



Title	スルホンアミド構造およびヘテロ環構造により糖部を固定した架橋型人工核酸の合成と機能性評価
Author(s)	三岡, 恭典
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/52264">https://hdl.handle.net/11094/52264</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> 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 ( 三岡 恭典 )

## 論文題名

スルホンアミド構造およびヘテロ環構造により糖部を固定した架橋型人工核酸の合成と機能性評価

## 論文内容の要旨

核酸医薬品は低分子医薬品、抗体医薬品に続く医薬品として大きな注目を集めている。核酸医薬品候補の中で、最も開発の進行しているのがアンチセンス医薬品 (アンチセンスオリゴヌクレオチド) である。アンチセンス法では、疾病の原因となる遺伝子のmRNAに対してアンチセンスオリゴヌクレオチドを結合させて二重鎖を形成し、タンパク質への翻訳を阻害する。アンチセンス医薬品に求められる性質として、相補鎖RNAとの結合親和性と生体内酵素に対する安定性が挙げられ、これらの性質を併せ持つ核酸分子として、著者の所属研究室では核酸糖部に架橋を施した架橋型人工核酸を開発してきた。また、アンチセンス医薬品として薬効を示すためには、標的とする臓器に移行しなければならない。これらの要求を満たし、核酸医薬品への応用に向けた架橋型人工核酸の開発が世界中で行われている。この背景のもと、著者は低分子医薬品の創薬研究において重要な構造であり、数多くの医薬品に含まれているスルホンアミド構造とヘテロ5員環構造に着目した新規架橋型人工核酸「スルホンアミド架橋型人工核酸」、「トリアゾール環架橋型人工核酸」及び「テトラゾール環架橋型人工核酸」を設計し、新規架橋構造の構築を行った。

核酸糖部2',4'位にスルホンアミド架橋構造を有するチミジンアナログの合成は、文献既知化合物を用い、スルホンアミド構造構築後のチミン塩基の導入と分子内求核置換反応により達成した。また、X線結晶構造解析により構造を確認した。5-メチルシチジンアナログの合成は、チミジンアナログの塩基部の変換により達成した。合成したアナログをオリゴヌクレオチドへ導入し、相補鎖DNAおよびRNAに対する二重鎖形成能を融解温度 ( $T_m$ ) 測定により評価した。その結果、相補鎖RNAに対しては優れた結合親和性を示す一方で、相補鎖DNAに対して大きな結合親和性の低下を示し、非常に優れたRNA選択性を有することが明らかとなった。また、生体内の主な分解酵素である3'-エキソヌクレアーゼを用いて安定性を評価した結果、非常に高い安定性を示した。

トリアゾール環架橋型人工核酸のチミジンアナログの合成は、アルキンとアジドによる分子内Huisgen反応での架橋部構築を検討したが反応の進行は見られなかった。そこで、トリアゾール環構築後の分子内求核置換反応を検討し、架橋部の構築に成功した。5-メチルシチジンアナログの合成はスルホンアミド架橋型と同様に行った。テトラゾール環架橋型人工核酸のチミジンアナログの合成は、アミド架橋構造により糖部を固定した中間体を用い、アミド結合の活性化に続くアジドとの反応により架橋部の構築を達成した。それぞれの構造はX線結晶構造解析により確認した。合成したアナログをオリゴヌクレオチドへ導入し、相補鎖DNAおよびRNAに対する $T_m$ 測定を実施したところ、トリアゾール環架橋型人工核酸においては相補鎖RNAに対する結合親和性を向上させ、相補鎖DNAに対する結合親和性を低下させることが明らかとなった。一方、テトラゾール環架橋型人工核酸は $T_m$ 測定の加熱条件において分解することが明らかとなった。詳細は明らかではないが、熱処理によりテトラゾール環から窒素分子が発生し、分解が進行する可能性が考えられる。生体内の主な分解酵素である3'-エキソヌクレアーゼを用いて安定性を評価したところ、修飾箇所の3'側リン酸ジエステル結合に対する安定化能の向上はそれほど見られなかったが、5'側リン酸ジエステル結合に対する安定化能が非常に高いことが明らかとなった。また、トリアゾール環よりもテトラゾール環の方が高い安定性を示し、架橋のわずかな違いによりオリゴヌクレオチド全体の物理的な性質が変化する可能性を示唆する非常に興味深い知見が得られた。

