

シリーズ「生理学者のための分子生物学技術講座」

アンチセンスオリゴヌクレオチドによる生理機能解析

武内 恒成*・山田 竜一*・井ノ口 馨**・高橋 直樹*

(* 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科・

** 三菱化学生命科学研究所)

I. は じ め に

生体内分子の機能を解析するには、その分子の欠損や不活性化を用いた手法が、現在最も有効な研究方法であることは間違いない。ジーンターゲティング法は、そのなかでも最も多くの成果をもたらした。しかし、このジーンターゲティング法では発生初期で致死となる分子では、詳細な生理機能の解析ができないこともある。また、類縁分子による代償作用や redundancy がある分子の解析では、期待されただけの明らかな変化を生じることなく、やはり解析が困難であることも多い。そのために、その分子の機能が発揮される組織部位特異的、あるいは個体発生の特定の時期特異的に遺伝子をノックアウトする技術が必要とされてきている。さらに、細胞レベルでの機能が示唆され、個体レベルでの解析まで必要としない場合にはジーンターゲティングまで求めないこともある。いくつもの分子を様々な組み合わせで発現抑制したり、ふたたび再発現し解析を試みる必要がある場合にもジーンターゲティング法ではなかなか困難である。

アンチセンス法は、このような要求に答える研究方法の一つであると考えられる。アンチセンス法に用いられる分子には、リボザイムやベクターが産生するアンチセンス RNA も含まれるが、本稿ではオリゴヌクレオチドを用いたものに限定する。リボザイムは分子設計が大変な上、標的とする組織に安定してデリバリーし、機能させるためには問題点が多い。ベクター産生型のアンチセンスは多くの成果をあげているが、ベクター作製の手間とアンチセンス分子の

発現効率をいかにして高めるかが問題となる。これに対しアンチセンスオリゴ法は、特別な設備やテクニックを必要とはせず実験系として最も簡単である。また、数種類の分子を狙った時期で発現抑制する実験系なども可能で、様々な応用が考えられる。しかしながらその簡易さゆえに、一度試してみたがうまく行かなかった、アンチセンスは効かないという声も非常によく耳にする。汎用できる方法論は確立しておらず、未だ試行錯誤によりそれぞれの分子の発現抑制のために試みなければならない点も多い。しかし、一度、実験系として確立できれば、生理機能を見たい分子の解析に非常に強力な手段となりえる。そこで本稿では、アンチセンスオリゴ法を実際の解析に用いる際に考慮すべき問題点などについて、我々の実験結果を基に概説したい。前半では細胞機能解析にこの系を用いる際のいくつかの注意すべき項目と我々の改良点を紹介する。後半部は in vivo での我々の解析例を紹介し、アンチセンスオリゴ法を生体内で実際に解析に用いる際のポイントと応用、今後の展望について考えてみたい。

II. 原 理

アンチセンスオリゴヌクレオチドの機能は、標的遺伝子の発現を抑制することである[1-4]。しかし、その制御機構については未だ不明な点が多い。現在考えられる機構としては、翻訳の阻害が主たる要因であると考えられている。RNase H, RNase III が DNA-RNA の二本鎖に作用して、mRNA を切断する効果の重要性が最も指摘されている[5](図1)。また、AUG 翻訳開始コドン近傍、リボソーム結合部位での阻

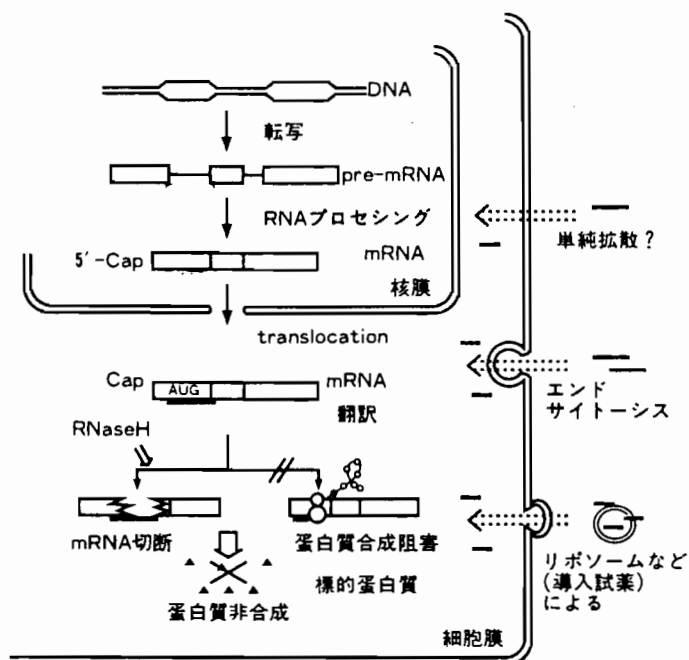


図1. アンチセンスオリゴの作用機構

■: アンチセンスオリゴ

害で、蛋白質合成を阻止する可能性も示唆されている。作用機構の詳細は今後のさらなる解析を待たなければならないが、実際は mRNA の分解と翻訳阻害両方の要因が寄与しているものと考えられている。原理の詳細な解明が進められる一方で、今日までに、アンチセンスオリゴ法を用いた細胞機能の解析が数多く行われ、成果をあげている。しかし、狙った成果をあげるまでに問題となる点も多い。大きくわけて

1. オリゴの化学的安定性、2. 細胞毒性の抑制、3. 標的遺伝子の選択と特異性、4. オリゴの細胞膜透過性と導入効率などがもっとも問題とされる。

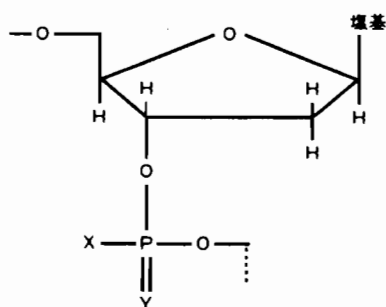
ここでは、それぞれの問題点ごとに注意すべきポイントと我々の具体的なプロトコールを示すので、読者の方々がそれぞれの分子で試す際の参考にしていただければ幸いである。

Ⅲ. 細胞機能解析 (in vitro) でのアンチセンスオリゴ法の実際

A. アンチセンスオリゴの分子設計の指針

1. オリゴの化学的安定性

アンチセンスオリゴがその効果を発揮するためには、前述のような標的部位に到達するまで安定でなければならない。ホスホジエステルオリゴ(D-オリゴ)も、かつては多く用いられてきたが、天然型であるためヌクレアーゼにより分解される。また、ポリアニオンであるために、細胞膜透過性も悪い。そこで、図2に示すような、修飾型アンチセンスオリゴが利用されている。メチルホスホネートオリゴ(MP-オリゴ)は細胞への透過性はあがるが、水性溶媒に溶けにくい。このほかにも糖鎖部位を修飾したオリゴが開発されている。それらの中でも現在主流を占めているのは、ホスホロチオネートオリゴ(S-オリゴ)である。S-オリゴはD-オリゴの骨格を残したまま、安定性、水溶性、ともに優れている。負電荷を帯びていることから細胞膜透



X-Y

O-O	ホスホジエステル (D-オリゴ)
S-O	ホスホロチオネート (S-オリゴ)
CH ₃ -O	メチルホスホネート (MP-オリゴ)
S-S	ホスホジチオネート
NHR-O	ホスホラミデート

図2. アンチセンス分子の基本構造

過性もよく、通常の DNA 合成機で作製できるという利点もある。我々の経験からも、現状では S-オリゴの利用が最適と考えられる。現在では様々な業者が受託合成を行っている。ただし、2. の細胞毒性の抑制の問題とも絡んで、どのような業者に如何に合成してもらうかが大きな問題となる。この点については、後で解説する。

オリゴヌクレオチド全長のうち、どこに S-型の修飾をするかも問題となる。実際、末端数残基のみや 1 塩基おきに修飾している例も見受けられる。しかし、我々は問題がなければ全長全ての残基に修飾することを勧めている。我々の解析例では、全修飾では効果があったオリゴが、一部の修飾だけに置き換えると効果が低減したケースがあった。ただ、S-型オリゴが細胞表面や細胞内高分子に特異的に結合してしまうことによる細胞毒性の問題も指摘されている。このために、我々はかなり高濃度のアンチセンスオリゴでないと効果が得られない場合や生体内 (in vivo) に投与して用いる場合には、検討を重ねた上で部分修飾に置き換える場合もある。

