

令和元年6月19日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05100

研究課題名(和文)人工核酸修飾オリゴヌクレオチドによる3本鎖DNA形成を基盤とした核酸医薬への検討

研究課題名(英文) Examination of oligonucleotide therapeutics based on the triplex DNA formation by artificial oligonucleotide

研究代表者

谷口 陽祐 (Taniguchi, Yosuke)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：00452714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、異常遺伝子に直接作用しその発現を特異的に阻害する核酸医薬であるアンチジーン核酸の創製を目的として行った。天然の核酸では結合不可能な遺伝子領域に対して結合可能な人工核酸の化学合成に成功し、安定かつ選択的な3本鎖DNA形成可能であることを明らかにした。さらには、新規核送達技術の開発にも成功し、この人工核酸を組み込んだアンチジーン核酸により効果的な遺伝子発現阻害に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、新規モダリティ創薬の一つとして期待される核酸医薬のなかでも、これまでに標的をされていない2本鎖DNAを標的とした新規創薬手法の基礎的成果を挙げているため、社会的な意義は大きい。また、核酸の高次構造の一つである3本鎖DNA形成を人工的に形成させることに着目した人工核酸の化学合成にも成功している。しかも、本研究で得られた人工核酸搭載アンチジーン核酸は、異常遺伝子を発現上流部である転写の段階を阻害する成果を挙げており、学術的な意義も非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：In this project, we aimed to create the antigene method, which is an oligonucleotide therapeutic that acts directly on abnormal genes and specifically inhibits their expression. We succeeded in the chemical synthesis of an artificial nucleic acid capable of binding to a gene region that can not be bound by natural nucleic acid, and revealed that stable and selective triplex DNA formation can be formed. Furthermore, we also succeeded in developing a new nuclear delivery technology, and succeeded in effectively inhibiting gene expression by antigene oligonucleotides having the artificial nucleic acid.

研究分野：核酸化学

キーワード：創薬化学 核酸医薬 ゲノム創薬 アンチジーン核酸 核送達技術

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

DNA や RNA の解析技術の進歩により、ゲノム情報を利用した病気の診断や治療など、様々な研究が盛んに行われている。このような研究の中でタンパク質をコードしない ncRNA の様々な機能の発見はライフサイエンスの革命的な変化を生み出している。小さな RNA は複数の遺伝子発現を制御していることから癌や糖尿病など多因子疾患の創薬標的あるいはリードとして臨床応用に向けた研究が活発化している。また、メッセンジャーRNA (mRNA) スプライシング機構を標的としたアンチセンス核酸は、現在数例ではあるが治験が開始されている状況にある。一方、RNA の制御・調節機能の複雑さが明らかになるにつれ、RNA 産生そのものの制御など謎が深まっている。2本鎖DNAを標的にするアプローチはRNAを標的とする創薬に比べて展開速度は遅いものの、病気に関与している異常遺伝子のみに直接作用し転写の段階を阻害するため、次世代の核酸医薬(アンチジーン核酸)として注目すべき手法である。

アンチジーン核酸は、遺伝子の異常が関与する様々な病気の根本的な原因となる2本鎖DNAに高い配列特異性と安定性で3本鎖DNA<sup>1)</sup>を形成し転写過程を阻害する方法である。さらに、人工的に形成させた3本鎖DNA領域では特定の遺伝子発現(転写)を人工的にコントロール<sup>2)</sup>、内在性機構を利用した突然変異の誘起<sup>3)</sup>や修復など遺伝子編集<sup>4)</sup>に利用できる可能性も示されている。これらの詳細な機構は未解明であるものの3本鎖DNA形成の有用性は明らかである。しかしながら、3本鎖DNAを形成できる2本鎖DNA塩基配列に制限があり一般的な利用の妨げになっている。この制限を克服するための非天然型核酸の開発研究も行われ、糖部を修飾したBNAや塩基部分を修飾した核酸誘導体により一部制限を克服した例が報告されている。しかしながら、これらの人工核酸を用いて細胞内で遺伝子発現を阻害した報告例はない。

