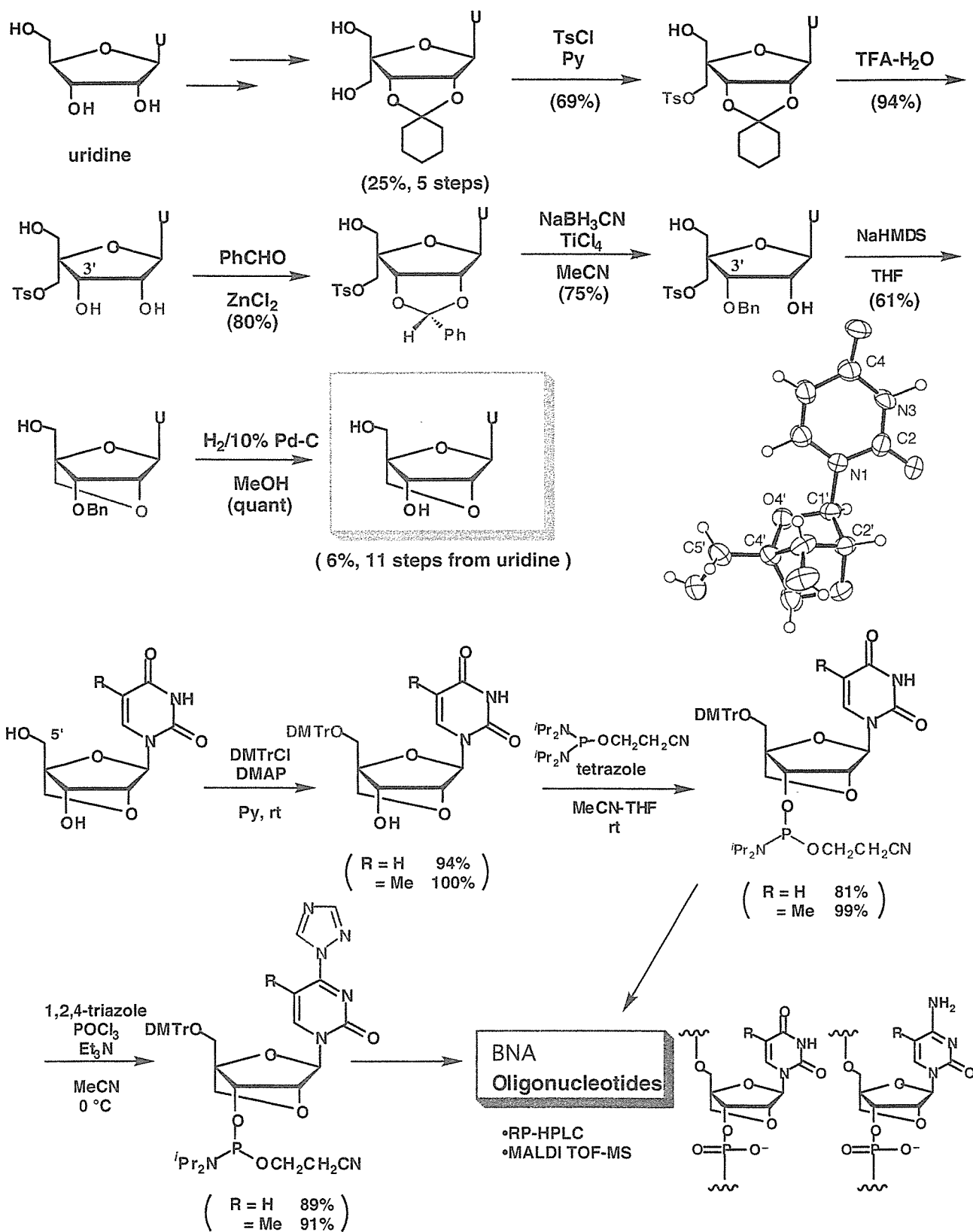


Fig. 4. Synthesis of BNA oligonucleotides.

