

## アンチセンス核酸 vs. siRNA



核酸医薬は低分子医薬や抗体医薬に続く新たな創薬手法として近年注目を集めています。

核酸医薬にはいくつかの作用様式がありますが、主な作用様式として、疾病の原因となる遺伝子のmRNAを標的として作用し、タンパク質への翻訳を抑制することで薬効を発揮する形が挙げられます。従来の作用機序と異なることから難病の治療薬開発につながると期待されています。

この様式で作用する核酸医薬にはアンチセンス核酸（アンチセンスオリゴヌクレオチド）とsiRNAが多く使用されています。それでは、アンチセンス核酸はsiRNAとどう違うのでしょうか。

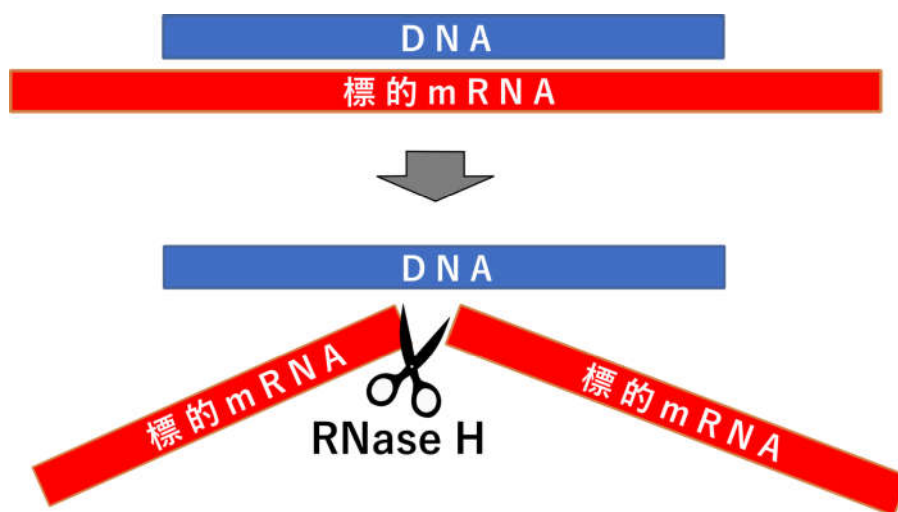
### 作用機構の違いについて

アンチセンス核酸とsiRNAは両方ともmRNAに作用しますが、下に説明する通り、作用する機構は微妙に異なります。

#### ① RNA分解型アンチセンス核酸

アンチセンス核酸はDNAにハイブリダイゼーションしたRNAのホスホジエステル結合を特異的に加水分解するRNase H活性を利用し、ターゲットRNA（mRNA, miRNA etc）とハイブリッドを形成するDNAを加えることでターゲットを特異的に切断するものです。

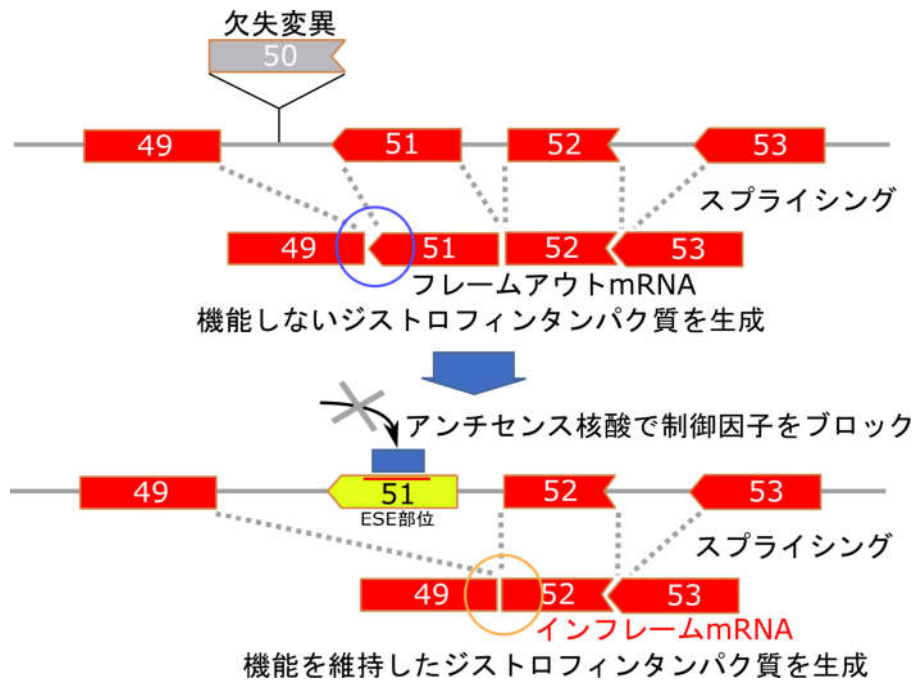
この作用機構より、使用するオリゴヌクレオチドにはRNase Hの認識を誘導するためDNAを主に使用し、核酸分解酵素への耐性を付与するためホスホロチオエート化（S化）を施します。



