

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：34413

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06116・19K21234

研究課題名（和文）炎症性副作用を軽減したプロドラッグ型siRNAの開発

研究課題名（英文）Development of prodrug-type siRNA reduced inflammatory adverse effect

研究代表者

越智 洋輔 (Ochi, Yosuke)

大阪薬科大学・薬学部・研究員

研究者番号：30826102

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本代表者らは、RNA干渉法を利用する核酸医薬の開発を目指したプロドラッグ型RNA分子、2'-O-メチルジチオメチル (MDTM)-siRNAの研究を行ってきた。MDTM-siRNAは、血清中での優れた安定性と天然型siRNAと同等のノックダウン活性が確認されていた。今回、2'-O-トリメトキシベンジルチオメチル基を有する4種塩基を合成し、オリゴ核酸合成後修飾法によりMDTM-RNAの合成に成功した。また、疾患への応用に向けて既存の修飾オリゴ核酸、2'-O-メチル修飾siRNAを細胞に用いたノックダウン実験において、MDTM修飾の導入箇所の選定の足がかりとなる結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性疾患に対して種々の核酸医薬品が近年開発されてきている。その薬剤の本体である核酸分子は生体内において不安定で、炎症性副作用を生じ得る。これらの欠点を克服するために様々な化学修飾によって安定性と副作用の改善が可能になる一方、細胞内での効果を弱める新たな欠点が生じた。この薬剤の新たな欠点を補うために細胞内外の環境に柔軟に反応して効果を発揮する新規化学修飾核酸を創製した。今回、本化学修飾核酸の効率的な合成方法を確立した。さらに標的疾患に対して従来の化学修飾を施した核酸配列を使用して効果を弱める修飾位置を特定し、今後、我々の新規化学修飾核酸へ置換することで効果を改善する足がかりを得た。

研究成果の概要（英文）：We developed 2'-O-methyldithiomethyl (MDTM)-siRNA as a prodrug-RNA. The MDTM-siRNAs showed high stability under fetal bovine serum and knockdown activity equivalent to native siRNAs. In this study, we succeeded synthesis of four nucleosides bearing 2'-O-trimethoxybenzylthiomethyl group and MDTM-RNA by post synthetic approach. The result of our RNAi study using 2'-O-methyl modified siRNA contributed to decision of 2'-O-MDTM-modification sites.

研究分野：核酸医薬

キーワード：核酸医薬 ジスルフィド RNA干渉

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、難治性疾患を対象とした医薬品に核酸医薬が期待されており、その中の一つに低分子干渉 RNA (small interfering RNA; siRNA) がある。siRNA は細胞内在性のタンパク質と複合体を形成し、配列特異的に mRNA を切断することによって遺伝子発現が抑制される RNA 干渉と呼ばれる現象を引き起こす。核酸分子、特に RNA は生体内の核酸分解酵素によって容易に分解されるだけでなく、サイトカイン産生の促進による炎症性副作用を引き起こすことが知られている。これらの欠点は、RNA の糖部 2'-OH 基をアルキル化することによって克服されてきた。しかし、新たな欠点として 2'-OH 基の修飾による siRNA の遺伝子発現抑制効果 (ノックダウン効果) の低下を招き、生体内での安定性の向上と炎症性副作用の低減、ノックダウン効果の維持をすべて両立することは困難である。そこで代表者らは先に示した機能を両立するため、プロドラッグ型 RNA 分子である 2'-*O*-メチルジチオメチル(2'-*O*-MDTM)-RNA の開発を行ってきた。

2. 研究の目的

代表者らが開発した 2'-*O*-メチルジチオメチル(2'-*O*-MDTM)-RNA は、2'-OH 基にジスルフィド結合を含む構造であり、細胞内のグルタチオン等で構成される還元的環境によってジスルフィド結合が切断され自発的に天然型 RNA へ変換される分子設計となっている (図 1)。MDTM-siRNA は 2'-*O*-メチル修飾-siRNA よりも高いノックダウン効果を示し、これまでに、ウリジン (U) においてのみ 2'-*O*-MDTM 基へ変換可能な 2'-*O*-トリメトキシベンジルチオメチル基 (TMBTM 基) を有するオリゴ核酸合成前駆体 (ホスホロアミダイト体) の合成、そのオリゴ核酸の合成および MDTM 修飾核酸への変換を既に達成している。¹⁾ 標的配列の拡張にはアデノシン、グアノシン、シチジン (A、G、C) への修飾も必要となるが、これら 3 種の TMBTM 修飾ホスホロアミダイト体の合成収率は満足の得られるものではなかった。まず、A、G、C の修飾ホスホロアミダイト体の合成収率の改善に着手した。

