

平成13年度

# 創薬等ヒューマンサイエンス研究

## 重点研究報告書

### 第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

## 超機能性核酸類縁体（BNA）を用いたアンチセンス 医薬品の開発とその実践的応用

所 属 大阪大学大学院薬学研究科

研究者 今 西 武

### 分担研究者

大阪大学大学院薬学研究科 真弓忠範、土井健史、宮下和之、中川晋作、小比賀聡、堤康央

### 要旨

BNA オリゴヌクレオチドを用い、ルシフェラーゼ、PPAR、ICAM-1、c-myc 遺伝子に対するアンチセンス効果の評価、遺伝子切断分子の開発、膜融合リボソーム調整のための最適化、細胞内移行性シグナルペプチド-BNA-ODN コンジュゲート体の合成を行った。

### 1. 研究目的

生命のあらゆる情報を蓄積している遺伝子 DNA から mRNA が転写され、さらにそれが翻訳されて生体機能を司るタンパク質を合成するセントラルドグマの過程において、mRNA に対して相補的な短い核酸断片を導入することにより二重鎖を形成させ、タンパク質への翻訳過程を制御する方法がアンチセンス法である。タンパク質を標的とする医薬品では、個々の標的タンパク質に対する結合親和性を高めるために、個々の化合物の最適化が必要であるのに対して、アンチセンス法の特徴として、標的遺伝子の配列が分かれば、それに結合するアンチセンスオリゴヌクレオチドの配列が一義的に決定されることから、様々な疾病に対して同じ戦略の下に医薬品の開発が行えるという点が挙げられる。昨年、ドラフトレベルではあるもののヒトの全ゲノム配列が解析、発表されたことから、これから迎えるポストゲノム時代において本方法は、遺伝子レベルでの疾病治療法として、益々重要になってくるものと期待される。アンチセンス法に用いる核酸断片として、天然のオリゴヌクレオチド類は、生体内でヌクレアーゼにより速やかに分解され、また RNA に対する親和性も十分では無い等、様々な問題を抱えており実用的ではないことから、現在のところ、修飾核酸類縁体としてホスホロチオエート結合を有する S-オリゴがもっぱら用いられている。しかし、これにもタンパク質との非特異的結合等、問題点を残しているのが実情である。そのため世界中で、これら問題点を克服すべく、新規な核酸類縁体の開発研究が活発に行われている。我々もこれまでに新規なヌクレオシド類縁体として糖部コンホメーションを固定した BNA (Bridged Nucleic Acid)を創製し、これを導入したオリゴヌクレオチド (BNA-ODN) が生体内で優れた安定性、標的 mRNA に対する高い結合親和性を示すことを明らかにしてきた。BNA のアンチセンス分子としての優れた潜在的価値を活用し、実用的なアンチセンス医薬品として

発展させていくためには、BNA-ODN の検討課題としてそのアンチセンス効果の実証、さらには様々な疾病原因遺伝子への適応拡大があげられる。同時に重要な問題として、BNA-ODN の細胞内への効果的な導入がある。細胞膜は負に帯電した脂質二重膜からなっており、高分子量かつ負に帯電したオリゴヌクレオチド類は細胞膜を透過することは極めて困難である。このためオリゴヌクレオチド類を細胞内へ導入するためには、一般に培養細胞系においてはカチオン性リポソームやウイルスベクター等の遺伝子導入ベクターが用いられているが、様々な問題が残されているのが現状である。この問題に対する解決策として研究分担者の真弓らは、リポソーム表面にセンダイウイルスの膜融合タンパク質を付与したハイブリッド型膜融合リポソームの開発を行ってきており、これまでにリポソーム内に封入した遺伝子医薬品やタンパク質等の水溶性物質を効率良く細胞内に導入することに成功している。本膜融合リポソームを用いてアンチセンス BNA-ODN を細胞内に効率良く導入することができれば、この点についても解決できものと期待される。

