

Title	核酸医薬を志向したオリゴヌクレオチドの立体構造検出に関する研究
Author(s)	下山, 敦子
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/61703
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (下山 敦子)

論文題名

核酸医薬を志向したオリゴヌクレオチドの立体構造検出に関する研究

論文内容の要旨

近年、創薬研究対象となる分子は従来の合成低分子化合物から抗体に代表されるたん白質医薬品を経て新たな分子形へと急激にシフトしており、その中でも中分子医薬に分類される核酸医薬は非常に注目を集めている。核酸医薬はオリゴヌクレオチドを構成成分とするが配列遺伝子の発現を介さず直接作用を示す分子であり、分子形としてさらに、一本鎖オリゴヌクレオチドのアンチセンス、アプタマー、二本鎖オリゴヌクレオチドのsiRNAやデコイなどがある。核酸医薬に天然型オリゴヌクレオチド（以下、DNAオリゴ）を用いる場合迅速な分解を受け期待される薬効発揮が難しいために酵素耐性を上げる修飾型核酸が研究されており、リン酸ジエステル結合の結合に参与していない酸素原子の一つを硫黄原子に置換したホスホロチオエート型修飾を導入したオリゴヌクレオチド（以下、PSオリゴ）が、特にアンチセンスへの応用例が多く報告されている代表例である。一方でPSオリゴは、リン酸ジエステル結合部への硫黄原子導入により疎水性が増し、さらにリン原子が不斉中心となることでエステル結合数 n に対して n^2 のジアステレオマーが生じるなど、物理化学的性質がDNAオリゴと比べて非常に複雑化しており、その分析法の確立は難易度が高い。

医薬品はその製造管理及び品質管理の基準が定められており、臨床試験に供される治験薬も含めその製造及び品質を管理していく必要がある。品質管理面から核酸医薬をとらえた場合、塩基配列の順番や長さが異なるものや分解物など、一次構造に由来する類縁物質や不純物だけを想定しても非常に多くの分子の品質を考慮する必要があるといえる。オリゴヌクレオチドの分析手法はイオン交換クロマトグラフィーやイオンペア逆相クロマトグラフィーが代表的であり、これらを用いることで先に例示したような類縁物質あるいは不純物に相当する分子の分離、同定及び定量に対応する分析法の検討が多く報告されているが、低分子医薬品における品質管理と同様に個々の類縁物質や不純物に対して分離、同定、定量を達成する分析系を確立し評価することは現在の分析化学水準では困難であると報告されており、核酸医薬に用いるオリゴヌクレオチドの品質は、多面的で相補的な品質確認を行いさらに有効性、安全性による確認も含めた方法で保証していく形が想定される。加えて、オリゴヌクレオチドは二重らせん構造やアプタマー、さらにはグアニンやシトシンを多く含む配列で形成されるG-quadruplexやi-motifなど、数多くの高次構造体形成が知られている。これら構造体は条件により構造配位が変化することも知られており、すなわち、すべてのオリゴヌクレオチドはその条件下により高次構造を形成することができ、かつ構造が変化しうる可能性を持っている。一方、たん白質医薬品においては、たん白質の高次構造変化などが有効性および安全性に大きく影響するのではという議論が盛んに行われおり、高次構造を含めた品質管理が求められている。これら背景から、オリゴヌクレオチドの高次構造を核酸医薬の品質としてとらえ管理していく必要性は高いと考えられるが、その分析評価方法が確立されていないこともあり二本鎖オリゴヌクレオチドやアプタマーなど限定した分子形での形成確認にとどまっている。

サイズ排除クロマトグラフィー（Size Exclusion Chromatography、以下SEC）は溶質のストークス半径に応じて分離する手法である。溶液中で存在している構造を反映した状態で溶質を分離できる特長があり、SECはたん白質医薬品の品質管理に必要な分析方法の一つとなっている。近年、LargyらがDNAオリゴの高次構造評価に対するSECの有用性を網羅的な検討により報告した。DNAオリゴの高次構造の違いがストークス半径の違いとなってSECにより検出された結果であり、SECがオリゴヌクレオチドの高次構造に対する品質管理試験法として有用である可能性が示唆された。しかしながら報告された方法は品質管理方法としては煩雑であり、予期しない高次構造は見逃される可能性があるなど解決すべき課題が残るものであった。加えて、修飾オリゴヌクレオチドに対してSECを用いて同様に構造評価した例はほとんど報告がない。そこで著者は、核酸医薬の品質管理手法を志向し、オリゴヌクレオチドの高次構造を品質として管理可能な分析方法の確立を目標とし、本研究に取り組んだ。

