

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06446

研究課題名(和文) パターン認識受容体との相互作用理解に基づくステルス型siRNA医薬設計法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of interaction between siRNA and pattern recognition receptors toward systematic siRNA drug design

研究代表者

田良島 典子 (TARASHIMA, Noriko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学系)・助教

研究者番号：90755183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、申請者が独自に設計したケミカルデバイスを利用してshort interfering RNA (siRNA)-パターン認識受容体間の相互作用を理解し、得られた情報を基に真に医薬応用可能なsiRNA医薬設計法を確立することを目的とした。これを実現するために、Br7C7AおよびBr3C3Aからなるケミカルデバイスならびにケミカルデバイス導入siRNAの合成を達成し、これらを用いた生化学的解析により、siRNAとRNA干渉関連タンパク質間の相互作用を解析することに成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have developed the logical chemical probes comprising 7-bromo-7-deazaadenosine (Br7C7A) and 3-bromo-3-deazaadenosine (Br3C3A) in order to investigate siRNA-RNAi related protein interactions. In a helical structure of nucleic acids, two grooves exist; a major and a minor. In molecular recognition, proteins are thought to recognize nucleic acids by the shape of their groove(s). The bromo substituents of Br7C7A and Br3C3A are expected to locate in the major and the minor grooves, respectively, and to act as a steric hindrance in each groove when these chemical probes are incorporated into siRNAs. A comprehensive investigation using siRNAs containing these chemical probes revealed that (i) incorporation of Br3C3A(s) at the 5'-end of the passenger strand obviously enhanced their RNAi activity, and (ii) direction of RISC assembly is determined by the interaction between Ago2 and siRNA in the minor groove near the 5'-end of the passenger strand.

研究分野：核酸創薬

キーワード：siRNA RNA干渉 ケミカルプローブ 自然免疫応答

1. 研究開始当初の背景

抗体に次ぐ次世代型医薬品として、核酸医薬には高い期待が寄せられている。その中でも short interfering RNA (siRNA) は、RNA 干渉 (RNAi) 機構に基づいて目的遺伝子の発現を強力に抑制出来ることから、疾患を問わず、数多くの臨床試験が精力的に行われてきた。しかし、現時点において医薬品として承認を受けた siRNA は 1 つもない。この要因の 1 つとして、自然免疫応答の賦活化による副作用の存在が挙げられる。これは、siRNA が toll-like receptor 3 (TLR3)、TLR7/8 および protein kinase R (PKR) をはじめとするパターン認識受容体と相互作用することにより発現すると考えられているが、その分子認識機構は極めて複雑であるために予測が難しい (M. Olejniczak, *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, 1)。

2. 研究の目的

核酸創薬における活性の保持・向上ならびに自然免疫応答回避の重要性から、核酸医薬分子の (1) どの位置に、(2) どのような化学修飾を施せば、(3) いずれのパターン認識受容体からの認識を逃れ、その活性を損なうことなく自然免疫応答を回避出来るのかを体系的に理解する必要がある。

そこで本研究では、後述するケミカルデバイスを用いて siRNA-パターン認識受容体間の相互作用を理解し、得られた分子情報を基に、真にヒトで利用可能なステルス型 siRNA の設計を実現することを計画した。

3. 研究の方法

siRNA のような二重らせん構造をとった核酸が受容体タンパク質と相互作用する場合、その塩基配列とともにらせん構造中の溝 (メジャーおよびマイナーグループと呼ばれる) の形を認識することが知られている (図 1 右)。したがって、siRNA 中のどちらのグループがパターン認識受容体の認識に関与するかを明らかに出来れば、自然免疫応答を回避するために適切な化学修飾の構造と導入位置が予測可能であると考えられる。また、二重らせん構造の中心部に位置する核酸塩基対は、その上側 (7 位窒素原子側) がメジャーグループに、下側 (3 位窒素原子側) がマイナーグループに面する。本研究ではこれに着目し、siRNA-パターン認識受容体間の相互作用を簡便に解析可能なツールとして 7-bromo-7-deazaadenosine ($\text{Br}^7\text{C}^7\text{A}$) あるいは 7-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirine-3-yl]-7-deazaadenosine ($\text{Dia}^7\text{C}^7\text{A}$) と 3-bromo-3-deazaadenosine ($\text{Br}^3\text{C}^3\text{A}$) あるいは 3-[3-(trifluoromethyl)-3H-diazirine-3-yl]-3-deazaadenosine ($\text{Dia}^3\text{C}^3\text{A}$) からなるケミカルデバイスを考案した (図 1)。それぞれの deazaadenine 環は二重らせん中、いずれも天然型 A:U ペアと同様に uracil 塩基と相補的な塩基対を形成するが、環上の Br 基あるいは diazirine 基は、それぞれメジャーグループある

