

## 様式 C-19

### 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21350093

研究課題名（和文） 点突然変異やSNPを分子標的とする遺伝子診断・遺伝子治療用機能化核酸の開発

研究課題名（英文） Development of novel functional oligonucleotide analogs for detection and regulation of a single base alteration in gene

研究代表者

村上 章 (MURAKAMI AKIRA)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授

研究者番号：60210001

研究成果の概要（和文）：

個人の体質差に関わる SNP 並びに重篤な疾患発症に関係する遺伝子の一塩基変異を、(1)RNA を対象とし、(2)正確・高感度・定量的に検出し、(3)当該遺伝子の発現を選択的に不活性化する分子標的機能化核酸分子の開発を行った。その結果、一塩基変異検出プローブの開発、生細胞内 RNA のリアルタイム検出法の開発、点突然変異 RNA の選択的制御によるガン細胞増殖抑制、に成功した。本成果は、病気の早期発見・治療を可能にする「RNA 診断法」に繋がり重要である。

研究成果の概要（英文）：

The congenital and acquired base mutations in genes are related to various diseases and to individual physical constitution. In this research, novel functional nucleic acid analogs were synthesized for development of a novel detection system for a single point mutation in gene and for suppression of cancer cell proliferation. Following results were obtained; (1) Synthesis of novel functional nucleic acid analogs for gene diagnosis and gene regulation; (2) Development of a protocol for homogeneous fluorescent assay of base alteration in RUNX1 and JAK2 genes; (3) Selective inhibition of cancer cell proliferation by photodynamic antisense protocol; (4) Development of live-cell RNA-imaging protocol. Through this research, we are convinced that the nucleic acids with sophisticated functions can reveal unknown functions of "RNA".

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
総計	7,600,000	2,280,000	9,880,000

研究分野：遺伝子化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：遺伝子、核酸、バイオテクノロジー、細胞・組織、蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムプロジェクトの成果は、正常人においても個人間で微小な遺伝子差異 (SNP) が存在し、それらが個人の体質や病気に対する応答の差に反映されていることを明らかにした。従って、SNP を検出する技術は癌治療や将来のオーダーメイド医療に直結し、それを現実なものとする上で極めて重要である。遺伝子変異の検出法としては既に多くの提案がなされているが、正確・高感度・迅速・簡便・定量的、の5つの必須条件を同時に満たして判定する技術は未だ開発途上である。これまでに代表者らはRNAと結合した時のみ著しい蛍光増感が起こるピレン修飾RNA特異的蛍光RNAプローブ (pyrene-probe) を開発し、それを用いた Homogeneous Fluorescence Assay 法 (HFA 法: 均一溶液中で B/F 分離を必要としない蛍光検出法) で、対象 RNA に存在する一塩基変異を極めて正確に識別できる能力を有することを報告した。(図1)

一方、Ras 遺伝子の変異に代表されるように、一塩基の変異はアミノ酸変異に繋がり、タンパク質自体の機能を大きく変えてしまう。多くの癌がそのような変異の結果である。このような遺伝子の点突然

変異に関わる疾患は分子標的治療の重要な対象であり、その治療法開発は喫緊の課題であるが、未だに成功していない。遺伝子変異に起因する疾患の治療には、変異遺伝子産物 (RNA およびタンパク質) の産生を選択的抑制し、さらにはその機能を抑制する方法が考えられる。この目的を達成した例は報告されていないが、RNA を対象とし、その変異のみをターゲットとして制御する手法としてのアンチセンス法の可能性が注目されている。

## 2. 研究の目的

本研究は、「先天的に遺伝子に存在し薬物感受性等、個の体質差に関わる SNP、及び後天的に生じ、癌などの重篤な疾患を引き起こす遺伝子の一塩基変異を、(1) 遺伝子とりわけ RNA を対象とし、(2) 正確・高感度・迅速・簡便・定量的に検出し、(3) 当該遺伝子の発現を核酸医薬により不活性化する

