

# REDUCT-siRNA：プロドラッグ型 siRNA 分子による 優れた遺伝子発現抑制効果



研究ノート

中川 治\*, 越智 洋輔\*\*, 林 淳祐\*\*\*, 和田 俊一\*\*\*\*, 浦田 秀仁\*\*\*\*\*

Effective Gene Silencing by a prodrug-siRNA: REDUCT-siRNA

Key Words : RNA interference (RNAi), small interfering RNA (siRNA), prodrug, REDUCT-RNA

## 1. はじめに：

近年、次世代型の医薬として注目されている核酸医薬は、薬効向上や生体内安定性の観点から、人工核酸の利用が不可欠とされている。RNA 干渉 (RNA interference: RNAi) 法は、核酸医薬における主要な戦略の一つであり、21-23 mer の二本鎖 RNA (siRNA) を細胞内に導入することで内因性タンパク質と RISC と呼ばれる複合体を形成し、相補鎖 mRNA と結合・切断することで特異的に遺伝子発

現を抑制する手法である<sup>1,2)</sup>。RNAi 法に要求される人工核酸の機能には、主に生体内での安定性と RISC による認識が挙げられるが、生体内機構が複雑に介在する本法において、未だ自在な分子設計は困難な点が多く、既存の人工核酸を限定的に使用しているのが現状である<sup>1,2)</sup>。そのような背景下、本稿では著者らが RNAi 法に対して分解酵素に対する安定性と RNAi 活性を両立可能な“プロドラッグ型 siRNA 人工分子”を開発したので、その詳細について紹介したい<sup>3-5)</sup>。



\*Osamu NAKAGAWA

1975年8月生  
大阪大学 大学院薬学研究科 博士後期課程修了 (2004年)  
現在、大阪大学 大学院薬学研究科 生物有機化学分野 特任講師 博士(薬学)  
核酸化学、生物有機化学  
TEL : 06-6879-8203  
FAX : 06-6879-8204  
E-mail : osamu\_nakagawa@phs.osaka-u.ac.jp



\*\*Yosuke OCHI

1987年8月生  
大阪薬科大学 大学院薬学研究科 博士後期課程修了 (2016年)  
現在、日本赤十字社 近畿ブロック血液センター 薬剤師 博士(薬科学)  
核酸化学  
E-mail : y-ochi@kk.bbc.jrc.or.jp



\*\*\*Junsuke HAYASHI

1988年8月生  
大阪薬科大学 大学院薬学研究科 博士前期課程修了 (2013年)  
現在、大阪薬科大学 機能分子創製化学研究室 助手 修士(薬科学)  
核酸化学  
TEL : 072-690-1088  
E-mail : j.hayashi@gly.oups.ac.jp

## 2. REDUCT-RNA の合成とプロドラッグ分子としての特性：

ジスルフィド結合は細胞内の高度な還元環境 (1-10 mM 還元型グルタチオン, GSH) 下で容易に切断されることから薬物等のデリバリー技術に活用されている。著者らはこれに着目し、核酸の 2' 位水酸基



\*\*\*\*Shun-ichi WADA

1967年6月生  
京都大学 大学院薬学研究科 博士後期課程修了 (1995年)  
現在、大阪薬科大学 機能分子創製化学研究室 准教授 博士(薬学)  
天然物化学、生物有機化学  
TEL : 072-690-1088  
E-mail : wada@gly.oups.ac.jp



\*\*\*\*\*Hidehito URATA

1960年2月生  
大阪大学 大学院薬学研究科 博士前期課程修了 (1985年)  
現在、大阪薬科大学 機能分子創製化学研究室 教授 博士(薬学)  
核酸化学、生物有機化学  
TEL : 072-690-1089  
FAX : 072-690-1089  
E-mail : urata@gly.oups.ac.jp

にメチルジチオメチル (MDTM) 基を導入した人工核酸 **1** を設計した (図1)。本分子は還元環境下でジスルフィド結合が切断され不安定なチオヘミアセタール体 **2** を経て 2'-OH 体 **3** (天然型 RNA) になるものと考えた。一般に 2' 位水酸基への修飾は分解酵素に対する安定性を向上させることから<sup>1,2)</sup>、**1** は細胞内導入までは優れた安定性を示し、細胞内に導入後、天然型 RNA へと変換されることで十分な RNAi 効果を示すことが期待される。著者らはこのような特性を有する分子を総じて REDUCT-RNA (Reducing-Environment-Dependent Uncatalyzed Chemical Transforming RNA) と名付けた。

**1** の合成に当たって、分子内にジスルフィドと 3 価のリンが共存すると副反応が生じることが知られており、オリゴ導入前に 2' 位水酸基へ MDTM 基の導入は困難が予想された。そこで、2'-O-トリメト

キシベンジルチオメチル (TMBTM) 体 **4** として一旦、オリゴヌクレオチド (ON) へ導入した後、2'-O-MDTM-ON **1** へ変換する、画期的なポストシンセシスアプローチを考案した (スキーム1)。

まずウリジンを出発原料とし、3',5'位水酸基をシリル保護した後、プメラータン転位反応により 2'-O-メチルチオメチル体 **5** を得た。塩化スルフルルを作用させ 2'-O-クロロメチル体へと変換した後、塩基性条件下で 2,4,6-トリメトキシベンジルメルカプタンを作用させることで 2'-O-TMBTM-ウリジン **6** を得た。3',5'位を脱保護した後、定法によりオリゴ導入前駆体となるアミダイト体 **7** を得た。続いて **7** を DNA/RNA 自動合成機を用いてオリゴヌクレオチドへ導入し、2'-O-TMBTM-ON **4** を得ることに成功した。次に 2'-O-TMBTM-ON **4** を pH 4 の緩衝液中で過剰量の dimethyl(methylthio)sulfonium tetra-

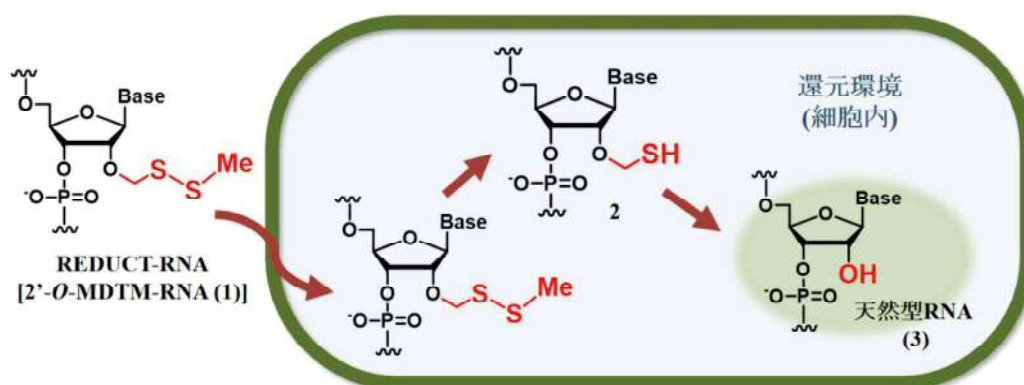
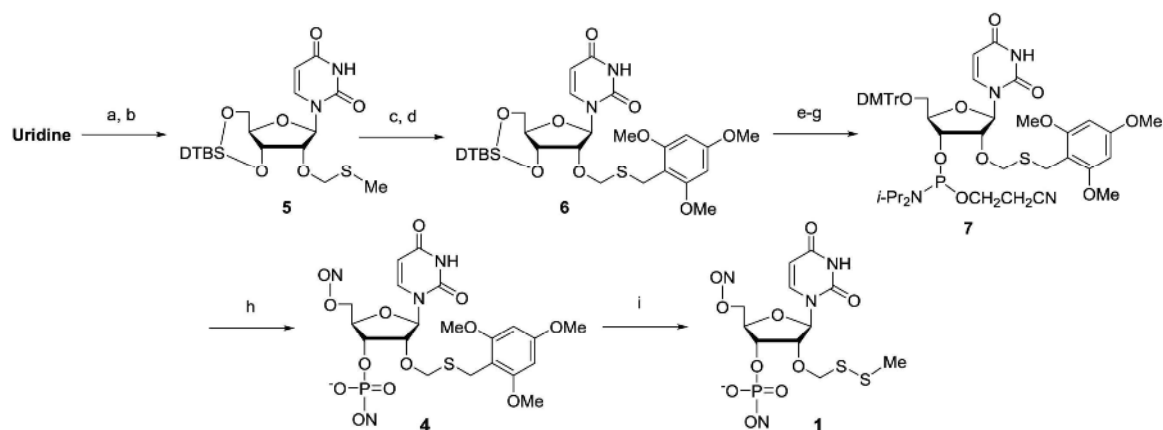


