

## 研究課題別評価

### 1 研究課題名：

“生体高分子組織化の可逆的制御と機能材料への展開 - がん細胞特異的遺伝子治療薬創成を目指して - ”

### 2 研究者氏名：和田 健彦

研究員：佐藤 博文（研究期間 H. 16. 04~H. 18. 03）

### 3 研究のねらい：

本研究はアンチセンス法などの遺伝子治療において、外部刺激により核酸認識制御機能を有する人工核酸を用いる事により、遺伝子治療機能の積極的かつ動的制御という新しい概念を導入し、正常細胞では機能することなく、がん細胞でのみ治療効果を発現するのみならず、極初期の「見えないガン細胞においても抑制機能を発現しうる」次世代の遺伝子治療薬として期待される人工核酸の創製を目指した。

### 4 研究成果：

我々は、化学者の視点から遺伝情報発現の積極的な制御に取り組み、がん細胞に特有の細胞内環境変化をトリガーとし、がん細胞内でのみ遺伝情報の発現抑制機能を発揮する「がん細胞特異的遺伝子治療薬創製」に対する方法論の開発を目指した。

#### (1) 刺激応答性人工核酸の固相合成法の確立

生体適合性と高い細胞膜透過性を有し、がん細胞特異的遺伝子治療に適用可能なペプチドリボ核酸 (PRNA) 誘導体合成のためには、従来の煩雑かつ時間を要する溶液法ではなく、簡便かつ高収率合成法の確立が必要不可欠である。このような観点から、我々は PRNA オリゴマー合成にペプチド固相法の適用を検討した。一般的な Boc 法では、脱保護過程における酸性条件下で脱プリン化反応の進行が観測されたため、温和な弱塩基性条件下で脱保護を行う Fmoc 法に変更し、種々の配列を有する 24 量体程度のオリゴ PRNA の簡便かつ高収率合成法を確立した。さらに固相法による DNA と PRNA をハイブリッド化した DNA-PRNA キメラ分子の合成にも取り組み、DNA 合成用 CPG 樹脂上での DNA-PRNA キメラ分子の合成法を確立した。固相合成法の確立により、PRNA 主鎖骨格への機能性アミノ酸や、ペプチド核酸 (PNA) そして DNA の簡便な導入が可能となった。

#### (2) PRNA とターゲット RNA の可逆的錯体形成・解離制御

PRNA は相補的 DNA/RNA と塩基配列特異的に安定なコンプレックスを形成することが明らかとなったので、外部因子による可逆的な錯体形成・解離制御に取り組んだ。PRNA・RNA 錯体形成系に、ホウ砂を添加することにより、*anti*→*syn* 配向変化に基づき安定に形成されていた PRNA・RNA 錯体は迅速かつ高効率に解離し、錯体形成の *on*→*off* 制御が達成された。つぎにホウ酸添加系の溶液 pH を 7.2 から 6.2 に調整すると、淡色効果は再び回復し、ホウ砂添加前と同じ  $T_m$  が観測され、塩基部の *syn*→*anti* 配向優先変化に伴い、PRNA・RNA 錯体の再形成が確認された。すなわち PRNA はホウ砂存在下、僅か 1 程度の pH 変化を外部因子とし RNA との錯体形成機能の可逆的制御能を有することを明らかとした。

このように PRNA は、ホウ酸存在下 pH などを外部刺激として、標的 RNA との錯体形成・解離の可逆的制御が可能な次世代の遺伝子治療薬としての潜在能力を有することは明らかとなったが、現実的な遺伝子治療薬として応用するには、1) 効果的な細胞内移行を実現するため高い細胞膜透過性の付与、2) 細胞内へのホウ酸類の投与方法・投与濃度、3) 触媒量で効果的な遺伝子治療薬として機能するため、標的 RNA のみを選択的に分解する RNase H の基質となる必要がある、など未だ問題を有している。我々は、これらの問題解決のため、PRNA と各種分子素子との融合による、第2世代の PRNA の合理的設計・合成に取り組んだ。

#### (3) 高い細胞膜透過性を有する PRNA の開発

PRNA に細胞膜透過性を付与するため、高い細胞膜透過性を示すアルギニン<sup>+</sup>を、 $\alpha$ -PRNA 骨格に組み込んだ新規 PRNA の設計・合成について検討した。アルギニンは、塩基性アミノ酸であり、塩基間水素結合に基づく核酸認識に加え、DNA 骨格の負電荷との分子間静電相互作用による、より安定なコンプレックス形成が期待されるだけでなく、ホウ酸添加に伴い標的 RNA との分子間水素結合・分子間静電相互作用いずれもが協同的

