



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	化学反応を利用した機能性核酸の細胞内ビルドアップ法の開発 [全文の要約]
Author(s)	丸山, 豪斗
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第11559号
Issue Date	2014-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/59341
Type	doctoral thesis
File Information	Hideto_Maruyama_summary.pdf



学 位 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称 博士（薬科学） 氏 名 丸山 豪斗

学 位 論 文 題 名

化学反応を利用した機能性核酸の細胞内ビルドアップ法の開発

【背景】

1998 年、Fire や Mello らによって細胞内に導入された二本鎖 RNA が遺伝子発現を抑制する RNA 干渉¹が発見された。RNA 干渉機構を利用し短鎖の二本鎖 RNA (siRNA; short-interfering RNA) を細胞内に導入することで、配列特異的に遺伝子発現を抑制することが可能になった²。そのため、siRNA は様々な疾患に対する治療薬としての応用が期待されているが、実用化には技術的なブレークスルーが必要な段階に直面している。

そこで RNA 干渉を誘導する新たな手法として、siRNA を断片化した短鎖 RNA を細胞内に導入し、細胞内環境において高分子の活性型 siRNA を内部構築する細胞内ビルドアップ型 siRNA を考案した。一般的な siRNA は 21 塩基程であるが 19 塩基以下に断片化した RNA を用いることによって免疫応答の賦活化を回避できることが期待される^{3,4}。

【細胞内ビルドアップ型 siRNA の合成と遺伝子発現抑制効果】

siRNA を 4 本の RNA に断片化し、それぞれの鎖の末端に Caged ホスホロチオエート (CPS) 基やヨードアセチル (IAc) 基を導入することで細胞内ビルドアップ型 siRNA (Intracellular Buildup RNA; IBR) を調製した⁵。IBR は細胞内に導入後、CPS-RNA のジスルフィドが細胞内に高濃度で存在する GSH (グルタチオン) により脱保護されることで活性化する。その後、PS-RNA と IAc-RNA とのケミカルライゲーションを経て、ligated siRNA が生成し、活性型 siRNA として遺伝子発現を抑制することを期待した。

IBR の遺伝子発現抑制効果を測定するため、ヒト由来の HeLa 細胞 (ルシフェラーゼ安定発現株) に IBR を導入し、24 時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、25 nM の siRNA と 100 nM の IBR がほぼ同等に標的遺伝子の発現を抑制することを明らかにした。同濃度の siRNA と比較して遺伝子発現抑制効果が減弱したが、IBR を用いて遺伝子発現が抑制可能であった。あらかじめ細胞外で調製した ligated siRNA を加えた場合も siRNA と比較して遺伝子発現抑制効果が減弱したことから非天然型構造の導入によって高次構造が変化し、活性が低下したと考えられる。

【免疫応答賦活性化能の測定】

IBR が免疫応答の賦活化を回避できるかを確かめるため、ヒト由来のグリオーマ細胞 (T98G) に各種 RNA を導入し、24 時間後の Interferon- β (IFN- β) 発現量をリアルタイム PCR により解析した。免疫応答を賦活化する poly I:C や siRNA を導入した場合には、

IFN- β の発現量が著しく上昇したが、IBR においては IFN- β の発現量はほとんど上昇しなかった。

以上のことから細胞内環境において短鎖の RNA から活性型 siRNA を構築する細胞内ビルドアップ型 siRNA の開発に初めて成功した⁶。さらに本手法は siRNA を臨床応用する際の重要な課題である免疫応答の賦活化を回避できることを見出した。

【新規ケミカルライゲーション反応の開発】

細胞内ビルドアップ型 siRNA は免疫応答の賦活化を回避することが可能であったが、天然型の siRNA と同等に遺伝子発現を抑制するためには高濃度の IBR を用いる必要があった。その原因はケミカルライゲーション反応により形成される構造（アミド結合）が、天然型のホスホジエステル結合とは大きく異なるため、siRNA の高次構造を歪めてしまうことであると考えられた。そこで、細胞内ビルドアップ型 siRNA に利用可能かつ siRNA の高次構造に影響を与えない新規ケミカルライゲーション法の開発を行った。

オリゴヌクレオチド末端 PS 基を DNFB により活性化し DNP-PS 基に変換後、オリゴヌクレオチドの末端に導入した水酸基やアミノ基と反応させることでホスホジエステル結合やホスホルアミデート結合の形成を検討した。ホスホルアミデート結合は天然型のホスホジエステル結合に類似した構造であり、siRNA 中に導入しても遺伝子発現抑制効果に影響を与えないと考えられる。

DNP-PS 基とアミノ基とのライゲーション反応によるホスホルアミデート結合の形成では、反応溶液の pH によって反応効率に顕著な違いが生じた。特に pH 8 において反応効率が高く 80% 以上の収率で反応が進行し、また生理的条件に近い pH 7 でも 60% 以上の良好な収率で反応が進行した。また、DNA/RNA の末端には 3'-末端と 5'-末端があるが、合成した化学修飾核酸を利用し、どちらの位置にアミノ基や DNP-PS 基を導入しても同様に反応が進行することを明らかにした。

以上より鋳型配列の存在下において DNA, RNA に関わらず効率的に反応が進行する優れたケミカルライゲーション反応の開発に成功した。

【参考文献】

- (1) Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M. K.; Kostas, S. A.; Driver, S. E.; Mello, C. C. *Nature* **1998**, 391, 806.
- (2) Elbashir, S. M.; Martinez, J.; Patkaniowska, A.; Lendeckel, W.; Tuschl, T. *EMBO J.* **2001**, 20, 6877.
- (3) Kleinman, M. E.; Yamada, K.; Takeda, A.; Chandrasekaran, V.; Nozaki, M.; Baffi, J. Z.; Albuquerque, R. J.; Yamasaki, S.; Itaya, M.; Pan, Y.; Appukuttan, B.; Gibbs, D.; Yang, Z.; Kariko, K.; Ambati, B. K.; Wilgus, T. A.; DiPietro, L. A.; Sakurai, E.; Zhang, K.; Smith, J. R.; Taylor, E. W.; Ambati, J. *Nature* **2008**, 452, 591.
- (4) Reynolds, A.; Anderson, E. M.; Vermeulen, A.; Fedorov, Y.; Robinson, K.; Leake, D.; Karpilow, J.; Marshall, W. S.; Khvorova, A. *RNA* **2006**, 12, 988.
- (5) Abe, H.; Kondo, Y.; Jinmei, H.; Abe, N.; Furukawa, K.; Uchiyama, A.; Tsuneda, S.; Aikawa, K.; Matsumoto, I.; Ito, Y. *Bioconjug. Chem.* **2008**, 19, 327.
- (6) Maruyama, H.; Nakashima, Y.; Shuto, S.; Matsuda, A.; Ito, Y.; Abe, H. *Chem. Commun.* **2014**, 50, 1284.