トランスクリプトーム解析とアンチセンス遺伝子治療

Transcriptome and antisense gene therapy

京都工芸繊維大学繊維学部

村上 章 Akira MURAKAMI

Key words: transcriptome; antisense; gene therapy; RNA-probe; RNA

はじめに

RNA が遺伝子発現を制御していることが 1980 年代初頭に報告され (アンチセンス RNA の発見), RNA が単なる遺伝情報の伝達物質であるという考え方は修正された¹⁾. その後, 触媒機能をもつ RNA が見いだされ (リボザイムの発見)²⁾ RNA の機能の多様性が注目された. 現在では RNA はさまざまな種類に分類され (tRNA, mRNA, rRNA, snRNA, snoRNA, miRNA, tmRNA など), それぞれの機能の解明が進んでいる³⁾. これらに加え近年の大きなトピックスとして RNAi が挙げられる. RNAi の要となる分子である siRNA は RNA の配列選択的切断に関与することで RNA の機能発現を抑制する機能をもつ^{4), 5)}. これらの RNA を機能性 RNA ととらえ, その機能を総合的に

理解しようとするリボスクレオソーム研究は今後いっそう進展するものと思われる. 一方, ヒトゲノムプロジェクト第 1 期がほぼ修了し, 第 2 期の展開としてプロテオームが注目されているが, その前段階での解析, すなわち mRNA の動態と発現量・機能解析を解析する概念であるトランスクリプトームも劣らず重要になってきている. 特にこれら mRNA の機能を選択的に制御することで細胞の機能解明, ひいては疾患の治療につながる可能性に注目したアンチセンス法と呼ばれる手法はすでに 30 年の歴史があり, 現在も臨床試験が行われている⁶⁾. 本レビューでは, 筆者らのアンチセンス研究を中心に RNA を対象とした検出法, 治療法の開発について報告する.

アンチセンス法

遺伝子を用いて遺伝子発現を制御するという機構は, 実際に発見されるまでは科学者のイメージネーションの産物であった. その具現化, すなわち新規概念の難知性疾患の

表 1 アンチセンス法に基づく臨床試験の現状*

対象疾患	アンチセンス薬剤名 あるいは対象遺伝子など	併用薬剤	試験レベル	実施主体
サイトメガロウイルス 網膜炎	Fomivirsen	なし	FDA 認可	ISIS Pharm.
再発非小細胞ガン ステージ IIIB, IV クローン病	Oblimersen Bcl-2 AS (G3139) Alicaforsen ICAM-1, ISIS 2302	Docetaxel なし	Phase II & III Phase III	Genta & NCI ISIS Pharm.
リュウマチ性関節炎	ISIS 104838-CS7 ICAM-1	なし	Phase II	ISIS Pharm.
潰瘍性大腸炎	Alicaforsen ICAM-1, ISIS 2302-CS22	なし	Phase III	ISIS Pharm.
難治性血漿細胞腫瘍	Oblimersen Bcl-2 AS (G3139)	Dexamethasone thalidomide	Phasen II	メリーランド大 NCL
成人非ホジキンリンパ腫	Oblimersen Bcl-2 AS (G3139)	Rituximab	Phasen II	M. D. Anderson 癌センター NCI
大腸ガン 直腸ガン	Oblimersen Bcl-2 AS (G3139)	Fluorouracil Oxaliplatin Leucovorin calcium	Phase II	San Antonio 癌センター NCI
慢性骨髄性白血病	Oblimersen Bcl-2 AS (G3139)	Cyclophosphamide Filgrastim Fludarabine	Phasen III	Genta

* URL: <http://www.clinicaltrials.gov/> より抜粋. 2003 年 10 月現在.

