

# 核酸医薬の分子デザイン； 化学修飾、コンジュゲート、複合体

Design of Nucleic Acid Therapeutics; Chemical Modification, Conjugation and Complexation

藤井 政幸 Masayuki Fujii\*<sup>1</sup>

## [SUMMARY]

核酸医薬を実現するためには、生物学的な分子基盤に立脚した合理的な分子デザインにより、生体内で化学的にも生物化学的にも十分に安定で、免疫誘導を起こさず、非特異的な結合や毒性もなく、狙った特定の細胞だけにデリバリーされて、細胞内に効率よく侵入し、細胞核、ミトコンドリア、細胞質など細胞内の所定の箇所にも動輸送されて、細胞内の標的分子と親和性良く特異的に結合して、副作用なく目指した作用だけを發揮する核酸分子を構築することが必要である。化学修飾、コンジュゲート、複合体、それぞれに積み上げられた成果のエッセンスを組み合わせることにより、これらの難題が克服されると信じる。

In order to achieve therapeutic applications of synthetic oligonucleotides, nucleic acid therapeutics should be stable enough chemically and biologically, inside and outside the cells, not induce immune-response, not cause non-specific binding to intracellular proteins, not be toxic, be delivered to the targeted tissue and cells, be taken up into cells effectively, be transferred and localized in the specific intracellular organs such as cellular nucleus, mitochondrion, and cytoplasm, bind to the target molecule with enough affinity and specificity, and not cause undesirable effect (off-target effect).

These complicated and difficult problems can be solved by combining all the achievements so far accomplished by chemical modification, conjugation and complexation.

Keyword ○ nucleic acid therapeutics, chemical modification, conjugation, complexation

## 1. はじめに

核酸医薬の実用化には、生体内で化学的にも生物化学的にも十分に安定で、免疫誘導を起こさず、非特異的な結合や毒性もなく、狙った特定の細胞だけにデリバリーされて、細胞内に効率よく侵入し、細胞内の所定の箇所にも動輸送されて、細胞内の標的分子と親和性良く特異的に結合して、副作用なく目指した作用だけを發揮する、そんな核酸医薬分子の設計が必要となる<sup>1)</sup>。Figure 1に示すように、例えば、細胞質に存在する mRNA や miRNA を標的とするアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) や siRNA は細胞質内に、細胞核内に存在する lncRNA や miRNA を標的とする ASO や siRNA、エキソスキッピングを狙って pre-mRNA を標的とする ASO は細胞核内に局在化することで効果が向上すると予測される。

われわれの研究グループは、核酸と任意のアミノ酸配列を有するペプチドとのコンジュゲートの簡便合成を可

能にする固相フラグメント縮合法を開発した<sup>2)</sup>。そして、合成したアンチセンス核酸-シグナルペプチドコンジュゲートは、細胞毒性の強いリポフェクション試薬などの遺伝子導入試薬を用いることなく単独で細胞内に侵入し、かつ、細胞核内および細胞質への細胞内局在化制御可能であることと、標的遺伝子発現抑制効果が顕著に増強されることを示した<sup>3)</sup>。また、siRNA の細胞内導入に有効なペプチド RL7 を見いだした<sup>4)</sup>。さらに、siRNA による RNA 干渉機構の中核をなすヒトアルゴノート 2 タンパク質 (hAgo2) には siRNA の 2 本鎖のうち的一方がガイド鎖として残り、ガイド鎖の配列に相補的な配列を持つ mRNA に結合、切断する。siRNA を医薬として応用するとき、ターゲットの mRNA に相補的なアンチセンス鎖がガイド鎖として残った時に、狙った遺伝子サイレンシングが期待できるが、センス鎖がガイド鎖として残った場合には標的外の遺伝子に作用する可能性があり、オフターゲット効果として siRNA 医薬の課題の 1 つとなっている。2012 年に報告された hAgo2 の X 線結晶構造解析の結果によれば、hAgo2 に取り込まれたガイドの 5'-末端水酸基はリン酸化され、hAgo2 の MID ドメインのカチオンポケットの中で安定化されていること

\*1 近畿大学産業理工学部 教授  
Faculty of Humanity-Oriented Science & Technology, Kindai University, Professor