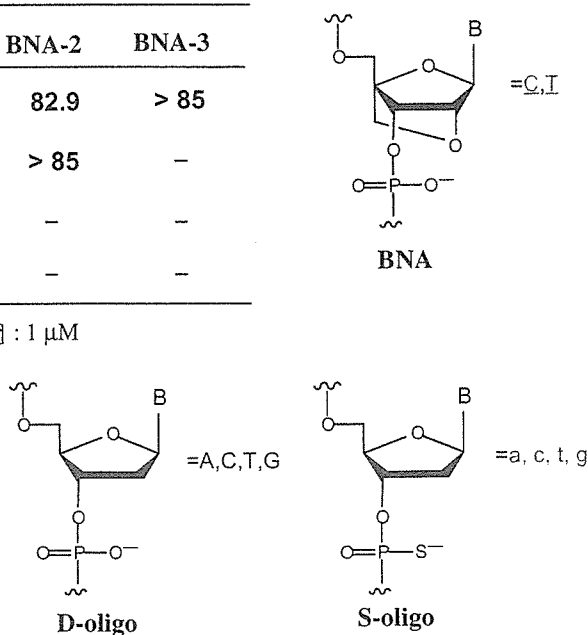
次に、これら BNA の相補鎖 RNA に対する結合親和性を T_m 測定により評価した。Table 1 にその結果をまとめたが、これら BNA オリゴヌクレオチドはいずれも天然の DNA オリゴヌクレオチドに比べ大幅な T_m 値の上昇、すなわち標的 RNA との結合親和性向上が確認された。また、この結果は、ホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド (S-オリゴ) である ISIS2302 で T_m 値が大きく低下していることと全く対照的であった。

Table 1. T_m Values of oligonucleotides with complementary RNA.

[NaCl] (mM)	D-oligo	S-oligo	BNA-1	BNA-2	BNA-3
0	57.7	49.0	75.7	82.9	> 85
10	62.3	51.3	79.1	> 85	-
50	69.3	59.3	> 85	-	-
100	73.8	63.5	-	-	-

Conditions: 20mM sodium phosphate buffer (pH 7.2), [oligomer] : 1 μ M

BNA-1: 5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'
 BNA-2: 5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'
 BNA-3: 5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'
 S-oligo : 5'-gcccaagctggcatecgtca-3'
 D-oligo : 5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'



次に、BNA オリゴヌクレオチドの生体内での安定性を評価するために、今回合成した BNA オリゴヌクレオチド類の蛇毒ホスホジエステラーゼ (SVPDE) に対する酵素耐性を D-オリゴ及び、S-オリゴ (ISIS2302) とともに検討した (Fig. 5)。その結果、天然の D-オリゴでは、数分間の酵素処理によりオリゴヌクレオチドの速やかな分解が観測されたが、BNA オリゴヌクレオチドの場合には、4 時間後においてもほとんど分解は認められなかった。この結果から、BNA オリゴヌクレオチドは S-オリゴと同様に生体内で非常に安定であるということが確認できた。

