

Scheme 10 Synthetic cycle for stereoregulated PS-ODNs using *N*-acyl-oxazaphospholidine monomers **52**.

which requires switching monomer sets to synthesize PS/PO-chimeric oligonucleotides, as described above. This method may also be compatible with the phosphoramidite method because the intermediates do not have phosphorothioate diesters, which are sensitive to oxidizing agents, although two sets of monomers and activators would be necessary.

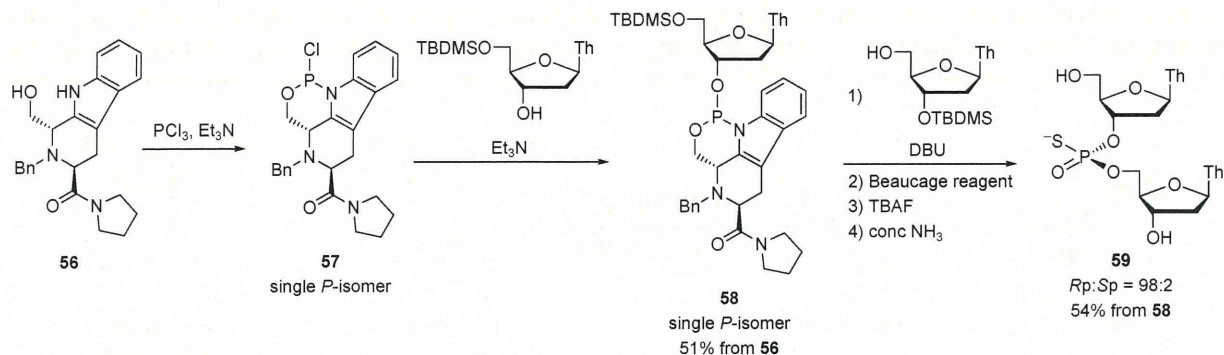
5.4. Stereoselective synthesis of monomer units and their application to the synthesis of stereoregulated *P*-chiral oligonucleotide analogs

The methods using a base-promoted condensation of diastereopure monomers give the desired *P*-chiral oligonucleotides with complete stereospecificity as described in the previous section. However, the separation of monomers from diastereomixtures

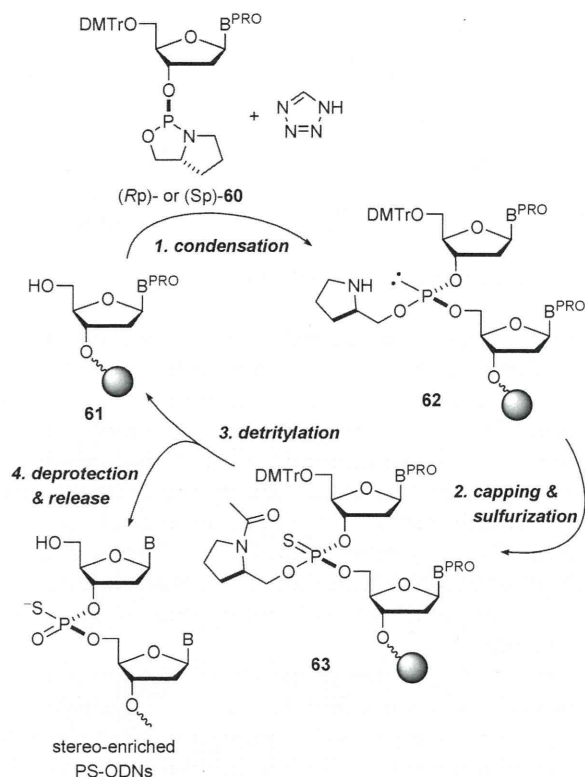
(*ca.* 1 : 1) by chromatography is troublesome. The reactive P^{III} monomers suffer from partial decomposition during the chromatographic resolution, whereas the efficiency of condensation reactions of the more stable P^V monomers is relatively low, although they can be separated without decomposition. To overcome this problem, various studies targeting the development of monomers that can be stereoselectively synthesized have been conducted.

Just *et al.* have reported several types of 2'-deoxyribo-nucleoside 3'-*O*-indolooxazaphosphorine monomers that can be stereoselectively synthesized using chiral auxiliaries and applied them to the synthesis of PS-ODN 2mers.^{87,88} For example, they synthesized an optically pure amino alcohol (Scheme 11, **56**) from *N*_b-(benzyloxycarbonyl)-tryptophan and used it as a chiral auxiliary in the synthesis of a thymidine 3'-*O*-indolooxazaphosphorine derivative **58**.⁸⁸ Only one of the two possible *P*-isomers of **58** was obtained stereoselectively. (Configuration of the phosphorus atom was not assigned.) Compound **58** was then allowed to react with 3'-*O*-TBDMS-thymidine in the presence of DBU. The reaction was almost completely stereospecific, and after subsequent sulfurization and deprotection, (*Rp*)-dithymidine phosphorothioate (**59**) (*Rp* : *Sp* = 98 : 2) was obtained. Although this monomer and the other indolooxazaphosphorine derivatives have not been applied to the synthesis of oligonucleotides longer than 2mers, these studies have clearly demonstrated that such monomers, which can be stereoselectively synthesized by using chiral auxiliaries, can be employed for the synthesis of internucleotidic chiral phosphate analogs *via* a base-promoted stereospecific reaction.

On the other hand, Agrawal *et al.* have reported the stereoselective synthesis of nucleoside 3'-*O*-oxazaphospholidine derivatives and their applications as monomer units for oligonucleoside phosphorothioates (Scheme 12).⁸⁹⁻⁹² Monomers **60** were synthesized by the reaction of the corresponding protected nucleosides bearing a 3'-OH with the prolinol-derived 2-chloro-1,3,2-oxazaphospholidine.^{90,92} Only the *trans* isomers were obtained stereoselectively from both *L*- and *D*-prolinols. Unlike the *N*-acyl-oxazaphospholidine monomers **52** shown in Scheme 10 and the indolooxazaphosphorine monomer **58** shown in Scheme 11, the condensation reactions of the oxazaphospholidine monomers **60**, which were activated by 1*H*-tetrazole like the widely used phosphoramidite monomers, were not stereospecific. When eight dinucleoside



Scheme 11 Synthesis of (*Rp*)-T_{ps}T **59** *via* stereoselective synthesis of thymidine 3'-*O*-indolooxazaphosphorine derivative **58** and its stereospecific condensation promoted by DBU.



Scheme 12 Synthetic cycle for stereo-enriched PS-ODNs using prolinol-derived oxazaphospholidine monomers **60**.

phosphorothioates (*Rp*)- and (*Sp*)-d[N_{PS}T] (N = A, T, G, C) were synthesized by using this cycle, it was observed that diastereoselectivity varied from *Rp* : *Sp* = 10 : 90 to 14 : 86 for (*Sp*)-d[N_{PS}T] and from *Rp* : *Sp* = 93 : 7 to 91 : 9 for (*Rp*)-d[N_{PS}T].^{90,92} The partial loss of diastereopurity can be attributed to the repetitive nucleophilic attacks of 1*H*-tetrazole at the chiral phosphorus atom of **60** leading to its epimerization, similar to the case of the phosphoramidite monomer (Scheme 5). The subsequent condensation reactions *via* both of the resulting two *P*-isomers of **60** and/or its tetrazolidine active intermediate give rise to the diastereomixtures of the products. Although stereoselectivity is not very high, the method can produce relatively long stereoenriched PS-ODN oligomers on an automated DNA synthesizer by using the same protocol as that of the conventional phosphoramidite method. All-(*Rp*)- and (*Sp*)-PS-ODN 18–20mers as well as those containing both (*Rp*)- and (*Sp*)-PS-linkages were synthesized in *ca.* 98% average yield per cycle (estimated by the DMTr⁺ assay).⁹²

The stereoselectivity of this method is dependent on the structure of the monomers, activators, and reaction conditions. For example, Hayakawa *et al.* have reported that the stereoselectivity of the reactions between **60** and a nucleoside in a solution phase varied from *Rp* : *Sp* = 86 : 14 to >99 : 1 with *D*-prolinol-derived monomers and from *Rp* : *Sp* = 29 : 71 to 1 : 99 with the *L*-prolinol-derived counterparts depending on the activator.⁹³ Best results were obtained by using *N*-phenylimidazolium triflate (PhIMT)⁹⁴ or benzimidazolium triflate (BIT).⁹⁵ (Stereoselectivity was slightly lower on a solid support (up to 94 : 6).) Agrawal *et al.* have reported that the ephedrine-derived monomer **64** (Fig. 7) gave T_{PS}T with little stereoselectivity

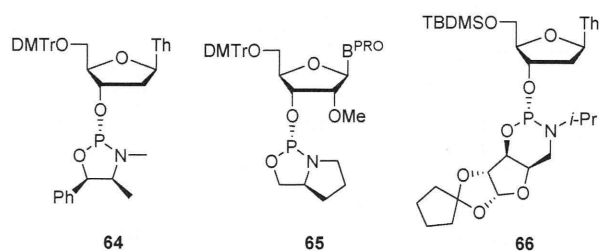


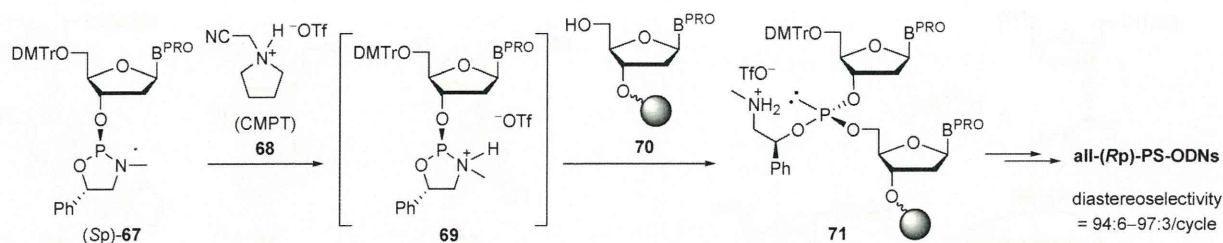
Fig. 7 Nucleoside 3'-*O*-oxazaphospholidine (**64**, **65**) and 3'-*O*-oxazaphosphorinane (**66**) monomers for stereoselective synthesis of dinucleoside phosphorothioates.

(*Rp* : *Sp* = 40 : 60) under conditions similar to those used for **60**.⁸⁹ The *L*-prolinol-derived 2'-*OMe*-ribonucleoside 3'-*O*-oxazaphospholidine monomers **65** gave (*Sp*)-2'-*OMe*-diribonucleoside phosphorothioates with diastereoselectivity ranging from *Rp* : *Sp* = 2 : 98 to 4 : 96, whereas the *D*-prolinol-derived counterpart gave (*Rp*)-2mers with significantly lower stereoselectivity (from *Rp* : *Sp* = 76 : 24 to 63 : 37).⁹¹ This indicates that the biased effects of the ribonucleoside chirality on stereoselectivity can be an important factor in the synthesis of *P*-chiral oligonucleotides with a stereoselective reaction. Just *et al.* synthesized a series of thymidine 3'-*O*-oxazaphosphorinane derivatives (*e.g.* **66**) with complete stereoselectivity from 2-chloro-oxazaphosphorinanes and used them to synthesize T_{PS}T under various reaction conditions.^{96,97} They found that T_{PS}T was obtained with excellent diastereoselectivity at low temperatures (*Rp* : *Sp* = 1 : 40 at 0 °C; 1 : 68 at -15 °C, 2-bromo-4,5-dicyanoimidazole, CHCl₃), while a significantly lower diastereoselectivity was observed at rt (*Rp* : *Sp* = 1 : 6, 2-bromo-4,5-dicyanoimidazole, MeCN).⁹⁷

Thus, the diastereomeric resolution of monomers by chromatography can be circumvented by using monomers that can be stereoselectively synthesized. Among these, the monomers that can be activated by weak acids^{89–93,96,97} are particularly attractive because they are fully compatible with the phosphoramidite method, and the synthesis of oligomers can be performed with a commercial DNA synthesizer using this method. However, the loss of diastereopurity of the monomers during the acid-promoted condensations is problematic. As shown above, it is difficult to develop a stereospecific azole-promoted condensation reaction applicable to both ribonucleotide and 2'-deoxyribonucleotide analogs. Although diastereoselectivity can be improved by lowering the reaction temperature,^{96,97} this approach is not suitable for syntheses on an automated synthesizer.