治療法開発に向けた試みは 1970 年代半ばから始まっている^{7), 8)}。アンチセンス法と呼ばれるこの治療法に基づく臨床試験は現時点で 30 件ほど行われている。表 1 に 2003 年 10 月現在ファイルされている臨床試験を示した。いずれもガンやウイルス原因疾患、免疫疾患という難病に対して試みられている。初期の臨床応用の試みはアンチセンス核酸単独での使用であり、表 1 に示したようにサイトメガロ網膜炎に対するアンチセンス薬 (Fomivirsen, ISIS Pharmaceuticals) 開発に至った。しかしながら、ガンなどに対する単独使用ではいまのところ良好な結果に至っていない。細胞系では良好な結果を得ながら、臨床試験で期待される成果が得られない原因はまだ解明されていない。現在のアンチセンス臨床試験の試みは、他の薬剤との併用法を採用し、アンチセンス核酸は付加的な効果を示すにとどまっているのが現状である。筆者らはアンチセンス核酸の単独使用を目的とし、従来のアンチセンス核酸の高機能化を実施しているが⁹⁾、現在は光のエネルギーを利用する光架橋性アンチセンス核酸の設計を行っている。まず、mRNA 中のウラシルと UVA 照射により結合するソラレン誘導体をアンチセンス核酸に導入した光架橋性アンチセンス核酸 (図 1(A)) を開発し¹⁰⁾、細胞増殖制御試験 (目標値: IC_{50} 1 nM) に用いた。筆者らが用いたガン細胞 (C4II; HPV18 型ゲノムをもつ子宮頸ガン細胞) の増殖能はアンチセンス核酸 5 μ M 添加の条件でも変化しなかったが、UVA 照射により 100 nM 添加系でも有意な細胞増殖制御効果が見られた。その制御効果は対象とする mRNA の有無および結合サイト、光照射時間、アンチセンス核酸濃度、に大きく依存した。現在までのところ IC_{50} = 25 nM まで実現できている。とりわけ p53 タンパク質に作用して分解を促進する HPV-E6 タンパク質をコードする領域を対象として設計されたアンチセンス核酸は細胞をアポトーシス

に誘導した。関係するタンパク質のカスケード解析を進めねばならないが、現時点では、比較的穏和な制ガン剤使用の条件で細胞を自発的に死滅させることができ、ガン化学治療薬になりえるのではないかと考えている。われわれはこれらの結果に基づいて動物実験を実施し、近い将来臨床試験に臨みたいと考えている。

RNA プローブ法

現在トランスクリプトーム解析は mRNA をいったん逆転写酵素反応により DNA に置き換え、それを DNA チップによる解析システムにアプライすることで行われている。RNA をそのまま解析すれば済むわけであるが、その手法は mRNA の発現量が少ないこと、その安定性が低いこと、DNA や RNA、さらにタンパク質などの共存下で RNA のみを直接定量・解析する手段がないことなどの理由により実現していない。真の意味でのトランスクリプトームを解析する手法 (あるいは mRNA の *in situ* 解析法) の開発は今後の課題であると考えている。もっとも、DNA に置き換えさえすれば一定の目的は達成できるのだからそれで良いという考え方もあるが、筆者らは、RNA プローブを用いた RNA の直接検出法の確立を目指している。すなわち特定の RNA 群を細胞内でそれぞれ個別にかつリアルタイムに検出し、他の RNA とのクロストークを解析する手法の開発に取り組んでいる。ここではその現状を紹介する。蛍光核酸プローブを用いた RNA 検出の例としては、高次構造が機能発現にかかわるリボザイムについての報告が代表的である。Turner らは環境に応じて著しくその蛍光挙動を変化させるピレンをオリゴ DNA の 5' 末端に導入し、リボザイム反応の詳細を 3 次元構造の観点から論じている¹¹⁾。

われわれが RNA プローブに求めた要件は、(1) RNA 識別能力がある、(2) 厳密な遺伝子配列認識能力がある、(3) B/F 分離を必要としない、(4) 液相・固相を問わない (チップ化が可能)、(5) 操作が簡便である、などである。特に DNA と RNA とを識別できるプローブは細胞内での RNA 検出に有効である。現在までに RNA を特異的に検出する蛍光修飾型 RNA プローブを開発している。このプローブは 2'-ピレン修飾ウリジン (Upy) を配列中央部分に 2 分子連続して導入した 2'-O-メチル型オリゴ RNA (OMUpy2, 図 1(B) X=O) であり、可視領域 (480 nm 付近) の蛍光発光変化から、RNA との結合を評価できる性能を有する^{12), 13)}。OMUpy2 は一本鎖の場合、ピレン由来の蛍光はほとんど消光されているが、相補的なオリゴ RNA と結合すると、480 nm 付近にブロードな蛍光を発する。しかし、OMUpy2 は Upy 近傍にミスマッチをもつ

