

学位論文題名

2'-O-メチル-4'-チオリボヌクレオシド修飾核酸を用いる
持続型核酸医薬創製研究

学位論文内容の要旨

近年の RNA 研究の飛躍的發展により、RNA が多くの生体機能を制御していることが明らかになってきた。これに伴い、癌を含めた様々な疾患と RNA との関連性が強く指摘されている。そのため RNA の機能制御を狙った医薬品の開発研究が展開されている。中でも、核酸による制御法は配列特異的であるために、これを用いた核酸医薬の開発研究が盛んに行われている。しかし、核酸医薬開発においては、(1)ヌクレアーゼの分解による効果の消失、(2)自然免疫応答による副作用、(3)細胞・組織標的化法などの様々な問題点が挙げられている。

化学修飾核酸はこれらの問題を克服するために最も広く用いられている。その中で、核酸の糖部 2'位水酸基をメチル化した 2'-O-メチル RNA (MeRNA) は高いヌクレアーゼ抵抗性と二本鎖の熱的安定性、自然免疫応答が回避できることが報告されており、核酸医薬開発で幅広く応用されている。一方、当研究室ではヌクレオシド糖部フラノース環 4'位酸素原子を硫黄原子に置換した 4'-チオ RNA (SRNA) が高いヌクレアーゼ抵抗性と二本鎖の熱的安定性を持つことを見いだしている。さらに天然型 siRNA より高い活性をもつ 4'-チオリボヌクレオシド修飾型 siRNA の開発に成功している。しかしながら、MeRNA や SRNA の生体内環境における安定性は十分とはいえず、核酸医薬としての効果の持続性に問題を残している。従って、上述した問題点を全て克服し、生体内使用に十分耐え得る核酸の開発は、核酸医薬という次世代型創薬研究には不可欠であると考えられる。そこで、核酸医薬開発において望みとした性質を持ち合わせた新しい化学修飾型核酸の開発と核酸医薬への展開を目的として MeRNA と SRNA の構造を併せ持った化学修飾型核酸である 2'-OMe-4'-チオ RNA (Me-SRNA) を設計、合成した。さらに、Me-SRNA を用いた核酸医薬の創製研究に着手した。

第 1 章 2'-置換-4'-チオ RNA の諸性質の解析

はじめに、15mer の Me-SRNA を用いて、1) 二本鎖の熱的安定性と CD スペクトルによる構造解析、2) 一本鎖 RNA のヌクレアーゼ抵抗性を調べた。

第 1 節 二本鎖の熱的安定性と CD スペクトルによる構造解析

まず、Me-SRNA と相補的な天然型 RNA、DNA との二本鎖の熱的安定性を T_m 値により評価した。その結果、Me-SRNA は RNA に対して選択的な高い二本鎖形成能を有していることが明らかになった。また CD スペクトルによる二本鎖の全体的な構造解析の結果、Me-SRNA と相補的な天然型 RNA および DNA との二本鎖は RNA に類似した A 型構造であることが示された。

第 2 節 一本鎖 RNA のヌクレアーゼ抵抗性の評価

核酸を生体内で使用するためには細胞内外の様々なヌクレアーゼの分解に対して抵抗性を持つことが必要である。そこで、2'-置換-4'-チオ RNA のエンドヌクレアーゼ (S1 ヌクレアーゼ)、3'エキソヌクレアーゼ (SVPD)、50% ヒト血漿中での安定性を調べた。まず、S1 ヌクレアーゼに対しては Me-SRNA は、天然型 RNA や DNA、SRNA、MeRNA と比較して極めて高い抵抗性を持つことが明らかになった。次に、SVPD に対する抵抗性を調べたところ、Me-SRNA が比較した中で最も高い抵抗性を示した。以上の結果より、Me-SRNA がエンドヌクレアーゼ、3'エキソヌクレアーゼの両方に対して高い抵抗性を持つことが示された。続いて、50% ヒト血漿中での安定性を調べた。その結果、Me-SRNA は天然型の RNA、MeRNA や SRNA よりも極めて高位安定性を有することが明らかになった。

以上の結果より、Me-SRNA が高い二本鎖形成能とヌクレアーゼ抵抗性を併せ持つことが明らかとなった。この性質は上述の核酸医薬の問題点を克服する条件を十分に満たしていると考えられる。そこで、2'-OMe-4'-チオリボヌクレオシド (4'S-M) を用いた核酸医薬開発研究を展開することにした。

第2章 *In vitro*での2'-O-メチル-4'-チオリボヌクレオシド修飾 siRNA による遺伝子発現抑制効果の検討と *in vivo* 実験への応用

第2章では核酸医薬開発を目的として、4'S-M 修 siRNA の修飾様式の検討と RNAi 効果の持続性評価、さらに *in vivo* での遺伝子発現抑制効果と自然免疫応答の回避能について調べた。