2. 細胞毒性の抑制、アンチセンスオリゴの合成と精製

アンチセンス法の実験系において、S-オリゴは D-オリゴに比べ、細胞毒性が強いことが知られている。合成したオリゴを逆相 HPLC にかけて、その溶出パターンをみると、S-オリゴは D-オリゴの場合に比べてブロードなピークが多くみられる。これらは、合成の際に生じる立体異性体や未反応の短鎖 S-オリゴの不純物である。この不純物が細胞毒性に影響することを我々は確認している (未発表)。すなわち、S-オリゴの精製度を上げることにより、細胞毒性は大幅に軽減される。そのために二段階の逆相 HPLC で精製を行っている。トリチル基 ON で合成した S-オリゴを逆相 HPLC で分取し、短鎖 S-オリゴや不純物を除く。トリチル基をはずした後に、再度逆相 HPLC にて高純度の S-オリゴを得ている。少なくとも 2 回 HPLC で精製したものをを用いるのが確実である。

実際には業者に受託合成を依頼することが多いが、この際にはできる限り精製を丁寧に行ってくれる業者に頼むべきである。どこに頼むかで実験の成否を大きく分けることがある。我々もある業者では細胞毒性が高くて解析に用いることができないことがあった。業者が用いているカラムの種類、カラムのメンテナンスの状況も大きく反映していると思われる。ラージスケールも含めた合成と精製は東亜合成(株)が詳しく、成功例も多いため、我々も勧めている。

3. 標的遺伝子への特異性

a. 何を標的とするか

アンチセンスオリゴ法の成否は、アンチセンス領域の選択、つまりどこを標的配列として選ぶかにかかっているといっても過言ではない。

アンチセンスオリゴの標的としては、前述のとおり mRNA である。DNA が標的となる可能性も指摘されているが (3 重鎖形成、トリプレックス形成)、3 重鎖を形成する部位がホモプリン・ホモピリミジンに限定されるので結合特異

性は低いと思われる。実際、mRNA を標的とした細胞系での RNaseH の関与の指摘からも [5,6], mRNA との相補的二重鎖形成による分解は標的として最も考慮される。また、多くの成功例を検討すると、構造蛋白質が標的の場合には、一般的には翻訳開始部位を含むアンチセンスオリゴを用いた例が多い [7,8,9]。つまり、mRNA の分解と翻訳阻害両方の要因を考えた設計である。mRNA 前駆体からのスプライシング領域に対するアンチセンスオリゴを用いて効果をあげた報告 [6] も多くある。つまり mRNA 前駆体もその対象として全く無視するわけには行かなくなる。塩基配列のうちどこを標的として選択するかは、アンチセンスオリゴの作用機構について完全なコンセンサスがない以上、まだ確立されていない。全ての可能性を考えた標的配列を選択することは困難であるが、最も考慮すべきは mRNA とのハイブリッド形成であることは間違いない。

b. 標的部位の検索

二次構造予測から設計するのであれば、ヘアピンループの閉鎖部よりは、開放部を標的とした方が効果的であるとされている。しかし、現状での mRNA 二次構造予測が本来の mRNA の形態を正しく反映しているとも考えられにくいことから、あまり実際的ではない。ただし、あくまで参考として一本鎖を取りそうな領域を選択することは価値があるかもしれない。最近では、mRNA とアンチセンスオリゴとのハイブリッド形成を熱力学的安定性をもとに計算する方法が出されている。受託計算も含めて利用できるプログラムとしては、Computer Hybridization Simulation (AGCT, CHS 社)、日立化成の受託解析、Oligo (National Bioscience 社)、Primer-Detective (Clontech 社)、東亜合成(株)と甲南大学の杉本らによる接塩基対モデルを基礎としたプログラム [10] などが知られているが、受託では驚くほど高価であり、また決して確実ではないことからあまり一般的ではない。今後、これら解析プログラムの研究が進み、有効なものとなることが期待される。

我々は、開始コドン近傍で検索し、その中にあたりがなければ解析プログラムを利用するようにしている。いずれにせよ、現状ではいくつかの配列を実際に細胞レベルで検討する必要がある。この時、試験管内での蛋白質合成系(ウサギ網状赤血球系)などで、発現抑制を検討する方法もあるが、我々はこの *in vitro* 合成系で効果のあったアンチセンス配列が全く細胞レベルでは効果がなかった場合を何度も経験しており、あまり相関がなさそうである。細胞培養系においてできる限り多くの部位で検討する必要があると考えられるが、現実的ではないので、我々は以下のような手順とアッセイ系を用いるようにしている。

① アンチセンスオリゴの長さは 15 mer から 30 mer の間にする。15 mer あれば特異的な mRNA に結合することが、統計的に知られている。30 mer を越えると、細胞内への取り込みが悪くなる。我々は 24 mer 前後で良い成果を得ている。実際、24 mer で効果のあった物が 30 mer 以上では効果が低下したことがある。7 mer や 10 mer でも成功した例はあるが、我々が塩基配列の似たファミリーを形成する類縁分子で検討した際には、10 mer では塩基配列の非常に似た分子の発現もわずかながら低下させた経験がある。特異性を考えるならば 15 mer 程度は必要であると考えられる。

② 余裕のない時には、開始コドン周辺の 5 ~ 6 カ所でとりあえず検討する。ATG 開始コドンを含む配列で前後にずらして作製する。この際に、合成するオリゴ内での二次構造予測も行っておく。(③④参照) 選択した配列は、ホモロジー検索で他の mRNA と相互作用がないことを確認する。

これで全くアンチセンス効果がなく標的配列がみつからないときの最終手段、あるいはアッセイ系を立ち上げている間に、標的配列の受託計算検索を依頼している。受託検索では、いくつかの候補となる標的配列があげられてくる。もしも、非常に(!)余裕があれば、複数の受託先に検索を依頼して、それぞれの候補配列を比

較してみても良い(オーバーラップしたものがあれば可能性は高い)。しかし、現状では依頼して提示された配列が全てはずれであることも覚悟しなければならない。いままでの経験では、現実性の高い業者のシステムで候補10領域のうち1, 2領域が効果がある配列であった。あくまで、可能性を高めるという意味でトライする方が良いと思われる。以前は100カ所近く実際に検討してみても領域を決められたものもあったが、その意味においては可能性を絞り込む上では受託検索なども行う意味があると思われる。さらに、アンチセンス効果のある配列でも、前後に3塩基動かしただけでも全く効果が失われ

た場合もある。

③ アンチセンスオリゴが自己構造をとったり、お互いハイブリッド形成しないように設計する。

④ 蛋白質などとの特異的相互作用が示唆されているものは避ける。たとえば、繰り返しCG配列が含まれるものは、免疫系B細胞レセプターとの結合が高く活性化すること[11]や、G4配列も非特異的な蛋白質との結合[12]が知られている。なるべく、GC配列、G残基の繰り返しは避ける。

