

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22287

研究課題名(和文)「食べるマイクロRNAを創る」ー機能性食品としての核酸ー

研究課題名(英文)Development of microRNA to eat: Nucleic acid as a supplement food

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(薬学域)・教授

研究者番号：40209820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題において我々は、機能性核酸分子を食する、という挑戦的な研究に挑んだ。コロナ渦の影響でバイオリジカルな評価に遅れが生じたが、当初利用する予定であった4'-チオRNAよりも高い安定性を示す二つの人工RNA(4'-セレノRNAならびに4'-チオLNA/BNA)の開発に成功し、さらに4'-セレノRNAが化学siRNA分子として有効であることを見出した。この人工RNAとエキソソーム封入技術を組み合わせることで、食する核酸分子、が創製できると期待している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、低分子化合物にかわる医薬品として核酸が注目されている。本研究では、この核酸を食べることで健康寿命を延長させるという非常に挑戦的な研究を目指した。その結果、食することが可能と予想される安定性をもった核酸分子の創製に成功した。

またこの人工核酸は、遺伝子の発現を制御するポテンシャルを有していることも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this work, we examined a challenging research project of eating functional nucleic acid molecules. Although the biological evaluation was delayed due to the influence of COVID-19, we succeeded to develop two artificial RNAs (4'-selenoRNA and 4'-thioLNA/BNA) showing higher stability than 4'-thioRNA, which is originally planned to use in this project. Furthermore, we showed that 4'-selenoRNA is effective as a chemically-modified siRNA. By combining these artificial RNAs with exosome encapsulation technology, we expect to be able to create edible nucleic acid molecules.

研究分野：核酸化学

キーワード：マイクロRNA 4'-チオRNA 4'-セレノRNA 機能性食品

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1990年初頭より始まった核酸を医薬品とする試みは、途中紆余曲折はあったものの、研究開始時の2018年時点で、6品目が核酸医薬品として世に送り出されていた(2021年現在では、15品目となり、加えて我が国初の核酸医薬品も承認された)。本研究課題は、核酸を機能性食品とする試みであるが、二十数年前の核酸医薬品創製という挑戦的な研究の芽生え期と同じ状況にあると考えられる。我が国は世界屈指の長寿国となっているが、近年、如何に健康で長生きをするか(健康寿命)という新たな命題が提唱され、様々な食物成分がサプリメントとして販売されている。しかし、「機能性核酸を食する」といった試みは、アカデミア研究としても企業研究としても前例がなく、極めて斬新かつ奇抜な発想であり、核酸の新たな価値を見出す画期的研究になると考え、本研究課題を提案するに至った。

研究代表者の南川は、長年にわたり化学修飾核酸の創製とその医薬化学的応用研究に携わってきた。本研究課題で使用する4'-チオ RNA は、その一つであり、これまでに4'-チオ RNA アプタマーの創製や4'-チオ siRNA による遺伝子発現抑制などに成功している。また研究分担者の田良島らと共に、過剰発現している miRNA の働きを抑制する anti-4'-チオ miRNA を創製し、これらが *in vitro* のみならず *in vivo* 評価系においても miRNA の機能を顕著に阻害することを明らかにした。一方、もう1名の研究分担者である小暮は、ナノ粒子の様々な構築方法を開発した実績を有しており、人工エクソソームの構築は実現性が高いと思われる。

以上のような研究背景の下、我々は「機能性食品としての核酸」という新しい応用研究の分野開拓をめざすことを計画した。

2. 研究の目的

本研究課題では、機能性 RNA の一つであるマイクロ RNA (miRNA) を人工エクソソームに封入し、これを食することで組織や臓器に送達し機能させる方法論を確立することを目的とする。具体的には、まず研究代表者の南川が開発した4'-チオ RNA (研究期間で、更に安定性を高めた化学修飾核酸を開発) で修飾した miRNA を調製する。

この4'-チオ RNA は、化学・酵素合成が可能であり、且つ核酸の毒性の一つである自然免疫応答を全く誘起しないという特徴を有する(食の供給と食の安全性: 図1左)。この修飾 RNA で、コレステロール合成に関わるタンパク質発現を制御する miRNA を調製する(何を食するか: 図1右上)。続いて、この miRNA を分担者の小暮が開発した人工エクソソームに封入し(食の調理法: 図1左下)、その機能を *in vitro* ならびに *in vivo* で評価する(食の機能: 図1右下)。

