

「ゲノム化学に基づくウイルス感染症に対する新規遺伝子治療薬の開発」

日本大学大学院総合科学研究科
生命科学専攻

井口晃史

目次

第1章 研究の背景	2
第2章 序論	
1. 新興感染症	3
2. SARS	4
3. インフルエンザ	5
第3章 本論	
1. ゲノム化学に基づく創薬	9
2. 遺伝子発現制御薬	12
3. リボザイム	14
4. ピロールイミダゾール (PI) ポリアミド	17
5. 研究:新規遺伝子発現制御薬ピロールイミダゾールポリアミドの RNA 結合への性質の検討	
背景と目的	19
方法	20
結果	23
第4章 考察	28
第5章 総括	30

第1章 研究の背景

医学領域での研究の目的は、癌や腎臓病など未だに治らない病気が多く存在している事実に基づき、病態解明、新規診断法や治療法の開発により、難治性疾患で苦しんでいる患者さんに光明をもたらし、人類を幸福にすることである。しかしながら最近では医学領域だけでの研究では健全な医療を創成するには不十分であり、環境学、生物学、経済学を含めた統合的領域から健全な医療を創成する試みがなされている。

これまでの治療法の開発として、人類は細菌を殺すために抗生物質を発見し開発してきた。現在では第4世代の抗生物質により老人の肺炎をも改善するが、一方で抗生物質の乱用による緑膿菌、MRSA、VREなど抗生物質の効かない弱毒菌による日和見感染がはびこり、現在の医療で大きな問題であり、多大な医療費の無駄使いとなっている。地球には微生物が存在し、その後人類が誕生した後共存し生命を営んでいたが、人類が抗生物質という武器を手に入れエゴイズムで細菌を殺してきたところ日和見感染と言う微生物の逆襲にあっていると言える。一方、中国などでは急速な経済成長の反面、大気汚染、水質汚濁、土壌汚染、廃棄物問題等の環境汚染問題が深刻化している。ダイオキシン類等の汚染が拡大し生態系を狂わせ、環境ホルモンとして生殖細胞の寿命が短縮し、中国の人口は減少している。これらは健康と医療問題として解決が急務である。さらにSARS、鳥インフルエンザなどの人畜感染症および新興感染症が起こっており、地球上での人類、植物、動物、微生物が共存すべく環境および生態系が崩れたことによる生命体への負の連鎖により世界の人口にも影響を与えている。これらの弊害は学問として医学、生物学、薬学などが縦割りになっているためそれぞれの分野でのみ研究をしてきた結果である。

ゲノム化学とは、ゲノムに限らずプロテオミクスをも含む広い範囲のバイオロジーの分野において化学を活用する研究全般を指し、ゲノム創薬、遺伝子診断、バイオチップ、バイオセンサー、バイオ材料などきわめて広い応用分野がある。ヒトの遺伝子構造の解読が完了し、ポストゲノムの時代に入り、ゲノム化学が今後の医療の中核をなすと考えられる。

このように今後人類の共存と発展を育む地球社会システムを形成するためには、医学、環境学、生物学、工学、人口学、経済学などが融合した学問領域での研究が必要である。特に、ゲノム化学に基づくウイルス感染症に対する新規遺伝子治療の開発は融合科学として重要である。今回、総合科学研究科生命科学専攻にて、私がこれまで行ってきたウイルス感染症に対する新規治療法開発を融合領域科学として、ゲノム化学に基づいた新規バイオ医薬の開発を試みた。

第2章 序論

1. 新興感染症

新興感染症とは、その発症がにわかに注目されるようになった感染症に対する総称である。通常は新興感染症例は局所的あるいは、人物の移動による国際的な感染拡大が公衆衛生上の問題となるような感染症について取り上げられる (1, 2)。病原体としてはウイルス、細菌、スピロヘータ、寄生虫など様々でウイルスによるものとしてはエイズ、エボラ出血熱、ラッサ熱、severe acute respiratory syndrome (SARS)、インフルエンザなどがある (3)。

世界保健機関 (WHO) の定義によると新興感染症は「かつては知られていなく、この 20 年間に新しく認識された感染症で局地的に、あるいは国際的に公衆衛生上の問題となる感染症」とされている (4)。この定義は 1990 年に初めて発表されたものであり、1970 年以降に発生したものが新興感染症として扱われている (5)。

新興感染症はエマージングといい、そのウイルスはエマージングウイルスという。最近話題になったものにエボラ出血熱、マールブルク熱などがある。このような新しい感染症がなぜ起きるのか。一つはウイルス側の事情にある。ウイルスはしばしば変異を起こす。新しいウイルスに対してヒトは必ずしも十分な対応がとれない。人間側の原因としては、森林の伐採などにより自然環境を破壊した結果、森林の奥深くに生息する動物が保有する病原体を顕在化してしまった、ということが挙げられる。また、交通手段の発達により、人的、物的輸送が拡大し、高速化した現代において、一地方に出現したウイルスが瞬く間に world wide に拡散してしまうこと、などがあげられる。人間の側から見れば、ウイルスの襲撃を受けたように見えるが、実際は人間の営みがウイルスを含めた野生動物との共生関係を崩したことが原因である。

ウイルスは DNA もしくは RNA の遺伝情報と増殖に使う酵素蛋白を持つだけで、自らの代謝系を持たないため、宿主動物に感染して初めて生き、殖えることが出来る。よって野生動物と共生するウイルスは宿主を殺すことはせず、感染しても病気は発症しない。熱帯雨林に生息する野生動物に寄生しているウイルスは約 3600 種あるとされ、それらのウイルスはおのおの野生動物を自然宿主として、自然に世代交代を続けている。しかし人間は熱帯雨林を開発して野生動物を追い払い、野生動物を人間社会に持ち込むという、自分勝手な行動をし始めた。その結果、野生動物を自然宿主にしているウイルスが開発によって行き場を失った動物と共に人間社会に入ってきた。ウイルスは自然宿主には無害でも新しい宿主に遭うと猛烈な攻撃を開始する、というのがエマージングウイルス出現のパターンである。

エマージングウイルス感染に対して抗生物質は無効であり、ワクチン生成も間に合わないことが多い。今まで使用された抗ウイルス薬に代わり、新たな方法で製造された抗

ウイルス薬の開発が必要である。したがって今後はゲノム化学に基づく遺伝子治療薬や核酸医薬が有望であると考えられる。

2. SARS

2002～2003年冬にかけて、新型肺炎の重症急性呼吸器症候群（SARS）が中華人民共和国の広東省で猛威をふるい、その高い死亡率と感染拡大の速さから感染発生国のみならず全世界を震撼させた。世界30か国以上で8400名を超える症例と約800名の死者がWHOに報告され（6）、総死亡率は、9.6%と推定された（7, 8）。

SARSの原因ウイルスは、従来とは異なるタイプの新たなSARSコロナウイルス（SARS-CoV）である（9, 10）。一般にコロナウイルスは約20nmの特徴的なスパイクを持つエンベロープウイルスで直径100～200nmの円形、楕円形および多形成の形状を示し、エンベロープに囲まれてゲノムRNAが存在し（図1）、それに核蛋白が結合し螺旋状のヌcleoキャプシドを形成している（11）。

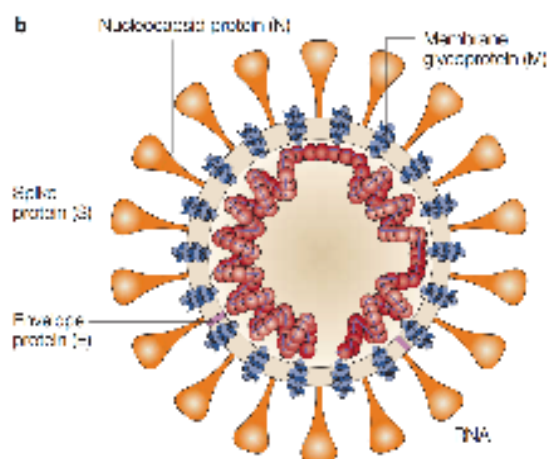


図1. コロナウイルスの構造（参考文献11より引用）。

ゲノムRNAは現在知られるウイルスRNAとしては最大の約31kbの(+)鎖RNAである（12）。ゲノムRNA5'末端にはcap構造、3'末端にはpoly(A)が存在する。ゲノム5'末端には約70ベースから成るleader sequenceがあり、その下流にRNA polymerase (ORF 1a, 1b)、スパイク蛋白、エンベロープ蛋白、膜蛋白、核蛋白の順で存在する（図2）。コロナウイルスは種特異性が高く、固有宿主以外の動物に感染することは少ないが、SARS-CoVはヒト以外にサル、ネコ、フェレットやマウス、ラットなどにも感染する（9）。SARS-CoVの高い病原性は、ウイルスの増殖に伴う直接的な細胞損傷というより、ウイルスが誘発する宿主反応が大きく影響していると考えられる。このウイルスの発生原はハクビシンが疑われていたが、キクガシラコウモリが保菌者であった。

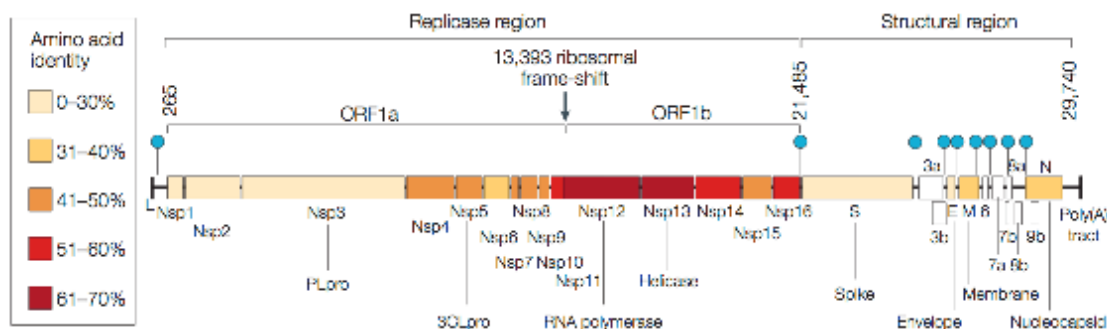


図 2. SARS ウイルスゲノム構造 (参考文献 11 より引用)。

したがって SARS は一種の人畜感染症といえる。

SARS-CoV はおもに飛沫感染によって拡がる。飛沫感染とは空気感染ではなく、咳やくしゃみで飛んだ SARS 患者の唾液を吸い込むことによる感染である。飛沫は大きいため、飛ぶ距離は通常 1m 以内である。しかし、SARS-CoV は空気や汚染された物を介してもっと広範囲に広がる可能性もある。汚染された物を触ることによる感染リスクを減らすために、石鹸と水で十分に手を洗うことを勧めている。

これまで SARS に罹患した患者に対し様々な治療が試みられ、その後も SARS-CoV に特異的な新薬やワクチンが広く開発されてきた (13)。しかし効果的な治療薬の開発のためにはさらなる実験的、臨床的研究が必要であり、これには遺伝子治療薬や核酸医薬が有望であると考えられる。

SARS は 2003 年 7 月 5 日の終息宣言以後は散発的に発生したのみであったが、今後再流行する可能性は否定できない。また SARS 創薬で培われた経験は、今後新興ウイルス感染症が発生した際に薬剤開発をする上で重要な経験となるであろう。

3. インフルエンザ

インフルエンザとはインフルエンザウイルスによる急性感染症の一種で流行性感冒ともいう。発病すると、高熱、筋肉痛などを伴う風邪の様な症状があらわれる (14)。急性脳症や二次感染により死亡する例もある (15)。本来はカモなどの水鳥を自然宿主として、その腸内に感染する弱毒性のウイルスであったものが、突然変異によってヒトの呼吸器への感染性を獲得したと考えられている (16, 17)。

インフルエンザとヒトとの関わりで、最も重大な転機は 1918 年から 1919 年にかけて発生したスペインかぜの世界的な大流行 (パンデミック) である。これは規模、死亡率の点で強力であり、感染者数 6 億人、死亡者数 4000 万~5000 万人にのぼり、第一次世界大戦終結の遠因ともいわれる (18)。その後、1957 年のアジアかぜ、1968 年の

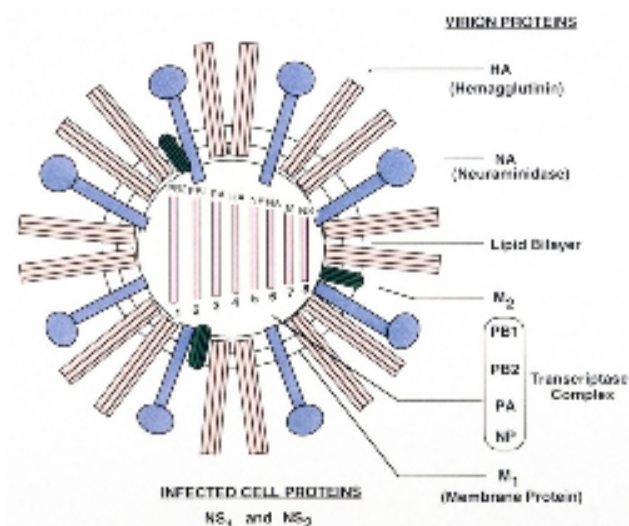
香港かぜと大きな変異を起こして世界的大流行を発生させ、スペインかぜ以降も、インフルエンザは毎年継続して感染流行を起こしている。さらに数年から数十年ごとに新型のヒトインフルエンザの出現とその新型ウイルスのパンデミックが起こっており、毒性の強い場合は多数の死者が出ている (19)。2009 年には豚由来の新型インフルエンザのパンデミックが発生し、大きな問題となった (20)。この 2009 年型と毎年流行する季節性が共に死亡率がとても低いことなどから「インフルエンザは風邪の一種、恐れる病気にあらず」と捉える人が多くなったが、これは誤解である。インフルエンザの症状はいわゆる風邪と呼ばれる症状の中でも特別に重く、区別して扱うことも多い。また風邪だから軽度の病気だというのは近年の認識であり、歴史的にはスペイン風邪、アジアかぜなどの風邪と呼ばれたインフルエンザのパンデミックは、大勢の人間を死に至らしめた。現在においても、パンデミック化した新型のインフルエンザは、人類にとって危険なウイルスであるとされる (21)。

