

Title	アミド結合により糖部をN型固定した架橋型人工核酸の合成と機能性に関する研究
Author(s)	矢原, 愛子
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/60069">https://hdl.handle.net/11094/60069</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。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。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

【23】

氏名	矢原愛子
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第25975号
学位授与年月日	平成25年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	アミド結合により糖部をN型固定した架橋型人工核酸の合成と機能性に関する研究
論文審査委員	(主査) 教授 小比賀 聡 (副査) 教授 藤岡 弘道 教授 小林 資正 教授 土井 健史

## 論文内容の要旨

新たな創薬手法の一つとして核酸医薬が注目を集めている中、Vitraveneに続くアンチセンス医薬の開発が望まれている。アンチセンス法とは、病原遺伝子のmRNAに相補的なオリゴヌクレオチド鎖(アンチセンス鎖)を用いて、その発現を抑制する手法である。しかし、天然の核酸は生体内酵素によって分解されやすいため、アンチセンス法に天然の核酸を用いることはできない。実用的なアンチセンス医薬の創製には、生体内の酵素に対する安定性と、標的核酸への強い結合力を示す人工核酸が必要不可欠であり、著者の所属研究室では、その実現に向けて核酸の糖部に修飾を施した人工核酸を種々開発してきた。しかし、相補RNA鎖に対する結合親和性と、生体内酵素に対する安定性という二つの要件を同時に満たした理想的な架橋型人工核酸は未だ開発されていない。また、望みの場所(臓器、細胞内オルガネラ)への送達(デリバリー)という観点でも発展の余地を残している。これらの要求を満たし、核酸医薬の実用化に資する人工核酸素材の創成に期待が高まっている。この背景から著者は、これまでの核酸糖部の架橋様式を精査し、アミド結合に着目した新たな架橋型人工核酸、「アミド架橋型人工核酸(Amido-bridged Nucleic Acid; AmNA)」を設計し、新規架橋骨格の構築、塩基の変換、2'-アミド基窒素原子上への置換基の導入を行った。

核酸糖部2',4'位にアミド架橋をもつAmNAのチミジンアナログ、AmNA[NH]-Tの骨格構築は、文献既知化合物を用い、立体選択的なチミン塩基の導入後、カルボキシル基とアミノ基の縮合により達成した。同構造はX線結晶構造解析により確認した。その後DNA自動合成機に適応可能なホスホロアミダイト誘導体合成を検討したが、最終工程の亜リン酸化の際、架橋部のアミド基窒素原子上で副反応が見られ、収率が低下した。このため、アミド基窒素原子をメチル基で置換したAmNA[NMe]の合成を同時に進めた。AmNA[NMe]-T合成にはアミド架橋構築後の化合物を用い、塩基部を保護した後にヨウ化メチルと反応させることでAmNA[NMe]-Tの合成に成功した。この誘導化により、合成上の改善点となっていた最終工程での亜リン酸化が改善され、収率が向上した。一方、アンチセンス医薬として使用するためには、核酸塩基の制限無くアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計できることが望まれる。そこで、5-メチルシトシンおよびアデニンを核酸塩基として持つAmNAの合成を検討した。まず、5-メチルシトシンアナログ、AmNA-<sup>13</sup>Cの合成は、AmNA[NMe]-T合成中間体である化合物を用いて、チミン塩基の活性化に続くアンモニア処理を行うことにより行った。さらに、プリン塩基を有するAmNAを合成するため、アミド架橋構築前の合成中間体を用いて塩基交換を行った。AmNAのアデノシンアナログ、AmNA-Aについてはモノマーまでの合成を達成した。

合成したAmNA[NH]-T、AmNA[NMe]-Tをオリゴヌクレオチドに導入し、機能評価を行った。融解温度 ( $T_m$ ) 測定の結果から、RNA鎖に対する結合親和性はいずれも予想通り極めて高いことがわかった。また、蛇毒から得られる3'-エキソヌクレアーゼを用いて酵素に対する安定性を評価した結果、AmNA[NH]、AmNA[NMe] は2',4'-BNA/LNAよりもそれぞれ約8倍、10倍高い安定性を示した。さらに、AmNA[NMe]-TおよびAmNA[NMe]-<sup>13</sup>Cを搭載したオリゴヌクレオチドの *in vitro*でのアンチセンス活性評価を行った。その結果、AmNA[NMe] 搭載オリゴヌクレオチドは、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搭載オリゴヌクレオチドに匹敵、もしくはそれを上回るアンチセンス効果を示し、アンチセンス医薬として高い効果が期待できる人工核酸分子であることがわかった。