⑤ 出来るだけ少ない培地で培養できる細胞株を選択して、図3に示すようなアッセイ系で、

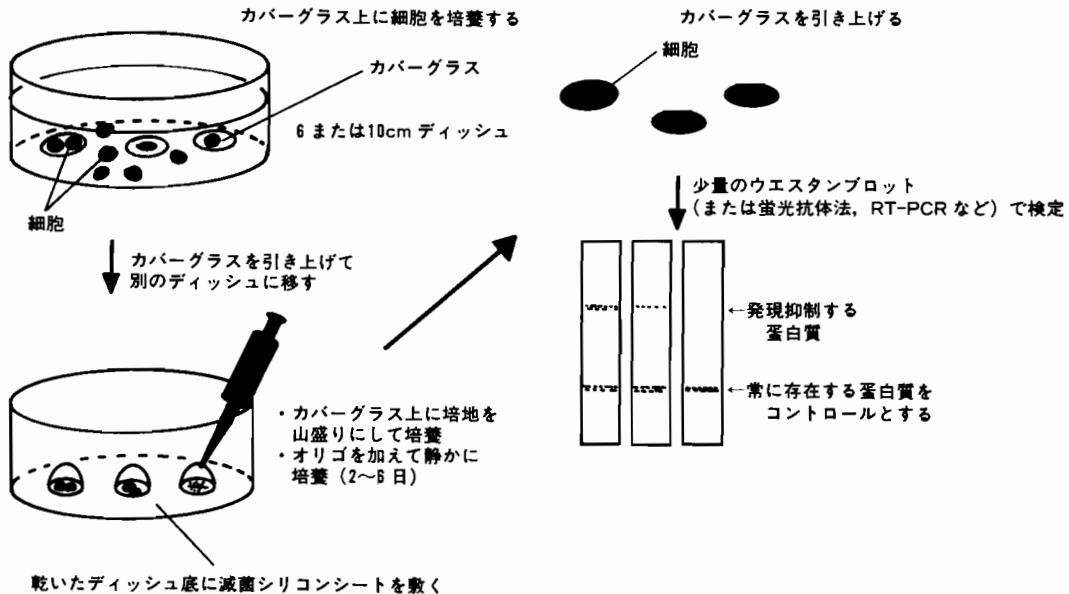


図3. アンチセンス標的配列スクリーニングのアッセイ系の一例

6 cm または 10 cm ディッシュ内に細胞培養用カバーグラス (Matsunami 社, 10~15 mm 径) を入れて培養を行い、細胞を定着させる。細胞の定着したカバーグラスを引き上げて、新しいディッシュ上に置き、ピペットマンでメディウムをのせる。この方法であれば、表面張力でメディウムが予想外に載せられる。200 μ l から 500 μ l 程度のメディウムで培養できるが、細胞がこの方法でどの程度の量で耐えうるかどうか前もって調べておく。(24 ウエルディッシュなどを用いると、ウエル壁面への表面張力でメディウムが上がってしまい、微量培地での培養がうまくゆかない)。心配ならば、滅菌シリコンシートを敷いた上にカバーグラスを載せるとうまくゆく。培地の pH が心配であれば、HEPES ベースのメディウムを用いると良い。ピペットマン 1~2 回/日でアンチセンスオリゴの入ったメディウムと交換しながら、CO₂ インキュベーター内に静置して培養する。数日後、カバーグラスごと引き上げて、ウエスタンブロット、蛍光抗体法、RT-PCR などで分子の発現抑制を確認する。ウエスタンブロットでは対象とする分子の他に、別の類縁分子などの抗体とともに発色させて、同じレーンでその分子との相対的な量の変化で検定するのが確実である。

アンチセンス効果を検討する。(解析をおこないたい細胞ではなくとも、効果のあるアンチセンス領域は変わらない。動物種が変わるときでは、当然その塩基配列に準じるが、種間でアンチセンス標的領域はほとんど同じところに落ちる)

c. アッセイ系の確立

アンチセンスオリゴ法は組織、個体レベルでの解析にも適用しうが、株細胞などの均一な性質を持つ培養細胞を用いた細胞レベルで、まずアンチセンス効果を評価するアッセイ系を用いるのが先決である。標的配列や濃度などの条件を決定したのちに、様々な解析に用いることが近道である。そのためには、できるだけ少量の培地下で培養できる細胞種を用い、オリゴの量も少量に押さえて、スクリーニングできる系をそれぞれ確立することが、確実にかつ安価に済ませるポイントである(図3)。

我々は、以前、RT-PCRを用いて mRNA の定量を行った後に、ウェスタンブロットで、蛋白質の発現量の変化を調べていたが、現在は蛋白質の発現変化のみで、定量を行っている。検出できる mRNA 量には変動が少ないが、蛋白質量は大きく発現抑制された例をわれわれは得ている。ウェスタンブロットにより、アンチセンス領域のスクリーニングを行う場合、発現抑制する分子と分子量が異なる別の分子も同時に検出し、同一メンブレン上の同じレーンで異なるサイズのバンドの濃さとして相対的に比較すると定量性があり安全である(図3)。この他に、蛍光抗体などで蛋白質の発現を確認する方法もあるが、定量性からはウェスタンブロットの方が無難であろう。

標的配列の検索の段階では、アンチセンスオリゴのどれか1種類のセンスオリゴを用いてコントロールとする。効果が見られたものがあれば、そのアンチセンスオリゴのセンスオリゴといくつかの変異を導入したミューテーションオリゴも検討する。与える濃度はどのオリゴにおいても細胞の増殖が変化しない程度に抑える。基本的にはアンチセンス効果は、アンチセンス

オリゴの投与濃度に比例するが、高濃度では毒性を与えてしまう。検索の際には、通常は5 μ M~10 μ M で十分であり、この濃度で効果が上がらなければその配列では可能性は薄いと考えられる。

少量のアッセイ系で、可能性のある領域が見つかったら、解析を行いたい細胞で毒性を与えない範囲で最適な濃度と投与間隔を検討する。センス、ミューテーションオリゴで変化がないことと、さらに前後に数残基移動させてみたアンチセンスオリゴでも検討を加えておくとうまい。その後、調べたい生理機能に見合ったスケールまでレベルアップして解析に移る。

4. オリゴの細胞膜透過性と導入効率

a. 細胞膜透過機構

アンチセンスオリゴの細胞膜の透過機構に関しても、多くの研究が行われているが、明確な答えはまだない(図1)。われわれは、温度依存性が見られることからエンドサイトーシスではないかと考えているし、多くの解析からもそれは示唆されつつある。そのための受容体様分子の存在を示唆する解析も行われているが、明かな答えは出ていない[13,14]。いずれにしろ、培養細胞において、培地に添加した量の1~5%が細胞内に取り込まれると考えられる。

b. 導入効率の向上

アンチセンス効果を上げるためには、合成オリゴが確実に細胞内に取り込まれる必要がある。我々は、かつて構造蛋白質の発現抑制に高濃度の合成オリゴ(20 μ M)を連続的(3~4時間ごと)に細胞に投与してアンチセンス効果を得た[9]。オリゴの濃度が低い、または投与間隔が長い場合はアンチセンス効果は低下した。すなわちアンチセンス効果はオリゴの細胞内への導入効率と相関していると考えられた。しかし、この方法は労力とコストの点で問題がある。

そこで、より導入効率を高めるため、様々な導入法を検討した。一般的にDNAトランスフェクションに用いられるリン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレー

ション法、また、市販の遺伝子導入試薬であるリポフェクチン試薬、リポフェクトアミン試薬、リポフェクトエース試薬、トランスフェクタム試薬、ジエントランスファー試薬、Tfx-10、20、50などを検討した。リポフェクチン試薬、リポフェクトアミン試薬、リポフェクトエース試薬、トランスフェクタム試薬はそれぞれポリカチオン分子であり、ジエントランスファー試薬などはリポソーム封入により遺伝子を細胞内に

導入する。

リン酸カルシウム法、DEAE-デキストラン法、エレクトロポレーション法では、導入効率とアンチセンス効果の増加は全くみられなかった。遺伝子導入試薬の併用はいくつかで若干の効果が認められた。また、別のグループの解析からもカチオン性リポソームであるリポフェクチンを用いて ICAM-1 の mRNA に対するアンチセンス効果を約1000倍増強した例が報告され

