

次世代型核酸医薬の創製: マイクロRNAの化学修飾と創薬への展開

Creation of new-type nucleic acid medicine:
Chemical modification of microRNA and development to drug discovery

愛知工業大学 工学部応用化学学科 教授／株式会社 e-NA Biotec 代表取締役 **北出 幸夫**

Yukio Kitade (Professor / Representative Director)
Aichi Institute of Technology / e-NA Biotec Inc.



キーワード

マイクロRNA医薬、次世代抗がん薬、補充療法、RNA干渉、ノックダウン効果

RNAウイルスなど一部を除き、地球上のほぼ全ての生物はDNAに遺伝情報を保存している。この遺伝情報は、RNAを介してタンパク質へ伝達され、タンパク質が生命維持の中心的な役割を果たすと考えられる。この考えは、1958年にF. Crick によってセントラルドグマ(図1)と提唱された¹⁾。

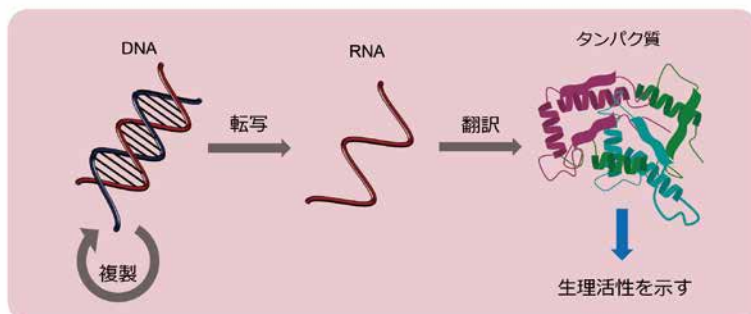


図1 セントラルドグマ

1990年には、ヒトの遺伝情報を全て読解しようとする、ヒト・ゲノムプロジェクトが開始された。このプロジェクトは2003年に終了したが、ヒトの遺伝子数は予想に反して少なく約22,000であった。これは、ヒトゲノムの僅か2%であり、残りの98%は不要なnon-coding領域と考えられた。しかし、近年のRNA研究により、non-coding領域の大部分の

DNAは、実際にはRNAに転写され、生成したnon-coding RNA (ncRNA) が多様な機能を示すことが分かってきた²⁾。その後、ncRNA研究は飛躍的に進み、次々と新しい生命現象が解明されてきた。ncRNAには、タンパク質の翻訳工場であるリボソームを構成するリボソームRNA (rRNA)、タンパク質の翻訳に必要なアミノ酸をリボソームに運搬するための転移RNA (tRNA)、核内低分子RNA (発生や分化に関与するmicroRNA (miRNA)) などが含まれる。

二本鎖RNAに由来するRNA干渉 (RNA interference; RNAi) は、1998年にA. FireとC. Melloらによって発見され、彼らは2006年にノーベル生理学・医学賞を受賞している。RNA干渉は、生体内遺伝子の発現抑制機構として重要な働きをし、mRNAの遺伝子発現を抑制する(図2.)^{3), 4)}。siRNAをはじめとする短鎖二本鎖RNAは、RNA干渉 (RNAi) によって配列特異的に標的のmRNAに作用し、遺伝子の発現を抑制することから、がんなどの難治性疾患の治療薬としての応用が期待される。RNA干渉を利用した核酸医薬は、疾患に関わるタンパク質を標的とする抗体医薬とは異なり、mRNAを標的とする。そのため、疾患遺伝子の配列さえ分かれば、容易に遺伝子制御分子を設計す