に分子内相互作用に変化することも期待され、安定なコンプレックス形成と迅速な錯解離機能を有する遺伝治療薬として期待される。アルギニンを組み込んだ  $\alpha$ -PRNAオリゴマー(Arg- $\alpha$ -PRNA)も、ホウ砂の添加により効果的に塩基部の *anti*→*syn*配向制御可能で、pHにより塩基部配向の可逆的制御も達成可能であることがCDスペクトル測定より明らかとなった。RNAとの錯体形成についてUV、CDスペクトルにより検討した結果、静電相互作用が十分発現すると予想される低塩濃度溶液中で、Arg- $\alpha$ -PRNAは相補的RNAと、塩基配列特異的に安定な錯体を形成することが明らかとなった。さらに、ホウ酸類を添加すると錯体は迅速に解離し、可逆的な錯形成・解離制御可能であることも示された。

これらの知見を踏まえ、実際に細胞への導入効率について検討した。蛍光標識Arg- $\alpha$ -PRNAのDMSO溶液をHeLa細胞培養液に添加し、共焦点レーザー顕微鏡によりその導入を観察した結果、非常に高効率に細胞内に取り込まれることが明らかとなった(図1)。エンドサイトシスで30分以内に高効率に取り込まれ、細胞毒性は観測されなかった。また、細胞導入効率が非常に高いことが知られているアルギニン8量体と同時に添加した系においても、アルギニン導入  $\alpha$ -PRNAがほぼ同量細胞内に導入されることが明らかとなり、高効率遺伝子治療薬として機能することが期待される。

#### (4) 配向規制因子としてフェニルボロン酸を導入した PRNA の合成

外部因子として細胞内へのホウ酸類の投与方法・投与濃度の問題を解決するため、4-カルボキシフェニルボロン酸(CPBA)をリシンの側鎖に縮合させ、これを PRNA に導入することにより、ホウ酸を塩基部配向規制因子として内部因子化した新規 $\alpha$ -PRNA を設計・合成した(図2)。

この新規モデルでは、安定な分子内ホウ酸エステル形成が期待される塩基性～中性リン酸緩衝液中で塩基部は*syn*配向を優先するのに対し、酸性溶液中では分子内ホウ酸エステルが解離し*anti*配向が誘起され、細胞内のpH変化による核酸認識制御が期待される。しかし、この新規PRNAオリゴマーの固相合成において、縮合効率の大幅な低下が観測されたので、原因と考えられるボロン酸部をピナコール保護したフェニルボロン酸モノマーを合成し、これをFmoc固相合成に用いることにより効率的なPRNAオリゴマー合成が可能になった。次にフェニルボロン酸への置換基導入による認識制御発現pH

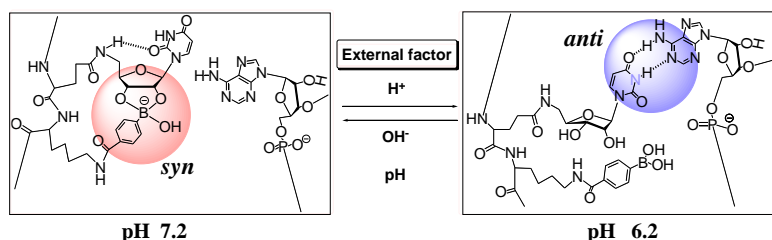


Figure 2. Reversible nucleobase orientation control of PRNA by pH

の調整についても検討した。種々の置換基を導入したフェニルボロン酸誘導体によるPRNAモノマーの塩基部配向制御のpH制御を、CDスペクトルを用いて検討したところ、電子求引性置換基を導入することにより結合定数が増大し、錯体解離pHの酸性側へのシフトが観測された。置換基効果を検討した結果、結合定数/解離発現pHは概ねハメット則に従って変化し、ある程度論理的設計が可能であることが示された。一方、CPBAを  $\epsilon$  位に導入したBoc-リシン誘導体を、ピナコールと真空下冷却混合攪拌することにより、簡便にボロン酸部をピナコール保護したCPBAモノマーを得た。N末保護基をFmoc基に変換した後、ピナコール保護Fmoc-CPBAモノマーを用いることにより、通常のFmoc固相合成法を用いても効率よくPRNAオリゴマー合成が可能となることが明らかとなった。

#### (5) PRNA-DNAキメラ分子の設計と合成

PRNAは、天然核酸と塩基特異的に安定な錯体を形成し、高い水溶性、高い酵素耐性を示す。しかし、mRNAとの錯体がRNaseHの基質となる可能性は低いという問題点があり、アンチセンス分子として作用するには細胞質内のmRNAの等量以上必要となる。一方、DNAは酵素耐性の低いリン酸ジエステル部位を有しているが、mRNAとの錯体がRNaseHの基質となり、触媒量のアンチセンス分子で大きな効果が発現することが期待できる。また、PRNAは三重鎖を形成せず、アンチジーン遺伝子治療法への適用は出来ないが、安定な三重鎖を形成するペプチド核酸(PNA)との複合化により、アンチジーン法への展開も期待される。

