

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：34413

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21517

研究課題名(和文) RNA干渉の作用長期化を目指した新規プロドラッグ型siRNAの開発

研究課題名(英文) Development of prodrug-type siRNA with long term activities

研究代表者

林 淳祐 (Hayashi, Junsuke)

大阪薬科大学・薬学部・助手(移行)

研究者番号：30740295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：当研究室で開発した細胞内還元環境下に応答し活性化するプロドラッグ型siRNAである2'-O-Methyldithiomethyl(MDTM)修飾siRNAのRNA干渉作用に関して評価を行った。その結果2'-O-MDTM-siRNAは天然型siRNAよりも有意に高い遺伝子発現抑制効果を示すことが明らかとなった。また2'-O-MDTM修飾はsiRNA中のどの部位に修飾を施してもその活性に影響を与えない修飾であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have developed novel prodrug-type siRNAs containing 2'-O-methyldithiomethyl groups which responsive to intracellular reducing environment and transformable into natural 2'-OH RNA. The gene silencing effects of 2'-O-methyldithiomethyl (MDTM)-modified siRNAs were remarkably stronger than those of natural(2'-OH) siRNAs. Furthermore, the siRNA activities of 2'-O-MDTM-siRNA were enhanced by increasing of 2'-O-MDTM modifications.

研究分野：核酸化学

キーワード：核酸医薬 siRNA プロドラッグ ジスルフィド

1. 研究開始当初の背景

低分子干渉 RNA (small-interfering RNA; siRNA) は RNA 干渉と呼ばれる遺伝子発現抑制機構を引き起こす核酸分子であり、近年 siRNA を利用した医薬が次世代型の核酸医薬として期待されている。DNA や RNA などの核酸分子は、生体内において核酸分解酵素により速やかに分解されるため、生体内での安定性の向上は siRNA を用いた創薬研究において重要な課題である。一般に RNA 中のリボース 2'-OH 基をアルキル化することで、siRNA の生体内での安定性が向上することが知られている。しかし 2'-OH 基の修飾によって siRNA の RNA 干渉能が低下することがあるため、生体内での安定性の向上と RNA 干渉能の両立のためには、複雑な分子設計が必要となる。代表者らは、上に示した機能の両立において、その分子設計を容易にするプロドラッグ型 RNA (2'-O-アルキルジチオメチル RNA) の開発を行ってきた。

2. 研究の目的

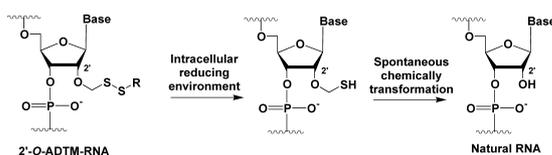
代表者らの開発したプロドラッグ型 RNA は、2'-OH 基にジスルフィド結合を含むアルキルジチオメチル基 (ADTM 基) による修飾を施すことで、細胞内の還元的環境により、天然型 RNA へと変換される分子設計となっている。(スキーム 1) 本研究はジスルフィド結合に隣接するアルキル基をメチル基とした 2'-O-メチルジチオメチル (2'-O-MDTM) -siRNA に関してその化学、物理学的性質や生物学的作用を評価することを目的とする。

3. 研究の方法

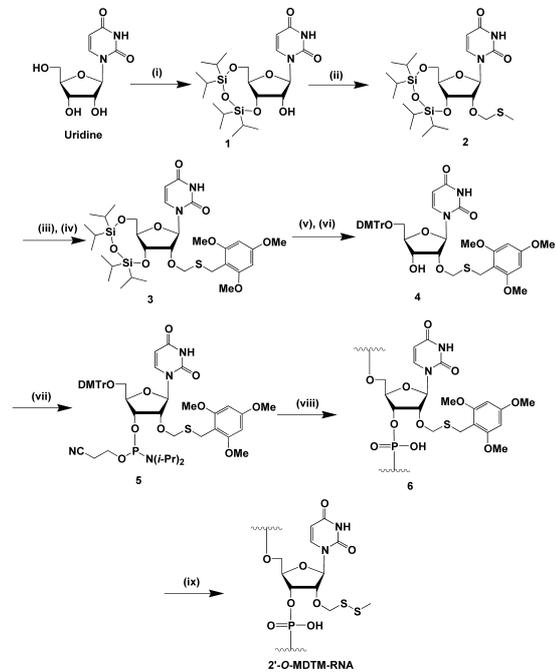
(1) 2'-O-MDTM 修飾 siRNA の合成

抗ルシフェラーゼ活性を有する RNA 配列中に ADTM 基として R 基がメチル基である 2'-O-メチルジチオメチル基 (2'-O-MDTM 基) を導入した RNA 鎖の合成を行った(表 1)。2'-O-MDTM-RNA の合成法をスキーム 2 に示した。2, 4, 6-トリメトキシベンジルチオメチル基 (TMBTM 基) を導入したアミダイトユニットを合成後、自動合成機にて RNA 鎖中に組み込み 2'-O-TMBTM-RNA 6 を得た。

