アポトーシス回避を指標としたアンチセンス効果の 選択的評価方法

田代康壽貴^{*1)}, 山口十四文・実吉峯郎^{*2)}, 綿矢有佑^{*3)}, 長谷川哲也・川口健夫^{*1)}

Inhibition of 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FUdR) induced apoptotic cell death by c-fos and c-jun antisense oligodeoxynucleotides

Novel assay method for antisense effect of oligodeoxynucleotides was designed. Antisense oligodeoxynucleotides (21mer) complementary to the region of the translation start site of *c-jun* and *c-fos* protooncogene inhibit apoptotic FM3A cell death induced by 5-fluoro-2'-deoxyuridine. Since antisense effect can be detected as survival of the cells, non-specific cytotoxicity of oligodeoxynucleotides can be neglected in this system. Though this inhibition effect is not directly related to a certain clinical target, the system is useful for the evaluation of novel designs in oligodeoxynucleotide molecules and/or antisense carriers. Phosphorothioate and 3'-terminal modified oligodeoxynucleotides were evaluated for their antisense effect in this system.

Yasutaka Tashiro^{*1)}, Toshifumi Yamaguchi・Mineo Saneyoshi^{*2)}, Yusuke Wataya^{*3)}, Tetsuya Hasegawa・Takeo Kawaguchi^{*1)}

key words : oligodeoxynucleotide, antisense, apoptosis, 5-fluoro-2'-deoxyuridine, FM3A

オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)をアンチセンスとして臨床応用するうえでの問題点として、ヌクレアーゼ分解による不安定性、生体膜透過性の低さなどが指摘されており、その改善・解決のために、多くの ODN 分子のデザインや各種

のキャリアの応用が検討されている。新しい分子デザインやキャリアの性能を評価する際、標的センスに対する特異的アンチセンス効果と、ODN 分子の一般的構造やキャリア自身に由来する非特異的効果を分離して検討することが必要である。従来、アンチセンス効果の評価には、標的遺伝子(センス)がコードする蛋白の産生阻害や、蛋白合成阻害に伴う細胞増殖阻害などが指標として用いられてきた。しかし、これらの現象は、polyanion である ODN 分子や cationic リポソームなどのキャリアが本質的に持っている細胞障害性によっても容易に引き起こされる。

筆者らは、アンチセンス ODN の塩基配列特異的な効果(アンチセンス効果)のみを効率的に検出するために、アンチセンス ODN による培養細胞のアポトーシス回避を指標とした評価方法を考案した。

細胞内のデオキシヌクレオチドプール imbalance が、エンドヌクレアーゼの発現を促し、2本鎖 DNA が切断されることによって、アポトーシスが誘導されることが知られている¹⁻³⁾。一方、癌原遺伝子 *c-fos*, *c-jun* の発現は、成長因子依存性細胞のアポトーシスに関与していることが報告されているが⁴⁾、近年、上記のデオキシヌクレオチドプール imbalance によって誘導されるエンドヌクレアーゼの発現にも関わっていることが明らかとなった⁵⁾。

本検討では、デオキシヌクレオチドプール imbalance の誘導剤として、チミジル酸の生合成阻害剤である 5-フルオロ-2'-デオキシウリジン(FUdR)を用い、FUdR 添加によって誘導されるマウス乳癌細胞(FM3A)のアポトーシスが、*c-fos*

^{*1)} Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University 城西大学薬学部

^{*2)} Department of Biological Sciences, Teikyo University of Science & Technology 帝京科学大学バイオサイエンス

^{*3)} Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University 岡山大学薬学部
Offprint requests to : Takeo Kawaguchi, Ph. D., Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University, Keyakidai 1-1, Sakado-shi, Saitama 350-02

および *c-jun* の各種アンチセンスによって回避され得るかを調べた。本方法では、アンチセンス効果が発現すれば細胞死が回避される一方、ODN 分子の非特異的效果(細胞障害性)は細胞死あるいは細胞増殖阻害として観察されるため、両効果の分離が可能と考えられる。

方法

(1) 細胞

マウス乳癌由来 FM3A 細胞を使用した。細胞は、2% (v/v) の非動化した牛胎仔血清(FCS) (日本製薬㈱) を含む ES 培地(日水製薬㈱)に懸濁し、5%CO₂ 存在下、37°C で培養した。

(2) オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)の合成

c-fos および *c-jun* の翻訳開始コドンの下流 18 あるいは 21 塩基配列を標的とした、ホスホロチオエート型アンチセンス ODN (日本製粉㈱生物化学研究部合成、表1)および3'末端のチミジンを5-ナフチルエチル-2'-デオキシウリジンに置換した誘導体(図1)を用いた。

コントロール ODN として、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子に相補的なホスホロチオエート型アンチセンス ODN を用いた。

(3) アンチセンス効果の測定

非動化した FCS 2% を含む ES 培地に、FM3A 細胞を 5×10^4 個/ml となるように懸濁した。この細胞懸濁液を、25 ml フラスコ中でアンチセンス ODN 1 μ M 存在下、24 時間培養した。24 時間培養後の細胞数は約 2×10^5 個/ml であった。そこに、FUDR (1 μ M) およびアンチセンス ODN を、1 μ M あるいは 10 μ M 濃度で添加し、96 穴マイクロプレートに 100 μ l/well ずつ 6 wells に分注した。分注後、0 および 24 時間後に PBS(-) に溶解した 5-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, ㈱同仁化学研究所) 溶液を 25 μ l/well の濃度になるように加えて、さらに 4 時間培養した。

2-Propanol (和光純薬工業㈱) を 150 μ l/well 加えたのち、マイクロプレートリーダー(モデル

表1 ホスホロチオエート型アンチセンス ODN の構造

Antisense ODN	Sequence
<i>c-fos</i> -S	5'-GGC GTT GAA ACC CGA GAA-3'
<i>c-jun</i> -S	5'-CGT TTC CAT CTT TGC AGT-3'

図1 3'末端修飾型アンチセンス ODN の化学構造と塩基配列

550, 日本パイオ・ラッドラボトリーズ㈱) により波長 570 nm での吸光度を測定し、細胞増殖率を求めた。また、全細胞数を血球計算板を用いて測定したのち、0.15% トリパンブルー (和光純薬工業㈱) により染色し、生細胞率を算出した。

結果と考察

FM3A 細胞の増殖率に対する FUDR 添加の影響(24 時間接触)を図2に示す。この結果より、FUDR 濃度として 1 μ M を選択した。FUDR と接触後 24 時間目の細胞の生存率は約 45%、増殖率はコントロールの約 25% であった。

FUDR (1 μ M) 存在下での細胞増殖に対する、ホスホロチオエート型アンチセンス ODN (S-oligo) の効果を図3に示す。コントロールとして用いた、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)に対するアンチセンス ODN (アンチ CAT-S)⁶⁾ およびアンチ *c-fos*-S は、細胞増殖率に影響を与えなかった。一方、アンチ *c-jun*-S は FUDR の影響を有意に減弱し、その効果は、単独では無効であったアンチ *c-fos*-S を併用することで増強された。*c-fos* および *c-jun* のコードする

図2 5-フルオロ-2'-デオキシウリジン (FdUrd) による FM3A 細胞の増殖阻害

図4 3'末端を5-ナフチルエチル-2'-デオキシウリジンで置換したアンチセンス ODN のアンチセンス効果 (* $p < 0.01$)

図3 ホスホロチオエート型アンチセンス ODN のアンチセンス効果 (* $p < 0.01$)

蛋白は、ヘテロ二量体を形成して作用することが知られており⁷⁾、単独では効果のなかったアンチ *c-fos*-S が、アンチ *c-jun*-S と併用されることで効果を示したものと考えられる。

ホスホロチオエート型の ODN は、立体異性体⁸⁾の生成や相補的塩基間の結合力の低下⁹⁾など、多くの問題点が指摘されている。一方、天然のリン酸ジエステル型 ODN の生体内での分解には、3'-エキソヌクレアーゼの関与が大きいことが知られていることから、ODN の3'末端を修飾することで安定性にすぐれ、塩基配列に特異的な結合能も維持された、天然型 ODN のデザインが可能になると考えた。今回は、安定性の向上に加えて、細胞膜透過性の改善も期待できる疎水性基(ナフチルエチル基)で、3'末端のチミジン5位のメチル基を置換した誘導体について検討した。

