

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：34401
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2019～2021
課題番号：19K05702
研究課題名（和文）プロドラッグ型siRNAを用いたホモ接合体家族性高コレステロール血症治療薬の開発

研究課題名（英文）Design of siRNA-based prodrug-type therapeutics for familial hypercholesterolemia

研究代表者
浦田 秀仁（Urata, Hidehito）
大阪医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80211085
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：代表者が開発した還元的环境下で活性化するプロドラッグ型RNA（REDUCT RNA）を用いて、家族性高コレステロール血症に対するApoB-siRNAの設計を行なった。REDUCT RNAを搭載する部位を合理的に設計する目的で、ApoB-siRNAの血清中で分解hotspotの同定、及び既存の非プロドラッグ型2'-OMe修飾によるApoB-siRNAの活性低下部位のマッピングを行なった。これらの結果に基づき設計したREDUCT ApoB-siRNAのin vitro細胞実験では、REDUCT修飾がプロドラッグとして有効に機能し、2'-OMe修飾に対する明らかな優位性を示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ApoB-siRNAの血清中で分解hotspotの同定の方法論を確立できたことは、今後のsiRNAの化学修飾を行う際の指針となるものと考えている。また、既存の非プロドラッグ型2'-OMe修飾によるApoB-siRNAの活性低下部位のマッピングの結果と組み合わせることで、化学修飾を要する部位のうち、従来の非プロドラッグ型修飾が許容される部位とプロドラッグ型修飾が不可欠な部位の区別ができ、またその有用性を実験的に示すことができたことは、siRNAの化学修飾にプロドラッグ型修飾が果たせる役割を示せた結果であり、今後の実用化に向けての発展が期待できる。

研究成果の概要（英文）：ApoB-siRNA for familial hypercholesterolemia was designed using the originally developed prodrug-type RNA (REDUCT RNA) activated in a reducing environment. To design modification sites with REDUCT RNA, identification of degradation hotspots of ApoB-siRNA in the serum and mapping of sites that reduce the activity of ApoB-siRNA by non-prodrug type 2'-OMe modification were performed. REDUCT ApoB-siRNA designed based on these results showed that REDUCT modifications functioned effectively as a prodrug and showed a distinct superiority over 2'-OMe modifications in vitro experiments.

研究分野：核酸化学

キーワード：核酸医薬 siRNA プロドラッグ型 還元環境 家族性高コレステロール血症

1. 研究開始当初の背景

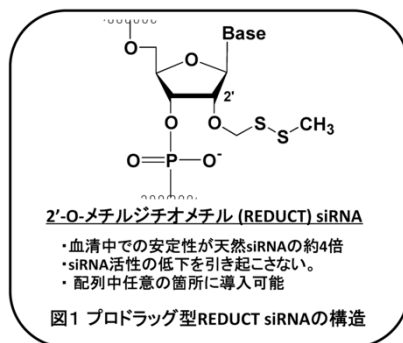
ホモ接合体家族性高コレステロール血症 (FH) は、低比重リポ蛋白(LDL) 受容体およびその関連遺伝子の変異により高 LDL 血症を引き起こし、心筋梗塞などを誘発する遺伝性の難病であり、ホモ接合体 FH の治療法の開発は喫緊の課題である。現在ホモ接合体 FH に対する有効な治療法は存在せず、スタチンの内服治療や LDL を血液中から除去する LDL アフェレーシスを行うことが一般的であるが、これらの治療法はホモ接合体 FH に対して効果が不十分であることや身体的負担が大きいなどの問題を抱えており、ホモ接合体 FH に対して十分な効果を発揮する新規治療薬の開発が強く望まれている。