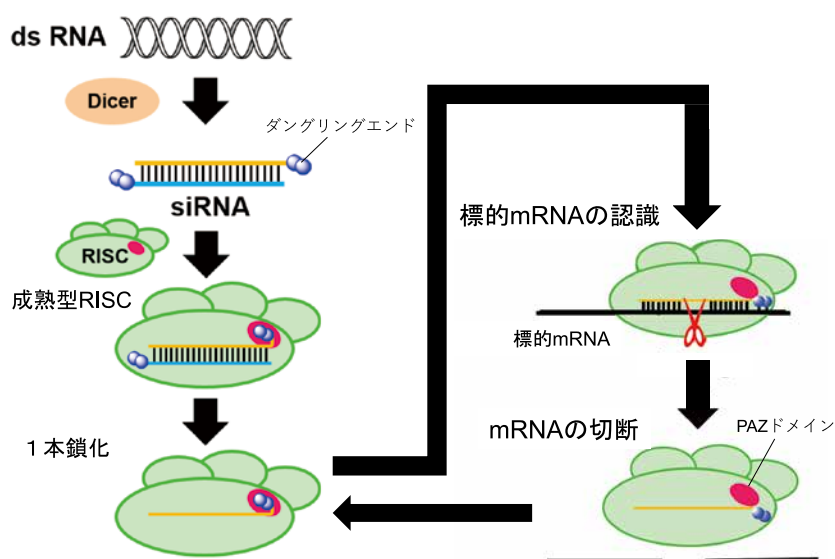


図2 RNA干渉機構とPAZドメインはダングリングエンド部分を放出

ることができると考えられ、抗体医薬の次に来る新たな革新的医薬として注目されている。細胞に取り込まれた長鎖二本鎖RNA(dsRNA)はDicer1によって切断されてsiRNAとなる。siRNAはRNA誘導型サイレンシング複合体(RISC)を構成するArgonaute2(Ago2)タンパクに取り込まれ、一本鎖化し、成熟化RISCを形成する。その後、成熟化RISCは標的mRNAと二本鎖を形成し、標的mRNAを切断することで遺伝子発現を抑制する。

RISCの主要構成タンパク質であるAgo2タンパクは4つのドメインから構成され、5'-末端はMIDドメインとPIWIドメインの境界で認識、固定化されている(図3)。3'-末端に位置するダングリングエンド部はPAZドメインで固定化されている。固定されたアンチセンス鎖が標的mRNA(Target mRNA)を認識した後、PAZドメインはダングリングエンド部分を放出することで、アンチセンス鎖は標的mRNAと完全相補的に結合し、mRNA鎖の切断が起こる(図2)。切断されたmRNA鎖が排出された後、ダングリングエンド部は再びPAZドメインの疎水性アミノ酸から形成されているポケットに固定化され(図2)、新たなmRNAを取り込むことで、mRNAが切断され遺伝子発現抑制が繰り返し起こる⁵⁾。この様にRNA干渉機構の中で、siRNAのダングリングエンド部が遺伝子発現に重大な関与をすることが示唆されたため、著者らの研究室ではダングリングエンド部に着目したRNA分子の新規化学修飾法の開発研究を行ってきた。

Dicerは、二本鎖RNAを約21-23塩基のsiRNAに分解するRNaseⅢファミリーのエンドヌクレアーゼである。ヒトや線虫では1種類であるが、ショウジョウバエには2種類存在し、それぞれDicer1、Dicer2と呼ばれている。ショウジョウ

バエにおいて、siRNA二本鎖の切断にはDicer2が関与しており、Dicer1は関与しないことが分かっている。Dicer1はもう一つのRNA干渉経路であるmiRNA機構において、Pri-miRNAからDrosha(Dicerと同様RNaseⅢ活性を有する)によって変換され、ステムとヘアピンループ構造を有するPre-miRNAを成熟型miRNAへと変換することが示されている(図4)。

ヒトにはAgo1-Ago4までの4種のArgonauteタンパクが存在する。その中でAgo2のみが切断活性を有しており、Ago2以外はその活性中心のアミノ酸が保存されておらず、切断活性を消失している。ArgonauteタンパクのRNA切断は、siRNAアンチセンス鎖の10塩基目と11塩基目の間で正確に標的mRNAを切断する。X線結晶構造解析によりPIWIドメイン近傍にあるリン酸結合ポケットにガイド鎖の5'-末端のリン酸基が固定されており、そこからPIWIドメインの切断活性中心までの距離によって、切断位置が決定されていると考えられている(図3. A)。

