

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390025

研究課題名(和文)RNA創薬を目指す実用的RNA分子の創製と核酸オリゴマーのPETプローブ化

研究課題名(英文)Owing to the development of RNA medicine, discovery of practical RNA molecules and synthesis of nucleic acid PET probes

研究代表者

北出 幸夫 (Kitade, Yukio)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号：20137061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：核酸オリゴマーのクリック反応によるポスト修飾が可能なエチニルベンゼン置換型グリコール及び1-デオキシ-1-エチニルリボースの新規合成法の開発、並びに塩基部欠損型リボースの簡便合成法を確立し、それらをRNAオリゴマーに誘導した。さらに、クリック反応などを用いてRNA3'-末端ダンダリングエンド部にグルコサミン誘導体を導入した二本鎖RNAの開発し、その機能評価を実施した。また、ヌクレアーゼ耐性やオフターゲット効果の回避を念頭としたRNA3'-末端ダンダリングエンド部修飾法の開発にも成功した。化学修飾miR-205を開発し、イヌ・メラノーマに対する臨床試験を実施中である。

研究成果の概要(英文)：Ethynylbenzene-substituted glycol, as a versatile click-reaction probe, was synthesized and their RNA post-labeling property was investigated. Stereoselective synthesis of 1-deoxy-1-ethynyl-β-D-ribofuranose was performed for RNA labeling. SiRNAs and miRNAs bearing urea/thiourea-bridged aromatic compounds at their 3'-end were also prepared and these dsRNAs definitely showed nuclease resistance. Oligonucleotides with glucosamine at the 3'-position were synthesized and their biological activity was investigated. Some of chemically modified siRNAs at the 3'-position showed avoidance of off-target effect. Chemically modified synthetic miRNA-205 inhibited the growth of melanoma cells in vitro and in vivo. A clinical trial of miR-205 against canine melanoma is now in progress; thus far, intratumoral injection of miR-205 into a recurrent tumor derived from naturally occurring canine melanoma has resulted in complete remission in 2 of 5 cases.

研究分野：医歯薬学

 キーワード：RNA創薬 ジンク オリゴヌクレオチド クリック反応 ラベル標識化 薬物動態 PETプローブ バイオイメー  
 ドラッグデリバリー

## 1. 研究開始当初の背景

2006年のノーベル医学生理学賞がRNA干渉に与えられたように、RNA分子の多様な機能が解明されつつある。近年、マイクロRNA(miRNA)が発見され、関連するメッセンジャーRNA(mRNA)の発現制御に基づく発生や細胞分化において重要な調節因子であることが判明してきた。更に癌の発生と細胞内miRNAレベルの変動との因果関係が解明されてきたことで、RNA創薬に最も近い分子としてmiRNAは脚光を浴びている。(R. Schickel, *et al.*, *Oncogene*, 2008, **27**, 5959-5974.) 申請者らは既に、3'-末端ダングリングエンド部分(水素結合による2本鎖形成をしない末端部分)を芳香族化合物を含む疎水性残基で置換した核酸オリゴマーの開発に成功している。更に、大腸がん細胞中で特異的にその発現量の低下が観察されるmiRNA-143に対する化学修飾型miRNA-143の投与でも、内在性のmiRNA-143同様にERK5やc-mycのタンパク発現を低下させることを確認している。このような化学修飾型miRNA-143は、内在性のmiRNAと比較して有意に、ヌードマウスを用いたヒト大腸がん細胞の増殖を、患部への一回局所投与、さらに静脈投与でも顕著に阻害した。本知見は既に特許出願済みである(特願2008-242263)。最近、これら化学修飾型miRNAの標的がん組織への移行性が高いこと並びに生物学的半減期の増大が確認され、化学修飾によるRNA分子の高機能化や薬物送達能(DDS)の問題も克服可能である事が示されている。

## 2. 研究の目的

我々は様々な3'末端修飾法を開発してきたが、今回はこれまでに得られた知見に基づく修飾デザイン法則・概念に則り、miRNAのさらなる高機能化を目指す。即ち本研究では、下記に示す項目のRNA創薬の実現が可能な実用的RNAの探索がメインテーマであるが、

