

機関番号：35408

研究種目：若手研究（B）

研究期間：平成 21～22 年度

課題番号：21750180

研究課題名（和文） 新規な機能性分子融合型 2 本鎖 RNA の開発

研究課題名（英文） Development of siRNAs conjugated with bioactive molecule

研究代表者 久保 貴紀 (Takanori Kubo)

研究者番号：90435751

研究成果の概要（和文）：

標的遺伝子の発現を強く抑制することができる RNA 干渉法は、がんなどの難治性疾患の治療法として期待されている。本研究では、RNA 干渉効果の向上を期待し、機能性物質融合型 2 本鎖 RNA を開発した。その結果、機能性物質融合型 2 本鎖 RNA は、高い細胞導入性、分解酵素耐性、遺伝子発現抑制能を示した。また、機能性物質融合型 siRNA をマウスの腫瘍内に投与した結果も優れた RNA 干渉効果を示した。これらの機能性物質を融合した 2 本鎖 RNA は、RNA 干渉反応における問題点を一掃でき、今後の医療応用への可能性を大きく広げるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：

RNAi technology is a powerful tool for suppressing gene expression in mammalian cells. In this study, we developed siRNAs conjugated with bioactive molecules in order to enhance potency of RNAi. The siRNAs conjugated with bioactive molecules had potent RNAi efficacy, higher nuclease stability, and efficient membrane permeability. Moreover, excellent gene-silencing efficacies of siRNAs conjugated with bioactive molecules were found in a subcutaneously implanted tumor mouse model. Our developed siRNAs conjugated with bioactive molecules are among the promising candidates for a new generation of modified-siRNAs that can solve the many problems associated with RNAi.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,340,000
2010 年度	1,800,000	540,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：①バイオテクノロジー、②核酸、③発現抑制

1. 研究開始当初の背景

RNA 干渉(RNA interference: RNAi)法は、癌やエイズなどの難治性疾患の強力な治療法の候補として期待されている。RNAi 法で用いる siRNA (small interfering RNA) 分子は化学的に合成でき、低濃度で標的遺伝子の発現を

強力に抑制することが出来る。しかしながら、RNAi 法にも解決すべき問題点がある。例えば、siRNA 分子の安定性や、細胞内導入性の獲得、更にはインターフェロン応答やオフターゲット効果などの副作用の低減である。これらの問題点を解決するために、既に様々

な修飾型 siRNA 分子が報告されている。例えば、コレステロールや化学修飾型ヌクレオチドを導入した修飾型 siRNA 分子である。このような修飾型 siRNA は、RNAi 法のいくつかの問題点は解決することに成功しているが、未修飾の siRNA に比べ RNAi 効果が減少するという大きな弱点がある。この理由として、修飾型 siRNA は RNAi 反応に必須なタンパク質との相互作用を妨げてしまうことが挙げられる。この修飾型 siRNA の弱点を克服でき、RNAi 法の問題点を一掃できるものは未だ報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、医薬への応用が期待されている RNAi 法の問題点を克服出来る「新規な機能性分子融合型 RNAi 分子の開発」を行った。RNAi 法は優れた遺伝子発現抑制能を示すが、低い細胞導入性や酵素分解を受けやすいなどの欠点もある。また、オフターゲット効果やインターフェロン応答などの副作用も低減しなければならない。これらの問題点を克服するために、脂質誘導体やペプチド等の機能性分子を直接結合させた機能性分子融合型 RNAi 分子の開発を行った。すなわち、脂質誘導体等の機能性分子を直接結合させることで、細胞膜との融合による細胞導入性の向上、リポタンパク等との結合による RNA 分解酵素からの保護、低濃度での RNAi 反応による副作用の低減などが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 機能性分子融合型 2 本鎖 RNA の開発。機能性分子融合型 2 本鎖 RNA は独自に開発した新規合成法を用い、簡便かつ高収率で目的の分子の合成を行った。機能性分子としては、脂質、PEG、膜透過ペプチドを用いた。以下に具体的な合成法を示す。21~27 塩基長の 2 本鎖 RNA のセンス鎖の 5' 末端をアミノ化した修飾型 RNA をカスタム合成し、活性エステル化した脂質または PEG を RNA へ直接結合させた。また、膜透過ペプチドは、*N*-(4-Maleimido butyryloxy) succinimide (GMBS) を使用し RNA と結合させた。脂質はパルミチン酸及びラウリン酸を、PEG は PEG200 及び PEG 500 を、ペプチドは、HIV-1 Rev NES ペプチドを利用した。

