



Title	siRNA医薬品の品質管理を志向した非変性条件の陰イオン交換クロマトグラフィーによる分析及びアニーリングにおいて生じる不純物の解析
Author(s)	騰川, 博之
Citation	大阪大学, 2025, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/101941
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名（騰川博之）	
論文題名	siRNA医薬品の品質管理を志向した非変性条件の陰イオン交換クロマトグラフィーによる分析及びアニーリングにおいて生じる不純物の解析
論文内容の要旨	
<p>核酸医薬はオリゴ核酸を主成分とした医薬品で、これまで難治とされてきた疾患の治療法として注目を集めている新たな創薬モダリティである。2024年11月時点で22品目が承認され、現在も臨床研究が多数進行中である。その中でも近年siRNA医薬品の開発が活発であり、2019年以降の5年間で6品目が承認されている。siRNAは約20塩基長のセンス鎖とアンチセンス鎖からなる2本鎖核酸であり、RNA誘導サイレンシング複合体（RISC）にアンチセンス鎖のみが取り込まれ複合体を形成し、標的mRNAを取り込み切断することで標的とするタンパク質の発現を抑制することができる。このようにsiRNA医薬品の有効成分は2本鎖のオリゴ核酸であるため、1本鎖のオリゴ核酸を有効成分とするアンチセンス医薬品と比較して混在している不純物の種類も多くまたその分離も困難となる。また複数のホスホロチオアート（PS）修飾が導入されたsiRNA医薬品が承認されているが、リン原子が不齊点となり有効性の異なる多くのジアステレオマーの混合物となっている。そこで本研究では、高い分離能を有し、オリゴ核酸の立体構造を維持したまま非変性条件で分析するのに適している陰イオン交換クロマトグラフィー（AEX）に着目し、siRNA医薬品に含まれる不純物及びPS修飾に由来するジアステレオマーの分離への応用可能性を評価した。またその検討の過程でアニーリングにおいて不純物が生じることが示唆されたため、その構造及びメカニズムの検証を行った。</p> <p>第一章では非変性条件のAEXによるsiRNA医薬品に含まれる不純物の分離を目的として実験を行った。まず天然型のsiRNAをモデル配列として条件検討を行い分析条件の最適化を行った。その結果、カラム温度30°C、移動相のpH 9.0の分析条件で2本鎖の変性を防ぎながら不純物を良好に分離できることが示された。最適化した条件で3つのモデル配列の目的物質と過剰な1本鎖の分離を検討したところ、良好に分離できることが示された。続いて、より目的物質と構造が類似しており分離が困難である不完全長の2本鎖の分離を試みたところ、末端または中央付近の1塩基を欠損した不完全長の2本鎖も良好に分離可能であることが示された。さらにその保持挙動を解明するために、末端から1~5塩基欠損した不完全長の2本鎖を用意しその保持挙動を検証したところ、欠損する塩基の数が増えオーバーハングの塩基が増えるのに従い保持が強くなる傾向が示された。また1本鎖及び2本鎖の状態のRNA及びDNAを分析し、その保持の強さと二重らせんの構造との相関を考察したところ、負電荷を有するリン酸の向きが保持の強さに影響することが示唆された。続いてpHが9.0または7.0の移動相において末端から1~5塩基欠損した不完全長の2本鎖を分析したところ、1塩基欠損により露出する対面塩基が互変異性の塩基であるUまたはGである場合に、アルカリ性の移動相において塩基上に負電荷を生じるため保持に強く関与することを明らかとした。このように、非変性条件のAEXがsiRNA医薬品に含まれる過剰な1本鎖や不完全長の2本鎖などの不純物の分離に適していることが示され、またその保持機構の一端を明らかにした。</p> <p>第二章ではPS修飾を有するsiRNAのジアステレオマーの分離への非変性条件のAEXの応用可能性を検証した。2か所のPS修飾を有する配列について、1本鎖の状態よりも2本鎖の状態で分離が良好となる傾向が示された。さらに、分析条件とPS修飾の位置によるジアステレオマーの分離への影響を検証したところ、1本鎖の状態では分析条件やPS修飾の位置により様々なピークパターンを示した一方で、2本鎖の状態では分析条件やPS修飾の位置が変化してもピークパターンに明確な影響を与えないことが示された。続いて、センス鎖またはアンチセンス鎖の5'末端に1か所PS修飾を有する配列を用いてRp体とSp体の溶出順について検証したところ、2本鎖を形成した状態において負電荷を有する硫黄原子が内側を向いているRp体よりも外側を向いているSp体の保持が強いことが示され、カラム官能基の4級アンモニウム基の正電荷と負電荷を有するPS結合の硫黄原子とのアクセシビリティの差によって分離していることが示唆された。さらに、4か所のPS修飾を有するsiRNAのジアステレオマーの分離を検証したところ1つのモデル配列において16の全てのジアステレオマーのピークトップが検出され、6か所のPS修飾を有するsiRNAでは64のジアステレオマーのうち約30のピークトップが検出された。このように、非変性条件のAEXが複数のPS修飾を有するsiRNA医薬品のジアステレオマーの分布の評価に有用であることが示され、またその保持機構の一端を明らかにした。</p> <p>第三章では複数のPS修飾を有するsiRNAをアニーリングする際に生じる不純物の構造の解析及びそのメカニズムの</p>	

