

## 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、中川 晋作、宮下 和之

### 要旨

新たな超機能性核酸類縁体の合成、遺伝子切断分子の開発、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、膜融合リボソーム調整のための最適化及び BNA オリゴヌクレオチドを用いるシフェラーゼ、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。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挙げられる。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 (ODN) 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 ODN 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ボ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、リボ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ボソームの開発を行ってきており、これまでにリボ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。従って、本膜融合リボソームを用いてアンチセンス BNA-ODN、さらにはアンチセンス BNA-ODN を吸着させた徐放化ナノ粒子を細胞内に効率良く導入することができれば、これまでの問題点が解決出来る上、さらに細胞質内でのアンチセンス BNA-ODN 濃度の制御が可能となり、効果的なアンチセンス効果が得られるものと期待される。

本研究は、超機能性核酸類縁体 BNA を基軸とし、膜融合リボソームによる細胞内導入技術を組み合わせアンチセンス医薬品への応用のための周辺基礎技術の確立、及び培養細胞レベルでの標的遺伝子に対するア

ンチセンス効果、さらにはモデル動物系での検討による実践的技術の確立を行い、アンチセンス医薬品の開発を目指すことを目的とするもので、平成13年度、14年度は、以下の項目について研究を行った。

#### 1) 超機能性核酸類縁体周辺基礎研究

1-1) 超機能性核酸類縁体 BNA の改良：BNA を基に酵素耐性、相補鎖認識能のより高い新規 BNA 類縁体の開発

1-2) 新規遺伝子切断分子の開発：遺伝子切断分子と BNA-ODN との複合体を形成させることにより高配列選択的遺伝子切断分子を創製し、アンチセンス効果をより確実なものとする。

#### 2) アンチセンス分子 (BNA-ODN) の細胞内輸送、徐放化システムの確立に関する研究

2-1) 細胞内移行性シグナルペプチドと BNA-ODN のコンジュゲート体を合成し細胞内移行能を検討する。

2-2) 細胞内薬物徐放化ナノ粒子の細胞質内導入を目指し、モデルナノ粒子を用いて膜融合リポソームへの封入条件を確立すると共に細胞内導入特性について評価し、アンチセンス分子を細胞内で徐放化させるための方法論を確立する。

#### 3) BNA-ODN のアンチセンス効果評価系の確立及びそれを利用したアンチセンス効果の検討

3-1) 各種標的遺伝子 (ルシフェラーゼ、細胞間接着因子 ICAM-1、癌関連遺伝子 c-myc, A-myb, B-myb, ペルオキシソーム増殖応答性受容体 PPAR) に対するアンチセンス BNA-ODN の合成方法を確立する。

3-2) ルシフェラーゼを標的遺伝子として培養細胞系における評価系を確立し、BNA-ODN のアンチセンス効果の実証を行う。

3-3) 癌遺伝子として細胞増殖に働く c-myc を標的とした BNA-ODN のアンチセンス効果の評価。

3-4) 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 Inter Cellular Adherent Molecule-1 (ICAM-1) を標的とした BNA-ODN のアンチセンス効果の評価。

3-5) ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) には3種のアイソフォーム ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) が知られているが、脂肪細胞において過剰発現することによりインスリン抵抗性糖尿病を招くと考えられている PPAR  $\gamma$  に着目し、BNA-ODN を用い糖尿病治療薬としてアンチセンス医薬品開発を目指す。

## 2. 研究方法

上記研究項目1)～3)について、以下に概略する方法に従って行った。

1-1) 新しい核酸類縁体として BNA の構造を基に、BNA と同じ骨格を持ちオリゴマー導入時にリン酸ジエステルにかわりホスホロアミダイト結合を形成させることを考えて 5'-amino-2',4'-BNA を、また BNA がメチレン架橋により糖部コンホメーションが N 型に固定されているのに対して、メチレン架橋をより立体的に嵩高いメチレンオキシメチレン架橋に代えた 2',4'-BNA<sup>COO</sup> をそれぞれ設計し、その合成について検討を行うとともに、それぞれのオリゴマーも合わせて合成し、アンチセンス分子としての機能評価 (酵素耐性、ハイブリッド形成能) を行った。

