

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04656

研究課題名(和文) iRed/iPedの完全化学合成を基軸とした実践的対がん創薬基盤研究

研究課題名(英文) Investigation of practical anticancer strategy based on chemically synthesized iRed/iPed

研究代表者

南川 典昭(MINAKAWA, Noriaki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学系)・教授

研究者番号：40209820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、機能性RNAを細胞内で発現可能なDNAデバイス(iRed)の更なる機能強化を目的に研究を行なった。その結果、(1) iRedの安定化を目的とした環状化、(2) iRedの完全化学合成、(3) 革新的デリバリー法との組合せによる新規がん治療薬創製の探索、さらに(4) このデバイスを、機能性ペプチド/ペプチド/プロテインを発現するiPedへと進化させる可能性を実証した。

研究成果の概要(英文)：In this study, research was conducted to further enhance the function of a DNA device (iRed) capable of expressing functional RNA in cells. As a result, (1) cyclization aimed at stabilizing iRed, (2) complete chemical synthesis of iRed, (3) searching for new cancer therapeutic drugs by combination with innovative delivery method, and (4) possibility to evolve this device to iPeds expressing functional peptide/protein were demonstrated.

研究分野：創薬化学

キーワード：核酸創薬 DNAデバイス 化学合成 RNAi創薬

### 1. 研究開始当初の背景

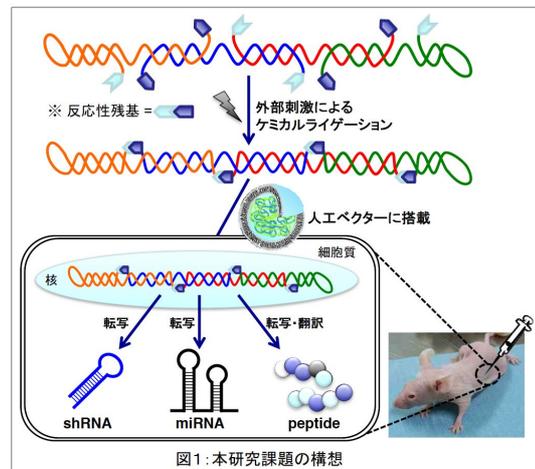
核酸を用いた医薬品(核酸医薬品)は、次世代の医薬品として期待が高い。中でもRNA干渉(RNAi)機構を利用する方法は、低濃度で目的の遺伝子発現抑制を実現できることから多くの核酸創薬研究が行われている。このアプローチで遺伝子の発現を抑制する場合、一般的には化学合成した small interfering RNA (siRNA) が用いられる。しかし siRNA は生体内で速やかに代謝・排泄されてしまうという欠点がある。RNAi 機構により遺伝子発現抑制を誘起する別法として細胞内で short-hairpin RNA (shRNA) を発現するプラスミド DNA を用いる手法がある。この手法では、理論的には1分子でもプラスミド DNA を細胞核内に導入できれば shRNA の持続発現が可能であり、RNAi 効果の持続性が期待できる。しかし、巨大なプラスミド DNA を細胞核内に導入することの難しさに加えて、プラスミド DNA 由来の毒性発現(CpG モチーフによる自然免疫応答など)が懸念される。

これらの研究背景を鑑み、研究代表者の南川は、shRNA 発現プラスミド DNA の長所(RNAi 効果の持続性)を活かしつつ、その欠点を回避できる新しいデバイス(intelligent shRNA expression device; iRed)の創製とそれを利用した対がん RNAi 創薬実現に向けた研究を行ってきた。この iRed は、ヌクレアーゼ抵抗性の 4'-チオ DNA によって最小化されており、これにより生体内安定性が向上し、持続的な遺伝子発現抑制効果が観察された。また 4'-チオ化修飾することで生体投与時の自然免疫応答をほぼ完全に回避することにも成功した。最終的に、この iRed を、共同研究者の石田が開発した革新的デリバリー法によって腫瘍に選択的に送達することで、マウスを用いた in vivo 評価系でも効果があることを確認できた。