(2) 機能性分子融合型 2 本鎖 RNA の細胞導入性、分解酵素耐性、RNA 干渉効果等の生化学的特性を評価。合成した機能性分子融合型 2 本鎖 RNA の生化学的特性について評価した。まず、遺伝子導入剤 (Lipofectamine™2000) を利用した場合、又は、利用しない場合での HeLa、A549、

SH10-TC 細胞に対する機能性分子融合型 2 本鎖 RNA の細胞導入性を検討した。アンチセンス鎖を蛍光 (FAM) でラベルした機能性分子融合型 2 本鎖 RNA を各細胞に加え、6~8 時間後の細胞導入性を共焦点蛍光顕微鏡及びフローサイトメトリーで検討した。

また、機能性分子融合型 2 本鎖 RNA の 10% 血清中での分解酵素耐性についても検討した。分解耐性は、0~48 時間後の 2 本鎖 RNA の分解率で評価した。さらに、ルシフェラーゼ遺伝子、又は、血管新生増殖因子 (VEGF) をターゲットとした機能性分子融合型 2 本鎖 RNA の遺伝子発現抑制能についても HeLa、A549、SH10-TC 細胞を用いて検討した。遺伝子発現抑制効果についても遺伝子導入剤存在下、及び、非存在下において評価した。

(3) 分解酵素耐性をもつ新規な機能性分子融合型 2 本鎖 RNA の合成と RNAi 効果の評価。高い分解酵素耐性を獲得させるために、インバートチミジン (iT) を 2 本鎖 RNA の 3' 末端に導入させた 2 本鎖 RNA を合成した。さらにこの iT 導入型 siRNA のセンスの 5' 末端に機能性分子を結合させた。この iT が導入された機能性分子融合型 2 本鎖 RNA についても細胞導入性、分解酵素耐性、RNA 干渉効果等の生化学的特性を評価した。

(4) 機能性分子融合型 2 本鎖 RNA の *in vivo* における RNAi 効果の評価。

In vivo における機能性分子融合型 2 本鎖 RNA の RNAi 効果を検討した。具体的には、ルシフェラーゼまたは GFP を発現する細胞を皮下に移植し、腫瘍形成後、合成した機能性分子融合型 2 本鎖 RNA を局所投与した。その後、ルシフェラーゼの発光または GFP の蛍光を経時的に観察し、機能性分子融合型 2 本鎖 RNA の抗腫瘍効果について評価した。

4. 研究成果

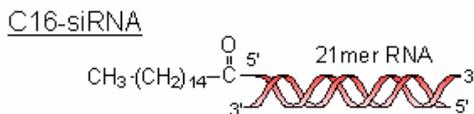
(1) 機能性分子融合型 2 本鎖 RNA の開発。2 本鎖 RNA に機能性分子を結合させるために、5' 末端にアミノ基を付与したセンス鎖 RNA および未修飾のアンチセンス鎖 RNA をそれぞれカスタム合成した。センス鎖 RNA にはアミノ基を介して様々な機能性分子を結合させた。機能性分子としては脂質 (パルミチン酸、ラウリン酸)、ポリエチレングリコール (PEG)、ペプチド (HIV Rev NES ペプチド) などである。RNA と上記機能性分子との縮合方法は *N*-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) などの活性エステル化機能性分子とアミノ基との反応、又は、*N*-(4-Maleimidobutyryloxy) succinimide (GMBS) などの 2 価性リンカーを利用した縮合方法を利用し、目的の機能性分子融合型センス鎖 RNA を高収率で得ること