今年度、我々は図に示すように、BNA-ODN の検討課題として、1) 各種標的遺伝子(細胞間接着因子 ICAM-1、がん関連遺伝子 c-myc, A-myb, B-myb、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 PPAR、ルシフェラーゼ) に対するアンチセンス BNA-ODN の合成と、まずルシフェラーゼ遺伝子を標的遺伝子として BNA-ODN のアンチセンス効果の実証を行う(分担研究者: 今西)。BNA-ODN の実践的適応拡大を最終目的として、2) 脂質代謝の制御、脂質細胞の分化、マクロファージの機能調節等の機能を有し、高脂血症や糖尿病に深く関わりのあるペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) を標的とした培養細胞系での評価系の確立(分担研究者: 土井)。3) 慢性関節リウマチ等炎症性疾患に関与していると考えられている細胞間接着分子 Inter Cellular Adherent Molecule-1 (ICAM-1) を標的とした培養細胞系での評価系の確立(分担研究者: 中川)。4) がん遺伝子として細胞増殖に働く c-myc を標的とした培養細胞系での評価系の確立を行う(分担研究者: 堤)。また、BNA-ODN のアンチセンス効果をより確実なものとするため、5) BNA-ODN に遺伝子切断機能分子を結合させることにより、標的 mRNA を切断することを最終目的として新たな遺伝子切断機能性分子の開

