

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410165

研究課題名(和文) 生細胞内クロスリンク反応によるDDSを用いない二本鎖核酸導入法の開発

研究課題名(英文) Construction of double-strand RNA in cell by cross-link reaction

研究代表者

佐藤 浩輔 (SATO, Kousuke)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70415686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：クロスリンク反応のためのチオール基を有する新規C-ヌクレオシドの合成に成功した。また、オリゴヌクレオチドへの導入も行った。

また、チオールと反応可能な新規C-ヌクレオシドの合成も行った。これらの新規ヌクレオシドの反応性を検討したところ、遊離のチオールと速やかに反応可能であった。そこで、タンパク質中のチオール基と共有結合する核酸医薬品の開発へと展開した。合成した修飾オリゴヌクレオチドはがん細胞を用いたアッセイにおいても殺細胞活性を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We synthesized a C-nucleoside containing thiol group for cross-link reactions, and incorporated into oligodeoxynucleotides by use of phosphoramidite units.

4-Halopyridine-C-nucleosides were also synthesized for cross-link reaction with thiol group. These C-nucleosides were highly reactive with mercaptoethanol. Therefore, these C-nucleosides applied to nucleic acid drugs by covalent bond formation with thiol group in target protein. Modified oligonucleotides formed covalent complex with target protein, and inhibited the cancer cell growth.

研究分野：生物有機化学

キーワード：核酸化学 核酸医薬品

1. 研究開始当初の背景

抗体医薬品が世界の医薬品の売り上げ上位に入っており、医薬品開発に新たな波が押し寄せている。それに加え、核酸医薬が次世代医薬品として脚光を浴びている。2012年 KYNAMRO™ が高コレステロール血症の薬として認可された。このことにより化学修飾を施した一本鎖核酸医薬品である、アンチセンス核酸は全身性の疾患への適用が可能になったと言える。しかしながら、触媒量の短鎖二本鎖 RNA により極めて高い効果を示す siRNA や転写因子などに対して“おとり”となるデコイ核酸のような二本鎖核酸医薬品についてはその細胞膜透過性が低く、カチオン性リポソームや高分子ミセルなどのキャリアを用いなければならない。このような DDS は系が複雑になること、コストが高くなること、予期しない副作用が起こることなど、実用化にはまだ解決しなければならない問題がある。そのため、DDS を必要とせずに二本鎖核酸を細胞内に導入することができれば現在の核酸医薬、特に siRNA 創薬のブレークスルーとなる。

これまでも DDS を用いない naked siRNA 導入の様々な方法論が開発されてきた。しかし、電気刺激を利用したエレクトロポレーション法や大量の核酸水溶液を急速に尾静脈投与するハイドロダイナミクス法、さらに個体に外部からマッサージ刺激を加えるメカニカルマッサージ法などは組織障害性が報告されており、実用化は難しいと考えられている。最近、Shimizu らは圧力刺激を利用した naked siRNA 導入法を用いることで、これらの問題点の解決を試みている (*PLoS One* **2012**, 7, e41319)。この方法はマウスの尾静脈投与後に専用の器具を用いて、標的組織を吸引することで naked siRNA を導入するもので、組織は限られているものの顕著な活性発現に成功している。しかし、この方法でも naked siRNA 導入から圧力刺激の効果的なタイミングの評価などの問題が残されている。

2. 研究の目的

これらの現状を踏まえ、申請者は以下のような逆転の着想に至った。1) siRNA を一本鎖として投与し、2) 細胞内でのテンプレート鎖上での化学反応により連結し、二本鎖のショートヘアピン RNA (shRNA) を形成する。3) このものの連結部分は細胞内の酵素 (Dicer) により切断され、目的とする siRNA が細胞内で初めて生じる (図 1 d)。これまでに申請者は DNA 中の酸化損傷の一つである 5-formyl-2'-deoxyuridine (¹⁰U) を選択的に検出することを目的として、新規の蛍光性核酸である 5-benzothiazolyl-2'-deoxyuridine (^{bt}U) を報告している (*Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, 49, 8392)。本反応は水中で効率よく進行し、その蛍光性だけではなく二つの芳香族環が新

たに生じるチアゾール環を介してピフェニル型の延長した平面分子を形成することを特徴とする。

そこで、本研究では化学選択的な本反応を生細胞内での shRNA 形成反応へと応用し、DDS を必要としない一本鎖核酸を導入するだけで二本鎖 siRNA を細胞内で発現する系の開発を行う。最終的には siRNA のみならず、デコイ核酸などを含めた核酸医薬品への応用を目指す。