#### ② スプライシング制御型アンチセンス核酸

アンチセンス核酸にはスプライス部位に強く結合し、スプライシングに関わるタンパク質の結合を阻害することで作用するものもあり、スプライシング調節薬として医薬品に使用されています。スプライシングを誘導するためにスプライシング制

御因子のアクセス部位（Exon Splicing Enhancer (ESE) 部位）にアンチセンスオリゴをハイブリッド形成させ、制御因子のアクセスを阻害してスプライシングを促進（**スプライススイッチング**）させます。



このタイプのアンチセンス核酸はmiRNAとハイブリッドを形成してmiRNAとmiRNA結合分子の結合を阻害することも可能です。

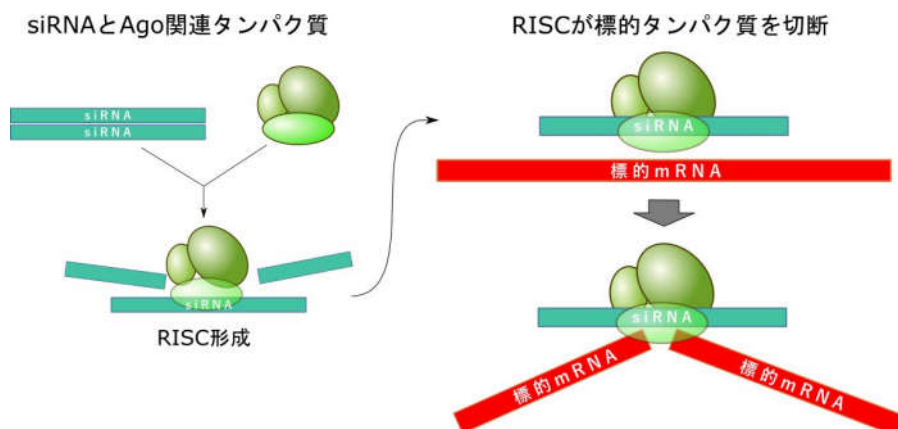
アンチセンス核酸としてmRNAにハイブリッドする1本鎖核酸は、RNA分解型、スプライシング制御型を問わず投与後核内まで到達するため、核およびサイトプラズムのRNA、mRNAやmRNA前駆体、miRNAなど**広範なRNAクラス**に作用します。

### ・アンチセンス核酸の特徴

- アンチセンス核酸はDNA/RNAハイブリッドを形成してmRNAに作用
- RNase Hによる分解とスプライシング調節の2つの作用様式がある
- 分子量が小さく核内まで到達するためmRNA, pre-miRNA, miRNAと多様な分子種をノックダウン

## ③ siRNA

これに対し、siRNAはRNAi反応を利用し、**2本鎖RNAを加えて細胞内でRISCを形成**させ、RISCによってターゲットを特異的に切断します。



従ってRNAオリゴを2本鎖にして使用しますが、RNAは核酸分解酵素への耐性が低いため、**耐性を上げるためにしばしば修饰核酸を導入し、リボソームに封入して耐性を付与**します。

また、細胞内への導入のためにリポソームへの封入のほか、GalNAcなどのリガンド付加なども行われます。

siRNAは2本鎖で膜の透過度が低く核まで到達しないため、**ターゲットとなる分子はmRNA**となります。

### ・ siRNAの特徴

- siRNAは2本鎖RNAが細胞内でRISCを形成、RISCがターゲット遺伝子を切断、分解に至る
- 2本鎖で分子量が大きいため細胞質で作用、主にmRNAをノックダウン
- ヌクレアーゼ耐性が低いため、耐性向上のため修飾核酸やリガンドによる改良が近年著しい

