

平成21年 6月19日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2006～2008
 課題番号： 18710173
 研究課題名 (和文) RNA 認識ペプチドを用いた合成 siRNA の新規デリバリーシステムの開発
 研究課題名 (英文) Research for Nano-switch delivery system of siRNA
 研究代表者
 児玉 耕太 (KODAMA KOTA)
 福岡大学・薬学部・助教
 研究者番号： 90419424

研究成果の概要： siRNA に同じ標的 mRNA に結合能を持つような特殊なペプチドをリンカーでつなぐことによって、標的である mRNA の近くにおいて siRNA が放出されるような Delivery System の開発を行い、システムの構築を目指した。この結果、ナノスイッチ型 siRNA と名付けたペプチド-siRNA の合成法の確立に成功し、siRNA 単独とほぼ同程度の遺伝子抑制活性を得ることができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	1,000,000	0	1,000,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	300,000	3,700,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：siRNA、DDS、感染症

1. 研究開始当初の背景

siRNA (small interfering RNA) は、低濃度でも効果が期待でき、mRNA を破壊するだけで、ゲノム遺伝子には全く影響を及ぼさないことが知られているため、その臨床応用が盛んに試されているが、生体の分解酵素による分解やデリバリー上の問題点から、その応用は眼内注射と言う特殊な投与経路に留まっている。また、現在、siRNA をコードするプラスミドを用いた遺伝子導入法やオリゴ核酸誘導体を用いた RNAi が試されているが、その実現には標的に到達させるための

Delivery System が不可欠となっている。現在までに知られているようなキャリアーはいずれも高分子化合物を利用したものであり、siRNA 一分子をデリバリーするものは未だ実現していない。類似なものには、siRNA を PEG などで修飾し分解耐性を上げる、もしくは核酸誘導体を用いた siRNA 誘導体などが報告されているが、根本的な解決になっていないのが、現状である。このため、siRNA が標的の存在する細胞へ到達するまでは、分解酵素などをブロックし、一旦標的細胞に取り込まれれば、標的である mRNA の近くに

において siRNA が放出されるようなインテリジェントな Delivery System が開発できればその臨床応用も実現味を帯びてくる。

2. 研究の目的

本研究ではすでに「KAN システム」により検出されている RNA 結合ペプチドである HIV の Rev responsive element (RRE) RNA に結合するペプチド (RRE 結合ペプチド) と HCV mRNA の 3'X-tail SL2 領域に結合するペプチドの 2 種類を用いて、siRNA とのコンジュゲート“ナノスイッチ型 siRNA”を合成し、評価に用いる。

この“ナノスイッチ型 siRNA”は“OFF”の際は RNA 結合ペプチドがカチオン、siRNA はアニオンに帯電しているため、静電的な複合体を組むことで分解酵素などの接近を阻害する。そして、標的に接近すると静電的な複合体が解消され、それぞれが互いの標的に結合し (“ON”の状態)、siRNA 単体よりも HIV を特異的に破壊することが期待される。このシステムを HIV や HCV において構築することができれば、配列特異的に RNA に結合するペプチドは、「KAN システム」により、検出が可能であるため、他の様々な疾患に関与する構造 RNA を認識することができるよう設計が可能である。

3. 研究の方法

①ナノスイッチ型 siRNA の合成法

まずナノスイッチ型 siRNA の合成法の合成法を確立する。

(1)ナノスイッチ型 siRNA の構造

siRNA の Antisense 鎖のみを修飾

出発原料

①siRNA antisense の 5'末端にアミノ基修飾を入れる。この際、リン酸エステルを介したアミノリンカーを用いる。リンカーは反応効率の高い ssH (EC-Amino linker)を使用。また、アミノ化 ssRNA を HPLC で高純度精製しておく。

②PEG リンカー: PIERCE の PCC 22102、PCC 22104、PCC 22108、PCC 22112 等を使用。

③RNA 結合ペプチドを C 末端システイン修飾体

(2)合成法

・ siRNA antisense とリンカーとのカップリング反応

siRNA 743.8uM	10ul
NHS-PEO4-maleimide linker 50mM	15ul
PBS (pH=7.2)	23ul
DMF	2ul
Total	50ul

