

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282240

研究課題名(和文) ナノ構造化と鋳型反応に基づくRNAの医薬機能創発

研究課題名(英文) Development of RNA medicine based on nano-structured design and templated reaction

研究代表者

阿部 洋 (ABE, HIROSHI)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80415067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：核酸鋳型化学反応を開発し、機能性RNAを設計・合成することを試みた。本法のRNA干渉法への適用を試みた。RNA干渉には通常20塩基以上のRNA二本鎖が用いられる。しかしながら、20塩基以上のRNAは細胞内で免疫応答を起こすことが問題なる。この非特異的な免疫応答はRNA干渉を医療応用する際に大きな問題となる。これを解決するために短鎖のRNA鎖を細胞内に導入することで、免疫系を回避した後、ビルドアップ的に長鎖の活性型RNA二本鎖を細胞内構築する反応を開発した。ビルドアップ型RNAは、免疫応答を回避できるとともに、RNA干渉効果をもたらすことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We developed a new strategy for the buildup reaction of active siRNA species from short RNA fragments in living cells using a chemical ligation reaction. This strategy could decrease undesired immune responses and provide more latitude for RNAi technology in the design and concentration of introduced RNA compared to traditional siRNA methods.

研究分野：核酸化学

キーワード：RNA 化学反応 免疫応答 RNA干渉

1. 研究開始当初の背景

近年、RNA の生命科学的研究は発展が著しく、RNA 分子が様々な機能を持つことが明らかになってきた。特に、遺伝子発現を特異的にノックダウンする RNA 干渉や蛋白質発現は RNA が担う重要な機能であり、バイオテクノロジーや医療技術において極めて利用価値が高い。これまで、申請者らは RNA が本来持っている機能以上の能力を引き出すことを目的とした、RNA 干渉技術や蛋白質発現法における独自の RNA のナノ構造体設計法を提案してきた。

申請者らは RNA 干渉においてナノ構造体設計法を適用した。これまで行われた RNA 干渉技術の臨床応用では、天然二本鎖 RNA 分子を用いた場合、その生体内における安定性が著しく低いことが問題となってきた。そこで、その安定性を高めるため、様々な非天然型核酸分子が用いられてきたが、安定性が高まる反面、肝心の RNA 干渉効果が低下するという問題点がある。そこで、申請者らは、天然 RNA 分子を、生体内にて安定化させ、かつ RNA 干渉効果を向上させる方法論として RNA のナノ構造体形成を報告した。

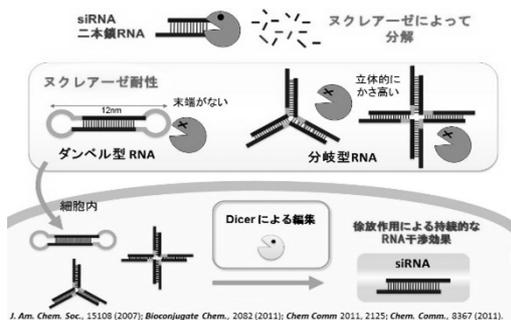


図1 ナノ構造化RNAによるRNA

図1に示したダンベル型 RNA や分岐型 RNA は申請者らが初めて報告した RNA ナノ構造体である。ダンベル型 RNA は末端を持たない環状構造であるため、生体内の主要な核酸分解酵素(exonuclease)によって分解されない。分岐型 RNA は、ナノサイズに分岐構造により立体障害を誘発し、分解酵素を近づけない。いずれの構造設計も血清中での RNA

安定性を著しく向上させた。一方、これらナノ構造化 RNA は、細胞内に入ると二本鎖 RNA 特異的なエンドヌクレアーゼ酵素であるダイサーにより徐々に二本鎖 RNA に変換され持続的な RNA 干渉効果を示した。

2. 研究の目的

本研究計画では、RNA ナノ構造体から生まれる新規な機能を創発することで、RNA 干渉法や蛋白質合成における革新的な手法を生み出し、創薬技術に応用することを目指した。RNA 干渉法では、ダンベル型 RNA や分岐型 RNA の分子デザインをすでに考案している。これらのナノ構造をさらに最適化することで、低濃度で有効かつ持続性が高い、或いは標的指向性のある分子デザインを確立する。この分子デザインは、長鎖 RNA からなるナノ構造体 RNA が細胞内で活性型二本鎖 siRNA に変換されるトップダウン的アプローチである(図2)。また新機軸として、短鎖 RNA 断片を細胞内に導入して細胞内でビルドアップ的に活性型 siRNA を構築できる技術を開発する。これは、申請者らがこれまで開発してきた細胞内での核