Considering this background, our group initiated a project to develop a method consisting of a stereoselective synthesis of monomers, which could be used to generate stereoregulated *P*-chiral oligonucleotide analogs under stereospecific, acid-promoted reaction conditions.^{98–103} Ideally, the method should be fully compatible with the phosphoramidite method and applicable to a solid-phase synthesis on an automated DNA synthesizer. Such a method would greatly facilitate the synthesis of stereoregulated *P*-chiral oligonucleotides and encourage their use.

It is reasonable to predict that the condensation of diastereopure nucleoside 3'-*O*-oxazaphospholidine derivatives would proceed stereospecifically if they are activated only by



Scheme 13 Stereocontrolled synthesis of PS-ODNs using less nucleophilic activator **68**.

N-protonation of the oxazaphospholidine ring without using a nucleophilic activator. Although it was shown that weaker nucleophilic activators were not effective with phosphoramidite derivatives,^{104,105} it was found that less nucleophilic *N*-(cyanomethyl)dialkylammonium salts efficiently activated nucleoside 3'-*O*-oxazaphospholidine monomers.^{98,99} Stereo-regulated PS-ODNs were synthesized by using one of these activators, *N*-(cyanomethyl)pyrrolidinium triflate (CMPT, **68**), on a solid support (Scheme 13).⁹⁹ 2'-Deoxyribonucleoside 3'-*O*-oxazaphospholidine monomers (**67**) were generated from the corresponding 2-chlorooxazaphospholidine derivative and protected nucleosides having a 3'-OH with dr of 93 : 7–96 : 4 (*trans* : *cis*) and the *trans* isomers were isolated by silica gel column chromatography in 62%–75% yields. It was expected that CMPT **68** would activate the P–N bond of monomers **67** only by *N*-protonation, and their subsequent condensation with the 5'-OH of nucleosides or oligonucleotides **70** would proceed without loss of diastereopurity. However, the HPLC analysis of the resultant PS-ODNs showed that the average diastereoselectivity per cycle was *ca.* 94 : 6–97 : 3, although the major products were generated with inversion of configuration, as expected.

Because it was found that the partial loss of diastereopurity was due to epimerization of the monomers **67** by the acidity of **68**,⁹⁹ the configurational stability of oxazaphospholidine monomers was investigated.¹⁰¹ Four types of nucleoside 3'-*O*-oxazaphospholidine monomers, shown in Fig. 8 (**60**, **67**, **72**, and **73**), were synthesized with dr ranging from 95 : 5

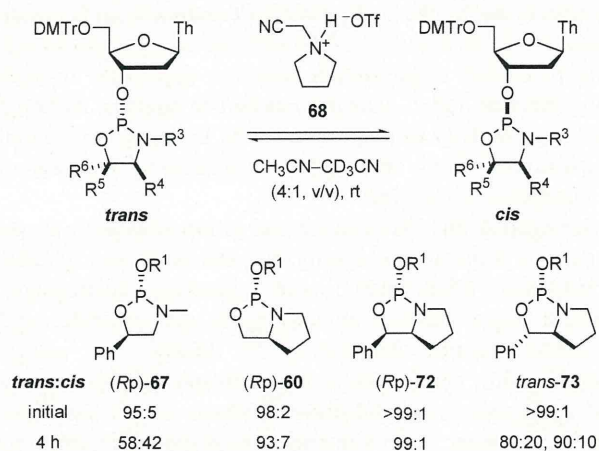
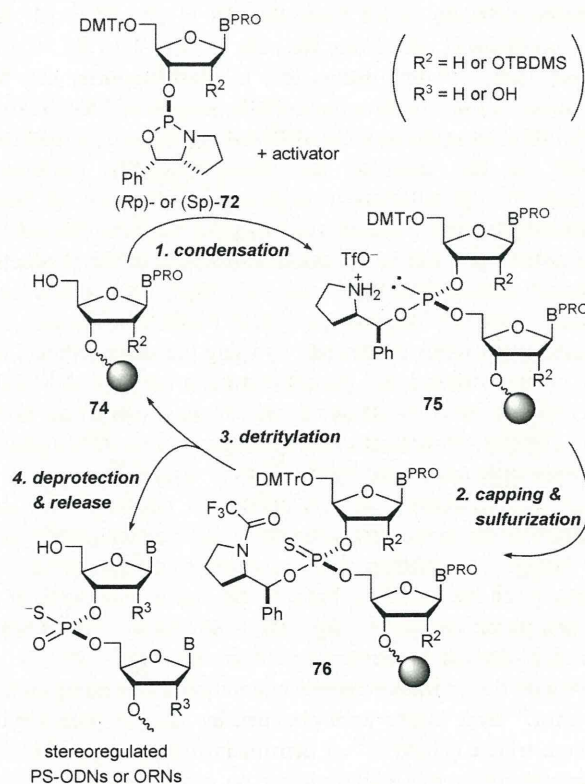


Fig. 8 Epimerization of *trans*-nucleoside 3'-*O*-oxazaphospholidine monomers **67**, **60**, **72** and **73** in the presence of CMPT **68**. R¹ = 5'-DMTr-thymidin-3'-yl. *trans*-**73** is a mixture of (2*S*,4*R*,5*R*)- and (2*R*,4*S*,5*S*)-isomers. dr of (2*S*,4*R*,5*R*)-**73** and (2*R*,4*S*,5*S*)-**73** were 80 : 20 and 90 : 10, respectively, after treatment with **68**.

to > 99 : 1 (*trans* : *cis*) and treated with 2 equiv. of CMPT **68** in CH₃CN–CD₃CN (4 : 1, v/v) at rt. After 4 h, ³¹P NMR analysis showed that the *trans* : *cis* ratio of monomer **67** changed from 95 : 5 to 58 : 42. In sharp contrast, the other bicyclic oxazaphospholidine derivatives showed significantly improved stability to epimerization. In particular, monomer **72** showed only negligible inversion. In addition, the *trans* isomer of **72** was exclusively generated from the corresponding 2-chlorooxazaphospholidine and the protected nucleoside. Therefore, diastereomeric resolution by chromatography was not necessary.

Monomer **72** was then applied to the synthesis of stereo-regulated PS-ODNs on a DNA synthesizer.¹⁰¹ The eight types of monomers **72** ((*Rp*)- and (*Sp*)-isomers for each of the four nucleobases) were synthesized in 44%–58% yields. The synthetic cycle (Scheme 14) is very similar to that shown in Scheme 12 as well as to that of the conventional phosphoramidite method except for the reagents. Monomers **72** and CMPT **68** are used for the condensation step. *N*-Trifluoroacetylimidazole (CF₃COIm) and *N,N'*-dimethylthiuram disulfide (DTD)¹⁰⁶

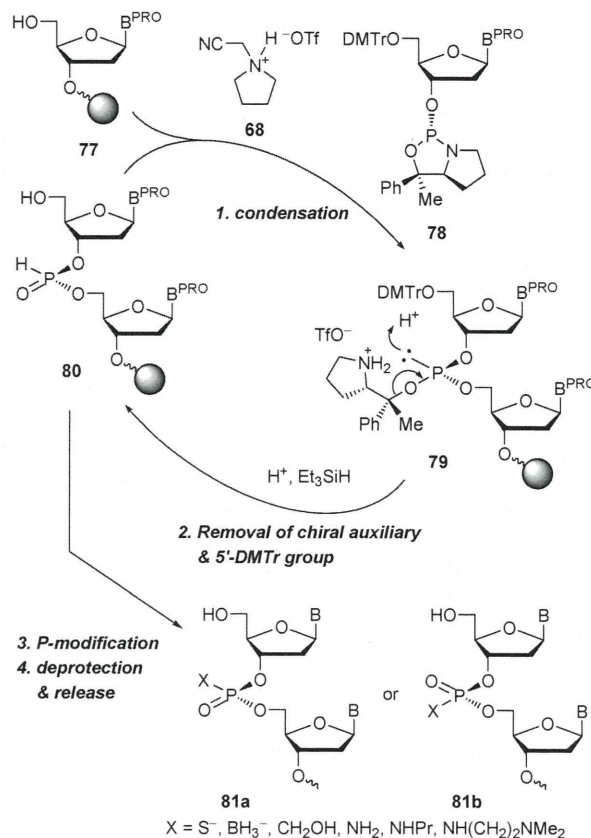


Scheme 14 Synthetic cycle for stereoregulated PS-ODNs and ORNs by the oxazaphospholidine method.

are used for the capping and sulfurization steps. Trifluoroacetylation was used for capping instead of acetylation because the *N*-acetylated pyrrolidinylmethyl moiety on the PS-linkages was too stable for complete deprotection by ammonia. The average coupling yields and diastereoselectivity for the synthesis of 8–12mers were 95%–99% and $\geq 99\%$, respectively. Thus, stereospecific condensation reactions were achieved by the use of the configurationally stable bicyclic oxazaphospholidine monomers **72**.

Next, the oxazaphospholidine method was applied to the synthesis of stereoregulated PS-ORNs.¹⁰² The *trans* isomers of **72** bearing a 2'-*O*-TBDMS group were stereoselectively synthesized (*trans* : *cis* > 99 : 1, 41%–75% isolated yields) and applied to the same synthetic cycle. However, it was found that the average coupling yields for the synthesis of 4mers were significantly lower (67%–94%) than those observed with the 2'-deoxyribonucleoside monomers. The lower reactivity was attributed to steric hindrance by the 2'-*O*-TBDMS group. To our surprise, this problem was overcome by using highly nucleophilic azole activators. The use of PhIMT or BIT greatly improved the efficiency of the condensation reactions, and all-(*R*p)- and (*S*p)-[U_{PS}]₉U were synthesized in 97%–99% average coupling yields (DMTr⁺ assay). The diastereoselectivity of the couplings was comparable or nearly comparable to that obtained by using CMPT (96 : 4 to >99 : 1). The mechanism of the reaction promoted by these azoles is not clear. It may proceed *via* *N*-protonation of the oxazaphospholidine ring as in the case of CMPT, or the dynamic kinetic resolution of the diastereomixture of azolide intermediates may occur. However, the success could be attributed to the configurational stability of the bicyclic oxazaphospholidine monomers **72** because condensation of the monocyclic oxazaphospholidine monomer **67** resulted in low diastereoselectivity when nucleophilic 1*H*-tetrazole was used as an activator.⁹⁸

It has also been demonstrated that the oxazaphospholidine method can be used to synthesize other *P*-chiral oligonucleotide analogs. As shown in Scheme 15, the synthesis uses the bicyclic oxazaphospholidine monomers **78** bearing an additional methyl group at the 5-position of the oxazaphospholidine ring in place of the monomers **72**.¹⁰³ The *trans* isomers of **78** have been stereoselectively synthesized (dr > 99 : 1) and isolated in 43%–83% yields. The condensation reactions of **78** promoted by CMPT **68** give diastereopure phosphite intermediates **79**. Treatment of **79** with an acidic solution causes an E1 reaction, generating the 5'-detritylated *H*-phosphonate diester intermediates **80** and a tertiary carbocation stabilized by the phenyl group. The acidic solution contains Et₃SiH as a carbocation scavenger. Thus, this two-step cycle produces oligodeoxyribonucleoside *H*-phosphonates stereospecifically. To the best of our knowledge, this is the first example of a stereocontrolled synthesis of *H*-phosphonate diesters. Because *H*-phosphonate diesters can be converted into a variety of *P*-modified phosphate analogs,²⁶ this method can greatly expand the availability of stereoregulated *P*-chiral oligonucleotides. In fact, dinucleoside boranophosphates, hydroxymethylphosphonates, and several types of phosphoramidates were synthesized with dr ranging from 98 : 2 to >99 : 1. Oligodeoxyribonucleoside boranophosphates and phosphoramidate 4mers were also synthesized in addition to PS-ODN



Scheme 15 Synthetic cycle for stereoregulated *P*-chiral oligonucleotide analogs **81** via oligonucleoside *H*-phosphonates **80** by the oxazaphospholidine method.

10mers, although the conversion of the *H*-phosphonates into boranophosphates and phosphoramidates was less efficient compared to the case of PS-ODNs.¹⁰³

Thus, the oxazaphospholidine method that uses configurationally stable bicyclic oxazaphospholidine monomers and CMPT (or azoles) can produce various *P*-chiral oligonucleotide analogs in a stereospecific manner. Because this method is compatible with the phosphoramidite method, it is expected to be applicable to the stereocontrolled synthesis of chimeric *P*-chiral oligonucleotide analogs as well as oligonucleotides with a fully-modified backbone by varying oxazaphospholidine/phosphoramidite monomers, CMPT/azole activators, and/or *P*-modification/oxidation steps. However, the method still has some problems: (1) because the oxazaphospholidine monomers are more sensitive to acids than the corresponding phosphoramidites, their isolation yields by chromatography are modest, although diastereomeric resolution is not necessary. (2) The efficiency of the condensation reactions needs improvement for the synthesis of long oligomers. In the case of ORN derivatives, the combinational use of CMPT and a less-bulky protecting group for 2'-OH than the conventional TBDMS group can be studied. (3) The efficiency of conversion of *H*-phosphonate diester linkages into *P*-modified phosphate analogs, such as boranophosphates, on a solid support must be improved. (4) Protocols for the synthesis of oligonucleotides with a chimeric backbone must be studied. A study is currently underway to address these problems.

