

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)研究成果報告書

平成25年 6月 1日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659054

研究課題名(和文) 核酸医薬品創製のための新素子と新戦略の開発

研究課題名(英文) Development of a novel approach toward nucleic acids-based therapeutics

研究代表者

南川 典昭(MINAKAWA NORIAKI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：40209820

研究成果の概要(和文)：本研究では高いヌクレアーゼ抵抗性とハイブリダイゼーション能を有する新しい核酸素子を創出し、それをスプライシング異常のエディット能をもつ核酸分子として機能させることを目的とした。まずバイブリッド型 4'-チオ核酸を合成したところ、望みとする性質を有していることが明らかとなった。それを用いて U1 snRNA のリクルート能を評価したところ 2'-F-4'-チオ RNA が期待した性能を発揮し、U1i 効果を示した。最終目的を達成するために head-to-head 型オリゴの合成法を検討した。

研究成果の概要(英文)：In this work, we aimed to prepare novel chemically modified RNA molecules possessing nuclease resistance and hybridization ability. In addition, we expected that these molecules exhibit editing ability of splicing abnormality. As a result, the resulting hybrid type of 4'-thionucleic acids showed preferable properties concerning of nuclease resistance and hybridization ability. Among the hybrid type of 4'-thionucleic acids developed, 2'-F-2'-thioRNA showed U1i activity arising from recruitment of U1 snRNA on pre-mRNA. Toward the end goal, we investigated the preparation of head-to-head oligonucleotides.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：ゲノム創薬

1. 研究開始当初の背景

「核酸を医薬品にする」、机上の空論と考えられていたこの創薬研究が極めて現実味の高い方法論になりつつある。1998年に世界初のアンチセンス医薬品として Vitravene (サイトメガロウイルス感染症治療薬)が、また 2004年には Macugen (加齢性黄変性症治療薬)が初のアプタマー医薬品として FDA によって承認され、日本においても現在、その使用が認められるに至っている。更には RNA 干渉 (RNAi) の発見やマイクロ RNA (miRNA) が制御する多彩な生命現象の解明が追い風となり、核酸

を用いる次世代型創薬研究が国内外を問わず活発に行なわれている。申請者もこれまでに、有機化学的なアプローチから、生体内でも使用可能な安定性(ヌクレアーゼ抵抗性)とハイブリダイゼーション能を持つ化学修飾核酸(例えば 4'-チオ核酸)を創出することにより、核酸医薬品創製研究に携わってきた。しかしこの創薬研究の分野がさらに発展するためには、既存の方法論(例えばアンチセンス法や RNAi 法)の展開に留まらず、全く新規な生体機能調節法を確立することが不可欠と考えられる。

2. 研究の目的

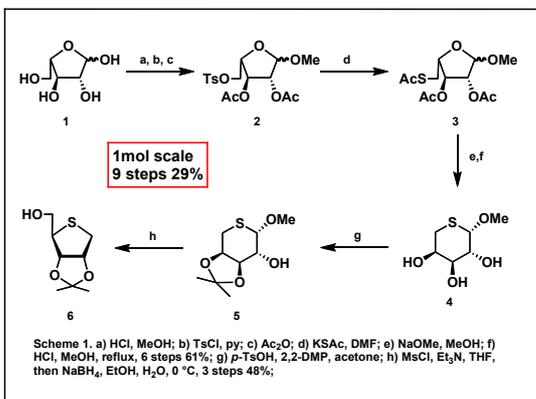
本研究では、次世代型医薬品としての期待が高い核酸による生体機能調整法の拡張を目的として、新しい核酸素子の創製と新しい方法論の提案、ならびにその実証研究を行なう。具体的には、①高いヌクレアーゼ抵抗性とハイブリダイゼーション能を併せ持つ新素子(ハイブリッド型4'-チオ核酸)を創出し、②これを head-to-head 型構造とすることによって2つの RNA 分子(U1 snRNA と異常 mRNA 前駆体)を会わせるアダプター分子として作用させ、③一塩基多型による異常 mRNA 前駆体生成に起因するスプライシング異常のエディット能を持った核酸分子として機能させる。本研究課題を遂行・成功させることによってスプライシング異常によって惹起される遺伝子変異性疾患に対する、全く新しい核酸治療薬の創製が可能となる。

