

平成15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

目 次

課題番号

KH11001

ハイスループットスクリーニングを指向した細胞機能解析法の
開発研究

川西 徹 …… 1

KH11002

ゲノム創薬を支援する高感度分析・解析技術の開発・応用に関
する研究

今井一洋 …… 11

KH11003

疾患モデル動物の開発および保存のための高度発生工学技術の
確立

小倉淳郎 …… 19

KH11004

トランスジェニックラットの作成とその公共利用のための胚バ
ンクの検討

小林英司 …… 25

KH11005

癌細胞の標的化を可能にするベクターの開発；単クローン抗体
からペプチドへの展開

石坂幸人 …… 32

KH11006

遺伝子改変動物をもちいたGタンパク質共役型受容体の機能解
析

田上昭人 …… 37

KH11007

新しい白血球の機能制御手法を適用したガン細胞の浸潤・転移
抑制方法の開発研究

鈴木和博 …… 53

KH11008

多剤耐性結核の診断と創薬探索技術としてのゲノム解析に関す
る研究

切替照雄 …… 65

KH12079

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

今西 武 …… 78

KH12084

コンディショナルノックインによる受容体機能変換マウス作成
と情報伝達機構の解析

笹岡俊邦 …… 82

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、小比賀 聡

研究要旨 新たな超機能性核酸類縁体 5'-amino-2',4'-BNA、2',4'-BNA^{COC} の合成と機能評価、遺伝子切断活性天然物スピロキシン C の全合成、膜融合リポソームを用いたナノスフェアからのオリゴヌクレオチドの徐法化、および PPAR γ を標的とする BNA-ODN の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。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チ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と細胞質内でのアンチセンス BNA-ODN 濃度の制御が挙げられる。

我々はこれら問題点を克服し、BNA を用いたアンチセンス医薬品の開発を目指して本研究に着手し、これまでの研究成果として、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を可能とするとともに、各種培養細胞系における実験からその効果を実証してきた。同時に BNA を越える新規人工核酸の開発、アンチセンス効果をより確実なものとするための DNA 切断機能性分子の開発も行い成果を挙げてきた。一方、アンチセンス分子の細胞内導入に関しては、細胞内移行シグナルペプチドとのコンジュゲート化や膜融合リポソームを用いる方法を検討し、特に後者の方法においては、膜融合リポソームを用いることで殆ど全ての動物細胞に対して、マイクロマニピュレーター等を用いることなく、直径 500nm 以下のナノ粒子を一挙かつ大量に、多数の細胞 (使用した細胞の 95%以上) の細胞質内へ導入できることを明らかにした。

今年度はこれまでの成果をふまえ、以下の項目についてさらに重点的に研究を行った。

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 類縁体を開発する。

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効率かつ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を旨とし、新規光トリガー DNA 切断分子として 3,4-エポキシピペリジン誘導体をこれまでに見出したが、天然物由来 DNA 切断活性化化合物をリードとしてより高活性な化合物を創製する。

3) アンチセンス分子 (BNA-ODN) 徐放化システムの確立に関する研究

アンチセンス核酸などの機能性核酸を用いた次世代の遺伝子治療の最適化を目指し、細胞内での薬物動態を時間的・空間的に制御出来る次世代型 DDS 製剤としての細胞内徐放システムの開発を目指す。今回の研究では、徐放性ナノ粒子にアンチセンス核酸を吸着させ、膜融合リポソームを用いて細胞質内へ導入し、細胞内でのアンチセンス核酸を徐放させるシステムの確立を試みた。

4) BNA-ODN のアンチセンス医薬品に向けた検討

ペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) は、細胞小器官ペルオキシソームの機能調節に関係する核内受容体として報告されたが、種々のエイコサノイドや合成抗高脂血症薬、抗糖尿病薬などがリガンドとして同定されたことから、脂質代謝の制御、脂肪細胞の分化に深く関与することが明らかになった。また、末梢マクロファージにおいてコレステロール逆転送系を活性化することから動脈硬化にも関与するなど、様々な機能を有しており、近年、非常に注目を集めている。

本研究では、病態と深く関わっている PPAR を、アンチセンス医薬品開発の標的の一つと考え、超機能性核酸類縁体 (BNA) を用いた発現抑制効果、機能抑制効果を評価し、実践へのこれらの応用を最終目的として研究を行った。

