

## 論文の内容の要旨

論文題目 構造情報を活用したsiRNA活性増強法の構築

(Development of a method for enhancing the siRNA activity by utilizing structural information)

氏名 篠原 史一

### [背景]

核酸医薬品は、従来の医薬品では有効な治療法がない疾患に対して新たな治療選択肢を与え得る新規な創薬モダリティとして期待され、多数の研究開発が進められている。核酸医薬品は構造やターゲット、メカニズムの違いによって複数の種類に分類されるが、代表的なものにアンチセンス医薬品と siRNA (small interfering RNA) 医薬品が挙げられる。アンチセンス医薬品は一本鎖の核酸から成り、mRNA、pre-mRNA、miRNA などの RNA に相補的に結合する性質を持つ。アンチセンス医薬品は、RNA 分解、スプライシング制御といった機能を発揮することで遺伝性疾患、希少疾患などを対象に、これまで 8 製品が国内外で承認されている。もう一方の siRNA 医薬品も、強力かつ持続的な標的 mRNA 発現抑制効果が期待できる次世代の核酸医薬基盤として注目されており、これまでに国内外で 3 製品が承認されている。しかしながら、上記のアンチセンス医薬品、siRNA 医薬品を始めとする核酸医薬品の更なる普及に際しては、核酸構造に起因する易分解性ならびに生体内利用(デリバリー)の課題が残っており、実用性の向上に向けた核酸医薬基盤改良研究が継続されている。

核酸医薬基盤の改良は、多くの場合において核酸化学修飾を施すことで検討され、ヌクレアーゼ耐性獲得による生体内での安定性向上、標的分子との結合親和性向上、機能向上による活性増強が意図される。機能向上によって核酸医薬基盤の活性を増強させることができれば、より少ない分子数で治療効果が期待できる上、核酸構造に起因した免疫刺激性による副作用の軽減も期待できることから、核酸医薬基盤の実用性向上に向けた活性増強に対するニーズは大きい。

### [目的]

siRNA は細胞内で配列相補性を持つ mRNA を切断することで標的遺伝子の発現を抑制するが、siRNA は細胞内で単独では機能せず、細胞内蛋白質 Argonaute 2 (AGO2) と複合体を

形成し、AGO2 の機能を介することで標的 mRNA の捕捉と切断を行う。これまでに複数のグループの研究により、siRNA は AGO2 との結合時に siRNA ガイド鎖の 5'末端塩基構造が AGO2MID ドメインによって認識されること、細胞内における siRNA と AGO2 の複合体形成効率は、siRNA ガイド鎖 5'末端塩基構造に影響を受けることが報告されている。そこで独自の siRNA 医薬基盤活性増強策を構築する目的で、siRNA ガイド鎖 5'末端塩基構造の最適化を検討した。すなわち siRNA ガイド鎖 5'末端塩基構造を siRNA と AGO2 の相互作用観点で構造最適化することで、RNA-induced silencing complex (RISC) 複合体形成効率を向上させ、その結果として siRNA 活性増強につなげることを検討した。得られた人工塩基を搭載した siRNA 評価結果に基づき、本研究コンセプトによる siRNA 活性増強策の有用性も検討した。

#### [結果]

本研究は以下に示す通り、①AGO2MID ドメインポケットへの高親和性結合人工塩基探索と、②siRNA ガイド鎖 5'末端への人工塩基搭載による siRNA 活性評価、の構成で展開した。

##### ① AGO2MID ドメインポケットへの高親和性結合人工塩基探索

siRNA ガイド鎖 5'末端結合ポケットに対して構造最適化された人工塩基の取得を目的に、以下の検討を実施した。AGO2MID ドメインポケット構造分析目的で、AGO2MID ドメインに高親和性に結合することが知られる天然塩基 AMP とヒト AGO2 MID ドメイン複合体の既知 X 線結晶構造情報を活用し、AGO2MID ドメインポケットマッピング解析を行った。その結果、AMP 結合部位における、水素結合受容体、供与体、疎水性原子の理想配置を得た。次に人工塩基デザイン展開に向けて、ポケット構造解析結果とマッピング解析結果を考察したところ、Adenine 8 位への疎水性置換基導入は AGO2MID ドメイン Tyrosine 529 との新たな van der Waals 相互作用形成によって結合親和性増強が期待できること、Adenine 6 位への疎水性置換基導入は Adenine 6 位疎水性環境との相互作用によって結合親和性増強が期待できることが示唆された。初期検証目的で、市販化合物中(約 510 万化合物)から上記の考察に合致する塩基アナログを *in silico* 結合 SCR によって探索した結果、市販品として購入可能な、Adenine 8 位置換アナログ 8-Br AMP が抽出された。ヒト AGO2 MID ドメインを用いたビアコア実験系ならびに NMR 結合実験系で 8-Br AMP の AGO2MID ドメインに対する結合強度を評価した結果、8-Br AMP はヒト AGO2 MID ドメインに対して比較対象の AMP よりも約 3.8 倍の結合親和性増強を示すことが確認された。さらに AGO2MID ドメインと 8-Br AMP 複合体 X 線結晶構造解析が行われた結果、8-Br AMP は 8-Br 基が Tyr529 と  $\pi$ - $\pi$  スタッキングすることによって新たな疎水性相互作用を形成し、結合親和性が増強していると考察された。

一方、アデニン 6 位展開アナログに関しては、市販化合物中に適当な塩基アナログが見い出せなかったため、in house で新規デザインを行うことで検討継続した。Adenine 6 位の疎水性環境に加えて、アデニン 6 位環境の AGO2MID ドメイン Lys525 はイオン性相互作用を通じた新規相互作用点となり得る可能性が示されたことから、これら両条件に合致する新規アナログとして 6-mCEPh-purine (6-(3-(2-carboxyethyl)phenyl)purine riboside monophosphate) が新規にデザインされた。上記の 8-Br AMP と同様にビアコア実験系ならびに NMR 結合実験系による結合親和性評価が行われた結果、6-mCEPh-purine は AMP に比して約 9 倍のヒト AGO2 MID ドメイン結合親和性を持つことが確認された。6-mCEPh-purine もヒト AGO2MID ドメイン複合体の X 線結晶構造解析が行われた結果、プリン 6 位に導入された酸性官能基は Lys525 とは明確な相互作用は形成せず、水分子を介して Thr526 と相互作用することが明らかとなった。MIDドメインを用いた NMR 結合親和性評価結果から、アデニン 6 位展開による 6-mCEPh-purine の MID 結合親和性増強が顕著であったことから、siRNA ガイド鎖 5'末端置換効果検証用塩基アナログに 6-mCEPh-purine を用い、引き続き細胞株ならびにマウス動物モデルによる siRNA 活性評価を実施した。

## ② siRNA ガイド鎖 5'末端への人工塩基配置による siRNA 活性検討

上記の「①AGO2MID ドメインへの高親和性結合人工塩基探索」で取得した人工塩基が siRNA 活性に与える影響を検討するため、siRNA ガイド鎖 5'末端に 6-mCEPh-purine を導入した Luciferase 標的 siRNA ならびにコレステロール生合成に関わる Apolipoprotein B(ApoB) 標的 siRNA を合成し、培養細胞株ならびにマウス動物モデルによる siRNA 活性評価を行った。培養細胞株における評価の結果、Luciferase 標的 siRNA と ApoB 標的 siRNA は共に、ガイド鎖 5'末端を 6-mCEPh-purine に置換することで、比較対象である 5'末端アデニンの siRNA に比べ、数倍の siRNA 活性増強がもたらされる結果を得た。その siRNA 活性増強効果は、siRNA ガイド鎖 5'末端 6-mCEPh-purine 修飾によって、細胞内における RISC 複合体形成効率が向上する結果であることも確認した。マウス動物モデルにおいても、6-mCEPh-purine をガイド鎖 5'末端に置換した ApoB 標的 siRNA は、5'末端にアデニンを有する siRNA に比べて標的発現抑制効果の増強と発現抑制の持続をもたらす結果を得た。標的 mRNA の発現抑制増強効果はタンパクレベルの発現抑制増強効果としても観察された。

## [結論]

siRNA の機能メカニズムに即したガイド鎖 5'末端塩基構造の最適化により、AGO2MID ドメインに対して結合親和性が増強した塩基アナログを初めて取得した。また、その新規塩基アナ

ログの機能メカニズムを、構造生物学的解析ならびに siRNA 機能評価によって明らかにした。得られた成果や知見は、基礎のみならず、siRNA 医薬基盤最適化策として今後の応用が期待される。