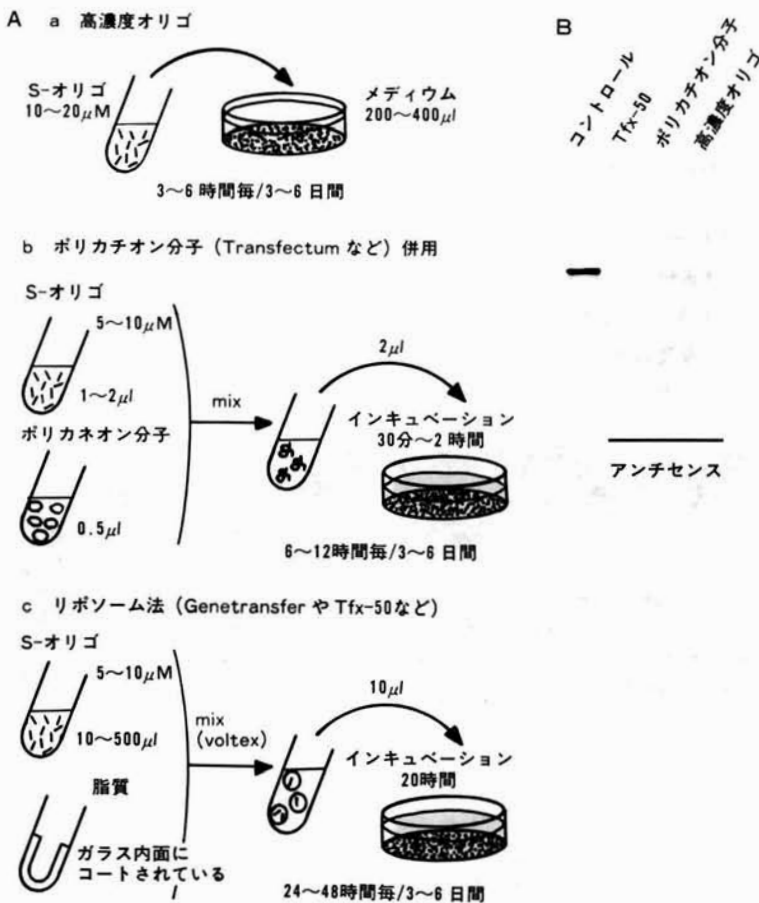


図4. アンチセンスオリゴの細胞への導入方法

a) 構造蛋白質の発現抑制のため、高濃度のオリゴを連続投与(3~6時間ごとに投与を3~6日間繰り返す。3~4回の投与ごとに培地交換)した方法。b) 導入試薬(ポリカチオン分子)を用いた方法。例えば Transfectum を用いると、オリゴの濃度を半分(5~10 μ M)にし、かつ投与間隔も長くしても、同等の効果をあげた(ウエスタンブロット参照)。c) リポソーム型導入試薬ではさらに投与間隔を長くしても(1回投与/1日)でをさらに抑制効果があった。a, bの方法ではまだわずかに発現がみられるが、リポソーム型ではほとんど発現が消失した。いずれも細胞接着分子 contactin の発現抑制の例(実験例参考)

ている[12]。ただ、細胞種によりどの試薬が効果的であるかは若干の差はあるようである[13,14]。付着性の上皮系細胞ではおよそ以下の順序で効果がみられた。Tfx-10, 20, 50, ジーントランスファー試薬, リボフェクトアミン試薬, トランスフェクタム試薬, リボフェクトエース試薬, リボフェクチン試薬(全て商品名)。効果のある遺伝子導入試薬を用いることにより、高濃度のオリゴを連続投与する場合に比べ、半分以下のオリゴで、アンチセンス効果が得られる。また、オリゴの投与間隔を長くしても(1回投与/1日)十分なアンチセンス効果が得られる(図4)。現時点では上皮系、神経系細胞では、リボソーム型の試薬の導入効率が良く、また血清存在で使用可能な Tfx-50 が最も有効である(図5)。

試薬の種類と細胞種の組み合わせによっては、これらの試薬は毒性を示し、実験系が逆に成り立たない場合もある。また、適切な S-オリゴの濃度、試薬の濃度は細胞により若干異なるので、前もってアッセイ系で検定する必要がある。

ある。基本的に導入試薬の濃度は、通常のベクター導入に用いるよりもかなり少量で導入効率を上げることができる。それぞれの試薬でベクター導入に用いる量換算に比べ、100分の1程度で十分なものが多い。

B. 注意点

細胞種によって、オリゴの毒性が出てしまう濃度や導入試薬の適正な濃度などが異なる。この設定を誤ると標的配列が見つかっていても解析ができない。おのおのの細胞でアッセイ系で前もって検定しておく。

アンチセンス効果であることをはっきりさせるために、必ずコントロールを確実に取る。アンチセンスオリゴ一つだけで、生理的变化を示すことは危険である。コントロール実験としてセンス側オリゴだけでなく、アンチセンス配列のうち数残基を置き換えた変異型オリゴやスクランブルオリゴも用いる。現在では、しっかりした専門誌では、いくつかのコントロールを検証しないと受け付けてくれなくなっている。さ

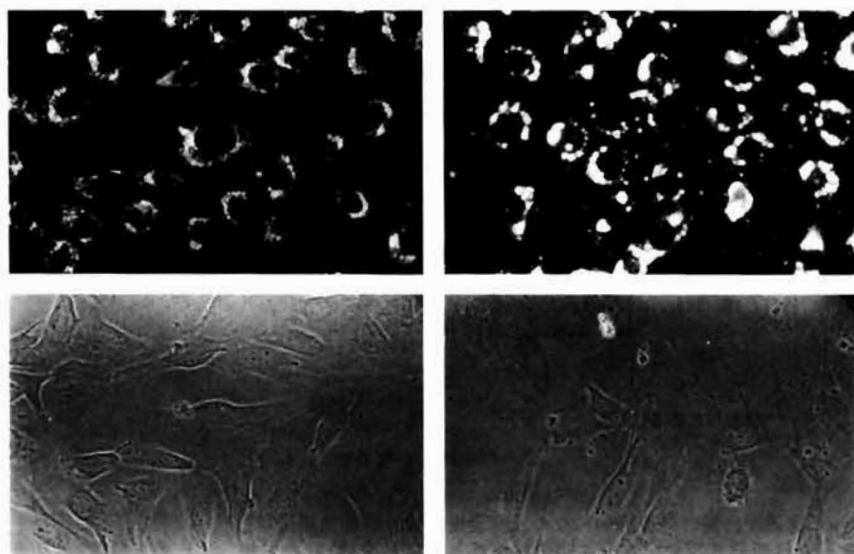


図5. アンチセンスオリゴの細胞への導入効率例(Tfx-50)

FITC 蛍光標識した S-オリゴ(24 mer)を、S-オリゴ単独(写真左)と Tfx-50 併用下(写真右)で細胞に導入して比較した。(細胞は sol-8(マウス骨格筋細胞株)。血清存在下の培養で 10 μ M を投与後 6 時間で固定観察した)蛍光標識オリゴの挙動を観察すると導入初期は写真のように、細胞内に粒子状に認められる。明らかに Tfx-50 存在下(右)のほうが導入効率は高い。(下はそれぞれの位相差像)

らに、アンチセンスオリゴによって、細胞増殖がコントロールと比べて低下しているといった生理的条件だけの議論は避けるべきである。アンチセンスオリゴによって確実に蛋白質か mRNA の発現レベルが抑制されているデータを示すことは絶対に必要である。

細胞内構造蛋白質のようなターンオーバーが遅いと思われる分子の発現抑制には、より慎重な検討を要する。細胞周期に関わる核内の因子、細胞内の酵素系では分子全体の何割かが発現抑制されれば生理的效果が現れることが多い。しかし、構造蛋白質などではかなりクリアな発現抑制がみられないと、細胞になんら変化が生じない場合も多い。アンチセンスオリゴ法で 100% 発現抑制することは現状では困難であるが、このような分子においてはオリゴの投与濃度や投与期間をできる限り検討して、望まれるレベルでの発現抑制を行う必要があるかもしれない。

IV. アンチセンスオリゴ法による細胞生理機能の解析例

A. 上皮系細胞における細胞接着裏打ち分子群の機能解析

ERM ファミリー分子群は、きわめてよく似たエズリン、ラディキシン、モエシン 3 種類の蛋白質から構成されている。これらは種々の細胞や組織に広く共発現し、細胞間および細胞-基質間接着部位、微絨毛、分裂溝などアクチンフィラメントが細胞膜に結合する部位に濃縮している。このことから、細胞膜とアクチンフィラメントの結合とその機能制御に重要な役割を果たしていると考えられている。似た分子が同じ局在を示すことから、これらの分子間には redundancy があり 1 分子のターゲティングでは変化が生じない可能性が高い、また、3 分子とも同時にターゲティングするのは困難があることから、分子の性格上致死になる可能性もあることから、これらを検証するためにアンチセンスオリゴを用いて機能解析を行った [9]。

ERM 3 分子をそれぞれ開始コドン近傍 24

mer のオリゴで、特異的に発現抑制することに成功した (図 6 A)。これら ERM 3 分子は、それぞれ単独の発現抑制によっては、残りの他の分子の発現や局在には変化を及ぼさなかった。生理機能ではエズリン、ラディキシンはそれらの単独の発現抑制で、形成過程の細胞接着を阻害した。また、ERM 1 分子や 2 分子の組み合わせの発現抑制ではすでに形成されている細胞接着は変化しないが、3 分子とも伴って発現抑制すると既に形成されている細胞接着の離脱が認められた (図 6 B)。さらに、アンチセンス法の有利な点であるが、途中でアンチセンスを洗い流すことによって、リバーシブルに接着が元に回復した。モエシン単独の発現抑制では接着には大きな影響はみられなかったが、浮遊系細胞においては微絨毛の消失傾向がみられた。さらに、ERM 3 分子の抑制によって微絨毛は劇的に消失した (図 7)。これら高いホモロジーをもった ERM 3 分子は redundancy をもちながら細胞間、細胞基質間接着及び微絨毛形成に直接関与している事がアンチセンスオリゴ法を用いることによって明らかになった。

