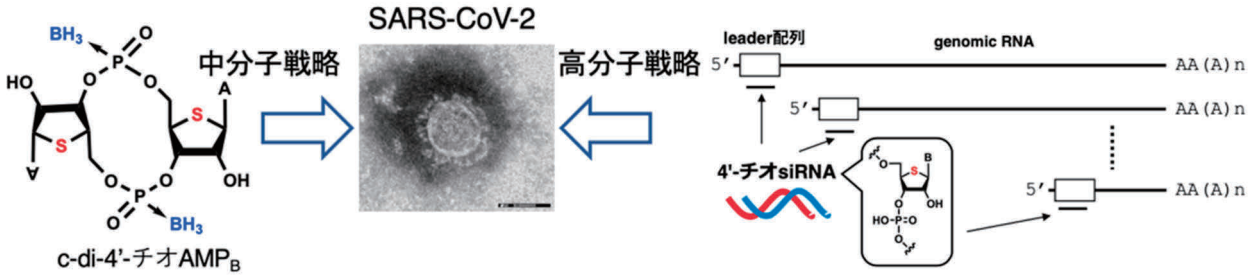
15　ウイルス感染症治療のための中分子・高分子創薬	南川　典昭

【目的】本研究において、我々はRNAウイルス感染症、特に新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）の治療薬開発のための新しい方法論確立を目的とする。具体的には、我々がこれまで独自に開発してきた4'-チオ核酸（核酸の糖部フラノース環酸素原子を硫黄原子に置換した核酸の総称）の技術を基盤とし、膜透過性環状ジヌクレオチド（c-di-4'-チオAMP_B：図左）開発による中分子戦略とヌクレアーゼ抵抗性small-interfering RNA（siRNA）開発による高分子戦略（図右）を実践し、これらによりSARS-CoV-2との闘いに勝利するための礎を築く。

【方法】中分子戦略の目的化合物であるc-di-4'-チオAMP_Bの合成にあたっては、過去に参考となる前例が極めて少なかった。そこでまずモデル化合物として二つのウリジンモノマー1と2を用いてc-di-UMP_Bを合成することで、立案した合成経路の妥当性を検証することにした。化合物1と2を*N*-PhIMTを活性化剤として用いてダイマーとした後、ボラノホスフェート（PB）型ダイマーとするためボラン・ジメチルスルフィド錯体と処理した。続いて、得られたダイマー体の5'位水酸基の保護基を除去し、ジアミダイト試薬を用いたアミダイト化を行った後、連続して*N*-PhIMTを活性化剤とした環化とボラン・ジメチルスルフィド錯体との処理を行い、c-di-UMP_Bを合成した。一方、高分子戦略であるヌクレアーゼ抵抗性siRNA開発については、まず天然型のsiRNAを用いて標的配列の最適化を検討した。当初予定したleader配列の他、ウイルスが独自にコードするRNA依存性RNAポリメラーゼ（RdRp）などを標的としたsiRNAを計11種類調製し、SARS-CoV-2感染細胞（Vero E6細胞）を用いたプラークアッセイを行うことで最適な配列を見出した。続いて、最適なsiRNAのパッセンジャー鎖とガイド鎖の各位置を4'-チオ体で修飾し、それらのRNAi効果と修飾様式の相間解析を行った。

【結果】モデル化合物であるc-di-UMP_Bを合成するために、まず二つのウリジンモノマー1と2の縮合とボラン・ジメチルスルフィド錯体による酸化を行い、ボラノホスフェート（PB）型ダイマーを達成した。続いて、ダイマー体の5'位水酸基の保護基を除去した後、*N*-PhIMT存在下でのアミダイト化、環化と酸化を連続的に行いc-di-UMP_B保護体の合成を達成した。最後に保護基を除去し、c-di-UMP_Bの生成をマススペクトルにより確認した。高分子戦略であるヌクレアーゼ抵抗性siRNA開発については、*in vitro*でのプラークアッセイの結果、検討した11種類の配列の中でRdRpを標的としたsiRNAに顕著な抗ウイルス活性が観察された。そこでこの配列のパッセンジャー鎖とガイド鎖に、Gを除く4'-チオ体を1残基ずつ導入した4'-チオsiRNAを合成し、その抗SARS-CoV-2を先と同様のプラークアッセイにより評価した。また、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に標的配列を組み込んだレポータープラスミドを調製し、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイにより修飾体導入位置がRNAi活性に与える影響を調べた。その結果、活性に若干のばらつきはあるものの、パッセンジャー鎖とガイド鎖のいずれの修飾も天然siRNAに匹敵するRNAi効果を示すことが明らかとなった。