### 2. 研究の目的

化学修飾したオリゴヌクレオチドは、特定の遺伝子の発現過程に直接作用して制御することができ、「核酸医薬」として臨床応用に向けた研究がなされている。多様な機能を有するRNAは、遺伝子発現制御には画期的な標的であるが、RNA調節機構の複雑さから、今後はRNA制御の根幹となるDNAを標的とした創薬開発の重要性が再認識されると考えられる。申請者はこれまでに、2本鎖DNA標的に配列特異的に3本鎖DNAを形成可能な独自の人工核酸を創製し展開してきた。本研究では、「3本鎖DNA形成による遺伝子発現制御法を基盤とした核酸医薬」の構築を目的とし、3本鎖DNA形成オリゴヌクレオチドの細胞内での安定性や利用率を高めるための化学修飾を施した機能性補助核酸の創製と人工核酸技術と融合させ、核酸医薬の基盤構築を目指した。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、3本鎖DNA形成による核酸医薬の基盤構築を目指し、配列依存性を克服したTA塩基対認識人工核酸の創製、アンチジーン核酸の生体内利用率を高める機能性補助核酸概念の確立を行う計画をした。具体的には、CG塩基対認識人工核酸設計概念を拡張しTA塩基対認識の一般性を獲得した人工核酸を開発する。人工核酸搭載アンチジーン核酸を核内でより効率的に機能させるため、相補鎖による2本鎖形成による細胞内での安定性の向上、さらに相補鎖の末端に核移行性基を、内部に特殊塩基を導入する。核内酵素による特殊塩基除去によるアンチジーン核酸の放出により、効率的に標的サイトに届ける斬新な補助推進核酸(多機能性ブースター核酸)の仕組みを確立する。これらの人工核酸の機能を融合し、3本鎖DNA形成を基軸とした核酸医薬の創製基盤構築を達成する。

### 4. 研究成果

配列依存性を克服したTA塩基対認識人工核酸の創製として、これまでに見いだしていたシュールドcを基本骨格とした人工核酸のCG塩基対認識様式を参考に、多点水素結合設計概念の拡張を行った新規人工核酸の設計を行った(図1)。この分子は、アデニン認識ユニットとして芳香族アミンを導入することで、TA塩基対のTに加えてAとも水素結合を形成可能とし、TA塩基対に対する選択性の獲得を期待した。さらに、芳香族性由来する隣接核酸塩基間でのスタッキング相互作用も増強し、親和性の向上を期待した。そして、二つの複素環をつなぐ回転可能な結合により、配列の変化に伴う3本鎖構造の変化に対して柔軟に適応可能となり、配列に依存することなくTA塩基対を認識可能であると期待した。

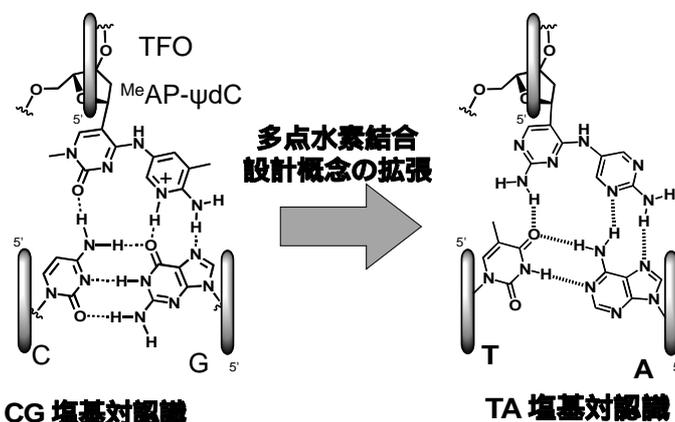
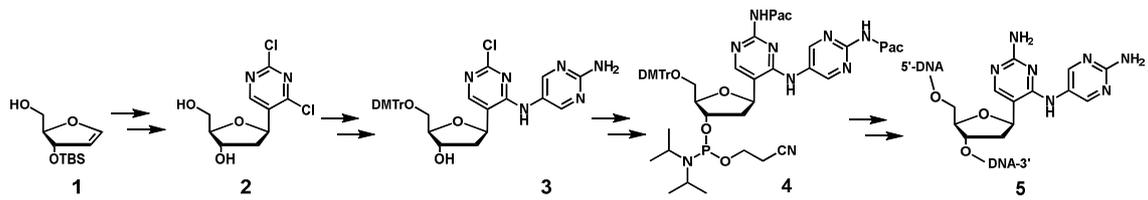


図1 分子設計概念の拡張によるTA塩基対認識分子の設計

化学合成は、化合物1を用いたヘック反応によりC-ヌクレオシド骨格を構築した(化合物2)。続いて、5'位水酸基のジメトキシトリチル保護、アデニン認識ユニットの導入により化合物3を合成した。その後、2位置換基の変換、アミノ基のフェノキシアセチル保護、3'位水酸基の亜リン酸化を経て、DNA合成前駆体であるアミダイト体4の合成をそれぞれ達成した。そして、この化合物4をDNA自動合成装置でオリゴヌクレオチド(TFO)に組み込み、固相からの切り出しと精製を行い人工核酸が組み込まれたTFO(5)を得た(式1)。