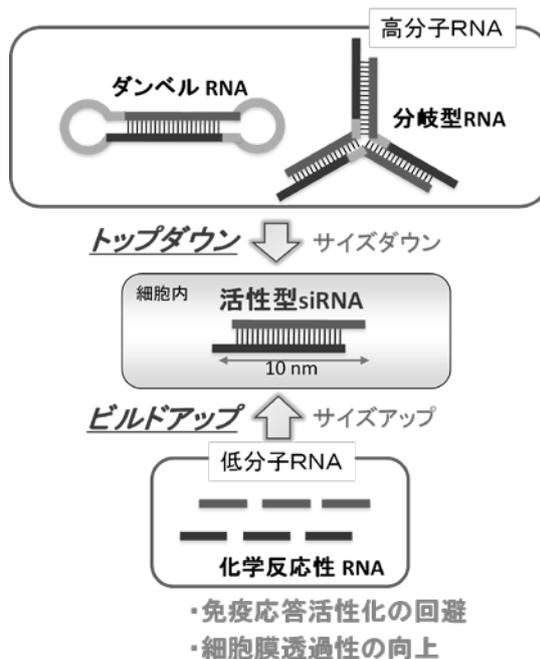


図2 RNA 干渉法におけるトップダウン戦略とビルドアップ戦略

酸酐型反応を応用することで可能になる。本研究計画では、ビルドアップ戦略により、高分子 RNA 医薬の問題である細胞膜透過性の低さや免疫系の非特異的活性化を克服することを目指す。さらに、開発した RNA 干渉技術を用いて、網膜再生を起こす遺伝子標的を狙った RNA 創薬開発の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) ダンベル型環状一本鎖 RNA の構造最適化

これまでに、ダンベル型環状一本鎖 RNA や分岐型 RNA を合成し、従来の二本鎖 RNA よりも血清中で安定性が向上すること、かつ RNA 干渉活性の持続性を確認した。しかしながら、低濃度で有効且つより高い活性を獲得すべくその構造の最適化を進めていく必要がある。また、二本鎖 RNA を用いた RNA 干渉法の課題である免疫応答による非特異的遺伝子発現抑制現象を、ナノ構造化することで回避・低減できないか、検討を行う。図 3 に示すダンベル型 RNA 構造は、2つのループ部とステム部に分類できる。この2つの部分の長さ及びループ部の配列を変えた誘導体を種々合成する。ループ部は、安定性やダイサーに対する反応性に重要と考えられることから、詳細な構造活性相関を検討する必要がある。ループ部に DNA や PEG 鎖を導入した誘導体を作成し、そ

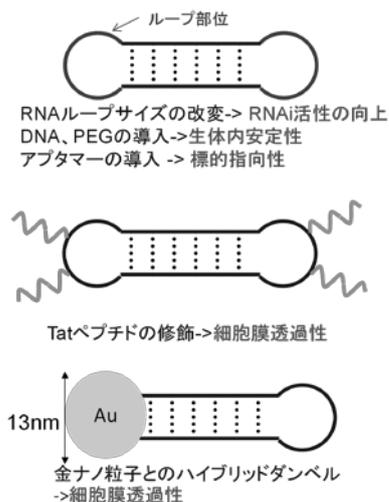


図3 ダンベル型 RNA の多機能化

の効果を検証する。

(2) ビルドアップ型 RNA 干渉法

siRNA を断片化し低分子化した RNA 断片を設計する。断片にはホスホロチオエート (PS) 基とヨウ化アセチル基を末端に導入する (図 4)。また、細胞外では反応しないように PS 基はフェニルジスルフィドで保護する。これら断片化 RNA は細胞内に導入されると、細胞内の高濃度のグルタチオン (GSH) により PS 基は脱保護され、化学的 RNA 連結反応が進行し、活性型 siRNA が構築される。本手法により RNA を低分子化することで、細胞膜透過性が向上するかどうかを検証する。また、免疫応答の低

