

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06449

研究課題名(和文) がん細胞内銅(I)イオンをマーカーとするsiRNAプロドラッグの開発

研究課題名(英文) siRNA prodrugs activated by Cu(I) in cancer cells

研究代表者

森廣 邦彦 (Morihiro, Kunihiko)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・准教授

研究者番号：70713890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、がん細胞内に多く蓄積した銅イオンに応答するsiRNAを開発し、がん細胞選択的に特定の遺伝子をノックダウンできるシステムの構築を目指した。まずは銅イオンで選択的に除去できる官能基で保護した人工アミダイトブロックを化学合成し、DNAおよびRNA中に導入した。非培養細胞系で銅イオン応答性を評価した結果、銅イオン選択的に保護基が除去可能なことが分かった。最後に、がん細胞で発現亢進が認められているタンパク質であるCyclin B1のmRNAに対する銅イオン応答性siRNAを合成した。本人工siRNAをがん細胞に導入した結果、銅イオン依存的にCyclin B1のノックダウン効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんは長年日本人の死因の第一位であり、その効果的な治療法の開発は喫緊の課題である。抗がん剤を用いた化学療法は外科手術および放射線治療に並ぶ重要ながん治療法の1つであるが、正常細胞に対しても毒性を示すため副作用が問題となる。本研究ではがん細胞内に集積しやすい銅イオンに反応して薬効を発現するsiRNAを開発した。本人工siRNAは細胞内の銅イオン濃度に依存してがん関連タンパク質Cyclin B1のmRNAをノックダウンするため、正常細胞にほとんど影響を与えることなくがん治療に用いることが可能である、将来的には担がんマウスモデルを用いたin vivo実験により、抗がんsiRNA医薬として評価する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed siRNAs that respond to copper ions accumulated in large amounts in cancer cells, aiming to construct a system capable of selectively knocking down specific genes in cancer cells. Initially, we chemically synthesized artificial amidite blocks protected with functional groups that can be selectively removed by copper ions, and incorporated them into DNA and RNA. We assessed the responsiveness to copper ions in a non-cultured cell system and observed selective removal of the protective groups by copper ions. Finally, we synthesized a copper ion-responsive siRNA targeting the mRNA of Cyclin B1, a protein known to be up-regulated in cancer cells. Introduction of this engineered siRNA into cancer cells resulted in copper ion-dependent knockdown of Cyclin B1.

研究分野：核酸化学

キーワード：銅イオン siRNA がん

1. 研究開始当初の背景

核酸医薬とは、(修飾)ヌクレオチドが十～数十残基連結した人工オリゴヌクレオチドであり、遺伝子発現を介さず直接生体分子に作用することで薬効を発揮する。核酸医薬は低分子医薬や抗体医薬と異なり、細胞内の DNA や RNA を直接標的化できることから、従来は治療が困難であった疾病への適用が大いに期待されている。2018年には RNA 干渉 (RNAi) メカニズムに基づいた初めての核酸医薬である Onpatro™ が米国 FDA ならびに欧州 EMA より承認を受け、その開発競争が世界中で過熱化している。RNAi は短鎖の RNA 二重鎖 (siRNA) が種々のタンパク質と RISC 複合体を形成した後、配列特異的に mRNA を切断する遺伝子発現抑制法である。siRNA は強力な遺伝子ノックダウン効果を示す一方、欠点としてオフターゲット効果に由来する毒性などが挙げられる。もし「siRNA を特定の場所でのみ活性化すること」ができれば、毒性の軽減や標的遺伝子の拡大など、RNAi 医薬品の開発においてさらなるブレークスルーをもたらすものと期待される。

siRNA の選択的な活性化を実現するためには、プロドラッグ化技術が有効であると考えられる。プロドラッグは化学修飾によって一時的に薬効を「オフ」状態にした化合物群であり、特定の刺激で修飾が除去されることによって選択的に「オン」状態に活性化することができる。これまでに低分子医薬や抗体-薬物複合体のプロドラッグ化が数多く実施され、一部は承認および臨床試験段階にある [Zhang *et al. Eur. J. Med. Chem.* 2017, 139, 542]。即ち、がん選択的なプロドラッグ化を siRNA に対して施すことで、RNAi のオフターゲット効果などによる通常細胞への副作用が大きく低減できると期待される。