22塩基程度の機能性短鎖RNAであるmiRNAをコードする遺伝子は様々な生物種のゲノム中に多数存在し、発現は時期や組織特異的に制御されている。miRNAがヒトを含む多くの生物種に存在することが明らかにされたことでmiRNA研究が急速に進展してきた。そしてmiRNAは、線虫の他にショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、マウス、植物など様々な生物種における遺伝子の発現制御に重要であることが明らかとなった。特定の標的mRNAの翻訳を3'-非翻訳領域(3'-UTR)にmiRNAが結合することで抑制する遺伝子発現調節因子として認識されている(図3. Bと 図4)。miRNAの標的mRNAの認識に関して、ガイド鎖3'-末端側のミス

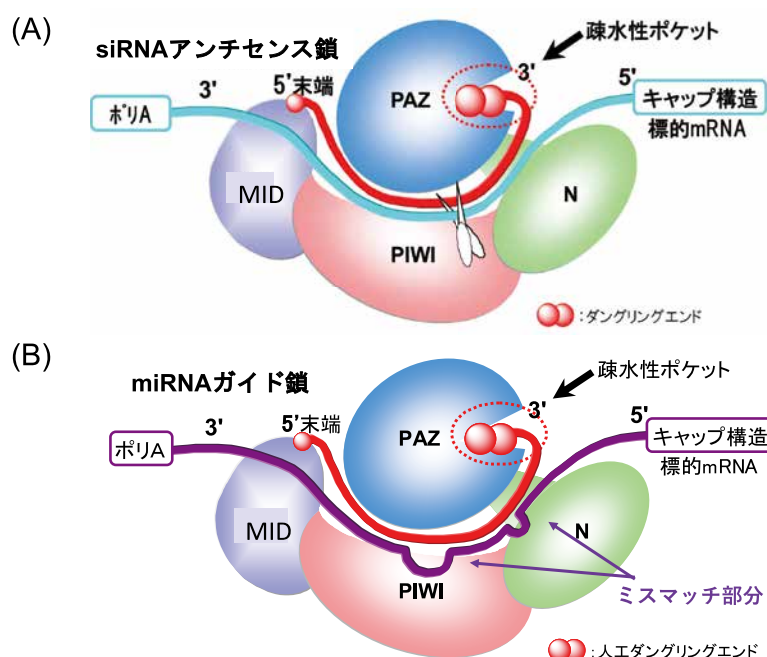


図3 siRNAや、miRNAとmRNAとの複合体

(A) siRNAとmRNAの複合体、(B) miRNAとmRNAの複合体。ミスマッチ部分を含む。

マッチよりも5'-末端側のミスマッチの方が抑制活性に大きく影響を与えると報告されている。また、RNAiで標的の識別に重要な役割をするのは、22塩基程度のmiRNAのうち5'-末端から数えて2番目から8番目までの7塩基であることも明らかとなっている。この領域はシード領域と呼ばれ、9番目以降の塩基も標的の選択に関わるがそれほど重要ではないとされている。このことから、1つのmiRNAは複数のmRNAを認識するとされている。さらに、標的mRNAは比較的長い3'-非翻訳領域を持たため、1つのmRNAが複数のmiRNAによって制御を受ける可能性もあると考えられている。

PAZドメインは疎水性アミノ酸残基からなるポケットが存在し、アンチセンス鎖(ガイド鎖)の3'-末端ダングリグエンド部を認識する(図3)。一方、Tuschlらは、3'-末端2塩基突

出部位であるダングリグエンド部にデオキシチミジン残基を二つ導入したDNA修飾型(TT) siRNAが天然型siRNAと比べて強いノックダウン効果を示すと報告している^{6), 7)}。(図5. A) 本修飾はmiRNAにも有効と考えられるが、miRNAの臨床展開には、siRNAの場合と同様、i) 核酸分解酵素耐性、ii) 標的細胞への効率的な輸送システム、iii) オフターゲット効果の回避、などの克服が重要である。

