98　炎症治療を志向した高性能アンチジーン核酸の開発	張　功幸

【目的】二重鎖 DNA を配列特異的な三重鎖核酸形成により認識できる一本鎖のオリゴ核酸（アンチジーン核酸）はゲノム DNA を標的とする創薬材料への適用が期待できる。しかし、形成される三重鎖核酸の安定性は低く、三重鎖形成可能な二重鎖 DNA 配列は限定されるため、アンチジーン核酸の実用に向けた研究はあまり行われていない。

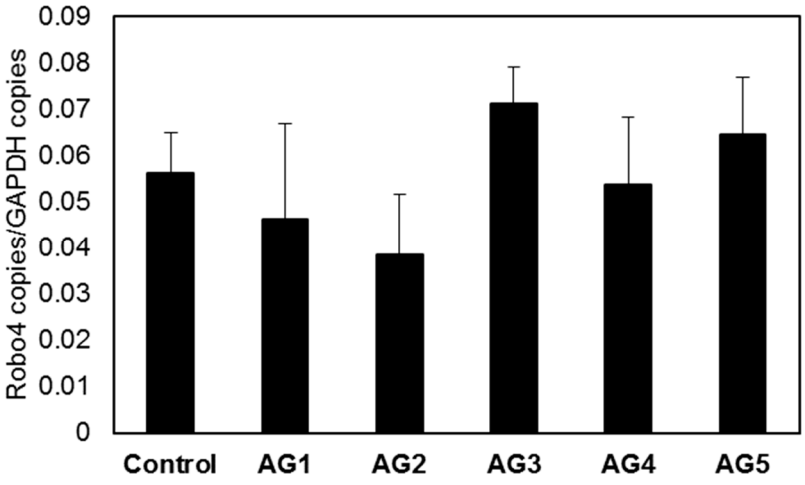
しかし、アンチジーン核酸は遺伝子本体を標的とするため、1. 既存の核酸医薬と比べて量論的に効率が良い、2. 工夫次第で遺伝子の発現促進が可能、3. 変異誘発等によるゲノムレベルでの遺伝子異常の修復（遺伝性疾患の完治）への応用なども期待できる。

私たちはこれまで“三重鎖の安定性”と“標的配列の制限”を克服できるアンチジーン核酸材料の開発を手掛け、様々な化学修飾核酸を見出してきた。しかし、これまで材料開発に注力し、その実用展開は全く行っていなかった。このような背景下、私たちが開発した材料等をアンチジーン核酸の実用に向けたアプリケーションへと展開すべく、共同研究者とともに Robo4 アンチジーン核酸の創製を目指した。

【方法】Robo4 の発現は *Robo4* 遺伝子の転写開始点付近に転写因子（SP1 や GABP など）が結合することが鍵となるため、転写因子結合部位や転写開始点をターゲットとしたアンチジーン核酸を設計した。その際、標的部位だけでなく標的二重鎖 DNA との結合親和性を向上させるための化学修飾の導入も検討した。そのアンチジーン効果は、Robo4 発現細胞である HUVEC を用いて、リアルタイム RT-PCR による Robo4 mRNA 発現量測定（ハウスキーピング遺伝子 *GAPDH* の mRNA 量で補正）により評価した。

【結果】Methylene-EoDNA 修飾が二重鎖 DNA と形成した三重鎖核酸を大きく安定化できることを融解温度測定により明らかにし、その安定化能は LNA（高い三重鎖核酸安定化能を持つ核酸材料）と同程度であった。次に、LNA や methylene-EoDNA 修飾されたアンチジーン核酸を用いて、Robo4 mRNA 発現量の抑制能を指標にアンチジーン効果を調べた。使用するアンチジーン核酸の濃度やリン酸ジエステル結合部のホスホロチオエート修飾など種々検討した。結果の一部を下図に示す。最終的には、400 nM の濃度において、Robo4 mRNA の発現量（補正後）を 60 %減少させるアンチジーン核酸を見出すことに成功した。

HUVEC 細胞におけるアンチジーン核酸による Robo4 mRNA 発現抑制能



98. 炎症治療を志向した高性能アンチジーン核酸の開発

張　功幸

徳島文理大学 薬学部 放射薬品学教室

Key words：アンチジーン核酸，架橋型核酸，三重鎖核酸，転写制御

緒　言

mRNA、miRNA やタンパク質を標的とする核酸医薬開発は世界的で熾烈な開発競争が行われているが、ゲノム DNA を標的とした核酸医薬（アンチジーン核酸）は実用レベルに無い。一本鎖のオリゴ核酸であるアンチジーン核酸は二重鎖 DNA を配列特異的な三重鎖核酸形成により認識する。その様式は「平行型」と「逆平行型」があるが、いずれも 1. 三重鎖核酸の安定性が低い、2. 三重鎖形成可能な二重鎖 DNA 配列が限られるといった課題がある。それゆえ、アンチジーン核酸戦略は汎用性が乏しく、実用に向けた基礎研究すら殆ど行われていない状況である。しかし、アンチジーン核酸は遺伝子本体を標的とするため、1. 既存の核酸医薬と比べて量論的に効率が良い、2. 工夫次第で遺伝子の発現促進が可能、3. 変異誘発等によるゲノムレベルでの遺伝子異常の修復（遺伝性疾患の完治）への応用などが期待できる。