いはマイナーグループに位置する。したがって、このケミカルデバイスを siRNA 中の任意の adenine の位置へ導入すれば、二重らせん構造を大きく変化させることなく Br 基あるいは diazirine 基が立体障害として機能し、siRNA-パターン認識受容体間の分子認識においてどちらのグループが関与しているかを明らかに出来る。さらに、各ケミカルデバイスに diazirine 基を導入した場合には ($\text{Dia}^7\text{C}^7\text{A}$ および $\text{Dia}^3\text{C}^3\text{A}$)、光照射により反応性の高いカルベンを生成することから、siRNA と相互作用するパターン認識受容体の補足にも利用可能であると考えた。

本研究では、(1) Br 型ケミカルデバイス ($\text{Br}^7\text{C}^7\text{A}$ および $\text{Br}^3\text{C}^3\text{A}$) の化学合成、(2) Br 型ケミカルデバイスの siRNA への導入ならびに性質評価、(3) Br 型ケミカルデバイス導入 siRNA を用いた RNAi 関連タンパク質との相互作用解析、(4) Br 型ケミカルデバイス導入 siRNA を用いた自然免疫応答関連タンパク質との相互作用解析、(5) diazirine 型ケミカルデバイス ($\text{Dia}^7\text{C}^7\text{A}$ および $\text{Dia}^3\text{C}^3\text{A}$) の化学合成の順に研究を実施した。

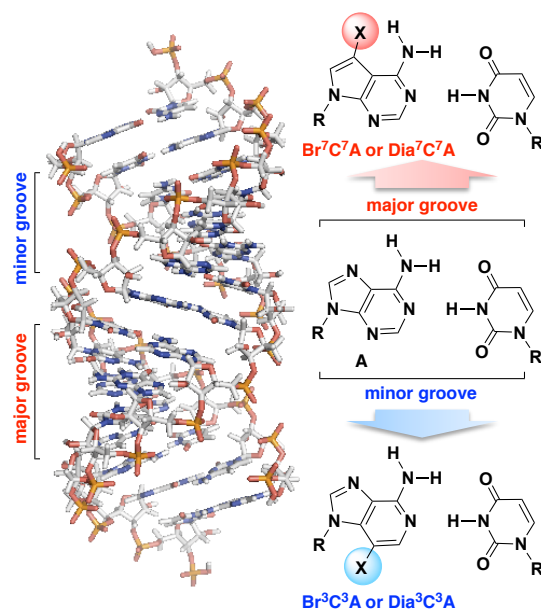


図 1 設計したケミカルデバイスのコンセプト

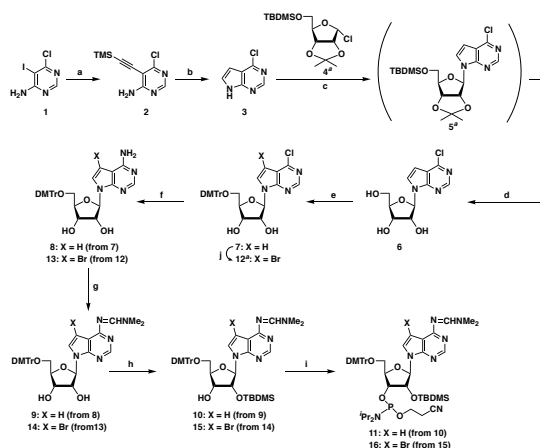
4. 研究成果

(1) Br 型ケミカルデバイス ($\text{Br}^7\text{C}^7\text{A}$ および $\text{Br}^3\text{C}^3\text{A}$) の化学合成

まず、 $\text{Br}^7\text{C}^7\text{A}$ の合成は、化合物 **1** を出発物質とし、TMS アセチレンとのクロスカップリング反応により **2** を収率 86% にて得た (Scheme 1)。このものを potassium *tert*-butoxide (KOtBu) 存在下、*N*-methylpyrrolidinone (NMP) 中、90 °C にて加熱処理することで所望の 7-deazapurine 誘導体 **3** を得た。続いて、得られた化合物 **3** と別途合成した 1-chlorosugar **4** とを Moreau らの報告したグリコシル化条件 (*J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 5162) に附すことで 6-chloro-7-deazapurine nucleoside 誘導体 **5** へと変換し、このものを単離することなく 90% trifluoroacetic acid (TFA) 水溶液で処理するこ

