

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：34413

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790121

研究課題名(和文)細胞内還元環境に応答して活性化する siRNA 創薬の開発

研究課題名(英文)Development of prodrug-siRNA activated by intracellular reducing environment

研究代表者

中川 治(Nakagawa, Osamu)

大阪薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：90380691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：次世代型の核酸医薬として期待されているRNA干渉法への応用を目指し、本代表者らはプロドラッグ型RNA分子：2'-O-メチルジチオメチル(MDTM)-RNAの開発を行ってきた。MDTM-RNAは、血清中で優れた安定性を示し、細胞内環境に酷似したグルタチオン還元環境下で速やかに天然型RNAへ変換が可能であった。更に本分子は天然型RNAに匹敵する優れた二重鎖親和性を示し、プロドラッグ分子として十分な基礎特性を有していた。また安定前駆体としてオリゴ核酸に導入した後に、MDTM-RNAへ効率よく変換可能な“オリゴ合成後修飾法”の開発にも成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed 2'-O-methyldithiomethyl (MDTM)-RNA as a prodrug-RNA. The MDTM-RNAs showed high stability under fetal bovine serum, and were easily converted into native-RNAs under glutathione reducing condition found in the intracellular environment. In addition, the MDTM-RNAs showed enough affinity toward complementary RNA. The synthesis of MDTM-RNAs was effectively achieved by a post-synthetic approach. The MDTM-RNA might be an excellent candidate for RNA technologies such as RNA interference.

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 siRNA プロドラッグ 機能性核酸 核酸化学

1. 研究開始当初の背景

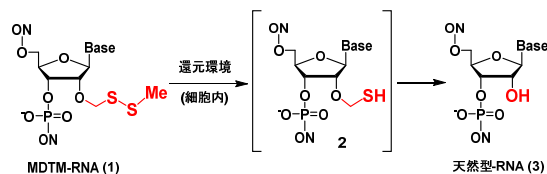
RNA 干渉 (RNAi) 法は、20 mer 程度の二本鎖 RNA (siRNA) を細胞内に導入すると内因性タンパク質と複合体である RISC を形成し、相補的な mRNA を切断することで、特定の遺伝子発現を抑制する手法である。これは従来のアンチセンス法と比較し、低濃度下で効率よく作用することから次世代型の核酸医薬として期待されている。しかし RNA を核酸医薬へ展開する場合、RNA 自身の分解酵素に対する不安定性克服が極めて重要となる。更に、機能性人工核酸を RNAi 法へ応用する場合、関連する酵素系に厳密に認識される必要があることから、従来のアンチセンス法にない特有の機能が要求される。そのような背景下、本代表者らは、十分な酵素耐性を有し、細胞内の還元環境下で活性化することで十分な RNAi 活性を示す“プロドラッグ型 RNA 分子：2'-O-メチルジチオメチル (MDTM)-RNA”を設計し、開発を進めてきた。

2. 研究の目的

RNAi 法に基づいた核酸医薬の開発において、RNA 自身の分解酵素に対する不安定性克服と、細胞内での十分な RNAi 活性の発現の両立が極めて重要な鍵となる。本代表者らは、酵素耐性を有する前駆体から細胞内の還元環境をスイッチとして native (天然)-RNA へと自発的に化学変化し活性化するプロドラッグ型人工 RNA 分子：2'-O-MDTM-RNA (1) を設計した。本研究は、1 の効率的合成法の確立と、プロドラッグ型分子としての物性を評価し、将来的に細胞を用いた RNAi 法へ展開し、RNA 医薬の発展に貢献できる分子とすることを目的とする。

3. 研究の方法

スキーム 2 に、2'-O-MDTM-オリゴヌクレオチド (ON) (1) の合成を示す。2,4,6-トリメトキシベンジルチオメチル (TMBTM) 基を有するウリジン誘導体 (6) の合成し、DNA/RNA 自動合成機を用いてオリゴヌクレオチドへ導入した。合成した 2'-O-TMBTM-ON (7) は HPLC にて分析・精製し、MALDI-TOF MS にてその構造を決定した。次に 2'-O-TMBTM-ON (7) を酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4) 中、



