

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293030

研究課題名(和文) 持続型アンチmiRNA創薬の開発と心疾患治療薬への展開

研究課題名(英文) Development of anti-miRNA oligonucleotides with stable duplexes to control cardiac diseases.

研究代表者

小松 康雄 (Komatsu, Yasuo)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長

研究者番号：30271670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円

研究成果の概要(和文)：相補的な2本鎖DNA間を脱塩基部位でクロスリンク(CL)する方法が、2本鎖RNA、2'-O-methyl RNA (MeRNA) に対しても有効であることをはじめに実証した。続いて、CL2本鎖構造は隣接する1本鎖における相補鎖とのハイブリを高度に安定化することを見出した。この性質に基づき、MeRNAから成るCL2本鎖を、miRNAに相補的な配列の両末端または一方のみに有するanti-miRNA oligo (AMO)を合成した。両末端にCL2本鎖を導入したAMOは従来型AMOよりも高い抑制活性と持続的効果を示すこと、またそれぞれの末端のCL2本鎖はAMOにおいて異なる役割を有することを見出した。

研究成果の概要(英文)：We had previously developed an interstrand cross-link (CL) that covalently conjugates a pair of apurinic/apyrimidinic sites (AP sites) on complementary DNA duplex. We first examined whether the AP site-based cross-link could be applied to complementary 2'-O-methyl RNA (MeRNA) duplexes. Next, we prepared several MeRNA-based anti-miRNA oligonucleotides (AMOs) having CL duplex at the end(s) of the antisense strand, and investigated relationship between the miRNA inhibition activity and the AMO structure. Interestingly, the AMO having the CL-duplex at both terminals exhibited the highest activity and the inhibitory activity was largely affected by the positions of the duplex in AMO molecules. These results indicate the potency of the present structural basis for developing AMO as therapeutic applications.

研究分野：核酸化学

キーワード：microRNA アンチセンス 核酸医薬 RNA クロスリンク

## 1. 研究開始当初の背景

microRNA(miRNA)は、mRNA に結合することでその発現を調節する一方で、それ自身の発現量の変化が遺伝子発現にアンバランスを誘起して疾病の原因にもなる。miRNA の mRNA への結合を抑える有効な技術として、miRNA に対するアンチセンスを挙げることができ、最近でも miR-122 のアンチセンスによる HCV 感染治療 (*Science*, 327, 198, 2010) や、miR-10b に対するアンチセンスでの乳癌の転移抑制 (*Nature Biotech.*, 28, 341, 2010) など、高い効果が数多く報告されている。一方で最近、アンチセンスとは異なる分子構造で miRNA の効果を抑える技術も報告された。例えば、miRNA と相補的な繰り返し配列を細胞において発現させると、miRNA の効果が非常に強く抑制されることが示された (miRNA sponge, *Nat. Methods*, 4, 721, 2007)。また、miRNA と相補的な配列が 2 つの塩基対によって挟まれたデコイ核酸 (Tough Decoy、以下 TuD) も、アンチセンスより高い抑制効果を示した (*Nucleic Acids Res.*, 37, e43, 2009)。これらは miRNA-タンパク質複合体が本来有する RNA 結合機構を利用することで miRNA の効果を競合阻害するため、非常に強い抑制効果を示すと考えられている。

一方、miRNA sponge と類似して、RNAi の繰り返し配列からなる高分子を DNA からの転写によって細胞外で作製したところ、RNA は球状構造 (RNAi-microsponge) を形成した。その sponge はカウンターカチオンの存在でコンパクトとなって細胞内に取り込まれ、細胞内において活性な siRNA 構造が徐々に切り出され、持続的な RNAi 効果が得られることが示された (*Nature Mater.*, 11, 316, 2012)。これは、細胞内での RNA の維持において RNA 分子の集積化の高い可能性を示唆している。

TuD は 2 つの長い塩基対 (18、10 塩基対) と 2 つの miRNA 結合部位 (25 塩基) からなり、全鎖長は 100 塩基近くに達する。高い潜在能