とで 6-chloro-7-deazapurine nucleoside **6** を得ることに成功した。化合物 **6** の 5'-OH 基を 4,4'-dimethoxytrityl (DMTr) group で保護した後、得られた化合物 **7** をメタノール性アンモニア中 110 °C にて加熱処理することで **8** へと変換した。化合物 **8** の塩基部アミノ基を *N,N*-dimethylformamide 基で保護することで化合物 **9** へと導いた後、**9** を AgNO₃ 存在下、*tert*-butyldimethylsilyl chloride (TBDMSCl) と反応させることで 2'-*O*-TBDMS 保護体 **10** を優先的に得ることに成功した。最後に得られた化合物 **10** をホスホロアミダイト試薬と反応させることで RNA オリゴマー合成のための C⁷A ホスホロアミダイト誘導体 **11** を得ることに成功した。Br⁷C⁷A ホスホロアミダイト誘導体 **16** の合成については、化合物 **7** を *N*-bromosuccinimide (NBS) で処理することで 7-デザア部位への Br 基の導入を達成し、C⁷A の場合と同様の方法にてホスホロアミダイト誘導体 **16** への変換を行なった。

3-Deaza 型ケミカルデバイスの合成については紙面の都合上省略するが、研究代表者の所属研究室において過去に報告したスクレオシド誘導体の合成法 (N. Minakawa *et al.*, *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 7158) を参考に合成を達成した。



Scheme 1 7-Deaza 型ケミカルデバイスの合成 Reagents and conditions; a) TMS-C≡CH, (PhCN)₂PdCl₂, CuI, Et₃N, DMF; b) KOtBu, NMP, 90 °C; c) 5-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl-2,3-*O*-isopropylidene-D-ribose, CCl₄, P(NMe₂)₃, TDA-1, KOH, toluene; d) 90% aqueous TFA; e) DMTrCl, pyridine; f) NH₃/MeOH, 110 °C; g) DMF dimethylacetal, DMF; h) TBDMSCl, AgNO₃, pyridine, THF; i) 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite, *i*Pr₂NEt, DMAP, CH₂Cl₂; j) NBS, CH₂Cl₂. *These compounds were not isolated because of their instability.

(2) Br 型ケミカルデバイスの siRNA への導入ならびに性質評価

合成した Br 型ケミカルデバイスを図 2 に示した siRNA 配列中の adenine (A) の位置へ導入した siRNA を種々合成した (その他、合計 21 種)。ところで、siRNA のシード領域における熱的安定性の変化は RNAi 効果に顕著な影響を与えることが知られている (K. Ui-Tei *et al.*, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 7100)。したがって、siRNA 中へのケミカルデバイスの導入が siRNA の熱的安定性へ与えた影響を精査するため、50%融解温度 (*T_m* 値) の測定を行

なった (図 2)。まず、ガイド鎖の 5'-末端部へ Br⁷C⁷A あるいは C⁷A を導入した siRNA では *T_m* 値の顕著な変化は観察されなかった (siR1-Br⁷C⁷A; Δ*T_m* = +1.0 °C and siR1-C⁷; Δ*T_m* = -0.9 °C)。また、ガイド鎖の中心付近 (siR2) あるいはパッセンジャー鎖の 5'-末端部 (siR3) へ化学修飾を導入した場合にも *T_m* 値の変化はほとんど観察されなかった (Δ*T_m* = -1.8 °C + 0.7 °C)。一方、3-deaza 型のケミカルデバイスを導入した場合には、siR1-siR3 いずれの修飾様式においてもわずかに *T_m* 値の向上が観察されたが (siR1-Br³C³, siR2-Br³C³, and siR3-Br³C³; Δ*T_m* = +1.8 °C + 3.0 °C)、総じてケミカルデバイスの導入による siRNA の熱的安定性変化は、RNA 干渉効果に影響を与えない程度であると判断出来た。

