

2007年11月15日

独立行政法人 理化学研究所

ダンベル型ナノサークル RNA で RNA 干渉効果を長期安定に

- 天然 RNA をナノバイオで変換、医薬品開発への確かな道 -

新しい種類の医薬品として、「RNA 医薬」が注目を集めています。これは、病原菌やがん細胞など“悪さをする遺伝子”の機能を破壊して、病気を治療するという手法を用いた薬です。しかし、染色体上の遺伝子を破壊することは難しく、「RNA 干渉 (RNAi)」現象が見つかって、実現への道がようやく見えるようになりました。

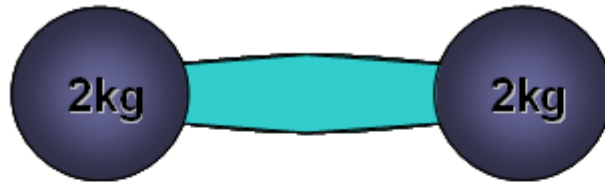
RNA 干渉は、二本鎖の RNA と同じ塩基配列を持つ mRNA が分解され、遺伝子の機能をなくしてしまう現象をいいます。この現象を活用し、人工的に二本鎖の RNA を遺伝子に導入することで、目的となる“悪さをする遺伝子”の発現を抑制する手法が「RNA 医薬」です。

米国スタンフォード大学のアンドリュー・Z・ファイアー教授と米国マサチューセッツ大学のクレイグ・C・メロー教授は、線虫の細胞に存在する 2 本鎖の RNA がほどこけて mRNA が働けない現象を見出し、1998 年に論文にしました。ノーベル財団は、2006 年度、この成果をもたらした両氏にノーベル医学生理学賞を贈りました。

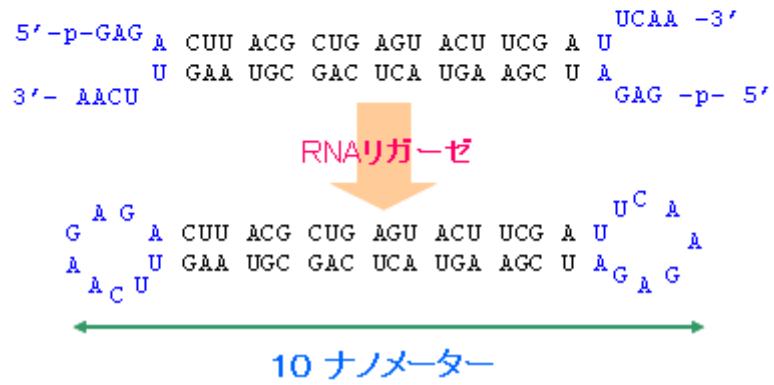
日米欧で RNA 医薬の開発競争が既に始まっていますが、天然型の RNA は生体内で不安定なため RNA 干渉現象が続かないことや、非天然の人工 RNA はその毒性が指摘されるなど、大きな壁が立ちふさがっていることもわかってきました。

理研中央研究所の伊藤ナノ医工学研究室は、ダンベル型の構造を持つ RNA が、RNA 干渉現象の効果を生体内で長期的に発揮することを世界で初めて発見しました。このダンベル型の RNA は、RNA 干渉効果の機能を含んだ長い RNA を、接合酵素「リガーゼ」を使って、両末端を切れ目のない環状に加工することで作りました。ダンベル型 RNA は、生体内では安定性が高いのですが、病巣に運び込まれると、細胞の中にある酵素「ダイサー」で環状部が切り離され、残った二本鎖の RNA は、RNA 干渉現象を引き起こし、目的の遺伝子が働かなくなります。これは、RNA 医薬の開発で今まで問題となっていた RNA 干渉の持続性と毒性を解決するもので、RNA 医薬品の開発を加速させる重要な発見となりました。

A



B



(図) (A) トレーニング用ダンベルと (B) ダンベル型 RNA の合成法と構造

2007年11月15日
独立行政法人 理化学研究所

ダンベル型ナノサークル RNA で RNA 干渉効果を長期安定に

- 天然 RNA をナノバイオで変換、医薬品開発への確かな道 -

◇ポイント◇

- RNA 干渉効果を末端がない環状のダンベル型構造で長期維持
- 人工 RNA が抱える、毒性や RNA 干渉効果の低減といった問題点を解決
- RNA 干渉を活用した、RNA 医薬の設計に革新的な発見