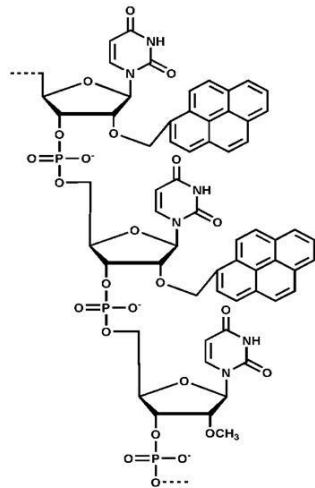


図1 pyrene-probe の基本構造

ことで、疾患の予防、治療あるいは症状の改善等に寄与する分子標的機能化核酸分子の開発」を目的とした。この目的のために種々の機能化核酸素子を開発し、それら素子を用いて、生細胞内並びに多細胞系であるショウジョウバエの初期胚の RNA 検出/局在確認 (RNA 診断) システムの構築を目指した。さらに、アンチセンス法による一塩基変異遺伝子の発現抑制効果の検証も目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 機能性核酸の分子設計と作製、

遺伝子の点変異を検出するプローブとして、既に開発済みの RNA プローブ (ピレン修飾型蛍光 RNA: pyrene-probe) に分子内エチレン鎖架橋したリボースを有するヌクレオチド (ENA) を導入した、改変型 RNA プローブ (ENA-pyrene-probe) を作製した。このプローブを用い、RUNX1 遺伝子内の SNP 並びに骨髄増殖性疾患に関わる遺伝子の一塩基変異の蛍光検出を試みた。また、遺伝子発現の光アンチセンス制御を目的としてヌクレオチドの 2' 位に光架橋性基 (psoralen) を有する光架橋性アンチセンス核酸 (Ps-Oligo) を設計し、化学合成した。

### (2) 遺伝子変異/SNP 検出

健常ボランティア由来 DNA 溶液 (9 検体) を用い、RUNX1-SNP 領域を PCR により増幅し、熱変性後 ENA-pyrene-probe を添加し、液相系にて蛍光発光を観測した。また、骨髄増殖性疾患患者由来 DNA 溶液 31 検体、健常ボランティア由来 DNA 溶液 20 検体を用い、非対称 PCR 後の DNA サンプルに対し ENA-pyrene-probe を添加し、液相系にて蛍光発光を観測した。(本研究に用いた DNA 試料は、文書によるインフォームド・コンセントを得て作製されたものである。)

### (3) 点変異遺伝子の機能制御

点変異部位を持つプラスミドにより癌化させた細胞株 (K12V) を用い、Ps-Oligo を作用させた。Ps-Oligo の配列は、Ras-mRNA-コドン 12 の領域と相補的な配列を選択した。K12V 細胞および Vco 細胞 (変異を起こしていない) に対し、Ps-Oligo を種々のトランスフェクション法により導入し、UVA 照射 (365nm; 1~2 分間) を行い、Ps-Oligo の細胞増殖制御能を評価した。

### (4) 細胞内/初期胚内 RNA のリアルタイムモニタリング

対象 RNA の高次構造を熱力学的安定性に基づいて評価するアルゴリズムを用いて予測し、かつコア配列を含む領域 (15~20 塩基長) を対象候補配列とした。これに基づき、ピレンを 2 分子有する pyrene-probe を設計し、作製した。その際、細胞透過性並びに生体安定性を高めるために、リン酸ジエステル結合を

ホスホロチオエート型に変換した。このプローブを用い、HeLa 細胞内の特定の mRNA 検出を行った。また、多細胞系試料としてショウジョウバエ初期胚を用い、対象 RNA として発生初期に胚中央部に発現する Kruppel-mRNA を選び、同様の手法により pyrene-probe を作製した。このプローブを用い、Whole Mount in situ Hybridization (WISH 法) による RNA 検出を実施した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 機能性核酸の分子設計と作製

(a) RNA 診断に用いる目的で従来の pyrene-probe の RNA 結合能を高めるべく分子内エチレン鎖架橋したリボースを有するヌクレオチドを導入した ENA-pyrene-probe は pyrene-probe に比べると RNA との結合能が 1.3 倍向上した。一方、機構はまだ解明されていないが、相補的 DNA と ENA-pyrene-probe の 2 本鎖は蛍光性であった。この結果、DNA の均一液相蛍光検出が可能となり DNA も pyrene-probe による遺伝子診断の対象とすることが出来ることになった

(b) 遺伝子制御用アンチセンス核酸の開発研究の一環として、遺伝子の一塩基変異部位の塩基に共有結合するように psoralen を種々のリンカー分子を介してアンチセンス分子の一部に導入した新規光架橋性アンチセンス核酸 (Ps-Oligo) を開発した。その結果、これまでに開発した光架橋性アンチセンス核酸は 6 種類となった (図 2)。

