

核酸医薬への応用を目指した  
inchworm 型ペプチド核酸の合成と機能評価

2021 年 7 月

濱下 優介

目次

**第1章 序論**

- 1-1. 遺伝子一塩基変異と人体への影響
- 1-2. 病気に対する現在の治療方法
- 1-3. 遺伝子を標的とする核酸医薬の作用機序
- 1-4. 人工核酸を用いた遺伝子発現制御
- 1-5. 細胞内輸送について
- 1-6. 本研究概要
- 1-7. 参考文献

**第2章 生体内温度で1塩基変異を認識する **inchworm** 型ペプチド核酸の合成**

- 2-1. はじめに
- 2-2. **i-PPc** の合成
- 2-3. 無細胞タンパク質発現系における遺伝子発現制御効果
- 2-4. **i-PPc** の1塩基認識機構の解明
- 2-5. **i-PPc** の設計について
- 2-6. 小括
- 2-7. 参考文献

**第3章 細胞膜透過型 **i-PPc** による細胞内での遺伝子発現制御**

- 3-1. はじめに
- 3-2. **i-PPc** の細胞内輸送挙動
- 3-3. シグナルペプチドを用いた **i-PPc** の細胞内輸送
- 3-4. **i-PPc(R<sub>9</sub>)** による1塩基の違いを認識した細胞内遺伝子発現抑制効果
- 3-5. 小括
- 3-6. 参考文献

**第4章 KRAS 遺伝子1塩基変異を標的とした治療戦略**

- 4-1. がん関連遺伝子における1塩基変異の重要性
- 4-2. 遺伝子の1塩基変異を標的とした治療薬に関する研究
- 4-3. 今後の展開
- 4-4. 参考文献

**第5章 KRAS 遺伝子1塩基変異を対象とした **PNA** 型人工核酸の合成**

- 5-1. はじめに
- 5-2. KRAS 遺伝子1塩基変異を対象とした **i-PPc** の塩基配列の決定
- 5-3. **i-PPc(R<sub>9</sub>)** による膵臓腺がん細胞の塩基配列依存的な細胞死評価

- 5-4. 細胞内遊離型 i-PPc を用いた膵臓腺がん細胞の塩基配列依存的な細胞死評価
- 5-5. 小括
- 5-6. 参考文献

## 第 6 章 三次元培養した膵臓腺がん細胞の R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc による細胞死評価

- 6-1. はじめに
- 6-2. 膵臓腺がん細胞のスフェロイド形成条件の策定
- 6-3. スフェロイド培養した膵臓腺がん細胞の R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc による細胞死誘導評価
- 6-4. 小括
- 6-5. 参考文献

## 第 7 章 総括

### Supplementary data

### 謝辞

# 第1章 序論

## 1-1. 遺伝子一塩基変異と人体への影響

1865年 G. Mendel によりエンドウ豆の観察実験から遺伝の法則が発見され、父母から優劣のある遺伝因子が1個ずつ子に伝わるのが遺伝であるという仮説が提唱された。この仮説から遺伝子の正体に関する研究が行われ、O. Avery *et. al.* によりデオキシリボ核酸 (DNA) が遺伝情報を伝達する<sup>1)</sup>こと、E. Chargaff により DNA の塩基組成についてアデニン (A) 残基とチミン (T) 残基が同数、グアニン (G) 残基とシトシン (C) 残基が同数であること<sup>2)</sup>が示された。その後 J. Watson と F. Crick により DNA の二重らせん構造モデル<sup>3)</sup>や F. Crick により DNA が相補的な伝令リボ核酸 (messenger RNA; mRNA) に転写され、その mRNA がタンパク質を構成するアミノ酸に翻訳されるという現在の分子生物学の基本原則 (セントラルドグマ) となっている。これらの研究から、生物にとって必要不可欠なタンパク質の合成には遺伝子の塩基配列が重要であることが証明された。塩基配列の重要性が提唱されて以降、1990年から2003年の間にヒトの全ゲノム 30 億塩基対の塩基配列が解読され遺伝子がマッピングされた過程の中で、異なるヒトの DNA 配列内に約 0.1% の「差異」が存在することが報告された<sup>4),5)</sup>。この「差異」は変異と呼ばれ、修復不可能な DNA の損傷や複製エラー、可動遺伝因子、核酸塩基の挿入や欠損、置換などが原因で生じることで遺伝子に多様性を与えることがわかった。さらに、その変異が特定の集団において 1% 以上の頻度で見られる場合には変異と区別して多型と定義されることとなった<sup>6)-8)</sup>。これらの遺伝子多型は、数塩基~数十塩基のくり返し配列の出現頻度が異なる反復配列多型 (variable number of tandem repeat; VNTR)、短いくり返し配列 (2~7 塩基) の反復回数が異なるマイクロサテライト多型 (short tandem repeat polymorphism; STRP)、ある特定の塩基配列において 1 塩基のみが変異する一塩基多型 (single-nucleotide polymorphism; SNP) 等に分類され<sup>9)</sup>、中でも SNPs はゲノム中に最も高い頻度で生じる多型で、ヒト DNA ではおよそ 1000 万箇所存在すると推定されるに至った。

SNP は約 1000 塩基対に 1 塩基対の割合で生じる多型であり、ほとんどの SNP は遺伝子間のジャンク領域に存在する (genomic SNPs; gSNPs) ため遺伝的な特徴の変化を生じさせないが、タンパク質の遺伝子領域に生じる SNPs は変異が起こる箇所によって、プロモーター領域に生じ遺伝子の発現量に変化を与える regulatory SNPs (rSNPs)、タンパク質のコード領域に生じて翻訳時にアミノ酸配列を変化させる coding SNPs (cSNPs) と変化させない silent SNPs (sSNPs)、タンパク質の翻訳に関与しないイントロン領域に生じる intron SNP (iSNPs) に分類される (Fig. 1-1)<sup>10)-13)</sup>。

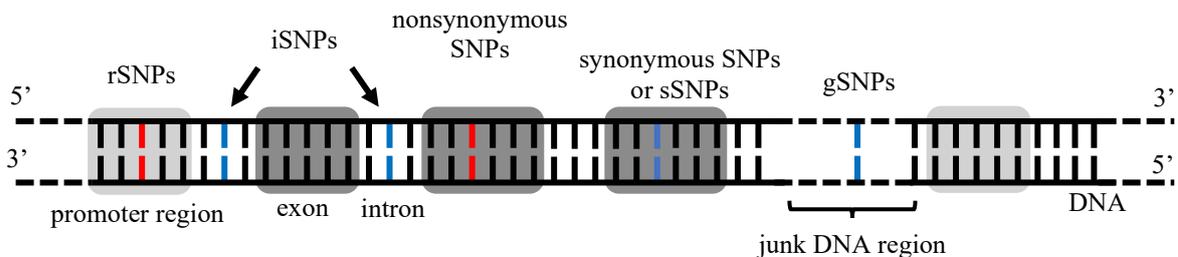


Fig. 1-1 遺伝子内に生じる SNPs の種類。

これらの SNP は、目や髪の色<sup>14)-17)</sup>、アルコール代謝能の違い<sup>13), 18), 19)</sup>など遺伝子の多様性による個性となり得る場合もあるが、高血圧<sup>20)</sup>、家族性アルツハイマー病<sup>21), 22)</sup>や鎌状赤血球貧血症<sup>20)</sup>などの遺伝子病、がん<sup>21)-31)</sup>やⅡ型糖尿病<sup>17), 24)</sup>などの疾病疾患<sup>7), 9)</sup>などの原因となることが明らかとなっている (Table 1-1)。例えば、鎌状赤血球貧血症は、ヘモグロビンの cSNP が原因と

Table 1-1 個性や疾病・疾患に関与する SNPs の一例。

遺伝子	アミノ酸変化 (1 例)	発現する体質の違いや疾病疾患
<i>OCA2</i>	Arg419Gln	目の色
<i>MC1R</i>	Arg151Cys, Arg160Trp	髪色, 日光への肌の感受性
<i>ADH2</i>	Arg48His	アルデヒドデヒドロゲナーゼ活性
<i>GRK4</i>	Arg65Leu, Ala142Val, Ala486Val	高血圧
<i>APOE4</i>	Cys112Arg	家族性アルツハイマー病
<i>CDKAL1</i>	no-change (iSNP)	Ⅱ型糖尿病
<i>HBB</i>	Glu6Val	鎌状赤血球貧血症
<i>CDKN2A</i>	Ala148Thr	急性リンパ球性白血病, 膵臓がん
<i>BRCA2</i>	Asp372His	乳がん, 子宮頸がん
<i>ERCC1</i>	Cys118Thr, Cys8092Ala	非小細胞肺癌
<i>SMAD7</i>	no-change (iSNP)	大腸がん, 肺がん, 胃がん
<i>KRAS</i>	Gly12Asp, Gly12Val, rSNP	膵臓がん, 大腸がん, 肺がん, 甲状腺がん

\* *OCA2*: Oculocutaneous albinism type 2, *MC1R*: Melanocortin 1 receptor, *ADH2*: Aldehyde dehydrogenase 2, *GRK4*: G protein-coupled receptor kinase 4, *APOE4*: Apolipoprotein E, *CDKAL1*: Cyclin-dependent kinase 5 regulatory subunit-associated protein 1-like 1, *HBB*: Hemoglobin beta, *CDKN2A*: Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, *BRCA2*: Breast cancer susceptibility gene 2, *ERCC1*: DNA repair excision repair protein, *SMAD7*: Mothers against decapentaplegic homolog 7, *KRAS*: Kirsten rat viral oncogene homolog

なり赤血球が鎌状に変化して生じる重篤な貧血症である。ヘモグロビンは  $\alpha$  サブユニットと  $\beta$  サブユニットのそれぞれ 2 つからなる 4 量体構造を形成しており、各サブユニットに 1 個結合したヘムが酸素と結合して血液中に酸素を供給する役割を果たしている。この  $\beta$  サブユニット遺伝子 (*HBB*) に変異 (E6V) が生じるとヘモグロビンが重合して赤血球を鎌状化 (Fig. 1-2) し、赤血球内低酸素による溶血発作や血管閉塞などを引き起こす。早期診断の重要性から、近年では新生児の普遍的スクリーニングプログラムが実施されている<sup>32)</sup>。

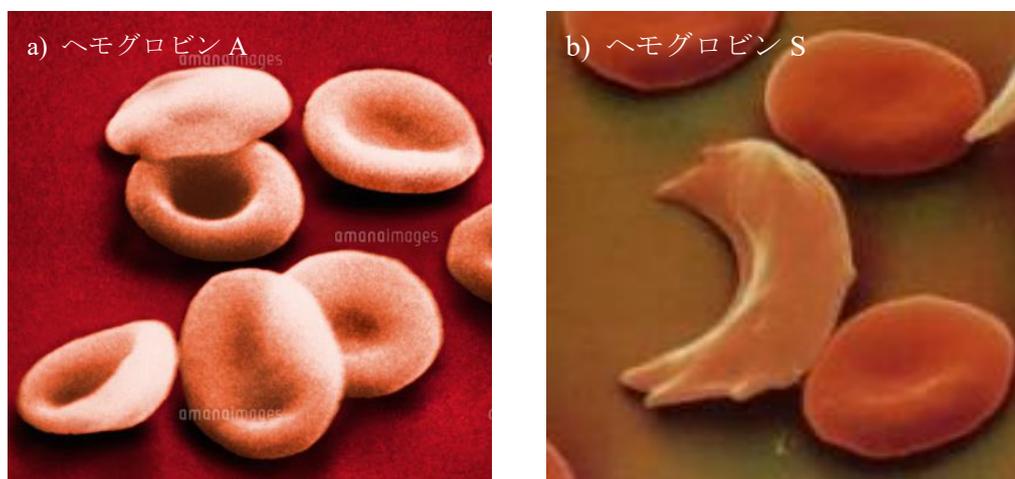


Fig. 1-2 a) 正常な赤血球ならびに b) 鎌状赤血球の画像。  
(a: アマナ株式会社 HP, b: 生物基礎 HP より引用)。

このような SNP による直接的な疾病疾患の発症のみならず，病気に対する治療薬の副作用や薬剤応答性の違いの原因にもなることが多数報告されている<sup>33)-35)</sup>．一例として，急性リンパ性白血病は白血球の 1 種であるリンパ系幹細胞が骨髄やそのほかの臓器において染色体異常などによりがん化し正常な機能を持たない白血球が異常に増殖する疾患である．この治療には，DNA 合成酵素に取り込まれることでイノシン酸がアデニル酸とグアニル酸に変換されることを阻害 (DNA 合成阻害) するプロドラッグ化 6-メルカプトプリンが投薬されているが，チオプリン S-メチルトランスフェラーゼ遺伝子に cSNPs が存在するとプロドラッグ化 6-メルカプトプリンの毒性代謝物 (2'-deoxy-6-thioguanosine 5'-triphosphate) を不活性化できず，骨髄抑制など重篤な副作用を引き起こすことが知られている<sup>12)</sup>．

遺伝的多様性の中でも最もありふれた SNP は，進化の過程において生物が環境変化に対応するために多様性に富んだ個体を残すための手段の一つであったかもしれない．しかしながら，進化の過程や親からの遺伝，さらにはその個体が生存過程で生じる SNP は時として生命に関わる大きな疾病・疾患を引き起こす原因ともなり得るだけでなく，間接的な問題点を引き起こす場合がある．このような SNP に対して，網羅的な遺伝子解析だけでなく，疾病・疾患の作用機序を理解した上での新たな治療法の開発が必要不可欠となっている．

## 1-2. 病気に対する現在の治療方法

先に示した多様な SNP が原因となる疾病・疾患に対する治療薬として，これまで低分子治療薬，抗体医薬，核酸医薬について研究され，そのいくつかは実用化されている．生体への作用機序を踏まえ，各治療薬の概略を以下に示す．

### 1-2-1. 低分子治療薬

基本的に，多くの低分子化合物はタンパク質や核酸などの標的に結合し，それらの機能を阻害することで薬効を示す．低分子治療薬は分子量が小さいため細胞膜透過性や脳内関門透過性，核膜透過性を示し，細胞内外や細胞膜表面に存在するタンパク質，DNA，RNA など幅広い分子を標的にできることを特徴とする．また，主に化学合成により製造されるため，製造コストが低くかつ代謝安定性の向上や立体構造の制御など目的に合わせた分子設計が可能であり，その用途は広い．この他にも経口や吸入投与など多様な投与方法が適応できる一方で，高い細胞膜透過性や低い標的特異性は副作用の原因となり，治療薬として認可されにくいといった欠点も併せ持つ<sup>36)-38)</sup>．そのため，最新のスクリーニング技術と化学ライブラリを利用した標的特異性の高い化合物の探索と構造決定が図られている<sup>39)</sup>にもかかわらず，治療薬として実用化される低分子化合物の数はそれほど増加していないのが実状である<sup>40)</sup>．

### 1-2-2. 抗体医薬

抗体は生体内において細胞外から侵入したウイルスや病原菌を除去する免疫機構の中で生産され，特定の抗原のエピトープに結合し作用する．この抗体を治療薬に応用した抗体医薬は細胞外タンパク質や細胞膜表面のタンパク質を標的として主にシグナル伝達の抑制に使われているだけでなく，低分子治療薬などの細胞毒性物質の輸送にも用いられる．抗体医薬品は主に単一細胞から作られた抗体 (モノクローナル抗体) が用いられ，その中でもアレルギー反応の低下を目的として遺伝子改変された完全ヒト型モノクローナル抗体が多用されている．抗体医薬は低分子化合物と比較して標的特異性が高く，副作用が低いことや *in vivo* における安定性が高いことがメリットである<sup>37)</sup>．その一方で，分子量が大きいため細胞膜を透過できず細胞内タンパク質

を標的にできないことや製造コストが高価であることなどの問題を抱えている<sup>37)</sup>。また、抗体医薬が直接的な原因とはならないが、大腸がんの治療に用いられる抗 EGFR 抗体薬が特定の遺伝子変異によって薬効が著しく低下する場合 (第 4 章で詳細に述べる) があり、新しい治療方法の開発が必要とされている。近年では、抗体と薬物を複合化した抗体医薬複合体 (antibody drug conjugate; ADC) が開発され<sup>41)</sup>、抗体と低分子化合物各々の機能を併せもつ副作用の少ない医薬品として期待されている。

### 1-2-3. 核酸医薬

核酸医薬はオリゴ核酸で構成される中分子医薬品で、核酸やタンパク質等の幅広い分子に対して高い特異性を持つ治療薬である。タンパク質に結合し作用する核酸医薬には、細胞外または細胞膜表面のタンパク質に結合し細胞内のシグナルを阻害する 1 本鎖の DNA または RNA であるアプタマー、細胞内のタンパク質 (転写因子; NF $\kappa$ B) に結合し転写を阻害する 2 本鎖 DNA のデコイ核酸<sup>42),43)</sup>、エンドソーム内の受容体 (Toll-like receptor) に結合し自然免疫を活性化する 1 本鎖 DNA の CpG オリゴヌクレオチドが挙げられる (Fig. 1-3)<sup>44)</sup>。これらのタンパク質を標的とする核酸医薬は、作用機構上、多くの制限や問題点が伴う。例えば、アプタマーは遺伝子変異を有する患者の治療ができないこと、デコイ核酸は標的とするタンパク質が制限されかつ細胞内輸送効率が低いこと、CpG オリゴヌクレオチドは配列内のシトシンの 5 位がメチル化されることで免疫活性作用が抑制される<sup>45)</sup>などの点が挙げられ、以降の研究展開を狭めることとなった。

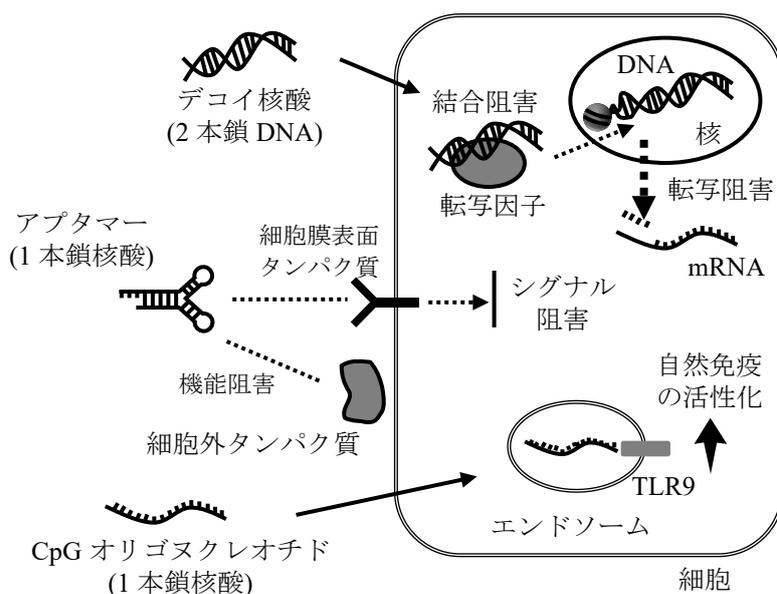


Fig. 1-3 タンパク質を標的とした核酸医薬の作用機構.

一方で、DNA や RNA を標的として疾病・疾患などの原因となるタンパク質の発現を直接抑制できる核酸医薬は、生体内安定性、ターゲティングトランスフェクト、細胞内や組織への局在化や off-target 効果など解決すべき課題が多く残っているものの、遺伝子の 1 塩基変異に対応できる可能性を秘めている。

### 1-3. 遺伝子を標的とする核酸医薬の作用機序

遺伝子の発現を抑制する方法として、核内の DNA を対象とした mRNA への転写を阻害するアンチジーン法、RNA を対象としたタンパク質への翻訳を阻害するアンチセンス法や RNA 干

渉 (RNAi) が挙げられる (Fig. 1-4). 核酸医薬はこれらの機構を経て対象となるタンパク質の発現を抑制し、医薬として効果を発揮する.

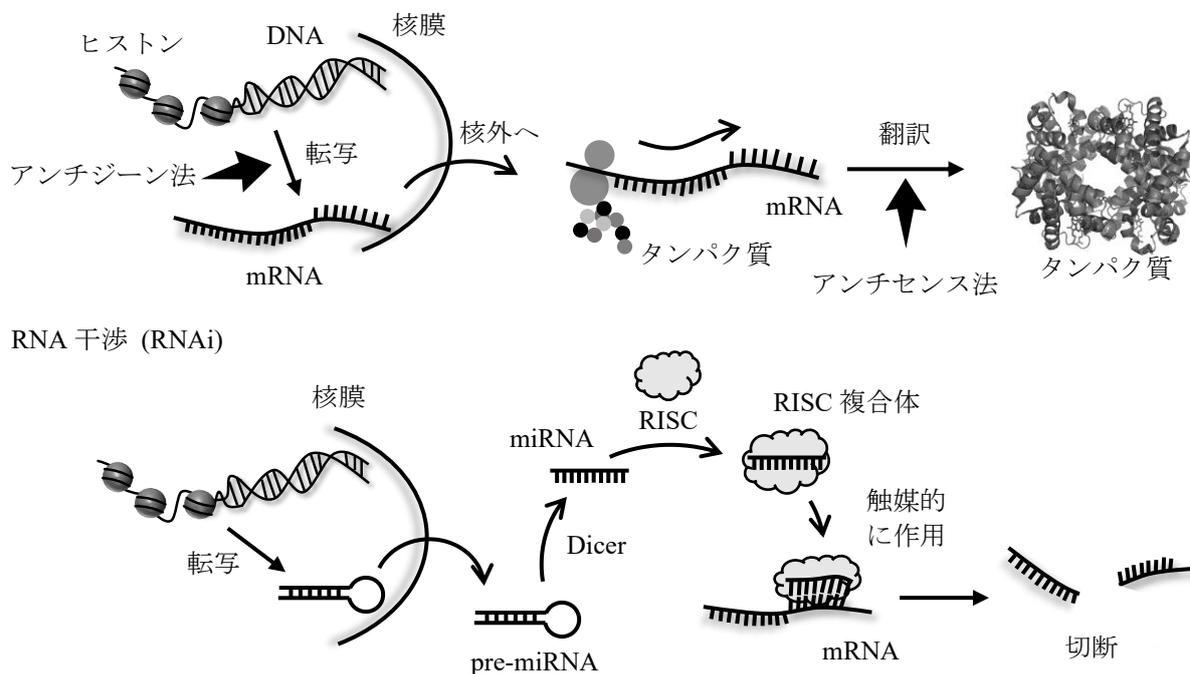


Fig. 1-4 遺伝子を標的とした核酸医薬の作用機構の概要.

アンチセンス法<sup>46)</sup>とは、核酸医薬が DNA と三重鎖 (triplex) を形成することで転写過程を阻害する、最も効率的な遺伝子の発現抑制法である。一方で、核内輸送法の確立やクロマチン構造へのターゲティング、三重鎖形成 (Hoogsteen 塩基対) に必要な塩基配列の制限など、用法は困難で限定される。このような状況の中で、1997年 P. B. Dervan *et. al.* は、pyrrole (Py)-imidazole (Im) polyamide が配列特異的に二本鎖 DNA を認識することを報告した (Fig. 1-5)<sup>47)</sup>。さらに、この Py-Im (PI) polyamide と *seco*-1,2,9,9a-tetrahydrocyclopropa[1,2-*c*]benz[1,2-*e*]indol-4-one (CBI) の併用により 1 塩基変異した KRAS 遺伝子の DNA をアルキル化して大腸がん細胞の細胞死を誘導するだけでなく、大腸がんモデルマウスの腫瘍を縮小させた点<sup>48)</sup>は興味深い。一方で、この PI polyamide は imidazole と G 残基、pyrrole と A, T, C 残基が相補鎖を形成するため、任意の 1 塩基変異を認識するには至っていない。

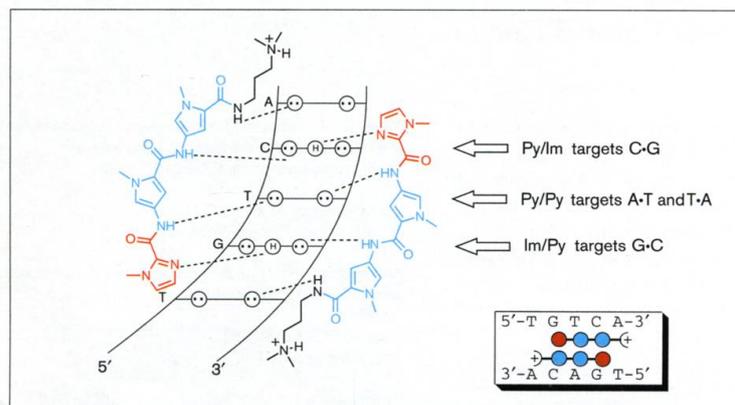


Fig. 1-5 Py-Im polyamide の dsDNA への相補鎖形成モデル. (S. White *et. al.*, *Chem. Biol.*, 4(8), 569-578 (1997) より引用)

アンチセンス法は、人工核酸を用いて標的とする mRNA や pre-mRNA, miRNA と相補鎖を形成させることで翻訳過程を阻害し遺伝子の発現を制御する方法である。ヌクレオチド型の人工核酸 (antisense oligonucleotide; ASOs) を用いた際の作用機構は、1) 標的とする mRNA に結合し ribosomal RNA (rRNA) による翻訳を物理的に阻害する立体障害型、2) mRNA と相補鎖を形成した後 DNA/RNA 二本鎖の RNA を切断する RNA 分解酵素 (Ribonuclease H; RNaseH) により RNA 自体分解する RNA 分解型、3) pre-mRNA と結合し、スプライシングを促進あるいは抑制するスプライシング因子と pre-mRNA との結合を阻害することで mRNA に取り込まれるエクソンを選別するスプライシング制御型、4) miRNA と結合し、miRNA と mRNA の結合を阻害して遺伝子の発現を制御する miRNA 阻害型、など多様な作用機構が存在する (Fig. 1-6)。これらの作用機序を利用したアンチセンス医薬品は、標的とできる塩基配列が幅広いことから実用化されている核酸医薬品 (9 品目) の中で最も多く (6 品目)、研究も盛んに行われている<sup>49)</sup>。いずれも従来の核酸の問題点であった生体内安定性や細胞内輸送効率の低さの改善と標的 RNA への塩基配列特異性および親和性の向上を目指した人工核酸が用いられている。その一方で、核酸への高い親和性は off-target 効果を引き起こす可能性があり、1 塩基変異のある遺伝子のみでの発現抑制を指向した核酸医薬の開発が必要となる。

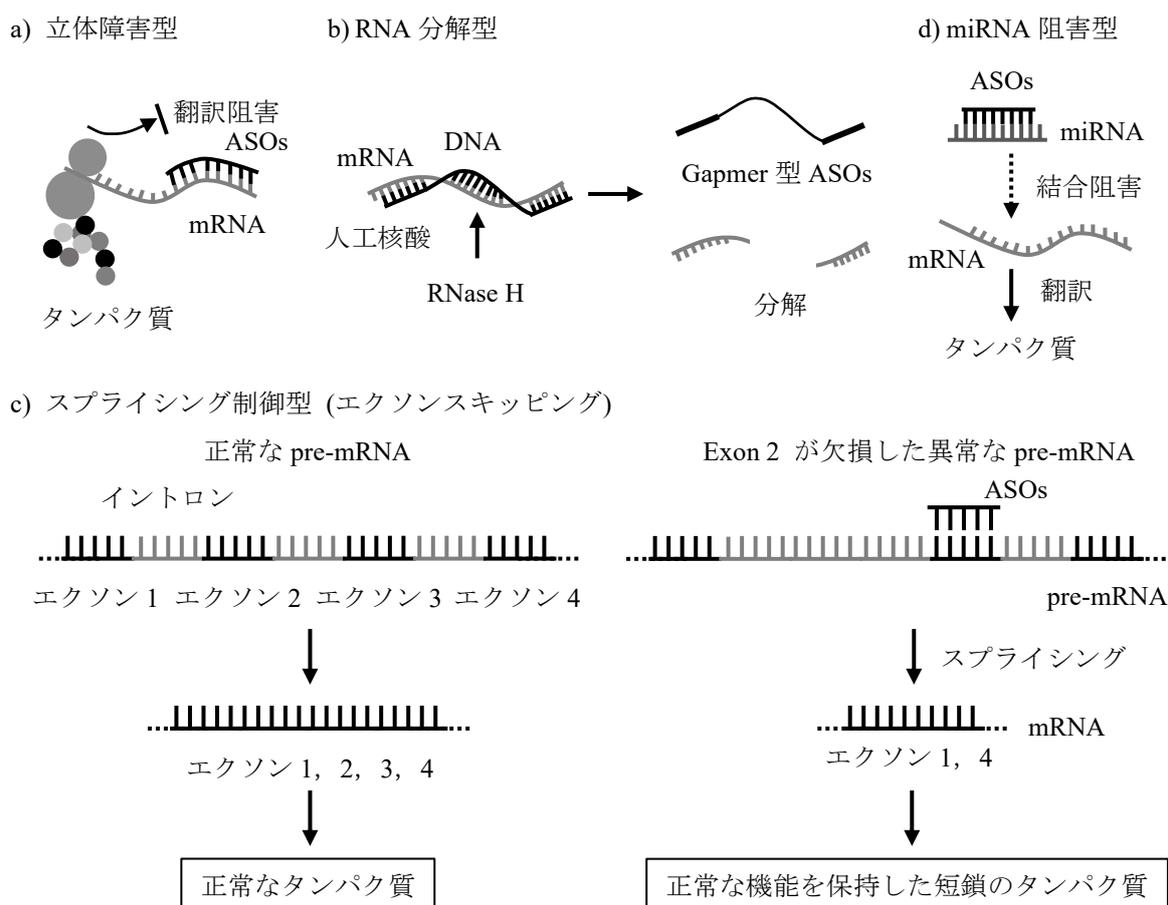


Fig. 1-6 遺伝子を標的としたアンチセンスオリゴヌクレオチドの作用機構。

RNAi とは、RNA 誘導サイレンシング複合体 (RISC) に取り込まれた短鎖 RNA が mRNA に結合して切断することで遺伝子の発現を抑制する機構である<sup>50)</sup>。短鎖 RNA には、外来二本鎖 RNA が分解され mRNA の塩基配列と完全に一致する siRNA, あるいは細胞内で生産される 1 本鎖

RNA で mRNA と部分的に一致する miRNA が利用される<sup>51)</sup>. miRNA は, 5'末端の 2-8 塩基 (seed 配列) と標的 mRNA 内の 3'-非翻訳領域との相補鎖形成により標的を認識する. この seed 配列が短いため miRNA では多数の mRNA を標的とすることができる一方で, siRNA では off-target 効果の原因となる<sup>52)</sup>. この他にも, siRNA は seed 配列以外のアンチセンス鎖 (guide strand) の 1 塩基認識能が低いことやセンス鎖 (passenger strand) が RISC に取り込まれることも off-target 効果を引き起こす原因となる<sup>53),54)</sup>. このため用いることができる塩基配列は限られているが, 塩基配列によっては触媒的に mRNA を切断できるため高い遺伝子発現抑制効果が期待できる. 2001 年 S. M. Elbahir らにより, はじめて哺乳類細胞で 21 塩基対の二本鎖 RNA を用いて RNAi による遺伝子発現抑制が報告され<sup>55)</sup>, 2018 年には家族性トランスサイレチンアミロイドーシスの治療薬として世界初の siRNA 医薬品 (patisiran) が開発された<sup>56),57)</sup>. この patisiran はトランスサイレチン mRNA の 3'-非翻訳領域を標的とした siRNA を脂質ナノ粒子で内包した核酸医薬であり, 同遺伝子を標的としたアンチセンス試薬<sup>58)</sup>よりも優位に抑制することが可能となった.

遺伝子を標的とする核酸医薬は遺伝機構を制御する根本的な治療戦略であり, 原理的には SNP に対応できる次世代医薬品として期待が高まっている. 一方で, 30 億塩基対の中の特定の SNP を標的とするためには塩基配列特異性の向上が必要不可欠であり, 天然核酸の課題解決や機能向上を目的とした人工核酸の開発が重要となる.

#### 1-4. 人工核酸を用いた遺伝子発現制御

##### 1-4-1. ホスホロチオエート型オリゴヌクレオチドを用いた遺伝子発現制御

DNA や RNA は, 糖 (デオキシリボースまたはリボース), リン酸部位, A, T(U), G, C の核酸塩基で構成される (Fig. 1-7 a). RNA への安定な相補鎖形成, 塩基配列依存性, ヌクレアーゼ耐性の向上を目的としてリン酸部位や糖を化学修飾した様々な人工核酸が研究されている.

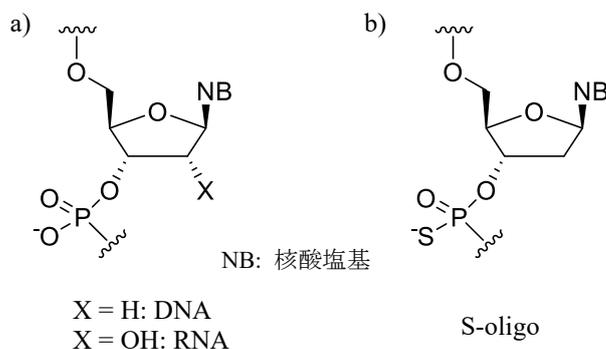


Fig. 1-7 a) DNA または RNA, b) S-oligo の化学構造.

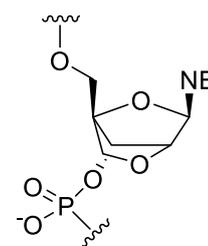


Fig. 1-8 LNA の化学構造.

DNA のリン酸部位の O 原子を S 原子に置換 (S 化) したホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド (S-oligo, Fig. 1-7 b) は, 細胞内輸送効率の向上やヌクレアーゼ耐性の向上<sup>59),60)</sup>がみられ, サイトメガロウイルスの mRNA を対象としたアンチセンス試薬 (Fomivirsen) が 1998 年に商品化された. また 2000 年 V. B. Kumar *et. al.*は, アルツハイマー病の原因タンパク質の一つである アミロイド β (Aβ) の mRNA を標的とした 42 塩基対の S-oligo を用いてアミロイド前駆体タンパク質の発現を老化促進モデルマウス内の扁桃体で 43%, 中隔野で 66%, 海馬で 68%程度抑制できることを報告した<sup>61)</sup>. しかし S 化により立体異性体が生じ, ヌクレアーゼ耐性や核酸との

相補鎖形成に影響を与えるものの、合成過程における立体異性体の単離が困難であること<sup>62),63)</sup>や様々なタンパク質に非特異的に吸着すること (off-target 効果)<sup>64)</sup>, S 原子の立体障害により DNA との相補鎖が不安定化<sup>62-64)</sup>した結果、塩基配列特異性が低下する<sup>65)</sup>ことが課題であった。

#### 1-4-2. 架橋型オリゴヌクレオチドを用いた遺伝子発現制御

1997 年 Y. Imanishi *et. al.*は、核酸の糖の持つ立体配座 (N 型および S 型) の揺らぎを固定することを目的として天然 RNA の 2'位の O 原子と 4'位の C 原子をメチレン基で架橋した架橋型人工核酸 (bridged nucleic acid; BNA) と呼ばれる RNA アナログを開発した<sup>66), 67)</sup> (Fig. 1-8). 2',4'-BNA (LNA) は N 型コンフォメーションを形成するため (Fig. 1-9 a), エントロピーの損失が抑制されることで相補的な DNA または RNA とより安定な相補鎖を形成することができる<sup>68)</sup>. このため LNA は DNA と比較して 1 塩基変異の認識能が高いことも報告されており<sup>69)</sup>, SNP 解析等に利用されている<sup>70-72)</sup>. 一方で, LNA オリゴマーでは  $T_m$  値が高く生体内での 1 塩基変異の認識は困難であるため, DNA とのキメラオリゴヌクレオチドとして生体内で利用されている<sup>73)</sup>. 一例として, ホタルルシフェラーゼ遺伝子を標的とした 27 mer BNA-DNA キメラオリゴヌクレオチドが, ウミシイタケルシフェラーゼの発現を抑制することなくホタルルシフェラーゼの発現を 80%程度抑制することを報告した. また S-oligo で観測された scramble 配列における両ルシフェラーゼの発現抑制は観測されなかったことから, キメラオリゴヌクレオチドが塩基配列特異的なアンチセンスとして利用できることが示された (Fig. 1-9 b)<sup>65)</sup>.

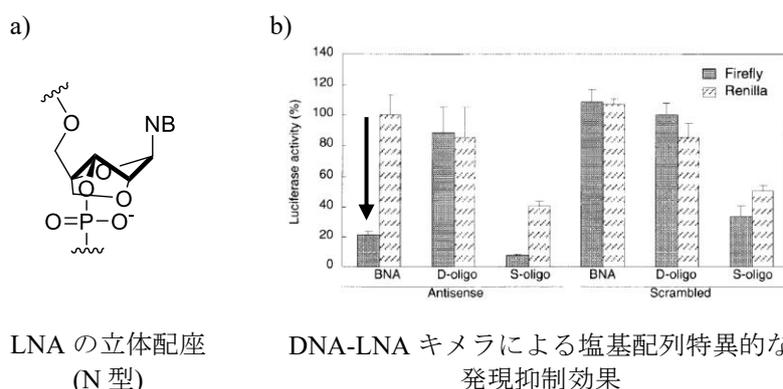


Fig. 1-9 a) LNA の N 型立体配座の化学構造ならびに b) DNA-LNA キメラによる発現抑制効果 (今西 武, 小比賀 聡, *日薬理誌*, **120**, 85-90 (2002) より引用).

この他にもアンチセンス DNA の両末端に LNA を配した Gapmer 型 ASOs による配列依存的な遺伝子発現抑制に関する研究が行われているが<sup>74)-76)</sup>, 1 塩基認識能が低いため ( $\Delta T_m = 6.1^\circ\text{C}$ ) に標的箇所との相補鎖形成を制御できず, RNase H による mRNA の切断は誘起されていない. 一方で, これらの LNA-DNA キメラオリゴヌクレオチドが容易に細胞内に取り込まれアンチセンス効果を誘起すること<sup>74), 77)</sup>や, LNA 修飾した siRNA (siLNA) は, siRNA の安定性を向上させ off-target 効果を抑制することが報告されており<sup>78)</sup>, 多方面での LNA を用いた研究が行われている. このような核酸のリン酸部位や糖部位の化学修飾だけでなく, 核酸の基本骨格を置換された人工核酸も開発されている.

#### 1-4-3. リン酸ジエステル結合を置換した人工核酸を用いた遺伝子発現制御

1968 年 M. H. Halford *et. al.*によってカルボシキメチルエステル結合で架橋したヌクレオチドアナログが合成され<sup>79)</sup>, その後 G. J. Cowling *et. al.*によりポリヌクレオチド化した核酸類似体が塩

基配列特異的に transfer RNA (tRNA) のリボソームへの結合を阻害することで、細胞内でタンパク質の合成を抑制することが報告された<sup>80)</sup>。また 1978 年 J. Pitha *et. al.*により設計されたビニルポリマーの側鎖にアデニン塩基を配したポリビニルアデニンは、特異性が低く完全な Watson-Crick 塩基対を形成することができなかったが、ウイルスの複製を阻害<sup>81)</sup>でき抗ウイルス剤として利用できる可能性がある。このような人工核酸の中で DNA や RNA と安定に相補鎖を形成でき 1 塩基変異を認識できる可能性がある人工核酸の一つに 1991 年 P. E. Nielsen *et. al.*により開発されたペプチド核酸 (PNA) がある<sup>82)</sup>。

PNA は、N-(2-aminoethyl)glycine を基本骨格としバックボーンに電荷をもたない人工核酸である (Fig. 1-10 a)。PNA は DNA または RNA と塩基配列依存的に安定な相補鎖を形成し、その安定性は DNA/DNA または DNA/RNA のそれと比較すると高く、塩濃度による影響を受けにくい特性を持っている<sup>83)</sup>。また、1 塩基の違いが  $T_m$  値に大きく反映されることから、例えば神経変性疾患の原因となるタウタンパク質の 1 塩基変異を検出するプローブ<sup>84), 85)</sup>や KRAS 遺伝子内の 1 塩基変異を検出するための PCR への利用など、SNP を標的とした研究が展開されてきた<sup>86), 87)</sup>。

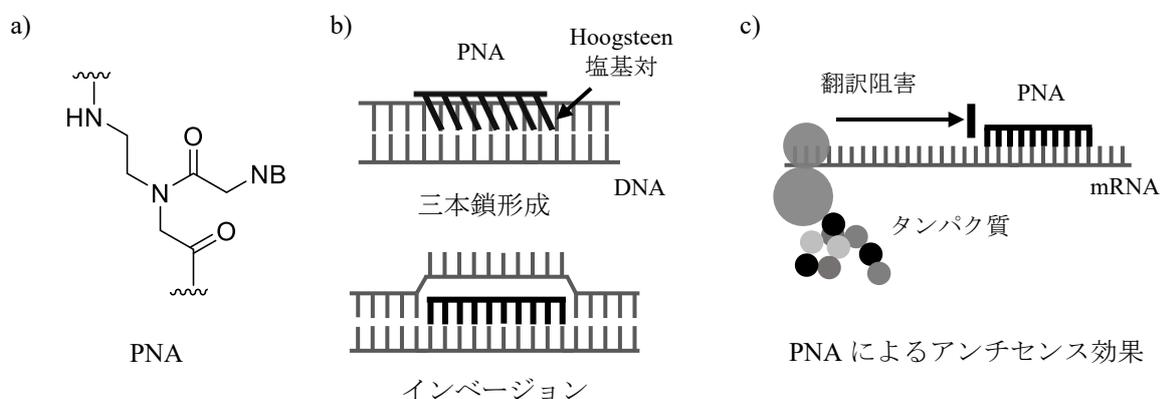


Fig. 1-10 PNA の a) 化学構造, b) DNA への結合形式および c) 立体障害型のアнтиセンス効果。

この他にも、PNA はヌクレアーゼやプロテアーゼに対する耐性<sup>88)</sup>や Hoogsteen 塩基対を介した二本鎖 DNA へのインベージョン (Fig. 1-10 b) により転写を阻害することが示され、アンチジェンとして利用できる可能性も示唆された<sup>82), 89)</sup>が塩基配列に制限があることから特にアンチセンスとしての研究が行われている (Fig. 1-10 c)。

P. E. Nielsen *et. al.*は急性骨髄性白血病に関連する融合遺伝子 PML/RAR $\alpha$ 遺伝子の開始コドン領域に相補的な 2 種の 15 mer PNA と非翻訳領域 (5'-UTR) に相補的な PNA を合成し、*in vitro*での翻訳阻害効果について報告した<sup>90)</sup>。また同年 L. Good *et. al.*は、*Escherichia coli* の  $\beta$ -galactosidase および  $\beta$ -lactamase 遺伝子を標的とした 15 mer PNA を用いて *in vitro* および *E. coli* 内における塩基配列依存的なタンパク質の発現を抑制できることを報告した<sup>91)</sup>。これらの *in vitro* における PNA のアンチセンス効果だけでなく、細胞内におけるアンチセンス効果についても報告されている。1992 年 J. C. Hanvey *et. al.*はアミアンウイルス 40 (SV40) T 抗原の塩基配列に相補的な 15 mer および 20 mer PNA を合成し、マイクロインジェクションにより線維芽細胞内に PNA を導入した結果、20 mer PNA を導入した細胞で 50%程度の T 抗原遺伝子の発現が抑制されることを報告した<sup>92)</sup>。この他にも電圧ポレーション法を用いて導入したジストロフィン mRNA のエクソスキッピングを目的とした PNA が *in vivo* でアンチセンス効果を誘起することが報告された<sup>93)</sup>。さらに M. Boules *et. al.*は、アルツハイマー病の原因となる A $\beta$ を産生するアミロイド前駆

体タンパク質 (APP) の mRNA を標的とした 15 mer PNA とその塩基配列の 5 塩基を変化させた mismatches 型 PNA (PNA<sub>MM</sub>) を合成し APP 過剰発現マウス内にインジェクションした結果、PNA<sub>MM</sub> においても APP の発現抑制がみられているものの相補鎖を形成する PNA で最大 90% の APP の発現が抑制されていることを報告した<sup>94)</sup>。これらの報告により、PNA が本来の天然核酸の持つ機能を高めた人工核酸であり、アンチセンスとして利用できることが証明された。一方で、PNA をアンチセンスとして生体内で利用するためには、オリゴマーの長鎖化に伴う水溶性の低下とそれによる非特異的な吸着や凝集、高い相補鎖安定性による生体内での 1 塩基認識能の低下、PNA のバックボーンの剛直性が高いことによる配向性の低下、細胞膜透過性が低い<sup>95)</sup>ことなどの課題を解決する必要がある。これらの課題の解決を目的として 4-aminopropyl 型や aminoethylpropyl 型、cyclohexan 型、glycol 型などの PNA 類縁体<sup>96)</sup>やバックボーンの $\alpha$ 位や $\beta$ 位、 $\gamma$ 位に置換基を導入し不斉性を向上した様々な PNA 誘導體、細胞内輸送効率の向上を目的として膜透過ペプチド (CPP) などを付加した PNA 複合体が報告されている。

#### 1-4-4. PNA 誘導體および複合体による遺伝子発現制御

2006年P. Zhou *et. al.*は、PNAバックボーンの $\alpha$ 位にグアノジノ基を導入した guanidine-based peptide nucleic acid (GPNA) を合成した (Fig. 1-11 b)。さらにD体のバックボーンを有するGPNAを導入することで、従来のPNAと同程度の1塩基変異認識を維持しつつ細胞内輸送効率を向上させることを報告した。その一方で、GPNAを配列内に隣接させた際に、ストランド内の静電的反発や立体障害により相補鎖形成温度が減少することを報告した<sup>97)</sup>。このGPNAを用いてA. D. Andradi *et. al.*は、E-カドヘリン遺伝子の転写開始部位を標的としたGPNAを導入したPNAオリゴマーがCPP-PNA conjugateと比較して両親媒性が低く細胞毒性が低いことや細胞内でE-カドヘリン遺伝子の発現を配列依存的に抑制できることを報告した<sup>98)</sup>。しかし、mismatches部位を16塩基中3塩基も導入しており、1塩基の違いを認識するまでには至っていない。

D. H. Ly *et. al.*は、PNAの水溶性や生体適合性の向上、剛直性の改善を目的として $\gamma$ 位に親水性の (*R*)-diethylene glycol (*R*-MP) を導入した<sup>(R)</sup>-MP $\gamma$ PNA (Fig. 1-11 c) を合成し、組み込んだPNAオリゴマーが右巻らせん構造を形成しDNAやRNAと配列依存的かつ安定に相補鎖を形成できること、水溶性が向上し凝集が減少することを報告した<sup>99)</sup>。さらに13-20 merの<sup>(R)</sup>-MP $\gamma$ PNAを用いて二本鎖DNAへのインベージョンについて検討した結果、二本鎖DNA内の1塩基変異を高度に認識しインベージョンできることを報告<sup>100)</sup>し、<sup>(R)</sup>-MP $\gamma$ PNAがアンチジーン試薬として利用できる可能性を示した。これらのようなPNAの課題解決を目的としてバックボーンを化学修飾したPNA誘導體に関する研究により、PNAのバイオアベイラビリティは向上している。一方で、PNA誘導體は、不斉点が発生するため異性体の単離など合成の煩雑さや相補鎖形成への影響を検討する必

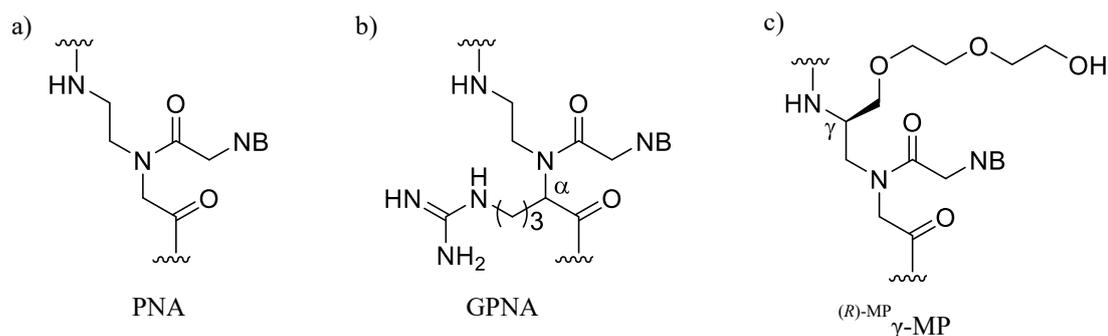


Fig. 1-11 バックボーンを化学修飾した PNA 誘導體の化学構造。

要があるなど、PNAの機能化に関する研究が現在も進められている。

PNA はペプチド固相合成と類似したスキームで合成される。このため固相表面上で膜透過ペプチド (CPP, 後述) などの機能性分子を比較的容易に付加することができる。J. Oehlke *et. al.*は、ノシセプチン/オルファミン FQ 受容体の mRNA を標的とした 12 mer PNA の C 末端に細胞膜透過性を有する $\alpha$ -ヘリックス両親媒性モデルペプチド MAP (KLALKLALKALKAALAKA) を配した PNA-MAP conjugate と PNA の塩基配列中の 5 塩基をシャッフルした PNA-MAP (scrambled) conjugate を合成した。これらを新生児ラット心筋細胞 (CM) およびチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞にトランスフェクションした結果、PNA-MAP conjugate が MAP をコンジュゲートしていない naked PNA と比較して 3 倍以上多く取り込まれることを報告した<sup>101)</sup>。また naked PNA をトランスフェクトした CM の心拍数は 50%減少したのに対し、PNA-MAP conjugate をトランスフェクトした CM では 90%の心拍数の低下がみられた。Scrambled PNA-MAP をトランスフェクトした CM では心拍数の減少はみられなかったことから、PNA-MAP がより効率的かつ塩基配列依存的にノシセプチン/オルファミン FQ 受容体の発現を抑制できることを示した<sup>101)</sup>。この他にもヒト免疫不全ウイルス由来 Tat ペプチドを付加した Tat-PNA conjugate による細胞内輸送や配列依存的な遺伝子発現制御が報告されている<sup>102)</sup>。

膜透過ペプチド以外にも P. E. Nielsen *et. al.*は、HeLa pLuc705 細胞のルシフェラーゼ pre-mRNA 内のグロビンイントロン (異常なスプライシング部位) を標的とした 18 mer PNA と 2 塩基のミスマッチ部位を導入した PNA<sub>MM</sub> の N 末端に glutamine phosphate あるいは lysine bis-phosphate を配した phosphate-PNA conjugate を合成した結果 (Fig. 1-12 b, c), サイトゾルおよび核内に効率的に輸送され配列特異的なアンチセンス効果 (splicing correction) を誘導したことを報告した<sup>103)</sup>。さらに P. E. Nielsen *et. al.*は、上述した 18 mer PNA の N 末端にコレステロールおよびコール酸で化学修飾した PNA を合成した結果 (Fig. 1-12 d, e), LipofectAMINE2000 を用いた HeLa pLuc705 細胞内への輸送効率が向上することや配列依存的なアンチセンス効果がみられることを報告し

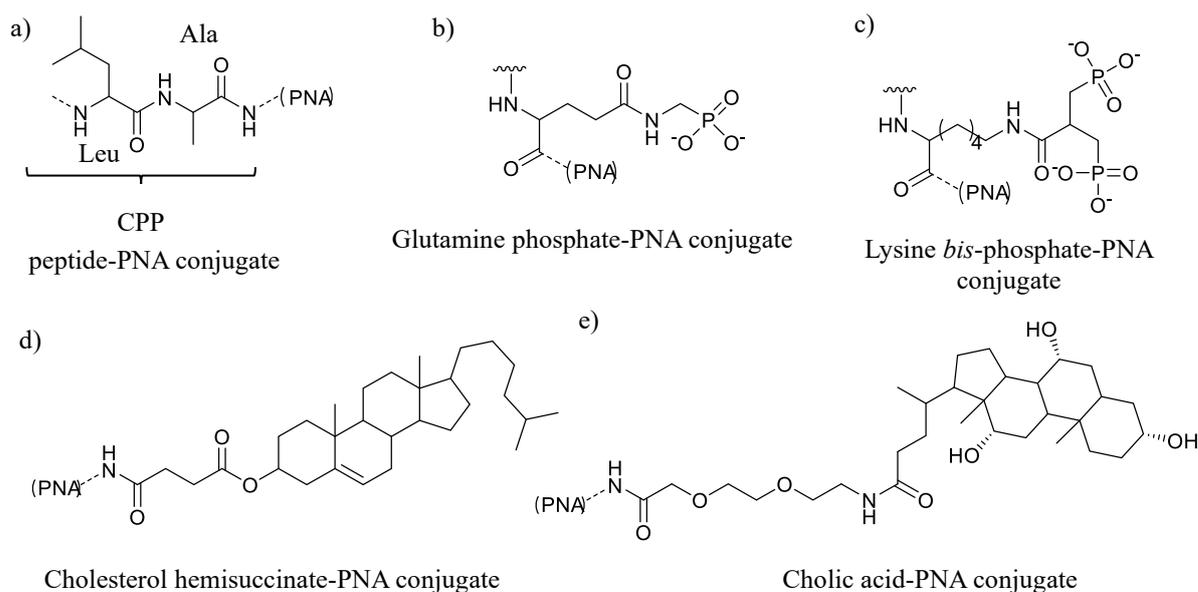


Fig. 1-12 PNA 複合体の化学構造。 a) peptide-PNA conjugate, b) and c) phosphate-PNA conjugate, d) cholesterol-PNA conjugate, e) cholic acid-PNA conjugate.

た (Fig. 1-13). またコール酸をコンジュゲートした PNA は、水溶性の向上に伴い効率的な細胞内輸送が可能となること、細胞膜表面への PNA/脂質複合体の蓄積が取り込み機構に寄与することを併せて報告した<sup>104)</sup>. このように、PNA は目的に応じてバックボーンの化学修飾や機能性分子の付加など比較的容易であることからそのバリエーションは多く、PNA を生体で治療薬として利用していくために化学修飾は必要不可欠であると考えられる。

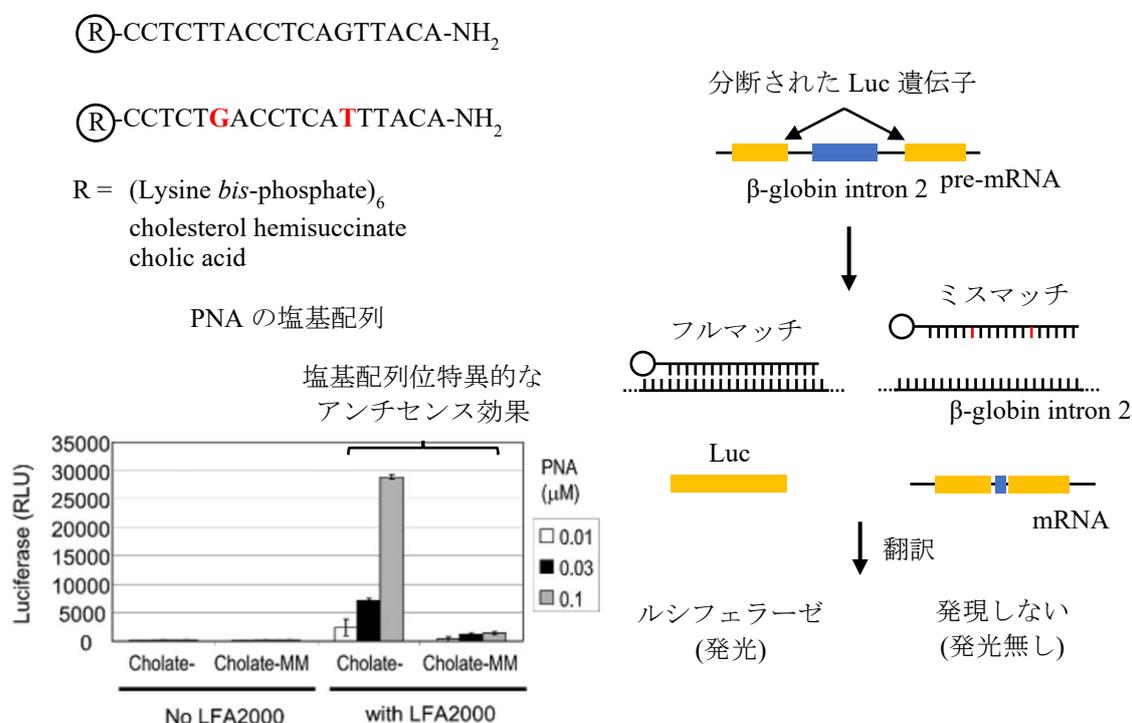


Fig. 1-13 Cholesterol hemisuccinate PNA conjugate による塩基配列特異的なアンチセンス効果 (splicing correction). (アンチセンス効果の図は, T. Shiraishi and P. E. Nielsen, *Bioconjugate Chem.*, **23**, 196-202 (2012) より引用)

天然核酸の糖—リン酸骨格を置換した PNA は、1 塩基変異に対応したアンチセンスとして利用できる可能性がある。そのため、PNA の課題解決に向けた様々な PNA 誘導体や複合体が研究されており、PNA のバイオアベイラビリティの向上が図られている。一方で、これまで配列依存的なアンチセンス効果が報告された PNA のミスマッチ配列は、12 塩基中 9 塩基<sup>101)</sup>、15 塩基中 5 塩基<sup>94)</sup>、16 塩基中 3 塩基<sup>98)</sup>、18 塩基中 2 塩基<sup>103),104)</sup>を変化させており、1 塩基のみを変異させたミスマッチ型との比較はほとんどの論文で報告されていない。これは、PNA の相補鎖安定性が高く、生体内温度での 1 塩基変異を認識することが困難となっていることに起因するため、37°C 条件下において高度な配列依存性を維持した状態で相補鎖形成能を効果的に不安定化した新規の分子設計が必要になると考えられる。

## 1-5. 細胞内輸送について

### 1-5-1. 細胞の取り込み機構

核酸医薬に限らず、細胞内で機能を発揮する様々な治療薬は細胞内の特定の場所に輸送される必要がある。エレクトロポレーションやマイクロインジェクションのような電氣的または機械的な輸送方法は、生体への適応を念頭にした際に用途制限の大きい手法である。このため細胞

の取り込み機構を利用した細胞内輸送方法が検討されており、抗体やシグナルペプチド、微粒子などを用いた細胞内輸送について数多くの研究が報告されてきた。

細胞外物質の取り込み機構<sup>105), 106)</sup>には、主にエンドサイトーシスやマクロピノサイトーシスが挙げられる (Fig. 1-14)。エンドサイトーシスは取り込み後のエンドソームの構成成分やその形成機構により、クラスリン介在性エンドサイトーシス、カベオラ介在性エンドサイトーシス、クラスリン非依存性エンドサイトーシスに分類される。クラスリン介在性エンドサイトーシスは、リガンドと結合した受容体が細胞内に取り込まれるための機構であり、カベオラ介在性エンドサイトーシスは細胞膜表面のスフィンゴ脂質やコレステロールに富んだカベオラと呼ばれるくぼみ構造を介して取り込みを行う。エンドサイトーシスでは、アクチンやダイナミンなど40種類のタンパク質が関与し、細胞外物質を内包したエンドソーム膜が形成されリソソームと膜融合する。その後エンドソーム内の物質はリソソーム内のヌクレアーゼおよびプロテアーゼにより分解され細胞内に放出される。一方で、マクロピノサイトーシスはタンパク質やエクソソームなど比較的高分子の物質の取り込みに利用される機構であり、増殖シグナルなどの刺激を受けた後、細胞骨格の形成に関与するアクチンの再重合により細胞膜の隆起が促進され膜の波うち状態を引き起こす。その後の膜融合により細胞外の溶質や細胞膜表面に吸着または結合した物質を内包したマクロピノソームが形成される。このマクロピノソームは、細胞種によりエンドソーム同様にリソソームに膜融合する場合と膜融合せずに取り込まれた物質がサイトゾルに輸送される経路が存在する。このように細胞の取り込み機構にはいくつかの種類があるため、細胞内で作用する分子がどの経路で取り込まれるのかを理解し効率よく輸送する必要がある。しかし、この方法での輸送効率は、分子の特性や細胞に依存するため、その効率は低下する可能性が推測される。このため目的の分子を細胞の特定の場所に輸送する技術の一つとしてシグナルペプチドを用いた細胞内輸送がある。

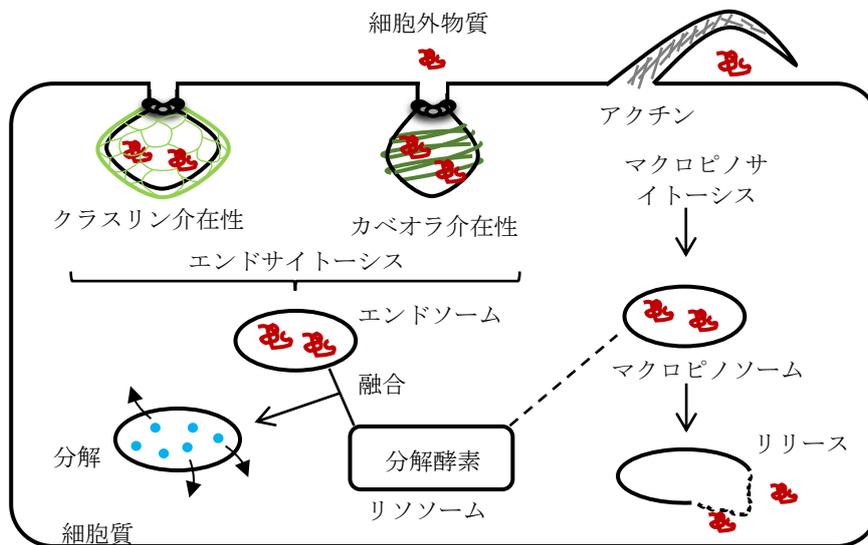


Fig. 1-14 細胞外物質の取り込み機構.

### 1-5-2. シグナルペプチドを用いた細胞内輸送

シグナルペプチドは、タンパク質に存在するタンパク質の細胞内での局在や細胞内への輸送を指示するオリゴペプチドである。これまでに細胞膜表面への接着を促す細胞接着シグナルペ

プチドやエンドサイトーシスやマクロピノサイトーシスを誘起する細胞膜透過ペプチド, 細胞取り込み後のエンドソームやマクロピノソームからリリースを促す小胞体リリースペプチド, 核への輸送を促す核移行シグナルペプチドが報告されている (Table 1-2).

Table 1-2 シグナルペプチドの一例.

シグナルペプチド	配列	シグナルペプチド	配列
細胞接着シグナル <sup>107)</sup>		小胞体リリースシグナル	
RGD	RGD	HA2	GLFGAIAAGFIENGWEGMIDGWYG
RGDS	RGDS	INF	GLFEAIAEFIENGWEGMIDGWYG
細胞膜透過シグナル <sup>108),109)</sup>		GALA	WEAALAEALAEALAEHLAEALAEAEALEALAA
Penetratin	RQIKIWFQNRMRMKWKK	KALA <sup>112)</sup>	WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKA
Tat (48-60)	GRKKRRQRRRPPQ	IZUMO1	LHLQKETFATYVARFQKEAY
Oligoarginine	RRRRRRRRR	S19	PFVIGAGVLGALGTGIGGI
TP10	AGYLLGKINLKALAALAKKIL	Pas	FFLIPKG
M918	MVTVLFRRLRIRACGPPVRV	F4	FFF
MAP	KLALKLALKALKAAALKLA	核移行シグナル	
KGL	KGLKLGGLLGLKLG	SV40	PKKRKV
Pep-3 <sup>110)</sup>	KWFETWFTWPKKRK	Nucleoplasmin	KRPAAIKKAGQAKKK
VT5 <sup>111)</sup>	DPKGDPKGVTVTVTVTGKDPKPG		

例えば 1988 年 A. D. Frankel *et. al.*によりヒト免疫不全ウイルス 1 (HIV-1) 由来の Tat タンパク質が細胞膜を透過できることが初めて報告され<sup>113)</sup>, 1997 年 E. Vivès *et. al.*により Tat タンパク質の 48-60 位のオリゴペプチドが効果的に細胞に取り込まれることが明らかになった<sup>114)</sup>. S. R. Schware *et. al.*は Tat ペプチドを用いて 120 kDa の  $\beta$ -galactosidase を細胞内に輸送できることを報告し, 細胞膜透過シグナルペプチドとしての有用性を提唱した<sup>115)</sup>. 2001 年 S. Futaki *et. al.*は, より細胞の取り込み効率を向上させた細胞膜透過ペプチドとして Tat(48-60) のアミノ酸をアルギニンに置換したオリゴアルギニン ( $R_n$ ;  $n=4-16$ ) を合成し, このオリゴペプチドが細胞に取り込まれ核に集積することを報告した<sup>116)</sup>. ここでは, アルギニン側鎖のグアノジノ基と細胞膜表面のプロテオグリカンとの静電的な相互作用が刺激となり Rac タンパク質の活性化を引き起こしマクロピノサイトーシスが誘起されることが明らかとなった (Fig. 1-15). その後, 詳細な機構は明らかになっていないがマクロピノソームからサイトゾルへリリースされることが報告されている<sup>117)</sup>. また興味深いことに  $R_n$  は, マクロピノサイトーシスだけでなく細胞膜を直接透過する

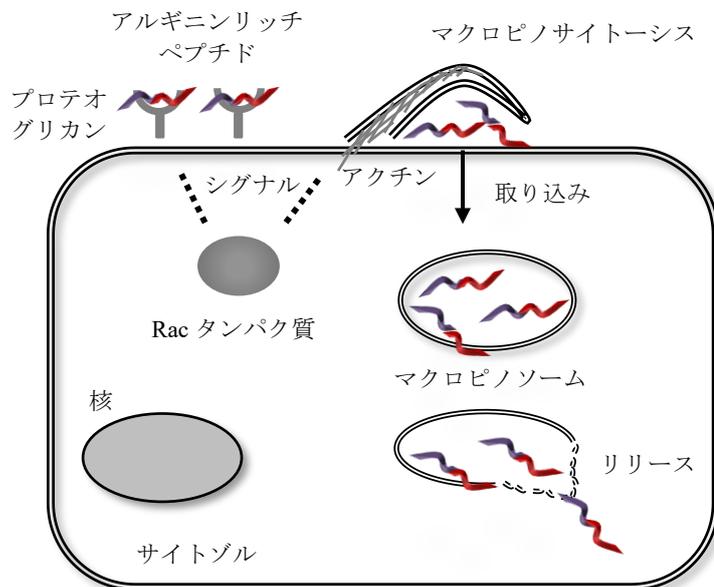


Fig. 1-15 アルギニンリッチペプチドの細胞取り込み機構.

