

# 治療・予防・診断を目指した分子の開発

春木 満, 根本 修克, 市川 司

日大工・生命

## 1. 研究の目的

Active aging を達成するうえで、癌や脳疾患・高血圧など高齢化に伴って増加する疾患や、B型肝炎など完治の困難なウイルス性感染症の予防・治療は重要な課題である。そこで、このような疾患に対して、治療薬や予防・診断法の開発を目指している。

## 2. 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<sub>m</sub>) を開発しており (図 1) <sup>1)</sup>、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<sub>m</sub>-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<sub>m</sub>-lac を用いた場合、肝細胞由来の HepG2 細胞へは PI<sub>m</sub> を用いた場合に比べて約 30 倍多く取り

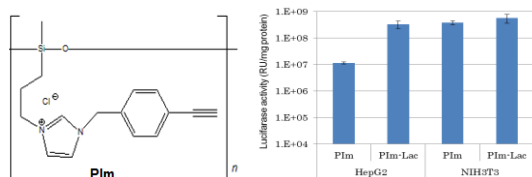


図 1 Lactose を付加した PI<sub>m</sub> による DNA 導入効率の解析

込みがみられたが、NIH313 細胞ではこのような差は見られなかった (図 1)。したがって、PI<sub>m</sub>-lac により HepG2 細胞へ特異的に核酸を送達できることが示された <sup>2)</sup>。

次に、グリオーマ細胞への核酸送達を目指した。脳腫瘍のうちでも特に悪性度が高いグリオーマには効果的な治療法がなく、その開発が求められている。グリオーマに薬剤を特異的に送達することは、その手段のひとつとして期待されている。さらに、グリオーマ細胞 (U87-MG) 表面に発現している上皮成長因子受容体 (EGFR) を標的とし、EGFR に特異的に結合するペプチド (GE-11) を連結した PI<sub>m</sub> を用いてグリオーマ細胞特異的遺伝子送達を行っている。しかしながら、PI<sub>m</sub> は合成収率が悪く、再現性良く良好な品質の標品を得ることが困難であったため、新たな誘導体 (PI<sub>m</sub>2) の合成を行った。GE-11 ペプチドを PI<sub>m</sub>2 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<sub>m</sub> に比べて約 10 倍多く取り込まれた (図 2)。しかしながら、PI<sub>m</sub>2 は PI<sub>m</sub> に比べて細胞への取り込み効率は 100 倍程度低くなっていた。その原因として、DNA との結合が弱いこと

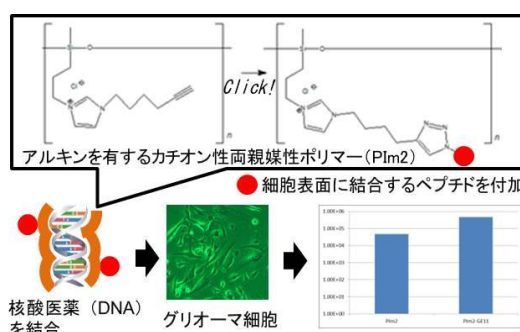


図 2 EGFR 結合ペプチドを付加した PI<sub>m</sub>2 によるグリオーマ細胞への DNA の送達

や、細胞毒性が高いことが考えられる。このような性質を改善するためには、側鎖にフェニル基を導入するなどの方法が考えられる。また、細胞への取り込み効率を高めるために、連結するペプチドの数を多くすることも検討している。

### 3. 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 3)。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。DNA/DNA 二重鎖の場合にも同様に蛍光が見られたが、リソソーム酸性化阻害剤

Bafilomycin を加えると蛍光が見られなかった。リソソームの DNase による分解にはリソソーム酸性化が必要なことから、DNA/DNA 二重鎖はリソソームの DNase によって分解されると考えられる。これに対し、DNA/RNA ヘテロ二重鎖の場合は Bafilomycin 存在下においても蛍光がみられた。したがって、細胞内の RNase H によりヘテロ二重鎖の 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。次に、動脈硬化プラークに浸潤しているマクロファージに選択的にプローブを取り込ませることにより、動脈硬化を診断することを目指した。そのために、マクロファージに取り込まれるデキストランを付加した PIm2 (PIm2Dex) を作成した。ルシフェラーゼ遺伝子発現プラスミドの RAW264 細胞への取り込みを測定したところ、PIm2Dex では PIm2 よりも取り込み効率が低下していた。その原因として、未修飾のポリマーでは食作用を介さない非特異的取り込みが多くなっていることが考えられる。取り込み効率を向上させるため、付加するデキストランの分子量を検討している。