3. 研究の方法

本研究課題の目標を達成するために、1)ハイブリッド型4'-チオ核酸(2'-O-MOE-4'-チオ RNA など)の合成と性質解析(ヌクレアーゼ抵抗性やハイブリダイゼーション能)ならびに head-to-head 型アダプター RNA 分子の合成、2)人工的にスプライシングサイトを導入したスプライシング評価用ベクターシステムの構築と評価系の確立、3)核酸分子の細胞内導入法の検討とアッセイ系の確立しながら、スプライシング異常のエディティング能を持つ新規核酸医薬品の創製をめざす。

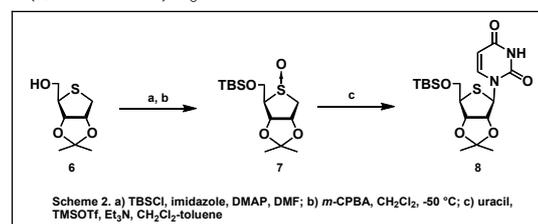
4. 研究成果

(1)4-チオ糖の大量合成法の再検討: 本研究を効率的に実施するためにはヌクレオシドユニット合成の原料となる4-チオ糖を大量に供給する必要がある。そこでまず、4-チオ糖の大量合成法を再検討することにした(Scheme 1)。その結果、L-arabinose (1)のアノマー水酸基をメチル化した化合物に対し、ピリジン中、触媒量の DMAP 存在下、一級水酸基選択的な Ts

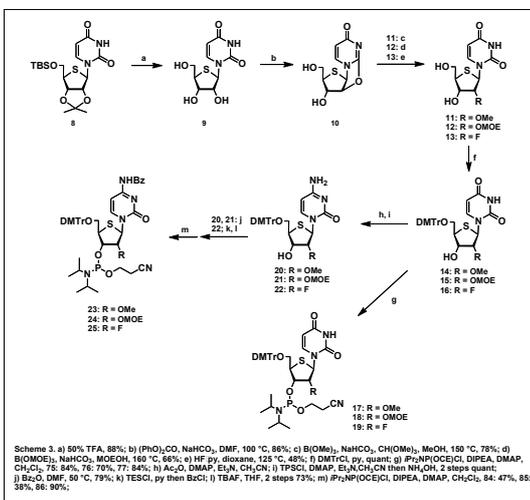


化を行い、続く Ac 化、SAc 化により化合物 3 を合成した。その後、Ac 基の脱保護及び環拡大反応に付すことによりチオピラノース 4 を収率 61%で得た。このチオピラノース 4 の水酸基をイソプロピリデン基で保護した後に、縮環反応に付すことで目的の4-チオ糖 6 を9工程 29%で得ることに成功した。

(2)ハイブリッド型4'-チオ核酸ユニットの合成: 大量合成によって得られた4-チオ糖 6 の5位水酸基を TBS 基で保護し、続いて mCPBA で酸化することでスルホキニド体 7 を合成した。これを Pummerer 反応の条件に付すことで4'-チオウリジン誘導体 8 を収率 74%で得ることに成功した(Scheme 2)。



続いて合成した 8 を用いてハイブリッド型4'-チオ核酸ユニットの合成を行なった(Scheme 3)。まず、8 の保護基を除去し、4'-チオウリジン (9) を経て 2,2'-アンヒドロ-4'-チオウリジン (10) へと変換した。続いて化合物 10 をメタノール中、オルトギ酸トリメチルと触媒量の炭酸水素ナトリウム存在下、ホウ酸トリメチルと封管中 150°C で反応させることで、2'-O-Me-4'-チオウリジン (11) を 78% の収率で得た。さらに RNA の固相合成に用いるために 11 の5'位水酸基を DMTr 基で保護した後に、アミダイト化を行うことで、2'-O-Me-4'-チオウリジンのアミダイトユニット 17 を合成した。また、シチジンユニット 23 も合成した。ほぼ同様の方法で、2'-O-MOE 体、