に成功した。このセンス鎖 RNA はアンチセンス鎖 RNA との間で 2 本鎖 RNA を形成させ、その生化学的特性を評価した。

(2) 機能性分子融合型 2 本鎖 RNA の細胞導入性、分解酵素耐性、RNA 干渉効果等の生化学的特性を評価。

脂質やペプチドを結合させた 2 本鎖 RNA は未修飾の 2 本鎖 RNA に比べ優れた細胞導入性を示した。さらに、Luciferase を標的とした RNAi 効果の評価したところ未修飾の 2 本鎖 RNA に比べ格段に優れた遺伝子発現抑制能を示した。特に、脂肪酸を直接結合させた脂質修飾型 2 本鎖 RNA は、高い細胞導入性、分解酵素耐性、遺伝子発現抑制能を示した(図 1)。

(A) 脂質-siRNA(21塩基長)の構造



(B) *In vitro*での 脂質-siRNAの RNAi効果と細胞導入性

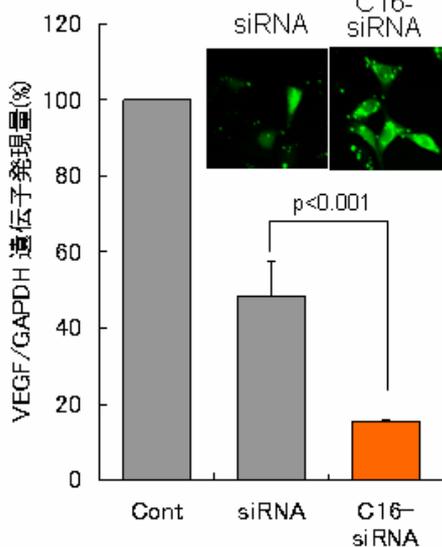


図1. *In vitro*における脂質-siRNA のRNAi効果

(3) 分解酵素耐性をもつ新規な機能性分子融合型 2 本鎖 RNA の合成と RNAi 効果の評価。インバートチミジンが導入された脂質修飾型 2 本鎖 RNA についても細胞導入性、分解酵素耐性、RNA 干渉効果等の生化学的特性を評価した。その結果、iT を導入した脂質修飾型 2 本鎖 RNA は、長時間 (120 時間) の RNAi 効果の持続性が観測された。一方、iT を導入していない脂質修飾型 2 本鎖 RNA は、48 時間以降に急激な RNAi 効果の減少が見られた。

(4) 機能性分子融合型 2 本鎖 RNA の *in*

*in vivo*における RNAi 効果の評価。

脂質修飾型 2 本鎖 RNA を担がんマウスの腫瘍内に投与した結果、脂質修飾型 2 本鎖 RNA は未修飾の siRNA に比べ、優れた RNA 干渉効果を示した (図 2)。

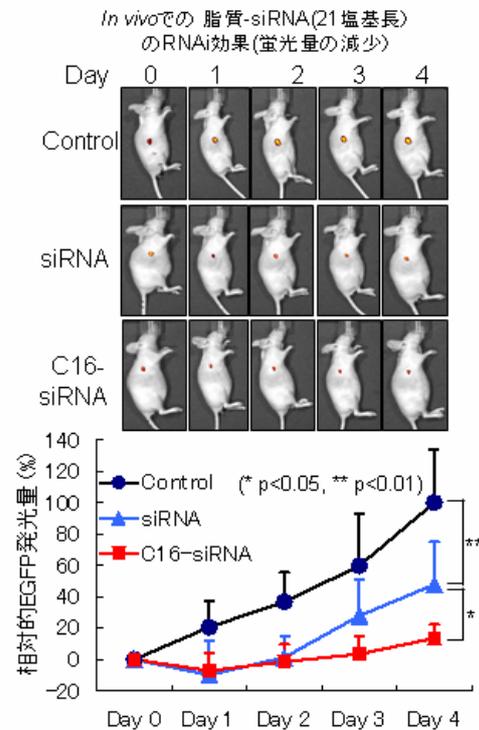


図2. *In vivo*における脂質-siRNA のRNAi効果

これらの機能性物質を融合した 2 本鎖 RNA は、RNA 干渉反応における問題点を一掃でき、今後の医療応用への可能性を大きく広げるものと期待される。

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 3 件)