6. Applications of stereoregulated *P*-chiral oligonucleotide analogs

The *P*-chiral oligonucleotide analogs have been primarily used for therapeutic applications and for studies of enzymatic reactions. For the latter purposes, those having a single *P*-modification at a specific site have been used in most cases. Because these oligonucleotides are available by HPLC separation or by using dimer building blocks, many studies have employed them to elucidate the interactions of specific pro-*Rp* or *Sp* oxygens with metal ions or amino acid residues in enzymatic reactions.^{10,21} However, many internucleotidic phosphates are involved in the recognition of an oligonucleotide by an enzyme,^{21,107} and thus, many oligonucleotides with a modified phosphate at specific sites are required to study such a recognition process in detail. Because it is laborious to prepare many oligonucleotides by HPLC separation or by using dimer building blocks, the development of a method that can readily produce such oligonucleotide analogs in a stereocontrolled manner is required.

In contrast, oligonucleotides with multiple modifications or a fully-modified backbone are used for therapeutic applications because such modifications are necessary to enhance their stability to nucleases. Many studies on their physicochemical and biological properties, such as the stability of duplexes with complementary oligonucleotides, cellular uptake, stability to nucleases, nonspecific interactions with proteins, and the ability to suppress gene expression, have been performed using oligonucleotides prepared by stereocontrolled chemical syntheses, HPLC separation, the dimer building block method, or enzymatic synthesis, and these studies have shown that their properties were affected by the configuration of the phosphorus atoms. For example, in the case of PS-ODN, (*Rp*)-PS-linkages are favored for duplex formation with complementary ORN strands,⁷³ while (*Sp*)-PS-linkages are chosen to enhance the stability to nucleases.⁷⁸ Therefore, PS-ODNs in which both (*Rp*)- and (*Sp*)-PS-linkages are properly arranged would be better drug candidates than those synthesized in a nonstereocontrolled manner. However, more research is required prior to any clinical trials. For this purpose, it is necessary to expand the availability of stereoregulated *P*-chiral oligonucleotide analogs—particularly, the most widely used PS-ODNs—by developing more efficient methods for their stereocontrolled synthesis. Moreover, new methods may lead to the identification of novel types of *P*-modifications suitable for therapeutic applications. Currently, only a few types of *P*-chiral oligonucleotide analogs, such as PS-ODNs, are used for therapeutic studies, partly because the introduction of a large substituent into an internucleotidic phosphate of an oligonucleotide in a nonstereocontrolled manner significantly destabilizes its duplex with a complementary oligonucleotide.^{108,109} Because the destabilization is reduced when the substituent is oriented outward from the duplex, the variety of *P*-chiral oligonucleotide analogs potentially suitable for therapeutic applications may increase.

Stereoregulated *P*-chiral oligonucleotides have rarely been used beyond the two objectives highlighted above. But the limited studies carried out to date have demonstrated their potential. For example, oligonucleotides having a stereodefined

PS-linkage can be used to synthesize their conjugates with other functional molecules, such as reporter molecules, through *S*-alkylation.^{10,110,111} Stereodefined phosphoramidate linkages (PN-linkages) have also been used to make such conjugates.^{112,113} Duplex formation of these conjugates with complementary oligonucleotides is not severely hampered by using cross links through stereodefined (*Sp*)-PS- or (*Rp*)-PN-linkages because the substituents are oriented outward,¹¹⁰ although it has also been reported that the introduction of an intercalator through an (*Rp*)-PS-linkage stabilized the duplex.^{111,113} A stereocontrolled synthesis is also advantageous because a more precise orientation of these functional molecules around duplexes is possible. Analyses of these diastereopure conjugates are also easier than their stereochemically-randomized counterparts. Moreover, it has been reported that duplex structures can be globally transformed by changing the absolute configuration of the phosphorus atoms. For instance, Endo and Majima have reported that double-stranded ODNs consisting of two self-complement ODN strands, which are cross linked to each other through stereodefined PN-linkages, form either double helices or hairpins depending on the absolute configuration of the PN-linkages.¹¹⁴ They have also reported stereodependent behaviors of various DNA nanostructures consisting of oligonucleotides cross linked to each other through stereodefined PN-linkages.^{115–117} In addition, significant stabilization of an ORN hairpin structure has been reported by introducing an (*Rp*)-PS-linkage at a specific site in its loop region.¹¹⁸ Such stabilization of oligonucleotide secondary structures has also been achieved with some conformationally restricted nucleotide analogs^{119–123} in which one of the non-bridging oxygen atoms of a phosphodiester is covalently linked to the ribose (*e.g.*, **82**,¹²¹ **83**¹²³ in Fig. 9). It has also been reported that left-handed *Z*-form duplexes can be stabilized by using ODNs with a specific arrangement of (*Rp*)- and (*Sp*)-PS-linkages.⁸² Such stereodependent behaviors of *P*-chiral oligonucleotides and stabilization of specific oligonucleotide structures by using stereodefined *P*-modifications may be useful for DNA nanotechnology.^{6–9} However, in many cases, the oligonucleotide analogs for such studies have been prepared by HPLC separation or the dimer building block method because the methods for stereocontrolled synthesis of *P*-chiral oligonucleotides, such as the oxathiaphospholane and oxazaphospholidine methods, are still too complicated for a typical end-user. The development of a more user-friendly method to synthesize stereoregulated *P*-chiral oligonucleotides or commercialization of the monomers or the oligonucleotides themselves should encourage their use and promote studies of DNA nanotechnology as well as those for the biological and therapeutic applications described above.

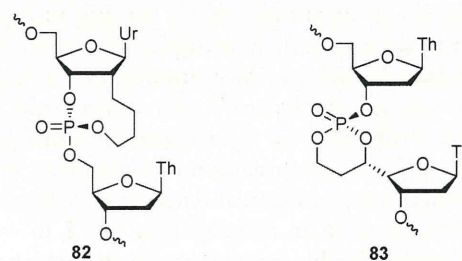


Fig. 9 Conformationally restricted *P*-chiral nucleotide analogs.

7. Conclusion

In conclusion, stereoregulated *P*-chiral oligonucleotide analogs have been used for biological and therapeutic studies. In addition, they are potentially useful for the synthesis of oligonucleotide conjugates and also for DNA nanotechnology. In order to promote studies on these applications, the development of a user-friendly method to produce these oligonucleotide analogs is required such that nonspecialists can perform the synthesis, preferably on an automated synthesizer. We expect that this goal is achievable either by further studies on the aforementioned methods or by the development of a novel, more efficient approach, such as a catalytic asymmetric synthesis of *P*-chiral phosphate analogs. New developments from other areas of chemistry, such as those from ongoing research on organophosphorus compounds or catalytic asymmetric synthesis, may be important to achieve this challenging goal.

Acknowledgements

The research in the authors' laboratory was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology (MEXT) and Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) and by grants from the New Energy and Industrial Technology Development Organization (NEDO) Japan for its Functionalized RNA Project, Suzuken Memorial Foundation and Futaba Electronics Memorial Foundation. The authors thank their coworkers Professor K. Saigo (Kochi University of Technology), Dr N. Iwamoto, T. Sato, M. Yamamoto, T. Kondo, S. Fujiwara, Y. Maizuru, and Dr M. Shimizu for their contributions to the authors' studies.

References

- 1 C. J. Echeverri and N. Perrimon, *Nat. Rev. Genet.*, 2006, **7**, 373–384.
- 2 D. Bumcrot, M. Manoharan, V. Koteliansky and D. W. Y. Sah, *Nat. Chem. Biol.*, 2006, **2**, 711–719.
- 3 E. R. Rayburn and R. Zhang, *Drug Discovery Today*, 2008, **13**, 513–521.
- 4 A. Sassolas, B. D. Leca-Bouvier and L. J. Blum, *Chem. Rev.*, 2008, **108**, 109–139.
- 5 C. Basille, R. Frydman, A. E. Aly, L. Hesters, R. Fanchin, G. Tachdjian, J. Steffann, M. LeLorc'h and N. Achour-Frydman, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2009, **145**, 9–13.
- 6 N. C. Seeman, *Mol. Biotechnol.*, 2007, **37**, 246–257.
- 7 F. A. Aldaye, A. L. Palmer and H. F. Sleiman, *Science*, 2008, **321**, 1795–1799.
- 8 M. Endo and H. Sugiyama, *ChemBioChem*, 2009, **10**, 2420–2443.
- 9 A. Kuzuya and M. Komiyama, *Nanoscale*, 2010, **2**, 310–322.
- 10 S. Verma and F. Eckstein, *Annu. Rev. Biochem.*, 1998, **67**, 99–134.
- 11 J. Kurreck, *Eur. J. Biochem.*, 2003, **270**, 1628–1644.
- 12 C. Wilson and A. D. Keefe, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2006, **10**, 607–614.
- 13 A. A. Levin, *Biochim. Biophys. Acta*, 1999, **1489**, 69–84.
- 14 S. Shukla, C. S. Sumaria and P. I. Pradeepkumar, *ChemMedChem*, 2010, **5**, 328–349.
- 15 P. O. P. Ts'o, P. S. Miller and J. J. Greene, in *Development of Target-Oriented Anticancer Drugs*, ed. Y.-C. Cheng *et al.*, Raven Press, New York, 1983, pp. 189–206.
- 16 Z. Lesnikowski, *Bioorg. Chem.*, 1993, **21**, 127–155.
- 17 W. J. Stec and A. Wilk, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 1994, **33**, 709–722.
- 18 A. V. Lebedev and E. Wickstrom, *Perspect. Drug Discovery Des.*, 1996, **4**, 17–40.
- 19 L. A. Wozniak, *Rev. Heteroat. Chem.*, 1999, **19**, 173–202.
- 20 Y. Lu, *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2006, **6**, 319–330.
- 21 P. Guga, *Curr. Top. Med. Chem.*, 2007, **7**, 695–713.
- 22 F. Eckstein, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 2000, **10**, 117–121.
- 23 G. Zon, *New J. Chem.*, 2010, **34**, 795–804.
- 24 N. Carrasco and Z. Huang, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **126**, 448–449.
- 25 N. Carrasco, J. Caton-Williams, G. Brandt, S. Wang and Z. Huang, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2006, **45**, 94–97.
- 26 A. Kraszewski and J. Stawinski, *Pure Appl. Chem.*, 2007, **79**, 2217–2227.
- 27 F. R. Atherton, H. T. Openshaw and A. R. Todd, *J. Chem. Soc.*, 1945, 660–663.
- 28 F. R. Atherton and A. R. Todd, *J. Chem. Soc.*, 1947, 674–678.
- 29 P. Li, Z. A. Sergueeva, M. Dobrikov and B. R. Shaw, *Chem. Rev.*, 2007, **107**, 4746–4796.
- 30 PDB ID: 8PSH, M. Bachelin, G. Hessler, G. Kurz, J. G. Hacia, P. B. Dervan and H. Kessler, *Nat. Struct. Biol.*, 1998, **5**, 271–276.
- 31 P. M. J. Burgers and F. Eckstein, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1978, **75**, 4798–4800.
- 32 P. M. J. Burgers and F. Eckstein, *Biochemistry*, 1979, **18**, 592–596.
- 33 K. K. Chacko, K. Lindner, W. Saenger and P. S. Miller, *Nucleic Acids Res.*, 1983, **11**, 2801–2814.
- 34 M. Bower, M. F. Summers, C. Powell, K. Shinozuka, J. B. Regan, G. Zon and W. D. Wilson, *Nucleic Acids Res.*, 1987, **15**, 4915–4930.
- 35 S.-G. Kim, S. Tsukaraha, S. Yokoyama and H. Takaku, *FEBS Lett.*, 1992, **314**, 29–32.
- 36 B. A. Connolly, F. Eckstein and A. Pingoud, *J. Biol. Chem.*, 1984, **259**, 10760–10763.
- 37 J. K. Frederiksen and J. A. Piccirilli, *Methods Enzymol.*, 2009, **468**, 289–309.
- 38 A. Wilk and W. J. Stec, *Nucleic Acids Res.*, 1995, **23**, 530–534.
- 39 Y. Tamura, H. Miyoshi, T. Yokota, K. Makino and A. Murakami, *Nucleosides Nucleotides*, 1998, **17**, 269–282.
- 40 P. S. Miller, N. D. Annan, K. B. McParland and S. M. Pulford, *Biochemistry*, 1982, **21**, 2507–2512.
- 41 R. Cosstick and F. Eckstein, *Biochemistry*, 1985, **24**, 3630–3638.
- 42 H. Matzura and F. Eckstein, *Eur. J. Biochem.*, 1968, **3**, 448–452.
- 43 F. Eckstein, V. W. Armstrong and H. Sternbach, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1976, **73**, 2987–2990.
- 44 P. M. J. Burgers and F. Eckstein, *J. Biol. Chem.*, 1979, **254**, 6889–6893.
- 45 L. S. Victorova, N. B. Dyatkina, D. Ju. Mozhherin, A. M. Atrazhev, A. A. Krayevsky and M. K. Kukhanova, *Nucleic Acids Res.*, 1992, **20**, 783–789.
- 46 M. A. Dineva, S. Chakurov, E. K. Bratovanova, I. Devedjiev and D. D. Petkov, *Bioorg. Med. Chem.*, 1993, **1**, 411–414.
- 47 D. Sergueev, A. Hasan, M. Ramaswamy and B. R. Shaw, *Nucleosides Nucleotides*, 1997, **16**, 1533–1538.
- 48 A. H. S. Hall, J. Wan, E. E. Shaughnessy, B. R. Shaw and K. A. Alexander, *Nucleic Acids Res.*, 2004, **32**, 5991–6000.
- 49 S. L. Beaucage and R. P. Iyer, *Tetrahedron*, 1992, **48**, 2223–2311.
- 50 E. Ohtsuka, M. Shiraishi and M. Ikehara, *Tetrahedron*, 1985, **41**, 5271–5277.
- 51 P. Schell, W. H. G. Laux and J. W. Engels, *Nucleosides Nucleotides*, 1999, **18**, 1169–1174.
- 52 T. Wada, N. Kobayashi, T. Mori and M. Sekine, *Nucleosides Nucleotides*, 1998, **17**, 351–364.
- 53 K. Seio, K. Kumura, J.-C. Bologna and M. Sekine, *J. Org. Chem.*, 2003, **68**, 3849–3859.
- 54 M. Sobkowski, *New J. Chem.*, 2010, **34**, 854–869.
- 55 H. Almer, J. Stawinski and R. Strömberg, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1994, 1459–1460.
- 56 Y. Hayakawa, Y. Hirabayashi, M. Hyodo, S. Yamashita, T. Matsunami, D.-M. Cui, R. Kawai and H. Kodama, *Eur. J. Org. Chem.*, 2006, 3834–3844.
- 57 M. Hirose, R. Kawai and Y. Hayakawa, *Synlett*, 1997, 495–497.
- 58 P. Schell and J. W. Engels, *Nucleosides Nucleotides*, 1997, **16**, 769–772.
- 59 Y. Hayakawa, M. Hyodo, K. Kimura and M. Kataoka, *Chem. Commun.*, 2003, 1704–1705.

- 60 W. J. Stec and G. Zon, *Tetrahedron Lett.*, 1984, **25**, 5279–5282.
- 61 Z. J. Lesnikowski, M. Jaworska and W. J. Stec, *Nucleic Acids Res.*, 1988, **16**, 11675–11676.
- 62 M. M. Jaworska-Maslanka, W. Kacperczyk, D. Korczynski and Z. J. Lesnikowski, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 1997, **7**, 23–30.
- 63 Y. Hayakawa, M. Uchiyama and R. Noyori, *Tetrahedron Lett.*, 1984, **25**, 4003–4006.
- 64 Z. J. Lesnikowski and M. M. Jaworska, *Tetrahedron Lett.*, 1989, **30**, 3821–3824.
- 65 Z. J. Lesnikowski, *Nucleosides Nucleotides*, 1992, **11**, 1621–1638.
- 66 J. Pyzowski, L. A. Wozniak and W. J. Stec, *Org. Lett.*, 2000, **2**, 771–773.
- 67 L. A. Wozniak, J. Pyzowski, M. Wieczorek and W. J. Stec, *J. Org. Chem.*, 1994, **59**, 5843–5846.
- 68 C. Le Bec and E. Wickstrom, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 510–513.
- 69 P. Guga, A. Okruszek and W. J. Stec, *Top. Curr. Chem.*, 2002, **220**, 169–200.
- 70 B. Nawrot, B. Rębowska, O. Michalak, M. Bulkowski, D. Błaziak, P. Guga and W. J. Stec, *Pure Appl. Chem.*, 2008, **80**, 1859–1871.
- 71 W. J. Stec, B. Karwowski, M. Boczkowska, P. Guga, M. Koziolkiewicz, M. Sochacki, M. W. Wieczorek and J. Błaszczak, *J. Am. Chem. Soc.*, 1998, **120**, 7156–7167.
- 72 W. J. Stec, A. Grajkowski, M. Koziolkiewicz and B. Uznanski, *Nucleic Acids Res.*, 1991, **19**, 5883–5888.
- 73 M. Koziolkiewicz, A. Krakowiak, M. Kwinkowski, M. Boczkowska and W. J. Stec, *Nucleic Acids Res.*, 1995, **23**, 5000–5005.
- 74 W. J. Stec, A. Grajkowski, A. Kobylańska, B. Karwowski, M. Koziolkiewicz, K. Misiura, A. Okruszek, A. Wilk, P. Guga and M. Boczkowska, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 12019–12029.
- 75 P. Guga, A. Maciaszek and W. J. Stec, *Org. Lett.*, 2005, **7**, 3901–3904.
- 76 A. Sierzchała, A. Okruszek and W. J. Stec, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 6713–6716.
- 77 X.-B. Yang, A. Sierzchała, K. Misiura, W. Niewiarowski, M. Sochacki, W. J. Stec and M. W. Wieczorek, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 7097–7100.
- 78 M. Koziolkiewicz, M. Wójcik, A. Kobylańska, B. Karwowski, B. Rębowska, P. Guga and W. J. Stec, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 1997, **7**, 43–48.
- 79 W. J. Stec, C. S. Cierniewski, A. Okruszek, A. Kobylańska, Z. Pawłowska, M. Koziolkiewicz, E. Pluskota, A. Maciaszek, B. Rębowska and M. Stasiak, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 1997, **7**, 567–573.
- 80 T. Inagawa, H. Nakashima, B. Karwowski, P. Guga, W. J. Stec, H. Takeuchi and H. Takaku, *FEBS Lett.*, 2002, **528**, 48–52.
- 81 A. M. Krieg, P. Guga and W. J. Stec, *Oligonucleotides*, 2003, **13**, 491–499.
- 82 P. Guga, M. Boczkowska, M. Janicka, A. Maciaszek, B. Nawrot, S. Antoszczyk and W. J. Stec, *Pure Appl. Chem.*, 2006, **78**, 993–1002.
- 83 P. Guga, M. Boczkowska, M. Janicka, A. Maciaszek, S. Kuberski and W. J. Stec, *Biophys. J.*, 2007, **92**, 2507–2515.
- 84 R. Pruzan, D. Zielinska, B. Rębowska-Kocon, B. Nawrot and S. M. Gryaznov, *New J. Chem.*, 2010, **34**, 870–874.
- 85 A. Wilk, A. Grajkowski, L. R. Phillips and S. L. Beaucage, *J. Am. Chem. Soc.*, 2000, **122**, 2149–2156.
- 86 R. P. Iyer, W. Egan, J. B. Regan and S. L. Beaucage, *J. Am. Chem. Soc.*, 1990, **112**, 1253–1254.
- 87 J.-C. Wang and G. Just, *J. Org. Chem.*, 1999, **64**, 2595–2598.
- 88 Y. Lu and G. Just, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2000, **39**, 4521–4524.
- 89 R. P. Iyer, D. Yu, N.-H. Ho, W. Tan and S. Agrawal, *Tetrahedron: Asymmetry*, 1995, **6**, 1051–1054.
- 90 R. P. Iyer, M.-J. Guo, D. Yu and S. Agrawal, *Tetrahedron Lett.*, 1998, **39**, 2491–2494.
- 91 M. Guo, D. Yu, R. P. Iyer and S. Agrawal, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, **8**, 2539–2544.
- 92 D. Yu, E. R. Kandimalla, A. Roskey, Q. Zhao, L. Chen, J. Chen and S. Agrawal, *Bioorg. Med. Chem.*, 2000, **8**, 275–284.
- 93 M. Hyodo, H. Ando, H. Nishitani, A. Hattori, H. Hayakawa, M. Kataoka and Y. Hayakawa, *Eur. J. Org. Chem.*, 2005, 5216–5223.
- 94 Y. Hayakawa, R. Kawai, A. Hirata, J. Sugimoto, M. Kataoka, A. Sakuraya, M. Hirose and R. Noyori, *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, **123**, 8165–8176.
- 95 Y. Hayakawa, M. Kataoka and R. Noyori, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 7996–7997.
- 96 E. Marsault and G. Just, *Tetrahedron*, 1997, **53**, 16945–16958.
- 97 Y. Jin and G. Just, *J. Org. Chem.*, 1998, **63**, 3647–3654.
- 98 N. Oka, T. Wada and K. Saigo, *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, **124**, 4962–4963.
- 99 N. Oka, T. Wada and K. Saigo, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 8307–8317.
- 100 T. Wada, Y. Maizuru, M. Shimizu, N. Oka and K. Saigo, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, **16**, 3111–3114.
- 101 N. Oka, M. Yamamoto, T. Sato and T. Wada, *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, **130**, 16031–16037.
- 102 N. Oka, T. Kondo, S. Fujiwara, Y. Maizuru and T. Wada, *Org. Lett.*, 2009, **11**, 967–970.
- 103 N. Iwamoto, N. Oka, T. Sato and T. Wada, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 496–499.
- 104 E. J. Nurminen, J. K. Mattinen and H. Lönnberg, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 2001, 2159–2165.
- 105 E. Nurminen and H. Lönnberg, *J. Phys. Org. Chem.*, 2004, **17**, 1–17.
- 106 Q. Song, Z. Wang and Y. S. Sanghvi, *Nucleosides, Nucleotides Nucleic Acids*, 2003, **22**, 629–633.
- 107 L. Jen-Jacobson, *Biopolymers*, 1997, **44**, 153–180.
- 108 B. Froehler, P. Ng and M. Matteucci, *Nucleic Acids Res.*, 1988, **16**, 4831–4839.
- 109 S. Amberg and J. W. Engels, *Helv. Chim. Acta*, 2002, **85**, 2503–2517.
- 110 J. A. Fidanza, H. Ozaki and L. W. McLaughlin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, **114**, 5509–5517.
- 111 S. Patnaik, P. Kumar, B. S. Garg, R. P. Gandhi and K. C. Gupta, *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, **15**, 7840–7849.
- 112 M. Endo and M. Komiyama, *J. Org. Chem.*, 1996, **61**, 1994–2000.
- 113 M. Endo, M. Fujitsuka and T. Majima, *J. Org. Chem.*, 2008, **73**, 1106–1112.
- 114 M. Endo and T. Majima, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, **3**, 3476–3478.
- 115 M. Endo and T. Majima, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 13654–13655.
- 116 M. Endo and T. Majima, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003, **42**, 5744–5747.
- 117 M. Endo, T. Shiroyama, M. Fujitsuka and T. Majima, *J. Org. Chem.*, 2005, **70**, 7468–7472.
- 118 T. E. Horton, M. Maderia and V. J. DeRose, *Biochemistry*, 2000, **39**, 8201–8207.
- 119 C. Zhou and J. Chattopadhyaya, *Curr. Opin. Drug Discovery Dev.*, 2009, **12**, 876–898.
- 120 M. Sekine, O. Kurasawa, K. Shohda, K. Seio and T. Wada, *J. Org. Chem.*, 2000, **65**, 6515–6524.
- 121 P. Borsting, K. E. Nielsen and P. Nielsen, *Org. Biomol. Chem.*, 2005, **3**, 2183–2190.
- 122 C. Zhou, O. Plashkevych and J. Chattopadhyaya, *J. Org. Chem.*, 2009, **74**, 3248–3265.
- 123 C. Dupouy, P. Millard, A. Boissonnet and J.-M. Escudier, *Chem. Commun.*, 2010, **46**, 5142–5144.

8. 肝臓を標的とした 新規 siRNA テクノロジー

仁科一隆*¹⁾・横田隆徳*²⁾

RNA 干渉(RNAi)は有用な配列特異的な遺伝子発現抑制方法であり、臨床での応用が期待されている。しかしその際に必要な、生体内における標的臓器への効果的かつ安全な siRNA (small interfering RNA) のデリバリー方法が確立していない。我々は siRNA の生体内における内因性輸送システムを利用するため、ベクターとしてビタミン E (VE) を用いた。siRNA のアンチセンス鎖 5'末端に VE を共有結合させ(VE-siRNA)、マウスに静脈投与したところ、肝細胞における内在性遺伝子の発現量を有意に低下させた。さらにこの VE-siRNA と脂肪酸や界面活性剤等を組み合わせた混合ミセルを作成して直腸内投与したところ、肝臓における標的遺伝子の発現抑制に成功した。これは世界初の肝臓に対する siRNA の経消化管投与方法の開発であり、今後その実現化に向けて最適化を行いたい。

1. はじめに

siRNA (small interfering RNA) を用いた遺伝子治療は、その臨床応用が期待されており、特に既存の治療法では不十分な難病に対して、その有効性が期待されている。しかし siRNA の最大の課題点は *in vivo* デリバリー法であり、siRNA をいかに効率良く標的臓器・細胞に到達させるかが最重要課題となっている。現在海外にて臨床治験等で検討されている機能核酸を用いた遺伝子治療法は、ほぼすべて静脈注射による全身投与であり、頻回な通院が必要となることから、慢性疾患の治療には制限がある。特に生活習慣病を始めとした長期投与を必要とする疾患への治療を考慮した場合に、自己投与可能な内服薬や坐薬の開発は必須である。本稿では我々の研究成果を中心に、新規 siRNA テクノロジーを用いた肝臓を標的とした治療法の開発について述べたい。

2. 生体内リポ蛋白を介した核酸デリバリー

本研究を始めるに当たり、我々はベクターとして最適な条件として、対象臓器または細胞において必要不可欠であり、なおかつ、その組織では合成ができないものを考えた。ビタミンはそれに最も適合する物質であり、中でもビタミン E (VE) は体内における生理的動態が分かっていることと安全性の点から最もベクターに相応しいものと考えた。また、同じ脂質であるコレステロールを結合させた siRNA (Chol-siRNA) がやはり肝臓に対するベクターとして有効であると報告されており¹⁾、我々は VE を siRNA に直接結合させることで、肝臓を標的とした生体内での VE の生理学的輸送動態を用いた siRNA のデリバリーを試みた。

VE のクロマン環 6 位の水酸基をアミダイト化し、27/29 塩基の化学修飾を施した siRNA のアン

*東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経病態学(神経内科学)分野

¹⁾(にしな・かずたか) ²⁾教授(よこた・たかのり)

チセンス鎖 5'末端にアミダイトを介して直接結合して、VE-siRNA を作成した。この siRNA は血清中の RNA 分解酵素 (RNase) に対し耐性があり、マウス血清内で 24 時間以上分解されないことを確認した。その後生体内での VE-siRNA の取り込みおよびその分布を調べるため、蛍光色素結合 VE-siRNA をマウスに静注し、肝臓を共焦点顕微鏡で観察したところ、ほぼすべての肝細胞に Cy3 の取り込みを認めた。また細胞質内への取り込みを確認するため、VE-siRNA を静注した後の肝臓から短い RNA のみを抽出して、VE-siRNA のアンチセンス鎖を認識するプローブでノザンブロットを行ったところ、投与した長さである 29 塩基と、Dicer によって細胞内で切り出された長さである 21 塩基の、計 2 本のアンチセンス鎖をバンドとして検出した。これらの結果から、VE-siRNA が確かに細胞質内にデリバリーされていることを確認した。次に生体内における VE-siRNA の効果を調べるため、マウス尾静脈から VE-siRNA を静注し、肝臓における標的遺伝子の mRNA (messenger RNA) の発現量を定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を用いて調べた。その結果、標的遺伝子特異的に発現を抑制していること、効果持続が 2 日程度であること、核酸の投与用量依存性に発現抑制効果が認められることを確認した。さらに IFN (interferon) 応答等の副作用が生じていないことを確認した²⁾。

3. VE-siRNA/CM の開発

VE が生体内でリポ蛋白と結合してデリバリーされることはよく知られており、VE-siRNA のデリバリー経路も VE 自身と同様リポ蛋白を経由している可能性が高い。実際 Chol-siRNA を静注した場合リポ蛋白介在性のデリバリーとなることが報告されている³⁾。ただしヒトと異なり、マウスの場合生体内のリポ蛋白のほとんどが高比重リポ蛋白 (HDL) であり、肝臓特異的にデリバリーされる訳ではない。最も肝臓特異的に集積するリポ蛋白は、外因性 (食餌由来) のコレステロールや中性脂肪を小腸から肝臓に輸送するカイロミクロン (CM) である。しかし、CM 自体は食事によって

8. 肝臓を標的とした新規 siRNA テクノロジー

分泌されるものであり、食前のマウス血清ではほとんど得られない。

そこで我々は CM を抽出して、VE-siRNA を CM に生体外で取り込ませた (“*ex vivo incubation*”) 新規ベクター (VE-siRNA/CM) を開発し、マウスに低用量投与する方法を開発した。CM の抽出方法として、強制的にミルクを経口摂取させたマウスの腸管リンパ管に穿刺して、CM が最も多く含まれるリンパ液を収集し、それを VE-siRNA と混ぜることで VE-siRNA/CM を作成した。VE-siRNA の肝細胞への取り込みのメカニズムについて図 1 に示す。この VE-siRNA/CM をマウス腹腔内に投与することで、肝臓における標的遺伝子の発現を抑制することに成功した。本方法は内因性の CM をベクターとして用いたことで肝細胞特異的にデリバリーされたことに加え、投与個体自身から作製したセルフベクターであるため副作用が無い等の優れた点を有しているが、最大の問題点は臨床応用の際の血液製剤化であった。

この問題を回避するため、我々は VE の生体内での吸収経路に着目した。本来 VE は経口摂取される物質であり、小腸粘膜上皮細胞で吸収され、上皮細胞内の小胞体で CM が合成される際にその構成成分の一つとして組み込まれる。合成された CM は分泌後細胞内輸送経路 (trans-cellular pathway) を通り、リンパ管を上行して静脈角から静脈系に入る。まず本来の吸収部位である小腸粘膜上皮細胞内への導入を狙って、小腸部位に VE-siRNA を吸収促進剤とともに投与したが、肝細胞への移行はわずかしき認められなかった。VE-siRNA は分子量が 19,000 と大きく、極性も高いことから、小腸粘膜上皮細胞に取り込まれなかったと考えられた。

そこで本来の小腸粘膜上皮細胞内への細胞内輸送経路ではなく、発想を転換して tight junction を開いた傍細胞輸送経路 (para-cellular pathway) による腸間膜通過方法を考案した。腸管膜透過性の比較的容易な直腸 (大腸) 部位で VE-siRNA をまずリンパ管内へ移行させ、その後尾側から頭側へのリンパ液の生理的な流れに乗せて VE-siRNA を上行させる。同時に食事により小腸粘膜上皮細

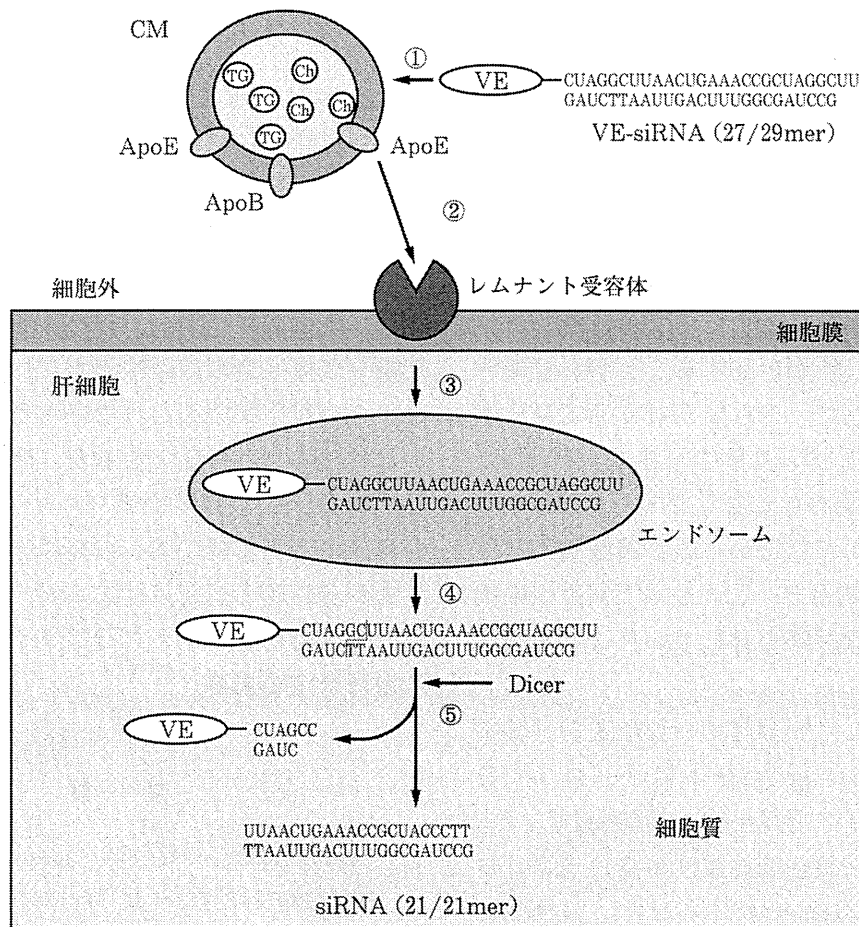


図1 VE-siRNA/CMの肝細胞への導入機序

- ① VE-siRNAがCMと結合
 - ② CMがApoEを介してレムナント受容体と結合
 - ③ 肝細胞内に移行し、エンドソーム形成
 - ④ エンドソーム脱出
 - ⑤ 細胞質内でDicerによって認識・切断され、21/21merのsiRNA形成
- ApoB: アポリポ蛋白 B, ApoE: アポリポ蛋白 E, Ch: コレステロール
 CM: カイロミクロン, TG: 中性脂肪, VE: ビタミン E
 VE-siRNA: ビタミン E 結合 siRNA, siRNA: small interfering RNA
 (筆者ら作成)

胞から分泌されたCMと小腸リンパ管内で出会わせて、CMにVE-siRNAを生体内で取り込ませる方法 (“in vivo incubation”) でVE-siRNA/CMを合成するという新規の方法を計画した。通常の静脈投与と異なる点は、血中のCMは急速にリポ蛋白リパーゼ (LPL) でカイロミクロンレムナント (CMR) に代謝され肝細胞に取り込まれるため、CM濃度が食後でも1%以下とわずかで、しかも

他に多くのsiRNA結合蛋白や脂質があるのに対して、リンパ管内はCMが高濃度に存在するため、VE-siRNAのCMへの導入効率が高くなるのが期待できる。実際に直腸部位の腸管内に脂肪酸と界面活性剤から成る混合ミセルとともに蛍光標識VE-siRNAを投与すると、VE-siRNAの肝細胞への導入に成功した。このデリバリーはほぼ肝特異的であることを確認した。またVE-siRNAが

CMR: カイロミクロンレムナント

リンパ管から採取した CM に明瞭に取り込まれたことが蛍光相関分光法を用いて確認された。また VE を結合させていない siRNA では、リンパ管内 CM への移行や肝細胞での siRNA はほとんど認められず、siRNA が VE との結合が直腸内から CM への移行に必要なことが確認された。さらに、VE-siRNA の肝移行性は、絶食により減弱し、ミルクなどの摂取によって増強されたことから、リンパ管内に CM が存在することが必要条件であることが示された。さらに CM から CMR を形成する酵素である LPL を阻害すると、肝細胞に siRNA がほとんど認められなくなった。これらの結果は、VE-siRNA の腸管からの肝細胞導入が生体内での CM との結合と、CM から CMR への代謝を経た生理学的な経路を介していることを明確に示している。

この方法を用いて、肝細胞での標的遺伝子発現効果を確認した。10mg/kg を 1 日 3 回投与することで、標的遺伝子の発現を約 40% 抑制できた。また血中の中性脂肪値や低比重リポ蛋白 (LDL) コレステロール値も約 40% 減少させた。安全性については、肝臓における off-target effect がなく、IFN 応答や肝機能・腎機能障害を含めた副作用について採血にて認められないことを確認した。CM によるデリバリーにより VE-siRNA が肝特異的にデリバリーされたため、副作用が軽減できたものと考えている。

4. おわりに

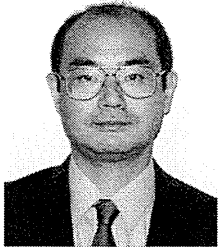
以上から、VE-siRNA と吸収促進剤の共投与により世界初の核酸の経腸管投与方法を開発した。経腸管投与であるため、従来の注射による方法と比較して圧倒的に侵襲性が少ないこと、生理的経路を利用した内因性の CM をベクターとして用いたため、肝細胞特異的なデリバリーに成功した。また投与個体自身の内因性セルフベクターであることから副作用が認められなかった。今回の直腸投与は坐薬の投与形態となるが、腸溶剤または大腸標的化 DDS (ドラッグデリバリーシステム) などの導入によって経口薬への発展も期待できる。投与量が多い等の問題点はあるが、本発明を元に実際の臨床応用を見据えた経口剤や坐剤の開発に取り組む予定である。

文 献

- 1) Soutschek J, et al : Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* **432** (7014) : 173-178, 2004.
- 2) Nishina K, et al : Efficient *in vivo* delivery of siRNA to the liver by conjugation of α -tocopherol. *Mol Ther* **16** (4) : 734-740, 2008.
- 3) Wolfrum C, et al : Mechanisms and optimization of *in vivo* delivery of lipophilic siRNAs. *Nat Biotechnol* **25** (10) : 1149-1157, 2007.

神経変性疾患のRNA干渉による創薬

Gene therapy with RNA interference for neurodegenerative diseases



横田 隆徳

Takanori YOKOTA

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経病態分野

◎Small interfering RNA (siRNA) の遺伝子発現抑制効果は非常に高く、遺伝性疾患、ウイルス性疾患においてその変異遺伝子・病原遺伝子自体を siRNA で治療する究極の遺伝子治療をめざした基礎研究が進行している。神経疾患に対しては、優性遺伝形式を示す神経変性疾患を中心にウイルスベクター、非ウイルスベクターを用いた *in vivo* での投与実験が試みられており、その有効性を示す報告も増えつつある。しかし同時に、副作用を含めた問題点や発現抑制効率の低さといった課題も存在する。今後これらの課題を克服し、siRNA が近い将来、難治性神経疾患における治療法の新しい選択肢となることが非常に期待される。

Key word : RNA干渉(RNAi), small interfering RNA (siRNA), short-hairpin RNA (shRNA), ウイルスベクター, 非ウイルスベクター

RNA干渉(RNAi)とは

長い二本鎖 RNA によって誘導される遺伝子発現抑制である RNA 干渉(RNA interference: RNAi)現象は、植物から昆虫、哺乳動物に至るまで広く保存されていることが観察され、元来真核細胞に備わった抗ウイルス機構として知られていた。細胞内に導入された二本鎖 RNA は、Dicer とよばれる RNase III 核酸分解酵素ファミリーによって 21~24 mer の短い 3'突出型の二本鎖の small interference RNA (siRNA) に分解される。siRNA のセンス鎖は Ago2 によりその中央部で切断され、アンチセンス鎖のみがヘリカーゼなどのいくつかの蛋白質からなる RNA 蛋白質複合体である RISC 複合体(RNA-induced silencing complex)に取り込まれる¹⁾。そして、RISC 複合体がアンチセンス鎖に相補的な配列をもつ標的 mRNA にアクセスし、その中央で分解する²⁾。しかし、哺乳動物における二本鎖 RNA の導入は、PKR や 2'5'oligoadenylate synthetase の活性化による非特異的な翻訳抑制や RNA の分解を引き起こすため、その利用の大きな妨げになっていた。

しかし 2000 年に、RNAi 機構の中間産物である siRNA を合成して用いることによってこれらの副

反応が回避され、siRNA の配列に特異的な遺伝子発現抑制が可能となった³⁾。さらに、siRNA 配列を短い 9 mer のループ配列でつないだ stem 型のパリンドロミックな配列を pol III 系のプロモーター下に挿入した、siRNA 発現 DNA プラスミドも開発された⁴⁾。

遺伝性疾患への応用の基本原理

ゲノム遺伝子の変異が原因で遺伝性疾患を発症する場合、遺伝子変異に起因する発症機序には、①変異のある遺伝子の遺伝子産物である蛋白質が本来もっている機能が消失または低下する場合(loss of function)と、②変異遺伝子や変異蛋白質があらたに病的機能を獲得する場合(gain of function)、の 2 つがあることが知られている。遺伝子変異が常染色体にある場合、対立する 2 つのアレルの双方に遺伝子変異があつてはじめて発症する常染色体劣性遺伝形式の疾患の多くは loss of function をその機序とし、一方のアレルのみで発症する常染色体優性遺伝形式の疾患の多くの場合は gain of function であることが多い。常染色体優性遺伝の場合は、野生型のアレルからは原則として正常個体の半分の量の正常蛋白質は発現しているので、本

来の蛋白の機能からの影響は少ないかまったくなく、変異アレルから発現した変異蛋白が何らかの正常とは異なる機能(gain of adverse function)や毒性(gain of toxic function)をあらたに獲得することにより、疾患が発症することが想定されている。

神経疾患では、①superoxide dismutase 1(SOD1)変異による筋萎縮性側索硬化症(ALS)、各種ポリグルタミン病、②アミロイド前駆蛋白(APP)やPS1 遺伝子変異による Alzheimer 病、③ α -synuclein 変異による Parkinson 病、などの常染色体優性遺伝形式を示す主要な疾患の多くは、gain of toxic function がその発症機序と考えられている。このような疾患の治療を考える場合、変異した蛋白の発現を抑制する方法があれば、その機序の如何にかかわらず発症・進行を防止することが期待できるわけである。

最近、著者らは SOD1 に対する siRNA を過剰発現させたトランスジェニックマウスを作製し、これを筋萎縮性側索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis: ALS)のモデルマウスである G93A 変異 SOD1 トランスジェニックマウスとかけ合わせ、全身の変異 SOD1 蛋白の発現を 80%以上抑制することに成功した⁵⁾。この効果により、270 日齢の時点で ALS 症状の発症は抑制されている。野生型 SOD1 はノックアウトしても明瞭な神経症状を示さないので副作用はない可能性が高いが、たとえば SCA6 の場合、その原因遺伝子カルシウム 1 A チャネルのノックアウトマウスは生後 1~2 週で死亡することが知られており、正常アレルの発現抑制はあらたな症状をきたす可能性が高い。したがって、優性遺伝疾患の治療には、正常アレルの発現を損わずに変異アレルの発現のみを抑制することが望ましい。

上述のように、変異が 1 塩基の違いである点変異でも、正常アレルと変異アレルの配列の差を認識して変異アレルのみを切断できる siRNA の作製は可能である⁶⁻⁸⁾。しかし、たとえば SOD1 や PS1 の点変異は 100 種類以上が知られており、そのすべてに特異的で効率的な siRNA がデザインできるわけではない。著者らはいかなる遺伝子変異に対しても特異的で有効な新しい RNAi 法を考案し、*in vivo* での有効性を実証した^{9,10)}。

ウイルスベクターを用いた RNAi 遺伝子治療

とくに神経変性疾患の治療には年単位の長期にわたる抑制効果が求められ、それにはウイルスベクターが有用である。非分裂細胞である神経細胞に対し遺伝子導入可能なウイルスベクターとして現在よく用いられてものには、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、レンチウイルスベクターがあげられる。AAV ベクターは非病原性で安全性が高いうえに導入遺伝子の宿主ゲノムへの導入はほとんど起こらないため、アデノウイルスベクターと比較すると、安定したより長期間の遺伝子発現が可能である。現在、脳神経系の遺伝子導入の臨床応用がもっとも期待されているベクターで、実際 Parkinson 病を中心に臨床試験が行われている。また、AAV ベクターの新規の血清型がつぎつぎと開発され、とくに 9 型はマウスへの経静脈投与で血液-脳関門を通過するため、脳・脊髄に遺伝子導入が可能であったとする報告もあり¹¹⁾、神経疾患に対する遺伝子治療のベクターとして期待されている。

1. 神経疾患への応用

神経疾患のおもな対象は優性遺伝性神経疾患で、とくにポリグルタミン病は主要なターゲットとなっている。2004 年に Xia らは、ポリグルタミン病のひとつである SCA1 のモデルマウス小脳にヒト ataxin-1 に対する short-hairpin RNA (shRNA) 発現 AAV1 型ベクターの直接投与を行い、神経症状が軽減し、かつ病理学的にも小脳の分子層の構造が保たれていることを示し、神経疾患に対する shRNA 発現ウイルスベクターの有用性を *in vivo* において最初に証明した^{12,13)}。

Alzheimer 病では、家族性 Alzheimer 病の原因遺伝子のひとつである変異アミロイド前駆蛋白(APP)に対し変異アレル特異的な shRNA をデザインし、その変異 APP 特異的 shRNA 発現 AAV5 ベクターを、スウェーデン型変異 APP を過剰発現させたトランスジェニックマウスの海馬へ直接投与して脳内の可溶性 A β 量を減少させ、認知機能障害を改善させたとの報告がなされた¹³⁾。

ALS に対しては、おもに家族性 ALS の 10~20% を占める superoxide dismutase(SOD1)遺伝子変

異に対するアプローチが試みられており、SOD1 に対する shRNA 発現レンチウイルス・AAV ベクターを ALS のモデルマウスである G93A SOD1 トランスジェニックマウスの骨格筋に注入あるいは直接、脊髄内に注入し、その発症時期を遅延させたとの報告がなされた¹⁴⁻¹⁶⁾。骨格筋にベクターを投与した場合は、逆行性軸索輸送によって運動ニューロンに shRNA を導入することができる。

ほとんどの Alzheimer 病、Parkinson 病や ALS は家族歴のない孤発性で遺伝子異常は明らかでないが、それぞれの発症機序のキーとなる分子がわかれば、その発現を抑制することで治療が可能かもしれない。Alzheimer 病では A β がその発症に中心的役割を果たすと考えられており、アミロイド前駆蛋白から A β を切り出す酵素である β および γ セクレターゼは RNAi の標的遺伝子の候補となりうる。このなかで、 γ セクレターゼは Notch など他の重要な分子も基質としているため、その機能を抑制すると問題を生じるが、 β セクレターゼの本体といわれる BACE1 のノックアウトマウスは特別の異常を示さないため、有望な標的分子である。これまでに BACE1 に対する shRNA 発現レンチウイルスベクターをスウェーデン型変異 APP 過剰発現トランスジェニックマウスの海馬へ直接投与して老人斑の沈着を減少させ、行動異常も改善されたとの報告がある¹⁷⁾。

2. 生体内における問題点

ウイルスベクターを用い生体内に RNAi を誘導させるには siRNA 発現 DNA ベクターの作製が必要となり、通常、pol-III 系プロモーター下のセンス鎖とアンチセンス鎖がループを介してつながる shRNA が用いられる⁴⁾。

shRNA 発現ウイルスベクターの *in vivo* への投与にあたり、おもに 3 つの異なる機序の副作用が予想されている。第 1 は、shRNA のデリバリーに用いるウイルスベクター自体の免疫原性の問題であり、第 2 は、siRNA/shRNA により標的遺伝子以外の遺伝子の発現も抑制してしまう off-target 効果の問題、第 3 は、発現させた shRNA 自体による副作用で、これには過剰な shRNA による細胞毒性の問題がある。

① off-target 効果……siRNA はたしかに標的

遺伝子に対する配列特異性は高いが、用いる siRNA が 21 塩基と短いため部分的に相同性のある別の遺伝子の発現まで抑制されてしまう可能性がある。この現象は off-target 効果とよばれており、siRNA を臨床応用する際に大きな問題となる。通常、19 塩基中 15 塩基以上で、最低では 11 塩基の相同性のある遺伝子において影響があったと報告された。また、バイオインフォマティクス解析により、off-target 効果を受ける遺伝子群は 3'側の非翻訳領域(UTR)に相同性を多く認める傾向があることが明らかとなった¹⁸⁾。これは標的遺伝子の 3'側の UTR に結合し、その発現を抑制する miRNA の作用機序に類似しており、siRNA のアンチセンス鎖の 5'から 2 塩基目~7(8)塩基目の 6(7)塩基(miRNA のシード領域に相当)が 3'側の UTR に相同性をもつ遺伝子に影響を及ぼすことによる。

② shRNA 毒性……shRNA 発現 AAV ベクターを経静脈的にマウスに全身性投与する実験系において、致死的な肝障害が認められたという報告が 2006 年になされた¹⁹⁾。この肝障害には配列依存性はなく、導入した shRNA の発現量との間に相関が認められ、障害を受けた肝では複数の miRNA の発現が低下していた。この組織障害の機序として、哺乳動物においては miRNA の前駆体(pre-miRNA)と shRNA は exportin-5 という共通の担体を通じて核から細胞質へ移行するため、核内に過剰に発現した shRNA が exportin-5 による pre-miRNA の細胞質への移行を競合的に阻害する結果、miRNA へのプロセスが障害され、肝毒性に関与したことが示唆されている。また最近、shRNA 発現 AAV ベクターをマウス脳実質内に局所注入した場合でも細胞障害を生じることが報告され、shRNA 発現 AAV ベクターのマウス脳実質内への局所投与で注入部位の神経細胞脱落とミクログリアの活性化などの神経毒性が認められた²⁰⁾。

過剰な shRNA の発現は細胞毒性を誘導する可能性があるため、ベクター投与量を下げることによって細胞毒性なく有効な至適投与量を見出すことができる場合がある³¹⁾。また、あえて shRNA 発現効率の悪い Pol II 系プロモーターや miRNA タイプの shRNA 発現ベクターを用い、抑制効率の優れた

shRNA をデザインして有効な RNAi 効果を発揮することで、shRNA 毒性を回避できる可能性が最近示された^{20,21)}。

● 非ウイルスベクターを用いた RNAi 遺伝子治療

非ウイルスベクターを用いたデリバリー方法は、ウイルスベクターと比較して一般的にデリバリー担体自体の毒性がない点で安全といえるが、その有効性や持続性が劣ることが多い。したがって、ウイルスベクターと同等の効果を得るためには複数回の投与を要することもあり、経済性の面での問題もある。とくに神経疾患を標的としたデリバリーの場合、血液-脳関門をどのように通過させるか、という点が最大の障害となっている。神経細胞および神経細胞よりもアプローチしやすい脳血管内皮細胞への非ウイルスベクターを用いたデリバリー方法について概説する。

1. 直接投与する方法

実際の *in vivo* における siRNA の有用性を確かめる目的で、直接脳内に siRNA を注入する報告がなされている。最近の報告では siRNA にコレステロールを結合させたものを投与する²²⁾ことや、カチオニックリポソームにトランスフェリンを結合させたものをベクターとして用いる²³⁾ことで、オリゴデンドロサイトにおける標的遺伝子発現抑制効果を上昇させている。临床上これらの方法は実用性に欠けるが、実際に siRNA をデリバリーすることができれば、標的遺伝子の発現抑制効果が *in vivo* でも認められることを示しており、重要である。神経細胞に対しては、サルの中脳黒質に化学修飾した siRNA を投与することで、標的遺伝子である α -synuclein の発現を抑制するという研究が最近報告されている²⁴⁾。

血液-脳関門で守られている神経細胞やオリゴデンドロサイトとは異なり、脳血管内皮細胞は全身投与でアクセスが比較的容易であるという利点がある。また、脳血管内皮細胞は多発性硬化症などの免疫性神経疾患、脳血管障害を中心とした神経疾患における病態形成の場として、重要な役割を果たしていることが知られている。脳血管内皮細胞への siRNA デリバリーが可能になれば、これ

らの疾患の治療法として応用が期待され、臨床上有用である。いままでに報告されたのは、ヒドロダイナミクス法とよばれる、大量の溶媒とともに高い圧力で細胞内に siRNA を導入させる方法のみであり²⁵⁻²⁷⁾、臨床における実用性は少ない。今後、各種非ウイルスベクターを用いた新規デリバリー方法の開発が望まれる。

2. 脳室内に投与する方法

全身投与して血液-脳関門を通過するよりも、脳室内に投与して脳-脊髄液関門を通過するほうが、脳室が閉鎖空間であるため薬物濃度を高い状態で維持できるなどさまざまな点で利点がある。そこで siRNA の脳室内投与についても研究が進められている。

化学修飾した合成 siRNA を直接脳室内に 1~2 週間持続注入することによって脳室の表層に近い海馬や大脳基底核においての標的遺伝子の発現を 50%程度抑制したという報告があり²⁸⁾、注目されている。siRNA をカチオニックリポソームに導入し、同様に長期間脳室内持続注入して脊髄や後根神経節、視床下部などにおいて有効に導入に成功したという報告もある^{29,30)}。また最近、HDL をベクターとして脳室内投与で有効に神経細胞に siRNA を導入したという報告がなされた³¹⁾。

3. 抗体やペプチドを利用して全身投与する方法

現在のところ、非ウイルスベクターを用いた siRNA のデリバリー方法のなかで、静脈注射により血液-脳関門を越えて中枢神経系に到達する方法は確立していないが、新規の有望な報告があいついでいる。

狂犬病ウイルスの糖蛋白からデザインした 29 アミノ酸からなるペプチドに 9 つのアルギニンを結合させ(RVG-9R)、これと SOD1 に対する siRNA とで複合体を作製させた。この複合体を静脈投与することで、血液-脳関門を越えて脳内の SOD1 の発現を 50%程度抑制した³²⁾。狂犬病ウイルスは、脳血管内皮や神経細胞に発現しているニコチンアセチルコリン受容体の $\alpha 7$ サブユニットに結合して受容体介在性トランスサイトーシスによって脳内に運ばれ、神経細胞にデリバリーしたと考えている。さらに、培養細胞から分泌された上清中の exosome を精製してこれに狂犬病ウイ

ルス導入ペプチドを結合させ、静脈投与で中枢神経内にデリバリーしたという報告もなされ、その発展が期待される³³⁾。

おわりに

siRNAの有効性は高く、神経疾患への応用を目的とした研究が急速に展開されている。ウイルスベクターを用いた方法では実際に *in vivo* での有効性を示した報告も多いが、同時に副作用を含めたいくつかの問題点もあげられている。非ウイルスベクターを用いた方法の標的遺伝子発現抑制率は50%程度にとどまっており、ウイルスベクターと比較した際にその有効性は大きく劣るのが現状である。今後これらの課題が克服され、近い将来 siRNA が難治性疾患における治療法の新しい選択肢となることが非常に期待される。

文献

- 1) Rand, T. A. et al. : *Cell*, **123** : 621-629, 2005.
- 2) Song, J. J. et al. : *Science*, **305** : 1434-1437, 2004.
- 3) Elbashir, S. et al. : *Nature*, **411** : 494-498, 2001.
- 4) Brummelkamp, T. R. et al. : *Science*, **29** : 550-553, 2002.
- 5) Saito, Y. et al. : *J. Biol. Chem.*, **280** : 42826-42830, 2005.
- 6) Yokota, T. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **314** : 283-291, 2004.
- 7) Davidson, B. L. and Paulson, H. L. : *Lancet Neurol.*, **3** : 145-149, 2004.
- 8) Li, Y. et al. : *Ann. Neurol.*, **56** : 124-129, 2004.
- 9) Kubodera, T. et al. : *Oligonucleotides*, **15** : 298-302, 2005.
- 10) Kubodera, T. et al. : *Hum. Gene Ther.*, **22** : 27-34,

- 2011.
- 11) Foust, K. D. et al. : *Nat. Biotechnol.*, **27** : 59-65, 2009.
- 12) Xia, H. et al. : *Nat. Biotechnol.*, **20** : 1006-1010, 2002.
- 13) Rodriguez-Lebron, E. et al. : *Mol. Ther.*, **17** : 1563-1573, 2009.
- 14) Miller, T. M. et al. : *Ann. Neurol.*, **57** : 773-776, 2005.
- 15) Ralph, G. S. et al. : *Nat. Med.*, **11** : 429-433, 2005.
- 16) Raoul, C. et al. : *Nat. Med.*, **11** : 423-428, 2005.
- 17) Singer, O. et al. : *Nat. Neurosci.*, **8** : 1343-1349, 2005.
- 18) Birmingham, A. et al. : *Nat. Methods*, **3** : 199-204, 2006.
- 19) Grimm, D. et al. : *Nature*, **441** : 537-541, 2006.
- 20) McBride, J. L. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105** : 5868-5873, 2008.
- 21) Giering, J. C. et al. : *Mol. Ther.*, **16** : 1630-1636, 2008.
- 22) Chen, Q. et al. : *J. Control Release*, **144** : 227-232, 2010.
- 23) Querbes, W. et al. : *Oligonucleotides*, **19** : 23-29, 2009.
- 24) McCormack, A. L. et al. : *PLoS One*, **5** : e12122, 2010.
- 25) Hino, T. et al. : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **340** : 263-267, 2006.
- 26) Campbell, M. et al. : *J. Gene Med.*, **10** : 930-947, 2008.
- 27) Fuest, C. et al. : *Neurosci. Lett.*, **464** : 47-51, 2009.
- 28) Thakker, D. R. et al. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101** : 17270-17275, 2004.
- 29) Guissouma, H. et al. : *Neurosci. Lett.*, **406** : 240-243, 2006.
- 30) Luo, M. C. et al. : *Mol. Pain*, **1** : 1-8, 2005.
- 31) Uno, Y. et al. : *Hum. Gene Ther.*, **22** : 711-719, 2011.
- 32) Kumar, P. et al. : *Nature*, **448** : 39-43, 2007.
- 33) Alvarez-Erviti, L. et al. : *Nat. Biotechnol.*, **29** : 341-345, 2011.

* * *

2) 神経筋疾患の RNAi 治療の展望

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科脳神経病態学 久保寺隆行

同 脳神経病態学 仁科 一隆

同 教授 横田 隆徳

key words RNA interference (RNAi), small interfering RNA (siRNA), short-hairpin RNA (shRNA), viral vector, non-viral vector

要 旨

small interfering RNA (siRNA) の遺伝子発現抑制効果は非常に高く、遺伝性疾患・ウイルス性疾患においてその変異遺伝子、病原遺伝子自体を siRNA で治療する究極の遺伝子治療を目指した基礎研究が進行している。神経疾患に対しては、優性遺伝形式を示す神経変性疾患を中心にウイルスベクター、非ウイルスベクターを用いた *in vivo* での投与実験が試みられており、その有効性を示す報告も増えつつある。しかしながら同時に、副作用を含めた問題点や発現抑制効率の低さといった課題も存在する。今後、これらの課題を克服し、siRNA が近い将来、難治性神経疾患における治療法の新しい選択肢となることが非常に期待される。

動 向

RNA interference (RNAi) は2本鎖RNA double-stranded RNA (dsRNA) によって配列特異的に mRNA が分解され、その結果遺伝子の発現が抑制される現象である。その標的遺伝子の発現抑制効果はこれまでの機能核酸であるアンチセンスやリボザイムよりも高いとされ、さらにその配列特異性も高いことから医療分野における応用が発

見当初から大きく期待され、現在世界中で激しい医薬品開発の競争が展開されている。

RNAi を生体内に人工的に誘導するには化学合成 siRNA (small interfering RNA) や siRNA 発現ベクターをツールとして利用し、さらにこれらを生体にデリバリーさせる方法として、siRNA の場合にはカチオニックリポソームやアテロコラーゲンなどの担体が、siRNA 発現ベクターの場合にはアデノ随伴ウイルスやアデノウイルス、レンチウイルスなどのウイルスベクターがある。

siRNA を用いた遺伝子治療の対象となる主要な疾患として、一般に変異蛋白が新たに病的機能を獲得する (gain of function) 優性遺伝性疾患があり、これらに対し siRNA で変異蛋白の発現を抑制することができれば、その発症機序のいかんに関わらず発症、進行を阻止することが期待できる¹⁾。神経疾患では、ポリグルタミン病、アミロイド前駆蛋白 (APP) や presenilin 1 (PS1) 遺伝子変異によるアルツハイマー病、superoxide dismutase (SOD1) 遺伝子変異による筋萎縮性側索硬化症 (ALS) など siRNA による治療が期待される神経変性疾患は多い。

神経系への導入に関しては、血液脳関門をいかにして通過させるか、という点が最大の障害であ

る。現時点では全身投与により神経系へデリバリーさせるのは困難で、脳内へ直接投与中心のアプローチが試みられている。ここでは、神経疾患に対して化学合成 siRNA, siRNA 発現ウイルスベクターを用いて RNAi を誘導する遺伝子治療の現状と問題点について各々概説する。

A. ウイルスベクターを用いた RNAi 遺伝子治療

神経疾患、特に神経変性疾患の治療には年単位の長期に渡る抑制効果が求められ、それにはウイルスベクターが有用である。非分裂細胞である神経細胞に対し遺伝子導入可能なウイルスベクターとして現在よく用いられているものにはアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、レンチウイルスベクターがあげられる。アデノウイルスベクターは最も古くから用いられてきた方法で、感染する細胞の範囲が広く、発現効率も高いが、*in vivo* 投与を行った場合には、宿主側のアデノウイルスに対する免疫反応を生じ易いことが指摘されている。レンチウイルスベクターはレトロウイルスに属し、従来のレトロウイルスの弱点を補うために開発されたもので、分裂細胞だけでなく非分裂細胞にも感染し、逆転写された導入遺伝子が宿主ゲノムへ挿入されるので遺伝子を安定に長期間発現させることが可能である。ただしレンチウイルスベクターでは細胞に導入される遺伝子のコピー数が少ないため、良好な RNAi 効果を発揮するためには抑制効率の優れた siRNA 配列をデザインする必要がある。AAV ベクターは非病原性で安全性が高く、導入遺伝子の宿主ゲノムへの導入はほとんど起こらないが、アデノウイルスベクターと比較して、安定したより長期間の遺伝子発現が可能である。現在、脳神経系の遺伝子導入の臨床応用が最も期待されているベクターで、実際パーキンソン病を中心に臨床試

験が行われている。またここ数年、AAV ベクターの血清型と組織特異性の関係についての理解が進展しており、標的組織の種類に応じて種々の血清型の AAV ベクターを使い分けることが可能である。特に新規血清型である 9 型は、マウスへの経静脈投与で血液脳関門を超え脳・脊髄に遺伝子導入可能であったとする報告もあり²⁾、神経疾患に対する遺伝子治療のベクターとして期待される。

1. siRNA 発現ベクター

ウイルスベクターを用い生体内に RNAi を誘導させるには、siRNA 発現 DNA ベクターの作製が必要となる。その発現システムは 2002 年に相次いで報告され、主にタンデムタイプとヘアピンタイプの 2 つに大別される^{3,4)} (図 1)。タンデムタイプは 2 つの RNA polymerase III (pol-III) 系プロモーターからセンス鎖とアンチセンス鎖に相当する RNA が別々に転写され、細胞内で 2 本鎖を形成して siRNA を産生する。一方、ヘアピンタイプは microRNA (miRNA) のプロセス機構をヒントに考えられた siRNA 発現法で、センス鎖とアンチセンス鎖がループを介してつながる short hairpin RNA (shRNA) が転写され、pre-miRNA と同じように細胞質で Dicer によってプロセッシングされて siRNA が切り出される (図 2)。その有効性は、プラスミドの細胞内濃度がより低濃度の場合ヘアピンタイプがタンデムタイプを上回っているとされ⁵⁾、ヘアピンタイプが現在最も多く使用されている。

ヘアピンタイプでは、shRNA を転写させるのに U6 RNA や H1 RNA などの短い RNA を転写する pol-III 系プロモーターが多く用いられている。一般に pol-III 系プロモーターは、その転写量は pol-II 系プロモーターよりも多く、また転写開始点が明確であり、転写の終結が 4 つ以上の T で決定されるといった特徴がある。しかしながら、pol-III 系プロモーターはほとんどの細胞で活性化

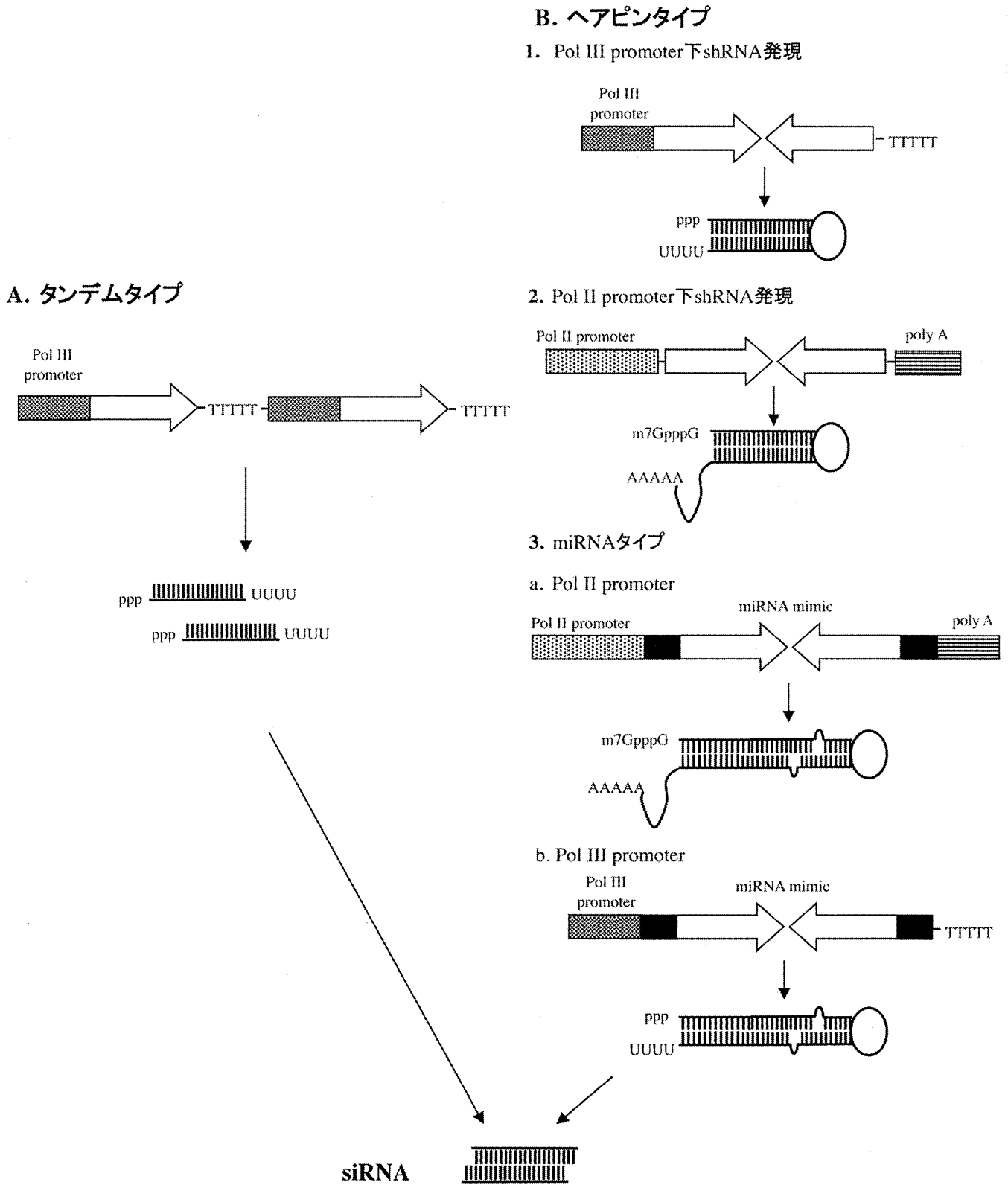


図1 siRNA発現ベクター

状態になっているため、標的遺伝子を組織・細胞特異的に抑制することが困難であり、また詳細は後述するがshRNA転写量が多い場合、shRNA毒

性の副作用を生じるおそれがある。そこで、最近、pol-II系プロモーターを利用したshRNA発現ベクターのシステムが報告されるようになってきた。

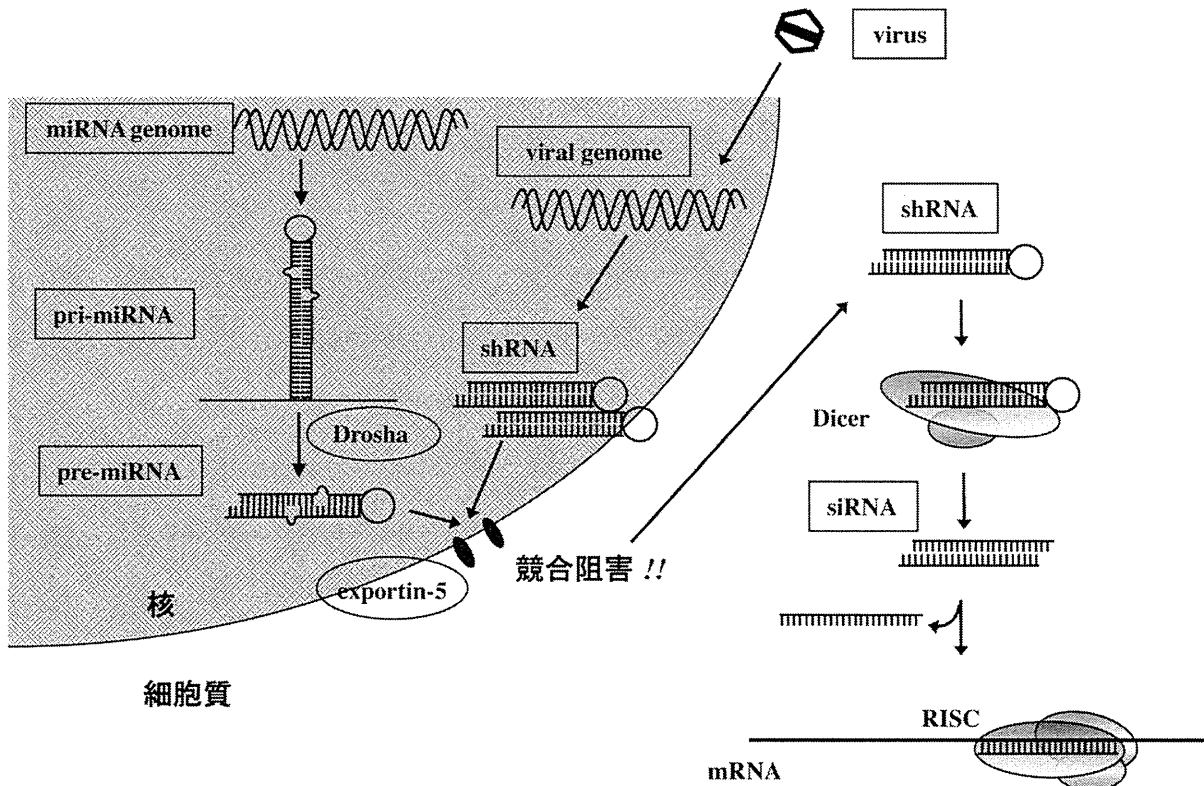


図2 細胞内におけるshRNA機構と過剰shRNAによるmiRNAプロセス障害

細胞内にshRNA発現ウイルスベクターが導入されると、核内で転写されたshRNAはexportin-5により核から細胞質に移行し、細胞質でDicerによってsiRNAに切り出される。siRNAは一本鎖化されRISC複合体へ取り込まれ、活性型RISCはsiRNAの配列に従って相補的な配列をもつ標的mRNAを認識して切断する。核内にshRNAを過剰に発現させた場合、miRNAの前駆体であるpre-miRNAのexportin-5を介する核から細胞質への移行が競合的に阻害される結果、成熟miRNAの発現が低下してしまう。

実際に、比較できるようにエンジニアしたPol-II系がpol-III系プロモーターよりshRNAの発現量が少ないことは示されている⁶⁾。Pol-II系プロモーターを用いる場合にはプロモーターの下流にminipoly Aなどを用いるなどの工夫をしてshRNA配列を挿入する方法⁷⁾以外に、miRNAの多くがpol-II系プロモーターによって転写されることからpol-II系プロモーター下に配置したpri-miRNAのmiRNA配列をsiRNA配列に置き換えたmiRNAタイプのベクターを構築する方法も考案されている⁸⁾。miRNAタイプのベクターはpol-III系プロモーター下で発現させることも可能で⁹⁾、内在性のmiRNAと同じ機構でプロセッシングを受けることから細胞にとってはより生理的な状況下でsiRNAを発現できると考えら

れ有効なRNAi効果が期待できる。

2. 神経疾患への応用

これまでに神経疾患に対するshRNA発現ウイルスベクターを用いた遺伝子治療の*in vivo*における有用性を立証しようと、多くの研究者によって主にモデル動物を対象に投与実験が試みられてきた(表1)。主たる対象は優性遺伝性神経疾患で、特にポリグルタミン病は主要なターゲットとなっている。2004年にXiaらはポリグルタミン病の一つSCA1のモデルマウスに対し、ヒトataxin-1に対するshRNA発現AAV1型ベクターの小脳への直接投与を行い、神経症状が軽減し、かつ病理学的にも小脳の分子層の構造が保たれていることを示し、神経疾患に対するshRNA発現ウイルス