独立行政法人理化学研究所（野依良治理事長）は、ダンベル型構造を持つ RNA が、長期的な遺伝子発現抑制効果を持つことを世界で初めて発見しました。これは、理研中央研究所（茅幸二所長）伊藤ナノ医工学研究室の阿部洋研究員、阿部奈保子訪問研究員と伊藤嘉浩主任研究員による成果です。

2006 年度ノーベル医学生理学賞が、その発見に授与されたように、RNA 干渉 (RNA interference、RNAi) ^{*1} は、配列特異的な遺伝子発現抑制効果から、理想的な医薬品開発技術として期待され、日米欧で激しい開発競争を展開しています。しかし、RNA 分子は、生体中で極めて不安定であるため、持続的な RNA 干渉効果を持たず、医薬品開発に活用する上で重要な問題となっていました。この 1 つの解決法として、非天然型の RNA を利用する研究が進み、その生体内での安定性が高いことが明らかとなりました。しかし、安定性は増すものの、必要とする RNA 干渉効果の低下や非天然である RNA が生体へ与える毒性が懸念されています。

研究グループは、天然型 RNA 分子をダンベル型構造にすることで、分解酵素などの攻撃を受けないエンドレスな構造にさせ生体内で安定性を確保し、長期的な RNA 干渉効果を発揮することを世界で初めて明らかにしました。今回の成果は、RNA 分子の不安定性を克服できる画期的な分子設計指針となり、RNA 干渉法による医薬品開発 ^{*2} に貢献すると期待されます。

本研究成果は、米国化学会誌『*Journal of the American Chemical Society*』（11 月 15 日付け：日本時間 11 月 16 日）にオンライン掲載されます。

1. 背景

遺伝子発現を阻害させる、いわば“遺伝子を沈黙させる”新たな現象として、RNA 干渉 (RNA interference、RNAi) を発見した、米国スタンフォード大学のアンドリュウ・Z・ファイアー教授と米国マサチューセッツ大学のクレイグ・C・メロー教授に、2006 年度のノーベル医学生理学賞が授与されたように、RNA 干渉は近年、大変注目されている現象です。RNA 干渉は、その配列特異的な遺伝子発現抑制効果から、これまでに治療が困難であったがん、遺伝子疾患や、感染症などさまざまな疾患治療を可能とする理想的な医薬品開発技術として期待されています。特に、siRNA (small interfering RNA) と呼ばれる 20 数塩基対の短い二本鎖 RNA が特異性・効果ともに高いことが知られるようになり、現在、日米欧で官民あげて、この

RNA干渉技術を利用した医薬品開発競争を展開しています。しかし、残念ながら、RNA干渉関連の特許技術の多くが、既に欧米で取得済みの状況で、日本の研究開発は明らかに遅れをとってしまっています。そのため、日本では医薬品開発に寄与できる独自のRNA干渉技術を緊急に開発する必要があります。

現在、開発・利用されているRNA干渉技術は、ウイルスやプラスミド由来のDNAベクター^{*3}から天然RNA分子を産生する方法と、化学合成した二本鎖RNAを用いる方法に大別されます。前者のDNAベクターは、主に基礎生物学の実験に用いられていますが、医薬品として応用する場合は、その安全性に問題を残しています。そのため、医薬品開発には、後者の化学合成した二本鎖RNAが用いられています。通常、医薬品は、生体内に投与されると血液中を移動し、患部の細胞に到達し、作用することで役目を果たします。しかし、天然RNA分子を用いた場合には、その生体内での安定性が著しく低く、患部の細胞に到達するまでにRNAが分解されてしまい、RNA干渉効果が持続しないことが、大きな問題となっています。そのため、安定性を高めるための方法として、非天然型RNAが開発されてきました。例えば、2'-フルオロRNA^{*4}や、2'-OメチルRNA^{*5}などがあげられます。しかし、安定性が高まる反面、肝心のRNA干渉効果が低下することが問題となるとともに、非天然核酸が生体に与える毒性も未知のまま、医薬品への応用には大きな困難が待ち構えていると想定されています。

2. 研究成果

研究グループは、天然型RNA分子を化学合成によってダンベル型構造にすることで、これまで抱えていた大きな問題を克服し、今後の医薬品開発の重要な指針となる、長持ちするRNA干渉効果を発揮することを発見しました。

