

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-13199

(P2005-13199A)

(43) 公開日 平成17年1月20日(2005.1.20)

(51) Int. Cl.⁷

C12N 15/09

F1

C12N 15/00 ZNAA

テーマコード(参考)

4B024

審査請求 未請求 請求項の数 1 書面 (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願2003-205080 (P2003-205080)	(71) 出願人	503149314 武井 佳史 岐阜県岐阜市此花町2丁目5番地
(22) 出願日	平成15年6月25日 (2003.6.25)	(71) 出願人	591038945 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
		(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	張 皓倩 愛知県名古屋市中川区富田町大字戸田字富田30番地戸田荘16棟401
		(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
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 siRNAを用いたヒトbcl-2蛋白質の発現の強い抑制。

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】ヒトbcl-2蛋白質の生合成を特異的に強く抑制する物質を提供する。

【解決手段】ヒトbcl-2蛋白質のメッセンジャーRNAの特定の塩基配列に対応するsmall interfering RNA (siRNA) 配列を用いる。

【効果】本発明のsiRNAによってヒトbcl-2蛋白質の発現を強く抑制することが出来る。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト *bcl-2* 蛋白質の発現を抑える *siRNA* 配列。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ヒト *bcl-2* 蛋白質の発現を抑制する *siRNA* 配列に関する。

【0002】

【従来技術】

bcl-2 遺伝子はヒト濾胞性B細胞リンパ腫に付随する *t(14;18)(q32;q21)* 転座点の解析から、辻本らによって単離された癌遺伝子である (Tsujimoto, Y. and Croce, C.M.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 83:5214-5218, 1986)。その後、Korsmeyerのグループによって、*bcl-2* 蛋白質の過剰発現がリンパ球系細胞に誘導されるアポトーシスを抑制することが示され (Hockenbery, D. et al.: Nature, 348:334-336, 1990)、*bcl-2* はアポトーシスのメカニズム研究の中心的存在となり、現在に至っている。現在までに *bcl-2* 遺伝子の類似関連遺伝子として、*bcl-x*, *bcl-w*, *mcl-1*, *bfl-1/A1*, *bax*, *bad*, *bik* などが同定・報告され、*bcl-2* ファミリーと呼ばれている。*bcl-2* 蛋白質はC末端付近に膜貫通領域を有し、ミトコンドリア外膜、小胞体膜および核外膜などの核分画に局在する。 *bcl-2* はアポトーシス誘導刺激によるミトコンドリアの膜電位低下とそれに伴う *apoptosis-inducing factor (AIF)* やシトクロム *c* の細胞質への流出を阻害することにより、抗アポトーシス作用を示す (Reed, J.C.: Nature, 387, 773-776, 1997)。

細胞の癌化は増殖異常だけでなく、アポトーシス異常が関与する。多くの固形癌由来の癌細胞は抗癌剤によるアポトーシスに抵抗性を示し、こうしたアポトーシス耐性が化学療法に対する抵抗性に関連することも明らかとなってきた。*bcl-2* は抗癌剤によるアポトーシス作用に大きく影響している。実際に、アポトーシス抑制因子である *bcl-2* 遺伝子を癌細胞に導入すると、種々の抗癌剤に対するアポトーシス耐性が引き起こされる。臨床癌においても、*bcl-2* 蛋白質の関与が指摘されている。非ホジキンリンパ腫では *bcl-2* 蛋白質の発現が高い場合には、予後が悪いことが示されている (Rassidakis, G.Z. et al.: Blood, 100, 3935-3941, 2002)。以上のように、*bcl-2* は癌治療の戦略上、とても魅力的な標的遺伝子であるといえる。したがって *bcl-2* 蛋白質の発現を抑える方法を考案することが癌の治療の確立に大きく寄与すると考えられる。

【0003】

bcl-2 蛋白質はミトコンドリア外膜、小胞体膜および核外膜などに局在するので、抗体等で、その作用を阻害するなどの戦略が成立しないため、*bcl-2* 蛋白質の生合成そのものを抑制することが必須となる。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、ヒト *bcl-2* 蛋白質の生合成を特異的に強く抑制する物質を提供することを課題とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】

特定の蛋白質の生合成を阻害するためには、その蛋白質の生合成を指令するメッセンジャーRNA (*mRNA*) を標的とすることが考えられる。すなわち、標的遺伝子の *mRNA* の働きを抑制し、かつその *mRNA* 自体を分解に導く戦略、つまり *RNA interference* を基本原理とする遺伝子発現制御システムを選択した。*RNA interference* の現象は、1998年、Fireらによって報告された、*C.elegans*

10

20

30

40

50

nsに2本鎖RNAを導入し、in vivoで特定遺伝子のノックダウンに成功したという発表(Fire, A. et al.: Nature: 391, 806-811, 1998)により広く知られるようになった。使用された2本鎖RNAのターゲット遺伝子に対する特異性は、非常に高くターゲット配列に相補しない2本鎖RNAでは一切の発現制御効果を示さなかった。次いで、この実験系を哺乳動物に応用する試みがなされたが、2本鎖RNAの導入に伴う、インターフェロン作用が働くため、哺乳動物細胞の遺伝子をターゲットとした2本鎖RNAは使用できない事が大きな問題となった。その後、Tuschlの研究グループがもっとも効率よく遺伝子をノックダウンする2本鎖RNAの研究をすすめ、3'末端に2塩基のオーバーハングを持った21-merという短い2本鎖を用いると、哺乳類細胞で問題となっていたインターフェロン作用を引き起こさずにRNAiを機能させることができると報告した。このような短い2本鎖RNAをsmall interfering RNA (siRNA)と呼ぶ(Elbashir, S. M. et al.: Nature, 411: 494-498, 2001, Bass, B. L. et al.: Nature, 411, 428-429, 2001)。申請者らは、ヒトbcl-2 mRNAに作用し、ヒトbcl-2蛋白質の生合成を阻害可能なsiRNAの塩基配列を見出した。

【0006】

すなわち、本発明は、(1)ヒトbcl-2蛋白質の生合成を強く抑制するsiRNA配列の決定からなる。

【0007】

【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は検討した5種のbcl-2 siRNAと陰性コントロールとして使用した2種のsiRNAの構造を示す。図2は5種のbcl-2 siRNAをヒト腎癌細胞(ACHN)に投与し、細胞可溶化液中のbcl-2蛋白質発現の抑制を調べるウエスタンブロットとバンドの濃さを定量化したデンシトメーター解析のグラフ、図3は、bcl-2蛋白質の生合成阻害に最も有効であることが判明したbcl-2 siRNA #3とそのスクランブル配列bcl-2 siRNA #3-SCR等をACHN細胞に投与し、回収した細胞の可溶化液中のbcl-2蛋白質発現の抑制を図2と同様に検討した結果を示す。

【0008】

1. siRNAの分子設計について説明する。ヒトbcl-2のmRNA(Tsujimoto, Y. and Croce, C. M.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 5214-5218, 1986)は既に報告されている。その翻訳領域の中で工夫をこらして選択を行った。まず、AAおよびCAから始まるターゲット配列よりGC含有量が45~55%の21塩基の候補配列42種を選択し、「GCの偏り」が比較的少ない配列8種に候補を絞った。続いて、この8種について、BLASTサーチによる類似配列の検索を行い、類似配列の少ないターゲットを選択し、かつその近傍二次構造解析結果を参考に、比較的立体障害の影響の少ないと想定できる5種を最終的に選択した。なお、この配列から出発して、ターゲット配列との相補性に影響の少ない置換、付加を行った配列は請求に含まれる。また、siRNAの3'末端に付加するオーバーハングの選択において、dTdT以外の2塩基についても請求に含まれる。

【0009】

2. siRNAによるbcl-2蛋白質の生合成抑制の効果判定について説明する。siRNAをbcl-2蛋白質を発現している細胞に投与し、所定時間後、細胞を回収、これを可溶化し、可溶化液中に含まれるbcl-2蛋白質を免疫生化学的に定量する。すなわち、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動後のウエスタンブロットィングそしてデンシトメーターによる定量が考えられる。抗bcl-2抗体は、市販品を使用する。

【0010】

【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) siRNAの作成を行った。ヒト bcl-2 の mRNA (GenBank Accession No. NM_000633: Tsujimoto, Y. and Croce, C.M.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 5214-5218, 1986) の翻訳領域および3'末端非翻訳領域から前述の配列選定法に基づいて設計した siRNA 5種を Dharmacon社に依頼し合成した。合成した siRNA duplex は図1に示す如くであり、各 siRNA の mRNA の標的部位は下記の如くである。

bcl-2 siRNA #1 (mRNA 標的部位: 塩基配列 654 番目から 672 番目; GACUCUGCUCAGUUUGGCC; GC含有量 52%)、
 bcl-2 siRNA #2 (mRNA 標的部位: 塩基配列 515 番目から 533 番目; ACAUCGCCCUGUGGAUGAC; GC含有量 52%)、
 bcl-2 siRNA #3 (mRNA 標的部位: 塩基配列 614 番目から 632 番目; GCAUGC GGCCUCUGUUUGA; GC含有量 52%)、
 bcl-2 siRNA #4 (mRNA 標的部位: 塩基配列 1443 番目から 1461 番目; GCUACCAAUUGUGCCGAGA; GC含有量 47%) bcl-2 siRNA #5 (mRNA 標的部位: 塩基配列 4081 番目から 4099 番目; AGACGCCACAUAUCUCUCC; GC含有量 47%)

【0012】

配列番号1 5' - (AA)GACUCUGCUCAGUUUGGCC - 3'
 配列番号2 5' - (CA)ACAUCGCCCUGUGGAUGAC - 3'
 配列番号3 5' - (CA)GCAUGC GGCCUCUGUUUGA - 3'
 配列番号4 5' - (AA)GCUACCAAUUGUGCCGAGA - 3'
 配列番号5 5' - (CA)AGACGCCACAUAUCUCUCC - 3'

【0013】

(実施例2) siRNAによる bcl-2 蛋白質生合成の抑制を検討した。bcl-2 蛋白質を発現しているヒト腎癌細胞 (ACHN, American Type Culture Collection; ATCC Number CRL-1611) 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% / MEM 培地 (MEM)] 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。あらかじめ、20 μM に濃度調整した bcl-2 siRNA #1, #2, #3, #4, #5 の各々をそれぞれ 5 μl とり、Opti-MEM 105 μl と混合し、プラス試薬 (インビトロジェン社) 10 μl を加え、よく混合し、室温で15分反応させた。さらに、リポフェクトアミン試薬 (インビトロジェン社) 4 μl を加え、室温で15分反応させ、siRNA・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1枚に投与可能な量である。続いてACHN細胞に新鮮なMEM 0.8ml を満たし、前述の siRNA・リポソーム処理液を 0.2ml を加えた後、37、4時間トランスフェクションを行った。このとき、siRNAの投与濃度は 100nM となる。10% FBS / MEM 1ml を加え、6時間培養した。細胞を MEM で洗浄し、新鮮なMEM 2ml を加え、さらに48時間培養を続けた後、細胞を可溶化した。調製した各細胞可溶化液を SDSゲル電気泳動 (SDS-PAGE) (12%ゲル, 30 μg protein/lane) した後、抗 bcl-2 抗体を用いたウエスタンブロットを行った。その結果を図2Aに示す。

レーン3および4に示す如く、bcl-2 siRNA #3 および bcl-2 siRNA #4 を投与することにより、bcl-2 蛋白質に特異的なバンドの減弱を認めた。各バンドの濃度をデンシトメータで測定したところ、無処理細胞のバンドを 100% とすると、bcl-2 siRNA #1 では 35%、bcl-2 siRNA #2 では 52%、bcl-2 siRNA #3 と bcl-2 siRNA #4 ではともに 3%、bcl-2 siRNA #5 では 39% のバンドの濃さであることが明らかとなった (図

2 B)。抗 - a c t i n 抗体による - a c t i n のイムノプロットも合わせて行い、各細胞可溶化液中の - a c t i n 含量に差がないことを示した (図 2 A)。

【 0 0 1 4 】

(実施例 3) b c l - 2 s i R N A による b c l - 2 蛋白質の生合成抑制の特異性を検討した。すなわち、実施例 2 において、強力な b c l - 2 蛋白質の生合成抑制を認めた b c l - 2 s i R N A # 3 のアンチセンス鎖をスクランブルにし、それに相補的な 2 本鎖 RNA (b c l - 2 s i R N A # 3 - S C R) を新たに合成し、陰性コントロールとして用いた。また、葉緑体ゲノム配列から選択した s i R N A も新たに合成し、哺乳類細胞に対する陰性コントロールとして用いた。なお、b c l - 2 s i R N A # 4 も b c l - 2 s i R N A # 3 とほぼ同等の b c l - 2 蛋白質の生合成抑制を示したが、標

10

的配列を 3 ' 末端非翻訳領域内から選出しているため、検討から除外した。すなわち、標的配列が翻訳領域内である b c l - 2 s i R N A # 3 を最終選択した。b c l - 2 蛋白質を発現しているヒト腎癌細胞 (A C H N) を実施例 2 で示した如く、3 5 m m ディッシュ (F A L C O N , 3 0 0 1) にまき、3 7 %、5 % C O ₂ 存在下で 1 晩前培養した。あらかじめ、2 0 μ M に濃度調整した b c l - 2 s i R N A # 3 等をそれぞれ 5 μ l とり、O p t i - M E M 1 0 5 μ l と混合し、プラス試薬 (インビトロジェン社) 1 0 μ l を加え、よく混合し、室温で 1 5 分反応させた。さらに、リポフェクトアミン試薬 (インビトロジェン社) 4 μ l を加え、室温で 1 5 分反応させ、s i R N A ・リボソーム処理液の調製を完了した。なお、上記調製量は 3 5 m m ディッシュで 1 枚に投与可能な量である。続いて A C H N 細胞に新鮮な M E M 0 . 8 m l を満たし、前述の s i R N A ・リボソーム処理液を 0 . 2 m l を加えた後、3 7 %、4 時間トランスフェクションを行った。このとき、s i R N A の投与濃度は 1 0 0 n M となる。1 0 % F B S / M E M 1 m l を加え、6 時間培養した。細胞を M E M で洗浄し、新鮮な M E M 2 m l を加え、さらに 4 8 時間培養を続けた後、細胞を可溶化した。調製した各細胞可溶化液を S D S ゲル電気泳動 (S D S - P A G E) (1 2 % ゲル , 3 0 μ g p r o t e i n / l a n e) した後、抗 b c l - 2 抗体を用いたウエスタンプロットを行った。その結果を 図 3 に示す。レーン 1 の b c l - 2 s i R N A # 3 においてのみ、b c l - 2 蛋白質の特異バンドが減弱した。レーン 2 の b c l - 2 s i R N A # 3 - S C R やレーン 3 の葉緑体ゲノムに対する s i R N A を投与しても、b c l - 2 蛋白質の発現は無処理 (レー

20

30

【 0 0 1 5 】

【 発明の効果 】

以上図示し説明したように本発明の s i R N A によってヒト b c l - 2 蛋白質の発現を強く抑制することが出来る。

【 0 0 1 6 】

【 配列表 】

< 1 1 0 > 村松 喬

< 1 2 0 > s i R N A を用いたヒト b c l - 2 蛋白質の発現の強い抑制。

< 1 3 0 > T M - 0 1 1

< 1 4 1 > 2 0 0 3 - 6 - ? ?

< 1 6 0 > 5

40

【 0 0 1 7 】

<210> 1
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<400> 1
aagacucugcucaguuuggcc 10

[0018]
<210> 2
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<400> 2 20
caacaucgcccuguggaugac

[0019]
<210> 3
<211> 21
<212> RNA
<213> Artificial Sequence 30
<220>
<400> 3
cagcaugcggccucuguuuga

[0020]
<210> 4
<211> 21
<212> RNA 40
<213> Artificial Sequence
<220>
<400> 4
aagcuaccaaauugugccgaga

[0021]

<210> 5
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <400> 5

caagacgcccaacaauucucucc

10

【0022】

【図面の簡単な説明】

【図1】この発明における、5種の bcl-2 siRNA duplex と2種のコントロール siRNA duplex の構造である。

【図2】この発明の一実施例に関わる、siRNAなどを投与したACHN細胞のヒト bcl-2 蛋白質の産生抑制を示し、Aはウエスタンブロットの図であり、BはAで検出した bcl-2 に特異的なバンドの濃さをデンシ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 siRNAなどを投与したACHN細胞のヒト bcl-2 蛋白質の産生抑制を示す。bcl-2 siRNA #3による bcl-2 蛋白質の産生抑制がその塩基配列に特異的であることを示す。

【図1】

bcl-2 siRNA #1
 GACUCUGCUCAGUUUGCCdTdT
 dTdTUCGAGACGAGUCAACCGG

bcl-2 siRNA #2
 ACAUCGCCUCUGGGAUGACdTdT
 dTdTUGUAGCGGACACCUACUG

bcl-2 siRNA #3
 GCAUGCGCCUCUGUUUGAdTdT
 dTdTTCGUACGCCGGACAAACU

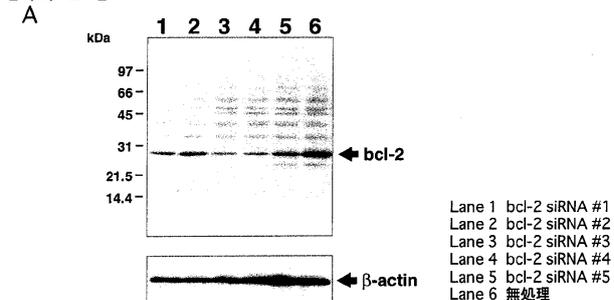
bcl-2 siRNA #4
 GCUACCAUUGUGCCGAGAdTdT
 dTdTTCGAUGGUUACACGGGUCU

bcl-2 siRNA #5
 AGACGCCAACAUUCUCdTTdT
 dTdTUCUGCGGUUGAAGAGAGG

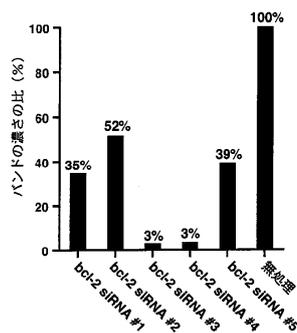
bcl-2 siRNA #3-SCR
 UUGAGCGCUGUGCCUGAUdTdT
 dTdTAAACUCGCGACACGGAGCUA

siRNA for chloroplast genome
 GCGCGUUUGUAGGAUUCGdTdT
 dTdTTCGCGGAAACAUCUAAGC

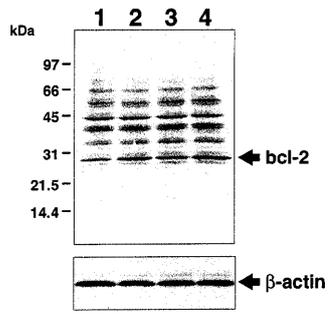
【図2】



B



【 図 3 】



Lane 1 bcl-2 siRNA #3
Lane 2 bcl-2 siRNA #3-SCR
Lane 3 siRNA for chloroplast genome
Lane 4 無処理

フロントページの続き

(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 2 8 4 5 - 1 6 1

Fターム(参考) 4B024 AA01 CA11 DA03 GA13 GA18 HA11