図 1 (A) 光架橋性アンチセンス核酸 (ホスホロチオエート型) および (B) ビスピレン型 RNA プローブの構造 (X=O, S)

図2 OMUpy2を用いたRNA検出

RNAや相補的なDNAと結合してもほとんど蛍光増感を示さない。すなわちOMUpy2は配列ならびにRNA認識能を有することが判明した。OMUpy2を5S-rRNAに対して添加したときの蛍光スペクトルを図2に示すが、ループ領域を対象としている配列を有するOMUpy2のみが著しい蛍光増感を示した。OMUpy2から得られる蛍光シグナルは、対象となるRNAの検出のみならず高次構造解析にとって非常に有効であることを示している。

次に、このRNAプローブを細胞系でのRNA解析に適用した。細胞系で使用するプローブには exonuclease 耐性が求められるため、天然型OMUpy2のリン酸ジエステル結合をチオエート型に変換したプローブを作製した(S-OMUpy2, 図1(B) X=S)。われわれはS-OMUpy2をmRNAの発現プロファイリングに利用している。低血清培地で3日間培養した細胞にS-OMUpy2を加えた後、この細胞を20%血清で刺激し、その直後から細胞由来の蛍光を蛍光顕微鏡によりモニターした。血清刺激後15分後にユニバーサルコントロール配列をもつS-OMUpy2添加系ではほとんど蛍光が見られなかったのに対し、c-fos mRNAを対象としたS-OMUpy2添加系では、有意な蛍光発光(480 nm)が確認された。現在より詳細な検討を行っているが、これまでの結果はmRNA発現カスケードを時間軸に基づいて評価できる可能性を示している。

おわりに

RNAを対象とした遺伝子発現機構の解析は生命現象の

本質に迫る重要なテーマになりつつある。われわれの手法は細胞内のRNAのみを検出できる機能をもっていることから、今後のトランスクリプトーム解析に有効であると考えている。その実施においては、検出感度の向上、対象mRNAの高次構造予測に基づく配列設計法の確立、mRNA以外の多様なRNAに対するプロファイリングの可能性など今後解決せねばならない課題も残されており、現在検討を進めている。

- 1) T. Itoh and J. Tomizawa: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **77**, 2450-2454 (1980).
- 2) A. J. Zaug and T. R. Cech: *Cell*, **19**, 331-338 (1980).
- 3) 鈴木 勉 (監修): 細胞工学, 9月号, 秀潤社 (2003).
- 4) S. Guo and K. J. Kempfues: *Cell*, **81**, 611-620 (1995).
- 5) A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Druves, and C. C. Mello: *Nature*, **391**, 806-811 (1998).
- 6) URL: <http://www.clinicaltrials.gov/>
- 7) P. S. Miller, L. T. Braiterman, and P. O. P. Ts'o: *Biochemistry*, **16**, 1988-1996 (1977).
- 8) P. C. Zamecnik and M. L. Stephenson: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**, 280-284 (1978).
- 9) J. M. Kean, A. Murakami, K. R. Blake, C. D. Cushman, and P. S. Miller: *Biochemistry*, **27**, 9113-9121 (1988).
- 10) A. Murakami, A. Yamayoshi, M. Namba, R. Iwase, and T. Yamaoka: *Eur. J. Pharm. Sci.*, **13**, 25-34 (2001).
- 11) R. Kierzek, Y. Li, D. H. Turner, and P. C. Bevilacqua: *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 4985-4992 (1993).
- 12) A. Mahara, R. Iwase, T. Sakamoto, K. Yamana, T. Yamaoka, and A. Murakami: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 3648-3650 (2002).
- 13) A. Mahara, R. Iwase, T. Sakamoto, T. Yamaoka, K. Yamana, and A. Murakami: *Bioorg. Med. Chem.*, **11**, 2783-2790 (2003).