まず、研究グループは、毒性を持たない天然RNA分子を用いたままで、生体内で安定化することはできないかと考えました。今回、その目的にかなう、ナノサイズのダンベル型RNA構造を考案しました(図1)。この構造名は、トレーニングに用いるダンベルに由来します(図2A)。このダンベル型RNAは、化学合成した環状一本鎖RNA(50塩基から60塩基)からなり、名前が示すようにその形は一本鎖の2つのループ部分(重りの部分)と二本鎖のステム部分(手で持つ部分)から構成されます(図2B)。ダンベル型RNAの合成には、RNA干渉効果の機能を含み、5'末端にリン酸基を有する長めの二本鎖RNAを原料として用いました。RNAリガーゼ^{*6}と呼ばれる酵素と原料RNA二本鎖を、水溶液で温度25℃、16時間処理することにより、それぞれRNAの5'末端と3'末端の2カ所が結合され、両末端が閉じたダンベル環状化した、およそ10nmサイズのダンベル型RNAを合成することができました(図2B)。

ダンベル型RNAは、分解酵素を使った試験管内での実験から、通常の本鎖RNAよりも高い生体内安定性を保持することが明らかとなりました。具体的には、生体内の主要なRNA分解酵素であるエキソヌクラーゼ^{*7}とそれぞれのRNAを一緒にして、分解するように処理すると、天然の本鎖RNAは1時間後には10%以下となり、急速に分解されるのに対して、ダンベル型RNAは依然70%以上が残存し、安定性が高いことがわかりました(図3)。その理由は、エキソヌクラーゼが、RNAの末端を認識して分解する特徴を持っているため、RNAをダンベル型化する

と、環状でRNA末端がなくなることから分解されなくなると考えられます。つまり、ダンベル型構造にすることにより、不安定であったRNAを安定化することができました。

次に、ダンベル型RNAがこのように生体中で安定であっても、病巣の患部細胞に到達した時には、RNA干渉効果を引き起こすように機能する必要があります。ダンベル型RNA自体は、RNA干渉効果を持ちませんが、二本鎖RNAの部分が、その効果を持ちます（図1）。そのため、ダンベル型RNAを、ヒト細胞内に存在する酵素「ダイサー^{※8}」で処理すると、ダンベル型のループの部分が除去され、二本鎖の手持ちの部分が切り出されるという特異的な認識と切断を受け、20塩基ほどの二本鎖RNAとなる反応を活用しました（図4）。この結果から、ダンベル型RNAが、細胞内で二本鎖RNAに変換され、RNA干渉効果を引き起こす機能を持つことが明らかとなりました。

さらに、ダンベル型RNAと、通常の本鎖RNAの、ヒト細胞中でのRNA干渉効果の持続性について、比較実験を行いました。その結果、1日後、3日後では、ダンベル型RNAおよびRNA二本鎖ともに、ほぼ同等の活性を示しましたが、5日後では、ダンベル型RNA (Db-23) が1.5倍と、より高い発現抑制活性を示しました（図5）。このことから、ダンベル型RNAの遺伝子発現抑制効果の高い持続性が明らかとなりました。

以上の結果から、ダンベル型RNAが生体内に投与されると、分解されずに患部細胞まで到達し、細胞内では二本鎖RNAに変換され、持続的なRNA干渉効果を引き起こすことが期待されます。これは、RNA干渉効果を利用した医薬品開発を加速する、重要な研究成果となりました。

3. 今後の期待

RNA干渉は、がん、遺伝子疾患や感染症などさまざまな疾患治療における医薬品開発への応用が期待されている重要な現象です。しかし、RNA分子が生体内で極めて不安定であることが、医薬品開発における問題となっていました。今回の成果は、二本鎖RNA分子の両端を結びダンベル構造を作るだけで、RNA分子を安定化できることを明らかにした、重要な発見となりました。この発見が今後のRNA医薬品を分子設計する際に、極めて有用な指針になると考えています。

(問い合わせ先)

独立行政法人理化学研究所

中央研究所 伊藤ナノ医工学研究室

研究員 阿部 洋 (あべ ひろし)

Tel : 048-467-9303 / Fax : 048-467-9300

(報道担当)

独立行政法人理化学研究所 広報室 報道担当

Tel : 048-467-9272 / Fax : 048-462-4715

Mail : koho@riken.jp

<補足説明>

※1 RNA 干渉(RNA interference、RNAi)

RNA 干渉とは、二本鎖 RNA を細胞内に加えると、結果的に片方の RNA と同じ塩基配列を持つ細胞内メッセンジャーRNA (mRNA) が特異的に分解される現象である。メッセンジャーRNA が分解されるため、それがコードしているタンパク質も発現しなくなる。特に、ヒト細胞においては、21~23 塩基対の短い二本鎖 RNA が、特異性および効果の点において有効であると報告されている。