動脈硬化惹起性リポ蛋白 LDL の構成成分であるアポリポ蛋白 B (apoB) の発現を抑制することで LDL などの産生そのものを抑制可能であることから、apoB は LDL 取り込み能に問題を有するホモ接合体 FH の根本的治療におけるターゲット分子として注目されている (1,2)。近年 apoB の発現を選択的に抑制するアンチセンス核酸 (AON) である Mipomersen がホモ接合体 FH 治療薬として上市されたが (3)、副作用対治療効果は低く、高用量の投与に伴う副作用の発現や高額の治療費など様々な問題を抱えている。それらの問題を踏まえ、AON よりも低用量で優れた効果が期待できる siRNA を利用した核酸医薬の開発が求められていた。

siRNA は、その一方の鎖であるアンチセンス鎖が Argonote 2 蛋白質との複合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) を形成し、アンチセンス鎖と相補的な配列をもつ mRNA を触媒的に切断・分解するものである。その高い遺伝子発現抑制活性の反面、生体内での不安定性が siRNA 創薬のボトルネックになっており、長年その改善に注力がなされ様々な修飾核酸が開発されてきた。例えば Alnylam 社が報告している apoB をターゲットとした siRNA では、siRNA 中のセンス鎖、アンチセンス鎖それぞれに複数の 2'-OMe 修飾を施すことで、生体内での安定性を高めている (4)。一方でこれらの修飾は、siRNA 中の修飾位置によっては RNAi 活性の低下を引き起こすことも知られており、トランスサイレチン型家族性アミロイドーシス治療薬である Patisiran は、体内での安定性向上のために lipid nanoparticle (LNP) による DDS 戦略を採用しながらも、センス鎖には 19 残基中 9 残基に 2'-OMe 修飾が施されているが、RISC を形成し標的 mRNA の配列認識に関わるアンチセンス鎖には 19 残基中 2 残基しか修飾が施されていない。これは siRNA、特にアンチセンス鎖の化学修飾により RISC の形成が阻害されることを強く示唆しており (5)、従来の修飾による安定性向上には一定の限界がある。

2. 研究の目的

代表者は siRNA 活性の低下を引き起こさず、生体内での安定性を向上させることの可能なプロドラッグ型 2'-O-メチルジチオメチル修飾 siRNA の開発を行ってきた (図 1)。これは、細胞内で高濃度に存在するグルタチオンにより形成される還元的環境で、ジスルフィド結合が開裂し、生成するチオヘミアセタールが自発的に脱離し天然型 RNA に変換されるもので、代表者はこの新規プロドラッグ型 siRNA を Reducing-Environment-Dependent Uncatalyzed Transforming siRNA (REDUCT siRNA) と名付けた (図 1) (6)。これまでの検討で REDUCT siRNA は血清中で優れた安定性を示すこと、2'-OMe-siRNA よりも REDUCT-siRNA は強い siRNA 活性を有し、修飾位置を選ばないことを明らかにした (7)。



本研究は、プロドラッグ型 REDUCT siRNA を用いて、ホモ接合体 FH に対する新規治療薬の開発を目的とする。REDUCT siRNA を用いることで、従来型修飾基では修飾不可能であった部位でも REDUCT 修飾は導入可能であり、本修飾により siRNA の生体内安定性の向上と高活性の両立が期待され、低用量、低毒性の siRNA 創薬及び naked DDS が可能となることが想定される。本研究では apoB を標的とした REDUCT siRNA を設計、評価し in vivo で有効な ApoB-siRNA の開発を目的とした。

3. 研究の方法

Soutschek らが報告している apoB mRNA に対する siRNA 配列を基に (8)、プロドラッグ型 REDUCT 修飾 ApoB-siRNA の開発にあたり、現時点の REDUCT 修飾 RNA 合成技術では 20mer 程度の RNA 鎖中に数塩基の導入が限界であることから、REDUCT 修飾の搭載部位を合理的にデザインする戦略を採ることとし、下記の点について検討を行なった。

1) 血清中での endonuclease による分解 hotspot の同定

アンチセンス鎖の 5'、3'-いずれかの末端を蛍光標識した ApoB-siRNA を用いて血清 (10% FBS) 中で分解反応を行い、分解物を native PAGE で分析し、血清中 endonuclease による分解 hotspot の同定を行った。