第1節 *In vitro*における siRNA の修飾様式の検討

様々な修飾様式のルシフェラーゼ遺伝子を標的にした 4'S-M 修飾 siRNA を合成して、それらのヒト細胞 (HeLa 細胞) における遺伝子発現抑制効果をルシフェラーゼレポーターアッセイにより評価した。その結果、パッセンジャー鎖の両末端を3残基ずつ修飾した siRNA (luc-SM6) が天然型 siRNA と同様の高い活性を持つことを見出した。

第2節 *In vitro*における siRNA の遺伝子発現抑制効果の持続性評価

続いて、luc-SM6 の効果の持続性を、天然型 siRNA (luc)、同様の修飾様式の 2'-OMe (luc-M6)、4'-チオリボヌクレオシド (luc-S6) 修飾 siRNA と比較した。その結果、luc-SM6 は luc や luc-M6、luc-S6 よりも高い持続性を示すことが明らかになった。次に luc-SM6 が持続性を示す要因を探るために、luc-SM6 の細胞内残存量を qRT-PCR により定量した。その結果、トランスフェクション後6日目において luc よりも15倍以上多く残存していることが明らかになった。この結果より、細胞内におけるヌクレアーゼ抵抗性が luc-SM6 の持続性に関与していることが示唆された。

第3節 *In vivo*における修飾 siRNA の遺伝子発現抑制効果と自然免疫応答回避能の評価

4'S-M 修飾 siRNA が *in vitro* で効果を示すことが明らかになったので、次に *in vivo* での効果を確かめることにした。Apolipoprotein B (ApoB) を標的とした 4'S-M 修飾 siRNA を用いて、マウスにおける ApoB 遺伝子発現抑制効果を評価した。その結果、投与後48時間では4'S-M 修飾 siRNA 投与群に天然型 siRNA 投与群よりも高い ApoB mRNA 発現抑制効果が観察され、これに付随する表現系である血中コレステロール濃度の有意な低下も観察された。さらに、siRNA の自然免疫応答回避能についても調べたところ、天然型 siRNA 投与群ではサイトカイン (IL-6 と IFN- α) の産生が高く誘導された。一方、4'S-M 修飾 siRNA 投与群ではその産生はほとんど認められなかった。従って、4'S-M による siRNA の修飾は、自然免疫応答が回避できることが明らかとなった。以上の結果より、4'S-M 修飾型 siRNA は *in vivo* での高い効果と自然免疫応答を回避できることが明らかとなり、創薬研究展開への大きな可能性が示された。

第3章 アンチ microRNA オリゴヌクレオチド (AMO) による microRNA 機能制御法への応用

第3章では4'S-Mを用いた核酸医薬開発研究のさらなる展開として microRNA (miRNA) 機能制御を狙った4'S-M 修飾 AMO についての検討を行った。

第1節 miR-21 を標的にした AMO の修飾様式と鎖長の最適化

まず、癌細胞等で多く発現がみられる miR-21 を標的にした AMO を用いて修飾様式と AMO の鎖長の検討を行った。その結果、標的 miRNA と同じ鎖長の4'S-M 完全修飾 AMO が高い miR-21 抑制効果と持続性を有することを見出した。

第2節 *in vivo* への応用を指向した2'-O-メチル-4'-チオリボヌクレオシド修飾 AMO による miR-122 機能調節への展開

第1節で見出した4'S-M 完全修飾 AMO について、異なる miRNA への適用可能性を確かめるために、miR-122 を標的として、その効果を調べところ、4'S-M 修飾 AMO は miR-122 の機能も効率的に抑制できることが示された。そこで、このものを *in vivo* 実験に応用することを指向して、さらにホスホロチオエート (PS) 修飾を施した、PS 型4'S-M 修飾 AMO を設計し、*in vitro* でその効果を調べた。その結果 PS 型4'S-M 修飾 AMO は4'S-M 修飾 AMO や2'-OMe 修飾 AMO よりも高い miR-122 の抑制効果と持続性を持つことが明らかになった。以上の結果より、PS 型4'S-M 修飾 AMO は核酸医薬への十分な応用可能性を持つことが示唆された。

本研究では、2'-O-メチル-4'-チオリボヌクレオシドが様々な核酸医薬の修飾ヌクレオシドとして、有用性を持つことを明らかとし、今後の創薬研究にこのものが大きく貢献できる可能性を示した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 田 彰
副 査 教 授 原 島 秀 吉
副 査 准教授 市 川 聡
副 査 教 授 南 川 典 昭