1. 研究方法

上記研究項目 1) ~ 4) について、以下に概略する方法に従って行った。

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ー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^{COC} 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。

2) 新規 DNA 切断活性分子として海産物由来抗腫瘍性天然物スピロキシン類に着目した。本化合物はチオール類存在下において二重鎖 DNA の 1 本を切断することが知られているが、そのメカニズムの詳細についてはわかっていない。スピロキシン類をリード化合物として各種誘導体を含めた天然物を合成し機構解明ならびに新たな DNA 切断構造ユニット創製を目指し、一般合成経路を確立するためスピロキシンの全合成研究を行った。

3) 徐放性ナノ粒子として、ポリビニルアミンナノスフェア (以降、ナノスフェアと略) を作製した。本ナノスフェアに FITC 標識オリゴヌクレオチドを静電的に吸着させ、膜融合リポソームを用いて細胞内へ導入した。細胞内に導入されたナノスフェアからのオリゴヌクレオチドの遊離は、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

4) 標的遺伝子としては、肥満、糖尿病、動脈硬化症などいわゆる生活習慣病の発症に関与している PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ) を選び、この発現を調べた。

はじめに、ヒト大腸癌由来 HCT116 細胞は内在的に PPAR γ を発現しており、この細胞における発現抑制を検討した。

次に、ヒト単球由来 THP-1 細胞はフォルボールエステルによりマクロファージに分化することが知られているが、これに伴い PPAR γ の発現が誘導される。この分化の誘導に伴う内在性 PPAR γ の発現抑制をアンチセンス法により検討した。

PPAR γ 遺伝子には多くのエキソンが存在し、転写開始部位の違い、スプライシングの違いにより、3 種類の mRNA ($\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) が作られることが知られている (タンパク質に関しては、 $\gamma 1$ と $\gamma 3$ は同じであるが、 $\gamma 2$ はこれらに比べ N 末端側が少し長い)。そこで、いずれの mRNA にも共通に存在する配列に対するアンチセンス分子を用いた。

いずれの細胞の場合も、リポフェクトアミンを用いて DNA を導入した。

HCT116 細胞に関しては 2 μ M の濃度で DNA を導入し、48 時間後に細胞を回収し、PPAR γ の発現を RT-PCR 法により調べた。一方、THP-1 細胞については、1 μ M の濃度でアンチセンス分子を導入すると同時にフォルボールエステルで分化を誘導し、24 時間後に細胞を回収し、PPAR γ の発現を RT-PCR 法により調べた。

1. 研究成果

上記研究項目 1) ~ 4) について、以下の研究成果を得た。

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'ホスホロアミダー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^{COC}の合成は、BNA 合成の中間体より各種塩基を有する BNA^{COC} 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^{COC} 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^{COC} 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。

2)スピロキシン類の基本骨格であるペリ位置換ピナフチル構造の構築は、立体障害により困難とされ、これまでにホモカップリング反応による合成が数例報告されていただけであったが、今回、これまでに例のないフッ素イオン添加による鈴木・宮浦クロスカップリング反応を基盤とした独自の方法により達成した。ついでスピロケタール構造の構築、官能基変換を経て、DNA 切断機構解明のため必須である天然物スピロキシン C の全合成に成功した。

3) アンチセンス核酸を吸着させた徐放性のナノパーティクルを膜融合リポソームを用いて細胞質内に導入し、細胞質内でアンチセンス核酸を最適な濃度に維持するための方法論の確立を試みた。

今回作製したナノスフェアーの粒子径・表面電荷を測定した結果、粒子径 308 nm、表面電荷 21.8 mV を示す、粒子表面がカチオン性に帯びた単分散のナノスフェアーであった。このナノスフェアー表面に、アニオン性電荷を有するオリゴヌクレオチドが静電的に吸着させた結果、ナノスフェアー1 粒子あたり約 3 万分子のオリゴヌクレオチドが吸着することが明らかとなった。このオリゴヌクレオチド吸着ナノスフェアーを封入したリポソーム及び膜融合リポソームを用いて、その細胞内導入を FACS にて検討した。その結果、リポソーム作用群よりも膜融合リポソーム作用群において効率よく細胞内に導入でき