ことも報告されている<sup>117)</sup>。さらに Futaki *et. al.* は、 $R_4$  の取り込み効率が  $R_{8,16}$  と比較して低いこと、 $R_8$  と比較して  $R_{16}$  は取り込み効率は高いものの毒性も高くなることを報告した<sup>117),118)</sup>。また P. A. Wender *et. al.* や P. E. Nielsen *et. al.* は、8 残基よりも 9 残基の  $R_n$  が効率的に細胞内とサイトゾルに輸送されることを報告している<sup>108),119)</sup>。この他にも transportan の類似体である疎水性ペプチドの TP10 や合成ペプチドである M918<sup>120)</sup>、MAP<sup>101)</sup> が細胞内輸送シグナルペプチドとして報告されているが、合成の簡便さや用途・用法に関する豊富な情報量を鑑みてか、 $R_n$  が多様な物質の細胞内輸送に多く用いられている<sup>108),121)</sup>。

細胞内輸送効率の向上を目的としたペプチド以外にもエンドソームやマクロピノソームからの効率的なリリースを目的としたシグナルペプチドも報告されている。その中でもヒトインフルエンザウイルス由来の hemagglutinin-2 (HA2) は膜融合ペプチドを有する糖たんぱく質であり、小胞体膜を崩壊させウイルスの小胞体からのリリースを促す<sup>122)</sup>。HA2 は酸性条件下で  $\alpha$ -helix へとコンフォメーション変化を引き起こし、N 末端の 23 残基の膜融合ペプチドがエンドソーム膜に孔を形成する。この孔が膜融合することでウイルス自身の遺伝子をサイトゾルへ輸送する (Fig. 1-16)<sup>123)</sup>。2012 年には HA2 と  $R_9$  を用いて red fluorescence protein のプラスミド DNA をサイトゾルに効率的に輸送できることが示され、HA2 が小胞体からのリリースに有用であることが報告された<sup>124)</sup>。また、HA2 の膜融合ペプチドの 4 残基目と 7 残基目の Gly と Ala をそれぞれ Glu に置換した INF7 は、効率よくエンドソーム膜を破壊することが報告されている<sup>125)</sup>。ウイルス由来の HA2 は生体内に用いた際に免疫原性の原因になる可能性があるため、ヒト由来のリリースペプチドとしてヒト精子のタンパク質由来の IZUMO1<sup>126)</sup> やヒト胎盤形成タンパク質 Syncytin 由来の S19 ペプチド<sup>127)</sup> などが報告されている。さらに S. Futaki *et. al.* は  $R_n$  によるサイトゾルへの輸送効率の向上を目的とした短鎖の小胞体リリースペプチドとして、Cathepsin D 由来の 7 残基の penetration accelerating sequence (Pas)<sup>128)</sup> や人工合成ペプチド由来の 4 残基のテトラフェニルアラニンペプチドを  $R_n$  に付加することで細胞内輸送効率が向上することを報告した<sup>129)</sup>。

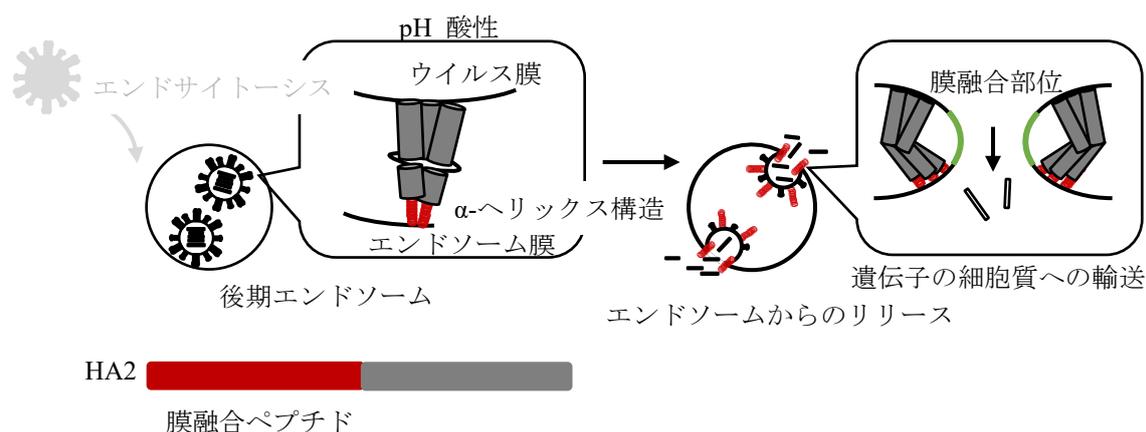


Fig. 1-16 HA2 ペプチドによるエンドソーム崩壊機構。

## 1-6. 本研究概要

上述のとおり、遺伝子に生じる 1 塩基変異は直接的な疾病・疾患の原因となるだけでなく、治療薬による副作用の誘発や薬剤応答性の低下を引き起こす要因となる。天然核酸や人工核酸で構成され遺伝子の発現を抑制することができる核酸医薬は、1 塩基変異が原因の疾病・疾患に対

して治療薬となる可能性を秘めている。これまでに多くの人工核酸が開発されているが、off-target 効果や生体内分解性などの制限により遺伝子の 1 塩基変異に依存した遺伝子発現制御を可能とする人工核酸は未だ開発されていないのが実情である。

本研究では、生体内温度近傍で 1 塩基変異を認識し遺伝子発現を抑制できる PNA 型人工核酸の設計を試み、この人工核酸による遺伝子発現制御ならびにこの作用機序を利用した核酸医薬としての可能性について検討した (Fig. 1-17)。

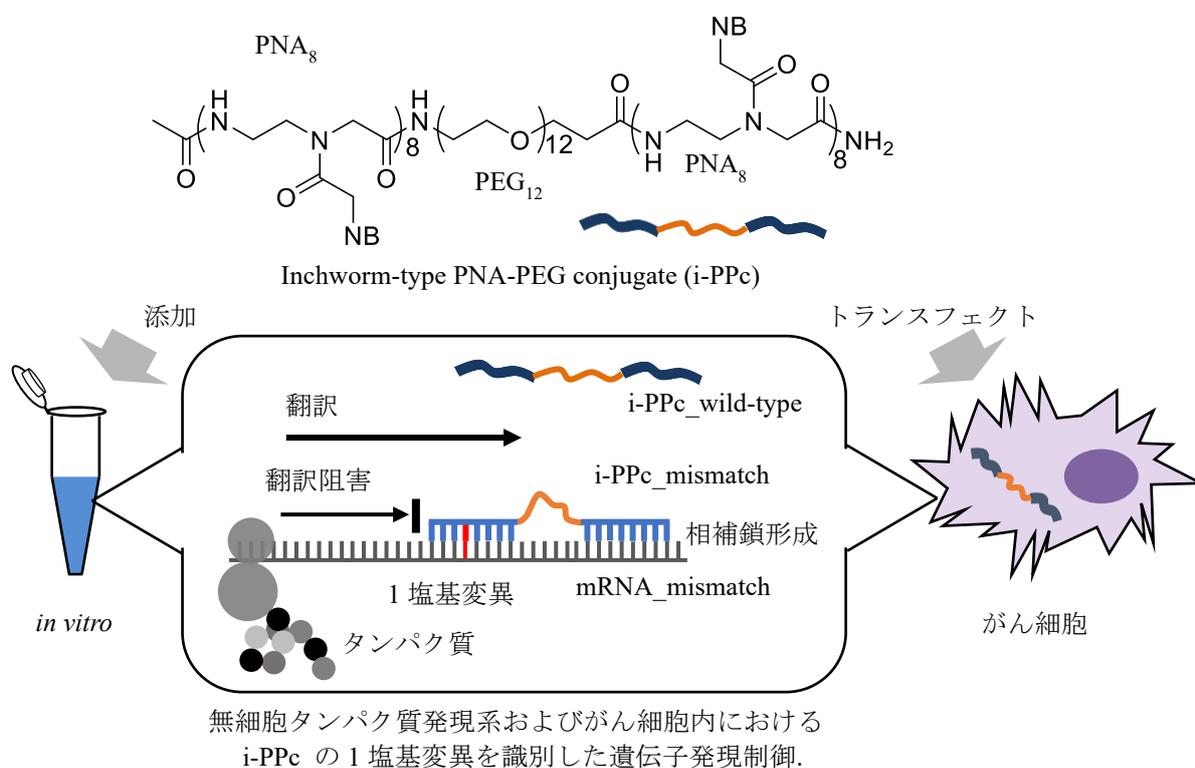


Fig. 1-17 i-PPc の化学構造と i-PPc を用いた無細胞タンパク質発現系およびがん細胞内での 1 塩基の違いを認識した遺伝子発現制御のイメージ図。

第 2 章では、1 塩基変異を認識する PNA 型人工核酸を設計、合成した (重合度が 12 からなる polyethylene glycol (PEG) の両末端に 8 残基の PNA を配した inchworm-type PNA-PEG conjugate (i-PPc)。この i-PPc の 1 塩基認識能を定量する評価系としてルシフェラーゼを発現する無細胞タンパク質発現系を構築し、i-PPc によるルシフェラーゼ発現抑制を定量した。また、i-PPc による発現抑制の作用機序を決定し、i-PPc と合成 DNA による相補鎖形成時の熱力学的パラメーターから、i-PPc の特異的な相補鎖形成挙動について論じた。

第 3 章では、i-PPc による細胞内での 1 塩基変異を認識した遺伝子発現制御の可能性について検討した。細胞内での遺伝子発現抑制を評価するためには i-PPc の細胞内輸送が必須であり、本稿では細胞膜透過シグナルペプチドとして簡便なオリゴアルギニン ( $R_9$ ) を分子に組み込んだ i-PPc( $R_9$ ) を合成した。ルシフェラーゼを恒常発現する大腸がん細胞株を樹立し、i-PPc( $R_9$ ) による細胞内ルシフェラーゼ発現抑制を定量することで抑制効果を評価した。

第 4 章では、がんの発症と多段階的な遺伝子の 1 塩基変異が密接に関連している例を紹介し、1 塩基変異を標的とした治療薬の必要性について解説した。多様な 1 塩基変異の中でも特に KRAS 遺伝子一塩基変異の弊害が問題となっている中で、現在開発されている治療薬の作用機序

と比較しつつ遺伝子治療薬としての i-PPc の優位性について言及した。

第 5 章では、KRAS 遺伝子 1 塩基変異を認識するように至適化された i-PPc によるがん細胞の細胞死誘導について検討した。具体的には、従来型の i-PPc(R<sub>9</sub>) に加え、細胞内で R<sub>9</sub> 部位が分離する新たな i-PPc (R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc) を用いて、野生型あるいは変異型 KRAS 遺伝子を有する 2 種の膵臓腺がん細胞 (BxPC-3, PANC-1) への細胞死誘導について検討し、この細胞死のメカニズムについて検討した。

第 6 章では、膵臓腺がん細胞のスフェロイド作成条件を策定し、R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc によるスフェロイド化がん細胞の細胞死誘導について検討した。生体内で組織化されたがん組織は二次元培養されたがん細胞と比較すると多くの点で性質が異なり、腫瘍組織に対する治療効果は一般的に低下することが指摘されている。In vivo 評価の前段階として、実用化への可能性を検討した。

第 7 章では、本論文での研究成果を総括した。

## 1-7. 参考文献

- 1) O. T. Avery *et. al.*, *J. Exp. Med.*, **79**(2), 137-158 (1944).
- 2) E. Chargaff, *Experientia*, **6**, 201-209 (1950).
- 3) J. D. Watson and F. H. C. Crick, *Nat.*, **171**(4356), 737-738 (1953).
- 4) International Human Genome Sequencing Consortium, *Nat.*, **409**, 860-921 (2001).
- 5) F.S. Collins *et. al.*, *Nat.*, **422**, 835-847 (2003).
- 6) The International SNP Map Working Group, *Nat.*, **409**, 928-933 (2001).
- 7) R. Karki *et. al.*, *BMC Med. Genom.*, **8**(37), 1-7 (2015).
- 8) A. Chakravarti *et. al.*, *Nat.*, **409**, 822-823 (2001).
- 9) S. Ismail and M. Essawi, *Middle East J. Med. Genet.*, **1**, 57-63 (2012).
- 10) B. S. Shastry, *J. Hum. Genet.*, **52**, 871-880 (2007).
- 11) A. J. Brookes, *Gene*, **234**, 177-186 (1999).
- 12) N. H. Lee, *Anticancer Agents Med. Chem.*, **10**(8), 583-592 (2010).
- 13) 田島 靖浩 *et. al.*, *生物機能開発研究所紀要*, **13**, 69-74 (2012).
- 14) D. White and M.R. Smith, *J. Hum. Genet.*, **56**, 5-7 (2011).
- 15) A. L. Duffy *et. al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, **80**, 241-252 (2007).
- 16) P. Sulem *et. al.*, *Nat. Genet.*, **39**(12), 1443-1452 (2007).
- 17) L. A. Hindorf *et. al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**(23), 9362-9367 (2009).
- 18) A. Iida *et. al.*, *J. Hum. Genet.*, **46**, 385-407 (2001).
- 19) A. Iida *et. al.*, *J. Hum. Genet.*, **47**, 74-76 (2002).
- 20) R. A. Felder *et. al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**(6), 3872-3877 (2002).
- 21) M. Gatz *et. al.*, *J. Gerontol. Med. Sci.*, **52A**(2), M117-M125 (1997).
- 22) K. H. Weisgraber *et. al.*, *J. Biol. Chem.*, **256**(17), 9077-9083 (1981).
- 23) A. F. Wright, *Encyclopedia of Life Science*, 1-10 (2005).
- 24) L. Jara *et. al.*, *Biol. Res.*, **50**(35), 1-18 (2017).
- 25) M. Fareed and M. Afzal, *Egypt. J. Medical Hum. Genet.*, **14**, 123-134 (2013).
- 26) L. Ning *et. al.*, *J. Cancer*, **7**(15), 2420-2426 (2016).
- 27) K. Yao *et. al.*, *Med.*, **94**(46), 1-10 (2015).

- 28) F. Schmid *et. al.*, *Mol. Cancer*, **11**(49), 1-12 (2012).
- 29) R. Rosell and J. Wei, *The Oncologist*, **17**, 1484-1485 (2012).
- 30) O. Kranenburg, *Biochim. Biophys. Acta*, **1756**, 81-82 (2005).
- 31) M. Fagny *et. al.*, *Br. J. Cancer*, **122**, 569-577 (2019).
- 32) G. J. Kato *et. al.*, *Nat. Rev. Disease Primer*, **4**(18010), 1-22 (2018).
- 33) M. Bachtiar and C. G. L. Lee, *Curr. Genet. Med. Rep.*, published online (2013).
- 34) D. J. Freeman *et. al.*, *Clin. Colorectal Cancer*, **7**(3), 184-190 (2008).
- 35) C.S. Karapetis *et. al.*, *N. Engl. J. Med.*, **359**(17), 1757-1765 (2008).
- 36) M. Kostic and L.H. Jones, *Trends in Pharmacol. Sci.*, **41**(5), 305-317 (2020).
- 37) E. Tambuyzer *et. al.*, *Nat. Rev.*, **19**, 93-111 (2020).
- 38) Z. Zhao and P.E. Bourne, *Drug Discov. Today*, **23**(3), 727-735 (2018).
- 39) R. Macarron *et. al.*, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **10**, 188-195 (2011).
- 40) A. Mullard, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **19**, 79-84 (2020).
- 41) S. Ponziani *et. al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(5510), 1-28 (2020).
- 42) M. Hecker and A. H. Wagner, *Biochem. Pharmaol.*, **144**, 29-34 (2017).
- 43) K. Wada and R. Morishita, *Drug Discov. System*, **25**(6), 579-589 (2010).
- 44) T. Inoue *et. al.*, *Drug Discov. System*, **34**(2), 86-98 (2019).
- 45) U. Ohto *et. al.*, *Nat. Lett.*, **520**, 702-706 (2015).
- 46) S. Sasaki, *有機合成化学協会誌*, **55**(7), 590-599 (1997).
- 47) S. White *et. al.*, *Chem. Biol.*, **4**(8), 569-578 (1997).
- 48) K. Hiraoka *et. al.*, *Nat. Commun.*, **6**(6706), 1-8 (2015).
- 49) R. Inoue, *Pharm. Tech. Japan*, **35**(13), 2533-2545 (2019).
- 50) A. Fire *et. al.*, *Nat.*, **39**, 806-811 (1998).
- 51) S. Bajan and G. Hutvagner, *Cell*, **9**(137), 1-27 (2020).
- 52) A. L. Jackson *et. al.*, *Nat. Biotechnol.*, **21**(6), 635-637 (2003).
- 53) A. L. Jackson *et. al.*, *RNA*, **12**(7), 1179-1187 (2006).
- 54) C. Tschuch *et. al.*, *BCM Mol. Biol.*, **9**(60) (2008).
- 55) S. M. Elbashir *et. al.*, *Nat.*, **411**, 494-498 (2001).
- 56) T. Coelho *et. al.*, *N. Engl. J. Med.*, **369**(9), 819-829 (2013).
- 57) D. Adams *et. al.*, *N. Engl. J. Med.*, **379**(1), 11-21 (2018).
- 58) M. D. Benson *et. al.*, *N. Engl. J. Med.*, **379**(1), 22-31 (2018).
- 59) F. Eckstein and H. Gindl, *Biochim. Biophys. Acta*, **149**, 35-40 (1967).
- 60) F. Eckstein and H. Gindl, *Eur. J. Biochem.*, **13**, 558-564 (1970).
- 61) V. B. Kumar *et. al.*, *Pep.*, **21**, 1769-1775 (2000).
- 62) C. A. Stein *et. al.*, *Pharmac. Ther.*, **52**, 365-384 (1991).
- 63) N. Dias and C. A. Stein, *Mol. Cancer Ther.*, **1**, 347-355 (2002).
- 64) J. E. Summerton, *Curr. Topics Med. Chem.*, **7**(7), 651-660 (2007).
- 65) 今西 武, 小比賀 聡, *日薬理誌*, **120**, 85-90 (2002).
- 66) S. Obika *et. al.*, *Tetrahedron Lett.*, **38**(50), 835-8738 (1997).
- 67) A. A. Koshkin *et. al.*, *Tetrahedron*, **54**, 3607-3630 (1998).

- 68) S. Obika *et. al.*, *Tetrahedron Lett.*, **39**, 5401-5404 (1998).
- 69) Y. You *et. al.*, *Nucleic Acid Res.*, **34**(8), e60-e71 (2006).
- 70) L.A. Ugozzoli *et. al.*, *Anal. Biochem.*, **324**, 143-152 (2004).
- 71) F. Bruguè *et. al.*, *Mut. Res.*, **669**, 80-84 (2009).
- 72) N. Jacobsen *et. al.*, *Nucleic Acids Res.*, **30**(19), e100-e107 (2002).
- 73) S. Obika *et. al.*, *Nucleic Acids Res. Suppl.*, **1**, 145-146 (2001).
- 74) M.H.U. Fazil *et. al.*, *Sci. Rep.*, **6**(37721), 1-13 (2016).
- 75) D. Magner *et. al.*, *Sci. Rep.*, **7**(12532), 1-16 (2017).
- 76) M. Shimojo *et. al.*, *Sci. Rep.*, **9**(7618), 1-10 (2019).
- 77) C. A. Stein *et. al.*, *Nucleic Acids Res.*, **38**(1), e3-10 (2009).
- 78) J. Elmén *et. al.*, *Nucleic Acids Res.*, **33**(1), 439-447 (2005).
- 79) M. H. Halford and A. S. Jones, *Nat.*, **217**, 638-640 (1968).
- 80) G. J. Cowling *et. al.*, *Biochim Biophys. Acta*, **452**, 452-456 (1971).
- 81) J. Pitha *et. al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **81**(1), 217-223 (1978).
- 82) P. E. Nielsen *et. al.*, *Sci.*, **254**(5037), 1497-1500 (1991).
- 83) M. Egholm *et. al.*, *Nat.*, **365**, 566-568 (1993).
- 84) M. Komiyama *et. al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**(13), 3758-3762 (2003).
- 85) B.S. Gaylord *et. al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**(1), 34-39 (2005).
- 86) J. D. Luo *et. al.*, *Nucleic Acids Res.*, **34**(2), e12-e18 (2006).
- 87) D. Jeong *et. al.*, *Korean J. Pathol.*, **45**, 151-159 (2011).
- 88) P. E. Nielsen *et. al.*, *Nucleic Acids Res.*, **21**(2), 197-200 (1993).
- 89) P. E. Nielsen *et. al.*, *Gene*, **149**, 139-145 (1994).
- 90) L. Mologni *et. al.*, *Nucleic Acids Res.*, **26**(8), 1934-1938 (1998).
- 91) L. Good and P. E. Nielsen, *Nat. Biotechnol.*, **16**, 355-358 (1998).
- 92) J. C. Hanvey *et. al.*, *Sci.*, **258**(5087), 1481-1485 (1992).
- 93) C. Brolin *et. al.*, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **4**, e267-e276 (2015).
- 94) M. Boules *et. al.*, *J. Mol. Neurosci.*, **24**, 123-128 (2004).
- 95) P. Wittung *et. al.*, *FEBS Lett.*, **365**, 27-29 (1995).
- 96) R. Iwase and A. Murakami, *有機合成化学協会誌*, **60**(12), 1179-1189 (2002).
- 97) P. Zhou *et. al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **16**, 4931-4935 (2006).
- 98) A. D. Andrasi *et. al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**(50), 16104-16112 (2006).
- 99) B. Sahu *et. al.*, *J. Org. Chem.*, **76**, 5614-5627 (2011).
- 100) R. Bahal *et. al.*, *Chem. Bio. Chem.*, **13**, 56-60 (2012).
- 101) J. Oehlke *et. al.*, *Eur. J. Biochem.*, **271**, 3043-3049 (2004).
- 102) J. Chen *et. al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**(39), 16846-16851 (2010).
- 103) T. Shiraishi *et. al.*, *Nucleic Acids Res.*, **36**(13), 4424-4432 (2008).
- 104) T. Shiraishi and P. E. Nielsen, *Bioconjugate Chem.*, **23**, 196-202 (2012).
- 105) S. D. Conner and S.L. Schmid, *Nat.*, **422**, 37-44 (2003).
- 106) I. A. Khalil *et. al.*, *Pharmacol. Rev.*, **58**(1), 32-45 (2006).
- 107) M. D. Pierschbacher and E. Ruoslahti, *Nat.*, **309**, 30-33 (1984).

- 108) N. Bendifallah *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, **17**, 750-758 (2006).
- 109) Y. Turner *et al.*, *J. Pep. Sci.*, **16**, 71-80 (2010).
- 110) M. C. Morris *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **35**(7), e49-e58 (2007).
- 111) J. Oehlke *et al.*, *FEBS Lett.*, **415**, 196-199 (1997).
- 112) S. H. Min *et al.*, *J. Gene Med.*, **8**1425-1434 (2006).
- 113) A. D. Frankel and C.O. Pabo, *Cell*, **55**, 1189-1193 (1988).
- 114) E. Vivès *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **272**(25), 16010-16017 (1997).
- 115) S. R. Schwarze *et al.*, *Sci.*, **285**(5433), 1569-1572 (1999).
- 116) S. Futaki *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **276**(8), 5836-5840 (2001).
- 117) S. Futaki *et al.*, *Biochem. Soci. Transaction*, **35**(4), 784-787 (2007).
- 118) I. Nakase *et al.*, *Mol. Ther.*, **10**(6), 1011-1022 (2004).
- 119) P. A. Wender *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**(24), 13003-13008 (2000).
- 121) M. Oba *et al.*, *Bioorg. Med. Chem.*, **23**, 4911-4918 (2015).
- 120) S. E. Andaloussi *et al.*, *Mol. Ther.*, **15**(10), 1820-1826 (2007).
- 122) S. A. Wharton *et al.*, *J. Gen. Virol.*, **69**, 1847-1857 (1988).
- 123) B. S. Hamilton *et al.*, *Viruses*, **4**, 1144-1168 (2012).
- 124) J. S. Liou *et al.*, *Pep.*, **37**, 273-284 (2012).
- 125) C. Plank *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **269**(17), 12918-12924 (1994).
- 126) N. Inoue and M. Okabe, *J. Mamm. Ova. Res.*, **27**, 183-190 (2010).
- 127) K. Sudo *et al.*, *J. Controlled Release*, **255**, 1-11 (2017).
- 128) K. Takayama *et al.*, *J. Controlled Release*, **138**, 128-133 (2009).
- 129) K. Takayama *et al.*, *Mol. Pharmaceutics*, **9**, 1222-1230 (2012).

## 第2章 生体内温度で1塩基変異を認識する inchworm 型ペプチド核酸の合成

### 2-1. はじめに

遺伝子の1塩基変異により引き起こされる病気や薬効の低下により治療困難な疾病・疾患を治療するためには、生体内温度で原因となる1塩基変異を認識できる新たな分子設計が必要となる。遺伝子の1箇所を認識するためには14-20塩基程度の塩基が必要であり、この鎖長のPNAでは $T_m = 68^\circ\text{C}$ 近傍となる。また1塩基変異を導入した一本鎖DNAとの $T_m$ 値は $50^\circ\text{C}$ 近傍となるため、生体内温度での1塩基変異の認識は困難である。一方で8塩基PNAなど鎖長を短くすると生体内温度近傍で1塩基変異を認識できるが、遺伝子の1箇所をターゲティングすることが困難となり off-target 効果の原因となる。このためPNAが生体内温度条件下で1塩基変異を認識するためには、高度な塩基配列特異性を維持しつつDNAまたはRNAとの相補鎖形成を不安定化する必要がある。

相補鎖構造の不安定化を目的として、生体適合性の高いPEGに着目した。PEGは両親媒性のポリマーであり、薬剤の水溶性<sup>1),2)</sup>や血中残存時間の向上<sup>3),4)</sup>、免疫原性の低下<sup>3)</sup>、コンジュゲートしたタンパク質の構造安定化<sup>5)</sup>に寄与するなど生体適合性や薬物動態を向上させる。このためPEG化された aptamer (Pegaptanib) などPEG化治療薬や治療薬を輸送するためのキャリアに関する研究が行われている<sup>2),4),6),7)</sup>。またPEGは僅かではあるもののオリゴヌクレオチドの相補鎖形成の安定性に寄与することも報告されている<sup>8),9)</sup>。このためPEGとPNAをコンジュゲートさせることで、水溶性の向上、非特異的吸着の抑制、さらには薬物動態の向上が期待できる。

以上の特性を踏まえ、本研究では16塩基のPNAを8塩基の1塩基変異認識部位と off-target 効果の抑制を目的とした8塩基の相補鎖形成部位に分割し、これらの8塩基のPNAを核酸と相補鎖を形成しないPEG<sub>12</sub>で架橋した inchworm-type PNA-PEG conjugate (i-PPc) を設計した (Fig. 2-1).

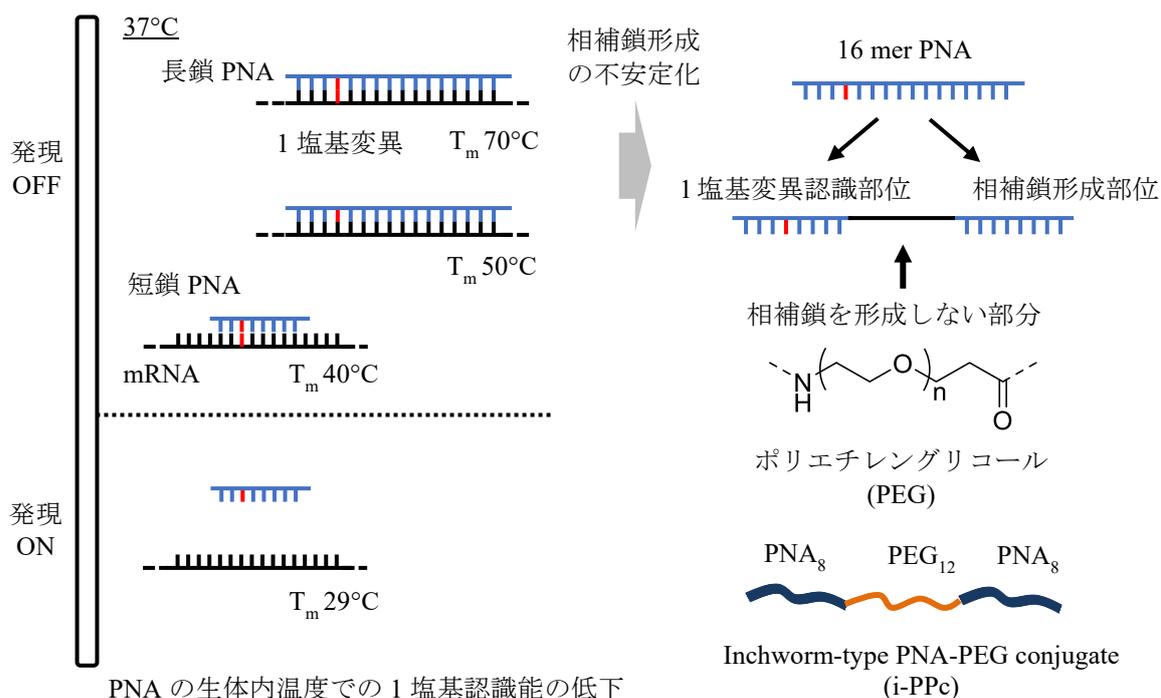


Fig. 2-1 PNAの問題点と生体内温度で1塩基変異を認識できるPNA型人工核酸の分子設計.

## 2-2. i-PPc の合成

### 2-2-1. はじめに

Fmoc 固相合成法<sup>10)</sup>は、固相表面で N 末端アミノ基を Fmoc 基により保護したモノマーの縮合、未反応アミノ基のアセチル化、Fmoc 基の脱保護を繰り返し行い、目的の配列の分子を得る手法である。本実験では、PNA モノマーとして Fmoc-A(Bhoc)-aeg-OH, Fmoc-T-aeg-OH, Fmoc-C(Bhoc)-aeg-OH, Fmoc-G(Bhoc)-aeg-OH または Fmoc-PEG<sub>12</sub>-OH を用いて目的の塩基配列の i-PPc を合成した (Fig. 2-2)。この際、弱塩基条件下における脱保護過程で、脱保護された末端アミノ基が 2 カ所のカルボニル炭素を求核攻撃することによるアシル化<sup>11)</sup>が生じる (Fig. 2-3 a: トランスアシル化, b: 分子内アシル化 (脱塩基反応)) ため、副反応を抑制する反応条件で脱保護を行った。

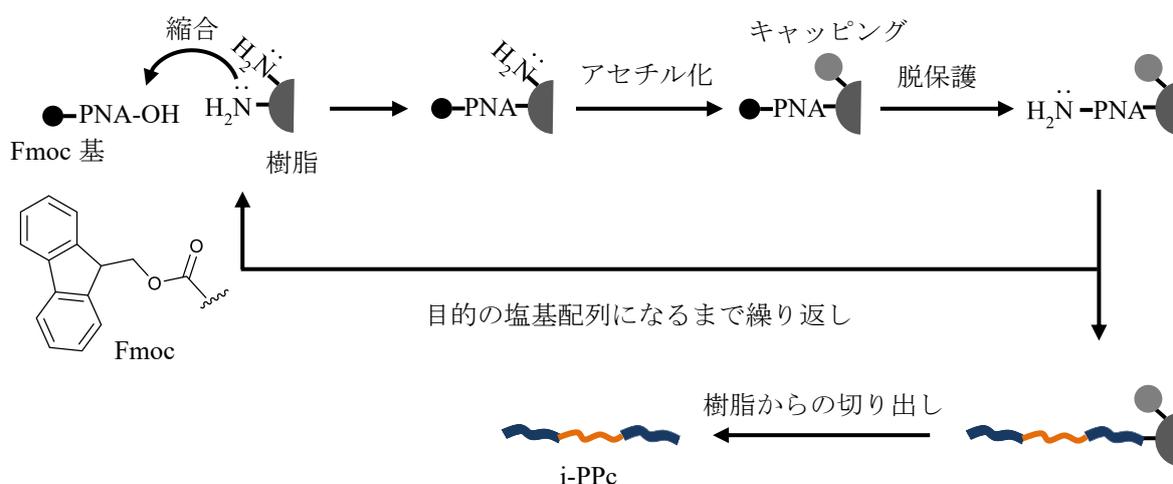


Fig. 2-2 PNA の Fmoc 固相合成法のイメージ図.

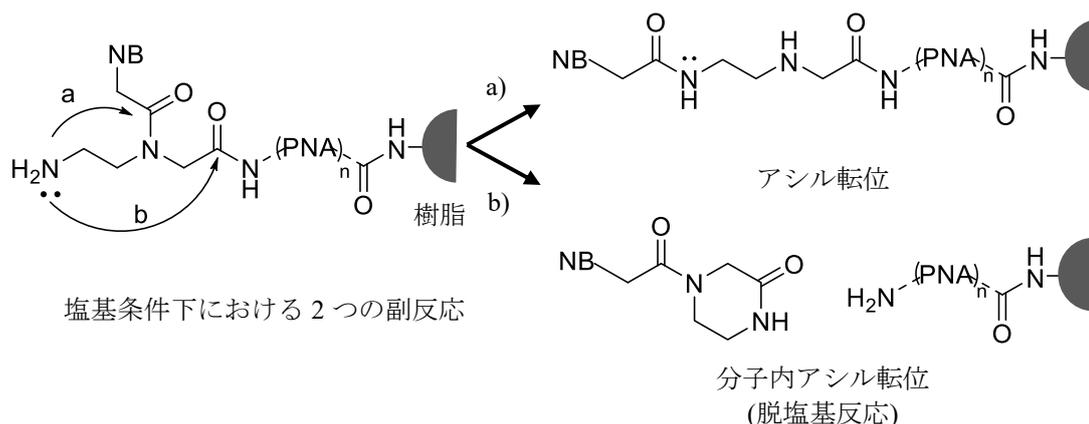
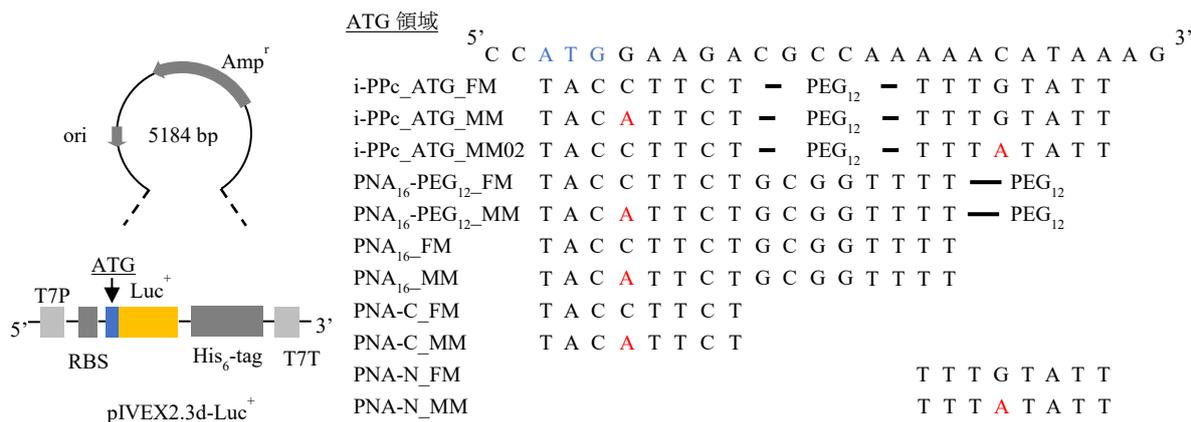


Fig. 2-3 PNA の Fmoc 固相合成法における副反応.

本項では、構築したプラスミドの T7 プロモーター領域を標的とした i-PPc\_T7, ルシフェラーゼ遺伝子の開始コドン領域を標的とした i-PPc\_ATG とこれに関連する各 PNA-PEG conjugate および PNA オリゴマー (Fig. 2-4) の合成について記載した。以降、センス鎖に対してフルマッチ型を FM、1 塩基ミスマッチ型を MM と表記することとする。



**T7P 領域**

5' A T T A A T A C G A C T C A C T A T A G G G A G A C 3'

i-PPc\_T7\_FM A T T A T G C T - PEG<sub>12</sub> - T A T C C C T C

i-PPc\_T7\_MM A T T A T G C T - PEG<sub>12</sub> - T A T C A C T C

Fig. 2-4 各遺伝子領域を標的とした i-PPc および PNA oligomer の塩基配列.

**2-2-2. 試薬**

- NovaPEG Rink Amide resin LL Nova Biochem
- Fmoc-A(Bhoc)-aeg-OH PANA GENE
- Fmoc-T-aeg-OH PANA GENE
- Fmoc-G(Bhoc)-aeg-OH PANA GENE
- Fmoc-C(Bhoc)-aeg-OH PANA GENE
- Fmoc-NH-PEG<sub>11</sub>-COOH (40 atom) Nova Biochem
- N-methyl-2-pyrrolidone (NMP) Wako
- N,N-diisopropylethylamine (DIPEA) Wako
- 1-[(1-(cyano-2-ethoxy-2-oxoethylideneaminoxy)dimethylaminomorpholino)]uroniu hexafluorophosphate (COMU) Merck Millipore
- Acetic acid anhydride (Ac<sub>2</sub>O) Wako
- Piperidine Wako
- Dichloromethane (DCM) Wako
- 2-propanol Wako
- Trifluoroacetate (TFA) nacalai tesque
- Triisopropylsilane (TIS) Wako
- Diethyl ether (Et<sub>2</sub>O) Wako
- Acetonitrile (ACN) Sigma Aldrich
- Methanol (MeOH) Wako
- α-cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) Bruker Daltonics

**2-2-3. 合成と精製**

所定量の NovaPEG Rink Amide Resin LL を膨潤後，樹脂の表面アミノ基に対し Fmoc-PNA-OH モノマー (4 eq.)，COMU (4 eq.)，DIPEA (8 eq.) を加え所定時間反応させた．反応後 NMP で樹脂を数回洗浄し，続いて 10% Ac<sub>2</sub>O in NMP で 5 min 攪拌しながら反応させ未反応一級アミンをキ

ャッピングした。続いて 20% piperidine を 3 min 反応させ Fmoc 基を脱保護した後、先と同様の条件で PNA モノマーを縮合した。この操作を目的の塩基配列になるまで繰り返し行った。末端アミノ基を 20% Ac<sub>2</sub>O でアセチル化した後、DCM, 2-propanol で樹脂を洗浄し減圧乾燥した。得られた乾燥樹脂に TFA/TIS/DCM = 95/2.5/2.5 混合溶液を加え、水中で 60 min, 室温でさらに 30 min 反応させた後、フィルターろ過して得たる液を濃縮し Et<sub>2</sub>O を適量入れて白色沈殿物を得た。その後、沈殿物を回収し Et<sub>2</sub>O で洗浄後、Milli-Q に溶解させ凍結乾燥して白色の粗晶を得た。

得られた粗晶をサンプリングし Milli-Q に溶解させ逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) および TOF-MS 測定を行い粗晶を同定した。同定後 HPLC を用いて精製し、再度 HPLC 測定およびマトリクス支援レーザー脱離イオン化法飛行時間型質量分析 (MALDI TOF-MS: Bruker Daltonics Autoflex III) 測定を行い目的物の純度を評価した。

#### 2-2-4. 結果および考察

精製後の i-PPc\_ATG\_FM のクロマトグラムと TOF-MS スペクトルを以下に示した (Fig. 2-5 a, b). 精製後の i-PPc\_ATG\_FM のクロマトグラムより 58.7 min に単一のメインピークが観察され、これが TOF-MS スペクトルにおける obs. peak = 4875.50 に起因する分子であると推察し、i-PPc\_ATG\_FM (calc. M<sub>w</sub> = 4874.86) が純度 99%以上で得られたと判断した。また TOF-MS スペクトルにおける m/z = 2440.55 に観察されたピークは、2 価の i-PPc\_ATG\_FM (calc. M<sub>w</sub> = 2437.43) と同定した。同様の手法で合成した各 PNA-PEG conjugate および PNA oligomer を HPLC により精製後 TOF-MS 測定により同定し、目的の塩基配列を有する PNA を高純度で得た (Table 2-1, Supplementary data).

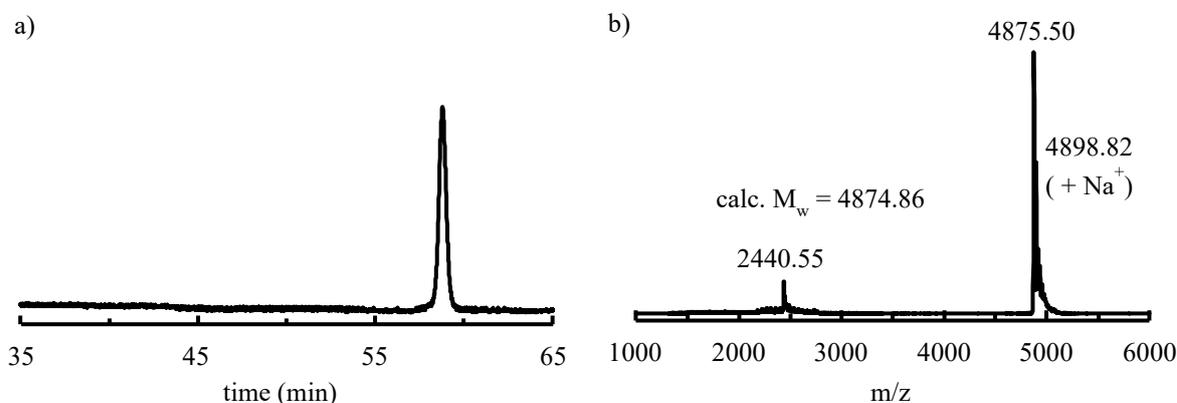


Fig. 2-5 精製後の i-PPc\_ATG\_FM の a)クロマトグラムおよび b) TOF-MS スペクトル.  
 Conditions: ODS-3 column (a: 10 × 250 mm, b: 4.6 × 250 mm, GL Science), 35°C, 4 mL/min,  
 A: 0.1% TFA in 5% ACN/Milli-Q, B: 0.1% TFA in 5% Milli-Q/ACN, 260 nm, 0.21 %/min  
 linear gradients. c) CHCA in MeOH, LP\_3-20 kDa.

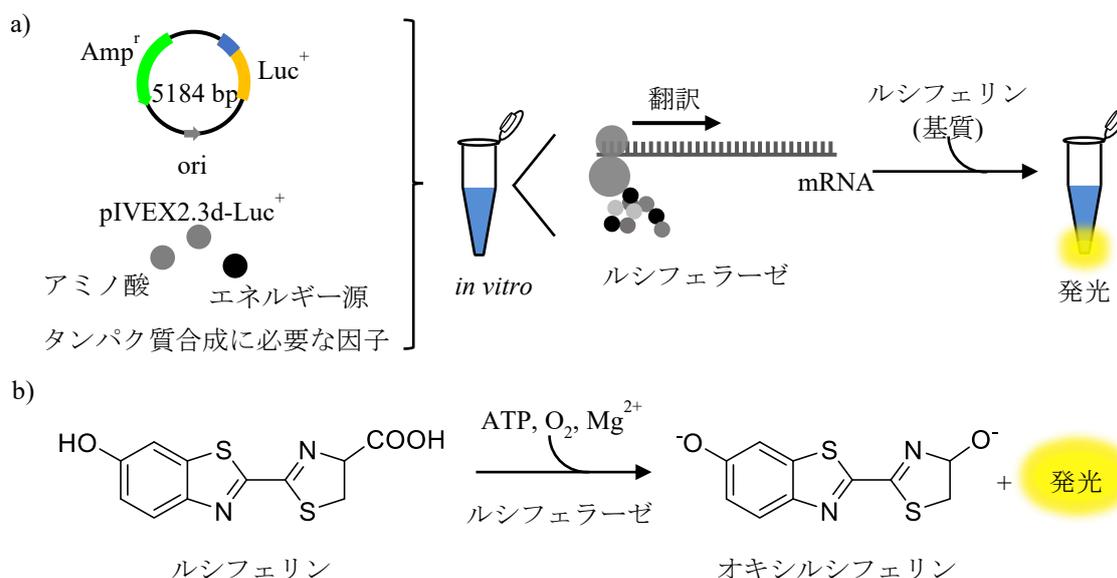
Table 2-1 合成した PNA-PEG conjugate または PNA oligomer の純度および同定.

	Purity (%)	TOF-MS	
		calc. $M_w$	obs. peak
i-PPc_T7_FM	99	4853.83	4852.94
i-PPc_T7_MM	99	4877.86	4876.86
i-PPc_ATG_FM	99	4874.86	4875.50
i-PPc_ATG_MM	99	4898.90	4897.24
i-PPc_ATG_MM02	99	4858.87	4862.99
PNA <sub>16</sub> -PEG <sub>12</sub> _FM	99	4900.86	4900.53
PNA <sub>16</sub> -PEG <sub>12</sub> _MM	99	4924.89	4923.93
PNA <sub>16</sub> _FM	99	4301.14	4300.38
PNA <sub>16</sub> _MM	99	4325.17	4322.68
PNA-C_FM	98	2111.05	2112.43
PNA-C_MM	97	2135.08	2137.50
PNA-N_FM	95	2181.12	2202.90
PNA-N_MM	98	2165.13	2165.13

## 2-3. 無細胞タンパク質発現系における遺伝子発現制御効果

### 2-3-1. はじめに

無細胞タンパク質発現系は、アミノ酸やエネルギー基質などタンパク質合成に必要な様々な因子を含む溶液に鋳型となる DNA を添加することで細胞内で行われている転写、翻訳の過程を *in vitro* で行うことができる (Fig. 2-6 a). この評価系を用いることで、生細胞を用いて評価する際に必要となる i-PPc の細胞内輸送挙動や細胞毒性、目的の遺伝子を発現する細胞の構築などの過程を検討することなく i-PPc の生体内温度近傍で 1 塩基を認識した遺伝子発現抑制効果を確認することができる。本研究では鋳型の DNA として無細胞タンパク質発現系において最適化されたルシフェラーゼ発現プラスミド pIVEX 2.3d Luc<sup>+</sup> plasmid を構築した。



ルシフェラーゼは、ATP と  $Mg^{2+}$  存在下で基質であるルシフェリンを酸化しオキシルシフェリンを生成する際に発光する (Fig. 2-6 b). この発光は、感度が高いため細胞生存率や細胞死評価、酵素活性評価を行う際に用いられる。また、この高い感度は、無細胞タンパク質発現系で懸念される低いタンパク質合成の課題点を補うことができると考えられる。この発光を定量することでルシフェラーゼの発現量を見積もることができ、発光が観測された場合ルシフェラーゼが発現されており、発光が観測されなかった場合ルシフェラーゼが発現していないことを示す。

本項では、i-PPc の生体内温度近傍での 1 塩基の違いを識別した遺伝子の発現抑制について検討することを目的として、評価系に必要なルシフェラーゼ発現プラスミドを構築した。その後タンパク質合成に必要な因子と共に合成した各塩基配列の PNA-PEG conjugate または PNA oligomer を添加し発光量を定量することで i-PPc の塩基配列依存的なルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制効果について検討した。そしてゲルシフトアッセイを行い i-PPc による遺伝子発現抑制機構の解明を行った。

### 2-3-2. 試薬

• RimeSTAR HS premix	TaKaRa Bio
• Plasmid pGL3-control vector	Promega
• QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen
• <i>NcoI</i>	TaKaRa Bio
• <i>XhoI</i>	TaKaRa Bio
• 0.5%または 1% agarose	
• Tris Acetate EDTA (TAE) buffer	
• NucleoSpin Gel and PCR clean-up Kit	TaKaRa Bio
• pIVEX2.3d	Roche Applied Science
• Ligation-Convenience Kit	NIPPON GENE
• <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) <i>DH5<math>\alpha</math></i> competent cells	TaKaRa Bio
• Plasmid Midi Kit	Qiagen
• Rapid Translation system (RTS) 100 <i>E. coli</i> HY Kit	Roche Diagnostics
• 0.01 M phosphate buffer saline (PBS)	
• ONE Glo™ luciferase assay solution	Promega
• Forward primer (5'-ACCACAACGGTTTCCCTCTA-3')	北海道システムサイエンス
• Reverse primer (5'-GTTCCATCTTCCAGCGGATA-3')	北海道システムサイエンス
• PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase Kit	TaKaRa Bio
• Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System	Promega

### 2-3-3. 実験操作

a) 無細胞タンパク質発現系で用いる Luc<sup>+</sup> plasmid DNA (pIVEX2.3d-Luc<sup>+</sup>) の構築 (Fig. 2-7)

鋳型プラスミド pGL3-control vector から *NcoI* 配列を付加したフォワードプライマー (5'-GCCACCATGGAAGACGCC-3') および *XhoI* 配列を付加したリバースプライマー (5'-AGCTCGCTCGAGACACGGCGATCTTTC-3'), PrimeSTAR HS premix を用いてポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によりホタル (*Photinus pyralis*) 由来ルシフェラーゼ (Luc<sup>+</sup>) の遺伝子断片を増幅した。その PCR 産物を QIAprep Spin Miniprep Kit を用いて精製した後、制限酵素 *NcoI* およ

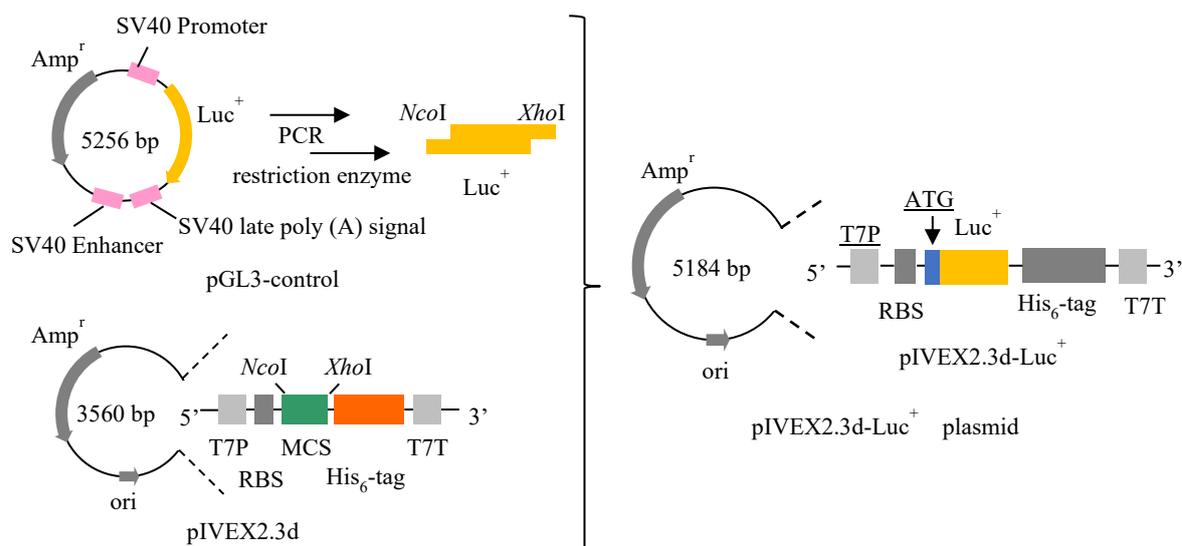


Fig. 2-7 pIVEX2.3d-Luc<sup>+</sup> plasmid の作製.  
(RBS: ribosome-binding site, MCS: multi-cloning site)

び *XhoI* で制限酵素消化した. 適正なサイズの挿入断片を 0.5% agarose in TAE を用いたゲル精製により単離し NucleoSpin Gel and PCR clean-up Kit を用いて回収した.

無細胞タンパク質発現系 (RTS 100 *E. coli* HY Kit) に最適化されたベクタ pIVEX2.3d を *NcoI* および *XhoI* で制限酵素消化し 1% agarose in TAE でゲル精製後, NucleoSpin Gel and PCR clean-up Kit を用いて目的の断片を回収した. これらの操作の後, 制限酵素消化した PCR 産物を消化した pIVEX2.3d に ligation-Convenience Kit を用いてライゲーションし *E. coli DH5 $\alpha$*  competent cells に形質転換した. 挿入された領域の塩基配列を PCR により確認し, 目的のプラスミド (pIVEX2.3d-Luc<sup>+</sup>) が得られたことを確認した. 作製した pIVEX2.3d-Luc<sup>+</sup> plasmid は *E. coli DH5 $\alpha$*  competent cells 内で増幅した後 Plasmid Midi Kit を用いて抽出精製した. 抽出した pIVEX2.3d-Luc<sup>+</sup> plasmid の純度は A<sub>260/280</sub> 比とアガロース電気泳動により確認した.

#### b) PNA-PEG conjugate および PNA oligomer による遺伝子発現抑制効果

先に合成した i-PPc および核酸化合物による遺伝子発現の抑制効果を比較することを目的として, *E. coli* 由来無細胞タンパク質合成系 (RTS 100 *E. coli* HY Kit) を用いたルシフェラーゼ発現量を検討した. PCR チューブに 12  $\mu$ L *E. coli* lysate, 10  $\mu$ L reaction mixture, 12  $\mu$ L amino acids solution, 1  $\mu$ L methionine solution, 5  $\mu$ L reconstitution buffer で構成される反応溶液を分注した. そこに所定濃度の PNA 溶液 5  $\mu$ L および 0.5  $\mu$ g/5  $\mu$ L pIVEX2.3d-Luc<sup>+</sup>溶液 2  $\mu$ L を添加後, その反応液を 30°C で 4 hours インキュベートした. 反応混合液 5  $\mu$ L を 0.01 mol/L PBS で 200 倍希釈し反応を止めたあと, 反応溶液 20  $\mu$ L と ONE Glo™ luciferase assay solution 20  $\mu$ L を混合し, 20  $\mu$ L を測定チューブに移し Lumat LB9507 luminometer で発光量を測定した. 本測定をサンプルごとに 5 回行い, 相対発光量の平均値と標準偏差を計算した. また control のルシフェラーゼ発現量を 100%とした際の各 PNA による遺伝子発現抑制率を算出した.

#### c) 二本鎖 DNA への PNA 化合物のインベージョン

遺伝子発現抑制機構の解明を目的として, PNA 化合物の DNA に対するインベージョンについて検討した. 前述の a) で得た pIVEX2.3d-Luc<sup>+</sup> plasmid の開始コドン近傍 119 bp の二本鎖 DNA (dsDNA) を PrimeSTAR™ HS DNA Polymerase Kit を用いて増幅し, Wizard SV Gel and PCR

Clean-Up System Kit を用いて精製した。ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い目的の dsDNA が調製できていることを確認した。

二本鎖 DNA (dsDNA) への PNA 化合物のインベージョンは、5 mM HEPES (pH 7.0) 緩衝液中 dsDNA 濃度が 100 nM, PNA 化合物濃度が 2000 nM となるよう調整し、30°C で 4 hours の条件で行った。反応終了後、1%ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いたゲルシフトアッセイによりインベージョンの有無を調べた。

#### 2-3-4. 結果および考察

##### a) Inchworm-type PNA-PEG conjugate による遺伝子発現抑制効果

pIVEX2.3d-Luc<sup>+</sup> plasmid の T7 プロモーター領域とルシフェラーゼの開始コドン領域と相補鎖を形成するように塩基配列を決定した 2 種の i-PPc (i-PPc\_T7\_FM, i-PPc\_ATG\_FM) によるルシフェラーゼ発現量への影響を評価した。その結果、i-PPc\_T7\_FM では 50 μl 添加した際に 10% 程度ルシフェラーゼの発現を抑制したものの 1 μM と 10 μM では発現を抑制しなかったのに対し、i-PPc\_ATG\_FM は 10 μM で 85% 程度、50 μM で完全にルシフェラーゼの発現を抑制した (Fig. 2-8)。さらに各 i-PPc の 1 塩基ミスマッチ型 (i-PPc\_T7\_MM, i-PPc\_ATG\_MM) では、i-PPc\_T7\_MM は濃度に依存せずルシフェラーゼの発現量を一切阻害しなかったのに対し、i-PPc\_ATG\_MM では 10 μM で 20% 弱、50 μM でも 25% 程度の発現抑制にとどまった。これらの結果は以下のように考察される。プロモーターは RNA ポリメラーゼが結合する DNA 領域で、開始コドン (ATG) のすぐ上流に存在する。主に転写の調節に関与するため、T7 プロモーター領域の塩基配列に対応した i-PPc\_T7\_FM が DNA にインベージョンして転写過程を阻害しない限りルシフェラーゼの発現は抑制されることはない。これは、i-PPc\_T7\_FM と i-PPc\_T7\_MM がルシフェラーゼの発現を抑制しなかった結果を支持している。この結果は、i-PPc がアンチセンスとして作用することでルシフェラーゼの発現が抑制されていることを間接的に示唆してい

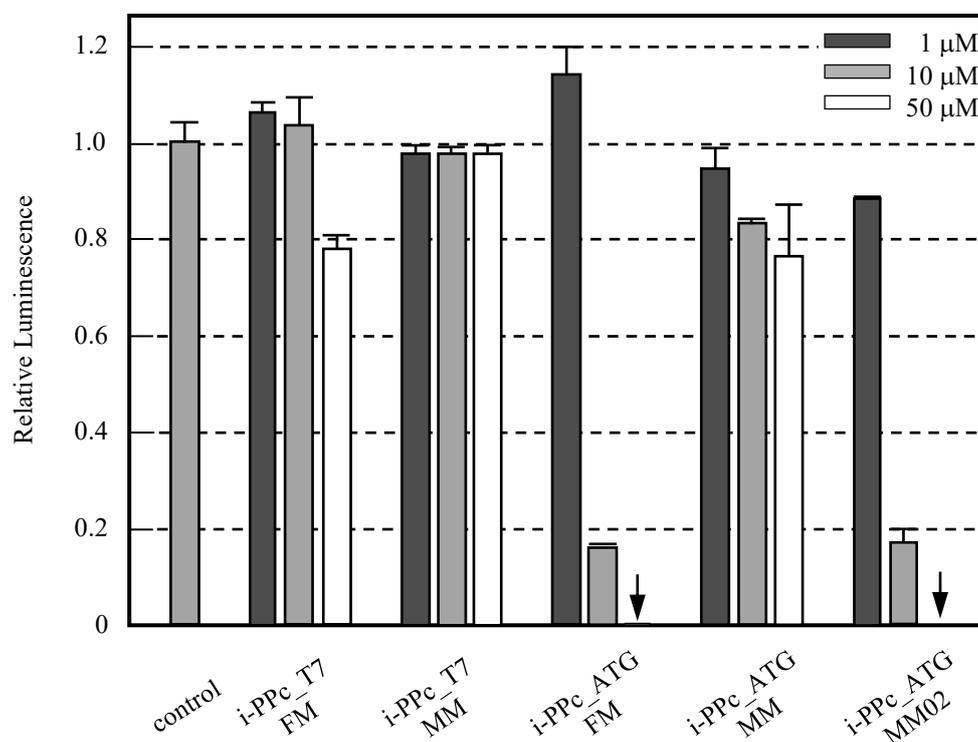


Fig. 2-8 無細胞タンパク質発現系における各 i-PPc 添加時の発光強度。

る。特筆すべき点は、生体内温度近傍で i-PPc\_ATG が 1 塩基の違いに依存して遺伝子発現を制御している点である。また、N 末端側で 1 塩基異なる i-PPc\_ATG\_MM02 では塩基配列依存的に発現を抑制できていないことがわかった。これは、N 末端あるいは C 末端側の PNA の役割と、それを構成する A/T, C/T 塩基対の含率に起因することが推察された。

つまり、i-PPc\_ATG\_FM の C 末端側 PNA (A/T = 5 塩基対, G/C = 3 塩基対) は N 末端側 (A/T = 7 塩基対, G/C = 1 塩基対) よりも C/G 含有量が高く、1 塩基が変異した際の相補鎖安定性に大きな違いが生じる。このため、C 末端側 (A/T = 6 塩基対, G/C = 2 塩基対) に変異が導入された i-PPc-ATG\_MM では相補鎖安定性に大きな違いが生じたと考えられるが、もともと相補鎖形成能が低い i-PPc\_ATG\_FM の N 末端側 (A/T = 7 塩基対, G/C = 1 塩基対) に変異が導入された i-PPc\_ATG\_MM02 (A/T = 8 塩基対, G/C = 0 塩基対) では、相補鎖の安定性に影響を及ぼさないことが推察された。以上の結果は、1 塩基認識能を誘起するためには、C 末端と N 末端の A/T, C/T 塩基対の含有量を考慮する必要があることがわかった。

#### b) ATG 領域を標的とした各 PNA-PEG conjugate と PNA oligomer による遺伝子発現抑制効果

開始コドン近傍を標的とした i-PPc による遺伝子発現抑制について詳細に検討した結果を Fig. 2-9 に示した。i-PPc\_ATG が 1 塩基の違いを認識して遺伝子発現を制御したのに対し、16 残基の PNA からなる PNA 化合物 (PNA<sub>16</sub>, PNA<sub>16</sub>-PEG<sub>12</sub>) ではフルマッチ型あるいはミスマッチ型いずれにおいても添加量の増加に伴い Luc<sup>+</sup>の発現量が減少することがわかった。後述するが、これは PNA<sub>16</sub>-PEG<sub>12</sub>\_FM, MM および PNA<sub>16</sub> oligomer の T<sub>m</sub> 値が 75°C 近傍 (FM) から 64°C 近傍 (MM) であり (Table 2-3), 30°C においては FM および MM 関係なく相補鎖を形成することに起因する (Fig. 2-15)。

また、i-PPc\_ATG の両末端の PNA 部 (PNA-C, PNA-N) とその 1 塩基ミスマッチ配列がルシフェラーゼの発現をどの程度抑制するか評価した。この結果、PNA-C\_MM ではいずれの濃度も 10~20%程度発現を抑制したのに対し、PNA-C\_FM では 50 μM でルシフェラーゼの発現を 85%程度抑制した。一方で、PNA-N はフルマッチ型とミスマッチ型いずれもルシフェラーゼ発現を抑制しないことが示された。この PNA-C\_FM と PNA-N\_FM を PEG で連結した、つまり i-PPc\_ATG\_FM ではわずか 10 μM でその効率に達することを考慮すると、これらの結果は inchworm 構造に起因すると考えられ、遺伝子発現抑制に影響を及ぼさない PNA-N が 1 塩基を認識する PNA-C の近傍に存在することでより効率的に遺伝子発現を抑制し、さらに 1 塩基の認識能を高めている可能性が示唆された。

• ATG region

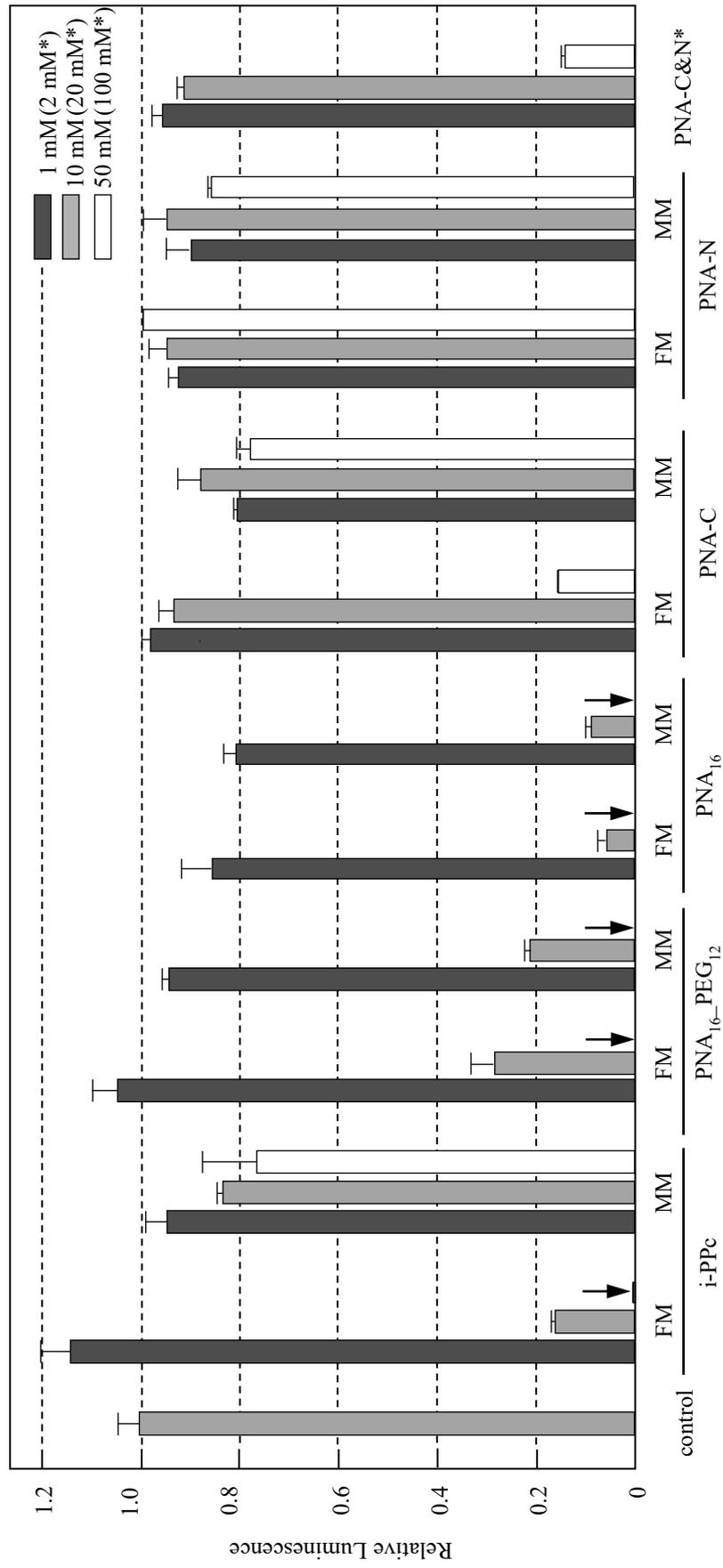


Fig. 2-9 無細胞タンパク質発現系における各 PNA-PEG conjugate および PNA oligomer 添加時の発光強度.

### c) i-PPc による遺伝子発現機構の解明

PNA は、Watson-Crick 塩基対だけでなく Hoogsteen 塩基対を介し、二本鎖 DNA (dsDNA) と相補鎖を形成することができる (Fig. 2-10 a). このインベージョンはゲルシフトアッセイにより確認することができる. 具体的には, dsDNA-PNA 複合体は, dsDNA よりも分子のサイズが大きくなるため電気泳動を行った際にゲル移動の遅延が観察される (Fig. 2-10 b). 本項目では, i-PPc の dsDNA へのインベージョンが遺伝子の発現を抑制している可能性 (アンチセンス) について検討することを目的とし, ルシフェラーゼ遺伝子の開始コドン近傍の 119 bp の dsDNA への i-PPc のインベージョンについて, ゲルシフトアッセイにより検討した.

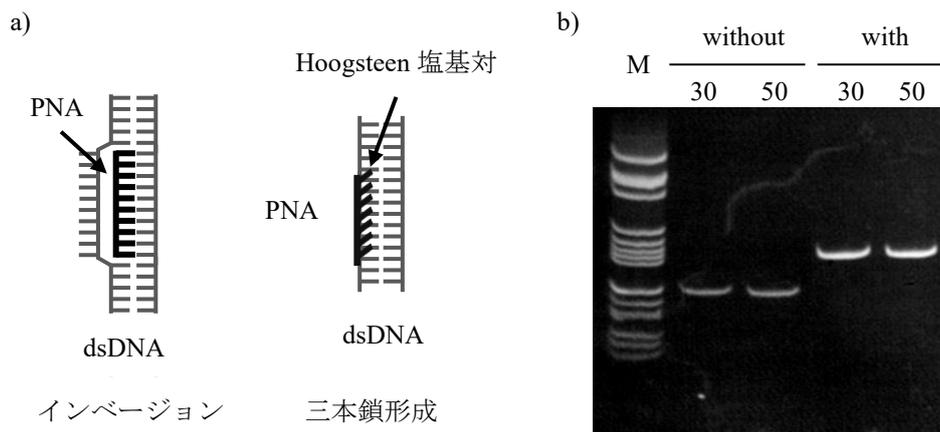


Fig. 2-10 a) PNA によるインベージョンのイメージ図および b) DsDNA (119 bp) と dsDNA-model-PNA (5'-AAAGAAAGG-3') インベージョン複合体のゲルシフトアッセイ.

その結果, i-PPc\_ATG およびブロック型 PNA<sub>16</sub>-PEG<sub>12</sub>, PNA-C と PNA\_N のフルマッチ, ミスマッチ型いずれにおいても dsDNA へのインベージョンに起因するゲルシフトは観察されなかった. 一方で, PNA<sub>16</sub>\_FM で僅かなゲルシフトがみられたことから dsDNA にインベージョンしている可能性が示唆された (Fig. 2-11). 以上より, i-PPc は mRNA を標的としたアンチセンス法で遺伝子の発現を抑制していることが示された.