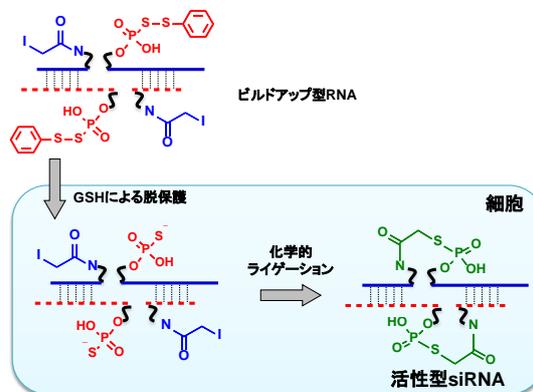


図4 ビルドアップ型 RNA

減が可能かを検証した。

4. 研究成果

(1) ダンベル型環状一本鎖 RNA の最適化

ループ部に DNA 鎖を導入したダンベル RNA を調製した。天然 RNA からなるダンベル型 RNA は、ループ部に切れ目を有する 2 本鎖 RNA を原料として用いて T4RNA リガーゼを用いてループ部で環化反応を行い調製していた。しかしながら、この手法をループ部修飾ダンベル型 RNA の合成には適用できない。そこで、ス

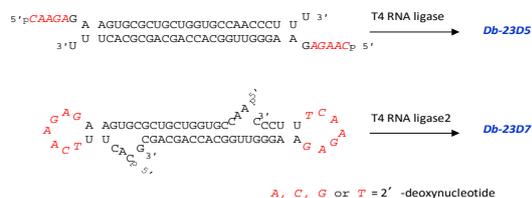


図5 ループ部修飾ダンベル型 RNA の合成

テム部に切れ目を有する 2 本鎖 RNA を原料として、各種酵素を検討した結果 T4RNA リガーゼ 2 を用いたダンベル化反応が高効率で進行することを見いだした (図 5)。

ループ部に DNA 鎖 3、5、7 塩基をそれぞれ導入したダンベル RNA は、いずれも天然型 RNA からなるダンベル RNA よりも高い生体内安定性を示した。また、3 塩基あるいは 5 塩基 DNA 導入ダンベル RNA は天然型ダンベル RNA とほぼ同等の RNA 干渉効果を示した (図 6)。

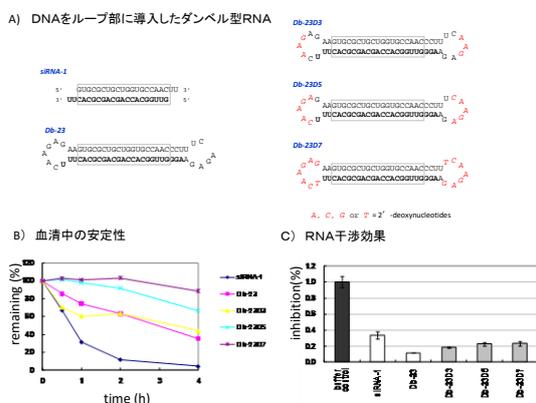


図 6 ループ修飾ダンベル型 RNA の RNA 干渉効果

(2) ビルドアップ型 RNA 干渉法

ルシフェラーゼ遺伝子を標的とする 25 塩基の siRNA を設計した。二本鎖の 3' 末端から 6 塩基、及び 7 塩基の部分に切れ目を入れて、断片化した。さらに、断片化した末端に、ヨードアセチル基及びホスホロチオエート基を導入した。ホスホロチオエート基は、フェニル

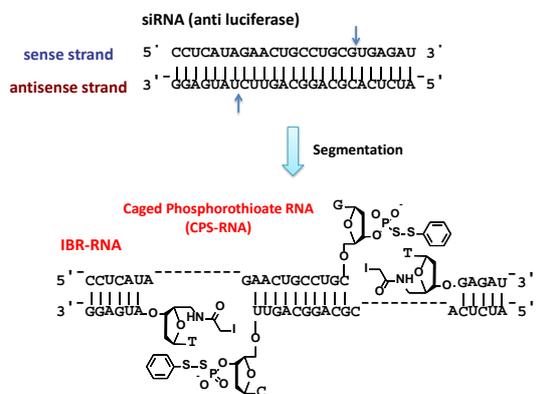


図 7 ルシフェラーゼ遺伝子を標的とするビルドアップ型 RNA の設計

ジスルフィドで保護した (図 7)。

まず、*in vitro* でビルドアップ反応が進行するかを確認した。ビルドアップ型 RNA を含む反応液をグルタチオン存在下、非存在下で反応させた。反応液をポリアクリルアミド電気泳動により解析したところ、グルタチオン存在下の反応液でのみ、完全長の RNA 二本鎖の生成が認められた。そのため、GSH 依存的にビルドアップ反応が起こることが明らかになった。