力を有する TuD を、将来的に化学合成医薬品として得るには、可能な限り低分子化することが合成上極めて有利である。しかしながら一方で、細胞内において持続的に機能するには上記の RNAi-microsponge で示された“単位構造の集積化”という概念を合成核酸に新たに取り入れることも重要なポイントである。つまり、“低分子化”と“細胞内で分断可能な分子集積化”を両立する技術が新たな核酸医薬分子の創出につながると考えた。

研究代表者は最近、2 本鎖核酸中のアルデヒド基に対して高効率で反応する化合物 (*J. Am. Chem. Soc.*, 131, 13208, 2009) と、それを利用して 2 本鎖間を架橋する技術を開発した (*Chem. Commun.*, 48, 2143, 2012)。架橋化は 2 本鎖を極めて安定化し、核酸分解酵素に対しても高い耐性を獲得させた。また研究分担者 (南川) は、核酸分解酵素に対する高い耐性を有し、自然免疫応答を誘導しない 4'-チオ核酸の合成に成功している (*Nucleic Acids Res.*, 40, 5787, 2012)。そこで我々は本開発において、この架橋化と 4'-チオ核酸誘導体技術をさらに発展させ、低分子化 TuD 型デコイを細胞内において徐放する集積化技術を開発する。

## 2. 研究の目的

miRNA は核酸医薬の有効な標的として期待されているが、最近 miRNA に結合することでその働きを非常に強力に抑える 100 塩基程度の高分子デコイ (おとり) 核酸が報告された。また、転写によって得られた繰り返し配列の長鎖 RNA は球状構造を形成し、細胞内において高い持続性を有することが示された。しかしながら核酸合成では、これらの高分子 RNA を高収量で得ることは困難である。そこでこのジレンマを解決するために我々は、低分子 RNA 鎖を合成後、化学的に効率良く連結することで RNA の分子集積体を構築する新技術を開発する。さらに集積体化された RNA は細胞内において徐々に安定化低分子デコイを放

出し、高い持続性を発揮させる。本開発によって我々は、核酸医薬における新しい創薬プラットフォームの構築を達成する。

### 3. 研究の方法

我々は、有機化学と RNA 工学に関する技術を駆使し、新規なアンチ miRNA オリゴ（以下 AMO）を開発し、さらに心疾患への適用を目指すことを計画した。

(1) **2 本鎖安定化技術の開発**：これまでの 2 本鎖含有型 AMO では、通常の 2 本鎖が用いられてきた。より安定で低分子化させた 2 本鎖を用いるため、2'-O-methyl RNA (MeRNA) などの修飾 2 本鎖間を共有結合によって連結する技術を開発する。2 本鎖間の連結には、末端および内部のそれぞれで連結する手法を開発し、さらに、クロスリンクされた 2 本鎖 (CL2 本鎖) の安定性と、それが隣接するハイブリにどのような影響を与えるかどうかについても検証する。

(2) **低分子化 AMO の構築と活性評価**：CL2 本鎖 MeRNA を miRNA の相補鎖の末端に導入し、細胞内における miRNA の抑制活性を従来型 AMO と比較する。さらに AMO 間の連結技術の開発にも取り組む。

(3) **心筋、心線維芽細胞に対する核酸医薬分子の開発**：従来よりも効果的に作用する AMO を開発後、心疾患の抑制や心筋細胞の分化に関わる miRNA を新規な AMO によって抑制し、将来的に心疾患への治療に役立つ AMO の構築を目指す。

### 4. 研究成果

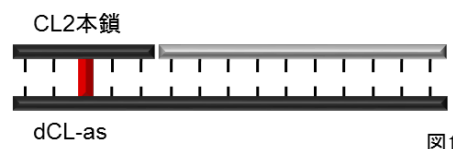
#### (1) 修飾核酸の CL 反応とその安定性評価

我々は、2 本鎖 DNA の相補的な部位に脱塩基部位を生成させ、それらを 2 価のアミノオキシ基を有する CL 試薬によって連結する反応を以前に開発していた。同架橋化反応が、2 本鎖 RNA に対しても有効かどうかを調べた結果、RNA 鎖中にも脱塩基部位を形成させた CL が可能であることを確認した。しかしなが

ら、CL された RNA (CL-RNA) は保存期間中にわずかに分解が見られ、CL-DNA よりもわずかに不安定である可能性が確認できた。そこで MeRNA の 2 本鎖に対する CL 反応を行った結果、DNA、RNA と同様に脱塩基部位の生成とその CL が可能であり、CL2 本鎖は安定であることを明らかにした。

次に 12 mer の MeRNA ならびに DNA から成る 2 本鎖を CL して精製した後、円二色性 (CD) 測定を幾つかの温度条件で行った。その結果、通常の相補的な 2 本鎖は高温条件下では構造が破壊されるが、CL2 本鎖は 1 本鎖への解離は見られず 2 本鎖構造を維持することを確認した。これは鎖内部において CL された場合、2 本鎖は非常に安定化されることを示唆している。

#### (2) CL2 本鎖のハイブリへの影響



22 mer の RNA と相補的な配列を有する DNA (as) が、12 mer の CL2 本鎖と結合したオリゴ (dCL-as、図 1) において、RNA との融解温度 ( $T_m$ ) がどのような影響を受けるかどうかを調べた。比較として、一般的な 2 本鎖構造 (dDS) および 1 本鎖構造 (dSS) を隣接部位に有する DNA (dDS-as, dSS-as) を用いてそれぞれの  $T_m$  値を比較した。実験の結果、通常の 2 本鎖構造を有する DNA (dDS-as) は、1 本鎖構造のオリゴ (dSS-as) と同じ  $T_m$  値を示した。一方で、CL2 本鎖を有する dCL-as は、dSS-as、dDS-as よりも 10 度以上高い  $T_m$  値を示し、標的 RNA とのハイブリが高度に安定化されていることを明らかにした。CL2 本鎖構造を有する異なる構造の DNA 分子をさらに複数種類合成し、それらの性質を詳細に調べ、ハイブリの安定化現象が CL2 本鎖特異的に生じていることを見出した。また、この安定化効果は MeRNA においても保持され、CL2 本鎖

MeRNA の接続によって、1 本鎖 MeRNA の  $T_m$  は 15 度以上向上することを確認した。ハイブリの  $T_m$  から熱力学的パラメーターを算出し、安定化効果に関する原因を調べた。その結果 CL2 本鎖は、隣接 1 本鎖のハイブリにおいてエントロピーの減少を抑制する効果を有し、それによってハイブリを安定化していることを明らかにした。

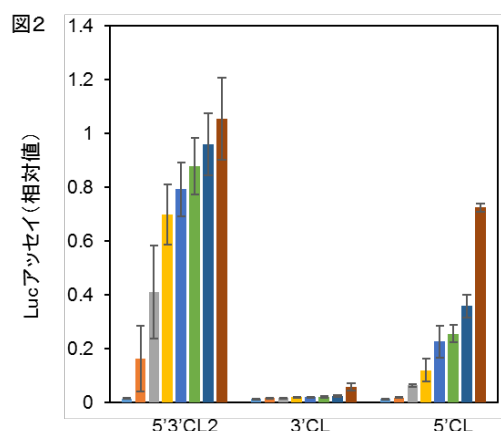
### (3) CL2 本鎖 MeRNA を有する AMO の構築と活性評価

上記の通り、MeRNA から成る CL2 本鎖はそれ自身が非常に安定な 2 本鎖であるばかりではなく、隣接する 1 本鎖領域のハイブリを安定化する新規な現象を見出した。こうした予想外の結果を受け、CL2 本鎖を活用する実験を実施した。