私たちはこれまで「平行型」アンチジーン核酸の課題解決に向けた研究を行っており、“三重鎖の安定性”と“標的配列の制限”を克服できる人工核酸ユニット・化学修飾の開発を手掛け、様々な二重鎖 DNA を安定かつ配列選択的に認識できるアンチジーン核酸材料を見出してきた［1］。しかし、これまで材料開発に注力し、その実用展開は全く行っていなかった。一方、共同研究者は炎症性疾患の治療標的となる血管内皮細胞に特異的に発現する受容体 Robo4（Round-about 4）のゲノムレベル機能解析を行っており、すでに細胞系での Robo4 評価系も確立していた。

このような背景下、私たちが開発した材料等をアンチジーン核酸の実用に向けたアプリケーションへと展開すべく、共同研究者とともに Robo4 アンチジーン核酸の創製を目指した。

方法および結果

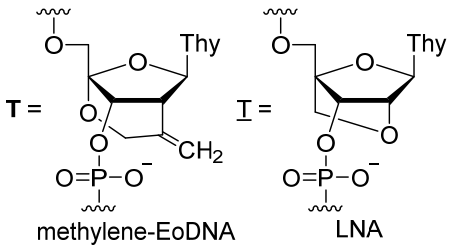
1. アンチジーン核酸の設計と合成

アンチジーン核酸は二重鎖 DNA の一方の鎖（標的鎖）と Hoogsteen 型水素結合を介して三重鎖核酸を形成する。その際、標的鎖は A、G、C、T の 4 種が考えられるが、それらと水素結合を形成するためにアンチジーン核酸としてそれぞれ T、mC（5-メチル C）、T あるいは mC、G を使用することにした。一方で、私たちは、LNA 修飾は二重鎖 DNA との安定な三重鎖核酸形成を可能にし［1］、アンチジーン核酸材料として有望であることを見出した。また、最近、オリゴ核酸材料として methylene-EoDNA の T アナログの開発に成功し［2］、そのアンチジーン核酸材料としての可能性に興味が持たれた。そこで、methylene-EoDNA 修飾オリゴ核酸による二重鎖 DNA との三重鎖核酸形成能を融解温度測定により評価した結果、LNA 修飾オリゴ核酸と同程度の高い三重鎖核酸の安定性（1 修飾あたり＋6.2℃～＋7.2℃）を示すことが明らかとなった（表 1）。このことから、アンチジーン核酸材料として LNA だけでなく methylene-EoDNA も期待できることが判明した（表 1 参照）。次に、methylene-EoDNA をアンチジーン核酸材料として利用するためには、mC を持つ methylene-EoDNA が必要であるためその合成を行った。すでに合成に成功している化合物 **1**［2］から 5 工程にて、オリゴ核酸合成に利用可能なビルディングブロック（mC を持つ methylene-EoDNA ホスホロアミダイト）**3** へと導くことができた（図 1）。一方、チミン塩基部のトリアゾリル化体も mC 等価体として、オリゴ核酸合成のビルディングブロックに使用できるため、methylene-EoDNA のトリアゾリル化体も合成した。しかし、オリゴ核酸

合成後の HPLC 分析で多数のピークが確認され、目的のオリゴ核酸を得ることができなかった。これは、methylene-EoDNA を含むオリゴ核酸合成時の酸化剤として過酸酸化を利用するが（通常用いられるヨウ素酸化はメチレン部と反応するために使用できない）、その条件下トリアゾリル化塩基部が反応・分解したためと考えられる。

表 1. Methylene-EoDNA 修飾オリゴ核酸の三重鎖核酸形成能

Oligonucleotides	T_m (°C)	ΔT_m/mod. (°C)
5'-TmCTTmCTTTTTmCTmCT-3'	25.6 ± 0.2	–
5'-TmCTTmCT**TTT**TmCTmCT-3'	44.3 ± 0.5	+6.2
5'-TmCTTmC**TTTT**TmCTmCT-3'	47.3 ± 0.7	+7.2
5'-TmCTTmCTTTTTmCTmCT-3'	43.0 ± 0.5	+5.8
5'-TmCTTmCTTTTTmCTmCT-3'	47.4 ± 0.3	+7.3