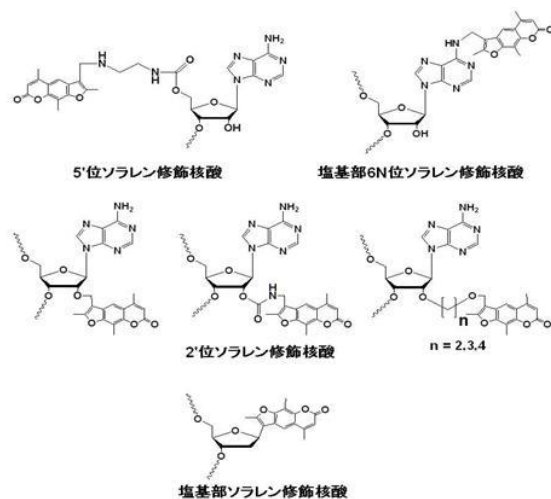


図2 psoralen 担持ヌクレオチドの基本構造

(c) RNA イメージング用ピレン修飾型核酸プローブの開発を行った。本プローブは既に開発済みであるが、生細胞内への自発的移行能を備えていなかった。先行研究成果をもとに本プローブのリン酸ジエステル結合をホスホロチオエート型に改変し、本プローブが生細胞内移行性を獲得したことを確認した。また、このプローブの発光波長(480nm)より長

波長側の蛍光を用いることを目指し、FRET の実行を視野に入れた、二重修飾 pyrene-probe を開発した。これまでに 3 種類のアクセプター蛍光剤を pyrene-probe の末端部分に修飾した新規 FRET 型 pyrene-probe を作製した。今後、生細胞系、多細胞系のマルチカラー RNA イメージングに応用する。

##### (2) 遺伝子変異/SNP 検出

開発した ENA-pyrene-probe を用い、健常ボランティア由来 RUNX1 遺伝子中の SNP の検出を試みた。その結果、RUNX1-SNP の 3 パターン (GG 型、GC 型、CC 型) に応じた蛍光発光が観測された。この結果は既存手法による結果と完全に一致した。本研究に用いた ENA-pyrene-probe 法は判定に要する時間が短いことや操作が簡便であることなどから SNP 判定法として優れていることが明らかになった。

また、骨髄増殖性疾患が疑われる患者由来 DNA 溶液 31 検体、健常ボランティア由来 DNA 溶液 20 検体を用い、非対称 PCR 後の DNA サンプルに対し ENA-pyrene-probe を添加し、液相系にて蛍光発光を観測した。その結果、健常ボランティア由来 DNA には JAK2 遺伝子の変異は全く検出されなかったのに対し、患者由来 DNA の 17 サンプルに JAK2 遺伝子の一塩基変異が検出された。この結果は Quenching Probe 法による結果と一致し、ENA-pyrene-probe が JAK2 遺伝子中の一塩基変異を正確に検出する能力を有すること、従って十分な臨床検査への適用能を有していることが示された (表 1)。

表 1 骨髄増殖性疾患に関わる JAK2 遺伝子変異の判定結果. (N:正常型、P:変異型)

健常者由来		患者由来	
Sample Number	ピレンプローブ法	Sample Number	ピレンプローブ法
1	N	87	N
2	N	89	P
3	N	90	N
4	N	91	P
5	N	92	P
6	N	94	N
7	N	95	P
8	N	96	P
9	N	97	P
10	N	98	N
11	N	99	P
12	N	100	N
13	N	102	P
14	N	103	P/N
15	N	104	N
16	N	105	P
17	N	106	P
18	N	107	P
19	N	108	P
20	N	109	N
		110	N
		111	P
		112	N
		113	P
		114	N
		115	P
		116	N
		117	N
		118	P
		119	N
		120	P

##### (3) 一塩基変異遺伝子の機能制御

遺伝子の一塩基変異が原因であると考え

られているガンに対する治療原理（光動力学的アンチセンス法）の構築を目的とした。一塩基変異を有する遺伝子を持つがん細胞系を用いて検証した結果、Ps-Oligo の添加濃度、光照射時間に依存して変異遺伝子を有する細胞のみの増殖を制御することが出来た。この結果は、従来困難であった点変異遺伝子の発現をアンチセンス法により制御できたことを示しており、今後のがん治療法の展開の方向性を示唆するものと考えている。

