

学術交流・研究推進プロジェクト 成果報告書

研究代表者 所属 機能分子創製化学研究室
職・氏名 教授・浦田 秀仁

研究テーマ：

REDUCT-RNA 搭載型 siRNA の in vivo 応用に関する研究

研究期間：

2019 年 4 月 1 日 ～ 2021 年 3 月 31 日

研究担当者：

<本学>

研究代表者 (大阪薬科大学・薬学部・浦田秀仁)
研究分担者 (大阪薬科大学・薬学部・和田俊一)
研究分担者 (大阪薬科大学・薬学部・林 淳祐)

<共同研究機関>

研究代表者 (国立循環器病研究センター研究所・病態代謝部・斯波真理子)
研究分担者 (国立循環器病研究センター研究所・病態代謝部・和田郁人)

研究目的：

核酸医薬の臨床応用には、生体内での安定性向上を目的とする化学修飾が不可欠であるが、siRNA 分子中の修飾位置によって siRNA 活性が低下することが siRNA 創薬の最大の課題となっている。このような問題を解決する戦略として申請者は細胞内の環境下で活性化される新規修飾核酸である REDUCT-RNA を設計し、開発を進めてきた。

アポリポ蛋白 B (ApoB) は動脈硬化惹起性リポ蛋白である LDL の構成成分であり、ApoB はホモ接合体家族性高コレステロール血症 (FH) 治療薬の標的分子になりうる。本研究では、REDUCT-RNA 搭載型 siRNA の FH 治療薬としての有効性を in vitro 及び in vivo で評価することを目的とする。

研究内容および研究成果：

1. ApoB siRNA の合成と in vitro 評価系の確立

文献既知の ApoB mRNA 標的配列 (S. Jurgen *et al.*, Nature, **2004**, 432, 173.) に対する 3'末端に TT オーバーハングを有する天然型 21mer siRNA (下記) を合成し、この ApoB siRNA をヒト肝癌由来細胞株である HuH-7 に CEM 法により transfection した。37 °C で 24 h インキュベート後、ApoB mRNA 発現量を RT-qPCR で定量し、ApoB siRNA が濃度依存的にその発現を抑制することを確認した。

5'-GUC AUC ACA CUG AAU ACC AAU TT-3' sense 鎖
3'-TT CAG UAG UGU GAC UUA UGG UUA-5' antisense 鎖

2. REDUCT 修飾 ApoB siRNA の設計

REDUCT 修飾の弱点は、現時点での合成技術では 21mer の RNA 鎖中に 4~5 残基程度の導入が限界であることである。この弱点を補う方法論として、既存の化学修飾により ApoB siRNA のノックダウン活性が低下する領域のマッピングを行うとともに、血清中で分解が起こりやすい位置の同定を行うことで、プロドラッグ型修飾と非プロドラッグ型修飾を併用する最適修飾 ApoB siRNA の設計を試みた。

i) 既存の化学修飾によるノックダウン活性が低下する部位のマッピング

二本鎖の siRNA の、遺伝子発現抑制活性が既存の化学修飾による影響を鋭敏に受けるアンチセンス鎖を 3 残基連続で 2'-O-Me 修飾した ApoB siRNA を網羅的に 16 種類合成し、それぞれの *in vitro* における ApoB mRNA 発現抑制活性を上記評価系で評価し、既存の化学修飾により活性低下が引き起こされる部位の同定を行った。その結果、アンチセンス鎖の 5'-末端から 3 残基連続で 2'-O-Me 修飾した ApoB siRNA の遺伝子発現抑制活性がほぼ消失し、また、13-15 および 15-17 番目残基の修飾で有意に活性低下することが分かった。そこで、さらに 1-3 番目の 3 残基について細かく 2'-O-Me 修飾した ApoB siRNA を合成し、特に 5'-末端から 2 番目の残基の 2'-O-Me 修飾が遺伝子発現抑制活性の低下に強く影響していることを明らかにした。

ii) 血清中での分解 hotspot の同定

これまで siRNA の血清中における分解物の同定が詳細に行われた例は少なく、方法論を確立する必要があった。

分解反応条件

siRNA の二本鎖のうち RISC に取り込まれ標的配列の認識に関わるアンチセンス鎖の 5'-, 3'-いずれかの末端を蛍光標識した ApoB siRNA を合成し、FBS (fetal bovine serum) 中で endonuclease による分解を受けやすい部位の同定を試みた。Hong らの方法 (J. Hong *et al.*, *FASEB J.* **2010**, 24, 4844) に準じて、0.5 μ M siRNA, 10% FBS in PBS, 37 °C で分解反応を行い、経時的にサンプリングし、20% PAGE で分析を行ったが、全く分解は認められなかった。そこで、siRNA のアンチセンス鎖のみ一本鎖で分解反応を行ったところ、瞬時に完全に分解が起こったことから、1) 二本鎖の条件では分解が遅くなること、2) 二本鎖 RNA でも分解は起こっているが分析ができていない、という 2 つの可能性が考えられた。加えて、FBS の希釈に緩衝液ではなく水を用いてイオン強度を下げると、二本鎖 RNA でも比較的分解反応が起こりやすくなることも分かった。これを変性ゲルを用いた PAGE で分析を行ったところ、やや改善は見られたが根本的な解決にはならなかった。

分解反応の分析法の検討

そこで、二本鎖の状態での siRNA の分解反応を行ったのち、蛍光標識したアンチセンス鎖を一本鎖として検出するために、過剰量の非標識アンチセンス鎖 DNA を添加し、PAGE を行った。その結果、非標識アンチセンス鎖 DNA を添加せず PAGE 分析すると分解産物が全く認められない反応物でも、非標識アンチセンス鎖 DNA を添加すると分解産物を鋭敏に検出することができた。この結果は、分解反応の際に FBS の希釈を水、緩衝液のいずれで行うかで影響を受けたが、非標識アンチセンス鎖 RNA を添加することで再現性良く一本鎖状態で検出することができた。また、サンプリングした反応液の反応を停止する目的で SDS などの変性剤を添加していたが、非標識アンチセンス鎖 DNA の添加により分解産物の検出

が可能になったことで反応が十分停止していないことも明らかになり、検討の結果、反応液を PhOH/CHCl₃ 処理することで反応を停止させることができることも明らかになった。

Hong らは 125 種類の siRNA の血清中での分解反応を行い、その分解挙動から 4 つのカテゴリに分類し、最も安定なカテゴリに属するものは天然型の構造でも 10% FBS 中で 6 時間後も未変化で存在できるとしている (J. Hong *et al.*, *FASEB J.* **2010**, *24*, 4844)。しかし、今回の本研究結果から、Hong らが分類した 4 つのカテゴリは siRNA の分解の程度を必ずしも表すものではなく、単に分解挙動の PAGE による検出しやすさを反映している可能性がある。

分解 hotspot の同定

上記検討結果に基づき、5'-, 3'-いずれかの末端を蛍光標識したアンチセンス鎖を用い、0.5 μM siRNA, 10% FBS, 50 mM リン酸緩衝液, 37 °C で分解反応を行い、経時的にサンプリングした反応液を PhOH/CHCl₃ 処理後、20 当量の非標識アンチセンス鎖 RNA を添加し、PAGE で分析した。その結果、3 つのバンドを確認することができ、21mer のアンチセンス鎖中主な分解が 3 箇所で行われていることが明らかになった。また、血清中での siRNA の分解は RNase A family が主要な分解酵素であることが報告されており (Haupenthal *et al.*, *Biopharm. Pharmacol.*, 2006, *71*, 702)、本研究で同定できた分解位置は、pyrimidine ヌクレオチドを認識して、その 3'-末端側を加水分解する RNase A の基質選択性と一致している。

ii) REDUCT-RNA 搭載型 ApoB siRNA の設計と in vivo 応用

以上の結果から、化学修飾によって siRNA 活性に影響のない部位には既存の修飾を施し、影響が大きく、かつ血清中で分解を受けやすい部位には REDUCT 修飾を使用した REDUCT ApoB siRNA を設計、合成を行い、in vivo 実験に供していく予定である。

成果発表：

<原著論文>

- ・
- ・

<学会発表>

- ・ 細胞内を模倣した還元的環境で活性化するプロドラッグ型核酸創薬
医工薬連関科学研究発表会、関西大学、2020 年 1 月 23 日

- ・

<その他>

- ・
- ・