インフルエンザの病原体はインフルエンザウイルスである (22)。ウイルスの分類上は「エンベロープを持つ、マイナス鎖の一本鎖 RNA ウイルス」として分類されるオルトミクソウイルス科に属する、A 型インフルエンザウイルス (23, 24)、B 型インフルエンザウイルス (25, 26)、C 型インフルエンザウイルスの 3 属を指す (27, 28)。ただし一般にインフルエンザウイルスと呼ぶ場合は、特に A 型、B 型のものを指し、その中でもさらにヒトに感染するものを意味する場合が多い (29)。

A 型インフルエンザウイルスは、直径 80 – 120 nm 程度のエンベロープを持つマイナス鎖の一本鎖 RNA ウイルスである (図 3A)。ただし患者から分離した直後に実験室で培養したものでは 1 – 2 μm 程度の繊維状の形態を示すことがある。インフルエンザウイルスのエンベロープは、ウイルスが放出される時に宿主となる細胞の細胞膜を獲得したもので、その表面には 10 nm 程度の長さの 2 種類のスパイクが存在しており、それぞれ HA (ヘマグルチニン)、NA (ノイラミニダーゼ) と呼ばれる (30)。またエンベロープ表面には小数の M2 (マトリックス蛋白 2) と呼ばれるエンベロープ蛋白も存在する。エンベロープの内側には、それを裏打ちする形で、M1 (マトリックス蛋白 1) と呼ばれる蛋白が局在しており、これが実質的な殻の役割を果たしている (31)。また、M1 の内側にごく微量の、NS2 (非構造蛋白 2) と呼ばれる蛋白が結合している。ウイルスの遺伝子は 8 つの分節に分かれている (図 3B)。遺伝子はそれぞれエンベロープ内部にある NP と呼ばれる核蛋白にらせん状にまき付いており、これがインフルエンザウイルスではヌクレオカプシドに相当する (32)。また、それぞれのヌクレオカプシドの片側には PA (RNA ポリメラーゼ α サブユニット)、PB1 (RNA ポリメラーゼ β 1 サブユニット)、PB2 (RNA ポリメラーゼ β 2) の 3 つのサブユニットからなる RNA 依存 RNA ポリメラーゼが結合しており、これによって mRNA の合成やウイルス遺伝子の複製が行われる (33, 34)。A 型インフルエンザウイルスには HA と NA の変異が特に多く、これまで HA に 16 種類、NA に 9 種類の大きな変異が見つかっており、その組み合わせの数

の亜型が存在し、亜型の違いは H1N1 – H16N9 といった略称で表現されている。

A



B

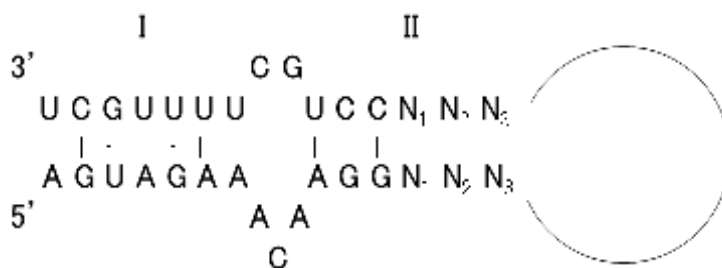


図 3. (A) インフルエンザ A 型ウイルス粒子の模式図 (参考文献 33 より引用)

(B) インフルエンザ A 型ウイルスゲノムの可能性のあるパンハンドル構造と配列
パンハンドルはループ構造部分と I と II の部分に分けられる。(参考文献 34 より引用)

B 型インフルエンザウイルスは、その特徴や臨床症状の点で A 型とよく似ている。特に臨床症状からは A 型と B 型は区別出来ず、A 型と同様、ヒトインフルエンザの病原体として重要である。B 型インフルエンザウイルスの遺伝子分節のうち、NA と M 分節は A 型との違いが大きい。A 型の NA 分節が 1 種類の蛋白をコードしているのに対して、B 型では NA と NB という 2 種類の翻訳開始点が異なる遺伝子がコードされていて、それぞれ合成される。また A 型の M 分節が選択的スプライシングによって M1 と M2 を合成するのに対し、B 型では M1 と BM2 という、翻訳開始点が異なる 2 つの遺

伝子が M 分節にコードされていてそれぞれが合成される (35)。B 型インフルエンザウイルスの HA と NA には A 型に見られるほどの多様性がない。このため亜型による分類は行われない。

C 型インフルエンザウイルスは、構造や臨床症状の点で A 型、B 型との差異が大きい。C 型インフルエンザウイルスには、A 型と B 型が共通して持っている、HA と NA という 2 種類のスパイクがなく、その代わりに HE (ヘマグルチニン-エステラーゼ) と呼ばれる、HA と NA の両方の役割を演じる 1 種類のスパイク蛋白を有する。また M 分節の発現機構が、A 型 B 型のどちらとも異なり、選択的スプライシングにより M1 と P42 という 2 種類の蛋白を合成した後で、P42 が宿主の酵素によって M1' と CM2 に切断される (36)。C 型インフルエンザウイルスの HE にも A 型に見られるほど多様性がなく亜型による分類は行われない。

A 型、B 型、C 型の 3 属のインフルエンザウイルスの中で、A 型インフルエンザウイルスは、特に突然変異によって変異型ウイルスが出現しやすい。インフルエンザウイルスが変異する場合、重要視されるのは HA と NA の、2 種類のスパイク蛋白の変異である。これらのスパイク蛋白はウイルス粒子表面にあるため、ヒトに感染したときに体内の抗体が結合して中和する抗原になるが、ウイルスに変異が起これると過去の感染によって作られていた抗体と反応しなくなるため、感染を起こしやすく、また重症化しやすくなる。また HA が大きく変異すると、レセプターとの結合性が変わった結果として、それまでヒトに感染しなかった鳥や他の動物のインフルエンザウイルスがヒトに感染する。インフルエンザウイルスが変異を起こしやすい理由は、他のウイルスと異なり突然変異のメカニズムを 2 つ持っているため、このメカニズムはそれぞれ連続変異、不連続変異とよばれる。連続変異は、ウイルス核酸が一塩基単位で変異を起こすものである。これは一般に言う遺伝子の突然変異と同じ機構である。不連続変異は、A 型インフルエンザウイルスなど分節した遺伝子を持つウイルスのみに見られる突然変異の機構である。異なる亜型のウイルスが 1 つの細胞に同時に感染すると細胞内で合成されたウイルス遺伝子や蛋白が集合するときに混ざり合い、結果として元のウイルスとは異なった組み合わせの遺伝子分節を獲得した「合いの子」のウイルスが新たに生じる。HA、NA 以外のウイルス遺伝子についても同様の組み換えが起こる。特に、ヒト型のウイルスと他の動物のウイルスとの間で組み換えが起きると、それまでヒトの間には存在しなかった新型のヒトインフルエンザウイルスが出現する。

インフルエンザにはワクチンが製造されている。ワクチンの接種により仮にインフルエンザにかかったとしても軽症で済むとされるが、個人差や流行株とワクチン株との抗原性の違いにより、必ずしも十分な効果が得られない。その作製は孵化鶏卵を用いて行われ、目的とするウイルス株を孵化鶏卵に接種して増殖させ、それを精製することで行われる。ワクチンの製造には 6 か月程度かかるため、次の冬に流行するウイルス株を正確に予測することは難しい。また、新型ウイルスのパンデミックが起きたときには間に合

わない。

インフルエンザには、その増殖を阻害する薬剤が数種類開発され、実際にインフルエンザの治療に利用されている。実用化されている抗インフルエンザ薬はアマンタジン、ザナミビル、オセルタミビル、ペラミビル、ラニナミビルの 5 種類である。このうち、アマンタジン、リマンタジンは A 型インフルエンザウイルスの M2 蛋白を阻害することで、ザナミビル、オセルタミビル、ペラミビル、ラニナミビルは A 型または B 型インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼを阻害することで、それぞれウイルスの増殖を阻害する (37)。一方、これらの薬剤に対する耐性を獲得した、アマンタジン耐性インフルエンザウイルスやザナミビル、オセルタミビル耐性インフルエンザウイルスの出現も既に報告されている (38)。特にアマンタジンでは耐性ウイルスが出現しやすい。アマンタジン耐性は主に連続変異によって M2 蛋白の構造が変化することによる。中枢神経系への副作用が出ることと共に、本剤を使用する上での重要な注意点である。このような薬剤耐性ウイルスの出現に対抗するため、薬剤開発の取り組みが継続されている。効果的な治療薬の開発のためにはさらなる実験的、臨床的研究が必要であり、これには遺伝子治療薬や核酸医薬が有望であると考えられる。

第 3 章 本論

1. ゲノム化学に基づく創薬

1990 年代以降の遺伝子工学の急速な発展は、生物学に新たな分野を付与することになった。つまり、遺伝子工学の発展により、標的細胞にベクターを導入して形質転換させたり、或いは特定の方法を用いて標的遺伝子を破壊するもしくはその発現を抑える、といったように細胞の遺伝子の発現を制御出来るようになった。この結果、生物を遺伝子レベルから研究することが可能になり、ヒトやイネを初めとする様々な生物のゲノム解析が進んだ。ゲノム化学の研究の具体的な研究内容を二つ挙げておく。

任意の DNA 塩基配列を修飾するテーラーメイドのドラッグの開発研究は、ゲノム研究において重要な配列特異的ジーンブロッカーや DNA をターゲットとする（次世代抗癌剤（特定の遺伝子に作用する特異性の高い）、つまり副作用のない抗癌剤）の開発を目的にしている。現在までのところ、任意の塩基配列を特異的に認識し、かつ抗癌作用の高い DNA 修飾剤の開発に成功している。今後これらの修飾剤に対する改良及び臨床試験などによる実用化に向けての進展が待たれる。

電気化学的な DNA 検出法の開発研究は電気化学を利用する遺伝子診断法が簡便性、コストなどの観点から注目されている。従来の DNA 検出法では、一つの DNA 塩基配列に対し一つの DNA 修飾電極が必要であり、このためハイスループット（膨大な数のサンプルの解析を行うこと）な検出を行うことが出来なかった。しかし、電気化学的な

DNA 検出法が開発され、標的塩基配列の認識能やハイスループット解析の実用化が注目されている。

ゲノム化学の研究の進展により新薬開発といったゲノム産業の進展や新規の研究分野の創出などが期待出来る。近年、医薬品開発のあらゆるステージにおいてトランスクリプトームやゲノミクス手法を積極的に取り入れる、いわゆるゲノム創薬が潮流になっている。当初トランスクリプトームはハイスループットな創薬標的探索の方法論と考えられていたが、現実にはこれに研究シーズを求めたもので臨床開発まで至った事例は少ない。一方トランスクリプトームによる疾患や生命現象の解明は、個々の遺伝子に還元して解析する手法に加えて、数十から数百個の遺伝子を巨視的な視点で解析する新たな手法を生み出した。またヒトゲノムプロジェクトにより明らかになった染色体上に点する 564 万件以上の SNP（一塩基多型）情報は生活習慣病などの多因子疾患の病因や薬物の有効性に関わる個体差をヒトで解析することを可能にしつつある。これらの情報の活用により、今後の医薬品開発の成功確率が高まると期待出来る。

2004 年 10 月に International Human Genome Sequencing Consortium が高い精度のヒトゲノム情報を公開した (39)。1953 年に DNA の構造が明らかにされてから 50 年目であった。1990 年代中頃より、米国ではゲノム関連のベンチャー企業が、日本では公的研究機関がそれぞれ中心となって網羅的完全鎖長 cDNA クローンコレクションとその解読を行い、ヒトやマウスの多くの蛋白の一次構造を明らかにした。さらに個別遺伝子の発現情報をハイスループットかつ網羅的に解析する手法が米国バイオベンチャー企業により確立された。これらの出来事は、遺伝子情報を応用した医学研究のパラダイムシフトが訪れたことを印象づけた。

創薬研究の最も重要なことの一つは、開発対象となる適応疾患に対しどのような標的分子を選択するかである。全ゲノムが情報解明される以前は、500 種類足らずの創薬標的分子が報告されていた (40)。ゲノム情報は、28.5 億ベースの染色体上にヒトの蛋白をコードする遺伝子はわずか 25,000 種類程度であることが示された (39)。その中で既知ならびに機能予測が出来る遺伝子は約 60%であり、残りは機能予測が出来ないものであった。さらに、経口医薬品を創出する可能性のある標的分子は全ゲノム中 3,000 種余りであり、その中で本当の意味で病態に大きく影響しうるもの、すなわち真の創薬的分子は最大でも、1,500 種類程度と推定されている (40)。ゲノム解読は予想外に少ない創薬標的分子の存在を明らかにした。

ゲノム情報や cDNA 配列情報をもとに、個別の遺伝子を識別出来る短い DNA オリゴヌクレオチドを高密度にスポットされたチップ や特定の遺伝子ファミリー (kinase, GPCR) や特定研究領域 (免疫炎症関連分子、癌遺伝子関連分子) にフォーカスをした cDNA クローンの PCR 断片を高密度にスポットした cDNA アレイを用いた、体系的、網羅的 mRNA の発現解析技術が開発され、1990 年代中盤より創薬研究に相次いで利用されるようになった (41)。

一方、マイクロアレイ技術や高密度 Real-Time PCR プラットフォームは疾患解析を個々の遺伝子に還元して解析する手法に加えて、数十から数百個の遺伝子を巨視的な視点で解析する手法を生み出した。これらの考え方は、クラスター解析 (42) やパスウェイ解析とよばれ、その背景にある真の病態発症のメカニズムやより重要な創薬標的分子に迫ることが出来ると期待される。マイクロアレイなどのトランスクリプトームの一次情報そのものは、新しい創薬標的分子を生み出すと言うより、新たな創薬探索のコンセプトを研究者に気付かせるツールであると考えられる (43)。マイクロアレイ技術や高密度 Real-Time PCR プラットフォームは、創薬標的分子探索以外の医薬品開発ステージにも応用されつつある。例えば、特定の創薬標的分子を予め設定せず、細胞レベルでの表現型としてトランスクリプトームの一次情報がある種のバイオマーカーとして化合物の最適化、生物活性の差別化に応用している (44)。また、医薬品開発で失敗の原因となる化合物の毒性予測において、前臨床段階でトキシコゲノミクスといった手法が導入されつつある (45)。

ヒトゲノム解読とともに注目されているのが、ゲノム上に点在する SNP (一塩基多型) である。遺伝子上のさまざまな領域の SNP は蛋白の直接的な機能変異を誘発し、特定の蛋白の量を変動させる可能性が示されている。TaqMan SNP は 200 万に及ぶ SNP をカバー出来るプローブをすでに作成し、Real-Time PCR プラットフォームでの解析を可能にしている。また、Mapping 500K Array Set は 50 万個の SNP を同時解析することを可能にし、実際に、医学、生物学研究の方法として活用されている (46)。2006 年後半より、循環器疾患の疫学調査である Framingham Heart Study のサンプルを用いた、Affymetrix 社のプラットフォームによる SNP 解析が開始されている。これらの結果の解析から、信頼度の高い疾患パスウェイが発見され新規の創薬標的分子の創出が生まれるであろうと期待されている。

この様に、ポストゲノム時代において病気の遺伝子レベルでの治療法としてゲノム化学に基づいた遺伝子治療の臨床応用が始まっている。遺伝子治療は遺伝子の欠損もしくは異常に基づく患者に対し遺伝子を補充する方法と、特定の遺伝子や蛋白の過剰によってもたらされる疾患に対し遺伝子を抑制する方法に分けられる。前者はいわゆる遺伝子治療で、細胞に遺伝子を導入することにより蛋白を産生させて補充を行う。後者は核酸医薬による遺伝子の制御であり、疾患の責任遺伝子に対し自由に設計出来ることから、新たな治療法として期待されている。遺伝子治療は従来、癌やエイズ等の致死性疾患に対しての適応であったが、現在では薬物療法抵抗性疾患にもその適応の裾野が広がってきた。

世界初の遺伝子治療は、1980 年に米国でβサラセミアに対して行われた (47)。その後、NIH で遺伝子治療のガイドラインが作製され、1990 年に先天性代謝疾患である ADA 欠損症の患児に行われた (48)。その後、米国を中心に 300 以上のプロトコールが実施されている。我が国の遺伝子治療は 1995 年に北海道大学で ADA 欠損症に対して

行われ (49)、その後各種の癌に対して 2003 年 3 月までに 42 例が行われている。しかし、1999 年に FDA は肝臓病治療に対してアデノウイルスを使用した遺伝子治療で死亡者が出た事を受け (50)、臨床試験を一時中止するよう命じた。また、2003 年には、重症複合免疫不全症に対して行われたレトロウイルスを使用した遺伝子治療で白血病の発症が報告され (51)、レトロウイルスを使用した臨床試験を中止している。現在のところ最も効果を上げている疾患は ADA 欠損症で、それ以外の疾患においては患者を治療するまでには至っていない。ゲノム化学に基づく遺伝子治療は、現在はまだ実験的医療の段階にあるが、21 世紀には本格的な実用化が進むものと予想される。

2. 遺伝子発現制御薬

遺伝子治療は遺伝子の欠損もしくは異常に基づく疾患に対して、遺伝子を補充する方法と、特定の遺伝子や蛋白の過剰によってもたらされる疾患に対し、遺伝子を抑制する方法に分けられる。後者が核酸医薬であり、疾患の責任遺伝子に対し自由に設計できることから、今後、新たな治療法として期待されている。これまで創薬開発は分子量 500 以下の低分子化合物が主体であったが、既に多くのケミカルライブラリーからの可能性の高い化合物の抽出は限界があり、現在では低分子化合物からの実用化薬物開発の確率は 32,500 分の 1 であり、多大な研究開発費に対し、費用対効果が悪く、そこで最近では核酸医薬に注目が集まっている。遺伝子発現を抑制する核酸医薬としては DNA レベルでは、二本鎖 DNA にトリプルヘリックスを形成し、遺伝子発現を抑制するアンチジーン、アンチセンス PNA (peptide nucleic acid) があり、RNA レベルではアンチセンスオリゴ、siRNA、リボザイムなどがある。

1) アンチセンスオリゴ

アンチセンスオリゴは 20 塩基程度の短いオリゴを標的 mRNA に相補的に分子設計する。アンチセンスオリゴは細胞の貪食作用により細胞内に入り、標的 mRNA とハイブリッドする事により主に mRNA から蛋白への翻訳を抑制するが (図 4)、分子生物学では遺伝子の発現を抑えて、その遺伝子の機能を研究する目的に用いられていたが、癌関連遺伝子などの有害な蛋白をコードする遺伝子の発現を抑えることが可能な薬として利用されている。mRNA の塩基配列がわかるとアンチセンス DNA の設計が可能であり、アンチセンス DNA は細胞内で mRNA と RNA-DNA ハイブリッドを形成し、それ以降の遺伝子の流れを遮断する。また、RNase H の活性化により RNA を分解する機序によっても遺伝子発現を抑制する。問題点としては安定性の低さと膜透過性の低さがあげられている。オリゴヌクレオチドは脂溶性が低く、かつ DNase によって分解されやすいため、生体内に投与すると血液中の DNase によって速やかに分解されてしまう。また細胞膜を透過する確率は極めて低い。これらについては種々の工夫で改善されてきたが、他の問題点として非特異的な効果が指摘されている。

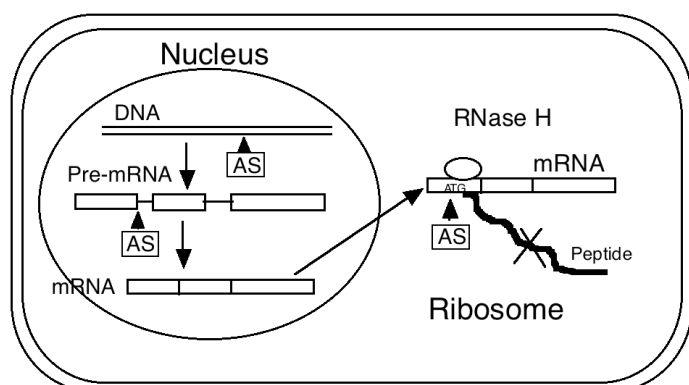


図 4. アンチセンスオリゴ(AS)の遺伝子発現抑制メカニズム。AS は二本鎖 DNA にアンチジーンとして働いたり、Pre-mRNA のプロセッシング部位にハイブリッドして、mRNA へのプロセッシングを抑制したり、リボゾームで mRNA の開始コドン ATG 領域にハイブリッドして、ペプチドへの翻訳抑制と RNase H 活性刺激による mRNA の分解を促す。

アンチセンスは様々なサイトカインを産生させ、NK 細胞の活性化や免疫応答を誘導することが明らかにされている。これまでアンチセンス薬による臨床試験が行われ、その特異性は認められてきた。

最終責任増殖因子である PDGF-A 鎖に対するアンチセンス DNA は高血圧ラットの血圧を下げることなく、血管増殖や腎硬化症を著明に抑制することを認め、降圧と関係なく高血圧症の心血管腎障害の新しい治療薬と考えられた (52, 53)。

アンチセンス PNA は DNA に類似構造をもったペプチドであり、核酸にハイブリッドするため、核酸分解酵素に耐性な遺伝子治療薬として期待されている。PDGF-A 鎖に対するアンチセンス PNA は、高血圧ラット由来血管平滑筋細胞 (VSMC) の増殖を認めている (54)。

2) siRNA

siRNA は二本鎖の RNA により、配列の相同な遺伝子の働きが抑制される現象 RNA interference を基にして mRNA を破壊して遺伝子機能を抑制し、ゲノム遺伝子には影響を与えない。RNAi を用いた遺伝子のノックダウン法は、siRNA を用いることにより哺乳類細胞にも適用可能であることが明らかになってから、遺伝子解析の一般的なツールとして広く使用されはじめるとともに、医薬への応用の可能性が広がっている。

siRNA を応用した遺伝子治療としては C 型ウイルス肝炎 (55) やアルツハイマー病 (56) などへの適応が考えられているが、実用化にはほど遠い状態である。

3. リボザイム

リボザイムとは RNA を酵素的に切断する RNA 核酸であり、人工的に作成し、アンチセンスと同様、特定の遺伝子発現を抑制出来る。リボザイムはヘアピン型、ハンマーヘッド型などの構造をとり、保存配列に RNA 切断酵素活性があり、標的 mRNA の GUC 配列の直後で切断する (図 5)。一旦 mRNA を切断すると、リボザイムは mRNA から離れ、別の mRNA にハイブリッドし更なる切断を繰り返す。リボザイムは RNA のループ構造を切断する事により mRNA の高次構造を変えて、mRNA 機能を抑制する (57)。標的となる mRNA の塩基配列にあわせて設計が可能であり、その特異性の高さから各種難治性疾患の遺伝子治療薬として期待されている。

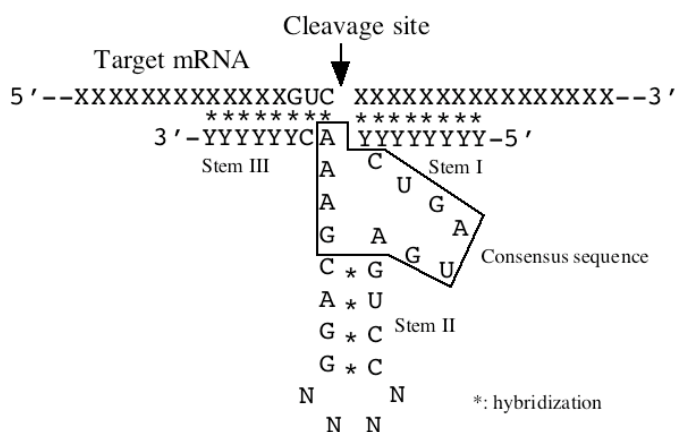


図 5. ハンマーヘッドリボザイムのターゲット mRNA 切断の原理。ハンマーヘッドリボザイムは Stem I, Stem III をターゲット mRNA の GUC 配列部位にハイブリッドする様に設計される。ボックス内の Consensus sequence は RNA 構造で、RNA 切断酵素活性を持つ。

PDGF-A 鎖 mRNA の二次構造のループ部位に存在する GUC 配列に対し分子設計されたハンマーヘッド型リボザイムは、*in vitro* 切断実験において切断活性が確認された。さらに RNase に耐性にするため、切断活性をもつ保存配列のみを RNA とし、さらに 3'末端を phosphorothioate 型に化学修飾した DNA-RNA キメラ型リボザイムは高血圧ラット由来 VSMC の増殖、PDGF-A 鎖発現を濃度依存性に抑制した (58)。さらに、リボザイムによる PDGF-A 鎖 mRNA 発現抑制の特異性はマイクロアレイ法にて確認されている (59)。

リボザイムの生体への投与方法は、合成リボザイムを直接投与方法と、リボザイムをコードする遺伝子を導入し、細胞内で転写する方法がある。細胞に感染後 mRNA としてリボザイムを発現する PDGF-A 鎖リボザイム発現組み換えアデノウイルスは高

血圧ラット由来 VSMC の基礎増殖、PDGF-A 鎖発現を有意に抑制した (60, 61)。

TGF- β に対する DNA-RNA キメラ型リボザイムのラット頸動脈のバルーン障害後の新生内膜形成の抑制度は PDGF-A 鎖に対する DNA-RNA キメラ型リボザイムより大きく、フィブロネクチン、コラーゲン発現抑制を伴っており、TGF- β に対する DNA-RNA キメラ型リボザイムも血管増殖性疾患の遺伝子治療として有効であると考えられた (62, 63)。また、TGF- β に依存して進行性腎障害を示す高血圧ラットにおいて 200 μ g の DNA-RNA キメラ型リボザイムは腎皮質の TGF- β 、I 型コラーゲン、フィブロネクチン mRNA 発現の低下を認め、腎硬化が改善し、キメラ型リボザイムは重症高血圧症における腎障害の遺伝子治療として有効である。

これまで心血管および腎臓疾患に対して growth factor をターゲットとした DNA-RNA キメラ型ハンマーヘッド型リボザイムが開発されてきたが、癌や HIV ウイルスにおいてリボザイムが遺伝子発現を阻止することに成功しているとの報告もみられており、ウイルス性疾患への応用も期待されている。

1) SARS ウイルスに対する DNA/RNA キメラ型リボザイムの開発

リボザイムの影響を最も受けやすいウイルスはライフサイクルの全てが DNA を介することなく RNA に依存したウイルスである。リボザイムには幾つかの種類がありその一つがハンマーヘッド型で生体内では植物のウイロイドやウイルソイド、イモリのサテライト DNA の転写産物で発見された (64)。自然環境の中ではこれらの酵素は分子内で必須の塩基配列 (通常 GUC) の 3' 側を切断する。ハンマーヘッド型リボザイムは二つの機能の構成部分すなわち標的 RNA を切断し幾つかの保存配列を含む触媒の核となる部分と核酸相補性を通してリボザイム核を特異的な標的領域に導く側方の部分を含んでいる。これらの二つの構成部分の機能の柔軟性を利用することが可能である (65)。切断された mRNA はすぐに分解しリボザイムは解離して新しい標的 RNA と反応することが可能である。

リボザイムを標的 RNA 特異的に設計する時には切断部位と両側の接続領域を考慮しなければならない。まず、切断の標的となる遺伝子領域は、切断後に対応する蛋白の機能が確実に失われるような重要な機能領域になくなくてはならない。さらにリボザイムの有効性を保つために標的の切断部位及び側方の塩基配列は出来るだけ保存されたものでなくてはならない。すなわち SARS-CoV の構造はレプリカーゼ、スパイク、エンベロープ、メンブレングリコプロテイン、ヌクレオカプシドプロテインをコードした RNA で構成されている。スパイクを構成する RNA 配列は急速に変異しやすく、リボザイムの標的切断部位は他の部位でなくてはならない。また標的の GUC 切断配列が mRNA の stem 構造にある場合、mRNA の機能は抑制されない。これは二次構造が影響を受けにくいからである。そのため、SARS-CoV RNA の二次構造を解析し、両方の binding arm がリボザイムの切断により RNA 配列を露出するループ構造を標

的とした最適な切断部位が選択された(66)。

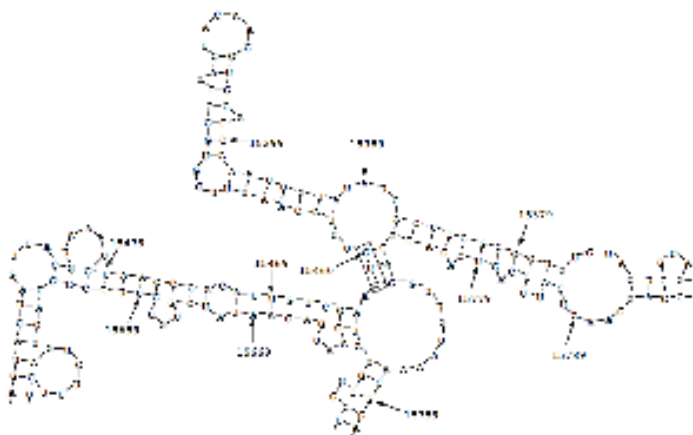


図 6. SARS-CoV RNA (NC_004718) と MHV の共通塩基配列のうち GUC 配列 (ボックス) を含む配列の二次構造。

我々は SARS-CoV に対する DNA/RNA キメラ型ハンマーヘッドリボザイムを、SARS の治療薬としての開発実験を行った。実際の SARS-CoV を用いた実験はその感染リスクのためこの研究では行う事が出来ない。そのため DNA/RNA キメラ型ハンマーヘッドリボザイムを標的の GUC 配列を含む SARS-CoV と MHV (Mousehepatitisvirus: マウス肝炎ウイルス) の共通領域に相補的に設計された (図 6)。

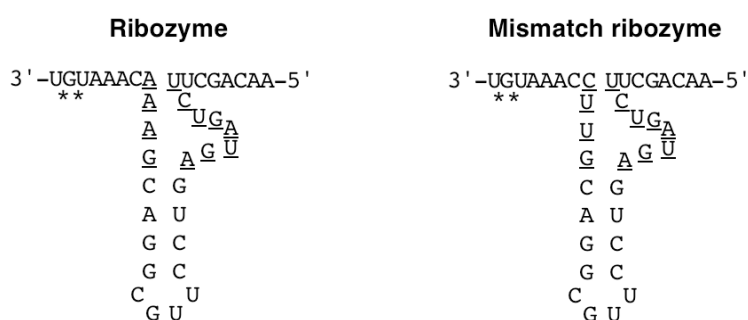


図 7. 設計した DNA-RNA キメラ型ハンマーヘッドリボザイムとミスマッチリボザイムの構造と塩基配列。下線が RNA でその他は DNA。* の塩基間は phosphorochyolate 型に化学修飾した。

SARS-CoV RNA をコードした合成標的 RNA を切断するリボザイムの能力は *in vitro* で評価し (図 7)、リボザイムが MHV の増殖を抑制する効果は細胞実験で検討

された (図 8)。

MHV はコロナウイルス科に属する一本鎖 RNA ウイルスでコロナウイルスのグループ II に属する。コロナウイルスは典型的には宿主や培養細胞の範囲が狭く、他のげっ歯類がこのウイルスの血清抗体を持っていることはあるが MHV の宿主はマウスのみである。細胞培養では DBT 細胞で増殖する時に合胞体性巨細胞形成 (プラーク) を形成する。SARS-CoV を標的とした DNA/RNA キメラ型リボザイムの DBT 細胞へのトランスフェクション効率 は 60 % であり MHV の増殖抑制率は約 60 % を示した。これはリボザイムがウイルス活性を抑制したことを示唆した。さらにこのキメラ型リボザイムは pCR3 プラスミドから転写した合成 SARS-CoV RNA の 3T3 細胞における発現を著明に抑制することが示されている。以上よりこの研究で開発された SARS-CoV を標的にした合成 DNA/RNA キメラ型リボザイムは SARS の治療薬となる可能性がある。

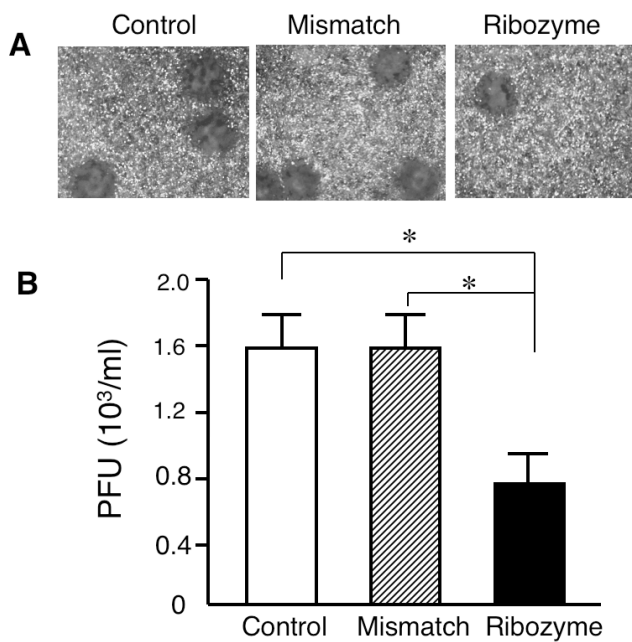


図 8. DBT細胞にリボザイム、ミスマッチリボザイムを投与した後、MHVを感染させた。培地中に含まれる MHV タイターをプラークアッセイにより測定した。リボザイムで処理した細胞ではミスマッチリボザイムで処理した細胞と比較して感染細胞の培地中のウイルス量が著明に減少していた。

4. ピロールイミダゾール (PI) ポリアミド

核酸医薬は核酸分解酵素により速やかに生体内で分解される。そこで、塩基配列を認識し、DNA に結合する PI ポリアミドが新規の遺伝子治療薬として開発された。

N-メチルピロールアミド骨格を有する抗生物質ネトロプシン、ディスタマイシン A

は三日月型の構造をし、この 2 つの天然物は DNA の A・T 塩基対を多く含む配列のマイナーグループに対して高い親和性を示す。ネトロプシン – DNA の X 線結晶構造が報告されて以来、ディスタマイシン A やネトロプシン誘導体と DNA の複合体の X 線結晶構造が解析され、ピロールアミドによる詳細な分子認識が明らかになった (67)。その結果 N-メチルピロールアミドは、A・T 塩基対により作られる狭いマイナーグループの構造に適合する。

一方、N-メチルピロールアミドを N-メチルイミダゾールアミド (Im) に置き換えると、G・C 塩基対に対して親和性を持つ分子が設計出来ることが提案された (68)。

PI ポリアミドは 1996 年にカルフォルニア工科大学の Dervan らにより抗生物質であるデユオカルマイシン A とディスタマイシン A が協同的な DNA のアルキル化能を有していることをヒントとし、PI ポリアミドは分子設計され、DNA のマイナーグループを認識していることから発見された化学合成物質である (69)。同時に京都大学の杉山らも PI ポリアミドが協同的な DNA のアルキル化能を有していることを発見し、それに基づいてこれまで PI ポリアミドを基盤とした様々な機能分子が設計されている(図 9)。

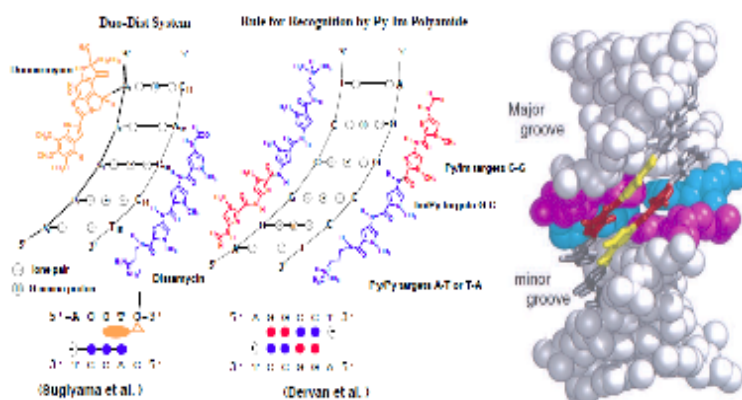


図 9. PI ポリアミドの構造と 2 本鎖 DNA への結合

PI ポリアミドは、Py/Im ペアが GC、Py/Py ペアは AT または TA、Im/Py ペアは GC を認識し、これにより様々な任意の二本鎖 DNA に塩基特異的に結合し、ターゲット遺伝子プロモーターに結合するよう設計すると、転写因子の結合を阻害し遺伝子発現を抑制する (図 10)。PI ポリアミドは生体内で安定であり、ベクターやデリバリー試薬なしに細胞の核に取り込まれる。

PI ポリアミドの特徴として、転写因子より強力に 2 本鎖 DNA に結合し、遺伝子発現を抑制する遺伝子制御薬であり、有機化合物であるため核酸医薬と違い核酸分解酵素に分解されず細胞や生体内で安定であり、DDS なしに細胞の核に取り込まれ、様々な

遺伝子をターゲットとして自由に分子設計出来る。このように PI ポリアミドは新規遺伝子制御薬であり、これまで治療薬の無かった疾患の責任因子に対しても自由に設計出来、核酸医薬の分解性の欠点がなく、疾病で活性化した転写活性を抑制するため病変のみを抑制し、副作用が少ない、転写活性抑制遺伝子制御薬として期待出来る。



図 10. PI ポリアミドによる転写因子結合抑制による遺伝子発現抑制。ターゲット遺伝子プロモーターの転写因子結合部位に設計された PI ポリアミドはプロモーターに水素結合し、転写因子の結合を抑制する。

5. 研究：新規遺伝子発現制御薬ピロールイミダゾールポリアミドの RNA 結合への性質の検討

背景と目的

PI ポリアミドは標的となる塩基配列を自由に選択出来て、さらに細胞膜や核膜の透過性も確認されているため、細胞外から遺伝子の発現を制御する分子として大きく発展する可能性を秘めている。

核酸医薬に代わる新規遺伝子発現制御薬である PI ポリアミドは心血管、腎臓病への遺伝子制御薬として創薬開発が行われてきた。ヒトおよびラット TGF- β プロモーター活性調節領域が同定され、血管増殖性疾患、腎炎において重要となる領域が決定され、PI ポリアミドの分子設計、合成が行われた。PI ポリアミドの TGF- β プロモーターへの結合はゲルシフトアッセイで確認され、TGF- β プロモーター活性、TGF- β 発現の抑制が確認された (70)。

また PI ポリアミドは、ウイルス感染症への遺伝子制御薬として創薬開発が行われてきた。ヒト HIV type 1 (HIV-1) 転写の阻害を目的として、転写因子である TATA-box 結合蛋白 (TBP)、Lymphoid-enhancer 結合因子 (LEF-1)、Ets-1 に拮抗して結合する PI ポリアミドを合成し、転写の阻害効果が測定された (71)。次に、HeLa 細胞の核抽出物を用いて HIV-1 転写に対する PI ポリアミドの効果が試され、60 nM PI ポリアミド存在下において、HIV-1 転写は 50 %阻害されることが明らかとなった。このような抑制は mismatchヘアピン PI ポリアミドでは全く観測されなかった。これらの結果から遺伝子制御に対する PI ポリアミドの有効性は確認され、ゲノム化学の応

用としての抗ウイルス薬の可能性が示されている。

新興感染症としては、SARS やインフルエンザがあるが、特にパンデミック化した新型のインフルエンザウイルスは、人類にとって危険なウイルスである。効果的な治療薬の開発のためにはさらなる実験的、臨床的研究が必要であり、これには遺伝子治療薬としての PI ポリアミドが有望であると考えられる。インフルエンザウイルスのようにマイナス鎖の一本鎖 RNA をゲノムに持つウイルスの増殖を抑制する実験が必要である。そこでまず、PI ポリアミドの結合を TGF- β 1 に依存して進行性腎障害を示す高血圧ラット遺伝子の TGF- β 1 DNA と二本鎖 RNA で測定する。そして、インフルエンザウイルスの増殖に重要なパンハンドルの二本鎖 RNA 部位 (34)への PI ポリアミドの結合を測定する。

方法

PI ポリアミドの設計

この研究で使用された PI ポリアミドの構造は図 11 に示されている。ラット TGF- β 1 (TGF- β 1 ポリアミド) を標的としたポリアミドはラット TGF- β 1 プロモーターの AP-1 結合領域の境界域に対して設計された (72)。ミスマッチポリアミドはプロモーターの転写因子の結合領域でないところに設計された (図 11A)。一本鎖 RNA でマイナス鎖の 8 分節であるインフルエンザ A 型ゲノムの酸性のポリメラーゼ (PA) を標的とした PI ポリアミドは (73)、インフルエンザウイルスの複製領域のパンハンドル部位に対して設計された (図 11B)。

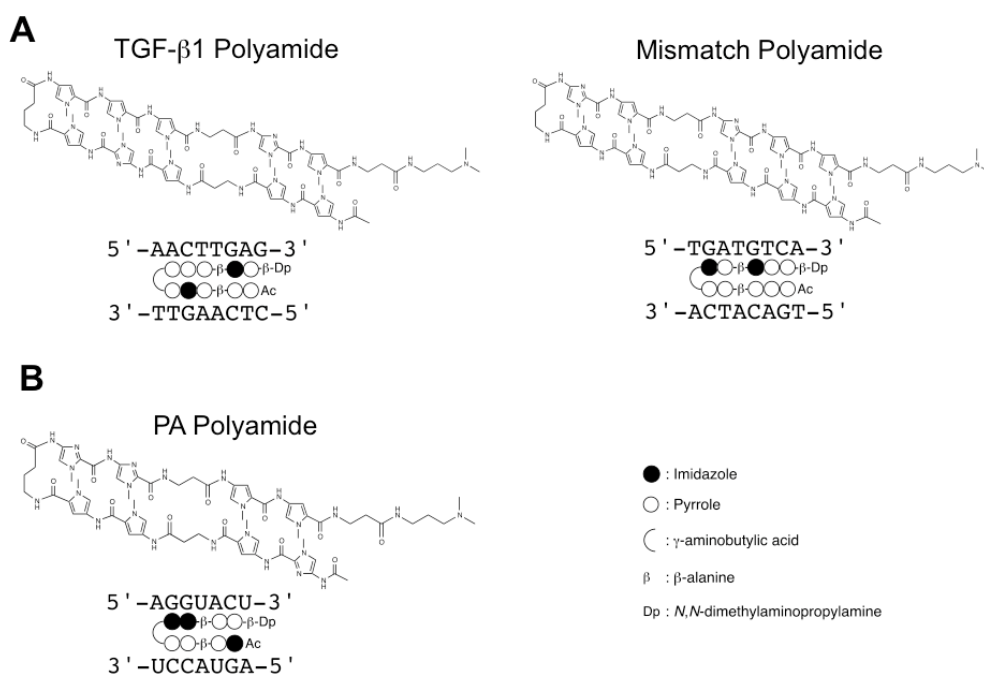


図 11. ピロール-イミダゾール (PI) ポリアミドの構造。(A) ラット transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) を標的とした PI ポリアミドはラット TGF- β 1 プロモーターの AP-1 結合部位 (-2303-2297) の境界域に設計された。ミスマッチポリアミドはプロモーターの転写因子結合部位でないところに設計された。(B) PI ポリアミド (PA ポリアミド) はマイナス鎖で一本鎖の 8 分節から構成されるインフルエンザ A 型ゲノムの酸性ポリメラーゼ (PA) を標的としてインフルエンザウイルスの複製部位に設計された。