式1 新規人工核酸と3本鎖形成オリゴヌクレオチドの合成

蛍光標識(FAM)した標的2本鎖DNAにTFOの濃度を徐々に増やして添加したサンプルをゲルシフトアッセイにより評価を行うことにより、移動度の遅いバンドとして3本鎖DNA形成を観測することができる。これらのバンドの蛍光強度を定量化することにより錯体形成定数を求めると、隣接する3'側の塩基がA、5'側がGである配列(3'AZG5')において、TA塩基対を選択的かつ高い親和性で認識することを達成した(図2)。一方、隣接塩基が異なる配列(3'AZA5'、3'GZA5'、3'GZG5')では、TA塩基対に対する親和性の低下、または選択性の低下が確認され、その認識能は配列に依存することが明らかになった。また、四つの標的塩基対に加えてデオキシウリジンとアデニンによる塩基対(dUA)に対する3本鎖形成能も同様に評価したところ、TA塩基対よりもdUA塩基対に対する認識能の方が高いことを確認した。このことから、新規人工核酸のアミノ基とTA塩基対のTの5位メチル基間で立体反発が生じ、配列依存性を示したのではないかと考えている。以上のように、一部未解決の問題点が明らかになったが、提案したTA塩基対の認識に成功した。

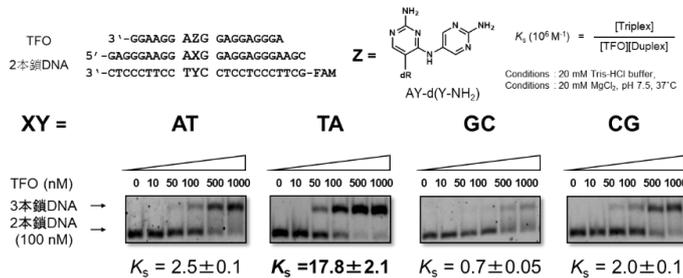


図2 AZG配列における3本鎖形成能評価

同時に、CG塩基対認識能の向上を期待して、シュードdCを基本骨格として、グアニン認識ユニットの構造最適化を行った。これまでの3位にメチル基を有するアミノピリジンユニットに加えて、4位にメトキシ基を有するアミノピリジンユニットを見い出す事に成功した(図3)。この化合物のピリミジン環上の窒素原子のpKaをNMR測定により算出した結果、7.3となり中性条件下で十分にプロトン化されていることも明らかになった。さらに、認識能はこれまでに報告した人工核酸よりも同等かそれ以上あることも明らかにした<sup>5)</sup>。