1-2) 抗腫瘍性抗生物質アジノマイシンの DNA 修飾構造単位を基に、新たな DNA アルキル化候補化合物として 3,4-エポキシピペリジンを設計・合成し、プラスミド pBR 322 DNA 切断活性について検討を行った。また各種類縁体をもちいて構造活性相関を明らかにした。この結果を基に光により DNA 切断活性を誘起する光トリガー機能を持つ化合物を新たに設計・合成しその機能評価を行うとともに、3,4-エポキシピペリジンとオリゴヌクレオチドとの複合体の合成についても検討した。

2-1) 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 CRQIKIWFQNRMMKWKK を合成した。オリゴヌクレオチドについては、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調整し、アンテナペディアペプチドとのコンジュゲート体を合成した。

2-2) 徐放化ナノ粒子のモデルとしてスチレンナノパーティクルを用い、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 (凍結乾燥空リポソーム法) に水和させることによりナノパーティクル封入りポソームを調整し、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。さらに LLCMK2 細胞、HeLa 細胞、HL60 細胞、HUVEC 細胞及び DC2.4 細胞を用い、細胞への導入効率、特性、メカニズムについて詳細に検討を加えた。

3-1) 我々が合成経路を確立した BNA アミダイト体と天然 DNA アミダイト体を用い、アミダイト法により DNA 合成機を用いて各種標的遺伝子に対する BNA-ODN 数十種類の合成を行った。精製は逆相 HPLC により行い、構造確認は MALDI-TOF-MS により行った。

3-2) 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 ODN、S-オリゴとの比較検討を行った。

3-3) 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-オリゴ、S-オリゴ、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。

3-4) ヒトさい帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて各種アンチセンスオリゴヌクレオチドを導入した後、TNF $\alpha$  刺激し、発現した接着分子 ICAM-1 及び Vascular Cell Adherent Molecule-1 (VCAM-1) の発現量を、抗体を用いて定量することによりアンチセンス効果の検討を行った。

3-5) 核内受容体 PPAR $\gamma$  及び RXR $\alpha$  を標的として、ヒト大腸癌由来細胞 HT-29、HCT116、ヒト単球系細胞 THP-1 を用い、タンパク質発現量についてはウエスタンブロット法により、発現により生じる機能については、レスポンスエレメントを組み込んだレポーター遺伝子を作成、導入し、アンチセンス効果をタンパク質発現量と機能の両面から評価を行った。

### 3. 研究成果

上記研究項目 1) ~ 3) について、以下の研究成果を得た。

1-1) 5'-Amino-2',4'-BNA の合成は、BNA 合成の中間体より効率的に合成することに成功した。また 5'-amino-2',4'-BNA 修飾オリゴマーは常法のアミダイト法により合成した。修飾オリゴマーについてアンチセンス分子としての特性を評価した結果、一般に BNA 構造を持たず P3'→N5'ホスホロアミダイト結合からなるオリゴマーの二重鎖形成能は、相補的 ssDNA、ssRNA に対して天然型オリゴマーより低下するのに対して、5'-amino-2',4'-BNA 修飾オリゴマーの場合、いずれに対しても上昇することが明らかになった。また酵素耐性について蛇毒ホスホジエステラーゼを用いて検討したところ、2',4'-BNA 修飾オリゴマーより安定であることが分かった。

BNA<sup>COC</sup> の合成は、BNA 合成の中間体より各種塩基を有する BNA<sup>COC</sup> 誘導体を効率的に合成することに成功した。また X 線結晶構造解析、NMR の解析結果から、予想通り典型的な N 型 (C3'-endo) コンホメーションを取っていることが明かとなった。オリゴマーへの組み込みは常法通りアミダイト法を用い、カップリング時間を長くすることにより収率よく達成された。BNA<sup>COC</sup> を組み込んだオリゴマーのアンチセンス・アンチジーン分子としての機能評価を行った結果、その二重鎖形成能は RNA 選択的であることが示された。一方、三重鎖形成能については、導入する BNA<sup>COC</sup> の位置や数に依存することが分かった。また蛇毒ホスホジエステラーゼに対しても高い酵素耐性を有しており、3'-末端にホスホロチオアート結合を有するオリゴマーと同程度の安定性が見られた。

