

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390027

研究課題名(和文) shRNA持続発現型人工ミニプラスミドによるRNAi創薬の新展開

研究課題名(英文) Development of a novel RNAi medicine based on shRNA expression mini-plasmid

研究代表者

南川 典昭(MINAKAWA, Noriaki)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：40209820

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、short hairpin RNA (shRNA)を持続的に発現可能な人工ミニプラスミドを創製し、これによりRNA干渉(RNAi)創薬の新しい方法論を確立することを目標として研究を行なった。その結果、2'-デオキシ-4'-チオヌクレオシド三リン酸体(dSNTP)を用いたPCR条件を見出し、人工ミニプラスミドの創製にまず成功した。さらにこの人工ミニプラスミドの両末端を結合させ、環状化させることにも成功した。こうして調製した人工ミニプラスミドはin vitroのみならずin vivo評価系においても遺伝子発現抑制効果を示した。また免疫応答を全く誘導しないことも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, I aim at a development of novel RNAi medicine based on shRNA expression mini-gene. As a result, I succeeded to prepare the mini-gene via PCR amplification using 2'-deoxy-4'-thionucleoside triphosphates (dSNTPs). In addition, I also developed a practical method to cyclize the resulting mini-gene.

The mini-gene showed potent RNAi activity both in vitro and in vivo. In addition, innate immune responses such as type-I INF and inflammatory cytokines were hardly induced by administration of the mini-gene in vivo.

研究分野：核酸創薬

キーワード：RNAi創薬 4'-チオDNA PCR 非天然塩基対 クリックケミストリー 免疫応答

1. 研究開始当初の背景

「医薬品 = 低分子有機化合物」、創薬研究におけるこの常識にパラダイムシフトが起こりつつある。即ち、分子量の大きな抗体や核酸も医薬品として用いられるようになってきた。核酸医薬品創製の分野では、RNAiの発見やマイクロRNAが制御する多彩な生命現象が明らかになり、RNAを対象とした創薬、中でもRNAi創薬が次世代型創薬研究として注目されてきている。

ところでRNAi機構による遺伝子発現抑制法には、(1)化学合成したshort-interfering RNA (siRNA)を利用する方法と、(2)shRNA発現プラスミドを利用する方法が知られている。後者の方法は、理論的には1分子でもプラスミドを細胞核内に導入できれば、shRNAの持続発現が可能であり、RNAi効果の持続性が期待できる。しかし、巨大なプラスミドを細胞核内に導入することの難しさに加えて、プラスミド由来の毒性発現(CpGモチーフによる自然免疫応答など)が懸念される。

研究代表者の南川は、これまでにDNAのヌクレオシド糖部、環内酸素原子を硫黄原子に置換した4'-チオDNAを創製し、これがヌクレアーゼに対して高い抵抗性と熱的に安定な二本鎖形成能を有していることを明らかにしている。また4'-チオdTTP (dSTTP)ならびに4'-チオdCTP (dSCTP)を合成し、PCRによる4'-チオDNAの効率的増幅と、増幅させた4'-チオDNA(非環状の二本鎖)からshRNA発現に起因する遺伝子発現抑制を誘起することに成功している。また研究分担者の石田は、抗がん剤の5-フルオロウラシル(5-FU)を繰返し投与することで腫瘍内の微小環境を能動的に変化させ、人工ベクターに搭載したsiRNAを腫瘍に選択的に集積させる技術の開発に成功している。

2. 研究の目的

本研究において我々は、これまでの研究成果を融合・発展させshRNA発現プラスミドDNAの長所(RNAi効果の持続性)を活かしつつ、その欠点を回避できる新しいデバイス(人工ミニプラスミド)の創製とそれを利用した対がんRNAi創薬の実現を目的とする。この人工ミニプラスミドは、ヌクレアーゼ抵抗性の4'-チオDNAによって最小化されており、さらに二本鎖の両末端が化学的に結合されている(図1)。これにより生体内安定性が向上し、持続的な遺伝子発現抑制効果が期待される。また化学的に環化させることで収率が向上し量的供給の改善も可能になると思われる。さらにプラスミドの化学修飾によって生体投与時の自然免疫応答の回避も期待出来る。最終目標として、この人工ミニプラスミドを、共同研究者の石田が開発した革新的デリバリー法によって腫瘍に選択的に送達することで、対がんRNAi創薬の基盤の確立をめざす。