測定は、10 mMリン酸緩衝液（pH 7.0）、100 mM KCl、0.5 mM $MgCl_2$、各オリゴ核酸 1.5 μMで行った。
使用した二重鎖DNAは、5'-GGCAGAAGAAAAAGAGACGC-3'（標的鎖）と
5'-GCGTCTCTTTTTCTTCTGCC-3'である。ΔT_m/mod.は、1修飾あたりのT_m変化を示す。

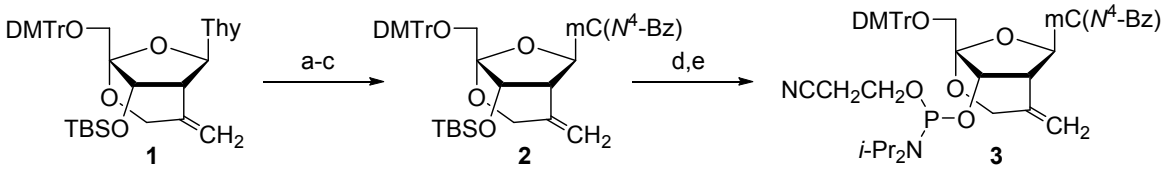


図 1. 5-メチルシトシン塩基（mC）を持つ methylene-EoDNA の合成

反応条件：a） triazole、$POCl_3$、Et_3N、MeCN、0 °C

b） 28% NH_3 aq.、1,4-dioxane、rt、81 % for 2 steps;

c） BzCl、pyridine、rt、66 %;

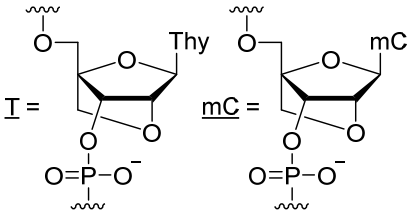
d） TBAF、THF、rt、83 %;

e） $(i\text{-}Pr_2N)_2POCH_2CH_2CN$、5-(ethylthio) tetrazole、MeCN、rt、64 %

次に、Robo4 の発現を抑制するアンチジーン核酸の設計に取り掛かった。Robo4 の発現は、Robo4 遺伝子の転写開始点付近に転写因子（SP1 や GABP など）が結合することで調節される［4, 5］。従って、それらの結合部位や転写開始点をターゲットとしたアンチジーン核酸を設計した。さらに、標的二重鎖 DNA との結合親和性を向上させるために、設計したアンチジーン核酸に LNA や methylene-EoDNA 修飾を加え、DNA 自動合成装置を用いて Robo4 遺伝子を狙った様々なアンチジーン核酸の合成を行った。本研究で使用した LNA を導入したアンチジーン核酸の一部 **AG1–AG5** を表 2 に示す。

表 2. LNA 修飾を持つアンチジーン核酸

Antigene oligonucleotides
5'-TmCmCmCTmCmCTmCmCT-3' (**AG1**)
5'-mCTTmCTmCmCmCTTmCmCTmCmCmCmCmCmCmCmC-3' (**AG2**)
5'-mCTTmCTmCmCmCTTmCmCTmCmCmC-3' (**AG3**)
5'-TmCTmCmCTmCmCTmCmCTTTTTmC-3' (**AG4**)
5'-mCmCmCTTTTmCmCTTGTmCmCmC-3' (**AG5**)



2. アンチジーン核酸の細胞での評価（アンチジーン効果）

Robo4 発現細胞である HUVEC を用いて、リアルタイム RT-PCR による Robo4 mRNA 発現量測定（ハウスキーピング遺伝子 *GAPDH* の mRNA 量で補正）によりアンチジーン効果を調べた。具体的には、アンチジーン核酸を 100 nM、200 nM、400 nM の濃度において、Lipofectamine® 2000 を用いてリポフェクションした。48 時間後、RNA 抽出を行い、cDNA を合成した。その後、リアルタイム RT-PCR により、Robo4 mRNA 量と GAPDH mRNA 量を算出し、補正することでデータとした。一例として、400 nM の **AG1–AG5** のデータを図 3 に示す。結果として、**AG1–AG5** については、いずれの濃度においても Robo4 mRNA の発現量を有意に減少させることができなかった。しかし、**AG1–AG5** 以外にも種々アンチジーン核酸を検討した結果、Robo4 mRNA の発現量（補正後）を 60%減少させるアンチジーン核酸を見出すことに成功した（Control との比較において有意差が確認された。Student t-test $p < 0.05$、data not shown）。一方で、本評価系ではホスホロチオエート修飾を用いた場合は、強い細胞毒性が確認された。Methylene-EoDNA 修飾アンチジーン核酸についても検討したが、アンチジーン効果は確認できなかった。今後は、アンチジーン核酸の作用部位を明確にするための実験を行うとともに、マウスを用いたアンチジーン実験へと展開していきたい。