#### (4) 細胞内/初期胚内 RNA のリアルタイムモニタリング

生細胞を用いたトランスクリプトーム解析法開発を目指し、生細胞内 RNA のライブイメージングを試みた。刺激に対する初期応答遺伝子 *c-fos*-mRNA、*c-jun*-mRNA および *c-myc*-mRNA に対し pyrene-probe を作製し、生細胞系での mRNA のリアルタイム検出を試みた。その結果、図 3 に示すように細胞内の核周辺に明確な蛍光発光を確認し、さらにこの蛍光強度が時間経過とともに変化することを確認した。この蛍光発光のスペクトルがセルフリー系で観測した蛍光スペクトルと一致したことから、コントロール配列を有する pyrene-probe では蛍光発光が見られなかったことより、生細胞を用いた RNA のライブイメージングに成功したと考えている。さらにこの手法を使って RNA 発現の時間変化も評価できることを明らかにした。

次いで、上記の成果の展開として、多細胞系における RNA イメージングを試みた。多細胞系試料としてショウジョウバエ初期胚を用いた WISH において、固定初期胚の中央部分に蛍光発光が観測された。この発光も pyrene-probe 由来であることが確認され、多細胞系でも RNA イメージングが可能になったことが明らかになった。従来の WISH 法ではプローブの作製からハイブリダイゼーション、検出まで数日を要していたが、単鎖核酸を用いる本法では 1 日以内に終了出来るというメリットも明らかになった。ただ、生きた状態の初期胚に対する RNA 検出の試みは成功に至っていない。初期胚に存在する膜の存在が障害になっていることが考えられる。

以上のように、様々な修飾を施した機能性核酸は、遺伝子診断、遺伝子治療の作用分子素子としての機能が高いことが明らかになった。更なる基礎研究を継続しながら臨床応用を視野に入れた研究を展開する必要がある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Waki R., Yamayoshi A., Kobori A., Murakami

A. Development of a system to sensitively and specifically visualize *c-fos* mRNA in living cells using bispyrene-modified RNA probes.

*Chem. Commun.*, 47, 4204-4206, 2011. (査読有)

2. Yamayoshi A., Yasuhara M., Galande S., Kobori A., Murakami A. Decoy-DNA Against Special AT-Rich Sequence Bionding Protein 1 inhibits the Growth and Invasive Ability of Human Breast cancer.

*Oligonucleotides*, 21, 115-121, 2011. (査読有)

3. Waki R., Yamayoshi A., Kobori A., Murakami A.

Real-time imaging of RNA expression in living cells using bispyrene-modified RNA probes.

*Chem. Lett.*, 40, 1247-1248, 2011. (査読有)

4. 脇 玲子, 村上 章. 蛍光標識 RNA プローブを用いた生細胞内 RNA のリアルタイムモニタリング.

*Antisense*, 15, 53-78, 2011. (査読無)

5. Higuchi M., Yamayoshi A., Kato K., Kobori A., Wake N., Murakami A. Specific regulation of point-mutated *K-ras*-immortalized cell proliferation by a photo-dynamic antisense strategy.

*Oligonucleotides*, 20, 37-44, 2010. (査読有)

6. Higuchi M., Kobori A., Yamayoshi A., Murakami A. Synthesis of antisense oligonucleotides containing 2'-*O*-psoralenyl-methoxyalkyladenosine for photodynamic regulation of point mutations in RNA.

*Bioorg. Med. Chem.*, 17, 475-483, 2009. (査読有)

7. Kobori A., Takaya K., Higuchi M., Yamayoshi A., Murakami A. Synthesis and Photoinduced Cross-linking Reactions of 4,5,8-Trimethyl-psoralen-incorporated Oligodeoxyribonucleotide.

*Chem. Lett.*, 38, 272-273, 2009. (査読有)

[学会発表] (計 102 件)

1. 眞田雄矢, 上田貴子, 小堀哲生, 山吉麻子, 村上 章.

FRET 型ピレン修飾核酸プローブの開発と RNA の可視化への応用.

日本化学会第 92 春季年会, 3D7-06, 2012.

(2012 年 3 月 27 日、慶応大学、神奈川県)

2. 村上 章, 内海夏希, 田崎一彦, 山吉麻子, 小堀哲生.

ビスピレン修飾型 2'-OMe RNA プローブを用いた RNA-タンパク質複合体検出法の開発.

日本化学会第 92 春季年会, 1PC-045, 2012.

(2012 年 3 月 24 日、慶応大学、神奈川県)

3. 富田康治, 小堀哲生, 山吉麻子, 村上 章. *M*<sup>4</sup>位にソラレン誘導体を導入したデオキシチジンを含む新規光応答性核酸の合成とその機能評価.

日本化学会第 92 春季年会, 1D7-10, 2012.