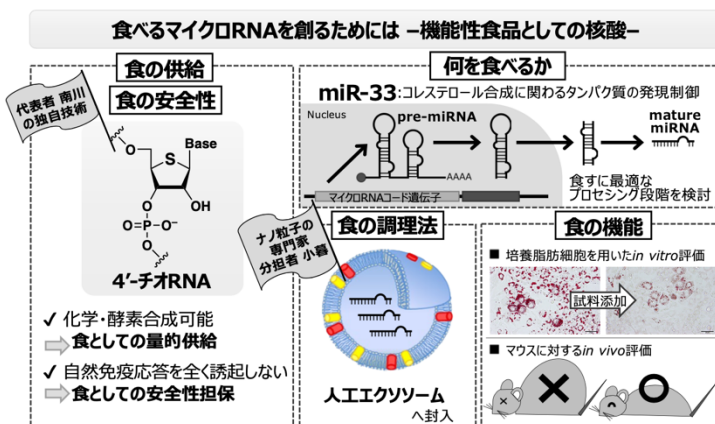


図1: 本研究課題の研究戦略の概念図

3. 研究の方法

本研究課題の目標を達成するために、まず miRNA として miR-33 を選択し、化学的(酸性条件)ならびに生化学的(分解酵素抵抗性)安定性を付与するために4'-チオ RNA で修飾を施すことにした(本研究課題では、更に安定な4'-セレノ RNA ならびに4'-チオ LNA/BNA の開発にも成功)。この4'-チオ RNA は、南川が開発した化学修飾核酸の一つであり、分解酵素に対する高い抵抗性に加え、自然免疫応答を全く惹起しない。加えて、フラノース環の酸素原子を硫黄原子に置換した極めてシンプルな化学修飾であるため天然型核酸との生物学的等価性を有するという、他の化学修飾核酸にはない特徴を有している。この修飾体で miR-33 を調製し、最終ゴールとしてマウスに給餌することで抗肥満効果を検証することを目的とした。

4. 研究成果

(1) 4'-チオ RNA 修飾型 miR-33 の合成とアンチ miRNA 効果
まず各種4'-チオリボヌクレオシドホスホロアミダイト体を合成し、これらアミダイト体を用いて4'-チオ RNA 修飾型 miR-33 を合成した。続いて、過去の方法 (Nucleic Acids Res. 2013, 41, 10659, J. Control. Release 2014, 173, 43, ChemBioChem 2014, 15, 2535) に倣いアンチ miRNA 効果を評価するための評価用プラスミドを調製した。これらを用いて遺伝子発現抑制効果の評価したが顕著な効果が観察されなかった。その理由については精査中であるが、研究を先に進めるために、miRNA と同様の RNAi 機構で遺伝子発現を抑制する siRNA

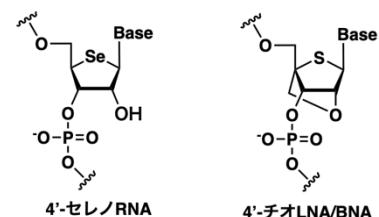


図2: 化学修飾核酸の構造

を用いてその効果を評価することにした。また研究期間中に 4'-チオ RNA よりも更に高い核酸分解酵素に対する抵抗性を示す化学修飾核酸 (4'-セレノ RNA ならびに 4'-チオ LNA/BNA) (図 2) の開発に成功したので、これらの性質評価ならびにそれらを含む RNA (siRNA) の遺伝子発現抑制効果を調べることでその性能を評価することにした。