MeRNA から成る CL2 本鎖を、5' および 3' 末端の両方またはいずれか一方にのみ有する miR-21 に対する anti-miRNA oligo (AMO) を合成し、HeLa 細胞における miRNA 抑制効果を調べた。その結果、両末端に CL2 本鎖を導入した AMO (5' 3' CL2) が、最も高い抑制活性を示すこと、また CL2 本鎖を 5' または 3' 末端それぞれに導入された AMO (5' CL, 3' CL) では活性が大きく異なることを見出した (図 2)。続いて miR-21 と同様に、他の miRNA (miR-16, let-7c) に対しても同様の AMO を構築し、それぞれ HCT116 ならびに HeLa 細胞を用いて抑制活性を比較した。miR-16、let-7c に対する AMO も、miR-21 に対する AMO と同様の構造活性相関を示し、共通した抑制機構があることが示唆された。

5' 3' CL2、5' CL、3' CL の核酸分解酵素に対する安定性を調べたところ、最も miRNA 抑制活性の高い 5' 3' CL2 は、非常に高い核酸分解酵素耐性を示した。しかしながら、5' または 3' にのみ CL2 本鎖を有する AMO の核酸分解酵素耐性は、活性とは反する結果となった。また、それぞれの AMO は、RNA-induced silencing complex (RISC) に結合しているこ

とも、免疫沈降とノーザンプロットによって確認した。



### (4) まとめと考察

本研究は初めに 2 本鎖構造の安定化法に関する研究から開始し、その過程で CL2 本鎖が隣接する 1 本鎖におけるハイブリを高度に安定化するという新現象を見出した。そこで当初の計画を変更し、この新しい現象の解明と AMO への応用に展開した。CL2 本鎖を有する AMO は従来型 AMO よりも極めて高い miRNA 抑制効果を有すること、さらに CL2 本鎖の導入部位がその活性に大きく影響することなどを見出した。分子生物学的技術とも組み合わせ、CL2 本鎖が核酸分解酵素に対する耐性の向上と、Argonaute との相互作用を介して miRNA に対する高い親和性を与える機構を提案するに至った。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

Hirano, Y., Ikegami, M., Kowata, K. and Komatsu, Y. Bionzyme reactions on cross-linked DNA scaffolds for electrochemical analysis. *Bioelectrochemistry*, **113**, 2017, 15-19. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2016.08.005

Ikegami, M., Hirano, Y., Mie, Y. and Komatsu, Y. Fabrication and characterization of nanoporous gold on microelectrode. *J. Electroanalytical Chem.*, **783**, 2016, 188-191. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2016.11.023>

Mie, Y., Ikegami, M. and Komatsu, Y. Nanoporous structure of gold electrode fabricated by anodization and its efficacy for

direct electrochemistry of human cytochrome P450. *Chem. Lett.*, **45**, 2016, 640-642. <https://doi.org/10.1246/cl.160164>

Kowata, K., Kojima, N. and Komatsu, Y. Development of a 3'-amino linker with high conjugation activity and its application to conveniently cross-link blunt ends of a duplex. *Bioorg. Med. Chem.*, **24**, 2016, 2108-2113. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.03.039

Ishii, K., Tarashima, S. N., Ota, M., Yamamoto, S., Okamoto, Y., Tanaka Y. and Minakawa, N. Practical synthesis of 4'-selenopurine nucleosides by combining chlorinated purines and 'armed' 4-selenosugar. *Tetrahedron*, **72**, 6589-6594 (2016). DOI:10.1016/j.tet.2016.08.071

Tarashima, N., Andou, H., Kojima T., Kinjyo N., Hashimoto Y., Furukawa K., Ishida T. and Minakawa, N. Gene silencing using 4'-thioDNA as an artificial template to synthesize short-hairpin RNA without inducing a detectable innate response. *Mol. Ther. –Nucleic Acids*, **5**, e274 (2016). DOI:10.1038/mtna.2015.48