2'-F 体についても合成し、全 3 種類のハイブリッド型 4'-チオ核酸ユニットの合成を達成した。

(3) ハイブリッド型 4'-チオ核酸の U1 アダプターとしての活性評価: ハイブリッド型 4'-チオ核酸がスプライシングのエディット能を示すためには U1 snRNA を mRNA 上の任意の位置にリクルートする必要がある。そこでその能力を評価するためにハイブリッド型 4'-チオ核酸で U1 アダプター分子を合成し、その U1i 活性を調べることにした。

Figure 1 に示したように、ルシフェラーゼ遺伝子をコードする pGL3-C の 3'UTR 部分に、野生型の U1snRNA に相補的な配列 (WT) を挿入したベクターを作製した。このベクターでは、挿入した配列に内在性の U1snRNA が結合可能であり、U1snRNA が結合することで U1i による遺伝子発現抑制が引き起こされルシフェラーゼ活性が低下する。さらに、これと併せて野生型の U1snRNA 結合配列に、変異配列 (MT) を挿入したベクターも調整した。このベクターでは、挿入配列に変異が存在するために U1snRNA が結合することが出来ず、U1i は引き起こされない。また、U1snRNA 結合配列をタンデムに挿入することで U1i による遺伝子発現抑制効果が上昇することがいくつかの研究グループにより既に報告されている。これらは、U1i による活性の違いをより顕著に観察することができるため、今回著者らも U1snRNA 結合配列を 2 つ、3 つとタンデムに複数挿入したベクターを調整した。

Figure 1 に示した改変型ベクターの U1i 活性測定は、補正用ベクターとして pRL-TK を使い、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイによって評価した。Figure 2 にはベクターのトランスフェクション 24 時間後において、pGL3-C の発光強度を 100 とした時の各ベクターのルシフェラーゼの発光強度を示した。その結果、U1snRNA 結合配列を 1 つ挿入した WT×1

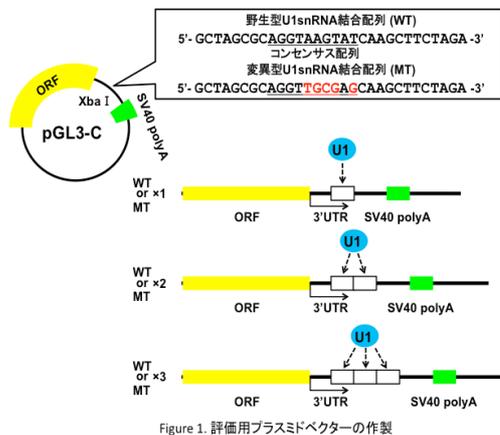


Figure 1. 評価用プラスミドベクターの作製

ベクターでは、ルシフェラーゼの発光が 40%程度まで低下しており、2 つおよび 3 つの結合配列を挿入した WT×2,×3 ベクターでは、発光はほとんど観察されず、U1i による非常に強い遺伝子発現抑制を示した。一方で、WT 配列の U1snRNA 結合部位に変異を導入した MT×1,×2,×3 ベクターでは、U1i によるルシフェラーゼ活性の低下はほとんど観察されなかった。

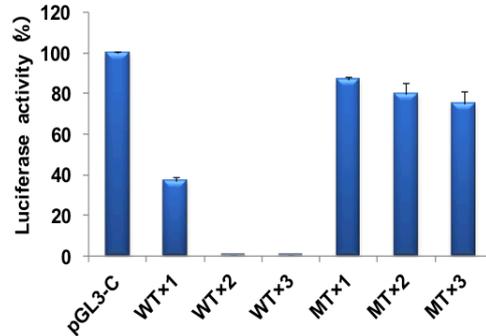


Figure 2. 評価用プラスミドベクターによる U1i 活性評価

WT 配列を挿入したプラスミドベクターを用いた場合に、内在性の U1snRNA による U1i 活性が確認され、WT 配列に変異を導入した MT プラスミドベクターでは U1i 活性が見られずに、ルシフェラーゼ発光の回復が確認された。また、野生型ベクターでは、U1snRNA 配列の数に依存して、U1i 活性の増強が見られた。以上の結果より、U1i 活性の評価系が確立できたと考えられた。続いて、MT プラスミドベクターを用いて U1 アダプターを用いた U1i 活性の評価を行うことにした。ピリミジンヌクレオシドとして 2'-O-Me ヌクレオシド, 2'-O-MOE ヌクレオシド, 2'-F ヌクレオシド, 2'-O-Me-4'-チオヌクレオシド, 2'-O-MOE-4'-チオヌクレオシド, 2'-F-4'-チオヌクレオシドの 6 種類を用い、プリンヌクレオシドとしては 2'-F ヌクレオシドを用いて adaptor 1~6 の 6 種類の U1 アダプターを合成した (Figure 3)。

