

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4048296号
(P4048296)

(45) 発行日 平成20年2月20日(2008.2.20)

(24) 登録日 平成19年12月7日(2007.12.7)

(51) Int.Cl.

F 1

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 1 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2002-47136 (P2002-47136)	(73) 特許権者	591038945
(22) 出願日	平成14年1月18日(2002.1.18)		村松 喬
(65) 公開番号	特開2003-210171 (P2003-210171A)		愛知県名古屋市天白区天白町大字平針字黒
(43) 公開日	平成15年7月29日(2003.7.29)		石2845-161
審査請求日	平成17年1月17日(2005.1.17)	(74) 代理人	100120293
			弁理士 長谷川 智子
		(72) 発明者	武井 佳史
			岐阜県岐阜市此花町2丁目5番地
		(72) 発明者	門松 健治
			愛知県名古屋市天白区中平5-1905ラ
			イオンズマンション中平101
		(72) 発明者	村松 喬
			愛知県名古屋市天白区天白町大字平針字黒
			石2845-161

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な安定化されたアンチセンスオリゴヌクレオチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

mRNAに相補的なアンチセンスオリゴヌクレオチドの5'-及び3'-両末端に逆向
キチミジン誘導体を結合させて得られる、安定なアンチセンスオリゴヌクレオチド。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アンチセンスヌクレオチドの作成に関する。

【0002】

【従来の技術】

アンチセンスオリゴDNAは特定のタンパク質の発現を抑える技術として高く評価されてきた。最も良く利用されるのはホスホロチオエイト骨格(Matsukura, M. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 7706-7710, 1987; Agrawal, S. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 7790-7794, 1989)のものである。しかし、ホスホロチオエイト骨格のオリゴヌクレオチドは細胞毒性が強いので、近年、いくつかの他のアンチセンスオリゴヌクレオチドの作成が行われた。例えばNielsen, P. E. et al. (Chem. Soc. Rev., 73-78, 1997), Uhlmann, E. et al. (Angew. Chem. Int. Ed., 37: 2796-2823, 1998), Lebréton, J. et al. (Synlett, 137-140, 1994), Idz

10

20

iak, I. et al. (Tetrapedron Lett., 34, 5417-5420, 1993)。しかし、毒性のなさ、ヌクレアーゼ抵抗性、合成の容易さを全て満たすのは困難な課題であった。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、毒性が低く、ヌクレアーゼ抵抗性が高く、合成が容易なアンチセンスオリゴDNAを合成することを課題とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】

逆向きチミジン (T) 修飾されたヌクレオチドを3'末端に持つDNA酵素は安定性が高い (Sioud, M. et al., J. Mol. Biol., 296, 937-947, 2000; Santiago et al., Nature Med., 5, 1264-1269, 1999) との知見はあるが、アンチセンス法に於いては応用されていなかった。そこで検討を重ね、3'末端、5'末端のいずれも逆向きTで修飾された5'-、3'-逆向きTと称するオリゴDNAを合成し、その活性を調べた。

【0005】

すなわち、本発明は、(1) 合成が容易で、毒性が少なく、ヌクレアーゼ抵抗性が高いアンチセンスオリゴDNAの合成からなる。

【0006】

【発明の実施の形態】

以下添付の図面に従ってこの発明を詳細に説明する。図1は5'-、3'-逆向きT修飾オリゴDNAの構造を、図2はその効果を増殖因子ミッドカインの発現抑制で調べたもの、図3はヌクレアーゼに対する安定性、図4は細胞毒性を調べたものである。