そこで先ず我々は、一つ目の課題である、核酸分解酵素耐性の増強に取り組んだ。様々な置換基をRNA3'-末端に導入し、先ず結合活性やノックダウン効果への影響について詳細な検討を加えた(図5. B, C)。ヌクレアーゼによる分解耐性の向上を期待してヌクレオシド部を芳香族化合物であるベンゼン誘導体やピリジン誘導体に置換したRNA誘導体を

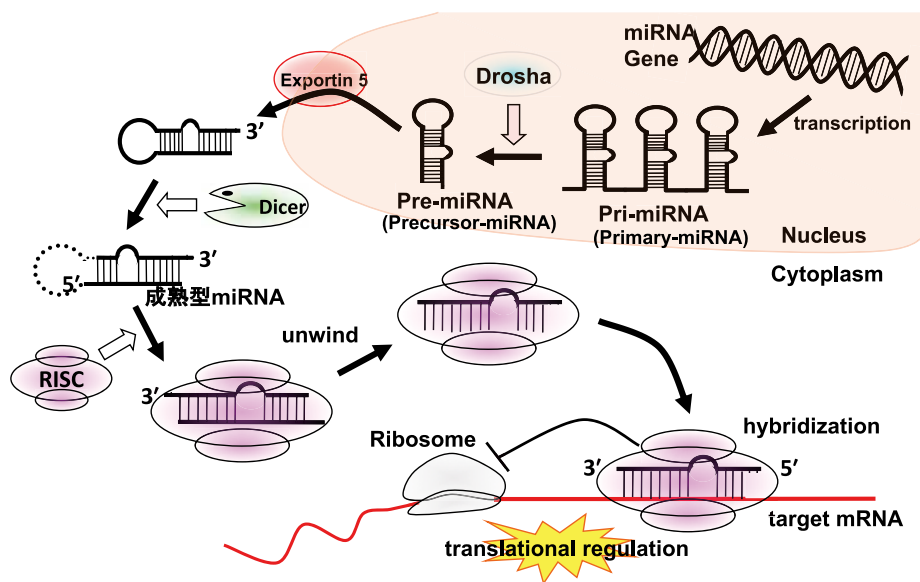


図4 miRNAのRNA干渉機構

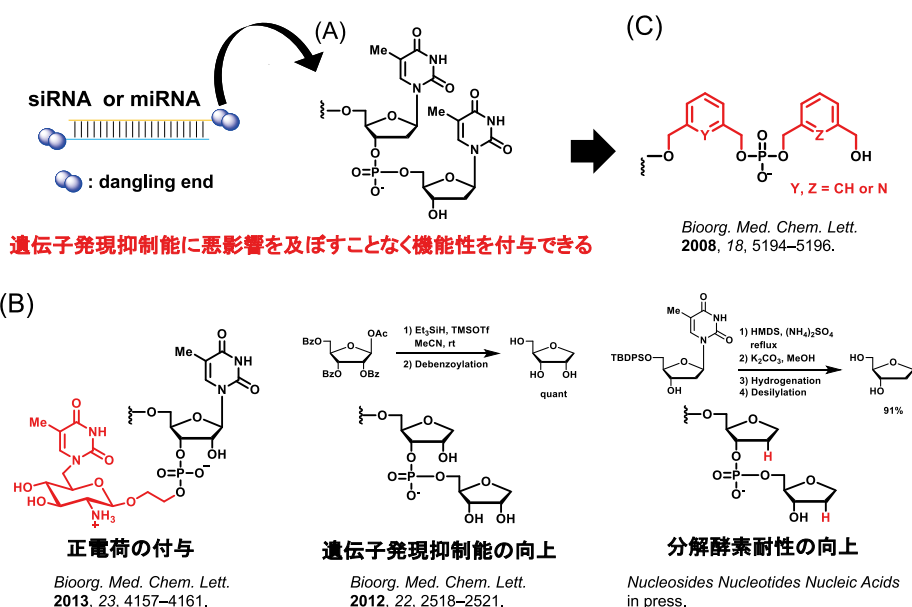


図5 ダングリングエンド部の様々な化学修飾

開発した⁹⁾。PAZドメインとダングリグエンド部との結合能は、ヒト遺伝子組換えPAZドメインを作成し、RNAを持たないダングリグエンド部のみとの結合能を等温滴定カロリーメータ (ITC) にて評価するシステムを立ち上げた⁹⁾。チミジン糖部をベンゼン骨格に置換したアナログや、ベンゼン誘導体やピリジン誘導体を連結した、核酸塩基部を持たないシンプルなアナログも開発した (図5. C)。これらも、未修飾型チミジンと比較したところ、ITCの解析結果からほぼ同等の結合活性を示した。この様に核酸塩基をもたない疎水性の置換基を導入しても、RNA干渉能 (ノックダウン効果) が低下することなく酵素分解耐性が增強されることを見出した。ノックダウン効果は、HeLa 細胞を用いたDual-Luciferase™ reporter assay にて評価した。