

治療・予防・診断を目指した分子の開発

春木 満, 木原慶彦, 根本修克

日大工・生命

1. ポリシロキサン誘導体による DNA の細胞へのターゲティング

核酸医薬は従来治療が困難である疾患に有効な医薬品として期待されているが、体内での分解を防ぎ、標的細胞にのみに選択的に送達するための効率的なキャリアの開発が課題となっている。我々は、ポリシロキサンを基盤とし、アルキンを有するイミダゾール誘導体により四級化を行ったカチオン性両親媒性ポリマー (PI_m) を開発しており¹⁾、これにクリック反応によりターゲティング分子を付加し、目的細胞に特異的に核酸を送達することを目指している。

まず、肝細胞に特異的なガラクトースをクリックケミストリーにより付加した PI_m-lac を用いて DNA 複合体を作製し、ルシフェラーゼアッセイにより細胞への取り込みを調べた。その結果、PI_m-lac を用いた場合、肝細胞由来の HepG2 細胞へは PI_m を用いた場合に比べて約 30 倍多く取り込みがみられたが、NIH3T3 細胞ではこのような差は見られなかった (図 1)。次に、グリオーマ細胞に多く発現している EGFR に結合するペプチドを PI_m に付加してグリオーマ細胞への

DNA の取り込みを調べたところ、PI_m に比べて約 10 倍多く取り込まれた。以上の結果から細胞特異的に DNA の導入を促進できたと考えられる。

2. ポリフェノール類による上皮型ナトリウムチャンネルの発現抑制効果の解析

腎臓細胞に存在する上皮性ナトリウムトランスポーター (ENaC) の過剰発現は食塩感受性高血圧の原因となる。ケルセチンなどのポリフェノール類は ENaC 発現抑制効果を有することが知られており、本研究ではジンゲロール誘導体や他のポリフェノール類による ENaC 発現抑制効果を解析した。解析は、アフリカツメガエル腎臓由来 A6 細胞に浸透圧ショックを与えることにより ENaC を発現誘導し、リアルタイム PCR を用いて ENaC mRNA を定量することにより行った。その結果、S 体および R 体の両方のジンゲロール誘導体について、鎖長が長い誘導体で顕著な抑制効果がみられた (図 2)。また、ケンフェロールは 200 μM の濃度で、クルクミンは 20 μM の濃度で顕著な抑制効果がみられた。