### 2. 研究の目的

研究代表者の南川が開発した iRed は RNAi 効果の持続性に加えて免疫応答回避能を有したすぐれたナノ DNA デバイス(DNA 医薬候補分子)であることが明らかとなった。しかしこの iRed は、4'-チオ化修飾されているとはいえ、二本鎖であるので両末端部分から解離あるいは分解を受ける可能性がある。またさらなる医薬展開のためには、iRed の量的供給と日米 EU 医薬品規制(ICH)の観点から PCR というバイオプロセスの回避が喫緊の課題と考えられた。そこで本研究では、(1) iRed の安定化を目的とした環状化、(2) iRed の完全化学合成によるバイオプロセスの回避を第一の目標と設定した。(3) またこれを革新的デリバリー法により腫瘍内へ送達することで、新規がん治療薬創製をめざす。(4) さらにこのデバイスを、機能性ペプチド(ひいてはタンパク)を発現する iPed (intelligent peptide/protein expressing device)へと進化させ、

がん治療の包括的創薬手法を開発する(図1)。これにより有機合成化学で挑む次世代医薬品創製の基盤技術を確立する。



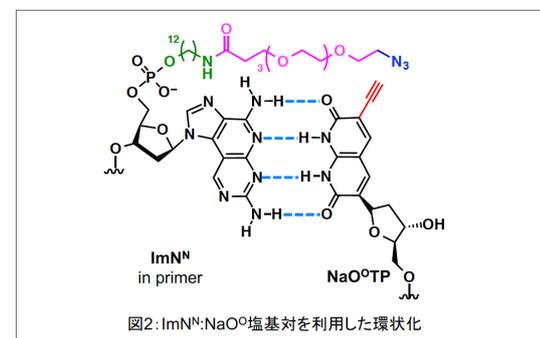
### 3. 研究の方法

本研究課題の目標と達成するために、まず我々が別途開発した第3番目の塩基対(ImN<sup>N</sup>:NaO<sup>O</sup>)を用いて iRed の環状化を検討する。また iRed の完全化学合成に向けては、モデル配列を用いて各種ケミカルライゲーション反応を検討後、最適条件を用いて iRed の完全化学合成に挑む。また調製した iRed の腫瘍内特異的送達に立脚した実用化に向けた in vivo 研究を行なう。さらにこの概念を、転写・翻訳を介して機能性ペプチド/プロテインを産生する iPed 戦略へと発展させるべく、iPed の調製と評価を行なう。

### 4. 研究成果

#### (1) iRed の安定化を目的とした環状化

両末端を結合させ環状化させるために我々が別途開発した第3番目の塩基対(ImN<sup>N</sup>:NaO<sup>O</sup>)を用いることにした(図2)。この ImN<sup>N</sup>:NaO<sup>O</sup> 塩基対は天然には存在しない4本の水素結合によって塩基対を形成できる。さらに芳香環の広がりによるスタッキング効果によってこれを導入した二本鎖 DNA を熱的に安定化することができる。従って、この ImN<sup>N</sup>:NaO<sup>O</sup> 塩基対を二本鎖 DNA の両末端に導入し、さらにそれぞれの末端に反応性残基を結合させれば環状化が実現できると考えた。