### サービスのご案内

ニッポンジーンマテリアルではアンチセンス核酸に使用される修飾核酸を用いたオリゴヌクレオチドやsiRNAの合成を行っています。核酸研究・配列スクリーニング・条件検討にご使用いただけます。

#### 核酸医薬品研究・開発用オリゴヌクレオチド合成サービス

ニッポンジーンの[siRNA合成サービス](#)でもsiRNA合成を承っています。



## FAQ

### Q アンチセンス核酸に使用されるホスホロチオエート化とはどのような修飾ですか？



**A** 核酸のホスホジエステル（PO）結合をホスホロチオエート（PS）結合に変える修飾（ホスホロチオエート化、S化）は、ヌクレアーゼ分解から核酸を保護するためにアンチセンスオリゴヌクレオチド合成に追加されます。全塩基の結合をPSバックボーンを含むよう修飾することも可能です。ただし、PS結合が追加されるたびに立体構造的な要因でTmは減少します。アンチセンス核酸に大規模なS化を行うと、非特異的なタンパク質への結合を促進します。この特性により、血清中での安定性が増し、細胞への取り込みが改善されますが、アンチセンス核酸の免疫受容体への非特異的結合により、炎症誘発性反応を引き起こす可能性もあります。

### Q 培養中の細胞にアンチセンス核酸やsiRNAを導入する方法は？



**A** アンチセンス核酸を細胞に導入するには、リポソームの使用、リガンドへのオリゴの結合（ペプチド、GalNAc、コレステロール、脂肪酸、アプタマー、抗体など）、エレクトロポレーション、直接送達など、いくつかの方法があります。



### もっと詳しく：アンチセンス核酸の合成

核酸医薬の一種として近年注目を集めているアンチセンス核酸の構造と合成について解説しました。

<https://www.nippongenematerial.com/special-feature/antisense-oligo/antisenseoligo2.html>



## もっと詳しく：アンチセンス核酸の設計

核酸医薬の一種として近年注目を集めているアンチセンス核酸の設計について解説しました。

<https://www.nippongenematerial.com/special-feature/antisense-oligo/antisenseoligo3.html>

[▲ページトップへ](#)

[お問い合わせ](#)

[プライバシーポリシー](#)

Copyright© Nippon Gene Material Co.,Ltd.

## アンチセンス核酸の合成



アンチセンス核酸は核酸医薬に用いられる短鎖（12mer～30mer）のオリゴヌクレオチドで、近年ではラボでもオリゴヌクレオチドの自動合成機などで簡便に合成することが可能です。

しかし一方で天然型のDNAやRNAモノマーで合成したオリゴヌクレオチドは生体内では核酸分解酵素で容易に分解されてしまうため、これらヌクレアーゼに耐性を持たせるために様々な修飾が施されます。

アンチセンス核酸の機能を維持しつつ、どのように核酸にヌクレアーゼ耐性を付与すればよいのでしょうか。

### 様々なアンチセンス核酸の化学構造

アンチセンス核酸は鎖を構成する核酸分子の種類や分子間の結合の種類、また末端に付加する修飾（リガンド）などによってその機能を獲得しています。以下にアンチセンス核酸の化学構造を説明します。

#### RNA分解型（Gapmerアンチセンス）

アンチセンス核酸は、ターゲットとなるmRNAにハイブリッドするDNAオリゴヌクレオチドで、合成も簡単に思えますが、実際in vitroやin vivoではヌクレアーゼによる分解で活性が急速に失われます。