3. 研究の方法

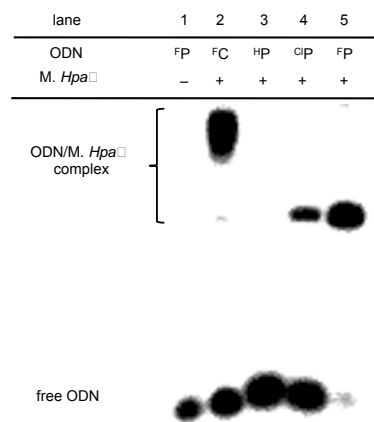
本研究は大きく 4 つの内容に分けることができる。A) 新規ヌクレオシド誘導体の合成、B) 新規ヌクレオシド誘導体の単量体での評価、C) 新規ヌクレオシド誘導体を含む shRNA 形成反応の評価、D) 細胞中での siRNA 活性発現の評価である。平成 25 年度は 2-aminothiophenol (AT) 骨格を含む新規ヌクレオシド誘導体の合成と単量体 ¹⁰U との反応とその評価を行う。また、得られた最適化合物をオリゴヌクレオチドへ導入する。平成 26 年度以降は、まず得られたオリゴヌクレオチドプロープの評価を行う。はじめはチューブ中での反応性や生じた shRNA の性質を様々な実験 (*T_m* 測定など) から評価し、その最適配列・条件を検討する。その結果を細胞での siRNA 活性発現へと応用する。siRNA の活性評価にはルシフェラーゼレポーターアッセイを用いる。最終的にはマウスを用いた *in vivo* での検討を行い、一般的な二本鎖核酸発現法として確立する。

4. 研究成果

まずはヌクレオシド塩基部にアミノチオフェノール骨格を有する誘導体の設計・合成を行った。2-ニトロ-4-ヨードアニリンを出発原料として、ヘック反応により C-ヌクレオシドを合成した後、アミノ基をヨード基へと変換した。得られたヨード体をチオールカップリング反応に付したところ、速やかに反応は進行し、目的とするチオール保護体を得られた。つづいてニトロ基の還元を行い、生じたアミノ基をアセチル基で保護し、数工程を経て、目的とする DNA 自動合成機に導入するためのホスホロアミダイト体を得た。DNA 自動合成機を用いてオリゴデオキシヌクレオチドを合成したが、アミノ基の保護基であるアセチル基の脱保護ができなかった。

そこで、保護基の問題のみならず収率の改善も見据えて合成経路の見直しを行うこととした。すなわち、置換基をフッ素として置き、直接的にチオールを反応させる経路を取った。チオールとの置換反応は速やかに進行し、望みとする置換体を得ることができた。また、チオール基と選択的にクロスリンクする核酸塩基部として、新たに 4-halopyridine 誘導体を設計した。本誘導体は 4-halopyridine を出発原料として、ヨード化、ヘック反応による C-グリコシル化を行った

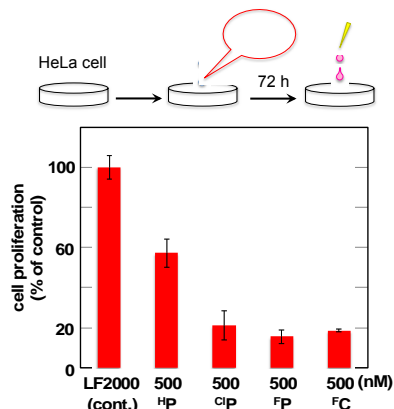
後に各種保護基を導入し、ホスホロアミダイトユニットへと導くこととした。さらに電子求引性基であるシアノ基を導入した誘導体の合成も行い、チオールとの反応性を検討した。β-メルカプトエタノールを用いてモノヌクレオシドの反応性を検討した結果、4-CI 体 < 4-F 体 < 4-CI-3-CN 体の順で反応性が高いことが明らかとなった。そこで、本ヌクレオシドを含むオリゴデオキシヌクレオチドがタンパク質中に存在するシステイン残基とも選択的に反応可能であると考え、核酸医薬品の創製研究へと展開した。標的をエピジェネティックに關与する DNA メチルトランスフェラーゼ(DNMT)とした。合成したオリゴヌクレオチドの 5'-末端標識化し、DNMT とインキュベーションし、変性ゲル電気泳動にて解析した。その結果、修飾オリゴヌクレオチドは DNMT と共有結合性の結合をしていることを明らかにした。またその反応性はヌクレオシドの反応性と異なり、4-F 体が最も高くなった。



また、得られた複合体は熱的にも安定であり、強固な結合により、酵素(DNMT)の活性部位を塞ぐことに成功した。さらに修飾二本鎖 DNA を HeLa 細胞にトランスフェクションした結果、殺細胞活性を示すことが明らかとなった。

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 4 件)

1. Nomura Y, Kashiwagi S, Sato K, Matsuda A*. Selective transcription of an unnatural naphthyridine:imidazopyridopyrimidine base pair containing four hydrogen bonds with T7 RNA polymerase. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2014, *53*, 12844-12848. DOI: 10.1002/anie.201406402 (査読あり)
2. Sato K*. Development of selective detection method for 5-formyl-2'-deoxyuridine in DNA using a fluorogenic reagent. *Yakugaku zasshi: J. Pharm. Soc. Japan* 2013, *133*, 1041-1053. <http://doi.org/10.1248/yakushi.13-00198> (査読あり)
3. Ichikawa S*, Ueno H, Sunadome T, Sato K, Matsuda A. Tris(azidoethyl)-amine hydrochloride; a versatile reagent for synthesis of functionalized dumbbell oligodeoxynucleotides. *Org. Lett.* 2013, *15*, 694-697. (Selected as *JACS Selected Issue 'Nucleic Acids: Chemistry and Application'*) DOI: 10.1021/ol400001w (査読あり)
4. 野村勇作, 柏木怜, 佐藤浩輔, 南川典昭, 松田彰 四本の水素結合を持つ核酸塩基の設計(2) -DNA, RNA ポリメラーゼによる認識- *Antisense* 2013, *17*, 4-13. (査読なし)