ることが示された。さらに細胞内に導入されたオリゴヌクレオチド由来の蛍光を、共焦点レーザー顕微鏡を用いて視覚的に確認した結果、大部分の緑色蛍光が粒子状に観察された。本結果は、膜融合リポソームにより細胞内導入されたオリゴヌクレオチドが、導入直後、ナノスフェアー表面に吸着した状態で細胞内に存在していることを示している。さらにこの細胞を培養し、細胞質内でのオリゴヌクレオチドの徐放を観察した結果、ナノスフェアー表面から、経日的にオリゴヌクレオチドが細胞質に放出されている像が観察された。

4) HCT116 細胞を用いて内在的発現の抑制を見た場合、S-オリゴでは明らかな抑制が見られなかったが、BNA を用いた時には顕著な抑制が認められ、その効果には再現性が見られた。

THP-1 細胞を用い、発現誘導時の発現抑制を見た場合、S-オリゴで一度抑制効果が見られたが、再現性は認められなかった。また、天然のオリゴを用いた場合には抑制効果は認められなかった。

それに対して BNA では、いずれの場合も再現性よく抑制効果が認められた。また、スクランブル配列を用いた場合には抑制効果は認められなかったことから、BNA アンチセンス分子の配列特異的な抑制効果が認められたと考えられる。

2. 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^{COC} 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。またアンチセンス効果をより高めるための新規 DNA 切断分子開発については、スピロキシン C の全合成に成功したが、本合成は、これまでに例のないクロスカップリング反応によるペリ位置換ピナフチル誘導体合成法をキーステップとしており、本反応を活用することにより様々なスピロキシン誘導体が合成可能と考えられる。今後、各種誘導体合成を通じてスピロキシン類の DNA 切断機構解明を明らかにし、その結果を基に新たな DNA 切断活性構造ユニットを設計・合成し BNA オリゴマーとのコンジュゲート化を計っていきたい。

一方、アンチセンス分子の細胞内での徐放化に関しては、今回、膜融合リポソームを用いてオリゴヌクレオチド吸着ナノスフェアーを細胞内に導入し、細胞内でナノスフェアー表面からオリゴヌクレオチドが経日的に細胞質に放出されていることを視覚的に確認した。しかし、視覚的な結果だけでは、末端の蛍光物質のみが解離している可能性や、オリゴヌクレオチドが分解されることでナノスフェアー表面から解離している可能性も十分に考えられる。この

点に関して、マクロインジェクション法により蛍光標識オリゴヌクレオチドを細胞内に導入した場合、蛍光物質のみや 1 塩基のオリゴヌクレオチドは数十分で、8 塩基のオリゴヌクレオチドでも 24 時間もすれば分解され細胞外に放出されるという報告がある。そのため 7 日後において認められた視覚的な徐放効果は、アンチセンス効果を十分に発揮することができる十数塩基の長さのオリゴヌクレオチドが細胞内に存在し得られたものと期待される。今後、実際にアンチセンス効果を評価するバイオアッセイを行うことで、視覚的に認められた徐放効果が作用の面での持続化にも結びつくことを示し、細胞質内において薬物を徐放化する新しい DDS 技術を確立していかなければならない。

これに加えて、BNA-ODN のアンチセンス医薬品への展開に関しては、本実験で用いた配列を有する BNA オリゴを用いることにより、PPAR γ 遺伝子の内在的な発現、及び分化誘導による発現を、効果的に抑制することが可能であることがわかった。すなわち、これら BNA オリゴを用いることにより、PPAR γ の機能解明への応用が可能であることが示唆された。

