



# 岐阜大学機関リポジトリ

## Gifu University Institutional Repository

Title	Studies on the Synthesis and Evaluation of Novel Small Interfering RNAs with Halide-based Overhang Nucleobases and Branching Structures( 内容と審査の要旨(Summary) )
Author(s)	Akash, Chandela
Report No.(Doctoral Degree)	博士(農学) 甲第721号
Issue Date	2019-09-20
Type	博士論文
Version	ETD
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/79035">http://hdl.handle.net/20.500.12099/79035</a>

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏 名 (本 国 籍)	Akash Chandela (インド)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 7 2 1 号
学 位 授 与 年 月 日	令和元年 9 月 2 0 日
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Studies on the Synthesis and Evaluation of Novel Small Interfering RNAs with Halide-based Overhang Nucleobases and Branching Structures (ハロアルキル修飾型 siRNA および分岐型 siRNA の 合成とその特性評価)
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 准教授 柳 瀬 笑 子 副査 岐阜大学 教 授 上 野 義 仁 副査 静岡大学 教 授 河 合 真 吾

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

短鎖二本鎖 RNA から成る siRNA (small interfering RNA) は、これまで有効な治療薬が得られていない難治性の癌や遺伝病など、いわゆる Unmet Medical Needs の高い疾患に対応する次世代医薬品として期待され、医薬品化に向けて開発研究が世界中で進められている。しかしながら、天然型 siRNA は、細胞内外に存在する RNA 分解酵素 (ヌクレアーゼ) により分解を受けるため不安定であること、生体組織や細胞への送達などにおいて開発の障壁となる課題があり、siRNA 医薬として承認されているものは極めて少ない。そこで本研究では、siRNA 医薬創出に向けた基盤技術開発として、(1) 3'-ダングリリングエンド部位へハロゲン化アルキルを導入した新規修飾 siRNA の合成とその特性評価、および (2) 複数の siRNA 分子をリンカーで連結した分岐型 siRNA の合成とその特性評価を行った。

(1) 3'-ダングリリングエンド部位へハロゲン化アルキルを導入した新規修飾 siRNA の合成とその特性評価

1-*O*-acetyl-2,3,5-*O*-tri-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-ribofuranose を出発原料として、2,2,2-trifluoroethyl  $\beta$ -D-ribofuranoside (TFE)、2,2,2-trichloroethyl  $\beta$ -D-ribofuranoside (TCE) および 2,2,2-tribromoethyl  $\beta$ -D-ribofuranoside (TBE) を合成した。各アナログをアミダイト体へと変換した後に、核酸自動合成機によりアナログを含む RNA を合成した。アナログをダングリリングエンド部位に含む二本鎖 siRNA の熱的安定性を 50%融解温度 ( $T_m$ ) を測定することにより検証した。その結果、二本鎖 siRNA の安定性は、TCE、TFE、TBE の順となり、これはハロアルカンの双極子モーメントの大きさの順と一致していた。続いて、アナロ

グを含む siRNA の RNA 干渉 (RNA interference; RNAi) 活性をデュアルルシフェラーゼアッセイにより検討した。その結果、活性は TCE、TFE、TBE、天然型の順となり、アナログを導入することにより siRNA の RNAi 活性が増強されることが分かった。また、アナログを含む siRNA とヒト組換え Paz タンパク質との親和性を、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によって検証したところ、ハロゲン化アルキルを導入することにより親和性が向上し、TCE を導入したもので最も結合能が高いことが分かった。*ab initio* フラグメント分子軌道法による計算結果から、この親和性の向上はアナログと Paz タンパク質との疎水性および静電的相互作用に起因していることが示唆された。また、アナログを含む RNA のヌクレアーゼ耐性を 3'-エキソヌクレアーゼを用いて検討したところ、アナログを導入することにより耐性が向上し、TBE を導入したものでは天然型と比較して約 8 倍安定であった。以上のことから、3'-ダングリリングエンド部位へハロゲン化アルキルの導入は、siRNA 医薬開発における有用な基盤技術の一つになるものと考えられる。

## (2) 複数の siRNA 分子をリンカーで連結した分岐型 siRNA の合成とその特性評価

siRNA 医薬開発において改善すべき課題の 1 つに腎臓におけるクリアランスがある。通常、分子量 40 kDa 未満の分子は腎臓の糸球体を通り、体外へ排出される。従って、siRNA を共有結合で連結し、分子量を 40 kDa 以上にすることができれば腎糸球体における濾過を抑制することが可能となり、これにより siRNA の血中における濃度を高めることができると考えられる。そこで本研究では、siRNA 3 分子をリンカーで連結した分岐型 siRNA を合成し、その特性を評価した。