Tarashima, N., Komatsu, Y., Furukawa, K. and Minakawa, N. Faithful PCR amplification of an unnatural base-pair analogue with four hydrogen bonds. *Chem. Eur. J.*, **21**, 2015, 10688-10695. DOI: 10.1002/chem.201501484

Suzuki, Y. and Komatsu, Y. Environmentally Responsive and Bright Fluorescent Probes Possessing Dansyl-Modified Oligonucleotides Under Hybridization of DNA and RNA. *RNA Technologies*, 2015, 145-159. DOI: 10.1007/978-3-319-17305-4\_7

Tarashima, N., Sumitomo T., Andou, H., Furukawa, K., Ishida T. and Minakawa, N. Synthesis of DNA fragments containing 2'-deoxy-4'-selenonucleoside units using DNA polymerases: comparison of dNTPs with O, S and Se at the 4'-position in replication. *Org. Biomol. Chem.*, **13**, 6949-6952 (2015). DOI: 10.1039/c5ob00941c

Maruyama, H., Furukawa K., Kamiya, H., Minakawa, N. and Matsuda, A. Transcription of 4'-thioDNA templates to natural RNA in vitro and in mammalian cells. *Chem. Commun.*, **51**, 7887-7890 (2015). DOI: 10.1039/C4CC08862J

Hirano, Y., Kodama, M., Shibuya, M., Maki, Y. and Komatsu, Y. Analysis of beat fluctuations and oxygen consumption in cardiomyocytes by scanning electrochemical microscopy. *Anal. Biochem.*, **447C**, 2014, 39-42. DOI: 10.1016/j.ab.2013.11.008

Mie, Y., Tateyama, E. and Komatsu, Y. p-Aminothiophenol modification on gold surface improves stability for electrochemically driven cytochrome P450 microsome activity. *Electrochim. Acta*, **115**, 2014, 364-369. DOI: 10.1016/j.electacta.2013.10.170

Saito, Y., Hashimoto, Y., Arai, M., Tarashima N., Miyazawa, T., Miki, K., Takahashi, M., Furukawa, K., Yamazaki, N., Matsuda A., Ishida T. and Minakawa, N. Chemistry, properties, and in vitro and in vivo applications of 2'-O-methoxyethyl-4'-thioRNA, a novel hybrid type of chemically modified RNA. *ChemBioChem.*, **15**, 2535-2540 (2014). DOI: 10.1002/cbic.201402398

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

Ikegami, M., Mie, Y., Hirano, Y. and Komatsu, Y. Direct Electrochemistry of Microsomal Human Flavin-containing Monooxygenases 1 and 3 on Naphthalenethiol Thin Films. *Ecs Electrochemistry Letters*, **2**, 2013, G5-G7. <http://eel.ecsdl.org/content/2/12/G5.short?rss=1&ssource=mfr>

Suzuki, Y., Kowata, K. and Komatsu, Y. Development of dansyl-modified oligonucleotide probes responding to structural changes in a duplex. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **23**, 2013, 6123-6126. DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.09.017

Hirano, Y., Kowata, K., Kodama, M. and Komatsu, Y. Development of a scanning electrochemical microscopy-based micropipette and its application to analysis of topographic change of single-cell. *Bioelectrochemistry*, **92C**, 2013, 1-5. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2013.01.004

Miyazawa, T., Umezaki K., Tarashima N., Furukawa K., Ooi T. and Minakawa, N. 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.*, **49**, 7851-7853 (2013). DOI: 10.1039/c3cc44848g

Kikuchi, Y., Yamazaki, N., Tarashima, N., Furukawa, K., Takiguchi, Y., Itou, K. and Minakawa, N. Gene suppression via U1 small nuclear RNA interference (U1i) machinery

using oligonucleotides containing 2'-modified-4'-thionucleosides. *Bioorg. Med. Chem.*, **21**, 5292-5296 (2013). DOI: 10.1016/j.bmc.2013.06.023

[学会発表](計 22 件)

