

平成21年 4月17日現在

研究種目：基盤研究 (S)

研究期間：2006～2010

課題番号：18109001

研究課題名 (和文) ヌクレアーゼ抵抗性修飾核酸を搭載した多機能性ナノ構造体による  
新規核酸医薬の創製研究課題名 (英文) Development of multifunctional envelope-type nano device encapsulating highly  
nuclease resistant oligonucleotides

研究代表者

松田 彰 (MATSUDA AKIRA)

北海道大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号：90157313

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：ゲノム創薬、ヌクレアーゼ抵抗性、RNA 干渉、薬物送達システム、4'-チオ核酸、  
siRNA、miRNA

## 1. 研究計画の概要

エキソおよびエンドヌクレアーゼ抵抗性核酸の化学合成、ヌクレアーゼ抵抗性核酸の酵素合成とショートヘアピン RNA (shRNA) およびアプタマーを発現するヌクレアーゼ抵抗性核酸ベクターの創出、および、それらの核酸誘導体を細胞質や核に十分量到達させるためのナノキャリア (多重型 MEND) を開発する。

## 2. 研究の進捗状況

(1) 標的細胞内外に存在するヌクレアーゼで分解されにくい (特にエンドヌクレアーゼ)、標的と熱的に安定な複合体を形成する、配列特異的および標的特異的な作用を示す糖部修飾核酸の開発研究を行った。2'-置換-4'-チオヌクレオシドを中心に誘導体合成を行った。2'-OMe 体を含む RNA (MeSRNA) は、DNA よりも RNA に対して熱的に安定な二本鎖を形成した。また、MeSRNA は 50% ヒト血漿中での半減期が 27 時間となり、天然型 2'-OMeRNA よりも 3.6 倍安定であった。MeSRNA はエンドヌクレアーゼでは分解されずにむしろ 3'-エキソヌクレアーゼでゆっくりと分解された。合成の容易さや他の性質の優位性から化学合成する siRNA には MeSRNA を使用することにした。さらに、2'-OMe-4'-セレノピリミジンヌクレオシドの合成およびそれらを含む RNA (MeSeRNA) の合成に成功し、それらは MeSRNA よりも 50% ヒト血漿中でさらに 2.5 倍安定であった。しかし、RNA への導入効率の改善がさらに必要である。

(2) 4'-チオ TTP (dTTP) および 4'-チオ CTP (dSCTP) は dATP, dGTP 存在下 KOD dash DNA ポリメラーゼを用いて効率よく DNA 中 (87mer) に取り込まれた。この酵素合成した 4'-チオ DNA 二本鎖から天然型 NTP 存在下 T7RNA ポリメラーゼで 87mer の RNA に転写できた。一方、ホタルルシフェラーゼ GL3 に対する shRNA を含む 300 塩基対のベクターを上記の PCR で酵素合成し、NIH3T3 細胞にトランスフェクトし RNAi 効果を調べた。4'-チオ DNA 二本鎖も天然型 DNA 二本鎖を用いた場合と同程度の RNAi 効果が観察されたことから、ヒト細胞中でも 4'-チオ DNA 二本鎖は RNA ポリメラーゼによる転写を受けていることが明らかになった。

(3) トランスフェリン修飾した MEND のエンドソーム脱出を促進するために pH-感受性膜融合ペプチドである GALA を導入することで、遺伝子発現を飛躍的に向上させることに成功した。また、siRNA の送達に関しては、R8-MEND に siRNA を搭載する方法を確立した。さらに、肺の血管内皮細胞を選択的に認識するペプチドリガンド (IRF) を見いだした。IRF で MEND の表面修飾を行ない、siRNA を搭載すると、効率的に遺伝子発現を抑制することが明らかになった。また、遺伝子発現の細胞間ヘテロジェネイティーの原因を解析した結果、細胞分裂に起因したヒストン蛋白の重要性が示唆された。さらに、遺伝子デリバリーにおけるウイルスベクターと非ウイルスベクターの遺伝子発現効率の差に関しても遺伝子翻訳過程に大きな差があることを見出した。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