得られた 6 に酢酸緩衝液中 (pH 4)、ジメチル(メチルチオ)スルホニウムテトラフルオロボレート (DMTSE) を作用させることで 2'-O-MDTM-RNA を効率よく得ることに成功した。<sup>1</sup> 同様の手法にて抗ルシフェラーゼ活性を有する siRNA 中に 1~4 カ所 2'-O-MDTM 基を導入した RNA を得た。



スキーム 1. プロドラッグ型 2'-O-ADTM-RNA の細胞内還元的环境下での変換機構



スキーム 2. オリゴ核酸合成後修飾法による 2'-O-MDTM-RNA の合成

(i) TIPDS-Cl<sub>2</sub>, pyridine; (ii) DMSO, Ac<sub>2</sub>O, AcOH; (iii) SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (iv) 2, 4, 6-trimethoxybenzylmercaptan; (v) Et<sub>3</sub>N-3HF, THF; (vi) DMTr-Cl, pyridine; (vii) 2-cyanoethyl *N,N*-diisopropylchlorophosphoramidite, *N,N*-diisopropylamine, DMAP, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (viii) DNA/RNA 合成機; (ix) DMTSE, 酢酸緩衝液 (pH 4)

		RNA sequence
Sense strand	S0	5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3'
	S1	5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3'
	S2	5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3'
	S4	5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3'
Antisense strand	A0	3'-TTG AAU GCG ACU CAU GAA GCU-5'
	A1	3'-TTG AAU GCG ACU CAU GAA GCU-5'
	A2	3'-TTG AAU GCG ACU CAU GAA GCU-5'
	A4	3'-TTG AAU GCG ACU CAU GAA GCU-5'
control		5'-ACUUGUGGCCGUUUACGUCTT-3' 3'-TTUGAACACCGCAAUUGCAG-5'

表 1. 抗ルシフェラーゼ活性を有する RNA の配列

U: 2'-O-MDTM 修飾を導入した箇所(アンチセンス鎖を A 鎖、センス鎖を S 鎖として、修飾数に応じて S0~S4, A0~A4 と命名した)

(2) 2'-O-MDTM-siRNA の二重鎖形成能の評価

2'-O-修飾 siRNA の RNA 干渉能の評価に先立ち、2'-O-MDTM-siRNA の二重鎖形成能の評価を融解温度測定 (*T<sub>m</sub>* 値) により行った。(測定条件: 100 mM NaCl, 10 mM Na-phosphate buffer (pH 7.2), 1 μM siRNA)

(3) 模擬的細胞内還元環境における 2'-O-MDTM-siRNA の天然型 siRNA への変換

細胞内ではグルタチオンと呼ばれる還元

性トリペプチドにより、還元的環境が構成されている。そこで2'-O-MDTM-siRNAが細胞内と同様の還元環境条件(10 mM グルタチオン, 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7))にて天然型 siRNA に変換されるかを HPLC で反応を追跡することで評価した。

#### (4) ヒト肺がん細胞 (A549 細胞)を用いた抗ルシフェラーゼ活性の評価

2'-O-MDTM-siRNA の遺伝子発現抑制効果を調べることを目的として標識タンパク質の一種であるルシフェラーゼに対する発現抑制効果を評価した。ルシフェラーゼを安定発現させたヒト肺がん細胞 (A549 細胞) に抗ルシフェラーゼ活性を有する 2'-O-MDTM-siRNA を Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Thermo fisher 社) を用いて導入し、一定時間培養後、ルシフェラーゼ発現量を Luciferase Assay System (Promega 社) を用いて測定した。対照 (コントロール) として抗ルシフェラーゼ活性を有さない siRNA を用いて、コントロールを導入した際の発現率を 100 % として発現抑制効果を比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) 2'-O-MDTM 修飾 siRNA の合成