1-2) 設計した 3,4-エポキシピペリジンが DNA 切断活性を有することを明らかにするとともに、各種誘導体を用いて構造活性相関について検討した結果、エポキシド構造と芳香環の存在、及びピペリジン環窒素原子が無保護であることが、DNA 切断活性を示す上で必須であることが明らかになった。またこの結果を基に窒素保護基として光感受性保護基を用いることにより、光に反応して DNA 切断機能を示す DNA 切断分子の開発に成功した。また配列選択的 DNA 切断を目指して ODN と 3,4-エポキシピペリジンとのコンジュゲート体の合成についても検討し、その合成に成功した。

2-1) 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 CRQIKIWFQNRRMKWKK 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及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。

2-2) 凍結乾燥空リポソーム法を用いることにより、リポソーム内に粒子系 500 nm のナノパーティクルを封入することに成功するとともに、ショ糖密度勾配遠心法を利用することによりナノパーティクルが封入されたリポソーム分画を完全に精製することに成功した。さらにセンダイウイルスとの融合についても検討し、透過型電子顕微鏡、表面電荷により膜融合リポソームが生成していることを確認した。また導入キャリアーとしての有用性を評価したところ、細胞障害性を全く示すことなく、94% の細胞において平均 10 個のナノパーティクル導入が認められ、さらに 26 個以上導入されている細胞群も 5% 以上見られた。また細胞の種類 (接着細胞、浮遊細胞、貪食細胞等) に関わらず 90% 以上の高い割合で導入された。また、本膜融合リポソームによる細胞内粒子導入は、エンドサイトーシスを介した経路では無く、細胞膜との融合により細胞質内に直接導入されていることを明らかにした。以上の結果から、本システムは、アンチセンス分子を細胞質内で徐放させる為の徐放化ナノ粒子を細胞質内へ導入する有効な技術になると示唆された。

3-1) 各種標的遺伝子（ルシフェラーゼ、細胞間接着因子 ICAM-1、癌関連遺伝子 c-myc, A-myb, B-myb、ペルオキシソーム増殖応答性受容体 PPAR）に対するアンチセンス BNA-ODN の合成に成功した。標的 RNA に対する親和性を融解温度（Tm）を指標に行ったところ、BNA-ODN は対応する天然 ODN や S-オリゴと比較してはるかに高い親和性を示すことが明らかになった。

3-2) ルシフェラーゼ遺伝子に対するアンチセンス効果は、天然型 ODN では発現抑制が全く見られなかった。S-オリゴでは強い発現抑制が見られたが、活性を示さないはずのランダム配列や、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えられたことから、非選択的なものであることが明らかになった。これに対して BNA-ODN はアンチセンス配列を有する ODN において特異的であるだけでなく、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く、アンチセンス効果によることが実証された。

3-3) c-myc に対する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 及び 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。

3-4) 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、ISIS2302 と同等のアンチセンス効果が示された。さらに、BNA 修飾を施す位置及び数により ICAM-1 発現抑制効果に差があることが確認されたことから、これらを最適化することにより ISIS2302 を上回る効果が得られる可能性が示唆された。

3-5) ヒト大腸菌由来細胞株 HT-29 を用いれば、内在性の PPAR $\gamma$  及び RXR $\alpha$  の発現の変化が検出可能であり、さらに PPAR response element である ACO 配列を併せて用いることにより、PPAR $\gamma$  及び RXR $\alpha$  の発現変化に伴う、これらの機能発現の評価が可能であることがわかった。ACO をエンハンサーエレメントとして持つレポータープラスミド PGV-B-ACO-Frag-E ベクターを構築し、BNA-ODN のアンチセンス効果を調べたところ、さらなる改善が必要なものの、アンチセンス効果を示す傾向が観察された。また HT-29 及び HCT116 を用いることにより PPAR $\gamma$  の発現量変化が検出可能であり、アンチセンス効果の評価系となることが判明した。