- RNase Hによる認識を損なわず
- ヌクレアーゼによる分解に耐性で
- 生理的に毒性の低い

方法による修飾が試みられ、

##### 1. DNAオリゴヌクレオチドのホスホロチオエート化（S化）

##### 2. 5', 3'末端にLNAや2'OMe, 2'MOEなどの修飾バックボーン核酸部位の導入

がヌクレアーゼ分解を防ぎ、かつRNAとの結合能を向上させることが分かりました。

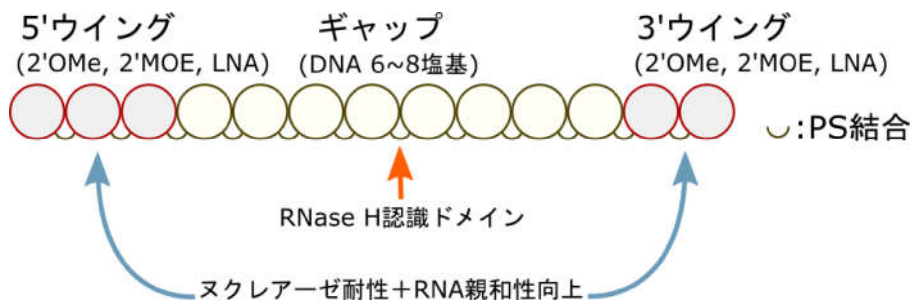


Fig. ギャップマー（模式図）

このようにS化DNAを5'および3'側3～5塩基の修飾核酸、LNAや2'-OMe, 2'-MOE核酸で挟むように合成したギャップマーは、配列中央部に位置するS化DNA部位がRNase Hに認識され、両端のウイング部が5', 3'からのヌクレアーゼに対する分解を緩和し、RNAへの親和性も強化されるため高いアンチセンス効果が得られます。

## スプライシング制御型 (Mixmerアンチセンス)

このタイプのアンチセンス核酸は、スプライス部位に強く結合してスプライシングに関わるタンパク質の結合を阻害し、エキソスキッピングを促すことで作用するものです。

そのため、ターゲットに強く結合すればよく、切断する必要はないため、RNase Hに認識されないモノマーを混ぜた15～30塩基のミックスマーか、DNAを用いないS化オリゴとして合成し、ターゲットにハイブリッドさせます。

2'-OMe, 2'-MOEなどの人工核酸を用いて合成したもの、DNA、LNA（または2'-cEt BNA）を混ぜてホスホロチオエート化したミックスマーや、モルフォリノ核酸で合成したものなどが多く使用され、ターゲットへの親和性が高くヌクレアーゼ耐性の高い塩基が使用されます。

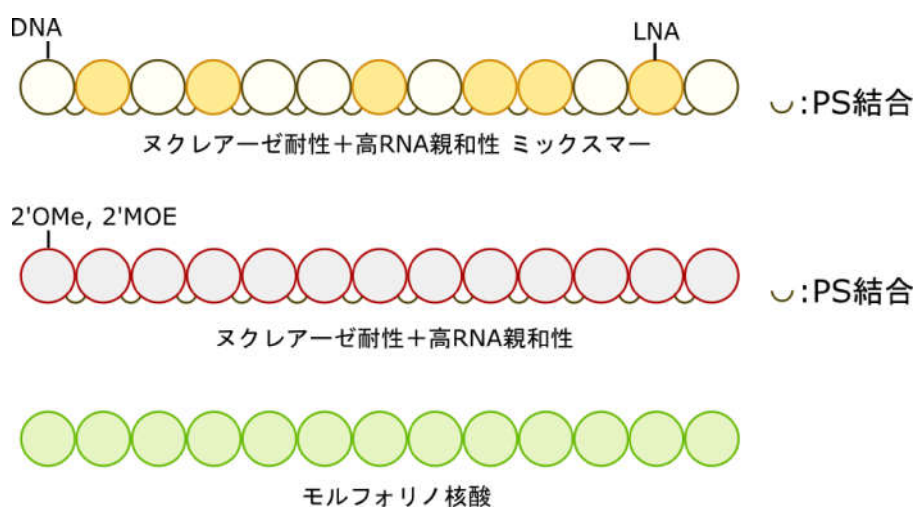


Fig. ミックスマーアンチセンスとモルフォリノ核酸 (模式図)

### サービスのご案内

ニッポンジーンマテリアルではアンチセンス核酸に使用される修飾核酸を用いたオリゴヌクレオチドやsiRNAの合成を行っています。核酸研究・配列スクリーニング・条件検討にご使用いただけます。

[核酸医薬品研究・開発用オリゴヌクレオチド合成サービス](#)



## ヘテロ二本鎖核酸

ヘテロ2本鎖核酸 (heteroduplex oligonucleotide : HDO) は、siRNA、アンチセンスオリゴ (ASO) に続く、第3の核酸医薬モダリティとして注目されているオリゴヌクレオチドです。

