

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月8日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22550159

研究課題名（和文）

細胞内デリバリー制御可能な多機能 siRNA の創製と遺伝子サイレンシング

研究課題名（英文）

Controlled intracellular delivery of Multi-functional siRNA and gene silencing

研究代表者

藤井 政幸 (FUJII MASAYUKI)

近畿大学・産業理工学部・教授

研究者番号：60199297

研究成果の概要（和文）：

固相フラグメント縮合法により化学合成したsiRNA-NESコンジュゲートによりK562細胞に発現するbcr/abl 遺伝子の発現を200nMにおいて8.3%、50nMにおいて11.6%に抑制した。また、siRNAと新規ペプチド（Pfct）とのコンプレックスを形成させることにより、市販導入剤と同等以上に効率よく細胞内に導入できることを見出した。siRNA-NESコンジュゲートとPfctとのコンプレックスを用いるとbcr/abl遺伝子を95%以上サイレンシングできることも証明した。この新規ペプチドPfctは全く細胞毒性がなく、PfctとsiRNAのコンプレックスはヌクレアーゼによる分解に対して非常に耐性が強く、その半減期を48時間以上に伸長した。

研究成果の概要（英文）：

The expression of bcr/abl gene in K562 cells were suppressed to 8.3% at 200nM and 11.6 % at 50nM by siRNA-NES conjugates synthesized solid phase fragment coupling. It was also found that the complex of siRNA and novel peptides (Pfct) was taken up into cells with comparable efficiency to commercially available lipofection reagent. The expression of bcr/abl gene was suppressed to 0.5% by the complex of siRNA-NES conjugate and Pfct. The complex of siRNA and Pfct showed no cyto-toxicity and an intensive resistance against nucleases digestion to extend the half-life time over 48 hours.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生体機能関連化学

## 1. 研究開始当初の背景

オリゴDNA/RNAを用いる遺伝子サイレンシング法（siRNA法、アンチセンス法、アンチジーン法、DNA/RNAエンザイム法）は、特定の病原遺伝子を標的とした疾病の治療法（遺伝子薬）として、また、未知遺伝子の機能解明のためのツールとして、医学、分子生物学上大きな注目を集めている。ゲノム医療、ポストゲノム研究のための基盤技術として、細胞に効率よく導入でき、特定の遺伝子のみを持続的に強力にサイレンシングする技術の開発が急務である。

## 2. 研究の目的

申請者はすでに独自に開発した固相フラグメント縮合法を用いてオリゴDNA/RNAにシグナルペプチドなどの様々な機能を持った生体分子をコンジュゲートすることにより、オリゴDNA/RNAを効率よく細胞内に導入し、しかも、その細胞内での局在化を制御できる手法の開発に成功している。また、この技術によりヒト白血病細胞中のテロメラーゼを1週間にわたり99.5%以上の効率でサイレンシングできることを明らかにしている。（この技術をsiRNA-核外輸送シグナル（NES）ペプチドコンジュゲートに応用し、特異的に白血病原因遺伝子を非常に高い効率でサイレンシングすることに成功した。

しかし、siRNA-ペプチドコンジュゲート単独では細胞内に導入することができず、従来のカチオン性リポソームを使用しなければならなかった。本研究ではこの問題を解決し、毒性のない特定遺伝子のサイレンシング法を開発するために、siRNAのセンス鎖を核外輸送シグナル（NES）ペプチドとカチオン性ペプチドで同時に修飾し、化学的アプローチによりマルチコンジュゲートsiRNAを創製する。

- (1) 効率よく細胞に取り込まれる。
- (2) 細胞質に局在化し、標的mRNAに強く結合する。
- (3) 細胞内ヌクレアーゼに耐性でサイレンシング効果を長時間持続する。
- (4) off-target効果を抑制し、高いサイレンシング効果を発揮する。