本研究戦略の概要



15. ウイルス感染症治療のための中分子・高分子創薬

南川　典昭

徳島大学 大学院医歯薬学研究部（薬学域）

Key words：環状ジヌクレオチド，small-interfering RNA，4'-チオ核酸，
RNA ウイルス感染症，新型コロナウイルス

緒　言

中国湖北省、武漢を発生源とする新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）は、RNA ウイルス感染症によるパンデミックの恐ろしさを全世界に知らしめた。その後、ワクチンと治療薬が開発され、with コロナの時代を迎えつつあるが、これまでの SARS や MERS、そして SARS-CoV-2 発生の歴史を振り返ると、近い将来、新興コロナウイルス感染症の再来は不可避と予想される。現在、SARS-CoV-2 感染症（COVID-19）の治療薬として、ウイルスの吸着を阻害する中和抗体が 3 品、メインプロテアーゼ阻害剤が 2 品、そしてウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ阻害剤が 2 品臨床使用されているが、SARS-CoV-2 をはじめとする新興・再興ウイルス感染症との闘いに勝利するためには、更なる治療薬の創出ならびに新しい創薬標的の探索は必要不可欠と考えられる。

以上の背景を鑑み、我々は中分子ならびに高分子による RNA ウイルス感染症治療薬開発の新しいプラットホームの開発をめざした。具体的には、我々がこれまで独自に開発してきた 4'-チオ核酸（核酸の糖部フラノース環酸素原子を硫黄原子に置換した核酸の総称）の技術を基盤とし［1〜3］、膜透過性環状ジヌクレオチド（c-di-4'-チオ AMP_B）開発による中分子戦略とヌクレアーゼ抵抗性 small-interfering RNA（siRNA）開発による高分子戦略を実践することで SARS-CoV-2 との闘いに勝利するための礎を築くことを目的とした。

方　法

中分子戦略の目的化合物である c-di-4'-チオ AMP_B の合成にあたっては、ボラノホスフェート（PB）型結合の合成に参考となる前例が極めて少なかった［4］。そこでまずモデル化合物として二つのウリジンモノマー1 と 2 を用いて c-di-UMP_B を合成することで立案した合成経路の妥当性を検証することにした。すなわち、化合物 1 と 2 を *N*-PhIMT を活性化剤として用いて亜リン酸ダイマー体 3 とした後、ボラノホスフェート（PB）型ダイマーとするため用いるボラン・ジメチルスルフィド錯体の等量ならびに反応時間を検討した。続いて、得られたダイマー体 4 の 5'位水酸基の保護基を除去し、ジアミダイト試薬を用いたアミダイト化を行った後、連続して *N*-PhIMT を活性化剤とした環化とボラン・ジメチルスルフィド錯体との処理を行い、c-di-UMP_B の保護体を合成した。最後に保護基を除去し、c-di-UMP_B の合成を達成することで合成経路の妥当性を実証した。

一方、高分子戦略であるヌクレアーゼ抵抗性 siRNA 開発については、まず天然型の siRNA を用いて標的配列の最適化を検討した。当初予定した leader 配列の他、ウイルスが独自にコードする RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ（RdRp）など、いくつかのタンパク質を標的とした siRNA を計 11 種類調製し、SARS-CoV-2 感染細胞（Vero E6 細胞）を用いたプラークアッセイを行うことで最適な配列を見出した。続いて、最適な siRNA のパッセンジャー鎖とガイド鎖の各位置を 4'-チオ RNA で修飾し、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイにより RNAi 効果と修飾様式の相間解析を行った。

結果および考察

モデル化合物として設定した c-di-UMP$_B$ の合成戦略（この方法は、我々のグループが開発したホスホロアミダイト法に基づいて立案した合成法である［3］）を図 1 に示した。別途調製した 1 と 2 を、アセトニトリル中モレキュラーシーブス存在下、*N*-PhIMT を活性化剤としてカップリングさせ亜リン酸ダイマー体 3 とした。続いてボラン・ジメチルスルフィド錯体を用いてボラノホスフェート（PB）型ダイマー体 4 への変換を試みた。この反応では、ボラノ化により脂溶性が向上し、TLC 上に原料より低極性の化合物が観察されると予想し、TLC 上のスポットの変化に基づいて反応を追跡した。まずボラン・ジメチルスルフィド錯体を 10 等量用いて室温で攪拌したが、30 分後でも TLC のスポットに変化は見られなかった。さらに反応時間を延長したところ、化合物が分解したと思われる高極性のスポットへと収束した。用いる試薬の等量数を 4 等量とし 3 時間攪拌したが同様の結果となった。そこで試薬の等量数を 1.5 等量とし、反応開始 15 分で反応を止め、原料と思われるスポットを回収し構造決定したところ、望みとするダイマー体 4 であることが確認された。望みとするダイマー体が合成できたので、続いて 5'位の DMTr 基を除去したのち、得られた 5 に対してジアミダイト試薬を用いたアミダイト化を行い、連続して *N*-PhIMT を活性化剤とした環化の条件に付した。得られた化合物のマススペクトルと ^{31}P-NMR から環化が進行した 7 の生成が確認できたので、それをボラン・ジメチルスルフィド錯体との処理し c-di-UMP$_B$ の保護体 8 を合成した。最後に、保護基を除去することで c-di-UMP$_B$ の生成をマススペクトルにより確認した。

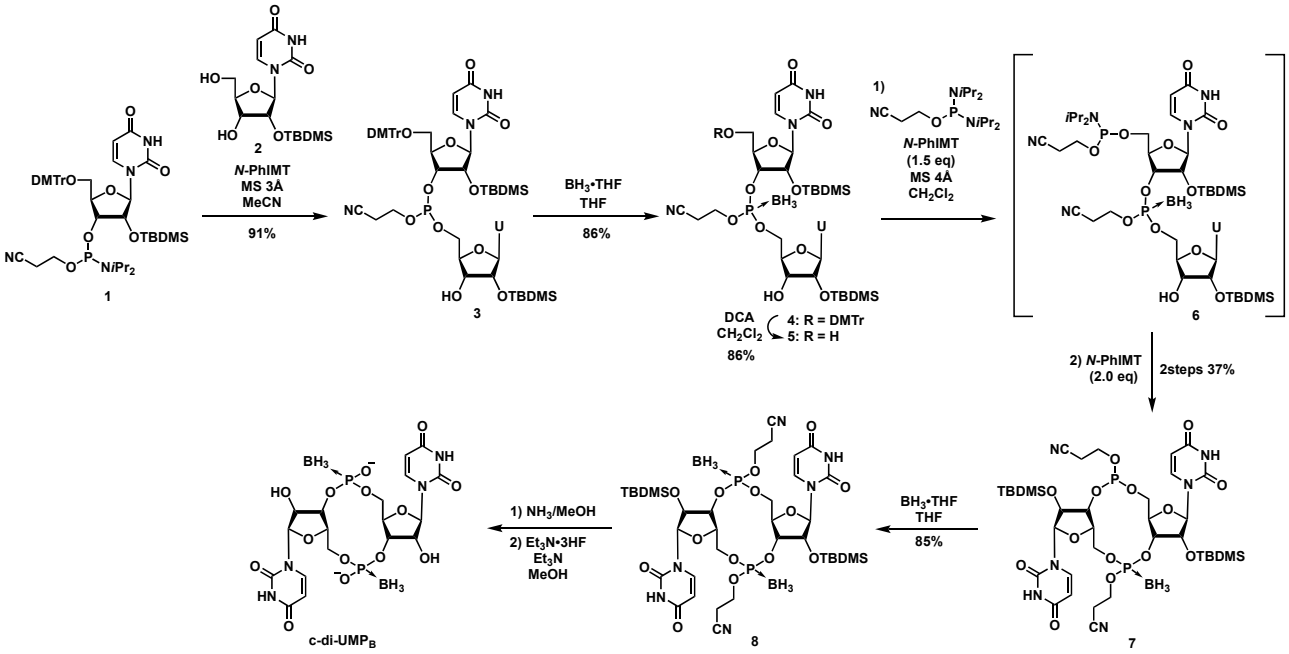


図1. c-di-UMP$_B$の合成

現在、この合成経路によって c-di-4'-チオ AMP$_B$ の合成を進めているが、ボラノホスフェート（PB）結合は不安定であり、基質の分解がしばしば確認された。加えて、合成中間体がリン原子の不斉によるジアステレオマー混合物として得られるため単離精製と構造確認が困難であった。一方、我々はごく最近、環状ジヌクレオチドに膜透過性を付与する新たなアプローチに成功したので［5］、この戦略を用いた膜透過性 c-di-4'-チオ AMP 誘導体合成も進めている。