siRNAやmiRNAの3'-末端ダングリグエンド部の化学修飾試薬として、ベンゼンやピリジン誘導体のホスホロアミダイト試薬やCPG樹脂を関東化学 (株) で市販している (図6)。また、負電荷を帯びている細胞表面との相互作用などを期待して正電荷を帯びたアミノ糖であるグルコサミンに置換したRNA誘導体¹⁰⁾の合成に

も成功した。さらに、核酸塩基を除いたリボース体¹¹⁾やデオキシリボース体¹²⁾も開発し、そのノックダウン活性を評価した。これら化合物は、ヌクレアーゼ耐性の増強を確認することができたことから、ユニバーサルなダングリグエンド部としての利用が可能である (図5. B)。

ダングリグエンドの 5'-末端側から、ベンゼン、ピリジンの順でRNAに置換したBP修飾miRNA-143 (4, X=CH, Y=N)は、顕著な抗がん活性を示した。このBP修飾miRNA-143誘導体とパッセンジャー (センス) 鎖の配列を最適化した誘導体から形成した2本鎖は、優れたヒト大腸がん細胞 (DLD-1) 増殖抑制活性を示した。さらにヒト大腸がん細胞を移植したヌードマウスに対し、BP修飾型miRNA-143誘導体を全身投与したところ顕著な抗がん活性を示した¹³⁾。化学修飾miRNAによる抗がん作用は、図7に示したmiRNAによる補充療法で説明できる。すなわち、何かしらの原因で発現低下したmiRNA-143によりがん遺伝子とがん抑制遺伝子とのバランスが崩れてがん化したのをヌクレアーゼ耐性でノックダウン効果を示す化学修飾miRNA-143を補充