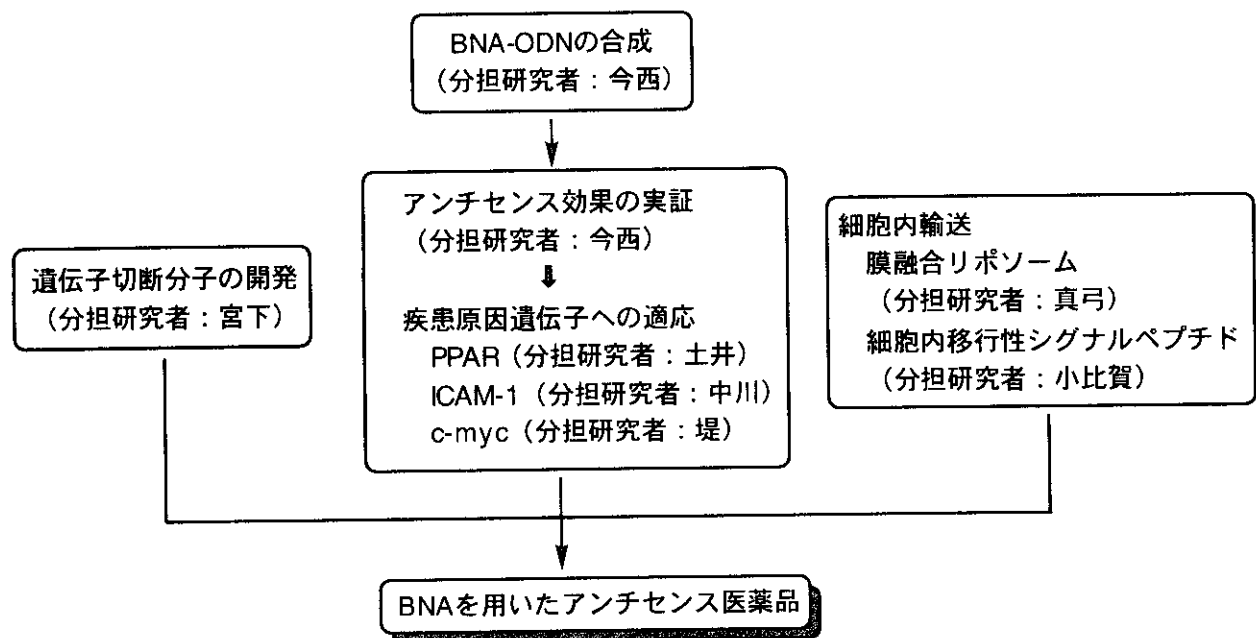


図 平成13年度研究計画

発研究を行う（分担研究者：宮下）。一方、細胞内へアンチセンス BNA-ODN を効率的に導入するための研究として、6) 膜融合リポソームを用い、アンチセンス分子の効率的導入と徐放化を行うことを最終目的として、まずアンチセンスオリゴヌクレオチドを封入するためのナノパーティクルをリポソームに封入するための最適条件の探索研究を行う（分担研究者：真弓）。7) また細胞内へのアンチセンス分子導入のための別法として細胞内移行性シグナルペプチドに着目し、オリゴヌクレオチドそのものに細胞膜透過機能を付与することを計画して、アンテナペディアペプチド-オリゴヌクレオチドコンジュゲート体の合成を行う（分担研究者：小比賀）。以上7項目を目的として研究を行った。

## 2. 研究方法

上記7項目について、それぞれ以下に概説する方法に従い研究を行った。

1) 我々が開発した BNA アミダイト体と天然の DNA アミダイト体を用い、DNA 合成機により各種標的遺伝子に対するアンチセンス BNA-ODN 数十種類の合成を行い、精製は逆相 HPLC により、構造確認は MALDI-TOF-MS 測定により行った。この内、ルシフェラーゼ遺伝子を標的としたアンチセンス BNA-ODN については、HepG2 細胞にホタルルシフェラーゼ遺伝子をコードしたプラスミドと、コントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子をコードしたプラスミドとともにトランスフェクションし、dual luciferase assay により天然型アンチセンス ODN、ホスホロチオエート型アンチセンス ODN との比較検討を行った。

2) 培養細胞としてヒト大腸癌由来細胞株 HT-29 を用い、核内受容体の内 PPAR $\gamma$ および RXR $\alpha$ を標的として、これら因子の発現により生じる機能について評価を行うため、レスポンスエレメントとして Acyl-CoA oxidase 遺伝子を含んだレポーター遺伝子を作成し、評価系を確立するとともに各種アンチセンスオリゴヌクレオチドを導入してそのアンチセンス効果の評価を試みた。

3) ヒトさい帯静脈血管内皮細胞 HUVEC を用いて、各種オリゴヌクレオチドを導入した後、TNF $\alpha$ 刺激を行い、発現した ICAM-1 および Vascular Cell Adherent Molecule-1 (VCAM-1) を、抗体を用いて定量することによりアンチセンス効果の評価を試みた。

4) HeLa 細胞を用いて c-myc に対する各種アンチセンスオリゴヌクレオチド (D-oligo, S-oligo, BNA-ODN) を導入し、2日後の生細胞数を指標としてアンチセンス効果の評価を行った。

5) 抗腫瘍性抗生物質アジノマイシンのアルキル化機能構造である 4-hydroxy-1-azabicyclo[3.1.0]hexane 構造に着目し、隣接水酸基の関与を仮定して新たなアルキル化機能構造として 3,4-epoxypiperidine を設計した。本仮説に基づいて、ピリジンを出発原料として各種誘導体の合成を行い、プラスミド pBR322 DNA の切断活性を指標として評価を行った。

6) 卵黄レシチン、コレステロール、フォスファチジン酸、ローダミン修飾ジアシルホスファチジルエタノールアミンから調整した脂質粉末をナノパーティクル溶液で水和することによりナノパーティクル封入リポソームを調整し、さらに紫外線照射により RNA を断片化したセンダイウイルスと処理することによりナノパーティクル封入膜融合リポソームを調整した。これを用い精製条件、性状の検討を行った。

7) 膜透過性ペプチドとしてその効果がある程度実証されているアンテナペディアペプチドに着目し、ジスルフィド結合により BNA-ODN に結合させることとし、N 末端に活性化システイン残基を有するアンテナペディアペプチド CRQIKIWFQNRMRMKWKK を合成した。オリゴヌクレオチドについては、研究項目1) の