次に、細胞内にビルドアップ型 RNA を導入して実際に細胞内で活性型 siRNA を作り出し、RNA 干渉効果を引き起こすかを検討した (図 8)。ビルドアップ型 RNA (IBR-RNA) は、通常の siRNA の比較し、同濃度 (25nM) でおよそ半分の活性を示した。さらに、IBR-RNA の濃度を 100nM まで高くすると、siRNA と同等の活性を示した。

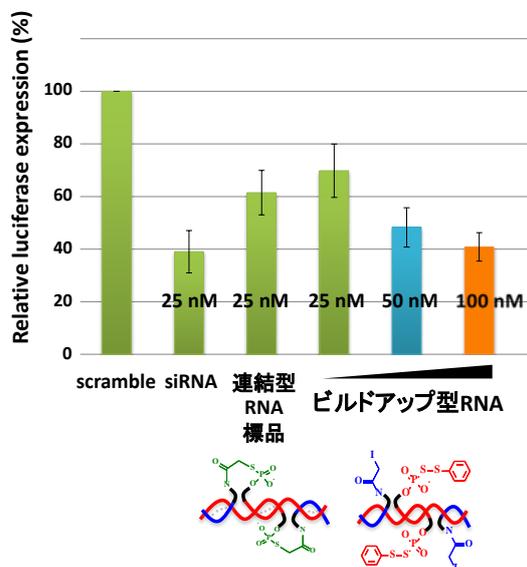


図 8 ビルドアップ型 RNA の RNA 干渉効果

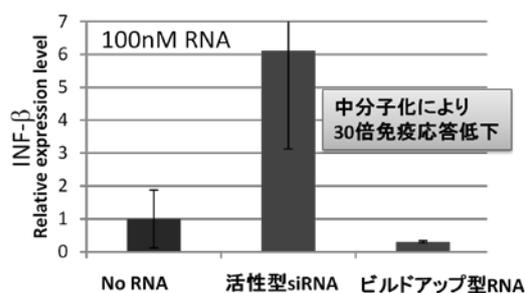


図9 ビルドアップ型 RNA の免疫応答

最後に、ビルドアップ型 RNA の免疫応答を解析した。ビルドアップ型 RNA を細胞内に導入し、24 時間後に、免疫応答の指標である IFN-β の発現を RT-PCR により定量化した (図 9)。その結果として、通常の siRNA が 100nM で免疫応答を起こすのに対して、ビルドアップ型はほとんど免疫応答を起こさないことが明らかとなった。

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 6 件)

- Naoko Abe, Ken Matsumoto, Mizuki Nishihara, Yukiko Nakano, Aya Shibata, Hideto Maruyama, Satoshi Shuto, Akira Matsuda, Minoru Yoshida, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe
Rolling Circle Translation of Circular RNA in Living Human Cells
Scientific Reports 5, 16435 (2015).
- Kazumitsu Onizuka*, Fumi Nagatsugi, Yoshihiro Ito, Hiroshi Abe*
Automatic Pseudorotaxane Formation Targeting on Nucleic Acids Using a Pair of Reactive Oligodeoxynucleotides
Journal of the American Chemical Society, 136 (20), 7201–7204 (2014).
- Hideto Maruyama, Yuko Nakashima, Satoshi Shuto, Akira Matsuda, Yoshihiro Ito*, Hiroshi Abe*
Intracellular buildup reaction of active siRNA species from short RNA fragments
Chemical Communications 50, 1284–1287 (2014).
- Hisao Saneyoshi Yoshihiro Ito*, Hiroshi Abe*
Long-lived luminogenic probe for detection of RNA in a crude solution of living bacterial cells
Journal of the American Chemical Society, 135 (37), 13632–13635 (2013).
- Aya Shibata, Takanori Uzawa, Yuko Nakashima, Mika Ito, Yukiko Nakano,

Satoshi Shuto, Yoshihiro Ito*, Hiroshi Abe*
Very rapid DNA templated reaction for efficient signal amplification and its steady-state kinetic analysis of the turnover cycle
Journal of the American Chemical Society, 135 (38), 14172–14178 (2013).