PI ポリアミドの合成

ヘアピン型の PI ポリアミドの自動合成を補助する機械は (PSSM-8、島津、京都、日本)、0.1 mmol スケールの連続流動のペプチド合成機と共に動かされた (200 mg of Fmoc-b-alanine-CLEAR Acid Resin, 0.50 meq/g、ペプチド研究所、大阪、日本)。自動固相は以下のシリーズ方法に従って行われた。dimethylformamide (DMF) で洗浄され、20 % piperidine/DMF と共に Fmoc グループに移動させた。メタノールで洗浄され、1-[bis(dimethylamino)methylene]-5-chloro-1H-benzotriazolium 3-oxide hexafluorophosphate (HCTU) 存在下のモノマーと diisopropylethylamine (4 eq each) を 60 分結合させた。メタノールで洗浄され、acetic anhydride/pyridine で保護され、最後に DMF で洗浄された。Fmoc- β -alanine-Wang 樹脂から Fmoc グループへの移動の後、メタノールで連続的に洗浄された。結合の方法はメタノールで洗浄されるに従って、Fmoc-amino acid と共に行われた。これらの方法は全体の配列が完全になるまで繰り返された。結合の方法が完全になった後、N-terminal amino グループは保護され DMF で洗浄され、反応容器は排出された。合成されたポリアミドは冷やされたエチルエーテルの沈殿による開裂の方法 (5 ml of 91 % trifluoroacetic acid (TFA)-3 % triisopropylsilane (TIS)-3 % 5 dimethylsulfide (DMS)-3 % water/0.1 mmol resin) の後に抽出された。その合成されたポリアミドは冷やされたエチルエーテルの沈殿による開裂の方法 (5 ml of N, N-dimethylaminopropylamine/0.1 mmol resin, 50 °C overnight) の後に抽出された。ポリアミドはケムコボンド 5-ODS-H カラム (Chemco Scientific、大阪、日本) と UV-975 HPLC UV/VIS 検出器 (Jasco、Easton、MD、米国) と PU-980 HPLC ポンプと共に高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で精製された。

表面プラズモン共鳴技法 (BiaCore アッセイ)

標的とする dsDNA と dsRNA に対する PI ポリアミドの結合の動力学は分子相互作用と共に表面プラズモン共鳴技法によって数値を求めた。ラット TGF- β 1 プロモーターに対して一致するビオチンでラベルされた dsDNA または dsRNA とインフルエンザ A ウイルスのパンハンドル部位に対して一致する dsDNA または dsRNA は合成

された (図 12A と 12B)。ビオチンでラベルされたオリゴヌクレオチドは dsDNA または dsRNA にアニールした。そして、ストレプトアビジンが機能的についたセンサーチップ SA 上に固定された (Biacore Life Sciences、東京、日本)。PI ポリアミドとビオチンでラベルされた ds-オリゴヌクレオチド との間の相互作用の動力学は Biacore 2000 システムで測定された (Biacore Life Sciences)。結合反応のデータは拡散率と共に Langmuir 二分子相互作用モデルに対して適合させた。

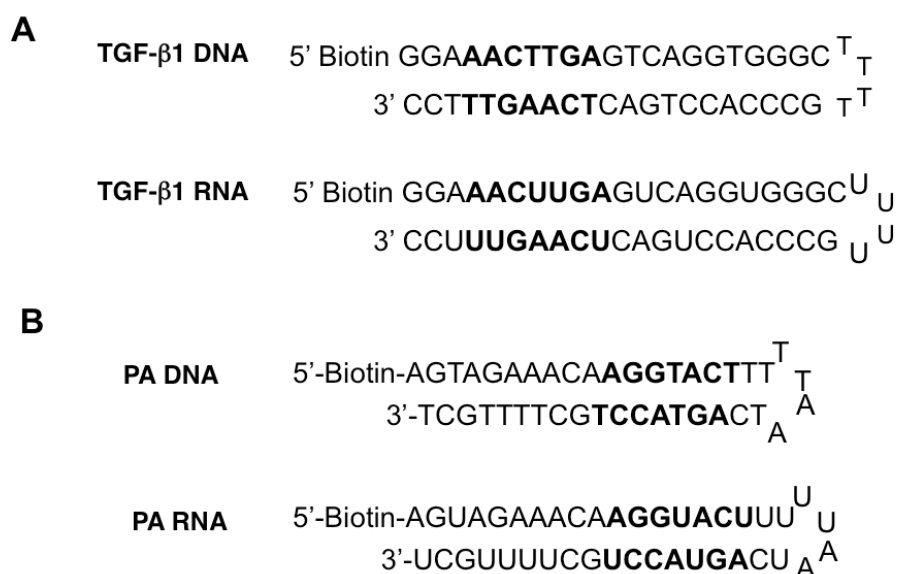


図 12. (A) ラット transforming growth factor-β1 (TGF-β1) プロモーターに対して一致する標的とした二本鎖 DNA または二本鎖 RNA のビオチンでラベルされた構造と配列。そして、(B) インフルエンザ A ウイルスのパンハンドル (PA) 領域の構造と配列。ピロール-イミダゾールポリアミドは太い活字面に示される。

ゲルシフトアッセイ

インフルエンザ A 型ゲノムの PA 遺伝子と -2289 から -2310 (ラット TGF-β1 上の AP1 結合部位を含む) に一致する DNA と RNA は gel mobility shift assays に対して合成された。2 picomole の DNA または RNA は TGF-β1 ポリアミドとミスマッチポリアミドの 5 から 100 μM に対して、PA ポリアミドは 0.1 から 200 μM に対して、37 °C 1 時間インキュベートされた。この複合体の結果は電気泳動で分離され、Clear Stain Ag で視覚化された (Nippon Gene、東京、日本)。

結果

目標とする RNA または DNA への TGF- β 1 の結合

TGF- β 1 ポリアミドとミスマッチポリアミドのセンサーグラムの結果から合され得られた標的とする dsRNA または dsDNA への結合の動力学は図 13 に示される (Biacore アッセイ)。標的とする dsDNA に対する TGF- β 1 ポリアミドの急速な結合は高い濃度でマッチ結合とミスマッチ結合がお互いに均衡し、相互に表われた (図 13A)。BiaCore アッセイは TGF- β 1 ポリアミドが二本鎖 RNA に急速に結合するのに対してミスマッチポリアミドは二本鎖 RNA に対して結合しないことが示され、明らかとなった (図 13B)。

表 1 と表 2 には標的とする dsDNA と dsRNA への TGF- β 1 ポリアミドとミスマッチポリアミドの相互作用に対する動力学の定数が示される。標的とする DNA への TGF- β 1 ポリアミドの相互作用に対する解離定数 (dissociation equilibrium constant: KD) は 2.4×10^{-9} で結合速度定数 (association rate constant: ka) は 7.8×10^4 であった (表 1)。同時に、標的とする RNA への KD は 6.7×10^{-7} で ka は 2.3×10^5 であった (表 2)。ミスマッチポリアミドの KD は標的とする DNA で 1.7×10^7 であり、標的とする RNA で 3.7×10^5 であった (表 1、2)。これらの結果は TGF- β 1 ポリアミドの RNA 結合が DNA 結合親和性よりも 2 log 低い結合親和性であることが示された。

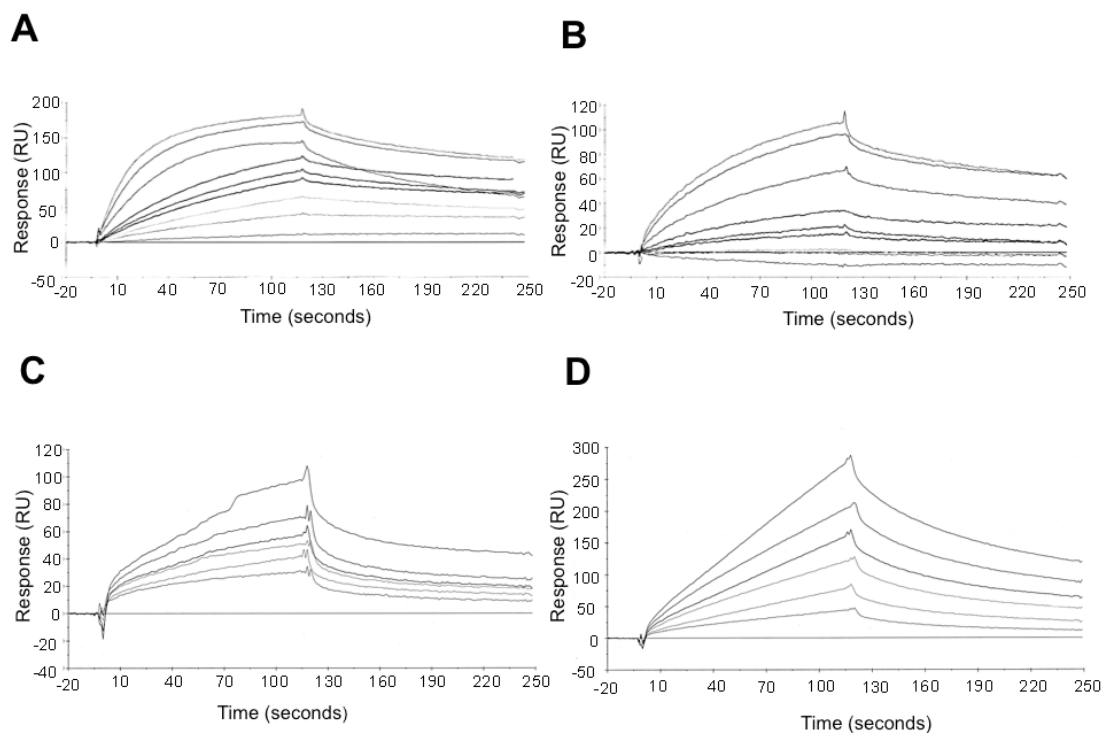


図 13. ラット transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) プロモーターの二本鎖 (ds) DNA と dsRNA を標的としたピロール-イミダゾール (PI) ポリアミドの相互作用の典型的な表面プラズモン共鳴センサーグラム (BiaCore アッセイ)。 (A) TGF- β 1 dsDNA を標的にした PI ポリアミドの結合の BiaCore アッセイ。 (B) dsDNA を標的にしたミスマッチポリアミド。 (C) TGF- β 1 dsRNA を標的にした PI ポリアミド。 (D) dsRNA を標的にしたミスマッチポリアミド。環状の部分以外のビオチンでラベルされたオリゴヌクレオチドは dsDNA または dsRNA としてアニールし、ストレプトアビジンで機能づけられたセンサーチップ SA 上に固定化された。PI ポリアミドとビオチンでラベルされた ds-オリゴヌクレオチドとの間の相互作用の動力学はビアコア 2000 システムを使用して測定された。結合反応のデータは mass transport とともに Langmuir 二分子相互作用モデルに適合させた。

表 1.

Kinetic constants for the interaction of TGF- β 1 Polyamide with the target dsDNA^a

	KD (M)	KA (1/M)	k _d (1/s)	k _a (1/Ms)	Specificity ^b
Polyamide binding (TGF- β 1 Polyamide)	2.41 x 10 ⁻⁹	4.15 x 10 ⁸	1.89 x 10 ⁻⁴	7.84 x 10 ⁴	68.5
Mismatch binding	1.65 x 10 ⁻⁷	6.06 x 10 ⁶	3.14 x 10 ⁻³	1.90 x 10 ⁴	

TGF- β 1: transforming growth factor- β 1, ^a KD: dissociation equilibrium constant; KA: association equilibrium constant; k_a: association rate constant; k_d: dissociation rate constant. ^b Specificity is defined as KA (Polyamide binding)/ KA (Mismatch binding).

表 2.

Kinetic constants for the interaction of TGF- β 1 Polyamide with the target dsRNA^a

	KD (M)	KA (1/M)	k _d (1/s)	k _a (1/Ms)	Specificity ^b
Polyamide binding (TGF- β 1 Polyamide)	6.69 x 10 ⁻⁷	1.49 x 10 ⁶	1.56 x 10 ⁻¹	2.33 x 10 ⁵	54.6
Mismatch binding	3.66 x 10 ⁻⁵	2.73 x 10 ⁴	1.13 x 10 ⁻²	3.09 x 10 ²	

TGF- β 1: transforming growth factor- β 1, ^a KD: dissociation equilibrium constant; KA: association equilibrium constant; k_a: association rate constant; k_d: dissociation rate constant. ^b Specificity is defined as KA (Polyamide binding)/ KA (Mismatch binding).