ルシフェラーゼ発現系においてアンチセンス効果を認めた BNA-ODN を選択し、5'位末端にヘキサメチレンリンカーを介してチオール基を導入した分子を合成した。

### 3. 研究成果

上記7項目の研究に対して、以下に概説する研究成果を得た。

1) 各種標的遺伝子(細胞間接着因子 ICAM-1、がん関連遺伝子 c-myc, A-myb, B-myb、ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 PPAR、ルシフェラーゼ)に対するアンチセンス BNA-ODN の合成に成功した。融解温度(Tm)測定により相補鎖 RNA に対する親和性を評価したところ、BNA-ODN は対応する天然の ODN やホスホロチオエート型 ODN と比較してはるかに高い親和性を示すことが明かとなった。次にルシフェラーゼ遺伝子に対するアンチセンス効果を検討したところ、天然型の ODN では、発現抑制効果は全く見られなかった。ホスホロチオエート型 ODN の場合、強い発現抑制効果が見られたが、活性を示さないはずのランダム配列オリゴヌクレオチドや、標的とはなり得ないウミシイタケルシフェラーゼの発現も抑制していることが明らかになった。これに対して、BNA-ODN の場合、アンチセンス配列を有するオリゴヌクレオチドにおいて特異的に発現抑制効果が見られるだけでなく、ウミシイタケルシフェラーゼの発現も抑制することはなかった。この結果から、BNA 修飾を施したオリゴヌクレオチドにおいて見られた遺伝子発現抑制効果は配列特異的で、アンチセンス効果によることが実証された。

2) ヒト大腸菌由来細胞株 HT-29 を用いることにより、内在性の PPAR $\gamma$ 及び RXR $\alpha$ の発現量の変化が検出可能で、さらに PPAR レスポンスエレメントである Acyl-CoA oxidase 遺伝子配列を併せて用いることにより、PPAR $\gamma$ 及び RXR $\alpha$ の発現量の変化に伴う機能発現の評価が可能であることがわかった。さらにこの ACO 配列をエンハンサーエレメントとして、その遺伝子発現を特異的に検出し、ルシフェラーゼを発現するレポータープラスミドの構築にも成功し、PPAR に対するアンチセンス効果の評価系を構築した。本評価系を用いてアンチセンス BNA-ODN の評価を行ったところ、今回用いたスクランブル配列においても若干抑制効果が見られたが、BNA-ODN のアンチセンス効果を示唆する結果が得られた。

3) ICAM-1 のアンチセンスとしてすでに確立されている ISIS2302 を用いて評価を行ったところ、ISIS2302 により濃度依存的に TNF $\alpha$ 刺激による ICAM-1 の発現量は抑制されるのに対し、VCAM-1 の発現量は抑制されず、本評価系により ISIS2302 のアンチセンス効果が明確に示された。そこで BNA-ODN を本評価系に適応したところ、同様にそのアンチセンス効果が示され、また BNA 修飾を施す位置及び数により ICAM-1 発現抑制効果にも差があることが確認された。

4) アンチセンスオリゴヌクレオチドとして用いた類縁体の内、D-oligo および BNA-ODN において明確なアンチセンス効果が観察された。一方、S-oligo においては、アンチセンス配列だけではなくセンス配列、スクランブル配列においても容量依存的に細胞増殖が抑制されたことから、非特異的な作用であることが示された。

5) ピリジンを出発原料として各種 3,4-epoxypiperidine 類の短行程かつ効率的合成方法の確率に成功した。プラスミド DNA の切断活性を検討したところ、予想通り切断活性を示すことが明かとなり、各種誘導体を用いて構造と活性の相関について検討を加えた結果、光学異性体間においては、それほど大きな活性の差は認められず、1) エポキシド構造、2) ピペリジン環の無置換アミノ窒素原子、3) 5位アルコキシ基部分に芳