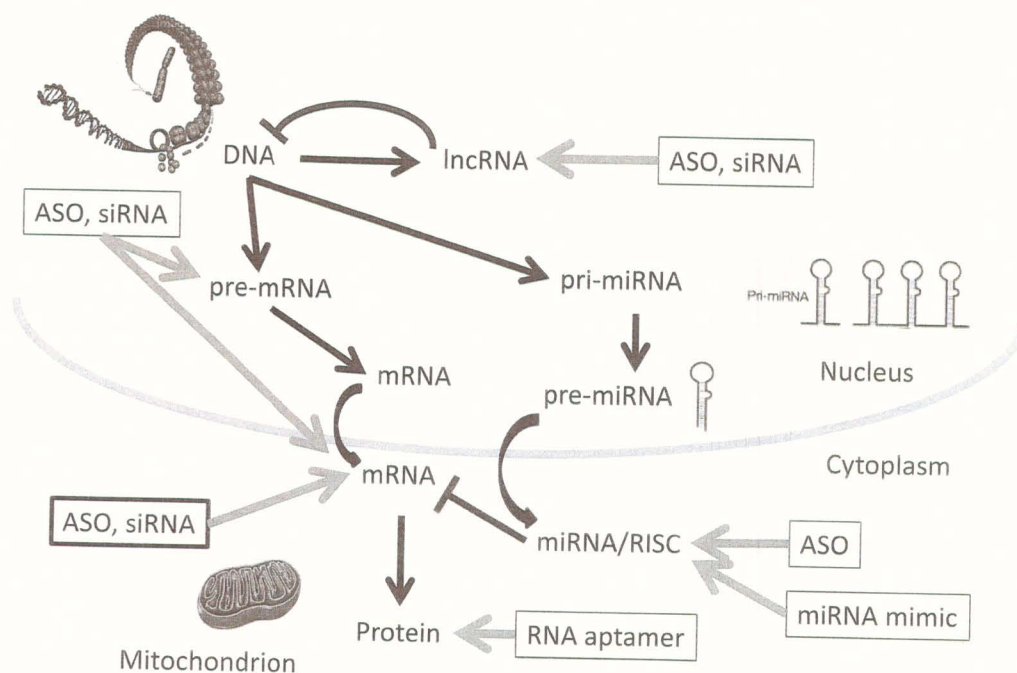


Figure 1 Nucleic Acid Therapeutics and Their Targets.

がわかっている<sup>5)</sup>。われわれのグループでは、siRNAの5'-末端の化学修飾核酸によりオフターゲット効果を回避できるsiRNAの分子デザインに成功した<sup>6)</sup>。本稿ではこれらの成果を要約して示す。

## 2. 核酸-ペプチドコンジュゲート

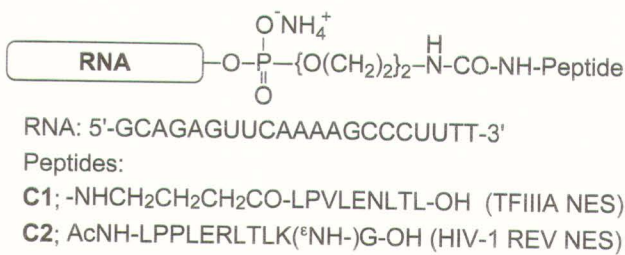
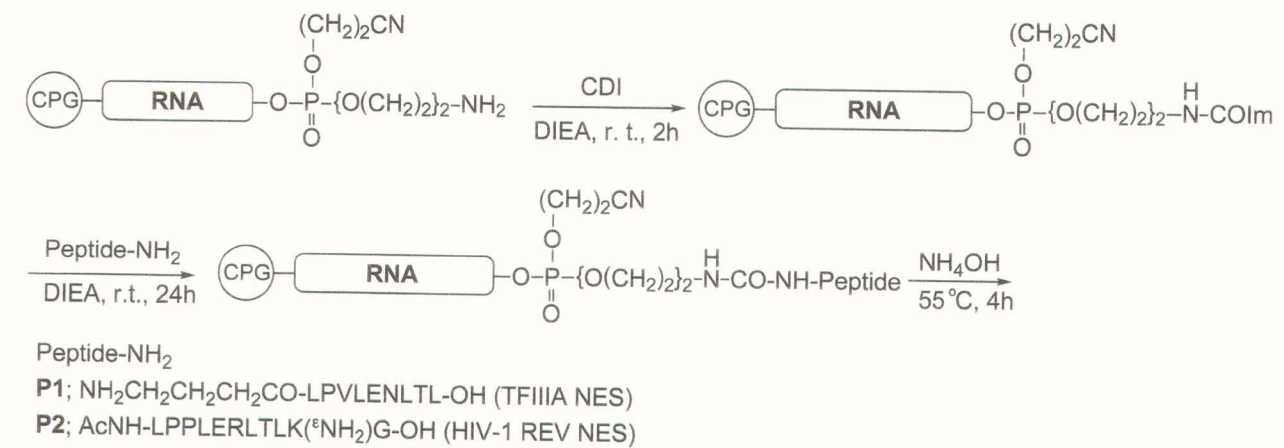
DNA、RNAにさまざまな機能性分子をコンジュゲートすることにより、細胞導入効率の向上や標的細胞特異的デリバリーおよび薬理活性の向上を目指した試みは1990年代から多くの関心を集め、活発に研究されてきた<sup>7)</sup>。細胞導入効率向上の観点からは、コレステロール、 $\alpha$ -トコフェロール、葉酸、GalNAc、RGDペプチドなどの細胞表面受容体に対するリガンド、PEG、ポリアミン、細胞膜透過性ペプチド (Cell Penetrating Peptide, CPP)、長鎖脂肪酸などの両親媒性分子や疎水性分子、さらには、標的細胞特異的なデリバリーを狙ったRNAアプタマーや抗体とのコンジュゲートが報告されている<sup>1)</sup>。

