The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	三環式骨格を核酸塩基に有するシチジン誘導体人工核酸及びチミジン誘導体人工核酸の開発
Author(s)	岸本, 悠希
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76488
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　　岸本　悠希　　）	
論文題名	三環式骨格を核酸塩基に有するシチジン誘導体人工核酸及び チミジン誘導体人工核酸の開発

論文内容の要旨

核酸医薬は、これまでに治療法がなかった難治性疾患への治療法として注目され、2020年1月現在、世界で11品目が実際に上市されている。核酸医薬に代表されるアンチセンス法では、疾患の原因タンパク質の基となる標的メッセンジャー RNA（mRNA）に対して、相補的な配列を有する一本鎖のオリゴデオキシヌクレオチド（以下、オリゴ核酸）が直接結合する機構を利用している。また、生体内の DNA 二重鎖を標的とするアンチジーン法では、一本鎖の三重鎖核酸形成オリゴヌクレオチド（TFO: Triplex-forming oligonucleotide）が二重鎖 DNA に結合する機構を利用する。これらアンチセンス法とアンチジーン法の双方において、用いるオリゴ核酸を天然の DNA のみで構成した場合、(1) 標的となる mRNA や二重鎖 DNA に対する結合親和性（二重鎖形成能並びに三重鎖形成能）や、(2) 標的配列への結合選択性、(3) 生体内での核酸分解酵素に対する安定性等に難点がある。従って、これら(1) ～ (3)の課題を解決するべく、核酸を構成する糖部、塩基部、リン酸ジエステル結合部に化学修飾を施した人工核酸分子が多数開発されてきた。糖部修飾核酸の一つに、2'-*O*,4'-*C* - methylene bridged nucleic acid(2',4'-BNA)/ locked nucleic acid (LNA) がある。2',4'-BNA/LNA は、二重鎖形成時のエントロピー損失を抑制するコンセプトで設計され、実際に相補鎖RNA に対して高い二重鎖形成能を有することが見出された。また、核酸二重鎖構造は主に積層する隣接塩基間でのπ-πスタッキング相互作用と、標的塩基との水素結合形成により安定化される。故に、人工核酸塩基によって標的核酸との二重鎖形成能を向上させる場合、上述の二点の特性を強化することが合理的戦略となる。具体的には、(a) 塩基部の環サイズ拡張によりスタッキング相互作用を強化する方法や、(b) 標的塩基への水素結合形成数を増加させる方法等がある。実際にシチジン誘導体として三環性の 3-β-D-2'-deoxyribofuranosyl-1,3-diaza-2-oxophenoxazine（以下、phenoxazine,フェノキサジン）及び G-clamp が報告され、本分子は上記(a,b)による機能を向上させることで、高い二重鎖形成能を示すことが知られている。また、2',4'-BNA/LNA にもスタッキング相互作用の増大効果があるため、糖部修飾核酸とフェノキサジン、G-clamp 等の環拡張型人工核酸塩基は、相補鎖核酸との二重鎖形成能を向上させる点で大きく共通する。

こうした背景の下、著者は 2',4'-BNA/LNA 骨格にフェノキサジン並びに、G-clampを導入したシチジン誘導体 BNAP (2',4'-BNA with a phenoxazine)並びに、BNAP-AEO (2',4'-BNA with a 9-(aminoethoxy)phenoxazine) を設計した。これらをオリゴ核酸へ一残基導入することで、既存の人工核酸と比較して、二重鎖形成能が飛躍的に向上することが見込まれた。核酸医薬への応用においては、これらの機能向上に伴い遺伝子発現抑制効果が向上するのではないかと考えられる。本実験においては、BNAP と BNAP-AEO の二重鎖形成能や二重鎖構造等について、各々が 2',4'-BNA/LNA とphenoxazine 並びに G-clamp の効果をどのように獲得しているかを物理化学的側面から詳細に精査することとした。まず実際に BNAP と BNAP-AEO モノマーを合成し、BNAP と BNAP-AEO をオリゴ核酸に導入した後、融解温度(T_m)測定と結合定数の算出により二重鎖形成能を評価した。その結果、BNAP-AEO を導入したオリゴ核酸は、比較対象となる天然シチジンを導入したオリゴ核酸と比較して、約10000倍の結合定数の向上を示した。また、ミスマッチ塩基識別能についても T_m 測定によって評価したところ、BNAP-AEO を導入したオリゴ核酸は、2',4'-BNA/LNA や G-clamp を導入したオリゴ核酸以上の高いミスマッチ塩基識別能を獲得した。また本オリゴ核酸は、モノマー自体の構造的な嵩高さによって、核酸分解酵素に対する耐性能を向上させていた。これらの結果より、BNAP-AEO は高い二重鎖形成能とミスマッチ塩基識別能を有しつつ、同時に核酸分解酵素に対して高い安定性を獲得していたことから、核酸医薬への応用において有用な特性を有することが示された。