当初の予定通り、1) 2'-O-メチル-4'-チオリボヌクレオシドを含む核酸 (MeSRNA) が優れたエンドヌクレアーゼ抵抗性を示し siRNA として使用できることを見出し、2) 2'-dSTTP と 2'-dSCTP や 2'-FSCTP が KOD dash DNA ポリメラーゼの基質になり PCR プロダクトが得られ、4'-SDNA (2'-dST と 2'-dSC を含む DNA) を含むプラスミドを NIH3T3 細胞にトランスフェクトすると、天然型 DNA を含むプラスミドとほぼ同等のホタルルシフェラーゼ GL3 に対する RNAi 効果が得られたことを見出した。さらに、3) プラスミドや siRNA を搭載する MEND についても R8-MEND、トランスフェリン修飾 MEND、GALA 修飾 MEND などが開発され、従来よりも高い細胞内取り込みを示した。

### 4. 今後の研究の推進方策

(1+3) siRNA の修飾様式および RISC への取り込みの最適化と、それらを搭載した MEND のがん細胞を標的にする in vitro および in vivo 実験。

(2)天然型 DNA テンプレート・4'-チオ DNA テンプレートを用いる 4 種類の 4'-チオ NTP による DNA 鎖・チオ DNA 鎖伸張反応および、PCR への展開。細胞中での shRNA の発現と RNAi 効果の増強。

### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 26 件) (すべて査読あり)

1) Takahashi, M.; Minakawa, N.; Matsuda, A. Synthesis and characterization of 2'-modified-4'-thioRNA: a comprehensive comparison of nuclease stability. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37, 1353-1362.

2) Matsugami, A.; Ohyama, T.; Inada, M.; Inoue, N.; Minakawa, N.; Matsuda, A.; Katahira, M. Unexpected A-form formation of 4'-thioDNA in solution, as revealed by NMR, and the implication on the mechanism of nuclease-resistance. *Nucleic Acids Res.* 2008, 36, 1805-1812.

3) Minakawa, N.; Sanji, M.; Kato, Y.; Matsuda, A. Investigations toward the selection of fully-modified 4'-thioRNA aptamers: optimization of in vitro transcription step in the presence of 4'-thioNTPs. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 9450-9456.

4) Inoue, N.; Shionoya, A.; Minakawa, N.; Ogawa, N.; Matsuda, A. Amplification of 4'-thioDNA in the presence of 4'-thio-dTTP and

4'-thio-dCTP, and 4'-thioDNA-directed transcription in vitro and in mammalian cells. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 15424-15425.

5) Nakamura, Y.; Kogure, K.; Futaki, S.; Harashima, H. Octaarginine-modified multi-functional envelope-type nano device for siRNA. *J. Cont. Rel.* 2007, 119, 360-367.

6) Inoue, N.; Minakawa, N.; Matsuda, A. Synthesis and properties of 4'-thioDNA: unexpected RNA-like behavior of 4'-thioDNA. *Nucleic Acids Res.* 2006, 34, 3476-3483.

[学会発表] (招待講演、国際学会のみ)

(計 9 件)

1) 松田 彰、加藤優佳、三次未央子、高橋真由美、南川典昭「核酸化学からアプタマーへ：ヌクレアーゼ抵抗性の化学的調節」2008, 6, 29 第 18 回日本サイトメトリー学会「サイトメトリーシステムの未来を考える (1) アプタマーは抗体を越えるのか? (東京慈恵医科大学)

2) 松田 彰「核酸化学から創薬へ」2007, 6, 27 先端融合領域イノベーション創出拠点形成「未来創薬・医療イノベーション拠点形成」事業、第3回未来創薬・医療イノベーションシンポジウム-未来創薬から医療への架け橋- (北海道大学)

[図書] (計 4 件)

1)南川典昭, 松田 彰、スーパー核酸：4'-チオ核酸の合成から核酸医薬開発に向けた基礎研究の展開，化学フロンティア「創薬をめざす有機合成戦略：進化する医薬品づくり」，穴戸宏造、新藤充編，pp157-164，化学同人 (2007 年)

2) 松田 彰，南川典昭、核酸医薬の創製をめざして：「バイオとナノの融合II，新生命科学への応用」，北海道大学 COE 研究成果編集委員会編，pp187-198，北海道大学 (2007 年)

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

1) 4'-セレノヌクレオシド及び 4'-セレノヌクレオチド、松田 彰，南川典昭，稲垣勇典 (北海道大学) 特願 2007-032111 出願日 2007 年 2 月 13 日

2) shRNA 発現用 DNA カセット、松田 彰，南川典昭，塩野谷亜紀，尾川直樹、(北海道大学) 特願 2007-298097 出願日 2007 年 11 月 16 日

[その他]

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/org/yakka01.html>