B. 神経系細胞における接着分子群の機能解析

Contactin (F3/F11) 分子は免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、GPI アンカーで膜に結合している神経特異的接着分子である。出生後の脳で急激に発現が増加し、神経軸索とシナプス部位に存在するが、その機能の詳細は明らかではない。我々はこの Contactin 分子の発現がみられるラット脊髄後根神経節 (DRG) の初代培養系とラット PC12 細胞において機能解析を試みた。培養細胞系 PC12 細胞では発現がみられるものの、他の接着分子と比べても機能解析に十分な高い発現ではなかったため、Contactin 発現ベクターを導入して Contactin をさらに Over expression した細胞株 (PC12 dfh) を作製した。この Contactin 高発現細胞株のアンチセンスオリゴによる機能解析を行った。アンチセンスオリゴ導入にあたっては、

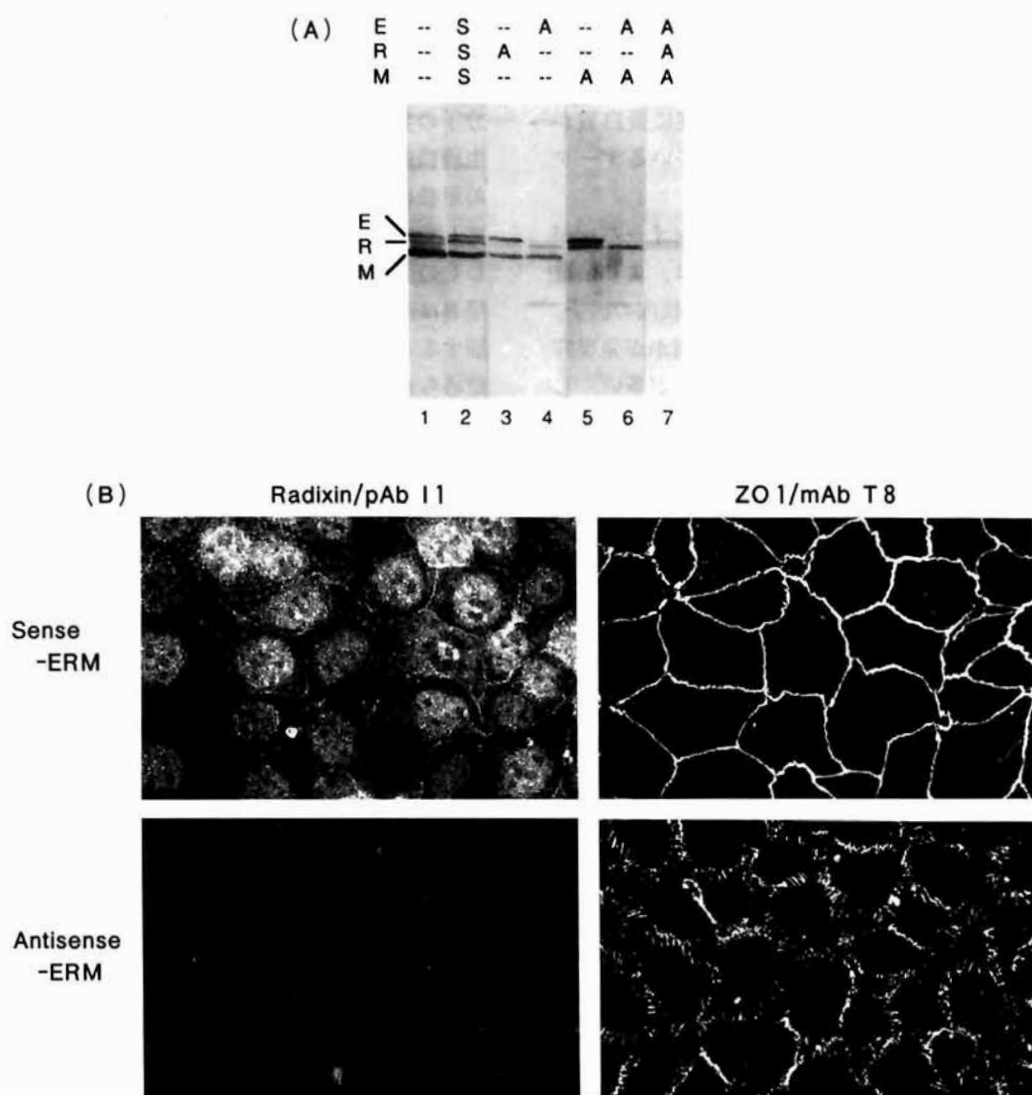


図6. ERMファミリーのアンチセンスS-オリゴによる発現抑制と細胞間接着に与えた影響の一例

(A) S-オリゴ連続投与96時間後(MTD 1A, 上皮系細胞). ウェスタンブロットで ERM ファミリー分子群の発現をみた. (E: エズリン 85 kD, R: ラディキシン 82 kD, M: モエシン 75 kD) アンチセンス(A)とセンス(S)の組み合わせをそれぞれのレーンの上に示した. 1分子抑制(レーン3~5), 2分子抑制(レーン6), 3分子抑制(レーン7)でアンチセンスを投与するとそれぞれの分子の発現が, 検出出来ない程度にまで落ちていることがわかる.

(B) センスオリゴ(左上)では ERM ファミリーの1分子ラディキシンは細胞間に局在しているが, ERM 3分子ともアンチセンスオリゴで発現抑制すると(左下)そのうちのラディキシンも蛍光抗体で確認できないまでに発現抑制されている(残りの2分子も同様)(48時間後).タイトジャンクションのマーカー分子である ZO-1 抗体で観察すると, センスオリゴ(右上)でみられる細胞間接着境界部位が ERM を発現抑制することによって壊れつつあることがよくわかる. この後, 細胞は離れ浮いてくるが, 途中でアンチセンスオリゴを洗浄し除去すると元通りに接着構造は回復する.

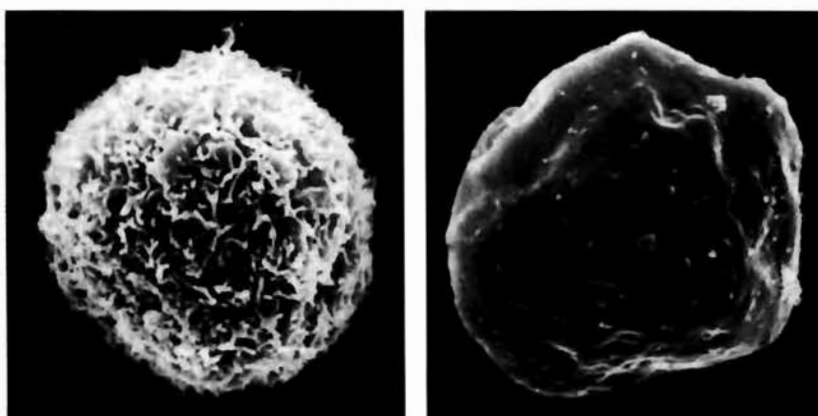


図7. ERM ファミリーのアンチセンス S-オリゴが微絨毛形成に与えた影響の一例
1分子の発現抑制ではコントロール同様の微絨毛形成がみられる(左). 3分子とも発現抑制すると、6日目まで完全な微絨毛消失が認められる(右). (thymoma 細胞)