まず 5'末端に ImN<sup>N</sup> を含む短鎖オリゴマーを合成した。さらにその末端にアルキルテザ

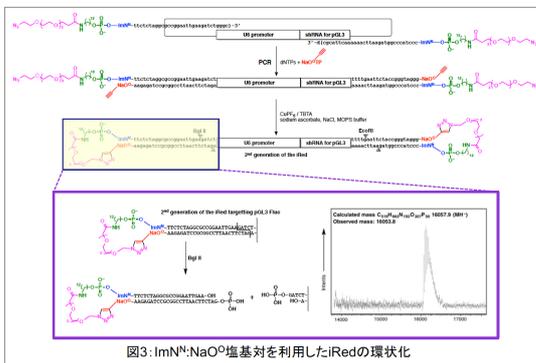


図3: ImN<sup>N</sup>:NaO<sup>O</sup>塩基対を利用したiRedの環状化

ーを介してアジド基を導入し、PCRにおけるprimer鎖とした。一方、NaO<sup>O</sup>についてはナフチリジン環の6位にエチニル基を導入した化合物の三リン酸体 (NaO<sup>O</sup>TP) を合成し、dNTPと共にPCRによるiRedの増幅条件に附した。その結果、NaO<sup>O</sup>TP存在下でも滞りなくPCRの進行が確認された。得られたPCR産物は、5'末端にアジド基、3'末端にエチニル基を有していると考えられる。そこでそのPCR産物をMOPS緩衝液中、銅触媒によるCuAAC (copper-catalyzed alkyne-azido cycloaddition) 反応の条件に附し、環状化を行なった。反応の進行をゲル電気泳動によって追跡しようと試みたが、反応前と反応後でPCR産物の移動度に変化は見られずCuAAC反応の進行を確認することは出来なかった。そこで反応後の生成物を制限酵素 (Bgl II ならびに EcoR I) で処理することにした。調製したPCR産物の両末端近傍にはこれら制限酵素の認識配列が存在するため、狙い通り環状化が進行していればhairpin型の断片が得られると考えた。CuAAC反応に附した後の生成物をBgl IIと処理し、反応液をMALDI TOF MSで確認したところhairpin型の断片に対応する分子量が観察された (図3)。同様にEcoR Iで処理した場合にはもう一方の末端部が環状化されたことを支持する分子量が観察された。これによりiRedの環状化の成功を確認できた。

上記のようにImN<sup>N</sup>:NaO<sup>O</sup>塩基対とCuAAC反応を組み合わせることでiRedの環状化を達成できた。しかしPCRによる増幅過程でNaO<sup>O</sup>TPがミスインコーポレーションしている可能性が考えられる。その場合、iRedからの転写過程で正しいshRNAが産生されず結果的にRNAi機構による遺伝子発現抑制が観

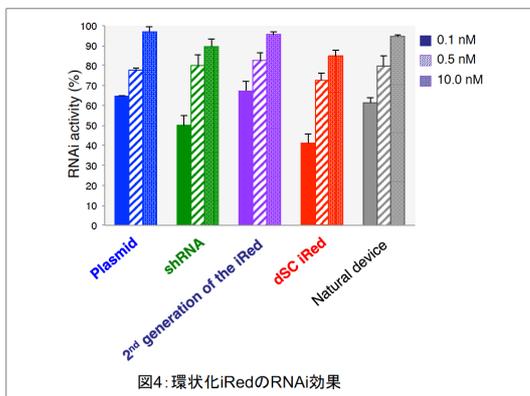


図4: 環状化iRedのRNAi効果

察されないはずである。そこで調製した環状化iRed (2<sup>nd</sup> generation of the iRed) のRNAi効果を評価した (図4)。その結果、環状化iRedは、化学合成したshRNAや非環状のiRed (dSC iRedやNatural device) よりも強いRNAi効果を示し、その効果はプラスミド (Plasmid) に匹敵することが明らかとなった。

## (2) iRedの完全化学合成

iRedの完全化学合成については、図5に示した4つのライゲーション反応をまずモデルオリゴマーを用いて検討することにした。反応①はiRedの環状化で利用したCuAAC反応によりテトラゾール環を介して二本鎖を連結させるものである。反応②は、保護されたホスホロチオエート (PS) 基とヨードアセチル基とを反応させる反応である。反応③は、同様に保護されたPS基と一級アミンを反応させることでホスホoramidate型の結合によって二本鎖を連結させるものである。さらに反応④では、一級アミンを一級アルコールとすることで天然型核酸と同じリン酸ジエステル結合で二本鎖を連結させるものであり、これが最も理想的なライゲーション反応条件である。

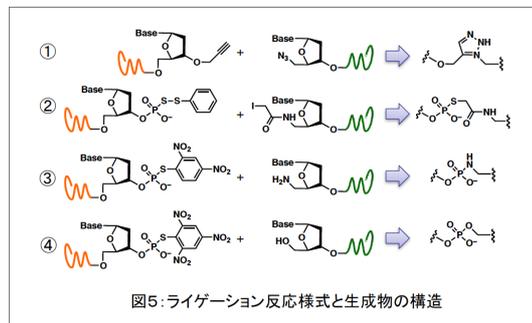
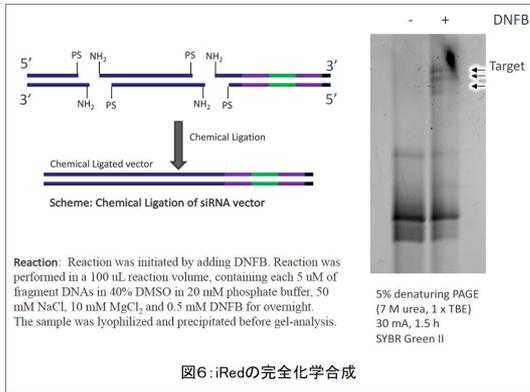


