ミニレビュー

放射性オリゴヌクレオチドを用いた
新しい診断・治療法の可能性

永次 史

近年、分子生物学の進歩によりさまざまな疾患が遺伝子レベルで解明されており、遺伝子発現は新しい創薬の標的として注目を集めている。特に癌に関しては、種々の癌関連遺伝子が同定され、癌が複数の遺伝子異常により起こることが明らかにされており、癌細胞のみを識別する新しい診断および治療法として、遺伝情報を標的とする方法が注目されている。本稿では、放射性標識オリゴヌクレオチドを用いた遺伝子イメージングおよび3本鎖DNA形成を利用した治療法の可能性について述べる。

1. 遺伝子イメージング

癌細胞では、*ras*, *fos*, *jun* などの増殖関連遺伝子の亢進が観察されており、この変化の検出は癌の早期診断に繋がると考えられる。放射性核種で標識したアンチセンスDNAは標的のmRNAに塩基配列特異的に結合するため、その検出法に適していると考えられる。Dewanjeeらは、白血病や固形癌で亢進している*c-myc*に相補的な配列をもつオリゴヌクレオチドを ^{111}In 標識したアンチセンス核酸の、*in vitro*および*in vivo*における癌細胞への集積を調べている¹⁾。 ^{111}In 標識はオリゴヌクレオチドの5'-末端に導入した配位子に ^{111}In を結合させることで行った。オリゴヌクレオチドの利用では体内での代謝が問題となるが、彼らは通常天然核酸由来のDNAの ^{111}In 標識体の血中での安定性を調べ、2時間後でも約80%は未変化体のままであり、十分安定であることを確認している。また、 ^{111}In 標識オリゴヌクレオチドの細胞膜透過性はp388細胞を用いて調べられており、定常状態の細胞よりも対数増殖期の細胞により高く、60分後の集積は投与量の約50%に達していることから、十分な透過性を持つことが明らかにされた。さらにこの*c-myc*相補的な ^{111}In 標識DNAの*in vivo*体内動態が調べられ、腫瘍/血中比で約3倍、腫瘍/筋肉比で約20倍の集積を示し、担癌マウスの

シンチグラムでは投与量の約14%の癌への取込みを示しており、この標識DNAが新しい癌診断薬剤として有用である可能性を示唆している。一方、癌遺伝子*c-erb B-2*に対して ^{111}In 標識アンチセンスを用いた同様の実験では、前者ほど高い腫瘍選択性は得られていない²⁾。このように、mRNAを標的とする遺伝子イメージングは、用いるアンチセンスDNAの塩基配列を標的に応じて変化させることで、さまざまな遺伝子に対応可能であり、新しいイメージングの手法として、癌の早期診断などへの応用が期待される。さらに、標的とするmRNAの種類と標的サイトの選択など、通常アンチセンス法と同様の問題点を克服し、臨床応用への道が拓かれることが期待される。

2. 放射性標識オリゴヌクレオチドを利用した治療法の可能性

アンチセンス手法の基礎検討のなかで、 ^{125}I のようなオージェ電子放出核種で標識されたDNAが、センス-アンチセンス複合体の形成によって、標識された位置から10塩基近傍のみで2本鎖DNA切断を起こすことが報告されている³⁾。最近この方法による、遺伝子を標的とした新しい治療法への展開を目指した興味深い試みが検討されている。近年2本鎖DNAの情報を認識する方法として、2本鎖DNAと1本鎖オリゴヌクレオチドとの間で形成される3本鎖の利用が注目されているが、この3本鎖形成オリゴマー(triplex-forming oligonucleotide, TFO)をオージェ電子放出核種である ^{125}I で標識し、配列特異的な2本鎖DNA切断が検討されている。Panyutinらは5- ^{125}I -シチジンを組み込んだポリピリミジン鎖からなるDNAオリゴマーを合成し、プラスミドDNAを制限酵素で切断した2本鎖DNA断片と3本鎖を形成させDNA切断能を調べた⁴⁾。合成した ^{125}I 標識TFOは酸性条件下で3本鎖を形成し、 ^{125}I 標識シチジンを組み込んだ位置の前後10塩基以内で2本鎖DNAを切断している。このDNA切断は、ラジカルスカベンジャーであるDMSO存在下で行った場合にもその切断効率にはほとんど変化はなかったことから、二次的に発生する拡散性のラジカルによるものではなく、オージェ電子直接的作用であることが示された⁵⁾。この切断効率は56日後で4%と効率は低いですが、彼らは別の報告で、 ^{125}I で標識した