検証を行った。まず、アニーリングの時間による不純物の生成量への影響を検証したところ、時間が長くなることにより不純物が顕著に増加し、その不純物はPS結合における切断により生じたものであることが示唆された。続いて、PS修飾の数と切断量の相関について検証したところ、PS修飾を2つ連続で有する配列においてその5'末端側のPS結合で切断が生じやすいことが明らかとなった。また、1つの配列において2ロット間で切断物の量に明確な差が生じた。さらに、アニーリングにおける加熱冷却処理の温度が高いほど切断物が多く生じること、微量に含まれる2価金属イオンが切断に関与していること、切断が生じるPS結合の5'末端側のリボースの2'-OHが反応に関与していることが示唆された。これらのことから、加熱することによりオリゴ核酸がフレキシブルな状態となり2価金属イオンが配位し、チオリン酸のリン原子の電子密度が低くなる結果、5'末端側のリボースの2'-OHがリン原子を求核攻撃することにより切断が生じると推定した。さらに、11種の2価金属イオンを添加して切断への影響を検証したところ、Cu²⁺を添加した場合にのみ2連続のPS修飾の5'末端側のPS結合における切断を促進し、1か所のみPS修飾を有する配列に対してはCu²⁺を添加しても顕著な切断物は検出されなかったことから、Cu²⁺は連続したPS修飾を有する配列を選択的に切断することが示唆された。本研究から、1つの可能性として合成したオリゴ核酸の精製において移動相などに含まれるCu²⁺が残留し複数のPS修飾を有するsiRNAのアニーリング中に切断を誘導することが示唆された。

以上のように、本研究ではsiRNA医薬品の品質管理の手法として非変性条件のAEXの有用性を示し、また複数のPS修飾を有するsiRNAのアニーリングにおいてPS結合で切断が生じることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨及び担当者

	氏　名　(　騰川　博之　)	
	(職)	氏　名
論文審査担当者	主　查　　教授	小比賀　聰
	副　查　　教授	近藤　昌夫
	副　查　　准教授	原田　和生

論文審査の結果の要旨

核酸医薬品はオリゴヌクレオチドを主成分とした医薬品であり、難治性疾患の新たな治療法として注目を集めている創薬モダリティの一つである。その中でも近年siRNA医薬品の開発が活発に行われている。医薬品の開発において品質の評価は極めて重要であるが、2本鎖のオリゴヌクレオチドで構成されるsiRNA医薬品は、1本鎖のオリゴヌクレオチドを有効成分とするその他の核酸医薬品と比較して、混在している不純物の種類も多くまたその分離も困難となる。またsiRNA医薬品にはその安定性向上のための化学修飾として複数のホスホロチオアート（PS）結合が導入されているが、PS結合のリン原子が不齊点となるため、現状では有効性の異なる多くのジアステレオマーの混合物として用いられているため、品質の評価という観点からはまだ課題が多い。申請者は、オリゴヌクレオチドの分析法として、高次構造を維持したまま分析するのに適している陰イオン交換クロマトグラフィー（AEX）に着目し、siRNA医薬品に含まれる不純物及びPS修飾に由来するジアステレオマーの分離への応用可能性を評価した。また本研究の過程で、siRNA医薬品の2本鎖形成過程（アニーリング過程）において予期せぬ不純物が生じる可能性を見出し、その不純物の構造及び生成メカニズムの検証を行った。その結果、以下に示す優れた成果を得た。

1. siRNA医薬品に含まれる様々な不純物の分離を目的として分離条件の検討を行ったところ、非変性条件のAEXがsiRNA医薬品に含まれる過剰な1本鎖や不完全な2本鎖などの不純物の分離に適していることを見出すとともに、その保持機構の一端を明らかにした。
2. PS結合を有するsiRNA医薬品のジアステレオマー分離に対して非変性条件のAEXの応用可能性を検証したところ、1本鎖の状態よりも2本鎖の状態で分離が良好となる傾向を見出した。また、2本鎖を形成した状態において負電荷を有する硫黄原子が内側を向いているRp体よりも外側を向いているSp体の保持が強いことを明らかにした。
3. 複数のPS修飾を有するsiRNA医薬品のアニーリング過程において生じる不純物について精査を行ったところ、アニーリングにおける加熱冷却処理の温度が高いほど切断物が多く生じること、微量に含まれる2価金属イオンが切断に関与していること、切断が生じるPS結合の5'末端側のリボースの2'-OHが反応に関与していることを明らかにした。

以上のように、本論文では、siRNA医薬品の品質管理の手法として非変性条件のAEXの有用性を示すとともに、複数のPS結合を有するsiRNAのアニーリング過程においてPS結合で切断が生じることを初めて明らかにした。この成果は、優れた学術的意義を有することに加えて、今後のsiRNA医薬品の品質評価や品質確保に関する研究の発展にも大きく寄与するものであることから、本論文は博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。