Incubate at R.T. (o/n, about 12h)

反応終了後、PAGE 精製。ssH と NHS との

カップリング効率は 95%以上と予想されるため、ssRNA とリンカーのカップリング後はゲルろ過精製のみにとどめ、PAGE でカップリングチェックを行う。

切り出し抽出後、濃度測定。精製品を次の反応に使用。

PAGE 精製 (22% denaturing gel 使用)

・ゲルろ過精製 + PAGE チェック

8M Urea 60ul に溶解し apply。

Run 450V, R.T. (1.5h)

バンドは若干上にシフト。ほぼ原料の siRNA と同程度の泳動度。

ゲル切り出し後、潰して 0.4M NaOAc 600ul を加えて攪拌抽出。(o/n)

抽出後、フィルター濾過後、エタノール沈殿。

15000rpm, 4°C, 5min

上清を 500ul 取り、100%EtOH を 1ml 加え 4°C

15000rpm, 4°C, 15min

上清を除いて、70%EtOH 500ul でリンス。

15000rpm, 4°C, 5min

上清を除いて凍結乾燥 or 遠心乾燥。

・リンカー付 siRNA とペプチドのカップリング反応

RNA+linker(80uM) 10ul

C terminal Cys peptide(10mM in aq.) 0.8ul

10mM Sodium Phosphate Buffer (pH= 7.0) 6.7ul

Total 17.5ul

Incubate at R.T. (o/n)

反応終了後、

反応終了後、PAGE 精製。

バンドはかなり上方シフト。切り出し後、上記と同様の方法で精製後、濃度測定 & 乾燥。

・annealing

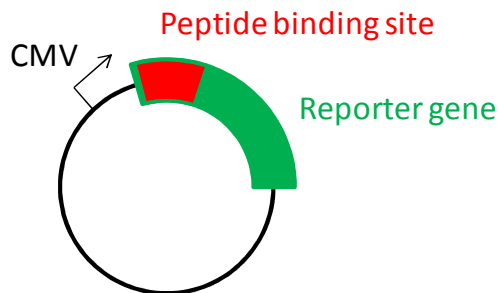
MALDI-TOF-MS を用いて、複合体の分子量を測定し、合成の完了を確認する。

②レポーター遺伝子を用いた“ナノスイッチ型 siRNA”の性能評価モデル系の構築

RNA 結合ペプチドの下流にレポーター遺伝子を導入したプラスミドを構築し、モデル評価系を作成する。レポーター遺伝子に EGFP を使用する。このプラスミドを pDsRed とともに HepG2 cell に導入し、そこへ試験を行う siRNA を処理することにより、遺伝子抑制効果の評価を行う。EGFP に対する siRNA は以下の 2 つが良く知られているが、最短でも構造 RNA より 120bp 離れているため、より近い部位の siRNA が必要な場合は、再設計を行い、遺伝子抑制効果の確認できたものについて使用する。

ペプチドの結合するステムループは、現在までに結合が確認できている HIV mRNA 及び HCV mRNA 中のステムループを発現する配列を導入する。

遺伝子抑制効果の評価は、経時的な蛍光観察が可能なキーエンス社の Biozero を用いて、EGFP と DsRed の蛍光比から RNAi の効果を見積もることにより行う。



“ナノスイッチ型 siRNA” 評価モデル

③ “ナノスイッチ型 siRNA” のリンカー長及び siRNA の認識部位を変えたコンビナトリアル合成

現在までに “ナノスイッチ型 siRNA” の合成法は①に示すように確立している。この合成法を活用して、ペプチドを 2 種類 (HIVmRNA 結合ペプチド、HCVmRNA 結合ペプチド) リンカー 4 種類、siRNA 3 種類 (活性体 2 種 + siRandom) の組み合わせにより、コンビナトリアル合成を行う。合成目標数は以下の 18 種類とする。