従来、ODN の3'末端部分の化学的修飾は、ODN の化学的合成経路上の都合から、やや煩雑かつ困難であったが、スパーサーを用いる新合成法¹⁰⁾により、効率よく目的物を得ることができた。3'修飾 ODN の FdUrd 処理細胞に対する効果を図4に示す。ホスホロチオエート誘導体では無効だったアンチ *c-fos* は、3'末端修飾体(アンチ *c-fos*-N)とすることで増殖抑制作用を約50%回避した。アンチ *c-jun* の3'末端修飾体(アンチ *c-jun*-N)は、単独ならびにアンチ *c-fos*-N との併用で、ほぼ100%増殖阻害を回避した。

ホスホロチオエート誘導体に比較して3'末端修飾体の効果が強かった理由としては、疎水性基の導入による細胞膜透過性の改善、および天然型のリン酸ジエステル骨格に由来する高 T_m などの複合的效果と考えられる。

アンチセンスの ODN は、ターゲット(目標センス)によってその塩基配列は異なるが、化学的な基本構造や物理化学的性質は同様であり、ある ODN を効率的に作用させ得るデザインは、他の目標に対する ODN に対しても汎用性を有すると考えられる。本検討では、アンチセンス効果を毒性から分離して評価するために、細胞のアポトーシス回避効果を指標とした。デオキシヌクレオチドプール imbalance に伴うアポトーシスの回避効果が、直接臨床上的有用性に結びつくものではないが、本評価方法で有効性が確認された分子デザインやキャリア構造は、他のアンチセンス ODN へ応用が可能であると考えられる。

文 献

- 1) Yoshioka A, Tanaka S, Hiraoka O et al. : Deoxyribonucleoside-triphosphate imbalance death : deoxyadenosine-induced dNTP imbalance and DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death. *Biol. Bioph. Res. Comm.* 146 : 258-264, 1987.
- 2) Yoshioka A, Tanaka S, Hiraoka O et al. : Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance : 5-Fluoro-deoxyuridine-induced DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death. *J. Biol. Chem.* 262 : 8235-8241, 1987.
- 3) Hirota Y, Yoshioka A, Tanaka S et al. : Imbalance of deoxyribonucleoside triphosphates, DNA double-strand breaks, and cell death caused by 2-chloro-deoxyadenosine in mouse FM3A cells. *Cancer Res.* 49 : 915-919, 1989.
- 4) Colotta F, Polentarutti N, Sironi M et al. : Expression and involvement of *c-fos* and *c-jun* protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. *J. Biol. Chem.* 267 : 18278-18283, 1992.
- 5) Hwang HS, Ohtani M, Nakazawa T et al. : Molecular mechanism of 5-fluoro-2'-deoxyuridine-induced dNTP imbalance cell death : Purification of an endonuclease involved in DNA double strand breaks during dNTP imbalance death. *Nucleosides & Nucleotides* 14 : 2089-2097, 1995.
- 6) Marcus-Sekura CJ, Woerner AM, Shinozuka K et al. : Comparative inhibition of chloramphenicol acetyltransferase gene expression by antisense oligonucleotide analogues having alkyl phosphotriester, methylphosphonate and phosphorothionate linkages. *Nucl. Acid Res.* 15 : 5749-5762, 1987.
- 7) Curran T, Fianza BR : Fos and Jun : The AP-1 connection. *Cell* 55 : 395-397, 1988.
- 8) Summers MF, Powell C, Egan W et al. : Alkyl phosphotriester modified oligodeoxynucleotides. VI. NMR and UV spectroscopic studies of ethyl phosphotriester(Et) modified Rp-Rp and Sp-Sp duplexes. *Nucl. Acid Res.* 14 : 7421-7436, 1986.
- 9) Bower M, Summers MF, Powell C : Oligodeoxynucleotide methylphosphonates. NMR and UV spectroscopic studies of Rp-Rp and Sp-Sp methylphosphonates modified duplexes of d(GGAATTCC). *Nucl. Acid Res.* 14 : 9081-9093, 1986.
- 10) Kawaguchi T, Yamaguchi T, Tanaka S et al. : Synthetic nucleosides and nucleotides. 37. Antisense oligodeoxynucleotides bearing 5-(phenylethyl)-2'-deoxyuridylate at the 3'-terminus : Exonuclease-resistant molecule with natural phosphodiester backbone. *J. Pharm. Sci.* 85 : 815-818, 1996.