

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590114

研究課題名（和文） C型肝炎ウイルスを標的とする新規 siRNA の開発

研究課題名（英文） Development of potent chemically modified siRNAs that suppress HCV replication

研究代表者

上野 義仁 (UENO YOSHIHITO)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20250467

研究成果の概要（和文）：C型肝炎はC型肝炎ウイルスの感染により起こる。現在、副作用の少ない新しい治療薬の開発が待ち望まれている。研究者らは、独自の方法で化学修飾した siRNA を合成し、これらがエンドヌクレアーゼ耐性、エキソヌクレアーゼ耐性を有すること、また標的以外の遺伝子の発現が抑制されてしまうオフ・ターゲット効果を軽減できること、更に末端ダンダリングエンド修飾 siRNA が効果的にC型肝炎ウイルスの複製を抑制することを見出した。

研究成果の概要（英文）：Small interfering RNA (siRNA) is a non-coding RNA with considerable potential as a new therapeutic drug for intractable diseases. siRNAs can be rationally designed and synthesized if the sequences of the disease-causing genes are known. In this study, we found that incorporation of naphthalene biaryl unit at the 5' and 3' ends of sense and antisense strands of siRNA improves silencing activity and nuclease resistance. Further, we found that the modified siRNA suppressed HCV replication more efficiently than unmodified siRNA. Thus, the naphthalene biaryl modification may hold promise as a method for improvement of the silencing activity and nuclease-resistance of siRNAs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：RNA 干渉・抗ウイルス剤

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎はC型肝炎ウイルスの感染により起こる。日本におけるC型肝炎ウイルス感染者数は150～200万人とも推定されている。C型肝炎の治療法としては、インターフェロン及びインターフェロンとリバビリンの併

用による治療が第1の選択肢となっている。しかし、インターフェロン療法あるいはインターフェロンとリバビリンの併用療法を行った場合、多くの患者に発熱、倦怠感、頭痛、食欲不振、脱毛などの副作用が見られることが報告されている。このことから副作用の少

ない新しい治療薬の開発が待ち望まれていた。

RNA 干渉 (RNA interfering; RNAi) とは、二本鎖 RNA を細胞に導入することで、同じ塩基配列を持つ細胞の染色体由来の RNA が分解される現象を言う。当初、RNAi は、線虫と植物に固有の現象と考えられていたが、2001 年にダングリングエンド構造を持つ 21 塩基対程度の長さから成る二本鎖 RNA (short interfering RNA; siRNA) を用いることにより、哺乳動物細胞においても RNAi が観察されることが見出された。これを契機に、RNAi を利用した核酸医薬品開発研究が、ベンチャー企業をはじめとして、世界中で進められていた。

天然の未修飾な核酸は細胞内外に存在する各種ヌクレアーゼにより速やかに分解されてしまうこと、また、ポリアニオニックなオリゴ核酸は生体膜を通過しづらいことから、siRNA を医薬品として使用しようとする場合、ヌクレアーゼ耐性、細胞膜透過性等の性質を付与した新しい siRNA の開発が必要であった。

2. 研究の目的

研究代表者らは、独自の方法で化学修飾した siRNA を合成し、これらがエンドヌクレアーゼ耐性、エキソヌクレアーゼ耐性を有すること、また標的以外の遺伝子の発現が抑制されてしまうオフ・ターゲット効果を軽減できること、更に末端ダングリングエンド修飾 siRNA が効果的に C 型肝炎ウイルスの複製を抑制することを見出していた。本研究では、この先行研究を統合し、C 型肝炎治療薬の創製を指向した、新規 siRNA を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 3'-末端ダングリングエンド部位にビアリアル型化合物を導入するにあたって、アミダイト体と CPG (controlled pore glass) 樹脂体の 2 種類を合成する必要がある。そこでまず、各種ビアリアル化合物を合成した。ホウ酸誘導体とヨードアリアルをパラジウム触媒を用いたクロスカップリングにより縮合した後に、脱シリル化を行い目的とする各種誘導体を得た。その後、水酸基の DMTr (dimethoxytrityl) 化を行い DMTr 誘導体へと導いた。CPG 樹脂体を合成する為に、各種ビアリアル誘導体をスクシニル化した後に、CPG 樹脂との結合を行い、各種誘導体が結合した固相担体を得た。また、得られた各種 DMTr 誘導体を亜リン酸化してアミダイト体を定量的に得た。

(2) 3'-末端に 2 塩基ビアリアル型アナログを含む 21 塩基の RNA オリゴヌクレオチドを固相ホスホロアミダイト法に従って核酸自

動合成機によって合成した。

(3) 合成したオリゴヌクレオチド各鎖をダングリングエンド部位が同じ化合物である相補鎖とアニーリングを行い二本鎖を形成させ、各 siRNA 二本鎖の熱的安定性を 50% 融解温度 T_m を測定することにより比較した。