このような背景を踏まえ、新規なアンチセンス分子ならびにアンチジーン分子設計に取り組んだ。アンチセンス分子としてDNAの両末端にPRNAを導入した新核酸モデルであるPRNA-DNA-PRNAキメラ分子を設計した(図3)。このキメラ分子は、両末端に高い酵素耐性のPRNAを有するので細胞内で *exo*-ヌクレアーゼなどにより

分解されず、mRNAとの錯体を安定に形成することができ、DNA部分と mRNA 錯体が RNase H の基質となり触媒量で効果的なアンチセンス機能の発現が期待できる。また、PRNA 糖部 2',3'-水酸基が外部因子として添加するホウ酸と架橋構造を形成することによりターゲット RNA と錯形成・解離の可逆的制御が期待される。このため、PRNA-DNA キメラ (PD) ならびに PNA-PRNA-DNA キメラ (PPD) の合成ならびにホウ酸を外部因子とした、可逆的な核酸認識制御と RNaseH 活性制御について検討した。

まず、PPD の DNA 部位は 5'-モノメトキシ-アミノチミジンのホスホロアミダイトを用いて、DNA 合成機による固相合成により 5' 末端にアミノ基を有する DNA オリゴマーを合成した。次に、この Fmoc-PRNA モノマーならびに PNA モノマーを固相上の DNA オリゴマーにペプチド固相合成により逐次導入し、HPLC を用いて単離・精製し、MALDI-TOF Mass により同定確認した。

PPD と相補的配列を有する RNA の融点は DNA/RNA の融点と比べて 6 度高く、PPD は RNA 特異的に安定な錯体を形成することが明らかとなった。次に PPD/RNA 錯体の、RnaseH 切断活性について検討した。PPD/RNA 錯体の RNA は、DNA/RNA 錯体の RNA が 72% だけ切断される条件下で、95% 切断され、PPD/RNA は DNA/RNA に比較してより高い RnaseH 活性を有することが示された。

以上の結果より、PPD は RNA 特異的に安定な錯体を形成し、PPD・RNA 錯体は RNaseH 活性を有し、触媒量で効果的な遺伝子治療薬として機能する可能性を有することを明らかとした。

以上ペプチドリボ核酸は、アルギニンとの複合化により高い細胞膜透過性を付与できること、フェニルボロン酸との複合化により pH のみを外部因子とし、わずか 1 程度の pH 変化によりターゲット RNA との錯体形成・解離を可逆的に制御可能であること、DNA と複合化することにより RNaseH 活性の付与が可能であることを明らかとした。最近ガン細胞の細胞質 pH は、シアル酸などの酸性多糖の過剰発現などにより正常細胞の細胞質 pH7.2 より低下し、6.2~6.5 であることが報告された。この報告に基づくと、フェニルボロン酸導入 PRNA は正常細胞内では *syn* 配向を優先し、遺伝子治療薬として作用しないのに対し、がん細胞の酸性細胞質内においては、分子内ホウ酸エステルが解離し、遺伝子治療薬として機能することが期待できる。つまり本系は、現在切望されているガン細胞特異的遺伝子治療薬への展開を可能とする方法論であり、現在細胞レベルでの実証実験を計画中である。

以上のように我々は、がん細胞特異的遺伝子治療薬開発を目指し、ペプチドリボ核酸 (PRNA) 誘導体という新しいカテゴリーの分子の合理的設計に取り組み、いくつかの具体例でその有効性を実証した。この方法論は一般性を有し、次世代の遺伝子治療薬のみならず、DNA チップなどの遺伝子診断薬や分子生物学への応用も可能であり、今後さらなる展開を検討していきたい。

## 5 自己評価 :

ホウ酸を外部因子とし、塩基部配向変化を駆動力とするターゲット DNA との錯体形成解離機能を有するペプチド核酸 (PRNA) を核とし、当初目的としたホウ酸の内部因子化、DNA との複合化したキメラ分子による RNaseH 活性の付与、細胞内環境変化によるターゲット RNA との錯体形成・解離制御を実現することに成功した。さらに、本領域の二木史朗研究員との協同研究により、アルギニンを分子内に組み入れることにより高い細胞膜透過性付与にも成功した。このアルギニン導入キメラ分子は、RNA 特異的に安定な錯体を形成することも明らかとなり、当初予定よりアンチセンス分子として優れたポテンシャルを有する化合物の合成に成功した。以上の結果に基づき、アンチセンス分子に求められる機能をモジュール化し、各モジュールの論理的組み合わせによる、アンチセンス分子の合理的な設計指針を提案でき、まだまだ臨床応用するためには克服べき問題も多いものの、当初予定以上の成果が得られたものと確信する。ただ、研究期間内に *in vivo* における機能評価実験を実施すべく努力したが、期間内には実現できなかったのは残念であった。今後、細胞内実験にも取り組み本方法論の有効性に対する実証実験に取り組んでいきたい。