(2) 4'-セレノ RNA の合成・性質解析と 4'-セレノ siRNA の遺伝子発現抑制効果

本研究課題では、調製した人工核酸分子を食することで効果を期待する。従ってより高い生体内安定性が望まれる。その目標達成のために硫黄原子と同族原子であるセレン原子を糖部に有する 4'-セレノ RNA を考案した。まず各種 4'-セレノリボヌクレオシドホスホリアミダイト体を合成した (太田雅士ら、有機合成化学協会誌、2020 年)。続いてこれらを用いて 4'-セレノ RNA を合成し、まずこの人工 RNA の二本鎖形成能を評価した。その結果、4'-セレノ RNA は、4'-チオ RNA には劣るものの天然型 RNA よりも熱的に安定な二本鎖を形成することが明らかとなった (図 3)。更に 50% ヒト血漿中での安定性を評価した結果、天然型 RNA ならびに 4'-チオ RNA の半減期がそれぞれ <10 秒、31 分となる条件下、4'-セレノ RNA の半減期は 100 分となり極めて高い生体内安定性を示す人工 RNA であることが明らかとなった。またそれぞれの RNA 分子の切断様式を詳細に解析すると天然型 RNA ならびに 4'-チオ RNA は、エンドヌクレアーゼによる切断で分解するのに対して、4'-セレノ RNA の場合はエンドヌクレアーゼによる切断を示すバンドは観察されず、エキソヌクレアーゼ活性によって徐々に切断されることが明らかとなった。糖部 2' 位に水酸基を有するにもかかわらずエンドヌクレアーゼによる切断がほとんど起こらないことは特筆に値すると考えている。

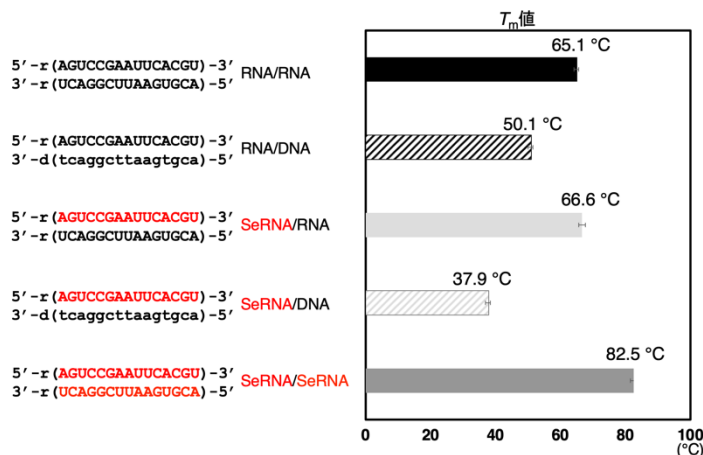


図3: 4'-セレノ RNA の二本鎖形成能

4'-チオ RNA の性能を凌駕する人工 RNA の開発に成功したので、続いてこの 4'-セレノ RNA で修飾した siRNA を種々合成し、それらの遺伝子発現抑制効果を調べた。その結果を図 4 に示したが、パッセンジャー鎖の末端部に 4'-セレノヌクレオチドを導入した 4'-セレノ siRNA (si2-si4) は天然型 (si1) と同等以上の RNAi 活性を示した。一方、ガイド鎖 5' 末端部に 4'-セレノヌクレオチドを導入した si5 は RNAi 活性がやや低下した。しかし、si5 のガイド鎖 5' 末端側に対してあらかじめリン酸化処理を行なった si6 および 5' 末端部を天然型 RNA とした si7 は天然型 (si1) と同等の RNAi 活性を示した。以上の結果から 4'-セレノ修飾の導入は、siRNA の RNAi 活性発現に必須となるガイド鎖 5' 末端部のリン酸化を妨げてしまうことが示唆された。一方で、一般に化学修飾の導入が許容されづらいと知られているガイド鎖 5' 末端から 2 番目における 4'-セレノ修飾の導入は、RNAi 活性の発現に悪影響を及ぼさない可能性が示唆された。

ところでセレン原子は、ヒトにとって必須の微量元素である一方、毒性を示すため必要量と中毒量の差が小さいことが知られている。そこで WST-8 を用いて 4'-セレノ siRNA の細胞毒性を評価した。パッセンジャー鎖両末端部にそれぞれ 4 残基 (計 8 残基) の 4'-セレノヌクレオチドを導入した si4 においても顕著な細胞毒性は観察されなかった。以上のことから、我々は、生体にも利用可能な安定性と安全性を示す新規人工 RNA、4'-セレノ RNA の開発に成功した。

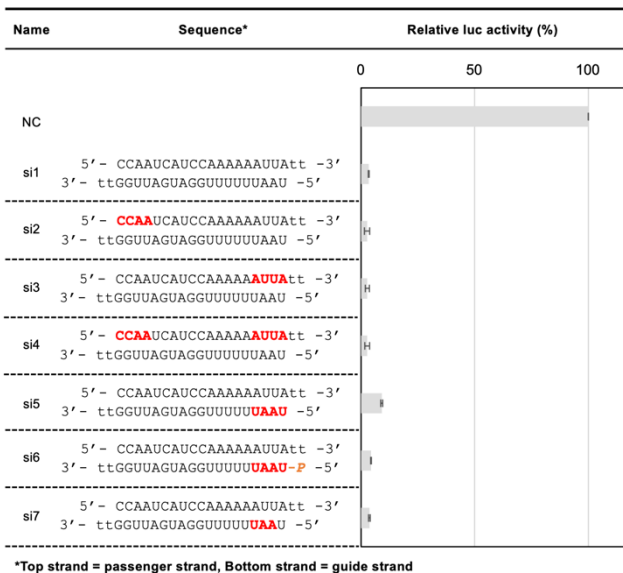


図4: 4'-セレノ siRNA の RNAi 効果

とところでセレン原子は、ヒトにとって必須の微量元素である一方、毒性を示すため必要量と中毒量の差が小さいことが知られている。そこで WST-8 を用いて 4'-セレノ siRNA の細胞毒性を評価した。パッセンジャー鎖両末端部にそれぞれ 4 残基 (計 8 残基) の 4'-セレノヌクレオチドを導入した si4 においても顕著な細胞毒性は観察されなかった。以上のことから、我々は、生体にも利用可能な安定性と安全性を示す新規人工 RNA、4'-セレノ RNA の開発に成功した。

(3) 4'-チオ LNA/BAN の合成と性質解析

上述した 4'-セレノ RNA に加え、更に新たな人工 RNA として 4'-チオ LNA/BAN を設計し、その合成にも着手した (図 5)。即ち、化合物 1 の水酸基をメシル化することで縮環させた後、引き続きホルムアルデヒド中でアルドール反応と還元を行うことで 4 位にヒドロキシメチル基を導入した 4-チオ糖 2 を合成した。生じた二つの 1 級水酸基をシリレン基で保護したのち Pummerer

反応を行うために硫黄原子を酸化したスルホキシド体 **4** へと導いた。得られた **4** に対してシリル化したピリミジン塩基存在下で Pummerer 反応を行ったところ望みとする化合物 **5** (あるいは **6**) を得ることに成功した。このものの糖部の保護基をすべて除去し、化合物 **7** (あるいは **8**) へと誘導した。得られたテトラオール

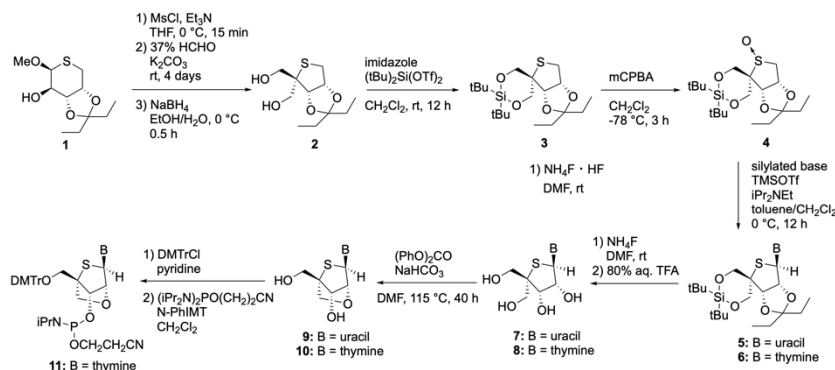


図5: 4'-チオLNA/BNAモノマーの合成法

体をも目的化合物に導くためには 4 つの水酸基を区別して保護する必要があるが、その試みはすべて意図した通りには進行しなかった。そこで化合物 **7** (あるいは **8**) を炭酸水素ナトリウム存在下炭酸ジフェニルと加熱処理を行った。その結果、目的とした化合物 **9** (あるいは **10**) を一行程で合成することに成功した。このうち化合物 **10** についてはホスホロアミダイト体 **11** へと誘導し 4'-チオ LNA/BAN を合成した。

合成した 4'-チオ LNA/BAN を用いてその性質解析を行った。まず二本鎖形成の評価を行ったところ、LNA/BAN には劣るものの RNA と安定な二本鎖を形成することが明らかとなった。また 4'-チオ LNA/BAN は、DNA に対する二本鎖形成能は低くこの性質は、4'-チオ RNA や 4'-セレノ RNA の性質と同じであった。続いて 4'-チオ LNA/BNA の

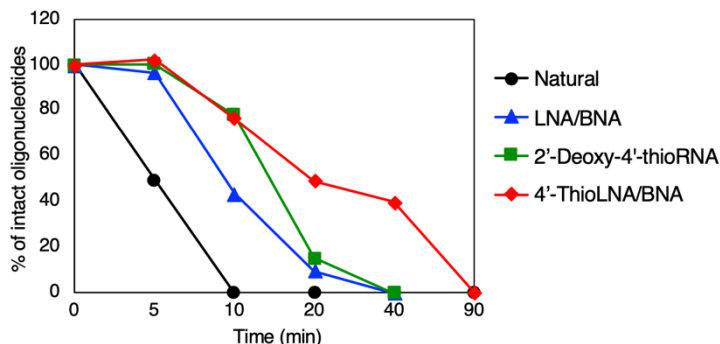


図6: 4'-チオLNA/BNAの酵素耐性

酵素耐性を評価したところ、この新規人工 RNA は核酸分解酵素に対して LNA/BNA よりも遥かに高い抵抗性を有していることが明らかとなった (図 6)。

(4) 人工エキソソームによる核酸医薬分子の細胞内送達

研究分担者の小暮は、miRNA を封入した人工エキソソームの構築とそれを用いた細胞内送達を行うため、miRNA のモデルとして市販で購入できる蛍光標識 siRNA 等を用い、そのナノ粒子化について検討を行った。小暮らは、プラスミド DNA をナノ粒子に封入する方法として、100 nm 程度のコア粒子を作成し、それを脂質膜で包み込む方法をすでに開発していたが、これを siRNA のような短い核酸分子にそのまま応用することは困難であった。そこで、siRNA のコアナノ粒子の調製方法を確立するために、種々のポリカチオンを用いて粒子化を検討したところ、siRNA のナノ粒子化には、ステアリル化アルギニン 8 重合体 (STR-R8) を用いる方法が最適であることを見出した。高分子ポリカチオンは巨大分子のプラスミドには適用可能であるが、短い核酸分子には、程よい疎水性と短いカチオン鎖が適した構造であることが示唆された。STR-R8 と siRNA の比を調節することで正電荷を有する STR-R8/siRNA ナノ粒子を構築し、負電荷リン脂質からなる脂質膜により静電的相互作用を利用して封入する技術の確立に成功した。封入率は 90% 近くになり、培養細胞を用いた実験において、標的遺伝子の有意なノックダウンに成功した。この核酸ナノ粒子を細胞から回収したエキソソームと膜融合させることで、人工エキソソームを構築できると考えた。脂質ナノ粒子およびエキソソームの脂質組成とあるイオンとの静電的相互作用を利用して、両粒子の膜融合を誘導することを試みた。その結果、脂質ナノ粒子とエキソソームの膜融合の誘導に成功した。この手法により、人工エキソソームの構築も達成可能であると考えている。

以上、本研究課題において我々は、機能性核酸分子を食する、という挑戦的な研究に挑んだ。コロナ渦の影響でバイオリジカルな評価に遅れが生じたが、当初利用する予定であった 4'-チオ RNA よりも高い安定性を示す二つの人工 RNA (4'-セレノ RNA ならびに 4'-チオ LNA/BNA) の開発に成功し、さらに 4'-セレノ RNA が化学修飾 siRNA 分子として有効であることを見出した。この人工 RNA とエキソソーム封入技術を組み合わせることで、食する核酸分子、が創製できると期待している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Maeda Rion, Saito-Tarashima Noriko, Wakamatsu Hideaki, Natori Yoshihiro, Minakawa Noriaki, Yoshimura Yuichi	4. 巻 23
2. 論文標題 Synthesis and Properties of 4 -ThioLNA/BNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 4062-4066
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.orglett.1c01306	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ota Masashi, Saito-Tarashima Noriko, Minakawa Noriaki	4. 巻 78
2. 論文標題 Chemistry for Nucleic Acid Analogs Having Sulfur and Selenium Atoms in Place of Furanose Ring Oxygen	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Synthetic Organic Chemistry, Japan	6. 最初と最後の頁 446 ~ 455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5059/yukigoseikyokaishi.78.446	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小暮 健太郎 (KOGURE Kentaro) (70262540)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・教授 (16101)	
研究分担者	田良島 典子 (TARASHIMA Noriko) (90755183)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・講師 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------