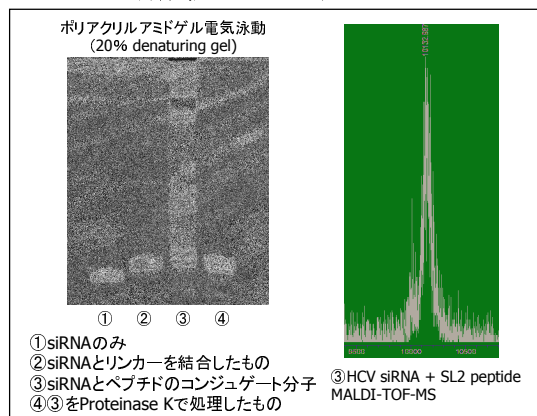
組合せID#	siRNA	Linker code	Peptide	
1	siRandom	22102	HIV	
2			HCV	
3	siEGFP-120	22102	HIV	
4			HCV	
5		22104	HIV	
6			HCV	
7		22108	HIV	
8			HCV	
9		22112	HIV	
10			HCV	
11		siEGFP-441	22102	HIV
12				HCV
13			22104	HIV
14				HCV
15	22108		HIV	
16			HCV	
17	22112	HIV		
18		HCV		

④ “ナノスイッチ型 siRNA” 設計法の確立
③で合成した “ナノスイッチ型 siRNA” を②で構築したモデル評価系を用いて遺伝子抑制能を評価し、構造活性相関を行う。HIVmRNA 結合ペプチドは HCVmRNA 結合ペプチド標的ステムループには結合しないため、HIVmRNA 結合ペプチドの Negative control には HCVmRNA 結合ペプチドを使

用する。また、逆も同様である。ここで重要となるのは、ペプチドの標的である構造 RNA(1) から siRNA の認識配列(2) までの距離であると考えられる。一般的に RNA 一塩基の長さは 3 Å 程度であると言われているため、今回使用する EGFP-120 でも 120bp と (1) から (2) までの距離は 300 Å 超となり、最も長いリンカーでも届かない可能性がある。届かない場合は siRNA の配列をより近いものに変える、より長いリンカーを使用する等の対処を行うが、mRNA も溶液中ではリニアではないと考えられるため、実際に使用する遺伝子についてモデル評価系を用いて評価する必要があると考えている。その意味でも①のモデル評価系の構築は重要である。

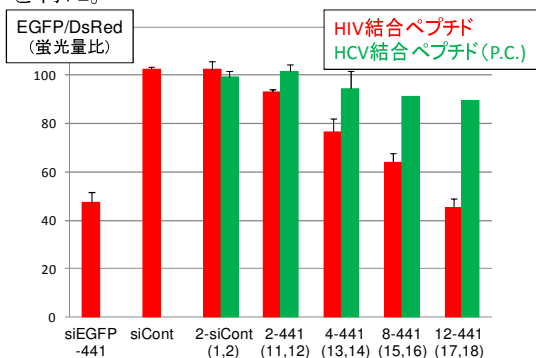
4. 研究成果

まず、3. 研究方法の①のナノスイッチ型 siRNA の合成法について記す。



上記のように RNA 結合ペプチドが siRNA にコンジュゲートした分子は、ゲル上で上にシフトし、そのバンドを切り出して MALDI-TOF-MS 測定を行ったところ、右図のように siRNA にペプチドが結合した分子の分子イオンピークが確認できた。このことが “ナノスイッチ型 siRNA” の合成法が確立できたことを示している。

この “ナノスイッチ型 siRNA” の合成法を用いて③で設定した 18 種類の “ナノスイッチ型 siRNA” を合成し、②のモデル評価系を用いて評価を行ったところ、以下のような結果を得た。



この結果、は siRNA 単体と遺伝子抑制活性はかわらないものの、リンカー長に依存して遺伝子抑制活性の増強が認められたことを示している。今回の siRNA の標的はペプチドの標的から 441bp と離れた所にあるため、今後はより近いところを標的とする siRNA を使用するなどの改善を行う予定である。