さらに本研究では MDTM 基を様々な位置に導入した siRNA を合成し、生物学的実験において既存の修飾オリゴ核酸と比較することで、siRNA 活性の向上および炎症性副作用の低減を両立可能な修飾 siRNA 配列の決定を目的とする。

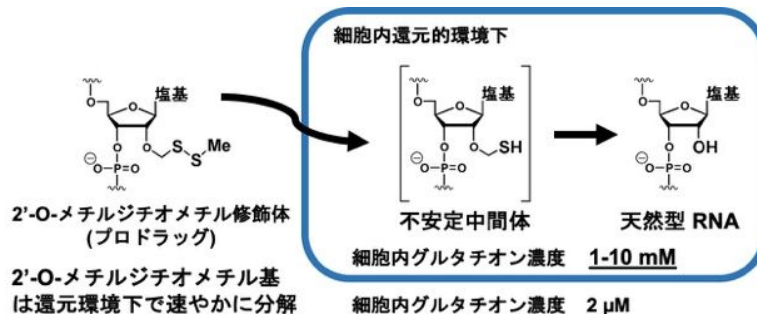


図 1. プロドラッグ型 2'-*O*-MDTM 修飾核酸の細胞内還元的环境下での変換反応

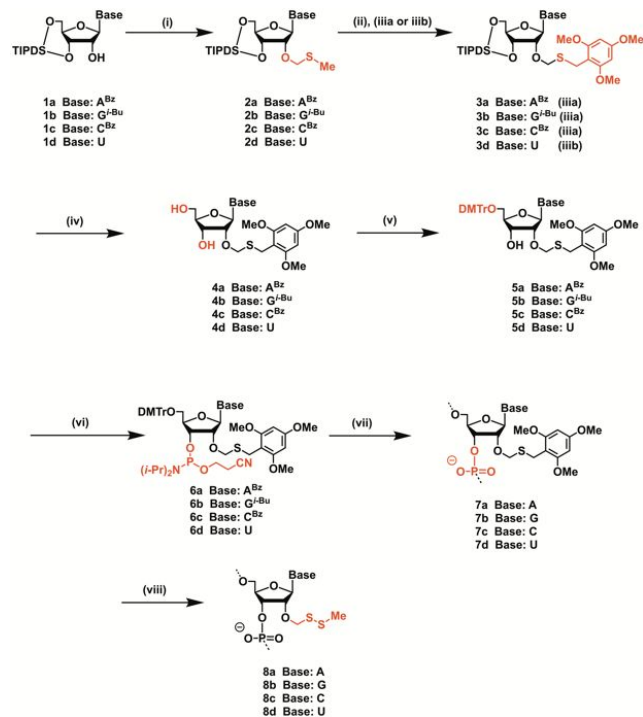
3. 研究の方法

(1) オリゴ核酸合成後修飾法による MDTM-siRNA の合成

A、G および C の修飾ホスホロアミダイト体の合成において、中間体である 2'-*O*-トリメトキシベンジルチオメチル (TMBTM) 修飾ヌクレオシド誘導体の合成収率の改善求められた。そこでウリジン誘導体の合成方法を改変し 3',5'位および塩基部を保護した A、G、C を出発原料として合成を試みた (スキーム 1)。得られた TMBTM 修飾ヌクレオシド誘導体から 3 工程で目的の修飾ホスホロアミダイト体を合成した。合成した修飾ホスホロアミダイト体 6a-d を自動合成機にて ApoB mRNA を標的とした RNA 配列に組み込んだ TMBTM-RNA 7a-d を得た。得られた 7a-7d に酢酸緩衝液中 (pH 4)、ジメチル(メチルチオ)スルホニウムテトラフルオロボラート (DMTSF) を作用させることで 2'-*O*-MDTM-RNA を効率よく得ることに成功した。