#### 4. 考察・まとめ

超機能性核酸類縁体 BNA の改良型モデル化合物 5'-amino-2',4'-BNA、BNA<sup>COC</sup> による修飾オリゴマーは酵素耐性に優れ、新たなアンチセンス分子候補化合物として有望であることが明らかになった。今後はオリゴマーを用いてアンチセンス効果を評価していく予定である。また光トリガー機能を有する DNA 切断分子については、今後、DNA との複合体を用いて配列選択的 DNA 切断分子としての可能性について検討する必要があるものと考えている。

一方、BNA-ODN はその合成法を確立し、各種遺伝子に対するアンチセンス効果を評価するための安定した供給が可能となり、また培養細胞系におけるルシフェラーゼ遺伝子を標的とした実験からその効果が実証された。各種疾病遺伝子（c-myc, ICAM-1, PPAR $\gamma$ ）を標的としたアンチセンス評価の結果から、c-myc に関しては ODN 中の CpG 配列に基づくアポトーシス誘導も考えられるが、いずれの標的遺伝子に対してもその有効性が示された。さらに安定かつ強力なアンチセンス効果を得るためには、やはり細胞内への効率的な輸送が重要な鍵になるものと考えられるが、この点についても細胞内移行性シグナルペプチドである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他、膜融合リポソームを用いる方法についてもナノパーティクルを用いて詳細に検討した。特に後者の方法については、細胞の種類を問わず、また細胞に障害を与えることなく迅速にナノパーティクルを細胞内へ輸送できたことから、アンチセンス分子を細胞質内で徐放させるシステムとしての応用が期待され、今後、アンチセンス評価系へ応用して行くことを計画している。いずれにおいても培養細胞系での BNA 修飾の数や位置等、さらなる検討は必要ではあるが評価系はほぼ確立し、今後、膜融合リポソームの適応を経て動物実験へとつなげていく予定である。

#### 5. 研究発表

- 1) 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).
- 2) Kunisawa J., Nakanishi T., Takahashi I., Okudaira A., Tsutsumi Y., Katayama K., Nakagawa S., Kiyono H., Mayumi T. Sendai virus fusion protein-mediates simultaneous induction of MHC class I/II-dependent mucosal