U1 アダプターの配列

3'-UAUGAAUGGACCGCAACGCUCGUUCGAA-5'

	Pyrimidine修飾	Purine修飾
adaptor 1:	2'-O-Me	2'-F
adaptor 2:	2'-O-MOE	2'-F
adaptor 3:	2'-F	2'-F
adaptor 4:	2'-O-Me-4'-thio	2'-F
adaptor 5:	2'-O-MOE-4'-thio	2'-F
adaptor 6:	2'-F-4'-thio	2'-F

Figure 3. U1 アダプターの配列および修飾様式

U1 アダプターの合成が出来たので、続いてそれらの U1i 活性を評価した。Figure 2 において作製した MT 配列挿入プラスミドベクターをトランスフェクションした

Hela 細胞に対し、変異配列に相補的な mRNA 前駆体結合領域と U1snRNA 結合領域を有する U1 アダプターをトランスフェクションする。すると、U1 アダプターは mRNA 前駆体の挿入配列部分に配列特異的に結合する。そして、U1 アダプターの U1snRNA 結合配列に内在性の U1snRNA が結合することで、U1i が引き起こされ、遺伝子発現抑制が誘導される。なおアッセイでは、標的である MT 配列を 3 つタンデムに挿入した MT×3 プラスミドベクターを用いることにした。

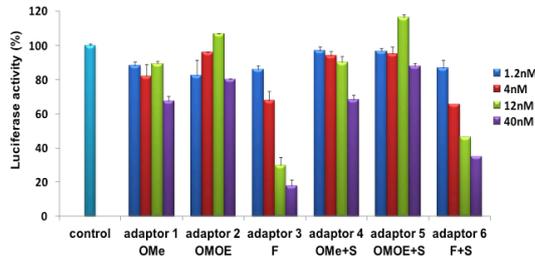


Figure 4. U1アダプターを用いたU1i活性評価

Figure 4 に、U1 アダプターのトランスフェクション 24 時間後において、control の発光強度を 100 とした時の各 U1 アダプターのルシフェラーゼの発光強度を示した。その結果、adaptor 2 (2'-O-MOE 修飾) と adaptor 5 (2'-O-MOE-4'-チオ修飾) ではルシフェラーゼ活性の低下が全く確認されなかった。また、adaptor 1 (2'-O-Me 修飾) と adaptor 4 (2'-O-Me-4'-チオ修飾) では、40nM 投与時に若干ながらルシフェラーゼ活性の低下が観測されたが、優位な遺伝子発現抑制効果は確認されなかった。一方で、adaptor 3 (2'-F 修飾) と adaptor 6 (2'-F-4'-チオ修飾) に関しては濃度依存的な遺伝子発現抑制効果が確認された。adaptor 6 の 50%阻害濃度 (IC₅₀) は 9.6nM であり、adaptor 3 の IC₅₀ (6.7nM) とほぼ同等の遺伝子発現抑制を示した。さらに、2'-F-4'-チオ修飾オリゴマーは、2'-F 修飾オリゴマーに比べ、ヌクレアーゼ抵抗性が高いことから、経時的に U1i 活性を評価することで adaptor 6 は adaptor 3 よりも高い遺伝子発現抑制効果を示すことが予想される。

本研究で合成した U1 アダプター分子は、mRNA 前駆体上に U1snRNA を誘導することで遺伝子発現を抑制したと考えられる。しかし、mRNA 上に U1 アダプターが結合することにより、アンチセンス分子として遺伝子発現を抑制している可能性も考えられた。そこで、その可能性を否定するために以下のような実験を行なった。つまり、U1 アダプターは mRNA 結合部位と U1snRNA 結合部位の両方を有することで活性を示している (Figure 5a) と考えられ