### 4. 金コロイドを用いたアミロイド・ペプチド検出法の開発

アルツハイマー病は脳内でアミロイド・ペプチド (A $\beta$ ) が凝集して老人斑 (アミロイド斑) として沈着し、やがて神経細胞が死滅することから、アルツハイマー病は A $\beta$ が原因というアミロイド仮説が有力となっている。現在アルツハイマー病の効果的な治療法はなく、進行を抑制する効果のある薬しかないことから、早期発見・早期診断が大切となっている。そのような診断法の開発を目指し、A $\beta$ を付加した金コロイドの作成を行うために、アルキンおよびチオールを導入したカチオン性ポリシロキサン誘導体 PIm-SH の合成を行った (図 4)。アジド化した A $\beta$  を PIm-SH にアルキンを介してクリック反応により結合し、HAuCl<sub>4</sub>を加

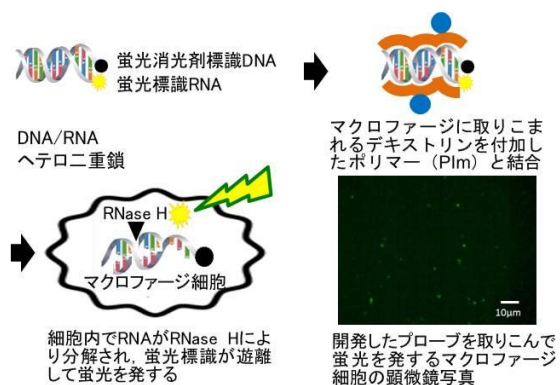


図3 DNA/RNA ヘテロ二重鎖蛍光プローブの RAW264 マクロファージ細胞への取り込み

えた後、 $\text{NaBH}_4$  で還元することにより金コロイドを作製した。作製した金コロイドおよび  $\text{A}\beta$  を添加した金コロイドを図4に示す。15  $\mu\text{M}$  になるよう  $\text{A}\beta$  を加えた結果、凝集を確認した。これは、金コロイドに付加した  $\text{A}\beta$  と添加した  $\text{A}\beta$  が凝集することで生じたと考えられる。この結果から、金コロイドにより  $\text{A}\beta$  を検出できるという可能性が示唆された。

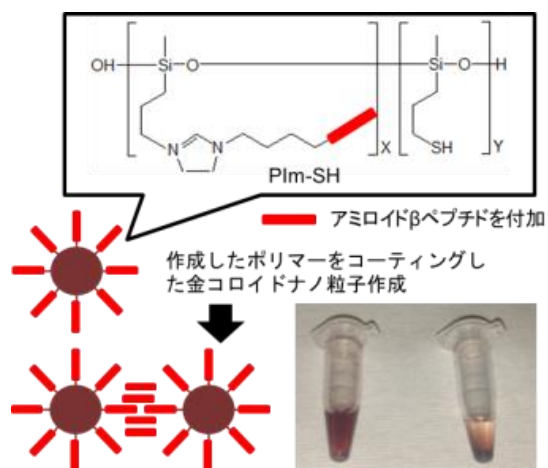


図4 Plm-SHを用いて作製した金コロイドによるアミロイド $\beta$ ペプチドの検出

### 5. 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。ENaC の mRNA の合成を抑えることが出来れば、食塩感受性高血圧の予防に効果があると期待される。ENaC は  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  のサブユニットからなり、3つのサブユニットを全部抑制できるほうが高い効果を示すと期待される。フラボノイドの一種である Quercetin は、 $\alpha$  ENaC 発現抑制効果が報告されているが、 $\beta$  ENaC および  $\gamma$  ENaC 発現も抑制されるかは興味深い。そこで、Gingerol 誘導体や他のポリフェノール類による  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  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 Gingerol 誘導体、Curcumin, Piceatannol, Zingerone, Quercetin に  $\beta$ ,  $\gamma$  ENaC 発現抑制効果がみられた (図5)。低浸透圧ショックにより p38 MAP キナーゼの活性化が引き起こされ  $\beta$  ENaC 遺伝子、 $\gamma$  ENaC 遺伝子の転写が促進されることが報告されている<sup>3)</sup>。今回効果を示した化合物は Tyrosine と構造に類似性があるため、p38MAPK による Tyrosine のリン酸化を阻害し、 $\beta$ ,  $\gamma$ -ENaC 遺伝子の転写が抑制されたと考えられる。

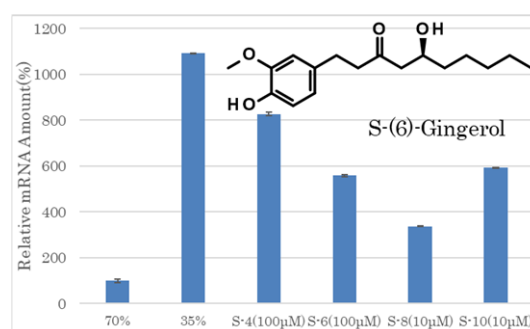


図5 S 体 Gingerol 誘導体による $\beta$ ENaC 発現抑制効果

### 6. 既承認薬ライブラリーを用いた新規薬効探索

L T T バイオファーマ社との共同研究により 1241 種の既承認薬ライブラリー、富山大学和漢医薬学総合研究所の探索研究プロジェクトに生薬エキス (120 種)、生薬成分化合物ライブラリー (96 種)、および漢方方剤エキス (42 種) の提供を受けた。これらのライブラリーを用いて、酸化ヌクレオチド分解酵素 MTH1 および B 型肝炎ウイルス逆転写酵素 RNase H 阻害剤の探索を行った。