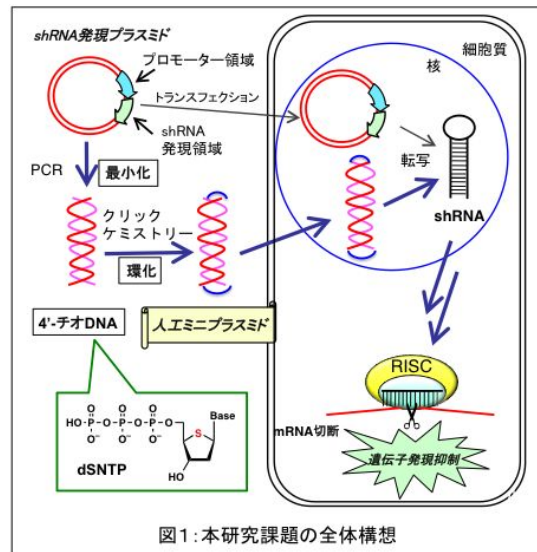


図1:本研究課題の全体構想

3. 研究の方法

本研究課題の目標と達成するために、まず4種のdSNTPを用いたPCR条件の最適化を行なう。続いて、調製した4'-チオDNAからなる人工ミニプラスミドのRNAi効果を効果の強さ、持続性、自然免疫応答の回避能の三つの項目を指標として評価する。さらに最も良好な結果を与えた人工ミニプラスミドについては、マウスを用いたin vivo評価を行なう。また南川が開発した新規人工塩基対を用いて人工ミニプラスミドの両末端を結合し環状化させる条件を確立する。

4. 研究成果

(1) dSNTPを用いたPCRによる4'-チオDNAの増幅: まず初めにdSNTPを効率よく取込むDNAポリメラーゼのスクリーニングを鎖伸長反応によって行なった。その結果、family Aに属するKlenow fragmentやTaq DNAポリメラーゼでは全く伸長反応が進行しなかった。それに対して、family Bに属するVent、Deep Vent、KOD Dash DNAポリメラーゼでは鎖伸長反応が効率よく進行した(data not shown)。そこでfamily Bに属する酵素を用いてdSNTP存在下モデル配列(104mer)のPCR増幅を検討した。その結果、KOD Dash DNAポリメラーゼを用いた場合、最も高い増幅効率を示すことが明らかとなった(図2)。

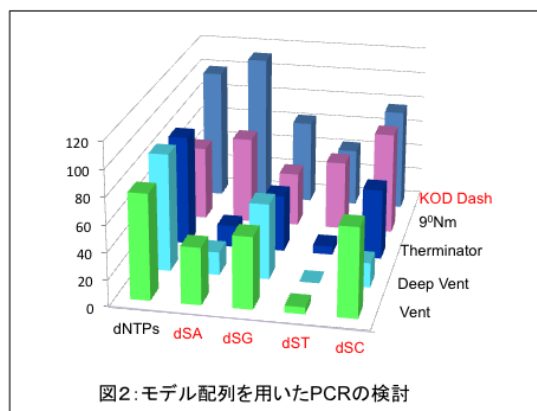


図2:モデル配列を用いたPCRの検討

(2) 人工ミニプラスミドの調製と invitro での RNAi 効果の評価: PCR の条件が確立できたので、続いてルシフェラーゼを標的とした shRNA 発現プラスミドから遺伝子発現抑制に必要な部分だけを PCR によって切り出した人工ミニプラスミド(用いる4種の dNTP のうち1種を dSNTP に置き換えた4種の人工ミニプラスミドを調製。それぞれを dSA iRed, dSG iRed, ST iRed および dSC iRed と命名)を調製した。これにより鎖長が 362bp となり分子サイズを shRNA 発現プラスミドの約 1/20 にダウンサイズすることが出来た。調製した人工ミニプラスミドを HeLa 細胞にルシフェラーゼ発現プラスミドと共にトランスフェクションし、RNAi 効果の評価した。その結果、人工ミニプラスミドの種類によって活性に違いがあるものの全てが遺伝子発現抑制効果を示した。図3に示したように、dSA iRed ならびに ST iRed の活性が比較的弱く、逆に dSG iRed および dSC iRed は化学合成した shRNA より強い RNAi 活性を示した。またその RNAi 効果は 7 2 時間後で最大となっており、これにより当初、我々が目標とした RNAi 効果の強さと持続性を兼ね備えた人工ミニプラスミドの創製に成功した。