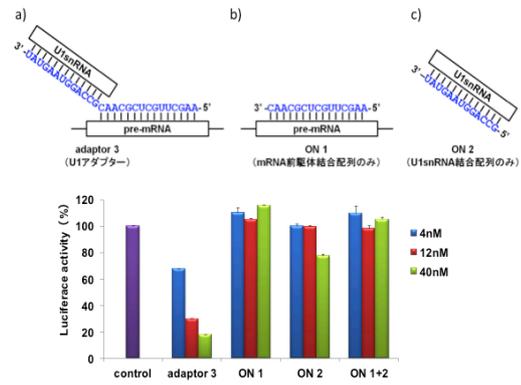


Figure 5. U1i機構による遺伝子発現抑制の検証

るが、アンチセンス分子として働いているのであれば Figure 5b, c に示したように、それぞれの結合部位のみで活性を示すはずである。そこで、これら配列の分子を合成しその活性を比較することにした。その結果、adaptor 3 では濃度依存的な遺伝子発現抑制が見られたのに対し、ON 1, 2 または、ON 1 と 2 を同時にトランスフェクションした場合には、ルシフェラーゼ発光の低下はほとんど観察されなかった (Figure 5)。U1snRNA 結合配列のみからなる ON1 や mRNA 結合配列のみからなる ON 2 で遺伝子発現抑制が見られないことより、adaptor 3 はアンチセンス分子としてではなく、U1 アダプターとして U1i により遺伝子発現抑制を引き起こしているということが明らかになった。

(4) U1 アダプターの活性とハイブリダイゼーション能の相関: U1 アダプターを設計する際に重要であると考えられるアダプター分子の性質は、相補的な RNA 分子とのハイブリダーゼーション能である。そこで、活性評価を行った 6 種類の U1 アダプターを用い一本鎖 RNA を相補鎖とした二本鎖の熱的安定性について、50%融解温度 (T_m 値) を測定・比較した。Figure 6 に示した mRNA 前駆体結合配列に相補的な 15 mer の RNA と U1snRNA 結合配列に相補的な 13 mer の RNA についてそれぞれ二本鎖を組ませ測定を行った (Table 1, 2)。

その結果、15 mer の mRNA 前駆体結合配列に対する天然型 RNA : RNA 二本鎖の T_m 値は 73.8 °Cであったのに対し、Figure 19 のアッセイにおいて最も U1i 活性の高かった adaptor 3 (2'-F 修飾) の T_m 値は 86.7 °Cとなり、12.9 °C高くなった。また、そのハイブリッド型修飾核酸である 2'-F-4'チオ RNA を含む adaptor 6 の T_m 値は 88.4 °Cとなり、天然型 RNA と比べ 14.6 °C高くなった。その他の修飾核酸に関しても、これまでの我々の実験結果を支持する結果となった (Table 1)。一方で、13 mer の U1snRNA

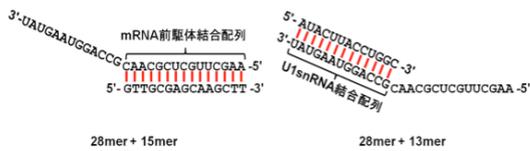


Figure 6. ハイブリダイゼーション能の評価に用いたオリゴマーの配列

duplexes	Tm (°C)	ΔTm (°C)
RNA : RNA	73.8 ± 0.2	
RNA : adaptor 1	81.5 ± 0.1	7.7
RNA : adaptor 2	82.9 ± 0.5	9.1
RNA : adaptor 3	86.7 ± 0.1	12.9
RNA : adaptor 4	84.7 ± 0.0	10.9
RNA : adaptor 5	82.0 ± 0.1	8.2
RNA : adaptor 6	88.4 ± 0.2	14.6