## 3. 研究の方法

(1) 固相フラグメント縮合法の拡張とマルチコンジュゲートsiRNAの合成

siRNAの5'-末端、3'-末端、中間など複数の位置に機能性分子を結合させたマルチコンジュゲートsiRNAの合成法を確立する。従来のリンカーを用いる方法に加えて、クリックケミストリーの応用を検討する。siRNAのアンチセンス鎖、センス鎖のどの位置にコンジュゲート、化学修飾を施すのが最も効果的かを探索する。DNA/RNA自動合成機により合成されたオリゴRNAを用いて固相フラグメント縮合法によりコンジュゲート体を作成する。化合物の分離、生成は逆相HPLCを、同定はMALDI-TOF質量分析計を用いて行う。

(2) マルチコンジュゲートsiRNAの細胞導入効率評価と選択的局在化制御

HIV-1 revタンパク、PKI $\alpha$ タンパク、MAPKKタンパクなどに由来する各種核外輸送シグナル（NES）ペプチドを蛍光ラベル化したsiRNAの様々な位置にコンジュゲートし、細胞への導入効率と細胞内での所在について共焦点走査型蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーを用いて観察する。M.J.Gait等はsiRNAと核局在化シグナル（NLS）ペプチドとのコンジュゲートを細胞内に導入することに失敗しているが、マルチコンジュゲートsiRNAによってその課題を克服する。

(3) マルチコンジュゲートsiRNAのヌクレアーゼ耐性評価

化学合成したマルチコンジュゲートsiRNAのヌクレアーゼ耐性をヒト血清中で評価し、HPLCおよび電気泳動にて解析する。細胞内安定性、サイレンシング効果持続性の指標となる。これまでの研究においてコンジュゲートsiRNAはヌクレアーゼに対して非常に耐性を有していることを明らかにしており（未発表）、マルチコンジュゲートsiRNAではさらに耐性が向上することが期待できる。

(4) マルチコンジュゲートsiRNAによる遺伝子サイレンシング

化学合成したマルチコンジュゲートsiRNAを用いてヒト白血病細胞K-562に発現する

bcr/abl 遺伝子 mRNA を標的としたサイレンシング効果を評価し、最適構造のマルチコンジュゲート siRNA を探索する。bcr/abl 遺伝子 mRNA の発現量は定量PCR法により、bcr/abl 遺伝子タンパクの発現量は蛍光標識抗体法によりそれぞれ定量する。

(5) ペプチド導入剤を用いるマルチコンジュゲート siRNA の細胞導入効率評価  
マルチコンジュゲート siRNA を核局在化シグナルなどの各種カチオン性ペプチドを用いて細胞へ導入し、最も効率の高いペプチドを探索する。その細胞への導入効率と細胞内での所在について共焦点走査型蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーを用いて評価する。申請者らはすでに数種類のカチオン性両親媒性ペプチドが DNA および RNA の細胞導入に非常に有効に機能することを発見しており、それらのペプチドを中心にさらに機能向上を図る。

(6) 化学修飾 siRNA の合成と細胞内安定性の増強

新規核酸塩基修飾ヌクレオシドを合成、siRNA に組み込み、細胞内でより安定で持続的な効果を発揮する siRNA 分子を構築する。申請者等はこの新規ヌクレオシドをダングリリングエンドに組み込むと二重鎖 DNA/RNA が強く安定化されることをこれまでの研究で明らかにしている。特に、ダングリリングエンドの化学修飾の効果をヒト白血病細胞に発現する bcr/abl 遺伝子 mRNA を標的としたサイレンシング効果により評価する。DNA/RNA 自動合成機を用いて化学修飾 siRNA を作成する。化合物の分離、生成は逆相 HPLC を、同定は MALDI-TOF 質量分析計を用いて行う。細胞内安定性はゲル電気泳動法により解析する。細胞への導入効率と細胞内での所在について共焦点走査型蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーを用いて観察する。bcr/abl 遺伝子 mRNA の発現量は定量PCR法により、bcr/abl 遺伝子タンパクの

発現量は蛍光標識抗体法によりそれぞれ定量する。

(7) マルチコンジュゲート siRNA を化学修飾、ペプチド導入剤と組み合わせた遺伝子サイレンシング法の開発

マルチコンジュゲート siRNA にさらに新規化学修飾ヌクレオシドを組み入れ、ペプチド導入剤と組み合わせることによりヒト白血病細胞に発現する bcr/abl 遺伝子 mRNA を標的としたサイレンシング効果を評価する。mRNA をターゲットとする siRNA 法においてその局在化と阻害活性との相関を明らかにする。細胞導入効率、細胞内分解酵素耐性を高めることにより生体系に応用可能な siRNA を創製する。細胞への導入効率と細胞内での所在について共焦点走査型蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーを用いて観察する。bcr/abl 遺伝子 mRNA の発現量は定量PCR法により、bcr/abl 遺伝子タンパクの発現量は蛍光標識抗体法によりそれぞれ定量する。

#### 4. 研究成果

(1) 固相フラグメント縮合法の拡張とマルチコンジュゲート siRNA の合成

siRNA の 5' -末端、3' -末端、中間など複数の位置に機能性分子を結合させたマルチコンジュゲート siRNA の合成に成功した。siRNA のセンス鎖 5' -末端にシグナルペプチド、両方の中間と 3' -末端に化学修飾塩基を導入した。

(2) マルチコンジュゲート siRNA の細胞導入効率評価と選択的局在化制御

各種核外輸送シグナル(NES)ペプチドを蛍光ラベル化した siRNA の様々な位置にコンジュゲートし、細胞への導入効率を評価し、細胞内での所在について共焦点走査型蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーを用いて観察した。

(3) マルチコンジュゲート siRNA のヌクレアーゼ耐性評価

マルチコンジュゲート siRNA のヌクレアーゼ

耐性をヒト血清中で評価し、市販の遺伝子導入剤を用いた場合には、siRNA は速やかに分解されたが、ある種のペプチドを混合するとヌクレアーゼ耐性が著しく向上することを見出した。

(4) マルチコンジュゲートsiRNAによる遺伝子サイレンシング

マルチコンジュゲート siRNA を用いてヒト白血病細胞 K-562 に発現する bcr/abl 遺伝子 mRNA を標的としたサイレンシング効果を評価したところ、修飾部位によりその活性が大きく影響を受けることを見出した。

(5) ペプチド導入剤を用いるマルチコンジュゲートsiRNAの細胞導入効率評価

マルチコンジュゲート siRNA を核局在化シグナルなどの各種カチオン性ペプチドを用いて細胞へ導入し、最も効率の高いペプチドを探索したところ、大変効果の高いペプチドを見出すことができ、特許出願した。

(6) 化学修飾 siRNA の合成と細胞内安定性の増強

申請者等は新規ヌクレオシドをダンダリングエンドに組み込むと二重鎖 DNA/RNA が強く安定化されることをこれまでの研究で明らかにしている。今回、siRNA の各部位に化学修飾ヌクレオシドを組み込み、その効果をヒト白血病細胞に発現する bcr/abl 遺伝子 mRNA を標的としたサイレンシング効果により評価した。その結果、センス鎖 10, 11 の位置に化学修飾ヌクレオシドを組み込むことにより細胞内安定性が増強されることを見出した。

(7) 化学修飾 siRNA とペプチド導入剤と組み合わせた遺伝子サイレンシング法の開発  
新規化学修飾ヌクレオシドを組み入れた siRNA とペプチド導入剤と組み合わせることによりヒト白血病細胞に発現する bcr/abl 遺伝子 mRNA を標的としたサイレンシング効果を評価した。その結果、新規両親媒性ペプチド導入剤を用いることにより、細胞毒性の低減、細胞内ヌクレアーゼ耐性の増強に成功し、サイレンシング効果も向上することを見出した。

(8) 化学修飾塩基を組み込んだ siRNA の合

成と RNA 干渉効果の増強

申請者等は新規ヌクレオシドをダンダリングエンドに組み込むと二重鎖 DNA/RNA が強く安定化されることをこれまでの研究で明らかにしている。今回、5' -末端および 3' -末端に化学修飾塩基を導入した新規 siRNA 分子を化学合成し、血清中でのヌクレアーゼ耐性を向上させることと off-target 効果を軽減することに成功した。また、これらのサイレンシング効果を評価した結果とヒトアルゴノートタンパクの機能構造を照合し、siRNA のどの個所のどのような化学修飾が RNA 干渉作用にどのような影響を与えるかについて合理的に考察する有力な情報を得ることができた。

(9) 化学修飾 siRNA とペプチド導入剤と組み合わせた無毒性細胞内デリバリー法の開発

(10) の化学修飾 siRNA とペプチド導入剤と組み合わせることにより細胞毒性の低減、細胞内ヌクレアーゼ耐性の増強、off-target 効果の軽減に成功した siRNA を毒性なく細胞内に導入して、遺伝子サイレンシング効果を発揮できる方法を開発することができた。次には in vivo での効果を実証したい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

① Base-pairing selectivity of a ureido-linked phenyl-2'-deoxycytidine derivative

Shu-ichi Nakano, Hirohito Oka, Yuuki Uotani, Kazuya Uenishi, Masayuki Fujii and Naoki Sugimoto

*Organic & Biomolecular Chemistry*, **2012**,10, 9664-9670.

② Non-toxic delivery of siRNA by amphiphilic peptides and silencing of hTERT

Masayuki Fujii and Shutaro Fujiaki

*Journal of Peptide Science*, **2012**, 18, 498-499.

③ Synthesis, Delivery and Gene Silencing of

siRNA-NES Conjugates

Masayuki Fujii and Irmina Diala

*Progress in Drug Delivery Systems*, **2011**, 10, 91-96.

④ Use of Nucleic Acid Analogs for the Study of Nucleic Acid Interactions

Shu Ichi Nakano, Masayuki Fujii and Naoki Sugimoto

*Journal of Nucleic Acids*, **2011**, 2011, 1-11.

⑤ Stacking interaction in the middle and at the end of a DNA helix studied with non-natural nucleotides

Shu-ichi Nakano, Hirohito Oka, Yuuki Uotani, Kazuya Uenishi, Masayuki Fujii and Naoki Sugimoto

*Molecular BioSystems*, **2010**, 6, 2023-2029.

⑥ Specific Suppression of bcr/abl mRNA by Chemically Modified siRNAs Targeting b3a2 Transcripts

Masayuki Fujii, Irmina Diala, Kazuya Uenishi, Shu-ichi Nakano<sup>3</sup> and Naoki Sugimoto

*Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **2010**, 29, 548-549.

⑦ Synthesis of siRNA-Peptide Conjugates by Solid Phase Fragment Condensation

Masayuki Fujii and Irmina Diala

*Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **2010**, 29, 546-547.

⑧ Highly Enhanced Silencing Effect by siRNA-Nuclear Export Signal Peptide Conjugates

Masayuki Fujii and Irmina Diala

*Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **2010**, 29, 544-545.

⑨ Suppression of Telomerase Activity and Proliferation of Cancer Cell Lines by siRNA Targeting hTERT mRNA

Masayuki Fujii and Irmina Diala

*Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, **2010**, 29, 542-543.

[学会発表] (計 43 件)

① シグナルペプチドコンジュゲートによる siRNA の細胞内デリバリーと遺伝子サイレンシング

藤明 修太郎・小幡 淳一・藤井 政幸

日本化学会第 93 春期年会、2013 年 3 月 22-25 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス

② siRNA-ペプチド複合体による細胞内デリバリーと遺伝子サイレンシング

藤井政幸, 藤明修太郎, 小幡淳一

第30回メディスナルケミストリーシンポジウム、2012年11月28-30日、タワーホール船堀、東京

③ Specific Delivery of siRNA by Amphiphilic Peptide-Signal Peptide Conjugates

Shutaro Fujiaki, Junichi Obata, Masayuki Fujii

第 39 回国際核酸化学シンポジウム、2012 年 11 月 15-17 日、名古屋

④ 核酸とペプチドの機能融合による bcr/abl 遺伝子サイレンシング

小幡淳一・藤明修太郎・藤井政幸

2012 年日本化学会西日本大会、2012 年 11 月 10-11 日、佐賀

⑤ 新規ハイブリッドペプチドによる siRNA の細胞導入と遺伝子サイレンシング

藤明修太郎・小幡淳一・藤井政幸

2012 年日本化学会西日本大会、2012 年 11 月 10-11 日、佐賀

⑥ 新規小ペプチドによる siRNA の無毒性細胞導入

藤井政幸、藤明修太郎、小幡淳一

第49回ペプチド討論会、2012年11月7-9日、鹿児島

⑦ Non-toxic Delivery and Gene Silencing by siRNA-Hybrid Peptide Complex

Shutaro Fujiaki, Junichi Obata, Masayuki Fujii

8<sup>th</sup> Annual Meeting of the Oligonucleotide

Therapeutics Society, October 28-31, 2012.

Boston, MA.

⑧ペプチド-siRNA複合体の無毒性細胞導入と遺伝子サイレンシング

藤明修太郎, 小幡淳一, 藤井政幸

第2回CSJ化学フェスタ2012 10月14-17日 横浜(慶応大学日吉キャンパス)

⑨両親媒性ハイブリッドペプチドによるsiRNA特異的無毒性細胞導入

藤井政幸・藤明修太郎・小幡淳一

第22回アンチセンスシンポジウム、2012年9月24-26日、仙台

⑩siRNA-NESコンジュゲートの合成、デリバリー、遺伝子サイレンシング

藤井政幸, Irmina Diala

第20回DDSカンファランス, 静岡, 2011年9月16-17日

⑪Non-toxic delivery of siRNA by amphiphilic peptides and silencing of hTERT

Masayuki Fujii and Shutaro Fujiaki

32<sup>nd</sup> European Peptide Symposium, 2-7 September 2012, Athen

⑫NON-TOXIC INTRACELLULAR DELIVERY AND EFFICIENT GENE SILENCING BY FUNCTIONAL FUSION OF siRNA AND PEPTIDES

Shutaro Fujiaki and Masayuki Fujii

XX International Roundtable on Nucleosides and Nucleic Acids, 5-9 August 2012, Montreal

⑬塩基性両親媒性ペプチドと二重鎖核酸との相互作用

西川 勇輝、増田 春菜、松原 愛、藤井政幸

第49回化学関連支部合同九州大会、2012年6月30日、北九州国際会議場

⑭新規両親媒性ペプチドによるsiRNAの無毒性細胞導入とhTERT遺伝子サイレンシング

池辺 貴彦、橋本 武志、藤井 政幸

第49回化学関連支部合同九州大会、2012年6月30日、北九州国際会議場

⑮核酸とペプチドの機能融合によるbcr/abl遺伝子サイレンシング

小幡 淳一、山岡 史典、藤井 政幸

第49回化学関連支部合同九州大会、2012年6月30日、北九州国際会議場

⑯新規ハイブリッドペプチドによるsiRNAの細胞導入

藤明修太郎、行武 陽介、藤井 政幸

第49回化学関連支部合同九州大会、2012年6月30日、北九州国際会議場

⑰新規ハイブリッドペプチドによるsiRNAの細胞導入

藤明修太郎、行武 陽介、藤井 政幸

第49回化学関連支部合同九州大会、2012年6月30日、北九州国際会議場

⑱両親媒性ペプチドによるsiRNAの無毒性細胞内デリバリーとhTERTサイレンシング

藤明修太郎、藤井政幸

日本化学会第92回春季年会 2012年3月25-28日、慶応大学日吉キャンパス

⑲ペプチドと核酸の機能融合による細胞内デリバリーと遺伝子サイレンシング

藤明修太郎、藤井政幸

日本化学会第92回春季年会 2012年3月25-28日、慶応大学日吉キャンパス

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: 細胞への核酸導入方法、核酸キャリア及び核酸複合体

発明者: 藤井政幸

権利者: (財)北九州産業学術推進機構

種類: PCT出願

番号: PCT/JP2011/065612

出願年月日: 2011年7月7日

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 政幸 (FUJII MASAYUKI)

近畿大学・産業理工学部・教授

研究者番号: 60199297