HDOは、標的遺伝子の転写産物に結合するアンチセンス核酸と、それに相補的に結合したキャリア鎖 (RNA) より構成されています。

転写産物に結合する鎖はホスホロチオエート化DNAオリゴやギャップマーをご利用いただくことが可能です。それに相補するような形でキャリア鎖であるRNA鎖を合成します。

効果のある鎖長については様々なバリエーションがあるようですが、DNA鎖の方はRNase Hによる認識がされるよう設計します。

キャリア鎖に細胞内へのデリバリーに必要なリガンド（例：tochoferol, cholesteryl, GalNAcやペプチド、抗体など）を結合させることが可能です。この結合はアンチセンス鎖の活性には影響を与えません。

### サービスのご案内

ニッポンジーンマテリアルではヘテロ2本鎖核酸（HDO）の合成を行っています。アカデミア研究者が研究用途で使用する行為についてレナセラピューティクス株式会社からライセンスを受けておりますので、核酸研究・配列スクリーニング・条件検討にご使用いただけます。

[アカデミア限定ヘテロ2本鎖核酸（HDO）合成サービス](#)



## FAQ

### Q アンチセンス核酸（ASO）は HPLC 精製する必要がありますか？



**A** アンチセンス核酸（ASO）は通常、長さが短いため HPLC 精製を必要としません。標準的な脱塩精製のみでも、ほとんどのアンチセンス用途に適しています。しかしながら配列の短さに反比例してオフターゲット効果の可能性が上昇し、実験結果の解釈が複雑になる場合があります。完全長の純度を高めたい場合はカートリッジ精製又はHPLC精製をご検討ください。生体を使用する場合は、より高純度のオリゴヌクレオチドが必要となることがあります。このような場合、合成・精製中に持ち越される可能性のある残留化学物質による毒性を軽減するために、in vivo HPLC 精製（カウンターイオンを全てNa+塩に交換）をお勧めいたします。

### Q ノックダウン実験ではどのくらいの濃度のアンチセンス核酸を使用すればよいですか？



**A** 最適な ASO 濃度は、細胞の種類や生物、使用する核酸の種類および送達方法などに依存します。カチオン性脂質を使用して人工核酸を用いたアンチセンス核酸(ASO)をHela細胞に送達するには通常、1 ～ 30 nM の範囲の ASO を使用します。特定のターゲットとシステムに応じて、用量を最適化していただく必要があります。詳しくは弊社までお問い合わせください。



### もっと詳しく：アンチセンス核酸 vs. siRNA

核酸医薬として注目を集めているアンチセンス核酸とは何か、siRNAとの違いについて解説しました。

<https://www.nippongenematerial.com/special-feature/antisense-oligo/antisenseoligo1.html>



### もっと詳しく：アンチセンス核酸の設計

核酸医薬の一種として近年注目を集めているアンチセンス核酸の設計について解説しました。  
<https://www.nippongenematerial.com/special-feature/antisense-oligo/antisenseoligo3.html>

[▲ページトップへ](#)

[お問い合わせ](#) | [プライバシーポリシー](#)

Copyright© Nippon Gene Material Co.,Ltd.

## アンチセンス核酸の設計



アンチセンス核酸を含む核酸医薬は、疾患に関連する遺伝子の配列情報を基に、誰でも設計することが可能という特徴があります。

しかしながら、実際に効果の高い配列を設計するにはいくつかのポイントがあることが分かっています。

本稿では、**アンチセンス核酸の設計方法**について、これまで知られている設計のポイントを説明いたします。

### 1. アンチセンス核酸の分子構成と合成

当ホームページ「アンチセンス核酸の合成」でも示しました通り、投与後の分解を防ぎ、アンチセンス核酸としてオリゴヌクレオチドを機能させるためにはヌクレアーゼ耐性が必須です。

このため、DNAオリゴヌクレオチドを全て**ホスホロチオエート(PS)**化し、**PSオリゴ**として合成します。

さらにPSオリゴに対し、ターゲットのRNAに対する親和性を高める目的で、核酸アナログである**2'OMe**、**2'MOE**、**LNA**を導入する場合があります。

この時、核酸アナログはアンチセンス分解機構を構成するRNase Hによって認識されないため、**中央にRNase H認識ドメインとしてDNAを6〜8塩基配置し、両端に核酸アナログを配置**します。このようなアンチセンス核酸を**Gapmerアンチセンス**と呼びます。