(2) ヒト肝がん由来細胞 (HuH-7) を用いた抗 ApoB 活性に及ぼす修飾位置の評価

2'-*O*-MDTM-siRNA の遺伝子発現抑制効果を調べることを目的として肝臓由来細胞で特異的に発現しているタンパク質 ApoB に対する遺伝子発現抑制効果を評価した。ApoB を発現しているヒト肝がん由来細胞 (HuH-7 細胞) に ApoB mRNA を標的とする配列を有する 2'-*O*-メチル修飾-siRNA (表 1) を Obika らによって開発された CEM (calcium enrichment of medium) を用いて導入し、²⁾24 時間培養後、ApoB mRNA 発現量を PCR 法を用いて測定した。天然型 siRNA を導入した際のノックダウン効率を 100% として発現抑制効果を比較した。



スキーム 1. オリゴヌクレオチド合成後修飾法による 2'-O-MDTM-RAN の合成

(i) DMSO, Ac₂O, AcOH; (ii) SO₂Cl₂, CH₂Cl₂; (iia) 2, 4, 6-trimethoxybenzylmercaptan, *N,N*-diisopropylethylamine, CH₂Cl₂; (iib) 2,4,6-trimethoxybenzylmercaptan, NaH, DMF; (iv) Et₃N-3HF, THF; (v) DMTr-Cl, pyridine; (vi) 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchloro-phosphoramidite, *N,N*-diisopropylethylamine, DMAP, CH₂Cl₂; (vii) DNA/RNA synthesiser; (viii) DMTSF, acetate buffer (pH 4)

	RNA 配列	Sense strand
		Antisense strand
siRNA 1 (native, control)	5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3'	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
	5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3'	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA -5'
siRNA 2	5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3'	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
	5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3'	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
siRNA 3	5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3'	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
	5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3'	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
siRNA 4	5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3'	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
	5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3'	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
siRNA 5	5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3'	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
	5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3'	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
siRNA 6	5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3'	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
	5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3'	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
siRNA 7	5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3'	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
	5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3'	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
siRNA 8	5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3'	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
	5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3'	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
siRNA 9	5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3'	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
	5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3'	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
siRNA 10	5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3'	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
	5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3'	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
siRNA 11	5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3'	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'
	5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3'	3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5'

表 1. ApoB mRNA を標的とする siRNA 配列. **赤太字**: 2'-O-メチル修飾を導入した箇所

4. 研究成果

(1) オリゴ核酸合成後修飾法による MDTM-siRNA の合成

A, G および C の修飾ホスホロアミダイト体の合成において、TMBTM 修飾ヌクレオチド誘導体の合成はオリゴ核酸合成後修飾に必要な置換基の導入工程であり極めて重要である。初めに U において確立された方法と同様、³⁾ **スキーム 1.** (ii) の後に溶媒と塩化スルフルルを減圧留去し、水素化ナトリウム存在下、DMF 中で 2,4,6-トリメトキシベンジルメルカプタンと反応を行ったところ (iib)、反応中間体が分解した。そこで、反応条件の種々検討し、試薬および溶媒を除去することなく DIEA と 2,4,6-トリメトキシベンジルメルカプタンを加えワンポットで行ったところ、収率を改善することに成功した。

これまでオリゴ核酸合成後修飾による 2'-O-MDTM-RNA の合成は RNA 配列中の U に 2'-O-MDTM 修飾を導入することには成功していたが、A、G および C へ 2'-O-MDTM 修飾の導入を行っていなかった。そこで、23 塩基の鎖長からなる ApoB mRNA を標的とした RNA 配列の一ヶ所に 2'-O-MDTM 基を導入した 8a-d へ変換する試みを行った。酢酸緩衝液中にて DMTSF を作用させ、反応の進行を HPLC にて追跡したところ、反応時間 5 分程度で原料の TMBTM-RNA 7a-d は消失し、8a-d をそれぞれ効率よく得ることに成功した (図 2)。得られた 8a-d は MALDI-TOF MS によって確認された (表 2)。