5. 主な発表論文等

(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 8 件)

1. Nishioku T., Dohgu S., Takata F., Eto T., Ishikawa N., Kodama KB., Nakagawa S., Yamauchi A., Kataoka Y., Detachment of brain pericytes from the basal lamina is involved in disruption of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in mice, *Cell Mol Neurobiology*, *Cell Mol Neurobiol* (2009), 29, 309-316 査読有

2. Kodama KB., Watanabe T., Kishi N., Ishibashi M., Kataoka Y., Structural Optimization of the Antimicrobial peptide agent Omigard™ by increasing its activity as a surfactant and the α -helical structure ratio, *Peptide Science* (2009), 209-210 査読有

3. Asai D., Kodama KB., Shoji Y., Nakashima H., Kawamura K., Oishi J., Kuramoto M., Niidome T., Katayama Y., Drug Delivery System Based on Responses to an HIV Infectious Signal, *Medicinal Chemistry*, (2008), 4, 386-391 査読有

4. Kuwata K., Nishida N., Matsumoto T., Kamatari YO., Hosokawa-Muto J., Kodama K., Nakamura HK., Kimura K., Kawasaki M., Takakura Y., Shirabe S., Takata J., Kataoka Y., Katamine S., Hot spots in prion protein for pathogenic conversion, *PNAS*, (2007), vol. 104, 11921-11926 査読有

5. 山口圭一、松本友治、児玉耕太、岸直人、桑田一夫、「プリオン病の発症と伝播機構」*細胞工学* 26(2) (2007) 151-155

6. Kodama K., et al: The Features and Shortcomings for Gene Delivery of Current Non-viral Carriers, *Current Medicinal Chemistry*, (2006), 13, 1979-1985 査読有

7. Shoji Y., Kodama K., et al: Drug delivery

system based on responses to intracellular signals in infectious cells. *Drug Delivery System* (2006), 21, 5 査読有

8. Oishi J., Kawamura K., Kang JH, Kodama K., et al: An intracellular kinase signal-responsive gene carrier for cell-specific gene therapy, *J. Control. Release* (2006), 110, 431-436. 査読有

[学会発表] (計 13 件)

1. 児玉耕太、渡辺拓也、岸直人、石橋正也、片岡泰文、院内感染防止用抗菌ペプチドの構造最適化、第 45 回ペプチド討論会 (東京)、2008 年 10 月 29 日

2. Nakamura HK., Kanamoto T., Kodama KB., Nakashima H. and Kuwata K., Small anti-HIV compounds found with in silico screening and MTT assay., CBI 学会 2008 年大会 (東京)、2008 年 10 月 22 日

3. 児玉耕太、神田英里、渡辺拓也、武藤淳二、鎌足雄司、松本友治、中村寛則、西田 教行、桑田一夫、片岡泰文、Design of anti-prion chemical chaperon、Prion Symposium 2008(サホロ)、2008 年 8 月 29 日

4. 神田英里、廣田剛、児玉耕太、武藤淳二、鎌足雄司、松本友治、中村寛則、西田教行、桑田一夫、片岡泰文：抗プリオン活性をもつケミカルシャペロンの構築、第 81 回 日本薬理学会年会 (横浜)、2008 年 3 月 17 日

5. 廣田剛、神田英里、児玉耕太、武藤淳二、鎌足雄司、松本友治、中村寛則、西田教行、桑田一夫、片岡泰文：抗プリオン効果を示すケミカルシャペロンの開発、日本薬学会 第 128 年会 (横浜)、2008 年 3 月 27 日

6. 山口圭一、松本友治、児玉耕太、桑田一夫、「マウスプリオン蛋白質のアミロイド原性ペプチドに関する研究」、第 45 回日本生物物理学会年会 (パシフィコ横浜)、2007 年 12 月 23 日