図5: ライゲーション反応様式と生成物の構造

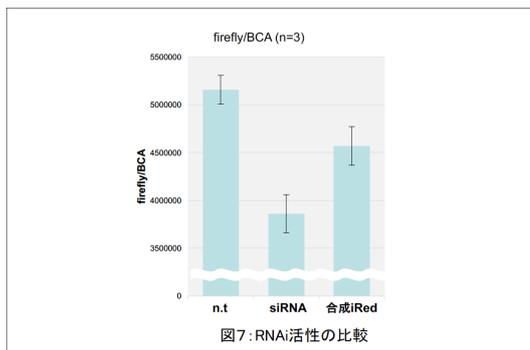
反応を種々検討した結果、反応①と②では基質の合成の手間や収率、またライゲーション反応の効率の点でiRedの完全化学合成には不向きであると判断した。また反応③も、基質合成の点では最も簡便ではあるが、ライゲーション反応の効率を向上させるには至らなかった。従って、より求核性の高い一級アミンを用いる反応③を用いることとし、反応条件の更なる精査を行なった。その結果、リン酸緩衝液 (pH 8.0) 中反応を行なった場合、収率よくライゲーション反応が進行することを見出した。

最適化した反応条件を用いてiRedの完全化学合成を検討した。合成するiRedは、SV40プロモーターとルシフェラーゼを標的とするshRNAコーディング領域を含む、計258merの二本鎖DNAであり、6つのフラグメントに分割し、これらをアニーリング後、一気にiRedを構築することにした。図6の脚注に記載した条件で一晩反応を行なった。反応液を凍結乾燥ならびにエタノール沈殿を行なった後、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析を行なったところ、目的とするiRedに対応するバンドが確認でき、これによ

り iRed の完全化学合成に成功した。



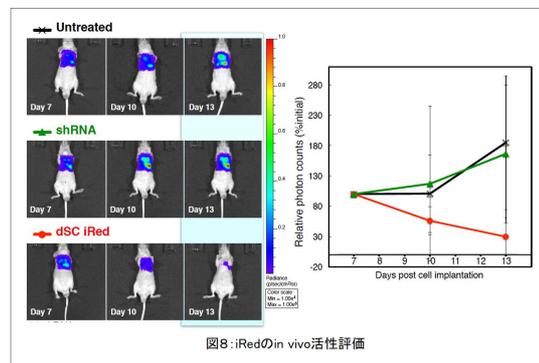
さらに得られた完全化学合成 iRed の RNAi 活性の評価を行なった。siRNA を比較対象として、それぞれをリポフェクトアミンによりトランスフェクションしルシフェラーゼアッセイによって遺伝子発現抑制効果を観察した。その結果、siRNA には及ばないものの RNAi 効果を観察することができた (図7)。この結果については、合成 iRed の精製が不十分であったことがその原因と考えている。引き続き、iRed の完全化学合成ならびにその精製の検討を行なっていく予定である。



### (3)革新的デリバリー法を用いた iRed の腫瘍内送達

iRed を用いた RNAi 効果の評価実験の最大のボトルネックは、その量的供給である。残念ながら環状化 iRed ならびに完全化学合成 iRed についてはマウスを用いた in vivo 評価を行なうための十分量を調製するには至らなかった。一方、PCR で調製する非環状の iRed については PCR 条件の精査ができ、ある程度の量的供給が可能となったので in vivo 活性の再評価を行なった。