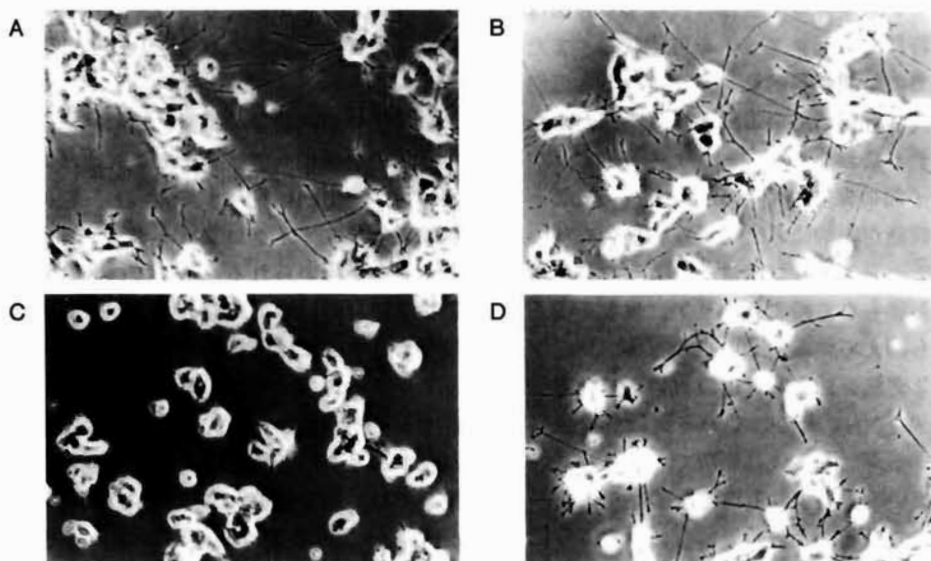


図8. 神経細胞接着分子 Contactin のアンチセンス S-オリゴによる解析例

Contactin 高発現細胞(PC 12 dfh)を Phosphacan をコートしたディッシュ上に蒔き, contactin に対するアンチセンス(C), センス(B)オリゴを投与, 4日目の形態変化をみた. コントロール(A, 導入試薬 Tfx-50のみ投与)とセンスオリゴ投与(B)では, 非常に低濃度の神経成長因子(NGF)処理によって神経突起の伸長がみられるが, アンチセンスオリゴによって Contactin が発現抑制された細胞では突起伸長が明らかに低下する(C). これがアンチセンスによる効果であることは, 1.5倍量のセンスオリゴを途中投与することで突起伸長が回復し, アンチセンス効果が中和されていることから証明できた. (D: アンチセンス+センスオリゴ投与)

Tfx-50 導入試薬を用いた. この培養細胞系と DRG 培養系において, Contactin 分子の発現を蛍光抗体法とウエスタンブロットで発現が確認できない程度にほぼ完全に抑制することに成功

した(図4). PC 12 dfh では, Contactin 分子のリガンドである Phosphacan をコートした基質上で, Contactin を発現抑制することによって, 神経突起(Neurite)伸長の阻害がみられた. こ

の現象は、Contactin と相互作用しない別の基質上では認められなかった。実際にアンチセンス効果であることは、アンチセンスオリゴを洗い流して培養を続けると Contactin の発現が回復して神経突起伸長がみられること、センスオリゴを投与してアンチセンスの効果が中和されるなど、リバーシブルな解析からも証明された(図 8)。Contactin は phosphacan をリガンドとして神経突起伸長に機能していることが明らかとなった。

V. アンチセンスオリゴ法の in vivo (脳内) 投与解析系への応用

A. in vivo 投与の現状と応用

アンチセンスオリゴを生体に投与する方法は組織部位特異的のノックアウトを可能にし、また発生過程での時期特異的なノックアウトも可能にする可能性も秘めている。また、したたかな生体システムにおいて、ジーンターゲットイング法では分子間の保護作用や redundancy によって分子の機能が劇的にみえてこない場合も多いが、アンチセンスオリゴ法はそのような発生過程に伴う影響もなく、よりクリアに現象を捉える可能性も備えている。その点からも、ジーンターゲットイング法を補える可能性も備えている。

in vivo の投与で成功している例は、大量に全身投与するか、あるいは局所でのデリバリーに限られている。いずれも核酸医薬品や遺伝子治療としての可能性から頻繁に行われるようになってきた。中には臨床試験に入っているものもあり、将来が有望視されている。エイズウイルスのように血流中に大量に存在するものは、全身投与で効果をあげている。局所投与ではブルーロニックゲルを用いて体温でゲル化する性質を生かして局所貯留性を高めた例がある。また、心臓の冠状動脈において、c-myc に対するアンチセンスオリゴを局所投与して、実験的に作った血管再狭窄において内皮細胞の肥厚を抑制した例も報告されている。この場合 S-オリゴは 3 日間に渡り投与局所で安定であった[15]。

導入効率をあげるための導入試薬の併用は、あらかじめ検定する必要がある。一般的にはリポソーム型の導入試薬が効果があるようである。しかし、in vitro の細胞で効果があったものが全て有効であるという相関はなさそうである。例えば、細胞で効果のあったポリカチオン系の導入試薬は in vivo ではかえって導入効率が下がるともいわれ、実際に我々も効果がなくなってしまう場合もある。また、1 週間以上の長期投与では、後半ではリポソーム型もさほど効果をあげなくなってくる。我々も現状では導入試薬を併用しないか、あるいは短期でリポソームで試すかである。この点では今後改良と検討を要する。阪大の金田らが行っているセンダイウイルスを用いたリポソーム法はかなり有効な手段であると思われる。

B. 生体脳内投与の指針

生体の脳組織へのアンチセンスオリゴ法の適用には、脳室内に投与する方法と、標的となる脳組織部位にマイクロフュージョンする方法のどちらかが用いられる。ここではわれわれの脳室投与方法[16]について紹介するが、脳組織実質投与も基本的には同様の方法である。

アンチセンスオリゴの脳室内投与は、脳室に接する脳内部位の比較的広範囲にわたって効果が及ぶことが示されている。しかし、単発的な投与では、脳脊髄液(CSF)からのクリアランスが大きいため効果は期待されない。そのため mini-osmotic-pump(ミニ浸透圧ポンプ)を用いた連続的な投与を行う。脳組織内への直接投与では、単発的な投与でもオリゴがまわりの細胞に取り込まれることは確認されており、かなり広範囲への浸潤性が知られている。例えば、脳室内投与であれば海馬領域までの浸潤は認められている。しかし、恒常的な蛋白質のレベルをアンチセンスで抑制するには、当然、投与を繰り返す必要がある。

実際の実験に際して注意する点は、事前に in vitro の系で十分に検証された効果のある領域のアンチセンスオリゴを用いることである。

まず, *in vitro* で検証して実際に蛋白質の発現抑制を確認してから, *in vivo* でのアンチセンスオリゴの投与を行うことが確実で無駄のない解析を行うための近道である。

C. 脳室内投与の実際

1. *in vitro* で効果の確認されているアンチセンスとセンス(またはスクランブルの)S-オリゴを 200 μ l の滅菌生理食塩水に溶かす。オリゴの濃度は我々は 0.25 mM から 1 mM の濃度で用いている。脳室内へは、ミニ浸透圧ポンプで 1 μ l/時間で 7 日間連続投与で、1.5 mM までは毒性は示さないとされている。発現抑制の効果が無いようであれば、少しずつ濃度をあげて行くが、かなり多量のオリゴが必要となり実験としては少し難しい。

2. マイクロシリンジの径の細いもの(27 G など)で、ミニ浸透圧ポンプ(Alzet 社, mode 12001 など)に S-オリゴ溶液を絶対に気泡が入らないように注入する。

3. ラットを麻酔(ペントバルビタール (50

mg/kg, i. p.))し、頭を剃毛し消毒後、脳定位固定装置(成茂, ラット用 SR-6 N など)に固定する。頭皮を切開し、露出させた頭骨をピンセットで擦るか乾燥させて出血を抑える。

4. L 型カニューレ(brain infusion kit (Alzet 社))の挿入部位を決める。(例えば、側脳室を狙う場合は, bregma -0.8 mm, 正中 1.5 mm の位置に dura から 3.5 mm の深さに入れている)デンタルドリルで頭骨に穴をあけ、マニピュレーターで垂直に挿入する。深さの設定は動かないようにスペーサー(図 9)で固定する。

5. L 型カニューレをミニ浸透圧ポンプのチューブに気泡が入らないように接続する。ミニ浸透圧ポンプを切開部から背側皮下に挿入し、デンタルセメントでカニューレを完全に固定後、皮膚を縫合する。イソジン液で消毒、テラマイシンなどを筋注しておく。

6. クリーンルームで 1 ケージ 1 個体ずつ(お互いひっかかないよう)静養させ、7 日後、目的とする実験に用いる。その際あるいは実験後、投与部位周辺の組織を出来るだけ速やかに