siRNA による抗ウイルス剤開発については、まず天然型 siRNA を用いて最適な標的配列を決定することにした。当初予定した leader 配列に加え、RdRp、メインプロテアーゼである 3CLpro、ヘリカーゼ、スパイクタンパク質、さらに nsp2、nsp9 と nsp14 の計 8 種類の標的に対して 11 種類の siRNA を合成した［6～8］。続いてそれらを用いてプラークアッセイにより有効な配列を決定することにした。すなわち 96 well plate に播種した Vero-E6 細胞（3×10^4 cells）に合成した siRNA（30 nM）をトランスフェクションし、6 時間後に SARS-CoV-2（MOI＝0.01）を感染させ、感染後

48 時間後のウイルス力価をプラークアッセイにより評価した。活性を評価した siRNA の標的タンパク質とプラークアッセイの結果を表 1 に示したが、RdRp を標的とした siR004 がウイルスの複製抑制効果が最も高いことが示された。

表1. プラークアッセイによる標的配列のスクリーニング

ID	Target	Plaque	ID	Target	Plaque
siR001	Nsp2		siR007	Helicase	
siR002	3CLpro		siR008	Leader	
siR003	Nsp9		siR009	3CLpro	
siR004	RdRp		siR010	Nsp14	
siR005	RdRp		siR011	Nsp14	
siR006	Spike		Mock	MOI=0.01	

NSP：non-structural protein、3CLpro：3C-like protease、Mock：非SARS-CoV-2感染コントロール、MOI：multiplicity of infection。

続いて、この siR004 に、まず G を除く 4'-チオ体を 1 残基ずつ導入し、修飾体の導入が抗ウイルス効果に与える影響を調べることにした。また、ルシフェラーゼ遺伝子の下流に標的配列を組み込んだレポータープラスミドを調製し、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイにより修飾体導入位置が RNAi 活性に影響を調べることにした。すなわち 96 well plate に播種した Vero-E6 細胞（3×10^4 cells）に 4'-チオ修飾 siRNA とレポータープラスミドをそれぞれトランスフェクションし、48 時間後の RNAi 効果を測定した。その結果、4'-チオ修飾 siRNA の RNAi 効果は、いずれも天然型 siRNA とほぼ同程度であることが明らかとなった（図 2）。

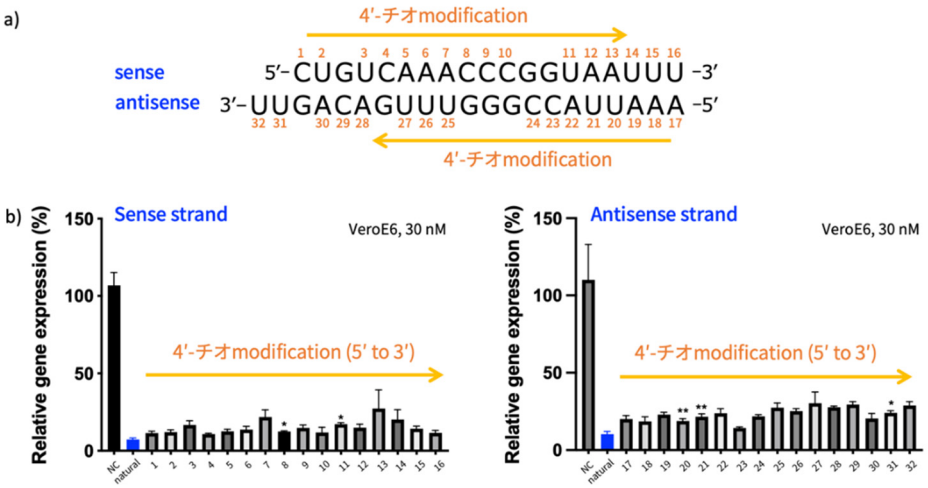


図 2. レポーターアッセイによる 4'-チオ修飾 siRNA の RNAi 効果

a）RdRp を標的とした siRNA の配列。

b）センス鎖に 4'-チオヌクレオチドを導入した siRNA の RNAi 効果。

c）アンチセンス鎖に 4'-チオヌクレオチドを導入した siRNA の RNAi 効果。

Statistically significant differences were determined using a one-way ANOVA followed by Sidak multiple comparisons test to compare with non-treated cells (* $p<0.05$, ** $p<0.005$).