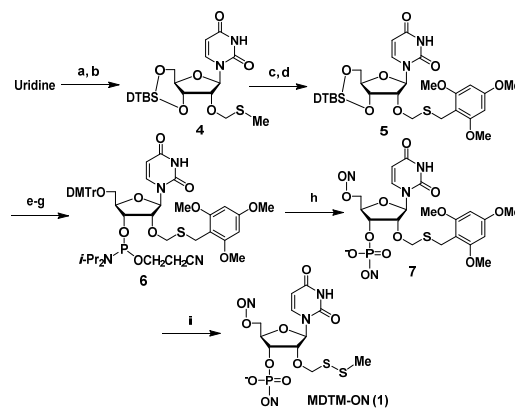
スキーム 1. プロドラッグ型人工 RNA 分子：2'-O-MDTM-RNA の設計コンセプト。

dimethyl(methylthio)sulfonium tetrafluoroborate (DMTSF) を作用させることで MDTM 基への変換反応を行い、HPLC にて反応を追跡した。2'-O-MDTM 体 (1) の構造は MALDI-TOF MS にて確認した。酵素耐性評価はチミジン dT-10 mer [5'-d(TTTTTTXXT)-3' (X: 2'-O-MDTM-uridine or thymidine)] の配列を用い、一定時間ごとに反応液の一部をとり反応を停止させ、HPLC にて解析した。還元条件 [10 mM グルタチオン (還元型, pH 7), 及び 100 mM ジチオトレイトール (pH 8)] 下における 2'-OH-ON (天然型 RNA) への変換反応は HPLC にて反応を追跡した。

4. 研究成果

本代表者らの設計した“プロドラッグ型 RNA 分子：2'-O-MDTM-ON (1)”は、細胞内の高濃度なグルタチオン還元環境 (1-10 mM)¹⁾ をスイッチとして天然型 RNA への変換を期待した分子である。具体的に 2'-O-MDTM-ON (1) のジスルフィド (S-S) 部位が還元環境下で切断され、不安定なチオヘミアセタール体 (2) を経て native (天然)-RNA (3) へと化学変化するものと考えた (スキーム 1)。一般に核酸糖部の 2' 位水酸基への修飾は、酵素耐性能が向上することから、²⁾ 本分子は細胞内導入まで十分な酵素耐性を示し、細胞内で天然型 RNA へと速やかに変換され、十分な RNAi 活性を示すものと考えられる。

そこで核酸糖部の 2' 位水酸基に MDTM 基を導入したウリジン誘導体を合成し、オリゴ合成導入前駆体であるアミダイト体の合成を試みた。しかし三価のリン原子とジスルフィド結合間の反応により本化合物は極めて不安定であり合成が困難であった。分子内にジスルフィド結合とアミダイトが共存する化合物は分子内で酸化還元反応が起こり、安定性の面で問題があると幾つか報告例がある



スキーム 2. 2'-O-MDTM-ON の合成。

条件: (a) DTBS(OTf)₂, DMF; (b) DMSO, Ac₂O, AcOH; (c) SO₂Cl₂, CH₂Cl₂; (d) 2,4,6-(MeO)₃BnSH, NaH, DMF; (e) Et₃N·3HF, THF; (f) DMTTrCl, pyridine; (g) (*i*-Pr₂N)₂POCE, diisopropylammonium tetrazolide, CH₂Cl₂; (h) DNA/RNA 自動合成機, HPLC 精製; (i) DMTSF, 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4)。

ことから、³⁾ 本分子の創製には新たな合成法の開発が必要とされた。そこで本代表者らは、オリゴヌクレオチドへ安定前駆体として導入した後に MDTM 基へ変換可能な独自の“オリゴ合成後修飾法 (ポストシンセシス法)”を考案し、容易に大量合成可能な実用性の高い合成法を開発することにした。また、プロドラッグ RNA 素子として必要とされる 2'-O-MDTM-ON (1) の各種物性評価を行った。