- and systemic immune responses via the nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue immune system. *J. Immunol.*, **167**, 1406-1412 (2001).
- 3) Huang, Y., Uchiyama, Y., Fujimura, T., Kanamori, H., Doi, T., Takamizawa, A., Hamakubo, T., & Kodama, T. A human hepatoma cell line expressing hepatitis C virus nonstructural proteins tightly regulated by tetracycline. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **281**, 732-740 (2001).
  - 4) Nakamura, T., Hinagata, J.-i., Tanaka, T., Imanishi, T., Wada, Y., Kodama, T., & Doi, T. HSP90, HSP70, and GAPDH directly interact with the cytoplasmic domain of macrophage scavenger receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **290**, 858-864 (2002).
  - 5) Uchida, M., Hino, N., Yamanaka, T., Ukushima, H., Imanishi, T., Uchiyama, Y., Kodama, T., & Doi, T. Hepatitis C virus core protein binds to a C-terminal region of NS5B RNA polymerase. *Hepatology Res.*, **22**, 297-306 (2002).
  - 6) Yamanaka, T., Uchida, M., & Doi, T. Innate form of HCV core protein plays an important role in the localization and the function of HCV core protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **294**, 521-527 (2002).
  - 7) Yamanaka, T., Kodama, T., & Doi, T. Subcellular localization of HCV core protein regulates its ability for p53 activation and p21 suppression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **294**, 528-534 (2002).
  - 8) Uchiyama, Y., Huang, Y., Kanamori, H., Uchida, M., Doi, T., Akihisa Takamizawa, A., Hamakubo, T., & Kodama, T. Measurement of HCV RdRp activity with C-terminal 21 aa truncated NS5b protein: optimization of assay. *Hepatology Res.*, **23**, 90-97 (2002).
  - 9) Ball Jr., A. R., Schmiesing, J. A., Zhou, C., Gregson, H. C., Okada, Y., Doi, T., & Yokomori, K. Identification of a chromosome-targeting domain in the human condensin subunit CNAP1/hCAP-D2/Eg7. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 5769-5781 (2002)
  - 10) Tanaka, T., Takeno, T., Watanabe, Y., Uchiyama, Y., Murakami, T., Yamashita, H., Suzuki, A., Aoi, R., Iwanari, H., Jiang, S.-Y., Naito, M., Tachibana, K., Doi, T., Shulman, A. I., Mangelsdorf, D. J., Reiter, R., Auwerx, J., Hamakubo, T., & Kodama, T. The generation of monoclonal antibodies against human peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs). *J. Atheros. Throm.*, **9**, 233-242 (2002).
  - 11) 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*, **58**, 3039-3049 (2002).
  - 12) Hari, Y., Obika, S., Sakaki, M., Morio, K., Yamagata, Y. & Imanishi, T. Effective synthesis of C-nucleosides with 2',4'-BNA modification. *Tetrahedron*, **58**, 3051-3063 (2002).
  - 13) Imanishi, T. & Obika, S. BNAs: Novel nucleic acid analogs with a bridged sugar moiety. *Chem. Commun.*, 1653-1659, (2002).
  - 14) 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.*, **12**, 1075-1077 (2002).
  - 15) Morita, K., Hasegawa, C., Kaneko, M., Tsutsumi, S., Sone, J., Ishikawa, T., Imanishi, T. & Koizumi, M. 2'-O,4'-C-Ethylene-bridged nucleic acids (ENA): Highly nuclease-resistant and thermodynamically stable oligonucleotides for antisense drug. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 73-76 (2002).
  - 16) Obika, S., Sekiguchi, M., Osaki, T., Shibata, N., Masaki, M., Hari, Y. & Imanishi, T. Synthesis and conformation of a novel bridged nucleoside with S-type sugar puckering, *trans*-3',4'-BNA monomer. *Tetrahedron Lett.*, **43**, 4365-4368 (2002).
  - 17) Uekusa, Y., Yu, W.-G., Mukai, T., Gao, P., Yamaguchi, N., Murai, M., Matsushima, K., Obika, S., Imanishi, T., Higashibata, Y., Nomura, S., Kitamura, Y., Fujiwara, H. & Hamaoka, T. A pivotal role for CC chemokine receptor 5 in T-cell migration to tumor sites induced by interleukin 12 treatment in tumor-bearing mice. *Cancer Research*, **62**, 3751-3758 (2002).
  - 18) Obika, S., Nakagawa, O., Hiroto, A., Yoshiyuki Hari, Y. & Imanishi, T. Synthesis and properties of 5'-amino-2',4'-BNA modified oligonucleotides with P3'→N5' phosphoramidate linkages. *Nucleic Acids Res. Suppl. No.2*, 25-26 (2002).
  - 19) Hari, Y., Osaki, T., Eguchi, K., Obika, S. & Imanishi, T. Synthesis and properties of oligonucleotides containing novel 2',4'-BNA analogues (2',4'-BNA<sup>CO</sup>). *Nucleic Acids Res. Suppl. No.2*, 147-148 (2002).
  - 20) Torigoe, H., Hari, Y., Obika, S. & Imanishi, T. Triplex formation involving 2',4'-BNA with isoquinolone base analogue: Efficient and selective recognition of C:G interruption. *Nucleic Acids Res. Suppl. No.2*, 183-184 (2002).
  - 21) Obika, S., Hari, Y., Sekiguchi, M. & Imanishi, T., Stable oligonucleotide-directed triplex formation at target sites with CG interruptions: Strong sequence-specific recognition by 2',4'-bridged nucleic-acid-containing 2-pyridones under physiological conditions. *Chem. Eur. J.*, **8**, 4796-4802 (2002).
  - 22) Obika, S., Hari, Y., Sekiguchi, M. & Imanishi, T., A 2',4'-Bridged nucleic acid containing 2-pyridone as a nucleobase: Efficient recognition of a C:G interruption by triplex formation with pyrimidine motif. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **40**, 2079-2081 (2001).

6. 知的所有権の取得状況  
該当無し