シチジンを3か所組み込んだ miss match を含むポリプリン鎖からなる DNA オリゴヌクレオチドを合成し、その切断効率が65日後で25%と少し上昇することを明らかにしている⁶⁾。一方、Orson らは逆平行型3本鎖を形成するポリプリン配列のTFOの5'末端に¹²⁵I 標識インターカレーターである 6-amino-9-[(3'-amino-propyl) amino]-2-methoxyacridine (DAMA) をスパーサーを介し結合し、その切断能を調べた⁷⁾。その結果、この¹²⁵I 標識 TFO は中性条件下で高い親和性で2本鎖 DNA に結合し、¹²⁵I 標識部位の前後2, 3塩基の範囲内で2本鎖 DNA の切断を起こすことが明らかにされた。以上のようなオージェ電子放出核種を組み込んだオリゴヌクレオチドを用いた治療法を臨床応用に発展させるためには、切断効率の大幅な改善など解決すべき問題点が残されている。また、3本鎖 DNA の利用に関しても、標的にできる2本鎖 DNA には配列上の制限があり、すべての配列で3本鎖形成を可能にする新しい方法の開発が必要であり、現在多くの研究室で基礎的な検討が続けられている⁸⁾。

以上、mRNA を標的とするアンチセンス法、および2本鎖 DNA を標的とする3本鎖 DNA の利用は遺伝子を標的とした選択的なイメージングおよび治療法としての可能性に大きな期待が寄せられている。筆者らは、これらの方法の効率の改善策の一つとして、形成される複合体の安定化を試みている。その具体的方策として共有結合により複合体間を結合することとし、細胞内でも利用可能な新しいクロスリンク分子として2-アミノ-6-ビニルプリン(1)を開発し、1を組み込んだオリゴヌクレオチドを用いた鎖間クロスリンク反応を検討してい

る⁹⁾。1は核酸モノマーを用いたモデル反応ではシチジンおよびグアノシンと付加体を形成することをすでに報告している^{9a)}。ビニル基の高い反応性のため1を直接オリゴヌクレオチドに導入することはできなかったが、スルフィド保護体2-アミノ-6-フェニルチオエチルプリン(2)としてオリゴヌクレオチドに組み込んだ

後、アルカリ処理を行うことにより、ビニル体1を含むオリゴヌクレオチドが容易に合成できるようになった^{9b)}。このクロスリンク分子は相補的ハイブリッドの標的部位のシチジンに対して選択的に高い反応性を示すという、ユニークな反応性を持つことが明らかになった。ビニル体1を組み込んだオリゴヌクレオチドはセンス-アンチセンス複合体や3本鎖 DNA の安定化を行い、さらに標的へのターゲティング能力の増大が期待されるため、現在、放射性標識体を用いた診断および治療への展開を検討中である。

本稿で述べたように、放射性標識オリゴヌクレオチドの利用は、癌などの遺伝子異常に基づく病気の新しい診断および治療法として発展が期待される。これらの方法に関しては、研究が端緒についたばかりであり、臨床への応用だけではなく基礎的な面にも問題点も多く残されており、その解決に向けたさらなる努力が望まれる。

Key Words : antisense, indium-111 labeled oligomer, antigene, auge electron, iodine-125 labeled oligomer

文 献

- 1) Dewanjee, M. K., Ghafouripour, A. K. et al. : *J. Nucl. Med.*, **35**, 1054-1063 (1994)
- 2) 藤林靖久, 中川加寿夫, 他 : 核医学, **33**, 115-122 (1996)
- 3) Martin, R. F. and Holmes, N. : *Nature*, **302**, 452-454 (1983)
- 4) Panyutin, I. G. and Neumann, R. D. : *Nucl. Acids Res.*, **22**, 4979-4982 (1994)
- 5) Panyutin, I. G. and Neumann, R. D. : *ibid.*, **25**, 883-887 (1997)
- 6) Orson, F. M., McShan, W. M. et al. : *Nucl. Med. Biol.*, **23**, 519-524 (1996)
- 7) Panyutin, I. G. and Neumann, R. D. : *Acta Oncologica*, **35**, 817-823 (1996)
- 8) 最近の総説, 佐々木茂貴 : 有機合成化学協会誌, **55**, 590-599 (1997)
- 9) a) Nagatsugi, F. et al. : *Tetrahedron Lett.*, **36**, 421 (1995); b) Nagatsugi, F. et al. : *Nucleic Acids Symposium Series*, **34**, 171 (1995); c) Nagatsugi, F. et al. : *Nucleic Acids Symposium Series*, **35**, 79 (1996); d) Nagatsugi, F. et al. : *Tetrahedron*, **53**, 3035 (1997); e) Nagatsugi, F. et al. : *Nucleic Acids Symposium Series*, in press.

(九州大学薬学部放射性薬品化学)