(4) ビアリアル型化合物導入による T_m 値増加の原因を追及するために、Marky と Bleslaur の手法に従い、van't Hoff トランジションエンタルピー (ΔH°)、エントロピー (ΔS°)、298K 及び 310K における自由エネルギー (ΔG°) を算出した。

(5) 合成したビアリアルアナログを含む siRNA のタンパク発現抑制能を実際にヒト子宮頸癌由来の細胞である HeLa 細胞に合成した siRNA を導入して評価した。評価方法には Dual-Luciferase reporter assay を使用した。デュアルレポーターとは、1 つのシステムにおいて 2 つの異なるレポーター酵素を同時に発現させ測定することを指し、本手法は発光タンパクである *Firefly* ルシフェラーゼと *Renilla* ルシフェラーゼの生物発光反応を識別している。なお合成した siRNA は *Renilla* ルシフェラーゼを標的とした配列であるため、*Renilla* ルシフェラーゼの発現抑制効果を *Firefly* ルシフェラーゼの発光量と比較してタンパク抑制能を評価した。また、siRNA をトランスフェクションしていない状態をコントロールとし 100% とした。

(6) ビアリアル化合物から代表してベンゼンビアリアルを 3'-末端ダングリングエンドに含む siRNA のヌクレアーゼ耐性を検討するために、5'-末端に蛍光色素であるフルオレセインが結合したオリゴヌクレオチドを合成した。まず、エキソヌクレアーゼの 1 つである snake venom phosphodiesterase (SVPD) を用いて、エキソヌクレアーゼ耐性を検討した。SVPD は 3'-OH 末端から 3' → 5' の方向に段階的にホスホジエステル結合を切断し、5'-モノヌクレオチドを生産する酵素である。一本鎖状態において時間依存的に SVPD 処理した RNA を反応停止後、電気泳動を行い解析した。

(7) Luciferase assay の際に細胞培養で用いているウシ血清中での安定性を検討した。通常 Luciferase assay ではウシ血清が 10% 含まれている培養液を使用しているが、今回 10% ウシ血清では明白な違いが現れなかったため、40% ウシ血清で評価を行った。二本鎖状態の siRNA を時間依存的にウシ血清で処理した後、電気泳動により解析した。

4. 研究成果

siRNA のヌクレアーゼ耐性の向上および RNAi 誘導活性の増強を目的とし、ダングリングエンド部位に各種ピアリアル型ユニットを導入した siRNA を設計・合成し、そのタンパク質発現抑制活性について検証した。

(1) 合成したオリゴヌクレオチド各鎖をダングリングエンド部位が同じ化合物である相補鎖とアニーリングを行い二本鎖を形成させ、各 siRNA 二本鎖の熱的安定性を 50% 融解温度 T_m を測定することにより比較した。その結果、天然型のチミジンをダングリングエンド部位にもつ siRNA よりもピアリアル型化合物に置換した siRNA の方が熱的安定性が高いことが示された。さらに、ベンゼン環の数がベンゼン型アナログからピレン型アナログへ増加するにつれ、二本鎖の安定性が増大することが示唆された。

(2) ピアリアル型化合物導入による T_m 値増加の原因を追及するために、Marky と Bleslaur の手法に従い、van't Hoff トランジションエンタルピー (ΔH)、エントロピー (ΔS)、298K 及び 310K における自由エネルギー (ΔG) を算出した。その結果、突出のない RNA やチミジン突出の RNA よりピアリアル型アナログを有する RNA の方が、二本鎖形成能の指標となる自由エネルギー変化 (ΔG) が負に増加し、二本鎖状態がより安定であることを示した。さらにベンゼンピアリアル突出 RNA から芳香族環が増えたピレンアナログ突出の RNA になるにつれ、安定性が順に向上することも示唆された。この安定性は、水素結合能や London 分散力などの二重らせん構造の安定化の指標となるエンタルピー変化 (ΔH) が、突出している化合物のベンゼン環が増えるにつれ増加しており、これが二本鎖形成に有利に働いたと考えられる。

(3) 合成したピアリアルアナログを含む siRNA のタンパク質発現抑制能を実際にヒト子宮頸癌由来の細胞である HeLa 細胞に合成した siRNA を導入して評価した。評価方法には Dual-Luciferase reporter assay を使用した。デュアルレポーターとは、1 つのシステム内において 2 つの異なるレポーター酵素を同時に発現させ測定することを指し、本手法は発光タンパクである *Firefly* ルシフェラーゼと *Renilla* ルシフェラーゼの生物発光反応を識別している。なお合成した siRNA は *Renilla* ルシフェラーゼを標的とした配列であるため、*Renilla* ルシフェラーゼの発現抑制効果を *Firefly* ルシフェラーゼの発光量と比較してタンパク質抑制能を評価した。また、siRNA をトランスフェクションしていない状態をコントロールとし 100% とした。その結果、