3. 研究発表

- 1) Hari, Y., Obika, S., Sekiguchi, M. & Imanishi, T. Selective recognition of CG interruption by 2',4'-BNA having 1-isoquinolone as a nucleobase in a pyrimidine motif triplex formation. *Tetrahedron* 59, 5123-5128 (2003).
- 2) Koizumi, M., Morita, K., Daigo, M., Tsutumi, S., Abe, K., Obika, S. & Imanishi, T. Triplex formation with 2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acids (ENA) having C3'-endo conformation at physiological pH. *Nucleic Acids Res.* 31, 3267-3273 (2003).
- 3) Obika, S., Andoh, J.-i., Onoda, M., Nakagawa, O., Hiroto, A., Sugimoto, T. & Imanishi, T. Synthesis of a novel bridged nucleoside bearing a fused-azetidone ring, 3'-amino-3',4'-BNA monomer. *Tetrahedron Lett.* 44, 5267-5270 (2003).
- 4) Obika, S., Nakagawa, O., Hiroto, A., Hari, Y. & Imanishi, T. Synthesis and properties of a novel bridged nucleic acid with a P3'->N5' phosphoramidate linkage, 5'-amino-2',4'-BNA. *Chem. Commun.*, 2202-2203 (2003).
- 5) Torigoe, H., Hari, Y., Obika, S. & Imanishi, T. Triplex Formation Involving 2'-O,4'-C-Methylene Bridged Nucleic Acid (2',4'-BNA) with 2-Pyridone Base Analogue: Efficient and Selective Recognition of C:G Interruption. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 22, 1097-1099 (2003).
- 6) Torigoe, H., Hari, Y., Obika, S. & Imanishi, T. Triplex Formation Involving 2'-O,4'-C-Methylene Bridged Nucleic Acid (2',4'-BNA) with 1-Isoquinolone Base Analogue: Efficient and Selective Recognition of C:G Interruption. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 22, 1571-1573 (2003).
- 7) Nakagawa, O., Hiroto, A., Obika, S. & Imanishi, T. A novel nucleic acid analogue, 3'-amino-2'-deoxy-3',4'-BNA, with an N3'->P5' phosphoramidate linkage and an S-type conformation. *Nucleic Acids Res. Suppl.*, 87-88 (2003).
- 8) Sekiguchi, M., Osaki, T., Harada, Y., Obika, S. & Imanishi, T. *trans*-3',4'-BNAs, novel nucleic acid analogues with an S-type conformation: Synthesis and incorporation into oligonucleotides. *Nucleic Acids Res. Suppl.*, 111-112 (2003).
- 9) Miyashita, K., Sakai, T. & Imanishi, T., Total synthesis of (\pm)-spiroxin C. *Org. Lett.* 5, 2683-2686 (2003).
- 10) 真弓 忠範, DDS とナノ粒子 特集によせて, 生化学会誌, 81, 177 (2003).
- 11) 中川 晋作 & 真弓 忠範, 細胞内薬物動態制御を目指した機能性ナノ粒子の細胞内導入, 生化学会誌, 81, 189-192 (2003).
- 12) Nakagawa, S. & Mayumi, T., Development of novel technology of DDS for gene therapy, *Drug Metabol. Pharmacokin.* 18, 223-229 (2003).
- 13) Kodama, T. & Doi, T. Role of class A scavenger receptor in the atherosclerosis and multiple pattern recognition, *Atherosclerosis*, 4, 192 (2003).
- 14) Tanaka, T., Iwasaki, S., Asaba, H., Namura, H., Mitsuhiro, W., Tachibana, K., Watanabe, Y., Uchiyama, Y., Sumi, K., Magoori, K., Ioka, R. X., Doi, T. Naito, M., Auwerx, J., Hamakubo, T., Sakai, J. & Kodama, T., PPAR δ agonist ameliorates obesity and insulin resistance through coordinate regulation of fatty acid metabolism in skeletal muscle, *Atherosclerosis*, 4, 217 (2003).
- 15) Tachibana, K., Tanaka, T., Tagami, M., Kobayashi, Y., Katayama, T., Ishimoto, K., Yamasaki, D., Ueda, C., Sumitomo, M., Kodama, T. & Doi, T. Analysis of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) target genes in the HepG2 cells over expressing each PPAR isoform in the tetracycline (Tet)-regulated system, *Atherosclerosis*, 4, 218 (2003).
- 16) Tanaka, T., Yamamoto, J., Iwasaki, S., Asaba, H., Hamura, H., Ikeda, Y., Watanabe, M., Magoori, K., Ioka, R. X., Tachibana, K., Watanabe, Y., Uchiyama, Y., Sumi, K., Iguchi, H., Ito, S., Doi, T., Hamakubo, T. Naito, M., Auwerx, J., Yanagisawa, M., Kodama, T. & Sakai, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100, 15924-15929 (2003).

4. 知的所有権の取得状況
該当無し

平成15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16年9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