(学会発表)(計 16 件)

1. 内海翔平, 佐藤浩輔, 市川聡 エピジェネティック制御を指向した非環式 C-ヌクレオシドの合成と性質、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
2. 笠井由起子, 佐藤浩輔, 市川聡 芳香族求核置換反応を利用した DNA メチル化酵素阻害剤の創製研究、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
3. Sato K. Novel Mechanism-based inhibitors of DNA Methyltransferase by Nucleophilic Aromatic Substitution Reaction. The 40th NAITO Conference on Epigenetics—From Histone Code to Therapeutic Strategy, 2015, 17th, Sep. Sapporo (Japan).
4. Sato H., Shrestha A. R., Sato K, Matsuda A. Synthesis and properties of a new backbone modified oligonucleotide containing phosphorodiamidate analogs. 11th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, 2015, 13th, Oct. Leiden (the Netherlands).
5. 佐藤浩輔, 国友祐磨, 松田彰 芳香族求

- 核置換反応を用いた不可逆的 DNA Methyltransferase 阻害剤の開発、第 41 回反応と合成の進歩シンポジウム、2015 年 10 月 26 日、近畿大学 11 月ホール(大阪府・東大阪市)
6. 佐藤秀樹、佐藤浩輔、Ajaya Ram SHRESTHA、松田彰 新規リン酸部修飾核酸の合成と諸性質解析、日本核酸医薬学会第 1 回年会、2015 年 11 月 30 日、京都テルサ(京都府・京都市)
 7. 佐藤秀樹、佐藤浩輔、Ajaya Ram SHRESTHA、松田彰 新規リン酸部修飾核酸の合成と諸性質解析、日本薬学会第 135 年会、2015 年 3 月 28 日、神戸学院大学(兵庫県・神戸市)
 8. Sato K., Nomura Y., Kashiwagi S., Matsuda A. Transcription of Unnatural Naphthyridine : Imidazopyridopyrimidine Base Pair by T7 RNA polymerase. XXI Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2014, 25th, Aug. Poznan (Poland).
 9. Kunitomo Y., Sato K., Matsuda A. Development of a Novel Dna Methyltransferase Inhibitor by Nucleophilic Aromatic Substitution Reaction. XXI Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2014, 25th, Aug. Poznan (Poland).
 10. Kunitomo Y., Sato K., Matsuda A. New DNA Methyltransferase Inhibitors by Nucleophilic Aromatic Substitution Reaction. The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2014, 6th, Nov. Kitakyushu (Japan).
 11. 横尾大樹、幸田康生、片岡真由美、佐藤浩輔、松田彰 Replication of 3'-deoxyapionucleic acid (apioNA), and the design and synthesis of 47-Me-apioNA、アンチセンス・遺伝子デリバリーシンポジウム 2014、2014 年 9 月 9 日、東京医科歯科大学 M&D タワー 2 階(東京都・文京区)
 12. 佐藤浩輔、柏木怜、松田彰 修飾ヌクレオシドトリリン酸体を用いた T7 RNA ポリメラーゼの基質認識に関する研究、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 28 日、熊本大学(熊本県・熊本市)
 13. 国友祐磨、佐藤浩輔、松田彰 芳香族求核置換反応による新規 CMTase 阻害剤の開発、第 23 回アンチセンスシンポジウム、2013 年 11 月 28 日、徳島大学(徳島県・徳島市)
 14. 佐藤浩輔、広瀬亘、松田彰 5-Benzothiazolyl-2'-deoxyuridine への蛍光誘導化による、DNA 酸化損傷-5-formyl-2'-deoxyuridine-の選択的検出、

第 39 回反応と合成の進歩シンポジウム、2013 年 11 月 6 日、九州大学 医学部 百年講堂(福岡県・福岡市)

15. 国友祐磨、佐藤浩輔、松田彰 S_NAr 反応による新規 CMTase 阻害剤の開発研究、25 周年記念万有札幌シンポジウム、2013 年 7 月 3 日、北海道大学(北海道・札幌市)
16. 国友祐磨、佐藤浩輔、松田彰 芳香族求核置換反応を用いた新規 DNA (Cytosine-5)Methyltransferase 阻害剤の開発、日本薬学会北海道支部例会第 140 例会、2013 年 5 月 18 日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

〔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
<http://japanese-apricot.pharm.hokudai.ac.jp/gousei iyaku/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
佐藤 浩輔 (SATO Kousuke)
北海道大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：70415686

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし