The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

新規PNAを用いたガン遺伝子ターゲティング

白石 竹彦

Peptide nucleic acid（PNA）[1]は核酸への強い結合力と高い塩基配列特異性を有する．この高い塩基配列認識能を利用して，PNAは現在までにFISH法やポイントミューテーションの検出などに応用されている．一方，PNAには細胞膜透過性が低いと言う欠点があり，これが細胞への応用研究の障害となってきた．本稿では，PNAの修飾による細胞取り込みの向上，ならびに修飾PNAのアンチセンス法への応用についての試みを紹介したい．

PNAは天然核酸の糖－リン酸骨格をN-(2-aminoethyl)-glycineに置き換えた構造をしている．天然核酸のリン酸結合部位はpH 7付近において電荷を持つのに対して，PNAのアミド結合部位は電荷を持たない．この中性の骨格のために，PNAは核酸に対して，より強く結合することが可能であり，[2]同時に高い塩基配列特異性を示す．また，PNAはヌクレアーゼやプロテアーゼに対して耐性を示す．[3]これらのPNAの性質は，アンチセンス医薬品として理想的であるが，[4]細胞への取り込みが貧しいという点が[5]応用研究の問題となってきた．[6]

PNAの細胞膜透過性の改善方法は，PNAの修飾による方法と，PNAを修飾しない方法に大別される．PNAを修飾する方法として，1）ポリリジンなどの多荷電化合物をPNA分子に導入する，[7] 2）NLSなどのターゲティングペプチドをPNAに結合させる，[8,9] 3）リガンドや疎水性化合物を結合させる，[10] 4）PNAとDNAのキメラ分子を作製し，DNAトランスフェクション試薬を使用する，[11]などがある．一方，PNAを修飾しない方法としては，1）PNAを相補的配列なオリゴDNAとハイブリさせ，DNAトランスフェクション試薬を使用する，[12] 2）streptolysin-Oにより細胞膜の透過性を向上させる，[13] 3）エレクトロポーレーション，4）マイクロインジェクションなどが報告されている．これらの方法はある程度の成功を収めているが，いずれの方法も汎用性のなさ，取り込み効率の低さ，合成の煩雑さなどの問題があり，決定的な方法がないのが現状である．

PNAを用いた細胞内の遺伝子発現制御を目指すためには，細胞内導入効率の高い修飾PNA分子の開発ならびに導入方法の確立がきわめて重要である．

9-Aminoacridine（Acr）修飾PNAの細胞取り込み

マイクロインジェクションやエレクトロポーレーションなどの物理的方法を別にすると，PNAを細胞に導入する方法で決定的なものは現在のところ存在しない．一方，天然核酸（DNA，RNA）の細胞への導入方法は種々のものが報告されている．その中でも，簡便さ，導入効率，安全性などの面から，最も広く使用されている方法としてカチオン性試薬を用いるものがある．これは，核酸分子および細胞膜表面が共に負の電荷を有することを利用して，正の電荷を帯びた媒介物を使用する方法である．代表的な試薬には，カチオン性脂質やPEI（polyethylenimine）があり，プラスミドDNAなどの細胞内導入に広く利用されている．特にカチオン性脂質は多種類のものが市販され，有効な薬物キャリアーとして期待されている．しかし，PNAは中性物質であるため，カチオン性脂質をPNAに直接使用することはできない．カチオン性脂質をPNAに使用する方法として，前述のようにDNAとPNAのキメラ分子を合成する方法，あるいは相補的DNAとハイブリさせることを利用する方法が試みられている．しかしながら，前者は合成が困難であり，後者は最適化が容易ではないという問題点があり，PNAをDNAに結合させる新規な方法が必要とされている．

そこで今回，PNAをDNAに結合させる新たな方法として，DNAインターカレーターのDNA結合能の利用を試みた．具体的には，DNAインターカレーターを結合させたPNAを用いることでPNA/DNA複合体を形成させ，この複合体のカチオン性脂質による細胞内導入を試みた．

図1に今回用いたAcr-PNAの構造を示す．Acr-PNAは，DNAインターカレーターである9-aminoacridine[14]（Acr）を，eg1-リンカーを介してPNAのアミノ末端に

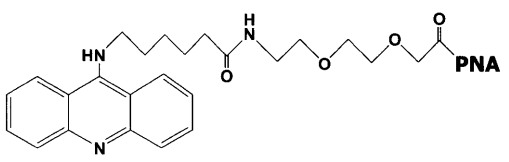

図1. 9-aminoacridine(Acr)を結合させたPNA(Acr-PNA)の構造．

著者紹介 Center for Biomolecular Recognition, IMBG, The Panum Institute（Visiting research assistant）
Blegdamsvej 3c, DK 2200N, Copenhagen, Denmark
TEL. +45-35327485 FAX. +45-35396042 E-mail: shiraishi@imbg.ku.dk

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

結合させたものである．このAcr-PNAの細胞取り込みを評価するために，fluoresceinでラベルしたPNA（Acr-Fl-PNA）を使用した．また，カチオン性脂質としてLipofectAMINE^{R}（LFA, Invitrogen）を，二本鎖DNAとしてcalf thymus DNA（CT-DNA）をそれぞれ用いて実験を行った．

Acr-PNA, CT-DNAおよびLFAの複合体を形成させた後，この複合体をHeLa細胞培養液に添加することでトランスフェクションを行った．複合体を添加してから18時間後に細胞を固定し，蛍光顕微鏡にて観察を行った．

その結果（図2），Acr-PNA/DNA/LFA複合体をトランスフェクトした細胞において顕著な蛍光が観察され，この方法によってAcr-Fl-PNAが細胞へ取り込まれることが明らかとなった．Acr-Fl-PNAのみ，あるいはAcr-Fl-PNA/DNA複合体（LFAなし）を用いた場合には顕著な細胞取り込みは観察されなかった．

一方，Acr-Fl-PNA/LFA複合体（DNAなし）の細胞への取り込みを検討したところ，予想に反し，DNAを添加した場合よりも効率よく細胞に取り込まれることが明らかとなった．また，Acrを持たないPNA（Fl-PNA）の場合には顕著な蛍光は観察されなかったことから，Acr-Fl-PNAの細胞への取り込みはAcr分子およびLFA依存的であると考えられた．対照実験としてPNAを相補的DNA分子と結合させてLFAを使用する方法[12]も試みたが，観察される蛍光は低いものにとどまった．以上の結果から，LFAのみによる導入方法を用いてAcr-PNAのアンチセンス効果を評価することとした．これは当初の狙いとは異なるが，DNA無添加の本法のほうが簡便かつ導入効率が高かったことによる．

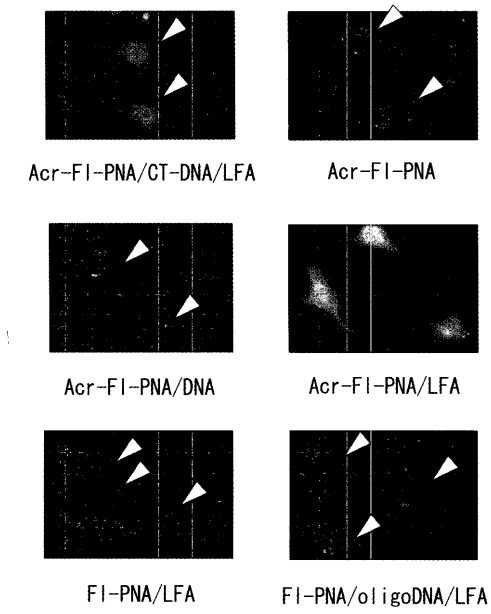

図2．Acr-PNAのHeLa細胞への取り込み．HeLa培養細胞に対するAcr-PNAの取り込みを，蛍光ラベルしたPNA（2 μM）を用いて検討した．［上側二段，4枚］蛍光ラベルしたAcr-PNA（Acr-Fl-PNA）をcalf thymus由来DNA（CT-DNA）およびLipofectAMINE^{R}（LFA）との複合体，あるいはLFAとの複合体として投与した場合には，18時間後には顕著な蛍光が観察された．しかしながら，このAcr-Fl-PNAをCT-DNAとの複合体，あるいはAcr-FL-DNA単独で投与した場合にはほとんど蛍光は観察されなかった．［最下段，二枚］対照実験としてAcrを持たない蛍光ラベルPNA（Fl-PNA）を用いた．Fl-PNAをLFAとの複合体，あるいは，相補的DNA（oligoDNA, 12bp）とLFAとの複合体として使用したが，いずれの場合においても顕著な蛍光は観察されなかった．

この Acr-Fl-PNA の LFA による取り込み機構は現在のところ不明である．Acr-Fl-PNA トランスフェクション開始数時間後には，細胞内にエンドソーム様の蛍光が観察される．その後，蛍光は細胞質へと分布するとともに，核に蓄積することが観察されている．このことから，Acr-PNA/LFA の細胞への取り込みはエンドサイトーシスによるものであると推察される．誌面の都合上今回は紹介しないが，本法によって細胞内に導入した Acr-PNA によってスプライシングの阻害が観察されることからも，Acr-PNA の核への分布は確かであると思われる．しかしながら，取り込まれた PNA の何％が実際にアンチセンス効果を発揮しているか？ということに対する明確な答えはまだない．

Acr-PNAを用いたMDM2のターゲッティング

MDM2タンパクは，p53タンパク（ガン抑制遺伝子）の機能を阻害あるいは，分解を促進[15]することで，p53の活性および量を調節している．MDM2タンパクは特定のガン細胞において過剰発現しており，[16]過剰発現したMDM2による過剰なp53の阻害がガン化の要因であるとするモデルが提唱されている．[17] MDM2の過剰発現が見られるガン細胞のうち，osteosarcomaおよびsoft tissueガンは野生型のp53を保持している頻度が高いことが明らかとされている．[16]これら二種類のガン細胞においては過剰発現したMDM2をダウンレギュレーションすることによって，野生型p53の活性化ならびにこれに由来する細胞死の誘導が可能であると考えられてきた．[18]実際に培養細胞を用いたモデルにおいてMDM2アンチセンス（S-オリゴ）がガン細胞増殖阻害作用ならびにp53の活性化を示すことからこのモデルは支持されており，[19]アンチセンス法によるMDM2のダウンレギュレーションはガン治療のターゲットとして期待されている．

NII-Electronic Library Service

The Society for Bioscience and Bioengineering, Japan

今回，我々はアンチセンスAcr-PNAによるMDM2のダウンレギュレーション効果を検討した．MDM2のmRNAに相補的な配列を持ったアンチセンスPNAを細胞内に導入することにより翻訳過程を阻害し，過剰発現したMDM2タンパクの細胞内レベルを下げるのが狙いである．

MDM2のmRNA配列から，スタートコドン近傍をはじめとした8ヶ所を標的部位として選び，相補的配列をもつAcr-PNA（12bp）を合成した．これらのAcr-PNAをJAR細胞（ヒト由来培養細胞，MDM2過剰発現細胞株）に対してLFAを用いて細胞内に導入し，MDM2のダウンレギュレーション効果を比較した．その結果，8ヶ所のうち2ヶ所の標的部位に対するPNAが有効であることが明らかとなった．

図3に最も効果的だったAcr-PNAの結果を示す．このAcr-PNAは濃度依存的にMDM2タンパクレベルを下げると同時に，p53レベルの上昇を誘導することが明らかとなった．一方，ミスマッチ配列を持つPNAは両タンパクレベルに顕著な影響を示さなかったことから，Acr-PNAによるアンチセンス効果が配列特異的効果であることが示唆された．また，Acr分子を持たないPNAも同様に両タンパク質に顕著な影響を持たなかった．

今回は結果を紹介するにとどめるが，最もアンチセンス効果の高かったAcr-PNAは，細胞増殖阻害ならびにp53の活性化に対して，化学療法剤（camptothecin）との相乗効果を示すことが明らかとなっている．このようなアンチセンス試薬と化学療法剤の相乗効果は，現在臨床試験中（phaseⅢ）であるGensome^{R}（Bcl2をターゲットにしたアンチセンス試薬）においても観察されている．このようなアンチセンス試薬と抗ガン剤との相乗効果は臨床応用上重要であると考えられており，興味深い結果と思われる．

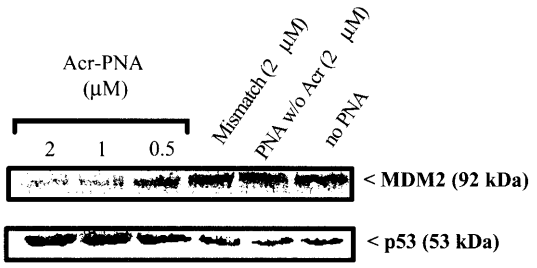

図3．Acr-PNAによるMDM2タンパクの発現抑制．JAR培養細胞をPNAで（LFAとの複合体として）24時間処理した後，MDM2およびp53タンパク質レベルをウエスタンブロットにて解析した．MDM2のmRNAに相補的な配列を持つAcr-PNAを使用した場合には，MDM2タンパクレベルの低下と同時にp53タンパクレベルの上昇が観察された．一方，ミスマッチ配列をもつAcr-PNA（Mismatch）やAcrを持たないPNA（PNA w/o Acr，MDM2のmRNAに相補的な配列を持つがAcrを持たないPNA）は両タンパクレベルに顕著な影響を示さなかった．

PNAには細胞膜透過性が低いという欠点があり，アンチセンスPNAの応用研究の妨げとなってきた．我々は細胞取り込み能の高いPNA分子の開発を通じて少しずつそのハードルを超えてきている．実験例で示したように，PNAをAcr分子と結合させることによって，細胞膜透過性の向上を図り，実際にAcr-PNAが培養細胞実験系でアンチセンス効果を示すことを見いだした．しかしながら，その有効濃度は1–2 μMと，他のタイプのアンチセンス分子よりも高濃度を必要とし，依然として十分効率的とは言えない．

PNAのアンチセンス法への応用のためには，さらに細胞導入効率が高くかつ細胞毒性の低い新規PNA分子の開発，あるいは新規導入方法の開発が大いに期待される．

文　献

1) Nielsen, P. E. *et al.*: *Science*, **254**, 1497 (1991).
2) Chakrabarti, M. C. and Schwarz, F. P.: *Nucleic Acids Res.*, **27**, 4801 (1999).
3) Demidov, V. V. *et al.*: *Biochem. Pharmacol.*, **48**, 1310 (1994).
4) Dias, N. *et al.*: *J. Mol. Biol.*, **294**, 403 (1999).
5) Ardhammar, M. *et al.*: *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **17**, 33 (1999).
6) Bonham, M. A. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **23**, 1197 (1995).
7) Liang, K. W. *et al.*: *Mol. Ther.*, **1**, 236 (2000).
8) Branden, L. J. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **17**, 784 (1999).
9) Pooga, M. *et al.*: *Nat. Biotechnol*, **16**, 857 (1998).
10) Pardridge, W. M. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 5592 (1995).
11) Uhlmann, E.: *Biol. Chem.*, **379**, 1045 (1998).
12) Doyle, D. F. *et al.*: *Biochemistry*, **40**, 53 (2001).
13) Faruqi, A. F. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 1398 (1998).
14) Armitage, B. *et al.*: *Biochemistry*, **37**, 9417 (1998).
15) Wang, H. *et al.*: *Int. J. Oncol.*, **15**, 653 (1999).
16) Momand, J. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **26**, 3453 (1998).
17) Freedman, D. A. and Levine, A. J.: *Cancer Res.*, **59**, 1 (1999).
18) Barak, Y. *et al.*: *EMBO J.*, **12**, 461 (1993).
19) Chen, L. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 195 (1998).

NII-Electronic Library Service