

ヌクレアーゼ抵抗性修飾核酸を搭載した 多機能性ナノ構造体による新規核酸医薬の創製

Development of multifunctional envelope-type nano device encapsulating highly nuclease resistant oligonucleotides

松田 彰 (MATSUDA Akira)
北海道大学・大学院薬学研究院・教授



研究の概要

In vitro のみならず in vivo でも有効な核酸医薬を実現するために、1) ヌクレアーゼ抵抗性核酸として 2'-O-メチル-4'-SRNA がエンドヌクレアーゼに抵抗性であることを見出した。2) shRNA を発現するためのヌクレアーゼ抵抗性核酸ベクターを創出した。さらに、これらを細胞内に送達するナノキャリア (多重型 MEND) を開発した。

研究分野：医薬化学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：ゲノム創薬、ヌクレアーゼ抵抗性、RNA 干渉、薬物送達システム、4'-チオ核酸、siRNA、miRNA

1. 研究開始当初の背景

生体高分子である蛋白質が薬として比較的容易に開発されるのに対して、生体高分子である核酸の開発がなぜ困難なのか。アンチセンス法が発見されて以来、多くの臨床試験が実施されたが、Vitravene が眼内注射薬として 1998 年に米国で認可されたのみである。また、RNA アプタマーが加齢性黄斑変性症治療薬 (眼球内注射) として米国で認可されたのは 2004 年であった。これらの現実を考えると、「核酸医薬」を実現するためには、エンドヌクレアーゼ抵抗性核酸の必要性とそれを搭載するキャリア (DDS) 開発が重要であると考えられた。

2. 研究の目的

- [1] エンドヌクレアーゼ抵抗性核酸 (修飾 DNA, 修飾 RNA) の創製
- [2] ヌクレアーゼ抵抗性核酸ベクターの創出
- [3] これらの「核酸医薬」を細胞質や核に十分量到達させるためのナノキャリア=薬物送達システム (DDS) の開発

3. 研究の方法

- (1) 4'-チオヌクレオシドを初めとする糖部修飾ヌクレオシドを含む DNA や RNA を化学合成し、ヒト血漿中を含むヌクレアーゼ抵抗性を測定する。さらに各種物理化学測定から熱的安定性や全体構造を明らかにする。
- (2) 各種糖部修飾ヌクレオシドの 5'-三リン

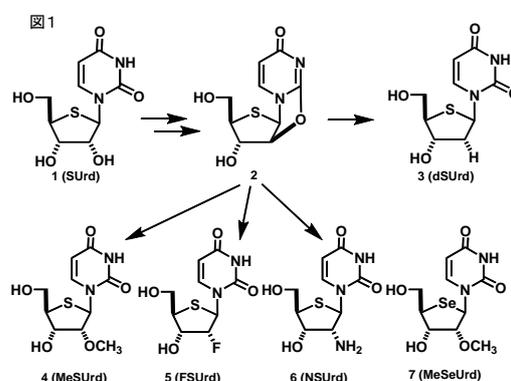
酸を化学合成し、DNA ポリメラーゼや RNA ポリメラーゼの基質性を調べる。また、PCR についても検討する。修飾ヌクレオシドを含むベクターを調製し、細胞内に導入し RNAi 活性を測定する。

(3) siRNA やプラスミドを搭載した MEND に細胞膜透過性素子、角膜透過性素子、エンドソーム脱出素子を加えそれぞれの機能を最適化し、in vitro のみならず in vivo 実験に適用する。

吸光・蛍光・TRF・発光測定装置を購入した。

4. これまでの成果

[1] 標的細胞内外に存在するヌクレアーゼで分解されにくい (特にエンドヌクレアーゼ)、標的と熱的に安定な複合体を形成する、配列特異的および標的特異的な作用を示す糖部修飾核酸の開発研究を行った (図 1)。



[4. これまでの成果 (続き)]

2'-置換-4'-チオヌクレオシドを中心に誘導体合成を行った。2'-OMe 体 (4) を含む RNA (MeSRNA) は、DNA よりも RNA に対して熱的に安定な二本鎖を形成した。また、MeSRNA は 50% ヒト血漿中での半減期が 27 時間となり、天然型 2'-OMeRNA よりも 3.6 倍安定であった。MeSRNA はエンドヌクレアーゼでは分解されずにむしろ 3'-エキソヌクレアーゼでゆっくりと分解された。合成の容易さや他の性質の優位性から化学合成する siRNA には MeSRNA を使用することにした。さらに、2'-OMe-4'-セレノピリミジンヌクレオシド (7) の合成およびそれらを含む RNA (MeSeRNA) の合成に成功し、それらは MeSRNA よりも 50% ヒト血漿中でさらに 2.5 倍安定であった。しかし、RNA への導入効率の改善がさらに必要である。

[2] 4' -チオ TTP (dSTTP) および 4' -チオ CTP (dSCTP) は dATP, dGTP 存在下 KOD dash DNA ポリメラーゼを用いて効率よく DNA 中 (87mer) に取り込まれた。この酵素合成した 4' -チオ DNA 二本鎖から天然型 NTP 存在下 T7RNA ポリメラーゼで 87mer の RNA に転写できた。一方、ホタルルシフェラーゼ GL3 に対する shRNA を含む 300 塩基対のベクターを上記の PCR で酵素合成し、NIH3T3 細胞にトランスフェクトし RNAi 効果を調べた。4' -チオ DNA 二本鎖も天然型 DNA 二本鎖を用いた場合と同程度の RNAi 効果が観察されたことから、ヒト細胞中でも 4' -チオ DNA 二本鎖は RNA ポリメラーゼによる転写を受けていることが明らかになった。

[3] トランスフェリン修飾した MEND のエンドソーム脱出を促進するために pH-感受性膜融合ペプチドである GALA を導入することで、遺伝子発現を飛躍的に向上させることに成功した。また、siRNA の送達に関しては、R8-MEND に siRNA を搭載する方法を確立した。さらに、肺の血管内皮細胞を選択的に認識するペプチドリガンド (IRF) を見いだした。IRF で MEND の表面修飾を行ない、siRNA を搭載すると、効率的に遺伝子発現を抑制することが明らかになった。また、遺伝子発現の細胞間ヘテロジェネイティーの原因を解析した結果、細胞分裂に起因したヒストン蛋白の重要性が示唆された。さらに、遺伝子デリバリーにおけるウイルスベクターと非ウイルスベクターの遺伝子発現効率の差についても遺伝子翻訳過程に大きな差があることを見出した。

5. 今後の計画

[1+3] siRNA の修飾様式および RISC への取り込みの最適化と、がん細胞を標的にする in vitro および in vivo 実験

[2] 天然型 DNA テンプレート・4'-チオ DNA テンプレートを用いる 4 種類の 4'-チオ NTP による DNA 鎖・チオ DNA 鎖伸張反応および、PCR への展開。細胞中での shRNA の発現と RNAi 効果の増強。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)
(研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、
連携研究者は一重下線)

1) Takahashi, M.; Minakawa, N.; **Matsuda, A.** Synthesis and characterization of 2'-modified-4'-thioRNA: a comprehensive comparison of nuclease stability. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37, 1353-1362.

2) Matsugami, A.; Ohyama, T.; Inada, M.; Inoue, N.; Minakawa, N.; **Matsuda, A.**; Katahira, M. Unexpected A-form formation of 4'-thioDNA in solution, as revealed by NMR, and the implication on the mechanism of nuclease-resistance. *Nucleic Acids Res.* 2008, 36, 1805-1812.

3) Minakawa, N.; Sanji, M.; Kato, Y.; **Matsuda, A.** Investigations toward the selection of fully-modified 4'-thioRNA aptamers: optimization of in vitro transcription step in the presence of 4'-thioNTPs. *Bioorg. Med. Chem.* 2008, 16, 9450-9456.

4) Inoue, N.; Shionoya, A.; Minakawa, N.; Ogawa, N.; **Matsuda, A.** Amplification of 4'-thioDNA in the presence of 4'-thio-dTTP and 4'-thio-dCTP, and 4'-thioDNA-directed transcription in vitro and in mammalian cells. *J. Am. Chem. Soc.* 2007, 129, 15424-15425.

5) Nakamura, Y.; Kogure, K.; Futaki, S.; Harashima, H. Octaarginine-modified multi-functional envelope-type nano device for siRNA. *J. Cont. Rel.* 2007, 119, 360-367.

6) Inoue, N.; Minakawa, N.; **Matsuda, A.** Synthesis and properties of 4'-thioDNA: unexpected RNA-like behavior of 4'-thioDNA. *Nucleic Acids Res.* 2006, 34, 3476-3483.

ホームページ等

<http://www.pharm.hokudai.ac.jp/org/yakka01.html>