同時に著者は、BNAP-AEO と同様の高機能な人工核酸塩基を開発することで、核酸医薬において、核酸塩基の配列設計にとらわれない高活性なオリゴ核酸の創製が可能になると考えた。そこで、三環式核酸塩基を導入した新規チミジン誘導体 OBN (1'-β-[3-(1,2-Dihydro-2-oxobenzo[*b*][1,8]naphthyridine)]-2'-deoxy-D-ribofuranos)を設計した。OBNでは、共役構造を連続させることにより芳香族性をもたせた。そのため、2つの炭素原子を OBN 内に導入している

点が、フェノキサジンと構造的に異なる点となる。また OBN を基盤とし、新たに化学修飾を加えたOBN^{CMO}(1'-β-[3-(8-Carboxymethoxy-1,2-Dihydro-2-oxobenzo[*b*][1,8]naphthyridine)]-2'-deoxy-D-ribofuranose)を設計した。これにより、OBN への化学修飾が二重鎖形成能にどのような影響を与えるかを評価した。まず OBN と OBN^{CMO} のモノマーを合成後、これらをオリゴ核酸内に導入した。その後、新規チミジン誘導体となる OBNを含むオリゴ核酸の二重鎖形成能と三重鎖形成能を T_m 測定により評価した結果、OBN を導入したオリゴ核酸は、配列内で OBN が連続する場合に、相補鎖核酸との二重鎖、及び三重鎖形成能を向上させることが明らかになった。特に二重鎖形成の際、CD スペクトル測定の結果から、OBN が二重鎖に大きな構造変化を与えないことも示された。更に OBNを導入したオリゴ核酸は核酸分解酵素に対する耐性能も同時に向上させており、この要因は OBN の構造の嵩高さによるものだと推察された。また OBN^{CMO} を導入したオリゴ核酸については、予期に反して二重鎖形成能を低下させる結果となったが、今後の OBN を基盤とした化学修飾の新たな設計指針が見出された。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　　名　（岸本　悠希　）			
論文審査担当者		（職）	氏　　名
	主 査	教授	小比賀　聡
	副 査	教授	赤井　周司
	副 査	教授	有澤　光弘

論文審査の結果の要旨

核酸医薬品は、難治性疾患への新たな治療法として注目を集めているが、その成否の鍵は核酸医薬品の機能を高める人工核酸の特性にあると言っても過言ではない。人工核酸に求められる特性としては、標的となる核酸（RNAやDNA）に対して高い結合親和性を有すること、標的核酸に対する優れた配列特異性を有すること、生体内での核酸分解酵素に対する耐性を有すること、などがあげられる。申請者は、このうち標的核酸に対する高い結合親和性獲得を主眼におき、新たな人工核酸の開発を行ってきた。特に、申請者は、核酸塩基の環サイズを拡張しスタッキング相互作用を増強させるというコンセプトに基づき種々の人工核酸をデザイン・合成し、その評価を実施した。その結果、以下に示す優れた成果を得た。

１）　糖部架橋型人工核酸2',4'-BNA/LNAに新たな核酸塩基として、フェノキサジンやその誘導体であるG-clampを導入した人工核酸（BNAP及びBNAP-AEO）を設計・合成した。

２）　合成した人工核酸を搭載したオリゴ核酸の物性を精査した結果、BNAP-AEOを搭載したオリゴ核酸は、天然のオリゴ核酸に比べて約10,000倍もの結合能の向上が認められた。さらに、このオリゴ核酸の塩基識別能を調べたところ、従来知られている各種人工核酸を搭載したオリゴ核酸を上回る塩基識別能を有することを見出した。

３）　さらに、BNAP-AEOを搭載することで、核酸分解酵素に対する高い耐性能も獲得することが明らかとなった。

４）　これらの知見を基に、新たな核酸塩基OBNを設計・合成しその機能評価を行なった結果、OBNを連続して導入することで、相補鎖核酸との二重鎖形成能やホモプリンーホモピリミジン二重鎖に対する三重鎖形成能が大きく向上することを見出した。

以上、本論文は、綿密な分子設計のもと今後の核酸医薬品の開発に重要な新たな人工核酸の開発に成功したものであり、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。