われわれのグループは、 $\alpha, \omega$ -ジイソシアナトアルカン (DIA) またはカルボニルジイミダゾール (CDI) を用いて、固相上で2つのフラグメントをつなぐ効率的な方法を開発した (Scheme 1)<sup>2)</sup>。

この固相フラグメント縮合法 (SPFC) により、アンチセンスDNAと核局在化シグナル (NLS) ペプチドとのコンジュゲートを合成した。このDNA-NLSコンジュ

ゲートはNLSのカチオン性のために自発的に細胞内に効率よく取り込まれ、細胞内では細胞核に局在化することを見いだした (Figure 2b-d)<sup>3)</sup>。そして、細胞核内に存在するヒトテロメラーゼに含まれるテンプレートRNAを標的としたanti-hTR sDNA-NLSコンジュゲートはヒト急性リンパ性白血病細胞中でヒトテロメラーゼを95%以上抑制することを証明した。また、アンチセンスDNAと核外輸送シグナル (NES) ペプチドとのコンジュゲートは、NESの疎水性のためと考えられるが、やはり遺伝子導入剤を用いることなく細胞内に取り込まれ、細胞内では細胞質 (核外) に局在化することを見いだした (Figure 2e-g)。細胞質に存在するbcr/abl遺伝子のmRNAを標的とするanti-bcr/ablDNA-NESコンジュゲートは、ヒト慢性骨髄性白血病細胞K562中に発現するbcr/abl遺伝子を85%以上抑制することを証明した。このように、標的の所在に合わせてNLSとNESを使いわけて、アンチセンスDNAの細胞内局在を制御することにより、そのサイレンシング効果が著しく向上した。

これらの結果を踏まえてsiRNA-NESコンジュゲートを合成し、その遺伝子サイレンシング効果を評価した。NESペプチドはエクスポーチンにより認識され、核膜孔複合体を通してタンパク質の細胞核内から細胞質への輸送を誘導する。生物種を超えて共通の配列上の特徴は疎水性アミノ酸、ロイシン (L) がLXXXLXXLXのよう



Scheme 1 Synthesis of RNA-NES Conjugates by SPFC.