#### (1) MTH1 阻害剤の探索

癌細胞は酸化ストレスを多く受けるため、酸化されたヌクレオチドを分解する MTH1 の発現が上昇する。MTH1 の活性を阻害すると癌細胞を死滅させることができ、普遍的な抗癌剤となると期待されている。そこで、MTH1 の活性を阻害する化

化合物の探索を目的とした。MTH1の活性は、基質として dGTP を用い、その分解により生じるピロリン酸を発色させて検出した。化合物を 0.1 mM の濃度で加え、生薬由来化合物についてスクリーニングを行った。これまで既承認薬ライブラリーの化合物については 8 種について顕著な活性の阻害がみられた。そのうち 1 種については 1.3  $\mu\text{M}$  で 50%の活性を阻害した。生薬由来化合物についてはバイカリン、ベルベリン、カピラリシン、硝酸デヒドロコリダリン、塩化パルマチンに 50%以上の阻害がみられた (図 6)。次に、生薬エキスを 0.2 mg/mL の濃度になるように加えた場合の結果、オウバクにおいて 50%以上の阻害が見られた。ベルベリン、デヒドロコリダリン、パルマチンは構造式が類似しており、ともに阻害活性を有することは順当といえる。また、パルマチンを含むオウバクにも阻害活性がみられたこととも合致する。漢方方剤エキスについては 0.2 mg/mL の濃度で加えてスクリーニングを行い、黄蓮解毒湯、半夏白朮天麻湯について 50%以上の阻害がみられた。

## (2) B型肝炎ウイルス逆転写酵素 RNase H 阻害剤の探索

B型肝炎ウイルス (HBV) の増殖に必須である逆転写酵素の RNase H 活性を阻害することにより、ウイルスの増殖を抑える薬剤の探索を目的とした。RNase H の活性は、基質として molecular beacon 型 DNA/RNA ヘテロ二重鎖を用い、その分解により生じる蛍光により検出した。既承認薬ライブラリーの化合物を 0.1 mM の濃度で加え、これまで 400 種類の化合物についてスクリーニングを行った。このうち 6 種について、顕著な活性の阻害がみられた。これらの化合物については、さらに詳しい解析を行う予定である。生薬由来化合物の化合物を 0.1 mM の濃度で加えた結果、Alisol A, Astragaloside IV, Ginsenoside-Rb1,

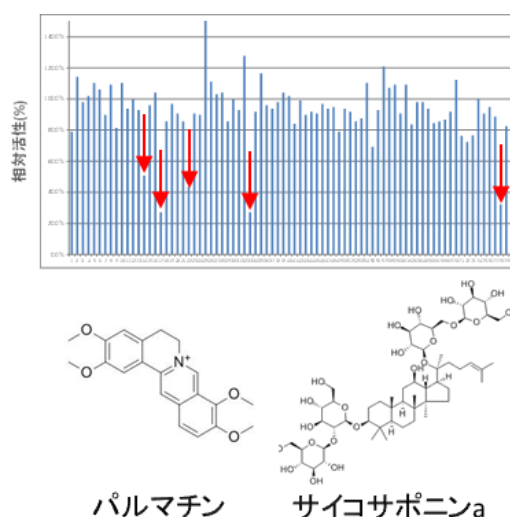


図 6 MTH1 を阻害する生薬由来化合物のスクリーニング結果 (上) と MTH1, HBV RNase H を阻害する生薬由来化合物の例 (下)

Ginsenoside-Rc, Ginsenoside-R, Icaritin, Saikosaponin a, Saikosaponin b2, Saikosaponin c, Saikosaponin d, Timosaponin A-III に顕著な阻害がみられた。これらの化合物は Icaritin を除きトリテルペノイドまたはステロイド骨格を有しており、このような構造が RNase H の活性阻害に必要と考えられる。また、Alisol A, Astragaloside IV, Saikosaponin には B型肝炎ウイルス増殖抑制効果が報告されており、本研究によりその阻害効果は逆転写酵素の RNase H 活性の阻害によることが示唆される。

## 【謝辞】

本研究は LTT バイオファーマ社との共同研究として、また平成 28 年度富山大学和漢医薬学総合研究所の共同利用・共同研究助成を受けて行われました。ここに感謝の意を表します。

## 【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) Kihara, Y., Maeda, R., Imaizumi, A., Ichikawa, T., Nemoto, N., Ishihara, T., Hirano, N., and Haruki, M., *J. Nanosci., Nanotech.*, 17, 5081-5089 (2017)
- 3) 新里直美, 丸中良典, 大豆たん白質研究, 9, 147-152 (2006).