(2012 年 3 月 24 日、慶応大学、神奈川県)

4. 上田貴子、山吉麻子、小堀哲生、山口政光、村上 章.  
Whole mount *in situ* hybridization detection of mRNAs in the *Drosophila* embryos using bispyrene-conjugated RNA probes.  
38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry: ISNAC 2011.378, 2011. (2011年11月9日、北海道大学)
5. 脇 玲子、山吉麻子、小堀哲生、村上 章.  
A novel method to profile RNA expression in living cells using fluorescent RNA probes.  
38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry: ISNAC 2011.238, 2011. (2011年11月9日、北海道大学)
6. 脇 玲子、山吉麻子、小堀哲生、村上 章.  
蛍光標識 RNA プローブを用いた生細胞内 RNA の発現プロファイリング.  
アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2011, 85, 2011. (2011年9月1日、大阪大学)
7. 村上 章、眞田雄矢、上田貴子、山吉麻子、小堀哲生.  
マルチカラー RNA イメージングを目指した FRET 型核酸プローブの開発.  
アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2011, 65, 2011. (2011年9月1日、大阪大学)
8. 脇 玲子、山吉麻子、小堀哲生、村上 章.  
蛍光イメージング法によるアンチセンス効果の評価.  
日本化学会第 91 春季年会, 1B7-48, 2011. (2011年3月26日、神奈川大学、神奈川県)
9. 脇 玲子、上田貴子、山吉麻子、小堀哲生、村上 章.  
Development of time-dependent transcriptome analysis system of mRNA expression using bispyrene-modified RNA probes in living cells.  
Pacifichem 2010, 1006, 2010. (2010年12月15日、ホノルル、アメリカ合衆国)
10. 脇 玲子、山吉麻子、小堀哲生、村上 章.  
蛍光修飾 RNA プローブを用いた RNA 蛍光イメージング法の開発.  
第 20 回アンチセンスシンポジウム, 24, 2010. (2010年12月2日、甲南大学、兵庫県)
11. 村上 章、新井太一郎、田中瑠璃子、山吉麻子、小堀哲生、木村晋也、前川 平.  
Detection of a point mutation in JAK2 DNA related to myelopoietic diseases by ENA modified pyrene-labeled RNA probe.  
37th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry: ISNAC 2010, 310-311, 2010. (2010年11月10日、はぎまんホール・ヴァイアマーレ、神奈川県)
12. 脇 玲子、上田貴子、山吉麻子、小堀哲生、村上 章.  
*In vitro* 蛍光イメージング法による刺激応答性 mRNA の解析.

- 日本化学会第 90 春季年会, 4D4-15, 2010. (2010年3月29日、近畿大学、大阪府)
13. 脇 玲子、上田貴子、山吉麻子、小堀哲生、村上 章.  
*In situ* imaging of the immediate-early genes using bispyrene-modified RNA probes in living cells.  
国際核酸医薬シンポジウム, 84, 2009. (2009年11月3日、九州大学、福岡県)
14. 村上 章、山吉麻子、樋口麻衣子、脇 玲子、上田貴子、小堀哲生.  
Photodynamic antisense regulation of gene having a point mutation by functionalized oligonucleotides.  
国際核酸医薬シンポジウム, 29, 2009. (2009年11月3日、九州大学、福岡県)
15. 山吉麻子、樋口麻衣子、小堀哲生、村上 章.  
機能性核酸による点変異遺伝子の特異的機能制御法の開発.  
第 82 回日本生化学会大会, 4P-801, 2009. (2009年10月24日、神戸ポートアイランド、兵庫県)
16. 脇 玲子、上田貴子、山吉麻子、小堀哲生、村上 章.  
Real-time monitoring of mRNAs with fluorescence-modified RNA probes in living cells.  
The 6th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 153, 2009. (2009年9月27日、岐阜大学)

〔図書〕(計1件)

Murakami, A. Ed.  
Recent Progress of Nucleic Acid Drug Development, in *Advances in Polymer Science* (*Advances in Polymer Science*; Springer-Verlag, Berlin) in press, **2012**.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

村上 章 (MURAKAMI AKIRA)  
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授  
研究者番号：60210001

##### (2) 研究分担者

山吉 麻子 (YAMAYOSHI ASAKO)  
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・助教  
研究者番号：70380532

##### (3) 連携研究者

木村 晋也 (KIMURA SHINYA)  
佐賀大学・医学部・教授  
研究者番号：80359794