2'-O-MDTM-RNA は既に確立済みの手法に準じて合成を行った。<sup>1</sup> これまでオリゴ核酸合成後修飾による 2'-O-MDTM-RNA の合成は DNA 配列中の一部に導入することには成功していたが、基質を RNA とした場合の反応性は明らかとなっていなかった。まず 21 塩基の鎖長からなる RNA のウラシル部位に 2'-O-MDTM 基を導入する試みを行った。DNA 自動合成機にて 2'-O-TMBTM-RNA を合成後、酢酸緩衝液中にて DMTSF を作用させ、反応の進行を HPLC にて追跡したところ、反応時間 2 時間程度で 2'-O-MDTM-RNA を効率よく得ることに成功した (図 1)。また同様の手法により、1 つの RNA 中に 2 ヶ所以上の修飾を行うことも可能であり、本合成後修飾法が、2'-O-MDTM-RNA の合成に適用可能であることが明らかとなった。

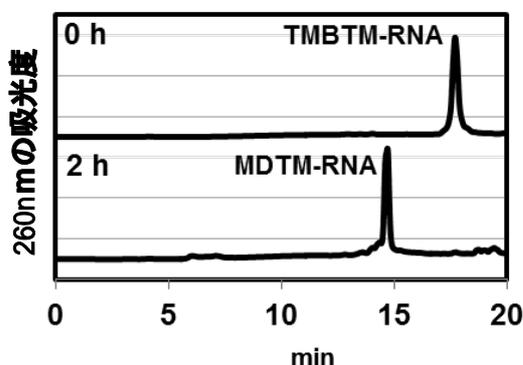


図 1. オリゴ核酸合成後修飾法による 2'-O-MDTM-RNA の合成 (HPLC による反応の分析)  
RNA 配列: 5'-CUU ACG CXG AGU ACU UCG ATT-3'

	siRNA配列	$T_m$ 値 (°C)	$T_m$ 値の差
siRNA 1	5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3' 3'-TT GAA UGC GAC UCA UGA AGC U-5'	68.0	-
siRNA 2	5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3' 3'-TT GAA UGC GAC UCA UGA AGC U-5'	68.9	+0.6
siRNA 3	5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3' 3'-TT GAA UGC GAC UCA UGA AGC U-5'	67.9	-0.1
siRNA 4	5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3' 3'-TT GAA UGC GAC UCA UGA AGC U-5'	67.2	-0.8
siRNA 5	5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3' 3'-TT GAA UGC GAC UCA UGA AGC U-5'	67.8	-0.2
siRNA 6	5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3' 3'-TT GAA UGC GAC UCA UGA AGC U-5'	68.2	+0.2
siRNA 7	5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3' 3'-TT GAA UGC GAC UCA UGA AGC U-5'	67.8	-0.2
siRNA 8	5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3' 3'-TT GAA UGC GAC UCA UGA AGC U-5'	67.0	-1.0
siRNA 9	5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3' 3'-TT GAA UGC GAC UCA UGA AGC U-5'	66.1	-1.9
siRNA 10	5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3' 3'-TT GAA UGC GAC UCA UGA AGC U-5'	68.3	+0.3
siRNA 11	5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3' 3'-TT GAA UGC GAC UCA UGA AGC U-5'	68.4	+0.4
siRNA 12	5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3' 3'-TT GAA UGC GAC UCA UGA AGC U-5'	66.2	-1.8
siRNA 13	5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3' 3'-TT GAA UGC GAC UCA UGA AGC U-5'	67.3	-0.7
siRNA 14	5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3' 3'-TT GAA UGC GAC UCA UGA AGC U-5'	66.8	-1.2
siRNA 15	5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3' 3'-TT GAA UGC GAC UCA UGA AGC U-5'	67.6	-0.4
siRNA 16	5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3' 3'-TT GAA UGC GAC UCA UGA AGC U-5'	66.9	-1.1

表 2. 2'-O-MDTM-siRNA の二重鎖形成能評価

U: 2'-O-MDTM 修飾部位

天然 siRNA (siRNA 1) と  $T_m$  値を算出することで、二重鎖形成能の評価を行った。

#### (2) 2'-O-MDTM-siRNA の二重鎖形成能の評価

一般に 2 本鎖 RNA は 1 本鎖 RNA よりも生体内での安定性が高いことが知られている。<sup>2</sup> そこで、生体内と同様の条件において、2'-O-MDTM 修飾 siRNA が 2 本鎖 RNA の状態で維持されるかの評価を行った。核酸は二重らせんを形成することで、塩基間のスタッキング効果により吸光度が減少する。すなわち二重らせん構造を形成している 2 本鎖 RNA は 1 本鎖 RNA よりも低い吸光度を示す。この現象を利用して、2 本鎖から 1 本鎖へと熱により解離させた際の吸光度の変化を測定することで、二重鎖形成能の評価を行うことが出来る ( $T_m$  値の測定)。先に合成した RNA 鎖 (S0~S4, A0~A4) を pH 7.2 のリン酸ナトリウム緩衝液中 (生体内と同等の条件) にてアニーリング (2 本鎖 RNA を形成) させ、表 2 に示した siRNA1~siRNA16 までの 16 本の siRNA を得た。得られた 2 本鎖 RNA の  $T_m$  値を測定することで、二重鎖形成能の評価を行った (表 2)。

