



Title	スピロクロプロピレン架橋型人工核酸及びエチニル ホスホネート修飾型人工核酸の合成と物性評価
Author(s)	堀場, 昌彦
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/72326">https://doi.org/10.18910/72326</a>
rights	
Note	

*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 ( 堀場 昌彦 )

## 論文題名

スピロシクロプロピレン架橋型人工核酸及び  
エチニルホスホネート修飾型人工核酸の合成と物性評価

## 論文内容の要旨

核酸医薬は、これまでに創薬標的とすることが困難であったDNAやRNAに作用することが可能であり、疾患に関与するタンパク質の生成を制御できる。そのため、従来の技術では治療が困難な疾患にも適用できることから、低分子医薬や抗体医薬に代わる次世代医薬品として期待されている。特に、RNAを標的とした核酸医薬が盛んに研究されており、上市されている8品目のうち6品目が該当する。このような核酸医薬の発展に対して、天然の核酸の構造に化学修飾を施した人工核酸は薬効を高めるための様々な特性を付与できるため、これまでに多大な貢献をしてきた。核酸医薬の薬効は、標的RNAに対する二重鎖形成能やヌクレアーゼ耐性能と密接に関係しており、これらの特性に焦点を当てた人工核酸が数多く開発されている。二重鎖形成能を向上させた人工核酸としては、核酸の糖部に架橋構造を導入することで、構造の自由度を抑制した2'-O,4'-C-methylene bridged nucleic acid (2',4'-BNA) / locked nucleic acid (LNA) が代表的である。しかしながら、ヌクレアーゼ耐性能については改善の余地があり、配列次第で肝毒性を誘発することも課題とされている。一方、ヌクレアーゼ耐性能を高める目的では、核酸のリン酸部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 (PS) 修飾が一般的に用いられている。しかしPS修飾を有する核酸医薬は、生体内のタンパク質と非特異的に結合することが以前から知られており、肝毒性の要因ともなっている。また、PS修飾はリン原子上に不斉を有しており、PS修飾をn個導入した核酸医薬は2<sup>n</sup>個のジアステレオマー混合物となるため、医薬品の安全性や製造・品質管理の面からも問題を孕んでいる。以上の背景から本研究では、2',4'-BNA/LNAとPS修飾それぞれの問題点に着目し、新たな人工核酸を開発することでその解決を目指した。

まず、2',4'-BNA/LNAに代わる人工核酸の開発に着手した。以前に、2',4'-BNA/LNAの架橋部への置換基導入が、ヌクレアーゼ耐性能や肝毒性の問題を改善する有効な設計法であることを示唆する報告がなされていた。これらの報告を参考に、新規人工核酸として2'-O,4'-C-spirocyclopropylene bridged nucleic acid (scpBNA) を設計した。scpBNAが有するスピロシクロプロパン構造は、その独特な環ひずみから架橋部のメチレンの結合角を拡大させ、コンホメーション全体を微細に変化させることが分子軌道計算の結果から予想できた。そのため、従来の置換基導入の効果によるヌクレアーゼ耐性能の向上と肝毒性の危険性の低減に加え、コンホメーション変化による二重鎖形成能の変化が期待できる。実際に、4種類の核酸塩基をそれぞれ有するscpBNAを合成し、オリゴヌクレオチドに導入した後、各種物性評価を行った。まず、scpBNAの二重鎖形成能について融解温度 ( $T_m$ ) を測定することで評価した。その結果、scpBNAは2',4'-BNA/LNAと同等の二重鎖形成能を有することが明らかになった。さらに、scpBNAのRNAに対する選択性は、2',4'-BNA/LNAよりも僅かに向上しているという結果も得られた。この結果は、嵩高いスピロシクロプロパン構造の導入による立体障害と環ひずみによるコンホメーション変化に由来すると考えられる。また、scpBNAのヌクレアーゼ耐性能は、2',4'-BNA/LNAよりも大幅に向上していた。さらに、2',4'-BNA/LNAを導入することで肝毒性を誘発する配列において、2',4'-BNA/LNAをscpBNAに置き換えることで肝毒性の指標となるAST値とALT値が低下することも明らかになった。以上より、scpBNAは2',4'-BNA/LNAの高い二重鎖形成能を維持しつつ、優れたRNA選択性やヌクレアーゼ耐性能を有し、肝毒性の回避に有効な人工核酸であることが示された。