2) 既存の化学修飾による ApoB-siRNA の活性低下を引き起こす部位のマッピング

ApoB-siRNA のアンチセンス鎖を 3 残基連続で 2'-OMe 修飾した ApoB-siRNA を網羅的に合成し、HuH-7 細胞に CEM 法 (9) によりトランスフェクションし (5~10 nM, 37 °C, 24 h)、RT-qPCR により apoB mRNA を定量することで、in vitro における apoB mRNA 発現抑制活性を評価し、化学修飾により KD 活性低下が引き起こされる部位の同定を行った。また、センス鎖についても同様に検討を行い、2'-OMe 修飾により apoB mRNA 発現抑制活性に影響が出る領域の同定を行った。

3) REDUCT ApoB-siRNA の設計及び評価

1) および 2) の結果から、血清中での分解 hot spot のうち、既存の化学修飾では siRNA 活性にほとんど影響がない部位には 2'-OMe 修飾を、既存の化学修飾では siRNA 活性に強く影響が現れる部位には REDUCT 修飾を行い、さらに肝臓へのターゲティングが可能になる GalNAc (N-アセチルガラクトサミン) 修飾 (10) をセンス鎖の 3'-末端に施した REDUCT ApoB-siRNA を設計、合成し (11)、in vitro 及び in vivo での評価を行った。

4) 病態モデルマウスを用いた in vivo 予備実験

C57BL/6J マウスに 5 mg/kg~20 mg/kg で siRNA を皮下投与し、3 日後解剖し血清、肝臓を採取した。Quick Gene で肝臓組織から total RNA を抽出し、Highcapacity cDNA reverse transcription kit を用いて cDNA を作成した。TaqMan 法による RT-qPCR で apoB mRNA の定量を行なった。

4. 研究成果

1) 血清中での siRNA 分解は 3'-exonuclease による分解が最も考慮する必要があるとされているが、これは 3'-末端に強力な阻害作用を持つ化学修飾を施すことで回避が可能であり、むしろ RNA 配列中ランダムに鎖切断を行う endonuclease による分解を防ぐことが重要との考えから、ApoB-siRNA の特にアンチセンス鎖の 10% FBS 中での endonuclease による分解 hot spot の同定を行った。

当初の実験条件では、分解が全く認められなかったが、反応条件、後処理条件に様々な工夫・改善を行うことで、分解反応の検出が可能になった。この間の検討で明らかになった重要な点として次の二点が挙げられる。i) siRNA 二重鎖の安定性が血清中での分解速度に大きく影響する。ii) endonuclease による分解は RNA 鎖にニックを入れるのみであり、分析条件によってはニックの入った二重鎖 RNA として検出され、分解が起こっていないような電気泳動パターンが得られる。

図 2 に種々の改善の結果得られたアンチセンス鎖を 3'-FAM 標識した場合の分解パターンを示した。主な分解物として 3 箇所バンドが認められ (矢印)、分解 hot spot 由来の分解物であることが示唆された。これらの近傍に化学修飾を部分的に施すことでアンチセンス鎖の安定性の向上が期待できると考えられた。これまで、siRNA の血清中での分解位置が同定された例はほとんどなく、今後の化学修飾 siRNA の設計に有益な情報を与えるものと考えている。

2) 既存の化学修飾による ApoB-siRNA の活性低下を引き起こす部位を同定する目的で、アンチセンス鎖に 3 残基連続で 2'-OMe 修飾を網羅的に導入した ApoB-siRNA を合成し (表 1) 「研究の方法」に示した方法で apoB mRNA の発現抑制効果の評価した。その結果、図 2 に示したように、アンチセンス鎖の 5'-末端から 3 残基連続で 2'-OMe 修飾すると siRNA 活性はほぼ完全に消失し (AS 1-3)、13-15 および

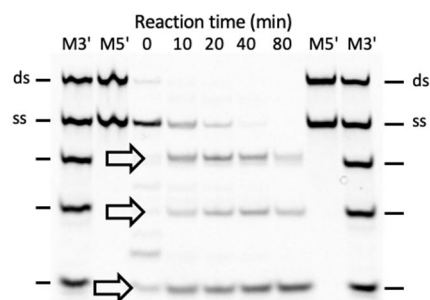


図2 20% PAGE analysis of degradation reactions of 3'-FAM labeled antisense strand of apoB siRNA (0.5 μM siRNA) in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) containing 10% FBS at 37°C.

表 1 Sequences of antisense strands modified with 2'-OMe.^a

name	sequence
AS 1-3	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
AS 3-5	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
AS 5-7	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
AS 7-9	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
AS 9-11	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
AS 11-13	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
AS 13-15	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
AS 15-17	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
AS 17-19	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
AS 19-21	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'

^a2'-OMe nucleotides are shown in red.

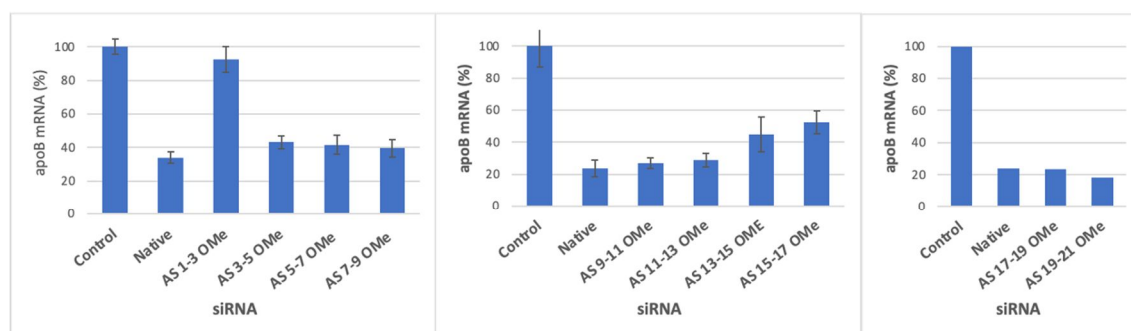


図3 HuH-7 cells were transfected with 5 nM siRNA in 10% FBS/9 mM CaCl₂/DMEM (CEM method) at 37 °C for 24 h. Cells were lysed and apoB mRNA were quantitated by RT-qPCR.

15-17 残基の修飾でも有意に活性低下した (AS 13-15、AS 15-17)。さらに、5'-末端 3 残基について詳細に評価し、siRNA 活性の低下に最も大きく影響する残基を明らかにした。これらの領域は、血清中での分解を抑制する目的で化学修飾が必要になる場合には、プロドラッグ型の修飾が有効であることを示唆している。

また、化学修飾による siRNA 活性への影響が比較的少ないセンス鎖についても同様の実験を行い、2'-OMe 修飾による活性低下が見られる領域を明らかにした。

3) 以上の検討結果から、アンチセンス鎖は 2'-OMe 修飾を行う領域と REDUCT 修飾を行う部位を設計した上で、3'-末端は抜群の酵素耐性を有する L 型 thymidine (dT^L) 2 残基のオーバーハングとした。また、センス鎖は 3'-末端を GalNac 修飾した上で 2'-OMe 修飾を行う領域を設計し、未修飾の Native ApoB-siRNA (A)、2'-OMe 修飾を行う領域のみ修飾した 2'-OMe-ApoB-siRNA (B)、2'-OMe 修飾及び REDUCT 修飾を行うべき部位を全て 2'-OMe 修飾した 2'-OMe, 2'-OMe-ApoB-siRNA (C)、2'-OMe 修飾及び REDUCT 修飾を行った 2'-OMe, REDUCT-ApoB-siRNA (D) を合成し、in vitro での apoB mRNA 発現抑制活性を評価した。

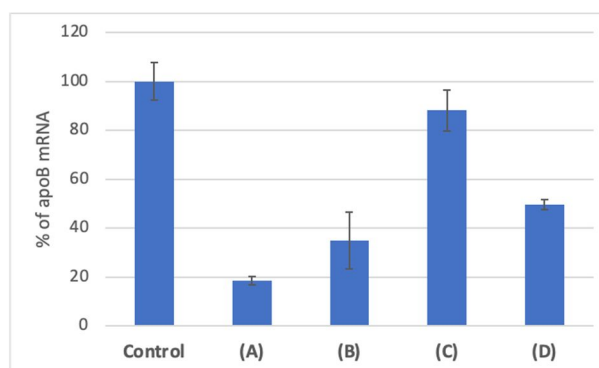


図4 HuH-7 cells were transfected with 10 nM siRNA in 10 %FBS/9 mM CaCl₂/DMEM (CEM method) at 37 °C for 24 h. Cells were lysed and apoB mRNA was quantitated by RT-qPCR. (A) Native ApoB-siRNA, (B) 2'-OMe ApoB-siRNA, (C) 2'-OMe, 2'-OMe ApoB-siRNA and (D) 2'-OMe, 2'-OMDTM ApoB-siRNA

図3に結果を示したが、未修飾の Native ApoB-siRNA (A)と比較して、siRNA 活性への影響が最小限となるよう設計した 2'-OMe-ApoB-siRNA (B)においても若干の活性の低下が認められたが、REDUCT 修飾を行うべき箇所を 2'-OMe 修飾した(C)では siRNA 活性はほぼ消失した。この結果は上記1)及び2)で同定した、siRNA の血清中での安定性向上に化学修飾が必要である領域のうち、従来の 2'-OMe 修飾では siRNA 活性が低下する箇所を的確に捉えることに成功したことを示唆している。一方、2'-OMe 修飾と REDUCT 修飾を適切に施した 2'-OMe, REDUCT-ApoB-siRNA (D)では、(B)と比較し、若干活性が低下するもののほぼ同程度の活性を維持しており、REDUCT 修飾がプロドラッグとして有効に機能していることが示唆された。また(C)と比較して、2'-OMe 修飾に対する REDUCT 修飾の優位性を示すことができたと考えている。

In vivo モデル実験として、病態モデルマウス (C57BL/6J) を用いて 2'-OMe-ApoB-siRNA (B) 及び 2'-OMe, 2'-OMe-ApoB-siRNA (C)を 5 mg/kg~20 mg/kg で皮下投与し、3 日後の肝臓細胞の apoB mRNA の発現量を RT-qPCR で定量したところ、いずれの siRNA もコントロールと有意差なく、in vivo で naked siRNA としての投与で siRNA 活性を発現するのに十分な安定性を有していないことが示唆された。

以上のように、ApoB-siRNA の血清中での分解実験から、化学修飾による安定化が必要な領域と、既存の非プロドラッグ型修飾 (2'-OMe 修飾) では siRNA 活性が低下する、つまりプロドラッグ型修飾が有効な領域を同定することができた。また、これらの情報を基に、一連の修飾 ApoB-siRNA を設計・合成し、その siRNA 活性の評価を行なった。In vitro では 2'-OMe 修飾、REDUCT 修飾が有効に機能している結果が得られたが、in vivo での予備検討では、以上のようにして設計した部分的 2'-OMe 修飾では十分な安定化は得られないことが判明したことから、今後 LNP (lipid nanoparticle) などの併用による保護・安定化の向上を図る方策や、REDUCT 修飾を全残基に施すことができる合成技術の開発を検討していく必要があると考えている。

< 引用文献 >

- (1) Soutschek, J., *Nature*, 2004, 432, 173–178.
- (2) Goldberg, A.C. *J. Clin. Lipidol.*, 2010, 4, 350–356.
- (3) Geary, R. S., Baker, B. F., Crooke, S. T., *Clin Pharmacokinet*, 2015, 54, 133–146.
- (4) Nair, J. K. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136, 16958–16961.
- (5) Akin, A. et al., *Nat. Nanotech.*, 2019, 14, 1084–1087.
- (6) Ochi, Y., Nakagawa, O., Sakaguchi, K., Wada, S., Urata, H., *Chem. Commun.*, 2013, 49, 7620.
- (7) Hayashi, J. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2018, 28, 2171–2174.
- (8) Soutschek, J. et al., *Nature*, 2004, 432, 173–178.
- (9) Hori, S., et al. *Nucleic Acids Res.*, 2015, 43, e128.
- (10) <https://www.glenresearch.com/10-1974.html>
- (11) Ochi, Y., Nakagawa, O., Hayashi, J., Wada, S., Urata, H., *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, 62, 4.63.1–4.63.20.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 林 淳祐、和田 俊一、浦田 秀仁	4. 巻 46
2. 論文標題 REDUCT-siRNA : 細胞内還元環境に反応して活性化するプロドラッグ 型RNA創薬	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 582-585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Wada Shun-ichi, Taniguchi Kohei, Hamazaki Hiroaki, Yamada Azusa, Hayashi Junsuke, Uchiyama Kazuhisa, Urata Hidehito	4. 巻 29
2. 論文標題 Influence of lysine residue in amphipathic helical peptides on targeted delivery of RNA into cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1934 ~ 1937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.05.044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taniguchi Kohei, Wada Shun-ichi, Ito Yuko, Hayashi Junsuke, Inomata Yosuke, Lee Sang-Woong, Tanaka Tomohito, Komura Kazumasa, Akao Yukihiro, Urata Hidehito, Uchiyama Kazuhisa	4. 巻 16
2. 論文標題 -Aminoisobutyric Acid-Containing Amphipathic Helical Peptide-Cyclic RGD Conjugation as a Potential Drug Delivery System for MicroRNA Replacement Therapy in Vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 4542 ~ 4550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00680	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 杉本 紀人、林 淳祐、船木 涼平、保積 慧美、和田 郁人、斯波 真理子、和田 俊一、浦田 秀仁
2. 発表標題 プロドラッグ型ホスホトリエステル修飾ギャップマー型核酸の合成とその遺伝子発現抑制効果の評価
3. 学会等名 日本薬学会第143年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉本紀人、林淳祐、船木涼平、保積恵美、和田郁人、斯波真理子、和田俊一、浦田秀仁
2. 発表標題 プロドラッグ型ホスホトリエステル修飾を導入したGapmer核酸の合成とその評価
3. 学会等名 日本核酸医薬学会 第6回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浦田秀仁
2. 発表標題 細胞内を模倣した還元的環境で活性化するプロドラッグ型核酸創薬
3. 学会等名 医工薬連関科学研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 J. Hayashi, R. Funaki, N. Sugimoto, Y. Ochi, S. Wada, H. Urata
2. 発表標題 Properties of reducing-environment-responsive prodrug-type phosphate-modified oligonucleotides for development of oligonucleotide therapeutics.
3. 学会等名 The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (Tokyo) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 J. Hayashi, R. Funaki, N. Sugimoto, Y. Ochi, S. Wada, H. Urata
2. 発表標題 Syntheses and properties of reducing environment responsive prodrug-type oligonucleotides bearing cyclic and linear disulfide moieties
3. 学会等名 Commemorative International Symposium of the Japan Society of Nucleic Acids Chemistry (Kobe) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉本紀人、船木涼平、林淳祐、越智洋輔、和田俊一、浦田秀仁
2. 発表標題 細胞内還元環境に応答するプロドラッグ型リン酸部修飾DNAの変換効率の比較
3. 学会等名 日本核酸医薬学会 第5回年会、7月（大阪）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 越智洋輔、林淳祐、森田康之、西垣美沙、和田俊一、浦田秀仁
2. 発表標題 還元環境に応答するプロドラッグ型 RNA の配列拡張を指向した合成研究
3. 学会等名 日本薬学会第139年会、3月（千葉）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林淳祐、船木涼平、越智洋輔、和田俊一、浦田秀仁
2. 発表標題 細胞内還元環境に応答する直鎖ジスルフィド修飾を施したプロドラッグ型リン酸トリエステル(PTE) 核酸の合成
3. 学会等名 日本薬学会第139年会、3月（千葉）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 山本昌、藤堂浩明、岡本浩一	4. 発行年 2021年
2. 出版社 情報機構	5. 総ページ数 401
3. 書名 医薬品におけるDDS技術開発と製剤への応用	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室一覧 機能分子創製化学研究室
<https://www.ompu.ac.jp/class/pharm/fmcc.html>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分 担者	斯波 真理子 (Harada-Shiba Mariko) (70271575)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・非常勤研究員 (84404)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------