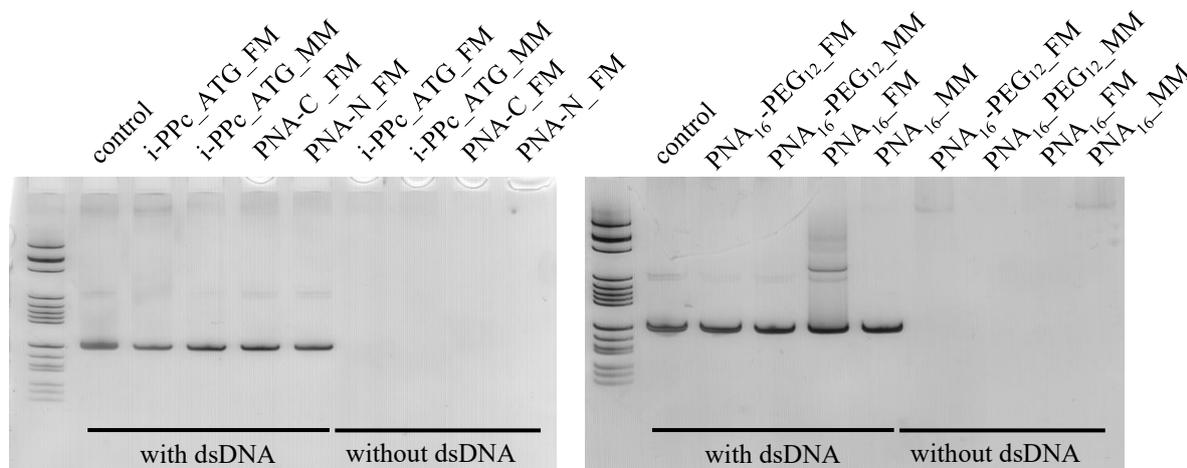


Fig. 2-11 DsDNA (119 bp) と PNA-PEG conjugate および PNA oligomer により形成されるインベージョン複合体のゲルシフトアッセイ.

## 2-3-5. まとめ

本項では、生体内温度近傍での 1 塩基の違いを認識した遺伝子発現制御を誘起する PNA 型人工核酸の開発を目的として中央 PEG 部の両末端に 8 塩基の PNA oligomer を配した i-PPc を設計し Fmoc 固相合成法により合成した。無細胞タンパク質発現系における i-PPc の 1 塩基の違いを認識した遺伝子発現抑制効果について検討した結果、ルシフェラーゼ遺伝子の ATG 領域を標的とした i-PPc を添加した際に最も顕著な 1 塩基認識能および遺伝子発現抑制効果が観測された。また i-PPc の遺伝子発現抑制機構は、mRNA を標的とするアンチセンスとして作用することが示された (Fig. 2-12)。

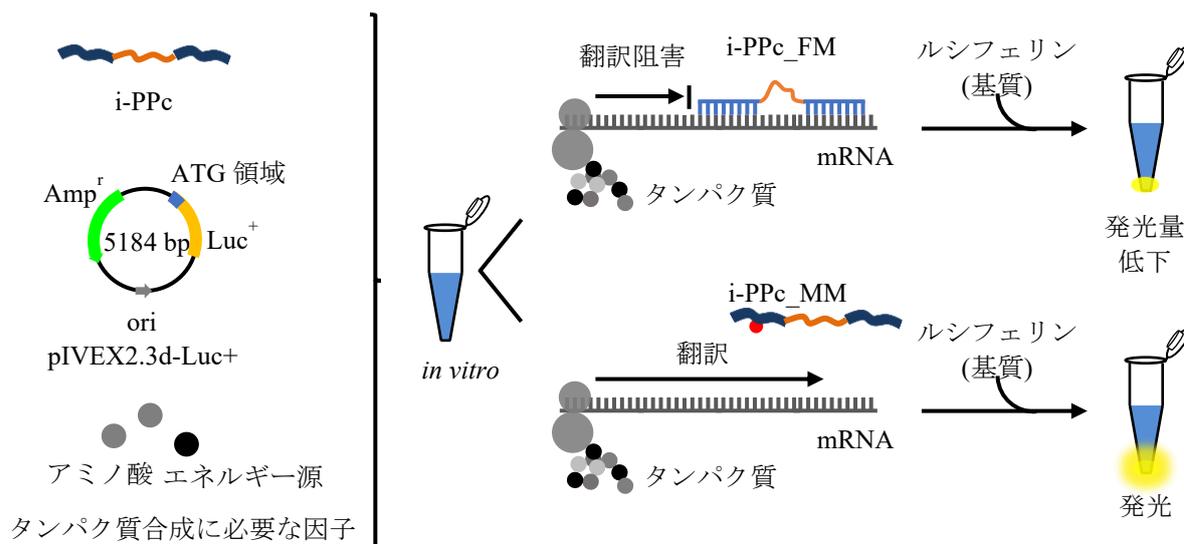


Fig. 2-12 無細胞タンパク質発現系 (*in vitro*) におけるルシフェラーゼ遺伝子の ATG 領域を標的とした i-PPc による 1 塩基の違いを認識したアンチセンス効果のイメージ図。

## 2-4. i-PPc の 1 塩基認識機構の解明

### 2-4-1. はじめに

本研究室で設計された i-PPc が無細胞タンパク質発現系における 1 塩基の違いを認識したアンチセンス効果を示すことが示された。しかし i-PPc による 1 塩基認識機構については解明されていない。これを解明するためには i-PPc の生体内温度近傍での相補鎖形成の安定性や状態について理解する必要があると考えられる。

PNA を含め核酸は、水素結合により相補鎖を形成し塩基同士のスタッキング相互作用により安定化する。これらは温度上昇に伴い二本鎖から一本鎖に解離し、温度を減少させることで一本鎖から二本鎖を形成する。これらの状態遷移は分光学的な手法で評価することができる。この状態遷移において二本鎖と一本鎖が 50%ずつ存在する温度を  $T_m$  値といい核酸の熱安定性を評価するための重要な要因となる。本稿では、ルシフェラーゼ遺伝子の ATG 領域を標的とした各 PNA-PEG conjugate および PNA oligomer の  $T_m$  値を分光学的に測定した。分光学的な方法を用いた核酸の  $T_m$  値測定にはインターカレーターを用いた蛍光測定や核酸塩基の 260 nm の吸収特性を利用した測定方法があるが、本研究では相補鎖形成に関係のない分子を添加せず、直接核酸の状態遷移を評価することができる 260 nm における吸光度測定を用いて測定した。また i-PPc は核酸との相補鎖形成を効果的に不安定化するように設計されているため、特にエントロピー変化

( $\Delta S$ ) やギブズの自由エネルギー変化 ( $\Delta G$ ) に違いが関与していると推察し昇温過程における  $T_m$  値を測定後、各熱力学パラメーターを算出し比較した。

DNA はこれまでに様々な二次構造が報告されており、一般的にはらせん軸に対し 20°傾き主溝が狭く深く、副溝が広く浅い右巻きの A 型 DNA、らせん軸に対して 6°程度傾き主溝が広く深く、副溝が狭く深い右巻きの B 型 DNA、A 型や B 型とは異なり左巻きの Z 型 DNA が知られており、通常 DNA は B 型のコンフォメーションを形成する<sup>12)</sup>。これらの構造の違いは、円偏光二色性 (CD) スペクトルにも影響を与える。このため一本鎖 DNA が二本鎖 DNA を形成することで長波長シフトがみられるなど DNA のコンフォメーションと CD スペクトルに関する研究が報告された<sup>13)-15)</sup>。最も一般的な B 型 DNA は、220 nm および 275 nm 近傍に正の極大ピークと 245 nm 近傍に負の極大ピークが観測される。また A 型 DNA は 210 nm 近傍に顕著な負の極大ピークと 270 nm 近傍に正の極大ピークがみられ、Z 型 DNA は 292 nm 近傍に負の極大ピークと 265 nm 近傍に正の極大ピークがみられることが示されている。一方で PNA はバックボーンに不斉炭素を持たないため CD スペクトルに影響を与えない。つまり CD 測定により、PNA の構造に影響を受けることなく i-PPc/ssDNA の状態遷移を DNA の二次構造の観点から評価できる。

本項ではルシフェラーゼ遺伝子の ATG 領域を標的とした各 PNA-PEG conjugate および PNA oligomer と合成 DNA (synDNA) の昇温過程における  $T_m$  値を測定し、熱力学パラメーターを算出した。また所定温度における i-PPc/DNA の CD 測定を行い、DNA の二次構造の変化を検出し i-PPc の 1 塩基認識機構について報告する。

#### 2-4-2. 試薬

- ・ 26 mer synDNA (5'-CCATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG-3') 北海道システムサイエンス
- ・ Tris-EDTA (TE) buffer (pH 8.0) ニッポンジーン
- ・ 塩化ナトリウム (NaCl) Wako
- ・ リン酸二水素ナトリウム・二水和物 Wako
- ・ リン酸水素二ナトリウム・十二水和物 Wako
- ・ 流動パラフィン Wako

#### 2-4-3. 実験操作

##### a) SynDNA と各 PNA-PEG conjugate および PNA oligomer の熱安定性評価

所定濃度の PNA/synDNA 溶液 (10 mM PB (pH 7.0), 150 mM NaCl) を調整し、キャピラリーセルに 7  $\mu$ L 程度入れ、上端を流動パラフィンでシーリングした。95°C で 5 min 静置した後、1°C/min で 95-4°C まで降温させてアニーリングした後、4-95°C の昇温過程 (1°C/min) における 260 nm の吸光度を測定した。得られた融解曲線から  $T_m$  値を二次微分法で見積もり、van't Hoff の式を用いて熱力学パラメーターを算出した<sup>16)</sup>。

PNA の濃度測定は JASCO-V630Bio の 1 滴測定ユニットを用いて、TE buffer (pH 8.0) 中で測定 (セル長: 1 mm, 波長: 260 nm, 積算回数: 5 回) した。また、融解温度測定は JASCO-V630Bio のメルティング測定用キャピラリージャケットを用いて測定 (レスポンス: medium, 測定波長: 260 nm, 開始時間: 300 sec, 開始温度: 4°C, データ間隔: 0.1°C, 温度勾配: 1°C/min, 目標温度: 95°C, 測定収束条件: 0.10°C, 積算回数: 5 回) した。

##### b) 所定温度での i-PPc/SynDNA 溶液の CD スペクトル測定

100  $\mu$ M i-PPc\_ATG 水溶液を調整し、10 mM PB (pH 7.0) および 150 mM NaCl を含む終濃度 80, 0  $\mu$ M i-PPc\_ATG/synDNA を PCR チューブに調整した。調整した各サンプルを 95°C で 5

min 処理したあと 4°C まで降温 (1 °C/min) させ, 150 mM NaCl を含む 10 mM PB (pH 7.0) 225  $\mu$ L に 75  $\mu$ L をできる限り素早く加え, 4°C 中で数回ピペッティングした. これを JASCO-J820 の測定室で 4°C に調節された 1 mm 石英セルに全量 300  $\mu$ L を移し, 5 min ホールドした. 5 min 後に所定温度での CD スペクトルを測定 (感度: Standard, 開始波長: 350 nm, 終了波長: 200 nm, 取り込み間隔: 0.1 nm, 走査モード: Continuous, 走査速度: 100 nm/min, レスポンス: 0.5 sec, バンド: 1 nm, スキャン: 32 回, セル長: 1 mm, 測定温度: 4, 37, 70°C) した. なお, 測定間の 4-37°C, 37-70°C 間は JASCO-J820 のペルチェ温調器を用いて 1 °C/min で昇温した.

#### 2-4-4. 結果および考察

所定濃度における i-PPc\_ATG/synDNA の融解曲線を Fig. 2-13 a, b に示した. 所定濃度での i-PPc\_ATG\_FM/synDNA の融解曲線はシグモイド型の曲線となり, 二次微分法を用いて  $T_m$  値を算出した結果, 32.74°C から 37.25°C と算出された (Table 2-2). また得られた各濃度の  $T_m$  値から Van't Hoff の式 ( $1/T_m = (R/\Delta H) \cdot \ln(C_i/4) + (\Delta S/\Delta H)$ , R: 気体定数; 1.987 cal $\cdot$ K $^{-1}\cdot$ mol $^{-1}$  (8.314 J $\cdot$ K $^{-1}\cdot$ mol $^{-1}$ ),  $C_i$ : 核酸の total conc) を用いて熱力学パラメーターの算出を行った結果,  $\Delta H = -62.62$  kcal/mol, 30°C における  $\Delta S$  ( $T_{30}\Delta S$ ) = -54.63 kcal/mol,  $\Delta G = -7.99$  kcal/mol と算出された. 一方で i-PPc\_ATG\_MM/synDNA の融解曲線では, 変曲点のある明確な融解曲線は現れず  $T_m$  値を算出できなかった. これは, i-PPc\_ATG\_MM が測定温度の範囲内 (4-95°C) において相補鎖を形成していない可能性が考えられた.

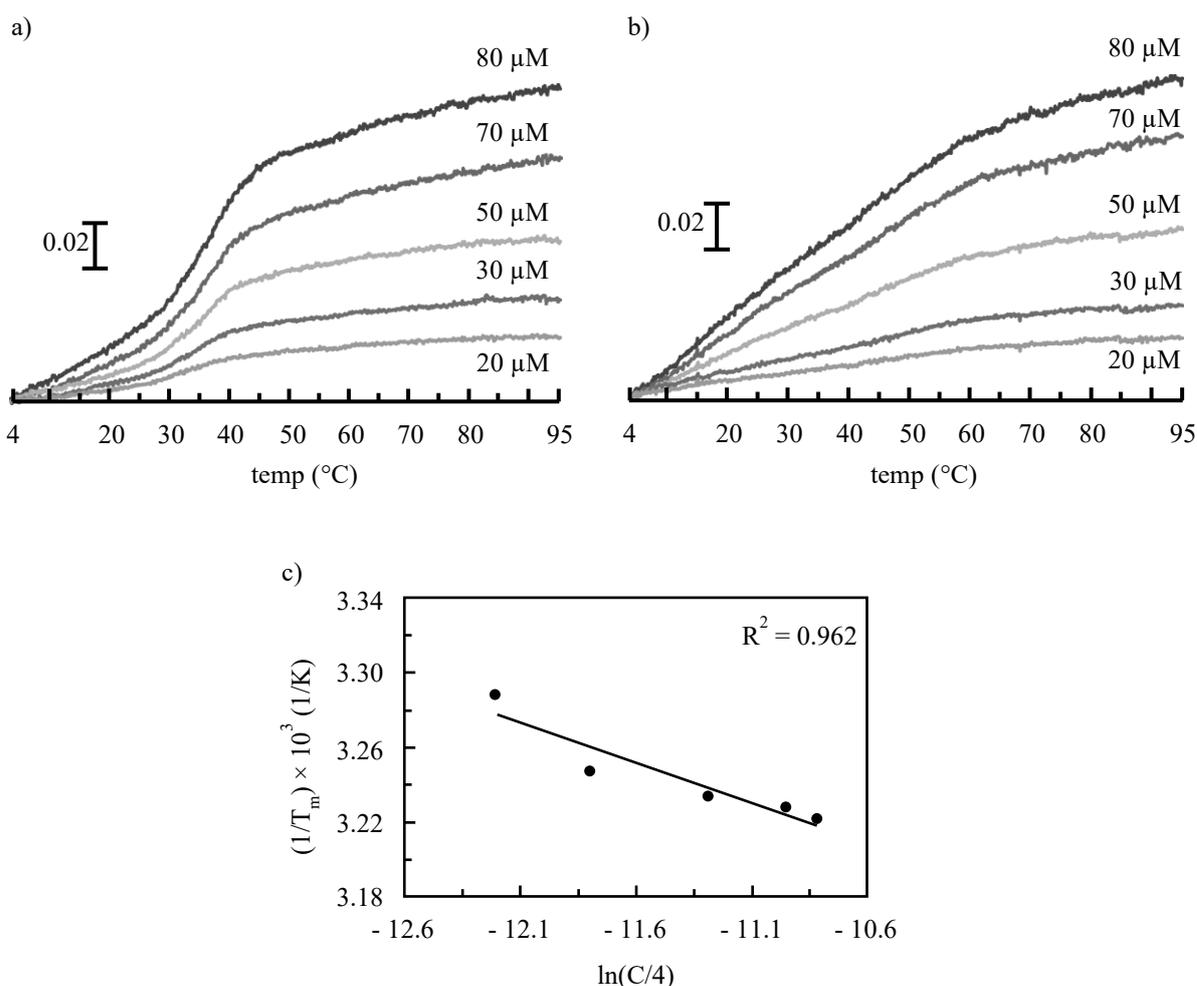


Fig. 2-13 ルシフェラーゼ遺伝子 ATG 領域を標的とした a) i-PPc\_ATG\_FM/synDNA ならびに b) i-PPc\_ATG\_MM/synDNA の融解曲線, c)  $1/T_m$  vs  $\ln(C/4)$  プロット (i-PPc\_ATG\_FM/synDNA).

Table 2-2 所定濃度の i-PPc\_ATG\_FM/synDNA の  $T_m$  値および熱力学パラメーター。

Conc. ( $\mu\text{M}$ )	range ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (cal/K $\cdot$ mol)	$T_{30}\Delta S$ (kcal/mol)	$\Delta G$ (kcal/mol)
80	4-25	37.25	- 62.62	- 180.22	- 54.63	- 7.99
70	4-35	36.63				
50	5-30	36.08				
30	4-25	34.80				
20	5-30	32.74				

所定温度における各 i-PPc の相補鎖形成挙動を CD スペクトル測定により評価した結果、70 $^{\circ}\text{C}$  での synDNA の CD スペクトルは i-PPc\_ATG\_FM あるいは i-PPc\_ATG\_MM の有無にかかわらず synDNA のみと同様のスペクトルパターンを示したことから、いずれの i-PPc も synDNA と相補鎖を形成していないことが示された (Fig. 2-14, 70 $^{\circ}\text{C}$ )。また 37 $^{\circ}\text{C}$  では i-PPc\_ATG\_FM 存在下での synDNA の CD スペクトルは 202 nm および 246 nm 近傍に顕著な負の極大ピーク、265 nm 近傍に生の極大ピークが観測され、A 型 DNA に特徴的な CD スペクトルパターンが観測された。一方で i-PPc\_ATG\_MM 存在下では synDNA のみと比較して CD スペクトルに違いがみられず、i-PPc\_ATG\_MM は 37 $^{\circ}\text{C}$  では synDNA と相補鎖を形成していないことが示された (Fig. 2-14, 37 $^{\circ}\text{C}$ )。さらに 4 $^{\circ}\text{C}$  では、i-PPc\_ATG\_FM 存在下において 37 $^{\circ}\text{C}$  で観測された CD スペクトルと同様の波長近傍に増大した負の極大ピークと正の極大ピークが観測され i-PPc\_ATG\_FM はより安定に synDNA と相補鎖を形成していることが示された (Fig. 2-14, 4 $^{\circ}\text{C}$ )。また 4 $^{\circ}\text{C}$  における i-

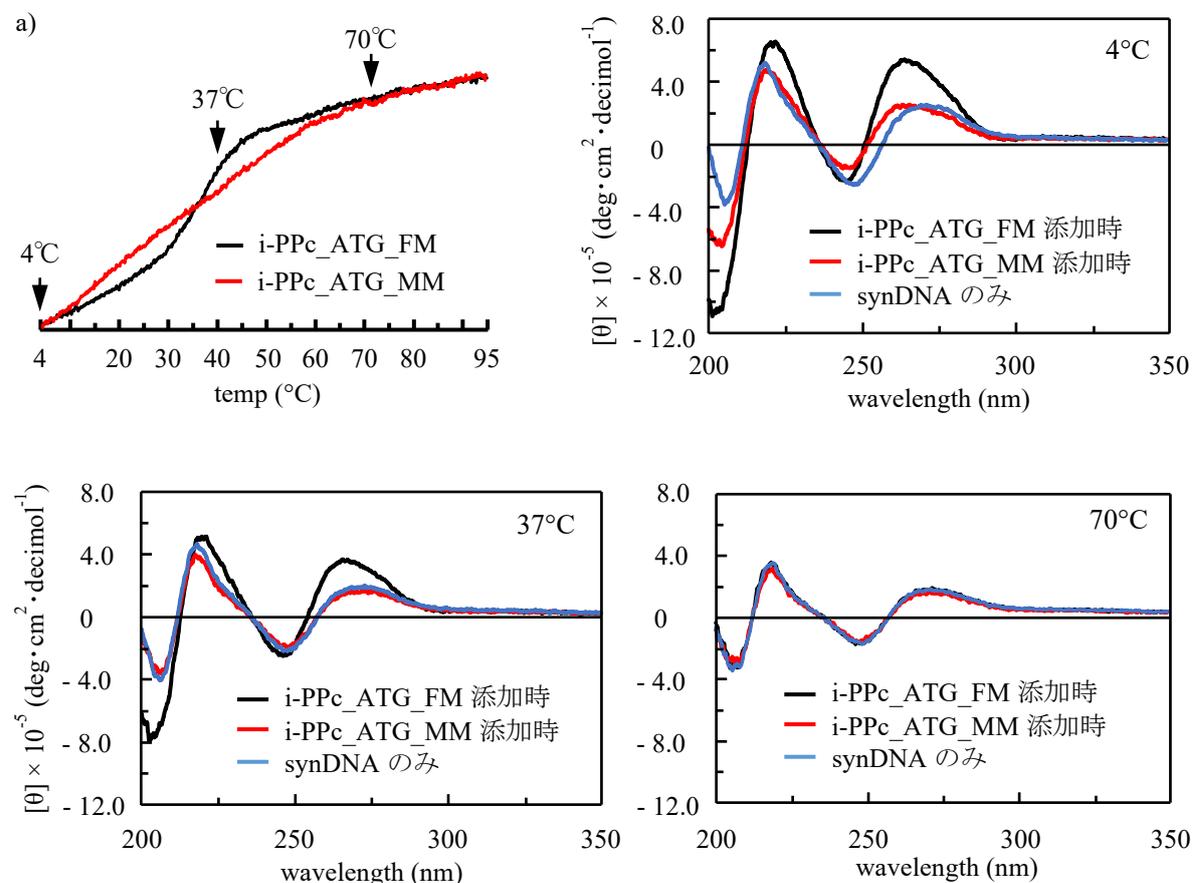


Fig. 2-14 a) i-PPc\_ATG\_FM および MM/synDNA の融解曲線と各温度における i-PPc\_ATG\_FM または i-PPc\_ATG\_MM 存在下および非存在下での synDNA の CD スペクトル。

PPc\_ATG\_FM 添加時の synDNA の CD スペクトルパターンは、2001 年 N. Sugimoto *et. al.*により報告された 16-mer PNA (N'-ATAAATTGGATACAAA-C'/d(5'-TTTGTATCCAATTTAT-3')) の CD スペクトルパターン<sup>17)</sup>と酷似していることがわかった。このことから i-PPc\_ATG\_FM は PEG 両末端 8 塩基の PNA 部が相補鎖を形成し、あたかも 16 塩基として相補鎖を形成していることが推察される。これに対し i-PPc\_ATG\_MM 添加時では 265 nm 近傍の正の極大ピークおよび 204 nm 近傍のピークの僅かな短波長シフトが観測された (Fig. 2-14 b)。これは i-PPc\_ATG\_MM の両末端 PNA 部が部分的に相補鎖を形成したこと、あるいは非特異的に相補鎖が形成されたことが原因と考えられた。これらの結果は、i-PPc\_ATG\_MM はいずれの測定温度条件において synDNA と相補鎖を形成しないことを意味しており、このために無細胞タンパク質発現系において 1 塩基を認識した遺伝子発現抑制効果を誘起することがわかった。

次に i-PPc の 1 塩基認識機構の解明を目的として各 PNA-PEG conjugate および PNA oligomer の  $T_m$  値を測定し、熱力学パラメーターを算出した結果を Table 2-3 に示した (supplementary data)。

先述のとおり i-PPc は生体内温度近傍に  $T_m$  値を有し 1 塩基異なる i-PPc\_ATG\_MM は synDNA と測定範囲内で相補鎖を形成できないほど不安定になることが示された。一方で、Table 2-3 より、PNA<sub>16</sub>-PEG<sub>12</sub> ではフルマッチ型で  $T_m = 76.18^\circ\text{C}$ 、 $\Delta G_{30} = -23.25 \text{ kcal/mol}$ 、ミスマッチ型で  $T_m = 64.94^\circ\text{C}$ 、 $\Delta G_{30} = -22.62 \text{ kcal/mol}$  と算出され、FM と MM の差は  $\Delta T_m = 11.24^\circ\text{C}$ 、 $\Delta \Delta G_{30} = -0.63 \text{ kcal/mol}$  と見積もられた。PNA<sub>16</sub> と比較 ( $\Delta \Delta G_{30} = 1.97 \text{ kcal/mol}$ ) すると、PEG<sub>12</sub> の導入により相補鎖安定性が向上していることが示された。また i-PPc ( $\Delta G_{30} = -7.99 \text{ kcal/mol}$ ) と比較するとその安定性は高すぎるため、生体内温度近傍で 1 塩基変異を認識することは困難であることが示された。

PNA-C の  $T_m$  値および  $\Delta G_{30}$  値は、フルマッチ型で  $T_m = 33.92^\circ\text{C}$ 、 $\Delta G_{30} = -8.08 \text{ kcal/mol}$ 、ミスマッチ型で  $T_m = 11.66^\circ\text{C}$ 、 $\Delta G_{30} = -5.19 \text{ kcal/mol}$  と見積もられた。これらの差は  $\Delta T_m = 22.26^\circ\text{C}$ 、 $\Delta \Delta G_{30} = 2.89 \text{ kcal/mol}$  と算出され、この大きな  $T_m$  値および  $\Delta G_{30}$  値の差が先の無細胞タンパク質発現系における 10, 50  $\mu\text{M}$  PNA-C による 1 塩基の違いを認識した遺伝子発現抑制に起因することが示された (Fig. 2-9)。また興味深いことに PNA-C\_FM の  $T_m$  値および  $\Delta G_{30}$  値は、i-PPc\_ATG\_FM のそれと同等の値を示しており、16 塩基の PNA で構成される i-PPc は 8 塩基の PNA oligomer と同等の相補鎖安定性であることが明らかとなった。一方で、PNA-N の  $T_m$  値および  $\Delta G_{30}$  値はフルマッチ型で  $T_m = 17.56^\circ\text{C}$ 、 $\Delta G_{30} = -5.44 \text{ kcal/mol}$ 、ミスマッチ型で  $T_m = 11.93^\circ\text{C}$ 、 $\Delta G_{30} = -4.80 \text{ kcal/mol}$  と算出され、生体内温度近傍では相補鎖が不安定であることが示された。これは PNA-N が A/T 塩基対リッチな塩基配列で構成されているためと推察される。

以上より、i-PPc\_ATG\_FM は 16 塩基で synDNA と相補鎖を形成しているにもかかわらず C 末端側の PNA 部と同等の相補鎖安定性であることが示された。また、i-PPc\_ATG の 1 塩基認識は C 末端 PNA 部の相補鎖形成に依存し、相補鎖形成した際には N 末端 PNA 部も相補鎖を形成することで安定性に寄与する。一方で、C 末端 PNA 部が相補鎖を形成しない場合は N 末端 PNA 部は分子の拡散に寄与することで、1 塩基の違いを認識していることが明らかとなった。

Table 2-3 各 PNA-PEG conjugate および PNA oligomer の  $T_m$  値および熱力学パラメーター。

Sample	$T_m$ (°C)	$\Delta H$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (cal/mol·K)	$T_{30}\Delta S$ (kcal/mol·K)	$\Delta G_{30}$ (kcal/mol)
i-PPc_ATG_FM	34.80	-62.62	-180.22	-54.63	-7.99
i-PPc_ATG_MM	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
PNA <sub>16</sub> -PEG <sub>12</sub> _FM	76.18	-121.91	-325.44	-98.66	-23.25
PNA <sub>16</sub> -PEG <sub>12</sub> _MM	64.94	-150.54	-421.96	-127.92	-22.62
PNA <sub>16</sub> _FM	75.17	-97.89	-256.96	-77.90	-19.99
PNA <sub>16</sub> _MM	64.59	-106.83	-292.97	-88.81	-18.02
PNA-C_FM	33.92	-61.27	-175.45	-53.19	-8.08
PNA-C_MM	11.66	-28.07	-75.48	-22.88	-5.19
PNA-N_FM	17.56	-28.07	-75.48	-33.91	-5.44
PNA-N_MM	11.93	-37.15	-106.72	-32.35	-4.80

Condition of  $T_m$  measurements : Total conc. 30  $\mu$ M PNA/synDNA in 10 mM PB (pH 7.0) and 150 mM NaCl, V-630bio spectrophotometer (JASCO),  $\lambda = 260$  nm, 4°C to 95°C at a rate of 1 °C/min.

## 2-4-5. まとめ

ルシフェラーゼ遺伝子の ATG 領域を標的とした i-PPc\_ATG の 1 塩基認識機構について各 PNA-PEG conjugate および PNA oligomer の  $T_m$  値および熱力学パラメーターを算出し, i-PPc\_ATG の CD スペクトル測定を行った結果, i-PPc\_ATG\_FM は生体内温度近傍で相補鎖を形成するのに対し, 1 塩基異なる i-PPc\_ATG\_MM は相補鎖を形成できないほど不安定化されていることが明らかとなり, この挙動により 1 塩基の違いを認識し遺伝子発現を抑制していることがわかった. また i-PPc\_ATG\_FM は 16 塩基で相補鎖を形成するにもかかわらず PNA-C\_FM と同等の熱安定性を示すため, 配列特異性を維持した状態で相補鎖形成を不安定化できていることが明らかとなった. この 1 塩基認識には PEG 両末端に配した PNA 部の相補鎖安定性の違いが関与しており, 片側の PNA 部の  $T_m$  値を生体内温度近傍 (37°C) に設定し, もう片側の PNA 部をそれよりも低  $T_m$  値に設定することで, 効率的に 1 塩基の違いを認識していることが示された.

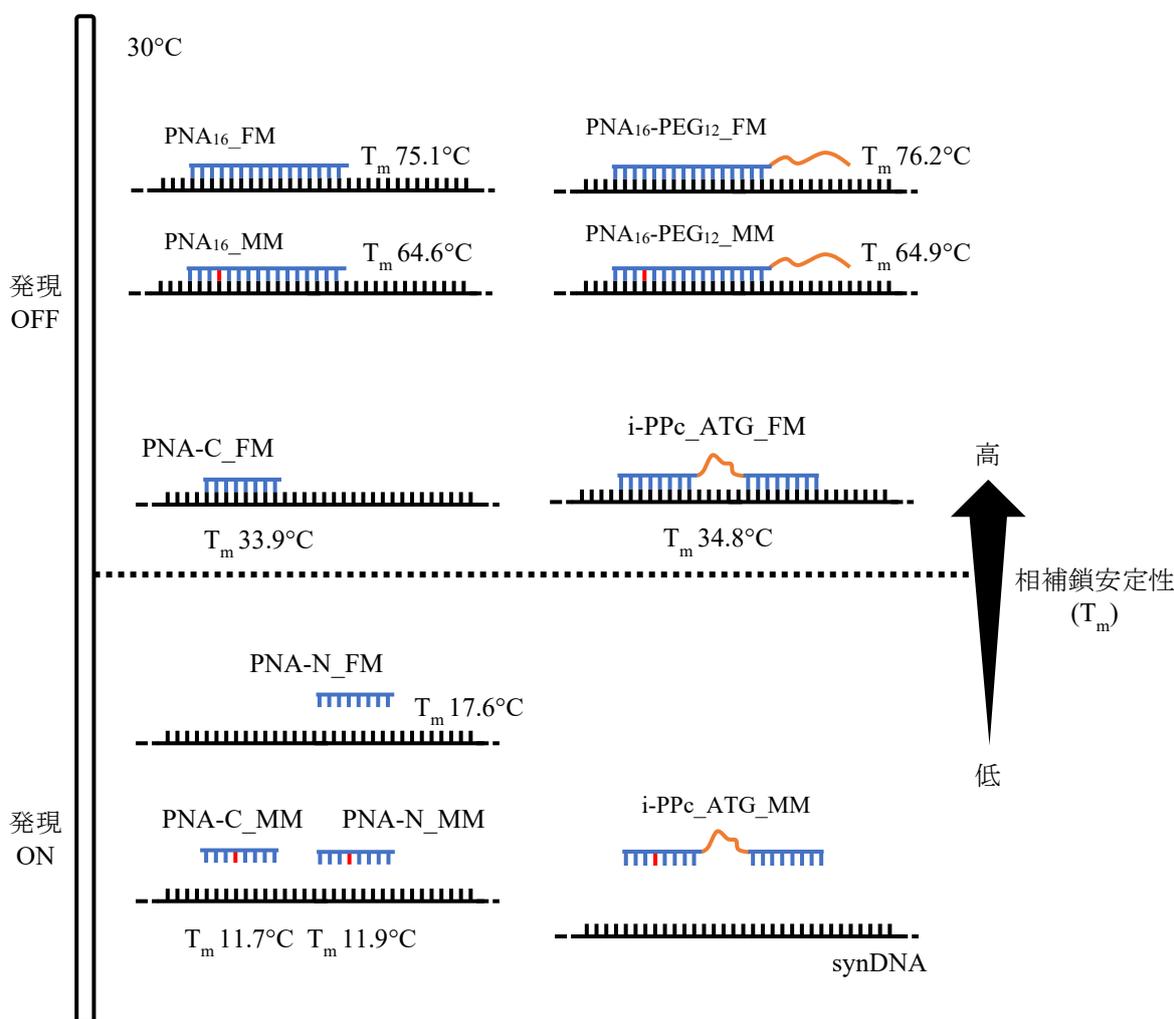


Fig. 2-15 各 PNA-PEG conjugate および PNA oligomer の 30°C における相補鎖形成挙動及び 1 塩基認識能した遺伝子発現抑制効果のイメージ図.

## 2-5. i-PPc の設計について

### 2-5-1. はじめに

これまでにルシフェラーゼ遺伝子の ATG 領域を標的とした i-PPc\_ATG が 1 塩基の違いを認識し遺伝子の発現を抑制することや i-PPc\_ATG/synDNA の熱安定性を評価した。この際に用いた i-PPc\_ATG は相補鎖を形成しない PEG<sub>12</sub> 部に対応する mRNA または synDNA の塩基数は 6 塩基であり、この塩基数が i-PPc\_ATG の相補鎖安定性に与える影響については検討されていない。本項では、i-PPc\_ATG\_FM の中央 PEG 部に対応する synDNA の塩基数が 3, 6, 12 塩基となるような synDNA を購入し T<sub>m</sub> 値および熱力学パラメーターを算出することで PEG<sub>12</sub> 部に対応する synDNA の塩基数が i-PPc\_ATG\_FM/synDNA の相補鎖安定性に与える影響について検討した。

### 2-5-2. 試薬

- synDNA-3: 5'-CCATGGAAGACGCAAAACATAAAGCAACGCCAA-3'
- synDNA-6: 5'-CCATGGAAGACGCCAAAACATAAAGCFCCAA-3'
- synDNA-12: 5'-CCATGGAAGACGCCAACGCCAAAACATAAAG-3'

### 2-5-3. 実験操作

2-4-3. に準じる。

### 2-5-4. 結果および考察

i-PPc\_ATG\_FM の C 末端および N 末端 PNA 間の距離 (中央 PEG 部に対応する synDNA 数) が 3, 6, 12 塩基になるように設計した 33 mer synDNA-3, 6, 12 と i-PPc\_ATG\_FM の融解曲線を Fig. 2-16 に示した。これらの融解曲線から各 T<sub>m</sub> 値を算出した結果、i-PPc\_ATG\_FM/synDNA-3 の T<sub>m</sub> = 33.80-40.54°C と算出され i-PPc\_ATG\_FM と synDNA-6, 12 の T<sub>m</sub> 値と比較して僅かに高い T<sub>m</sub> 値が示された。また i-PPc\_ATG\_FM/synDNA-6 と i-PPc\_ATG\_FM/synDNA-12 の T<sub>m</sub> 値を比較すると i-PPc\_ATG\_FM/synDNA-6 の T<sub>m</sub> = 30.23-38.08°C, i-PPc\_ATG\_FM/synDNA-12 の T<sub>m</sub> = 32.45-37.60°C と算出されそれぞれの T<sub>m</sub> 値に大差は観測されなかった (Table 2-4)。

また得られた各 T<sub>m</sub> 値から i-PPc\_ATG\_FM/synDNA-3, 6, 12 の熱力学パラメーターを算出し 30°C における  $\Delta G_{30}$  値を比較すると、synDNA-3 と synDNA-6 の  $\Delta\Delta G_{30} = -0.44$  kcal/mol, synDNA-6 と synDNA-12 の  $\Delta\Delta G_{30} = +0.36$  kcal/mol, synDNA-3 と synDNA-12 の  $\Delta\Delta G_{30} = -0.08$  kcal/mol となり 30°C における i-PPc\_FM と synDNA-3, 6, 12 の相補鎖安定性は、i-PPc\_ATG\_FM/synDNA-3  $\approx$  i-PPc\_ATG\_FM/synDNA-12 > i-PPc\_ATG\_FM/synDNA-6 の順で不安定であることが示され、至適な PEG<sub>12</sub> 部の synDNA の塩基数がある可能性が示唆された。しかし本研究において、この差は僅かであったため i-PPc の中央 PEG 部分の synDNA の塩基数が相補鎖安定性に及ぼす影響については詳細に検討することができなかった。また synDNA-6 を用いた場合がわずかに不安定であった原因は、DNA が A 型コンフォメーションを形成する i-PPc/synDNA の両末端の PNA 部と標的の 8 塩基 synDNA の空間的な配置が影響していると推察しているが詳細には不明である。

以上より、i-PPc 中央 PEG 部分の synDNA の塩基数が相補鎖形成に与える影響について T<sub>m</sub> 値および熱力学パラメーターを算出し検討した結果、その差は僅かであるものの i-PPc\_FM/synDNA-6 が最も不安定であり至適の塩基数がある可能性が示唆された。しかし本研究で設計した塩基数では i-PPc の相補鎖形成に影響はないと判断した。

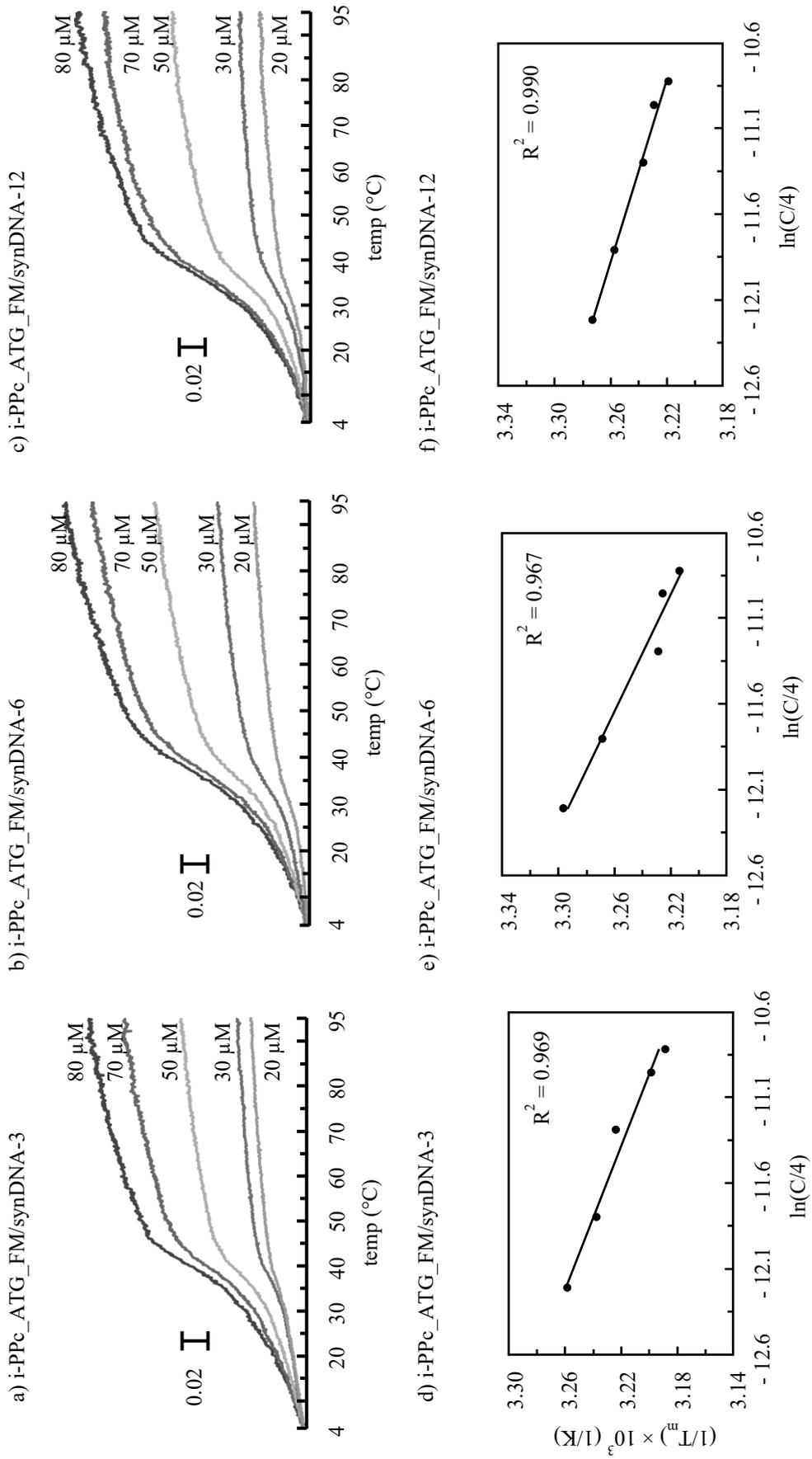


Fig. 2-16 所定濃度の i-PPc\_ATG\_FM/a) synDNA-3, b) synDNA-6, c) synDNA-12 の融解曲線および i-PPc\_ATG\_FM/d) synDNA-3, e) synDNA-6, f) synDNA-12 の  $1/T_m$  vs  $\ln(C/4)$  プロット.

Table 2-4 所定濃度 i-PPc/synDNA-3, 6, 12 の  $T_m$  値および熱力学パラメーター.

Sample	Total Conc. ( $\mu\text{M}$ )	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )	$\Delta H$ (kcal/mol)	$\Delta S$ (cal/mol $\cdot$ K)	$\Delta G_{30}$ (kcal/mol)
synDNA-3	80	40.54	- 41.30	- 110.32	- 7.86
	70	39.55			
	50	37.09			
	30	35.81			
	20	33.80			
synDNA-6	80	38.08	- 33.82	- 87.09	- 7.42
	70	36.91			
	50	36.59			
	30	32.81			
	20	30.23			
synDNA-12	80	37.60	- 53.20	- 149.82	- 7.78
	70	36.57			
	50	35.87			
	30	33.92			
	20	32.45			

Condition of  $T_m$  measurements : Total conc. 80, 70, 50, 30, 20  $\mu\text{M}$  i-PPc\_ATG\_FM/synDNA-3, 6, 12 in 10 mM PB (pH 7.0) and 150 mM NaCl, V-630bio spectrophotometer (JASCO),  $\lambda = 260$  nm,  $4^{\circ}\text{C}$  to  $95^{\circ}\text{C}$  at a rate of  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

## 2-6. 小括

本研究では生体内温度近傍で1塩基の違いを認識した遺伝子発現抑制を誘起するPNA型人工核酸の開発を目的として両親媒性のPEG<sub>12</sub>の両末端に8塩基のPNAを配したi-PPcを設計した。

構築したプラスミドのT7プロモーター領域およびATGコドン領域を標的としたi-PPcおよびブロック型PNA-PEG conjugate, PNA oligomerを合成し無細胞タンパク質発現系での遺伝子発現抑制効果について検討した結果, ATGコドン領域を標的としたi-PPcにおいて顕著に1塩基の違いを認識してアンチセンス的に発現を抑制することが示された。

またi-PPcの1塩基認識機構の解明を目的としてATGコドン領域を標的としたPNA-PEG conjugateおよびPNA oligomerの熱安定性と相補鎖形成挙動を評価した結果, i-PPc\_ATG\_FMは16塩基としてsynDNAと相補鎖を形成していることが示され, さらにPNA-Cと同等のT<sub>m</sub>値およびΔG<sub>30</sub>値の示したことからi-PPcは配列特異性を維持した状態で相補鎖形成を不安定化していることが明らかとなった。また, i-PPc\_ATG\_FMはC末端側に1塩基の違いを導入する(i-PPc\_ATG\_MM)ことで相補鎖を形成できないほど相補鎖形成が不安定になることが示された。これらの1塩基の違いを認識する機構にi-PPc両末端の8塩基のPNA oligomerの相補鎖安定性の違いが関与していることが示された。

以上より, 生体内温度近傍で1塩基の違いを識別し遺伝子の発現を抑制できるinchworm型人工核酸を開発することができた。

## 2-7. 参考文献

- 1) Z. Liu *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**(33), 10876-10877 (2008).
- 2) W. Li *et al.*, *Prog. Polym. Sci.*, **38**, 421-444 (2013).
- 3) A. Abuchowski *et al.*, *J. Biol. Chem.*, **252**(11), 3578-3581 (1977).
- 4) X. Lu and K. Zhang, *Nano Res.*, **11**(10), 5519-5534 (2018).
- 5) P. Bailon and W. Berthold, *Pharm. Sci. Technol. Today*, **1**(8), 352-356 (1998).
- 6) L.H. Belén *et al.*, *Front. Pharmacol.*, **10**(1450), 1-16 (2019).
- 7) F.M. Veronese and G. Pasut, *Drug Discov. Today*, **10**, 1451-1458 (2005).
- 8) N. Shokrzadeh *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **24**, 5758-5761 (2014).
- 9) J.M. Govan *et al.*, *Bioconjug. Chem.*, **22**(10), 2136-2142 (2011).
- 10) C.D. Chang and J. Meienhofer, *Int. J. Pep. Protein Res.*, **11**, 246-249 (1978).
- 11) S.A. Thomson *et al.*, *Tetrahedron*, **51**(22), 6179-6194 (1995).
- 12) D.W. Ussery, *Encyclopedia Life Sci.*(2002).
- 13) M.J.B. Tunis-Schneider and M.F. Maestre, *J. Mol. Biol.*, **52**, 521-541 (1970).
- 14) D.M. Gray *et al.*, *Methods Enzymol.*, **211**, 389-406 (1992).
- 15) J.C. Sutherland *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78**(8), 4801-4804 (1981).
- 16) N.C. Silvester *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, **5**, 917-923 (2007).
- 17) N. Sugimoto *et al.*, *Biochem.*, **40**, 8444-8451 (2001).

### 第3章 細胞膜透過型 i-PPc による細胞内での遺伝子発現制御

#### 3-1. はじめに

先の章では無細胞タンパク質発現系における i-PPc の 1 塩基の違いを認識した遺伝子発現抑制効果について報告した. しかしこの評価系は *E. coli* 抽出液などを用いた *in vitro* の評価系であり, 細胞を対象としていない. このため i-PPc を核酸医薬として用いるためには, 無細胞タンパク質発現系から細胞を用いた評価系に展開する必要がある. 本研究では, i-PPc による 1 塩基の違いを認識した細胞内遺伝子発現抑制効果について検討した.

本章では, 蛍光色素でラベル化した i-PPc を合成し細胞内輸送挙動を評価し, サイトゾルへの輸送を目的として細胞膜透過シグナルペプチドを修飾した i-PPc(R<sub>9</sub>) の合成と細胞内輸送および細胞内での 1 塩基変異を認識した遺伝子発現抑制について報告する.

#### 3-2. i-PPc の細胞内輸送挙動評価

##### 3-2-1. はじめに

細胞内で i-PPc による遺伝子発現制御を可能とするためには, i-PPc の細胞毒性や細胞内輸送経路に関する情報が必要となる.

細胞毒性は, i-PPc 添加後の細胞生存率を生細胞内の脱水素酵素活性より見積もった. これは発色基質であるテトラゾリウム塩 WST-8 が生細胞内の脱水素酵素により水溶性 WST-8 formazan へと還元され, この吸光値を測定 ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) することで細胞生存率を見積もることができる (Fig. 3-1). 細胞内輸送挙動に関する評価には, sulforhodamine B (SRB) で蛍光ラベル化した i-PPc と取り込み機構が既知である蛍光標識された取り込みマーカーとの共局在法を用いた蛍光顕微鏡像から判断した. 先述したが, 細胞による取り込み機構にはクラスリン介在性エンドサイトーシスやクラスリン介在性エンドサイトーシス, マイクロピノサイトーシスなどの機構が存在し, 各取り込み機構において既知のマーカーが存在する. 本研究では, クラスリン介在性エンドサイ

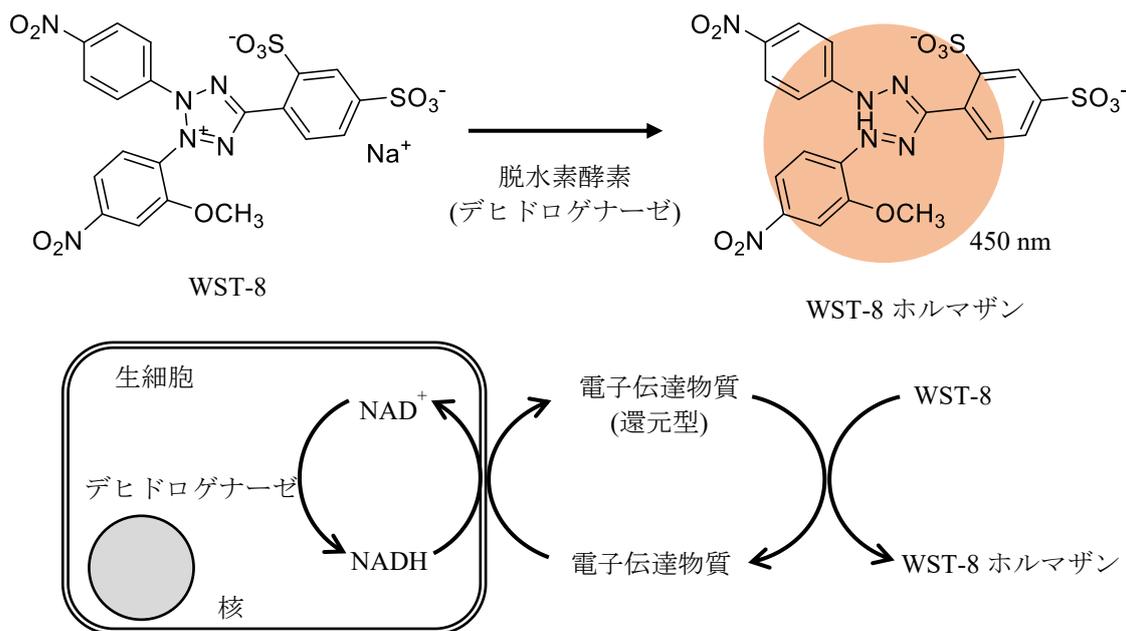


Fig. 3-1 WST-8 を用いた Cell Counting Kit の測定原理.

トーススマーカーとして fluorescence isothiocyanate (FITC)-transferrin (FITC-Tf), カベオラ介在性エンドサイトーシスマーカーとして FITC-cholera toxin (FITC-Cx), マクロピノサイトーシスマーカーとして FITC-dextran ( $M_w = 15,0000$ ; FITC-Dx) を用いた。

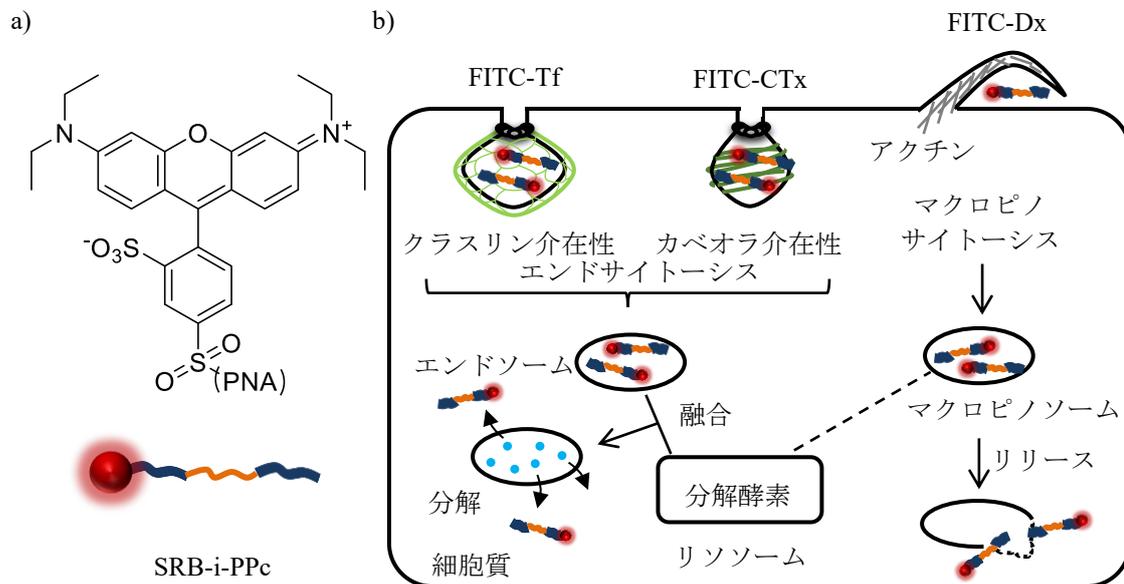


Fig. 3-2 a) SRB の化学構造と SRB でラベル化した i-PPc のイラストおよび b) SRB-i-PPc と取り込み機構既知の FITC ラベル化分子との共局在法による細胞輸送経路の特定.

本項では、i-PPc による 1 塩基の違いを認識した細胞内遺伝子発現抑制を目的として i-PPc の細胞毒性評価および細胞内輸送経路について報告する。

### 3-2-2. 試薬

- i-PPc 合成試薬は 2-2-2. に準じる.
- Sulforhodamine B acid chloride (SRB-Cl) Sigma Aldrich
- ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞 RIKEN Cell Bank
- 牛胎児血清 (FBS)
- D-MEM (with high glucose, phenol red) Wako
- 0.05 % (w/v) trypsin-0.53 mmol/L EDTA · 4 Na sol. Wako
- PBS (-) Nissui
- Sodium dodecyl sulfate (SDS)
- Cell counting Kit-8 DOHINDO
- Fluorescein isothiocyanate (FITC)-Transferrin (FITC-Tf)
- FITC-cholera toxin (FITC-CTx) Sigma Aldrich
- FITC-Dextran ( $M_w = 15,0000$ ) Sigma Aldrich
- Type-I collagen
- 6 N Hydrochloride (HCl) Wako

### 3-2-3. 実験操作

#### a) SRB-i-PPc の Fmoc 固相合成

先述した Fmoc 固相合成法を用いて i-PPc (N'-TTATGTTT-PEG<sub>12</sub>-TCTTCCAT-C') を合成し、

HPLC を用いて精製後 TOF-MS 測定により同定した。また, i-PPc の N 末端への SRB 基の導入は, 表面アミノ基に対し SRB-Cl (4 eq.) と DIPEA (8 eq.) を添加し, 暗所室温で 1 hour 反応させた。樹脂を減圧乾燥後, TFA/TIS/DCM = 95/2.5/2.5 混合液を加え, 氷中で 1 hour, 室温で 30 min 反応して樹脂から切り出した。得られた粗晶は HPLC で精製後, TOF-MS 測定により同定した。

#### b) がん細胞への毒性評価

細胞毒性評価には, 10% FBS in D-MEM 培地中で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で継代培養したヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞を用いた。継代培養した HeLa 細胞を  $1.0 \times 10^4$  cells/well となるように 96 well plate に播種し, 10% FBS 含有 D-MEM 中 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 24 hours 前培養した。24 hours 培養後, 既存の培地を除去した後 10% FBS 含有 D-MEM および D-MEM (無血清条件) に置換した後, 所定濃度の i-PPc および SDS を 10  $\mu$ L 添加し 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 24 hours 培養した。培養後, 10  $\mu$ L WST-8 sol. を各ウェルに添加し, 2 hours インキュベーターで反応させ, 各ウェルの吸光度 ( $\lambda = 450$  nm) を測定した。細胞生存率は, 各条件における control でノーマライズし算出した。

#### c) 細胞内輸送経路の特定

継代培養した HeLa 細胞を type I collagen coat された 35 mm $\Phi$  glass bottom dish (IWAKI) に  $1.0 \times 10^5$  cells/dish となるように播種し, 10% FBS 含有 D-MEM 中で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 24 hours 前培養した。前培養後, PBS (-) 3 mL で 2 回洗浄した後, [SRB-i-PPc] = 25  $\mu$ g/mL と FITC-Marker ([FITC-Dx] = 50  $\mu$ L/mL, [FITC-Tf] = 25  $\mu$ g/mL, [FITC-CTx] = 1  $\mu$ g/mL) を添加し無血清 D-MEM 中で 30 min 培養した。培養後 PBS (-) 3 mL で 2 回洗浄した後, SRB-i-PPc と各 FITC-マーカー取り込み後の HeLa 細胞を位相差および蛍光顕微鏡で観察した。

### 3-2-4. 結果および考察

#### a) SRB-i-PPc の Fmoc 固相合成

精製した SRB-i-PPc のクロマトグラムおよび TOF-MS スペクトルを以下に示した (Fig. 3-3)。精製後の SRB-i-PPc のクロマトグラムでは 38 min 近傍にメインピーク (純度 98%) が観察された。また TOF-MS スペクトルでは  $m/z = 5426.98$  に単一のピークが観測され, SRB-i-PPc (calc.

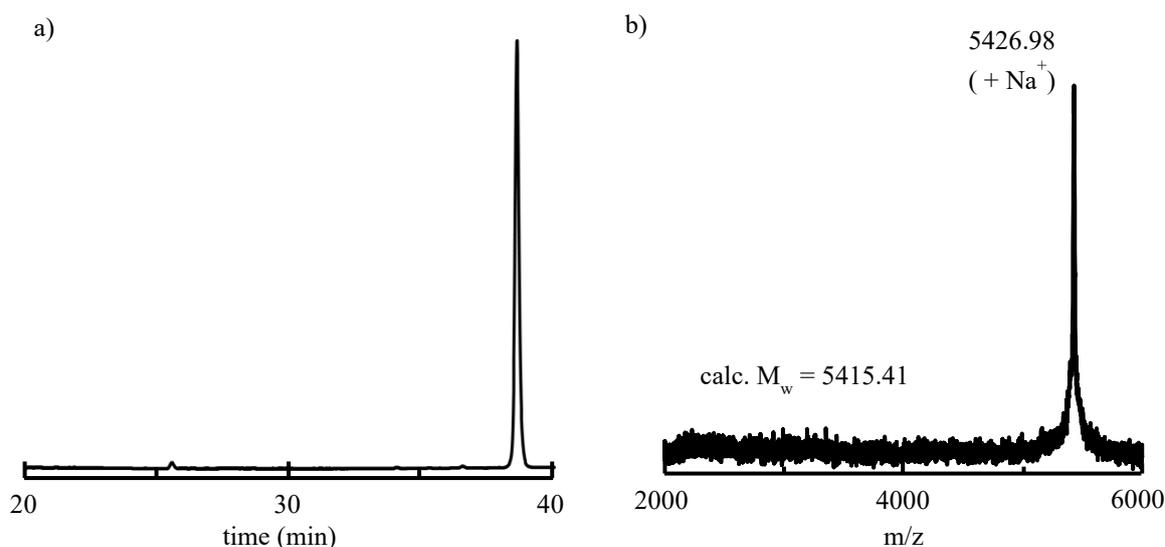


Fig. 3-3 SRB-i-PPc の精製後の a) クロマトグラムおよび b) TOF-MS スペクトル。  
Conditions: a) ODS-4 column (4.6  $\times$  250 mm, GL Science), 35°C, 1 mL/min, 0.5% TFA in 5-35% ACN (35 min linear gradient),  $\lambda = 260$  nm, b) CHCA/MeOH, LN\_0-3 kDa.

$M_w = 5415.41$ ) と同定できた。これらの i-PPc および SRB-i-PPc を用いて細胞毒性評価および細胞取り込み経路の特定を行った。

#### b) 毒性評価

96 well plate に播種された HeLa 細胞に所定濃度の i-PPc (100, 50, 25, 12.5  $\mu\text{M}$ ) および SDS (1000, 500, 100, 50, 25, 12.5  $\mu\text{M}$ ) を添加し, 24 hours 培養後の HeLa 細胞の細胞生存率を WST-8 assay を用いて測定後に算出した (Fig. 3-4)。血清条件下での i-PPc の毒性について, 100  $\mu\text{M}$  で細胞生存率は 85%程度, 12.5  $\mu\text{M}$  でも細胞生存率は 98%程度と見積もられ, 細胞毒性はきわめて低いことがわかった。一方, 比較対象とした SDS では, 100-500  $\mu\text{M}$  で顕著な細胞死がみられた。無血清条件下でも i-PPc の細胞毒性は低く (いずれの濃度範囲でも 90%以上), SDS では 50-100  $\mu\text{M}$  で顕著な細胞毒性が観測された。この結果を踏まえ, 細胞内輸送経路の特定は 5  $\mu\text{M}$  付近で行うこととした。

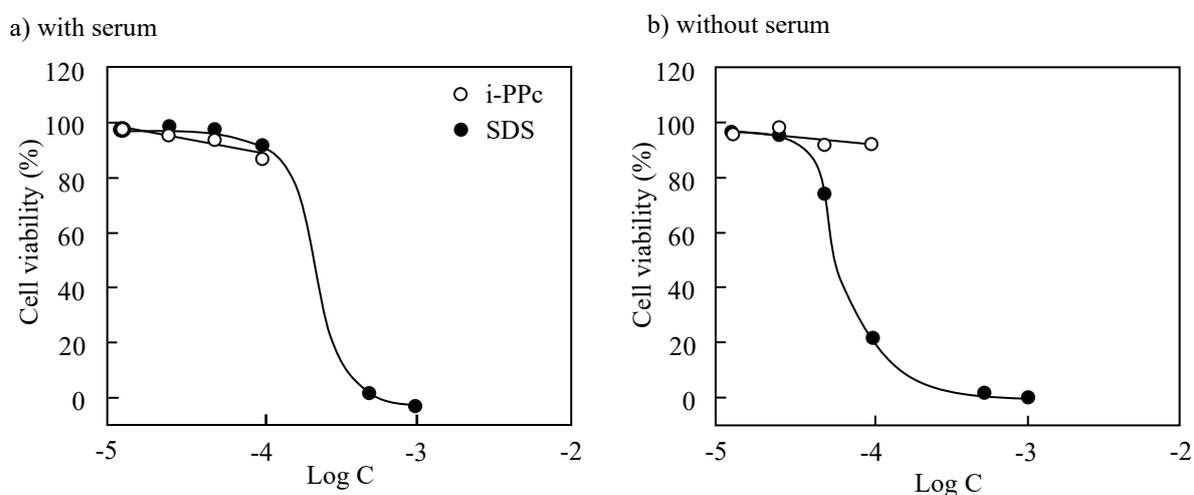


Fig. 3-4 血清および無血清条件下において所定濃度 i-PPc を添加し 24 hours 培養後の HeLa 細胞の生存率。

#### c) 細胞内輸送経路の特定

合成した SRB-i-PPc と細胞取り込み経路が既知の FITC マーカーを HeLa 細胞に取り込ませた後の蛍光顕微鏡像を Fig. 3-5 に示す。HeLa 細胞内に取り込まれた SRB-i-PPc の蛍光画像を FITC-Dx ( $M_w = 15,0000$ , マクロピノサイトーシスマーカー) 添加後の蛍光顕微鏡像と重ね合わせた結果 (merge 像), SRB-i-PPc 由来の赤色蛍光と FITC-Dx 由来の緑色蛍光が HeLa 細胞内の同じ場所で観察されたため HeLa 細胞内において同じ局在を示すことが明らかとなった。一方で, FITC-Tf(クラスリン介在性エンドサイトーシスマーカー) および FITC-CTx(カベオラ介在性エンドサイトーシスマーカー) をそれぞれ添加後の蛍光顕微鏡像と重ね合わせた結果, 一部類似した局在を示した (FITC-Tf 添加後の蛍光顕微鏡像) が, そのほとんどは異なる場所に存在することが示された。

これらの蛍光顕微鏡像より, i-PPc はマクロピノサイトーシス経路で HeLa 細胞内に取り込まれることがわかった。しかしながら, 取り込まれた i-PPc は細胞内で点在していることから, 取り込み後のマクロピノソームに停滞した状態で, サイトゾルにリリースされていないこともあわせてわかった。

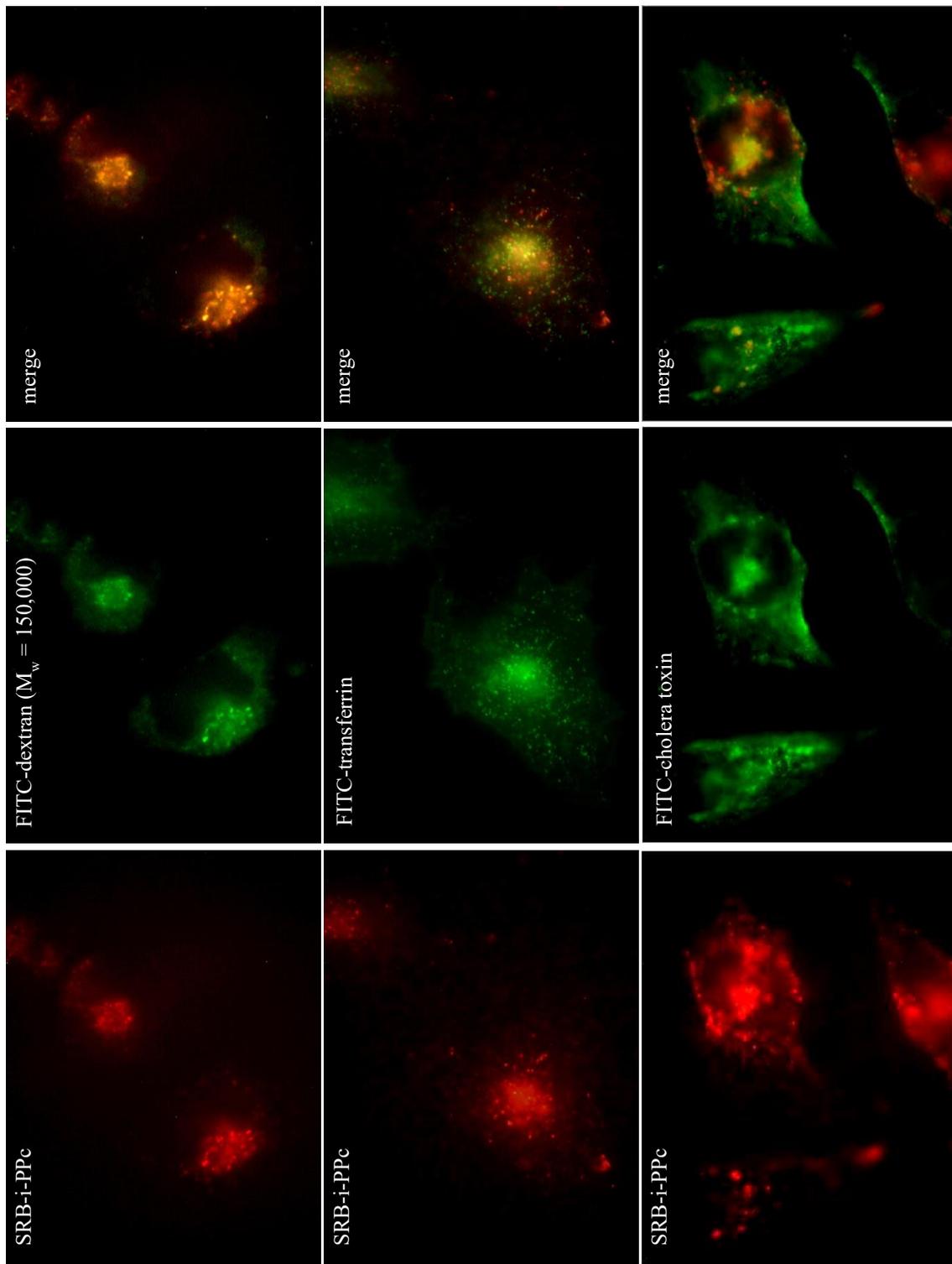


Fig. 3-5 SRB-i-PPc および FITC-Maker を取り込みませ所定時間培養後の HeLa 細胞の蛍光顕微鏡像と merge 像。  
 Conditions: HeLa 細胞  $1.0 \times 10^5$  cells/dish, [SRB-i-PPc] = 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (4.62  $\mu\text{M}$ ), [FITC-Dx] = 50  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , [FITC-Tf] = 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , [FITC-CTx] = 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 各サンプルを取り込みませ 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  雰囲気下で 30 min 培養, 0% FBS in D-MEM.

### 3-2-5. まとめ

細胞内での i-PPc による 1 塩基認識能の評価を念頭に、HeLa 細胞への i-PPc の細胞毒性評価および細胞内取り込み経路の特定について検討した。WST-8 assay により細胞毒性を評価した結果、i-PPc の顕著な細胞毒性は観測されず、また N 末端に蛍光色素を有した SRB-i-PPc の細胞内取り込み経路はマクロピノサイトーシス経路であることがわかった。しかしながら、取り込み後にマクロピノソームからサイトゾルへリリースできていないことが判明した。この結果は、i-PPc のサイトゾルへのリリースを踏まえた細胞内輸送法について検討する必要があることを意味している。

### 3-3. シグナルペプチドを用いた i-PPc の細胞内輸送

#### 3-3-1. はじめに

本項では、シグナルペプチドを用いた i-PPc のサイトゾルへの輸送を目的として共局在法とコンジュゲート法について検討した。共局在法は、取り込み後に小胞体の崩壊を促す小胞体リリースペプチドと i-PPc を同時に添加し細胞に取り込ませることで、小胞体に内包されている i-PPc をサイトゾルに輸送する方法である。この方法では、i-PPc にシグナルペプチドを付加する必要がなく比較的容易に i-PPc をサイトゾルに輸送できると考えられる。一方で、i-PPc とシグナルペプチドの細胞の取り込み効率の違いなどが生じる可能性が考えられるため、シグナルペプチドを i-PPc に対して多量に細胞に与える必要がある。コンジュゲート法は、サイトゾルへの輸送が報告されているシグナルペプチドを i-PPc にコンジュゲートすることでサイトゾルに輸送する方法である。この方法は共局在法とは異なり、i-PPc に対して多量のシグナルペプチドを必要とせず i-PPc をサイトゾルに輸送することができる。しかし固相表面上で合成する際に残基数の増加に伴う収率の低下やコンジュゲートの合成が煩雑になると推察される。また、シグナルペプチドを i-PPc にコンジュゲートする際には、i-PPc の 1 塩基の認識や遺伝子発現抑制を阻害しない分子設計が必要となる。

本稿では、小胞体リリースペプチドにインフルエンザウイルス由来のヘマグルチニン (HA2) ペプチド誘導体である INF-7 ペプチド<sup>1)</sup>、細胞透過ペプチドとしてノナルギニン (R<sub>9</sub>) ペプチド

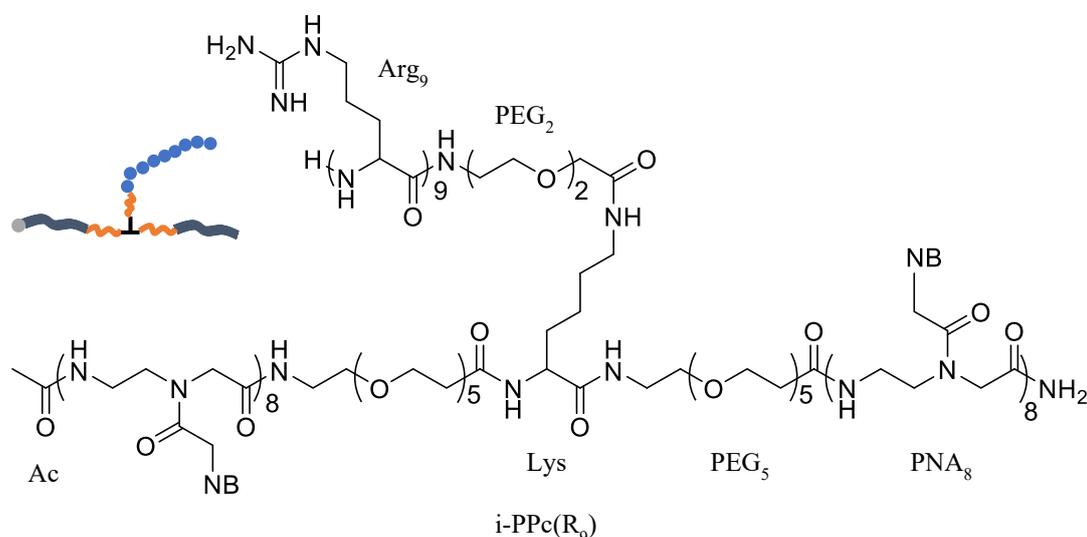


Fig. 3-6 サイトゾルへの輸送を目的とした R<sub>9</sub>をコンジュゲートした i-PPc(R<sub>9</sub>) の化学構造。

ド<sup>2),3)</sup>を用いた. これらと i-PPc の共局在法による細胞内輸送と i-PPc の中央 PEG 部に R<sub>9</sub> ペプチドを導入した i-PPc(R<sub>9</sub>) を設計し (Fig. 3-6) サイトゾルへの細胞内輸送について検討した.

### 3-3-2. 試薬

• Fmoc-L-Ala-OH	Applied Biosystems
• Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH	Applied Biosystems, Nova biochem
• Fmoc-L-Asn(Trt)-OH	Applied Biosystems
• Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH	Applied Biosystems
• Fmoc-Gly-OH	Applied Biosystems
• Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH	Applied Biosystems
• Fmoc-L-Ile-OH	Applied Biosystems
• Fmoc-L-Leu-OH	Applied Biosystems
• Fmoc-L-Lys(Dde)-OH	渡辺化学株式会社
• Fmoc-L-Met-OH	Applied Biosystems
• Fmoc-L-Phe-OH	Applied Biosystems
• Fmoc-L-Trp(tBoc)-OH	Applied Biosystems
• Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH	Applied Biosystems
• Fmoc-N-amido-dPEG <sub>5</sub> -acid	Nova Biochem
• Fmoc-8-Adox-OH	渡辺化学株式会社
• Sulforhodamine B acid chloride (SRB-Cl)	Sigma Aldrich
• COMU	Nova Biochem
• <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyl- <i>O</i> -(7-azobenzotriazol-1-yl)-uronium hexafluorophosphate (HATU)	Nova Biochem
• Diisopropylcarbodiimide (DIC)	Wako
• Oxyma pure	Nova biochem
• Hydroxylammonium chloride (NH <sub>2</sub> OH·HCl)	Wako
• Imidazole	Wako
• D-MEM (high glucose, with HEPES)	Wako
• 細胞観察液	
• Calcein-AM	DOJINDO

### 3-3-3. 実験操作

a) シグナルペプチドならびに蛍光ラベル化したノナアルギニン (SRB-R<sub>9</sub>) の合成

本研究で用いた INF-7 ペプチドおよびこのペプチドにオリゴアルギニンを付加した細胞膜透過型リリースペプチド (R<sub>9</sub>-G-INF-7 peptide) のアミノ酸配列を以下に示した.

INF-7 peptide: GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYG-NH<sub>2</sub>

R<sub>9</sub>-G-INF-7 peptide: RRRRRRRRRR-G- GLFEAIEGFIENGWEGMIDGWYG-NH<sub>2</sub>

SRB-R<sub>9</sub> peptide: SRB-NH-RRRRRRRRR-NH<sub>2</sub>

これらのペプチドは従来のペプチド固相合成法により合成した. 樹脂 (Nova PEG rink amid resin LL) の表面アミノ基に対し Fmoc-amino acid (4 eq.), COMU (4 eq.) と DIPEA (8 eq.) を添加

し 1 hour 攪拌反応させた。NMP で洗浄後、未反応のアミノ基末端を 10% Ac<sub>2</sub>O で 5 min キャッピングした。Fmoc 基は 20% piperidine で 15 min 攪拌反応して脱保護し、先と同様に COMU および DIPEA で次のアミノ酸を縮合させた。これらの操作を目的の塩基配列になるまで繰り返し行い (SRB 基の導入は 3-2-3. 参照), DCM および 2-propanol で洗浄後、減圧乾燥した。TFA/TIS/Milli-Q = 95/2.5/2.5 の溶液により水中で 3 hours, 室温で 30 min 攪拌反応させ樹脂からペプチドを切り出し, 樹脂をフィルター除去して濃縮, Et<sub>2</sub>O により粗品を得た。HPLC で精製後 TOF-MS 測定を行い同定した。

b) 合成機を用いた i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) の Fmoc 固相合成

設計した i-PPc(R<sub>9</sub>) の合成スキーム (Fig. 3-7) と条件 (Table 3-1) を以下に示した。Table 3-1 に従い Ac-PNA<sub>8</sub>-PEG<sub>5</sub>-Lys(Dde)-PEG<sub>5</sub>-PNA<sub>8</sub>-resin を合成<sup>4)</sup>後, Lys 側鎖の Dde 基を 20% NH<sub>2</sub>OH·HCl, 15% imidazole in NMP/DCM 中で室温, 2 hours 反応させ脱保護した<sup>5)</sup>。脱保護後, Fmoc-PEG<sub>2</sub>-OH を縮合し, 次いで Fmoc-Arg(Pbf)-OH を縮合した。Fmoc-Arg(Pbf)-OH の縮合には, 分

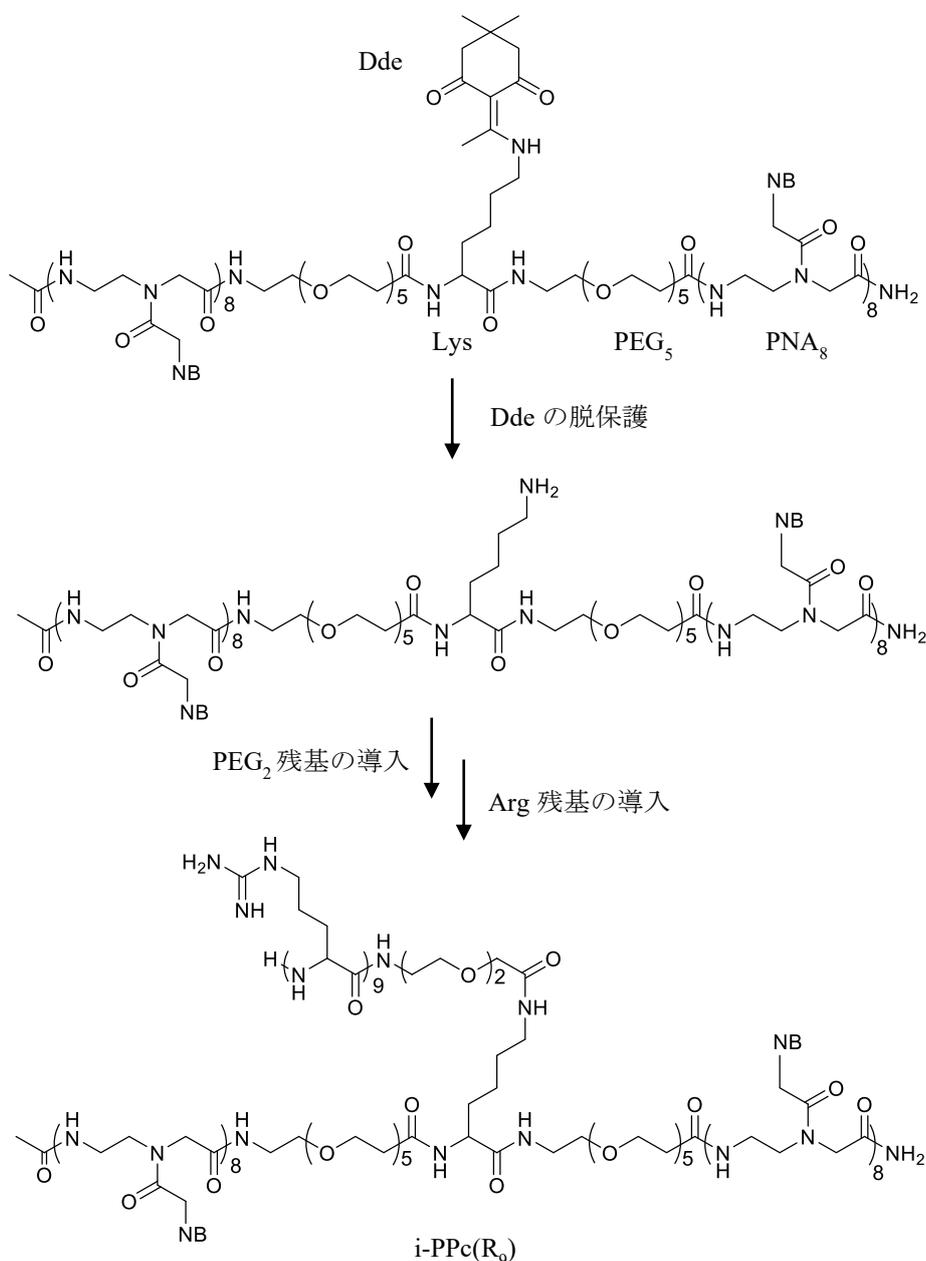


Fig. 3-7 i-PPc(R<sub>9</sub>) の合成スキーム.

子内環化反応 ( $\delta$ -ラクタム化)<sup>6)</sup> の抑制を目的として HATU/DIPEA を用いて室温で 30 min を 2 回行った。Arg の N 末端への SRB 基の導入、樹脂からの切り出しは前述と同じ条件で行い、同様に HPLC で精製後 TOF-MS 測定により同定した。

Table 3-1 i-PPc(R<sub>9</sub>) の Fmoc 固相合成条件.

過程	試薬	反応条件
膨潤 縮合	Nova PEG rink amid resin LL in NMP	75°C, 10 min
主鎖骨格	DIC / oxyma (4 eq.)	75°C, 6 min <sup>1</sup>
Fmoc-8-Adox-OH	HATU (4 eq.) / DIPEA (8eq.)	75°C, 6 min × 2
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	HATU (4 eq.) / DIPEA (8 eq.)	r. t., 30 min × 2
アセチル化 <sup>2</sup>	lutidine / acetic acid anhydride / NMP = 6/5/89	r. t., 1 min
脱保護		
Fmoc 基	20% piperidine / NMP	r. t., 3 min
Dde 基	20% NH <sub>2</sub> OH / 15% imidazole / NMP / DCM	r. t., 120 min
切り出し	TFA / TIS / DCM = 95/2.5/2.5	氷中: 60 min, r. t.: 30 min

<sup>1</sup> ダブルカップリングはその過程を 2 回繰り返して行った。<sup>2</sup> オリゴアルギニン以外。

#### c) 共局在法による i-PPc の細胞内輸送評価

合成した INF-7 peptide および細胞膜透過型リリースペプチド (R<sub>9</sub>-G-INF-7 peptide) を DMSO に溶解して本実験を行った。

継代培養した HeLa 細胞を type I コラーゲンコートされた 35 mmΦ ガラスボトムシャーレに  $1.0 \times 10^5$  cells/dish となるように播種し、10% FBS 含有 D-MEM 中で 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 24 hours 前培養した。前培養後、PBS (-) 3 mL で 2 回洗浄し [SRB-i-PPc] = 4.62 μM および [INF-7 peptide] = 100 μM または [R<sub>9</sub>-G-INF-7 peptide] = 100 μM となるように無血清 D-MEM 中に添加し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 30 min 培養した。培養後 PBS (-) 3 mL で 2 回洗浄した後、SRB-i-PPc と各ペプチド処理後の HeLa 細胞の状態を位相差および蛍光顕微鏡を用いて観察した。

#### d) SRB-R<sub>9</sub> の細胞内輸送評価

Type I コラーゲンコートした 35 mmΦ ガラスボトムシャーレに継代培養した HeLa 細胞を 10% FBS 含有 D-MEM 中に  $5.0 \times 10^4$  cells/dish となるように播種し 24 hours 前培養した。その後、シャーレ内の培地を除去し無血清 D-MEM 培地で 2 回洗浄後、無血清 D-MEM を 2 mL 添加し 3 hours インキュベートした。3 hours 後、1 μM SRB-R<sub>9</sub> in 0% FBS/D-MEM を添加し所定時間インキュベートした。SRB-R<sub>9</sub> を含む培地を除去した後 PBS (-) で 2 回洗浄し、細胞観察液を 3 mL 添加した後に蛍光顕微鏡で細胞を観察した。

#### e) i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) の細胞内輸送評価

精製後の i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) を Milli-Q に溶解させた後 0.22 μm PTFE フィルターを用いて滅菌ろ過した。継代培養した HeLa 細胞を 35 mmΦ プラスティックディッシュに  $5.0 \times 10^4$  cells/dish となるように播種し 24 hours 前培養した。その後無血清 D-MEM で 30 min 置換し 1 mL 無血清 D-MEM 中に 5 μL i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) を添加し (final conc. 0.95 μM) 1 hour インキュベートした。1 hour 後に蛍光顕微鏡を用いて細胞の状態を観察したが i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) のガラスボトムディッシュへの吸着がみられたため、0.05%(w/v) trypsin-0.53 mmol/L EDTA・4 Na 処理し細胞を剥離後、35 mmΦ ガラスボトムディッシュに播種しなおし 10% FBS in D-MEM 中で所定時間培養した。所定時間

培養後の細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

### 3-3-4. 結果および考察

#### a) i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) の合成

精製後の i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) のクロマトグラムより R<sub>t</sub> = 31.3 min 近傍に単一メインピークが観察された (Fig. 3-8 a). また TOF-MS スペクトルより (Fig. 3-8 b), i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) の calc. M<sub>w</sub> = 7119.52 に対し obs. peak = 7160.83 (+K<sup>+</sup>) が観察され, このピークが i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) であると判断した. また TOF-MS スペクトルの m/z = 2396.93 近傍のピークは, 多価イオン化した i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) である. HPLC クロマトグラムから, 純度 98%以上の i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) が得られたことが分かった.

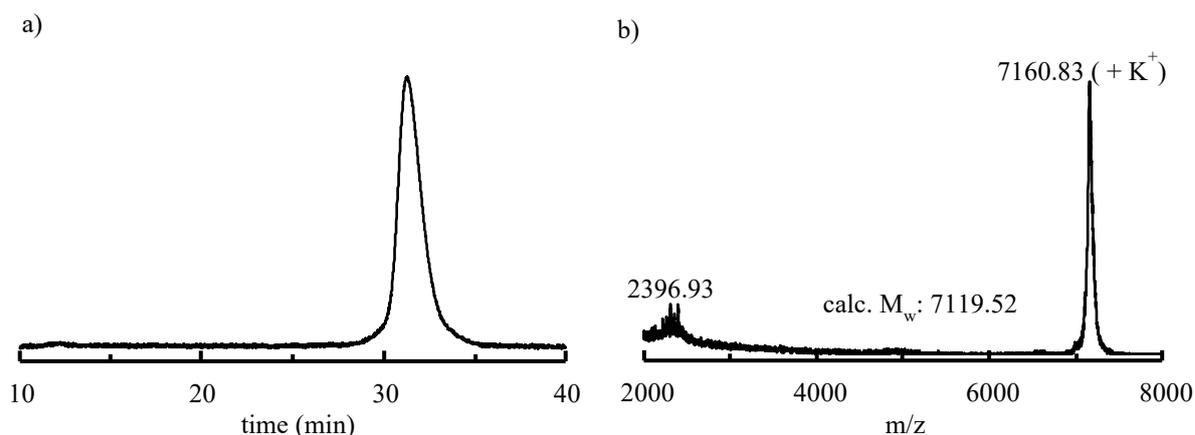


Fig. 3-8 精製後 i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) の a) クロマトグラムならびに b) TOF-MS スペクトル.

Conditions: a) ODS-4 column (4.6 × 250 mm, GL Science), 35°C, 1 mL/min, A: 0.1% TFA in 5% ACN/Milli-Q, B: 0.1% TFA in 5% Milli-Q/ACN, λ = 260 nm, A-B の 0.06 %/min linear gradient. b) CHCA in MeOH, LP<sub>3</sub>-20 kDa.

#### b) 共局在法による i-PPc の細胞内輸送

i-PPc のサイトゾルへの輸送を SRB-i-PPc と各ペプチドを HeLa 細胞に同時に取り込ませ 24 hours 培養後の細胞の状態を蛍光顕微鏡で観察して評価した。

SRB-i-PPc のみ添加後の蛍光顕微鏡像 (×4 および ×1000) より, i-PPc が HeLa 細胞内に点在しておりマクロピノソームからリリースされていないことが改めて示された (Fig. 3-9 a, d). そこで INF-7 ペプチドと共局在させた結果, 400 倍の蛍光顕微鏡像ではサイトゾルにリリースされているような顕微鏡像が得られた (Fig. 3-9 b). しかし 1000 倍での蛍光顕微鏡像では, SRB-i-PPc が細胞内に点在している部分が多くリリース効率が低いことが示された (Fig. 3-9 e). これは INF-7 ペプチドがマクロピノサイトーシスにより取り込まれる効率が低いことが原因と推察した. このためマクロピノサイトーシスによる INF-7 ペプチドの取り込み効率の向上を目的として合成した R<sub>9</sub>-G-INF-7 ペプチドと SRB-i-PPc を HeLa 細胞に取り込ませた結果, 400 倍と 1000 倍の蛍光顕微鏡像において SRB-i-PPc 由来の蛍光が細胞内全体に広がっており, i-PPc のサイトゾルへの輸送が確認できた (Fig. 3-9 c, f). 一方で, SRB-i-PPc のみ, SRB-i-PPc と INF-7 ペプチド, SRB-i-PPc と R<sub>9</sub>-G-INF-7 ペプチドを取り込ませた際の 400 倍蛍光顕微鏡像 (Fig. 3-9 a, b, c) を比較すると, 特に R<sub>9</sub>-G-INF-7 ペプチドを取り込んだ細胞で細胞死が見られた. これは, INF-7 ペプチドがエンドソーム内の酸性条件下で, α-helix 構造にコンフォメーション変

化しマクロピノソームを崩壊させた後<sup>1)</sup>, 細胞膜にも作用したことが原因と推察した. また 23 残基の疎水性ペプチドである INF-7 ペプチドを高濃度に添加したため, 非特異的な吸着などにより細胞毒性を示した可能性が考えられる.

以上より, R<sub>9</sub>-G-INF-7 ペプチドと SRB-i-PPc を共局在させることで i-PPc がサイトゾルに輸送できることが示された. 一方で, 大量の R<sub>9</sub>-G-INF-7 ペプチドの添加により細胞死が観察され, i-PPc のサイトゾルへの輸送には適していないと判断した. このため i-PPc にノナアルギニン (R<sub>9</sub>) をコンジュゲートした i-PPc(R<sub>9</sub>) の細胞内輸送について検討した.

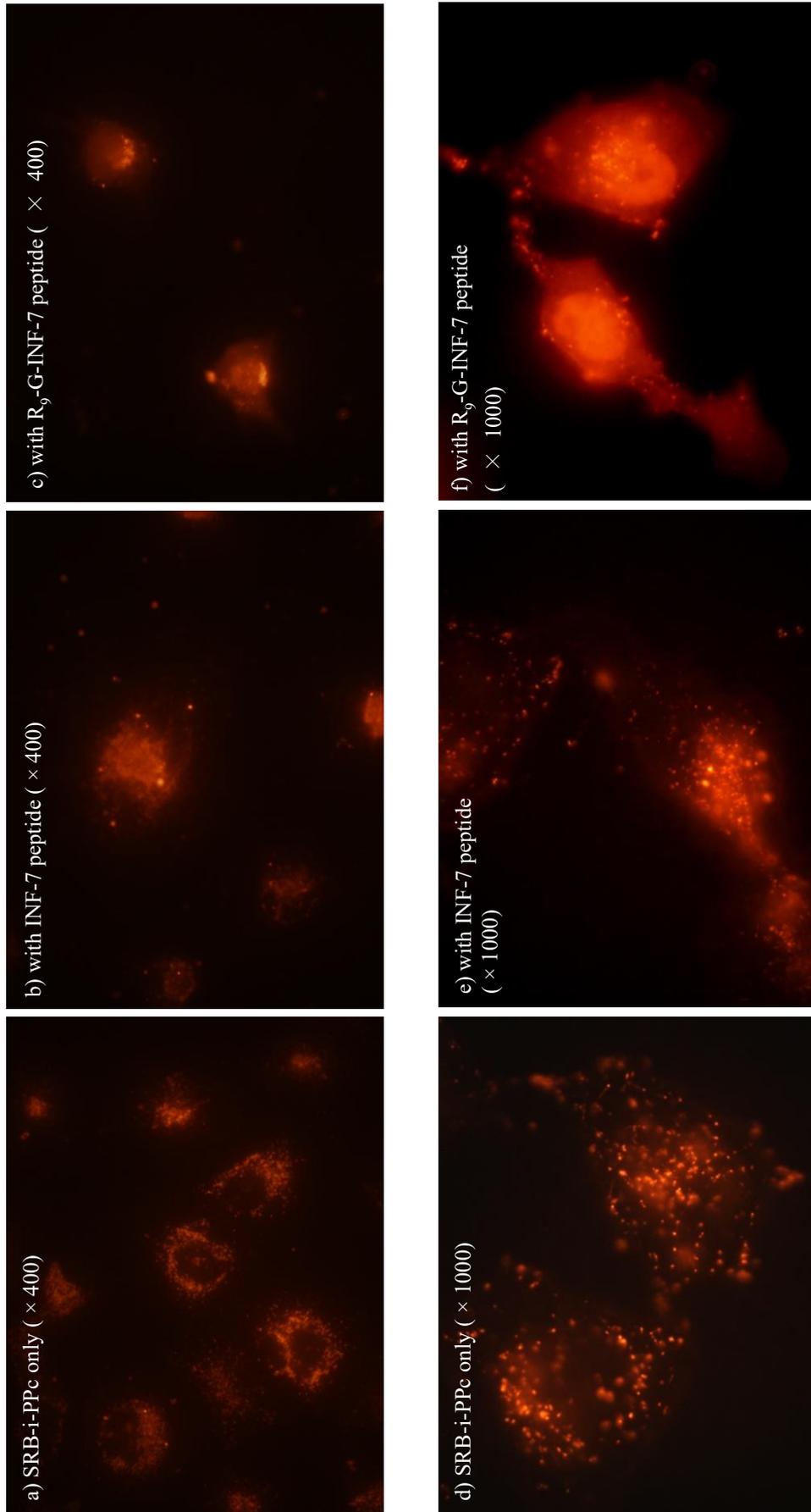


Fig. 3-9 HeLa 細胞における a) SRB-i-PPc のみならびに各シグナルペプチド; b) INF-7 peptide, c) R<sub>9</sub>-G-INF-7 peptide を添加し所定時間培養後の蛍光顕微鏡像.

Conditions:  $1.0 \times 10^5$  cells/dish, [SRB-i-PPc] = 4.62  $\mu$ M, [INF-7 peptide] = 100  $\mu$ M, [R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc] = 100  $\mu$ M, [R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc] = 100  $\mu$ M, 0% FBS in D-MEM 中 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 24 hours 培養.

### c) i-PPc(R<sub>9</sub>) の細胞内輸送

i-PPc(R<sub>9</sub>) の細胞内輸送を検討することを念頭におき、R<sub>9</sub> によるサイトゾルへの輸送について検討した。R<sub>9</sub> の N 末端にローダミン系蛍光色素 SRB を配した SRB-R<sub>9</sub>-NH<sub>2</sub> を合成し毒性を示さなかった条件 (Supplementary data) で HeLa 細胞に添加し所定時間培養後の状態を蛍光顕微鏡で観察した。添加して 5 min 後の蛍光顕微鏡像より細胞に取り込まれていないことが示された (Fig. 3-10 a)。これを培養すると 6 hours 後にはサイトゾルに輸送され核近辺に集積しているような蛍光顕微鏡像が得られ (Fig. 3-10 b), ノナアルギニンがサイトゾルに輸送されることが示された。

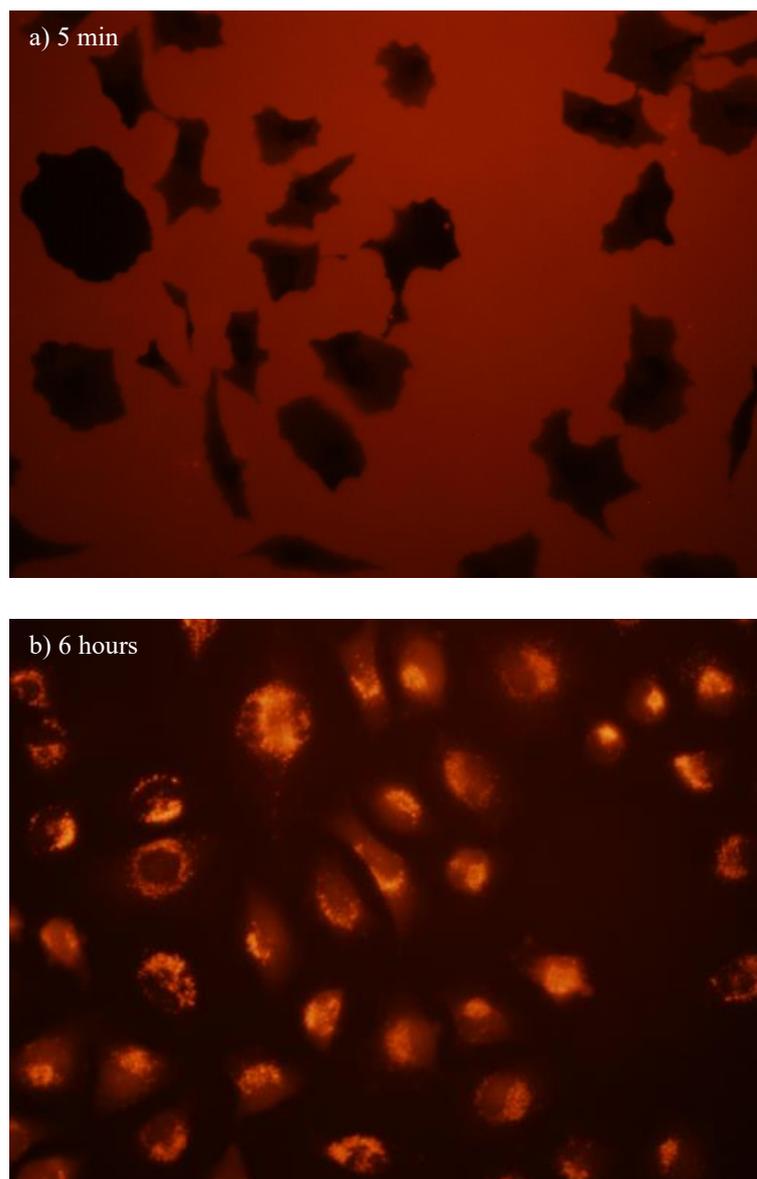


Fig. 3-10 SRB-R<sub>9</sub> を取り込ませ a) 5 min, b) 6 hours 培養後の HeLa 細胞の蛍光顕微鏡像。

Conditions: 細胞数  $5.0 \times 10^4$  cells/dish, [SRB-R<sub>9</sub>-NH<sub>2</sub>] = 1  $\mu$ M, 0% FBS in D-MEM 中 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下でインキュベート。

次に i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) を無血清条件下で 1 hour 取り込ませた HeLa 細胞を 10% FBS 含有 D-MEM 培地中 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で所定時間培養後に顕微鏡観察して i-PPc(R<sub>9</sub>) の細胞内輸

送について検討した。24 hours 培養後の蛍光顕微鏡像より、i-PPc(R<sub>9</sub>) は HeLa 細胞に取り込まれているが細胞内に点在しており、マクロピノソームからリリースされていない可能性が示唆された (Fig. 3-11 上段)。また、48 hours 培養後においても細胞内に点在している i-PPc(R<sub>9</sub>) が多くみられた。一方で、細胞全体に赤色蛍光が広がっている細胞や核近辺に集積している細胞も観察されサイトゾルにリリースされていることが伺えた (Fig. 3-11, 中段)。また i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込み 48 hours 培養後の細胞の生存を Calcein-AM 染色により評価した結果、緑色蛍光が細胞全体にみられた (Fig. 3-11, 中段)。これは、生細胞内の加水分解酵素であるエステラーゼにより、細胞膜を透過した Calcein-AM が不透過性の Calcein ( $\lambda_{ex} = 490 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 515 \text{ nm}$ ) に加水分解されたことに起因する。従って HeLa 細胞は i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込んだ後も生存できることがわかった。この結果は、1  $\mu\text{M}$  i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込んだ HeLa 細胞の WST-8 アッセイによる毒性評価と同様の結果を示した (Supplementary data)。さらに 96 hours 培養後には、i-PPc(R<sub>9</sub>) が点在している細胞も見られるものの i-PPc(R<sub>9</sub>) がサイトゾルにリリースしている細胞が増加しているような蛍光顕微鏡像が得られた (Fig. 3-11, 下段)。しかしアーティファクトな部分を観察している可能性もあるため詳細には不明である。

以上より、i-PPc のサイトゾルへの輸送を目的としてノナルギニンを導入した i-PPc(R<sub>9</sub>) を合成し細胞内輸送について検討した結果、24 hours 培養後には細胞に取り込まれ培養日数の増加に伴い核近辺に集積した細胞やサイトゾルにリリースされた細胞が増加し i-PPc(R<sub>9</sub>) が徐々にサイトゾルに輸送されることが示された。

### 3-3-5. まとめ

本項では、i-PPc のサイトゾルへの輸送を目的としてシグナルペプチドとの共局在法やコンジュゲート法を用いて i-PPc の細胞内輸送について検討した。R<sub>9</sub>-G-INF-7 ペプチドとの共局在法において顕著な i-PPc のサイトゾルへのリリースが観察されたが、同時に細胞死が観察された。

一方で、R<sub>9</sub>をコンジュゲートした i-PPc(R<sub>9</sub>) を 1 hour 取り込ませた結果、培養日数の増加に伴い生細胞において徐々にサイトゾルに輸送されていることが示された。このため i-PPc(R<sub>9</sub>) を用いて細胞内遺伝子発現抑制について検討することにした。

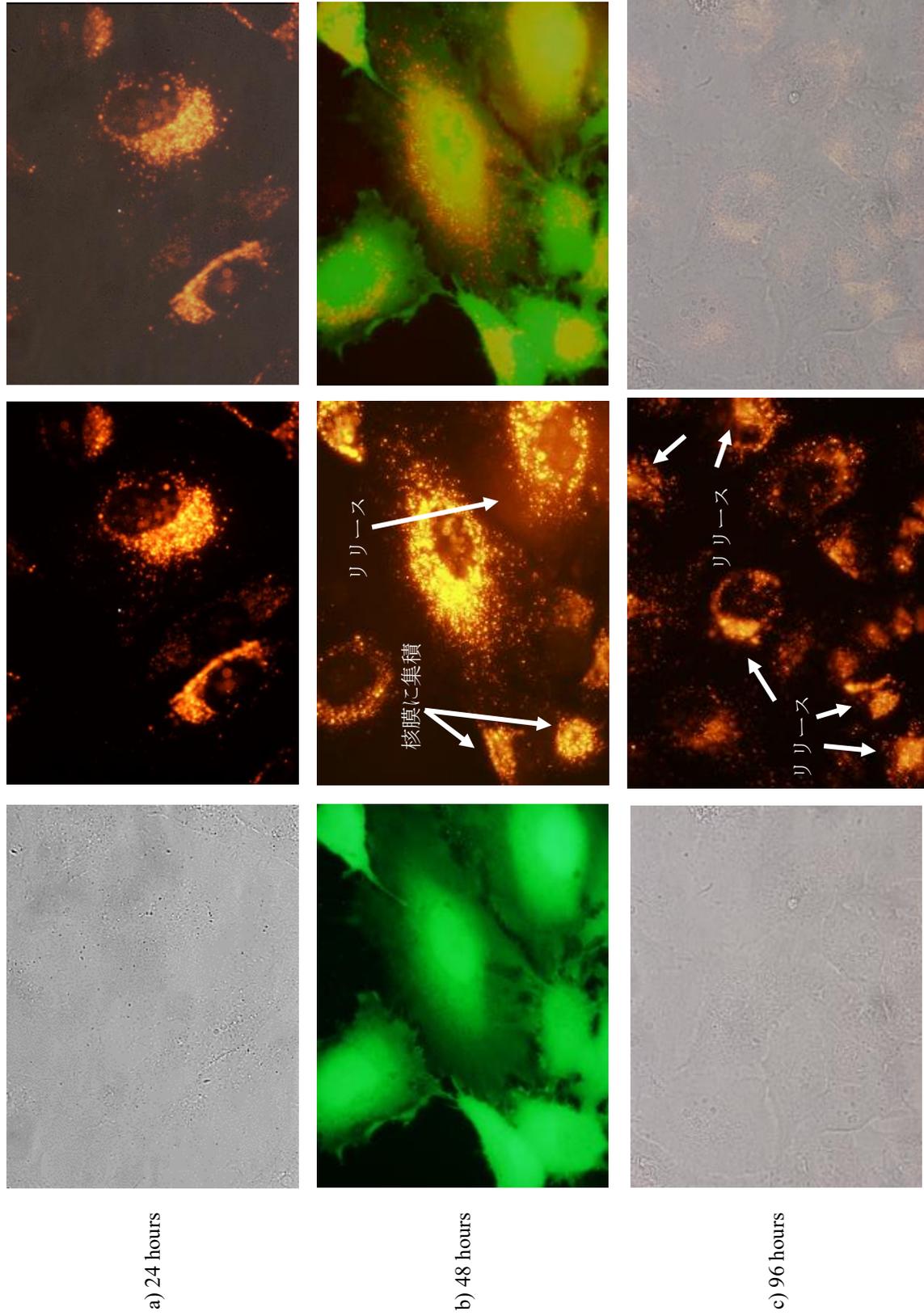


Fig. 3-11 HeLa 細胞に i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) を 1 hour 取り込みませ所定時間培養後の位相差および蛍光顕微鏡像.  
 Conditions: 細胞数  $5.0 \times 10^4$  cells/dish, [i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB)] = 0.95  $\mu$ M, 0% FBS in D-MEM.

### 3-4. i-PPc(R<sub>9</sub>) による 1 塩基の違いを認識した細胞内遺伝子発現抑制効果

#### 3-4-1. はじめに

本項では、i-PPc による 1 塩基の違いを認識した細胞内における遺伝子発現抑制効果について検討することを目的として、ルシフェラーゼを発現する mRNA の開始コドン領域を標的とした i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM および 1 塩基異なる i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM を合成した。その後ルシフェラーゼを恒常的に発現できるヒト結腸癌由来 HT-29 (HT29-Luc<sup>+</sup>) 細胞を樹立し、i-PPc(R<sub>9</sub>) による HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞内における 1 塩基の違いを認識した遺伝子発現抑制効果について検討した。

#### 3-4-2. 試薬

- ・ i-PPc の合成は 2-2-2. に準じる。
- ・ Tris-EDTA (TE) buffer (pH 8.0) ニッポンジーン
- ・ pGL3-basic vector
- ・ pMSCV-puro vector
- ・ Lipofectamine
- ・ Mccoy's 5a medium Gibco
- ・ 0.25%(w/v) trypsin sol. Wako
- ・ PBS(-) ニッスイ
- ・ Cell counting Kit-8 DOHINDO
- ・ Glo lysis buffer × 1 Promega
- ・ Steady-Glo<sup>®</sup> luciferase assay system Promega
- ・ Bright-Glo<sup>®</sup> luciferase assay system Promega
- ・ SynDNA (5'-CCATGGAAGACGCCAAAAACATAAAG-3') 北海道システムサイエンス

#### 3-4-3. 実験操作

a) ルシフェラーゼ遺伝子の開始コドン領域を標的とした i-PPc(R<sub>9</sub>) の Fmoc 固相合成

以下に示す塩基配列の各 i-PPc(R<sub>9</sub>) を先述した table 3-1 に従い合成した。得られた粗晶を HPLC で精製後、TOF-MS 測定により同定した。

i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM: 5'-TTATGTTT-PEG<sub>5</sub>-Lys(PEG<sub>2</sub>-Arg<sub>9</sub>)-PEG<sub>5</sub>-TCTTCCAT-3'

i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM: 5'-TTATGTTT-PEG<sub>5</sub>-Lys(PEG<sub>2</sub>-Arg<sub>9</sub>)-PEG<sub>5</sub>-TCTT▲CAT-3'

b) ルシフェラーゼ発現結腸癌細胞の構築

細胞内で Luc<sup>+</sup>を恒常発現させるためのプラスミド pMSCV-Luc<sup>+</sup> (Fig. 3-12) はルシフェラーゼ遺伝子 (Luc<sup>+</sup>) とウイルスベクター pMSCV-puro から 2-3-3. に準じて作製した。得られた pMSCV-Luc<sup>+</sup> をリポフェクトアミンを用いてヒト結腸癌由来 HT-29 細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションした HT-29 細胞のルシフェラーゼの恒常発現は、各代数継代培養した細胞を 96 well plate に 5000 cells/well となるように播種し WST-8 assay 後、ルミノアッセイを行い、細胞の NADH 活性当たりのルシフェラーゼによる発光量で評価した。

c) HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞における i-PPc(R<sub>9</sub>) の細胞内輸送

Method 1: 35 mmΦ ガラスボトムディッシュまたは 96 well plate に継代培養した HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞をそれぞれ 5.0 × 10<sup>4</sup> cells/dish または 1000 cells/well となるように播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 24 hours 前培養した。前培養後に所定濃度の FBS 含有 McCoy's 5a 培地で 30 min 置換

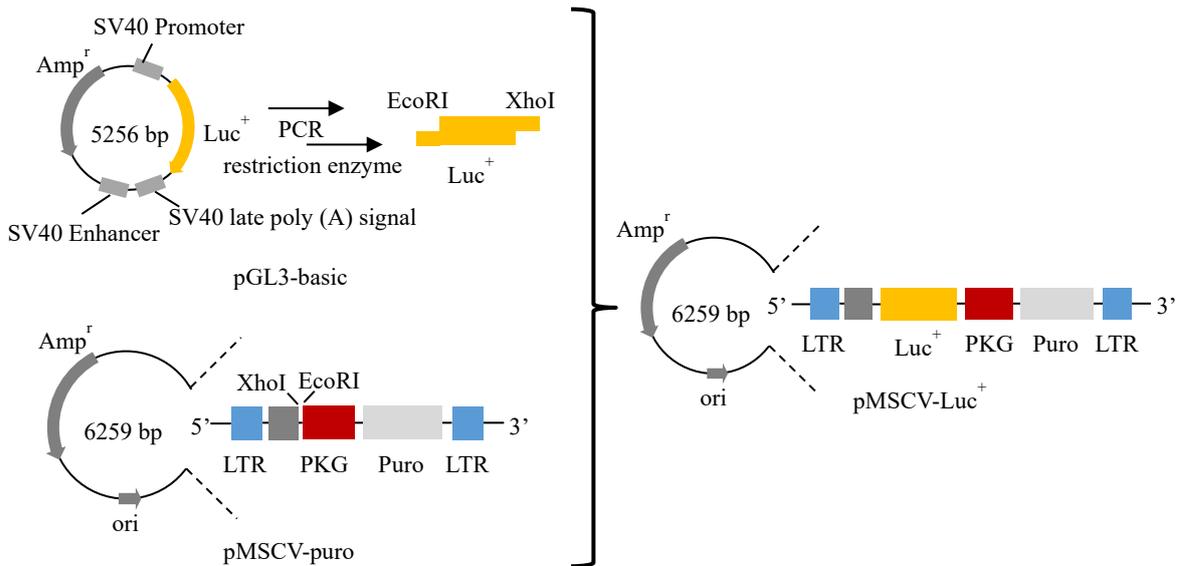


Fig. 3-12 ルシフェラーゼ遺伝子を有するウイルスベクターの構築.

後、i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB)/PBS(-)溶液 (1 μM) または所定濃度の FBS 含有 McCoy's 5a 培地で所定時間取り込ませた後、細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

**Method 2:** 25 cm<sup>2</sup> flask から回収して得た細胞懸濁液を 10% FBS 含有 McCoy's 5a 培地で希釈し、 $5.0 \times 10^4$  cells/mL ( $1.5 \times 10^5$  cells / 3 mL 培地) の懸濁液を調整後 2000 rpm, 5 min で遠心し上清を除去した。得られたペレットを 3 mL の無血清 McCoy's 5a 培地に懸濁させた後、i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) を終濃度 1 μM となるように添加、転倒混和した。その後 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 1 hour インキュベートした。無血清 McCoy's 5a 培地で 2 回洗浄し、10% FBS 含有 McCoy's 5a 培地に懸濁させた。セルカウント後に  $2.5 \times 10^4$  cells / 2 mL となるように 10% FBS 含有 McCoy's 5a 培地で希釈し観察用ディッシュに播種した (Fig. 3-13)。24 hours 培養後の細胞の状態を蛍光顕微鏡で観察した。

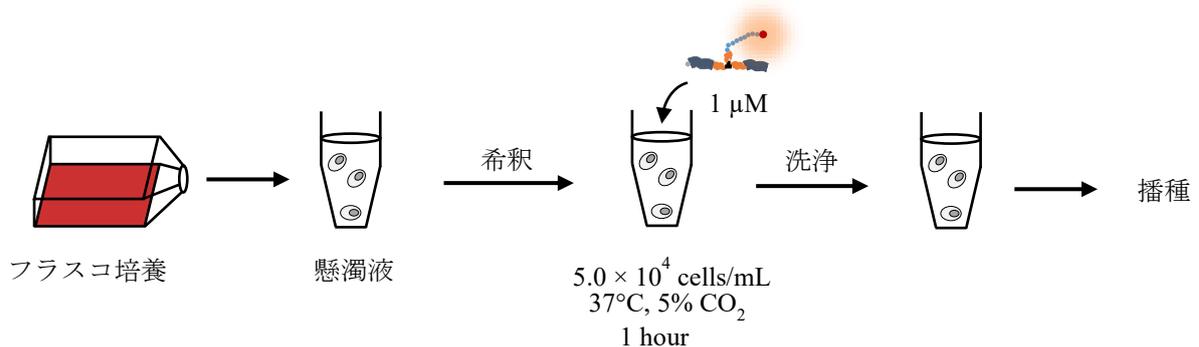


Fig. 3-13 浮遊状態の HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞に i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込ませる方法のイメージ図.

d) HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞内での i-PPc(R<sub>9</sub>) による 1 塩基の違いを認識した遺伝子発現抑制効果

**i-PPc(R<sub>9</sub>) の添加と細胞播種:** 25 cm<sup>2</sup> flask で継代培養し 6 割コンフルエントの状態の HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞懸濁液を 10% FBS 含有 McCoy's 5a 培地で  $5.0 \times 10^4$  cells/mL となるように希釈し、5 mL チューブ 5 本に 3 mL ずつ分注した ( $1.5 \times 10^5$  cells / tube). 遠心機で 2000 rpm, 5 min 遠心して既存の培地を除去した後、各チューブに無血清 McCoy's 5a 培地を 3 mL ずつ加え再懸濁した。それぞれのチューブに 200 μM i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM, i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM, i-PPc\_FM, i-PPc\_MM および

Milli-Q を 15  $\mu\text{L}$  ずつ加え 10 回程度ピペッティングした後、37°C、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 1 hour 培養した。このとき 30 min ごとにそれぞれの懸濁液を 5 回転倒混和した。1 hour 後に各チューブを 2000 rpm、5 min (swing rotor) 遠心後上清を除去し 10% FBS 含有 McCoy's 5a 培地 3 mL を添加し 5 回程度ピペッティングした。この操作を 2 回行い洗浄した。洗浄後、0.50  $\times$  38 mm Terumo Needle で 2 回ピペッティングし一部サンプリングしてセルカウントした。その後、各サンプルを添加した細胞懸濁液をそれぞれ 10% FBS 含有 McCoy's 5a 培地で希釈し、500, 1000, 2500 cells/well となるように 100  $\mu\text{L}$  ずつ白色 96 well plate に播種した。播種した細胞を 37°C、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で所定時間培養した。

ルシフェラーゼの発現量評価: 所定時間培養後にインキュベーターから取り出し 2 min 攪拌後 background を測定した。その後、well に 10  $\mu\text{L}$  ずつ WST-8 sol. を添加した後インキュベーターに 2 hours 静置し、マイクロプレートリーダー (測定条件: Absorbance,  $\lambda = 450, 610 \text{ nm}$ , 25°C, 10 nm (bandwidth), 25 (number of flashes)) を用いて吸光度を測定した (WST-8 assay)。測定後に既存の培地を除去し PBS(-) 200  $\mu\text{L}$  で 2 回洗浄した後 50  $\mu\text{L}$  Glo Lysis buffer を添加して室温で 7 min 静置した。その後に Steady-Glo Luciferase assay system sol. を 50  $\mu\text{L}$  ずつ加え 5 min 静置し、マイクロプレートリーダーで発光量を測定 (測定条件: mode: Luminescence, temp.: 25°C, attenuation: none, integration time: 5000 ms) した。遺伝子発現抑制の効果は、WST-8 assay により得られた生細胞の NADH 活性あたりの発光量を算出した。またルシフェラーゼの発現率は、i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM, MM および i-PPc\_FM を取り込んだ HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞における発光量を i-PPc\_MM の発光量でノーマライズした。

#### e) i-PPc(R<sub>9</sub>) の融解温度測定

終濃度 80  $\mu\text{M}$  となるよう i-PPc(R<sub>9</sub>)/synDNA 溶液 (10 mM PB (pH 7.0), 150 mM NaCl) を調整し、前述の 2-4-3. と同条件で測定、解析した。

### 3-4-4. 結果および考察

#### a) ルシフェラーゼ遺伝子の開始コドン領域を標的とした i-PPc(R<sub>9</sub>) の合成

精製後の i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM のクロマトグラムより、R<sub>t</sub> = 25.1 min に単一のメインピークが観察された (Fig. 3-14 a)。また TOF-MS スペクトルでは、m/z = 6577.02 (calc. M<sub>w</sub> = 6578.91) にメインピークが観測された。ここで、m/z = 3293.94 のピークは多価イオン化した i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM である (Fig. 3-14 b)。クロマトグラムより、純度は 99% 以上であった。同様に精製後の i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM のクロマトグラムより R<sub>t</sub> = 25.1 min にメインピークがみられた (Fig. 3-14 c)。また TOF-MS スペクトルでは、m/z = 6601.26 (calc. M<sub>w</sub> = 6602.94) にメインピークが観測された (Fig. 3-14 d)。ここで m/z = 3306.90, 2182.03 のピークは帰属できなかったが、クロマトグラムにおける R<sub>t</sub> = 19 min 近傍に観測された分子に起因すると推察した。精製後のクロマトグラムより純度 98% 以上の i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM を得た。

#### b) ルシフェラーゼ発現結腸癌細胞 (HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞) の樹立

pMSCV-Luc<sup>+</sup> をトランスフェクトしたヒト由来結腸癌細胞 HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞を所定代数継代培養し、細胞当たりのルシフェラーゼ発現量を評価した (Fig. 3-15)。2-4 代目の HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞において、細胞当たりのルシフェラーゼによる発光が 17000 近傍にみられ、ルシフェラーゼが恒常的に発現していることが分かった。以上より、以降の評価には HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞を用いた。

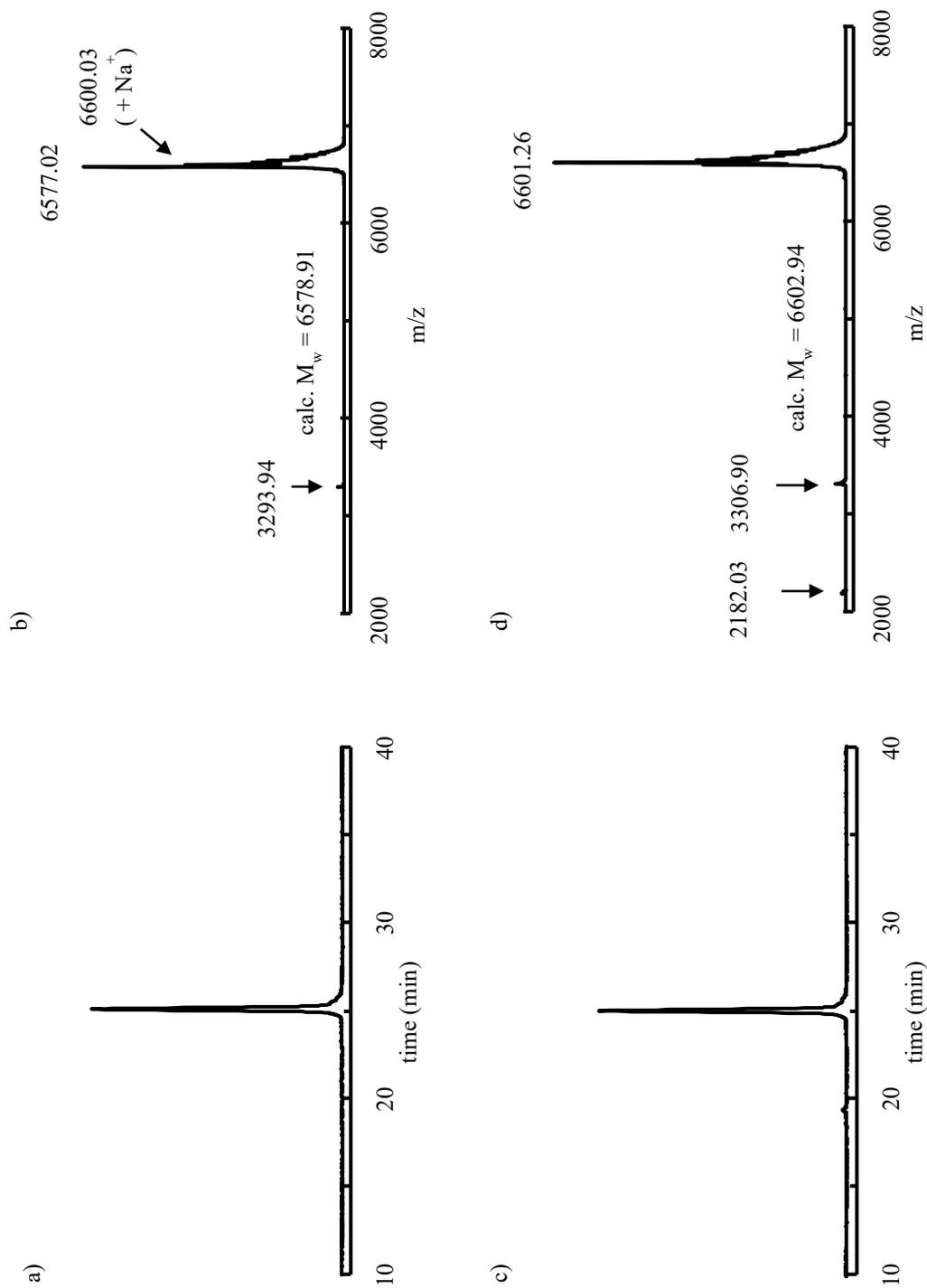


Fig. 3-14 精製後の a), b) i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM および c), d) i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM のクロマトグラムならびに TOF-MS スペクトル。  
 Conditions: a), c) ODS-3 column (4.6 × 250 mm, GL Science), 35°C, 1 °C/min, A: 0.1% TFA in 5% ACN/Milli-Q, B: 0.1% TFA in 5% Milli-Q/ACN, 260 nm, A-B 1 %/min linear gradient, b), d) CHCA/DMSO, LP\_3-20 kDa.

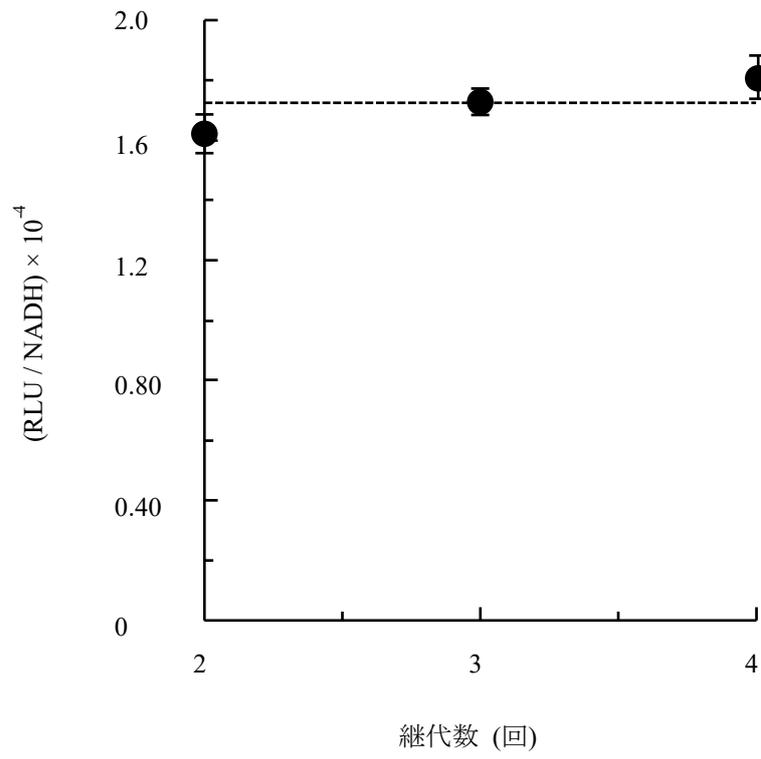


Fig. 3-15 各継代数の HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞によるルシフェラーゼ発現量.

### c) HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞における i-PPc(R<sub>9</sub>) の細胞内輸送

本項では、i-PPc(R<sub>9</sub>) による HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞内での 1 塩基の違いを認識した遺伝子発現抑制効果を検討することを念頭に、HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞における i-PPc(R<sub>9</sub>) の細胞内輸送方法を探索した。

35 mmΦ ガラスボトムディッシュに  $5.0 \times 10^4$  cells/dish となるように播種した HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞に PBS(-) を用いて i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込ませたところ、位相差顕微鏡像より著しい細胞数の減少が確認された。これは PBS(-) により細胞が死滅しディッシュから剥離したことが原因と考えられる。この際の蛍光顕微鏡像では生細胞の取り込みを観察することはできなかった (Fig. 3-16)。これは取り込み時間が短かったことが原因と考えられるが、長時間 PBS(-) に細胞を暴露するとさらに死細胞が増加することが予想されたため、本プロトコルは採用しなかった。

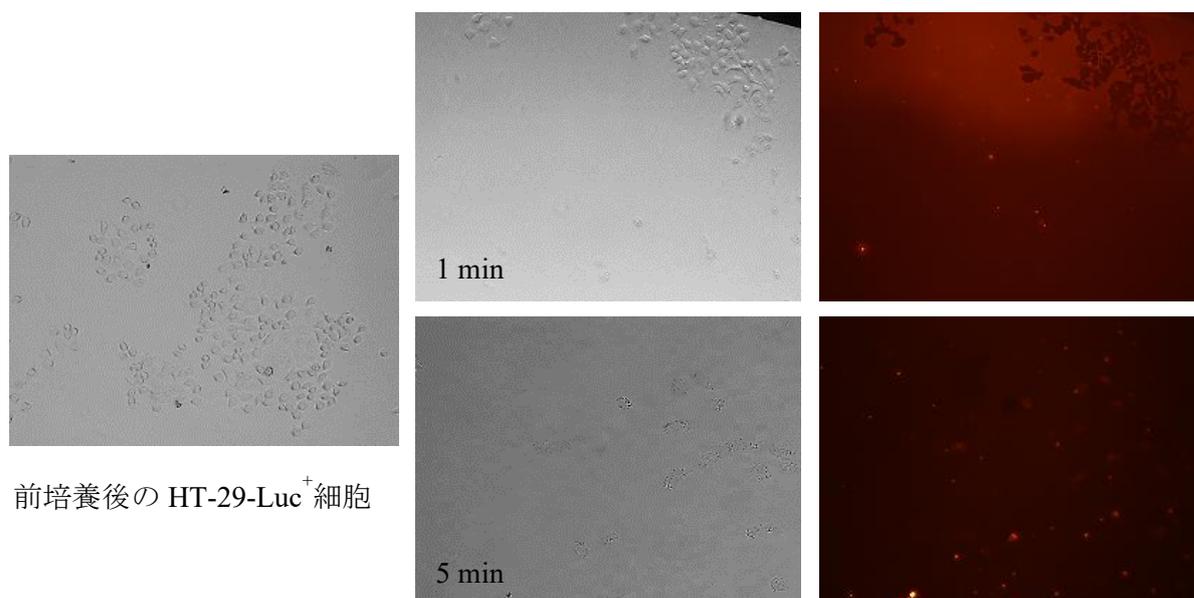


Fig. 3-16 HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞に i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込ませた際の位相差および蛍光顕微鏡像。  
Condition: HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞  $5.0 \times 10^4$  cells/dish, 1  $\mu$ M i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) in PBS(-) 中で 1 min または 5 min 培養。

次に 96 well plate に HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞を 1000 cells/well となるように播種し、前培養後に無血清、0.5%、10% FBS 含有 McCoy's 5a 培地を用いて i-PPc(R<sub>9</sub>) の細胞内輸送について検討した。無血清 McCoy's 5a 培地で 1 hour 培養した HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞の位相差顕微鏡像では、10% FBS 含有 McCoy's 5a 培地と比較すると縮退した細胞が多く観察され、アポトーシスを誘起している可能性が示された (Fig. 3-17)。これは細胞が生存するために必要な成分が不足したことが原因と推察される。この条件において 1  $\mu$ M i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) を 1 hour 取り込ませた結果、生細胞による i-PPc(R<sub>9</sub>) の取り込みは観察されず、Fig. 3-17 で観察された縮退した細胞に i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) が堆積していることが示された (Fig. 3-18 a)。次いで 10% FBS 含有 McCoy's 5a 培地中で 1  $\mu$ M i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) を 1 hour 取り込ませると生細胞が多く観察されたものの、蛍光顕微鏡像では i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) の基盤への吸着がみられ正確な観察が困難であった (Fig. 3-18 b)。これは血清を介してウェルに i-PPc(R<sub>9</sub>) が静電的に吸着したことが原因と考えられた。このため i-PPc(R<sub>9</sub>) が HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞に取り込まれるためには、栄養不足による細胞死および基材への吸着が最も少ない FBS 濃度を決定する必要があるが生じた。

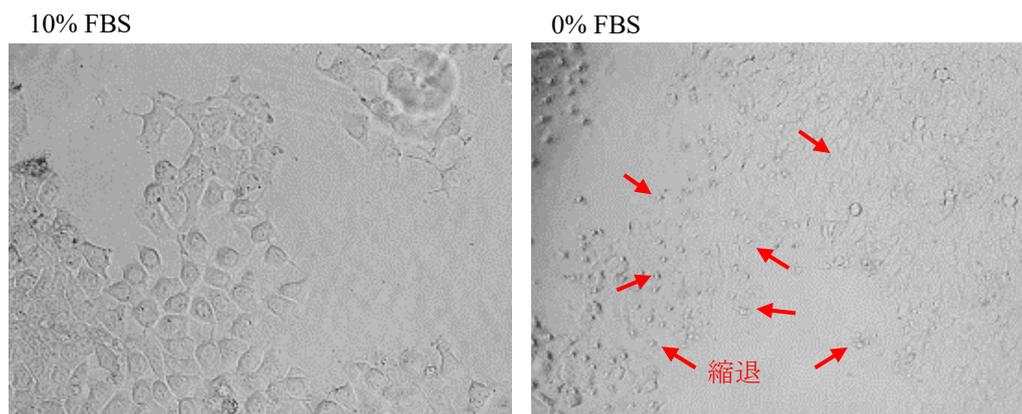


Fig. 3-17 10% FBS または 0% FBS in McCoy's 5a 培地で培養後の HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞の位相差顕微鏡像。  
Condition: HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞 1000 cells/well, 1 hour 培養 (37°C, 5% CO<sub>2</sub>).

そこで 0.5% FBS 含有 McCoy's 5a 培地中で 1  $\mu$ M i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) を 16 hours 取り込ませた結果、縮退した細胞がわずかに観察されるものの生細胞に i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) を取り込ませることができた (Fig. 3-18 c). しかし接着細胞に対して i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込ませる方法では多くの死細胞が観察されることや i-PPc(R<sub>9</sub>) が基盤に吸着するため、遺伝子発現抑制を評価する上で i-PPc(R<sub>9</sub>) の濃度依存性を正確に反映させることは困難であると判断した.

上述の問題点を克服するため、基材に播種する前の懸濁液の段階で i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込ませる方法 (2-2-4. c, method 2, Fig. 3-13) を検討した. 懸濁液中の HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞 (1.5  $\times$  10<sup>5</sup> cells) に 1  $\mu$ M i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) を無血清 McCoy's 5a 培地中で 1 hour 取り込ませた後に播種し、24 hours 培養後の HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞を顕微鏡で観察した (Fig. 3-19). 位相差顕微鏡像よりディッシュの底に接着・伸展した細胞が観察され、縮退した細胞は観察されなかった. これは、本方法が無血清培地中で i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込んだ後も生存している細胞をスクリーニングできることを意味している. この時の蛍光顕微鏡像から、i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) が細胞内に点在しマクロピノソームに留まっている状態やサイトゾルへリリースされることが示された. この方法により i-PPc(R<sub>9</sub>) が細胞に取り込まれサイトゾルへのリリースされた原因は、浮遊状態の細胞では全周囲に i-PPc(R<sub>9</sub>) が存在できるため、細胞が効率的に i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込むことができたと推察した.

以上より、ルシフェラーゼを恒常発現する HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞における i-PPc(R<sub>9</sub>) の細胞内輸送について検討した結果、懸濁液の状態が無血清条件下、1  $\mu$ M i-PPc(R<sub>9</sub>-SRB) を 1 hour 取り込ませるプロトコルが HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞内での 1 塩基の違いを認識した遺伝子発現抑制効果の検討に応用できることが確認された.





Fig. 3-19 細胞懸濁液の段階で  $1 \mu\text{M}$  i-PPc( $\text{R}_9$ -SRB) を無血清条件下で 1 hour 取り込ませ観察用ディッシュに播種し 24 hours 培養後の位相差および蛍光顕微鏡像。

#### d) i-PPc( $\text{R}_9$ ) による HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞内での 1 塩基の違いを認識した遺伝子発現抑制効果

先の結果を踏まえ、細胞懸濁液の段階で各  $1 \mu\text{M}$  i-PPc( $\text{R}_9$ ) および i-PPc を無血清 McCoy's 5a 培地中で 1 hour 取り込ませ、500, 1000, 2500 cells/well となるように HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞を播種した。所定時間培養後の生細胞当たりの発光量を WST-8 assay およびルミノアッセイにより評価しルシフェラーゼ発現に与える影響について検討した。

i-PPc( $\text{R}_9$ )\_FM を取り込ませた HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞のルシフェラーゼ発現率は、500 cells/well では 2 日から 3 日目で、1000 cells/well では 1 日から 2 日目にかけて一時的に増加した (Fig. 3-20 a, b) が、最終的にはルシフェラーゼの発現は抑制され 500 cells/well では 25%程度 (5 日目), 1000 cells/well では 15%程度 (5 日目), 2500 cells/well では 40%程度 (4 日目)となった。一方で i-PPc( $\text{R}_9$ )\_MM を取り込ませた場合は各細胞数においてもほとんど抑制されず、最大で 2500 cells/well で 10%程度の抑制 (4 日目) に止まった (Fig. 3-20 c)。このことから i-PPc( $\text{R}_9$ ) は HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞内において 1 塩基の違いを認識しルシフェラーゼの発現を抑制できることが示された。さらにサイトゾルに輸送されない i-PPc\_FM を取り込ませた HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞では、いずれの細胞数においてもほとんどルシフェラーゼの発現を抑制しなかったことから、サイトゾルへのリリースに  $\text{R}_9$  が必要であることがわかった。

i-PPc( $\text{R}_9$ ) および i-PPc を取り込んだ HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞の細胞死について WST-8 アッセイにより評価した結果、450 nm における吸光度は control と比較して顕著な差はみられなかったことから、細胞毒性はほぼないものと判断した。また、2500 cells/well 播種して 4 日培養後の吸光度の減少は、細胞がウェル内で 8-9 割のコンフルエントとなったことが原因である。

以上より、各 i-PPc( $\text{R}_9$ ) および i-PPc を取り込ませた HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞のルシフェラーゼ発現率を算出した結果、i-PPc( $\text{R}_9$ )\_FM において最大 40%程度の優位な発現抑制効果が観測され i-PPc が細胞内で 1 塩基を認識できることが示された。また i-PPc のみではほとんど発現抑制効果は観測されなかったことから、 $\text{R}_9$  によるマクロピノソームからのリリースが重要であることがわかった。

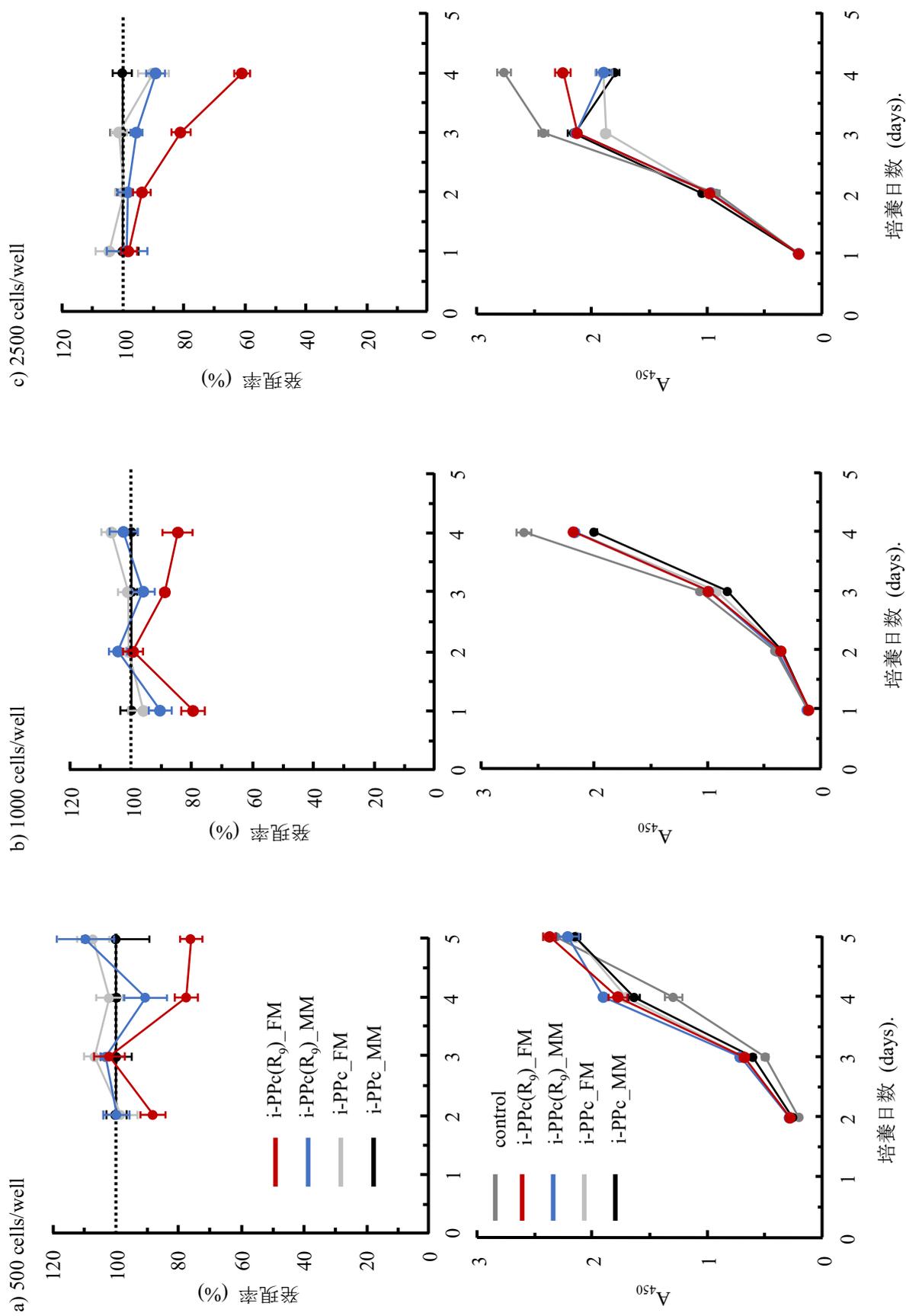


Fig. 3-20 各 i-PPc( $R_9$ ) および i-PPc を取り込ませた HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞の細胞当たりのルシフェラーゼ発現率.

### e) i-PPc(R<sub>9</sub>) の融解温度測定

I-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM を取り込んだ HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞ではルシフェラーゼ遺伝子の発現を優位に抑制することが示された一方で、i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM を取り込んだ細胞でも約 10%程度の遺伝子発現抑制がみられた。この原因を解明するために i-PPc(R<sub>9</sub>) の相補鎖安定性を T<sub>m</sub> 値の観点から評価した。

I-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM/synDNA と i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM/synDNA の融解曲線を Fig. 3-21 a) に示した。得られた各融解曲線より T<sub>m</sub> 値は各々 39.9°C と 37.2°C と算出され、i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM は i-PPc と比較して相補鎖の安定性が T<sub>m</sub> = 2.7°C 程度安定になることがわかった。これに対し、i-PPc\_MM は相補鎖を形成できないほど相補鎖形成が不安定になっていたが、i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM では T<sub>m</sub> = 37.2°C と、R<sub>9</sub> の導入により i-PPc の 1 塩基認識能が低下していることがわかった。これはアルギニン側鎖のグアノジノ基と synDNA のリン酸基が静電的相互作用により二本鎖が安定化したことが原因と考えられる。

以上より i-PPc(R<sub>9</sub>) の 1 塩基認識能を T<sub>m</sub> 値の観点から評価した結果、R<sub>9</sub> の導入により i-PPc の相補鎖形成が安定し 1 塩基認識能が低下していることがわかり、これが i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM を取り込んだ HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞で観測された遺伝子発現抑制効果の原因であると推察した。

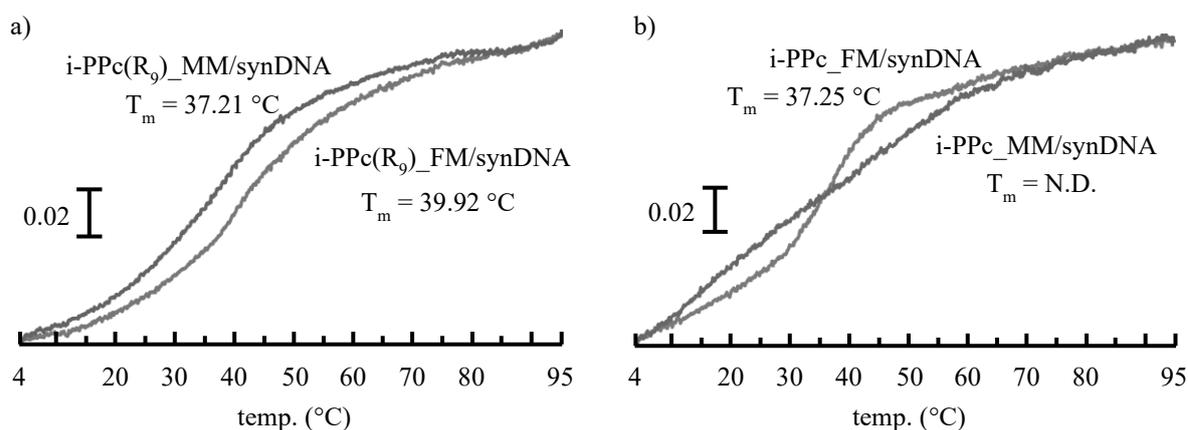


Fig. 3-21 a) i-PPc(R<sub>9</sub>)/synDNA ならびに b) i-PPc/synDNA の融解曲線 (total conc. = 80 μM).

### 3-4-5. まとめ

本項では、i-PPc の 1 塩基の違いを認識した細胞内遺伝子発現抑制効果について検討することを目的として、ルシフェラーゼ遺伝子の ATG 領域を標的とした i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM と 1 塩基異なる i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM を合成した。細胞内でルシフェラーゼを恒常発現するヒト結腸癌由来 HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞を樹立し、懸濁液の状態では i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込ませる方法が効率の良い細胞内輸送の方法であることが示された。この方法を用いて i-PPc(R<sub>9</sub>) による HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞内の遺伝子発現抑制効果について検討した結果、細胞毒性を示すことなく細胞内に取り込まれ、i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM において最大 40%のルシフェラーゼ発現抑制効果がみられた。これらの結果から、i-PPc は細胞内においても 1 塩基の違いを認識できることが示された。一方で、各 i-PPc(R<sub>9</sub>)/synDNA の T<sub>m</sub> 値測定した結果、R<sub>9</sub> の導入により i-PPc の 1 塩基認識能が低下していることが示された。

### 3-5. 小括

本章では、i-PPc の 1 塩基の違いを認識した細胞内遺伝子発現抑制効果について検討することを目的として、まず i-PPc の細胞毒性評価および細胞内輸送経路の決定を行った。その結果、10-100  $\mu\text{M}$  i-PPc において顕著な細胞毒性はみられなかった。また i-PPc はマクロピノサイトーシスにより細胞に取り込まれる一方で、マクロピノソームからサイトゾルに輸送されないことが示された。

i-PPc のサイトゾルへの輸送を目的として細胞膜透過型リリースペプチド ( $\text{R}_9\text{-G-INF-7}$  ペプチド) を i-PPc と同時に取り込ませた結果、i-PPc がサイトゾルに輸送されることが示されたが同時に細胞死が誘起されることが示された。一方で、 $\text{R}_9$  ペプチドを i-PPc の中央 PEG 部に導入した i-PPc( $\text{R}_9$ ) を Fmoc 固相合成法により合成し、i-PPc( $\text{R}_9$ ) の HeLa 細胞内への輸送について検討した結果、無血清培地中で 1 hour 取り込ませて所定時間培養することで徐々にサイトゾルに輸送されることが示された。

細胞内遺伝子発現抑制効果の評価系の構築を目的として、ルシフェラーゼを恒常発現するヒト結腸癌細胞 (HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞) を樹立した。この細胞を用いて i-PPc( $\text{R}_9$ ) の細胞内輸送について検討した結果、懸濁液の状態では i-PPc( $\text{R}_9$ ) を取り込ませる方法が効果的な方法であることが示された。この方法を用いて i-PPc( $\text{R}_9$ ) による HT-29-Luc<sup>+</sup>細胞内の遺伝子発現抑制効果について検討した結果、毒性を示すことなく i-PPc( $\text{R}_9$ )\_FM において最大 40% のルシフェラーゼ発現抑制効果がみられ、i-PPc( $\text{R}_9$ ) は細胞内で 1 塩基の違いを認識できることやサイトゾルへのリリースには 3-4 日程度必要であることが示された。その一方、各 i-PPc( $\text{R}_9$ )/synDNA の  $T_m$  値測定した結果、 $\text{R}_9$  の導入により i-PPc の 1 塩基認識能が低下していることが示された。このため i-PPc の細胞内における 1 塩基認識能を向上させる新規の分子設計が必要となる。

以上より、i-PPc( $\text{R}_9$ ) が細胞内においても 1 塩基の違いを認識した遺伝子発現抑制効果を誘起することが明らかとなった。一方で、本研究で標的とした遺伝子は、トランスフェクトされた外来の遺伝子であり、生体に存在する遺伝子ではない。今後は i-PPc の核酸医薬への展開を念頭に、生体で生じる遺伝子の 1 塩基変異を標的として検討する必要がある。

### 3-6. 参考文献

- 1) C. Plank *et. al.*, *J. Biol. Chem.*, **269**(17), 12918-12924 (1994).
- 2) S. Futaki *et. al.*, *J. Biol. Chem.*, **276**(8), 5836-5840 (2001).
- 3) I. Nakase *et. al.*, *Mol. Ther.*, **10**(6), 1011-1022 (2004).
- 4) Biotage 社 technical report “Microwave Assisted Synthesis of Peptide Nucleic Acid (PNA) Oligomers Using Biotage<sup>®</sup> Initiator+ Alstra<sup>TM</sup>” (2015).
- 5) J. J. D-Mochón *et. al.*, *Org. Letts.*, **6**(7), 1127-1129 (2004).
- 6) R. Roodbeen *et. al.*, *Eur. J. Org. Chem.*, **2012**, 7106-7111 (2012).

## 第4章 KRAS 遺伝子 1 塩基変異を標的とした治療戦略

### 4-1. がん関連遺伝子における 1 塩基変異の重要性

遺伝子の 1 塩基変異が、がん発症や薬効低下の原因となることは第 1 章で先述した。がんの発症や生存、維持に関与するがん関連遺伝子（ドライバー遺伝子や抑制遺伝子）の変異は、各部位のがんを平均して 30-60 程度存在し (Table 4-1)<sup>1), 2)</sup>、そのうちの約 95%が 1 塩基変異であり、さらにその 90.7%がミスセンス変異であることが報告されている<sup>1)</sup>。このことからがん関連遺伝子内の 1 塩基変異は、発現するタンパク質の構造や機能に変化を与える可能性が高いことが伺える。

Table 4-1 がん関連遺伝子と細胞過程での役割.

がん関連遺伝子	遺伝子	役割 (関与するシグナル伝達経路)
がん遺伝子	<i>AKT1</i>	細胞の生存 (PI3K 経路)
	<i>BRAF</i>	細胞の生存 (RAS 経路)
	<i>EGFR</i>	細胞の生存 (RAS, PI3K 経路)
	<i>PIK3CA</i>	細胞の生存 (PI3K 経路)
	<i>RAS</i>	細胞の生存 (RAS 経路)
	<i>MET</i>	細胞の生存 (RAS, PI3K 経路)
がん抑制遺伝子	<i>APC</i>	細胞運命 (APC 経路)
	<i>CDKN2A</i>	細胞の生存 (細胞周期, アポトーシス)
	<i>PTEN</i>	細胞の生存 (PI3K 経路)
	<i>SMDA4</i>	細胞の生存 (TGF-β 経路)
	<i>TP53</i>	細胞の生存 (細胞周期, アポトーシス; DNA ダメージ制御)

*AKT1*: v-akt murine thymoma viral oncogene homolog, *APC*: adenomatous polyposis coli, *BRAF*: v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1, *CDKN2A*: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A, *EGFR*: epidermal growth factor receptor, *MET*: met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor), *PIK3CA*: phosphoinositide-3-kinase, *PTEN*: phosphatase and tensin homolog, *RAS*; *HRAS*: Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog), *KRAS*: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), *NRAS*: neuroblastoma RAS viral oncogene homolog), *SMDA4*: SMDA family member 4, *TP53*: tumor protein 53.

がん遺伝子の 1 塩基変異は、EGFR や HER2 などの受容体チロシンキナーゼ (receptor tyrosine kinase; RTK) や RAS タンパク質、RAS タンパク質下流の細胞増殖シグナル伝達因子 (BRAF, MEK など) などで見られ、がんの生存や細胞運命 (細胞の増殖, 分化, 細胞死) を制御する。またがん遺伝子のみではがん化することはなく PIK3CA や TP53 遺伝子などのがん抑制遺伝子に 1 塩基変異が生じることで進行し、多臓器へ浸潤や転移する<sup>1), 3)</sup>。例えば大腸がんは、初期に遺伝子の転写の調節に関与するカテニンβの分解に関与するがん抑制遺伝子 (APC 遺伝子) に 1 塩基またはフレームシフト変異が生じる。その後、KRAS 遺伝子 1 塩基変異に起因する細胞増殖により良性腫瘍が形成された後に、がん遺伝子 (PIK3CA) やがん抑制遺伝子 (TP53 遺伝子), 転写の調節に関与する SMAD4 遺伝子等に変異が生じることで悪性腫瘍へと変化する<sup>1)</sup>。膵臓腺がんにおいても、初期では KRAS 遺伝子 1 塩基変異により前癌病変として知られる膵上皮内腫瘍性病変 (PanIN) が形成され、同時期にがん抑制遺伝子 (CDKN2A 遺伝子) の変異を経て、最終的には TP53 遺伝子と SMDA4 遺伝子の変異により浸潤性膵管腺がんが発症する<sup>3)</sup>。このようにがんの発症と多段階的な遺伝子の 1 塩基変異は密接に関連しており、1 塩基変異を標的とした治療

薬の重要性がうかがえる。

## 4-2. 遺伝子の1塩基変異を標的とした治療薬に関する研究

### 4-2-1. EGFR のチロシンキナーゼの1塩基変異を標的とした治療薬

EGFR チロシンキナーゼ阻害剤 (EGFR-TKI) であるゲフィチニブやエルロチニブは EGFR 遺伝子に1塩基変異のある非小細胞肺癌 (NSCLC) に対する分子標的薬である。EGFR は細胞膜表面に存在する RTK であり、増殖因子が結合する細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、チロシンキナーゼを有する細胞内ドメインで構成される。EGFR 遺伝子変異の 40-45% はチロシンキナーゼ領域のエクソン 21 に生じる1塩基変異であり<sup>4)</sup>、中でも L858R は 45% の NSCLC で観測される。通常、EGFR は EGF などの増殖因子の結合により二量体を形成し、チロシンキナーゼは ATP と結合する (活性型)。この ATP を利用してチロシン残基がリン酸化され、下流のタンパク質を活性化することで細胞増殖シグナルを伝達する (Fig. 4-1 a)。一方で、変異型 EGFR (L858R) は EGFR の不活性状態を不安定化し、活性状態を安定化する。これにより野生型と比較して長期的な酵素活性化が促進され、細胞増殖シグナルを下流に伝達し続けることでがん細胞を増殖させ続ける<sup>4), 5)</sup>。このため EGFR-TKI は、変異型 EGFR の ATP 結合部位に ATP と競合的にかつ可逆

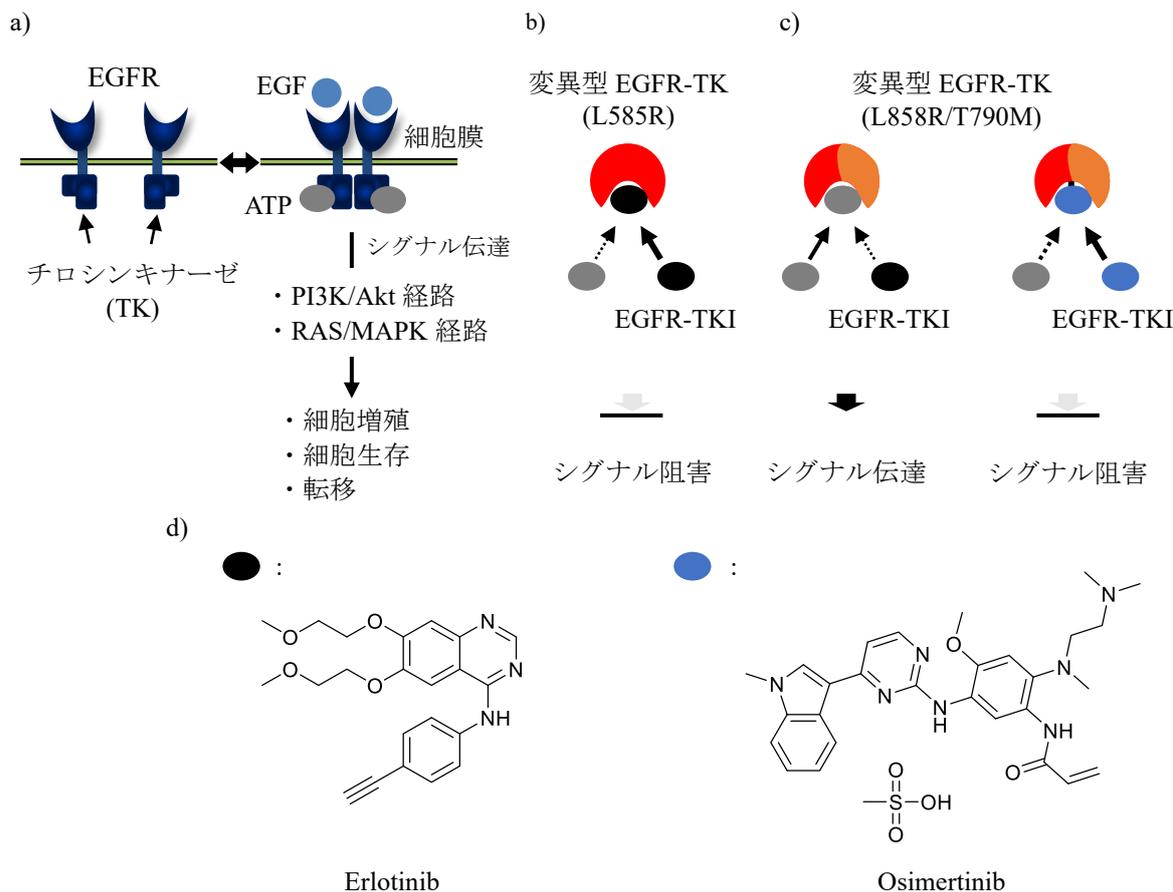


Fig. 4-1 a) 野生型 EGFR のシグナル伝達機構および b), c) 変異型 EGFR のチロシンキナーゼを標的とした阻害剤の作用機構, d) 肺癌治療に用いられる EGFR-TKI.

的に結合することでチロシン残基のリン酸化および下流へのシグナル伝達を阻害し細胞の増殖を抑制する (Fig. 4-1 b)。これは、野生型と比較して変異型の ATP への親和性が低下し、EGFR-TKI への親和性が向上しているため変異型特異的に作用する<sup>5)</sup>。しかし、50% の NSCLC は、エクソン 20 の二次変異 (T790M) により ATP の親和性が向上し EGFR-TKI に対する薬効耐性を示

す<sup>4)</sup> (Fig. 4-1 c). このため 2016 年 T790M 変異が生じた NSCLC 患者への二次治療薬として ATP 結合部位と不可逆的に結合することができる EGFR-TKI; オシメルチニブが開発されている<sup>6)</sup>. この他にも KRAS 遺伝子 1 塩基変異や過剰発現した MET 遺伝子 (スキッピング変異, 1 塩基変異) などのがん遺伝子の変異により薬効が低下することも明らかになっている<sup>4),5)</sup>.

#### 4-2-2. KRAS 遺伝子 1 塩基変異を標的とした治療薬

RAS (HRAS, KRAS, NRAS) 遺伝子はヒトのがんにおいて最も変異するがん遺伝子であり<sup>7),8)</sup>, すべてのがんを対象とした際に KRAS 遺伝子で最も頻繁に変異が生じていることがわかる (86%). また, この KRAS 遺伝子の 1 塩基変異は, 膵臓がん患者の 98%, 大腸がん患者の 45%, NSCLC 患者の 31%にみられ (Table 4-2)<sup>8)</sup>, 特にコドン 12 で最も高い頻度で生じることが分かっている. 主な KRAS 遺伝子の変異はがんの種類により異なり, 膵臓がんや大腸がんでは G12D, NSCLC では G12C が主であることが報告されている (Table 4-3)<sup>8),9)</sup>. このようながん細胞内での KRAS 遺伝子 1 塩基変異は, 発症だけでなく薬効低下の原因となる.

Table 4-2 各がんにおける Ras 遺伝子の変異発生率.

がんの種類	Ras 遺伝子変異発生率	Ras 遺伝子変異		
		KRAS	NRAS	HRAS
全がん		86%	11%	3%
膵管腺がん	98%	100%	0%	0%
大腸がん	52%	86%	14%	0%
非小細胞肺がん	32%	96%	3%	1%
メラノーマ	28%	3%	94%	3%
甲状腺がん	13%	8%	65%	27%
HNSCC	6%	9%	5%	86%

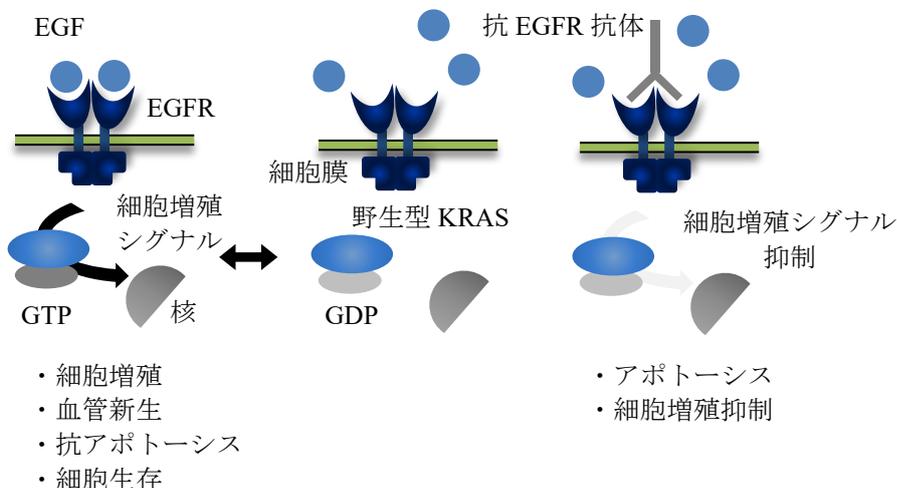
Table 4-3 各がんにおける KRAS 遺伝子 1 塩基変異.

がんの種類	KRAS 遺伝子変異				
	G12D	G12R	G12C	G12V	Other
膵管腺がん	39-51%	12-17%	2-4%	30-39%	5-9%
大腸がん	44%	1%	12%	32%	> 7%
非小細胞肺がん	6%	-	59%	29%	6%

KRAS タンパク質は GTP 結合活性型と GDP 結合不活性型の 2 種の異なる状態をとる膜結合 GTP アーゼであり, 細胞増殖シグナルを核に伝達する役割を担う. 細胞膜表面の上皮成長因子受容体 (EGFR) に上皮成長因子 (EGF) が結合した際の一過的にシグナルが伝達され, 下流のタンパク質を活性化して細胞増殖や血管新生を誘発する<sup>10)</sup> (Fig. 4-2 a). 大腸がんの治療薬 (アービタックス, ベクティビックス) は EGFR を標的とする抗 EGFR 抗体であり, この伝達シグナルを阻害することでがん細胞の増殖を抑制する<sup>11)</sup> (Fig. 4-2 a). 一方で KRAS 遺伝子の cSNP が原因で発現される変異型 KRAS タンパク質は, GTP 結合活性型となる. これは EGF の EGFR への結合とは関係なく恒常的に細胞増殖シグナルを出し続けることを意味しており, 結果として細胞が増殖し続ける原因となる<sup>10)</sup> (Fig. 4-2 b). このため, KRAS 遺伝子に cSNP が存在する場合は先の

抗 EGFR 抗体薬により伝達シグナルは阻害できず，薬効（がん細胞の増殖抑制効果）は現れない<sup>12),13)</sup>．事実，厚生労働省は KRAS 遺伝子に変異をもつ患者への抗 EGFR 抗体薬の投薬を制限しており，対象者には副作用の強い従来の低分子型抗がん剤の投与が行われている．

a) 野生型 KRAS タンパク質を有するがん患者



b) 変異型 KRAS タンパク質を有するがん患者

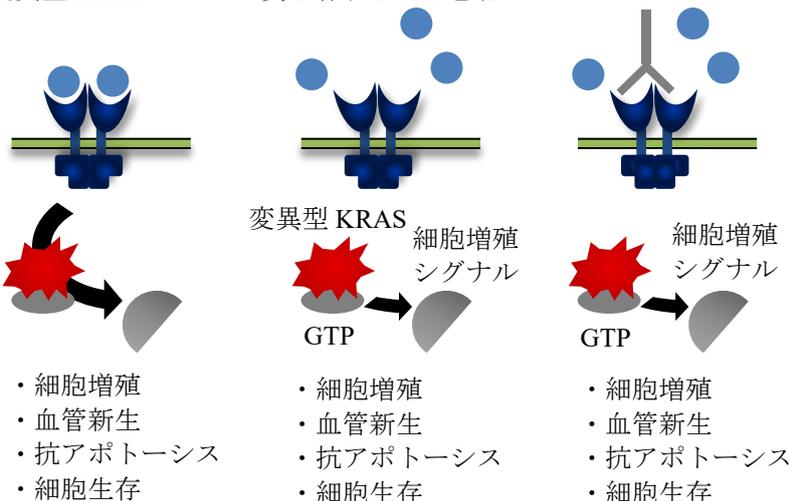


Fig. 4-2 a) 野生型および b) 変異型 KRAS タンパク質を介した細胞増殖機構の違いと大腸がん患者に対する抗 EGFR 抗体の作用機構．

このような KRAS 遺伝子一塩基変異の作用機序を考慮すると，変異型 KRAS タンパク質からのシグナル阻害が一つの治療法として期待できる<sup>14)</sup>が，KRAS タンパク質と GTP の親和性が高いことが原因で GTP 拮抗阻害剤の同定は困難であった<sup>8)</sup>．近年になってようやく，ARS-1620 や AMG510 が NSCLC や大腸がんの変異型 KRAS (G12C) タンパク質と特異的に共有結合し，細胞増殖シグナルの阻害および抗腫瘍効果を示すことが報告された<sup>15), 16)</sup>．これは，ARS-1620 や AMG510 がシステイン残基に隣接するアロステリックなポケット (switch II pocket) に入り込むことで KRAS (G12C) タンパク質を不活性の状態で捕捉することに起因することから，KRAS (G12C) タンパク質の分子標的薬として第 2 相試験へと進行している．一方で，これらの化合物はシステイン反応性であるため，その他の変異型 KRAS タンパク質への適用は確認されていない．

このような状況下で、M. A. Collins *et. al.*は、p53 がん抑制遺伝子が作用しない状況で KRAS<sup>G12D</sup> が発現すると他臓器への転移を誘起するのに対し、KRAS<sup>G12D</sup> の発現を抑制すると腫瘍形成時のアポトーシスを誘導することを報告した<sup>17),18)</sup>。同様に H. Ying *et. al.*は、KRAS<sup>G12D</sup> の消滅により引き起こされるアポトーシスが、腫瘍のグルコース取り込みの低下と様々な代謝 (非酸化的リン酸化およびヘキソサミン合成) の低下により助長されることを報告した<sup>19)</sup>。つまり、変異型 KRAS タンパク質の発現抑制ががん治療の作用機序となり、これらの化合物が治療薬となる可能性が提示されるに至った。さらに、1 塩基変異性 KRAS タンパク質の発現を直接的に抑制する核酸化合物は、変異ごとの KRAS タンパク質の構造解析を経て阻害化合物を探索する従来の創薬法と比較すると優位性が格段に高まることとなる。

以上を念頭に、従来の抗がん剤では治療効果が認められない<sup>20), 21)</sup>、KRAS 遺伝子に高頻度で変異がみられる膵臓がんを対象とした研究が進められてきた。E. Z. Khvalevsky *et. al.*は、膵臓腺がん細胞内の KRAS (G12D) 遺伝子を標的とした siRNA を生分解性ポリマー (local drug eluter; LODER) で内包した siG12D LODER が細胞死を誘導することやゼノグラフトマウスにおいて抗腫瘍効果を示すことを報告した<sup>22)</sup>。しかし siRNA 単体では細胞内で 96 hours には分解されることや野生型 KRAS 遺伝子への影響については検討されていない。また、塩浜らは、3'末端 2 塩基に人工核酸を配した特定の siRNA (21 塩基からなり、5'末端から 13 塩基の部分に mRNA の 1 塩基変異認識箇所を配置) が変異型 KRAS 遺伝子 (G12D) を標的として発現を選択的に抑制できること (WT: 55.4%, G12D: 90.9%) を報告した<sup>23)</sup>。その一方で、野生型 KRAS 遺伝子を標的とした siRNA では、塩基配列選択性は観測されていない (WT: 87.6%, G12D: 75.3%)。この原因を筆者らは、siRNA と標的 mRNA の mismatches の違いに起因すると述べている。siRNA は、変異点の位置や mismatches ペア、塩基配列により塩基配列依存性と発現抑制効果に多大な違いが生じるため、使用できる塩基配列が制限されると考えられる。さらに siRNA の 1 塩基認識能の低さは、A. Mehta *et. al.*により報告されたヒト肺がん細胞内の変異型 KRAS 遺伝子 (G12S) を標的とした siRNA においても示唆されており<sup>24)</sup>、siRNA により 1 塩基変異を認識することが困難となっているのが現状である。この一方で、M. Acunzo *et. al.*は、1 塩基変異した KRAS 遺伝子 (G12S) を標的として 5'末端の 6 塩基 (seed 領域) の中央に 1 塩基変異がくるようにし 3'末端側 11 塩基の補足領域との間を相補性のない 3 塩基で架橋した人工 miRNA を設計した。そしてこの分子が、肺がん細胞内において塩基配列依存的に発現を抑制し細胞死を誘導できることやゼノグラフトマウスにおいて腫瘍が縮小することを報告し、RNAi により 1 塩基変異を認識して発現抑制できることを示した (Fig. 4-3)<sup>25)</sup>。さらに、膵臓腺がん細胞内の G12D 変異およびメラノーマ細胞の 2 塩基異なる BRAF (V600D) についても塩基配列依存的に発現抑制できることを報告した<sup>26)</sup>。しかし、人工 miRNA を添加された細胞は、48 hours 以降に生存性が向上していることやゼノグラフトマウスにおいて頻りに投与する必要があることなど、細胞内および *in vivo* における生体内での安定性に課題が残った。

この他、KRAS 遺伝子の 1 塩基変異を標的としていないものの、アンチセンス法を用いた KRAS 遺伝子の発現抑制効果も報告されている。S. J. Ross *et. al.*は、野生型およびすべての変異型 KRAS 遺伝子の 3'非翻訳領域を標的とした Gapmer 型アンチセンスオリゴヌクレオチド (AZD4785) が KRAS mRNA の発現を抑制し、特に KRAS タンパク質に変異のある細胞で抗増殖効果を示すことを報告した。これは、変異型 KRAS タンパク質の発現抑制により下流のシグナル (MAPK) 経路が阻害されたことに起因すると筆者らは述べているが、野生型 KRAS タンパク質を有する細

胞との関連性については詳細には不明である。

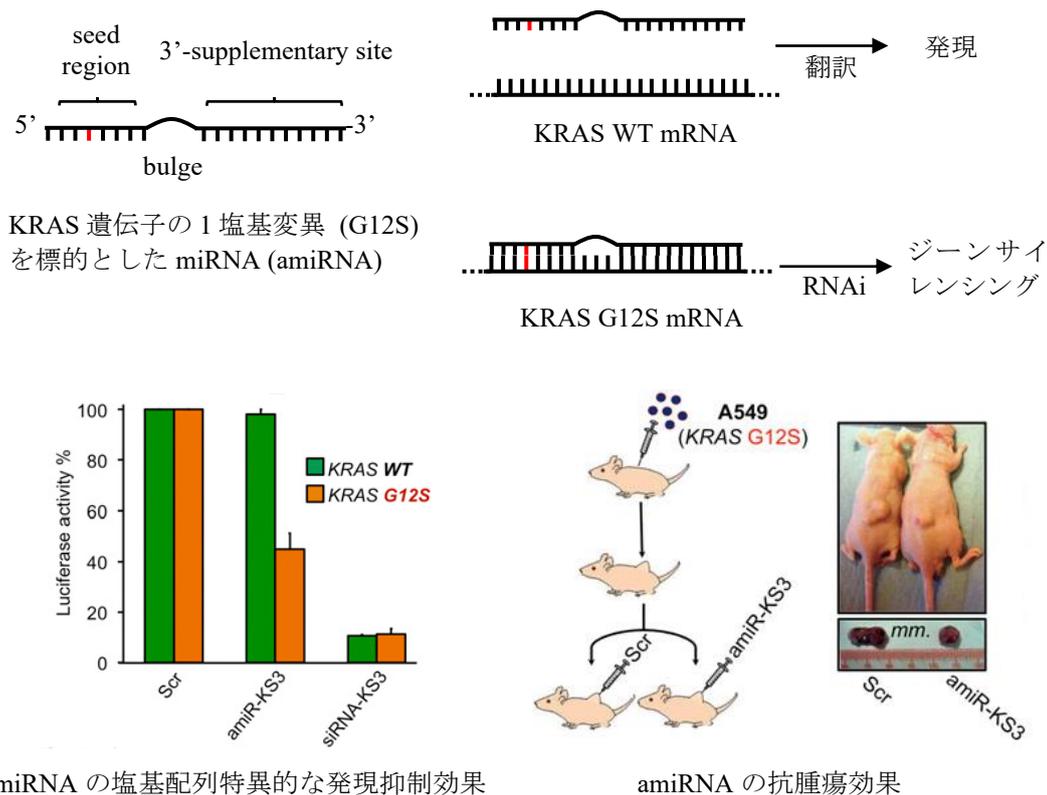


Fig. 4-3 KRAS 遺伝子 1 塩基変異を標的とした人工 miRNA の分子設計と塩基配列特異的な発現抑制効果, ならびに抗腫瘍効果 (M. Acunzo *et. al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**(21), E4203-4212 (2017) より引用).

#### 4-3. 今後の展開

本章では, がん発生における KRAS 遺伝子 1 塩基変異の作用機序とこの 1 塩基変異を標的としたがん治療薬の重要性について説明した. 多様な KRAS 遺伝子の 1 塩基変異はがん細胞の増殖や生存に影響を与えることからがん治療の標的となるため, 現在では変異型 KRAS タンパク質からの増殖シグナルを阻害する化合物の探索が創薬の主体となっている. しかしながら, 結晶構造解析を経た探索法は変異パターンが多様な KRAS タンパク質に適用するには不利で, 変異型 KRAS タンパク質の発現抑制を作用機序とする核酸医薬の優位性が改めて明確になったといえる. しかしながら, 天然型核酸あるいは人工核酸を用いたこれまでの研究成果は生体内分解や off-target 効果などの課題を抱えており, 臨床に進行できる結果には到達していないのが実情である. 一方で, 先に示してきた i-PPc は細胞内で 1 塩基変異を認識した遺伝子発現制御を達成しており, これらの課題を克服した核酸医薬となり得る可能性を有している.

これらの成果を踏まえ, 以下の章では KRAS 遺伝子の塩基配列特異的な発現抑制を目的とした i-PPc の分子設計と膵がん細胞に対する細胞死誘導並びにその機構解析を目的とした. 第 5 章では, KRAS 遺伝子を標的としかつ細胞内輸送を可能とした i-PPc (i-PPc(R<sub>9</sub>), R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc) による野生型または変異型 KRAS 遺伝子を有する 2 種の膵臓がん細胞の細胞死誘導とその機構について述べた. 第 6 章では, より生体内環境での効果を検討するため, スフェロイド化した各膵臓腺がん細胞への細胞死誘導について検討した. KRAS 遺伝子変異性がん治療薬としての可能性について述べる.

#### 4-4. 参考文献

- 1) B. Vogelstein *et al.*, *Sci.*, **339**(6127), 1546-1558 (2013).
- 2) R. Pagliarini *et al.*, *EMBO reports*, **16**(3), 280-296 (2015).
- 3) R. H. Hruban *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, **6**, 2969-2972 (2000).
- 4) S. V. Sharma *et al.*, *Nat. Rev.*, **7**, 169-181 (2007).
- 5) M. J. Eck and C.-H. Yun, *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 559-566 (2010).
- 6) J. C. Soria *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **378**(2), 113-125 (2018).
- 7) A. M. Waters and C. J. Der, *Cold Spring Harb Perspect Med.*, **8**(9), 1-23 (2018).
- 8) A. D. Cox *et al.*, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **13**(11), 825-851 (2014).
- 9) K. L. Bryant *et al.*, *Trends Biochem. Sci.*, **39**(2), 91-100 (2014).
- 10) S. Jančí *et al.*, *J. Biomed. Biotech.*, **2010**, 1-13 (2010).
- 11) E. A. Dubois and A. F. Cohen, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **68**(4), 482-483 (2009).
- 12) D. J. Freeman *et al.*, *Clin. Colorectal Cancer*, **7**(3), 184-190 (2008).
- 13) C. S. Karapetis *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, **359**(17), 1757-1765 (2008).
- 14) P. Liu *et al.*, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, **9**(5), 871-879 (2019).
- 15) M. R. Janes *et al.*, *Cell*, **172**, 579-589 (2018).
- 16) J. Cannon *et al.*, *Nat.*, **575**, 217-242 (2019).
- 17) M. A. Collins *et al.*, *PLOS ONE*, **7**(12), e49707-e49721 (2012).
- 18) M. A. Collins *et al.*, *J. Clin. Invest.*, **122**(2), 639-635 (2012).
- 19) H. Ying *et al.*, *Cell*, **149**, 656-670 (2012).
- 20) R. K. Kelley and A. H. Ko, *Biol. Target Ther.*, **2**(1), 83-95 (2008).
- 21) K. Miyabayashi *et al.*, *Cancer Res.*, **73**(7), 2221-22234 (2013).
- 22) E. Z. Khvalevsky *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**(51), 20723-20728 (2013).
- 23) Y. Shihama *et al.*, *近畿大学産業理工学部かやのもり*, **30** (2019).
- 24) A. Mehta *et al.*, *Pharm. Res.*, **36**(133), 1-13 (2019).
- 25) M. Acunzo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**(21), E4203-4212 (2017).
- 26) M. Acunzo *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**(21), Supplemental Information (2017).
- 27) S. J. Ross *et al.*, *Sci. Transl. Med.*, **9**(eaal 5253), 1-13 (2017).

## 第5章 KRAS 遺伝子 1 塩基変異を対象とした PNA 型人工核酸の合成

### 5-1. はじめに

本章では、膵臓腺がん細胞で生じる KRAS 遺伝子の 1 塩基変異を標的とした i-PPc の合成とこの i-PPc による細胞死誘導について検討した。具体的には、KRAS 遺伝子の 1 塩基変異を認識するための至適な塩基配列を決定し、i-PPc(R<sub>9</sub>) ならびに i-PPc と R<sub>9</sub> 部位が分離する i-PPc (R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc) を用いて、野生型あるいは変異型 KRAS 遺伝子を有する 2 種の膵臓腺がん細胞 (BxPC-3, PANC-1) への細胞死誘導について検討した。さらに、細胞死に至る機構について検討した。

### 5-2. KRAS 遺伝子 1 塩基変異を対象とした i-PPc の塩基配列の決定

#### 5-2-1. はじめに

i-PPc が膵臓がん細胞内で KRAS 遺伝子の 1 塩基変異を認識し発現を抑制するためには、i-PPc と野生型あるいは変異型 KRAS mRNA との相補鎖の融解温度を 37°C 近傍となるように i-PPc を設計する必要がある。相補鎖安定性は A/T と G/C の含有量や隣接した塩基の相互作用により決定されるため、1 塩基変異を認識するための至適な塩基配列を策定する必要がある。本項では、細胞内で KRAS 遺伝子 1 塩基変異を認識する i-PPc の合成を目的として塩基配列の異なる 4 種 i-PPc とその 1 塩基ミスマッチ型を合成し、野生型 KRAS 遺伝子と同じ塩基配列を持つ合成 DNA (synDNA) との熱安定性を評価した。

#### 5-2-2. 試薬

- ・ i-PPc 合成試薬 (2-2-2. 参照)
- ・ SynDNA (5'-AATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTG-3') 北海道システムサイエンス

#### 5-2-3. 実験操作

##### a) 各塩基配列の i-PPc の Fmoc 固相合成

Table 5-1 に示した KRAS 遺伝子 1 塩基変異近傍を標的とした塩基配列を持つ 4 種の i-PPc を合成した (2-2-3. 参照)。得られた i-PPc は HPLC で精製後、TOF-MS 測定により同定した。

Table 5-1 KRAS 遺伝子を標的とした各 i-PPc の塩基配列。

synDNA および i-PPc の塩基配列	
KRAS DNA	5'-AATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGCC-3'
i-PPc <b>1</b>	3'-ATATTTGA — PEG <sub>12</sub> — TCGAC <u>C</u> AC-5'
i-PPc <b>2</b>	3'-AACACCAT — PEG <sub>12</sub> — TCGAC <u>C</u> AC-5'
i-PPc <b>3</b>	3'-TTTGAACA — PEG <sub>12</sub> — TCGAC <u>C</u> A-5'
i-PPc <b>4</b>	3'-TATTTGAA — PEG <sub>12</sub> — TCGAC <u>C</u> A-5'

\*i-PPc\_MM: C → T.

##### b) i-PPc と synDNA の熱安定性評価

i-PPc の濃度測定ならびに synDNA との融解温度測定は 2-4-3. に準じて行った。

#### 5-2-4. 結果および考察

SynDNA と i-PPc **1** ~ **4** のフルマッチ型、あるいはミスマッチ型との T<sub>m</sub> 値を Table 5-2 に示した。この結果、**1** と **4** においてフルマッチあるいはミスマッチ型と synDNA の T<sub>m</sub> 値が 37°C を境

にする条件を満たしたが、**4**ではN末端(3')側のPNA残基数が1塩基少なく off-target 効果の原因になると推察し、以降は**1**を用いることとした。

Table 5-2 各 i-PPc の塩基配列の T<sub>m</sub> 値.

	T <sub>m</sub> (°C)	
	FM	MM*
i-PPc <b>1</b>	43.6	35.2
i-PPc <b>2</b>	61.9	51.5
i-PPc <b>3</b>	54.1	45.4
i-PPc <b>4</b>	-	34.4

### 5-3. i-PPc(R<sub>9</sub>) による膵臓がん細胞の塩基配列依存的な細胞死評価

#### 5-3-1. はじめに

本項では、5-2.で決定した塩基配列をもつ i-PPc(R<sub>9</sub>) を合成し、膵臓がん細胞の細胞死誘導について検討した。対象とするがん細胞として、野生型 KRAS 遺伝子 (コドン 12: GGT) を保有するヒト膵臓腺癌由来 BxPC-3 細胞と変異型 KRAS 遺伝子 (コドン 12: GAT) を保有する PANC-1 細胞を用いた。

#### 5-3-2. 試薬

- ・ i-PPc 合成試薬 (2-2-2. 参照)
- ・ BxPC-3 細胞 ATCC
- ・ PANC-1 細胞 理研バンク
- ・ RPMI-1640 培地 (with HEPES) Wako
- ・ RPMI-1640 培地 (phenol red free) Wako
- ・ Fetal bovine serum (FBS)
- ・ Penicillin-Streptomycin solution (× 100) Wako
- ・ Cell counting Kit-8 DOJINDO
- ・ CellTiter-Glo<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability assay Promega
- ・ CellTiter-Glo2<sup>®</sup> Luminescent Cell Viability assay Promega
- ・ × 1 GloLysis buffer Promega

#### 5-3-3. 実験操作

##### a) i-PPc(R<sub>9</sub>) の Fmoc 固相合成

以下の i-PPc(R<sub>9</sub>) を合成 (3-3-4. 参照) し、HPLC で精製後 TOF-MS 測定により同定した。

i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM: 5'-CACCCAGCT-PEG<sub>5</sub>-Lys(PEG<sub>2</sub>-Arg<sub>9</sub>)-PEG<sub>5</sub>-AGTTTATA-3'

i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM: 5'-CATCAGCT-PEG<sub>5</sub>-Lys(PEG<sub>2</sub>-Arg<sub>9</sub>)-PEG<sub>5</sub>-AGTTTATA-3'

##### b) Cell Counting Kit-8 を用いた細胞死誘導評価

i-PPc(R<sub>9</sub>) の添加: 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下 10% FBS と × 1 penicillin-streptomycin 含有 RPMI-1640 培地中で継代培養した各細胞を 100 μL 培地中 2500 cells/well となるように 96 well plate に播種し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 24 時間前培養した。既存の培地を除去した後、所定濃度の i-PPc(R<sub>9</sub>) を含む 10% または 3% FBS 含有 RPMI-1640 培地を 100 μL 添加し 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 3 日間培養した。この際、i-PPc(R<sub>9</sub>) を添加して 2 日培養後に同操作を行い培地交換した。

Cell Counting Kit-8: 96 well plate 内を 10% または 3% FBS と × 1 penicillin-streptomycin 含有 RPMI-1640 (phenol red free) 培地で 2 回洗浄し 2 min 攪拌後 background ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) を測定した。その後 10  $\mu\text{L}$  WST-8 sol. を添加しインキュベーターで 2 時間静置した。2 時間後に background と同様に吸光度を測定した。所定濃度の各 i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込んだ各膵臓腺がん細胞の生存率を、control の  $\lambda = 450 \text{ nm}$  における吸光度でノーマライズし算出した。

c) Luminescence assay を用いた細胞死誘導評価

i-PPc(R<sub>9</sub>) の添加: 継代培養した細胞の 96 well plate への細胞播種は b) に準じる。1  $\mu\text{M}$  または 3  $\mu\text{M}$  i-PPc(R<sub>9</sub>) を含む 3% FBS, × 1 penicillin-streptomycin 含有 RPMI-1640 培地 (以降, 特に指定が無い場合はこれを培地とする) を調製した。既存の培地を除去した後, 1  $\mu\text{M}$  または 3  $\mu\text{M}$  i-PPc(R<sub>9</sub>) 含有培地を 100  $\mu\text{L}$  ずつ添加し 2 日間培養した。培養後, 既存の培地を除去し 1  $\mu\text{M}$  または 3  $\mu\text{M}$  i-PPc(R<sub>9</sub>) 含有培地を 100  $\mu\text{L}$  ずつ添加し培地交換し, さらに 2 日間培養した。

Luminescent cell viability assay: 継代培養時の培地を除去し, 200  $\mu\text{L}$  PBS(-) もしくは培地で 1 回洗浄後, 測定順かつ 6 sec おきに 50  $\mu\text{L}$  Glo Lysis buffer を添加し 5 min 静置した。その後 50  $\mu\text{L}$  CellTiter-Glo sol. を同様に添加し, 10 min 静置した後に各ウェルの発光量を測定した。所定濃度 i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込んだ各膵臓腺がん細胞の生存率を, control の各細胞の生存率を 100% としてノーマライズし算出した。

浮遊状態の細胞に i-PPc(R<sub>9</sub>) を添加する方法: 継代培養時の培地を除去し, 7mL PBS(-) を加え洗浄した後に 500  $\mu\text{L}$  0.05%(w/v) trypsin-0.53 mmol/L EDTA・4 Na sol. を添加し 37°C で 10 min 処理して各細胞をフラスコから剥離させた。Phenol red free の培地 4 mL で回収, 遠心 (1500 rpm, 3 min) 後に上清を除去した。得られたペレットを 3.2 mL phenol red free 培地に懸濁させ, 0.50 × 38 mm Terumo Needle で 3 回ピペッティング後, 懸濁液の一部を同培地で 5 倍希釈しセルカウントした。懸濁液を 2.5 × 10<sup>4</sup> cells/mL となるように同培地で希釈後, 滅菌した 200  $\mu\text{L}$  PCR チューブに 100  $\mu\text{L}$  ずつ移し 2,500 cells/tube となるように細胞を播種した。その後, 調整した × 10 i-PPc(R<sub>9</sub>) phenol red free 培地を 10  $\mu\text{L}$  ずつ所定のレーンに添加し所定時間培養した。

Luminescent cell viability assay: PCR チューブ内で所定時間培養した 1  $\mu\text{M}$  各 i-PPc(R<sub>9</sub>) を含む細胞懸濁液 110  $\mu\text{L}$  を白色 96 well plate に移した。その後測定順かつ 6 sec おきに 110  $\mu\text{L}$  CellTiter-Glo sol. を勢いよく添加し 25°C に設定したマイクロプレートリーダー中で 10 min 静置し, 所定のウェルの発光量を測定した。1  $\mu\text{M}$  各 i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込んだ各膵臓腺がん細胞の生存率を control の各細胞の生存率を 100% として control の発光量でノーマライズし算出した。

#### 5-3-4. 結果および考察

a) 各 i-PPc(R<sub>9</sub>) の Fmoc 固相合成

精製後の i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM のクロマトグラムより  $R_t = 34.0 \text{ min}$  に単一のメインピーク (Fig. 5-1 a) が, また TOF-MS スペクトルでは calc.  $M_w = 6614.93$  に対し  $m/z = 6618.80$  にメインピークおよび  $m/z = 3312.52$  (二価イオン化) にピークが観測され (Fig. 5-1 b), 純度 99%以上の i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM が得られたと判断した。

精製後の i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM のクロマトグラムより  $R_t = 34.2 \text{ min}$  に単一のメインピーク (Fig. 5-1 c) が, TOF-MS スペクトルでは calc.  $M_w = 6629.95$  に対し  $m/z = 6630.64$  にメインピークおよび  $m/z = 3321.33$  (二価イオン化) にピークが観測され (Fig. 5-1 d), 純度 98%以上の i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM が得られたと判断した。以上より, 目的とする高純度な i-PPc(R<sub>9</sub>) を得た。

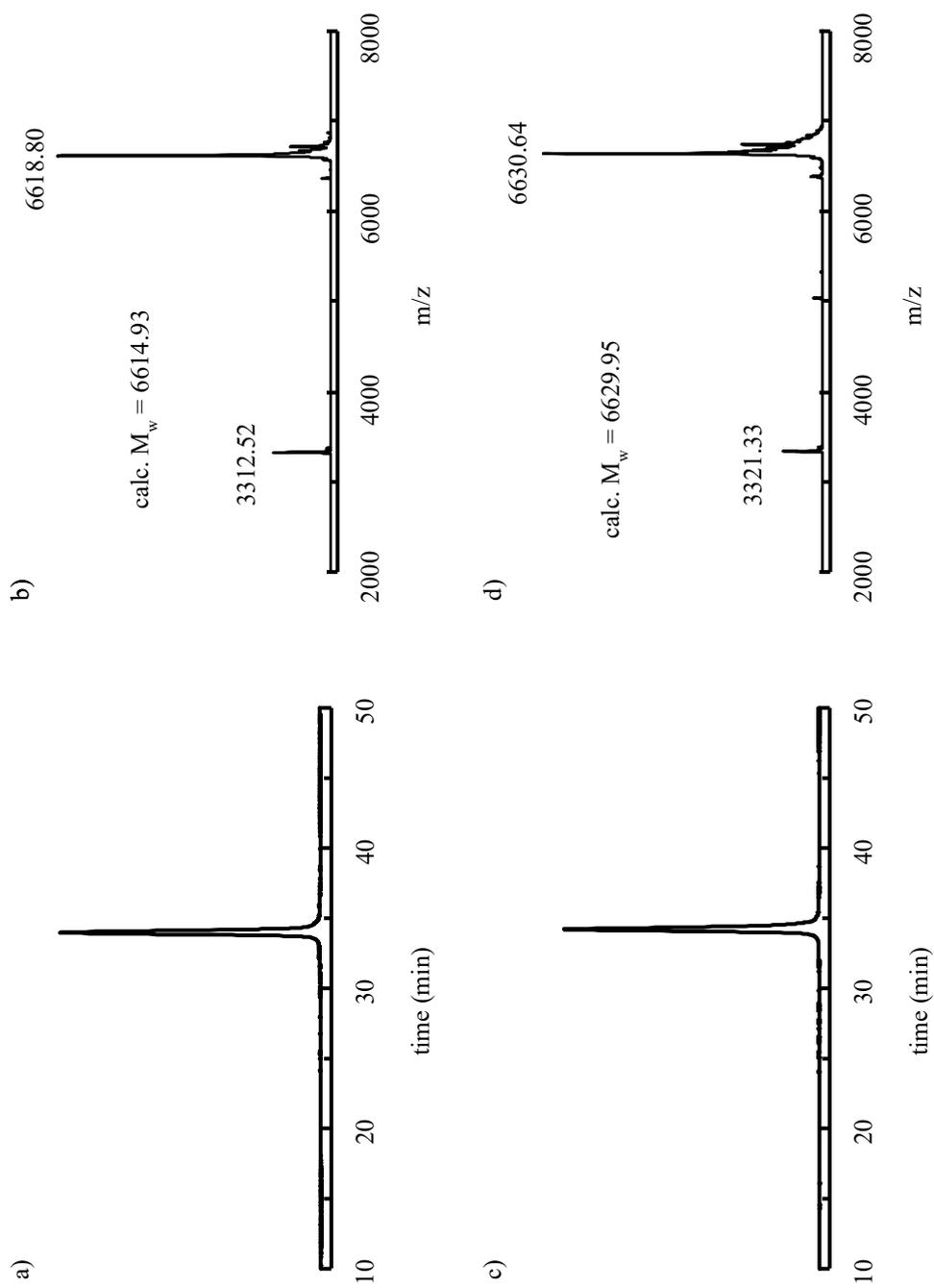


Fig. 5-1 精製後の a), b) *i*-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM および c), d) *i*-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM のクロマトグラムならびに TOF-MS スペクトル。  
 Conditions: a) ODS-3 column (4.6 × 250 mm, GL Science), 35°C, 1 mL/min, A: 0.1% TFA in 5% ACN/Milli-Q, B: 0.1% TFA in 5% Milli-Q/ACN, λ = 260 nm, A-B の 1 %/min linear gradient. b) CHCA in DMSO, LP\_3-20 kDa.

b) Cell Counting Kit-8 を用いた i-PPc(R<sub>9</sub>) による各膵臓腺がん細胞の塩基配列依存的な細胞死評価

I-PPc(R<sub>9</sub>) による各膵臓腺がん細胞の塩基配列依存的な細胞死評価目的として、所定濃度 (10, 1, 0.1, 0.01 μM) の i-PPc(R<sub>9</sub>) 溶液を BxPC-3 細胞 (WT) および PANC-1 細胞 (MT) に添加し 3 日培養後の細胞生存率を算出した。

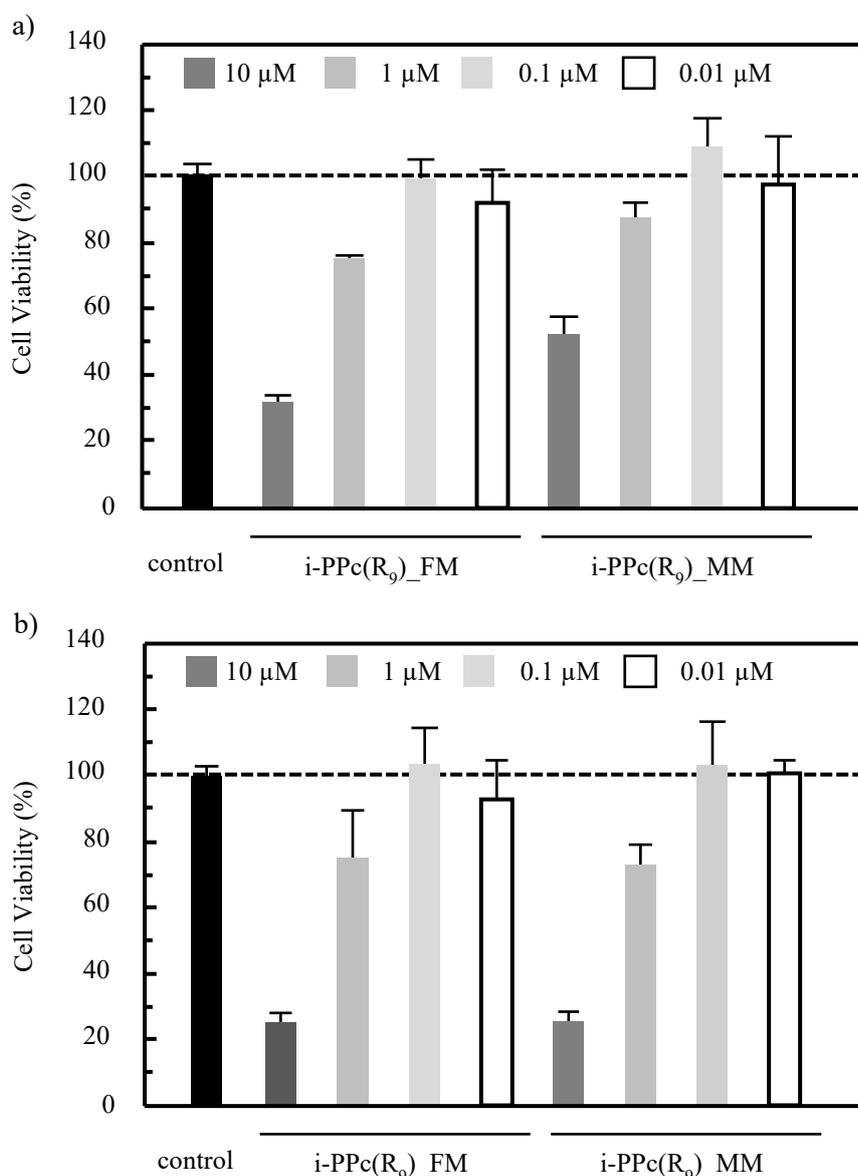


Fig. 5-2 所定濃度 i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込ませた a) BxPC-3 細胞および b) PANC-1 細胞の細胞生存率。

Conditions: 2500 cell/well, [i-PPc(R<sub>9</sub>)] = 10, 1, 0.1, 0.01 μM, 培養日数 3 日, WST-8 assay, λ = 450 nm.

0.1 μM および 0.01 μM i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM, MM を添加された BxPC-3 細胞の生存率は、91.8 - 109% と算出され細胞死は観測されなかった。一方で、10 μM および 1 μM i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込んだ BxPC-3 細胞の生存率は、FM でそれぞれ 32.0% および 75.2%, MM では 47.8% および 12.8% と見積もられたことから、i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM を添加した BxPC-3 細胞において優位な細胞死が観測された (Fig. 5-2 a)。これは i-PPc(R<sub>9</sub>) が BxPC-3 細胞内において 1 塩基の違いを認識し KRAS 遺

伝子の発現を抑制していることを示す。

これに対し、PANC-1 細胞の生存率を評価した結果 (Fig. 5-2 b), BxPC-3 細胞と同様に 0.1  $\mu\text{M}$  および 0.01  $\mu\text{M}$  i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込んだ PANC-1 細胞に顕著な細胞死は観測されなかった。一方で、10  $\mu\text{M}$  i-PPc(R<sub>9</sub>) では 74.6%程度の細胞死が観測された。これは PANC-1 細胞にとって 10  $\mu\text{M}$  i-PPc(R<sub>9</sub>) の濃度が高く、i-PPc(R<sub>9</sub>) 自体が細胞毒性を示したと推察される。また 1  $\mu\text{M}$  i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM では 24.4%, i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM では 26.4%と見積られ、i-PPc(R<sub>9</sub>) の塩基配列に依存した細胞死は観測されなかった。この原因として、本実験では 10% FBS 含有 RPMI-1640 培地中で行っているため PANC-1 細胞が死にくい環境にあることや血清による i-PPc(R<sub>9</sub>) の取り込みが阻害されたことにより PANC-1 細胞の細胞死の差が顕著に表れなかったことが推察される。このため FBS 濃度を減少させても細胞増殖が観測された 3% FBS 含有 RPMI-1640 培地中での細胞死評価を行うことにした (Supplementary data).

#### c) 3% FBS 含有 RPMI-1640 培地中での i-PPc(R<sub>9</sub>) による PANC-1 細胞の細胞死評価

3% FBS 含有 RPMI-1640 培地中で PANC-1 細胞に 1  $\mu\text{M}$  i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込ませた後、4 日間培養した際の細胞死評価を行った (Cell counting Kit-8) 結果、i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM では細胞死亡率は 29.4%, i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM では 37.2%と見積もられ、僅かではあるが i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM で優位な細胞死が観測された (Fig. 5-3)。この結果は、細胞の誘導死において FBS 濃度が重要であることを意味している。一方で、Cell Counting Kit-8 の感度が低い (コンフルエントな状態の PANC-1 細胞でも A<sub>450</sub>=0.7 程度と、BxPC-3 細胞と比較すると極めて低い NADH 活性である (Supplementary data)) ことも問題であった。このため i-PPc(R<sub>9</sub>) による細胞死が正確に評価できていない可能性が考えられたため、より顕著な細胞死の観測を目的として 1  $\mu\text{M}$  または 3  $\mu\text{M}$  i-PPc(R<sub>9</sub>) を 3% FBS in RPMI-1640 培地中で取り込ませ所定時間培養後の各膵臓腺がん細胞の細胞死をルミノアッセイにより評価することにした。

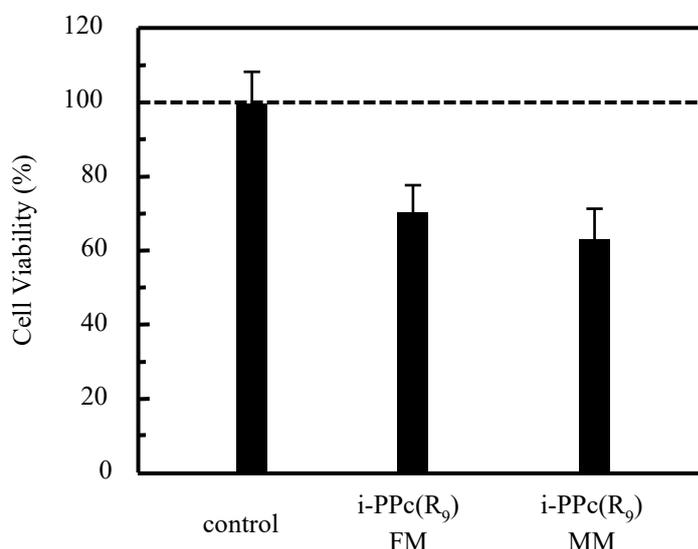


Fig. 5-3 i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込ませ 4 日培養後の PANC-1 細胞の細胞生存率。  
Conditions: 細胞数 2500 cell/well, [i-PPc(R<sub>9</sub>)] = 1  $\mu\text{M}$ , 培養日数 4 日, WST-8 assay ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ).

#### d) Luminescence assay を用いた i-PPc(R<sub>9</sub>) による各膵臓腺がん細胞の細胞死評価

##### d)-1 接着した細胞に対し i-PPc(R<sub>9</sub>) を添加する方法

播種した BxPC-3 細胞に 3  $\mu\text{M}$  あるいは 1  $\mu\text{M}$  i-PPc(R<sub>9</sub>) を添加し、1 日間と 4 日間培養した後の細胞の生存をルミノアッセイにより評価した。この結果、いずれの濃度においても i-

PPc(R<sub>9</sub>)\_MM 添加時と比較すると i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM 添加した場合において有意な細胞死が誘導されることがわかった (Fig. 5-4). 特に 3 μM i-PPc(R<sub>9</sub>) を添加した際の 4 日培養後の BxPC-3 細胞の死亡率は、i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM を取り込んだ細胞で 44.7%, i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM で 6.3%と、1 μM 添加時よりも顕著に細胞死が誘導されることが示された (Fig. 5-4). 以上より、いずれの濃度においても、i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM 添加時は培養時間の増加に伴い優位な細胞死がみられ、塩基配列に依存した細胞死を誘導することが示された.

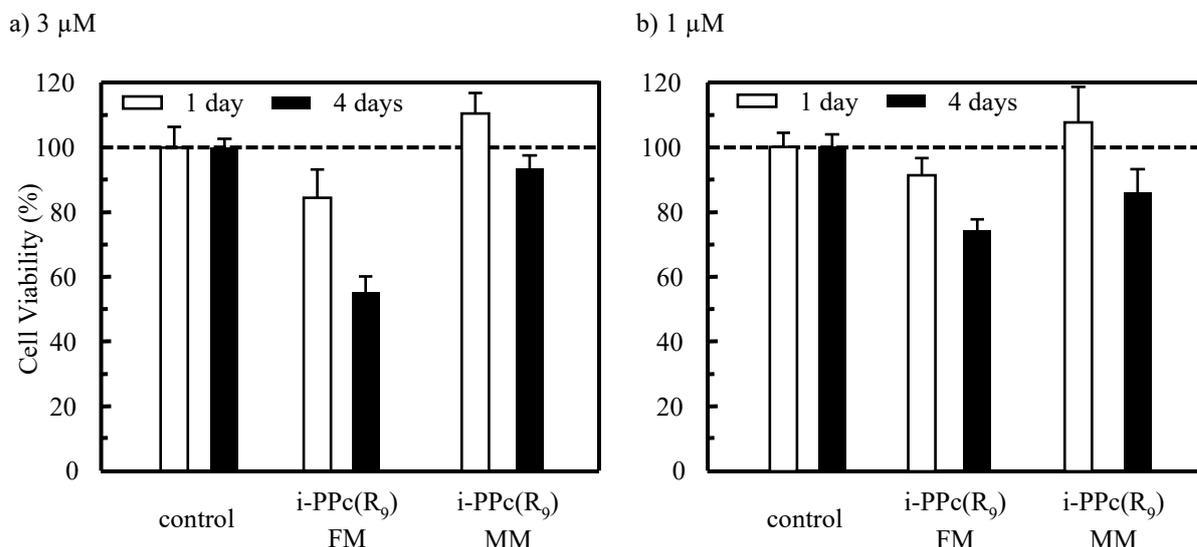


Fig. 5-4 a) 3 μM および b) 1 μM i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込ませ 1 日または 4 日間培養後の BxPC-3 細胞の生存率.

Conditions: 細胞数 2500 cell/well, [i-PPc(R<sub>9</sub>)] = 3, 1 μM, 培地 3% FBS, × 1 penicillin-streptomycin in RPMI-1640 培地, 培養日数 1 day, 4days, Luminescence assay (CellTiter-Glo2 cell viability assay, temp.: 25°C, attenuation: none, integration time: 5000 s, settle time: 0 ms).

一方で、PANC-1 細胞では、3 μM i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込んで 4 日培養後の塩基配列に関係なく 80%程度の細胞死亡率が算出され PANC-1 細胞に対して高い毒性を示した (Fig. 5-5 a). また、1 μM i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込ませて 4 日培養後の PANC-1 細胞の細胞死亡率は i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM で 50.5%, i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM で 40.2%と見積もられ、i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM で優位な細胞死は観測されなかった (Fig. 5-5 b). この原因は、i-PPc(R<sub>9</sub>) のグアノジノ基と 96 well plate 表面のコラーゲン (-SO<sub>4</sub>基) の静電的相互作用が原因でプレートに吸着し、分散して接着・増殖する PANC-1 細胞に取り込まれる量が安定しないことに起因すると推察された. このため、以降は PCR チューブ内の非接着状態の膵臓腺がん細胞に i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込ませた後に播種するプロトコルで細胞死評価を行った.

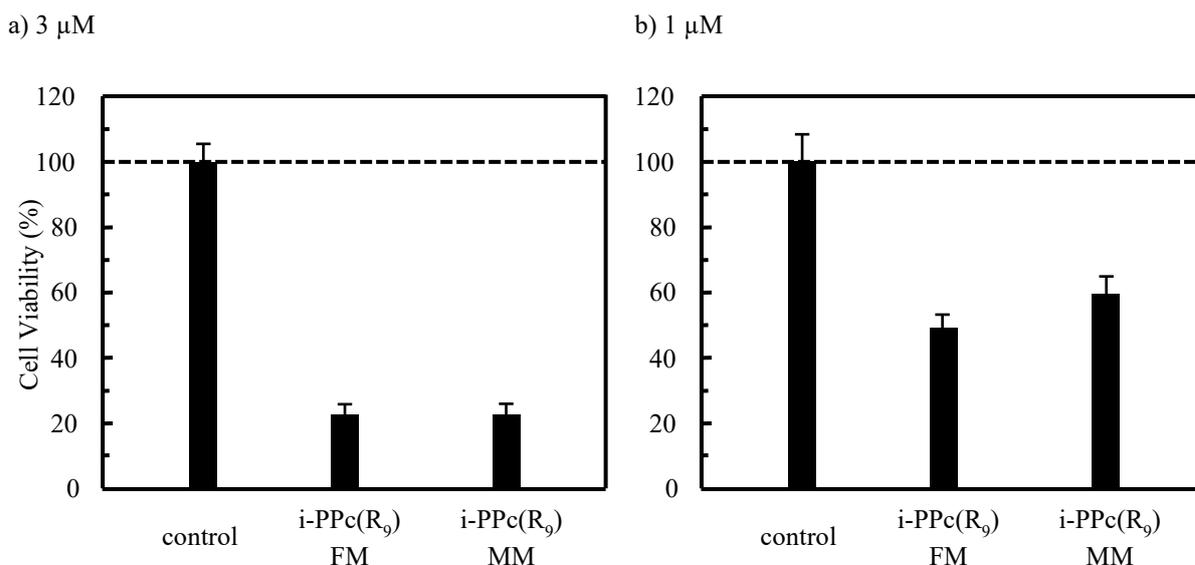


Fig. 5-5 a) 3 μM および b) 1 μM i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込ませ 4 日間培養後の PANC-1 細胞の生存率. Conditions: 細胞数 2500 cell/well, [i-PPc(R<sub>9</sub>)] = 3, 1 μM, 培地 3% FBS, × 1 penicillin-streptomycin in RPMI-1640 培地, 培養日数 4days, Luminescence assay (CellTiter-Glo cell viability assay, temp.: 25°C, attenuation: none, integration time: 5000 s, settle time: 0 ms).

#### d)-2 浮遊状態の細胞に対して i-PPc(R<sub>9</sub>) を添加する方法

各臓器がん細胞の細胞懸濁液に対し 1 μM i-PPc(R<sub>9</sub>) を添加し 4 日培養後の細胞生存率をルミノアッセイにより評価した (Fig. 5-6). この結果, 1 μM i-PPc(R<sub>9</sub>)<sub>FM</sub> を添加した BxPC-3 細胞では 14.7%, i-PPc(R<sub>9</sub>)<sub>MM</sub> を添加した場合には 3.8%と見積もられ, このプロトコルにおいても塩基配列依存的に細胞死が誘導されることがわかった. この際, 本プロトコルで標準偏差が高い原因は, PCR チューブ内では BxPC-3 細胞は生存できないため (Supplementary data), 細胞の生存状態に起因することが推察される.

一方で, PANC-1 細胞に対し同濃度の 1 μM i-PPc(R<sub>9</sub>)<sub>FM</sub> を添加した際の細胞死亡率は 31.1%, i-PPc(R<sub>9</sub>)<sub>MM</sub> では 24.4%と, i-PPc(R<sub>9</sub>)<sub>MM</sub> による優位な細胞死誘導は観測されなかった. この原因は i-PPc(R<sub>9</sub>) は 1 塩基認識能が低下しており (i-PPc(R<sub>9</sub>)<sub>FM</sub>/synDNA: T<sub>m</sub> = 46.8°C, i-PPc(R<sub>9</sub>)<sub>MM</sub>/synDNA: T<sub>m</sub> = 46.0°C, supplementary data), PANC-1 細胞内で 1 塩基変異を認識できないことに起因すると推察した. しかし, i-PPc(R<sub>9</sub>) が BxPC-3 細胞内では 1 塩基の違いを認識でき, PANC-1 細胞内では認識できない原因については詳細には不明である. このため細胞内でより高度に 1 塩基変異を認識できる分子設計が必要であると考えられる.

以上より, 浮遊状態の BxPC-3 細胞において i-PPc(R<sub>9</sub>) は 1 塩基の違いを認識して KRAS 遺伝子の発現を抑制することができたが, PANC-1 細胞内では 1 塩基変異を認識することができなかった.

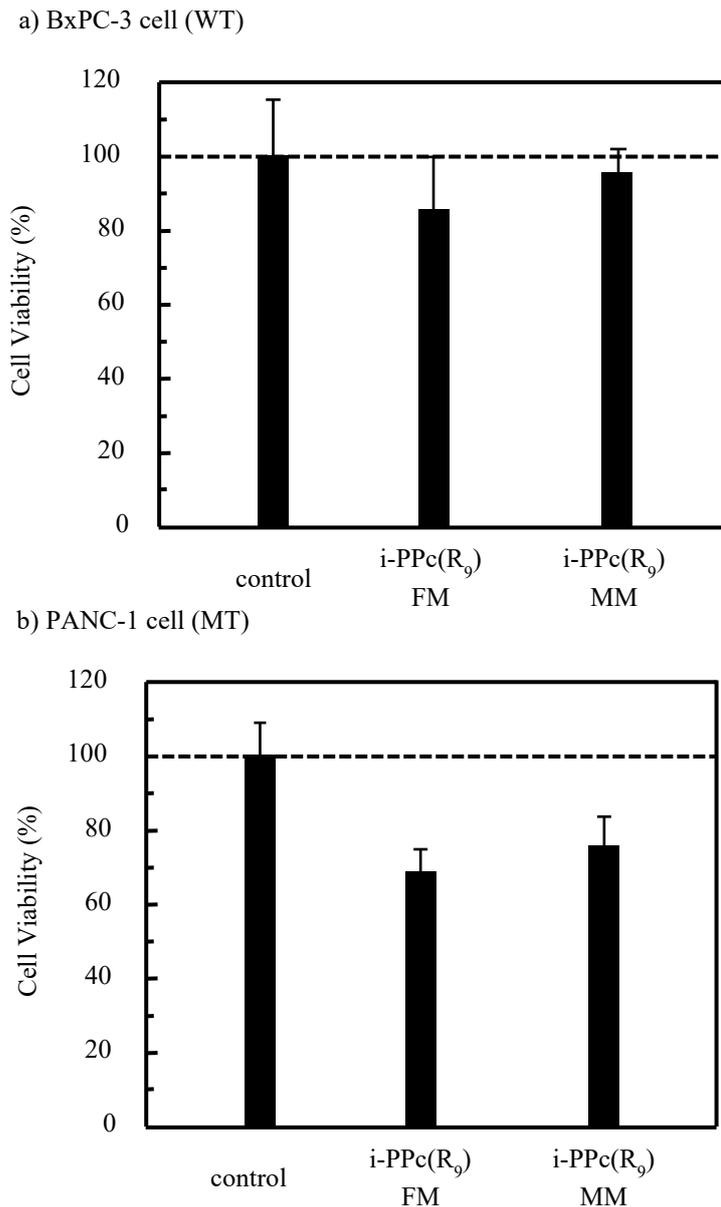


Fig. 5-6 a) BxPC-3 と b) PANC-1 細胞に 1  $\mu$ M i-PPc(R<sub>9</sub>) を取り込ませ 4days 培養後の膵臓腺癌細胞の生存率.

Conditions: 細胞数 2500 cell/well, [i-PPc(R<sub>9</sub>)] = 1  $\mu$ M, 培地 3% FBS,  $\times$  1 penicillin-streptomycin in RPMI-1640 培地, 培養日数 4days, Luminescence assay (CellTiter-Glo cell viability assay, temp.: 25°C, attenuation: none, integration time: 5000 s, settle time: 0 ms).

### 5-3-5. まとめ

本項では、膵臓腺がん細胞の野生型 KRAS 遺伝子および 1 塩基変異型 KRA 遺伝子を標的とした 2 種の i-PPc(R<sub>9</sub>) を Fmoc 固相合成により合成し、KRAS 遺伝子の塩基配列的な発現抑制に伴う各膵臓腺がん細胞の細胞死を WST-8 assay およびルミノアッセイにより評価した。その結果、接着状態および浮遊状態の BxPC-3 細胞 (WT) において塩基配列依存的な細胞死が誘導され、i-PPc(R<sub>9</sub>) が BxPC-3 細胞内で 1 塩基を認識した遺伝子発現抑制効果を示すことがわかった。一方で PANC-1 細胞では塩基配列依存的な細胞死は誘導されなかった。

## 5-4. 細胞内遊離型 i-PPc を用いた膵臓腺がん細胞の塩基配列依存的な細胞死評価

### 5-4-1. はじめに

これまでの研究で、サイトゾルへの輸送を目的として設計された i-PPc(R<sub>9</sub>) の 1 塩基変異の認識能が細胞内で低下する可能性が提示された。これは R<sub>9</sub> のグアノジノ基と mRNA のリン酸基の静電的相互作用による i-PPc/mRNA の相補鎖の安定化が原因と推察された。そこで細胞内に導入後、R<sub>9</sub> と i-PPc が分離する新たな分子設計を施すことで、i-PPc の 1 塩基認識能が維持できると考えられる。

本稿では、リソソーム内システインプロテアーゼ (Cathepsin B) により切断される protease sensitive linker (GFLG ペプチド)<sup>1)</sup> を R<sub>9</sub> と i-PPc の間に導入することで、細胞内で i-PPc が単独で存在する新たな R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を設計した (Fig. 5-7)。Cathepsin B はオートファジーや免疫応答に関与する一方で、がんの浸潤や転移に関与するプロテアーゼであり、がん細胞において過剰発現している<sup>2), 3)</sup>。この他にも Cathepsin B の発現を抑制することにより腫瘍の成長が抑制されるためがん治療薬の標的としても注目されている<sup>2)</sup>。

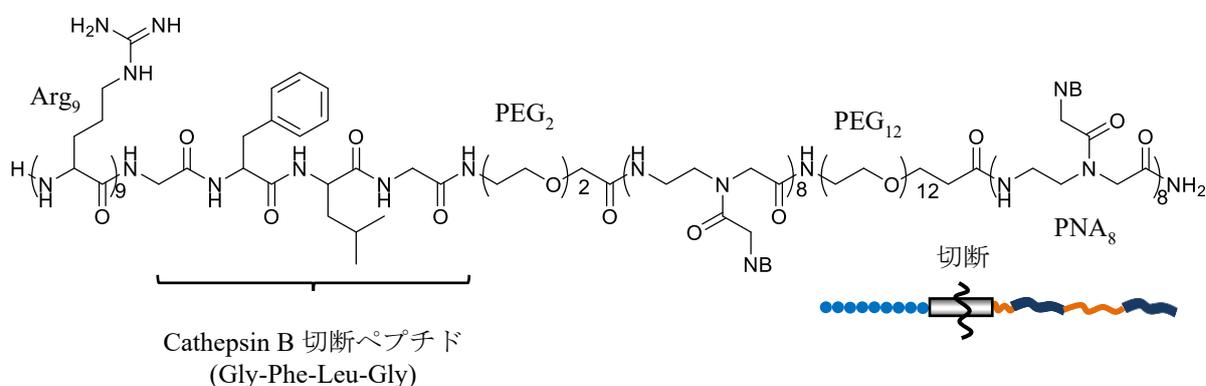


Fig. 5-7 R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc の化学構造とイラスト。

本項では、がん細胞内における GFLG ペプチド部の切断挙動を確認することを目的として fluorescence resonance energy transfer (FRET) を誘起するモデルペプチドを合成し、HeLa 細胞内における GFLG ペプチドの切断を確認した。その後、R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を合成し 2 種の膵臓腺がん細胞の塩基配列依存的な細胞死誘導および KRAS 遺伝子の発現抑制により引き起こされるアポトーシスについて検討した。

### 5-4-2. 試薬

- i-PPc 合成試薬は 2-2-2., ペプチド合成試薬は 3-3-2. に準じる.
- 4-dimethylaminoazobenzen-4'-carboxylic acid (Dabcyl) 東京化成
- D-MEM (high glucose, with HEPES) Wako
- RPMI-1640 (with HEPES) Wako
- 0.05%(w/v) trypsin-0.53 mmol/L EDTA・4 Na sol. Wako
- 0.25%(w/v) trypsin sol. Wako
- CellTiter-Glo2<sup>®</sup> Cell Viability assay Promega
- × 1 Glo Lysis buffer Promega
- RealTime-Glo<sup>™</sup> MT Cell Viability assay Promega
- RealTime-Glo<sup>™</sup> Annexin V Apoptosis and Necrosis assay Promega

- 1 mg/mL Calcein-AM in DMSO DOJINDO
- 1 mg/mL Propidium Iodide (PI) in H<sub>2</sub>O DOJINDO
- Hoechst33342 Invitrogen Molecular Probes
- × 1 Live cell imaging solution Invitrogen Molecular Probes

### 5-4-3. 実験操作

#### a) モデルペプチドの Fmoc 固相合成

設計したモデルペプチド (Fig. 5-8) のアミノ酸配列を以下に示した.

Model peptide: N'-Dabcyl-PEG<sub>2</sub>-GFLG-PEG<sub>2</sub>-K(5-FAM)-PEG<sub>2</sub>-R<sub>9</sub>-NH<sub>2</sub>-C'

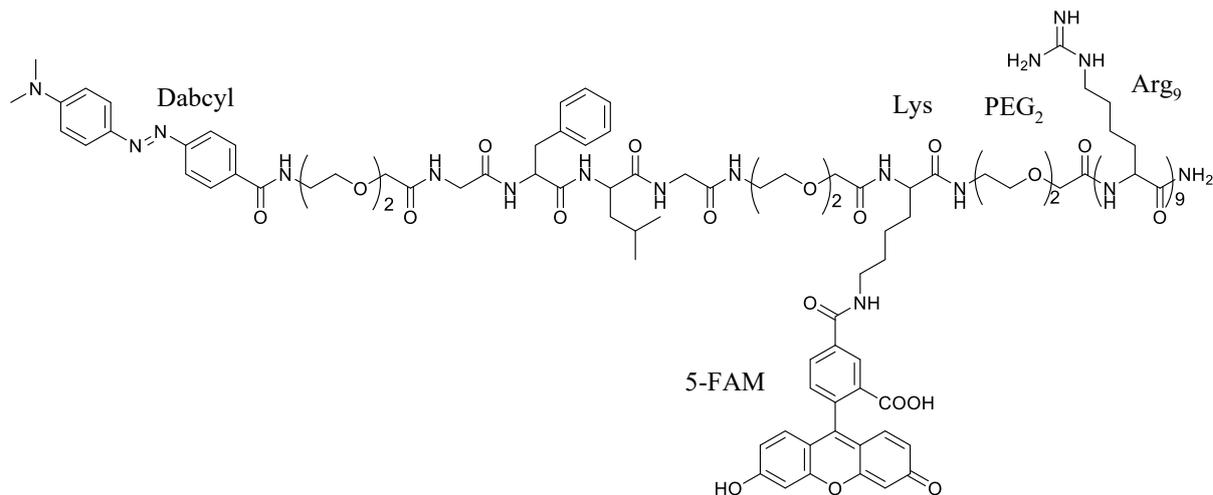


Fig. 5-8 Dabcyl-PEG<sub>2</sub>-GFLG-PEG<sub>2</sub>-K(5-FAM)-PEG<sub>2</sub>-R<sub>9</sub>-NH<sub>2</sub> の化学構造.

Table 5-3 の条件でモデルペプチドを Fmoc 固相合成した.

切り出し後の粗晶を Et<sub>2</sub>O を用いて回収し DMSO に溶解させた後凍結乾燥した. 得られた粗晶の HPLC 測定より純度を, TOF-MS 測定により質量を測定して同定した.

Table 5-3 モデルペプチドの Fmoc 固相合成条件.

過程	試薬	反応条件
膨潤 縮合	Nova PEG rink amide resin LL	75°C, 10 min
Fmoc-Amino acid-OH		
Fmoc-Lys(5-FAM)-OH	DIC / oxyma (4 eq.)	75°C, 6 min
Dabcyl-OH		
Fmoc-8-Adox-OH	HATU (4 eq.) / DIPEA (8 eq.)	75°C, 6 min
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	HATU (4 eq.) / DIPEA (8 eq.)	r. t., 30 min × 2
アセチル化	lutidine/acetic acid anhydride/NMP = 6/5/89	r. t., 1 min
脱保護	20% piperidine in NMP	r. t., 3, 10 min
切り出し	TFA/TIS/Milli-Q = 95/2.5/2.5	氷中: 2 hours, r. t.: 30 min

#### b) モデルペプチドの細胞毒性評価

ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞を 2500 cells/well となるように 96 well plate に播種し, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下 37°C で 1 日前培養した. 52.1 mM モデルペプチドを所定量の DMSO で希釈後, 3% FBS 含有 D-MEM と混合し 4.10-130 μM を調整した. 既存の培地を除去した後, 所定のウェルに 100 μL ずつ添加し 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 24 時間培養した.

24 時間培養後に既存の培地を除去し Glo Lysis buffer 100 μL を 6 sec おきに添加して 5 min 室

温で静置した。その後 CellTiter-Glo2 100  $\mu$ L を 6 sec おきに添加し室温で 10 分間反応させ、150  $\mu$ L を白色プレートに移し発光量を測定した。それぞれの濃度のモデルペプチドを取り込んだ HeLa 細胞の生存率は、モデルペプチドを添加していないウェルの発光量でノーマライズし算出した。

測定条件; mode: luminescence, shaking (linear): 30 s.

#### c) HeLa 細胞内における GFLG ペプチドの切断評価

HeLa 細胞を 96 well plate に播種 (2500 cells/well) し、24 時間前培養した。52.1 mM モデルペプチドを DMSO および 3% FBS in D-MEM で希釈し、8.2  $\mu$ M モデルペプチド in 3% FBS/D-MEM を調整した。既存の培地を除去した後、所定のウェルに 100  $\mu$ L ずつ添加し 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で培養し、経時的に 5-FAM 由来の緑色蛍光をマイクロプレートリーダーで測定した。

測定条件; mode: fluorescence bottom reading (optimal read), shaking (orbital): 20 s,  $\lambda_{ex}$  = 485 nm,  $\lambda_{em}$  = 535 nm, gain 50.

#### d) 蛍光顕微鏡観察による GFLG ペプチドの切断評価

c) と同条件でモデルペプチドを取り込ませてから 78 時間後の HeLa 細胞に対して、既存の培地を除去し Live cell imaging solution で 1 回洗浄後、1 mg/mL PI in H<sub>2</sub>O 10  $\mu$ L と 1 mg/mL Hoechst33342 in Milli-Q 6  $\mu$ L を添加し 5 min 静置した。その後、Live cell imaging solution で洗浄後の HeLa 細胞を蛍光顕微鏡で観察した。

#### e) R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc の Fmoc 固相合成

以下に示した各 KRAS 遺伝子に相補的な R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を先述した Table 3-1 に従い Fmoc 固相合成した。

R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_FM: Arg<sub>9</sub>-Gly-Gly-Phe-Leu-Gly-PEG<sub>2</sub>-CACCAGCT-PEG<sub>12</sub>-AGTTTATA-NH<sub>2</sub>

R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_MM: Arg<sub>9</sub>-Gly-Gly-Phe-Leu-Gly-PEG<sub>2</sub>-CATCAGCT-PEG<sub>12</sub>-AGTTTATA-NH<sub>2</sub>

得られた粗晶の各 R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc の HPLC 測定より純度を、TOF-MS 測定により質量を測定して同定した。

#### f) PCR チューブ内における細胞死評価

10% FBS,  $\times$  1 penicillin-streptomycin in RPMI-1640 中で継代培養した BxPC-3 細胞 (WT) および PANC-1 細胞 (MT) を 3% FBS,  $\times$  1 penicillin-streptomycin in RPMI-1640 中で 2500 cells/tube となるように 100  $\mu$ L ずつ PCR チューブに分注した。その後、各 KRAS 遺伝子に相補的な R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を 10  $\mu$ L (終濃度 1  $\mu$ M) 添加し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で所定時間培養した。所定時間培養後に細胞懸濁液 100  $\mu$ L を白色 96 well plate に移し、CellTiter-Glo sol. 100  $\mu$ L を加え 25°C で 10 min 静置し発光量を測定した。得られた発光量から生存率を算出することにより評価した。

測定条件; mode: luminescence, temp.: 25°C, attenuation: none, integration: 5000 ms, settle time: 0 ms.

g) ATP 定量法による細胞死評価

10% FBS 含有 RPMI-1640 培地で継代培養した各臓器がん細胞を白色 96 well plate に 2500 cells/well となるように 100  $\mu$ L ずつ播種し 24 時間前培養した。培養後に培地を除去し、3  $\mu$ M R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc in 3% FBS/RPMI-1640 を所定のレーンに添加し 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で所定時間培養した。所定時間培養後に既存の培地を除去し、GloLysis buffer 50  $\mu$ L を測定順かつ 6 sec おきに加え室温で 5 min 静置した。CellTiter-Glo2 sol. 50  $\mu$ L を勢いよく測定順かつ 6 sec おきに加え 25°C で 10 分間反応させた後の発光量を測定した。Control の生存率を 100%として発光量をノーマライズし算出した。

測定条件; mode: luminescence, shaking: orbital, duration: 30 s, amplitude: 2 mm, attenuation: none, integration time: 5000 ms, settle time: 0 ms.

h) 還元酵素活性を利用した細胞死評価

10% FBS 含有 RPMI-1640 培地で継代培養した PANC-1 細胞を白色 96 well plate に 2500 cells/well となるように 100  $\mu$ L ずつ播種した。一方で RealTime-Glo™ MT Cell Viability assay Kit の説明書に従い 3% FBS in RPMI-1640 培地 1 mL に NanoLuc enzyme 6.0  $\mu$ L と substrate 6.0  $\mu$ L を混合した後、さらに 3% FBS in RPMI-1640 培地を 1 mL 添加しゆっくりとピペティングした (Realtime-Glo reagents)。所定のレーンに Realtime-Glo reagents を 100  $\mu$ L ずつ添加した (0.3  $\mu$ L Realtime-Glo / 200  $\mu$ L 3% FBS in RPMI-1640)。その後 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 24 hours 前培養した。所定濃度の R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を 3% FBS in RPMI-1640 培地で希釈し 60  $\mu$ M R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc in 3% FBS/RPMI-1640 を調整した。これを所定のウェルに 10  $\mu$ L ずつ添加し所定時間培養した。所定時間培養後にインキュベーターから取り出しマイクロプレートリーダーに移し以下の条件で発光量を測定した。

測定条件; mode: luminescence, temp.: 37°C, wait: 5 min, shaking: orbital, duration: 30 sec, amplitude: 2mm, attenuation: none, integration time: 5000 ms, settle time: 0 ms.

i) 細胞観察による細胞死評価

所定のウェルに 3% FBS in RPMI-1640 培地 100  $\mu$ L を入れた。その後、継代培養した各臓器がん細胞を 3% FBS in RPMI-1640 培地中で 2500 cells/well となるように 100  $\mu$ L 播種し 24 時間前培養した (2500 cells / 200  $\mu$ L 培地)。60  $\mu$ M R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc in 3% FBS/RPMI-1640 を調整し、所定のウェルに 10  $\mu$ L ずつ添加し軽く攪拌後、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下 37°C で培養した。

3% FBS in RPMI-1640 培地 1000  $\mu$ L に 1 mg/mL Hoechst33342 (6  $\mu$ L), 1 mg/mL Calcein-AM (3  $\mu$ L), 1 mg/mL PI (12  $\mu$ L) を混合し、その混合液 10  $\mu$ L を添加し 37°C で 30 min 静置した。その後蛍光顕微鏡を用いて細胞の状態を観察した。細胞死亡率は、Hoechst33342 で染色された細胞数および PI 染色された細胞数を Image J を用いてセルカウントした後、Hochst33342 染色された細胞当たりの PI 染色された細胞により算出した。

j) アポトーシスおよびネクローシス評価

10% FBS in RPMI-1640 培地中 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で継代培養した各臓器がん細胞を白色 96 well plate に 3% FBS in RPMI-1640 培地中で 2500 cells/well となるように 90  $\mu$ L ずつ播種し

24 時間前培養した。所定濃度の各 R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を 3% FBS in RPMI-1640 培地で希釈し 30 μM R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を調整した。その後 10 μL ずつ所定のウェルに添加し所定時間培養した (final conc. 3 μM R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc)。所定時間培養後に RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis assay Kit 内の各試薬を所定量ずつ 3% FBS in RPMI-1640 培地中で混合し調整した試薬を 100 μL ずつ測定するウェルに添加し 1 hour おきに発光量および蛍光を測定した。

共通の条件; temp.: 37°C, shaking: orbital, duration: 30 s, amplitude: 2 mm.

発光測定条件; mode: luminescence, attenuation: none, integration time: 5000 ms, settle time: 0 ms.

蛍光測定条件; mode: fluorescence bottom reading, optimal read, λ<sub>ex</sub> = 485 nm, λ<sub>em</sub> = 535 nm, gain: 70, number of flashes: 28 (4 × 7 flashes per well), integration time: 20 μs, lag time: 0 μs, settle time: 0 ms.

#### 5-4-4. 結果および考察

##### a) モデルペプチドの合成

GFLG ペプチドの切断挙動の確認を目的として、分子内 FRET を誘起するモデルペプチドを合成した。HPLC 測定および TOF-MS スペクトル測定の結果、を Fig. 5-9 に示した。

HPLC 測定では R<sub>t</sub> = 27.3 min にメインピーク、TOF-MS スペクトルでは m/z = 2970.22 (calc. M<sub>w</sub> = 2970.39) にメインピークが観測され、目的のモデルペプチドが 75.6%の純度で得られたことがわかった。また、蛍光検出器 (λ<sub>ex</sub> = 494 nm, λ<sub>em</sub> = 518 nm) を用いた HPLC 測定ではメインピーク (R<sub>t</sub> = 27.4 min) の蛍光強度が減少しており、5-FAM と Dabcyl 間の分子内 FRET が誘起されていることがわかった (Fig. 5-9 b)。以降は、このモデルペプチドを用いて細胞毒性および HeLa 細胞内での GFLG ペプチドの切断挙動を評価した。

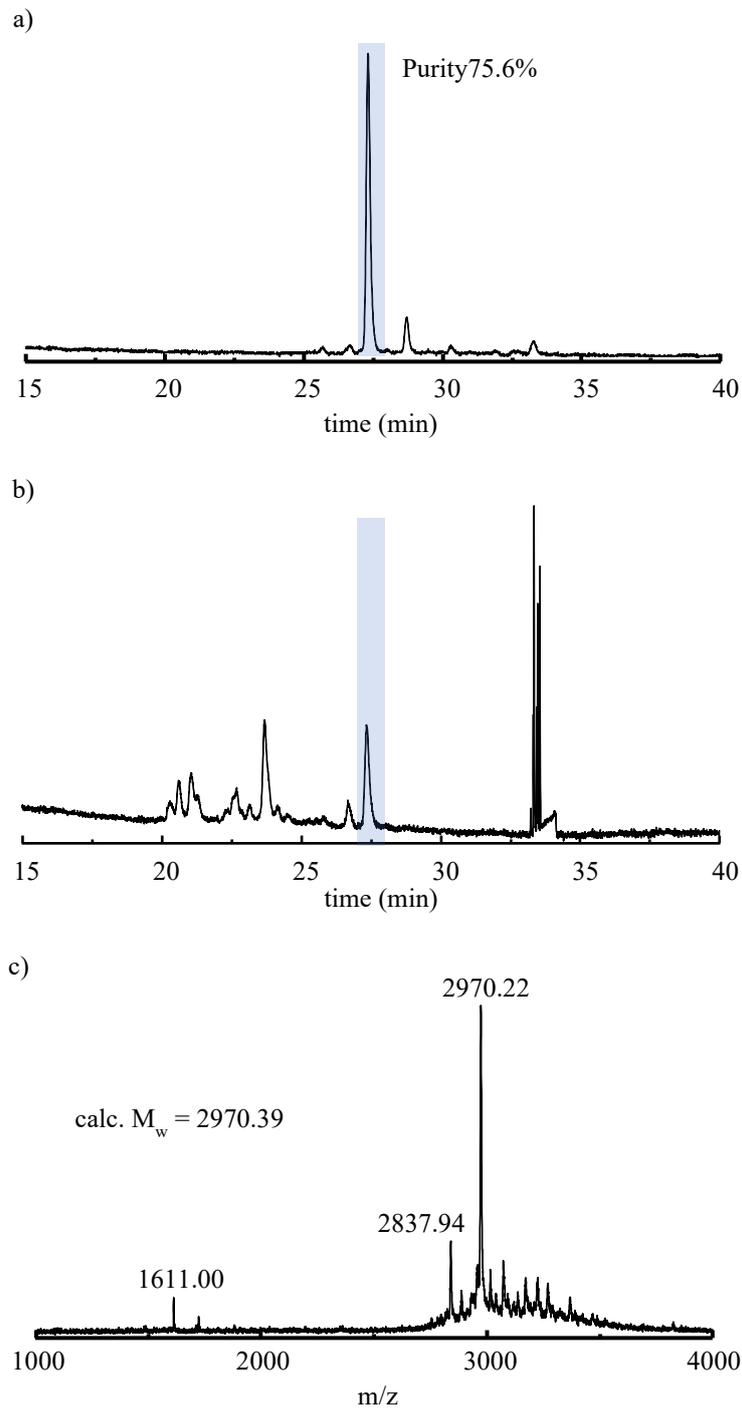


Fig. 5-9 モデルペプチドの a), b) クロマトグラムならびに TOF-MS スペクトル. Conditions: a), b) ODS-3 column ( $4.6 \times 250$  mm, GL Science),  $35^\circ\text{C}$ , 1 mL/min, **A**: 0.1% TFA in 5% ACN/Milli-Q, **B**: 0.1% TFA in 5% Milli-Q/ACN, a)  $\lambda = 490$  nm, b)  $\lambda_{\text{ex}} = 494$  nm,  $\lambda_{\text{em}} = 518$  nm **A-B** 3 %/min linear gradient. c) CHCA in DMSO, LP\_1-3 kDa.

## b) モデルペプチドの細胞毒性評価

HeLa 細胞へのモデルペプチドの毒性を評価した結果、 $IC_{50}$  値は  $18.4 \mu\text{M}$  と算出された (Fig. 5-10). この結果を基に、HeLa 細胞内での GFLG ペプチドの切断評価は、 $IC_{50}$  値よりも低い濃度 ( $8.20 \mu\text{M}$ ) で行うことにした.

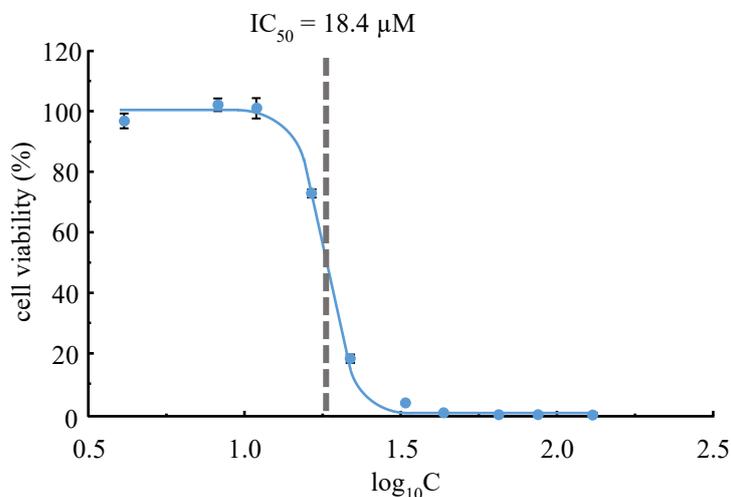


Fig. 5-10 所定濃度のモデルペプチドを取り込んで 24 hours 培養後の HeLa 細胞の生存率.

## c) HeLa 細胞内における GFLG ペプチドの切断評価

本実験で設計したモデルペプチドは、donor fluorophore に 5-FAM, acceptor fluorophore に Dabcyl (quencher) を用いており、GFLG ペプチドの切断前では 5-FAM 由来の蛍光は Dabcyl により消光される. 一方で細胞内の Cathepsin B により GFLG ペプチドが切断され、5-FAM と Dabcyl の分子間の距離が遠くなると 5-FAM 由来の蛍光が回復するという原理を利用している (Fig. 5-11). このためモデルペプチドを HeLa 細胞に取り込ませて所定時間培養後の細胞内の蛍光を測定することにより GFLG ペプチドの切断を評価した.

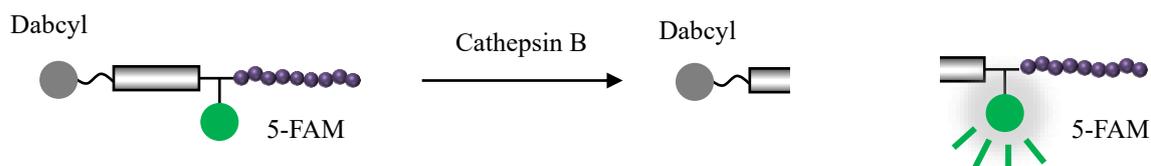


Fig. 5-11 設計したモデルペプチドにおける FRET の原理.

蛍光強度を測定した結果、培養時間の増加に伴い 5-FAM 由来の蛍光が増加した (Fig. 5-12). これは HeLa 細胞内で GFLG ペプチドが切断され 5-FAM 由来の蛍光が回復したことを示す. この GFLG ペプチドが HeLa 細胞内で切断されていることを確認することを目的として顕微鏡観察を行うことにした.

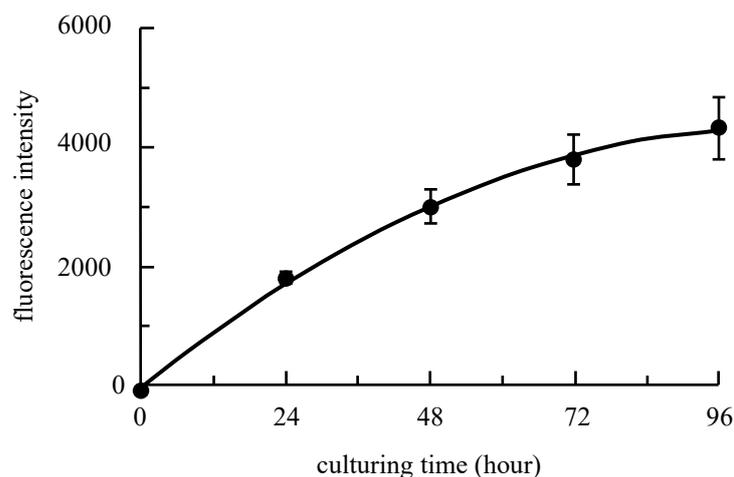


Fig. 5-12 モデルペプチドを HeLa 細胞に取り込ませて所定時間培養後の蛍光強度.  
Conditions: 細胞数 2500 cells/well, [model peptide] = 8.2  $\mu$ M, fluorescence,  $\lambda_{ex}$  = 485 nm,  $\lambda_{em}$  = 535 nm, gain 50.

#### d) 蛍光顕微鏡観察による GFLG ペプチドの切断評価

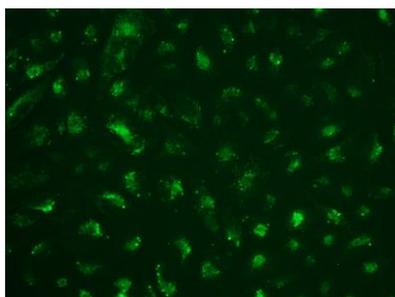
8.2  $\mu$ M モデルペプチドを 3% FBS in D-MEM 中で HeLa 細胞に添加し 78 hours 培養後の細胞の状態を蛍光顕微鏡により観察した. 蛍光顕微鏡像より, 5-FMA 由来の緑色蛍光が細胞内で観測され, 死細胞の DNA にインベージョンする PI 由来の赤色蛍光はほとんどみられなかったことから, モデルペプチドが細胞内に取り込まれた後 GFLG ペプチドが切断されたことが示された (Fig. 5-13 b, c). 切断されたモデルペプチドは細胞内に点在しており, マクロピノソームあるいはリソソーム内で切断されたことが推測された (Fig. 5-13 b).

以上の結果より, 生細胞内で GFLG ペプチドが切断されることが示され, i-PPc を細胞内で遊離するために GFLG ペプチドが利用できると判断した.

a) 位相差顕微鏡像



b) 蛍光顕微鏡像



c) merge 像

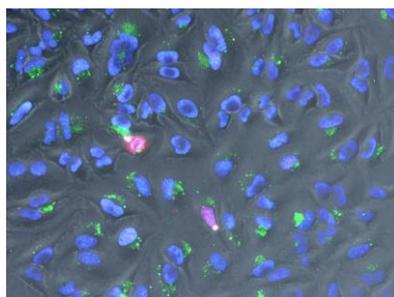


Fig. 5-13 モデルペプチドを取り込ませ 78 hours 培養後の HeLa 細胞の a) 位相差顕微鏡像および b) 蛍光顕微鏡像, c) マージ像.

Conditions: 細胞数 2500 cells/well, [model peptide] = 8.2  $\mu$ M, 3% FBS in D-MEM, 78 hours 培養.

#### e) R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc の Fmoc 固相合成

R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc について, FM 型の HPLC 測定では  $R_t$  = 26.7 min にメインピーク (Fig. 5-14 a), TOF-MS スペクトルでは  $m/z$  = 6894.86 (calc.  $M_w$  = 6894.23) にピーク (Fig. 5-14 b) が観測され, 目的のモデルペプチドが 95%以上の純度で得られたことがわかった.

同様に 1 塩基変異した KRAS 遺伝子を標的とした MM 型のクロマトグラムでは  $R_t$  = 26.6 min

近傍に単一メインピーク (Fig. 5-14 c), TOF-MS スペクトルでは  $m/z = 6912.22$  (calc.  $M_w = 6909.25$ ) にピークが観測され (Fig. 5-14 d), 目的の  $R_9$ -GFLG-i-PPc\_MM が純度 99% で得られた。以降, 得られた i-PPc を用いて BxPC-3 細胞および PANC-1 細胞の KRAS 遺伝子の塩基配列依存的な細胞死評価を行った。

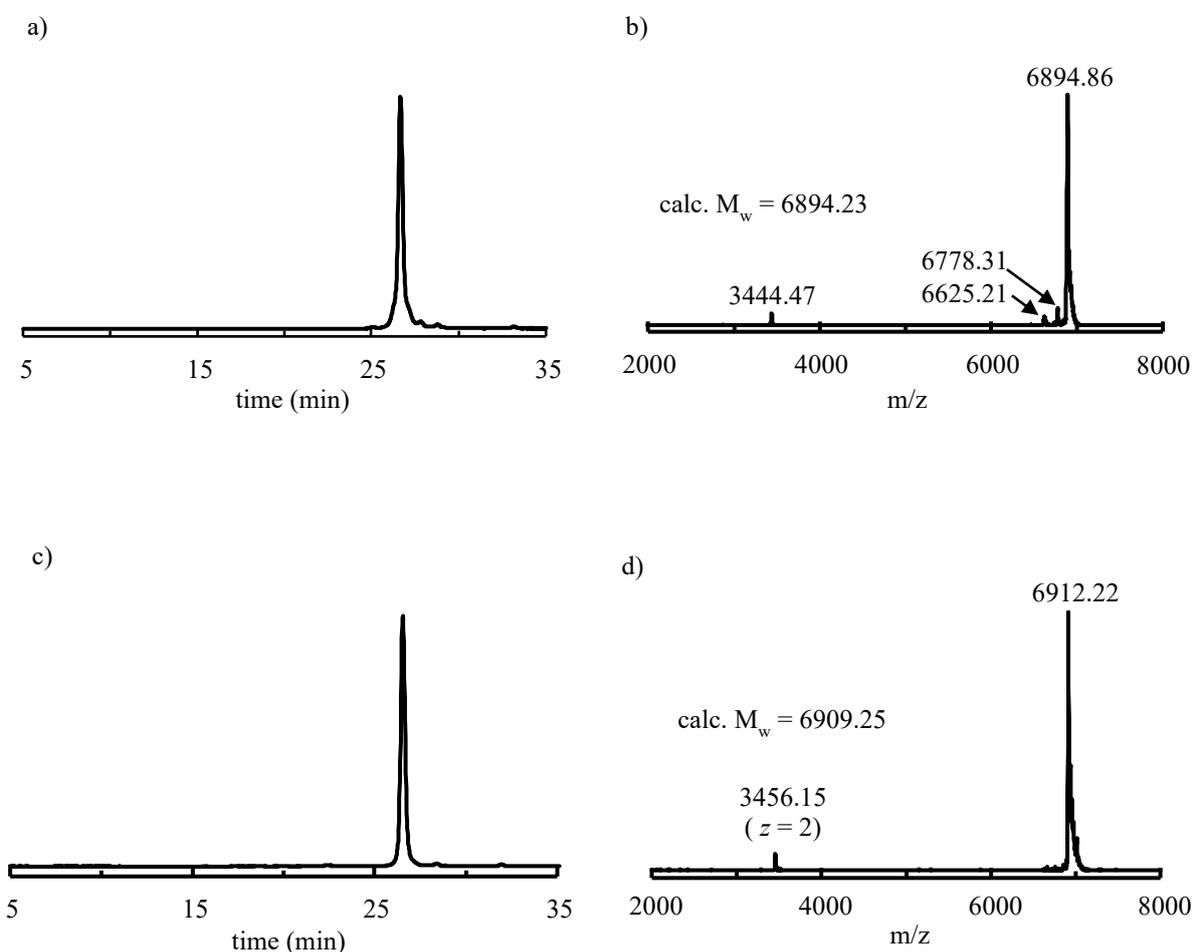


Fig. 5-14 精製後の a), b)  $R_9$ -GFLG-i-PPc\_FM および c), d)  $R_9$ -GFLG-i-PPc\_MM のクロマトグラムならびに TOF-MS スペクトル。

Conditions: a) ODS-3 column ( $4.6 \times 250$  mm, GL Science),  $35^\circ\text{C}$ ,  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ , A: 0.1% TFA in 5% ACN/Milli-Q, B: 0.1% TFA in 50% Milli-Q/ACN,  $\lambda = 260$  nm, A-B 1%/min linear gradient. b) CHCA in DMSO, LP\_3-20 kDa.

#### f) PCR チューブにおける細胞死評価

$1 \mu\text{M}$   $R_9$ -GFLG-i-PPc を 3% FBS,  $\times 1$  penicillin-streptomycin in RPMI-1640 培地中で各臓器がん細胞に添加して細胞死誘導を評価した結果,  $R_9$ -GFLG-i-PPc では添加後 1 日目では  $R_9$ -GFLG-i-PPc\_MM で優位な細胞死 (BxPC-3 細胞: 23.0%, PANC-1 細胞: 20.8%) が観測されたのに対し, 4 日培養後にはいずれの細胞においても細胞死は誘導されなかった (Fig. 5-15).

このような結果となった原因は, 主に再現性の低い実験プロトコルが問題と考えられる。例えば, チューブ内での BxPC-3 細胞の培養は経時的に細胞死が生じることで実験結果の標準偏差が大きくなること, チューブの底に細胞が沈降し  $R_9$ -GFLG-i-PPc が届いていないだけでなく細胞死を生じさせること, さらにはチューブ内の Cathepsin B が増加することで細胞に取り込まれる前に i-PPc が  $R_9$  と切断されたことでサイトゾルに輸送されなかったことが考えられた。

上述の結果を再考し、以降は接着細胞に対する細胞死評価を行うこととした。

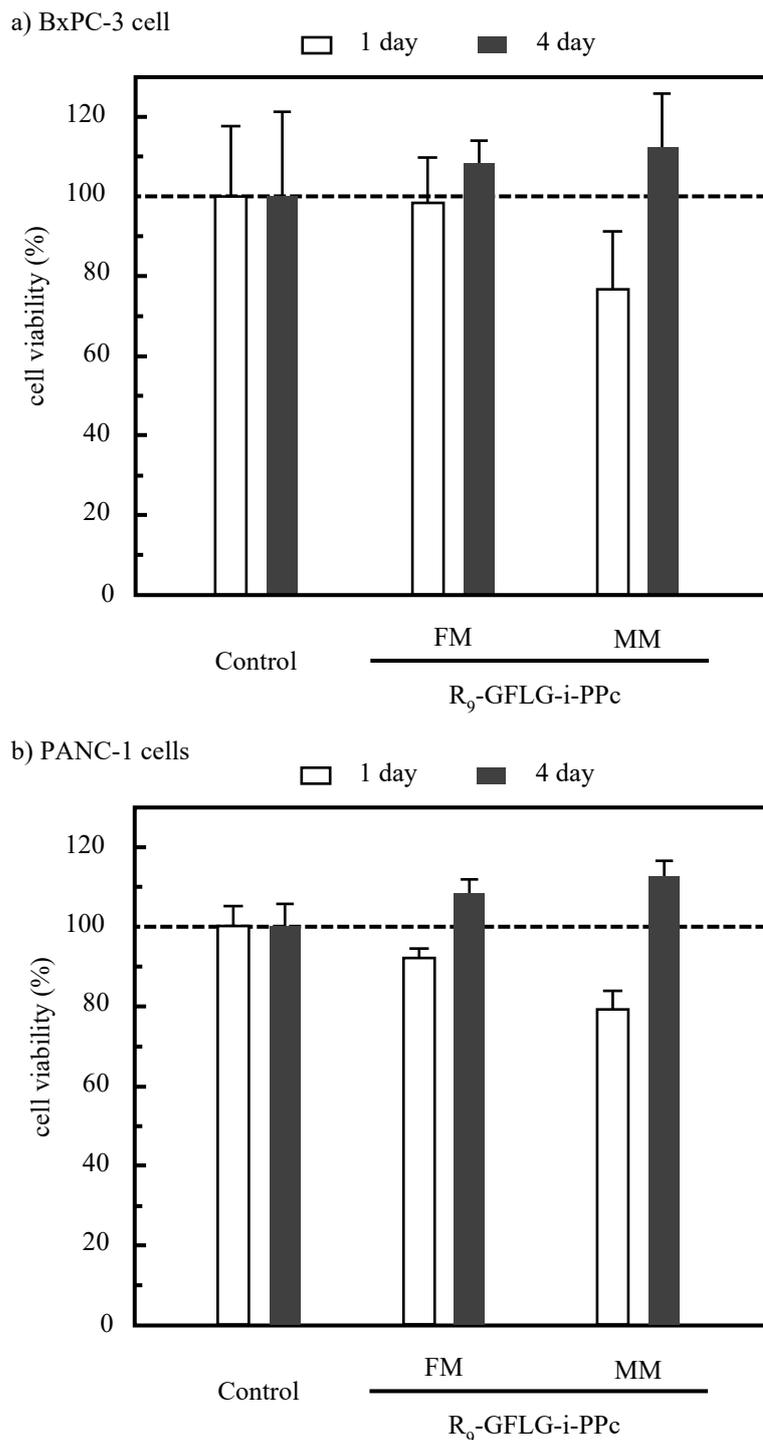


Fig. 5-15 PCR チューブ内における  $R_9$ -GFLG-i-PPc を取り込ませ所定時間培養後の a) BxPC-3, b) PANC-1 細胞の生存率.

Conditions: 細胞数 2500 cells/tube, [ $R_9$ -GFLG-i-PPc] = 1  $\mu$ M, 3% FBS in RPMI-1640 培地, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 1 日および 4 日培養.

#### g) ATP 定量法による細胞死評価

白色 96 well plate に播種した BxPC-3 細胞 (2500 cells/well) に 3  $\mu$ M  $R_9$ -GFLG-i-PPc を添加した結果, 1 日培養後の細胞では細胞死はほぼみられなかったが, 4 日培養すると  $R_9$ -GFLG-i-PPc\_FM で 42.6%,  $R_9$ -GFLG-i-PPc\_MM で 13.2%の細胞死が誘導され, BxPC-3 細胞に対して FM 型の i-PPc の細胞死誘導の優位性が示された (Fig. 5-16). この作用機序として,  $R_9$ -GFLG-i-PPc

が BxPC-3 細胞内において KRAS 遺伝子の 1 塩基の違いを認識して発現を抑制したことが推察された。

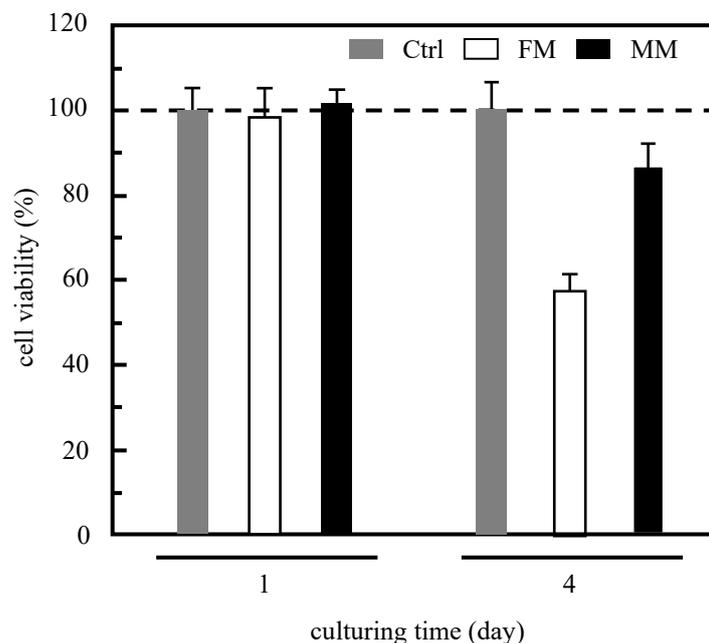


Fig. 5-16 R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加し所定時間培養した BxPC-3 細胞の生存率 (ATP 定量法).  
Conditions: 細胞数 2500 cells/well, [R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc] = 3 μM, 3% FBS in RPMI-1640 培地, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 1 日および 4 日培養.

一方で、PANC-1 細胞に R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加した場合、細胞死の誘導効率は GGT 標的型 (FM) では 1~4 日目までほぼコンスタントに 16%程度であるのに対し、GAT 標的型 (MM) では 1 日目 (約 20%) から経時的に増加し 3 日目以降は約 30%までその割合を増やした (Fig. 5-

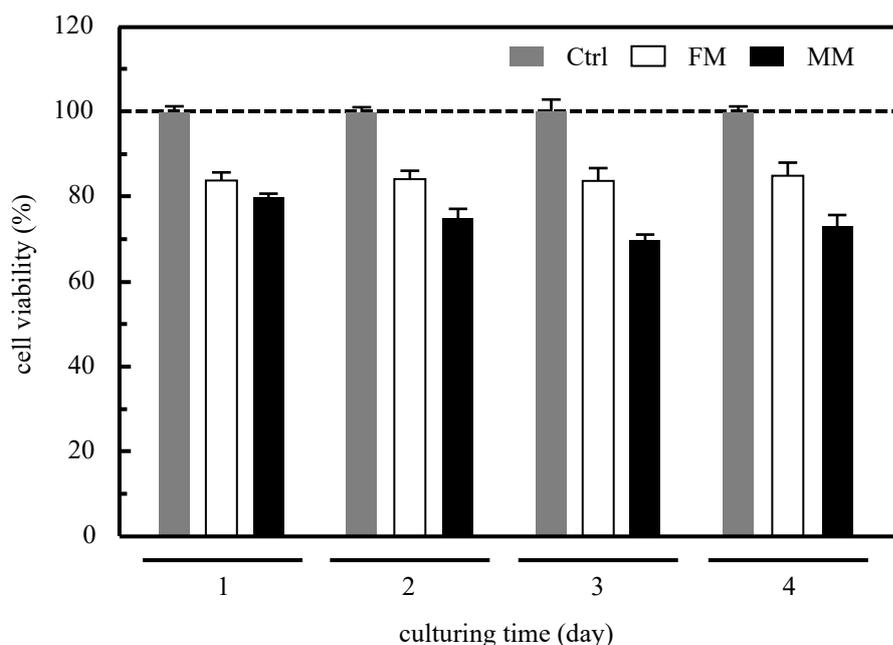


Fig. 5-17 R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加し所定時間培養後の PANC-1 細胞の生存率 (ATP 定量法).  
Conditions: 細胞数 2500 cells/well, [R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc] = 3 μM, 3% FBS in RPMI-1640 培地, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で所定時間培養.

17). この結果は, PANC-1 細胞における KRAS 遺伝子の変異の割合と合致して細胞死が誘導されていることがわかる. つまり, PANC-1 細胞の KRAS 遺伝子変異は G12D (GGT→GAT) であるが, すべての遺伝子変異しているわけではなく, 約 30%が野生型 (GGT) として存在している. このため GGT 標的型の i-PPc を添加した場合でも一定の割合で細胞死が誘導されることとなる. 一方で, GAT 標的型の i-PPc は残りの 70%程度の変異型 KRAS 遺伝子を標的としており, 培養日数の増加に伴い細胞死が誘導されたと解釈できる.

#### h) 還元酵素活性を利用した細胞死評価

g) で得られた結果の確証を得ることを目的として, 生細胞内の還元酵素を利用して細胞死の誘導効率を評価 (Realtime-Glo™ MT Cell Viability assay) した. この評価方法では, 細胞内に透過した基質が生細胞内の還元酵素により還元されることで NanoLuc の基質となり NanoLuc ルシフェラーゼ反応が生じ発光する. この発光を定量することで R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を取り込んだ細胞の生存率を算出した. BxPC-3 細胞は, 還元酵素の活性が高く同じウェルでの本測定は困難であることが予備実験より明らかになったため (no data), PANC-1 細胞に対してのみ本アッセイを行った.

この結果, GGT 標的型あるいは GAT 標的型 i-PPc のいずれも, 添加直後から培養時間の増加に伴い細胞死が誘導され, 最終的 (120 時間培養) には各々15%あるいは 25%の細胞死が誘導されることがわかった (Fig. 5-18). この評価方法でも GGT 標的型でわずかな細胞死誘導が見られ, かつ GAT 標的型 i-PPc において優位に細胞死が誘導されており, 先に示した ATP 定量法と類似した結果となったことから, 細胞死の誘導に関する再現性が確認できたと考えられる. これらの結果は, R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc が細胞内の 1 塩基変異を認識して発現を制御することを作用機序とした新たな核酸医薬としての可能性を示している.

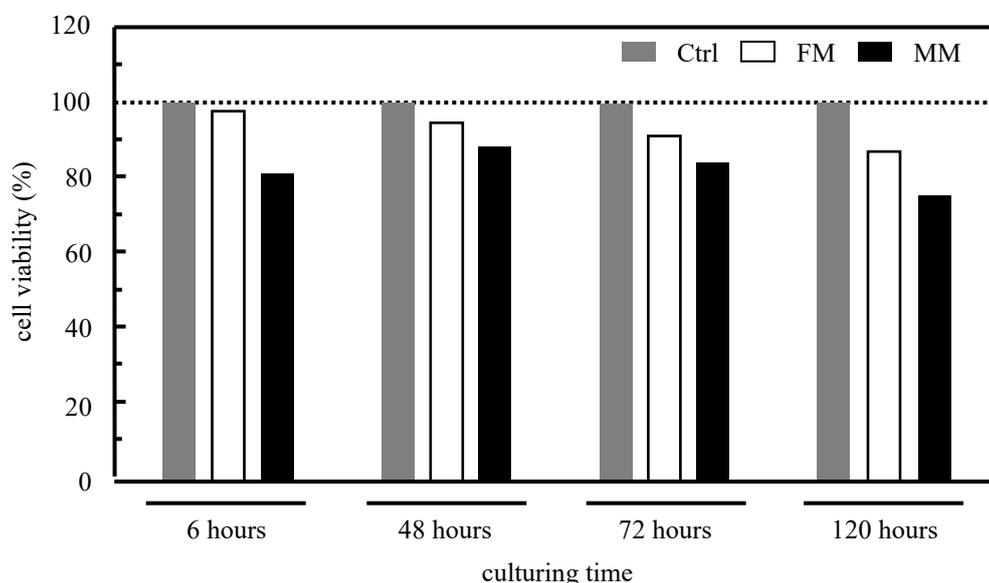


Fig. 5-18 還元酵素を利用し評価した 3% FBS in RPMI-1640 中で R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加し所定時間培養後の PANC-1 細胞の生存率.

Conditions: 細胞数 2500 cells/well, [R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc] = 3 μM, 3% FBS in RPMI-1640 培地, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で所定時間培養.

本実験における PANC-1 細胞の状態を位相差顕微鏡により観察した結果, R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_MM を添加した場合, 培養時間の増加に伴い縮退しかつ凝集した細胞像が多くみられ (Fig. 5-19),

ATP 定量および還元酵素活性法で得られた傾向を支持する結果となった。一方で、ATP 定量および還元酵素活性法で得られた細胞死誘導効率の割合と位相差像から視覚的に感じる割合が合致せず、位相差像では明らかに細胞死の誘導効率が高いように思える。このような定量法と顕微鏡像との不整合性は、細胞が死んでも ATP が残存していることや、還元酵素活性が維持されていることが原因と推察した。このため R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加して所定時間培養後の細胞を染色し蛍光顕微鏡観察を行うことにした。

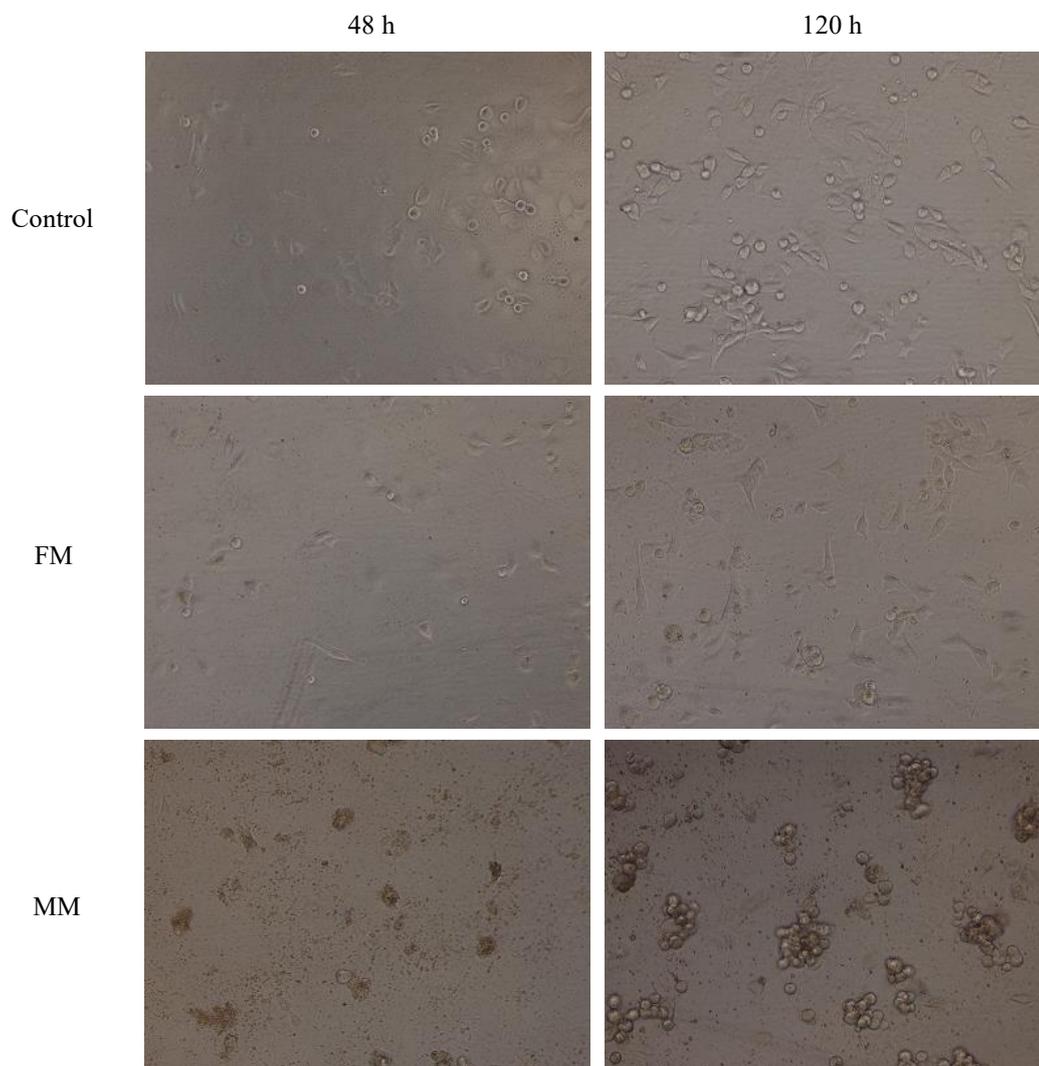


Fig. 5-19 R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加して所定時間培養後における PANC-1 細胞の位相差顕微鏡像。

#### i) 細胞観察による細胞死評価

本実験では、3 μM R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加して所定時間培養後の各膵臓腺がん細胞の状態を蛍光顕微鏡により観察した。R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加して 24 時間培養後の BxPC-3 細胞の蛍光顕微鏡像より細胞死亡率を算出した結果、R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_FM を取り込んだ細胞の死亡率は、22.7% と見積もられ R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_MM を取り込んだ際には 52.0% と算出された (Supplementary data). これを培養すると 120 時間後では、R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_FM を取り込んだ BxPC-3 細胞の細胞死亡率は 10.8%, R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_MM では 6.91% と算出され、120 時間後では R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_MM を取り込んだ細胞と比較して R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_FM を取り込んだ細胞で死細胞が多く観察された (Fig. 5-20). 細胞の縮退は観察された一方で、アポトーシスを引き起こした際に観察される核の

凝縮は観察されなかった。これは観察する倍率が低く正確に観察できていない可能性が考えられる。また 24 時間培養後でこれほど多くの細胞死が観察された原因は、詳細には不明であるが増殖前の比較的少ない段階で R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加しているため毒性により死滅した細胞や播種数のばらつきにより誤差が大きくなったこと、アーティファクトな部分を観察している可能性が考えられる。また PI 染色されるためには細胞膜が崩壊する必要があり、アポトーシスを引き起こしている細胞は細胞膜が保持されているため完全に死細胞を検出できていない可能性も考えられる。このため 24 時間培養後の観察結果は精度が低いと推察した。

R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加し 96 時間培養後の PANC-1 細胞の蛍光顕微鏡より、R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_MM を添加した際の Calcein-AM で染色した際の蛍光顕微鏡像では、縮退しアポトーシスを誘起しているような細胞においても緑色蛍光が観測されており、縮退した細胞内の加水分解酵素は活性を有している可能性が示唆され Calcein-AM による生死判定は精度が低いと判断した。R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_FM を取り込んだ PANC-1 細胞の細胞死亡率は、54.3%と算出されたのに対し R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_MM を取り込んだ PANC-1 細胞の死亡率は、78.3%と見積もられ R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_MM で死細胞が多く観察された (Fig. 5-21)。以上より、R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加後の各膵臓腺がん細胞を生死染色し蛍光顕微鏡により観察した結果、24 時間後では細胞数が少なく細胞死亡率の精度は低い可能性が示唆された。さらに長期培養するとそれぞれの主となる KRAS 遺伝子の塩基配列依存的に多くの死細胞が観察された。しかしこの目視による細胞死評価は、アーティファクトな部分を観察している可能性が高いためウェル全体を観察し評価する必要があると考えられる。

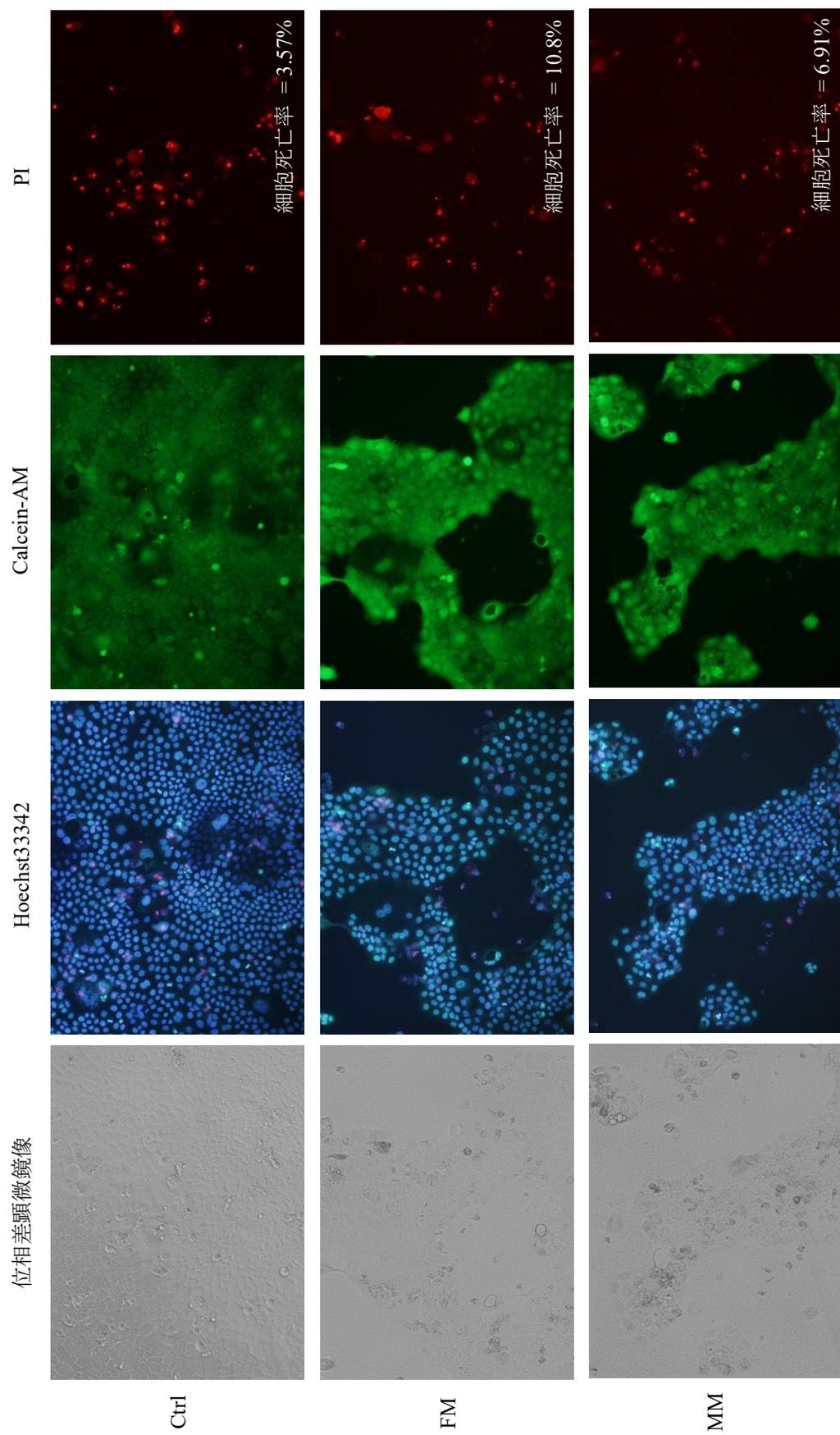


Fig. 5-20 R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加して 120 hours 培養後に生死染色した BxPC-3 細胞の蛍光顕微鏡像.

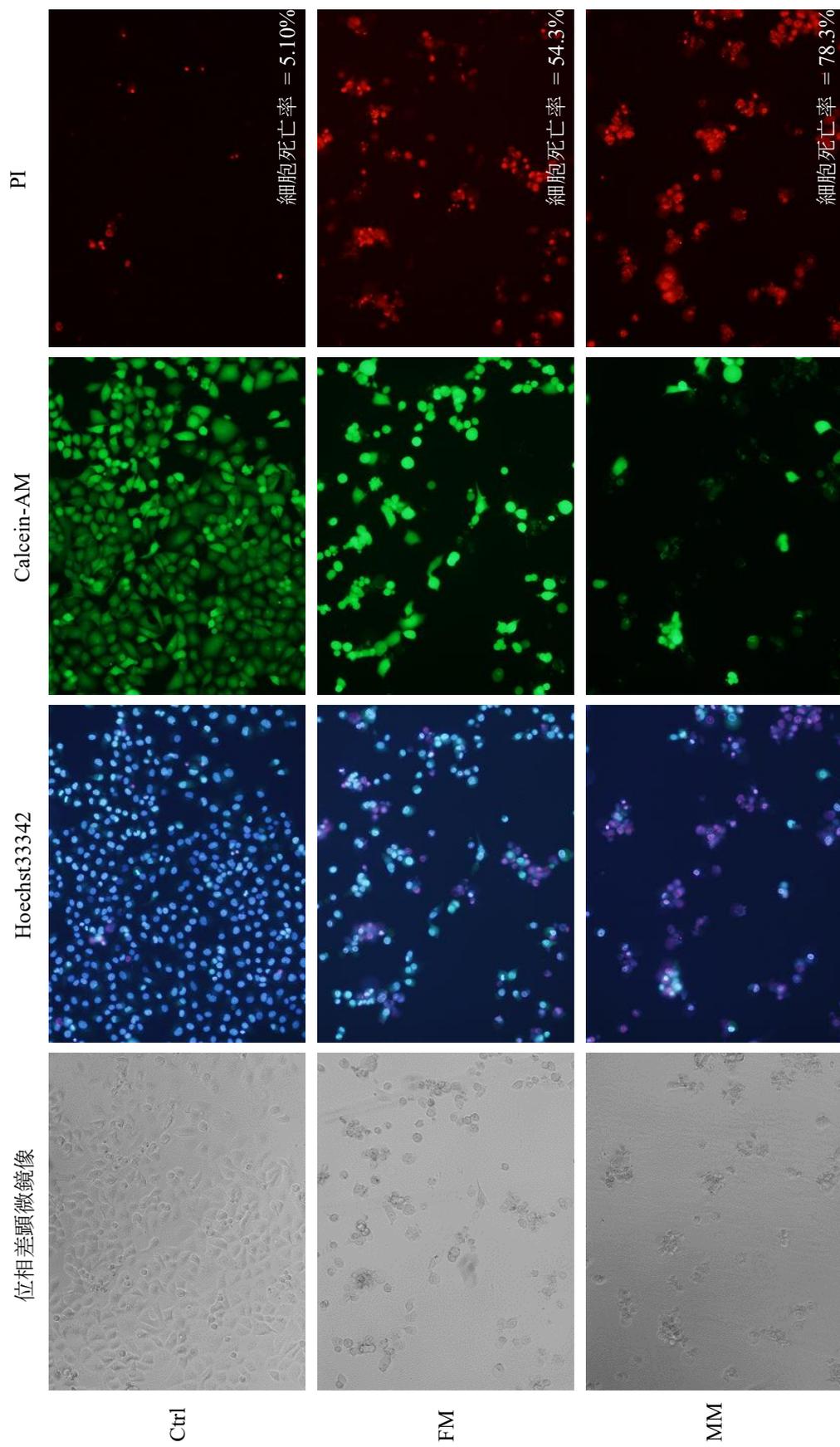


Fig. 5-21 R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加して 96 hours 培養後に生死染色した PANC-1 細胞の蛍光顕微鏡像.

## j) アポトーシスおよびネクローシス評価

本実験では RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis assay Kit を用い、初期アポトーシスと 2 次ネクローシスを同ウェルで経時的に測定した。健全な細胞ではルシフェラーゼによる発光および細胞膜非透過性のインターカレーター (DNA 結合性蛍光色素) 由来の蛍光は観測されない。一方で、初期アポトーシスが誘起された細胞では phosphatidyl serine (PS) が細胞膜表面に露出するため、PS と Annexin V が特異的に結合し添加した Annexin V 融合タンパク質 (Annexin V-LgBit および Annexin V-SmBit) 同士が近接することで NanoLuc® が形成され既に添加した基質を還元し発光が観測されるようになる。これが進行し 2 次ネクローシスが誘起されると細胞膜の完全性が失われるため細胞内へのインターカレーターの侵入と DNA への結合により緑色蛍光も観測される (Fig. 5-22)。本項目では、前述の原理を用いて R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc による各膵臓腺がん細胞のアポトーシスおよび 2 次ネクローシスについて検討した。

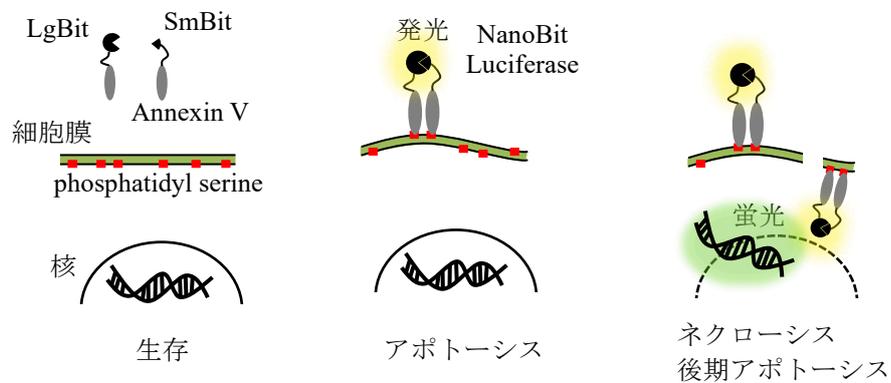


Fig. 5-22 RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis assay によるアポトーシスおよび 2 次ネクローシスの測定原理.

3  $\mu$ M 各 R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加し所定時間培養した BxPC-3 細胞のアポトーシスおよびネクローシス評価を行った結果、R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_FM では添加直後から 6 時間後にかけて RLU = 3000-4000 近傍に極大値を示し (Fig. 5-23 a), 3 時間後からアポトーシスが誘導される (Fig. 5-23 b) ことがわかった。またその時の蛍光強度は、添加して 1 時間後から 5 時間後にかけて蛍光強度の増加がみられアポトーシスと同時に二次ネクローシスに移行していることがわかる (Fig. 5-23 b)。一方で、1 日目以降のアポトーシスアッセイでは FM 型と MM 型 i-PPc による違いはみられなかった。また、ネクローシスアッセイではむしろ R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_MM において強く誘起されている結果となり、先の ATP および還元酵素活性定量により得られた結果と矛盾することがわかる。この原因の詳細は不明だが、BxPC-3 細胞の R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc に対する感受性が影響している可能性が考えられる。R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_FM を添加直後に急激にアポトーシスを示す発光値が上昇した現象もこれに関連すると考えられる。一方で、同濃度の FM においてのみ強いアポトーシスを誘起しており、単純に i-PPc 濃度が原因とも考えられず、この点も踏まえてより多くの研究データをもとに判断する必要がある。今後は添加初期にみられる急激なアポトーシス値の上昇を念頭に、より低濃度の i-PPc に対するアポトーシス、ネクローシス誘起を評価する必要がある。

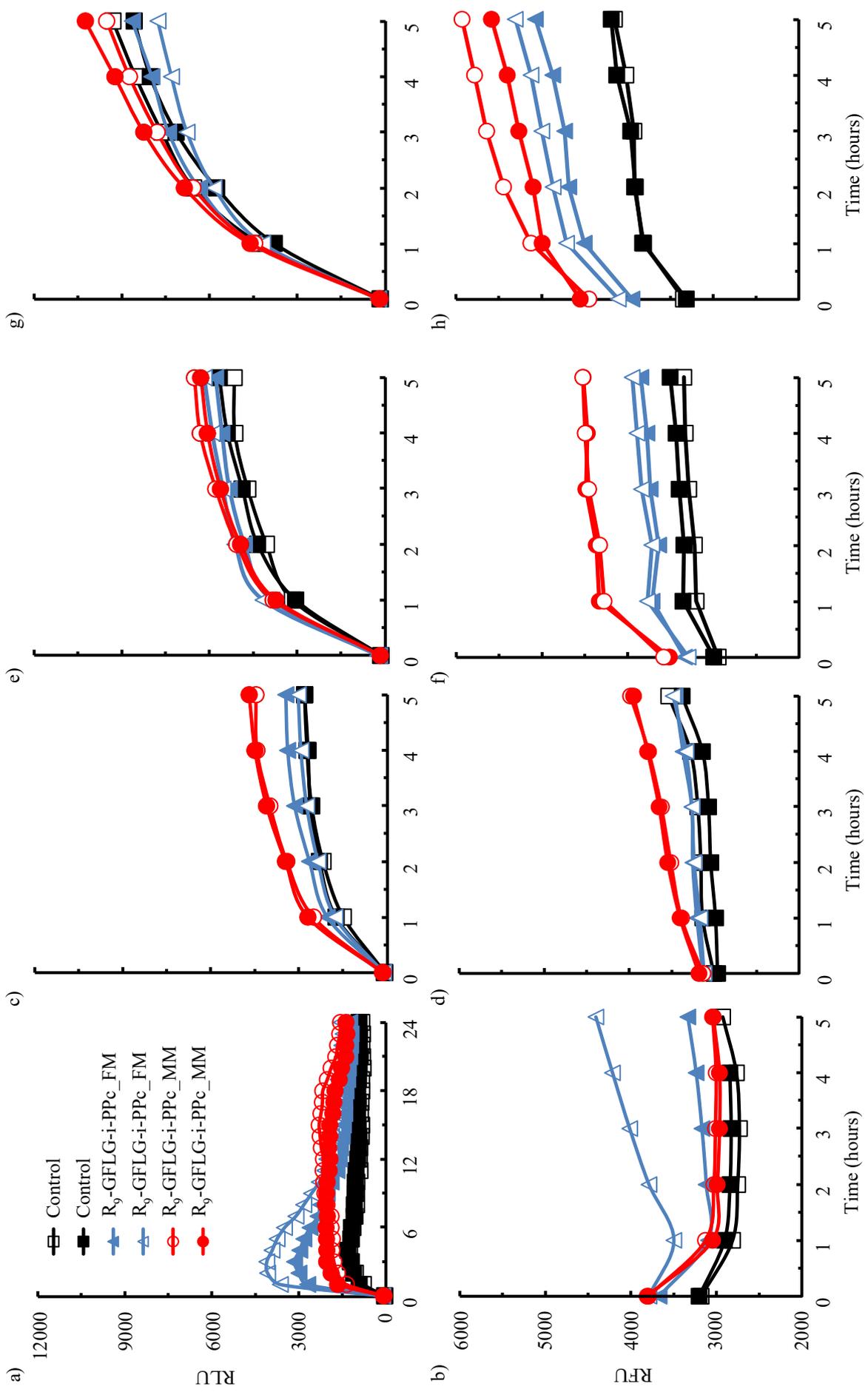


Fig. 5-23 R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加して a), b) 0 day, c), d) 1 day, e), f) 2 days, g), h) 3 days 培養後の BxPC-3 細胞の RLU および RFU.

PANC-1 細胞に対する R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc 添加後のアポトーシスおよびネクローシス挙動は、BxPC-3 細胞のそれと比較すると異なる結果を示した。アポトーシス挙動について、R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_FM ではわずかに発光強度が上昇 (RLU = 450) したものの、その値は BxPC-3 細胞の時 (RLU = 3000) と比較すると小さく、一方で R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_MM では時間の経過に伴い徐々に増加し、12 時間後には FM 添加時よりも高いアポトーシス誘導がみられた (Fig. 5-24 a)。さらに、培養日数の増加に伴い R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_MM で優位にアポトーシスを誘導することがわかった (Fig. 5-24 c, e, g)。この際、コントロールと比較して R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_FM でもアポトーシスを誘起したが、これは項目 g) で述べた内容 (PANC-1 細胞にも野生型遺伝子が 30%程度存在する) と整合性のある結果であった。このように、塩基配列依存的なアポトーシスが顕著に誘導されるまでに 1~2 日以上所要した (Fig. 5-24 c, e, g) 理由として、PANC-1 細胞は KRAS シグナル非依存的なシグナル経路も持ち合わせていること<sup>4),5),6)</sup>から BxPC-3 細胞にみられた迅速なアポトーシスは誘導されにくいこと、また、変異型 KRAS タンパク質<sup>G12D</sup>の欠失によりグルコースの取り込みが徐々に低下する<sup>7)</sup>ことから、アポトーシスの誘導に時間がかかったものと思われる。

ネクローシス挙動をみると、添加直後には顕著なネクローシスは検出されないものの、1 日培養後から徐々に増加する傾向がみられた。一方で、培養後 3 日目まで塩基配列依存的なネクローシスはみられず、3~4 日後で MM 型でわずかにネクローシスが強く誘導されることがわかった (Fig. 5-24 d, f, h)。これは、変異型 KRAS タンパク質の発現抑制やこれをトリガーとするネクローシス誘導に時間がかかること、また PANC-1 細胞が保有する野生型 KRAS 遺伝子により MM と FM 間でネクローシスに差が出にくく蛍光検出が困難となるなど、いくつかの原因が想定された。今後は、播種細胞数を増やす、培養日数を増やす、あるいは検出感度を高める等の対応が必要と考えられる。

以上より、R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加し所定時間培養後の PANC-1 細胞のアポトーシスおよびネクローシス評価を行った結果、R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_MM で 12 時間以降に優位なアポトーシスが誘導され、24 時間以降に二次ネクローシスに移行することが示されたが、R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc の塩基配列依存的な二次ネクローシス誘導を判断するには上述の問題点を解決した評価が必要となった。

#### 5-4-5. まとめ

本項では、1 塩基変異を認識した KRAS 遺伝子の遺伝子発現抑制に伴う塩基配列依存的な細胞死評価を目的としてリソソーム内システインプロテアーゼ; Cathepsin B により切断される GFLG ペプチドでノナルギニンと i-PPc を架橋した R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を設計し合成した。

R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc による膵臓腺がん細胞; BxPC-3 細胞 (WT) と PANC-1 細胞 (MT) の細胞死誘導について検討した結果、BxPC-3 細胞では添加直後に塩基配列依存的なアポトーシス誘導がみられたものの、それ以降は正確に判断できなかった。PANC-1 細胞では、12 時間以降から緩やかに塩基配列依存的なアポトーシスが誘導されることがわかった。その後の 2 次ネクローシスもみられたことから、R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_MM が PANC-1 細胞を特異的にアポトーシス誘導させ、非常にゆっくりではあるが二次ネクローシスへと移行させていることがわかった。

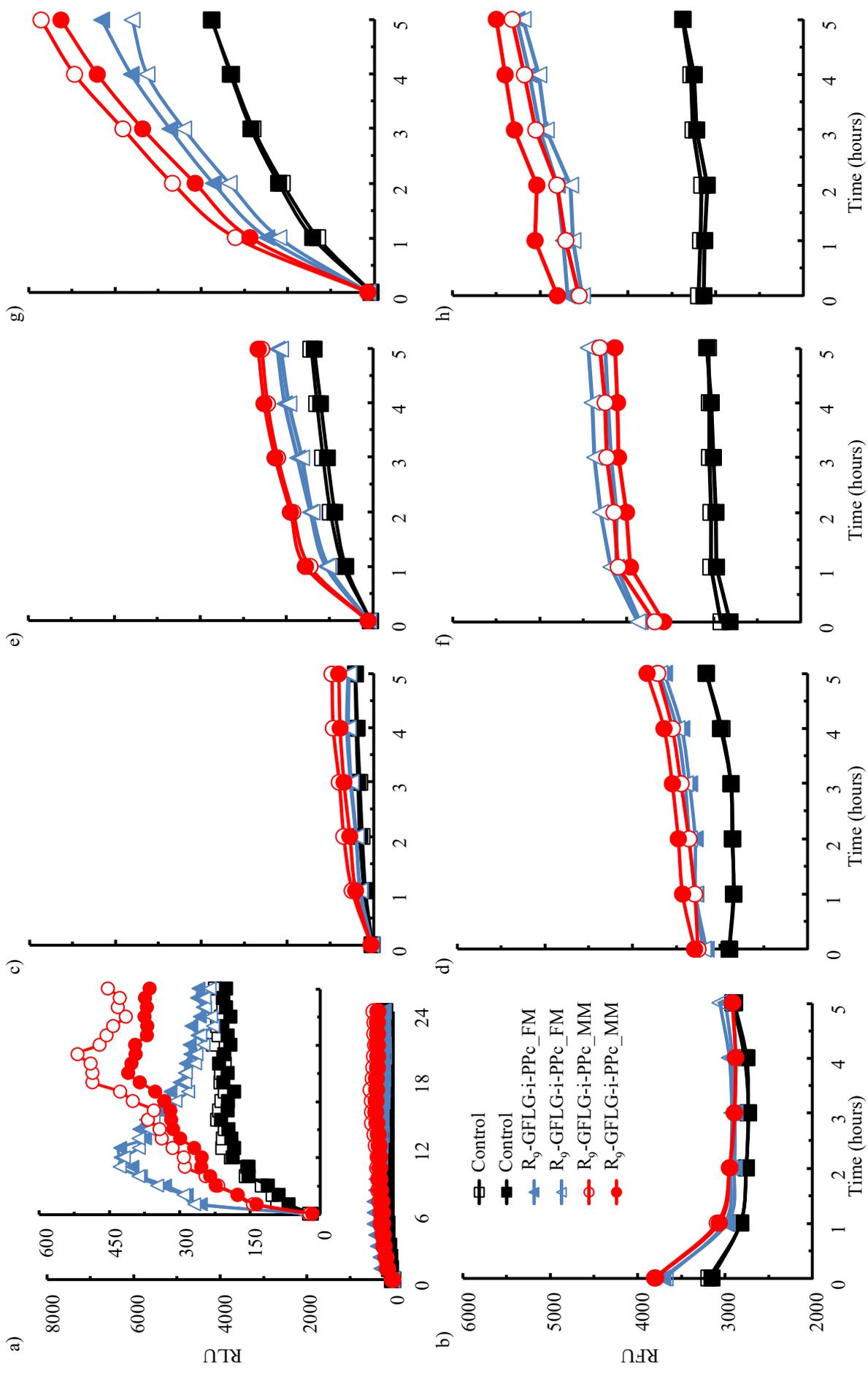


Fig. 5-24 R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加して a), b) 0 day, c), d) 1 day, e), f) 2 days, g), h) 3 days 培養後の PANC-1 細胞の RLU および RFU.

## 5-5. 小括

本章では、がんの発症や薬効の低下に関与するがん遺伝子の一つである KRAS 遺伝子を標的とした i-PPc が 37°C で 1 塩基変異を認識できる塩基配列を熱安定性評価により決定した。この塩基配列を有する 2 系統 4 種の i-PPc (i-PPc(R<sub>9</sub>), R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc) を合成し、これらを用いて KRAS 遺伝子野生型膵臓腺がん細胞である BxPC-3 細胞と、変異型である PANC-1 細胞 (G12D) の細胞死誘導の効率を評価した。

I-PPc(R<sub>9</sub>) を添加し所定時間培養した BxPC-3 細胞では、野生型 KRAS 遺伝子と相補鎖を形成する i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM で優位な細胞死がみられたものの、PANC-1 細胞では i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM と i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM で同等または i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM で優位な細胞死が観測され、塩基配列依存的な細胞死はみられなかった。この原因については現時点では不明であるが、ノナアルギニンの導入により i-PPc 本来の 1 塩基認識能が低下している可能性が相補鎖形成挙動から推察された。

このため、細胞内遊離型の R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を合成し各細胞に対する細胞死誘導について評価した結果、BxPC-3 細胞および PANC-1 細胞のいずれの膵臓腺がん細胞においても KRAS 遺伝子の塩基配列依存的な細胞死が観測され、R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc が 1 塩基変異を認識していることが示された。R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc による各膵臓腺がん細胞のアポトーシス挙動を評価した結果、BxPC-3 細胞は R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_FM 添加直後から 6 時間にかけて顕著にアポトーシスが誘導されるのに対し、PANC-1 細胞については R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_MM を添加して 12 時間後から緩やかにアポトーシスがおこり、二次ネクローシスへと移行することがわかった。

以上の結果は、R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc が KRAS 遺伝子変異性がん細胞のみアポトーシスを誘導できることを意味しており、膵がん疾患に対する核酸医薬として利用できる可能性が示された。

## 5-6. 参考文献

- 1) S. A. R. Naqvi *et al.*, *Cancer Biother. Radiopharm.*, **25**, 89-95 (2010).
- 2) C. S. Gondi and J. S. Rao, *Expert Opin. Ther. Targets*, **17**(3), 281-291 (2013).
- 3) J. S. Mort and D. J. Buttle, *Int. Biochem. Cell Biol.*, **29**(5), 715-720 (1997).
- 4) G. Zimmermann *et al.*, *Nat. Lett.*, **497**, 638-642 (2013).
- 5) Y. Kim *et al.*, *Mol. Cells*, **37**(12), 888-898 (2014).
- 6) M. D. Muzumdar *et al.*, *Nat. Commun.*, **8**(1090), 1-19 (2017).
- 7) H. Ying *et al.*, *Cell*, **149**, 656-670 (2012).

## 第6章 三次元培養した膵臓腺がん細胞の R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc による細胞死評価

### 6-1. はじめに

これまでの研究では、96 well plate など二次元の培養基材を用いて i-PPc による KRAS 遺伝子発現抑制に伴う各膵臓腺がん細胞の細胞死誘導について検討した。しかし、これらの評価系は三次元的な生体内環境とは異なる環境下での評価であり、i-PPc を核酸医薬として用いるためにはより生体内環境を模倣した評価系を構築する必要がある<sup>1)</sup> (Fig. 6-1)。

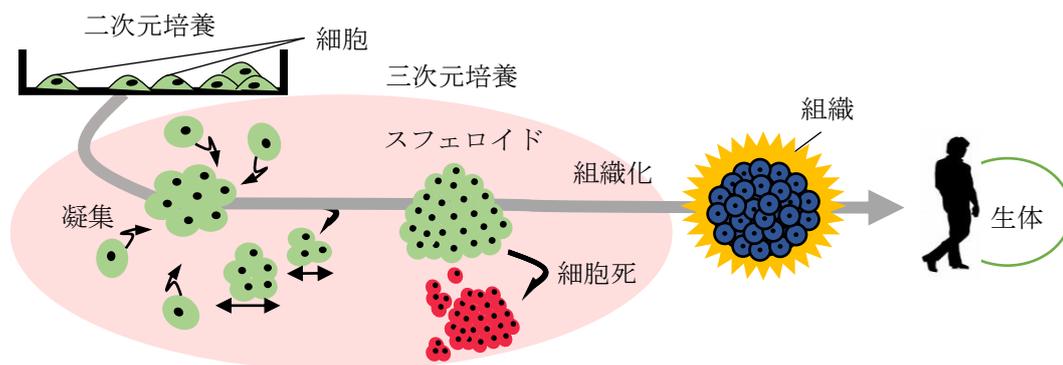


Fig. 6-1 より生体内環境を模倣した培養方法のイメージ図。

本項では、より生体内環境を模倣した評価系の構築を目的として各膵臓腺がん細胞のスフェロイド形成について検討した。また形成したスフェロイドに対する R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc による 1 塩基の違いを認識した配列依存的な細胞死評価について検討した。

### 6-2. 膵臓腺がん細胞のスフェロイド形成条件の策定

#### 6-2-1. はじめに

生体内の細胞は、周囲の細胞や細胞外基質と相互作用し組織を形成している。スフェロイドは接着した細胞の凝集により形成された三次元の構造体で、二次元培養と比較して生体内環境での細胞の状態に近づけることが可能となる。一方で、スフェロイドを形成できる細胞種が限られており、内部の細胞の壊死や均一なサイズのスフェロイドを作製できないなどの課題点がある。このため本項では、R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc による細胞死評価を念頭に 3 種の三次元培養基材を用いて各膵臓腺がん細胞 (BxPC-3 細胞, PANC-1 細胞) のスフェロイド形成条件の策定を行った。

#### 6-2-2. 試薬

- |   |         |
|---|---------|
| ・ RPMI-1640                             | Wako    |
| ・ Fetal bovine serum                    |         |
| ・ GloLysis buffer                       | Promega |
| ・ CellTiter-Glo <sup>®</sup> 2.0        | Promega |
| ・ CellTiter-Glo <sup>®</sup> 3D Reagent | Promega |
| ・ 1 mg/mL Calcein-AM in DMSO            | DOJINDO |
| ・ 1 mg/mL PI in H <sub>2</sub> O        | DOJINDO |

#### 6-2-3. 器具

- ・ 三次元培養器材: PrimeSurface<sup>®</sup> (住友ベークライト), EZSPHERE<sup>®</sup> (Iwaki), NanoCulture Plate

## (ORGANOGENIX)

- ・ マイクロプレートリーダー: Infinite200 pro
- ・ 位相差・蛍光顕微鏡: IX71

TECAN  
OLYMPUS

### 6-2-4. 実験操作

#### a) 各膵臓腺がん細胞のスフェロイド形成時の形態観察

37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で継代培養した各膵臓腺がん細胞を PrimeSurface に 2500 cells/well in 200 µL 10% FBS/RPMI-1640 培地, EZSPHERE および NanoCulture Plate に  $1.0 \times 10^4$  cells/well in 200 µL 10% FBS/RPMI-1640 培地となるように所定のウェルに播種し 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で所定時間培養した。このとき EZSPHERE および NanoCulture Plate に播種して 2 日後に培地交換を行った。所定時間培養後の各膵臓腺がん細胞におけるスフェロイド形成過程を位相差顕微鏡により観察し形態観察を行った。

#### b) 各膵臓腺がん細胞のスフェロイドの増殖性評価

上述した条件で各膵臓腺がん細胞を播種し所定時間培養後にルミノアッセイにより増殖性を評価した。

**CellTiter-Glo<sup>®</sup> 3D Reagent:** PrimeSurface に播種した細胞に使用した。所定時間培養後に 8 連ピペットマンを用いて各ウェルに 100 µL ずつ CellTiter-Glo<sup>®</sup> reagent を添加した。その後、室温、暗所にて 15 min 反応させた。反応後マイクロプレートリーダーを用いて所定のウェルの発光量を測定した。

**CellTiter-Glo<sup>®</sup> 2.0 Reagent:** EZSPHERE および NanoCulture に播種した細胞に使用した。所定時間培養後に各ウェルから既存の培地を 150 µL 除去した後、100 µL GloLysis buffer を添加し 5 min 室温で静置した。その後、CellTiter-Glo<sup>®</sup> reagent 100 µL を加え 10 min 室温で反応させた。10 min 後に 10 回ピペッティングし測定用の白色 96 well plate に所定量移し、マイクロプレートリーダーで発光量を測定した。

測定条件; mode: luminescence, attenuation: none, integration time: 5000 ms, settle time: 0 ms.

#### c) 各膵臓がん細胞の生死染色

上述した条件で各プレートに各膵臓腺がん細胞を播種し、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 2 日 1 回培地交換を行いながら所定時間培養した。所定時間培養後に所定量の Calcein-AM および PI を添加し生死細胞染色を行った。染色後の細胞の状態を位相差顕微鏡および蛍光顕微鏡で細胞観察した。

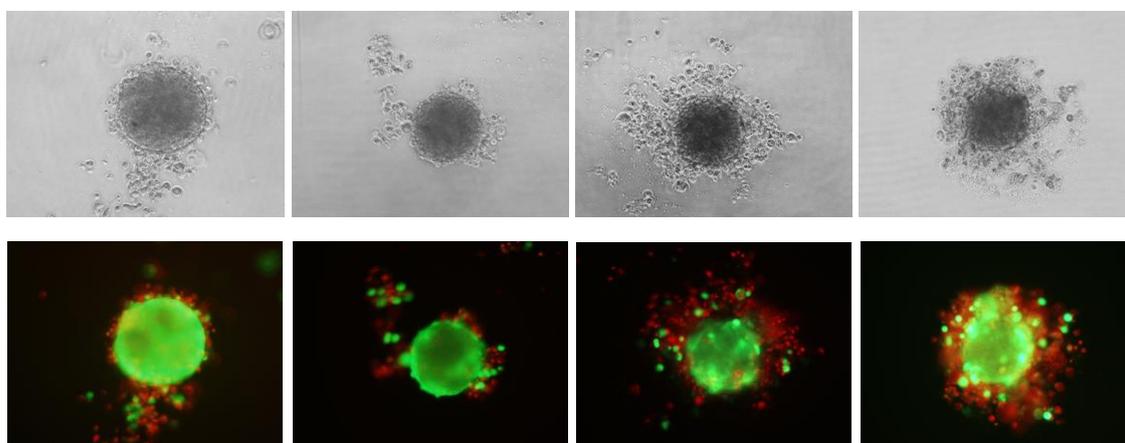
## 6-2-5. 結果および考察

### a) 各臓器がん細胞のスフェロイド形成時の形態観察および生死染色

BxPC-3 細胞および PANC-1 細胞を PrimeSurface に播種した際の形態変化と、Calcein-AM および PI 染色により各細胞の生死を位相差および蛍光顕微鏡を用いて観察した。

PrimeSurface は 96 well plate の U 底表面を MPC ポリマーでコートしているため、細胞が基材に吸着せず一つの大きなスフェロイドを形成することができる。細胞観察の結果を以下に示した (Fig. 6-2)。PrimeSurface に播種された BxPC-3 細胞は 12 hours 後には一つの大きなスフェロイドを形成したが、その後は徐々に崩壊していく様相が観察された。また所定時間培養後の BxPC-3 細胞の生死染色では培養時間の増加に伴い PI 由来の赤色蛍光の増加がみられることから、死んだ細胞がスフェロイド周辺に堆積している様子が蛍光顕微鏡像より観察された (Fig. 6-2 a)。一方で PANC-1 細胞はスフェロイドを形成せず PrimeSurface の底に集まり平面的に増加しており、死細胞はほとんど観察されなかった (Fig. 6-2 b)。

### a) BxPC-3 細胞



### b) PANC-1 細胞

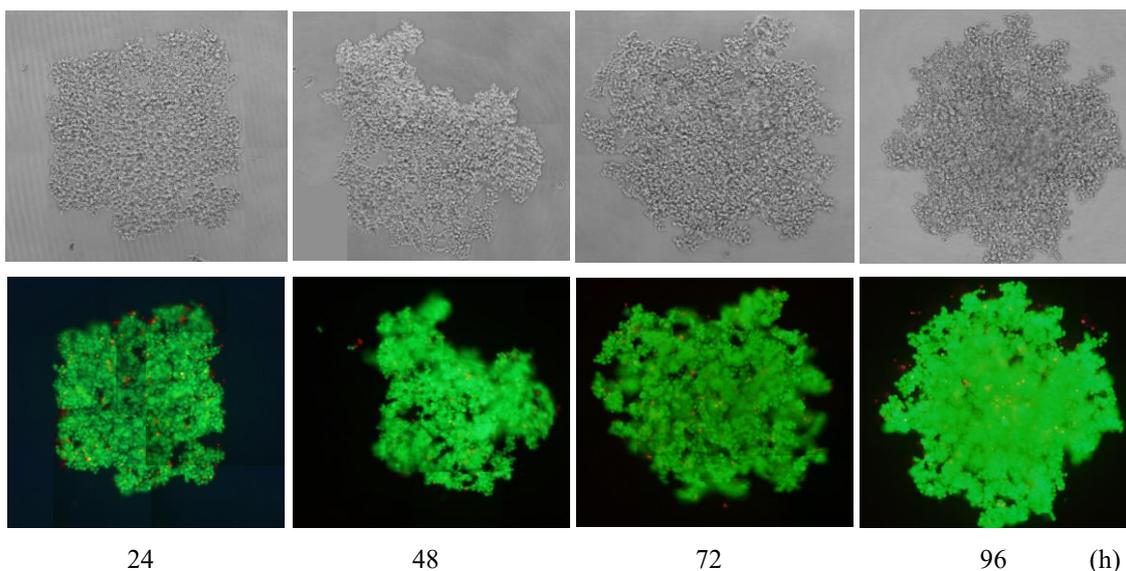
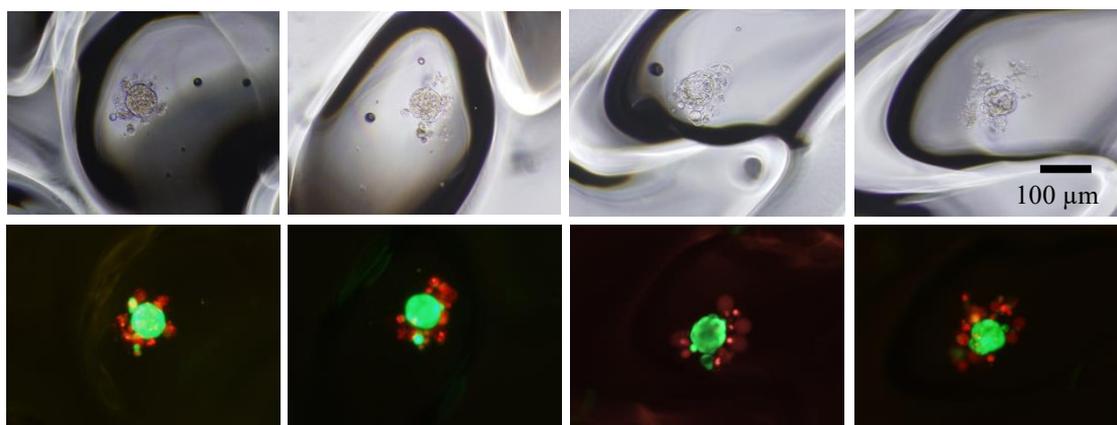


Fig. 6-2 PrimeSurface® で所定時間培養後に生死染色した際の a) BxPC-3 細胞および b) PANC-1 細胞の位相差顕微鏡像および蛍光顕微鏡像。

Condition: 細胞数 2500 cells/well in 200  $\mu$ L 10% FBS/RPMI-1640 培地, 2 日に 1 回培地交換。

次に EZSPHERE®を用いた際の各膵臓腺がん細胞のスフェロイド形成について検討した。EZSPHERE®は培養面を細胞低吸着性ポリマーでコートした微細なウェルであり、サイズの均一な小さなスフェロイドを多数形成できる。この基材に BxPC-3 細胞および PANC-1 細胞を播種 ( $1.0 \times 10^4$  cells/well) し、所定時間培養後に生死染色した細胞の状態を位相差および蛍光顕微鏡で観察した。得られた位相差顕微鏡像より、BxPC-3 細胞ではサイズ均一な小さなスフェロイドが観察されたが、先と同様に形成直後からスフェロイドの崩壊が観察された。また生死染色後の蛍光顕微鏡像より、培養時間の増加に伴い死細胞の増加が確認された (Fig. 6-3 a)。一方で PANC-1 細胞では、スフェロイドの形成は観察されず二次元的な増殖が観察された。また細胞染色においても死細胞はほとんど観察されなかった (Fig. 6-3 b)。

a) BxPC-3 細胞



b) PANC-1 細胞

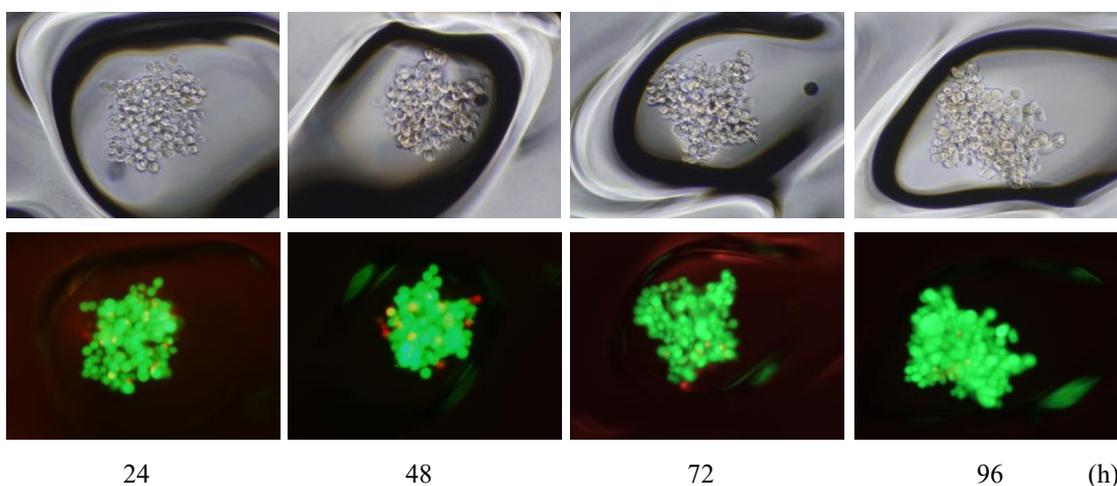


Fig. 6-3 EZSPHERE®で所定時間培養後に生死染色した際の a) BxPC-3 細胞および b) PANC-1 細胞の位相差顕微鏡像および蛍光顕微鏡像。

Condition: 細胞数  $1.0 \times 10^4$  cells/well in 200  $\mu$ L 10% FBS/RPMI-1640 培地, 2 日に 1 回培地交換。

最後に、NanoCulture Plate 上での各膵臓腺がん細胞の凝集形態について検討した。NanoCulture Plate は表面に微細構造を均一にパターンニングした特別な樹脂フィルムで、サイズの異なる比較的小さなスフェロイドを多数形成することができる。この NanoCulture Plate に各膵臓腺がん細胞 ( $1.0 \times 10^4$  cells/well) を播種し、経時的なスフェロイド形成挙動と各細胞の生死を位相差および蛍光顕微鏡で観察した。得られた位相差および蛍光顕微鏡像より、BxPC-3 細胞ではサイズの

異なる比較的小さいスフェロイドが形成され死細胞は先の2つの基材よりも少ないと判断した (Fig. 6-4). 一方で PANC-1 細胞では, 部分的に凝集していたがスフェロイドの形成は観察されなかった. また培養日数の増加に伴い細胞が増殖していることが分かった (Fig. 6-5).

BxPC-3 細胞

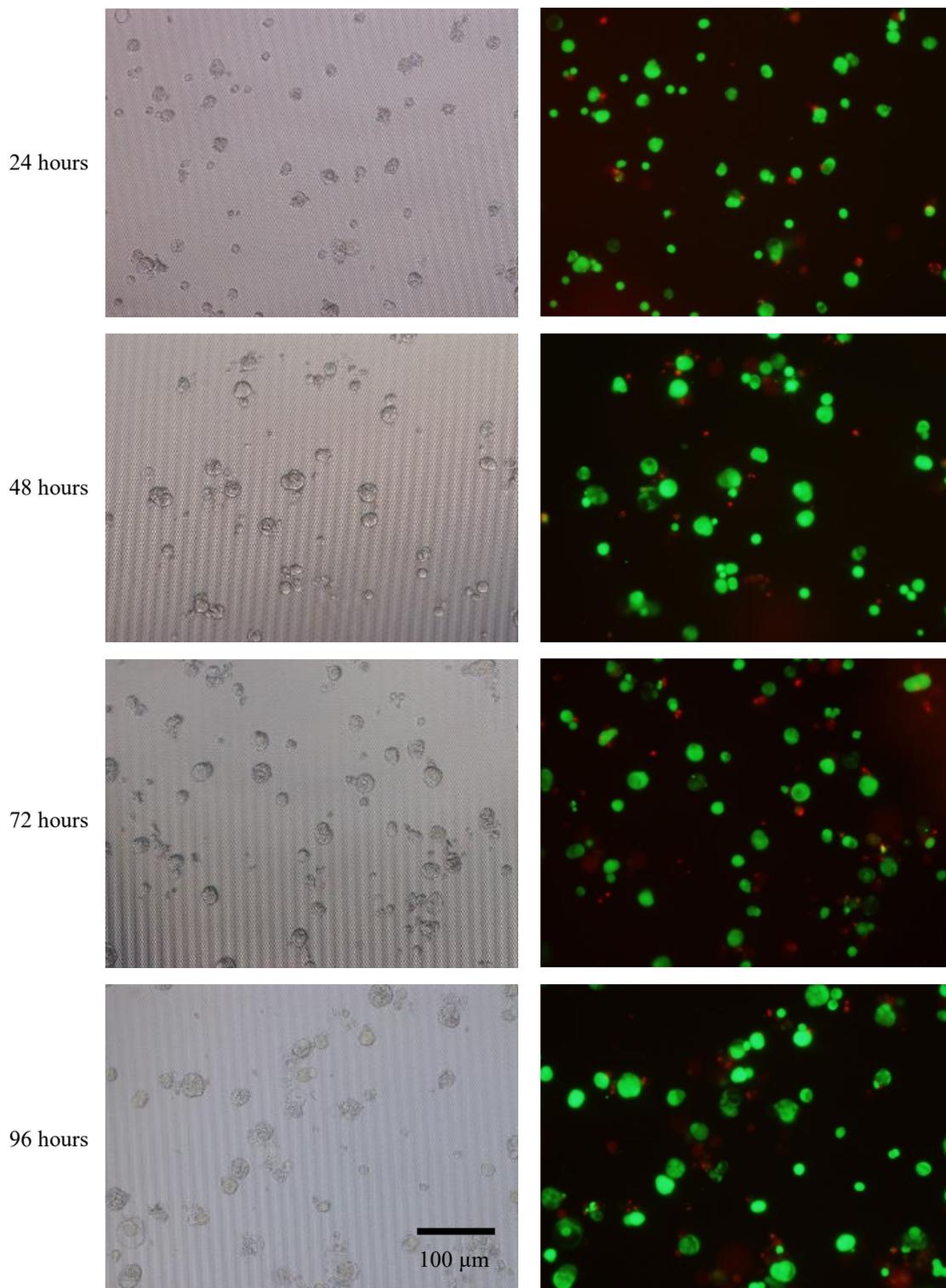


Fig. 6-4 NanoCulture Plate で所定時間培養後に生死染色した際の a) BxPC-3 細胞の位相差顕微鏡像および蛍光顕微鏡像.

Condition: 細胞数  $1.0 \times 10^4$  cells/well in 200 μL 10% FBS/RPMI-1640 培地, 2 日に 1 回培地交換.

PANC-1 細胞

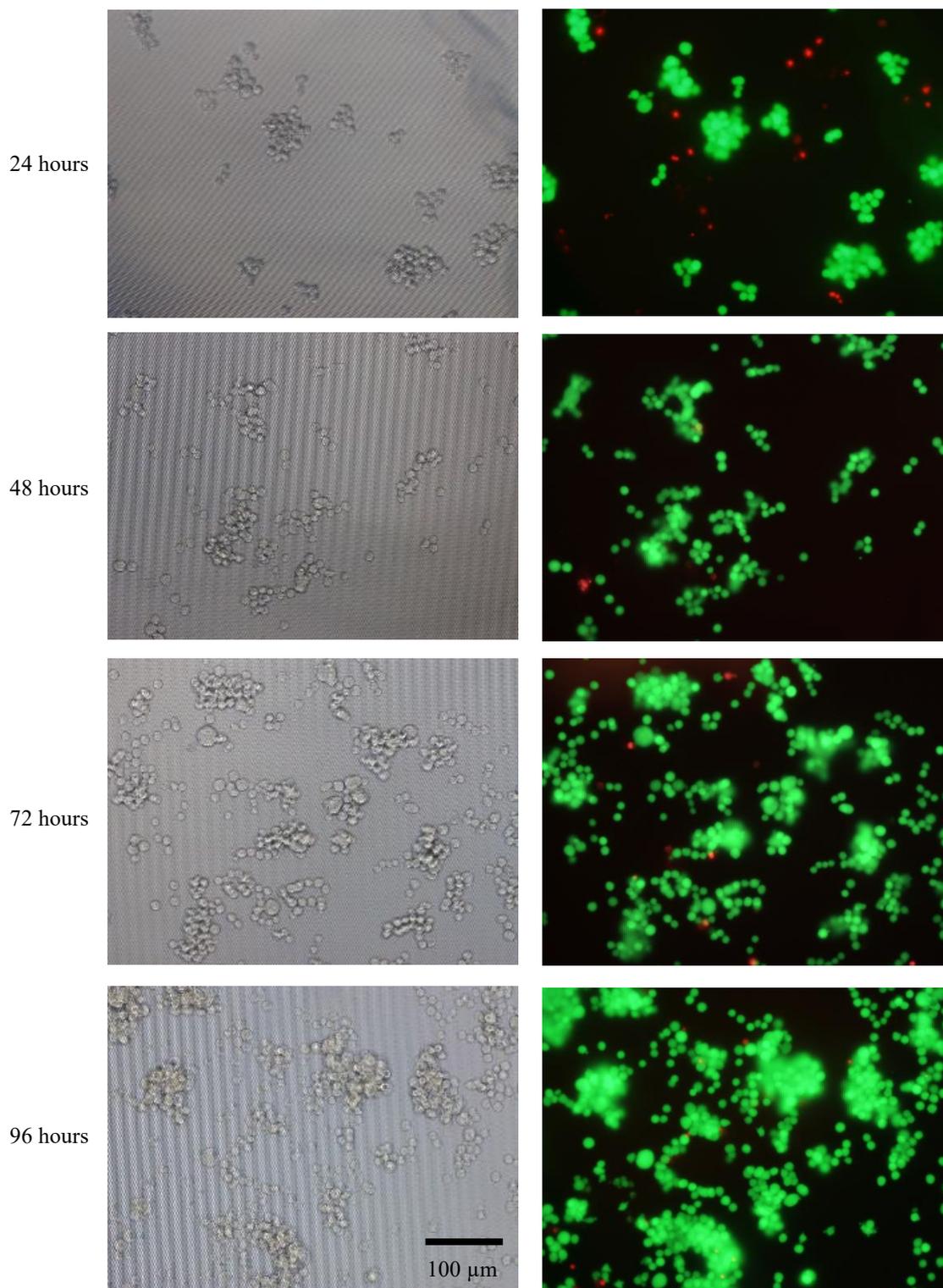


Fig. 6-5 NanoCulture Plate で所定時間培養後に生死染色した際の PANC-1 細胞の位相差顕微鏡像および蛍光顕微鏡像。

Condition: 細胞数  $1.0 \times 10^4$  cells/well in 200  $\mu$ L 10% FBS/RPMI-1640 培地, 2 日に 1 回培地交換。

各臓器がん細胞を 3 種の三次元培養基材に所定量播種し培養した結果, BxPC-3 細胞はいずれの基材においても目的とするスフェロイドが形成されることが観察されたが, PrimeSurface®および EZSPHERE®を用いた際はスフェロイド形成直後からスフェロイドが崩壊

し死細胞が多く観察された。一方で PANC-1 細胞は、いずれの基材においても生存および増殖は観察されたがスフェロイドの形成は観察されなかった。この原因は E-cadherin の発現量が少ないなどの細胞の特性に起因すると推察した。次に所定の基材に播種した各膵臓腺がん細胞の増殖性をルミノアッセイにより評価した。

#### b) 各基材に播種した膵臓腺がん細胞の増殖性評価

各基材に播種した BxPC-3 細胞および PANC-1 細胞の増殖性評価を行った結果を Fig. 6-6 に示した。いずれの基材に播種した BxPC-3 細胞は、培養日数の増加に伴い発光強度の減少がみられ 4 日培養後には、PrimeSurface および EZSPHERE では 70%以上が死滅した。一方で NanoCulture Plate を用いた際には 80%程度の生存率が観測され、PrimeSurface および EZSHERE を用いた場合よりも高い生存率を示した (Fig. 6-6 c)。

PANC-1 細胞はいずれの基材においても増殖し、EZSHERE および NanoCulture Plate を用いた場合では 48 hours 培養後にコンフルエントな状態となり発光量の停滞が観測された (Fig. 6-6)。

#### 6-2-6. まとめ

3 種の三次元培養基材を用いて各膵臓腺がん細胞のスフェロイド形成条件を策定した。その結果、BxPC-3 細胞では各基材の特性に基づいたスフェロイドを形成することができたが、PANC-1 細胞ではいずれの基材においてもスフェロイドを形成することができなかった。この際、NanoCulture Plate において PrimeSurface や EZSPHERE よりも高い生存性を示した。一方で、PANC-1 細胞はいずれの基材においてもスフェロイドを形成することができず、2 次元培養と同様の増殖曲線を示すことが分かった。

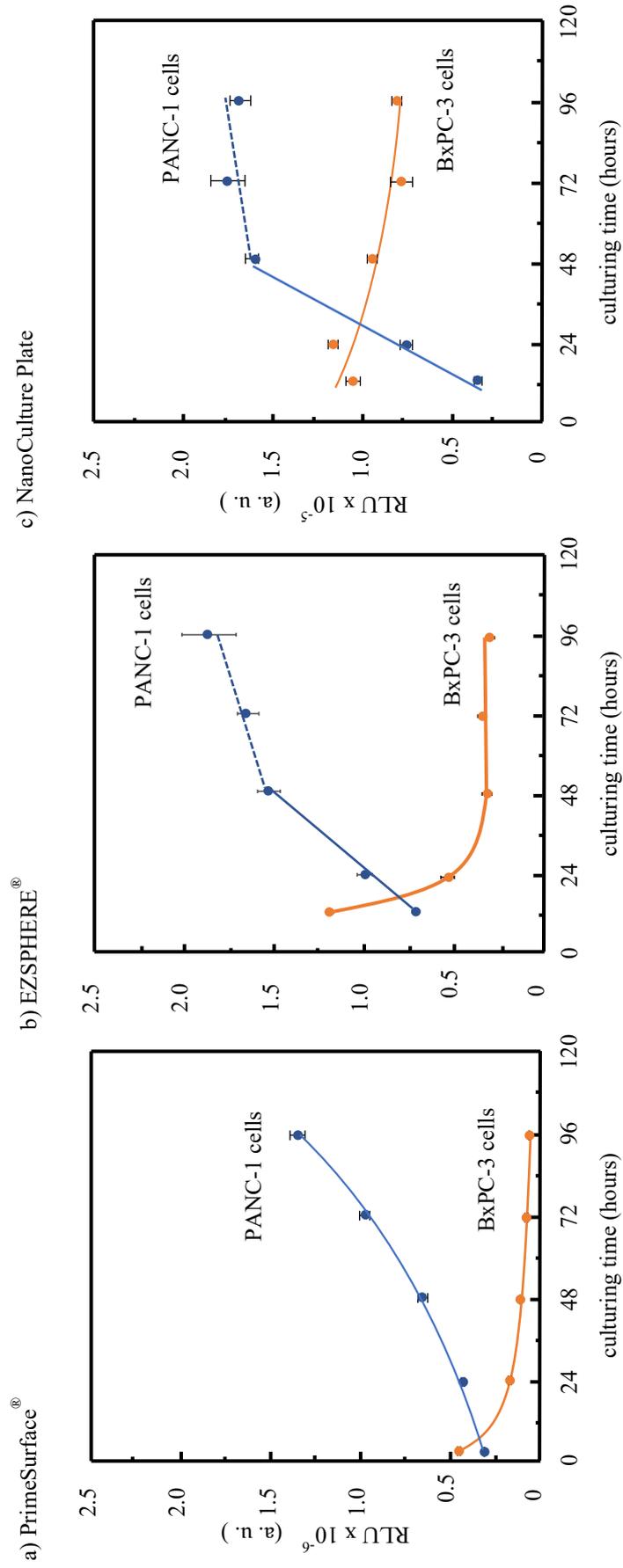


Fig. 6-6 各三次元培養基材に各膵臓腺がん細胞を播種し所定時間培養後の発光量.  
 Condition: a) 細胞数 5000 cells/well, b), c)  $1.0 \times 10^4$  cells/well in 200  $\mu$ L 10% FBS/RPMI-1640 培地, 2 日に 1 回培地交換.

### 6-3. スフェロイド培養した膵臓腺がん細胞の R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc による細胞死誘導評価

#### 6-3-1. はじめに

本項では、生体内環境を模倣した条件での R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc による塩基配列特異的な細胞死誘導評価を目的として、NanoCulture plate 上の BxPC-3 細胞の細胞死誘導について検討した。この際、スフェロイド内部の細胞に R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc が浸透しない可能性が考えられたため、高濃度の R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加することにした。

#### 6-3-2. 試薬

- ・ RPMI-1640 Wako
- ・ Fetal bovine serum
- ・ GloLysis buffer Promega
- ・ CellTiter-Glo<sup>®</sup>2.0 Promega

#### 6-3-3. 器具

- ・ NanoCulture Plate ORGANOXENIX
- ・ マイクロプレートリーダー: Infinite200 pro TECAN

#### 6-3-4. 実験操作

37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で継代培養した BxPC-3 細胞を 200 μL 10% FBS in RPMI-1640 培地中で 1.0 × 10<sup>4</sup> cells/well となるように NanoCulture Plate に播種し、位相差顕微鏡でスフェロイド形成を確認しながら 24 hours 培養した。24 hours 培養後、10 μM R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc in 3% FBS in RPMI-1640 培地となるように各 R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加し 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で 24 hours 培養した。その後、CellTiter-Glo<sup>®</sup>2.0 Reagent を用いた luminescence assay により生存細胞由来の発光量を測定した。細胞生存率は、R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加していないウェルの細胞 (control) の生存率を 100% として各 R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加した際の細胞の発光量をノーマライズして算出した。

#### 6-3-5. 結果および考察

スフェロイド化した BxPC-3 細胞に対する R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc の細胞死誘導について検討した結果、FM 型では 90% 程度、MM 型では 80% 程度の細胞死が観測された (Fig. 6-7)。この結果から、スフェロイド化 BxPC-3 細胞においても R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc が 1 塩基の違いを認識した細胞死を誘導できることが示された。これはスフェロイドを形成した BxPC-3 細胞内においても KRAS 遺伝子の発現を抑制していることを示す。一方で R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_MM においても顕著な細胞死が観測されたが、これはスフェロイド形成によりストレスのかかった細胞に高濃度の R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加したことによる細胞死が原因と推察した。このため詳細な条件の策定を行う必要があると考えられる。

#### 6-3-6. まとめ

スフェロイド形成した BxPC-3 細胞に 10 μM R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加し 24 hours 培養後の細胞死誘導について評価した結果、R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_FM を添加した際に優位な細胞死が観測され、i-PPc が 3 次元組織化された細胞にも作用することが示された。

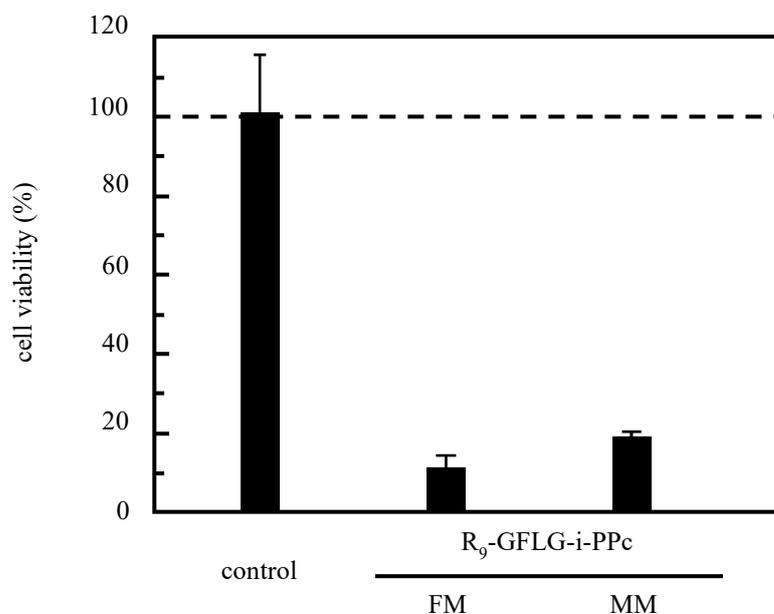


Fig. 6-7 R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加し 24 hours 培養後の BxPC-3 細胞 (スフェロイド) の生存率.

Conditions: 細胞数  $1.0 \times 10^4$  cells/well, [R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc] = 10  $\mu$ M, 24 hours 培養.

#### 6-4. 小括

本項では、より生体内環境を模倣した評価系での R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc による塩基配列依存的な細胞死誘導評価を行った。

まず 3 種の三次元培養基材を用いて各臓器がん細胞のスフェロイド形成について検討した結果、BxPC-3 細胞はすべての基材においてスフェロイドを形成したものの、スフェロイド形成直後および培養日数の増加に伴い細胞が死滅することが分かった。ただし、NanoCulture Plate では BxPC-3 細胞を播種して 4 日培養後においても 80%程度の生存率を示した。一方で、PANC-1 細胞はいずれの基材においてもスフェロイドを形成しなかった。これは細胞の特性に起因することが推察される。

NanoCulture Plate 上で形成した BxPC-3 細胞のスフェロイドに R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加し培養した結果、R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_FM において優位な細胞死誘導が観測され、生体内環境を模倣した評価系においても KRAS 遺伝子の 1 塩基の違いを認識し遺伝子の発現を抑制できることが明らかとなった。

#### 6-5. 参考文献

- 1) A. Abbott, *Nat.*, **424**, 870-872 (2003).

## 第7章 総括

本論文では、生体内温度で1塩基の違いを認識した発現抑制効果を誘起する新規 PNA 型人工核酸の開発を目的として i-PPc を設計・合成し、無細胞タンパク質発現系およびがん細胞内における1塩基の違いを認識した遺伝子発現抑制効果について検討した。

第2章では、ルシフェラーゼ遺伝子を標的とした i-PPc を合成し無細胞タンパク質発現系における遺伝子発現抑制効果および1塩基認識機構について検討した。その結果、ルシフェラーゼ遺伝子の開始コドン領域を標的とした i-PPc において、相補鎖を形成するフルマッチ型 i-PPc (i-PPc\_ATG\_FM) 添加時に90%程度の発現抑制効果がみられたのに対し、C末端側に1塩基の違いを導入したミスマッチ型 i-PPc (i-PPc\_ATG\_MM) では10%程度の発現抑制にとどまった。これは i-PPc が無細胞タンパク質発現系において1塩基の違いを認識して遺伝子の発現を抑制できることを意味しており、この効果は、アンチセンスとして作用していることを明らかとした。

また、i-PPc および PNA 化合物の熱安定性および相補鎖形成挙動を評価した結果、i-PPc\_ATG\_FM が16塩基として synDNA と相補鎖を形成する一方で、相補鎖安定性はC末端側8塩基の PNA oligomer; PNA-C\_FM と同程度であることが明らかとなった。この結果は、i-PPc が塩基配列依存性を維持した状態で相補鎖形成が不安定化していることを示している。また i-PPc の1塩基認識機構は、両末端 PNA oligomer の相補鎖安定性の違いが関与していることが示された。これらの結果は、i-PPc が生体内温度近傍で1塩基の違いを認識し遺伝子の発現を抑制できる新規 PNA 型人工核酸であることを示唆している。

第3章では、がん細胞内での i-PPc による1塩基の違いを認識した遺伝子発現抑制効果について検討した。蛍光ラベル化した i-PPc の細胞内輸送挙動について検討した結果、マクロピノサイトーシス経路で細胞に取り込まれるが、マクロピノソームからサイトゾルへリリースされないことがわかった。このため、サイトゾルへの輸送を目的として膜透過ペプチド (ノナルギニン, R<sub>9</sub>) を導入した i-PPc(R<sub>9</sub>) を合成した結果、i-PPc がサイトゾルに徐放されることが蛍光顕微鏡像より示された。次に Luc<sup>+</sup>発現大腸がん細胞 (HT-29 Luc<sup>+</sup>細胞) に対する i-PPc(R<sub>9</sub>) によるルシフェラーゼ遺伝子の発現抑制について検討した結果、i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM において最大40%の発現抑制効果がみられたのに対し、i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM ではほとんどみられなかった。このことは、i-PPc が細胞内においても1塩基の違いを認識できることを意味している。一方で、遺伝子発現抑制効果があらわれるまでに3-4日所要することから、細胞膜透過シグナルペプチド (R<sub>9</sub>) による輸送効率が低い可能性が示唆された。さらに、この R<sub>9</sub> シグナルペプチドの導入により、37°C での i-PPc の1塩基認識能が低下していることが併せて判明した。

第5章では、i-PPc による KRAS 遺伝子変異性膵がん細胞の細胞死誘導について評価した。KRAS 遺伝子に頻度が高く生じる1塩基変異部位 (exon1, codon12) を標的として、野生型の遺伝子配列と相補性をもつ FM 型と G12D (GGT→GAT) 変異型と相補性をもつ MM 型の塩基配列を配した2系統4種の i-PPc (i-PPc(R<sub>9</sub>), R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc) を合成した。

i-PPc の中央部に R<sub>9</sub> が修飾された i-PPc(R<sub>9</sub>) を KRAS 遺伝子野生型の膵がん細胞 (BxPC-3 細胞) に投与したところ、FM 型で最大40%、MM 型で10%の細胞死が誘導された。一方で、KRAS 遺伝子変異型 (G12D; GGT→GAT) 膵がん細胞 (PANC-1 細胞) では FM 型、MM 型いずれにおいてもほぼ同等 (80%) の細胞死が誘導された。これらの結果から、i-PPc(R<sub>9</sub>) は BxPC-3 細胞内において1塩基の違いを認識し KRAS 遺伝子の発現を抑制している可能性が示唆された。一方

で、PNAC-1 細胞では塩基配列依存的な細胞死を誘導できなかった原因については現時点で不明だが、ノナアルギニンペプチドの導入により i-PPc の 1 塩基認識能が低下したことが一因と考えられる。

I-PPc の分子鎖末端に R<sub>9</sub> が修飾された R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc では、FM 型で BxPC-3 細胞の優位な細胞死 (最大 40%程度) を誘導すること、この際、添加直後から 6 時間後にかけて優位なアポトーシスが誘導されることが示された。また、PANC-1 細胞では MM 型を添加した際に優位な細胞死が観測され (最大 30%程度)、添加後 12~72 時間後にかけて優位なアポトーシスが誘導された。以上より、R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc は BxPC-3 細胞および PANC-1 細胞内において KRAS 遺伝子の 1 塩基変異を認識して発現を抑制し、細胞死を誘導している可能性が示唆された。

第 6 章では、R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc による 3 次元組織化された BxPC-3 細胞に対する塩基配列依存的な細胞死誘導について検討した。スフェロイド化した BxPC-3 細胞に対し 10 μM R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加し 1 日培養後の細胞死亡率は、R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_FM で 90%、R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc\_MM で 80%程度と見積もられ、生体内環境を模倣した条件においても KRAS 遺伝子の 1 塩基の違いを認識できることが示された。

遺伝子内の 1 塩基変異は、疾病・疾患や間接的な問題を引き起こす。このような 1 塩基変異を標的として遺伝子発現を抑制できる人工核酸は、新規の核酸医薬となり得る。これまでに天然核酸の課題点を補った人工核酸は数多く研究されているが、生体や細胞内において 1 塩基変異を高度に認識できる人工核酸は極めて少ないのが現状である。このような背景の中で、本論文で提唱した i-PPc は、以上の成果から生体に適用できる新規の PNA 型核酸医薬としての応用を可能とするものである。細胞内への低い輸送効率やがん細胞へのターゲティングトランスフェクトなどの多くの課題も残っているものの、今後、この基本的な分子設計概念 (inchworm 型) を基とした核酸医薬への実用化が期待される。

## Supplementary data

### 第2章 生体内温度で1塩基変異を認識する inchworm 型ペプチド核酸の合成

#### S2-1. PNA-PEG conjugate および PNA oligomer の Fmoc 固相合成

設計した PNA-PEG conjugate および PNA oligomer を Fmoc 固相合成法により合成し HPLC を用いて精製後 TOF-MS 測定により同定した. その際のクロマトグラムおよび TOF-MS スペクトルを以下に示す.

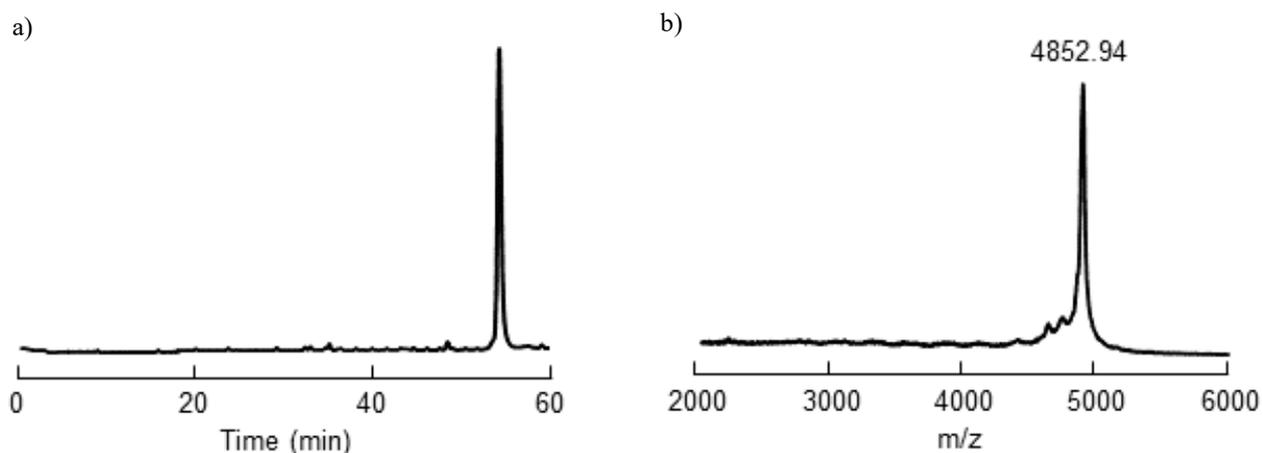


Fig. S1 i-PPc\_T7\_FM の精製後の a) クロマトグラムならびに b) TOF-MS スペクトル.

Conditions: a) ODS-3 column ( $4.6 \times 2.5$  mm, GL Science), 1 mL/min,  $\lambda = 260$  nm, 01% TFA in 5-25% ACN (60 min linear gradient).

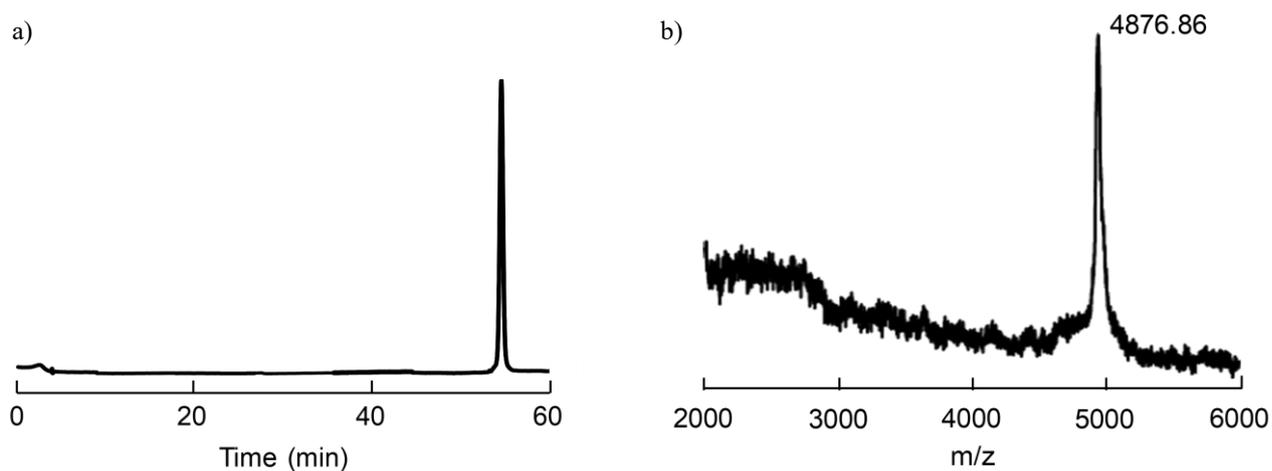


Fig. S2 i-PPc\_T7\_MM の精製後の a) クロマトグラムならびに b) TOF-MS スペクトル.

Conditions: a) ODS-3 column ( $4.6 \times 2.5$  mm, GL Science), 1 mL/min,  $\lambda = 260$  nm, 0.1% TFA in 5-25% ACN (60 min linear gradient).

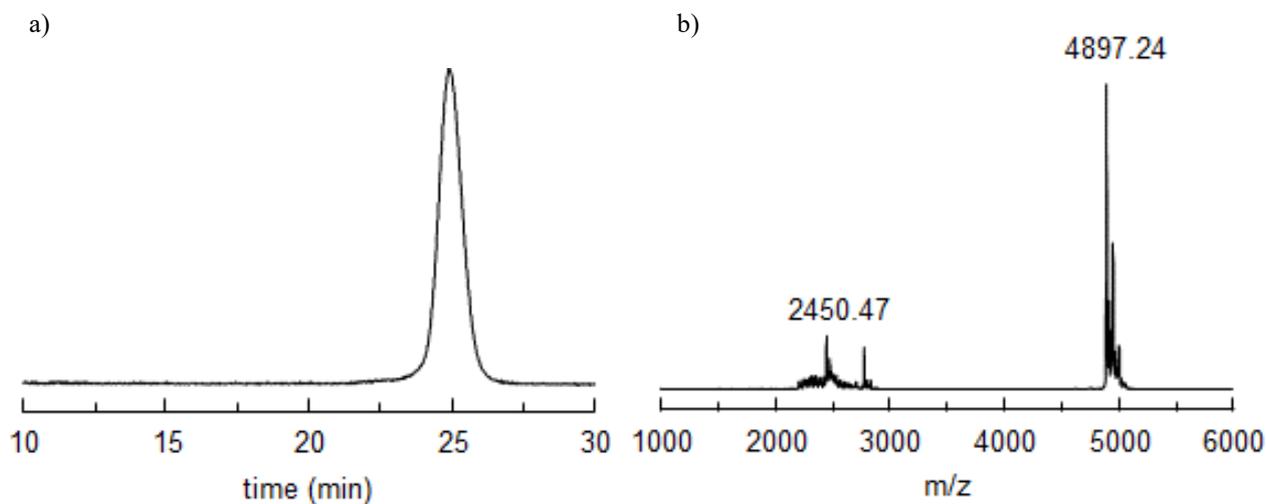


Fig. S3 i-PPc\_ATG\_MM の精製後の a) クロマトグラムならびに b) TOF-MS スペクトル.  
 Conditions: a) ODS-3 column ( $4.6 \times 2.5$  mm, GL Science), 1 mL/min,  $\lambda = 260$  nm, 01% TFA in 5.0-16.5% ACN (25 min linear gradient).

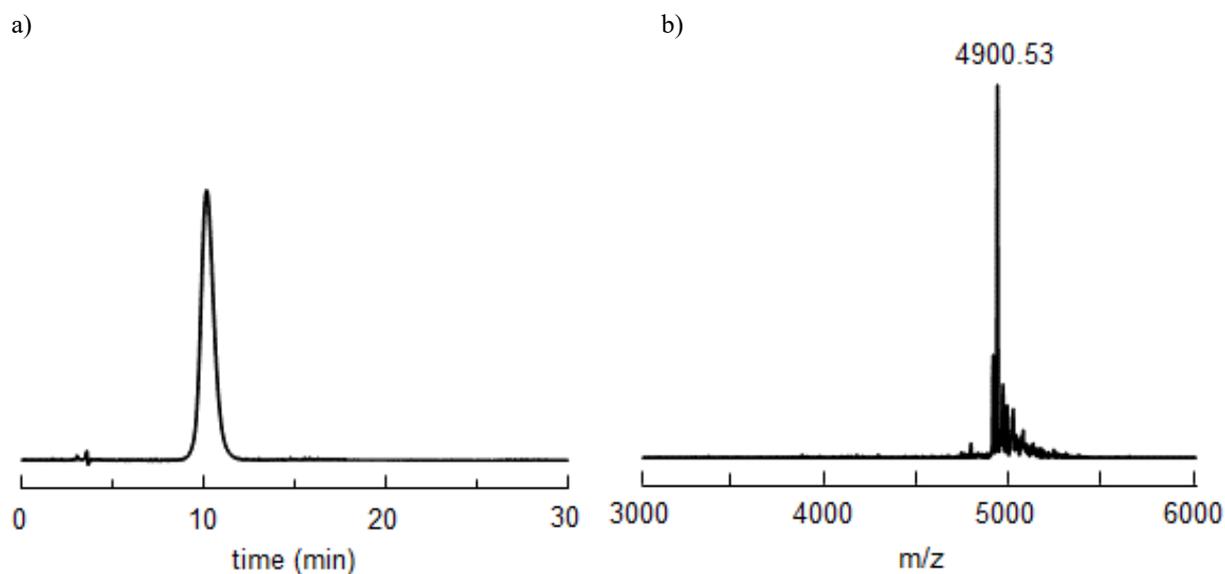


Fig. S4 PNA<sub>16</sub>-PEG<sub>12</sub>\_FM の精製後の a) クロマトグラムならびに b) TOF-MS スペクトル.  
 Conditions: a) ODS-3 column ( $4.6 \times 2.5$  mm, GL Science), 1 mL/min,  $\lambda = 260$  nm, 0.1% TFA in 20-25% ACN (60 min linear gradient).

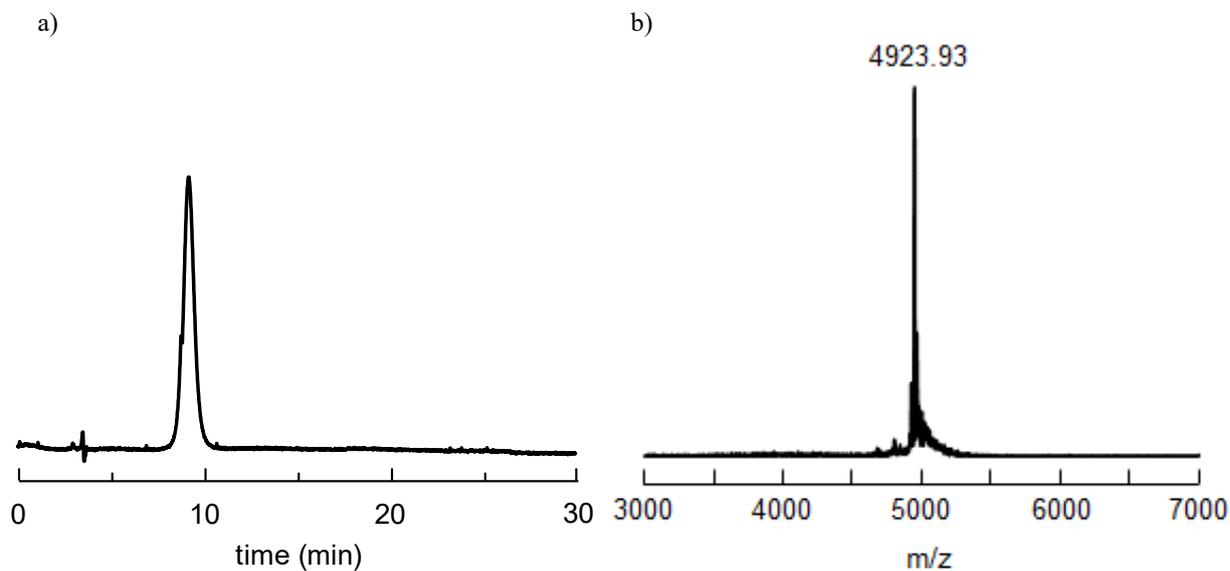


Fig. S5 PNA<sub>16</sub>-PEG<sub>12</sub>\_MM の精製後の a) クロマトグラムならびに b) TOF-MS スペクトル.  
 Conditions: a) ODS-3 column (4.6 × 2.5 mm, GL Science), 1 mL/min, λ = 260 nm, 0.1% TFA in 20-25% ACN (60 min linear gradient).

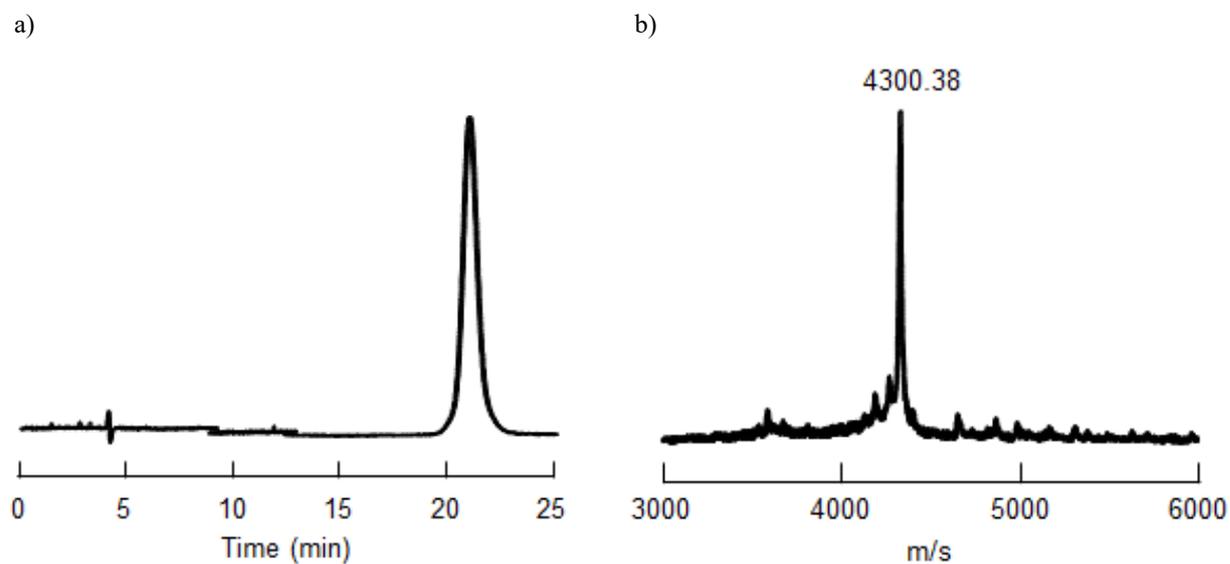


Fig. S6 PNA<sub>16</sub>\_FM の精製後の a) クロマトグラムならびに b) TOF-MS スペクトル.  
 Conditions: a) ODS-3 column (4.6 × 2.5 mm, GL Science), 1 mL/min, λ = 260 nm, 0.1% TFA in 0-100% ACN (100 min linear gradient).

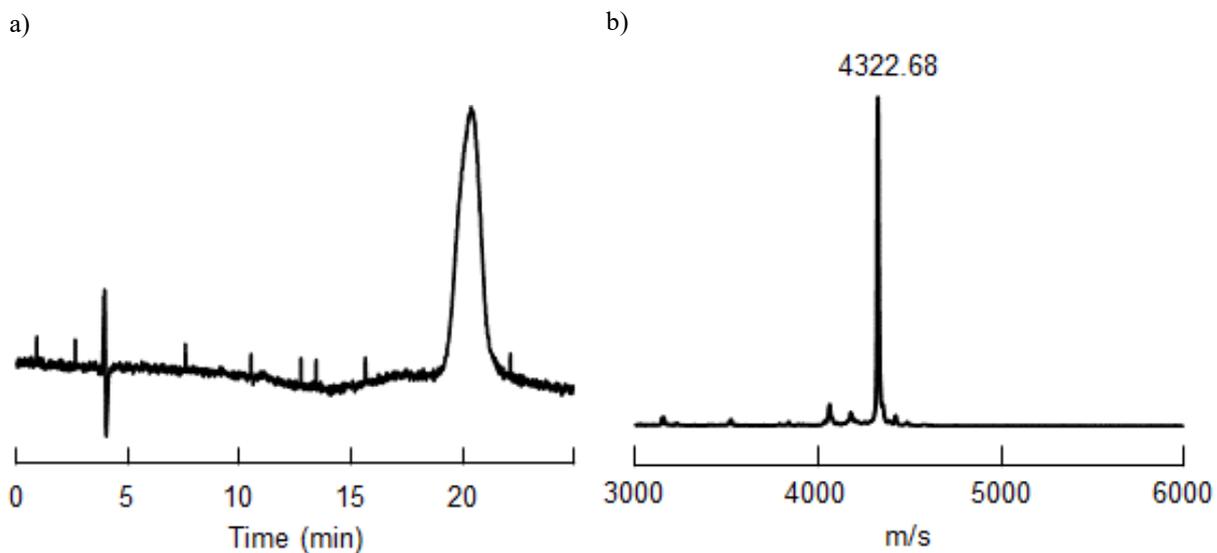


Fig. S7 PNA<sub>16</sub>\_MM の精製後の a) クロマトグラムならびに b) TOF-MS スペクトル.  
 Conditions: a) ODS-3 column (4.6 × 2.5 mm, GL Science), 1 mL/min, λ = 260 nm, 0.1% TFA in 5.0-16.5% ACN (25 min linear gradient).

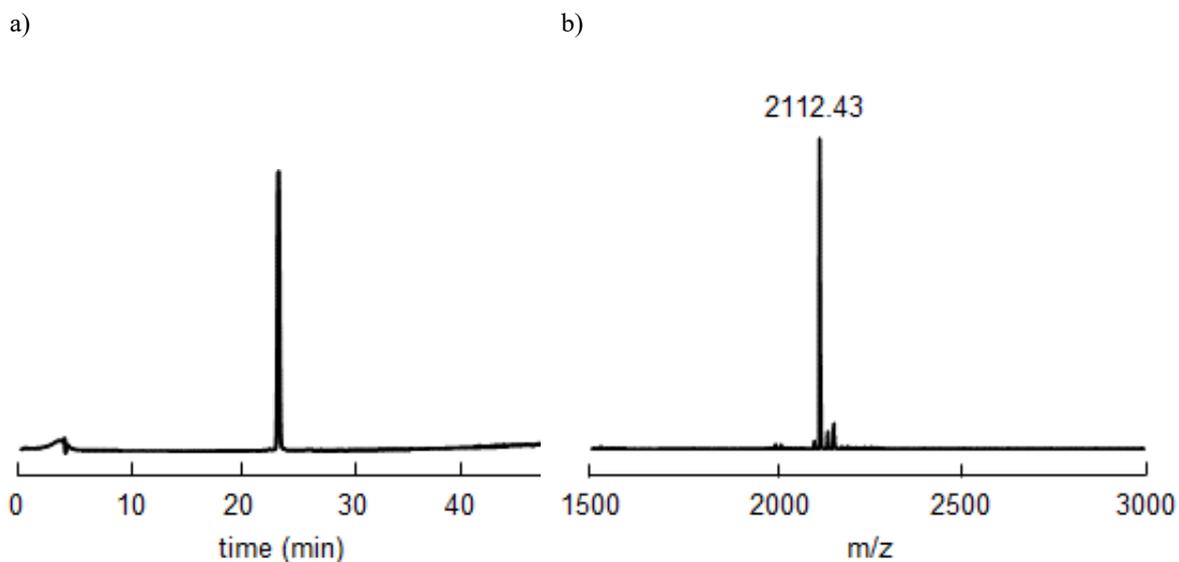


Fig. S8 PNA-C\_FM の精製後の a) クロマトグラムならびに b) TOF-MS スペクトル.  
 Conditions: a) ODS-3 column (4.6 × 2.5 mm, GL Science), 1 mL/min, λ = 260 nm, 0.1% TFA in 5.0-30% ACN (40 min linear gradient).

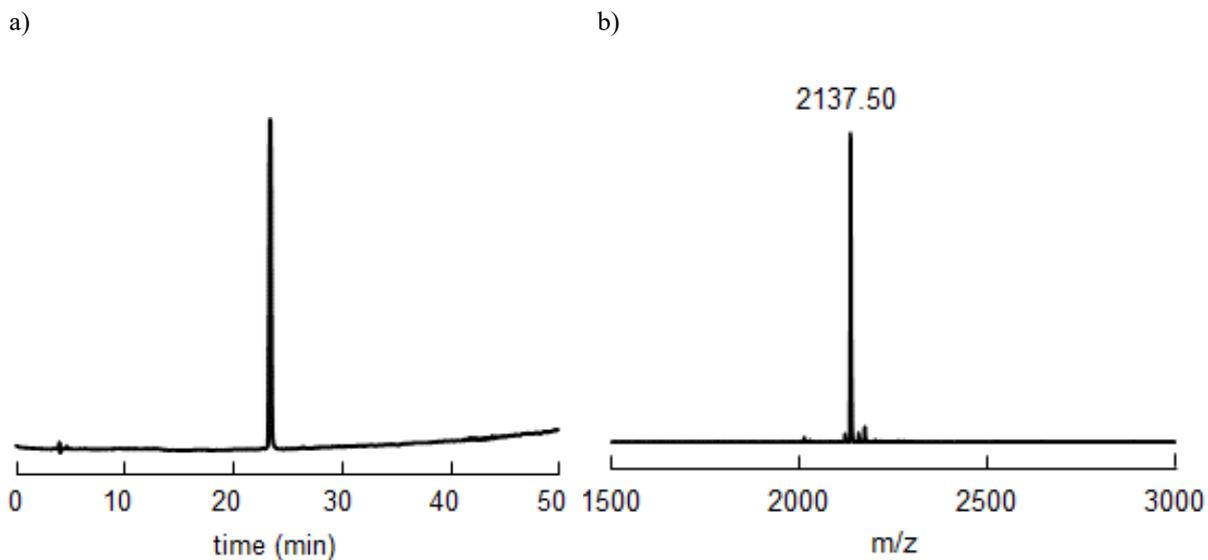


Fig. S9 PNA-C\_MM の精製後の a) クロマトグラムならびに b) TOF-MS スペクトル.  
 Conditions: a) ODS-3 column (4.6 × 2.5 mm, GL Science), 1 mL/min,  $\lambda = 260$  nm, 0.1% TFA in 5.0-16.5% ACN (25 min linear gradient).

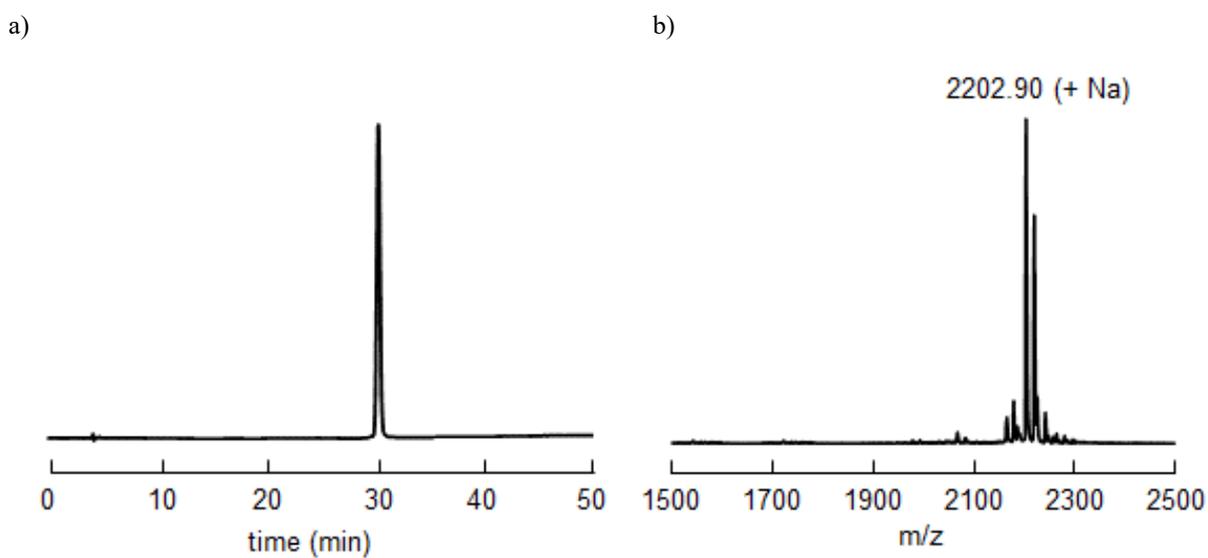


Fig. S10 PNA-N\_FM の精製後の a) クロマトグラムならびに b) TOF-MS スペクトル.  
 Conditions: a) ODS-3 column (4.6 × 2.5 mm, GL Science), 1 mL/min,  $\lambda = 260$  nm, 0.1% TFA in 5-25% ACN (40 min linear gradient).

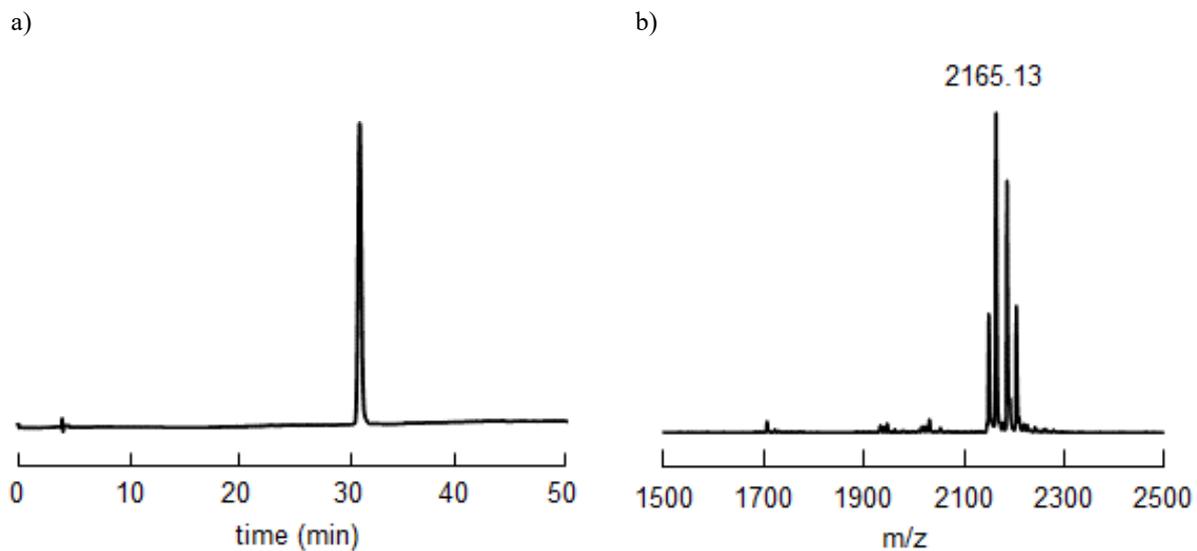


Fig. S11 PNA-N\_MM の精製後の a) クロマトグラムならびに b) TOF-MS スペクトル.  
Conditions: a) ODS-3 column (4.6 × 2.5 mm, GL Science), 1 mL/min,  $\lambda = 260$  nm, 0.1% TFA in 5-25% ACN (40 min linear gradient).

## S2-2. PNA-PEG conjugate および PNA oligomer の熱安定性評価

I-PPcの1塩基認識機構の解明を目的として合成した各PNA-PEG conjugateおよびPNA oligomerの融解温度測定を行った。以下にその結果を示す。

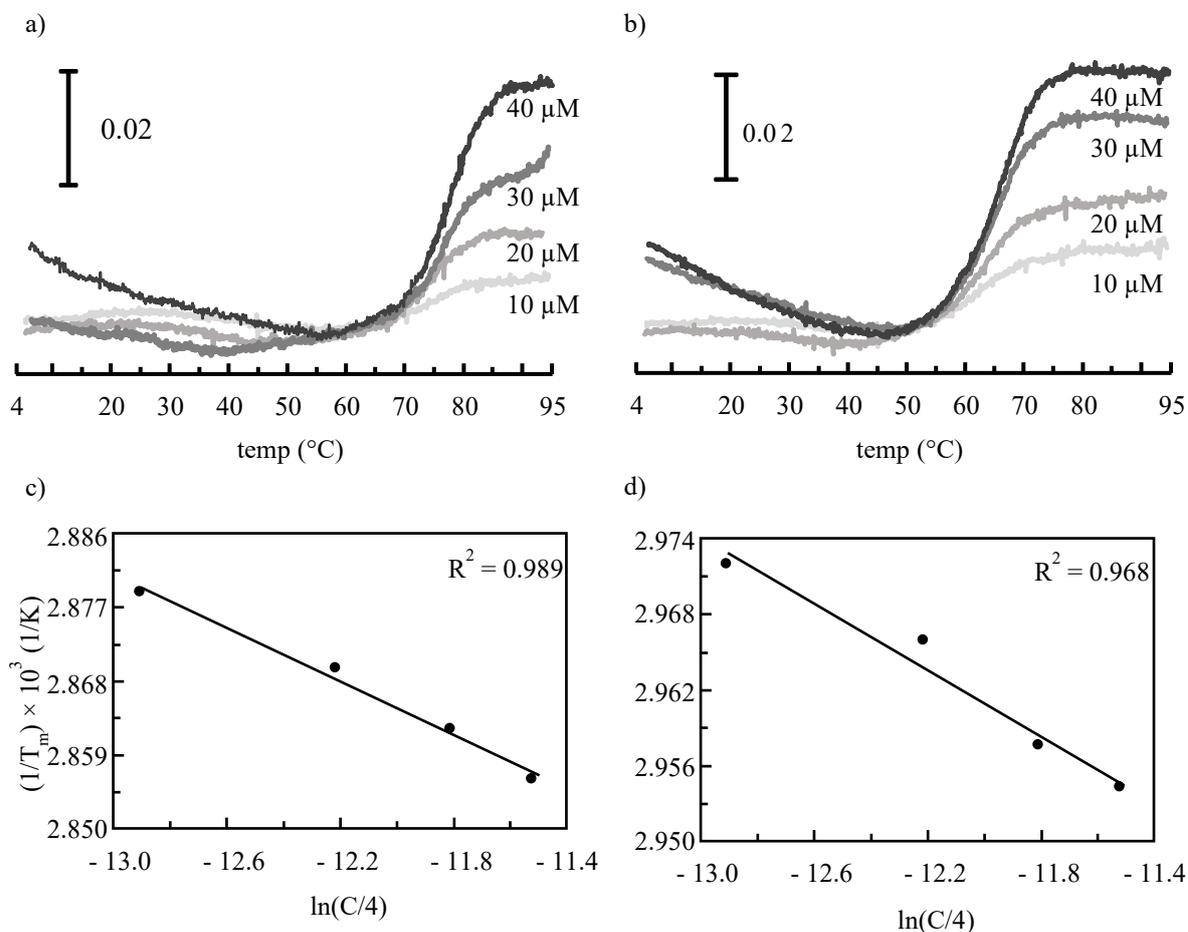


Fig. S12 a), c) PNA<sub>16</sub>-PEG<sub>12</sub>\_FM/synDNA, b), d) PNA<sub>16</sub>-PEG<sub>12</sub>\_MM/synDNA の a), b) 融解曲線および c), d)  $1/T_m$  vs  $\ln(C/4)$  プロット.

Table S1 ブロック型 PNA<sub>16</sub>-PEG<sub>12</sub> conjugate/synDNA の  $T_m$  値.

Sample	Total Conc. (μM)	Temp. range (°C)	$T_m$ (°C)
PNA <sub>16</sub> -PEG <sub>12</sub> _FM	40	60.07-90.00	76.93
	30	60.00-90.03	76.18
	20	59.93-90.00	75.28
	10	60.01-90.02	74.15
PNA <sub>16</sub> -PEG <sub>12</sub> _MM	40	50.07-80.04	65.32
	30	49.94-80.01	64.94
	20	50.02-80.02	63.99
	10	50.01-80.00	63.30

Condition of  $T_m$  measurements : Total conc. 40, 30, 20, 10 μM PNA/synDNA in 10 mM PB (pH 7.0) and 10 mM NaCl, V-630bio spectrophotometer (JASCO),  $\lambda = 260$  nm, 6°C to 90°C at a rate of 1 °C/min.

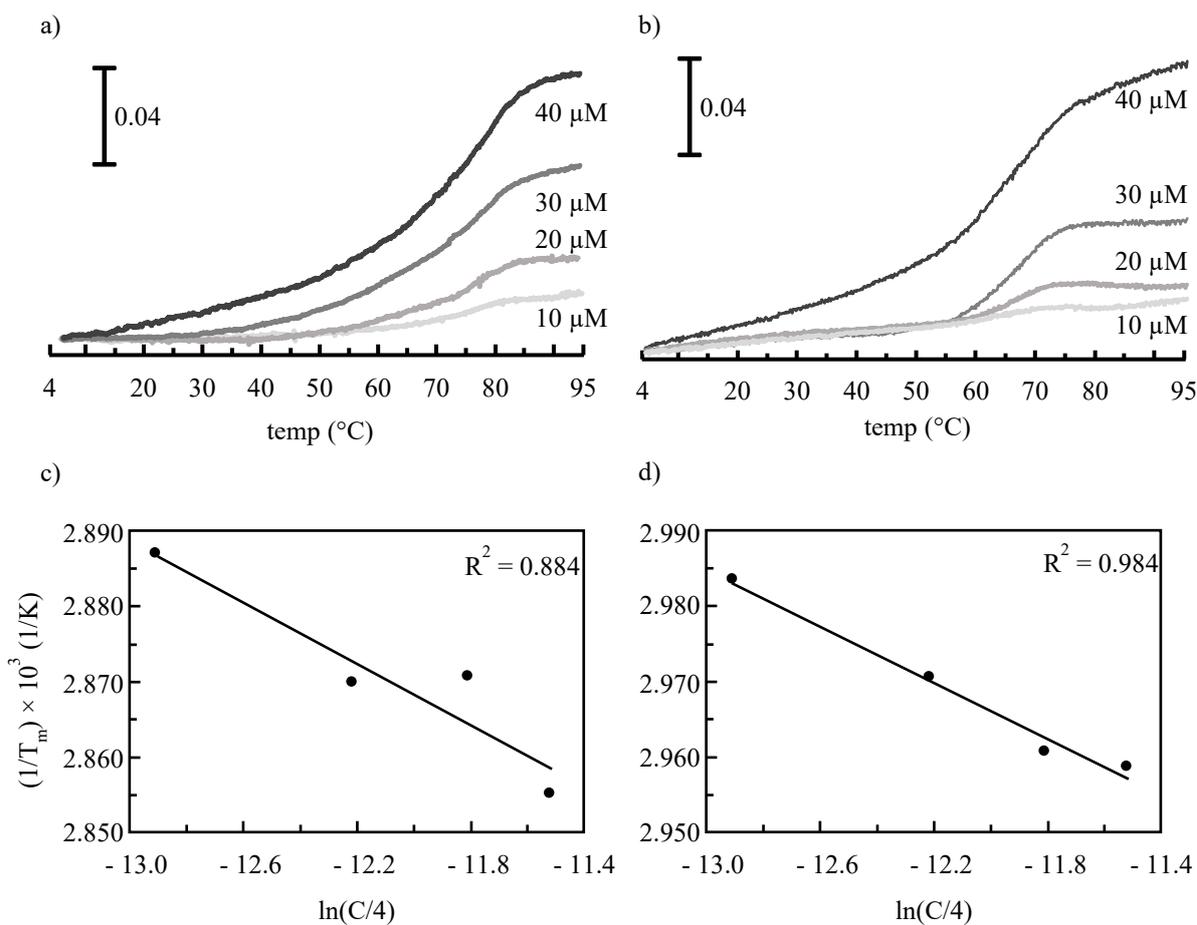


Fig. S13 a), c) PNA<sub>16</sub>\_FM/synDNA, b), d) PNA<sub>16</sub>\_MM/synDNA の a), b) 融解曲線および c), d)  $1/T_m$  vs  $\ln(C/4)$  プロット.

Table S2 PNA<sub>16</sub> oligomer/synDNA の  $T_m$  値.

Sample	Total Conc. ( $\mu\text{M}$ )	Temp. range ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )
PNA <sub>16</sub> _FM	40	50.01-90.00	77.06
	30	50.01-89.94	75.17
	20	55.01-90.11	75.27
	10	48.99-88.90	73.21
PNA <sub>16</sub> _MM	40	40.03-90.02	64.82
	30	39.95-90.00	64.59
	20	40.01-89.99	63.48
	10	40.01-75.00	62.02

Condition of  $T_m$  measurements : Total conc. 40, 30, 20, 10  $\mu\text{M}$  PNA/synDNA in 10 mM PB (pH 7.0) and 10 mM NaCl, V-630bio spectrophotometer (JASCO),  $\lambda = 260$  nm,  $6^{\circ}\text{C}$  to  $90^{\circ}\text{C}$  at a rate of  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

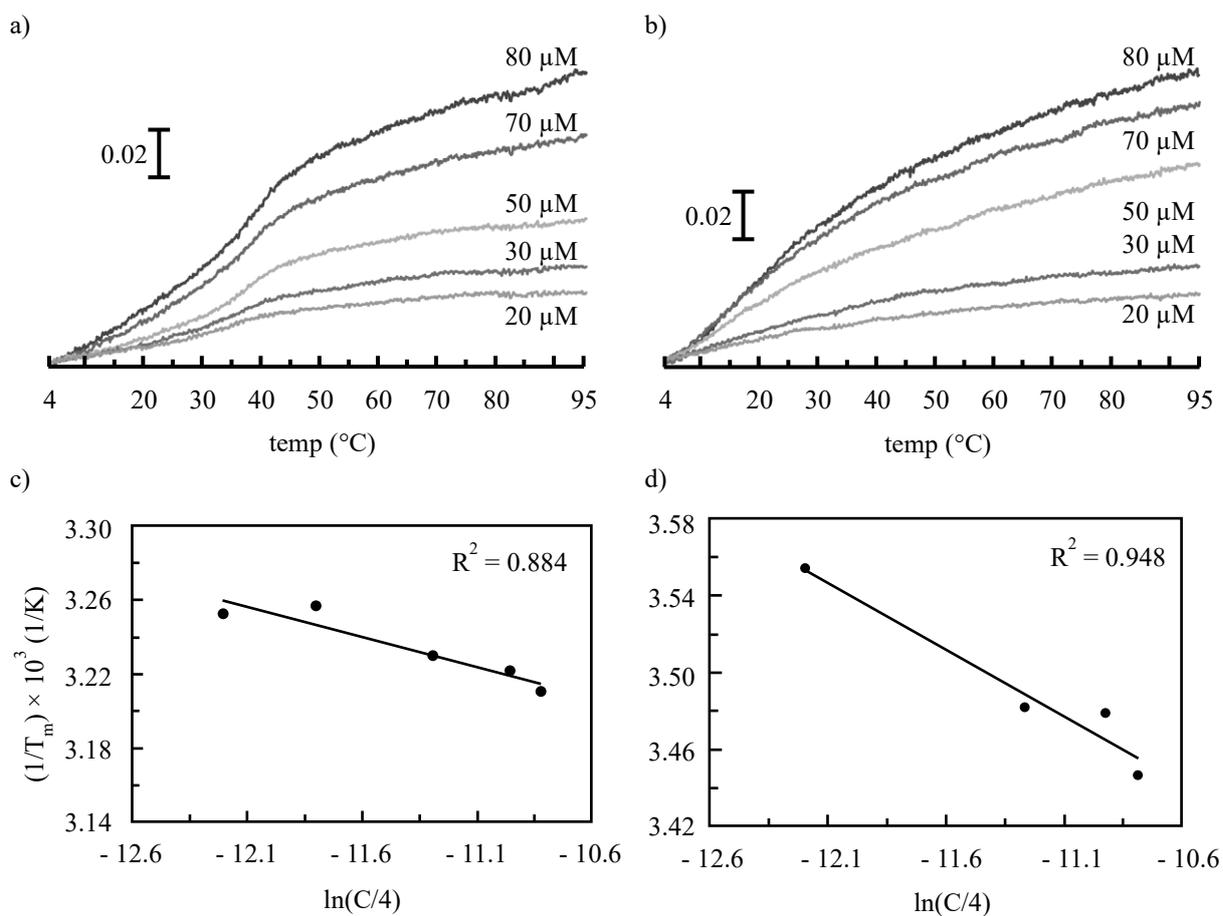


Fig. S14 a), c) PNA-C<sub>FM</sub>/synDNA, b), d) PNA-C<sub>MM</sub>/synDNA の a), b) 融解曲線および c), d)  $1/T_m$  vs  $\ln(C/4)$  プロット.

Table S3 PNA-C oligomer/synDNA の  $T_m$  値.

Sample	Total Conc. ( $\mu\text{M}$ )	Temp. range ( $^{\circ}\text{C}$ )	$T_m$ ( $^{\circ}\text{C}$ )
PNA-C <sub>FM</sub>	80	25.14-50.00	38.40
	70	25.10-50.02	37.31
	50	25.00-50.00	36.54
	30	25.12-55.00	33.92
	20	15.00-45.93	34.35
PNA-C <sub>MM</sub>	80	4.03-35.95	16.97
	70	4.28-36.00	14.28
	50	4.03-36.02	14.05
	30	5.20-30.91	11.66
	20	5.11-30.93	8.19

Condition of  $T_m$  measurements : Total conc. 80, 70, 50, 30, 20  $\mu\text{M}$  PNA/synDNA in 10 mM PB (pH 7.0) and 150 mM NaCl, V-630bio spectrophotometer (JASCO),  $\lambda = 260$  nm,  $4^{\circ}\text{C}$  to  $95^{\circ}\text{C}$  at a rate of  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

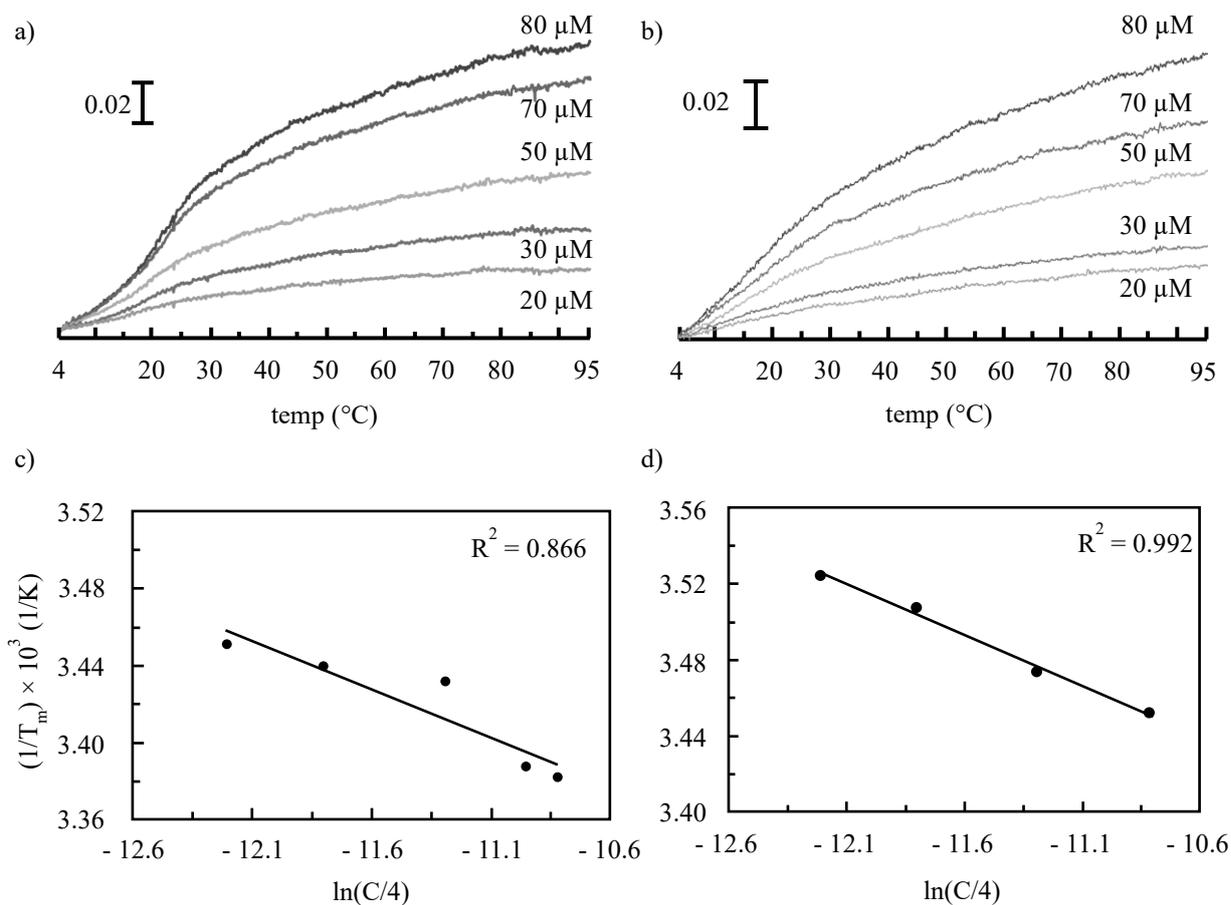


Fig. S15 a), c) PNA-N<sub>FM</sub>/synDNA, b), d) PNA-N<sub>MM</sub>/synDNA の a), b) 融解曲線および c), d) 1/T<sub>m</sub> vs ln(C/4) プロット.

Table S4 PNA-N oligomer/synDNA の T<sub>m</sub> 値.

Sample	Total Conc. (μM)	Temp. range (°C)	T <sub>m</sub> (°C)
PNA-N <sub>FM</sub>	80	5.00-30.07	22.54
	70	5.00-30.02	22.05
	50	10.03-35.04	18.26
	30	4.99-35.00	17.56
	20	5.13-35.02	16.60
PNA-N <sub>MM</sub>	80	4.42-35.07	16.49
	70	4.24-35.01	19.49
	50	4.10-35.03	14.70
	30	4.01-35.02	11.93
	20	4.04-35.00	10.59

Condition of T<sub>m</sub> measurements : Total conc. 80, 70, 50, 30, 20 μM PNA/synDNA in 10 mM PB (pH 7.0) and 150 mM NaCl, V-630bio spectrophotometer (JASCO), λ = 260 nm, 4°C to 95°C at a rate of 1 °C/min.

### 第3章 細胞膜透過型 i-PPc による細胞内での遺伝子発現制御

#### S3-1. SRB-R<sub>9</sub> の細胞毒性評価

精製した所定濃度の SRB-R<sub>9</sub> を 0% または 10% FBS in D-MEM 中で 24 hours 培養した HeLa 細胞の生存率を WST-8 アッセイにより評価した。

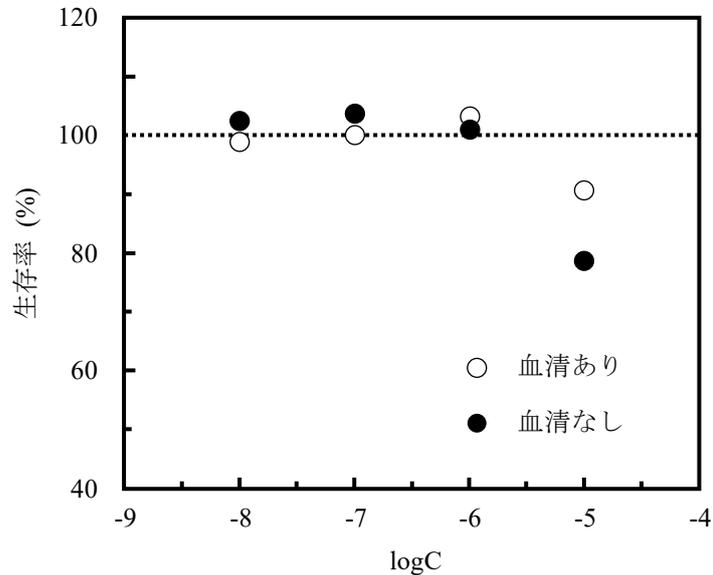


Fig. S16 SRB-R<sub>9</sub> の WST-8 アッセイによる毒性評価.

Conditions: HeLa 細胞 5000 cells/well, [SRB-R<sub>9</sub>] = 10, 1, 0.1, 0.01  $\mu$ M

#### S3-2. i-PPc(R<sub>9</sub>) の細胞毒性評価

$5.0 \times 10^4$  cells/mL の HeLa 細胞に対し 0% FBS in D-MEM 中で 1 hour 取り込ませた後 48 well plate に播種し、所定時間培養後の細胞の増殖性を WST-8 アッセイにより評価した。

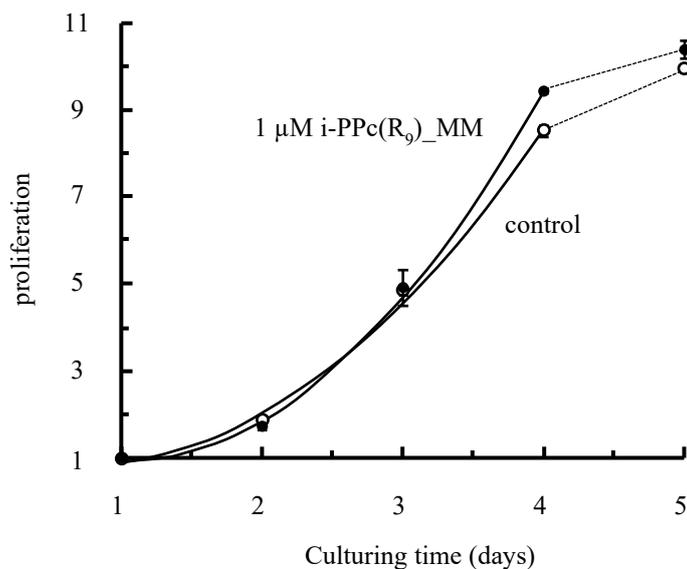


Fig. S17 i-PPc(R<sub>9</sub>) の WST-8 アッセイによる増殖性評価.

Conditions: HeLa 細胞 5000 cells/well, [i-PPc(R<sub>9</sub>)] = 1  $\mu$ M.

## 第5章 KRAS 遺伝子 1 塩基変異を対象とした PNA 型人工核酸の合成

### S5-1. KRAS 遺伝子 1 塩基変異を標的とした i-PPc の塩基配列の決定

各 i-PPc/synDNA の  $T_m$  値を 4-95°C までの 260 nm における吸光度を測定し二次微分法を用いて算出した。

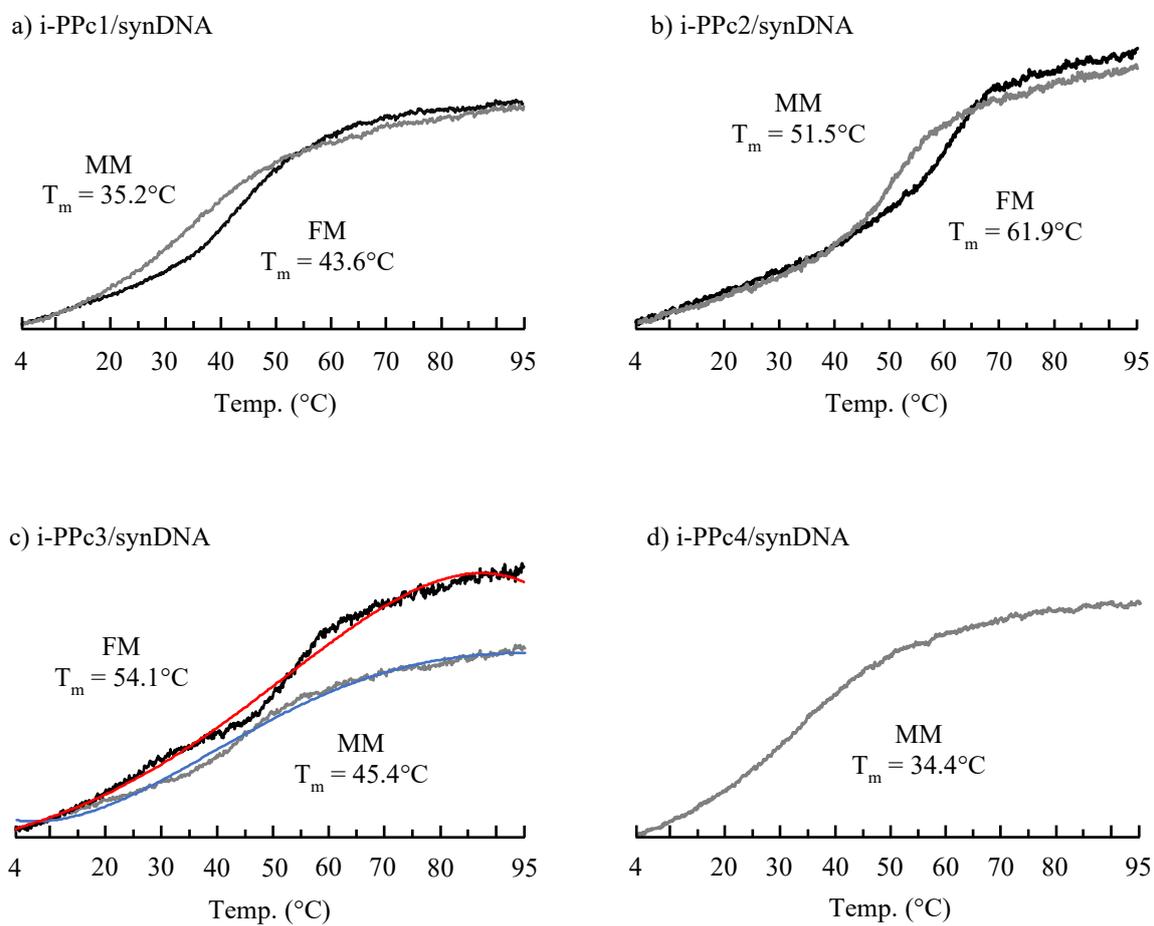


Fig. S18 KRAS 遺伝子を標的とした各 i-PPc の融解曲線.

## S5-2. 所定濃度 FBS in RPMI-1640 培地中における各膵臓腺がん細胞の増殖曲線

所定濃度 FBS in RPMI-1640 培地中の各膵臓腺がん細胞の増殖曲線を WST-8 アッセイを行い作製した。

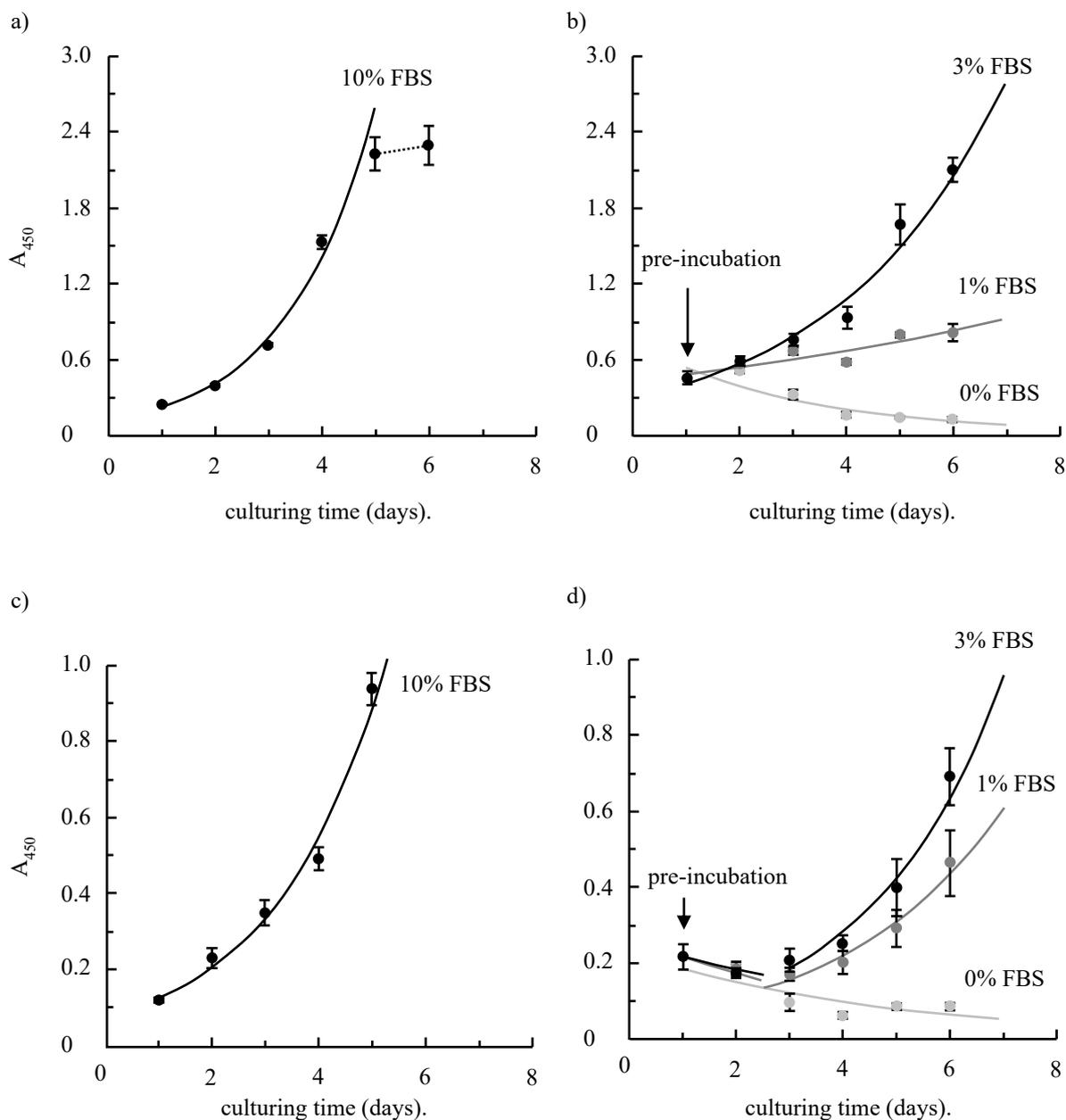


Fig. S19 a), c) 10% FBS, b), d) 3%, 1%, 0% FBS in RPMI-1640 培地中で所定時間培養後の a), b) BxPC-3 細胞および c), d) PANC-1 細胞の増殖曲線。

Conditions: 細胞数 2500 cells/well, 培養 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下, WST-8 アッセイ ( $\lambda = 450$  nm).

### S5-3. PCR チューブ内における各膵臓腺がん細胞の増殖曲線

PCR チューブに各膵臓腺がん細胞を播種し、所定時間培養後にルミノアッセイを行い、増殖性を確認した。

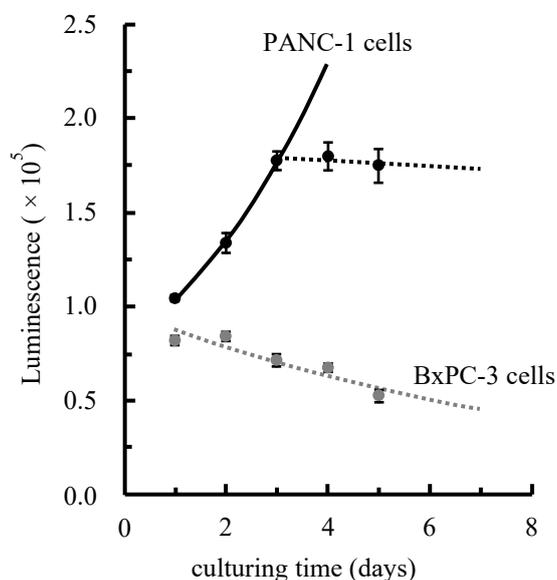


Fig. S20 PCR チューブ内における各膵臓腺がん細胞内の増殖曲線.  
Conditions: 細胞数 2500 cells/tube, 培養: 3% FBS in RPMI-1640 培地, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下.

### S5-4. i-PPc(R<sub>9</sub>)/synDNA の融解曲線

KRAS 遺伝子を標的とした i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM/synDNA および i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM/synDNA の T<sub>m</sub> 値をそれぞれ分光光度計 (JASCO V630bio) および CD スペクトル測定装置を用いて測定した。

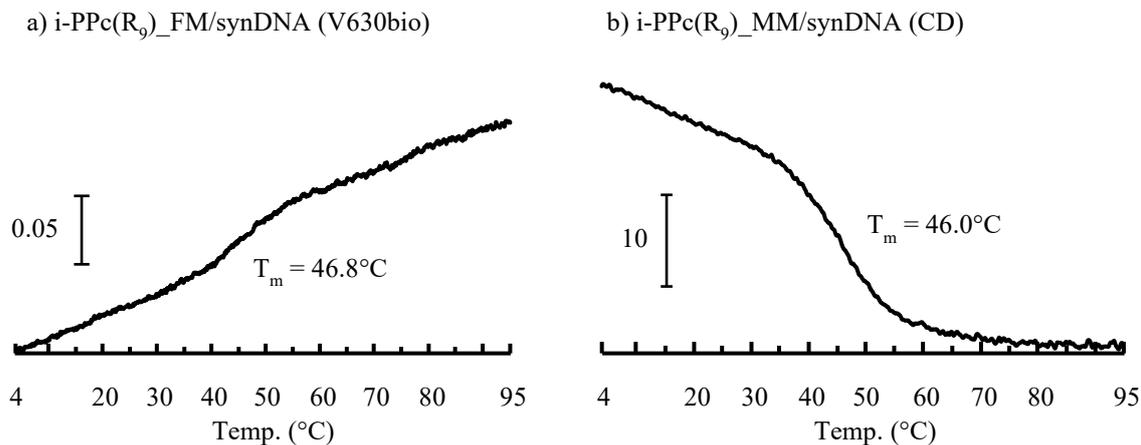


Fig. S21 80  $\mu$ M a) i-PPc(R<sub>9</sub>)\_FM/synDNA ならびに b) i-PPc(R<sub>9</sub>)\_MM/synDNA の融解曲線.  
Conditions: b) 感度: standard (100 mdeg), データ取り込み間隔: 0.1°C, 測定波長: 263 nm, 温度勾配: 0.1 °C/min, 開始温度: 4°C, 終了温度: 95°C, バンド幅: 3 mm, レスポンス: 4 sec, データ間隔: 0.1°C.

### S5-5. 細胞観察による細胞死評価

各 R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc を添加して 24 hours 培養後の各膵臓腺がん細胞の生死染色を行い、24 hours 培養後の状態を蛍光顕微鏡観察により細胞死亡率を評価した。

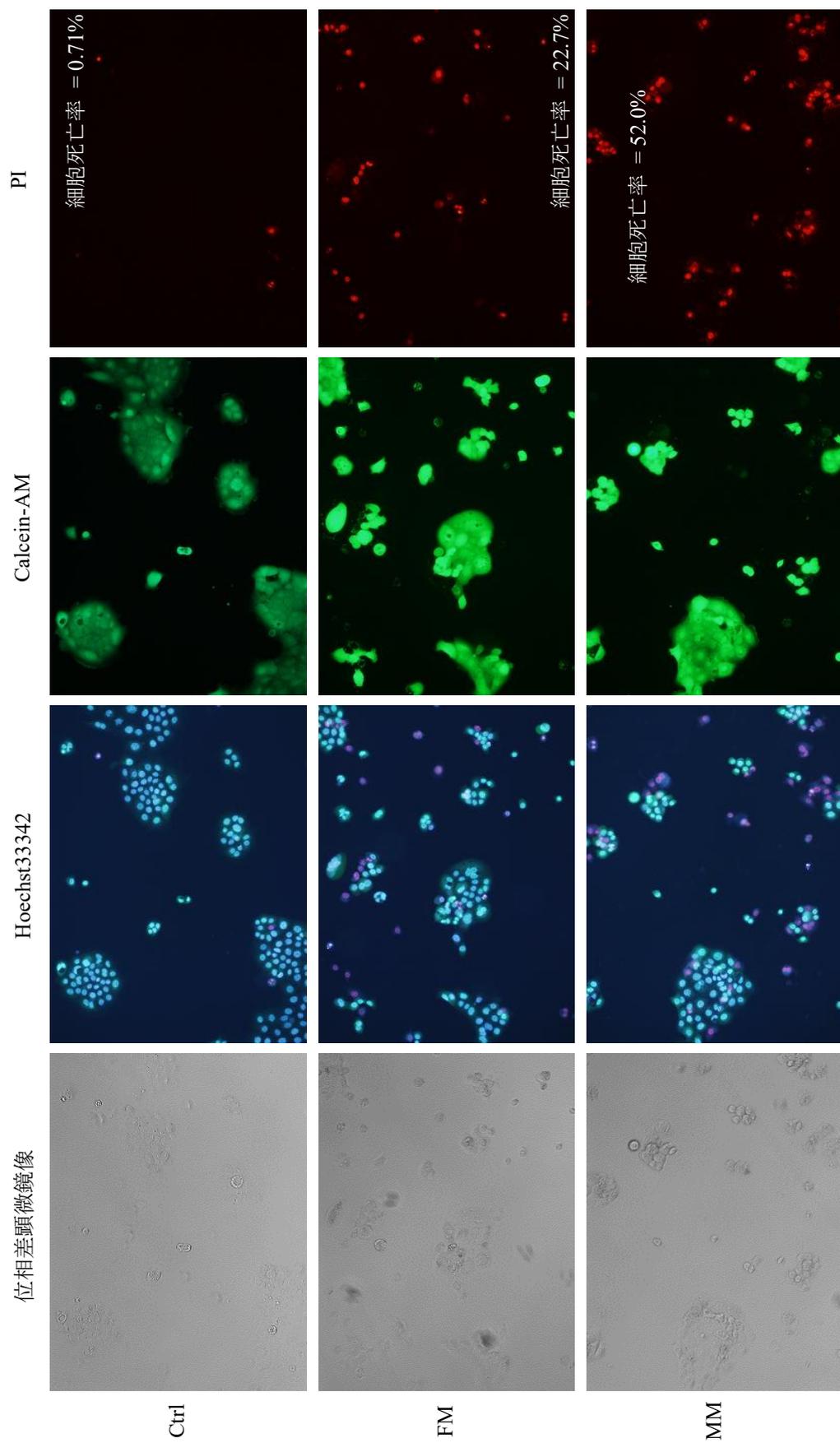


Fig. S22 R<sub>9</sub>GFLG-i-PPc を添加して 24 hours 培養後に生死染色後の BxPC-3 細胞の蛍光顕微鏡像。  
 Conditions: 細胞数 2500 cells/well, 3% FBS in RPMI-1630 培地, [R<sub>9</sub>GFLG-i-PPc] = 3 μM.

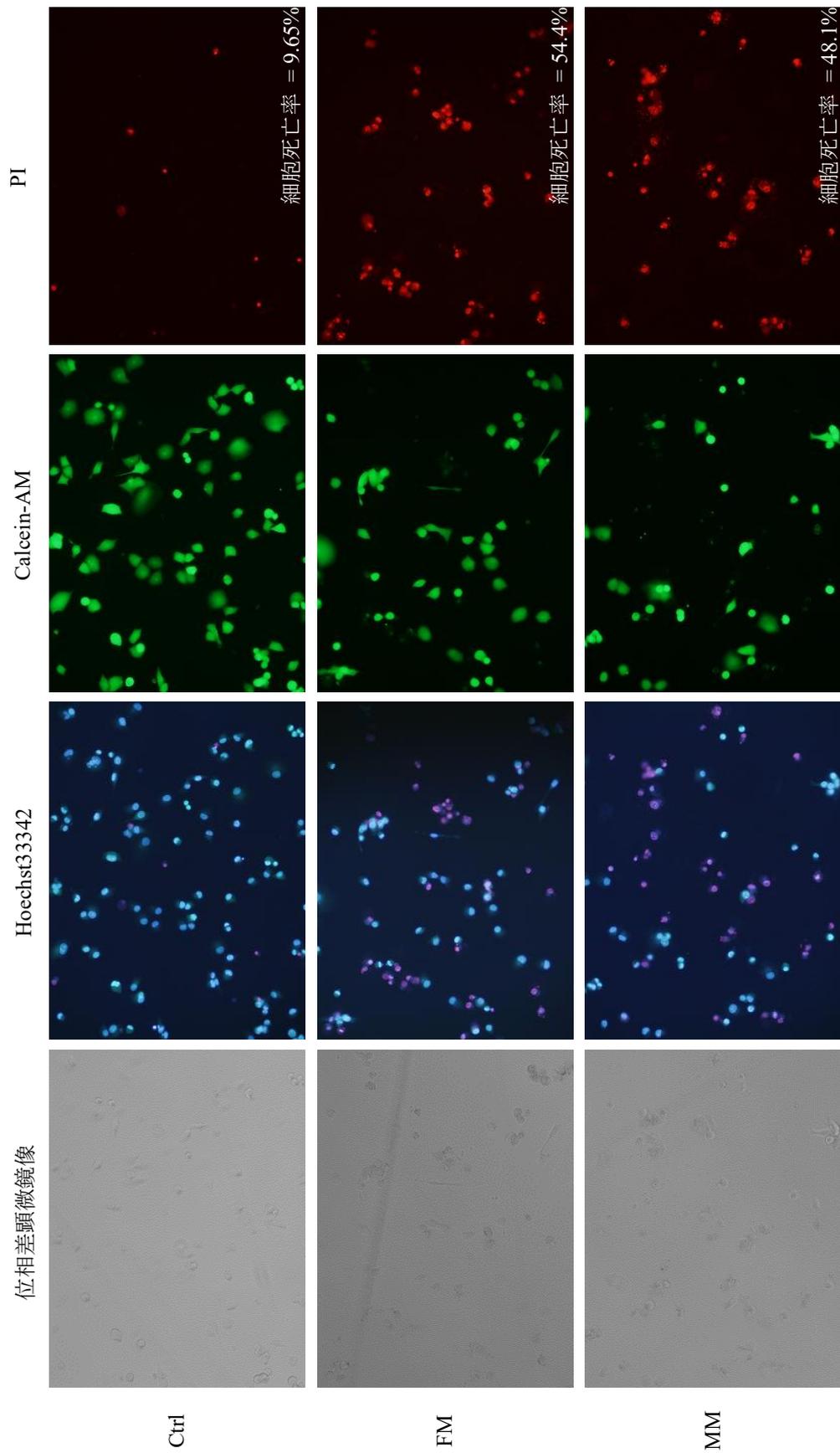


Fig. S23 R<sub>9</sub>GFLG-i-PPc を添加して 24 hours 培養後に生死染色後の PANC-1 細胞の蛍光顕微鏡像。  
 Conditions: 細胞数 2500 cells/well, 3% FBS in RPMI-1630 培地, [R<sub>9</sub>-GFLG-i-PPc] = 3 μM.

## 謝辞

本研究は、鳥取大学工学部化学・バイオ系学科生物有機化学研究室(木瀬研究室)で行われたものです。日々の研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、ご指導を賜りました指導教官であり主査を務めていただいた木瀬 直樹教授ならびに河田 康志教授、そして直接研究のご指導をしてくださった櫻井 敏彦准教授に深く感謝しております。少数精鋭で主体的に行動しやすい本研究室は、私自身が成長するために最も良質な環境だったと思っております。その中で様々な研究に挑戦させていただけたこと、研究に対する考え方や実験の手法を懇切丁寧に、時には叱咤激励しながらご指導いただいたこと、本当に感謝しております。また研究を通して、力強いストレートな言葉でご指導いただいた研究者だけでなく人としての考え方は、私が社会に出た際の土台となると信じております。この7年間にわたり恩師を超えることを考え努力し続ける中で、将来の自分の方向性を見出すことができたことが、私にとって最も価値のあることだと感じております。社会においても、恩師から受け継いだポジティブ精神や考え方に自分の価値を付加しながら、これからも全力で物事に取り組んでいこうと思います。7年間の研究生活を支えていただき、本当にありがとうございました。

また、竹内 章子氏や柴田 崇弘氏をはじめとして研究室の後輩諸氏にも刺激を受けながら研究を遂行することができました。本当にありがとうございました。

最後に、私が自分で選んだ道を進むことを温かく見守り辛抱強く支援してくださった両親に対し、深い感謝の意を表して謝辞と致します。