図 14 に dsDNA と dsRNA に対する TGF- β 1 ポリアミドの結合に対する gel mobility shift assays が示される。TGF- β 1 ポリアミド (5 から 100 μ M) は適度な dsDNA に結合したのに対して、ミスマッチポリアミドは適度な DNA に対して結合しなかった (図 14A)。TGF- β 1 ポリアミドとミスマッチポリアミドの 5 から 100 μ M の濃度では適度な dsRNA のはっきりとしたゲルシフトは観察されなかった (図 14B)。

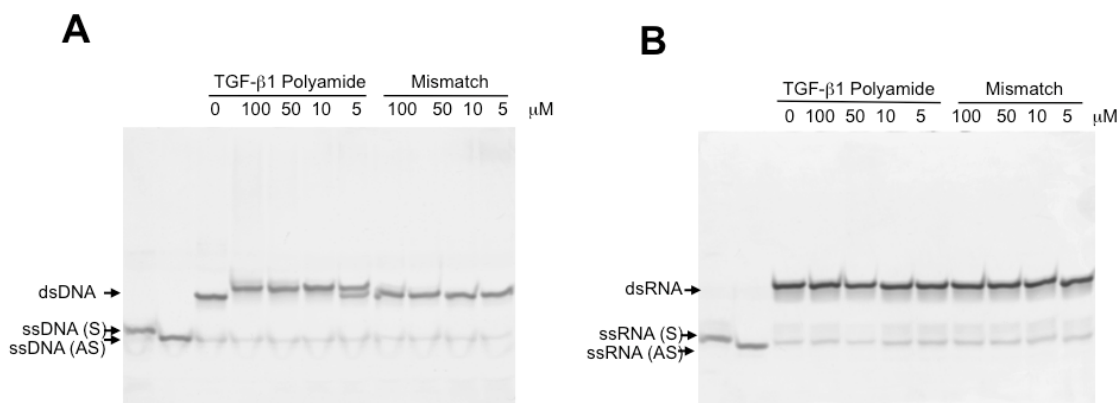


図 14. ラット transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) プロモーターを標的としたピロール-イミダゾール (PI) ポリアミドの二重鎖 (ds)DNA または dsRNA に対する gel mobility shift assays. (A) dsDNA または dsRNA の 2 picomole は TGF- β 1 (TGF- β 1 ポリアミド) を標的とし、そしてミスマッチポリアミド (ミスマッチ) を標的とする 5 から 100 μ M の PI ポリアミドとともに 37 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベートされた。それらの結果の複合体は電気泳動で分離され、Clear Stain Ag で視覚化された。ss(S): センサー本鎖、ss(AS): アンチセンサー本鎖

PA PI ポリアミドの目標とする RNA または DNA への結合

次に、私達はインフルエンザ A 型ウイルスの PA 遺伝子を標的とする dsDNA と dsRNA に対する PA ポリアミドの結合を評価した。ビアコアアッセイは高い濃度の互いに均衡したマッチの結合に従い、ミスマッチポリアミドと比較して標的とする dsDNA に対して PA ポリアミドは速い結合を示した (図 15A)。ビアコアアッセイは PA ポリアミドが dsRNA に対して速い結合を示すことを明らかにした (図 15B)。PA 遺伝子のモデル DNA に対する PA ポリアミドの相互作用において、KD は 3.4×10^{-8} であり、 k_a は 1.3×10^5 であった (表 3)。PA 遺伝子のモデル RNA に対する PA ポリアミドの相互作用において、KD は 4.6×10^{-7} であり、 k_a は 2.0×10^4 であった (表 3)。

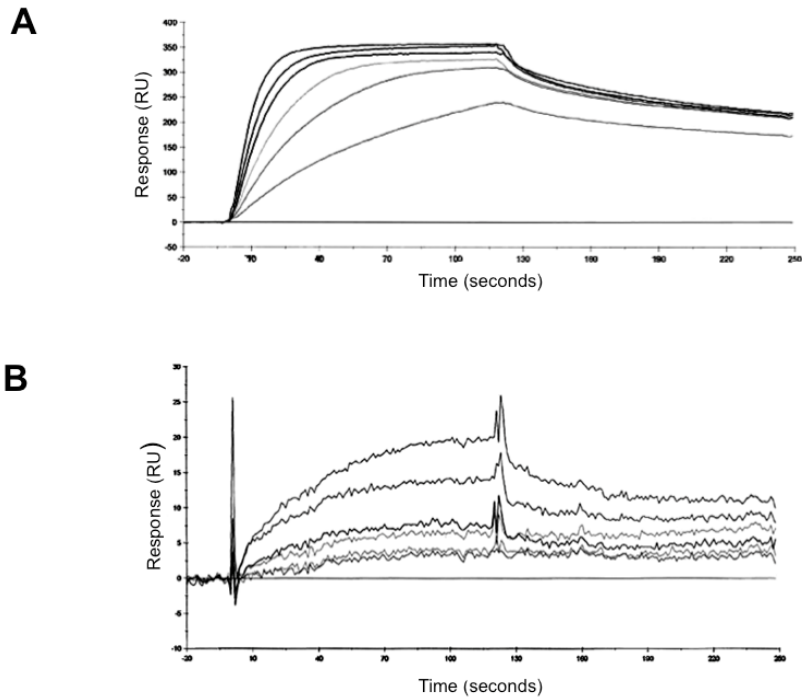


図 15. インフルエンザ A ウイルスのパンハンドル (PA) 領域の二本鎖 (ds)DNA と dsRNA を標的としたピロール-イミダゾール (PI) ポリアミドの相互作用の典型的な表面プラズモン共鳴センサーグラム (ピアコアアッセイ)。(A) dsDNA または (B) dsRNA を標的とする PA ポリアミドの結合のピアコアアッセイ。環状領域以外のピオチンでラベルされたオリゴヌクレオチドは dsDNA または dsRNA としてアニールした。そして、ストレプトアビジンで機能づけられたセンサーチップ SA 上に固定化された。ピオチンでラベルされた ds-オリゴヌクレオチドと PI ポリアミドとの間の相互作用の動力学はピアコア 2000 を使用して測定された。結合反応のデータは mass transport とともに Langmuir 二分子相互作用モデルに適合させた。

表 3.

Kinetic constants for the interaction of PA Polyamide with target dsDNA and dsRNA

	KD (M)	KA (1/M)	k_d (1/s)	k_a (1/Ms)
dsDNA	3.44×10^{-8}	2.91×10^7	4.41×10^{-3}	1.28×10^5
dsRNA	4.57×10^{-7}	2.19×10^6	9.25×10^{-3}	2.02×10^4

PA: influenza virus panhandle resion; ^a KD: dissociation equilibrium constant; KA: association equilibrium constant; k_a : association rate constant; k_d : dissociation rate constant.

dsDNA と dsRNA に対する PA ポリアミドの結合に対する Gel mobility shift

assays が図 16 に示される。PA ポリアミド (0.1 から 200 μM) は適度な dsDNA に対し結合したのに対して (図 16A)、いくつかの濃度の PA PI ポリアミドは適度な dsRNA に対して明らかなゲルシフトは観られなかった (図 16B)。

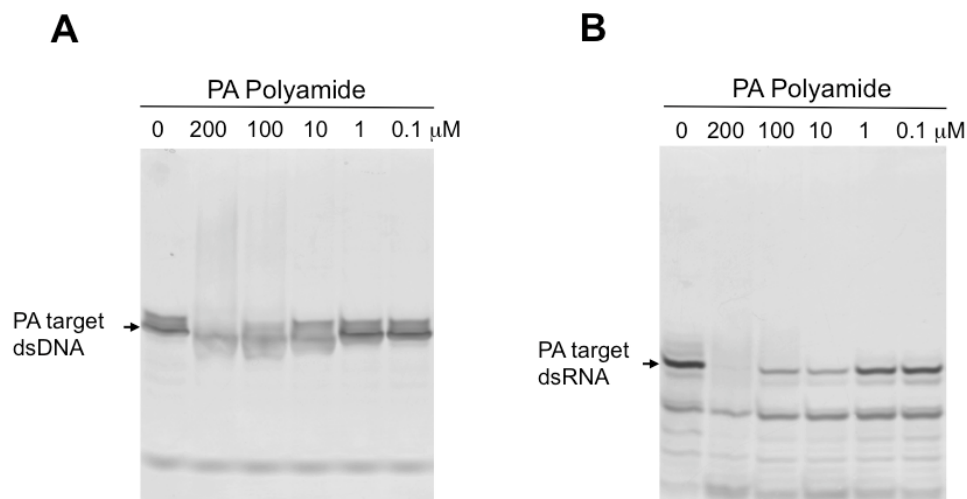


図 16. インフルエンザ A ウイルスのパンハンドル (PA) 領域を標的としたピロロール-イミダゾール (PI) ポリアミドの二本鎖 (ds)DNA または dsRNA の gel mobility shift assays. (A) dsDNA または dsRNA の 2 picomole は PA ポリアミドの 0.1 から 200 μM と共に 37 $^{\circ}\text{C}$ で 1 時間インキュベートされた。それらの結果の複合体は電気泳動で分離され、Clear Stain Ag で視覚化された。

dsDNA と dsRNA への PI ポリアミドの分子結合

ラット TGF- β 1 dsDNA と dsRNA を標的とする PI ポリアミドの分子模型図は CFF 力場変数を用いて Discover Program によって行い、dsDNA と dsRNA の構造体は標準的な結合の長さ及び角度を用いた Program の Insight II Builder Module を用いて構築した (図 17)。ラット TGF- β 1 ポリアミドは B 型の dsDNA のマイナーグループに確りと挿入れた。理想的な A 型の dsRNA へは推定されるマイナーグループに緩やかに合体した。

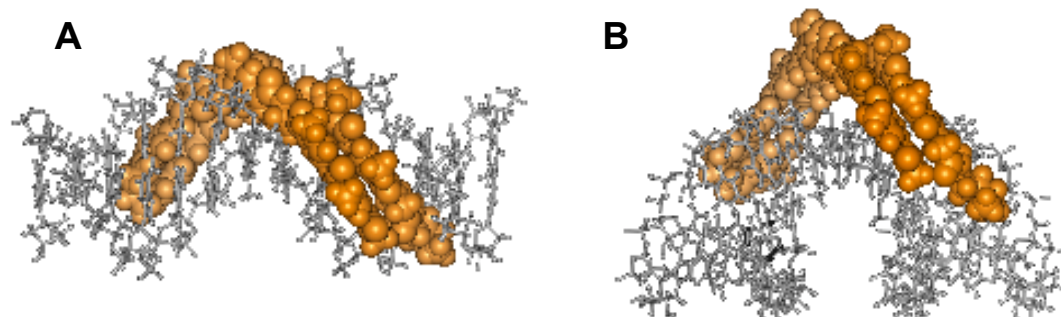


図 17. TGF- β 1 を標的とする PI ポリアミドの推定される結合構造 (A) dsDNA (B) dsRNA

第4章 考察

リボザイムや siRNA のような RNA を標的とした核酸医薬はインフルエンザウイルス薬に発展しているが、薬剤治療や現在のワクチンはインフルエンザを防止するのに制限された価値を持っている (74, 75)。しかしながら、それらの核酸医薬は標準的な治療としては確立されていない。

RNA を標的とした化合物は多様な種類の RNA に対して結合する。アンチセンスオリゴヌクレオチドとリボザイムはワトソン-クリック塩基対に対して相補的な RNA の配列に特異的に交雑する。RNA 結合蛋白は二つの連続したマイナーグループに相互作用し、最初の A 型 RNA 螺旋の一つの面である全体にはまるメジャーグループに相互作用する (76)。アミノグリコシドのような抗生物質であるトブラマイシンとカナマイシン A は GA 対と GG 対にそれぞれ結合し、RNA の内部ループのなかのピリミジンに富んだ領域に結合する (77)。それらの RNA 結合化合物の多くは RNA 構造の中の内部ループと湾曲とヘアピンのような対でない要素の化合物を標的に特異的な構造の基本を示す (78)。

天然物であるネトロプシンとディスタマイシンはマイナーグループに結合することが報告されている。ヘキスト染色で RNA に対して低い親和性を示す。それに対してアミノグリコシドと挿入物は DNA と RNA との間の結合を分けることが出来ない (79)。dsDNA に対する Py と Im が 1:1 の複合体である PI ポリアミドの結合は DNA の A-T 域の狭いマイナーグループに三日月型の Py-Py の安定結合が選択的に認識される構造の過程から考えられた。カルボキシアミデースの NHs は A の N₃ と T の O₂ のようにラセンを形成する特異的な A-T と T-A の塩基対であるマイナー・グループ面の方向に突き出ている。このように、Im を除く Py 環は立体機構の 1:1 複合体の GC 塩基対の環の外の NH₂ を読んでいる (68)。ここで紹介する研究の中で、私達はそれらの DNA 結合原理に対して一致する PI ポリアミドの RNA 結合能を評価した。

今回の研究での BiaCore アッセイでは dsRNA に対する TGF-β1 ポリアミドの明らかな結合を示した。KD 値 (7×10^{-7}) は dsDNA に対する KD 値 (2.4×10^{-9}) よりも 2 log 低かった。PA ポリアミドはまた、dsRNA に対して速い結合を示した。それらの結果は TGF-β1 ポリアミドが DNA 結合親和性より 1 から 2 log 低い親和性で RNA に結合することを示している。ゲルシフトアッセイはしかしながら標的 RNA に対する PI ポリアミドの明らかなシフトは見られなかった。標的 dsRNA に対する PI ポリアミドの結合定数は TGF-β1 ポリアミドと標的 RNA との間がとても弱いことを示し、DNA との結合が 10^{-9} M であったのに比較して 10^{-7} M であった。

CFF 力場変数を用いた Discover Program によるラット TGF-β1 dsDNA と

dsRNA を標的とする PI ポリアミドの推定される結合の分子模型図ではラット TGF- β 1 ポリアミドは B 型の dsDNA のマイナーグループに確りと挿入され、A 型の dsRNA へは推定されるマイナーグループへは緩やかに合体した。また、最近 Dervan らは螺旋 DNA と RNA に対する結合に対し、構造的に PI ポリアミド分子の 3 種類の明らかな能力を比較する thermal melting temperature 解析によって RNA に対する PI ポリアミドの結合が研究された。そして、構造的に PI ポリアミドは構造の相違に影響されない dsDNA に対して大きく熱安定性を示し、それに対して、PI ポリアミドは dsRNA に対する熱安定性を示さなかった。この研究の著者達は A 型標的 dsRNA 上の PI ポリアミドの推定される結合を解析した。そして、Py と Im のサブユニットが DNA 螺旋に対して相対的に同等でわずかに曲線を示すことを明らかにして、PI ポリアミドに相補的な RNA の不足した形を論証した (80)。

今回の研究では dsRNA 上の PI ポリアミドが低い親和性であることが可能であると思われる標的 dsRNA 上の PI ポリアミドの低い親和性は RNA リボース糖の 2'-OH からの結果の螺旋 RNA の形状から連想された (81)。A 型 RNA の構造は PI ポリアミドが要求する特徴の多くと矛盾するかもしれない DNA に対して浅いマイナー・グループを持っている。加えて、A 型 RNA の塩基対は傾斜していて、マイナー・グループ面の浅い湾曲から導かれる螺旋幅の全体の膨張の原因である螺旋軸から外れている。

