

Title	塩基部アルキニル修飾核酸によるアンチセンス核酸の毒性と物性への影響評価
Author(s)	三上, 敦士
Citation	大阪大学, 2024, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/96136">https://hdl.handle.net/11094/96136</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。

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

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

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏 名 ( 三 上 敦 士 )

## 論文題名

塩基部アルキニル修飾核酸によるアンチセンス核酸の毒性と物性への影響評価

## 論文内容の要旨

アンチセンス核酸 (ASO) は世界中で精力的に研究されており、新たな創薬モダリティである核酸医薬品の主要な一角として大きな注目を集めている。ASOは数十塩基ほどの化学合成オリゴヌクレオチド (ON) であり、生体内ヌクレアーゼであるRNaseH1依存的に標的mRNAを切断することで特定タンパク質への翻訳を阻害し薬効を発揮する。薬物プロファイルの改善を図ってASOにはリン酸部や糖部へ化学修飾が導入されるが、その化学修飾に由来する肝毒性、血小板減少、補体の活性化などが認められる場合がある。毒性発現機序の詳細なメカニズムは不明であるが、これらの毒性はリン酸部や糖部の化学修飾の脂溶性に大きな影響を受け、多くのタンパク質と非特異的に結合するASOほど毒性が高い傾向にあることが知られている。毒性を低減させる新たな化学修飾が望まれており、最近の我々の報告では、機序が不明であるもののグアニン塩基に芳香族アルキニル修飾を導入することで毒性の低減に成功した。

ASOとその毒性に関するこれまでの研究は糖部修飾核酸の影響を評価するものがほとんどであったが、これはASOに化学修飾を導入することの困難さが大きな原因であると考えられる。一般的に、化学修飾ASOは市販されている糖部修飾核酸ビルディングブロック (ホスホロアミダイト体) を用いて化学合成され、多様な化学修飾をASOへ導入するにはまず各化学修飾ホスホロアミダイト体を合成することが必要である。ASOの毒性を低減させる新たな化学修飾が望まれているが、各化学修飾ホスホロアミダイト体を合成しASOへ導入、その後導入した化学修飾が毒性を低減させるか評価するという流れでは多くの化学修飾を評価することは困難であり、市販されている試薬を用いて合成されたASOによる研究がほとんどであるというのが現状である。

このような背景から本研究では、毒性ASOへ新規化学修飾を導入し、ASOとタンパク質との非特異的な結合に起因する毒性を抑制できるか評価することとした。脂溶性の高い糖部修飾核酸ほどタンパク質との結合力や毒性が高いという報告から着想を得て、親水性アルキニル置換基の導入によってASOのタンパク質との非特異的な結合を抑制し毒性を低減できるのではないかと考えその合成と評価を行った (第一章)。また、既存のON合成手法では化学修飾導入に多くの時間と手間がかかることから、化学修飾ONの迅速な合成と物性評価を目標として、ホスホロアミダイト体合成を経ない、菌頭反応を基盤としたON伸長後のON化学修飾法を確立することとした (第二章)。

第一章では1種類の毒性ASOと3種類の非毒性ASOを用いて実験を行った。まず、各ASOをHeLa細胞へ添加した際の細胞の挙動を評価した。毒性ASOの添加は核小体ストレスを誘起することが過去に報告されていたので、毒性ASO添加時における核小体マーカータンパク質であるNPM1の時間変化の追跡を試みところ、毒性ASOの添加によってNPM1が時間経過に従って核質へと拡散することが本研究で明らかとなった。NPM1の核質への拡散はp53のネガティブレギュレーターを阻害しアポトーシスを誘導することが知られているため、毒性ASOは核小体ストレス、NPM1の拡散、p53活性化を経て細胞死を誘導することが判明した。次に、これら4配列のタンパク質との非特異的な結合力をゲルシフトアッセイによって比較したところ、毒性ASOのタンパク質結合力は非毒性ASOよりも低いことが判明した。この結果から、本実験系ではタンパク質との非特異的な結合ではなく、未知の特定タンパク質との結合が毒性に重要である可能性が考えられた。次に、親水性置換基導入によってASOのタンパク質結合能に影響があるか評価するため、菌頭反応によって6種類の親水性アルキニル置換基を2'デオキシウリジン塩基部へと導入し、各ホスホロアミダイト体への変換を経て親水性置換基を毒性ASOへと導入した。各修飾体の親水性をCLogPの推測値で比較したところ、置換基導入によってCLogPが減少したため各修飾体の親水性は増加したと考えられる。得られた修飾ASOのタンパク質結合能をゲルシフトアッセイによって評価したところ、親水性アルキニル置換基の導入によるタンパク質結合能への影響は認められなかった。一方で、コントロールとして導入した1-デシンはタンパク質結合能を大きく向上させたことから、ASOのタンパク質との非特異的な結合力は塩基部の脂溶性にも影響を受けることが明らかとなった。核酸糖部やリン酸部の脂溶性に限らず塩基部も含め、より一般的にASOの脂溶性とタンパク質との非特異的な結合力には相関があると考えられる。また、各修飾ASO