- Naoko Abe, Michio Hiroshima, Hideto Maruyama, Yuko Nakashima, Yukiko Nakano, Akira Matsuda, Yasushi Sako, Yoshihiro Ito*, and Hiroshi Abe*
Rolling circle amplification in a prokaryotic translation system using small circular RNA
Angewandte Chemie International Edition, 52(27), 7004–7008 (2013)

[学会発表] (計 18 件)

- 阿部洋、細胞内 RNA の解析と機能制御、特別招待セミナー、愛知がんセンター、2015 年 11 月 20 日
- 阿部洋、人工核酸を用いた細胞内 RNA の解析及び機能制御、第一回新しい原子分子組織化物質・材料創出に向けた光・量子ビーム応用技術 調査専門委員会、名古屋大学、2015 年 5 月 8 日
- 阿部洋、標的を触媒として利用する遺伝子検出のための化学反応プローブの開発、若手研究者のための有機化学札幌セミナー、北海道大学理学部 5 号館、2014 年 11 月 17 日、札幌市
- 阿部洋、細胞内 RNA の機能制御と解析、名古屋大学 野依記念物質科学研究館講演演室、2014 年 11 月 5 日、名古屋市
- Hiroshi Abe, Synthetic biology of Circular RNA, RIKEN SYPOSIUM & 15th Tokyo RNA club, October 15th 2014, RIKEN, Wako-shi,
- 阿部洋、RNA のナノ構造化に基づく機能創発、RNA インフォマティクス道場 in 札幌、産総研北海道センター、2014 年 8 月 27 日、札幌市
- 阿部洋、RNA ナノ構造化による医薬機能創発、第 25 回 未来創薬・医療イノベーションセミナー、2014 年 7 月 9 日、北海道大学、札幌市
- 阿部洋、ナノ構造化による医薬機能創発、東京リサーチパークセミナー、2014 年 5 月 15 日、協和発酵キリン町田研究所、東京都町田市
- Hiroshi Abe, Synthetic Biology of Circular RNA, iCeMS-RIKEN Joint Symposium, Mesoscopic Chemical Biology “Integrated Chemical-Physical Systems Towards Cell Control”, Feb. 7th 2014, University of Kyoto, Kyoto
- 阿部洋、第 3 回植物 RNA 研究ネットワークシンポジウム、RNA を植物から考える –植物を支える RNA 機能–、「化学反応プローブを用いた RNA イメージング法の開発」、2013 年 11 月 22 日、北海

- 道大学農学部講義室、札幌
11. 阿部洋、日本農芸化学会中部支部第169回例会「核酸科学の新潮流」、ナノ構造化したRNA分子の機能創発、2013年11月9日、岐阜大学、岐阜
 12. 阿部洋、ナノ構造化RNAの機能創発、2013年7月22日、スパイバー社、鶴岡
 13. 阿部洋、北海道大学大学院講義、まるい核酸の研究、2013年7月18日、北海道大学薬学部、札幌
 14. 阿部洋、第63回高分子年次大会、Synthetic biology of Nano-structured Nucleic Acids、2013年5月31日、京都国際会議場、京都
 15. 阿部洋、BIO tech 2013、細胞内遺伝子発現の解析と制御法開発、2013年5月10日、東京ビックサイト、東京
 16. 阿部洋、JST 推薦シーズ 新技術説明会、第2回 ライフイノベーション分野（創薬、医療技術）、バイオイメージングに基づく診断法の開発、2013年2月25日、JST 東京別館ホール、東京

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：核酸連結法
発明者：阿部洋、丸山豪斗
権利者：独立行政法人科学技術振興機構
種類：
番号：
出願年月日：特願2014-171540
国内外の別：PCT/JP2015/004294

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://biochemistry.chem.nagoya-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：