香環の存在がそれぞれ必須であり、4) エポキシド構造とアルコキシ基の相対立体化学は trans 配置が重要であることが示された。

6) 空のリポソーム (d=1.02) とナノパーティクル (d=1.12) の密度差を利用し、ナノパーティクル封入りリポソームをステップシヨ糖密度勾配遠心分離により精製することに成功した。精製したナノパーティクル封入りリポソームについては、密度、粒子径、表面電荷により確認し、透過型電子顕微鏡により直径 800 nm のリポソーム内水相に、粒子径 500 nm のナノパーティクルが封入されていることが視覚的にも確認された。さらにセンダイウイルスとの膜融合リポソームについても同様にステップシヨ糖密度勾配遠心分離条件下に精製を行い、透過型電子顕微鏡で観察したところ、この場合、リポソーム表面にセンダイウイルス膜融合タンパク質由来のスパイク状構造が確認され、粒子径、表面電荷測定等によりナノパーティクルを封入した膜融合リポソームであることが確認された。

7) N 末端に活性化システイン残基を有するアンテナペディアペプチド CRQIKIWFQNRMMKWKK と 5' 位末端にヘキサメチレンリンカーを介してチオール基を有する BNA-ODN より、ジスルフィド結合により結合したコンジュゲート体を全収率 39.3% で合成することに成功した。得られたコンジュゲート体の構造については、紫外線吸収スペクトル、MALDI-TOF-MASS 測定により、また、DTT 処理によりそれぞれペプチド由来およびオリゴヌクレオチド由来の分子イオンピークを与えることから確認した。

#### 4. 考察

研究項目 1) の結果から、BNA 修飾オリゴヌクレオチドが、標的となる相補鎖 RNA に対して極めて高い結合親和性と配列認識能を有していることが示され、ホスホロチオエート型 ODN の効果は配列非特異的なもの（非アンチセンス効果）であるのに対して、BNA-ODN の抑制効果は配列特異的でありアンチセンス分子として非常に有効であることが明かとなった。この研究と平行して、研究項目 2) ~ 4) においては、いずれも各種疾病に対するアンチセンス評価系を確立し、BNA-ODN の実践的アンチセンス分子としての応用を計ったものである。研究項目 2) では、ヒト大腸菌由来細胞株 HT-29 を用い、PPAR $\gamma$  に対するアンチセンス効果評価系の構築を、研究項目 3) では ICAM-1 に対してすでにアンチセンス効果が報告されている ISIS2302 を基に評価系を構築し、研究項目 4) においては HeLa 細胞を用い c-myc に対する評価系の確立をそれぞれ行った。BNA-ODN のアンチセンス効果は、いずれの系においても観察されたが、例えば PPAR $\gamma$  を標的とする場合のように未だ不十分なものもあることから、この点については評価系のさらなる最適化、アンチセンスオリゴヌクレオチドの標的配列の最適化、BNA 修飾の数、位置等についてさらなる検討も必要と考えられる。

一方、負の電荷を持ったアンチセンスオリゴヌクレオチドを、細胞膜を通過させ、効率的に細胞内へ導入することは、アンチセンス分子を実践的な医薬品として応用するうえにおいて不可欠なことであるが、そのための方法として、研究項目 6) の膜融合リポソームを用いる方法については、まず第一段階としてナノパーティクルの膜融合リポソームへの内封条件の最適化、精製、さらにその構造の確認を行った。最終的にはこのナノパーティクル粒子内に BNA-ODN をさらに内包させ、その輸送に用いる予定である。また研究項目 7) に述べた細胞内移行シグナルペプチドを用いる方法としては、細胞内での開裂を期待してアンテナペディアペプチドと BNA-ODN をジスルフィド結合により結合させたコンジュゲート体を合成し、マスペクト