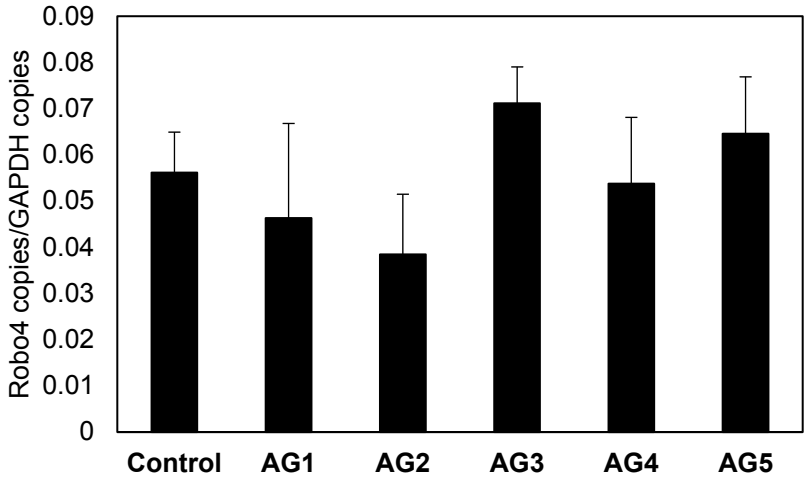


図 3. HUVEC 細胞におけるアンチジーン核酸（400 nM）による Robo4 mRNA 発現抑制能
アンチジーン核酸を HUVEC に導入し、48 時間経過後 Robo4 mRNA 量をリアルタイム RT-PCR により解析した。本データは各 3 回測定した結果を示す。

考　察

アンチジーン核酸の実用に向けては、より高いアンチジーン活性を示す必要があると考えられる。そのためには新たな材料開発が必須であり、より広範な二重鎖 DNA 配列の標的化の実現、標的二重鎖 DNA との結合親和性や配列特異性の向上、さらにはゲノム DNA への効率的なアクセスなど、まだ多くの課題を抱えている。しかし、アンチジーン核酸は、実用されているアンチセンス核酸と同じオリゴ核酸であるため、既に多くの医薬品開発に関する知見があり、創薬に向けたハードルが低いと考えられる。それゆえ、有効なアンチジーン核酸材料が開発されれば、様々な疾患の治療に向けてゲノム DNA を標的としたアンチジーン核酸創薬が大きく発展すると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学大学院薬学研究科生命情報解析学分野准教授の岡田欣晃博士である。徳島文理大学薬学部にて新たな研究室立ち上げにあたり早急に様々な機器を導入する必要がある状況下、上原記念生命科学財団からのご支援は大変有難く、心から感謝申し上げます。

文 献

1) Hari Y. Development of artificial nucleic acid that recognizes a CG base pair in triplex DNA formation. Yakugaku Zasshi. 2013;133(11):1201-8. PMID:24189561 DOI:10.1248/yakushi.13-00215

2) Torigoe H, Hari Y, Sekiguchi M, Obika S, Imanishi T. 2'-*O*,4'-*C*-Methylene bridged nucleic acid modification promotes pyrimidine motif triplex DNA formation at physiological pH: thermodynamic and kinetic studies. J Biol Chem. 2001 Jan 26;276(4):2354-60. Epub 2000 Oct 16. PMID:11035027 DOI:10.1074/jbc.M007783200

3) Osawa T, Obika S, Hari Y. Synthesis and properties of novel 2'-*C*,4'-*C*-ethyleneoxy-bridged 2'-deoxyribonucleic acids with exocyclic methylene groups. Org Biomol Chem. 2016 Oct 12;14(40):9481-9484. PMID:27714307 DOI:10.1039/c6ob01960a

4) Okada Y, Yano K, Jin E, Funahashi N, Kitayama M, Doi T, Spokes K, Beeler DL, Shih SC, Okada H, Danilov TA, Maynard E, Minami T, Oettgen P, Aird WC. A three-kilobase fragment of the human Robo4 promoter directs cell type-specific expression in endothelium. Circ Res. 2007 Jun 22;100(12):1712-22. Epub 2007 May 10. PMID:17495228 DOI:10.1161/01.RES.0000269779.10644.dc

5) Okada Y, Jin E, Nikolova-Krstevski V, Yano K, Liu J, Beeler D, Spokes K, Kitayama M, Funahashi N, Doi T, Janes L, Minami T, Oettgen P, Aird WC. A GABP-binding element in the Robo4 promoter is necessary for endothelial expression in vivo. Blood. 2008 Sep 15;112(6):2336-9. Epub 2008 Jun 2. PMID:18519813 DOI:10.1182/blood-2008-01-135079