

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18911

研究課題名(和文) 反応性残基の特性を利用した高機能性RNAの開発

研究課題名(英文) Development of sophisticated small RNAs utilizing the properties of functional groups

研究代表者

喜多村 徳昭 (KITAMURA, Yoshiaki)

岐阜大学・工学部・助教

研究者番号：10503659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：siRNAやmicroRNAといった機能性短鎖RNAは次世代医薬品として期待されている。しかし、体内酵素による分解、標的組織移行性や細胞膜透過性の低さなどの問題により、十分な治療効果が得られないのが現状である。本研究では、siRNAやmicroRNAが有する特徴的な構造である3'末端2塩基突出部位に着目し、標的組織内に効率的に取り込まれ、組織の環境に応答して機能を発揮する高機能性短鎖RNAの開発に取り組み、目的とするRNAを構築する上で有用な様々な手法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Small interfering RNAs (siRNAs) and microRNAs inhibit gene expression by RNA interference (RNAi) and thus have great potential as nucleic acid-based drugs. However, naked RNA strands have many problems that hinder their application as therapeutics, such as their rapid degradation in biological fluids, poor cellular uptake, and off-target effects. In the course of our study, we focused on studying siRNAs containing nucleoside mimics in their 3'-termini. In this study, we found that furanoid glycols could be useful as stimulus-responsive units. In addition, it was found that introduction of 2-O-benzylated abasic nucleoside (RHOBn) at the 3'-end of an siRNA greatly improves resistance towards various nucleases. Furthermore, we have developed a scalable synthetic method for phosphoramidite derivatives of artificial nucleosides including 1-deoxy-1-ethynyl-β-D-ribofuranose (RE). These results should help to advance the development of RNAi-based medicine.

研究分野：医歯薬学

キーワード：核酸医薬 機能性短鎖RNA 環境応答 分解酵素耐性 簡便合成 CuAAC

1. 研究開始当初の背景

(1) siRNA や microRNA といった機能性短鎖 RNA は次世代医薬品として期待されている。しかし、体内酵素による分解、標的組織移行性や細胞膜透過性の低さなどの問題により、十分な治療効果が得られない。

(2) 細胞膜透過性の改善を目的とした DDS の開発、酵素抵抗性の向上やオフターゲット効果の抑制に有効な修飾法の探索が世界中で盛んに行われている。しかし、前者では、DDS の精密な設計が必要であり(生体組織との非特異的な相互作用や安定化による遺伝子発現抑制効果の減弱化や炎症誘発毒性などの問題がある)、後者では、多くの場合、化学修飾により分解酵素耐性が向上する一方で遺伝子発現抑制効果が減弱してしまう。実験動物での siRNA や microRNA の評価も行われているが、投与の際、細胞膜透過のための脂質(リポフェクション試薬)を併用した手法が用いられている。リポフェクション試薬の併用は、投与量が少ない局所療法には有効と考えられるものの、投与量が増加する全身投与の場合、標的臓器への移行効率や肝・腎毒性が問題となっている。

(3) 研究代表者は先行研究で、siRNA や microRNA が有する特徴的な構造である 3'末端 2 塩基突出部位(ダングリリングエンド)の化学修飾とそれらが及ぼす影響について種々の有益な知見を得ている。加えて、これらの機能性短鎖 RNA の医薬創製を目指す上で有用な手法(種々の機能性核酸や構築基盤の簡便合成法、穏和な条件下での核酸やペプチドの簡便ポスト修飾法)を開発している。

2. 研究の目的

研究代表者や共同研究者が先行研究で得ている知見()および技術()を活かして、標的組織内に効率的に取り込まれ、組織の環境に应答して機能を発揮する高機能性短鎖 RNA を開発する。

ダングリリングエンドの化学修飾により、遺伝子発現抑制能に悪影響を及ぼすことなく酵素耐性を改善できる。化学修飾により鎖選択性を制御できる(意図しない遺伝子の発現抑制を回避できる)。穏和な条件下での簡便な RNA のポスト修飾法(リガンドフリーCuAAC 反応)を開発し、本手法が DNA やペプチドにも応用可能であることを明らかにしている。RNA の修飾に有用な種々の機能性化合物の簡便合成を達成している。末端アルキンとアジドとの CuAAC 反応において、隣接位にヘテロ原子を有するアルキンは他のアルキンと比較して効率的にアジドと反応することを見出すとともに実証している。

3. 研究の方法

(1) 目的の RNA が標的組織内に取り込まれた後に標的組織の環境下で修飾分子と切り離される必要がある。そこで、環境に应答して切断されるリンカー分子を組み込んだダングリリングエンドを設計し、合成を検討した。

(2) 目的の RNA を開発するにあたり、ダングリリングエンドの構造最適化を検討した。

(3) 核酸自動合成機を用いてダングリリングエンドに 1-デオキシ-1-エチル- β -D-リボフラノース (R^E) を導入した RNA を構築するにあたり、対応するホスホロアミダイト誘導体を合成した。

4. 研究成果

(1) ダングリリングエンドに導入する分子の合成を検討する過程で、フラノイドグリカル(dDR)の1位や3位に適切な置換基を導入することによりdDRの反応性を制御できることを見出し、環境应答分子として利用可能であることを証明した。

(2) ダングリリングエンドの構造最適化を検討する中で、2 位水酸基をベンジル化した塩基部欠損ヌクレオシド ($R^{H_{O}Bn}$) を siRNA のダングリリングエンドに導入すると、血清中での安定性が大幅に向上することを見出した(図1)。なお、 $R^{H_{O}Bn}$ 修飾 siRNA は天然ヌクレオシドであるチミジン(dT)修飾 siRNA とほぼ同等の遺伝子発現抑制活性を示した(図2)。