※2 RNA 干渉法による医薬品開発、RNA 医薬

RNA 干渉法により、配列特異的に mRNA を分解することができ、標的遺伝子発現を抑制することが可能である。そのため、がんや感染症に関する原因遺伝子配列がわかれば、その配列を標的として RNA 干渉を引き起こすことにより、原理的にはすべての病気に有効な治療法となり得る。しかしながら、RNA 干渉に用いられる二本鎖 RNA は生体内で極めて不安定であることや、RNA 二本鎖をいかに標的患部(細胞)へ送達するかなどが、医薬品開発に向けて大きな課題となっている。現在、日米欧の製薬会社や、ベンチャー企業の間で、RNA 医薬の研究開発競争が展開されている。日本の RNA 医薬開発はやや立ち後れているのが現状である。

※3 DNA ベクター

ウイルスやプラスミド由来の環状二本鎖 DNA を用いて、ヒト細胞内で RNA を転写することができる。結果として、転写された RNA が RNA 干渉を引き起こす。DNA ベクターは、効率よく RNA を細胞内に作り出すことができ、基礎生物実験で一般的に利用されている。一方、医薬品として DNA ベクターを人体投与する場合、その転写制御が難しいことから安全面が懸念される。

※4 2' - フルオロ RNA

天然 RNA の生体内不安定性を克服するために開発された非天然核酸の一種である。天然 RNA の 2'位水酸基がフッ素基に置換されている。

※5 2' - O メチル RNA

天然 RNA の生体内不安定性を克服するために開発された非天然核酸の一種である。天然 RNA の 2'位水酸基がメトキシ基に置換されている。

※6 RNA リガーゼ

二つの RNA 断片を結合させる酵素。

※7 エキソヌクレアーゼ

生体内、特に血清中における主要な核酸分解酵素の 1 つ。RNA あるいは DNA の末端を認識し、末端から切断、分解する。

※8 ダイサー

細胞内に存在する二本鎖 RNA を切断する酵素で、リボヌクレアーゼ III と呼ばれる。長い二本鎖 RNA が細胞内導入されると、ダイサーによって約 20 塩基対ほどの短い二本鎖 RNA に分解されることがわかっている。

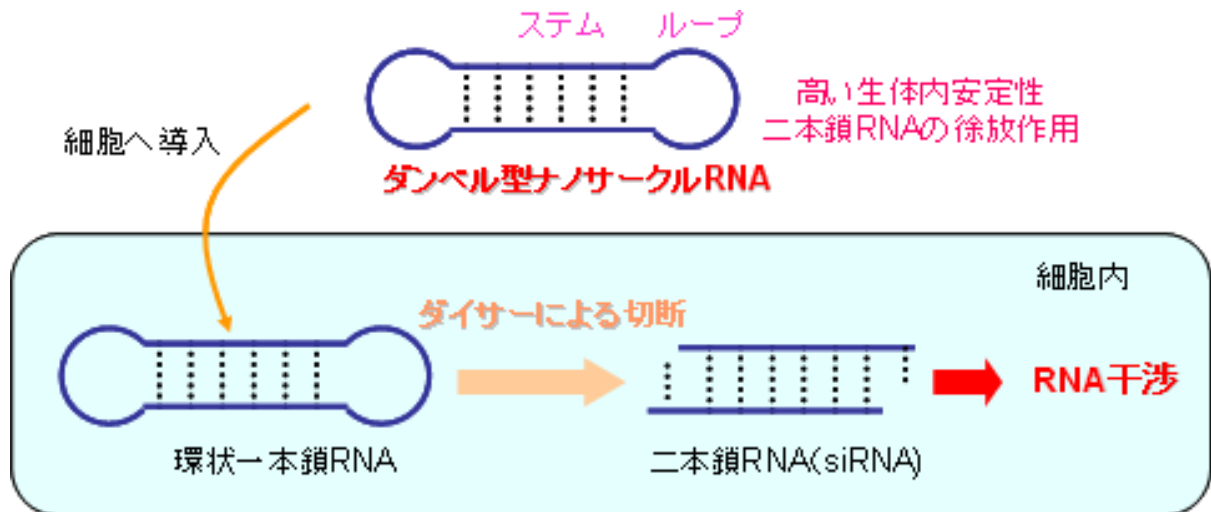


図1 ダンベル型 RNA による RNA 干渉効果の発現メカニズム

ダンベル型 RNA は、細胞外では高い生体内安定性を持ち、分解されずに細胞（患部）に到達する。一方、細胞内に入ると細胞内酵素であるダイサーにより切断を受け、二本鎖 RNA に変換される。結果として、二本鎖 RNA が RNA 干渉作用（遺伝子発現抑制作用）を引き起こす。

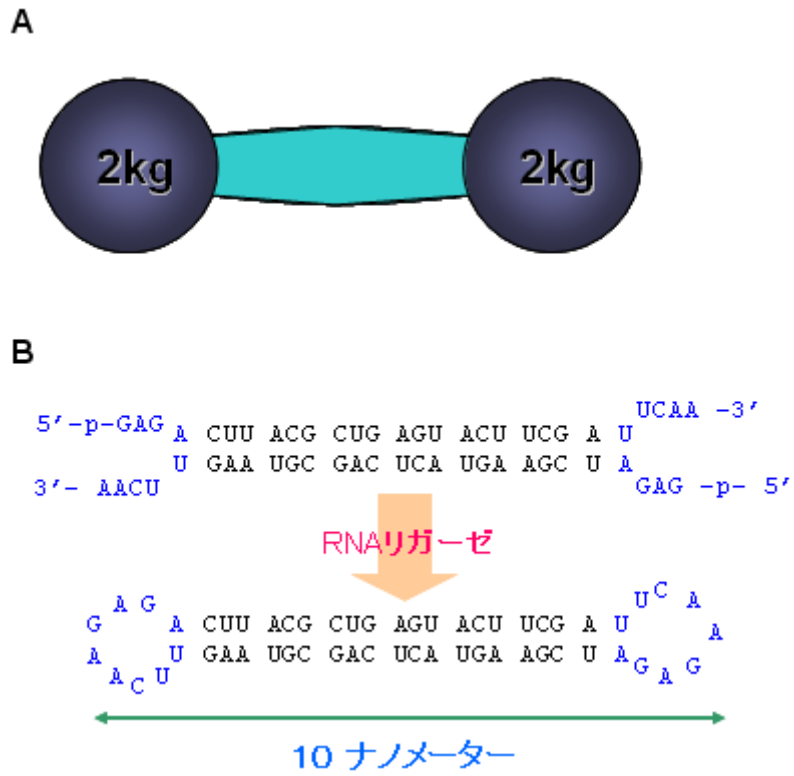


図2 (A) トレーニング用ダンベルと (B) ダンベル型 RNA の合成法と構造

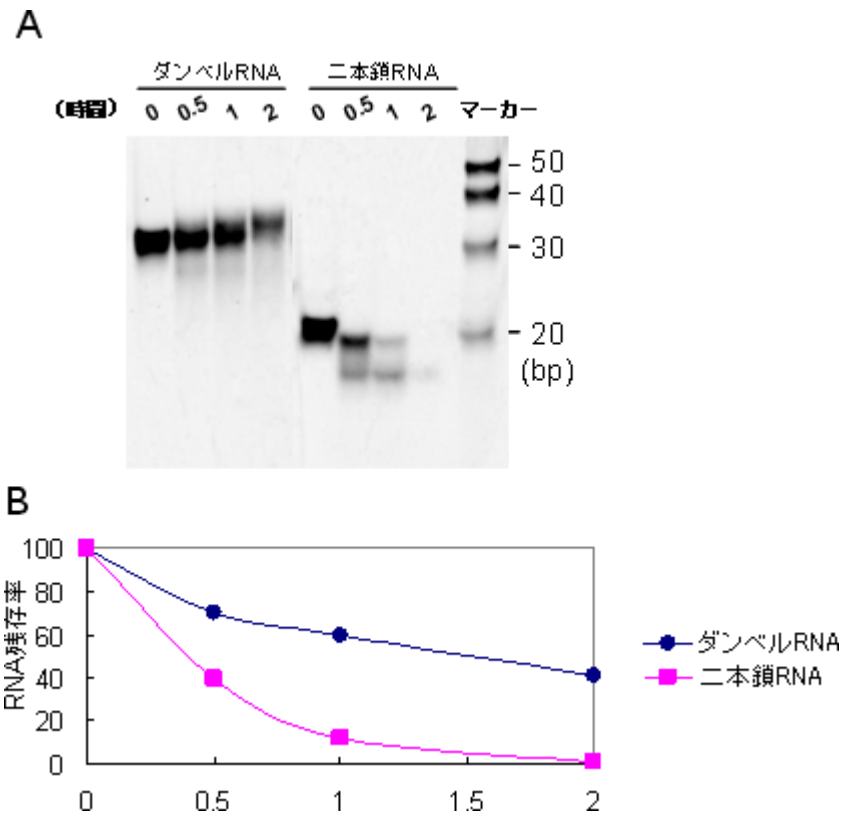


図3 ダンベル型 RNA の安定性

- (A) ダンベル型 RNA および二本鎖 RNA を、分解酵素であるエキソヌクレアーゼで処理し、時間ごとに電気泳動で分析した。
- (B) 電気泳動分析の結果をグラフにした。二本鎖 RNA は、急速に分解されるのに対して、ダンベル型 RNA はゆっくりと分解され、安定性の高いことがわかる。

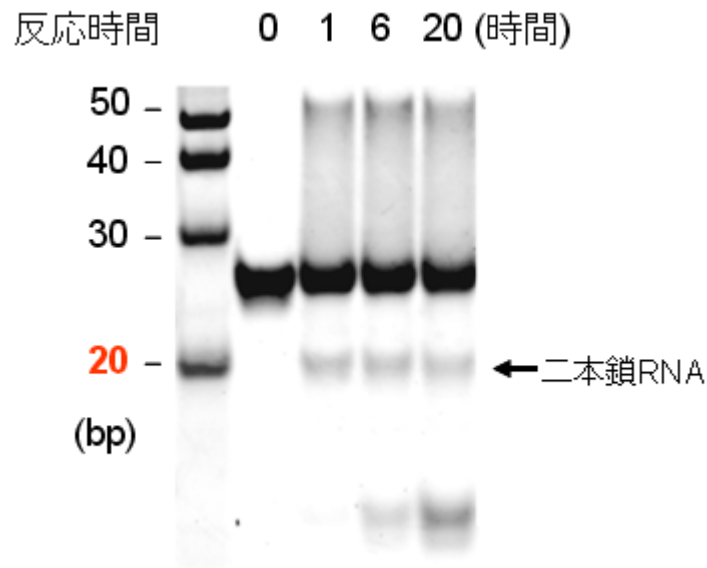


図4 ヒト細胞内酵素ダイサーによるダンベル型 RNA から二本鎖 RNA への変換

ダンベル型 RNA を細胞内酵素ダイサーにより処理し、時間ごとに電気泳動により分析した。ダンベル型 RNA は、徐々に切断され、20 塩基対ほどの二本鎖 RNA を生じ、ほぼ一定の濃度を保っていることがわかる。

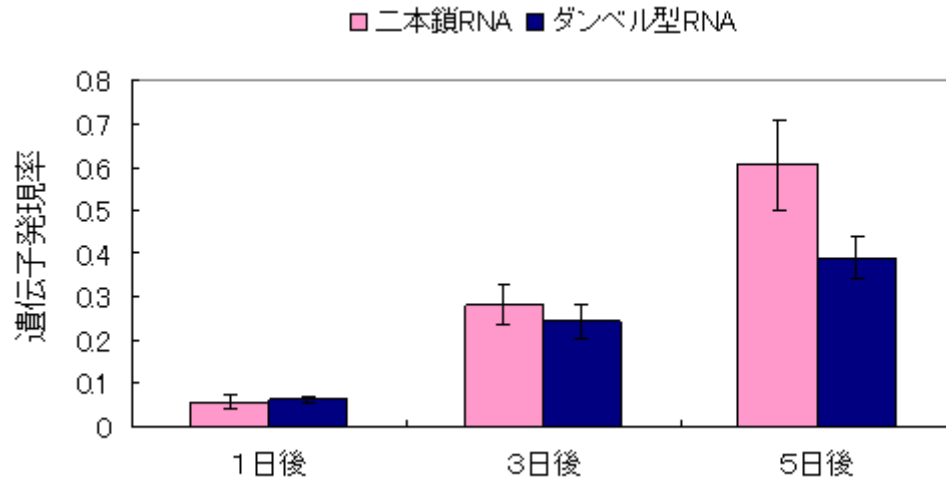


図5 ダンベル型 RNA による長期的な RNA 干渉効果（遺伝子発現抑制効果）

ダンベル型 RNA および、二本鎖 RNA の RNA 干渉作用（遺伝子発現抑制作用）を測定した。それぞれの RNA サンプルをヒト細胞内に導入後、1、3 および 5 日後に、遺伝子発現率を計測した。その結果、1 日後および 3 日後において、両 RNA は同程度の遺伝子発現抑制効果を示したが、5 日後はダンベル型 RNA がより高い効果を示した。