ベンゼン型アナログ、ナフタレン型アナログをダングリングエンド部位に持つ siRNA 及び siRNA では天然型チミジンの siRNA とほぼ同等、もしくはそれ以上の抑制効果が見られた。しかし、さらに芳香環が一つ増えたフェナントレン型アナログを持つ siRNA では活性が弱くなり、さらに増えたピレン型アナログの siRNA ではほぼ活性が見られなかった。つまり、ダングリングエンド部位を嵩高くする事は、PAZ ドメインとの認識に立体障害を及ぼし、活性低下につながる事が示唆された。

(4) ピアリアル化合物から代表してベンゼンピアリアルを 3'-末端ダングリングエンドに含む siRNA のヌクレアーゼ耐性を検討するために、5'-末端に蛍光色素であるフルオレセインが結合したオリゴヌクレオチドを合成した。まず、エキソヌクレアーゼの 1 つである snake venom phosphodiesterase (SVPD) を用いて、エキソヌクレアーゼ耐性を検討した。SVPD は 3'-OH 末端から 3' → 5' の方向に段階的にホスホジエステル結合を切断し、5'-モノヌクレオチドを生産する酵素である。一本鎖状態において時間依存的に SVPD 処理した RNA を反応停止後、電気泳動を行い解析した。その結果、5 分後には天然のチミジンをもつオリゴヌクレオチドはほぼすべて分解されてしまっているのに対し、ダングリングエンド部位にベンゼンピアリアルが導入されているオリゴヌクレオチドでは、約 1 時間後に完全な分解が起こっている。つまり、3'-末端ダングリングエンド部位へピアリアル型ユニットを導入することで、3'-エキソヌクレアーゼに対して強い耐性を示す事が示唆された。

(5) Luciferase assay の際に細胞培養で用いているウシ血清中での安定性を検討した。通常 Luciferase assay ではウシ血清が 10% 含まれている培養液を使用しているが、今回 10% ウシ血清では明白な違いが現れなかったため、40% ウシ血清で評価を行った。二本鎖状態の siRNA を時間依存的にウシ血清で処理した後、電気泳動により解析した。その結果、ベンゼンピアリアルをダングリングエンドに有する siRNA の方が、チミジンを持つ siRNA よりもゆっくり加水分解されていくことが確認できた。つまり、ピアリアル型アナログはウシ血清に対して高い耐性を有する事が示された。

(6) センス鎖の 5'-末端ならびにアンチセンス鎖の 3'-末端にナフタレン型ピアリアルを導入した siRNA を設計・合成した。両鎖にこれらのユニットを導入することにより、導入した末端部位の二重鎖の熱力学的安定性が上昇しアンチセンス鎖の選択性が向上する

こと、さらにセンス鎖の 5'-末端にビアリアル型ユニットを導入することでセンス鎖の 5'-末端リン酸化が抑制され、センス鎖によるオフターゲット効果が抑制されると考えた。その結果、ダングリングエンドがチミジンの siRNA では、全くタンパク発現抑制が観測されなかった。これは、使用した配列のセンス鎖 5'-末端が A-U リッチな配列であるため、熱力学的に不安定な末端となっているので、アンチセンス鎖よりセンス鎖が選択的に取り込まれたことが原因であると考えられる。一方でセンス鎖 5'-末端をナフタレン型ビアリアルにより安定化させた siRNA では明らかな抑制効果が観測された。また、siRNA はセンス鎖 5'-末端に 5'-O-Me 修飾型チミジンを導入し、センス鎖 5'-末端のリン酸化を阻害しているが、その抑制活性はナフタレン型ビアリアルを導入した siRNA よりも低いものであった。このことより、効果的な抑制活性がみられた siRNA では、センス鎖 5'-末端のリン酸化を阻害しただけでなく、ナフタレン型ビアリアルスタッキング効果による末端の安定化も活性向上に大きく寄与していると示唆される。次にこの新規デザイン siRNA の効果の普遍性を検証するために、同じく *Renilla* luciferase をターゲットにした、異なる配列の siRNA を合成した。今回も、オフターゲット効果の抑制を確認するために、センス鎖が取り込まれやすいセンス鎖 5'-末端に A-U リッチな配列を選択し、再びタンパク発現抑制活性を検証した。その結果、未修飾の siRNA では活性が全く見られないのに対し、修飾 siRNA では 30nM においてタンパク質の発現を効果的に抑制した。

(7) 東京都臨床医学総合研究所の小原らは、急速に突然変異が進む HCV 遺伝子の中でも、保存性が 95%以上あり、かつウイルス増殖に必要であると言われている非翻訳部位を標的とした siRNA を検討した。その結果、HCV 複製を効果的に抑制する、HCV の 5'-UTR を標的する siRNA 配列を発見した。そこで、この効果的に HCV 複製を抑制する配列を用いて新規センス鎖 5'-末端安定化型 siRNA を合成し、その活性能の評価を東京都臨床医学総合研究所に依頼した。その結果、本修飾 siRNA は、0.1nM の濃度で *in vitro* において C 型肝炎ウイルス (HCV) の複製を効果的に抑制した。今回デザインした新規 siRNA は HCV に対する複製抑制能も、天然型に比べて高いことが示唆された。また、芳香族化合物を有する siRNA を細胞に導入しても、細胞毒性が引き起こされないことがわかり、*in vivo* への応用が可能であると考えられた。

(8) さらに、3'-末端ダングリングエンドのベンゼン-リン酸骨格部位に光反応性残基を

導入した siRNA を設計・合成し、その機能について検証した。その結果、本修飾 siRNA は、RNA 干渉に関与するタンパク質を解析する上で有用なプローブであることを明らかにした。

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 5 件)

- ① Yoshikawa, K., Ogata, A., Matsuda, C., Kohara, M., Iba, H., Kitade, Y. and Ueno, Y.: Incorporation of biaryl units into the 5' and 3' ends of sense and antisense strands of siRNA duplexes improves strand selectivity and nuclease resistance, *Bioconjugate Chem.* 22: 42-49, 2011. 査読有 DOI:10.1021/bc100301w
- ② Ogata, A., Furukawa, C., Sakurai, K., Iba, H., Kitade, Y. and Ueno, Y.: Biaryl modification of the 5'-terminus of one strand of a microRNA duplex induces strand specificity, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20: 7299-7302, 2010. 査読有 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.10.077>
- ③ Kuboe, S., Yoda, M., Ogata, A., Kitade, Y., Tomari, Y. and Ueno, Y.: Diazirine-containing RNA photocrosslinking probes for the study of siRNA-protein interactions, *ChemCom* 46: 7367-7369, 2010. 査読有 DOI:10.1039/C0CC02450C
- ④ Ueno, Y., Watanabe, Y., Shibata, A., Yoshikawa, K., Takano, T., Kohara, M. and Kitade, Y.: Synthesis of nuclease-resistant siRNAs possessing universal overhangs, *Bioorg. Med. Chem.* 17: 1974-1981, 2009. 査読有 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.033>
- ⑤ Ueno, Y., Yoshikawa, K., Kitamura, Y. and Kitade, Y.: Effect of incorporation of alkyl linkers into siRNAs on RNA interference, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19: 875-877, 2009. 査読有 <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.11.107>

[学会発表] (計 5 件)

- ① 芳香族化合物で修飾した安定で有用な RNA 分子の開発, 上野義仁, 日本化学会 第 90 春季年会 (2010. 3. 27, 東大阪市)

- ② SYNTHESIS AND PROPERTIES OF SIRNAS MODIFIED WITH AROMATIC COMPOUNDS, Y. Ueno, Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and 19th Antisense Symposium (2009.11.4, Fukuoka)
- ③ SYNTHESIS OF 5' -CAPPED SIRNA FOR SUPPRESSION OF OFF-TARGET EFFECTS AND ITS CAPABILITY TO ACHIEVE PROTEIN EXPRESSION, A. Ogata, Y. Ueno, C. Furukawa, K. Sakurai, H. Iba, Y. Kitamura, and Y. Kitade, Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and 19th Antisense Symposium (2009.11.4, Fukuoka)
- ④ DIAZIRINE-CONTAINING RNA PHOTO-CROSS-LINKING PROBES FOR THE STUDY OF SIRNA-PROTEIN INTERACTIONS, S. Kuboe, M. Yoda, Y. Ueno, Y. Tomari, Y. Kitamura, and Y. Kitade, Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and 19th Antisense Symposium (2009.11.4, Fukuoka)
- ⑤ EFFECT OF INCORPORATION OF AROMATIC COMPOUNDS INTO DANGLING ENDS OF SIRNAS, K. Yoshikawa, Y. Kitamura, Y. Ueno, and Y. Kitade, Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and 19th Antisense Symposium (2009.11.4, Fukuoka)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上野 義仁 (UENO YOSHIHITO)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：20250467

(2) 連携研究者

小原 道法 (KOHARA MICHINORI)

東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・参事研究員

研究者番号：10250218