

氏名	はやし じゅんすけ 林 淳 祐
学位の種類	博士(薬科学)
学位記番号	論博薬科第77号
学位授与の日付	平成31年3月9日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	核酸医薬への応用を目指した糖部およびリン酸部 修飾プロドラッグ型核酸の合成と機能評価
論文審査委員	(主査) 教授 春沢 信哉 (副査) 教授 浦田 秀仁 (副査) 准教授 宇佐美 吉英

論文内容の要旨

核酸医薬はオリゴ核酸を用いた医薬の総称であり、特定の遺伝子の発現を選択的に制御可能であることから、次世代の医薬として大きく注目されている。一方、オリゴ核酸は生体内で核酸分解酵素により容易に分解を受け、さらに極性高分子であるため細胞膜透過性が低い。そこでオリゴ核酸を核酸医薬として応用するために、核酸分解酵素耐性や細胞膜透過性の向上を目的として様々な修飾核酸が開発されている。例えば、RNAの糖部2'位に置換基を導入した2'位修飾核酸は核酸分解酵素に対する耐性が向上することから、これまでに上市された核酸医薬でも広く利用されている。また、オリゴ核酸中のリン酸ジエステル(PDE)結合に修飾を施した非荷電性リン酸部修飾核酸であるリン酸トリエステル(PTE)核酸は、核酸分解酵素耐性および細胞膜透過性が向上することから次世代の核酸医薬として注目されている。

一方で、2'位修飾およびPTE修飾を、それぞれsiRNA中およびアンチセンス核酸(AON)中に導入すると遺伝子発現抑制効果が低下することが知られている。この活性低下は2'位の修飾により、siRNAの活性発現に必須となるRISC(RNA-induced silencing complex)の形成が阻害されることや、PTE修飾によりAONとmRNAとの親和性が低下することで引き起こされるものと考えられている。そこで、これらの

問題を解消する方法論の一つとして、生体内での反応で天然型核酸に変換されるプロドラッグ型核酸が注目されている。

筆者の所属する研究室では、細胞内還元環境に応答し、天然型 RNA へと変換される“Reducing-Environment-Dependent Uncatalyzed Chemical Transforming (REDUCT)-RNA” (Figure 1) を、新たな概念に基づくプロドラッグ型 2'位修飾 RNA として開発し、その有用性評価を行ってきた。先行研究において、2'-O-methyldithiomethyl (MDTM) 修飾を有する REDUCT 核酸 (Figure 1, R=Me) は、優れた核酸分解酵素耐性を有すること、および 2'-O-MDTM 修飾を導入した siRNA は天然型 siRNA と同等以上の遺伝子発現抑制効果を有することが明らかにされている。

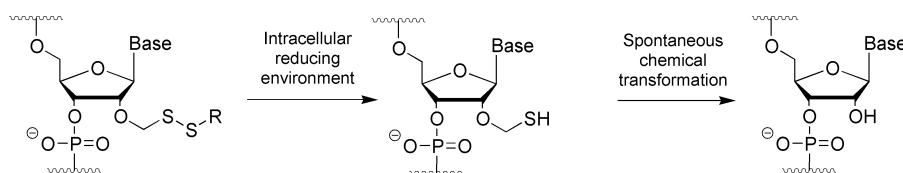


Figure 1. Design and conversion of REDUCT-RNA into natural RNA.

本研究では REDUCT-RNA の核酸医薬応用を目指した基礎検討として、まずルシフェラーゼを用いた評価系にて、2'-O-MDTM siRNA の遺伝子発現抑制効果を、従来から汎用される非プロドラッグ型の 2'位修飾核酸である 2'-O-Me siRNA の抑制効果と比較した。その結果、siRNA のアンチセンス鎖 5'末端側の uridine 部位に複数の修飾を導入した非プロドラッグ型 2'-O-Me siRNA は、遺伝子発現抑制効果を全く示さなかったのに対し、プロドラッグ型 2'-O-MDTM siRNA では 50 % 程度まで遺伝子発現を抑制しており、2'-O-MDTM 修飾の導入に伴う活性低下は、ほとんど見られなかった。この結果から 2'-O-MDTM 修飾は、従来の 2'修飾では siRNA 活性の低下が引き起こされる箇所でも導入可能な修飾であることが示唆された。

次に標的遺伝子配列の拡張を目指し、筆者の所属する研究室で開発された「オリゴ核酸合成後修飾法」を利用して uridine 以外のヌクレオシド残基が 2'-O-MDTM 修飾されたオリゴ核酸の合成法を検討した。まず 2'-O-(2,4,6-trimethoxybenzylthiomethyl) (2'-O-TMBTM) adenosine, guanosine および cytidine phosphoramidite を N-保護ヌクレオシドから 6 工程にて収率 24–30 % で得た後、これらを用いて 2'-O-TMBTM オリゴ核酸を合成した。得られた 2'-O-TMBTM オリゴ核酸は、「オリゴ核酸合成後修飾法」により、uridine の場合と同様に、他の 2'-O-TMBTM ヌクレオシドにおいても極めて効率よく 2'-O-MDTM オリゴ核酸へと変換可能であった。