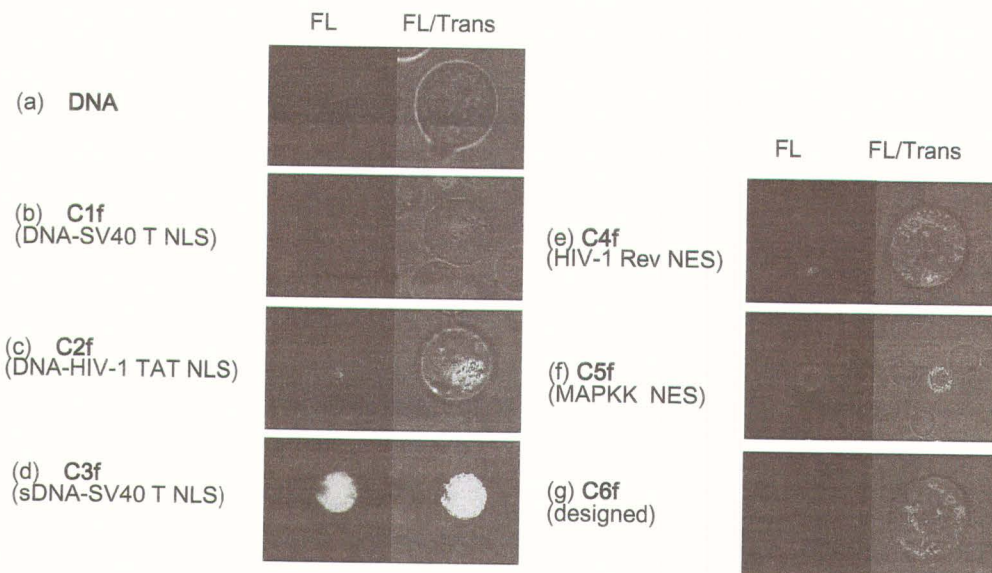


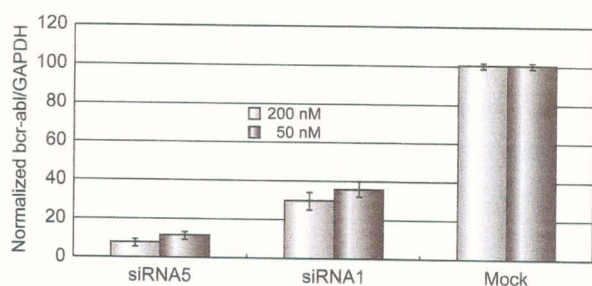
Figure 2 Nuclear (b-d) and Cytoplasmic (e-g) Localization of DNA-Signal Peptide Conjugates.

に一定の間隔で含まれていることである。

*Xenopus laevis* 由来 TFIIIA および HIV-1 由来 REV タンパク質の核外輸送シグナル (NES) ペプチドをそれぞれコンジュゲートした2種類の RNA-NES コンジュゲート **C1** および **C2** を合成し (Scheme 1)、慢性骨髄性白血病細胞 K562 に発現する bcr/abl キメラ遺伝子の b3a2 転写産物のジャンクション部位 (361-381) を標的

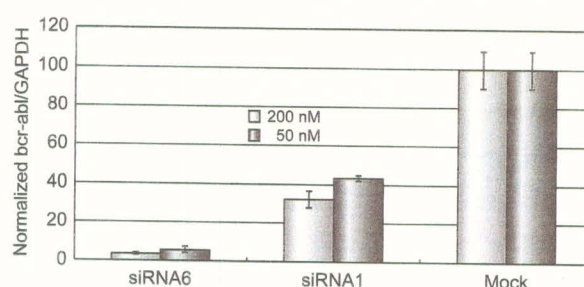
としたコンジュゲート **C1** とその相補鎖からなる siRNA 5 およびコンジュゲート **C2** とその相補鎖からなる siRNA 6 サイレンシング効果をリアルタイム PCR 法により評価した。

siRNA 5 および siRNA 6 の評価の結果をそれぞれ Figure 3 および Figure 4 に示す。Figure 3 に示すとおり、天然型 siRNA (siRNA 1) を用いた場合には bcr/



**Figure 3** Silencing of bcr-abl mRNA by siRNA5 (TFIIIA NES) in K562.

siRNA mediated reduction of bcr-abl mRNA expression in K562 cells. Normalized bcr-abl/GAPDH mRNA levels were measured in 24 h after transfection by Lipofectamine 2000™.



**Figure 4** Silencing of bcr-abl mRNA by siRNA6 (HIV-1 REV NES) in K562.

siRNA mediated reduction of bcr-abl mRNA expression in K562 cells. Normalized bcr-abl/GAPDH mRNA levels were measured in 24 h after transfection by Lipofectamine 2000™.

abl 遺伝子の発現は200 nMにおいては69.8%、50 nMにおいては63.7%にそれぞれ抑制された。一方、siRNA-NES コンジュゲート **siRNA 5** および **siRNA 6** を用いた場合には著しいサイレンシング効果の向上が見られ、siRNA-TFIIIA NES コンジュゲート **siRNA 5** では200 nMにおいて8.3%、50 nMにおいて11.6%にまで抑制され、siRNA-HIV-1REV NES コンジュゲート **siRNA 6** では200 nMにおいて4.0%、50 nMにおいて6.3%までそれぞれ抑制された。以前、われわれのグループはDNA-HIV-1 REV NES ペプチドコンジュゲートがヒト急性リンパ性白血病細胞 Jurkat の細胞質に局在化することを証明しており<sup>3)</sup>、siRNA-NES コンジュゲートによりサイレンシング効果が著しく向上したのはsiRNA-NES コンジュゲートが細胞質に局在化し、RNA 干渉機構により標的とする mRNA をより効率的に分解したためと推測できる。

残念ながら、siRNA-NES コンジュゲートは単独では細胞膜を透過できず、何らかの導入試薬を必要とした。この課題は次に述べる両親媒性のデザインペプチドとの複合体を利用することにより解決することができた。

### 3. 複合体

Kraut らの計算結果によれば、核酸塩基対の間隔は逆平行βシート構造のアミノ酸2残基分にほぼ等しく、核酸塩基またはリン酸骨格とアミノ酸残基が連続して広い領域にわたってコンタクトできる構造であることが示されている<sup>8)</sup>。われわれはアルギニン (R) とロイシン (L) の繰り返し配列を持つペプチドが2重鎖DNAおよびRNAと静電相互作用により複合体を形成するとき、ペプチドは逆平行βシート構造を取り、アルギニン側鎖は

RNA のリン酸と静電相互作用により引き合い、ロイシン側鎖は外側の面に並ぶため、複合体は疎水性表面を形成することを見いだした<sup>4)</sup>。

その複合体を Jurkat 細胞および HeLa 細胞の培養液に添加したところ、その複合体は細胞膜透過性を有し、siRNA に対して20当量を用いると、市販導入試薬と同等のトランスフェクション効率を有することがわかった。**Figure 5** は HeLa 細胞に対して4時間後の導入を共焦点レーザー顕微鏡で観察したものである。HeLa 細胞へも効率よくトランスフェクションされ、15当量から20当量のペプチドを使用することにより、導入効率が向上していることがわかった。

また、siRNA のみの場合や RNAiFect 存在下でも siRNA は数時間以内に分解されてしまったが、この複合体は10% FBS 中での酵素分解から siRNA を保護し、半減期を48時間以上に伸ばすことも確認された。

さらに、RL7-siRNA 複合体は細胞毒性がほとんどなく、市販導入試薬の RNAiFect や TransIT に比べてかなりの高濃度でも毒性を示さないことが証明された。

RL7-siRNA 複合体を用いて hTERT 遺伝子のサイレンシング効果を評価した結果を **Figure 6** に示す。200 nM の siRNA 濃度を RNAiFect により導入した場合には62.1%のサイレンシングであったが、RL7を20当量用いて導入した場合には92.6%のサイレンシング効果を示した。

そこで、単独では細胞に導入できなかった siRNA-NES コンジュゲートをこの RL7 と組み合わせて、細胞導入を行うことを試みた。その結果、リポフェクション試薬を使うことなく siRNA-NES コンジュゲートを細胞導入することに成功し、高い遺伝子サイレンシング効率を観測することができた。**Figure 7** に示す通り、siRNA-

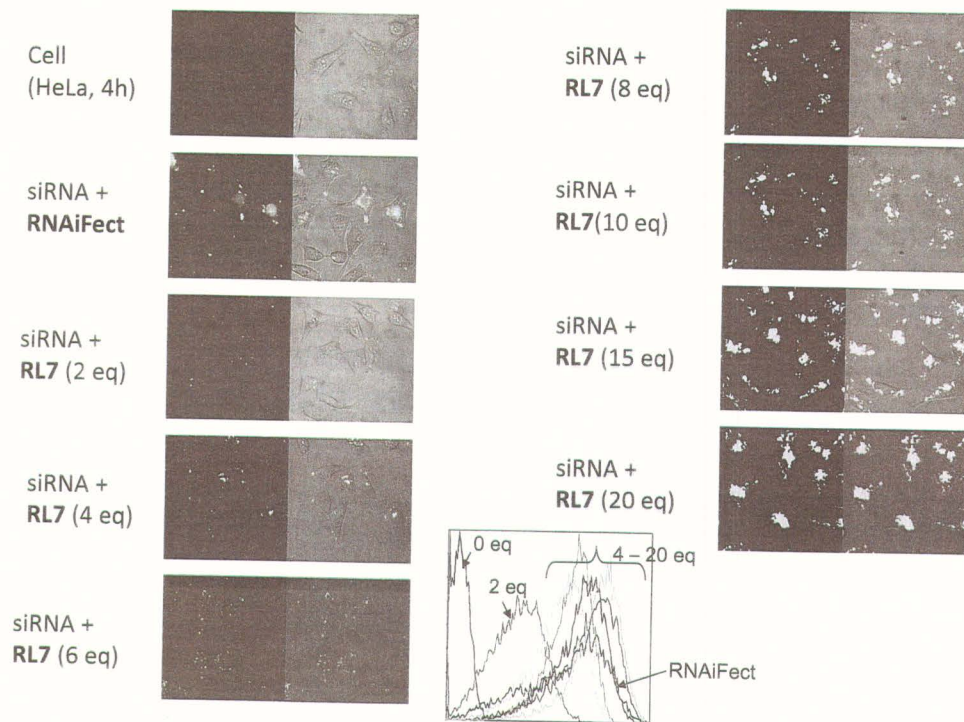


Figure 5 Cellular Uptake of siRNA-RL7 Complex (HeLa Cells).