核酸医薬品としての可能性を検証するために、スルホンアミド架橋型人工核酸及びトリアゾール環架橋型人工核酸を導入したオリゴヌクレオチドの遺伝子発現抑制効果を*in vitro*及び*in vivo*により評価した。*In vitro*評価の結果、スルホンアミド架橋及びトリアゾール環架橋修飾オリゴヌクレオチドは用量依存的な遺伝子発現抑制効果を示し、対応するポジティブコントロールとして用いた2',4'-BNA/LNA修飾オリゴヌクレオチドと同程度の抑制効果を示した。続いて*in vivo*評価を実施した結果、スルホンアミド架橋及びトリアゾール環架橋修飾オリゴヌクレオチドは2',4'-BNA/LNA修飾オリゴヌクレオチドと同程度の遺伝子発現抑制効果を示し、さらに肝臓への移行性の向上傾向を示した。

著者は今回開発したスルホンアミド架橋型人工核酸及びトリアゾール環架橋型人工核酸が、相補鎖RNAに対する優れた親和性と生体内酵素に対する高い安定性を有すること、そして、*in vivo*評価において遺伝子発現抑制効果と肝臓への移行性の向上を示すことを明らかとし、核酸医薬品の優れた素材になりうる可能性を示した。さらに、架橋構造の違いにより、*in vivo*における遺伝子発現抑制効果や肝臓への蓄積量が変化することを示し、今後のアンチセンス医薬品開発において重要な知見を得た。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 三 岡 恭 典 )	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教 授 小比賀 聡
	副 査 教 授 小林 資正
	副 査 教 授 宇野 公之

## 論文審査の結果の要旨

低分子医薬品や抗体医薬品に次ぐ新たな医薬品として核酸医薬品が大いに注目されているが、その実用化に向けて、新規修飾核酸を開発することは非常に重要となる。本研究は、医薬品に数多く用いられているスルホンアミドとヘテロ5員環構造に着目し、それらを架橋部に導入した新規架橋型修飾核酸による標的への親和性の向上と安定性に加え、体内動態の改善を目指したものであり、以下の興味深い成果を得た。

1) スルホンアミド架橋構造を有する新規架橋型人工核酸SuNAの合成に成功し、X線結晶構造解析から、糖部構造はN型に固定されており、6員環架橋であるが、環サイズは6員環架橋と7員環架橋の間であることを明らかとした。

2) SuNAを導入したオリゴヌクレオチドは、相補鎖RNAとの二重鎖を安定化する一方で相補鎖DNAとの二重鎖を不安定化させること、非常に優れた酵素耐性能を有することを明らかにした。

3) ヘテロ5員環架橋構造を有するトリアゾール環架橋型人工核酸TrNA及びテトラゾール環架橋型人工核酸TeNAの合成に成功し、X線結晶構造解析から糖部構造は2',4'-BNA/LNA と同様のN型に固定されていることを確認した。

4) TrNA及びTeNAを導入したオリゴヌクレオチドは相補鎖RNAとの結合親和性を増加させ、相補鎖DNAとの結合親和性を低下させることを明らかにした。また、3'側よりも5'側リン酸ジエステル結合に対する酵素耐性能を向上させることを見出した。

5) SuNA及びTrNAを導入したオリゴヌクレオチドのin vivo試験より、肝臓への移行性を向上させ、2',4'-BNA/LNA修飾オリゴヌクレオチドと同等の遺伝子抑制効果を有することを明らかとし、SuNA及びTrNAが優れた核酸医薬の素材であることを示した。

以上の研究成果は、核酸医薬品の実用化に向けた基盤となるものであり、核酸化学、生物有機化学だけでなく、幅広く薬学の発展に貢献することが期待される。よって、本研究は博士(薬科学)の学位論文として相応しいものであると判断した。