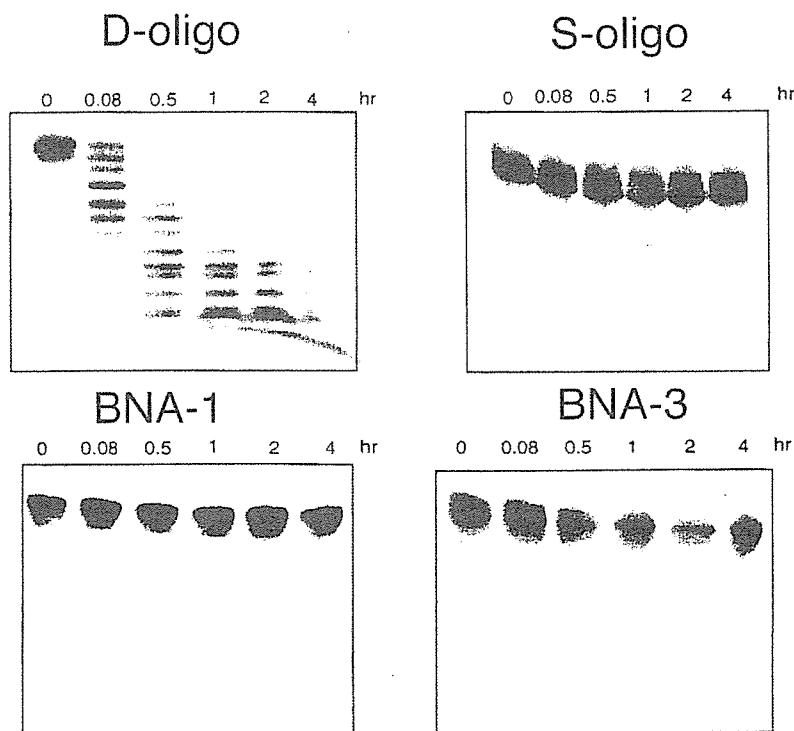
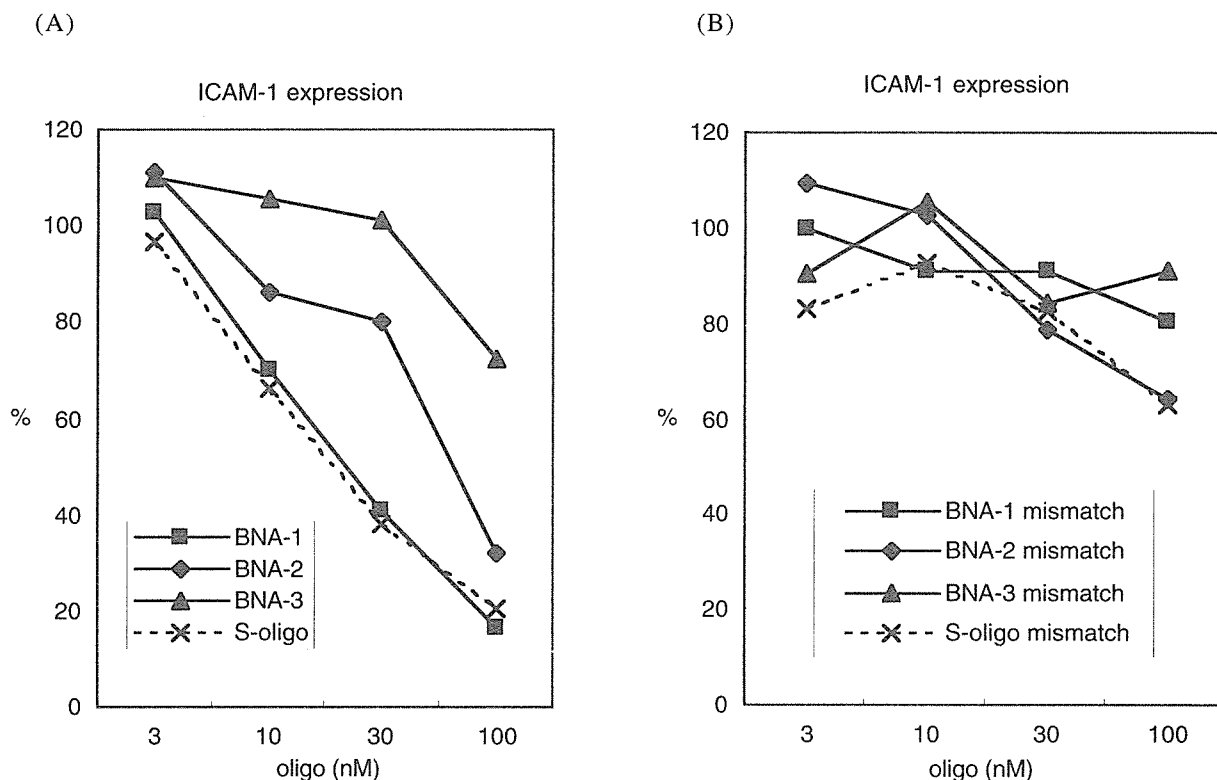


Fig. 5. Enzymatic stability of BNA oligonucleotides.