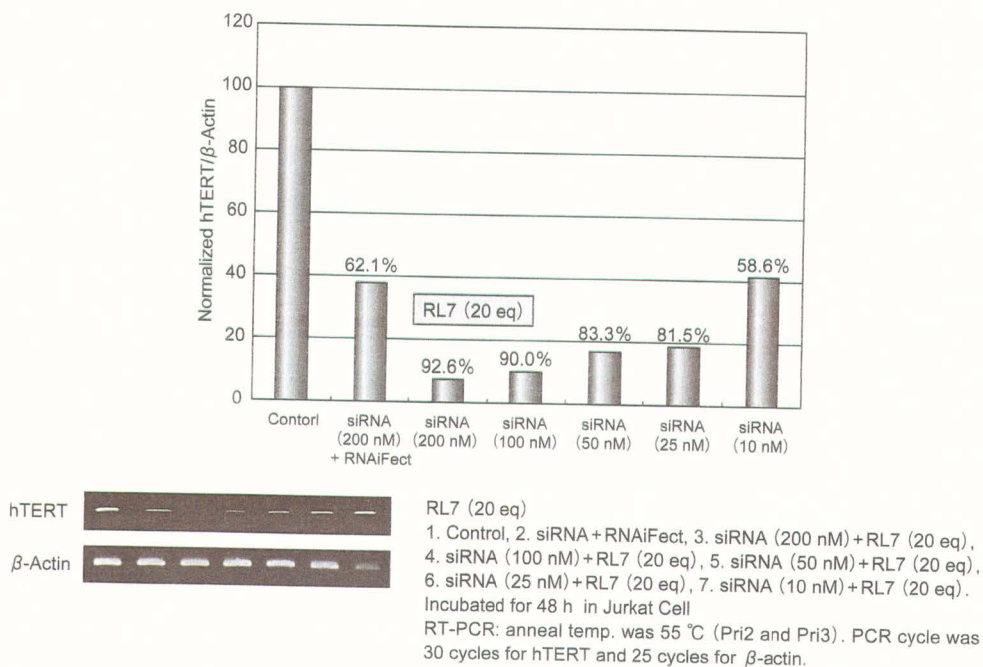


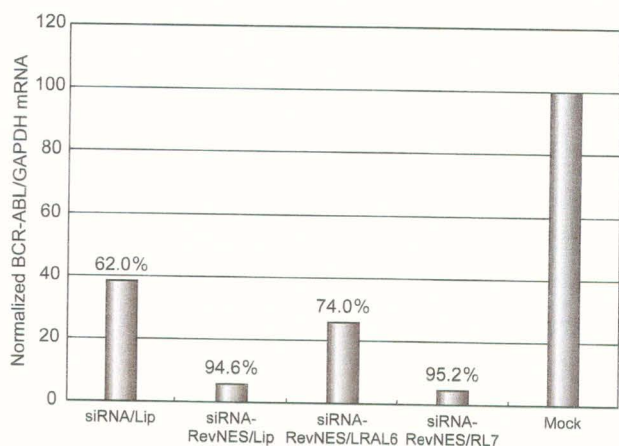
Figure 6 Silencing of hTERT by siRNA/RL7 Complex in Jurkat.

NESとRL7との複合体を用いると bcr/abl 遺伝子を 100 nM で 95.2%サイレンシングできた。同濃度で市販導入試薬 Lipofectamine 2000™を用いた場合には 94.6%であったので、ほぼ同等の効果が得られたといえる。ここに、siRNA コンジュゲートとペプチド複合体の融合に

より、より高機能な遺伝子サイレンシングが達成された。

#### 4. 化学修飾

hAgo2は、4つのドメイン、Nドメイン、PAZドメ



**Figure 7** Silencing of bcr-abl by siRNA-NES/RL7 Complex in K562.

siRNA mediated reduction of bcr-abl mRNA expression in K562 cells. Normalized bcr-abl/GAPDH mRNA levels were measured 24 h after transfection. [siRNA]=100 nM

イン、MIDドメイン、PIWIドメインと、2つのリンカー、L1リンカー、L2リンカーから構成される、分子量が約100 kDaのタンパク質であるが、siRNAのリン酸化されたガイド鎖5'-末端がhAgo2のMIDドメインとPIWIドメインとの境界部分にあるカチオン性アミノ酸に富む5'末端結合ポケットに取り込まれて安定化されていることが明らかとなっている<sup>8)</sup>。