7. 原田枝理子、高田美友子、湧川朝也、西奥剛、角典子、児玉耕太、山内淳史、中川慎介、首藤英樹、丹羽正美、片岡泰文、アドレノメデュリンによる脳血管周皮細胞ペリサイトの弛緩作用-脳微細循環調節機構の解明を目指して、第 60 回日本薬理学会西南部会 (宮崎)、2007 年 11 月 22 日

8. K. Kuwata, N. Nishida, T. Matsumoto, Y. Kamatari, K. Kodama, J-H. Muto, H. Nakamura,

K. Kimura, M. Kawasaki, Y. Takakura, S. Shirabe, J. Takata, Y. Kataoka and S. Katamine

"A Hot Spot in Prion Protein for Pathogenic Conversion.", The 21st Annual Symposium of The Protein Society (2007.7.24 the Boston Marriott Copley Place, USA)

9. 鎌足雄司、武藤(細川)淳二、西田教行、松本友治、児玉耕太、中村寛則、桑田一夫、「正常型プリオン蛋白質とその構造を安定化する低分子化合物の同定」、2007年プリオン研究会(ニュー・グリーンピア津南)、2007年8月25日

10. 鎌足雄司、松本友治、西田教行、武藤(細川)淳二、児玉耕太、中村寛則、桑田一夫、「正常型プリオン蛋白質とその構造を安定化する低分子化合物の結合部位の同定」、第7回日本蛋白質科学会年会(仙台国際センター)、2007年5月24日

11. 武藤(細川)淳二、西田教行、鎌足雄司、児玉耕太、松本友治、中村寛則、桑田一夫、「正常型プリオン蛋白質の構造を安定化する低分子化合物の同定とその治療効果」、第143回日本獣医学会学術集会(つくば国際会議場エポカルつくば)、2007年4月4日、ベストプレゼンテーション賞受賞

12. 吉見陽児、鎌足雄司、松本友治、マークスワソ、児玉耕太、戸田年総、桑田一夫、DPI(二面偏波式干渉法)によるプリオンタンパク質-金属イオン相互作用の解析、日本分析化学会第55年会、大阪、2006年9月20日

13. 鎌足雄司、吉見陽児、松本友治、児玉耕太、桑田一夫、2006年プリオン研究会、プリオンタンパク質に対する二価金属イオンの結合、2006年9月2日

[図書](計1件)

1. 赤穂奈美、加留部善晴、楠田真理子、児玉耕太、塩井誠次郎、高田二郎、松永和久、薬学における放射線・放射性物質の利用、2008年9月5日、京都廣川書店

[産業財産権]

○出願状況(計4件)

1.

名称: ペプチド
発明者: 児玉耕太、西奥剛、片岡泰文、安高勇気、石橋正也、岸直人、渡辺拓也
権利者: 福岡大学

種類: PCT/JP

番号: 2009/61164

出願年月日: 平成21年6月19日

国内外の別: PCT

2.

名称: ヒト免疫不全ウイルスの増殖阻害剤
発明者: 児玉耕太、金本大成、中村寛則、中島秀喜、寺久保繁美、桑田一夫
権利者: 聖マリアンナ医科大学
種類: 特願
番号: 2008-226642
出願年月日: 平成20年9月4日
国内外の別: 国内

3.

名称: ペプチド
発明者: 児玉耕太、西奥剛、片岡泰文、安高勇気、石橋正也、岸直人
権利者: 福岡大学
種類: 特願
番号: 2008-162214
出願年月日: 平成20年6月20日
国内外の別: 国内

4.

名称: プリオンタンパク質構造変換抑制剤
発明者: 桑田一夫、木村公則、鎌足雄司、松本友治、中村寛則、高田二郎、西田教行、片峰茂、片岡泰文、児玉耕太
権利者: 岐阜大学、福岡大学、長崎大学
種類: 特願
番号: 2007-178247
出願年月日: 平成19年7月6日
国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

児玉耕太 (KODAMA KOTA)
福岡大学・薬学部・助教
研究者番号: 90419424

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし