

# 細胞内環境応答性人工核酸の開発とがん細胞特異的遺伝子治療薬への応用 —ペプチドリボ核酸-DNA キメラ人工核酸の合成と核酸認識および遺伝情報発現制御への展開— Development of Intracellular Environment Corresponding Artificial Nucleic Acids and Applied for Cancer Cell Specific Gene Therapeutics; Synthesis of Peptide Ribonucleic Acid (PRNA)-DNA Chimeras and Their Interaction Properties with Target RNA and RNase H activity of Chimera-RNA Complexes

上松亮平・水谷達哉・坂本清志・荒木保幸・和田健彦（東北大多元研）

1. 我々は、副作用が少なく適用範囲拡大が期待できる次世代の遺伝子治療薬創製を目指し、外部因子による標的 RNA との錯体形成⇄解離の自在な制御機能を有するペプチドリボ核酸 (PRNA)の開発を行っている。我々は、がん細胞特異的核酸医薬の創製を目指し、ペプチドリボ核酸 (PRNA) を設計・合成し、その特性について報告してきた。PRNA はがん細胞内環境 (細胞質 pH= 6.2) をトリガーとし、がん細胞内でのみ miRNA や siRNA、mRNA など標的 RNA に対する高い塩基配列選択的錯体形成能を有し、遺伝子治療薬としての高い効果を発現するのに対し、正常細胞内 (pH 7.2) では RNA のみならず DNA とも相互作用せず副作用を発現しない理想的ながん細胞特異的核酸医薬として期待されている新規人工核酸である<sup>1</sup>。しかし、PRNA と RNA との錯体の安定性は中程度であり、RNase H の基質となりにくいなど改善すべき点も有している<sup>2</sup>。PRNA/標的 RNA 錯体が、RNase H の基質となれば PRNA は触媒的に機能し効果的な薬効が期待され、実用性の高い遺伝子治療薬としての展開が期待される。

このような背景を踏まえ、本研究では多彩な機能を理論的かつ簡便に付与可能な”モジュール法”を PRNA 合成に適用し、PRNA をがん細胞特異的機能発現モジュール、DNA を触媒的 RNA 分解機能発現モジュール、PNA を安定錯体形成モジュールとしてとらえ、標的 RNA と安定錯体を形成し、かつ錯体が RNase H の基質となり、触媒量で高い遺伝子治療効果発現が期待できる PRNA-PNA-DNA キメラ人工核酸(P<sub>R</sub>PD, 図 1)を設計した。

2. P<sub>R</sub>PD は、DNA 自動合成機によりアミノ末端を有する DNA を合成した後、DNA 自動合成機で用いた CPG カラムを活用し、このカラム内での Fmoc ペプチド固相合成法により各モノマーを順次導入する、新規合成法を開発した。しかし、当初市販の Bhoc 基導入モノマーを用いていたが、酸性脱保護条件下での DNA のデプリネーションが観察されたため、塩基性条件下で脱保護可能な PNA モノマーを新規合成に取り組んだ。種々保護基を検討した結果、Bz 基で保護した C、A、G が脱保護条件を含め適切であることを見出し、Bz 保護 PNA モノマーの比較的高収率合成法を確立した。この新規モノマーを P<sub>R</sub>PD 合成に適用したところ、高収率・高純度での合成に成功し、新規合成法の開発に成功した。なお各化合物は HPLC での単離・精製の後 CSI-TOF Mass と NMR で同定した。

3. 得られた P<sub>R</sub>PD の標的 RNA 認識ならびに RNA との錯体の RNase H 活性、ならびにタンパク質合成など遺伝子機能発現抑制効果について検討した。P<sub>R</sub>PD は標的 RNA に対し、高い塩基配列特異的安定錯体形成機能を有すると共に、P<sub>R</sub>PD/RNA 錯体は高い RNase H 切断活性を示し、触媒的遺伝子治療薬としての高いポテンシャルを有することが明らかとなった。これらの結果を踏まえ、無細胞合成系での遺伝子発現抑制を評価したところ、P<sub>R</sub>PD が高い遺伝子発現抑制機能を示すことが示された。そこで siRNA をターゲットとし、*in cell* における RISC 複合体形成抑制に基づく遺伝子治療薬としての機能についても検討したので併せて報告する。

<参考文献>

1) (a) T. Wada; N. Minamimoto; Y. Inaki; Y. Inoue, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6900-6910; (b) T. Wada; *et al. Biopolym.* **2004**, *76*, 15-20; (c) T. Wada; *et al. Chem. Lett.*, **2010**, *39*, 112-113(Editor's Selected); (d) T. Wada; *et al. C.S.J. Curr. Rev.* **2011**, *6*, 71-77; (e) T. Wada; *et al. Frontier of Chem.* **2011**, *2*, 135-144; (f) T. Wada; *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2011**, 10379-10381.

2) T. Wada; Y. Inoue, *Tetrahedron* **2003**, *59*, 7871-7878; (b) T. Wada; *et al. Tetrahedron*, **2010**, *66*, 344-349.

発表者紹介

氏名 上松 亮平 (うえまつりょうへい)  
所属 東北大学多元物質科学研究所  
東北大学大学院理学研究科化学専攻  
学年 博士課程 (前期) 2年  
研究室 生命機能制御物質化学研究分野 (和田研究室)

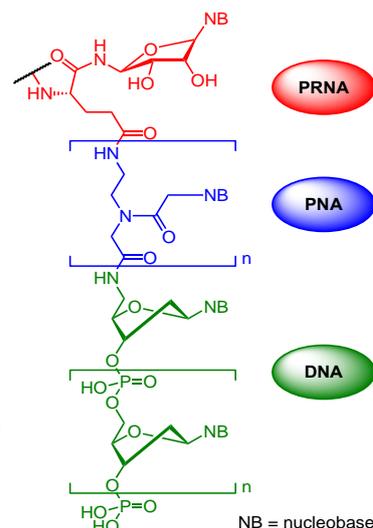


図 1 キメラ人工核酸 (P<sub>R</sub>PD)