RNA の機能構造はしばしば特異的な 3 列構造を要求する。この構造の骨格は分子の範囲内の水素結合の形状の二次構造の要素によって規定される。この幹構造から導き出される内部環構造と湾曲部とヘアピン環のような二次構造のいくつかは認識される領域に対して導かれる (82)。インフルエンザウイルス RNA の二重鎖パンハンドル構造は複製、転写そしてビリオン RNA のビリオンへのパッケージングに重要である。一部の相補的な RNA の二重螺旋構造の形状は A 型に近い。この幹構造を含んでいるものはワトソン・クリック塩基対の形状から湾曲している (83)。今回の研究で、私達はインフルエンザ A ウイルスのパンハンドルの幹領域を標的とした PI ポリアミドの結合能力を試験した。BiaCore アッセイは RNA に対する PI ポリアミドの親和性が標的とする dsRNA に対して PI ポリアミドが低い親和性を示し、DNA (PA ポリアミドの KD 値は DNA の (3.4×10^{-8}) に比較して dsRNA は 10^{-7} であった) よりも 1 log 低いことを明らかにした。

今回の研究で PI ポリアミドは標的とする dsDNA よりも標的とする dsRNA への低い結合能力を持っていることを示唆した。dsRNA と dsDNA への PI ポリアミドの明らかな結合の性質は二次構造と化学的結合の性質の中の標的とする RNA と DNA との間の差異を連想させるかもしれない。インフルエンザ A ウイルスの標的としたパンハンドルの幹領域のここで紹介された PI ポリアミドはインフルエンザへの実際の医療の発展には難しいだろう。

第5章 総括

遺伝子機能の設計された不活化は特に遺伝子治療の中で使用され、ウイルス感染の中で取り扱われ、癌や異常な遺伝子発現による他の病気などの遺伝子の機能を明確にする手法として重要である。遺伝子の機能はアンチ遺伝子 (84) またはアンチセンスペプチド核酸のような核酸医薬によって DNA レベルで不活性化が可能で、また、アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド (85) とリボザイム (86) と siRNA (87) とアプタマー (88) による RNA レベルで不活化が可能である。

それらの核酸薬品は化学的修飾に相当する核酸分解酵素によって簡単に分解される。また、ベクターを含むドラッグ・デリバリーシステムは治療的な適用を要求する。転写調節は遺伝子発現の基本である。転写の開始は遺伝子プロモーターの中の同一 DNA の反応分子に対して転写因子が結合することが要求される。このなかで私達は新規の遺伝子抑制薬であるピロール-イミダゾール (PI) ポリアミドを発展させた。PI ポリアミドは duocarmycin A と distamycin A から最初に認識され、N-methylpyrrole と N-methylimidazole アミノ酸の芳香族環を構成する小さな合成分子から最初に認識された (89)。合成された PI ポリアミドは高い親和性と特異性で二本鎖の DNA のマイナー-グループの中に特異的な塩基配列で結合することが出来る。PI ポリアミドは核酸分解酵素に対して完全に抵抗性であり、いくつかのドラッグデリバリーを除く組織に対して届けることができる。PI ポリアミドは医学的に潜在力があり、分子生物学の使い勝手のよい道具となることが期待される。結合位置の特異性はピロール (Py) 対とイミダゾール (Im) 対が Py/Im 対で CG 塩基対を標的として、Py/Im が GC 塩基対を認識して、Py/Py が AT と TA 塩基対の両方に結合することに対して依存する (69, 90, 91)。

私達は動脈の狭窄と肥大化 (92) の進行性腎障害 (70, 72, 93) に潜在力がある transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) を標的とした PI ポリアミドを説明した。私達はまた、アテローム性動脈硬化症 (94) へのレクチン様酸化 LDL 受容体-1 を標的とした PI ポリアミドを発展させた。それらの PI ポリアミドは標的遺伝子の転写を強力に抑制する dsDNA のプロモーター領域の転写因子結合領域に対して設計された。DNA 二重螺旋への PI ポリアミドの対則が二重螺旋の RNA へ結合可能かどうかを明らかにすることが残っている。記述されたこれまでに PI ポリアミドの RNA への結合の性質は報告されていない。この研究で報告されたピアコアアッセイでは PI ポリアミドは標的 dsRNA に対する PI ポリアミドの結合定数は TGF- β ポリアミドと標的 RNA との間がとても弱いことを示し、DNA との結合が 10^{-9} M であったのに比較して 10^{-7} M であった。そして、それらの結果は TGF- β 1 ポリアミドが DNA 結合親和性より 2 log 低い親和性で RNA に結合することを示していた。現行の PI ポリアミ

ドでは RNA への結合親和性が低いので、アルキル化剤の添付や化学的に構造変化させた PI ポリアミドの化学合成が必要かもしれない。核酸医薬は核酸分解酵素により速やかに生体内で分解されるが、PI ポリアミドは生体内で安定であり、DDS なしに細胞に取り込まれ、様々な遺伝子をターゲットとして自由に分子設計出来る。そこで、PI ポリアミドを基盤とした様々な機能分子が新たに設計されることが期待される。

インフルエンザは毎年継続して感染流行を起こしている。さらに数年から数十年ごとに新型のヒトインフルエンザの出現とその新型ウイルスのパンデミックが起こっている。インフルエンザ A ウイルスはヒトの中の呼吸器域に感染流行を示す原因の Orthomyxoviridae 属のメンバーである。現行の研究で標的とする TGF- β 1 とインフルエンザ A ウイルスでの DNA 結合の性質とを比較して PI ポリアミドの RNA への結合を探索した。ピアコアアッセイは RNA に対する PI ポリアミドの親和性が標的とする dsRNA に対して PI ポリアミドが低い親和性を示し、DNA (PA ポリアミドの KD 値は DNA の (3.4×10^{-8}) に比較して dsRNA は 10^{-7} であった) よりも 1 log 低いことを明らかにした。ここで紹介した実験の結果から、PI ポリアミドは標的とする dsDNA よりも標的とする dsRNA への低い結合能力を持っていることを示唆した。

TGF- β 1 の時と同様に現行の PI ポリアミドでは RNA への結合親和性が低いので、ここで紹介された PI ポリアミドはインフルエンザへの実際の医療の発展には難しいと思われた。アルキル化剤の添付や化学的に構造変化させた PI ポリアミドの化学合成が必要かもしれない。今回の研究はこれまで二本鎖 DNA をターゲットとしていたピロールイミダゾールポリアミドが二本鎖 RNA に塩基配列特異的に結合する事を今回始めて明らかにした。核酸医薬は核酸分解酵素により速やかに生体内で分解されるが、PI ポリアミドは生体内で安定であり、DDS なしに細胞に取り込まれ、様々な遺伝子をターゲットとして自由に分子設計出来、遺伝子発現を抑制出来る。そこで、PI ポリアミドを基盤とした様々な機能分子が新たに設計されることが期待される。

本研究は微生物学、環境学、化学、医学の領域に基づき、振興ウイルス感染症である SARS、インフルエンザに対し、ゲノム化学に基づきリボザイム、PI ポリアミドの開発について纏めたものである。

【謝辞】

本研究にあたり、大学院入学当初より丁寧に研究について、御教授、御指導いただきました私の主指導教員である総合科学研究科教授 福田昇先生に深く感謝します。実験の計画の立て方から手技、結果、解析方法、データのまとめ方など含め多くのことを御教授、御指導いただきました総合科学研究科兼任教授 清水一史先生に深く感謝します。そして、貴重な分子模型図を提供していただきました京都大学大学院理学研究科教授

杉山弘先生に深く感謝します。

【参考文献】

1. Taylor L.H., Latham S.M., Woolhouse M.E., 2001. Risk factors for human disease emergence. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 356, 983-989.
2. Binder S., Levitt A.M., Sacks J.J., Hughes J.M., 1999. Emerging infectious disease: public health issues for the 21st century. *Science* 284, 1311-1313.
3. Satcher D., 1995. Emerging infections: getting ahead of the curve. *Emerging Infectious Diseases* 1, 1-6.
4. Ebel G., Spielman A., 1998. Emerging infections: origins, ecology, costs and prevention. *Parasitology Today* 14, 134-135.
5. Fauci A.S., 2005. Emerging and reemerging infectious diseases: the perpetual challenge. *Academic Medicine* 80, 1079-1085.
6. Groneberg D.A., Zhang L., Welte T., Zabel P. Chung K.F., 2003. Severe acute respiratory syndrome: global initiatives for disease diagnosis. *Q. J. Med.* 96, 845-852.
7. Peiris J.S.M., Yuen K.Y., Osterhaus A.D.M.E., Stohr K., 2003. The severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 349, 2431-2441.
8. Leung G.M., Hedley A.J., Ho L.M., Chau P., Wong I.O.L., Thach T.Q., Ghani A.C., Donnelly C.A., Fraser C., Riley S., Ferguson N.M., Anderson R.M., Tsang T., Leung P.Y., Wong V., Chan J.C.K., Tsui E., Lo S.V., Lam T.H., 2004. The epidemiology of severe acute respiratory syndrome in the 2003 Hong Kong epidemic: an analysis of all 1755 patients. *Ann. Intern. Med.* 141, 662-673.
9. Peiris J.S.M., Lai S.T., Poon L.L.M., Guan Y., Yam L.Y.C., Lim W., Nicholls J., Yee W.K.S., Yan W.W., Cheung M.T., Cheng V.C.C., Chan K.H., Tsang D.N.C., Yung R.W.H., Ng T.K., Yuen K.Y., and members of the SARS study group., 2003. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361, 1319-1325.
10. Drosten C., Gunther S., Preiser W., Werf S.V.D., Brodt H.R., Becker S., Rabenau H., Panning M., Kolesnikova L., Fouchier R.A.M., Berger A., Burguiere A.M., Cinatl J., Eickmann M., Escriou N., Grywna K., Kramme S., Manuguerra J.C., Muller S., Rickerts V., Sturmer M., Vieth S., Klenk H.D., Osterhaus A.D.M.E., Schmitz H., Doerr H.W., 2003. Identification of novel Coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348, 1967-1976.
11. Stadler K., Maignani V., Eickmann M., Becker S., Abrignani S., Klenk H.D.,

- Rappuoli R., 2003. SARS-Beginning to understand a new virus. *Nature Reviews* 1, 209-218.
12. Rota P.A., Oberste M.S., Monroe S.S., Nix W.A., Campagnoli R., Icenogle J.P., Penaranda S., Bankamp B., Maher K., Chen M.H., Tong S., Tamin A., Lowe L., Frace M., DeRisi J.L., Chen Q., Wang D., Erdman D.D., Peret T.C.T., Burns C., Ksiazek T.G., Rollin P.E., Sanchez A., Liffick S., Holloway B., Limor J., McCaustland K., Rasmussen M.O., Fouchier R., Gunther S., Osterhaus A.D.M.E., Drosten C., Pallansch M.A., Anderson L.J. Bellini W.J., 2003. Characterization of novel Coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *Science* 300, 1394-1399.
 13. Haagmans B.L., Osterhaus A.D.M.E., 2006. Coronaviruses and their therapy. *Antiviral Research* 71, 397-403.
 14. Eccles R., 2005. Understanding the symptoms of the common cold and influenza. *Lancet Infect. Dis.* 5, 718-725.
 15. Brankston G., Gitterman L., Hirji Z., Lemieux C., Gardam M., 2007. Transmission of influenza A in human beings. *Lancet Infect. Dis.* 7, 257-265.
 16. Webster R.G., Bean W.J., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y., 1992. Evolution and Ecology of Influenza A viruses. *Microbiological Reviews* 56, 152-179.
 17. Suzuki Y., 2005. Sialobiology of Influenza molecular mechanism of host range variation of influenza viruses. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 399-408
 18. Salom R., Webster R.G., 2009. The influenza virus enigma. *Cell* 136, 402-410.
 19. Hilleman M.R., 2002. Realities and enigmas of human viral influenza: pathogenesis, epidemiology and control. *Vaccine* 20, 3068-3087.
 20. Jain S., Kamimoto L., Bramley A.M., Schmitz A.M., Benoit S.R., Louie J., Sugerman D.E., Druckenmiller J.K., Ritger K.A., Chugh R., Jasuja S., Deutscher M., Chen S., Walker J.D., Duchin J.S., Lett S., Soliva S., Wells E.V., Swerdlow D., Uyeki T.M., Fiore A.E., Olsen S.J., Fry A.M., Bridges C.B., Finelli L., 2009. Hospitalized patients with 2009 H1N1 influenza in the United States, April-June 2009. *N. Engl. J. Med.* 361, 1935-1944.
 21. Taubenberger J.K., Morens D.M., 2008. The pathology of influenza virus infections. *Ann. Rev. Pathol.* 3, 499-522.
 22. Lakadamyali M., Rust M.J., Babcock H.P., Zhuang X., 2003. Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 9280-9285.
 23. Cros J.F., Palese P., 2003. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the

- nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Research* 95, 3-12.
24. Nobusawa E., Sato K., 2006. Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. *J. Virol.* 80, 3675-3678.
 25. Bouvier N.M., Palese P., 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine* 26, D49-D53.
 26. Pinto L.H., Lamb R.A., 2006. The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J. Biol. Chem.* 281, 8997-9000.
 27. Matsuzaki Y., Sugawara K., Mizuta K., Tsuchiya E., Muraki Y., Hongo S., Suzuki H., Nakamura K., 2002. Antigenic and genetic characterization of influenza C viruses which caused two outbreaks in Yamagata city, Japan, in 1996 and 1998. *J. Clin. Microbiol.* 40, 422-429.
 28. Matsuzaki Y., Katsushima N., Nagai Y., Shoji M., Itagaki T., Sakamoto M., Kitaoka S., Mizuta K., Nishimura H., 2006. Clinical Features of influenza C virus infection in children. *J. Infect. Dis.* 193, 1229-1235.
 29. Zambon M.C., 1999. Epidemiology and pathogenesis of influenza. *J. Anti. Chem.* 44, 3-9.
 30. Nayak D.P., Hui E.K.W., Barman S., 2004. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Research* 106, 147-165.
 31. Kash J.C., Goodman A.G., Korth M.J., Katze M. G., 2006. Hijacking of the host-cell response and translational control during influenza virus infection. *Virus Research* 119, 111-120.
 32. Klumpp K., Ruigrok W.H., Baudin F., 1997. Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNA structure. *EMBO J.* 16, 1248-1257.
 33. Palese P., Shaw L.S., 2007. *Orthomyxoviridae: the viruses and their replication.* Fields Virology, 5th ed., Lippencott Williams & Wilkins, New York, pp. 1647-1689.
 34. Lee Y.S., Seong B.L., 1996. Mutational analysis of influenza B virus RNA transcription *in vitro*. *J. Virol.* 70, 1232-1236.
 34. Jackson D., Elderfield R.A., Barclay W.S., 2011. Molecular studies of influenza B virus in the reverse genetics era. *J. Gen. Virol.* 92, 1-17.
 35. Li Z.N., Muraki Y., Takashita E., Matsuzaki Y., Sugawara K., Hongo S., 2004. Biochemical properties of the P42 protein encoded by RNA segment 6 of influenza C virus. *Arch. Virol.* 149, 275-287.
 36. Ison G.M., 2011. Antivirals and resistance: influenza virus. *Current Opinion in Virology* 1, 563-573.
 37. Hsu J., Santesso N., Mustafa R., Brozek J. Chen Y.L., Hopkins J.P., Cheung A.,