これらの検討から、2'-*O*-MDTM-adenosine, guanosine, cytidine および uridine を有するオリゴ核酸の合成法を確立することに成功した。今後、本法を用いて病態原因遺伝子を標的とした siRNA を合成し、その薬理活性評価を行う予定である。

また、REDUCT の概念をリン酸部修飾核酸に応用した REDUCT-PTE 核酸の開発を行った。PTE 結合はオリゴ核酸合成時の核酸塩基の脱保護工程で分解することが知られている。そこで、オリゴ PTE 核酸合成のための脱保護条件の検討を行った結果、緩和な脱保護条件として 50 mM K₂CO₃ の MeOH 溶液を用いた条件にて処理を行うことで、オリゴ PTE 核酸が合成可能であることが分かった。しかし、オリゴ PTE 核酸の細胞膜透過性を評価する上で、PTE 核酸の難水溶性が問題となった。そこで、水溶性ポリアミンであるスペルミンを結合させたスペルミン-オリゴ PTE 核酸コンジュゲート (Sp-PTE-ON) を合成し、その細胞膜透過性を評価した。その結果、Sp-PTE-ON は細胞導入試薬を用いずとも細胞膜を透過することが確認され、その効果は PDE 構造を PTE 構造へと変換することで顕著に向上することが分かった。

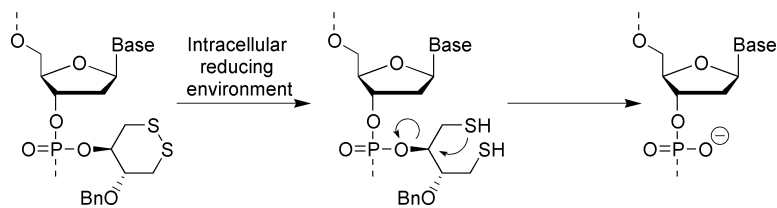


Figure 2. Design and conversion of REDUCT-PTE oligonucleotide containing cyclic disulfide moiety into natural oligonucleotide.

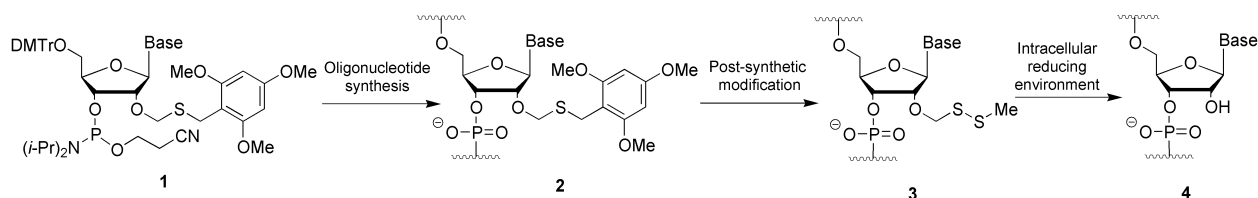
これらの結果を踏まえ、次に環状ジスルフィド結合を含む官能基をリン酸部に導入した PTE 核酸 (REDUCT-PTE 核酸) の合成および機能評価を行った (Figure 2)。その結果、本 REDUCT-PTE 核酸が極めて優れた血清中での安定性および細胞膜透過性を有することが明らかとなった。そこで、本分子を AON 中に導入した REDUCT-PTE-AON の合成を行い、遺伝子発現抑制効果を評価したところ、本分子による十分な遺伝子発現抑制効果は確認されなかった。その原因として環状ジスルフィド結合の開裂が遅く、細胞内に到達後の天然型 AON への変換反応が十分に進行していないことが考えられた。

今後、本研究で得られた知見に基づき、より遺伝子発現抑制効果の高い REDUCT-PTE 核酸の創出につなげていきたいと考えている。

論文審査の結果の要旨

核酸医薬はオリゴ核酸を用いた医薬の総称であり、特定の遺伝子の発現を選択的に制御可能であることから、次世代の医薬として大きく注目されている。一方、オリゴ核酸は生体内で核酸分解酵素により容易に分解を受け、さらに極性高分子であるため細胞膜透過性が低い。そこでオリゴ核酸を核酸医薬として応用するために、核酸分解酵素耐性や細胞膜透過性の向上を目的として様々な修飾核酸が開発されている。