【0007】

1. 5'-、3'-逆向きTオリゴDNAの効果を判定した増殖因子ミッドカインについて説明する。アンチセンスオリゴDNAは特定のタンパク質の発現を抑える技術として高く評価されてきた。最も良く利用されるのはホスホロチオエイト骨格 (Matsukura, M. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 7706-7710, 1987; Agrawal, S. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. 86: 7790-7794, 1989) のものである。しかし、ホスホロチオエイト骨格のオリゴヌクレオチドは細胞毒性が強いので、近年、いくつかの他のアンチセンスオリゴヌクレオチドの作成が行われた。例えばNielsen, P. E. et al. (Chem. Soc. Rev., 73-78, 1997), Uhlmann, E. et al. (Angew. Chem. Int. Ed., 37: 2796-2823, 1998), Lebretton, J. et al. (Synlett, 137-140, 1994), Idziak, I. et al. (Tetrapedron Lett., 34, 5417-5420, 1993)。しかし、毒性のなさ、ヌクレアーゼ抵抗性、合成の容易さを全て満たすのは困難な課題であった。マウスMKのmRNA (Tomomura, M. et al.: J. Biol. Chem. 265: 10765-10770, 1990) あるいはヒトMKのmRNA (Tsutsui, J. et al.: Biochem. Biophys. Res. Commun., 176: 792-797, 1991) は既に報告されている。このヌクレオチド15-32を基にMKの発現を抑えるアンチセンスヌクレオチドが設計されている (Takei, Y., Cancer Res., 61: 8486-8491, 2001)。

【0008】

2. アンチセンスオリゴヌクレオチド配列によるMKの合成抑制の効果判定について説明する。アンチセンスオリゴヌクレオチド配列を持つ物質を、MKを合成分泌している細胞に投与し、培養液中に分泌されるMKを免疫生化学的に定量する。MKの免疫生化学的定量法としては酵素免疫法 (Muramatsu, H. et al.: J. Biochem., 119: 1171-1175, 1996) あるいはSDSポリアクリルアミドゲル電

10

20

30

40

50

気泳動後のウェスタンプロティング (Muramatsu, H. et al. : Dev. Biol., 159; 392-402, 1993) そしてデンシトメーターによる定量が考えられる。

【0009】

3. アンチセンスオリゴDNAの細胞毒性の判定について説明する。細胞にアンチセンスオリゴDNAを加え、細胞増殖測定キット (同仁化学) によって吸光度を測定することによる。

【0010】

4. アンチセンスオリゴDNAの安定性の判定について説明する。アンチセンスオリゴDNAを血清と共に保温 (37℃) し、ポリアクリルアミド尿素変性ゲル電気泳動によってオリゴDNAのサイズを調べることによる。

【実施例】

以下、実施例により本発明を説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0011】

(実施例1) アンチセンスオリゴDNAの作成を行った。5'-、3'-逆向きアンチセンスDNA (配列番号1)、同リバーズDNA (配列番号2)、同センスDNA (配列番号3) を設計した。

【0012】

配列番号1 5'-TAGGGCGAGAAGGAAGAAGT-3',

配列番号2 5'-TGAAGAAGGAAGAGCGGGAT-3',

配列番号3 5'-CTTCTTCTCCTTCTCGCCCTT-3',

下線のTは逆向きTを示す。

【0013】

DNAシンセサイザー、Expdite 8900 Nucleic Acid Synthesis System (Applied Biosystems社) により5'-、3'-逆向きオリゴDNA、アンチセンスオリゴDNAを合成し、Wakopak Handy ODSカラム (Waters) にてHigh performance液体クロマト (HPLC) 精製を行い、検討に用いた。コントロール配列として、アンチセンス部位に対応したセンスとリバーズDNAを同様に合成・精製して使用した。

【0014】

(実施例2) 5'-、3'-逆向きTアンチセンスDNAによるMK産生の抑制を検討した。MKを分泌しているマウス直腸癌細胞 (CMT-93, American Type Culture Collection; ATCC Number CCL-223) を35mmディッシュ (FALCON, 3001) に 3×10^5 個/ディッシュ [ウシ胎仔血清 (FBS) 10% / ダルベッコ修飾最小必要培地 (DMEM)] の細胞密度で正確にまき、37℃、5% CO₂ 存在下で1晩前培養した。翌日、37℃に加温したITS-ヘパリン/DMEM (インスリン10 µg/ml、トランスフェリン5.5 µg/ml、亜セレン酸6.7 ng/mlおよびヘパリン20 µg/mlをそれぞれ最終濃度で含むDMEM) にて洗浄し、同培地を1mlを加え2時間培養した。あらかじめ、1mMに濃度調整した5'-、3'-逆向きTアンチセンスDNAまたはコントロールDNAを30 µlとり、DMEM630 µlと混合し、Lipofectamine-plus kitのplus試薬を60 µl加え、室温で15分反応させた。さらに、Lipofectamine試薬24 µlを加え、室温で15分反応させ、アンチセンスDNA・リポソーム処理液の調製を完了した。なお、上記調製量は35mmディッシュで5枚 (5重アッセイ用) に投与可能な量である。続いてCMT-93細胞に新鮮なDMEM0.8mlを満たし、前述のアンチセンスDNA・リポソーム処理液を0.2mlを加えた後、37℃、3

