第 16 回 日本臨床薬理学会 1995 年 11 月 1～2 日 東京・明治記念館

アンチセンスオリゴヌクレオチドの家兎ヘルペス
角膜炎に対する効果の基礎的検討

東海林 洋子^{*1} 岩谷 若夫^{*1,*2} 田村 信也^{*2}
 乗松 美貴^{*1} 荒木 尚美^{*1} 長谷 秀樹^{*3}
 鳥山 聖子^{*3} 若松 裕子^{*3} 宮 永嘉隆^{*3}
 嶋田 甚五郎^{*1} 水島 裕^{*1}

アンチセンスオリゴヌクレオチドは近未来の医薬品として注目を浴びており、欧米では一部臨床試験に入っている。生物学的安定性など幾つかの問題点が指摘されているが、リン酸結合のフォスフォロジエステル結合をフォスフォロチオエートに換えたS-オリゴが比較的安定で、生物活性も高いことから、アンチセンス研究の主流となっている。我々は、S-オリゴを選択し、単純ヘルペスウイルスI型 (HSV-I) のimmediate-early (IE) pre-mRNA4/5 に対するアンチセンスS-オリゴを種々合成し、その抗ヘルペス効果を検討してきた。ターゲットをスプライシング部位を中心として検討したところ、3'スプライシング部位に限局して効果が認められた¹⁾。ターゲットがスプライシング部位から上流あるいは下流に離れる程、抗ヘルペス効果は減少する傾向にあった。また、興味あることにイントロン領域をターゲットとしたアンチセンスS-オリゴに高い抗ヘルペス活性が認められた。

塩基配列特異性やターゲットmRNAとの二重鎖形成能、他遺伝子とのホモロジーなどの問題を加味し、20-30merが用いられている。S-オリゴは非特異的な反応が見られ、問題となっている。S-オリゴの長さや反応性に関する検討はあまり行われていないが、膜透過性や非特異的な反応とも関連が

Table 1. Various oligonucleotides complementary to immediate-early pre-mRNA of herpes simplex virus type I

HSV-I immediate-early pre-mRNA 4/5

あるものと思われる。今回、高い抗ヘルペス効果を示したイントロン領域をターゲットとし、長さを変えて、抗ヘルペス効果を検討した。この時、ターゲットmRNAとの二重鎖形成能の指標のひとつである融解温度(T_m)を測定した。細胞培養系において13mer以上のS-オリゴで安定した抗ヘルペス効果が認められた。そこで、13merと20merについて、家兎角膜に対するHSV-Iの生着阻止効果について基礎的な検討を行った。

方法: Tab.1 に示す配列をターゲットとした、アンチセンスS-オリゴを合成・精製し、抗ヘルペス効果の判定は前回の報告と同様に行った²⁾。簡単に述べるとVero細胞にHSV-I感染と同時にアンチセンスS-オリゴを投与し、72時間目の細胞変性(CPE)抑制効果を示す最小濃度(MIC)にて表した。T_mはターゲットmRNAの代わりにセンス配列のDNAとアンチセンスS-オリゴと二重鎖を形成させた後、温度を徐々に上昇させ、吸光度(OD₂₆₀)の変化

*1 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター
臨床薬理学

〒216 川崎市宮前区菅生 2-16-1

*2 科研製薬㈱

*3 東京女子医科大学眼科

Fig.1 Anti-herpetic effect of antisense phosphorothioate oligonucleotides(NT-58) on rabbit cornea keratitis induced by herpes simplex virus type I

を記録し、T_mを測定した。さらに、家兎角膜を27Gの針で#型に擦過し、HSV-Iを接種した。同時にアンチセンスS-オリゴを一回点眼し、角膜炎の度合いを0～3のスコアにより表示した。結果：今回の検討結果より、9mer以下では温度上昇による吸光度変化はシグモイド曲線とならず、T_mは測定不能であった。T_mは長さ依存性に高くなり、ターゲットmRNAとの二重鎖形成能は長さ依存性に高いことを示唆していた。また、長さに比例して、抗ヘルペス活性も観察され、13mer以上で安定した抗ヘルペス活性が得られた。

これより、13merと20merのアンチセンスS-オリゴを選択し、家兎角膜に対するウイルス生着阻止効果を判定した。20merでは非特異的と見られる炎症反応が見られ、角膜の所見判定は困難であった。13merでは、0.1%および0.5%水溶液ともにウイルス生着阻止効果が見られた。0.5%水溶液ではやや角膜の充血が見られた。Fig.1に示すように、S-オリゴ点眼48時間および96時間後の判定で、いずれもウイルスのみを接種した群より角膜炎は抑制されていた。

考察：我々は、これまで細胞培養系を用いて、抗ヘルペス効果を有するアンチセンスS-オリゴの検索を行ってきた。今回は、中でも高い抗ヘルペス効果が認められたイントロン領域をターゲットとしたアンチセンスS-オリゴを選択し、効果に及ぼす長さの影響を検討した。長さに比例して二重鎖形成性能が高くなることを示唆しており、抗ヘルペス効果を得るためにはある程度の長さが必要であると思われた。T_mと抗ヘルペス効果が相関していることから、T_mはS-オリゴの抗ヘルペス効果のスクリーニングにおいて、一つの指標になり得るものと思われた。in vitroでの効果が果たして、in vivoでも見られるかを検討したところ、アンチセンスS-オリゴのウイルス生着阻止効果はin vivoでも明らかであった。しかも、一回の点眼で96時間後まで効果が持続したことから、頻回投与の煩わしさが少ないことを示唆している。この結果は、アンチセンスS-オリゴの今後の医薬品としての開発において重要な治見を与えるものと思われた。結語：HSV-IのIE pre-mRNA4/5をターゲットとしたアンチセンスS-オリゴは、長さ依存性に抗ヘルペス活性が認められた。この活性はT_mに比例していた。また、アンチセンスS-オリゴ(13mer)はin vitroならびにin vivoの系で、抗ヘルペス活性が認められた。

文献

- [1] N. Tamura, W. Iwatani, Y. Shoji, M. Norimatsu, J. Shimada, Y. Mizushima. Antiviral effects of phosphorothioate oligonucleotides complementary to 3' splice of herpes simplex virus immediate early pre-mRNA. Nucleic Acids Symposium Series 31:73-74, 1994.
- [2] 岩谷若夫、東海林洋子、田村信也、乗松美貴、荒木尚美、嶋田甚五郎、水島裕。ホスホロチオエート型アンチセンスDNA 単純ヘルペスウイルスI型に対する抗ウイルス効果の発現メカニズムに関する研究。臨床薬理 26:427-428, 1995.