これまでにオリゴ核酸の糖部2'位やリン酸部に修飾基を導入することで、核酸分解酵素耐性や細胞膜透過性が向上することが報告されているが、これらの修飾核酸を小分子二本鎖RNA (siRNA) やアンチセンスオリゴ核酸 (AON) などに導入すると遺伝子発現抑制活性がしばしば低下することが問題とされている。論文申請者は、所属する研究室にて新たに開発された、細胞内還元環境において天然型RNAへと変換されるプロドラッグ型核酸である2'-O-メチルジチオメチル (MDTM) RNA **3**に着目し、本分子を既存の2'位修飾に代わる新たな修飾核酸として核酸医薬へと応用することを目指し、2'-O-MDTM siRNAの遺伝子発現抑制作用および標的配列拡張のために天然4種塩基を有する2'-O-MDTMオリゴ核酸の合成検討を行った。

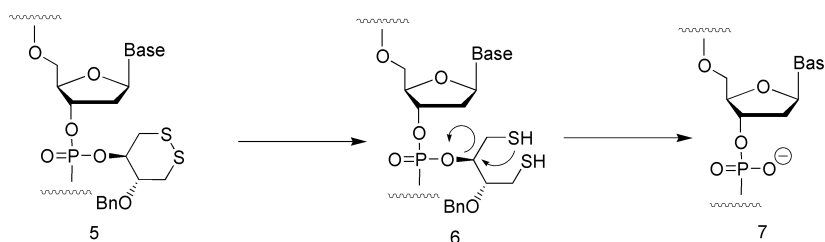


まずルシフェラーゼを利用した評価系を用いて、プロドラッグ型2'-O-MDTM siRNA **3**の遺伝子発現抑制効果を、従来から汎用される非プロドラッグ型の2'位修飾核酸である2'-O-Methyl (Me) siRNAの抑制効果と比較した。その結果、siRNAのアンチセンス鎖5'末端側のuridine部位に複数の修飾を導入した非プロドラッグ型2'-O-Me siRNAは、遺伝子発現抑制効果を全く示さなかったのに対し、プロドラッグ型2'-O-MDTM siRNAでは50%程度まで遺伝子発現を抑制しており、2'-O-MDTM修飾の導入に伴う活性低下は、ほとんど見られなかった。この結果から、2'-O-MDTM修飾は、従来の2'修飾ではsiRNA活性の低下が引き起こされる箇所でも導入可能な修飾であることが示唆された。

そこで次に論文申請者は標的遺伝子配列の拡張を目指し、申請者の所属する研究室で開発された「オリゴ核酸合成後修飾法」を利用して uridine 以外のヌクレオシド残基が 2'-O-MDTM 修飾されたオリゴ核酸の合成法を検討した。2'-O-(2,4,6-trimethoxybenzylthiomethyl) (2'-O-TMBTM)

adenosine, guanosine および cytidine phosphoramidite **1** を *N*-保護ヌクレオシドから 6 工程にて収率 24–30 % で得た後、これらを用いて 2'-*O*-TMBTM オリゴ核酸 **2** を合成した。得られた 2'-*O*-TMBTM オリゴ核酸 **2** から、「オリゴ核酸合成後修飾法」により、uridine の場合と同様に、他の 2'-*O*-TMBTM ヌクレオシドにおいても極めて効率よく 2'-*O*-MDTM オリゴ核酸 **3** へと変換可能であり、天然 4 種塩基を有する 2'-*O*-MDTM オリゴ核酸の合成法を確立した。

さらに論文申請者は、細胞内還元環境において天然型オリゴ核酸へと変換される新規プロドラッグ型核酸として、環状ジスルフィド結合を含む官能基をリン酸部に導入した PTE 核酸 **5** の合成および機能評価を行った。



その結果、本プロドラッグ型 PTE 核酸は血清中で極めて優れた安定性を有し、細胞導入試薬を用いずとも十分な細胞膜透過性を有することが明らかとなった。残念ながら本修飾を導入した AON は、十分な遺伝子発現抑制作用を示さなかったものの、これらの知見はプロドラッグ型オリゴ PTE 核酸の核酸医薬への応用の可能性を実験的に示したものであり、今後の進展が大いに期待される。

以上のように本論文は、論文申請者の所属研究室で新規に開発された 2'-*O*-MDTM siRNA が、既存の 2'-*O*-Me siRNA よりも優れた遺伝子発現抑制作用を示すことを明らかにするとともに、天然 4 種塩基に 2'-*O*-MDTM 修飾を導入したオリゴ核酸の合成法の確立にも成功している。さらに、細胞内還元環境にて変換されるプロドラッグ型核酸のコンセプトを PTE 核酸に応用し、プロドラッグ型 PTE 核酸が優れた血清中での安定性および細胞膜透過性を有することを明らかにしている。残念ながら本修飾を導入した AON は、十分な遺伝子発現抑制作用を示さなかったものの、これらの成果は、核酸創薬研究における重要な知見を含んでおり、今後プロドラッグの概念を基盤とした核酸創薬研究の発展に大きく寄与するものと考えられる。

以上により、上記の論文は、博士(薬科学)論文として適当と判断する。