分析方法としてSECに着目し、DNAオリゴ、PSオリゴに共通する、構造検出力のある分析方法としての確認を行っ

た。オリゴヌクレオチドのSEC分析に影響を及ぼす因子を確認して分析条件を設定したのち、DNAオリゴ及びPSオリゴを用いて本SEC分析条件の高次構造検出について確認した。この高次構造検出力確認には、特定の高次構造をとるあるいはとらないグループとして、一本鎖、二本鎖、自己相補、ヘアピン、G-quadruplexなどの配列を設計し設定して用いた。その結果、SEC分析条件の特に移動相によってオリゴヌクレオチドの溶出挙動は影響を受けること、その影響度合いはDNAオリゴとPSオリゴとで異なることを見出した。また、今回のSEC分析条件を用いることで、DNAオリゴは一本鎖、二本鎖、ヘアピンをそれぞれ識別でき、PSオリゴは一本鎖、二本鎖をそれぞれ識別できることを検証した。PSオリゴで識別性が低かった原因は、DNAオリゴと比べピークが非常にブロードとなり溶出時間が遅延しぱらついたことであった。著者はこの理由がPSオリゴの持つその高い疎水性という物性に起因しており、カラム充填剤と相互作用したためであることを明らかとした。さらに今回設定したSEC条件を用いることで、製造後のオリゴヌクレオチドが熱力学的安定性の異なる高次構造混合物であること、および、アニーリングにより安定な構造へ収束すること、これら現象を検出できることを見出した。

核酸医薬を志向したオリゴヌクレオチドの品質管理において、二本鎖オリゴヌクレオチドやアプタマーなど高次構造形成が有効性に直結する分子形ではその構造について形成の有無や程度などを有効性や安全性と関連付けて品質として評価し、管理する必要があると考えられてきた。今回の結果から、これらに加え、高次構造形成が作用機序に直接関係しないあるいは高次構造を形成しにくいとされてきたアンチセンスなどの一本鎖オリゴヌクレオチドにおいても、製造工程含め複数の準安定な高次構造を形成する可能性があり、これらが有効性や安全性にもたらす影響を評価していく必要があることが示された。また、本結果は、比較的短い一本鎖オリゴヌクレオチドがアニーリング操作の前後で高次構造を変化させることを示したばかりでなく、SEC分析により鋭敏にこれらの構造変化を検出できることを確認したものである。これより、今後の核酸医薬を志向したオリゴヌクレオチドの品質管理手法としてSECが有用であると結論付けた。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (下山 敦子)	
	(職) 氏 名
論文審査担当者	主 査 教授 小比賀 聡
	副 査 教授 高木 達也
	副 査 教授 大久保 忠恭

論文審査の結果の要旨

下山 敦子氏は、核酸医薬品の品質管理手法を志向し、オリゴヌクレオチドの高次構造を品質として管理可能な分析方法の確立に向け研究に取り組んだ。本研究において下山氏は、分析方法としてサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) に着目し、分析対象として天然型オリゴヌクレオチド (DNAオリゴ) および核酸医薬開発において重要な修飾核酸の一つであるホスホロチオエート型オリゴヌクレオチド (PSオリゴ) を選択した。その結果、以下に示す非常に優れた成果を得た。

1) SEC分析において、オリゴヌクレオチドの溶出挙動は特に移動相により影響を受けること、その影響度合いはDNAオリゴとPSオリゴとで異なることを見出した。また、PSオリゴはDNAオリゴに比べて溶出が遅くブロードなピークとして検出されたが、これはPSオリゴの高い疎水性という物性に起因するものであることを検証した。

2) DNAオリゴおよびPSオリゴの双方に対して、高次構造が検出できる共通のSEC条件を設定した。このSEC分析条件ではPSオリゴの高次構造 (一本鎖状態と二本鎖状態) を識別することが可能であった。DNAオリゴでは、これに加えてヘアピン構造の識別も可能であることを見出した。

3) 製造後のオリゴヌクレオチドが熱力学的安定性の異なる高次構造混合物であり、アニーリング処理により安定な構造へ収束するということを、設定したSEC分析条件を用いることにより検出した。

4) 今回の研究を通じ、医薬品としてオリゴヌクレオチドを開発する際には、高次構造についても品質特性として管理していくことが重要であること、その手法としてSECが有用であることを提案した。

以上の研究成果は、博士 (薬科学) の学位論文に値するものと認める。