“オリゴ合成後修飾法”によるメチルジチオメチル (MDTM) 基への変換のための前駆体として要求される条件として、オリゴヌクレオチド伸長反応上で使用される各種試薬 [トリクロロ酢酸溶液, ヨウ素溶液, キャップ化 (アセチル化) 試薬, カップリング試薬 (1*H*-テトラゾール) 等] による暴露に十分耐え得ること、CPG 樹脂からの切出しの際の熱アンモニア水に対して安定性を有することが要求される。更にオリゴヌクレオチドは水溶性であることから、水系溶媒中でジスルフィド化が可能な条件が必要とされる。そこで、これらの条件を満たす前駆体の 2' 位導入基として 2,4,6-トリメトキシベンジルチオメチル (TMBTM) 基を設計した。本導入基は、Bishop ら⁴⁾ のモノメトキシベンジルチオメチル基から dimethyl(methylthio)sulfonium tetrafluoroborate (DMTSF) を利用して MDTM 基へ変換する手法を参考にし、核酸のために本代表者らが独自に改良を施し最適化したものである。予備検討として、3', 5' 位を環状シリル保護したウリジンの 2' 位水酸基に TMBTM 基を導入した誘導体を、水溶性溶媒中で DMTSF 処理を施すと副反応を生じることなく数分以内に極めて迅速に MDTM 基へ変換可能であった。そこで TMBTM 基を有するウリジン誘導体のアミダイト体 (6) の合成を行った (スキーム 2)。ウリジンを出発原料とし 3', 5' 位を di-*tert*-butylsilyl (DTBS) 基にて保護した後、ジメチルスルホキド、無水酢酸、酢酸を作用させることで、2'-O-メチルチオメチル体 4 を得た。続いて、塩化スルフリルと反応させることで、2'-O-クロルメチル体へと変換した後、直ちに 2,4,6-トリメトキシベンジルメルカプタンに水素化ナトリウムを加えた溶液に添加することで、収率よく 2'-O-TMBTM-ウリジン (5) を得た。続いて定法に従い、DTBS 基を脱保護した後、5' 位水酸基の 4,4'-ジメトキシトリチル化、3' 位水酸基のアミダイト化を行い、オリゴ合成導入前駆体である 6 を首尾よく得ることに成功した。アミダイト体 6 は、オリゴ縮合反応時に用いる無水アセトニトリル中で極めて安定であり、長鎖のオリゴ合成サイクルに十分組み込めるだけの安定性を有していた。続いてアミダイト体 6 を DNA/RNA 自動合成機にて、活性化剤として 5-エチルチオ-1*H*-テトラゾール (ETT) を用い、縮合反応時間を延長することで、天然 DNA と同等の効率にて縮合反応が進行した。続いて 28% アンモ

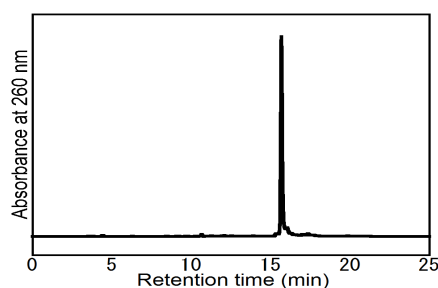


図 1. HPLC データ (2'-O-TMBTM-ON, アンモニア処理後, 精製前). 配列: 5'-d(GCGTTXTXTGCT)-3' (X: 2'-O-TMBTM-uridine).

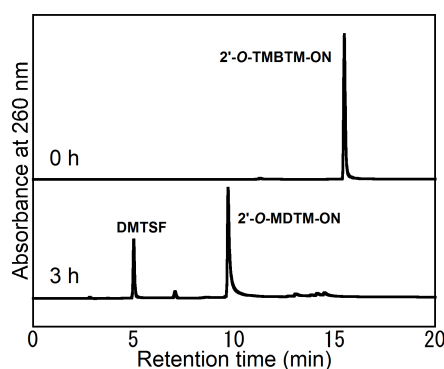


図 2. HPLC データ (MDTM 基への変換反応). 配列: 5'-d(GCGTTXTXTGCT)-3' (X: 2'-O-TMBTM-uridine → 2'-O-MDTM-uridine).