4'-チオ核酸は、ヌクレアーゼ抵抗性に加えて天然型核酸との生物学的等価性を期待して開発した人工核酸である。今回の実験結果から、4'-チオ体の導入が RNAi 効果に許容であることが示された。今後、さらに修飾体の導入数を増やし、より詳細な RNAi 効果と修飾様式の相関解析を行うことで、ヌクレアーゼ抵抗性 siRNA による抗 SARS-CoV-2 治療薬の開発を進めたい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、徳島大学大学院医歯薬学研究部（薬学域）の田良島典子准教授ならびに徳島大学大学院医歯薬学研究部（医学域）の野間口雅子教授、駒貴明准教授である。これらの共同研究者と実験の一部を分担いただいた大学院生に感謝いたします。

文　献

1） Hoshika S, Minakawa N, Matsuda A. Synthesis and physical and physiological properties of 4'-thioRNA: application to post-modification of RNA aptamer toward NF-kB. Nucleic Acids Res. 2004 Jul 19;32(13):3815–3825. PMCID: PMC506795 DOI: 10.1093/nar/gkh705

2） Saito-Tarashima N, Matsuo A, Minakawa N. Gene expression of 4'-thioguanine DNA via 4'-thiocytosine RNA. J Am Chem Soc. 2020 Oct 14;142(41):17255–17259. PMID: 33016701 DOI: 10.1021/jacs.0c07145

3） Saito-Tarashima N, Kinoshita M, Igata Y, Kashiwabara Y, Minakawa N. Replacement of oxygen with sulfur on the furanose ring of cyclic dinucleotides enhances the immunostimulatory effect via STING activation. RSC Med Chem. 2021 Sep 23;12(9):1519–1524. PMCID: PMC8459331 DOI: 10.1039/D1MD00114K

4） Sood A, Shaw BR, Spielvogel BF. Boron-containing nucleic acids. 2. Synthesis of oligodeoxynucleoside boranophosphates. J Am Chem Soc. 1990 Nov 1;112(24):9000–9001. DOI: 10.1021/ja00180a066

5） Motani K, Saito-Tarashima N, Nishino K, Yamauchi S, Minakawa N, Kosako H. The Golgi-resident protein ACBD3 concentrates STING at ER-Golgi contact sites to drive export from the ER. Cell Reports. 2022;41(12):111868. PMCID: PMC 36543137 DOI: 10.1016/j.celrep.2022.111868

6） Ambike S, Cheng CC, Feuerherd M, Velkov S, Baldassi D, Afridi SQ, Porras-Gonzalez D, Wei X, Hagen P, Kneidinger N, Stoleriu MG, Grass V, Burgstaller G, Pichlmair A, Merkel OM, Ko C, Michler T. Targeting genomic SARS-CoV-2 RNA with siRNAs allows efficient inhibition of viral replication and spread. Nucleic Acids Res. 2022 Jan 11;50(1):333–349. PMCID: PMC8754636 DOI: 10.1093/nar/gkab1248

7） Chang YC, Yang CF, Chen YF, Yang CC, Chou YL, Chou HW, Chang TY, Chao TL, Hsu SC, Ieong SM, Tsai YM, Liu PC, Chin YF, Fang JT, Kao HC, Lu HY, Chang JY, Weng RS, Tu QW, Chang FY, Huang KY, Lee TY, Chang SY, Yang PC. A siRNA targets and inhibits a broad range of SARS-CoV-2 infections including Delta variant. EMBO Mol Med. 2022 Apr 7;14(4):e15298. PMCID: PMC8988202 DOI: 10.15252/emmm.202115298

8） Mishra D, Suri GS, Kaur G, Tiwari M. Comparative insight into the genomic landscape of SARS-CoV-2 and identification of mutations associated with the origin of infection and diversity. J Med Virol. 2021 Apr;93(4):2406–2419. PMID: 33347622 DOI 10.1002/jmv.26744