両端の核酸アナログ部が分解を緩和、RNAへの親和性を強化するため、高いアンチセンス効果が得られると言われています。

また、RNase H活性に依存しないアンチセンス核酸の場合は**位置を問わずに核酸アナログを混ぜて合成すること（Mixerアンチセンス）**も可能です。

この場合はDNAが連続しないよう核酸アナログを混ぜて合成するか、全て核酸アナログとして合成を行います。

核酸医薬に使用される核酸分子・修飾

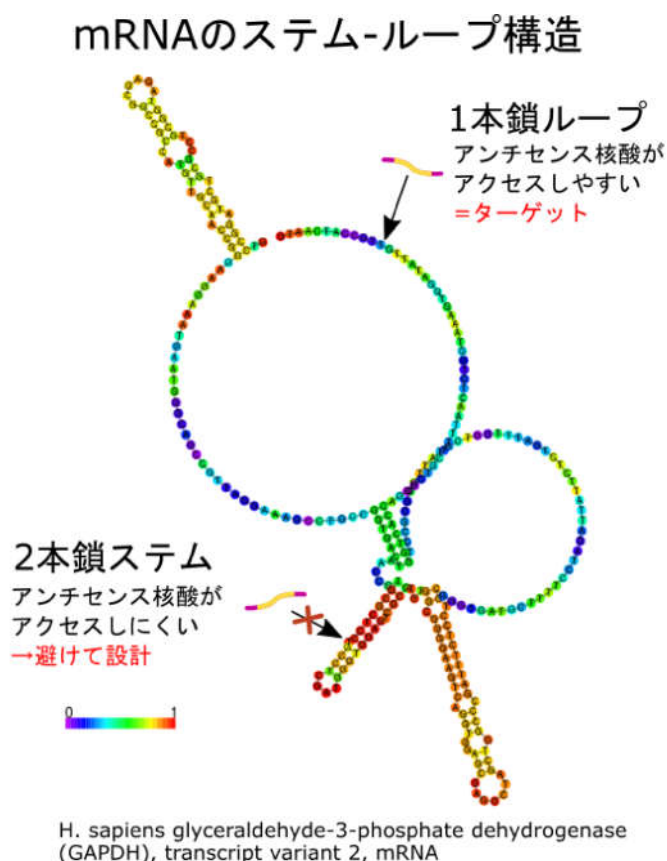
| 核酸アナログ・修飾核酸 | 修飾部位  | RNase H認識 | ターゲットへの親和性 | 備考          |
|-------------|-------|-----------|------------|-------------|
| ホスホロチオエート化  | リンケージ | あり        | 低い         | 高いヌクレアーゼ耐性  |
| 2'OMe       | 糖     | なし        | 高い         | 天然型修飾RNA    |
| 2'MOE       | 糖     | なし        | 高い         | 毒性低         |
| LNA         | 糖     | なし        | 高い         | 親和性大幅向上、毒性高 |
| 5-MeC       | 塩基    | あり        | 高い         | TLR9反応回避    |

## 2. アンチセンス核酸の配列選択方法

### ① mRNAの二次構造予測を行う

アンチセンス核酸はターゲットとなるmRNAに相補的に結合することで作用することにより、**mRNAとの結合部位がステムなどのRNA二次構造を取っているかいないかで効率が大きく変化すると考えられます。**

従って、ターゲット配列の二次構造を予測し、生理条件下で**2本鎖ステム構造**を取るような部分を避け、**1本鎖ループ部分の配列に相補するよう設計**します。



RNAの二次構造予測にはmfold (<http://www.unafold.org/>、結果は計算後6時間の間サイト上に公開)、RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) などのオンラインサイトを利用することが可能です。

また、RNase Hを用いてmRNAへのアクセシビリティをマッピングし、実験的に結合効率の高い部位を推測する手法も取られます。

### ② 得られた標的配列のオフターゲットを確認する

標的とする配列が決定したら、**標的外の遺伝子の中に、標的配列とのホモロジーが高くオフターゲットを示しうる遺伝子がないか確認**します。

また、後のin vivo試験を見据え、ヒト以外に実験動物であるマウスなど他の哺乳動物についてもオフターゲットがないか確認することも重要です。

標的外の遺伝子と相同性を持ち、ハイブリダイゼーションを起こす狭義のオフターゲット効果は近年の研究で、特にLNAを含むGapmerアンチセンスの毒性に関連することが示されており、そのような配列は注意深く除外することが必要です。

