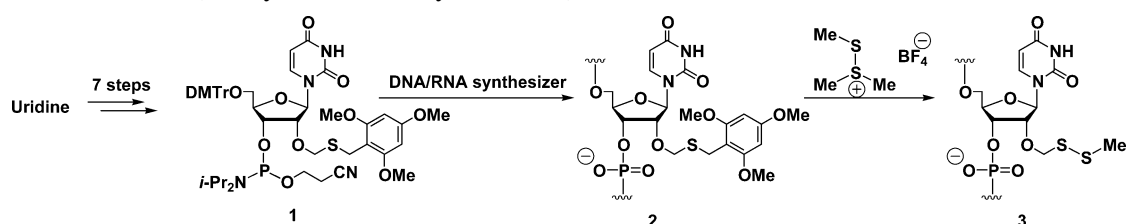


氏名	越智 洋輔
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	博薬科第28号
学位授与の日付	平成28年3月12日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項
学位論文題目	細胞内環境で活性化されるプロドラッグ型 siRNA の 開発
論文審査委員	(主査) 教授 春沢 信哉 (副査) 教授 浦田 秀仁 (副査) 准教授 和田 俊一

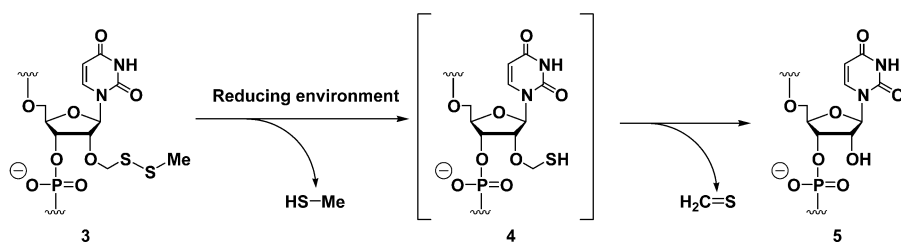
論文内容の要旨

低分子干渉 RNA (small interfering RNA, siRNA) は、 mRNA を認識するアンチセンス鎖とその相補鎖のセンス鎖からなる短鎖の合成二本鎖 RNA である。 siRNA を細胞内に導入すると、アンチセンス鎖が内因性蛋白質と複合体 (RISC) を形成し、これが標的となる mRNA を切断することから、 siRNA は遺伝子発現を抑制するツールとして用いられており、現在、臨床応用に向けた治験も進行している。実際に siRNA を臨床応用する場合、生体内での高い安定性が求められるが、 RNA は生体内のヌクレアーゼによって極めて速やかに分解される欠点がある。この点を改善する目的で、様々な化学修飾 RNA の設計・合成が行われてきたが、多くの化学修飾した RNA はヌクレアーゼ耐性を示す一方で、遺伝子発現抑制効果が大きく低下することが知られている。 siRNA のアンチセンス鎖の 5'-末端から 2 残基目から 8 残基目の領域は seed region とよばれ、この領域とアンチセンス鎖の 5' 末端の残基に化学修飾を施すと、 2'-O-メチル修飾や 2'-フルオロ修飾のような軽微な修飾でさえも、天然型 RNA と比較して siRNA 活性が低下することが知られている。以上のように siRNA の遺伝子発現抑制活性は化学修飾に対して非常に鋭敏なことから、細胞外においてはヌクレアーゼ耐性を示し、細胞内へ移行後、天然型 RNA に構造変化し得るプロドラッグ型 RNA

を着想し、細胞内の還元的環境下でジスルフィド結合の開裂が期待できる 2'-O-メチルジチオメチル-RNA (3) の合成を計画し、その RNA を “Reducing-Environment-Dependent Uncatalyzed Chemical Transforming RNA (REDUCT RNA)” と命名した。しかし、オリゴヌクレオチド合成ユニットのアミダイト体に 2'-O-アルキルジチオメチル基を共存させると、アミダイトの 3 価のリン原子の還元性によってジスルフィドが開裂するとの報告がある。このため、本研究ではジスルフィド結合を持たない安定なアミダイト体を合成し、オリゴヌクレオチド合成後にアルキルジチオメチル基に変換する、“オリゴヌクレオチド合成後修飾法”による 2'-O-メチルジチオメチル (methyldithio- methyl, MDTM) RNA の合成法について検討を行った。



まず、ヌクレオシドレベルの予備検討として、2' 位水酸基に 2,4,6-トリメトキシベンジルチオメチル (2,4,6-trimethoxybenzylthiomethyl, TMBTM) 基を有するウリジン誘導体を設計・合成し、dimethyl(methylthio)sulfonium tetrafluoroborate (DMTSM) を用い、90 % 以上の収率で目的の MDTM 化体に変換することに成功した。そこで、安定な TMBTM-ウリジンアミダイト体 1 を合成し、オリゴヌクレオチド (oligodeoxynucleotide, ODN) 2 に組み込み、DMTSM を用いた独自のオリゴヌクレオチド合成後修飾法によって MDTM 化したところ、純度、効率とも良好に 2'-O-MDTM-ODN 3 へ変換することに成功した。



3 は細胞内環境を模倣した 10 mM グルタチオン還元条件下で、中間体 4 を経て 2'-OH 体 5 へ速やかに変換され、さらに 3 は、ヘビ毒ホスホジエステラーゼやウシ胎児血清の存在下で、天然型 ODN と比較して半減期が 2 倍以上になり優れたヌクレアーゼ耐性を示すことが明らかとなった。このことから、2'-O-MDTM 基は、プロドラッグ型 siRNA の新規修飾基として非常に有望であると考えられた。そこで、実

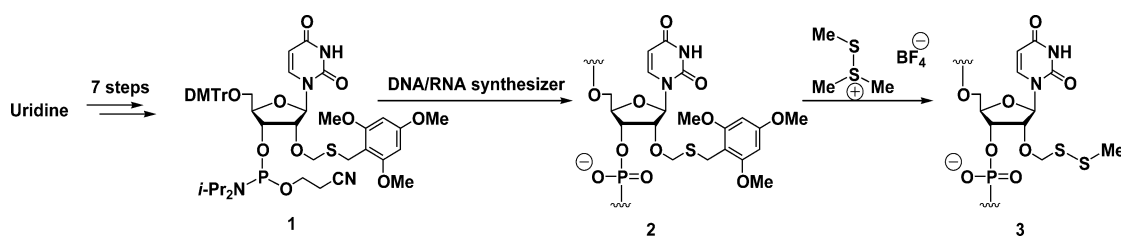
際に 21 mer 抗ルシフェラーゼ siRNA 配列中に、2'-O-TMBTM-ウリジンを組み込み、DMTSF を作用させることで 2'-O-MDTM-RNA へ変換することにも成功した。

合成したプロドラッグ型 siRNA、2'-O-MDTM-siRNA の遺伝子発現抑制効果を評価するため、ルシフェラーゼを安定発現している A549 (A549-Luc) 細胞に Lipofectamine 2000 を用いて siRNA をトランスフェクションし、24 時間培養後のルシフェラーゼ発現量を測定した。その結果、A549-Luc のルシフェラーゼ発現量は天然型 siRNA だけでなく 2'-O-MDTM-siRNA によっても効果的に抑制され、2'-O-MDTM-siRNA は天然型 siRNA と同等か、それ以上の遺伝子発現抑制効果を示した。さらに、siRNA のアンチセンス鎖の seed region に 2'-O-MDTM 基を導入した場合でも siRNA 活性を低下させることなく遺伝子発現抑制効果を示した。

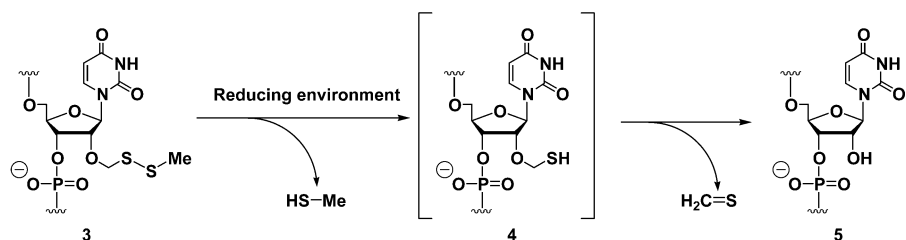
以上の結果から、2'-O-MDTM siRNA は設計のコンセプトどおり細胞内で天然型 siRNA に変換され遺伝子発現抑制効果を示していることが示唆され、2'-O-MDTM 修飾は修飾位置に制約されない汎用性の高い新規の化学修飾であることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

低分子干渉 RNA (siRNA) は、 mRNA を認識するアンチセンス鎖とその相補鎖のセンス鎖からなる短鎖の合成二本鎖 RNA である。 siRNA を細胞内に導入すると、アンチセンス鎖が内因性蛋白質と複合体 (RISC) を形成し、これが標的となる mRNA を切断することから、 siRNA は遺伝子発現を抑制するツールとして用いられており、現在、臨床応用に向けた治験も進行している。実際に siRNA を臨床応用する場合、生体内での高い安定性が求められるが、 RNA は生体内のヌクレアーゼによって極めて速やかに分解される欠点がある。このため、様々な化学修飾 RNA の設計・合成が行われてきたが、化学修飾した RNA はヌクレアーゼ耐性を示す一方、遺伝子発現抑制効果が大きく低下することが知られている。そこで、学位論文申請者は、細胞外においてはヌクレアーゼ耐性を示し、細胞内へ移行後、天然型 RNA に構造変化し得るプロドラッグ型 RNA を着想し、細胞内の還元的環境下でジスルフィド結合の開裂が期待できる 2'-O-メチルジチオメチル-RNA (**3**) の合成を計画した。本研究ではジスルフィド結合を持たない安定なアミダイト体 **1** を合成し、オリゴヌクレオチド合成後にアルキルジチオメチル基に変換する“オリゴヌクレオチド合成後修飾法”による 2'-O-メチルジチオメチル (MDTM) RNA **3** の合成法について検討を行った。



最初に、2' 位水酸基に 2,4,6-トリメトキシベンジルチオメチル (TMBTM) 基を有するウリジンアミダイト体 **1** を設計し、種々検討の結果、アミダイト **1** の合成に成功した。次いで、**1** を用いてオリゴヌクレオチド **2** に組み込み、独自のオリゴヌクレオチド合成後修飾法によって MDTM 化したところ、純度、効率とも良好に 2'-O-MDTM-ODN **3** へ変換することに成功した。



3 は細胞内環境を模倣したグルタチオン還元条件下 2'-OH 体 5 へ速やかに変換され、さらに 3 は、ヘビ毒ホスホジエステラーゼやウシ胎児血清の存在下で、天然型 ODN と比較して半減期が 2 倍以上の優れたヌクレアーゼ耐性を示すことが明らかとなった。

合成したプロドラッグ型 siRNA、2'-O-MDTM-siRNA の遺伝子発現抑制効果を評価するため、ルシフェラーゼを安定発現している A549 (A549-Luc) 細胞に Lipofectamine 2000 を用いて siRNA をトランスフェクションし、ルシフェラーゼ発現量を測定したところ、A549-Luc のルシフェラーゼ発現量は天然型 siRNA だけでなく 2'-O-MDTM-siRNA によっても効果的に抑制され、2'-O-MDTM-siRNA は天然型 siRNA と同等か、それ以上の遺伝子発現抑制効果を示した。さらに、siRNA のアンチセンス鎖の seed region に 2'-O-MDTM 基を導入した場合でも siRNA 活性を低下させることなく遺伝子発現抑制効果を示した。

以上の結果から、2'-O-MDTM siRNA は設計のコンセプトどおり細胞内で天然型 siRNA に変換され遺伝子発現抑制効果を示していることが示唆され、2'-O-MDTM 修飾は修飾位置に制約されない汎用性の高い新規の化学修飾であることが明らかになった。

これらの結果は、*Chem. Commun.* (2013) と *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (2016) という一流誌に掲載され、今後の RNA の化学と創薬研究においてさらなる発展が期待できるものである。

上記の論文は、博士(薬科学)論文として適当と判断する。