更に項目 , についても検討を加える。

研究目的の概要は、項目 RNA創薬の実現が可能な実用的RNAの分子設計・合成を実施、項目 核酸分子のPETラベル化手法を用い、その実用性・有効性を解明、項目 開発した化学修飾RNA分子が癌などの疾病治療に有効か確認するため、岐阜大学動物病院との連携で、イヌなどの伴侶動物を用いた臨床治験の実施、である

ここでmiRNAとは、細胞内でRNAiと呼ばれる経路のエフェクター因子の1つである。RISCと呼ばれるタンパク複合体に取り込まれることで、ターゲットmRNAを認識し、転写後RNA調節因子として働く。2本鎖RNAのうち、主にRISC内に残り、遺伝子発現調節に関わる方の鎖をガイド鎖、もう一方の鎖をパッセンジャー鎖と呼ぶ。

本研究では、RNA3'-末端化学修飾用の新規CPG樹脂の開発と、これまでに合成に成功している核酸オリゴマー修飾用の糖部置換型ヌクレオシド(T. Ando, H. Shinohara, X. Luo, M. Kandeel, Y. Kitade, *Carbohydr. Res.*, 2007, **342**, 2641-2648.) 塩基部欠損型ヌクレオシド(K. Taniho, R. Nakashima, M. Kandeel, Y. Kitamura, Y. Kitade, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22, 2518-2521 (2012))などを用いて末端や塩基配列中に天然型塩基と置換させて導入した化学修飾miRNAを作成する。これまでの知見などをふまえて主にガイド鎖はmRNAとの認識に重要であると考えられているため「RISCに残りやすい」ようにデザインし、パッセンジャー鎖は逆に「RISCに残りにくい=放出されやすい」ようにデザインする。(Y. Akao, Y. Kitade, *et al.*, *Cancer Gene Ther.*, 2010, **17**, 398-408.)

## 3. 研究の方法

本研究を進めるに当たり、i) これまでの業績を基にマイクロRNA分子の改良を行い、我々が目指すRNA創薬についての問題点のさ

らなる改善（ヌクレアーゼ耐性の増加、細胞膜透過性の向上、オフターゲット効果の回避）及び、ii) PET ラベル化などへの実用性が最も高いポスト修飾可能な分子の創製を第一の目標とする。次に、得られた高機能性 RNA 分子、及び RNA ポスト修飾法を用いて、細胞レベルでの試験により活性の確認を行い、その後実験動物を用いての活性の確認及び薬物動態の解析を行う。以上の内容を岐阜大学工学部、大学院連合創薬医療情報研究科、岐阜大学動物病院及び理化学研究所との連携で実施していく。

#### 4. 研究成果

(1) 1-Deoxy-1-ethynyl-β-D-ribofuranose は、アジド化合物との CuAAC 反応による核酸オリゴマーの陽電子放出断層画像撮影法 (Positron Emission Tomography; PET) への応用のほか、新たな C-ヌクレオシド構築におけるビルディングブロックとしての利用が期待できる。そこで、この化合物の新規立体選択的合成法を確立した。また申請者らは既に核酸オリゴヌクレオチドの PET ラベル化に適応可能な、リン酸緩衝液中、配位子非存在下での CuAAC 反応条件を確立しており、同条件下、1-deoxy-1-ethynyl-β-D-ribofuranose と 4-fluorobenzylazide との環化付加反応に成功した。

(2) エチニルベンゼン置換型グリコールは、申請者らが以前に開発したエチニルベンゼン骨格アナログを核酸オリゴマーに導入した場合、天然型核酸とは安定な二本鎖を形成しないことが示唆されたため、オリゴヌクレオチドの糖部 5'-3'位にある 2 つの酸素の原子間距離が天然型核酸により近くなるように新たに設計したものである。この化合物の新規合成ルートを確立した。さらに核酸オリゴマーの内部や末端へ導入し、4-fluorobenzylazide を用いて上述の CuAAC 反応を行った。その結果、RNA 内部、末端どちら

へ導入した場合でも、既存のエチニルベンゼン骨格を導入したものと比較して 15~22%、環化付加反応の収率向上を確認した。

(3) siRNA において塩基部の必要性の有無を検証するために、塩基部欠損型リボース (RH) の簡便合成法の開発に成功した。RH を siRNA 末端や内部に置換した場合、末端置換では天然型 dTdT (Thymidine dimer) よりも優れたヌクレアーゼ耐性、若干ではあるが強い遺伝子抑制能を有していることを明らかとした。内部置換では、末端ダングリングエンドに続いた位置に 1 つ RH 修飾を施した siRNA が最も優れた RNAi 活性を示すことを確認した。

(4) 先に合成したリン酸ジエステル結合で連結したベンゼン-ピリジン型修飾をウレアあるいはチオウレア結合で連結したダングリングエンド部を有する各種 siRNA や miRNA を合成して、その生物学的機能を評価した。その結果、顕著なヌクレアーゼ耐性や有効なノックダウン効果を確認した。

(5) 芳香族化合物をウレアあるいはチオウレア結合で連結したダングリングエンド部である各種ダイマー体を合成し、ヒト遺伝子組換え Ago2 の PAZ domain との結合親和性を評価した。蛍光クエンチング法ならびに ITC の結果から、ピリジン-ピリジン型よりもベンゼン-ピリジン型が、PAZ domain との結合に有利である傾向を確認した。

(6) 肝細胞などに発現しているデスミン、ビメンチンは N-アセチルグルコサミンを選択的に認識することが知られている。糖鎖を認識するレセプターを介したデリバリー方法を構築するため、グルコサミン類縁体の RNA へのクリック反応を用いた修飾方法の開発を試みた。クリック反応にてグルコサミン類縁体を連結した RNA を合成した。現在、グルコサミン結合型 RNA の詳細な生物機能評価を実施している。

(7) オフターゲット効果の回避を念頭とし

た RNA3'-末端ダングリリングエンド部修飾法の開発を実施した。siRNA は RISC に取り込まれた後、片方の鎖 (sense 鎖) が除去される。残った鎖 (antisense 鎖) が配列特異的に mRNA と結合し、切断することで遺伝子発現抑制が起こる。しかし、誤って RISC に sense 鎖が残った場合、標的以外の mRNA に結合しオフターゲット効果が起こる。ダングリリング部位への極性残基の導入によって sense 鎖の RISC への取り込みが抑制されることを明らかにした。極性残基は、比較対照の dTdT ダイマーより PAZ との結合親和性が低いことが示された。

(8) メラノーマ細胞において特異的発現低下が観察される miR-205 を標的とする化学修飾 miR-205 を開発し、岐阜大学動物病院と連携したイヌを用いた臨床試験 (ヒトに対しては前臨床試験に相当) を実施中であるが、現時点では良好な結果を得ている。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 8 件)

(1) M. Kandeel, A. Al-Taher, R. Nakashima, T. Sakaguchi, A. Kandeel, Y. Nagaya, Y. Kitamura, Y. Kitade, Bioenergetics and Gene Silencing Approaches for Unraveling Nucleotide Recognition by the Human EIF2C2/Ago2 PAZ Domain, PLOS ONE、査読有、9 巻、2014、e94538、DOI: 10.1371/journal.pone.0094538

(2) Q. Ren, K. Tsunaba, Y. Kitamura, R. Nakashima, A. Shibada, M. Ikeda, Y. Kitade, Synthesis of ethynylbenzene-substituted glycol as a versatile probe for labeling oligonucleotides, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters、査読有、24 巻、2014、1519-1522、DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.01.082

(3) S. Noguchi, J. Iwasaki, M. Kumazaki, T. Mori, K. Maruo, H. Sakai, N. Yamada, K.

Shimada, T. Naoe, Y. Kitade, Y. Akao, Chemically Modified Synthetic micro RNA-205 Inhibits the Growth of Melanoma Cells In Vitro and In Vivo, Molecular Therapy、査読有、21 巻、2013、1204-1211、DOI: 10.1038/mt.2013.70

(4) M. Kandeel, Y. Kitade, In silico molecular docking analysis of the human Argonaute2 PAZ domain reveals insights into RNA interference, Journal of computer-aided molecular design、査読有、27 巻、2013、605-614、DOI: 10.1007/s10822-013-9665-3

(5) X. Luo, T. Sugiura, R. Nakashima, Y. Kitamura, Y. Kitade, Synthesis of oligonucleotides with glucosamine at the 3'-position and evaluation of their biological activity, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters、査読有、23 巻、2013、4157-4161、DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.05.036

(6) Y. Kitamura, Y. Masegi, S. Ogawa, R. Nakashima, Y. Akao, Y. Ueno, Y. Kitade, Chemically modified siRNAs and miRNAs bearing urea/thioures-bridged aromatic compounds at their 3'-end for RNAi therapy, Bioorganic & Medicinal Chemistry、査読有、21 巻、2013、4494-4501、DOI: 10.1016/j.bmc.2013.05.046

(7) M. Kandeel, Y. Kitade, Computational Analysis of siRNA Recognition by the Ago2 PAZ Domain and Identification of the Determinants of RNA-Induced Gene Silencing, PLOS ONE、査読有、8 巻、2013、DOI: 10.1371/journal.pone.0057140

(8) Y. Kitamura, K. Edayoshi, Y. Kitade, Stereoselective synthesis of 1-deoxy-1-ethynyl- $\beta$ -D-ribofuranose as a versatile scaffold, Tetrahedron Letters、査読有、53 巻、2012、6987-6989、DOI: 10.1016/

[学会発表](計 19 件)

(1) 柴田 綾、溝口 真帆代、喜多村 徳昭、池田 将、北出 幸夫、グルコサミン結合型 RNA 分子の合成とその機能、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 26 日、神戸学院大学(兵庫県・神戸市)

(2) 溝口真帆代、柴田綾、喜多村徳昭、池田将、北出幸夫、生体親和性グルコサミン結合型 RNA 分子の合成、第45回中部化学関係学協会支部連合秋季大会、2014年11月30日、中部大学(愛知県・春日井市)

(3) Y. Kitamura, Q. Ren, K. Tsunaba, A. Shibata, M. Ikeda, Y. Kitade, Synthesis of oligonucleotides possessing ethynyl groups and rapid ligand-free click reaction for PET labeling、第 41 回国際核酸化学シンポジウム、2014 年 11 月 5 日、北九州国際会議場(福岡県・北九州市)

(4) 河出美和、中島礼美、喜多村徳昭、北出幸夫、化学修飾 siRNA の合成とそのオフターゲット効果、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 2014 (第 24 回日本病院薬剤師会東海ブロック学術大会・平成 26 年度日本薬学会東海支部例会) 2014 年 11 月 9 日、静岡県立大学(静岡県・静岡市)

(5) 牧野洋平、仁 欽、喜多村徳昭、北出幸夫、クリック反応による PET ラベル化 RNA 合成と評価、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 2014 (第 24 回日本病院薬剤師会東海ブロック学術大会・平成 26 年度日本薬学会東海支部例会) 2014 年 11 月 9 日、静岡県立大学(静岡県・静岡市)

(6) Y. Kitade, Q. Ren, Y. Kitamura, R. Nakashima, A. Shibata, M. Ikeda, SYNTHESIS OF OLIGONUCLEOTIDES POSSESSING ETHYNYL-BENZENE GLYCOL AND THEIR APPLICATION FOR

PET-LABELING、21st International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids-Chemical Biology of Nucleic Acids、2014 年 8 月 24 日、Poznan University(ポーランド・ポズナン)

(7) 喜多村徳昭、小川俊介、Mahmoud Kandeel、北出幸夫、RNA 医薬の開発を目指した 3' -末端修飾 RNA の合成と機能評価、第 60 回 日本薬学会東海支部総会・大会 2014、2014 年 7 月 5 日、鈴鹿医療科学大学(三重県・鈴鹿市)

(8) 河出美和、中島礼美、喜多村徳昭、北出幸夫、オフターゲット効果の回避を目指した 3'末端化学修飾 siRNA の合成とその評価、日本薬学会 第 134 年会、2014 年 3 月 29 日、熊本市総合体育館(熊本県・熊本市)

(9) R. Nakashima, M. Kawade, Y. Kitamura, M. Ikeda, Y. Kitade, Chemical modifications at the 3' -terminus of siRNA for suppressing off-target effects、第 40 回 国際核酸化学シンポジウム、2013 年 11 月 14 日、神奈川大学(神奈川県・横浜市)

(10) S. Ogawa, R. Nakashima, M. Kandeel, Y. Kitamura, M. Ikeda, Y. Kitade, Synthesis and evaluation of the chemically modified dangling ends on double-stranded RNA: an RNA interference investigation、第 40 回 国際核酸化学シンポジウム、2013 年 11 月 13 日、神奈川大学(神奈川県・横浜市)

(11) Y. Nagaya, K. Taniho, A. Kobayashi, M. Mizoguchi, Y. Kitamura, R. Nakashima, M. Ikeda, Y. Kitade, Synthesis and properties of modified siRNAs bearing 1,2-dideoxy-D-ribofuranose in their 3' -dangling end、第 40 回 国際核酸化学シンポジウム、2013 年 11 月 13 日、神奈川大学(神奈川県・横浜市)

(12) Y. Kitade, Synthesis of the chemically modified miRNAs and their anticancer activities、MicroRNAs Europe 2013 Symposium、2013 年 11 月 4 日~5 日、

ケンブリッジ大学(イギリス・ケンブリッジ)  
(13) 長屋優貴、中島礼美、喜多村徳昭、池田将、北出幸夫、RNA 創薬を目指す塩基部欠損型デオキシリボヌクレオシドの合成、第 59 回 日本薬学会東海支部総会・大会、2013 年 7 月 6 日、名城大学(愛知県・名古屋市)  
(14) 仁 欽、網場佳奈、喜多村徳昭、柴田綾、池田将、北出幸夫、エチニルベンゼン置換型グリコールを導入した核酸オリゴマーの合成とその性質、第 59 回 日本薬学会東海支部総会・大会、2013 年 7 月 6 日、名城大学(愛知県・名古屋市)  
(15) マハモウド・カンディール、マラリア TMP キナーゼのヌクレオチド認識能評価、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)  
(16) 中島礼美、オフターゲット効果の回避を目的とした 3' 末端化学修飾 siRNA の開発、日本薬学会第 133 年会、: 2013 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)  
(17) 枝吉佳奈、Stereoselective synthesis of 1-deoxy-1-ethynyl- $\beta$ -D-ribofuranose and its applications、第 39 回国際核酸化学シンポジウム、2012 年 11 月 15 日、名古屋大学(愛知県・名古屋市)  
(18) 小林彩花、Synthesis and biological properties of double-stranded RNAs containing 1-deoxy- $\beta$ -D-ribofuranose、第 39 回国際核酸化学シンポジウム、2012 年 11 月 15 日、名古屋大学(愛知県・名古屋市)  
(19) 北出幸夫、Synthesis of urea-substituted microRNAs possessing nuclease-resistance and their anticancer activities、第 20 回国際ヌクレオシド、ヌクレオチド、核酸ラウンドテーブル、2012 年 8 月 5 日、モントリオール(カナダ)

[産業財産権]

出願状況(計 2 件)

(1) 名称: リボヌクレオチド 誘導体及びそれを用

いたリボヌクレオチド 構築物並びにそれらの製造方法

発明者: 北出幸夫、柴田綾

権利者: 国立大学法人岐阜大学

種類: 特許

番号: 特願 2015-060689

出願年月日: 2015 年 3 月 24 日

国内外の別: 国内

(2) 名称: RNA 干渉剤、その製造方法及びその利用

発明者: 北出幸夫、中島礼美

権利者: 国立大学法人岐阜大学

種類: 特許

種類: PCT/JP2013/082179

出願年月日: 2013 年 11 月 19 日

国内外の別: 外国

[その他]

2013年5月17日付、岐阜新聞、「岐阜大、皮膚がん増殖抑制に成功 RNA開発、新薬に道」

[https://www.gifu-np.co.jp/tokusyu/iryo/iryo20130517\\_1.shtml](https://www.gifu-np.co.jp/tokusyu/iryo/iryo20130517_1.shtml)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北出 幸夫 (KITADE YUKIO)

岐阜大学・工学部・教授

研究者番号: 20137061