- Hovhannisyan G., Ivanova L., Flottorp S.A., Saeterdal I., Wong A.D., Tian J., Uyeki T.M., Aki E.A., Coello P.A., Smaill F., Schunemann H.J., 2012. Antivirals for treatment of influenza. *Ann. Intern. Med.* 156, 512-524
38. International Human Genome Sequencing Consortium, 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931-945.
39. Hopkins A.L., Groom C.R., 2002. The druggable genome. *Nature Reviews* 1, 727-730.
40. Ruan Y., Le Ber P., Ng H.H., Liu E.T., 2004. Interrogating the transcriptome. *Trends Biotechnol.* 22, 23-30.
41. Eisen M.B., Spellman P.T., Brown P.O., Botstein D., 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 95, 14863-14868.
42. Takayama K., Garcia-Cardena G., Sukhova G.K., Comander J., Gimbrone M.A., Libby P., 2002. Prostaglandin E₂ suppresses chemokine production in human macrophages through the EP4 receptor. *J. Biol. Chem.* 277, 44147-44154.
43. Yokoi A., Kuromitsu J., Kawai T., Nagasu T., Hatasugi N., Yoshimatsu K., Yoshino H., Owa T., 2002. Profiling novel sulfonamide antitumor agents with cell-based phenotypic screens and array-based gene expression analysis. *Molecular Cancer Therapeutics* 1, 275-286.
44. Lettieri T., 2006. Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives* 114, 4-9.
45. Matsuzaki H., Dong S., Loi H., Di X., Liu G., Hubbell E., Law J., Berntsen T., Chadha M., Hui H., Yang G., Kennedy G.C., Webster T.A. Cawley S., Walsh P.S., Jones K.W., Fodor S.P.A., Mei R., 2004. Genotyping over 100,000 SNPs on a pair of oligonucleotide arrays. *Nature Methods* 1, 109-111.
46. Cline M.J., 1985. Perspectives for gene therapy: inserting new genetic information into mammalian cells by physical techniques and viral vectors. *Pharmac. Ther.* 29, 69-92.
47. Blaese R.M., Culver K.W., Miller A.D., Carter C.S., Fleisher T., Clerici M., Shearer G., Chang L., Chiang Y., Tolstoshev P., Greenblatt J.J., Rosenberg S.A., Klein H., Berger M., Mullen C.A., Ramsey W.J., Muul L., Morgan R.A., Anderson F., 1995. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA-SCID: initial trial results after 4 years. *Science* 270, 475-480.
48. Onodera M., Ariga T., Kawamura N., Kobayashi I., Ohtsu M., Yamada M., Tame A., Furuta H., Okano M., Matsumoto S., Kotani H., McGarrity G.J., Blaese R. M., Sakiyama Y., 1998. Successful peripheral t-lymphocyte-directed gene transfer for

- a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency. *Blood* 91, 30-36.
49. Raper S.E., Chirmule N., Lee F.S., Wivel N.A., Bagg A., Gao G.P., Wilson J.M., Batshaw M.L., 2003. Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol. Genet. Metab.* 80, 148-158.
50. Buckley R., 2002. Gene therapy for SCID-a complication after remarkable progress. *Lancet* 360, 1185-1186.
51. Fukuda N., Kubo A., Watanabe Y., Nakayama T., Soma M., Izumi Y., Kanmatsuse K., 1997. Antisense oligodeoxynucleotide complementary to platelet-derived growth factor A-chain messenger RNA inhibits the arterial proliferation in spontaneously hypertensive rats without altering their blood pressures. *J. Hypertens.* 15, 1123-1136.
52. Kishioka H., Fukuda N., Nakayama M., Hu W.Y., Satoh C., Kanmatsuse K., Manoharan M., 2000. Effect of methylene methylimino linkage of antisense oligonucleotide to the platelet-derived growth factor A-chain on growth of vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Euro. J. Pharmacol.* 392, 129-132.
53. Fukuda N., Furuya R., Kishioka H., Suzuki R., Matsuda H., Tahira Y., Takagi H., Ikeda Y., Saito S., Matsumoto K., Kanmatsuse K., 2003. Effects of antisense peptide nucleic acid to platelet-derived growth factor A-chain on growth of vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 42, 224-231.
54. Wang Y., Kato N., Jazag A., Dharel N., Otsuka M., Taniguchi H., Kawabe T., Omata M., 2006. Hepatitis C virus core protein is a potent inhibitor of RNA silencing-based antiviral response. *Gastroenterology* 130, 883-892.
55. Yang J.P., Fan W., Rogers C., Chatterton J.E., Bliesath J., Liu G., Ke N., Wang C.Y., Rhoades K., Wong-Staal F., Li Q.X., 2006. A novel RNAi library based on partially randomized consensus sequences of nuclear receptors: Identifying the receptors involved in amyloid β degradation. *Genomics* 88, 282-292.
56. Ohkawa J., Koguma T., Kohda T., Taira K., 1995. Ribozymes: from mechanistic studies to applications *in vivo*. *J. Biochem.* 118, 251-258.
57. Hu W.Y., Fukuda N., Nakayama M., Kishioka H., Kanmatsuse K., 2001. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by DNA-RNA chimeric hammerhead ribozyme targeting to rat platelet-derived growth factor A-chain mRNA. *J. Hypertens.* 19, 203-212.
58. Kotani M., Fukuda N., Ando H., Hu W.Y., Kunimoto S., Saito S., Kanmatsuse K.,

2003. Chimeric DNA-RNA hammerhead ribozyme targeting PDGF A-chain mRNA specifically inhibits neointima formation in rat carotid artery after balloon injury. *Cardiovasc. Res.* 57, 265-276.
59. Lin Z.H., Fukuda N., Suzuki R., Takagi H., Ikeda Y., Saito S., Matsumoto K., Kanmatsuse K., Mugishima H., 2004. Adenovirus-encoded hammerhead ribozyme to PDGF A-chain mRNA inhibits neointima formation after arterial injury. *J. Vasc. Res.* 41, 305-313.
60. Hu W.Y., Fukuda N., Kishioka H., Nakayama M., Satoh C., Kanmatsuse K., 2001. Hammerhead ribozyme targeting human platelet-derived growth factor A-chain mRNA inhibited the proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 158, 321-329.
61. Teng J., Fukuda N., Hu W.Y., Nakayama M., Kishioka H., Kanmatsuse K., 2000. DNA-RNA chimeric hammerhead ribozyme to transforming growth factor- β 1 mRNA inhibits the exaggerated growth of vascular smooth muscle cell from spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc. Res.* 48, 138-147.
62. Su J.Zi., Fukuda N., Hu W.Y., Kanmatsuse K., 2000. Ribozyme to human TGF- β 1 mRNA inhibits the proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 278, 401-407.
63. Forster A.C., Symons R.H., 1987. Self-cleavage of Plus and Minus RNAs of a virusoid and a structural model for the active sites. *Cell* 49, 211-220.
64. Xing Z., Whitton L., 1992. Ribozymes which cleave Arenavirus RNAs: Identification of susceptible target sites and inhibition by target site secondary structure. *J. Virol.* 66, 1361-1369.
65. Fukushima A., Fukuda N., Lai Y., Ueno T., Moriyama M., Taguchi F., Iguchi A., Shimizu K., Kuroda K., 2009. Development of a Chimeric DNA-RNA hammerhead ribozyme targeting SARS virus. *Intervirology* 52, 92-99.
66. Kopka M.L., Yoon C., Goodsell D., Pjura P., Dickerson R.E., 1985. Binding of an antitumor drug to DNA netropsin and C-G-C-G-A-A-T-T^{Br}C-G-C-G. *J. Mol. Biol.* 183, 553-563.
67. Kopka M.L., Yoon C., Goodsell D., Pjura P., Dickerson R.E., 1985. The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 1376-1380.
68. Dervan P.B., 2001. Molecular recognition of DNA by small molecules. *Bioorg. Med. Chem.* 9, 2215-2235.
69. Lai Y.M., Fukuda N., Ueno T., Matsuda H., Saito S., Matsumoto K., Ayame H., Bando T., Sugiyama H., Mugishima H., Serie K., 2005. Synthetic

- pyrrole-imidazole polyamide inhibits expression of the human transforming growth factor- β 1 gene. *J. Pharmac. Expe. Thera.* 315, 571-575.
70. Dickinson L.A., Gulizia R.J., Trauger J.W., Baird E.E., Mosier D.E., Gottesfeld J.M., Dervan P.B., 1998. Inhibition of RNA polymerase II transcription in human cells by synthetic DNA-binding ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 12890-12895.
72. Matsuda H., Fukuda N., Ueno T., Tahira Y., Ayame H., Zhang W., Bando T., Sugiyama H., Saito S., Matsumoto K., Mugishima H., Serie K., 2006. Development of gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeting the TGF- β 1 promoter for treatment of progressive renal diseases. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 422-432.
73. Odagiri T., Tobita K., 1990. Nucleotide sequence of the PA gene of influenza A/WSN/33(H1N1). *Nucl. Acids Res.* 18, 654.
74. Lazarev V.N., Shmarov M.M., Zakhartchouk A.N., Yurov. G.K., Misurina O.U., Akopian T.A., Grinenko N.F., Grodnitskaya N.G., Kaverin N.V., Naroditsky B.S., 1999. Inhibition of influenza A virus reproduction by ribozyme targeted against PB1 mRNA. *Antiviral Res.* 42, 47-57.
75. Ge Q., McManus M.T., Nguyen T., Shen C.H., Sharp P.A., Eisen H.N., Chen J., 2003. RNA interference of influenza virus production by directly targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 2718-2723.
76. Ryter J.M., Schultz S.C., 1998. Molecular basis of double-stranded RNA-protein interactions: structure of a dsRNA-binding domain complexed with dsRNA. *EMBO J.* 17, 7505-7513.
77. Disney M.D., Labuda L.P., Paul D.J., Poplawski S.G., Pushechnikov A., Tran T., Velagapudi S.P., Wu M., Childs-Disney J.L., 2008. Two-dimensional combinatorial screening identifies specific aminoglycoside-RNA internal loop partners. *J. Am. Chem. Soc.* 130, 11185-11194.
78. Thomas R., Liu X., Hergenrother P.J., 2005. Size-specific ligands for RNA hairpin loops. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 12434-12435.
79. Arya D.P., Coffee R.L., Xue J.L., 2004. From triplex to B-form duplex stabilization: reversal of target selectivity by aminoglycoside dimers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 4643-4646.
80. Chenoweth D.M., Meier J.L., Dervan P.B., 2013. Pyrrole-imidazole polyamides distinguish between double-helical DNA and RNA. *Angew. Chem. Int. Ed.* 52, 415-418.

81. Chenoweth D.M., Dervan P.B., 2010. Structural basis for cyclic Py-Im polyamide allosteric inhibition of nuclear receptor binding. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 14521-14529.
82. Mathews D.H., Disney M.D., Childs J.L., Schroeder S.J., Zuker M., Turner D.H., 2004. Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7287-7292.
83. Cheong H.K., Cheong C., Choi B.S., 1996. Secondary structure of the panhandle RNA of influenza virus A studied by NMR spectroscopy. *Nucl. Acids Res.* 24, 4197-4201
84. Helene C., 1991. The anti-gene strategy: control of gene expression by triplex-forming-oligonucleotides. *Anticancer Drug Des.* 6, 569-584.
85. Stein C.A., Cohen J.S., 1988. Oligodeoxynucleotides as inhibitors of gene expression: A review. *Cancer Res.* 48, 2659-2668.
86. Vaish N.K., Kore A.R., Eckstein F., 1998. Survey and summary recent developments in the hammerhead ribozyme field. *Nucl. Acids Res.* 26, 5237-5242.
87. Paddison P.J., Hannon G.J., 2002. RNA interference: the new somatic cell genetics? *Cancer Cell* 2, 17-23.
88. Ellington A.D., Conrad R., 1995. Aptamer as potential nucleic acid pharmaceuticals. *Biotechnol. Ann. Rev.* 1, 185-214.
89. Sugiyama H., Lian C., Isomura M., Saito I., Wang A.H.J., 1996. Distamycin A modulates the sequence specificity of DNA alkylation by duocarmycin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 14405-14410.
90. Trauger J.W., Baird E.E., Dervan P.B., 1996. Recognition of DNA by designed ligands at subnanomolar concentrations. *Nature* 382, 559-561.
91. White S., Szewczyk J.W., Turner J.M., Baird E.E., Dervan P.B., 1998. Recognition of the four Watson-Crick base pairs in the DNA minor groove by synthetic ligands. *Nature* 391, 468-471.
92. Washio H., Fukuda N., Matsuda H., Nagase H., Watanabe T., Matsumoto Y., Terui T., 2011. Transcriptional inhibition of hypertrophic scars by a gene silencer, pyrrole-imidazole polyamide, targeting the TGF- β 1 promoter. *J. Invest. Dermatol.* 131, 1987-1995.
93. Matsuda H., Fukuda N., Ueno T., Katakawa M., Wang X., Watanabe T., Matsui S., Aoyama T., Saito K., Bando T., Matsumoto Y., Nagase H., Matsumoto K., Sugiyama H., 2011. Transcriptional inhibition of progressive renal disease by gene silencing pyrrole-imidazole polyamide targeting of the transforming growth

factor- β 1 promoter. *Kidney Int.* 79, 46-56.

94. Ueno T., Fukuda N., Tsunemi A., Yao E.H., Matsuda H., Tahira K., Matsunoto T., Matsumoto K., Matsumoto Y., Nagase H., Sugiyama H., Sawamura T., 2009. A novel gene silencer, pyrrole-imidazole polyamide targeting human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 gene improves endothelial cell function. *J. Hypertens.* 27, 508-516.