siR1			
5'-aaacaugcagaaaaugcugt-3' : passenger strand			
3'-ttuuuguacgucuuuuAacAc-5' : guide strand			
siR	A	<i>T_m</i> (°C)	Δ <i>T_m</i> (°C)
Cont.	A	66.0	
siR1-Br ⁷ C ⁷	Br ⁷ C ⁷ A	67.0	1.0
siR1-C ⁷	C ⁷ A	65.1	-0.9
siR1-Br ³ C ³	Br ³ C ³ A	69.0	3.0
siR1-C ³	C ³ A	62.8	-3.2
siR2			
5'-aaacaugcAgAaaugcugt-3'			
3'-ttuuuguacgucuuuuacgac-5'			
siR	A	<i>T_m</i> (°C)	Δ <i>T_m</i> (°C)
siR2-Br ⁷ C ⁷	Br ⁷ C ⁷ A	65.9	-0.1
siR2-C ⁷	C ⁷ A	64.2	-1.8
siR2-Br ³ C ³	Br ³ C ³ A	67.8	1.8
siR2-C ³	C ³ A	61.1	-4.9
siR3			
5'-aAacAugcagaaaaugcugt-3'			
3'-ttuuuguacgucuuuuacgac-5'			
siR	A	<i>T_m</i> (°C)	Δ <i>T_m</i> (°C)
siR3-Br ⁷ C ⁷	Br ⁷ C ⁷ A	66.7	0.7
siR3-C ⁷	C ⁷ A	65.1	-0.9
siR3-Br ³ C ³	Br ³ C ³ A	68.3	2.3
siR3-C ³	C ³ A	63.3	-2.7

図 2 ケミカルデバイス導入 siRNA の配列と熱的安定性評価

(3) Br 型ケミカルデバイス導入 siRNA を用いた RNAi 関連タンパク質との相互作用解析続いて、ケミカルデバイスの導入が RNAi 効果に与える影響を評価した (図 3)。その結果、パッセンジャー鎖の 5'-末端部へマイナーグループ側に立体障害を有する Br³C³A を導入した siR3-Br³C³A においてのみ顕著な RNAi 効果の増強が観察された。このことは、RNAi の活性本体を担う RISC と siRNA のパッセンジャー鎖 5'-末端部付近のマイナーグループ側での相互作用が活性発現に重要な役割を果たしている可能性を示唆している。

この現象をより詳細に解析するため、RISC 中へ望みとするガイド鎖が取り込まれた場合 (*ON-Target*) と望まないパッセンジャー鎖が取り込まれた場合 (*Off-Target*) の RNAi 効果の評価できるアッセイ系を構築し、ケミカルデバイスの導入が RISC 中へ取り込まれる siRNA の鎖の選択へ与える影響を評価した (紙面の都合により *data not shown*)。その結果、パッセンジャー鎖の 5'-末端部へ Br³C³A を導入した siR3-Br³C³A では、望みとするガイド鎖の取り込み効率 (*ON-Target*) が向上し、望

まないパッセンジャー鎖の取り込み (*Off-Target*) が抑制されていることが明らかとなった。すなわち、本研究により siRNA のパッセンジャー鎖 5'-末端部のマイナーグループ側における立体障害は RISC 形成における siRNA の方向性決定に大きな影響を与え、望みとするガイド鎖の取り込み効率を向上させることを見出した。

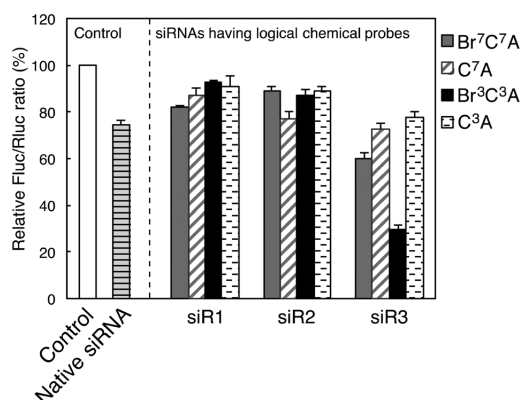


図 3 ケミカルデバイス導入 siRNA の RNAi 効果

(4) Br 型ケミカルデバイス導入 siRNA を用いた自然免疫応答関連タンパク質との相互作用解析

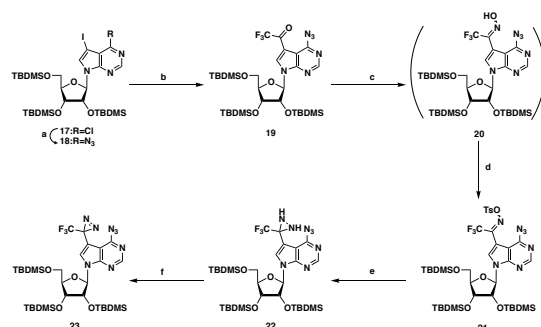
続いて、siRNA の医薬開発におけるもう 1 つの問題点である自然免疫応答の賦活化に与える影響を精査するため、鍵となるパターン認識受容体との相互作用解析を試みた。