続いて、PS修飾の課題解決を志向して新たな人工核酸を設計した。リン酸部修飾型核酸は、酸素原子を硫黄原子に置換した人工核酸の他に、炭素原子に置換した人工核酸も多数報告されてきた。その中で、リン酸部の5' 位酸素原子を炭素原子に置換した人工核酸は、導入したメチレン基と核酸の塩基部が立体反発を起こし、二重鎖形成能を低下させることが知られている。この立体反発を解消しつつ、自由度の低い構造を導入することで高い二重鎖形成能の獲得を目指した炭素原子置換型の人工核酸として、ethynylphosphonate (EP) 修飾を考案した。しかしながら、EP修飾オリゴヌクレオチドの $T_m$ 測定の結果、EP修飾は予想に反して二重鎖形成能の低下を招いた。分子軌道計算やCDスペクトル測定を行ったところ、通常のリン酸部の構造とは異なる構造をとっていることが示唆され、EP修飾による構造変化が二重鎖形成能低下を引き起こしたと考えられる。一方、EP修飾のヌクレアーゼ耐性能については、立体障害となる

置換基や活性中心の金属イオンの結合を阻害するような修飾を有していないにも関わらず、天然のオリゴヌクレオチドよりも向上していることが明らかになった。またEP修飾は、核酸医薬の作用メカニズムにおいて重要な役割を担う ribonuclease H の認識様式を変化させるという興味深い知見も得られた。低下した二重鎖形成能については、2' , 4' -BNA/LNAを併用することで補うことが可能であった。以上の結果より、EP修飾は核酸医薬へと応用可能な物性を有していることが示された。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 （堀 場 昌 彦）		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授
	副 査	教授
	副 査	教授
		小比賀 聡 大久保 忠恭 赤井 周司

## 論文審査の結果の要旨

核酸医薬品に関する研究開発は近年非常に活発に行われており、基礎研究から応用・実用化研究まで急速に進みつつある。そのような状況の中で、核酸構造への化学修飾により新たな機能性が付与された人工核酸の役割は極めて重要である。申請者は、これまでに研究開発が進められてきた様々な人工核酸や核酸の化学修飾の中から、架橋型人工核酸とホスホロチオエート結合に着目し、それらの持つ課題を克服し更なる機能向上を狙った新たな人工核酸の開発研究を行なった。その結果、以下に示す非常に優れた研究成果を得た。

- 1) 独特な環ひずみを有するスピロシクロプロパン構造を架橋型人工核酸に導入したscpBNAの合成に成功した。
- 2) scpBNAをオリゴヌクレオチドに導入し、その優れたRNA選択性およびヌクレアーゼ耐性を示すと共に、肝毒性低減効果を見出した。
- 3) ホスホロチオエート結合に代わる新たなヌクレオシド間の結合様式としてエチニルホスホネート結合を提案し、これを含む各種ヌクレオシド二量体の合成に成功した。
- 4) この結合を含むオリゴヌクレオチドの二重鎖形成能ならびにヌクレアーゼ耐性能を精査した結果、前者では天然DNAに比べやや低下が認められたものの後者については天然DNAに比べ大幅な向上を認めた。
- 5) さらに、この結合をDNA鎖に導入することにより、DNA/RNAヘテロ二重鎖を認識するRNaseHとの相互作用様式が変化し、RNA鎖の切断パターンが変わるという興味深い知見を得た。

以上の通り申請者は、今後の核酸医薬品の研究開発において重要な新たな機能素材の創製を行うとともに、関連する科学領域に貴重な知見を提供した。よって本論文は、博士（薬学）の学位論文に値するものと認める。