三重 安弘、平野 悠、小綿 恵子、中村 彰良、安永 茉由、中島 芳浩、小松 康雄、クロスリンク 2 本鎖構造を有する anti-miRNA オリゴ核酸の構造と miRNA 阻害活性との相関、日本核酸医薬学会第 2 回年会、2016/11/15、東京理科大学葛飾キャンパス(東京都・葛飾区)

三重 安弘、小綿 恵子、平野 悠、中村 彰良、安永 茉由、中島 芳浩、小松 康雄、Structure-function relationship of anti-miRNA oligonucleotides modified with interstrand cross-links. The 21st Annual Meeting of the RNA Society、2016/06/29、国立京都国際会館(京都府・京都市)

小松 康雄、核酸の新規安定化技術の開発と、遺伝子分析ならびに医薬品への応用、新技術説明会、2016/05/26、JST 東京本部別館(東京都・市ヶ谷)

小綿 恵子、三重 安弘、平野 悠、中村 彰良、安永 茉由、中島 芳浩、小松 康雄、クロスリンク 2 本鎖を有する核酸の miRNA 阻害効果と構造の相関性、日本薬学会第 136 年会、2016/03/28、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

三重 安弘、平野 悠、小綿 恵子、中村 彰良、安永 茉由、中島 芳浩、小松 康雄、Interstrand cross-link of 2'-O-Methyl RNA duplexes and its application as miRNA inhibitors、日本核酸医薬学会第 1 回年会、2015/11/30、京都テルサ(京都府・京都市)

三重 安弘、平野 悠、小綿 恵子、小松 康雄、2'-O-Methyl RNA 2 本鎖の分子内架橋化反応と miRNA 阻害核酸への展開、第 17 回日本 RNA 学会年会、2015/07/15、ホテルライフォート札幌(北海道・札幌市)

Minakawa, N. Gene silencing via RNAi machinery using 4'-thioDNA. The 6th Taiwan-Japan Symposium on Nanomedicine, 2015/01/08 (Taipei, Taiwan).

Minakawa, N. A new approach for gene silencing using 4'-thioDNA. 10th AFMC International-Medical Chemistry Symposium in 2015, 2015/10/19 (Jeju, Korea).

Minakawa, N. Development of RNAi medicine using 4'-thioDNA. The 4th International Conference on Biotechnology and Bioengineering, 2015/12/12 (Singapore).

小松 康雄、合成核酸からの分析化学へのアプローチ、日本分析化学会第 63 年会、2014/09/18、広島大学(広島県・東広島市)

平野 悠、小玉実生恵、小綿 恵子、池上 真志樹、小松 康雄、2 本鎖間架橋化 DNA を活用した電極界面上での酵素反応場の構築、薬学会第 134 年会、2014/03/28、熊本大学(熊本県・熊本市)

Minakawa, N., Tarashima, N., Hayashi, K., Terasaki, M., Taniike, H., Inagaki, Y., Fukuda, S., Furukawa, K., Matsuda, A. How to prepare 4'-selenoRNA? XXI Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2014/08/26 (Poznan, Poland).

小綿 恵子、小島 直、宮岸 真、小松 康雄、オリゴの合成後修飾に適したアミノリンカー固相担体の開発、第 23 回アンチセンスシンポジウム、2013/11/29、徳島大学(徳島県・徳島市)

[産業財産権]

出願状況(計 3 件)

名称: 核酸複合体、核酸ハイブリダイゼーションの形成方法、医薬組成物、核酸検出用プローブ及び相補鎖核酸複合体  
発明者: 小松康雄、平野 悠、三重安弘  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2016-563686  
出願年月日: 平成 27 年 12 月 08 日  
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松 康雄 (KOMATSU, Yasuo)  
国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究グループ長  
研究者番号: 30271670

(2) 研究分担者

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(薬学系)・教授  
研究者番号: 40209820

(3) 研究分担者

平野 悠 (Hirano Yu)  
国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・主任研究員  
研究者番号: 70415735