3 方向に分岐したリンカーを結合させた固相担体を作成し、核酸自動合成機により 3 つの鎖を同時に伸長させることにより分岐型 RNA を合成した。合成した分岐型 siRNA の熱的安定性を  $T_m$  を測定することにより検証した。その結果、リンカーで siRNA を連結することにより siRNA 二本鎖の熱的安定性が向上することが分かった。続いて、分岐型 siRNA の RNAi 活性をルシフェラーゼアッセイにより検討した。その結果、G 鎖を連結した siRNA では活性が大きく減弱するのに対し、P 鎖を連結した siRNA では未分岐の siRNA と同等の活性を示し、RNAi 活性が保持されていることが明らかとなった。また、分岐型 siRNA は、天然の二本鎖 siRNA と比較して、3'-エキソヌクレアーゼに対してより耐性であった。更に、分岐型 siRNA の水溶液中での粒子径を動的光散乱法にて測定したところ、通常の本鎖 siRNA では、その直径が 2.80 nm であったのに対し、二分岐型では 5.70 nm、三分岐型では 6.87 nm であることが分かった。以上の結果より、P 鎖を連結した分岐型 siRNA は、腎臓におけるクリアランスを改善するための一つの解決手法に繋がるものと考えられる。

## 審査結果の要旨

短鎖二本鎖 RNA から成る siRNA (small interfering RNA) は、標的分子に対する特異性が高いこと、細胞質で働くため核内ゲノム DNA への影響が少ないこと、また作用メカニズムも明確であることから、これまで有効な治療薬が得られていない難治性の癌や遺伝病など、いわゆる Unmet Medical Needs の高い疾患に対応する次世代医薬品とし

て期待され、医薬品化に向けて開発研究が世界中で進められている。しかしながら、天然型 siRNA は、細胞内外に存在する RNA 分解酵素 (ヌクレアーゼ) により分解を受けるため不安定であること、生体組織や細胞への送達などにおいて開発の障壁となる課題があり、siRNA 医薬として承認されているものは極めて少ない。そこで本研究では、siRNA 医薬創出に向けた基盤技術開発として、(1) 3'-ダングリングエンド部位へハロゲン化アルキルを導入した新規修飾 siRNA の合成とその特性評価、および (2) 複数の siRNA 分子をリンカーで連結した分岐型 siRNA の合成とその特性評価を行っている。

#### (1) 3'-ダングリングエンド部位へハロゲン化アルキルを導入した新規修飾 siRNA の合成とその特性評価

1-*O*-acetyl-2,3,5-*O*-tri-*O*-benzoyl- $\beta$ -D-ribofuranose を出発原料として、2,2,2-trifluoroethyl  $\beta$ -D-ribofuranoside (TFE)、2,2,2-trichloroethyl  $\beta$ -D-ribofuranoside (TCE) および 2,2,2-tribromoethyl  $\beta$ -D-ribofuranoside (TBE) を合成し、各アナログをアミダイト体へと変換した後、核酸自動合成機により RNA に導入している。siRNA 二本鎖の熱的安定性を評価したところ、TCE、TFE、TBE の順となり、これはハロアルカンの双極子モーメントの大きさの順と一致していることを見出している。続いて、siRNA の RNA 干渉 (RNA interference; RNAi) 活性を測定した結果、活性は TCE、TFE、TBE、天然型の順となり、アナログを導入することにより siRNA の RNAi 活性が増強されることを明らかにしている。また、アナログを含む RNA のヌクレアーゼ耐性を 3'-エキソヌクレアーゼを用いて検討したところ、アナログを導入することにより耐性が向上し、TBE を導入したものは天然型と比較して約 8 倍安定であった。以上のことから、3'-ダングリングエンド部位へハロゲン化アルキルの導入は、siRNA 医薬開発における有用な基盤技術の一つになるものと考えられる。

#### (2) 複数の siRNA 分子をリンカーで連結した分岐型 siRNA の合成とその特性評価

3 方向に分岐したリンカーを結合させた固相担体を作成し、核酸自動合成機により 3 つの鎖を同時に伸長させることにより分岐型 RNA を合成している。分岐型 siRNA の RNAi 活性を検証した結果、G 鎖を連結した siRNA では活性が大きく減弱するのに対し、P 鎖を連結した siRNA では未分岐の siRNA と同等の活性を示し、RNAi 活性が保持されていることを見出している。更に、分岐型 siRNA の水溶液中での粒子径を動的光散乱法にて測定したところ、通常の本鎖 siRNA では、その直径が 2.80 nm であったのに対し、二分岐型では 5.70 nm、三分岐型では 6.87 nm であることを明らかにしている。以上の結果より、P 鎖を連結した分岐型 siRNA は、腎臓におけるクリアランスを改善するための一つの解決手法に繋がるものと考えられる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値のあるものと認められた。

#### 【学位論文の基礎となる学術論文】

1) Title: Systemic delivery of small interfering RNA therapeutics; obstacles and advances

雑誌名: *Reviews in Agricultural Science*, 2019, 7, 10-28.

著者: Akash Chandela, Yoshihito Ueno.

2) Title: Synthesis and characterization of small interfering RNAs with haloalkyl groups at their 3'-dangling ends

雑誌名: *Bioorganic Medicinal Chemistry*, **2019**, 27, 1341-1349.

著者: Akash Chandela, Taeko Watanabe, Kenji Yamagishi, Yoshihito Ueno.