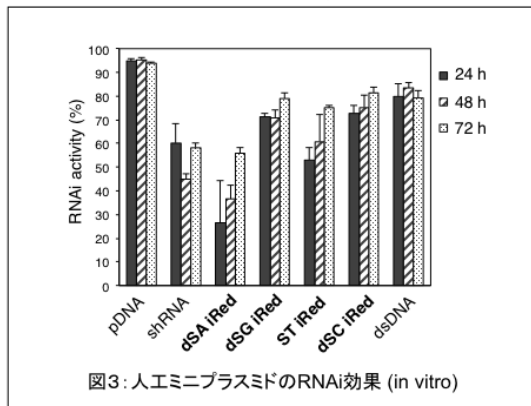


図3: 人工ミニプラスミドのRNAi効果 (in vitro)

なお人工ミニプラスミド間での RNAi 効果の違いについては、配列中に含まれる 2'-デオキシ-4'-チオ体の残基数と関係があることが明らかとなった。すなわち人工ミニプラスミド全配列中(724 残基)に 200 残基以上の 2'-デオキシ-4'-チオ体が含まれる dSA iRed や ST iRed は活性が弱く、100 残基程度の dSG iRed や dSC iRed は強い RNAi 効果を示した。

(3) 人工ミニプラスミドの in vivo での RNAi 効果: In vitro で有意な RNAi 効果が観察されたので続いて、in vivo での活性評価を行なった。ヒト胸膜中皮腫細胞 (MOST-211H-Luc) を胸腔内に移植した胸膜中皮腫モデルマウスにおいて、腫瘍移植後、8 日目と 11 日目に dSC iRed を胸腔内に投与後し、ルシフェラーゼ活性を観察した (図4A)。まず、無処置のコントロール群では、腫瘍の増殖に応じたルシフェラーゼ活性の増強が観察された。一方、dSC iRed を投与したマウスでは顕著なルシフェラーゼ遺伝子発現抑制効果が観察された (図 4B)。また、

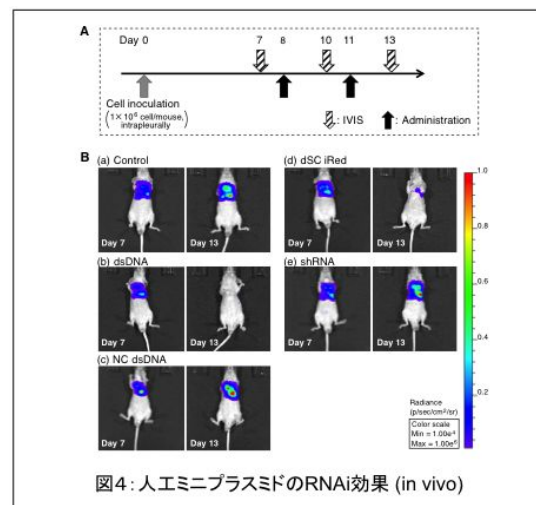


図4: 人工ミニプラスミドのRNAi効果 (in vivo)

比較対象として等モル量の化学合成 shRNA を投与した場合には顕著なルシフェラーゼ活性の減弱は観察されなかったことから、dSC iRed を用いた遺伝子発現法の有用性が確認された。これにより人工ミニプラスミドは in vitro のみならず in vivo においても有意な遺伝子発現抑制効果を示すことが明らかに出来た。

(4) 人工ミニプラスミドの自然免疫応答回避能: 我々が開発したこの人工ミニプラスミドは、RNAi 効果とともに分子量のダウンサイジングと化学修飾の導入によりプラスミド DNA によって誘導される自然免疫応答を回避できることも期待している。そこで人工ミニプラスミド (ST iRed および dSC iRed) をマウスに投与し、炎症性サイトカインならびにインターフェロンの誘導量を shRNA 発現プラスミドと人工ミニプラスミドと同じ鎖長の二本鎖 DNA (dsDNA) と比較した (図 5)。

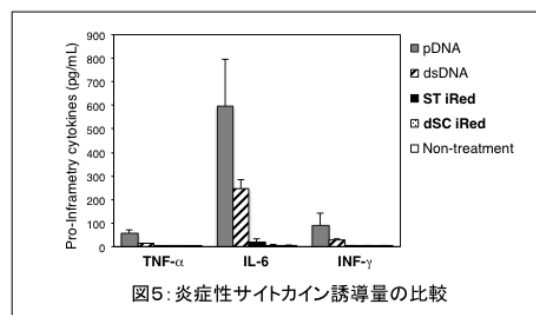
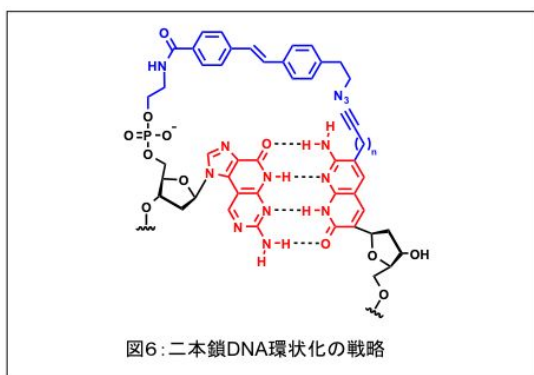


図5: 炎症性サイトカイン誘導量の比較

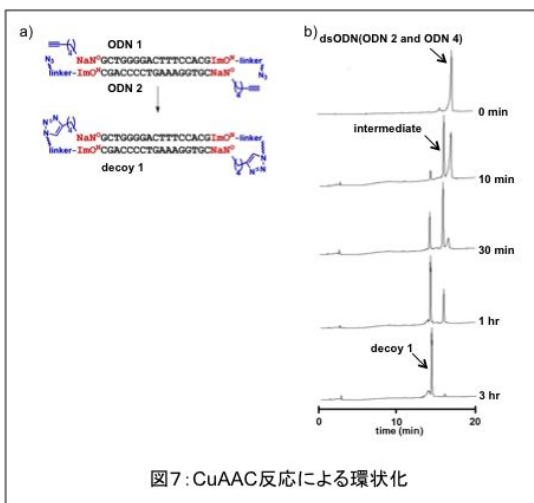
その結果、shRNA 発現プラスミドでは相当量の炎症性サイトカインの誘導が観察された。また dsDNA でも分子サイズは人工ミニプラスミドと同じであるが、化学修飾が施されていないため炎症性サイトカインの誘導が観察された。それに対して、人工ミニプラスミドでは殆ど炎症性サイトカインの誘導が観察されなかった。この傾向は、インターフェロンの誘導量についても同じであり (data not shown) 分子量のダウンサイジングと化学修飾の導入が自然免疫応答の回避に効果的に作用することを証明できた。

(5) 人工ミニプラスミドの環状化の検討:

これまで評価に用いた人工ミニプラスミドは二本鎖 DNA である。従って、細胞内（生体内）で解離する可能性が考えられる。これを防ぐために両末端を結合させ環状化することが望まれる。これを実現するために我々が開発した第3番目の塩基対 ($\text{NaN}^0:\text{ImO}^N$) を用いることにした。この $\text{NaN}^0:\text{ImO}^N$ 塩基対は天然には存在しない4本の水素結合によって塩基対を形成できる。さらに芳香環の広がりによるスタッキング効果によってこれを導入した二本鎖 DNA を熱的に安定化することができる。従って、この $\text{NaN}^0:\text{ImO}^N$ 塩基対を二本鎖 DNA の両末端に導入し、さらにそれぞれの末端に反応性残基を結合させれば環状化が実現できると考えた。これを達成するために、 NaN^0 ユニットにアルキルリンカーを介してエチニル基を導入し、一方 ImO^N ユニットのさらにその末端にアジド基を導入し、copper catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) 反応を行なうことにした (図6)。



この戦略に必要なアミダイトユニットを調製後、環状化反応のモデル配列の ODN1、ODN2 および ODN3、ODN4 を合成した(図7a)。まず相補的な ODN1 と ODN3 をアニーリングし、0.1 M MOPS 緩衝液中 CuSO_4 とアスコルビン酸ナトリウムを加え加え CuAAC 反応を行なった。反応の HPLC 進行をにて追跡したが原料のオリゴマーの分解が観察されるのみで目的とする環状体は観察されなかった (data not



shown) 。 それに対して ODN2 と ODN4 を同条件

に附したところ反応開始後わずか10分で新しいピークが HPLC 解析で観察された。さらに反応を続けると、そのピークが原料のピークとともに徐々に消失し、最終的に一本のピークに収束した (図7b、decoy1) 。このピークを分取し、MALDI-TOF マス測定、ならびに完全水解によって分析した結果、両末端部分で CuAAC 反応が進行した環状 DNA であることが明らかとなった。

なお、ODN1 と ODN3、ODN2 と ODN4 の反応結果の違いは NaN^0 ユニット上のエチニル基の自由度の違いであると考えている。すなわち ODN1 や ODN3 の場合、エチニル基が直接ナフチリジン環に結合しており、そのため相補鎖側のアジド基との接近が困難となる。それに対して ODN2 や ODN4 の場合、自由度の高いブチル基を介してエチニル基が結合しており、これによりアジド基との接近が容易になり CuAAC 望みとする反応が速やかに進行したと考えている。

この環状化反応は現時点ではモデル配列を用いた検討ではあるが、今後はこの反応性残基を PCR による増幅過程で人工ミニプラスミドに導入できれば、細胞内（生体内）でより安定な人工ミニプラスミドが創製できると考えている。

以上、本研究において我々は、人工ミニプラスミドという RNAi 新しい創薬の概念を提案しこれが細胞を用いた *in vitro* の評価系のみならず実験動物を *in vivo* 用いた評価系においても効果的に遺伝子発現抑制効果を示し、且つ自然免疫応答を全く誘導しないデバイスとなり得る事を実証した。

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9件)

N. Tarashima, K. Hayashi, M. Terasaki, H. Taniike, Y. Inagaki, K. Hirose, K. Furukawa, A. Matsuda and N. Minakawa, First Synthesis of Fully Modified 4-SelenoRNA and 2-OMe-4-selenoRNA Based on the Mechanistic Considerations of an Unexpected Strand Break. *Org. Lett.*, 2014, 16, 4710-4713. DOI:10.1021/ol502077h (査読有)

Y. Higuchi, K. Furukawa, T. Miyazawa and N. Minakawa, Development of a new dumbbell-shaped decoy DNA using a combination of the unnatural base pair $\text{ImON}:\text{NaN}^0$ and a CuAAC reaction. *Bioconjugate Chem.*, 2014, 25, 1360-1369. DOI:10.1021/bc500225r (査読有)

T. Kojima, K. Furukawa, H. Maruyama, N. Inoue, N. Tarashima, A. Matsuda and N. Minakawa, PCR amplification of 4-thioDNA using 2-deoxy-4-thionucleoside 5-triphosphates. *ACS Synth. Biol.*, 2013, 2,

529-536. DOI:10.1021/sb400074w(査読有)

T. Miyazawa, K. Umezaki, N. Tarashima, K. Furukawa, T. Ooi and N. Minakawa, Synthesis of a novel 1,2-dithianenucleoside via Pummerer-like reaction, followed by Vorbruggen glycosylation between a 1,2-dithiane derivative and uracil. Chem. Commun., 2013, 49, 7851-7853. DOI:10.1039/c3cc44848g(査読有)

Y. Kikuchi, N. Yamazaki, N. Tarashima, K. Furukawa, Y. Takiguchi, K. Itou and N. Minakawa, Gene suppression via U1 small nuclear RNA interference (U1i) machinery using oligonucleotides containing 2'-modified-4'-thionucleosides. Bioorg. Med. Chem., 2013, 21, 5292-5296. DOI:10.1016/j.bmc.2013.06.023(査読有)

M. Takahashi, N. Yamada, H. Hatakeyama, M. Murata, Y. Sato, N. Minakawa, H. Harashima and A. Matsuda, In vitro optimization of 2'-OMe-4'-thioribonucleoside-modified anti-microRNA oligonucleotides and its targeting delivery to mouse liver using a liposomal nanoparticle. Nucleic Acids Res., 2013, 41, 10659-10667. DOI:10.1093/nar/gkt823(査読有)

南川 典昭 : 4'-チオ DNA を用いた RNA 創薬, 薬学雑誌, 2013, 133, 53-60, DOI: 10.1248/yakushi.12-00245-2. (査読有)
N. Tarashima, Y. Higuchi, Y. Komatsu and Noriaki Minakawa, A practical post-modification synthesis of oligodeoxynucleotides containing 4,7-diaminoimidazo[5,4:4,5]pyrido[2,3-d]pyrimidine nucleosid, Bioorg. Med. Chem., 2012, 20, 7095-7100. DOI:10.1016/j.bmc.2012.10.035(査読有)

M. Takahashi, C. Nagai, H. Hatakeyama, Noriaki Minakawa, H. Harashima and A. Matsuda : Intracellular stability of 2-OMe-4-thioribonucleoside modified siRNA leads to long-term RNAi effect, Nucleic Acids Res., 2012, 40, 5787-5793. DOI:10.1093/nar/gks204(査読有)

[学会発表](計 27 件)

田良島 典子、小島 孝光、金城 望、古川 和寛、安藤 英紀、石田 竜弘、南川 典昭 : intelligent RNA expressing device (iRed)を利用した新規遺伝子発現抑制法の開発, 日本化学会第 95 春季年会, 2015.3/26 ~ 3/29, 日本大学理工学部船橋キャンパス(千葉県船橋市)

田良島 典子、小島 孝光、金城 望、古川 和寛、安藤 英紀、石田 竜弘、南川 典昭 : Intelligent RNA expressing device (iRed)を利用した核酸創薬の的手法, 第 32 回メディスナルケミストリ

ーシンポジウム, 2014.11/26-11/28, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

K. Furukawa, Y. Higuchi, T. Miyazawa and N. Minakawa, A New Dumbbell-Shaped Decoy DNA targeting NF-k B with the unnatural base pair ImON:NaNO, OTS annual meeting, 2014.10/12-10/15, San Diego(USA)

N. Tarashima, T. Sumitomo, K. Furukawa and N. Minakawa, ENZYMATIC SYNTHESIS OF 4-SELENODNA, XXI Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2014.8/24-8/28, Poznan(Poland)

N. Minakawa, N. Tarashima, K. Hayashi, M. Terasaki, H. Taniike, Y. Inagaki, S. Fukuda, K. Furukawa and A. Matsuda, How to prepare 4-selenoRNA?, XXI Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2014.8/24-8/28, Poznań(Poland)

田良島 典子、古川 和寛、山崎 尚志、南川 典昭 : 人工塩基対 ImNN :NaOO の PCR 増幅と RNAi 創薬への応用, 日本薬学会 第 134 年回, 2014.3/28-3/30, 熊本大学(熊本県熊本市)

相良 和幸、松本 大貴、田良島 典子、古川 和寛、南川 典昭 : クリックケミストリーを用いた RNA 簡便精製法の開発, 日本薬学会 第 134 年回 2014.3/28-3/30, 熊本大学(熊本県熊本市)

N. Tarashima, N. Yamazaki, K. Furukawa and N. Minakawa, Enzymatic incorporation of unnatural ImNN:NaOO base pair consisting of four hydrogen bonds, The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2013.11/13-11/15, 神奈川大学(神奈川県横浜市)

Y. Higuchi, K. Furukawa and N. Minakawa, Synthesis of circular decoy DNA containing unnatural base pair ImON:NaNO by CuAAC reaction, The 40th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2013.11/13-11/15, 神奈川大学(神奈川県横浜市)

N. Tarashima, T. Kojima, Y. Hashimoto, K. Furukawa, N. Yamazaki, H. Kiwada, T. Ishida, Y. Takiguchi and N. Minakawa, A novel approach of gene suppression using an intelligent shRNA expressing device (iRed), 9th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, 2013.10/6-10/8, Naples(Italy)

田良島 典子、南川 典昭 : 新規 Im:Na 塩基対の DNA ポリメラーゼによる基質認識, 日本薬学会第 133 年会, 2013.3/28, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

樋口 陽介、古川 和寛、南川 典昭 : ImON:NaNO 塩基対を両末端部に持つ環上 DNA の合成研究, 日本薬学会第 133 年会, 2013.3/28, パシフィコ横浜(神奈川県)

横浜市)

N. Minakawa:Chemistry & Biology of 4'-thioDNA,Memorial Seminar of International Academic Exchange between Dongguk University & The University of Tokushima, (招待講演)、2012.12/21, Gyeongju(Korea)

Y. Kikuchi, N. Yamazaki, Y. Taniguchi, N. Minakawa: Gene silencing by 2'-modifie-4'-thio oligonucleotides via Uti machinery,第39回国際核酸化学シンポジウム,2012.11/15,名古屋大学(愛知県名古屋市)

樋口 陽介, 南川 典昭: Huisgen 反応を利用した ImON:NaNO 塩基対を含む環状 DNA の合成研究, アンチセンス,遺伝子,デリバリーシンポジウム 2012, 2012.9/25, 仙台市民会館(宮城県仙台市)

南川 典昭:化学修飾 DNA を利用する RNAi 創薬の新展開、第19回ファーマサイエンスフォーラム(招待講演)、2012.7/25、北海道大学(北海道札幌市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tokushima-u.ac.jp/ph/faculty/labo/mar/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

南川 典昭(MINAKAWA, Noriaki)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号:40209820

(2)研究分担者

石田 竜弘(ISHIDA, Tstsuhiro)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号:50325271