の毒性を評価したところ、トリエチレングリコール修飾配列のみで僅かな毒性の低減が認められた。リン酸部やグアニン塩基がタンパク質結合に重要であることを示唆する報告があることから、ウリジン塩基への化学修飾導入はAS0のタンパク質結合や毒性に大きな影響を与えなかったのではないかと考えられた。本研究では、これまで報告のなかった親水性置換基の導入によるAS0の非特異的なタンパク質との結合や毒性への影響を明らかにし、低毒性AS0を創出する上で貴重な知見が得られたと考えられる。

第一章では塩基部親水性アルキニル修飾によるAS0の毒性への影響を評価したが、検討に用いた化学修飾は7種類のみであり、また核酸塩基もウリジン類縁体のみに限られていた。これは、前述したように、従来の固相合成法では化学修飾に対応するホスホロアミダイト体を合成する必要があることから、多種類の塩基部修飾AS0を合成することが困難であったためである。第二章では、より多くの修飾置換基や核酸塩基間の違いを評価することを目的に、塩基部修飾AS0の更なる合成と評価を簡便にするべく、ホスホロアミダイト体合成を経ないON伸長後塩基部修飾法の開発に着手した。5-ヨード-2'-デオキシウリジン(5IdU)あるいは7-デアザ-7-ヨード-2'-デオキシグアノシン(7IdG)を固相合成時にあらかじめONに導入しておき、これまで報告のなかった液相における菌頭反応を用いたON伸長後修飾法により塩基部にアルキニル置換基を導入する手法を検討した。モデルとして5IdUを含むONとエチニルベンゼンを用い検討した結果、得られた最適条件下において目的ONの収率は30%程度であった。このとき、目的ONからさらに塩基部環化反応やアルキンの多重付加反応が進行するために収率は中程度に留まったが、菌頭反応のカップリング効率自体は70%程度と良好であった。次に、7IdGを含むONを用いて菌頭反応を行ったところ、電子豊富な芳香環であるためか反応性に劣り、目的ONの収率は10%程度であった。最後に、5IdUと7IdGの両方においてアルキンの基質一般性と合成したONの二重鎖形成能をT<sub>m</sub>値測定により評価した。両塩基においてアルキニル置換基がON二重鎖の主溝に位置するにも関わらず、ウラシル類縁体はグアニン類縁体よりも二重鎖形成能を損なうことが判明した。本研究では、菌頭反応を利用して5IdUもしくは7IdGを有するONの液相修飾法を開発し、ONのウラシルやグアニンを液相で修飾することが可能となった。得られたアルキニル修飾ONのT<sub>m</sub>値測定から、ピリミジン塩基5位への化学修飾はプリン塩基7位への化学修飾よりも許容度が低い可能性が示された。T<sub>m</sub>値はAS0の活性や毒性に重要な指標であり、今回報告した伸長後修飾法は望ましいT<sub>m</sub>値を示す塩基部修飾置換基を探索するのに有用な手法となると考えられる。

以上より、本学位論文では、これまで報告のなかった親水性アルキニル置換基の導入によるAS0の非特異的なタンパク質との結合や毒性への影響を明らかにし、また、ホスホロアミダイト体合成を経ないON伸長後のON化学修飾法の確立に成功した。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 三 上 敦 士 )		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 小比賀 聡
	副 査	教授 有澤 光弘
	副 査	教授 荒井 雅吉
<p><b>論文審査の結果の要旨</b></p> <p>近年注目を集めている核酸医薬品の中でもアンチセンス核酸 (ASO) は、長さが15~30塩基長ほどの化学合成オリゴヌクレオチドであり、生体内ヌクレアーゼであるRNaseH1依存的に標的mRNAを切断することで特定タンパク質への翻訳を阻害し薬効を発揮する。生体内での安定性や薬効の向上を目的としてASOには様々な化学修飾が施されているが、一部の化学修飾がASOの毒性発現の要因であるとも言われている。ASOの毒性を低減させる新たな化学修飾の開発が望まれているものの、ASOを化学修飾するには技術的困難が伴うため十分に研究がなされていないのが現状である。申請者は、核酸塩基部分に新規化学修飾を導入したASOを種々合成し、それらの化学修飾が毒性発現に与える影響を検証した。また、化学修飾オリゴヌクレオチドの効率的な合成のために、菌頭反応を基盤としたオリゴヌクレオチドの伸長後化学修飾法を開発した。その結果、以下に示す優れた成果を得た。</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. これまでASOに結合するタンパク質量と毒性には相関があると考えられてきたが、本研究により単なるタンパク質量ではなく特定のタンパク質あるいは特定のタンパク質群とASOとの結合がより重要であることを見出した。</li> <li>2. 液相での菌頭反応によるオリゴヌクレオチド塩基部修飾法を新たに確立した。</li> <li>3. ピリミジン塩基の5位に対する化学修飾とプリン塩基の7位への化学修飾がオリゴヌクレオチドの二重鎖形成能に与える影響を精査し、ピリミジン塩基とプリン塩基では化学修飾の許容性が異なることを見出した。</li> </ol> <p>以上の通り、本論文では、ASOの毒性低減につながるオリゴヌクレオチドの塩基部修飾について、その物性と毒性の相関を明らかにするとともに新たな合成法の開発にも成功している。この成果は、優れた学術的意義を有することに加えて今後の核酸医薬品の安全性に関する研究の発展にも大きく寄与するものであることから、本論文は博士 (薬科学) の学位論文に値するものと認める。</p>		