### ③ オリゴがダイマー・高次構造を生じないかを確認する

有効かつ特異性の高い配列が得られたら、それを基にオリゴヌクレオチドの配列を設計しますが、その際**オリゴヌクレオチドがダイマーを形成したり、オリゴ自身で高次構造を取らないかを確認**します。

### ④ アンチセンス核酸のデザイン上避けるべき配列は

上①～③で示したポイントの他に、アンチセンス核酸のデザイン上避けるべき配列があります。

細菌由来のゲノムに特徴的な**非メチル化CpGモチーフは脊椎動物の免疫刺激を引き起こす**ことが知られています。特にPu-Pu-CpG-Py-Py（Pu=プリン塩基、Py=ピリミジン塩基）モチーフは強力な免疫刺激を有するため、可能であればこのモチーフを回避して設計します。

このモチーフを避けることが難しい場合、シトシン塩基の代替として**修飾塩基の5-メチルシトシンを用いて合成することによって、免疫応答を緩和させる**ことが示されています。

#### サービスのご案内

5-メチルシトシンを含むオリゴ合成など、核酸医薬研究・配列スクリーニング・条件検討などにご利用いただける核酸合成サービスをご案内します

[ニッポンジーン社 修飾DNAオリゴ合成サービス](#)（グループ会社のホームページに移動します）

[ニッポンジーンマテリアル 核酸医薬品研究・開発用オリゴヌクレオチド合成サービス](#)



また、安定なDNA/RNA高次構造のG-quadruplexを形成するグアニン塩基リッチな配列（特にTTAGGG、TTGGGG）についても、避けたほうが良いと考えられます。

### ⑤ アンチセンス核酸の鎖長について

アンチセンス核酸の鎖長は**一般的に12merから28mer、典型的には15merから22merの間で設定**します。

**25merを超えると細胞内への移行性が低下**し、短い方がコスト上有利かつ移行性も良好ですが、**短いほどハイブリダイゼーション可能なオフターゲットmRNA（狭義のオフターゲット）の数は増加**し、副作用などの発現の可能性が上昇します。

オフターゲット効果は核酸医薬の毒性の度合いと関連すると言われているため、**鎖長の選択はオフターゲット効果を考慮**し、配列の最適化や核酸アナログの選択で回避できるか検討するなど戦略的に決定する必要があると考えられます。

## FAQ

**Q** アンチセンス核酸のターゲット配列として、開始コドン領域は使用できますか？



**A** ターゲットmRNAの2次構造を解析し、ループ部分であることを確認できれば、開始コドン部位はターゲット配列に使用できます。配列がループ部分で、かつリボソームや翻訳開始因子、スプライソソームなどmRNAの成熟・翻訳開始

に関わるタンパク質複合体の結合部位として作用する部位であれば、アンチセンス核酸のターゲットとして使用することが可能と考えられます。

---

**Q** 2'MOEとLNAをギャップマーに入れる際の注意事項を教えてください。

▲

**A** 2'MOEとLNAはホスホロチオエート化（PS化）したギャップマーオリゴとしてアンチセンス核酸に多く用いられます。2'MOEはヌクレアーゼ耐性とターゲットへの親和性を向上させ、毒性を低減させる効果があります。LNAはよりヌクレアーゼ耐性と親和性が高い核酸アナログですが、毒性が生じる場合があります。ギャップマーとして合成する際の典型的なデザインとしては、2'MOEは5塩基の2'MOE + 10塩基DNA + 5塩基2'MOEで構成されます。LNAは3塩基のLNA + 10塩基DNA + 3塩基LNAで構成されることが多いようです。



### もっと詳しく：アンチセンス核酸 vs. siRNA

核酸医薬の一種として近年注目を集めているアンチセンス核酸についてsiRNAと比較しながら解説しました。

<https://www.nippongenematerial.com/special-feature/antisense-oligo/antisenseoligo1.html>

[▲ページトップへ](#)

[お問い合わせ](#)

[プライバシーポリシー](#)