図1. REDUCT-RNAの概要：還元環境下で自発的に天然型RNAへ化学変化するプロドラッグ分子。



スキーム1. ポストシンセシス法による 2'-O-MDTM-ON の合成。

(a) DTBS(OTf)<sub>2</sub>, DMF; (b) DMSO, Ac<sub>2</sub>O, AcOH; (c) SO<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (d) 2,4,6-(MeO)<sub>3</sub>BnSH, NaH, DMF; (e) Et<sub>3</sub>N · 3HF, THF; (f) DMTrCl, pyridine; (g) (*i*-Pr<sub>2</sub>N)<sub>2</sub>POCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CN, diisopropylammonium tetrazolide, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; (h) DNA/RNA自動合成機 (i) DMTrSF, 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4)。

fluoroborate (DMTSF) を作用させたところ、4時間後には副反応を生じることなく、首尾よく 2'-O-MDTM-ON **1** へ変換可能であった (図2)。

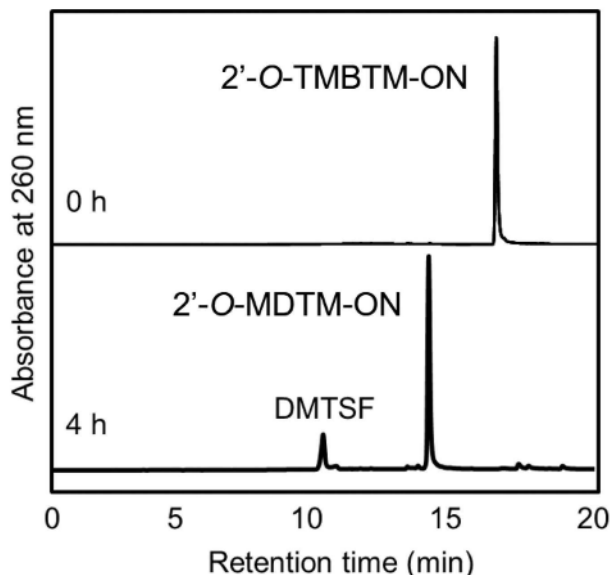


図2. DMTSFを用いた 2'-O-TMBTM-ON → 2'-O-MDTM-ON の変換反応 (HPLC データ).  
オリゴ配列: 5'-r(GCGUUXUUUGCU)-3' (X: 2'-O-TMBTM-ウリジン → 2'-O-MDTM-ウリジン).

2'-O-MDTM-ON のプロドラッグ分子としての基礎物性を評価した。2'-O-MDTM-ON をウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum: FBS) に対する安定性を評価したところ、天然型 DNA と比較して 2'-O-MDTM-ON は有意な安定性を有することが分かった (図3)。そして細胞内環境をミミックした 10

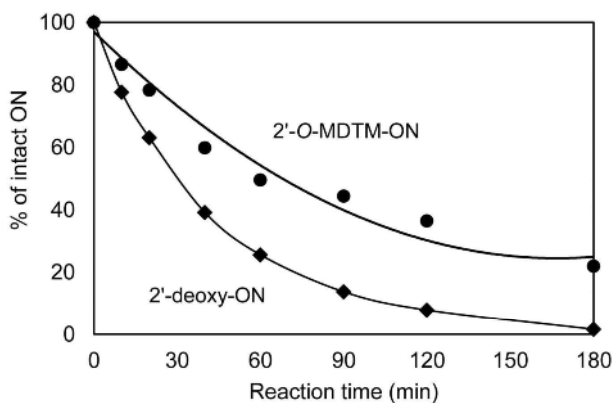


図3. 血清中における 2'-O-MDTM-ON の安定性評価.  
反応条件: 5%ウシ胎児血清 (FBS: Fetal Bovine Serum), オリゴ濃度 12.5 nmol/ml, 温度 37°C.  
オリゴ配列: 5'-d(TTTTTTTTXXT)-3' [X: 2'-O-MDTM-ウリジン or チミジン (2'-デオキシ)].

mM GSH (pH 7) 還元条件に室温で付したところ、2'-O-MDTM-ON は綺麗に 2'-OH 体 (天然型 RNA) へと変換されることが分かり (図4)、プロドラッグ分子として十分な基礎特性を有することが分かった。

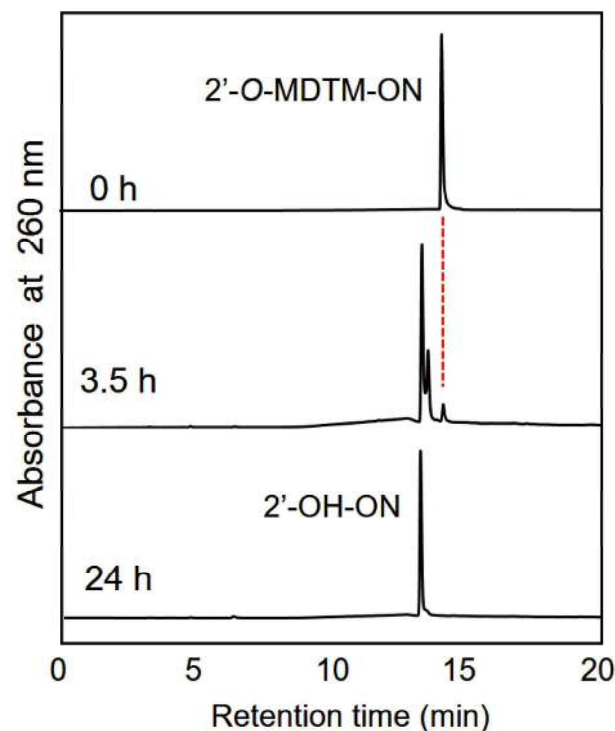


図4. 還元条件 (10 mM GSH, pH 7, 室温) 下での 2'-O-MDTM-ON → 2'-OH-ON の変換反応 (HPLC データ).  
オリゴ配列: 5'-r(GCGUUXUUUGCU)-3' (X: 2'-O-MDTM-ウリジン → 2'-OH-ウリジン).

### 3. REDUCT-siRNA の優れた遺伝子発現抑制効果:

実際に 2'-O-MDTM-ウリジン を siRNA に導入し遺伝子発現抑制効果を検証することとした。Firefly Luciferase 遺伝子を標的とした種々の 2'-O-MDTM-siRNA **2-16** を合成した (表1)。先立って 2'-O-MDTM-siRNA **2-16** の二重鎖形成能を融解温度 ( $T_m$ ) 測定により評価したところ、2'-O-MDTM-siRNA は RNA 二重鎖を不安定化させることなく天然型 siRNA **1** と同等の十分な安定性 ( $\Delta T_m < \pm 0.6/\text{mod.}$ ) を有することが分かった。そこで Firefly Luciferase を安定発現しているヒト肺胞基底上皮腺癌 A549 細胞 (A549-Luc) を使い、2'-O-MDTM-siRNA **2-16** を Lipofectamine® 2000 にてトランスフェクションし評価した (図5)。その結果、驚くべきことに 2'-O-MDTM-siRNA は概して天然型 siRNA と同等かそれ

表1. RNAi 評価に用いた REDUCT-siRNA 配列と二重鎖融解温度 ( $T_m$ ).

配列名	配列 <sup>a)</sup> センス鎖 (5'-3') アンチセンス鎖 (3'-5')	$T_m$ (°C) <sup>b)</sup>	$\Delta T_m$ (°C)	$\Delta T_m/\text{mod.}$ (°C)
Control	GACGUAAACGGCCACAAGUTT TTCUGCAUUUGCCGGUGUUCA	n.d.		
siRNA1	CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU	68.0	—	
siRNA2	CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGAAUGCGAC <u>U</u> CAUGAAGCU	68.6	+0.6	+0.60
siRNA3	CUUACGC <u>U</u> GAGUACUUCGATT TTGAAUGCGAC <u>U</u> CA <u>U</u> GAGCU	67.9	-0.1	-0.03
siRNA4	<u>C</u> <u>U</u> UACGC <u>U</u> GAG <u>U</u> ACU <u>U</u> CGATT TTGAAUGCGAC <u>U</u> CA <u>U</u> GAGCU	67.2	-0.8	-0.13
siRNA5	CUUACGC <u>U</u> GAG <u>U</u> ACUUCGATT TTGAAUGCGAC <u>U</u> CA <u>U</u> GAGCU	67.8	-0.2	-0.05
siRNA6	CUUACGC <u>U</u> GAGUACUUCGATT TTGAAUGCGAC <u>U</u> CAUGAAGCU	68.2	+0.2	+0.10
siRNA7	<u>C</u> <u>U</u> UACGC <u>U</u> GAG <u>U</u> ACU <u>U</u> CGATT TTGAAUGCGAC <u>U</u> CAUGAAGCU	67.8	-0.2	-0.04
siRNA8	CUUACGC <u>U</u> GAG <u>U</u> ACUUCGATT TTGAA <u>U</u> GCGAC <u>U</u> CA <u>U</u> GAG <u>C</u> <u>U</u>	67.0	-1.0	-0.17
siRNA9	<u>C</u> <u>U</u> UACGC <u>U</u> GAG <u>U</u> ACU <u>U</u> CGATT TTGAA <u>U</u> GCGAC <u>U</u> CA <u>U</u> GAG <u>C</u> <u>U</u>	66.1	-1.9	-0.24
siRNA10	CUUACGC <u>U</u> GAG <u>U</u> ACUUCGATT TTGAAUGCGAC <u>U</u> CAUGAAGCU	68.3	+0.3	+0.10
siRNA11	CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGAAUGCGAC <u>U</u> CA <u>U</u> GAGCU	68.4	+0.4	+0.20
siRNA12	<u>C</u> <u>U</u> UACGC <u>U</u> GAG <u>U</u> ACU <u>U</u> CGATT TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU	66.2	-1.8	-0.45
siRNA13	CUUACGCUGAGUACUUCGATT TTGAA <u>U</u> GCGAC <u>U</u> CA <u>U</u> GAG <u>C</u> <u>U</u>	67.3	-0.7	-0.18
siRNA14	CUUACGC <u>U</u> GAG <u>U</u> ACUUCGATT TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU	66.8	-1.2	-0.60
siRNA15	CUUACGC <u>U</u> GAGUACUUCGATT TTGAAUGCGACUCAUGAAGCU	67.6	-0.4	-0.40
siRNA16	CUUACGC <u>U</u> GAGUACUUCGATT TTGAA <u>U</u> GCGAC <u>U</u> CA <u>U</u> GAG <u>C</u> <u>U</u>	66.9	-1.1	-0.22

<sup>a</sup> U: 2'-O-MDTM-ウリジン.<sup>b</sup> 測定条件: 1  $\mu$ M siRNA 二重鎖, 100 mM 塩化ナトリウム, 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2).

以上の優れた遺伝子発現抑制活性を示した。アンチセンス鎖の5'末端及びシード領域（アンチセンス鎖の5'末端から2-8塩基目の7塩基）に導入した場合（siRNA 3-5, 8, 9, 11, 13, 16）にも優れた活性を示した。一般にシード領域に2'-O-修飾体（2'-O-Me, 2'-F-RNA）を導入すると活性が著しく低下することが報告されていることから<sup>1,2)</sup>、2'-O-MDTM-siRNAの優れた遺伝子発現抑制活性は、期待通り、細胞内導入後に天然型siRNAへ変換され活性を示したものと考えられる。

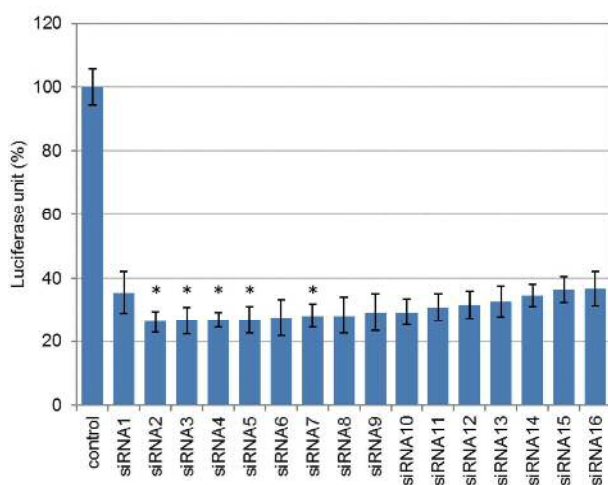


図5. A549-Luc細胞を用いた REDUCT-siRNA の Firefly Luciferase 遺伝子発現抑制効果。  
条件：各 siRNA (10 nM) を Lipofectamine® 2000 (3 uL/mL) を用いてトランスフェクション (4時間) 後、10%FBS を含む新しい培地へ交換し、37°C で 24 時間培養 (\* $p < 0.01$ )。

#### 4. おわりに：

以上、REDUCT-siRNA は天然型 siRNA を上回る優れた遺伝子発現抑制効果を示し、著者らの戦略が極めて有効であることを証明できた。本分子の特徴である非触媒的な化学変換は、酵素反応に基づいた手法と比較して、分子設計が容易で高い拡張性をもつ。著者らは既に本ポストシンセシス合成法で種々の誘導体の合成にも成功しており、還元条件下での持続的な反応制御も可能となりつつある。今後、REDUCT-siRNA が RNAi 法において基盤分子となることを目指し、現在も精力的に本研究を展開しているところである。

#### 5. 参考文献：

- (1) Prakash, T. P.; Allerson, C. R.; Dande, P.; Vickers, T. A.; Sioufi, N.; Jarres, R.; Baker, B. F.; Swayze, E. E.; Griffey, R. H.; Bhat, B., *J. Med. Chem.* **2005**, *48*, 4247-4253.
- (2) Amarzguioui, M.; Holen, T.; Babaie, E.; Prydz, H., *Nucleic Acids Res.* **2003**, *31*, 589-595.
- (3) Ochi, Y.; Nakagawa, O.; Sakaguchi, K.; Wada, S.; Urata, H., *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 7620-7622.
- (4) Ochi, Y.; Nakagawa, O.; Hayashi, J.; Wada, S.; Urata, H., *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* **2015**, *62*, 4.63.1-4.63.20.
- (5) Ochi, Y.; Imai, M.; Nakagawa, O.; Hayashi, J.; Wada, S.; Urata, H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 845-848.