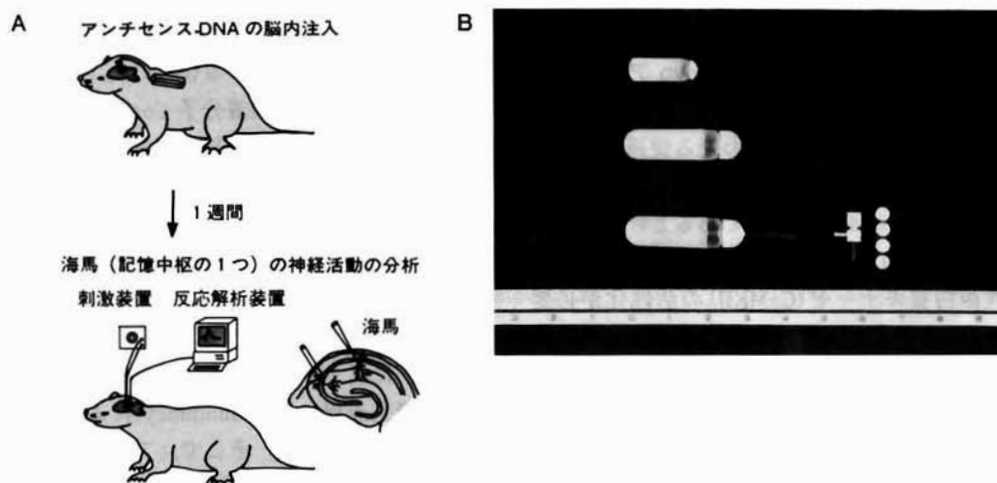


図 9. アンチセンスオリゴの *in vivo* (脳内) 投与の原理とミニ浸透圧ポンプ

ミニ浸透圧ポンプはラット体内で体液を吸収して、決まった速度でポンプ内の溶液を放出できる。右の写真に示したものは、上から順に 100 μ l を 3 日間放出するタイプ、200 μ l を 1 μ l/時間で 1 週間放出するタイプ(実験例(1)で使用)、200 μ l を 0.5 μ l/時間で 2 週間放出するタイプ(実験例(2))である。写真右下は L 型カニューレと深さを固定するためのスペーサー、これらを用いて、特定の分子を組織部位特異的に発現抑制することによって A に示すような生理学的な解析にも応用できる。

取っておく。組織切片など作製し何か異常はないか、実際に狙った分子の発現がどの程度抑えられていたかを、ウエスタンブロット、組織染色などで確認する。

これらを用いて *in vivo* の電気生理への応用や動物行動実験に応用することも可能である。また、いくつかの分子をまとめて発現抑制したり、ターゲティングマウスでの更なる他の分子の抑制も可能である。組織培養や、スライスカルチャーでの解析も試みられている。さらに、最近、我々は発生過程での解析を考え、マウス胎仔子宮外培養や胎仔子宮外手術法などにアンチセンスオリゴを利用した新たな方法を模索している。ジーンターゲティングでは、分子間の redundancy や、個体の発生過程のしたたかさから期待しただけの機能が現れない分子の解析や、さらには個体を致死たらしめる分子の解析においても、アンチセンスにより組織部位と時間特異的に発現抑制することによって、切れ味よく生理機能が現れるのではないかと期待している。いずれにせよ、*in vivo* への応用は様々な可能性が考えられる実験系である。

VI. 脳内 *in vivo* 投与による解析例

A. カルシニューリンの *in vivo* アンチセンス投与による解析

シナプス伝達の長時間にわたる促進現象である長期増強 (long-term potentiation; LTP) は、記憶の細胞レベルの素過程であると考えられている。LTP の誘導には Ca/カルモジュリン依存性蛋白質キナーゼ (CaMKII) の活性化が必要である。これに対して、シナプス伝達効率の減少 (long-term depression: LTD) には、キナーゼの作用を消去する Ca/カルモジュリン依存性蛋白質ホスファターゼであるカルシニューリンの活性化が必要である。シナプス伝達が増強するか減少するかは、これらキナーゼとホスファターゼの活性のバランスによるという仮説が立てられている。これを検証するために、カルシニューリンのアンチセンスオリゴを脳室内に投与して、生体脳の海馬における LTP の誘導が

どのような影響を受けるか調べた [16]。

LTP を記録する側の側脳室海馬の近傍にカニューレを植え込み、ミニ浸透圧ポンプによってカルシニューリンのサブユニット ($A\alpha$, $A\beta$) を標的としたアンチセンスオリゴを 1 週間連続的に投与した (0.25 mM, 200 μ l)。ウエスタンブロットで海馬のカルシニューリン蛋白質を定量すると、アンチセンス投与群では LTP を記録した側の海馬で $A\alpha$ は 67%, $A\beta$ は 55% に減少していた。スクランブル DNA 投与群では、おのおの 92% と 90% にとどまった。これらのラットを用い、ウレタン麻酔下で LTP 実験を行った。アンチセンス DNA を注入したラット群では、通常のラットに比べ LTP が成立しやすくなった。これに対してスクランブルオリゴ投与群では、この弱いテタヌス刺激では (50 Hz, 200 パルス), LTP の誘導が認められなかったことから、スクランブルオリゴ投与群の海馬の機能自体には問題がなかったことがわかる。これらの結果は、カルシニューリンが LTP の誘導を抑制していることを示すと同時に、神経細胞内の Ca/カルモジュリン依存性蛋白質キナーゼとホスファターゼの活性バランスが、シナプス伝達効率の方向性 (LTP と LTD) を決定していることを示唆している (図 10)。

2. 神経細胞接着分子 Contactin の *in vivo* アンチセンス投与による解析

免疫グロブリンスーパーファミリーに属する接着分子は、その機能解析のためにジーンターゲティングも数多く行われている。しかし、その発現の領域特異性などから期待されるだけの劇的な変化は現れていない。それには、このファミリーに属する分子種の多さなどからも想定される発生過程での redundancy によるものであるとも考えられる。そこで、アンチセンスによる発生過程、部域特異的な分子の発現抑制を狙った。Contactin (F3/F11) 分子は出生後、神経系で発現が認められる免疫グロブリンスーパーファミリー接着分子であり、大脳皮質全体と海馬領域で広く発現が認められる。

この分子の *in vitro* で最も効果のあったアン

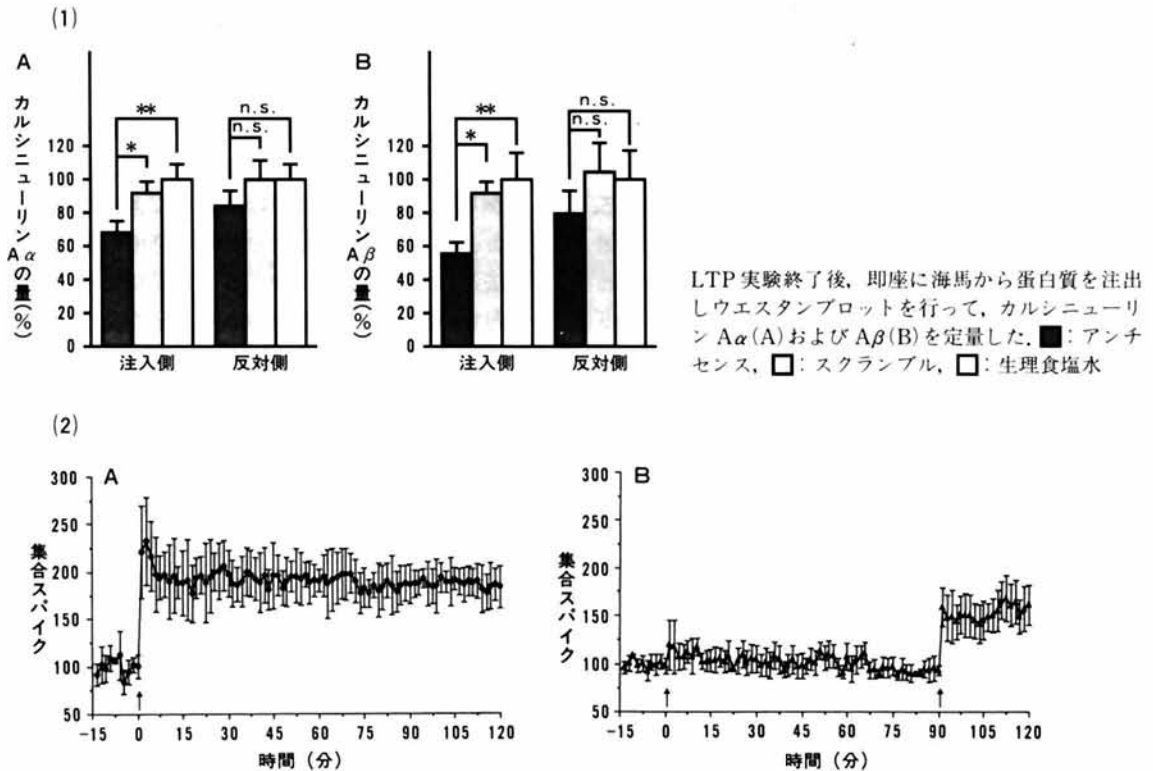


図10. カルシニューリンの脳内アンチセンスオリゴ投与による実験の一例

(1) アンチセンスオリゴ投与によるカルシニューリンの発現抑制例

(2) アンチセンスオリゴ投与によるカルシニューリン発現抑制でのLTPの促進

A) カルシニューリン A α および A β に対するアンチセンスオリゴを側脳室に1週間連続投与した。海馬のCA3に100 Hz, 7-pulse train のテタヌス刺激を与え(矢印, 時間0), 反対側の海馬CA1から集合スパイクを記録した。このテタヌス刺激は通常, LTP も LTD も誘導しない中立的な刺激である。B) スクランプルオリゴを投与したラットに同様のテタヌス刺激を与えた(最初の矢印)。90分後に50 Hz, 200 pulse のテタヌス刺激を与えた。この場合は A) でみられたような LTP の促進はみられない。

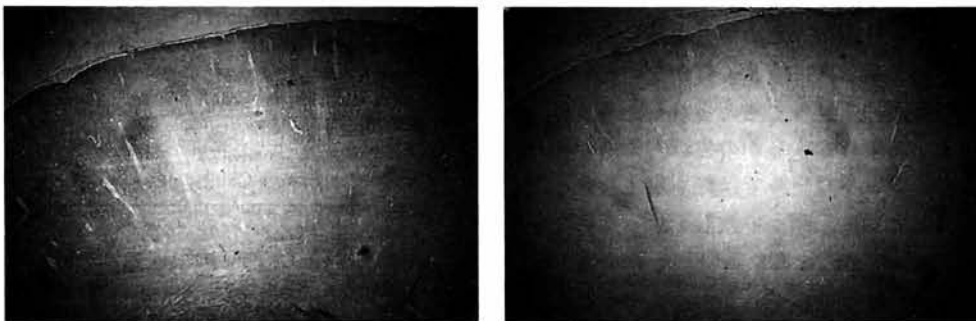


図11. 神経接着分子 Contactin の脳内アンチセンス投与による発現抑制の一例

contactin に対するセンス(左), アンチセンス(右)オリゴを大脳実質に12日間連続投与した。投与後連続切片を作製し、カニユーレから2 mm 離れた部位で免疫染色を行った。センスオリゴ(左)投与では全体に Contactin の発現が認められるが、アンチセンスオリゴ(右)では全く発現が抑制されている。

チセンスオリゴを海馬近傍の側脳室あるいは大脳皮質実質にカニューレを植え込み、ミニ浸透圧ポンプで12日間連続投与した(0.5 mM, 200 μ l). 投与後にカニューレ挿入部位から2 mm離れた隣接部位の組織切片を免疫染色すると、明らかに Contactin の発現抑制が起こっていることがわかる(図11). この時に NCAM など他の接着分子の発現には何ら変化がなかったことから、脳の部位特異的な発現抑制が可能となった。

Ⅶ. お わ り に

生体内分子の機能を解析する最も有効な方法は、その分子を欠損あるいは不活性化することである・・・このシンプルな発想のもとに酵素阻害剤などの薬剤からジーンターゲットング法に至るさまざまな方法が現在までに考案され、分子の機能を知るうえでの重要な手がかりとなる情報を与えてきた。今回紹介したアンチセンスオリゴ法は、生きた細胞、組織レベルで分子を欠損させ、分子の働きをみることのできる簡易な方法として大きな可能性を秘めている。

アンチセンスオリゴ法は多くの研究において試され大きな成果をあげている一方、その簡便さから一度は試みたもののうまく行かないケースも多いようである。とくにアンチセンス標的配列の決定がたまたまうまく行った例が報告され、不運にも標的配列に行きあたらなかったために結果が出なかった場合、あるいは精製が不十分なオリゴを用いたため毒性が強く実験系が組めなかった場合が、うまく行かないという声の大部分を占めていると考えられる。さらに、アンチセンスではなんらかの生理的効果が現れているが、コントロールでは何も起きなかったために良しとして、細かい検討を行っていない“ずさん”なデータもまた多い。それゆえ、アンチセンス法は岐路にさしかかっているとみえる。そのためには詳細なアンチセンスの分子機構の解明と、確実な方法論、そして確実な結果を積み重ねて行くことが今後きわめて大切である[17]。現時点では方法論でいまだ確立して

いない点も多いが、アンチセンス法は非常に魅力的な遺伝子制御法である。臨床応用も含めて、大きな可能性を秘めており、医薬品としての開発は、すでに眼科用抗ウイルス炎症剤として発売されたものもある。研究は端緒についたばかりで、これから多くの改善もなされることによって、生理学、分子生物学や発生生物学の手法としても確立してゆくものと思われる。生体内での応用も広がりつつあり、様々な工夫が行われている。基本的には大がかりな準備や機器を必要としないため、とにかく一度やってみることのできる系である。本稿がそのためにいくらかでも参考になれば幸いであるし、ますます多くの方に試みていただき、有効な手段として進展して行くことを願っている。

文 献

- 1) Uhlmann E & Peyman A: Antisense oligonucleotides: A new therapeutic principle. *Chem Rev* **90**; 543-584, 1990
- 2) Agrawal S: Antisense oligonucleotides: towards clinical trial. *Trends in Biotech* **14**; 376-378, 1996
- 3) 武内恒成, 渡辺和忠, 月田承一郎: S-oligo アンチセンスを用いた細胞機能解析, *実験医学* **12**; 1657-1663, 1994
- 4) 武内恒成, 池上司郎, 井ノ口馨, 渡辺和忠: アンチセンスオリゴ法—より高効率な細胞機能解析系と in vivo 中枢神経系への応用 *実験医学* **14**; 573-583, 1996
- 5) Shuttleworth J, Colman A: Antisense oligonucleotide-directed cleavage of mRNA in *Xenopus* oocytes and eggs. *EMBO J* **7**; 427-434, 1988
- 6) Condon Y P & Bennett C F: Altered mRNA splicing and inhibition of human E-selectin expression by an antisense oligonucleotide in human umbilical vein endothelial cells. *J Biol Chem* **271**; 30398-30403, 1996
- 7) Tominaga M, Tominaga T, Miwa A & Okada Y: Volume-sensitive Chloride Channel Activity Does Not Depend on Endogenous P-glycoprotein. *J Biol Chem* **270**; 27887-27893, 1995
- 8) Nakanishi H, Obaishi H, Sato A, Wada M, Mandai K, Satho K, Nishioka H, Matsuura Y, Mizoguchi A & Takai Y: Neurabin: A novel neural tissue-specific actin filament-binding protein involved in neurite formation. *J Cell Biol* **139**; 951-961, 1997
- 9) Takeuchi K, Sato N, Kasahara H, Funayama N, Nagafuchi A, Tsukita Sa & Tsukita Sh: Pertuba-

- tion of cell adhesion and microvilli formation by antisense oligonucleotides to ERM family members. *J Cell Biol* **125**; 1371-1384, 1994
- 10) 杉本直己: 最近接塩基対パラメータを用いた核酸の安定性予測とその機能との関係 *生物物理* **33**; 61-67, 1993
 - 11) Krieg A M, Yi A-K & Matson S: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**; 546-549, 1995
 - 12) Chiang M-Y, Chean H, Zounes M A, Freier S M, Lima W F & Bennet C F: Antisense oligonucleotides inhibit intercellular adhesion molecule 1 expression by two distinct mechanisms. *J Biol Chem* **266**; 18162-18171, 1991
 - 13) Yakubov L A, Deeva E A, Zarytova V F, Ivanova E M, Rytte A & Vlassov V V: Mechanism of oligonucleotide uptake by cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**; 6454-6458, 1989
 - 14) Zelphati O & Szoka F C: Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**; 11493-11498, 1996
 - 15) Simons M, Edelman E R, DeKeyser J L, Langer R & Rosenberg R D: Antisense c-myc oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation in vivo. *Nature* **359**; 67-70, 1992
 - 16) Ikegami S, Kato A, Kudo T, Ozawa F & Inokuchi K: A facilitatory effect on the induction of long-term potentiation in vivo by chronic administration of antisense oligodeoxynucleotides against catalytic subunits of calcineurin. *Mol Brain Res* **41**; 183-191, 1996
 - 17) Wagner R W: Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* **372**; 333-335, 1994