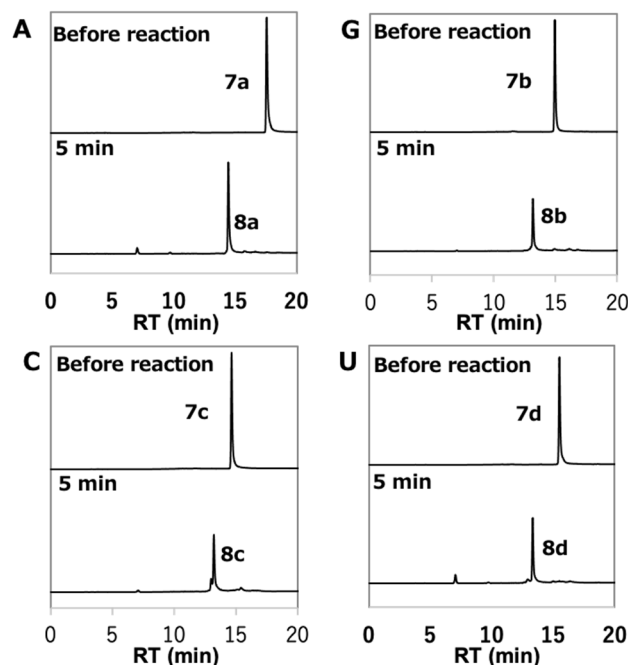


図 2. オリゴ核酸合成後修飾法による 2'-O-MDTM-RNA の合成 (HPLC による反応の分析)
縦軸: 吸光度 260 nm

2'-O-MDTM-RNA 配列	MALDI-TOF MS	
	理論値 [M-H] ⁻	測定値
8a 5'- A UU GGU AUU CAG UGU GAU GAC TT-3' (A: 2'-O-MDTM-A)	7414.6	7413.0
8b 5'-AUU G GU AUU CAG UGU GAU GAC TT-3' (G: 2'-O-MDTM-G)	7414.6	7415.3
8c 5'-AUU GGU AUU C AG UGU GAU GAC TT-3' (C: 2'-O-MDTM-C)	7414.6	7414.2
8d 5'-AUU GGU AUU CAG UGU GAU GAC TT-3' (U: 2'-O-MDTM-U)	7414.6	7415.8

表 2. 2'-O-MDTM-RNA の配列と MALDI-TOF MS の結果

(2) ヒト肝がん由来細胞 (HuH-7) を用いた抗 ApoB 活性に及ぼす修飾位置の評価

通常 siRNA のアンチセンス鎖の 5'-末端から 2-8 塩基の seed 領域と呼ばれる部位に修飾を施すことで、遺伝子発現抑制が低下することが知られているが、⁴⁾ 使用する siRNA 配列によって影響する位置が異なることがある。そこで、最適な修飾位置を検証するため、3 塩基連続でアンチセンス鎖を 2'-O-メチル修飾した siRNA の遺伝子発現抑制効果を評価した。

先に示した siRNA 1-11 を 9 mM Ca²⁺ を含有する CEM に溶解して HuH-7 細胞に導入した。24 時間培養後の細胞を回収し、サンプル中の ApoB mRNA に逆転写酵素を用いて cDNA を作成し、PCR にて ApoB mRNA の発現量を測定した後、ノックダウン活性を算出した (図 3)。その結果、siRNA 2, 8, 9 において、天然型の siRNA 1 よりもノックダウン活性が大きく低下することが明らかとなり、seed 領域を含む siRNA 2 では予想通り活性の低下が見られた。今回活性の低下が確認された修飾位置を 1 塩基ごと詳細に評価し、同位置に 2'-O-MDTM 修飾を導入した siRNA とノックダウン活性の比較を行う予定である。