まず、二本鎖 RNA を認識するパターン認識受容体である Toll-like receptor 3 (TLR3) を強制発現させた HEK293 細胞を用いて構築したレポーターアッセイ系においてケミカルデバイス導入 siRNA の自然免疫応答賦活化作用を評価したところ、パッセンジャー鎖の 5'-末端部へ Br³C³A を導入した siR3-Br³C³A においてサイトカイン誘導量の減弱が観察されることが明らかとなった (*data not shown*)。すなわち、パッセンジャー鎖 5'-末端部のマイナーグループ側における立体障害は TLR3 の認識を阻害する可能性が示唆された。しかし、本検討において観察された自然免疫誘導は非常に弱い作用であったことから、siRNA の医薬開発において問題となる自然免疫応答の全てを反映しているとは言い難く、さらなる検証の必要性があった。そこで、*in vivo* での自然免疫系に近くヒトで発現する全てのパターン認識受容体との相互作用を介した自然免疫応答を一括して評価可能な whole blood assay (WBA) 系においてケミカルデバイス導入 siRNA の自然免疫応答賦活化作用を再評価した。その結果、先の TLR3 に対する相互作用解析の場合とは異なり siR3-Br³C³A を用いた場合にサイトカイン誘導量が顕著に増加することが明らかとなった (*data not shown*)。すなわち、siRNA によって惹起される自然免疫応答においては、TLR3 の他にも重要な役割を果たすパターン認識受容体が存在することが示唆された。

(5) Diazirine 型ケミカルデバイス (Dia⁷C⁷A および Dia³C³A) の化学合成

先の実験において観察されたケミカルデバイス導入 siRNA による自然免疫応答発現において鍵となるパターン認識受容体を同定するため、続いて、diazirine 型ケミカルデバイスの合成検討に着手した。上述のように diazirine 基は光照射によりカルベンを生じることから、ケミカルプローブ近傍に位置する相互作用タンパク質を補足可能であると期待される。

Dia⁷C⁷A の合成は、6-chloro-7-iodo-7-deazaadenosine 誘導体 **17** に対してアジ化ナトリウムを作用させることで 6-アジド体 **18** とした後、*n*-BuLi 存在下、THF 中-78 °C にて 1-trifluoroacetyl piperidine を作用させることでトリフルオロアセチル基の導入を行なった (Scheme 2)。得られた化合物 **19** を hydroxylamine hydrochloride で処理することによりオキシム体 **20** とした後、連続して TsCl と反応させることで化合物 **21** を得た。最後に、**21** をメタノール性アンモニアにて短時間処理することでジアジリジン体 **22** へと変換し、連続する I₂ を用いた酸化反応により 7-deaza 部位にジアジリジン基を有するケミカルデバイス誘導体 **23** を得ることに成功した。現在、類似の手法により、対応する Dia³C³A 誘導体の合成法を検討中であり、これらの標的補足型ケミカルデバイスを用いて、さらに研究を進展させて行く予定である。



Scheme 2 Diazirine 基を有する 7-deaza 型ケミカルデバイスの合成 Reagents and conditions; a) NaN₃, DMF, 50 °C, quant; b) 1-trifluoroacetyl piperidine, *n*-BuLi, THF, -78 °C, 71%; c) hydroxylamine hydrochloride, EtOH, pyridine; d) TsCl, Et₃N, DMAP, CH₂Cl₂, 2 steps 54%; e) NH₃/MeOH, r.t.; f) I₂, Et₃N, MeOH, 35%.

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 Noriko Saito-Tarashima, Hirotaka Kira, Tomaya Wada, Kazuki Miki, Shiho Ide, Naoshi Yamazaki, Akira Matuda, Noriaki 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. (査読有)
DOI: 10.1039/C6OB01866A

〔学会発表〕(計 14 件)

① 和田知也、田良島典子、吉良太孝、南川典昭、siRNA-パターン認識受容体の相互作用解析のためのケミカルアプローチ、日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 24 日-3 月 27 日、仙台国際センター (宮城県仙台市)

② 田良島典子、和田知也、吉良太孝、南川典昭、RNA-タンパク質間の動的な相互作用解析のためのケミカルアプローチ-真に医薬応用可能な化学修飾 siRNA の理論的設計法の確率へ向けて、第 34 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日、つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

③ 和田知也、田良島典子、吉良太孝、南川典昭、RNA-タンパク質間相互作用解明のためのケミカルツールの創製、第 55 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、2016 年 11 月 5 日-11 月 6 日、就実大学 (岡山県岡山市)

〔その他〕

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田良島 典子 (TARASHIMA, Noriko)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教
研究者番号：90755183