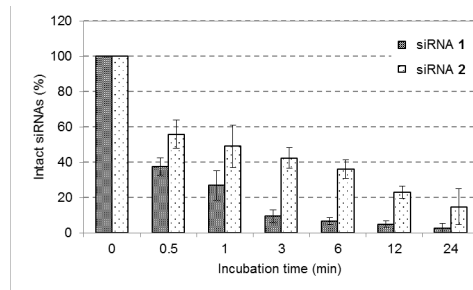


図1 50%ウシ血清中での安定性(siRNA 1:dT 修飾 siRNA、siRNA 2: $R^{H_{O}Bn}$ 修飾 siRNA)

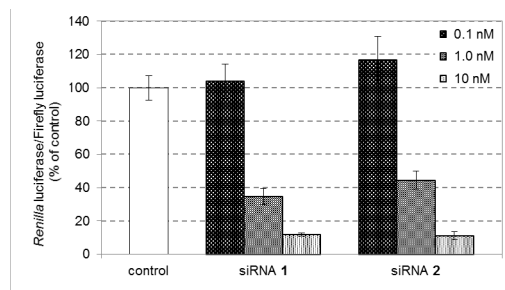


図2 遺伝子発現抑制活性 (siRNA 1:dT 修飾 siRNA、siRNA 2: $R^{H_{O}Bn}$ 修飾 siRNA)

(3) ダングリングエンド構築のために有用な R^F の核酸自動合成用誘導体の簡便合成法を開発した(図3)。R^F を有する RNA は、研究代表者らが確立した CuAAC 反応条件下で種々のアジド化合物と迅速に反応した。

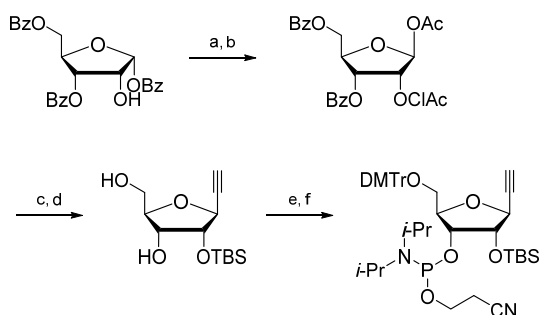


図3 Reagents and conditions: (a) ClAcCl, pyridine, CH₂Cl₂, rt, quant; (b) Ac₂O, AcOH, H₂SO₄, rt, 92%; (c) TMS-acetylene, *n*-BuLi, EtAlCl₂, CH₂Cl₂, toluene, 0 °C then rt, 58%; (d) i) TBSCl, AgNO₃, pyridine, THF, rt; ii) NaOMe, MeOH, rt, 31%; (e) DMTrCl, pyridine, rt then 60 °C, 60%; (f) *i*-Pr₂NP(Cl)O(CH₂)₂CN, *i*-Pr₂NEt, CH₂Cl₂, rt, 83%.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Yuki Nagaya, Yoshiaki Kitamura, Aya Shibata, Masato Ikeda, Yukihiko Akao, Yukio Kitade, Introduction of 2-*O*-benzyl abasic nucleosides to the 3'-overhang regions of siRNAs greatly improves nuclease resistance, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有、27、2017、5454–5456.

Yoshiaki Kitamura, Ryo Asakura, Koki Terazawa, Aya Shibata, Masato Ikeda, Yukio Kitade, Nucleobase azide-ethynylribose click chemistry contributes to stabilizing oligonucleotide duplexes and stem-loop structures, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有、27、2017、2655–2658.

〔学会発表〕(計4件)

長屋優貴、喜多村徳昭、柴田綾、池田将、赤尾幸博、北出幸夫、塩基部欠損ヌクレオシド類を3'末端に有する siRNA の合成と性質評価、日本薬学会第138年会、金沢、2018年3月

寺澤康輝、喜多村徳昭、長屋優貴、柴田綾、池田将、北出幸夫、リボース誘導体を母核とする新規 traceless 型リンカーの開発、日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2017、鈴鹿、2017年11月

Yoshiaki Kitamura, Ryo Asakura, Koki Terazawa, Aya Shibata, Masato Ikeda, Yukio Kitade, Nucleobase azide-

ethynylribose click chemistry: stabilizing oligonucleotide duplexes and stem-loop structures, 第44回国際核酸化学シンポジウム (ISNAC2017)・日本核酸化学会第1回年会、東京、2017年11月

Yoshiaki Kitamura, Ryo Asakura, Koki Terazawa, Aya Shibata, Masato Ikeda, Yukio Kitade, Nucleobase azide-ethynylribose click chemistry contributes to stabilizing oligonucleotide duplexes and stem-loop structures, 第26回国際複素環化学会議 (26th ISHC Congress) レーゲンスブルク (ドイツ)、2017年9月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜多村 徳昭 (KITAMURA YOSHIAKI)
岐阜大学・工学部・助教
研究者番号：10503659

(2) 研究協力者

北出 幸夫 (KITADE YUKIO)
愛知工業大学・工学部・教授
研究者番号：20137061

(3) 研究協力者

池田 将 (IKEDA MASATO)
岐阜大学・工学部・教授
研究者番号：20432867

(4)研究協力者

柴田 綾 (AYA SHIBATA)

岐阜大学・工学部・助教

研究者番号：50462693