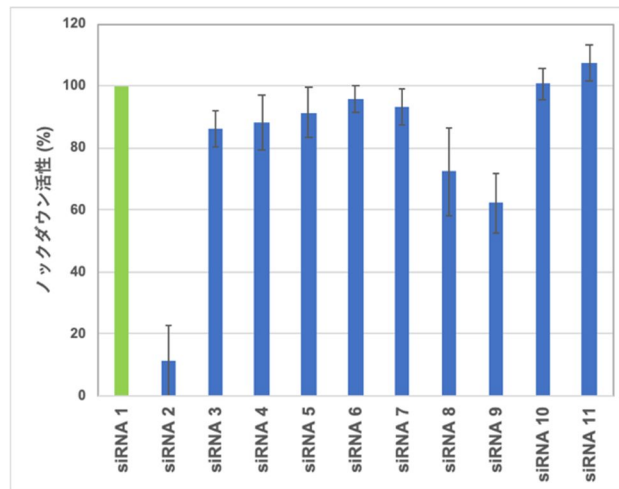


図 3. 2'-O-MDTM-siRNA の ApoB 発現抑制効果

ApoB を抑制する配列を有する siRNA を CEM により ApoB を発現するヒト肝がん由来細胞 (HuH-7) に導入後、24 時間培養後の細胞内 ApoB mRNA の減少割合。天然型 siRNA (siRNA 1) のノックダウン活性を 100% とした時のノックダウン活性の比率を示した。

(3)結論

以上の結果より、ApoB を対象とする siRNA のアンチセンス鎖でノックダウン活性の低下に寄与する 2' 位修飾の位置を特定した。今回検討できなかったが、siRNA が誘発するサイトカイン産生の軽減は 2'-O-メチル修飾によって解決できるが、アンチセンス鎖をメチル修飾した siRNA ではノックダウン活性の低下が確認されている。⁵⁾ メチル修飾 siRNA よりも高いノックダウン活性が得られる MDTM-siRNA は細胞外での安定性と炎症性副作用の軽減およびノックダウン活性の両立に寄与できる可能性がある。またメチル修飾が許容される配列については、メチル修飾でノックダウン活性を低下させる位置に 2'-O-MDTM-修飾を併用することで更なる核酸分解酵素に対する耐性を獲得すると考えられた。これらのことから 2'-O-MDTM-siRNA は siRNA 創薬研究において、極めて有用な RNA 分子であることが考えられた。

参考文献

- 1) Hayashi J.; Nishigaki M.; Ochi Y.; Wada S.; Wada F.; Nakagawa O.; Obika S.; Harada-Shiba M.; Urata H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2018**, 28, 2171.
- 2) Hori S.; Yamamoto T.; Waki R.; Wada S.; Wada F.; Noda M.; Obika S. *Nucleic Acid Res.* **2015**, 43, e128.
- 3) Ochi Y.; Nakagawa O.; Sakaguchi K.; Wada S.; Urata H. *Chem. Commun.* 2013, **49**, 7620.
- 4) Amarzguioui, M.; Holen, T.; Babaie, E.; Prydz, H. *Nucleic Acids Res.* 2003, **31**, 589.
- 5) Judge A.; Bola G.; Lee A.; MacLachlan I. *Molecular Therapy* 2006, **13**, 494.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hayashi Junsuke, Ochi Yosuke, Morita Yasuyuki, Soubou Katsuma, Ohtomo Yuhei, Nishigaki Misa, Tochiyama Yuko, Nakagawa Osamu, Wada Shun-ichi, Urata Hidehito	4. 巻 26
2. 論文標題 Syntheses of prodrug-type 2'-O-methyldithiomethyl oligonucleotides modified at natural four nucleoside residues and their conversions into natural 2'-hydroxy oligonucleotides under reducing condition	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 5838 ~ 5844
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmc.2018.10.025	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 越智洋輔、森田康之、林淳祐、和田俊一、浦田秀仁
2. 発表標題 配列拡張を指向した 2'-O-メチルジチオメチル-オリゴヌクレオチドの合成
3. 学会等名 第68回 日本薬学会近畿支部総会・大会
4. 発表年 2018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 General synthesis and knockdown activity of prodrug-type 2'-O-methyldithiomethyl oligonucleotide
3. 学会等名 第45回 国際核酸化学シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2018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
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----