(徳島大学大学院薬科学教育部)

学 位 論 文 題 名

2'-O-メチル-4'-チオリボヌクレオシド修飾核酸を用いる 持続型核酸医薬創製研究

近年の RNA 研究の飛躍的發展により、non-coding (nc) RNA が多くの生体機能を制御していることが明らかになってきた。これに伴い、癌を含めた様々な疾患と ncRNA との関連性が強く指摘されこれらの機能制御を目的とする核酸創薬が展開されている。核酸創薬においては、(1)ヌクレアーゼ抵抗性の獲得、(2)自然免疫応答による副作用の回避、(3)細胞・組織標的化法などの解決が必要となる。そこで本研究では、2'-OMe-4'-チオリボヌクレオシド (Ns) を含有する RNA を核酸医薬として開発すべく、1)2'-置換-4'-チオ RNA の諸性質の解析、2)2'-OMe-4'-チオ RNA (Me-SRNA) を含む siRNA の設計・遺伝子発現制御と *in vivo* 実験への応用、3) Me-SRNA を含むアンチ micro (mi) RNA (AMO) の合成と miRNA 機能制御、について研究した。

1. 2'-置換-4'-チオ RNA の諸性質の解析

二本鎖 Me-SRNA は対応する天然型 MeRNA とほぼ同等～それ以上の熱的安定性 (T_m 値) を示し、CD スペクトルの解析から RNA 二本鎖と同じ A 型二本鎖を形成することが分かった。一本鎖 15mer Me-SRNA は S1 エンドヌクレアーゼ、および 50% ヒト血漿中での半減期 ($t_{1/2}$) は、それぞれ、24 時間以上、27.2 時間とかなり安定であった。これらを同じ鎖長・配列の天然型 RNA および MeRNA と比較すると、エンドヌクレアーゼに対しては RNA より 3400 倍以上、MeRNA より 6.5 倍安定であり、血漿中では RNA より 9800 倍以上、MeRNA より 3.6 倍安定であった。

2. *In vitro* での 2'-O-メチル-4'-チオリボヌクレオシド修飾 siRNA による遺伝子発現抑制効果の検討と *in vivo* 実験への応用

ルシフェラーゼ遺伝子に対する siRNA の 2'-OMe-4'-チオリボヌクレオシド修飾様式—活性相関を HeLa 細胞で調べたところ、アンチセンス鎖への導入は活性低下を招いたが、センス鎖両末端に 3 残基ずつ導入した (lu-SM6) 場合に活性を保持した。lu-SM6 の活性は天然型 siRNA と比較して約 1.5 倍持続し、それがセンス鎖のヌクレアーゼ抵抗性によることを明らかにした。さらに、肝臓で高発現している ApoB を標的にした Me-SRNA を設計 (Apo-SM) し、SNALP に搭載しマウスに 1.25 mg/kg で尾静脈注射し 48 時間後の肝臓の ApoB mRNA 量をリアルタイム PCR で調べた。天然型 siRNA が約 40% 低下させたのに対して、Apo-SM は約 75% の抑制効果を示した。投与後 6 時間目の自然免疫応答の活性化を調べた。天然型 siRNA は IL-6 および IFN- α の産生を誘導したが、Apo-SM は両者ともその産生誘導はかなり少ないものであった。

3. アンチ microRNA オリゴヌクレオチド (AMO) による microRNA 機能制御法への応用

がん等で多く発現が見られる miR-21、および、肝臓で高発現している miR-122 を標的にして完全

修飾型一本鎖 Me-SRNA を合成し、それらの抑制活性を調べた。鎖長は miR と同じ長さがよく、リン酸ジエステル (PO) 結合よりもホスホロチオエート (PS) 結合を持つ AMO の方が高活性であった。これらは天然型 MeRNA よりも高活性であり、特に miR-122 に対する PS 結合を持つ AMO は時間がたつにつれて抑制活性が上昇した。これらの結果を踏まえて、*in vivo* 実験を目指し、臓器標的分子 (肝臓: コレステロール、トコフェロール、前立腺がん: NAAG 阻害剤) を結合した AMO も合成した。

論文発表に続いて発表内容とその関連の専門分野を含めた口頭試問を実施した。その内容は、本研究の背景、目的および関連分野等における知識など多岐に亘った。これらに対する回答は、適切かつ高度なものであり、博士の学位を与えるに相応しいと判断した。

提出された学位論文は独創的かつ有用性に富み、本専門研究分野の中で高く評価されるに値する内容であると判断した。

以上の結果、本論文審査委員会は、高橋真由美氏を博士 (生命科学) の学位を授与するに相応しい十分な学力と研究能力を有するものと認めた。