われわれのグループでは、センス鎖、アンチセンス鎖の5'-末端にアミノ基を導入したsiRNAを合成し、そのサイレンシング効果への影響を評価した。

sense strand

RNA 1; 5'-UACGGCAAGCUGACCCUGAag-3'

RNA 3; 5'-TACGGCAAGCUGACCCUGAag-3'

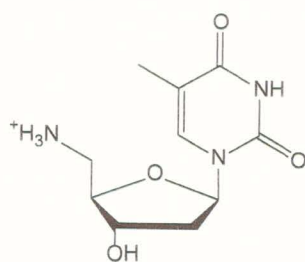
RNA 5; 5'-T\*ACGGCAAGCUGACCCUGAag-3'

antisense strand

RNA 2; 5'-UCAGGGUCAGCUUGCCGUAgg-3'

RNA 4; 5'-TCAGGGUCAGCUUGCCGUAgg-3'

RNA 6; 5'-T\*CAGGGUCAGCUUGCCGUAgg-3'



T\*の構造式

HeLa細胞のゲノムに組み入れたEGFP遺伝子を標的として、[siRNA]=20 nMを用いてサイレンシング効果を比較した。その結果をFigure 8に示す。siRNA3/2 (T/U)、siRNA5/2 (T\*/U)はsiRNA1/2 (U/U)よりも、また、siRNA3/4 (T/T)、siRNA5/4 (T\*/T)はsiRNA1/4 (U/T)よりもサイレンシング効果が低下した。この結果は、センス鎖5'-Tによりセンス鎖5'-末端側の塩基対が熱力学的に不安定化し、センス鎖が選択される確率が向上したためと考えられる。同様に、センス鎖5'-T\*もTと同程度にセンス鎖5'-末端側の塩基対が熱力学的に不安定化し、センス鎖が選択される確率が向上したためと考えられる。すなわち、センス鎖5'-T\*はRISC形成を妨げず、センス鎖5'-T\*によりアンチセンス鎖が選択される確率が向上したわけではないという結果であった。

次に、siRNA1/4 (U/T)はsiRNA1/2 (U/U)よりも、siRNA3/4 (T/T)はsiRNA3/2 (T/U)よりも、そして、siRNA5/4 (T\*/T)はsiRNA5/2 (T\*/U)よりもサイレンシング効果が向上した。これはアンチセンス鎖5'-Tによりアンチセンス鎖5'-末端側の塩基対が熱力学的に不安定化し、アンチセンス鎖が選択される確率が向上したためと考えられる。

さらに、siRNA5/2 (T\*/U)はsiRNA3/2 (T/U)と、siRNA5/4 (T\*/T)はsiRNA3/4 (T/T)とそれぞれほぼ同等のサイレンシング効果を示した。このことにより、センス鎖5'-T\*はRISCローディングコンプレックス (RLC)の形成およびAgo2への積み込みを阻害しないといえる。

最後に、siRNA1/6 (U/T\*)、siRNA3/6 (T/T\*)、siRNA5/6 (T\*/T\*)はまったくサイレンシング効果を示さなかった。アンチセンス鎖5'-T\*は、1本鎖化後にRISCを不安定化し、サイレンシング効果を消失させたためと考えられる。

以上の結果のとおり、siRNAの化学修飾によりAgo2によるアンチセンス鎖選択の効率を改善することが可能となり、シグナルペプチドとのコンジュゲートにより細胞内局在化の制御が可能となり、両親媒性ペプチドとの複合体により細胞膜透過性の改善および細胞内での安定性の向上が可能となった。今後、さらに多様な化学修飾、コンジュゲート、複合体の組み合わせにより、細胞内の標的分子と親和性良く特異的に結合して、副作用なく目指した作用だけを発揮するような核酸医薬分子の設計に近づくことができると期待される。

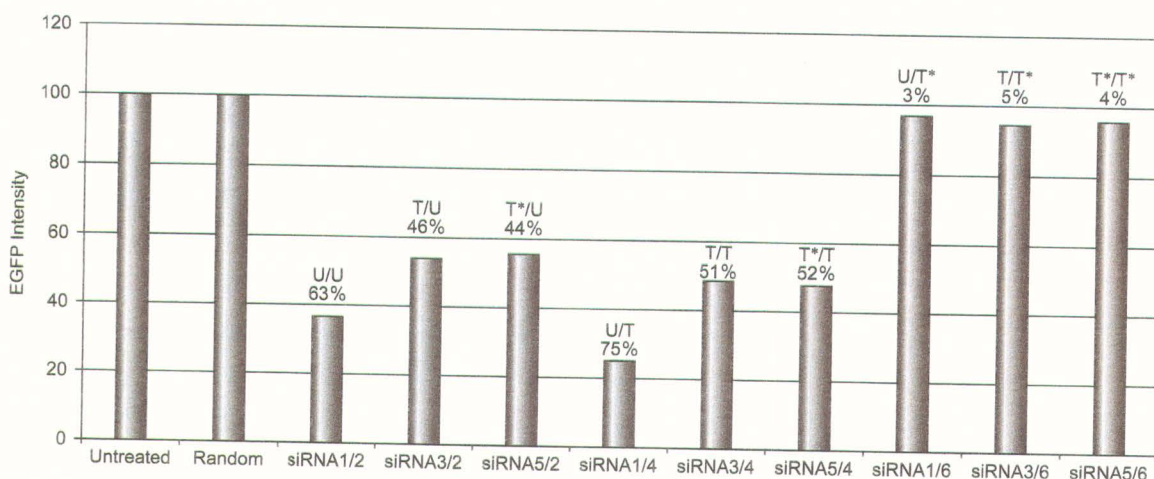


Figure 8 Silencing of EGFP mRNA by 5'-Cationic siRNA.  
EGFP-HeLa  $3 \times 10^5$  cells/ml, [siRNA] = 200 nM transfected by HiPerFect, 10% FBS, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C, 24 h.

## 5. 今後の展望

siRNA分子の化学デザインは、分子生物学的研究によって明らかにされてきたRNA干渉に関与するタンパク質の構造および作用機序と二人三脚で合理性と精密さを増してきており、生物学的分子基盤に立脚した合理的な分子デザインが核酸医薬実用化への重要な戦略である。

### 謝辞

この研究の一部は日本学術振興機構科学研究費補助金基盤研究(C)により補助されています。

### Reference

1. Van Ommen, G.-J.B. and Aartsma-Rus, A. (2013) *New Biotechnology* 30, 299-301. Gavrilov, K., and Saltzman, W.M. (2012) *YALE j. Biol. And Med.*, 85, 187-200. Burnett JC, Rossi JJ. (2012) *Chem Biol.* 19(1) 60-71.
2. Kubo, T., Morikawa, M., Ohba, H., Fujii, M. (2003) *Org. Lett.*, 5, 2623-2626. Muroa, S. and Fujii, M. (2009) *Current Organic Chemistry*, 13, 1366-1377.
3. Kubo, T., Zhelev, Z., Rumiana, B., Ohba, H., Doi, K. and Fujii, M. (2005) *Org. Biomol. Chem.*, 3, 3257-3259.
4. Fujii, M., Fujiaki, S. and Obata, J. (2012) *Peptide Science*,

2012, 233-234.

5. Schirle, NT. and MacRae, IJ. (2012) 336 (6084) 1037-1040. Elkayam, E., Kuhn, CD., Tocilj, A., Haase, AD., Greene, EM., Hannon, GJ., Joshua-Tor, L. (2012) *Cell*, 150(1), 100-110.
6. Takashina, A., Kayano, H., Emi, T., Murakami, K., Ogawa, N., Ariyoshi, J., Yamayoshi, A. and Fujii, M. (2014) *Proceedings of the XXI Round Table on Chemical Biology of Nucleic Acids*, 2014, 143.
7. Venkatesan, N. Kim, B.H. (2006) *Chem., Rev.*, 106, 3712-3761. Ede, NJ, Tregear, GW, Haralambidis, J. (1994) *Bioconjug Chem.* 5(4) 373-8.
8. Charles, W. Carter, JR. and Kraut, J. (1974) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 71(2) 283-287. Church, GM., Sussman JL. And Kim, SH., (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74(4) 1458-1462.

### AUTHOR



藤井 政幸 (ふじい まさゆき)

学位：理学博士  
所属：近畿大学産業理工学部生物環境化学科 教授  
専門分野：生物有機化学、核酸 (DNA、RNA) 化学  
e-メール：mfujii@fuk.kindai.ac.jp

学歴：  
1983年 3月 京都大学理学部卒業  
1987年 3月 京都大学大学院博士後期課程退学

職歴：  
1987年 4月 近畿大学環境科学研究所助手  
1987年10月 近畿大学九州工学部 (現産業理工学部) 助手  
同講師、同助教授を経て

2002年 4月より現職  
1990年 2月 京都大学理学博士  
1992-1993年 カリフォルニア工科大学客員研究員