Table 1. 28mer:15merのTm値

duplexes	Tm (°C)	ΔTm (°C)
RNA : RNA	64.2 ± 0.1	
RNA : adaptor 1	71.1 ± 0.4	6.9
RNA : adaptor 2	71.3 ± 0.2	7.1
RNA : adaptor 3	74.5 ± 0.3	10.3
RNA : adaptor 4	75.3 ± 0.6	11.1
RNA : adaptor 5	73.9 ± 0.4	9.7
RNA : adaptor 6	76.9 ± 0.2	12.7

Table 2. 28mer:13merのTm値

結合配列に対する T_m 値の場合では、2'-O-MOE 修飾を施した adaptor 2 の T_m 値が 71.3 °C となり、天然型二本鎖の T_m 値よりも 7.1 °C 上昇した。また、2'-O-MOE-4'-チオ修飾を施した adaptor 5 の T_m 値は 73.9 °C となり天然型二本鎖の T_m 値よりも 9.7 °C 上昇し、adaptor 2 よりも高い T_m 値を示した (Table 2)。以上の結果より、今回合成した U1 アダプターは、全て天然型の RNA 二本鎖に比べ T_m 値は向上した。 T_m 値では adaptor 6 (2'-F-4'-チオ修飾) が最も高い値を示したのに対し、U1i 活性では adaptor 3 (2'-F 修飾) が最も高い活性を示した。また、高い U1i 活性を示した adaptor 3, 6 以外の U1i アダプターの間に、僅かしか T_m 値の差が見られなかった。このことから、U1i 活性には T_m 値以外の何か他の要因が大きく関わっていることが考えられ、更なる検討が必要と思われる。

(5) スプライシング異常の校正能を有する U1 アダプターの創製に向けて：以上述べたように、U1 アダプターによる U1i 法の検討を行い、2'-F RNA や 2'-F-4'-チオ RNA を含む U1 アダプターが高い U1i 活性を示すことを明らかにした。このことより、これらの修飾 U1 アダプターを用いることで、U1snRNA を任意の部位へリクルートする

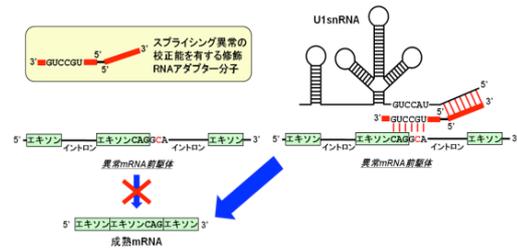


Figure 7. アダプター分子を用いたスプライシング異常の校正

ことが可能であるということが明らかとなった。そこで本研究課題の最終目的である、U1 アダプターをスプライシング異常の校正能を有する核酸分子として機能させることを計画した。つまり、U1 アダプターを用いて、U1snRNA を変異 mRNA 前駆体上の 5' スプライス部位へとリクルートすることにより、スプライシング異常を校正することが出来ると考えた (Figure 7)。このアダプター分子は短鎖の RNA である為、化学合成が容易であり、化学修飾核酸を用いることで免疫応答の賦活化を抑えることも可能である。さらに、改変型の U1snRNA ではなく、生体内に存在する野生型の U1snRNA を使用できるということも大きな利点であると考えられる。

このアダプター分子は、U1 アダプターと同様に、U1snRNA のリクルート能が重要となることから、前章の U1i 活性評価において高い活性を示した 2'-F RNA と 2'-F-4'-チオ RNA を用いて合成することにした。また、これらアダプター分子は構造的特徴として、head-to-head 型 (5'-5'結合型) 構造を有している必要があると考えられる。そこでまず、head-to-head 型オリゴマーの合成を検討することにした。

(6) head-to-head 型オリゴマーの合成検討：head-to-head 型オリゴマーは、アセチレンとアジドを有するヌクレオシドユニットを 5' 末端に導入した 2 本のオリゴマーを Huisgen 反応により結合させることで合成することにした。

まず DNA オリゴマーを用いてモノアジド化の検討を行った。すなわち CPG 樹脂に担持された DNA オリゴマー (ODN 1)