2. 研究の目的

本研究では「がん選択的な核酸医薬」を実現するべく、がん細胞に過剰に蓄積した銅(I)イオンに反応して薬効を発揮する siRNA プロドラッグの創製を目指す (図 1A)。がん細胞では銅(I)イオンの取り込みと排出機構が破綻しており、細胞内にプールとして蓄えられていることが明らかにされている [Gupte *et al. Cancer Treat. Rev.* 2009, 35, 32] (図 1B)。すなわち、通常細胞との銅(I)イオン濃度の差をがんを標的化するためのマーカーとして利用することができる。例えば、抗酒癖剤であるジスルフィラムを硫酸銅とともに投与することで、がん細胞への銅イオンの過剰蓄積を利用した抗がん治療が報告されている [Skrott *et al. Nature* 2017, 552, 194]。本研究の独創性は主に以下の 2 点にある。

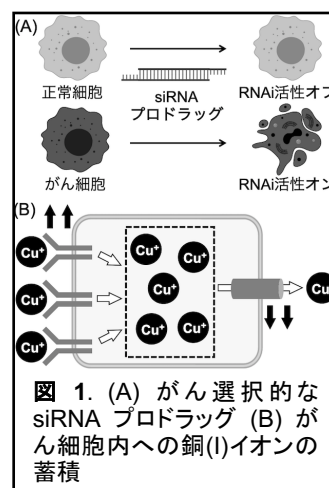


図 1. (A) がん選択的な siRNA プロドラッグ (B) がん細胞内への銅(I)イオンの蓄積

(がん選択的に機能する siRNA の開発) 本研究は高濃度の銅(I)イオンに反応した siRNA の活性化を行うことで、がん選択的な RNAi 医薬品としての可能性を世界で初めて示すものである。本研究が成功すれば、正常細胞への影響を抑制可能な副作用が小さい核酸医薬の開発につながることを期待される。本手法は外部刺激に頼ることがなく、医療現場で用いる際に特別な装置や技術を必要としないため、非常に実用性の高いがん治療薬になり得る。

(有機合成化学を基盤としたシステムの構築) 本研究は生物学的手法と比較して有機化学的に分子構造を変換できる強みを有している。例えば、今年ノーベル化学賞に輝いた CRISPR-Cas9 システム中の guide RNA (gRNA) に本技術を導入すれば、銅(I)イオン濃度依存的な遺伝子操作が可能になる。さらに、応答性を調整することも容易であり、鉄(II)や亜鉛(II)イオンといった他の生体金属イオンに反応したシステムの構築も可能である。

3. 研究の方法

(1) 銅(I)イオン応答型リボヌクレオシドの機能評価

申請者はこれまでに銅(I)イオン応答型リボヌクレオシドである rU^{tp} の化学合成に成功している (図 2A)。 rU^{tp} は銅(I)イオンによって天然のウリジンに変換されるため、siRNA に搭載することで銅(I)イオン濃度依存的な遺伝子発現制御が期待できる (図 2B)。本研究ではまず rU^{tp} の性質をヌクレオシドレベルで評価する。具体的には、 rU^{tp} の中性緩衝溶液に銅(I)イオン源としてテトラキス(アセトニトリル)銅(I)ヘキサフルオロホスファートを様々な濃度で加えて 37 °C 下で静置する。一定時間後に反応液を HPLC によって分析し、ウリジンへの変換を速度論的に解析する。また、銅(II)イオンを初め、他

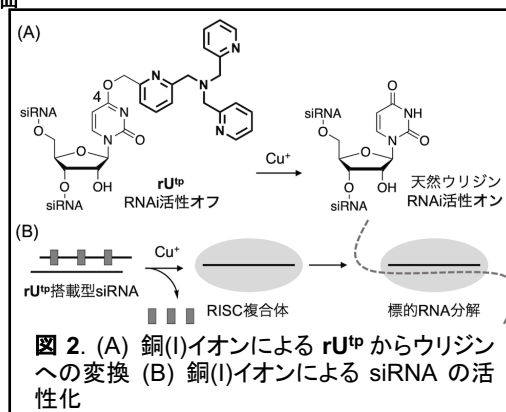


図 2. (A) 銅(I)イオンによる rU^{tp} からウリジンへの変換 (B) 銅(I)イオンによる siRNA の活性化

の金属イオン（鉄(II)イオンや亜鉛(II)イオンなど 10 種類程度を予定）を加えて同様に実験を行い、銅(I)イオンに対する反応選択性を評価する。

(2) 銅(I)イオン応答型 siRNA の合成と機能評価

rU^{TP}を核酸自動合成機を用いて siRNA 中に導入する。標的をルシフェラーゼおよびアポトーシス抑制タンパク質 Bcl-xL の mRNA として siRNA を配列設計する。生成物は HPLC 精製後にマスペクトロメトリーによって同定する。rU^{TP}の修飾数や修飾位置が異なる複数の siRNA の融解温度 (T_m 値) を測定し、rU^{TP}が RNA 二重鎖の安定性に与える影響を精査する。また、細胞培養系で用いる場合、細胞内ヌクレアーゼによる siRNA の分解が問題となる場合が多い。そこで、ヒト血漿や各種ヌクレアーゼと rU^{TP} 搭載型 siRNA を混合し、ゲル電気泳動などによって残存する siRNA を定量することで、rU^{TP}修飾とヌクレアーゼ耐性能の関連性についても考察する。ヌクレアーゼ耐性が不十分な場合、各 RNA 鎖の末端どうしを連結する「ダンベル化」を検討することでその改善を図る [Abe *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 15108]。

(3) 細胞培養系を用いた薬効評価

ヒトがん細胞を用いて銅(I)イオン応答型 siRNA プロドラッグの性質を調べる。プロドラッグをトランスフェクション試薬 (RNAiMAX など) によって細胞内に導入した後、培養液に銅(I)イオン源を添加して一定時間培養する。ルシフェラーゼ活性をレポーターアッセイによって評価し、銅(I)イオン源の有無による RNAi 効果の差を検証する。Bcl-xL については RNA を抽出して cDNA を作製後、リアルタイム PCR によってその発現量を定量する。これらの実験は銅(I)イオンのみならず様々な金属イオンで評価を行う。また、Bcl-xL のノックダウンは細胞死を誘導することが知られていることから、MTT アッセイなどの細胞増殖試験を実施することで抗がん剤としてより実践的に評価する。さらに、ヒト正常細胞 (胎児腎細胞 HEK293T など) で同様の実験を実施することで、がん細胞に対する選択性も精査する。

(4) モデルマウスを用いた薬効評価

銅(I)イオン応答型核酸プロドラッグの有効性を、ヒトがん細胞を生着させた免疫不全ヌードマウスを用いて評価する。餌や飲み水に銅(I)イオン源を添加することでがん細胞内の銅(I)イオン濃度をあらかじめ上昇させ、一定期間経過後にプロドラッグを尾静脈から投与する。この際、がん組織へのドラッグデリバリー担体として脂質ナノ粒子やリガンド分子の利用を予定している。ポジティブコントロールとしては保護基をもたない siRNA を、ネガティブコントロールとしてはスクランブル配列の siRNA を用いる。時間経過に伴う腫瘍サイズの変化を追跡するとともに、一定期間後に解剖して腫瘍の重量を測定することで抗がん活性を評価する。また、核酸分子は肝臓に集積して毒性を示す場合が多いため、定期的に採血して血中の AST および ALT を定量することで安全性についても精査する。

4. 研究成果

本研究ではまず上記の通り銅イオン応答性ヌクレオチドの化学合成から着手した。市販のウリジンから数工程で目的のアミダイトブロックの合成に成功し、核酸自動合成機を用いて DNA および RNA 中に導入した。まずは DNA 中での銅イオン応答性を非培養細胞系で精査した。銅イオン応答性 DNA は銅イオン存在下で経時的に天然の DNA に変換され、本分子設計の妥当性を示すことができた (図 3A)。また、還元型グルタチオンを添加すると反応が加速されることから、1 価の銅イオンが活性化に重要であることが分かった (図 3B)。他の金属イオンに対する反応性は非常に低く、銅(I)イオンに対する優れた選択性を有していることが明らかとなった (図 3C)。

続いて、がん細胞で発現の亢進が認められているタンパク質の 1 つである Cyclin B1 の mRNA を標的としたし RNA に、銅イオン応答性ヌクレオチドを導入した。その際、siRNA のアンチセンス鎖中の 3 箇所を導入位置として選んだ (図 4A)。修飾 siRNA は天然の siRNA と比較して融解温度 (T_m 値) が低下したものの、すべて 37 °C 以上であり細胞内で安定な二重鎖を形成し得ることが分かった。これらの銅イオン応答性 siRNA を HeLa 細胞にトランスフェクションして一定時間後

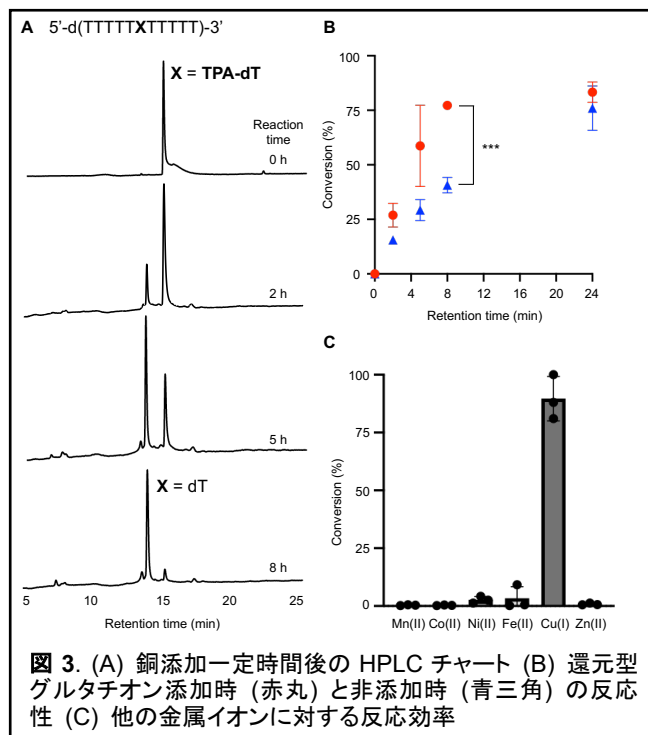


図 3. (A) 銅添加一定時間後の HPLC チャート (B) 還元型グルタチオン添加時 (赤丸) と非添加時 (青三角) の反応性 (C) 他の金属イオンに対する反応効率

に Cyclin B1 の mRNA 量を定量したところ、銅イオン源の添加によってノックダウン効果が上昇する結果が得られた (図 4B)。また、修飾位置によって siRNA の活性化効果が異なることも分かった。以上の結果より、本研究では新たに銅イオンによって活性化できる siRNA を開発し、実際にヒトがん細胞を用いた実験によりその有用性を証明することができた。将来的にはがんマウスモデルを用いた *in vivo* 実験などにより、siRNA 医薬としてより実践的な評価を行なっていく必要があると考えられる。これら一連の成果は学術論文としてとりまとめ、Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 誌に報告した [DOI: 10.1016/j.bmcl.2024.129738]。

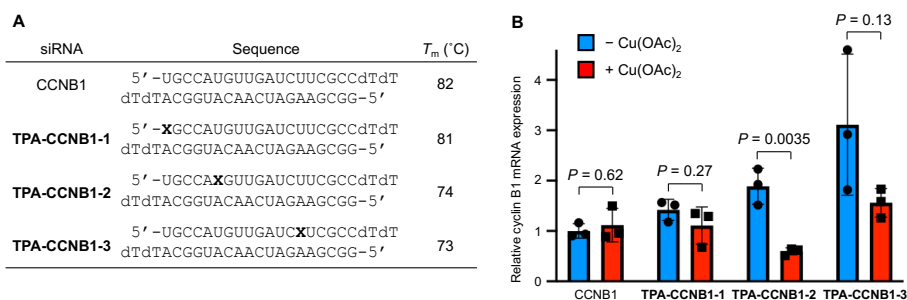


図 4. (A) 合成した銅イオン応答性 siRNA の配列と融解温度 (X = 銅イオン応答性ヌクレオチド) (B) 銅イオン源添加の有無による HeLa 細胞中の Cyclin B1 の mRNA 発現量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Morihiro Kunihiko, Tomida Yasuhiro, Ando Honami, Okamoto Akimitsu	4. 巻 104
2. 論文標題 Copper-mediated siRNA activation for conditional control of gene expression	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 129738 ~ 129738
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bmcl.2024.129738	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yasuhiro Tomida, Honami Ando, Kunihiko Morihiro, Akimitsu Okamoto
2. 発表標題 Activation of siRNA triggered by copper ion accumulated in cancer cells
3. 学会等名 The 49th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富田 康弘、森廣 邦彦、岡本 晃充
2. 発表標題 がん細胞内に蓄積された銅イオンをトリガーとするsiRNAの活性化
3. 学会等名 日本化学会第103春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安藤 帆菜美、森廣 邦彦、岡本 晃充
2. 発表標題 がん細胞内に蓄積した不安定な金属イオンをトリガーとする核酸医薬の活性化
3. 学会等名 第11回CSJ化学フェスタ2021
4. 発表年 2021年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------