ヒト胸膜中皮腫細胞 (MOST-211H-Luc) を胸腔内に移植した胸膜中皮腫モデルマウスにおいて、腫瘍移植後、8日目と11日目に iRed を胸腔内に投与し、移植後7日目、10日目および13日目にルシフェラーゼ活性を観察した。まず、無処置のコントロール群では、腫瘍の増殖に応じたルシフェラーゼ活性の増強が観察された。一方、iRed を投与したマウスでは顕著なルシフェラーゼ遺伝子発現抑制効果が観察された。また、比較対象として等モル量の化学合成 shRNA を投与した場合には顕著なルシフェラーゼ活性の減

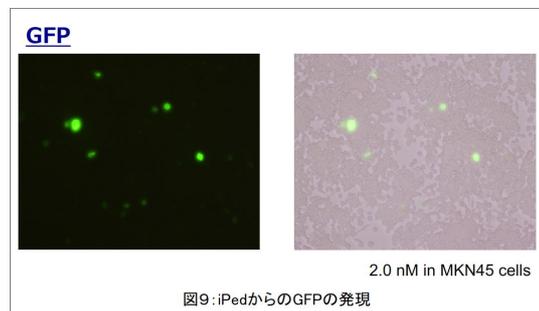


弱は観察されなかった (図8)。In vitro では顕著な RNAi 効果を示す shRNA ではあるが、in vivo では代謝分解が速やかに進行するため期待した効果が得られなかったと思われる。一方、iRed は in vitro のみならず in vivo においても有意な遺伝子発現抑制効果を示すことが明らかにできた。

### (4) 機能性ペプチド/タンパク質を発現する iPed への応用展開

iRed は細胞内に導入された後、その配列情報をもとに RNA (shRNA) へと転写され RNAi 効果を示す。このシステムを利用すれば転写された RNA からペプチド/タンパク質までも産生できるのではないかと考えた。機能性ペプチドはタンパク-タンパク間相互作用の阻害活性を有するなど創薬の魅力ある標的の一つである。しかし生体内安定性やバイオアベイラビリティの低さなどの問題点を抱えている。従って iPed 戦略が実現できれば今までにないペプチド/タンパク質創薬のアプローチになることが期待される。

初めに CMV プロモーターの下流に FLAG 配列(DYKDDDDK)をコードする iPed を化学合成し、無細胞タンパク質発現系を用いてその産生を抗 FLAG 抗体により観察しようと試みた。しかし残念ながら FLAG ペプチドの発現を確認することはできなかった。そこで緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードした iRed を調製し、その発現を蛍光顕微鏡で観察したところ望み通り GFP の蛍光が確認できた (図9)。



以上、本研究において我々は、機能性 RNA を細胞内で発現可能な DNA デバイス (iRed) の更なる機能強化を目的に、(1) iRed の安定化を目的とした環状化、(2) iRed の完全化学合成、(3)革新的デリバリー法との組合せによる新規がん治療薬創製の探索、さらに(4)こ

のデバイスを、機能性ペプチドペプチド/プロテインを発現する iPed へと進化させる可能性を実証した。

#### 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 9 件)

<sup>1</sup> Y. Igata, N. S.Tarashima, D. Matsumoto, K. Sagara, N. Minakawa, A 'catch and release' strategy towards HPLC-free purification of synthetic oligonucleotides using a phosphoramidite unit possessing a photocleavable azide linker. *Bioorg. Med. Chem.*, 2017, 25, 5962–5967. DOI:10.1016/j.bmc.2017.09.014 (査読有)

<sup>2</sup> S. N. Tarashima, M. Ota, N. Minakawa, Synthesis of 4'-selenoribonucleosides, the building blocks of 4'-selenoRNA, using a hypervalent iodine. *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, 2017, 70, 1–21. DOI:10.1002/cpnc.34 (査読有)

<sup>3</sup> S. N. Tarashima, H. Kira, T. Wada, K. Miki, S. Ide, N. Yamazaki, A. Matsuda, N. Minakawa, Groove modification of siRNA duplexes to elucidate siRNA-protein interactions using 7-bromo-7-deazaadenosine and 3-bromo-3-deazaadenosine as chemical probes. *Org. Biomol. Chem.*, 2016, 14, 11096–11105. DOI:10.1039/c6ob01866a (査読有)