アミド基窒素原子をメチル修飾することによって化学的安定性および、生体内安定性の向上が見出されたことから、種々のアルキル置換基の導入により、AmNA修飾オリゴヌクレオチドに優れた効果をさらに付与できることが予想された。また、実際の医薬品としての利用を考えた際の臓器へ到達・蓄積に核酸の糖部2'位へのアルキル修飾が有効であるという知見から、AmNAのアミド基窒素原子上へ各種の置換基を導入することによってオリゴヌクレオチドの性質を変化させ、体内動態を変化させることができ得るかを検証した。種々の置換基Rを有するAmNA[NR]-Tの合成にはAmNA[NMe]-Tの合成経路と同様にアミド架橋構築後の化合物を用い、塩基部を保護した後に各種アルキルハライド試薬と反応させることにより、8種類の誘導体を得ることに成功した。これらのAmNA[NR] をオリゴヌクレオチドへと導入した結果、オリゴヌクレオチド全体として化学的安定性を向上した他、置換基の種類によってオリゴヌクレオチドの脂溶性が変化するという知見を得た。加えてAmNA[NR] 修飾により酵素耐性能も向上することが明らかとなった。また、アミド基窒素上の置換基を変化させたことによる結合親和性への影響は修飾数を増加させると、各修飾間の差異は小さくなり、いずれのオリゴヌクレオチドにおいても、相補RNA鎖に対して高い結合親和性を示した。これらの性質を示したAmNA[NR]搭載オリゴヌクレオチドは、疎水性の高い置換基導入によってオリゴヌクレオチドの脂溶性が高まったことから、オリゴヌクレオチドの脂溶性が大きく異なる3種の修飾を用いて、*in vivo*実験を行うことにより、オリゴヌクレオチドの体内動態および薬効を評価した。その結果、薬効との相関は十分認められなかったものの、AmNA[NR] 搭載による脂溶性の付与が、臓器移行性を向上させることが示された。

申請者は、今回開発したAmNAが相補RNA鎖に対する結合親和性と、生体内酵素に対する安定

性を併せ持つ機能性核酸素材であるとともに、これまでアンチセンス医薬開発の壁となっていたオリゴヌクレオチドの臓器へのデリバリー問題を解決しうる機能性を有することを見出した。

## 論文審査の結果の要旨

低分子による新薬の開発が停滞するなか、核酸を用いた新たな創薬手法が注目されている。その中で、アンチセンス法とは標的とする遺伝子のmRNAに相補的なオリゴヌクレオチドを用いて、その遺伝子発現を抑制する手法であり、これまで有効な治療法が見いだされていない数多くの難治性疾患の治療法として期待が持たれている。

本研究では、新規骨格を有する人工核酸として、アミド架橋型人工核酸 (AmNA) を設計するとともに、その合成法の確立、核酸塩基の変換、アミド窒素原子への各種官能基の導入を行なった。さらに、合成したAmNAを導入したオリゴヌクレオチドの物性評価を実施し、標的RNAとの高い結合親和性や核酸分解酵素に対する優れた耐性を明らかにした。これらに加えて、AmNAのアミド基窒素原子上の置換基の種類に応じて、オリゴヌクレオチドの物性 (脂溶性等) が大きく変化するという結果を得た。これらの知見に基づき、*in vitro*及び*in vivo*での標的遺伝子の発現抑制効果を検証したところ、*in vitro*及び*in vivo*のいずれにおいても顕著な薬理活性を示すこと、さらに*in vivo*ではオリゴヌクレオチドの脂溶性に応じて標的臓器への移行量が異なることを見いだした。これらの結果は、AmNAが次世代の核酸医薬素材として極めて有望であることを示すものであり、核酸創薬を目指した今後の研究に大きなインパクトを与えるものと考えられる。

以上の研究成果は、博士 (薬学) の学位論文として相応しいものであると判断した。