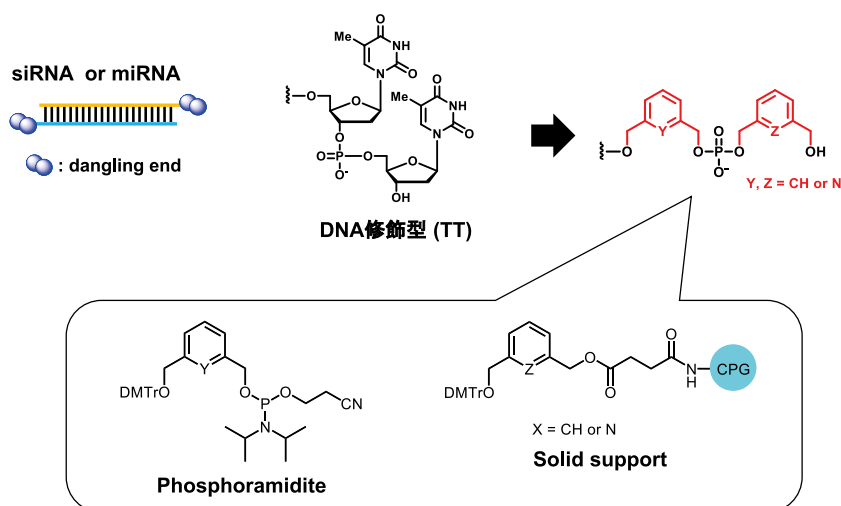


図6 関東化学 (株) より発売した化学修飾試薬

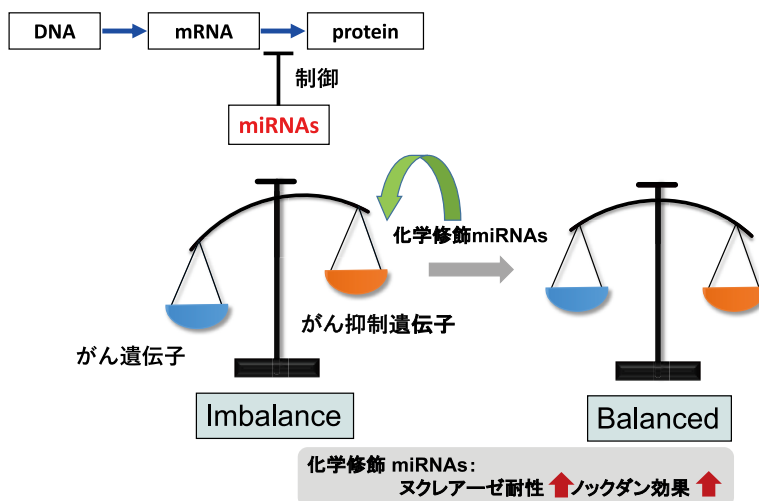


図7 miRNAの補充療法のメカニズム

することで崩れたバランスをもとに戻し、正常化するものと考えている。

負電荷の核酸を陽性荷電脂質などとリポプレックスを形成させて細胞内に導入するリポフェクション法を用いた全身投与では、毒性や疾患細胞選択性などの問題が未解決である。そこで、副作用が少ないと考えられる局所投与による治療を実施するため、皮膚ガンであるメラノーマに着目した。miRNA-205は、ヒト・メラノーマにおいて発現低下が顕著ながん抑制遺伝子であることが分かってきた。また、ヒトと同様イヌのメラノーマにおいても同様のmiRNA-205の発現低下が確認された。そこで、ヌクレアーゼ耐性を示すBP修飾miRNA-205を合成し抗がん活性を評価したところ、優れたヒト・メラノーマ細胞の増殖抑制効果を示した^{14)・16)}。自然発生メラノーマで放射線治療後に再発したイヌでの臨床試験を、岐阜大学動物病院の森崇教授らのもとで実施して頂いた。著者らが開発したBP修飾miRNA-205を用いて、患

部への週1、2回の計7回の局所投与で、10例中3例で完全寛解を示す優れた抗がん活性を示した(図8)。

この様にヌクレアーゼ耐性の付与がRNA医薬の開発に有用であることから、さらにダングリングエンド部のヌクレアーゼ耐性増強を目的に、先に示したBP修飾体のベンゼン残基とピリジン残基とのリン酸ジエステル結合をウレア結合に変換したBuP誘導体も開発した。この修飾体は、ヒト血清中での優れた安定性を示したことから国際特許も取得した¹⁷⁾。このウレア修飾miRNAの有効性に関しては今後詳細に検討し報告する予定である。

次の課題である、標的細胞への効率的輸送システムの開発にも取り組んでいる。一方で我々は、RNA医薬の開発には将来RNA分子の体内動態の解析が必要となると考えた。半減期が非常に短い放射性原子(¹⁸F, ¹¹C)が置換したPETラベル化分子の導入には、最終段階でのクリック反応の利用が最適と考えた。そこで、RNA分子の3'-末端にエチニル基を導入し、アジド基を修飾したPETラベル化分子をクリック反応で架橋することで、PETラベル可能なRNA誘導体の効率的合成法の開発に成功した¹⁸⁾(図9)。今後、RNA医薬の開発が進んだ場合に、RNA医薬の体内動態の解析に有効と考えている。なお、RNAへのエチニル基の導入に必要な試薬も開発済みであり、関東化学(株)より市販している。

さらに我々は、本法を用いて、がん細胞膜などに存在する特異的レセプターやトランスポーターを認識することが可能な様々なアジド修飾化リガンドを合成した。次いで、アジド修飾化リガンド体とエチニル基を有するRNA分子とをクリック反応して連結したパッセンジャー鎖(センス鎖)を合成した。種々のリガンドをRNA分子に架橋することで様々なDDS機能を付与したRNA分子のライブラリー化が容易にできることとなった(図10)。本法により、著者らは現在種々の

自然発生メラノーマの放射線治療後の再発がん治療



図8 化学修飾miR-205の抗メラノーマ活性

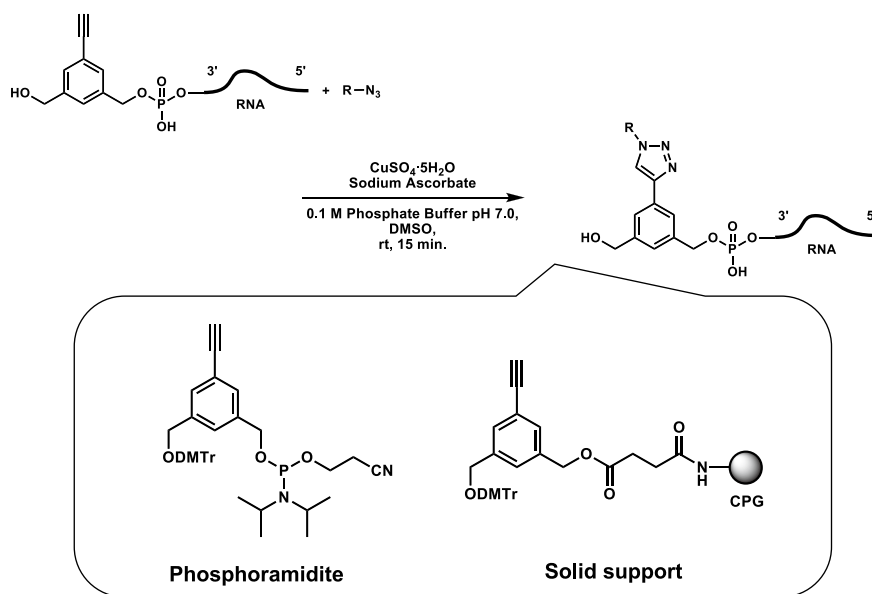


図9 関東化学(株)より発売した標識体導入試薬

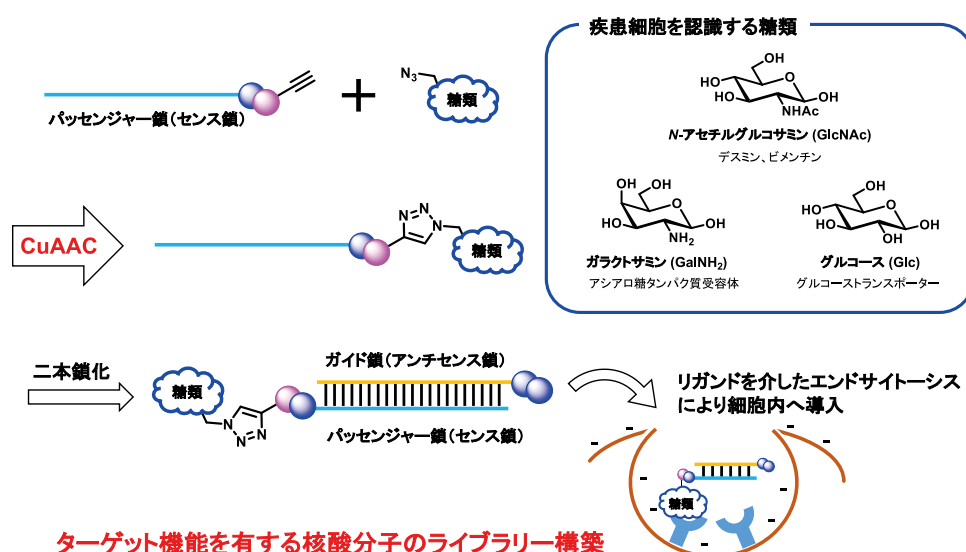


図10 クリック反応によるDDS機能を有するRNAの創製

リガンドが結合したとパッセンジャー鎖とヌクレアーゼ耐性を有するガイド鎖 (アンチセンス鎖) からなる2本鎖RNAの簡易的なライブラリー化に成功した。このライブラリーが充実すれば、臓器選択性やがん細胞選択性を有するmiRNAやアンチセンスなどの核酸医薬の開発を容易にするものと考えている。

予備的検討の結果、ヒト乳がん細胞を選択的に認識するリガンドの探索にも成功しており、現在その抗がん活性や細胞膜透過性などを詳細に検討している。本研究が進めば、リポフェクション試薬なしに全身投与可能なRNA医薬の開発に繋がることが期待される。これら核酸の高機能化が、将来RNA医薬の実現に大きく寄与すること期待して本稿を閉じる。

参考文献

- 1) F. H. C. Crick, *Symp Soc Exp Biol.* **13**, 138-163 (1958).
- 2) J. D. Watson, *DNA: The Secret of Life*, New York, Alfred A. Knopf, Inc., 2003.
- 3) A. Fire, S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, C. C. Mello, *Nature* **391**, 806-811 (1998).
- 4) J.J. Song, S.K. Smith, G.J. Hannon, T.L. Joshua, *Science* **305**, 1434-1437 (2004).
- 5) E. Elkayam, C.D. Kuhn, A. Tocili, A.D. Haase, E.M. Greene, G.J. Hannon, L. Joshua-Tor, *Cell* **150**, 100-110 (2012).
- 6) S. M. Elbashir, W. Lendeckel, T. Tuschl, *Genes Dev.* **15**, 188-200 (2001).
- 7) J.B. Ma, Y. R. Yuan, G. Meister, Y. Pei, T. Tuschl, D. J. Patel, *Nature* **434**, 666-670 (2005).
- 8) Y. Ueno, Y. Watanabe, A. Shibata, K. Yoshikawa, T. Takano, M. Kohara, Y. Kitade, *Bioorg. Med. Chem.* **17**, 1974-1981 (2009).
- 9) Y. Kitade, Y. Akao, *J. Pharmacol. Sci.* **114**, 276-280 (2010).
- 10) X. Luo, T. Sugiura, R. Nakashima, Y. Kitamura, Y. Kitade, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 4157-4161 (2013).
- 11) K. Taniho, R. Nakashima, M. Kandeel, Y. Kitamura, T. Kitade, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 2518-2521 (2012).
- 12) Y. Nagaya, Y. Kitamura, R. Nakashima, A. Shibata, M. Ikeda, Y. Kitade, *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* **35**, 64-75 (2016).
- 13) Y. Akao, Y. Nakagawa, I. Hirata, A. Iio, T. Itoh, K. Kojima, R. Nakashima, Y. Kitade, *Cancer Gene Ther.* **17**, 398-408. (2010).
- 14) M. Kandeel, Y. Kitade, *PLoS One* **8**, e57140 (2013).
- 15) M. Kandeel, Y. Kitade, *J. Comput. Aided Mol. Des.* **27**, 605-614 (2013).
- 16) M. Kandeel, A. Al-Taher, R. Nakashima, T. Sakaguchi, A. Kandeel, Y. Nagaya, Y. Kitamura, Y. Kitade, *PLoS One* **9**, e94538 (2014).
- 17) Y. Kitamura, Y. Masegi, S. Ogawa, R. Nakashima, Y. Akao, Y. Ueno, Y. Kitade, *Bioorg. Med. Chem.* **21**, 4494-4501 (2013).
- 18) T. Shiraishi, Y. Kitamura, Y. Ueno, Y. Kitade, *Chem. Commun.* **47**, 2691-2693 (2011).