1. Keichiro Mihara, Kazuyoshi Yanagihara, Misato Takigahira, Akira Kitanaka, Chihaya Imai, Joyeeta Bhattacharyya, Takanori Kubo, Yoshifumi Takei, Shin-ichiro Yasunaga, Yoshihiro Takihara, Akiro Kimura. Synergistic and persistent effect of T-cell immunotherapy with anti-CD19 or anti-CD38 chimeric receptor in conjunction with rituximab on B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Br J Haematol.*, 査読有, **151**, (2010) 37-46.
2. Kazuyoshi Yanagihara, Masaru Tsumuraya, Misato Takigahira,

Keichiro Mihara, Takanori Kubo, Kazuo Ohuchi, Toshio Seyama. An orthotopic implantation mouse model of human malignant pleural mesothelioma for in vivo photon counting analysis and evaluation of the effect of S-1 therapy. *Int J Cancer.*, 査読有, **126**, (2010) 2835-2846.

3. Mizuki Kitamatsu, Takanori Kubo, Rino Matsuzaki, Tamaki Endoh, Takashi Ohtsuki, Masahiko Sisido. Carrier PNA for shRNA delivery into cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有, **19**, (2009) 3410-3413.

[学会発表] (計 8 件)

1. 久保貴紀、柳原五吉、瀬山敏雄： 脂肪酸修飾による 2 本差鎖 RNA のジーンサイレンシングの向上、第 69 回日本癌学会学術総会、9/22-24 (2010)、大阪
2. 柳原五吉、瀧ヶ平美里、久保貴紀、森田泰博、瀬山敏雄： がん悪液質誘発マウスモデルの開発、第 29 回分子病理学研究会、7/31-8/1 (2010)、つくば
3. 久保貴紀、柳原五吉、瀬山敏雄： In vitro および in vivo イにおける脂質コンジュゲート 21-ntsiRNA の RNA 干渉効果について、第 29 回分子病理学研究会、7/31-8/1 (2010)、つくば
4. Kubo, T., Yanagihara, K., Seyama, T. : Highly efficient gene suppression by lipid conjugated duplex RNA. Joint Symposium of the 5th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society and the 19th Antisense Symposium. Nov. 3-6 (2009), Fukuoka, Japan
5. 柳原五吉、圓谷勝、久保貴紀、瀬山敏雄： 悪性胸膜中皮腫の同所移植マウスモデルの開発と生体イメージング解析、第 68 回日本癌学会学術総会、10/1-10/3 (2009)、横浜
6. 久保貴紀、柳原五吉、瀬山敏雄： 脂質修飾 2 7nt RNA による遺伝子発現抑制効果と細胞導入性の向上、第 68 回 日本癌学会学術総会、10/1-10/3 (2009)、横浜
7. 久保貴紀、柳原五吉、中西速夫、瀬山敏雄： In vivo イメージングシステムを用いた新規修飾型 2 本鎖 RNA の RNAi 効果、第 28 回 分子病理学研究会、7/18-7/19 (2009)、神戸
8. 久保貴紀、ルミアナ バカロバ、柳原五吉、瀬山敏雄： 細胞導入性および RNA 干渉効果が高い機能性分子結合型 2 本鎖 RNA の開発、第 25 回 日本 DDS 学会、7/3-7/4 (2009)、東京

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保貴紀 (Takanori Kubo)
安田女子大学・薬学部薬学科・助教
研究者番号：90435751

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：