その結果、siRNA 配列中に複数の 2'-O-MDTM 修飾を行った場合でも  $T_m$  値のは 2 °C 下がる程度で、顕著な二重鎖形成能の低下は見られなかった。このことから 2'-O-MDTM-siRNA は生体内においても 2 本鎖 RNA として存在することが考えられた。

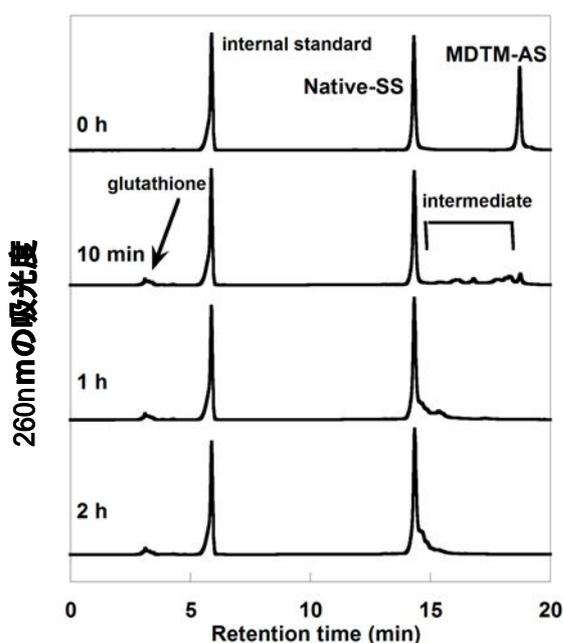
#### (3) 模範的細胞内還元環境における 2'-O-MDTM-siRNA の天然型 siRNA への変換

これまでに 1 本鎖オリゴヌクレオチドを用いて、天然型オリゴヌクレオチドへと変換されることを確認していたが、反応において立体的な制約の大きい 2 本鎖 RNA において同様に反応が進行するかは不明であった。そこ

で分子内に複数の 2'-O-MDTM 修飾を有する siRNA が細胞内と同程度の還元環境において天然型 siRNA へと変換されるかの検討を行った。siRNA 13 (表 2) を pH 7.0 のリン酸緩衝液中にて還元性ペプチドであるグルタチオン (GSH) を作用させ、反応を HPLC により追跡した (図 2)。その結果、反応時間 2 時間程度で、2'-O-MDTM 修飾 RNA のピークは消失し、天然型のピークへと収束した。以上のことから 2'-O-MDTM-siRNA は生体内の還元環境において天然型 siRNA へと十分にに変換されることが明らかとなった。

#### (4) ヒト肺がん細胞 (A549 細胞)を用いた抗ルシフェラーゼ活性の評価

2'-O-MDTM-siRNA の遺伝子発現抑制効果の評価した。先に示した siRNA 1-16 を細胞内への導入試薬として Lipofectamine 2000 を用いて導入した。24 時間培養後の細胞を回収し、サンプル中のルシフェラーゼ発現量を測定した (図 3)。その結果 siRNA2-5, 7 において、天然型 siRNA 1 よりも優れた遺伝子発現抑制効果を示すことが明らかとなった。通常 siRNA のアンチセンス鎖の 5'-末端から 2~8 塩基の seed 領域と呼ばれる部位に修飾を施すことで、遺伝子発現抑制が低下することが知られている。<sup>3</sup> 一方 2'-O-MDTM-siRNA では修飾位置による顕著な遺伝子発現抑制の低下は見られなかった。このことから、2'-O-MDTM-siRNA は細胞内においても天然型へと変換され、優れた siRNA 活性を有する



アナログであることが明らかとなった。

図 2. 2'-O-MDTM-siRNA の細胞内模擬的な還元環境での変換反応 (HPLC による反応の分析)

siRNA 配列: 5'-CUU ACG CUG AGU ACU UCG ATT-3'  
3'-TT GAA UGC GAC UCA UGA AGC U-5'

反応条件: 10 mM GSH, 50 mM リン酸緩衝液, 37 °C

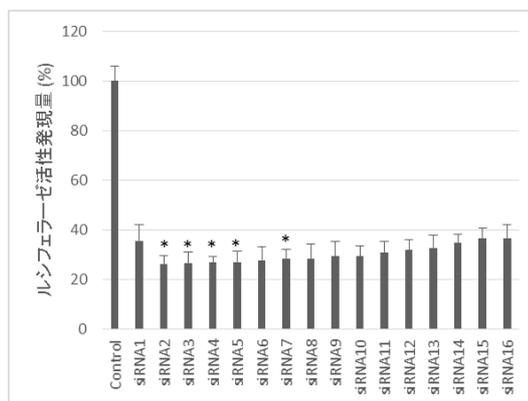


図 3. 2'-O-MDTM-siRNA の遺伝子発現抑制効果

ホタルルシフェラーゼを抑制する配列を有する siRNA を lipofectamine 2000 によりルシフェラーゼ安定発現ヒト肺がん細胞 (A549-lun) に導入後、24 時間培養後の細胞内ルシフェラーゼ発現量。抑制能を持たないコントロール配列を導入した際の発現量との比率を示した。

#### (5) 結論

以上の結果より、2'-O-MDTM-siRNA は天然型 siRNA よりも優れた遺伝子発現抑制効果を示すことが明らかとなった。また通常 2'-OH 基の修飾は siRNA 活性に密接に関連しているため、適切な修飾部位の設定など、その分子設計が非常に困難となる。一方、遺伝子発現抑制効果の検討からも 2'-O-MDTM-siRNA はその修飾位置に関わらず優れた遺伝子発現抑制効果を示した。これらのことから 2'-O-MDTM-siRNA は siRNA 創薬研究において、複雑な分子設計を必要としない RNA 分子であることが考えられた。

#### 参考文献

- 1) Ochi, Y.; Nakagawa, O.; Sakaguchi, K.; Wada, S.; Urata, H. *Chem. Commun.* **2013**, 49, 7620.
- 2) Braasch, D. A.; Jensen, S.; Liu, Y.; Kaur, K.; Arar, K.; White, M. A.; Corey, D. R. *Biochemistry* **2003**, 42, 7967.
- 3) Amarzguioui, M.; Holen, T.; Babaie, E.; Prydz, H. *Nucleic Acids Res.* **2003**, 31, 589.

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Junsuke Hayashi, Yusuke Samezawa, Yosuke Ochi, Shun-ichi Wada and Hidehito Urata.

Syntheses of prodrug-type phosphotriester oligonucleotides responsive to intracellular reducing environment for improvement of cell membrane permeability and nuclease resistance. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 27, 2017, 3135-3138. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.05.031 (査読有)

(2) Yosuke Ochi, Mieko Imai, Osamu Nakagawa, Junsuke Hayashi, Shun-ichi Wada and Hidehito Urata.

Gene silencing by 2'-O-methylthiomethyl-modified siRNA, a prodrug-type siRNA

responsive to reducing environment.  
*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 26, 2016, 845-848.  
DOI: 10.1016/j.bmcl.2015.12.074 (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

(1) 林 淳祐, 鮫澤佑介, 和田俊一, 浦田秀仁  
細胞内還元環境下で応答するプロドラッグ  
型リン酸トリエステル - オリゴ核酸の開発,  
日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 24 日 ~  
27 日、東北大学川内キャンパス(宮城県仙台  
市青葉区)

(2) 西垣美沙, 越智洋輔, 林 淳祐, 和田俊一,  
浦田秀仁、細胞内還元環境下で活性化するプ  
ロドラッグ型 siRNA の RNAi 活性の経時変  
化, 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 24  
日 ~ 27 日、東北大学川内キャンパス(宮城県  
仙台市青葉区)

(3) 林 淳祐, 西垣美沙, 越智洋輔, 和田俊一,  
浦田秀仁, 細胞内還元環境において活性化す  
る新規プロドラッグ型 siRNA  
(REDUCT-siRNA) の 2'-O-methyldithio-  
methyl 修飾が RNA 干渉能に与える影響, 日  
本核酸医薬学会第 2 回年会, 2017 年 11 月 15  
日 ~ 17 日、東京理科大学 葛飾キャンパス  
図書館大ホール(東京都葛飾区)

(4) 林 淳祐, 越智 洋輔, 和田 俊一、浦田 秀  
仁細胞内還元環境に応答する 2'-プロドラッ  
グ型 RNA (REDUCT-RNA) の開発  
核酸医薬への応用を指向した RNA 干渉作  
用に関する検討 , 第 66 回日本薬学会近畿  
支部総会・大会、大阪薬科大学 (大阪府高槻  
市)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

林 淳祐 ( Junsuke Hayashi )  
大阪薬科大学・薬学部・助手  
研究者番号 : 30740295