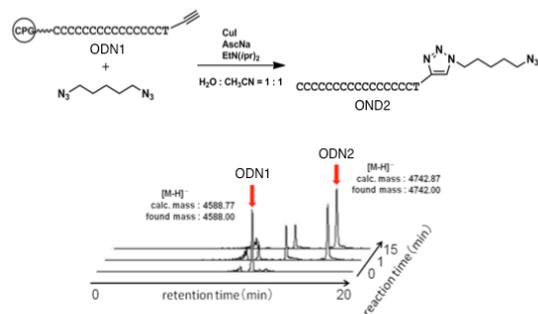


Figure 8. Huisgen反応によるモノアジド化オリゴマーの合成検討

を過剰量の 1,5-ジアジドペンタン存在下、huigen 反応の条件に付したところ、15分という短時間で目的のモノアジドオリゴマー (ODN 2) を合成することに成功した (Figure 8)。得られた ODN2 を用いた head-to-head 型オリゴマーの合成については検討中である。

(7) おわりに：申請者らはハイブリッド型 4'-チオ核酸が高いハイブリダーゼクション能を有し、U1 snRNA と mRNA を会合させるアダプター分子として機能し、U1i 機構による遺伝子発現抑制を誘起することを明らかにした。今後は、このハイブリッド型 4'-チオ核酸を用いて、bis-azide linker を用いた huigen 反応を行うことで、head-to-head 型オリゴマーを合成し、スプライシング異常の校正能を有するアダプター分子としての応用を検討していきたいと考えている。

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 7 件)

- ① Mayumi Takahashi, Chisato Nagai, Hiroto Hatakeyama, Noriaki Minakawa, Hideyoshi Harashima and Akira Matsuda, Intracellular stability of 2'-OMe-4'-thioribonucleoside modified siRNA leads to long-term RNAi effect. *Nucleic Acids Res.* **2012**, 40, 5787-5793. (査読有)
(doi:10.1093/nar/gks204)
- ② Noriko Tarashima, Yosuke Higuchi, Yasuo Komatsu, and Noriaki Minakawa, A practical post-modification synthesis of oligodeoxynucleotides containing 4,7-diaminoimidazo[5',4':4,5]pyrido[2,3-d]pyrimidine nucleoside. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 7095-7100. (査読有)
(doi: 10.1016/j.bmc.2012.10.035.)
- ③ Yasuyuki Hirama, Noriaki Minakawa, and Akira Matsuda, Synthesis and characterization of oligodeoxynucleotides containing a novel tetraazabenzoc[d]azulene:naphthyridine base pair. *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, 19, 352-358. (査読有)
(doi: 10.1016/j.bmc.2010.11.023.)
- ④ Kazuyuki Kuramoto, Noriko Tarashima, Yasuyuki Hirama, Yusaku Kikuchi, Noriaki Minakawa, and Akira Matsuda, New imidazopyridopyrimidine: naphthyridine base-pairing motif, Im^N:NaO⁰, consisting of a

DAAD:ADDA hydrogen bonding pattern, markedly stabilize DNA duplexes. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 10818-10820. (査読有)
(doi: 10.1039/c1cc13805g)

[学会発表] (計 27 件)

- ① Yusaku Kikuchi, Naoshi Yamazaki, Yoshiharu Takiguchi, Noriaki Minakawa, Gene silencing by 2'-modified-4'-thio oligonucleotides via U1i machinery. 2012.11/15-11/17, 第 39 回国際核酸化学シンポジウム、名古屋大学豊田講堂、名古屋市
- ② A. Matsuda, M. Takahashi, N. Minakawa, H. Hatakeyama, M. Murata, Y. Sato, H. Harashima, 2'-O-Me-4'-thioRNA as a Potential Use for Oligonucleotide Therapeutics. 2012.10/28-10/31. 8th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutic Society, The conference center at Harvard Medical School, Boston, USA
- ③ 菊地優作、山崎尚志、滝口祥令、南川典昭、2'-F-4'-チオヌクレオシドを含むキメラ型オリゴマーの合成と性質、2012.3/29-3/31、日本薬学会第 132 年会、北海道大学、札幌市

[その他]

ホームページ；

<http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/lab0/mar/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南川 典昭 (MINAKAWA NORIAKI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：40209820

(2) 研究分担者

伊藤 孝司 (ITOHI KOJI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：00184656

山崎 尚志 (YAMAZAKI NAOSHI)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：20271083