ニア水 (55°C, 10 時間) で CPG 樹脂から切出し、HPLC にて解析したところ、オリゴヌクレオチド配列に 1-3 個導入したものは、副反応や分解物を生じることなく天然 DNA 合成に匹敵する極めて高いグレードにて合成可能であった (図 1)。

次に、dT-10 mer の 2'-O-TMBTM-ON に水中で DMTSF を作用させたところ、副反応を生じることなく数時間で極めて効率よく MDTM 基へ変換されることが分かった。しかし、プリン塩基を含む配列中で同様な反応を行ったところ、反応は効率よく進行するもののプリン塩基の脱離したものが一部生じていた。本反応の強酸性条件によりプリン塩基が脱離したものと考え、酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4) 中で反応させると、反応速度は若干低下したものの脱プリン化を防ぐことができ、各種塩基配列に問題なく対応可能となった (図 2)。

続いて、2'-O-MDTM-ON の蛇毒 3'-エキソヌクレアーゼ (snake venom phosphodiesterase, SVPDE) に対する安定性を評価した (図 3)。天然 DNA (2'-deoxy 体) に対しては、完全長体の半減期が 20 分以内であるのに対し、2'-O-MDTM-ON は 40 分であり、2' 位水酸基に MDTM 基を導入することで有意に酵素耐性が向上することが分かった。ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum; FBS) に対しても評価したところ、SVPDE の場合と同様に優れた安定性を有していた。

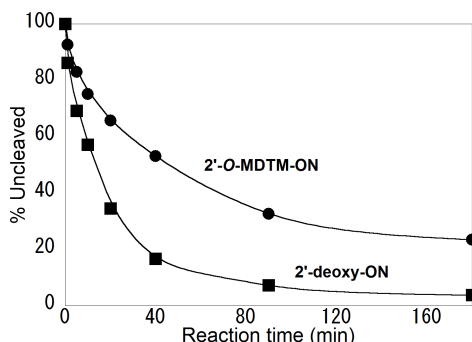


図3. 酵素耐性評価 (3'-エキソヌクレアーゼ, SVPDE). 反応条件: 10 mM MgCl₂ and 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0), each strand 12.5 nmol/ml, SVPDE (Boehringer Mannheim) 0.1 μg/ml at 37 °C. 配列: 5'-d(TTTTTTTT)X-3' [X: 2'-O-MDTM- uridine or thymidine (2'-deoxy)].

続いて、2'-O-MDTM-ON に 100 mM ジチオトレイトール (DTT) (pH 8) を添加したところ、数分以内に極めて速やかに 2'-OH 体 (native-RNA) へ変化することが分かった (図4)。更に、細胞内条件である 10 mM グルタチン (還元型, pH 7) 中で反応させたところ、約 20 時間後には完全に 2'-OH 体へ変換した。このことから、本分子は細胞内で期待通りに 2'-OH 体へ化学変化するものと考えられる。

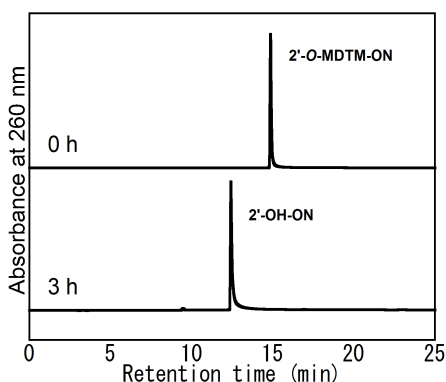


図4. HPLC分析 (DTT還元反応, pH 8). 配列: 5'-d(GCGTTXTXTGCT)-3' (X: 2'-O-MDTM-uridine → 2'-OH-uridine).

RNAi 法において、siRNA は二重鎖を形成させた状態で投与することが十分な活性発現を得る上で重要となってくる。そこで、MDTM-ON の相補鎖 RNA に対する二重鎖形成能を評価したところ、MDTM-ON は、天然型 RNA 二重鎖と同等の親和性 (融解温度, T_m) を示し、RNAi 法へ十分な性質を有していた。

一方、様々な遺伝子配列に対応するためには全核酸塩基種 (A, G, C, U) を有する 2'-O-MDTM 体の合成が不可欠である。そこで、シトシン、アデニン、グアニン塩基を有する 2'-O-TMBTM ヌクレオシドの合成を試み、ウリジン体と同様な経路にて首尾よく合

成に成功した。今後、これらをオリゴヌクレオチドに組み込み、同様に MDTM 基への変換反応を検討する。

本代表者らが開発した“オリゴ合成後修飾法”は、最終工程で MDTM 基へ変換可能であることから、本法を応用することで、種々の誘導体合成が容易となる。MDTM 体は二重鎖親和性への影響を考慮して、末端置換基は最小のメチル基としていたが、末端置換基 (R) を種々変更することで、機能性の拡張が可能となるものと考えられる。そこで、末端置換基をエチル基に変えたエチルジチオメチル (EDTM) 体の合成を試み、MDTM 体と同様に効率よく合成が可能であった。今後、様々な機能性基を導入し、プロドラッグ型 RNA 分子の機能を拡張する。

RNAi 法のためのプロドラッグ型人工核酸として、2'位にアシル基を導入した誘導体が開発されている。⁵⁾ この 2'-O-アシル化体は細胞内のエステラーゼで加水分解を受け、native-RNA (2'-OH 体) へと誘導する分子設計である。しかし、この分子は血清中のエステラーゼ⁶⁾ で分解する可能性があることから、生体への応用は困難が予想される。我々の分子の特徴は細胞内での過剰に存在するグルタチオンの還元条件下で分解し活性化するものであり、酵素反応と異なり、基質特異性を考慮する必要がないため、効率のよい分解活性が期待され、そして分子設計が容易であるという特徴をもつ。さらに既存の修飾核酸を用いた siRNA オリゴは、RNAi 機構に認識されないものが殆どであり、配列の中央に修飾した場合、劇的に活性が低下するため、RISC 認識に重要でない配列末端に修飾する必要があった。⁷⁾ しかし、本分子は、理論上、siRNA 配列のどこでも自在に修飾が可能となることから、酵素による分解が大幅に抑制できる可能性があり、その結果、低濃度下でも機能する可能性を秘めている。つまり、濃度の低下が可能となれば、細胞毒性の低減や低コスト化につながる可能性があり、RNAi 法の基盤技術として革新的な結果が期待される。

以上、本研究において、プロドラッグ型 RNA 分子として 2'-O-MDTM-RNA を設計し、細胞内と同様な還元条件下で極めて速やかに分解を受け、不安定なチオヘミアセタール体を経て 2'-OH 体 (native-RNA) へ変換することを見出した。更に本分子の合成法として、安定修飾体 2'-O-TMBTM 体としてオリゴ核酸へ導入した後に、MDTM 基へ変換可能な独自の“オリゴ合成後修飾法 (ポストシンセシス法)”を開発することに成功した。2'-O-MDTM-RNA は優れた酵素耐性を示し、プロドラッグ RNA として十分な特性を有しており、*in vivo* 応用へ向けての基礎を構築できた。

今後、本人工核酸を、細胞を用いた RNAi 法へと応用展開し、RNA 医薬としての有用性を見出す。

参考文献：

- 1) (a) R. Hong *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 1078-1079 (2006); (b) M. E. Anderson, *Chem.-Biol. Interact.*, **112**, 1-14 (1998); (c) D. P. Jones *et al.*, *Clin. Chim. Acta*, **275**, 175-184 (1998); (d) A. Meister *et al.*, *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 711-760 (1983).
- 2) L. L. Cummins *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **23**, 2019-2024 (1995).
- 3) (a) A. Semenyuk *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 12356-12357 (2006); (b) A. Semenyuk *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **48**, 469-472 (2008).
- 4) P. Bishop *et al.*, *Tetrahedron Lett.*, **34**, 4469-4472 (1993).
- 5) (a) T. Lavergne *et al.*, *J. Org. Chem.*, **76**, 5719-5731 (2011); (b) R. Johnsson *et al.*, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**, 3721-3725 (2011).
- 6) T. Tsujita *et al.*, *Eur. J. Biochem.*, **133**, 215-220 (1983).
- 7) Y.-L. Chiu *et al.*, *RNA*, **9**, 1034-1048 (2003).

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 1 件)

Yosuke Ochi, Osamu Nakagawa, Katsunori Sakaguchi, Shun-ichi Wada and Hidehito Urata, A post-synthetic approach for the synthesis of 2'-O-methylthiomethyl-modified oligonucleotides responsive to a reducing environment, *Chem. Commun.*, **49**, 7620-7622 (2013), DOI: 10.1039/c3cc43725f, 査読有.

[学会発表](計 10 件)(発表者：)

- (1) 越智洋輔, 中川 治, 和田俊一, 浦田秀仁, オリゴ合成後修飾法の拡張を指向した 2'-O-エチルジチオメチル-オリゴヌクレオチドの合成, *日本薬学会第 134 年会*, 2014 年 3 月 27-30 日, 熊本 (国内, 口頭).
- (2) 今井美恵子, 坂口勝則, 越智洋輔, 中川 治, 和田俊一, 浦田秀仁, オリゴ合成後修飾法による 2'-O-メチルジチオメチル修飾 RNA 合成と二重鎖形成能の評価, *日本薬学会第 134 年会*, 2014 年 3 月 27-30 日, 熊本 (国内, ポスター).
- (3) Osamu Nakagawa, Yosuke Ochi, Katunori Sakaguchi, Katsuma Sobu, Tomohiro Mikami, Shun-ichi Wada, Hidehito Urata, Development of 2'-O-methylthiomethyl-modified RNA as prodrug-siRNA: Reducing-Environment-Dependent Uncatalyzed Chemical Transforming RNA, "REDUCT-RNA" *40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry*, Yokohama, Japan, 2013 年 11 月 13-15 日 (国際, ポスター).
- (4) 中川 治, 越智洋輔, 坂口勝則, 惣坊克磨, 三上友寛, 和田俊一, 浦田秀仁, 2'-O-メチルジチオメチル修飾 RNA のポストシ

ンセシス法による効率的合成法の開発, *第 39 回反応と合成の進歩シンポジウム*, 福岡, 2013 年 11 月 5-6 日 (国内, 口頭).

(5) 中川 治, 越智洋輔, 坂口勝則, 惣坊克磨, 三上友寛, 和田俊一, 浦田秀仁, 2'-O-メチルジチオメチル修飾核酸の RNA 導入とプロドラッグ分子としての機能評価, *第 63 回日本薬学会 近畿支部総会・大会*, 京都, 2013 年 10 月 12 日 (国内, 口頭, 支部奨励賞受賞演題).

(6) 中川 治, 越智洋輔, 坂口勝則, 惣坊克磨, 三上友寛, 和田俊一, 浦田秀仁, siRNA への応用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修飾 RNA の合成, *第 7 回バイオ関連化学シンポジウム*, 名古屋, 2013 年 9 月 27-29 日 (国内, ポスター).

(7) 中川 治, 越智洋輔, 坂口勝則, 惣坊克磨, 三上友寛, 和田俊一, 浦田秀仁, 還元環境下でのジスルフィド結合切断に基づくプロドラッグ型人工 RNA 分子: 2'-O-メチルジチオメチル RNA の開発, *日本薬学会第 133 年会*, 横浜, 2013 年 3 月 27-30 日 (国内, ポスター, 講演ハイライト選出演題).

(8) Osamu Nakagawa, Yosuke Ochi, Katunori Sakaguchi, Shun-ichi Wada, Hidehito Urata, Synthesis and Evaluation of 2'-O-Methylthiomethyl-RNA as Prodrug-RNA Activated by Reducing Environment, *39th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry*, Nagoya, Japan, 2012 年 11 月 15-17 日 (国際, ポスター).

(9) 中川 治, 越智洋輔, 坂口勝則, 和田俊一, 浦田秀仁, 細胞内還元環境にตอบสนองし活性化するプロドラッグ型人工 RNA 分子の開発, *第 62 回日本薬学会 近畿支部総会・大会*, 兵庫, 2012 年 10 月 20 日 (国内, 口頭).

(10) 越智洋輔, 中川 治, 和田俊一, 浦田秀仁, 合成後修飾法による 2'-O-メチルジチオメチルオリゴヌクレオチドの合成, *日本薬学会第 132 年会*, 札幌, 2012 年 3 月 28-31 日 (国内, 口頭).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中川 治 (Osamu Nakagawa)
大阪薬科大学 薬学部・助手
研究者番号： 90380691