ルを始めとする各種スペクトルによりその構造を確認した。

研究項目5)では、アンチセンス効果をより確実なものとするため、アジノマイシンを基に遺伝子切断分子の設計を行い、DNA切断活性を見い出すとともに、構造と活性の相関についても興味深い知見が得られたが、その切断機構の詳細については、さらなる検討が必要と考えられる。

## 5. まとめ

BNA修飾オリゴヌクレオチドのアンチセンス効果については、ルシフェラーゼ遺伝子を標的遺伝子とした系によりその効果を実証することができた。さらに各種疾病への実践的応用を最終目的として、今回、培養細胞系でPPAR、ICAM-1、c-myc遺伝子に対するアンチセンス効果評価系についても確立し、その結果、BNA-ODNのアンチセンス効果は、これら評価系においても程度の差はあるものの、いずれの場合も認められ、その有効性が示された。同時にBNA修飾の位置、修飾の数によってもアンチセンス効果に差が見られることも明らかとなったことから、アンチセンス効果をより高めるためには、これらの点について最適化を行う必要があるものと考えられる。一方、アンチセンスBNA-ODNの細胞内への効率的な導入に関しては、膜融合リポソーム法と細胞内以降シグナルペプチドを用いる方法について検討を行い、膜融合リポソームを用いる方法については、これまで水溶性化合物をリポソームへ内包し細胞内へ移行させるのに成功していたが、今回、粒子系500nm程度のナノパーティクルもリポソーム内へ取り込ませることに成功した。今後は、ナノパーティクルに実際にオリゴヌクレオチド類を封入し、細胞内への取込み効率と、その徐放化について検討していく予定である。また細胞内移行性シグナルペプチドを用いる方法としては、ルシフェラーゼ遺伝子を標的とするアンチセンスBNA-ODNとアンテナペディアペプチドとのコンジュゲート体の合成に成功した。今後、その機能評価を行っていく予定である。なお先の各種疾病原因遺伝子に対するアンチセンス効果を評価する実験において、各種オリゴヌクレオチド類の細胞内への導入は、今のところlipofectAMINE等、市販のカチオン性リポソームを用いているが、最終的には我々の膜融合リポソームを用いる方法、あるいは細胞内移行性シグナルペプチドとのコンジュゲート体を用いる方法を適応する予定である。また、BNA-ODNのアンチセンス効果をより確実なものとするため、標的mRNAを切断することを考え、新たな遺伝子切断分子の開発にも着手し、非常に単純な構造を有する新規DNA切断分子を見出したが、今後はこの分子の特性を生かし、トリガー機能の付与、BNA-ODNとのコンジュゲート体の合成へと展開し、より強力なアンチセンス分子の創製へとつなげていきたいと考えている。

## 6. 研究発表

- 1) Obika, S., Morio, K., Nanbu, D., Hari, Y., Itoh, H. & Imanishi, T. Synthesis and conformation of 3',4'-BNA monomers, 3'-O,4'-C-methylenribonucleosides. *Tetrahedron*, in press.
- 2) Hari, Y., Obika, S., Sakaki, M., Morio, K., Yamagata, Y. & Imanishi, T. Effective synthesis of C-nucleosides with 2',4'-BNA modification. *Tetrahedron*, in press.
- 3) Imanishi, T. & Obika, S. BNAs: Novel nucleic acid analogs with a bridged sugar moiety. *Chem. Commun.*, in press.
- 4) Miyashita, K., Park, M., Adachi, S., Seki, S., Obika, S. & Imanishi, T. A 3,4-epoxypiperidine structure as a novel

and simple DNA-cleavage unit. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, in press.

5) Kunisawa, J., Nakagawa, S. & Mayumi, T. Pharmacotherapy by Intracellular Delivery of Drugs Using Fusogenic Liposomes: Application to Vaccine Development *Adv. Drug Del. Rev.*, 52, 177-186, 2001.

7. 知的所有権の取得状況

該当なし



---

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究  
重点研究報告書

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

平成14年9月10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