

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790107

研究課題名（和文） siRNA 医薬品の創製を指向した新規オリゴ核酸修飾法の開発

研究課題名（英文） Novel modification method of oligonucleotides for siRNA medicine

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

研究成果の概要（和文）：次世代創薬ターゲットとして注目されている siRNA 医薬品の創製を目指し、従来 siRNA の問題となっている遺伝子発現抑制能、分解酵素耐性、細胞膜透過性などの改善が期待できる siRNA 合成のための新規オリゴ核酸修飾用担体ならびに種々の化学修飾核酸の簡便合成法を開発した。

研究成果の概要（英文）：Small interfering RNAs (siRNAs) are considered to be attractive candidates as nucleic acid drugs, owing to their powerful regulation of gene expression in a sequence-specific manner. In this study, novel some solid supports and synthetic method of artificial nucleic acids for chemically modified siRNA were developed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：核酸医薬・siRNA・オリゴ核酸修飾

1. 研究開始当初の背景

(1) siRNA 医薬品は相補的な配列を含む標的 mRNA の遺伝子発現を抑制することから、注目を集めている。しかし、siRNA を血中に単独で投与した場合、細胞膜透過性が低く、また酵素による分解を受けるため、十分なタンパク質発現抑制 (RNAi) 効果が得られない。

(2) 申請者は先行研究で、RNAi 効果に悪影響を及ぼすことなく、酵素耐性を向上できる化学修飾法を見出している。また、他の研究グループの研究により、RISC タンパク質の

siRNA 認識部位には芳香族（疎水性）アミノ酸が豊富に存在していることが明らかになっている。

(3) 申請者は本研究において鍵となる反応を独自で開発している。siRNA を合成する際に通常用いる固相合成法では、RISC タンパク質の siRNA 認識に重要な 3' 末端の水酸基を除去することは困難である。申請者が開発した反応（不均一系触媒を用いた鈴木 - 宮浦反応）を用いることにより目的の siRNA が合成できると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 申請者は先行研究で、siRNA の 3' 末端 2 塩基突出部分の糖部あるいは糖-塩基部を 1,3-ベンゼンジメタノール (BDM) に置換すると、分解酵素に対する耐性が向上することを見出している。そこで、疎水性の増大による細胞膜透過性の改善を目指し、BDM の 3' 末端水酸基を欠損させた siRNA の合成に着手した。水酸基欠損型 siRNA は標的とする遺伝子の発現をより強力に抑制することも期待できる。さらに、開発した手法を用いて siRNA の体内動態を評価する上で有用な放射性同位元素や陽電子放出元素、あるいは蛍光性物質を導入したプローブが合成できる。

(2) 3' 末端 2 塩基を塩基部改変型ヌクレオシドに置換することにより遺伝子発現抑制能を低下させることなく分解酵素耐性を獲得できると考えられた。塩基部欠損ヌクレオシドへの置換は塩基部の意義解明にも繋がると考えられた。

(3) (2) の結果から、3' 末端突出 2 塩基の塩基部を欠損させても遺伝子発現抑制活性が低下しないことが判明した。そこで、突出 2 塩基を疎水性残基に置換した siRNA ライブラリー構築のために 1-デオキシ-1-エチニル-β-D-リボフラノースの立体選択的の合成を検討した。

3. 研究の方法

(1) 従来の固相合成法では 3' 末端水酸基の除去は困難であることから、目的の siRNA を合成するにあたり、新規修飾法を開発する必要がある。ボロン酸エステル、スルホン酸エステルやトリアゼンを連結した固相担体を用いて標的の配列を有するオリゴ核酸を構築した。オリゴ核酸が構築できたスルホン酸エステルやトリアゼンを連結したオリゴ核酸の脱スルホン酸化や脱窒素化を各種反応条件にて検討した。

(2) リボース誘導体から塩基部欠損型ヌクレオシドを合成し、核酸固相合成用誘導体に変換した後、標的の配列を有するオリゴ核酸を構築した。アニーリングにより siRNA とし、物性を評価した。

(3) 1-デオキシ-1-エチニル-β-D-リボフラノースは、1 例のみ合成報告例があるが、立体選択性がなく、オリゴヌクレオチド導入への応用が困難であった。そこで立体選択的の合成を検討した。

4. 研究成果

(1) 種々の担体を調製し、検討を行った結果、スルホン酸エステル連結型担体ならびにトリアゼン連結型担体を用いることにより、目的の siRNA を合成する上で鍵となる官能基を末端に導入したオリゴ核酸を合成することに成功した。

(2) ルイス酸とトリエチルシランを用いたアノマー位の脱水酸化法を利用することにより、リボース誘導体から塩基部欠損型ヌクレオシドを得た。ルイス酸として TMSOTf を用いることにより脱水酸化が定量的に進行し、原料から塩基部欠損型ヌクレオシドをほぼ定量的に合成することができた (図 1)。3' 末端突出 2 塩基を塩基部欠損型ヌクレオシドに置換した RNA は、予想通り酵素耐性を有しており (図 2) また興味深いことに天然型 siRNA と比較して優れた遺伝子発現抑制効果を示した (図 3)。

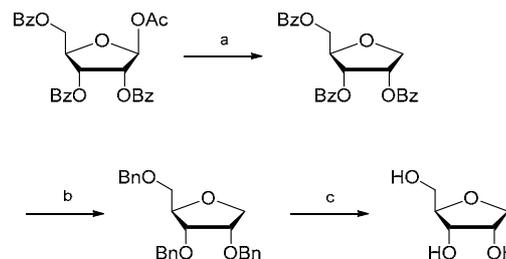


図 1 Reagents and conditions: (a) Et_3SiH , TMSOTf, MeCN, rt, quant; (b) i) NaH, MeOH, rt; ii) BnBr, NaH, DMF, rt, quant; (c) H_2 , $\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$, MeOH, rt, 94%.

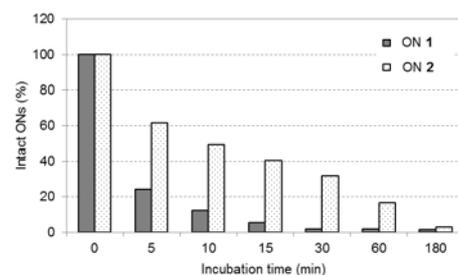


図 2 ヌクレアーゼ耐性 (ON 1: 天然型 siRNA, ON 2: 塩基部欠損型置換 siRNA)

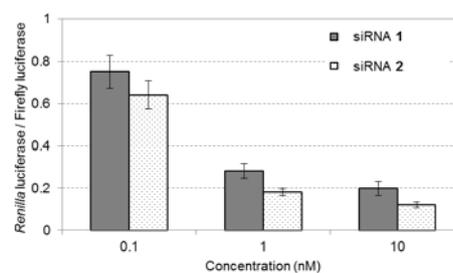


図 3 Dual-luciferase アッセイ (ON 1: 天然型 siRNA, ON 2: 塩基部欠損型置換 siRNA)

(3)(2) で用いた手法を利用してリボースのテトラシル保護体に TMSOTf 存在下でトリメチルシアニドを作用させることにより、1位にβ選択的にシアノ基を導入することができた。シアノ基のエステルへの変換および水酸基の保護を行った後、エステルからエチニル基に変換し、保護基を除去することにより1-デオキシ-1-エチニル-β-D-リボフラノースを立体選択的に合成することに成功した(図4)。銅存在下、1-デオキシ-1-エチニル-β-D-リボフラノースとアジド化合物との環化付加反応は効率よく進行した。

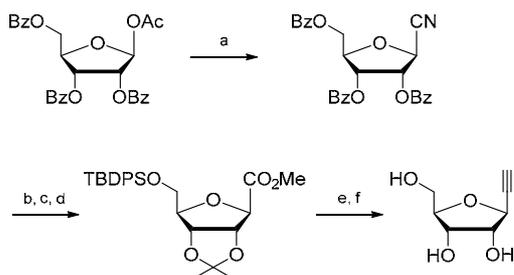


図4 Reagents and conditions: (a) TMSCN, TMSOTf, CH₂Cl₂, rt, quant; (b) i) NaOMe, MeOH, rt; ii) HCl, rt, 70%; (c) TBDPSCl, pyridine, rt, 79%; (d) 2,2-dimethoxypropane, *p*-TsOH, acetone, 94%; (e) i) DIBAL-H, CH₂Cl₂, -78 °C; ii) Bestmann-Ohira reagent, K₂CO₃, MeOH, rt, 67%; (f) CF₃CO₂H, H₂O, rt, 79%.

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2件)

Yoshiaki Kitamura、Kana Edayoshi、Yukio Kitade、Stereoselective synthesis of 1-deoxy-1-ethynyl-β-D-ribofuranose as a versatile scaffold、Tetrahedron Lett.、査読有、53、2012、6987-6989.

Kazumi Taniho、Remi Nakashima、Mahmoud Kandeel、Yoshiaki Kitamura、Yukio Kitade、Synthesis and biological properties of chemically modified siRNAs bearing 1-deoxy-β-D-ribofuranose in their 3'-overhang region、Bioorg. Med. Chem. Lett.、査読有、22、2012、2518-2521.

〔学会発表〕(計3件)

Kana Edayoshi、Yoshiaki Kitamura、Masato Ikeda、Yukio Kitade、Stereoselective synthesis of 1-deoxy-1-ethynyl-β-D-ribofuranose and its applications、第39回国際核酸

化学シンポジウム、名古屋、2012年11月

枝吉佳奈、喜多村徳昭、北出幸夫、1-Deoxy-1-ethynyl-β-D-ribofuranoseの立体選択的合成、平成24年度日本薬学会東海支部例会、静岡、2012年7月

Kazumi Taniho、Yoshiaki Kitamura、Yukio Kitade、Synthesis of 1-deoxy-β-D-ribofuranose and its application for RNAi studies、第38回国際核酸化学シンポジウム、札幌、2011年11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)
岐阜大学・工学部・教授
研究者番号：20137061

(3)研究協力者

上野 義仁 (UENO YOSHIHITO)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号：20250467

(4)研究協力者

池田 将 (IKEDA MASATO)

岐阜大学・工学部・准教授

研究者番号：20432867