BNA-1: 5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'
 BNA-2: 5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'
 BNA-3: 5'-GCCCAAGCTGGCATCCGTCA-3'
 S-oligo: 5'-gcccnaagctggcctacatcg-3'

BNA-1 mismatch: 5'-GACGCATCGCGCCTACATCG-3'
 BNA-2 mismatch: 5'-GACGCATCGCGCCTACATCG-3'
 BNA-3 mismatch: 5'-GACGCATCGCGCCTACATCG-3'
 S-oligo mismatch: 5'-gaegcctacatcg-3'

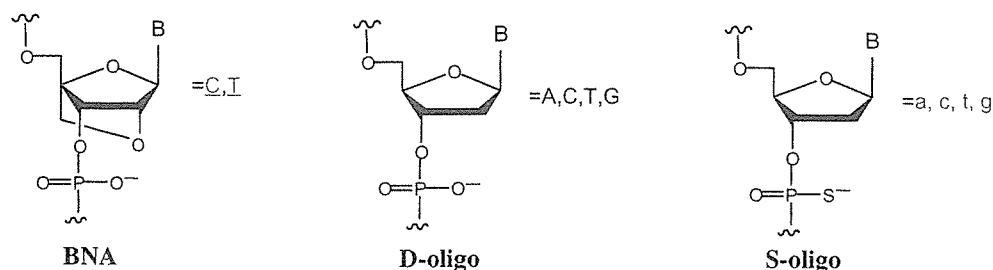


Fig. 7. Inhibition of ICAM-1 gene expression by antisense BNA oligonucleotides.

4. 考察

BNA オリゴヌクレオチドは、従来の化学修飾型オリゴヌクレオチドとは異なり、その糖部立体配座を RNA と同じ N 型に固定化するというコンセプトに基づき設計・合成されたものであり、その化学構造は他の化学修飾型オリゴヌクレオチドに多く見られるような天然型から大きく逸脱したものではない。このような化学構造的特徴から、任意の配列の任意の位置に BNA 修飾を施したオリゴヌクレオチド類 (BNA オリゴヌクレオチド) を通常の DNA 合成機を用いて容易に大量調製可能である。さらに、BNA オリゴヌクレオチドは、我々の当初の期待通り標的 RNA との結合親和性に優れているばかりではなく、生体内での安定性についても十分実用レベルに達していることが今回の結果から確認できた。これらの点は、従来よりアンチセンス法実用化に際しての大きな問題とされてきた点であり、次世代のアンチセンス分子として非常に期待がもたれる。特に、オリゴヌクレオチド中の一部分

に BNA 修飾を行なうだけで、これまでに類を見ない程の結合親和性の向上とヌクレアーゼに対する耐性を獲得できたことは特筆すべき点であると言える。また、RNase H に認識されるには BNA オリゴヌクレオチド中に天然型デオキシヌクレオチドを少なくとも 4 残基以上連続して含む必要が有るといふ非常に興味深い知見を得ることができた。今回検討を行なった BNA オリゴヌクレオチドの中で BNA-1 は、現在臨床段階での検討が進められている ISIS2302 (S-オリゴ) に匹敵する優れた ICAM-1 発現抑制効果を示すことが確認できた。このような優れたアンチセンス活性発現には、BNA の有する“相補鎖 RNA に対する高い結合親和性”、“生体内における優れた安定性”といった特徴に加え、“BNA-1/RNA 複合体が RNase H により効果的に認識を受けた”という点が大きく寄与しているものと考えられる。今後より綿密な配列の設計を施すことにより、BNA オリゴヌクレオチドのアンチセンス特性を飛躍的に向上させることが可能であると考えられる。さらに、ミスマッチ配列を用いた検討から BNA オリゴヌクレオチドの遺伝子発現抑制効果が配列特異的なものであることも確認できたことから、BNA はこれまでに配列非特異的な発現抑制が数多く報告されている S-オリゴよりもより効果的で且つ安全な（副作用の少ない）実用的アンチセンス医薬品の候補化合物として非常に有望であると言えよう。

5. まとめ

以上、本研究によって糖部立体配座を固定した新規な人工核酸 (BNA) の優れたアンチセンス特性を明らかにすることができた。今後、様々な標的遺伝子に対するアンチセンス BNA 分子を設計・合成し、その遺伝子発現抑制効果を検討することにより本研究結果の一般化を図るとともに、モデル動物を用いた前臨床試験を推進していくことで、実用的なアンチセンス医薬品の開発が達成できるものと考えている。また、本研究の成果は新たな医薬品開発のみならず、幅広い生命科学分野における研究用ツールとして利用可能である。国内外の多くの先生方との共同研究により、この BNA の幅広い利活用を図っていきたいと考えている。

6. 研究発表

該当なし

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
若手研究者奨励研究報告書

平成13年11月30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