10

20

30

40

50

時間トランスフェクションを行った。このとき、アンチセンスDNAの投与濃度は5 μ Mとなる。10% FBS/DMEM 1 mlを加え、7時間、培養した。細胞をDMEMで洗浄し、ITS-ヘパリン/DMEM 1 mlを加え、さらに16時間培養を続け、上清を回収した。回収した培養上清についてSDSゲル電気泳動(SDS-PAGE)(15%ゲル)の後、抗MK抗体を用いたウエスタンブロットを村松らの方法(Muramatsu, H. et al: Dev. Biol. 159: 392-402, 1993)によって行った。その結果を図(図2A)に示す。レーン1のアンチセンスDNA投与においてのみ、MKに特異的なバンドの減弱を観察した。コントロール配列のリバースDNAとセンスDNAを投与しても、同細胞のMK産生は抑制されなかった。これは、アンチセンスDNA投与により、CMT-93細胞のMKの産生・分泌量が減少したことを示している。また、各バンドの濃度をデンストメータで測定したところ、アンチセンスDNA投与細胞のMK産生量はセンスDNA投与細胞の9%にまで減少したことが分かった(図2B)。

10

【0015】

(実施例3) アンチセンスDNAを非熱処理5%ウシ血清と37℃で所定の時間保ち、そのオリゴDNAの大きさを7M尿素を含む20%ポリアクリルアミドゲル電

気泳動で分析した。各オリゴヌクレオチドはSYBR®ゴールド染色キット(モレキュラー・プローブ社)で染色した。5'-、3'-逆向きTオリゴDNAは5'末端側の1個のヌクレオチドがはずれるだけで安定であり(A)、3'-逆向きオリゴDNAも安定であった。(B)。S-オリゴDNA(C)、非修飾オリゴDNA(D)はいずれも不安定であった。

20

【0016】

(実施例4) アンチセンスオリゴDNAのCMT-93細胞への毒性を調べた。CMT-93細胞を 2×10^5 個ずつ24穴プレートにまき、10%ウシ胎児血清を含むDMEMで24時間培養した。ここに0、50、100、200 μ Mの5'-、3'-逆向きTセンスDNA、S-オリゴセンスDNAを加え、48時間後残存する細胞数を細胞カウントキット(同仁化学)で測定した。高濃度のS-オリゴセンスDNAは毒性を示した(B)が、高濃度の5'-、3'-逆向きTセンスDNAは毒性を示さなかった(A)。

【0017】**【発明の効果】**

以上図示し説明したように本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド作成法により、安定性が高く、活性の高いアンチセンスオリゴヌクレオチドを作成することができる。

30

【0018】

配列表

<1 1 0> 村松 喬

<1 2 0> アンチセンスオリゴヌクレオチドの新規作成法

<1 3 0> TM-0 0 3

<1 4 1> 2 0 0 2-1-1 8

<1 6 0> 3

【0 0 1 9】

10

<2 1 0> 1

<2 1 1> 2 0

<2 1 2> DNA

<2 1 3> Artificial Sequence

<2 2 0>

<4 0 0> 1

20

t a g g g c g a g a a g g a a g a a g t

【0 0 2 0】

<2 1 0> 2

<2 1 1> 2 0

<2 1 2> DNA

<2 1 3> Artificial Sequence

30

<2 2 0>

<4 0 0> 2

t g a a g a a g g a a g a g c g g g a t

【0 0 2 1】

<2 1 0> 3

<2 1 1> 2 0

<2 1 2> DNA

40

<2 1 3> Artificial Sequence

<2 2 0>

<4 0 0> 3

t c t t c t t c c t t c t c g c c c t t

【0 0 2 2】

【図面の簡単な説明】

50

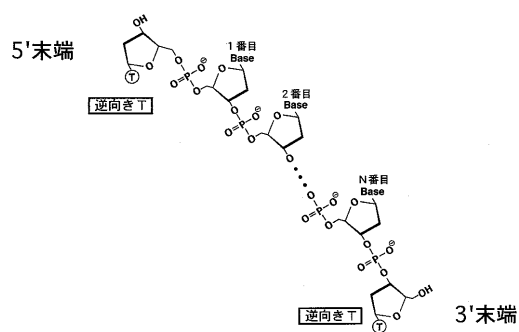
【図 1】この発明の 5' -、3' - 逆向きオリゴ DNA 構造式を示す。

【図 2】この発明の一実施例に関わる、アンチセンス DNAなどを投与した CMT-9 3 細胞の MK 産生抑制を示す。A はウエスタンブロットの図であり、B は A で検出した MK に特異的なバンドの濃さをデンストメータ解析によって数値化したグラフである。

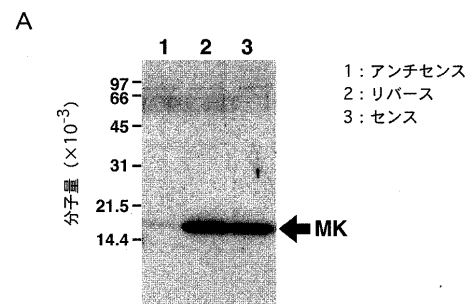
【図 3】この発明の一実施例に関わるアンチセンス DNA の血清中における安定性を示したポリアクリルアミド電気泳動の写真である。

【図 4】この発明の一実施例に関わる、CMT-9 3 細胞への毒性を示したグラフである。

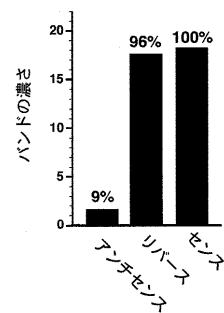
【図 1】



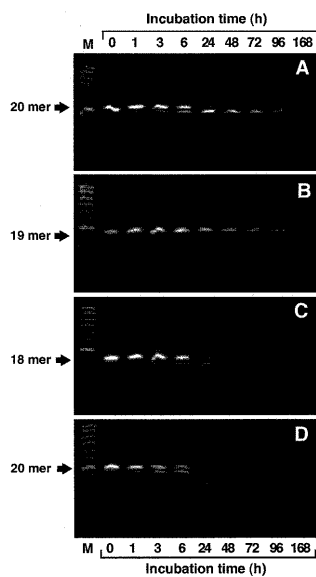
【図 2】



B

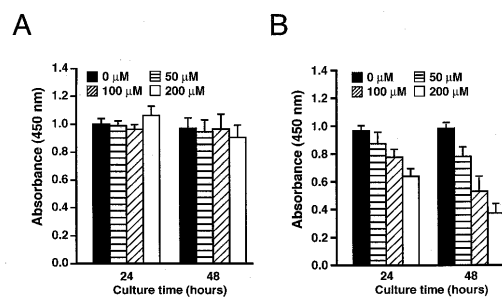


【図 3】



A: 5', 3'-逆向き T オリゴ DNA
 B: 3'-逆向き T オリゴ DNA
 C: S オリゴ DNA
 D: 非修飾オリゴ DNA

【図 4】



A: 5', 3'-逆向き T オリゴ DNA
 B: S オリゴ DNA

フロントページの続き

審査官 内藤 伸一

(56)参考文献 J.Mol.Biol.,(2000),296,p937-947

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters ,(2002),12,p73-76

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/09

CA(STN)

BIOSIS(STN)

WPIDS(STN)