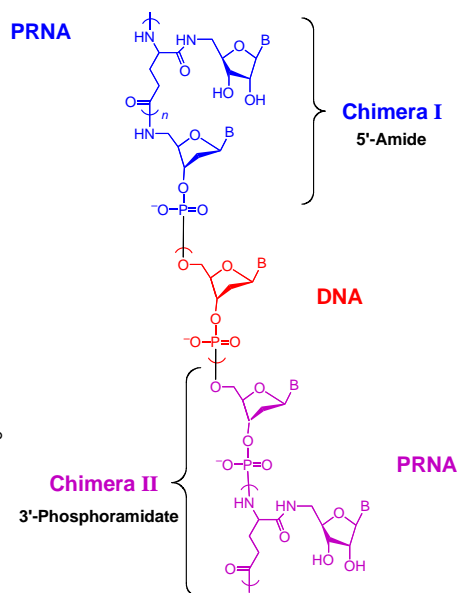


Chart 3 Structure of PRNA-DNA chimera.

## 6 研究総括の見解：

分子レベルの精密な視座から、遺伝情報発現の積極的な制御に取り組み、がん細胞を標的とする特異的遺伝子治療薬創製に向けての開発指針を確立しようとしたものである。この観点から、多くの有用な知見が蓄積された。特に、刺激応答性合成核酸、PRNAとターゲット錯体形成・解離機構、の解明と配向規制因子内部素子化など注目に値する成果が多い。このうちの膜透過性PRNAの研究では、本さきがけ研究の他のメンバーとの共同研究を通じて良い成果に至った点は、特筆に価する点であろう。

実際の応用はもとよりたやすいことでないが、予想される困難点の整理と明確化が望まれる。

。

## 7 主な論文等：

論文（全 21 報）

- (1). Active Control of DNA Recognition Behavior of  $\alpha$ -Peptide Ribonucleic Acids Containing Basic Amino Acid Residues by External Factors,  
T. Wada, H. Sato, M. Kikkawa, Y. Inoue,  
*Biopolym.*, in press.
- (2) Synthesis of Peptide Ribonucleic Acid Consisting of D- and L-  $\alpha$ -Glutamic Acid as a Backbone Structure,  
T. Wada, Y. Hashimoto, H. Sato, and Y. Inoue,  
*Nucleic Acids Res.*, **32**, 27-28 (2004).
- (3). A 5'-Amino-5'-deoxyribonucleoside Containing Nucleic Acid Model for External Reversible Control of Recognition Behavior through *anti-syn* Orientational Switching of the Nucleobase Induced by Borate Esterification of the *cis*-2',3'-Diol,  
T. Wada, H. Sato, N. Minamimoto, and Y. Inoue,  
*Biopolym.*, **76**, 15 (2004).
- (4). Active control of DNA recognition behavior of  $\alpha$ -peptide ribonucleic acids containing basic amino acid residues by external factors,  
H. Sato, T. Wada, and Y. Inoue,  
*J. Bioactive and Compatible Polym.*, **19**, 65 (2004).
- (5). Solid-Phase Synthesis of Peptide Ribonucleic Acids (PRNA),  
T. Wada, H. Sato, Y. Hashimoto, and Y. Inoue,  
*Tetrahedron*, **59**, 7871 (2003).

## 特許

- ・アンチセンス分子及びそれを用いた遺伝子機能発現の制御方法：和田健彦、井上佳久  
PTC 国際特許出願 平成 16 年 6 月 現在審査中
- ・ヌクレオシド誘導体：井上佳久、和田健彦  
PTC 国際特許出願 平成 16 年 6 月 現在審査中

## 受賞

該当なし

## 招待講演

- ・第18回名古屋カンファレンス 招待講演者（Jan. 18～19, 2007, 名古屋大学・野依記念交流会館）
- ・International Congress on Nanobiotechnology & Nanomedicine (NanoBio2006; June 19-21, 2006, San Francisco, USA) Invited Speaker.
- ・PACIFICHEM (Dec. 15～19, 2005, Hawaii, USA)  
*Peptide ribonucleic acids (PRNA): A novel strategy for active control of DNA recognition through borate ester formation* (Boronic Acids: Synthetic and Biological Applications (#273) ; Invited Speaker)
- ・第 84 日本化学会春季年会（March 26～29, 2004, 関西学院大学）  
「特別企画・核酸機能化への化学的新展開：ポストゲノムの生命化学」招待講演者
- ・6th International Biorelated Polymers Symposium (IBPS2004) , (Aug. 22-26, Philadelphia, USA) Invited Speaker.