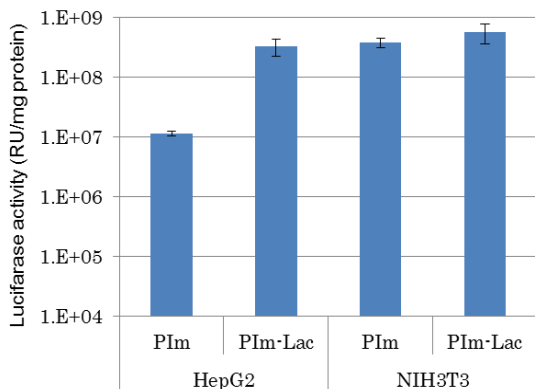


図 1 ルシフェラーゼアッセイによる Lactose を付加した PI_m による DNA 導入効率の解析

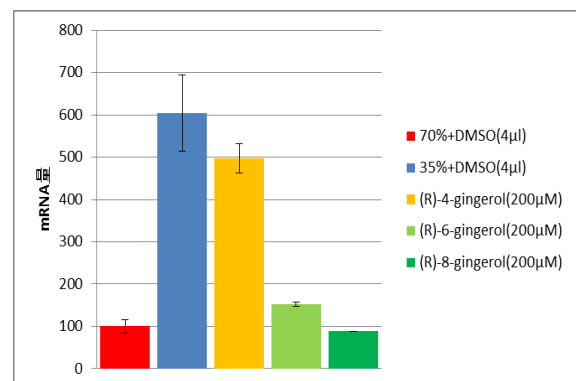


図 2 R 体ジンゲロール誘導体 (200 μM) による ENaC 発現抑制効果の解析

3. アミロイドβペプチド凝集の検出法の開発

(1) 蛍光偏光解消法を用いたアミロイド凝集検出法の開発

アミロイドβペプチド (Aβ 12-28) および fluorescein ラベルした Aβ 12-28 をモル比 10:1 の割合で hexafluoroisopropanol (HFIP) に溶解した後に真空乾燥し、最終濃度 20 μM となるように 10% HFIP を含む 50 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.1) に溶解し、同緩衝液に懸濁した Aβ 12-28 を最終濃度 2 μM になるように加えて蛍光偏光解消度を測定した。その結果、継続的に偏光度の増大がみられ (図 3)、これはアミロイドβペプチドの凝集によると考えられる。偏光度が上昇した後、アミロイド凝集を解消させる効果が報告されているクルクミンを最終濃度 37 μM となるように加えると偏光度の減少がみられ、凝集の解消が観測できたと考えられる。これを利用してアミロイド凝集を抑制する化合物を簡便に探索できると期待される。

(2) 金コロイドを用いたアミロイド凝集検出法の開発

アルキンを導入したカチオン性ポリシロキサン誘導体にアジド化したジスルフィドおよびアミロイドβペプチドをクリックケミストリーにより付加し、金コロイド表面へのコーティングを行った。作成した金コロイドにアミロイドβペプチドを加えた結果、暗赤色から薄桃色へ変化が見られた。これは金コロイドに連結されたアミロイ

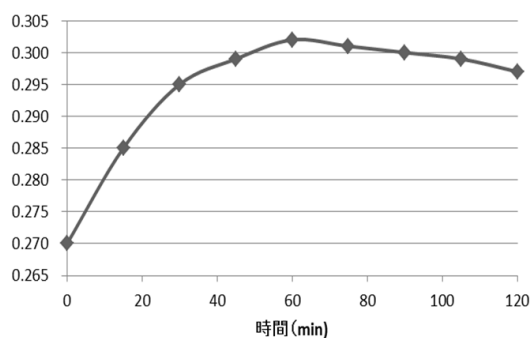


図 3 アミロイドβペプチド凝集による蛍光偏光度の経時変化

ドβペプチド間の結合が遊離のアミロイドβペプチドを加えることにより切断され、凝集していた金コロイドが分散した可能性が考えられる。

4. 細胞内における RNase H 分解を利用したアクチベータブル蛍光プローブの開発

癌組織や動脈硬化プラークなどの病変部を可視化して識別することは、疾患の診断や外科的切除での取り残し防止のために重要である。蛍光分子を用いて検出する場合、患部以外に残存するバックグラウンドの蛍光が検出の妨害となる。そこで、遊離の状態では蛍光を生じず、患部に取り込まれた場合のみ蛍光を発するアクチベータブル蛍光プローブが有用と期待される。本研究では、細胞内の RNase H により分解されることで蛍光を発するアクチベータブル蛍光プローブの開発を目指した。5'-fluorescein ラベルした RNA と 3'-quencher (BHQ1) ラベルした DNA を用いて molecular beacon 型 DNA/RNA ヘテロ二重鎖を調製し、RAW264 マクロファージ細胞に導入したところ、細胞内に蛍光が検出された (図 4)。したがって、細胞内の RNase H により RNA 鎖が分解されたことにより fluorescein が遊離し、蛍光を発したと考えられる。

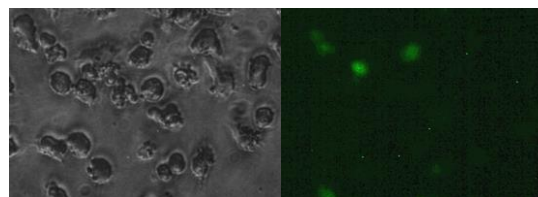


図 4 DNA/RNA ヘテロ二重鎖蛍光プローブの RAW264 細胞への取り込み (左)透過光観察 (右)蛍光顕微鏡観察

【参考文献】

- 1) Kihara, Y., Ichikawa, T., Abe, S., Nemoto, N., Ishihara, T., Hirano, N., and Haruki, M., *Polym. J.*, 46, 175-183 (2014).
- 2) 新里直美, 丸中良典, 大豆たん白質研究, 9, 147-152 (2006).