<sup>4</sup> K. Ishii, S. N. Tarashima, M. Ota, S. Yamamoto, Y. Okamoto, Y. Tanaka, N. Minakawa, Practical synthesis of 4'-selenopurine nucleosides by combining chlorinated purines and 'armed' 4-selenosugar. *Tetrahedron*, 2016, 72, 6589–6594. DOI:10.1016/j.tet.2016.08.071 (査読有)

<sup>5</sup> M. Hasan, N. Tarashima, K. Fujikawa, T. Ohgita, S. Hama, T. Tanaka, H. Saito, N. Minakawa, K. Kogure, The novel functional nucleic acid iRed effectively regulates target genes following cytoplasmic delivery by faint electric treatment. *Sci. Technol. Adv. Mater.*, 2016, 17, 554–562. DOI:10.1081/14686996.2016.1221726 (査読有)

<sup>6</sup> N. Tarashima, Andou, K, T. Kojima, N. Kinjyo, Y. Hashimoto, K. Furukawa, T. Ishida, N. Minakawa, Gene silencing using 4'-thioDNA as an artificial template to synthesize short-hairpin RNA without inducing a detectable innate response. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2015, 5, e274. DOI:10.1038/mtna.2015.48. (査読有)

<sup>7</sup> N. Tarashima, Y. Komatsu, K. Furukawa, N. Minakawa, Faithful PCR Amplification of an Unnatural Base-Pair Analogue with Four Hydrogen Bond. *Chem. Eur. J.*, 2015, 21, 10688–10695. DOI:10.1002/chem.201583062 (査読有)

<sup>8</sup> N. Tarashima, T. Sumitomo, H. Andou, K.

Furukawa, T. Ishida, N. Minakawa, Synthesis of DNA fragments containing 2'-deoxy-4'-selenonucleoside units using DNA polymerases: comparison of dNTPs with O, S and Se at the 4'-position in replication. *Org. Biomol. Chem.*, 2015, 13, 6949–6952. DOI:10.1039/c5ob00941c (査読有)

<sup>9</sup> H. Maruyama, K. Furukawa, H. Kamiya, N. Minakawa, A. Matsuda, Transcription of 4'-thioDNA templates to natural RNA in vitro and in mammalian cells. *Chem. Commun.*, 2015, 51, 7887–7890. DOI:10.1039/C4CC8862J (査読有)

[学会発表](計 21 件)

<sup>1</sup> 大島康文、Mahadi Hasan、田良島典子、濱進、福田達也、田中保、南川典昭、小暮健太郎: 微弱電流処理を利用した機能性核酸の細胞内取り込みの検討、日本薬学会第 138 年会、2018.3/25-3/28、石川音楽堂 (石川県金沢市)

<sup>2</sup> 高橋知樹、山本清義、江村智子、日高久美、田良島典子、遠藤政幸、杉山弘、南川典昭: iRed を骨格とした核酸ナノ構造体の開発研究、日本薬学会第 138 年会、2018.3/25-3/28、石川音楽堂 (石川県金沢市)

<sup>3</sup> M. Ota, N. Saito-Tarashima, N. Minakawa, Synthesis and properties of 4'-selenoRNA, The 44<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC 2017), 2017.11/14-11/16, 東京理科大学 葛飾キャンパス (東京都葛飾区)

<sup>4</sup> 大島康史、虎尾 祐、三村美夕紀、Mahadi Hasan、田良島典子、濱進、福田達也、田中保、南川典昭、小暮健太郎: ユニークなエンドサイトーシスを誘起する微弱電流を利用した機能性核酸の細胞質送達、第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会、2017.10/21-10/22、徳島大学 (徳島県徳島市)

<sup>5</sup> 太田雅士、石井和貴、田良島典子、南川典昭: 4'-セレノ RNA の合成並びに性質解析、第 56 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会、2017.10/21-10/22、徳島大学 (徳島県徳島市)

<sup>6</sup> N. Minakawa, Chemical and enzymatic syntheses of 4'-selenonucleic acids, FIBER International Summit for Nucleic Acids 2017, 2017.7/19-7/21, 甲南大学(兵庫県神戸市)

<sup>7</sup> 筈川涼太、早川真由、丸山豪斗、阿部奈保子、木村康明、周東智、松田彰、南川典昭、阿部洋: 機能性核酸合成を志向した化学的核酸連結反応、日本核酸医薬学会第 3 回年会、2017.7/12-7/14、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

<sup>8</sup> 南川典昭、田良島典子、高橋知樹、山本清義、金城望、安藤英紀、石田竜弘、小暮健太郎: 化学修飾 DNA を利用した RNA 創薬、第 33 回日本 DDS 学会学術集会、2017.7/ 6-7/7、みやこめっせ (京都府京都市)

<sup>9</sup> 井形陽佑、相良和幸、田良島典子、南川典昭: 核酸分子の簡便精製を可能とする 'キ

ヤッチ&リリース'タグの開発、日本ケミカルバイオロジー学会第12回年会、2017.6/7-6/9、北海道大学(北海道札幌市)

10 井形陽佑、相良和幸、田良島典子、南川典昭: 'キャッチ&リリース'法を用いたオリゴヌクレオチドの簡便精製法の開発、日本核酸医薬学会第2回年会、2016.11/15-11/17、東京理科大学葛飾キャンパス(東京都葛飾区)

11 南川典昭: RNA-タンパク質間相互作用解析のためのケミカルアプローチ、日本核酸医薬学会第2回年会、2016.11/15-11/17、東京理科大学 葛飾キャンパス(東京都葛飾区)

12 N. Tarashima, K. Hayashi, T. Sumitomo, N. Minakawa, Chemical and enzymatic synthesis of 4'-seleno oligonucleotides, The 43<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (ISNAC 2016), 2016.9/27-9/29, 熊本大学(熊本県熊本市)

13 N. Minakawa, Development of RNAi medicine using chemically-modified DNA analogs, FIBER International Summit for Nucleic Acids 2016, 2016.7/6-7/8, 甲南大学 (兵庫県神戸市)

14 N. Minakawa, Development of RNAi medicine using 4'-thioDNA, The 4th International Conference on Biotechnology and Bioengineering, 2015.12/12-12/13, Peninsula Excelsior Hotel (Singapore)

15 南川典昭: 4'-チオDNAを用いた遺伝子発現抑制の新戦略、BMB2015(第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会)、2015.12/1-12/4、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

16 田良島典子、南川典昭: 人工塩基対の酵素認識に基づくダンベル型遺伝子発現デバイスの創製、日本核酸医薬学会第1回年会、2015.11/30-12/2、京都テルサ(京都府京都市)

17 N. Tarashima, N. Minakawa, Development of minimally-sized DNA vector for gene silencing using an unnatural base pair analog having four hydrogen bonds, 10<sup>th</sup>AFMC International Medical Chemistry Symposium in 2015 (AIMECS 2015), 2015.10/18-10/21, International Convention Center (Jeju, Korea)

18 N. Minakawa, A new approach for gene silencing using 4'-thioDNA, 10<sup>th</sup>AFMC International-Medical Chemistry Symposium in 2015 (AIMECS 2015), 2015.10/18-10/21, International Convention Center (Jeju, Korea)

19 N. Tarashima, N. Kinjyo, T. Kojima, H. Andou, T. Ishida, N. Minakawa, Gene silencing via RNA interference (RNAi) machinery using 4'-thioDNA as an artificial template, The 42<sup>nd</sup> International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2015.9/23-9.25、イーグレ姫路(兵庫県姫路市)

20 南川典昭: 化学修飾DNAを利用したRNAi創薬、核酸化学最前線フォーラム、2015.7/9-7/10、甲南大学(兵庫県神戸市)

21 田良島典子、南川典昭: 人工塩基対を利用

した第2世代 intelligent RNA expression device (iRed) の開発研究、遺伝子・デリバリー研究会第15回シンポジウム、2015.5/1、京都薬科大学(京都府京都市)

〔図書〕(計1件)  
田良島典子、南川典昭、シーエムシー出版、核酸医薬の創製と応用展開、2016、70-78

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labo/maur/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

南川 典昭 (MINAKAWA, Noriaki)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授  
研究者番号: 40209820

### (2) 研究分担者

石田 竜弘 (ISHIDA, Ttsuhiro)  
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授  
研究者番号: 50325271

阿部 洋 (ABE, Hiroshi)  
名古屋大学・理学研究科・教授  
研究者番号: 80415067