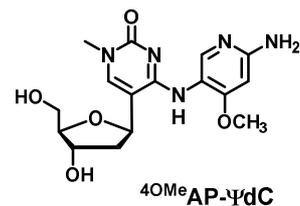


図3 構造最適化により見いだしたCG塩基対認識人工核酸

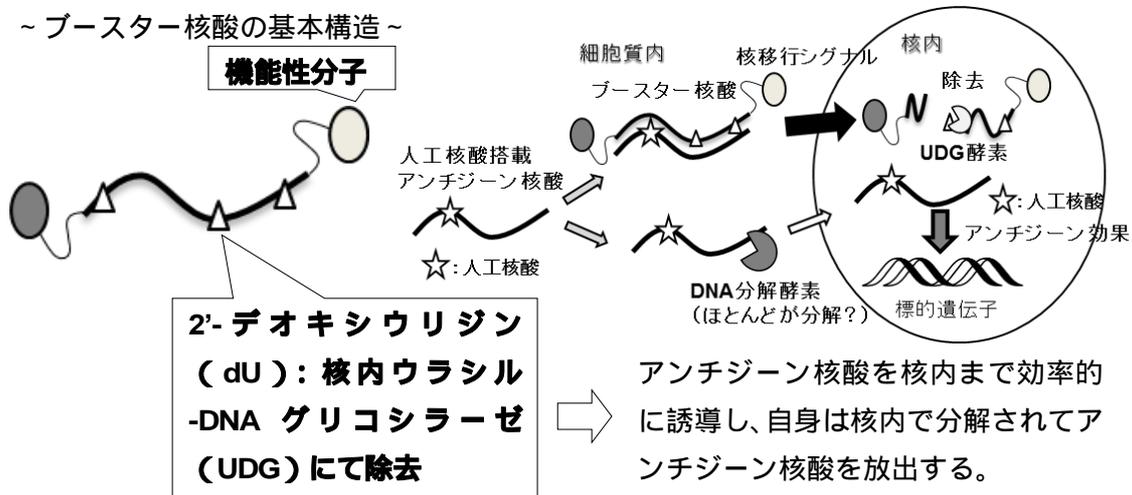


図4 プースター核酸の予想される効果

アンチジーン核酸の生体内利用率を高める機能性補助核酸概念の確立するために、アンチジーン核酸が核内に到達する前に分解を防ぐプースター核酸の創製に取り組んだ。核内において効率的に放出されるように核内酵素である UDG (ウラシル-DNA グリコシラーゼ) にて除去される様に設計した(図4)<sup>6)</sup>。アンチジーン核酸とプースター核酸の2本鎖DNAをDNA消化酵素と作用させた結果、2本鎖DNAとなる事で酵素耐性能が向上し、安定性の向上が期待された。また、上記の2本鎖DNAと蛍光標識した標的となる2本鎖DNAを混合してゲルシフトアッセイ

を行ったところ、3本鎖DNA形成も全く観測されなかった。しかしながら、興味深いことに核内酵素であるUDG存在下で2本DNA同士を混合すると、標的2本鎖DNAに対して3本鎖DNA形成が観測された(図5)。さらに、酵素量を増やすことにより明らかな3本鎖形成由来のバンドが濃くなることから、酵素によりプースター核酸の分解さらには放出されたアンチジーン核酸による3本鎖DNA形成であることが示唆された。そこで、プースター核酸に消光剤、アンチジーン核酸に蛍光剤を取り付けた2本鎖DNAを細胞にトランスフェクションしたところ、核内でアンチジーンの蛍光発光が観測された。一方、プースター核酸にUDGの基質にならない核酸を用いた所、蛍光発光は全く確認されず、一本鎖DNAであるアンチジーン核酸が細胞内、核内も含めて放出されていないことを明らかにした。この情報をもとに、遺伝子発現阻害能がどのくらいあるのかを全RNAを抽出したのちに標的のmRNAをRT-PCRにより定量を行った結果、1本鎖状態の人工核酸搭載アンチジーン核酸による効果よりも、プースター核酸と2本鎖DNAを形成させた時の方がより発現量の低下が確認され、効果的なアンチジーン効果を示すことを見いだした。本研究により、申請時に提案したプースター核酸の基本的な概念の構築に成功した。

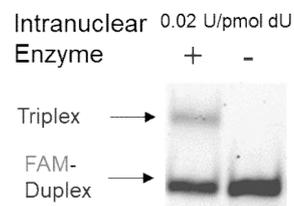


図5 核内酵素存在下による3本鎖DNA形成の確認

#### <引用文献>

Duca, M.; Vekhoff P.; Oussedik K.; Halby L., *Nucleic Acids Research*, 2008, 36, 5123-5138.

Soyfer, V. N.; Potaman, V. N., "Triple-Helical Nucleic Acids", Springer-Verlag, New York, 1996.

Raghavan, S. C., et al, *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 22749-22760.

Kalish, J. M.; Seidman, M. M.; Weeks, D. L.; Glazer, P. M., *Nucleic Acids Research*, 2005, 33, 3492-3502.

Lei Wang, Yosuke Taniguchi, Hidenori Okamura, Shigeki Sasaki, Modification of the aminopyridine unit of 2'-deoxyaminopyridinyl-pseudocytidine allowing triplex formation at CG interruptions in homopurine sequences, *Nucleic Acids Research*, 2018, 46, 8679-8688.

Lee, C. Y.; Park K. S.; Park, H. G., *Chem. Commun.*, 2015, 51, 13744-13747.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5件)

Yosuke Taniguchi, Lei Wang, Hidenori Okamura, and Shigeki Sasaki, Synthesis of 2'-deoxy-4-aminopyridinylpseudocytidine derivatives for incorporation into triplex forming oligonucleotides, *Current Protocols in Nucleic Acids Chemistry*, in press, DOI: <https://doi.org/10.1002/cpnc.80> 査読有

Ninticha Thavoncharoensub, Kento Maruyama, Choon Han Heh, Kok Hoong Leong, Hui Shi, Yoshiharu Shigematsu, Shigeki Sasaki and Yosuke Taniguchi, Synthesis of N-modified 8-oxo-2'-deoxyguanosine triphosphate and its characterization, *Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids*, 38:8, 579-589 (2019) DOI: 10.1080/15257770.2019.1586919 査読有

Yosuke Taniguchi, Mei Miyazaki, Nozomu Matsueda, Lei Wang, Hidenori Okamura, Shigeki Sasaki, Stable and Selective Antiparallel Type Triplex DNA Formation by Targeting a GC Base Pair with the TFO Containing One N2-Phenyl-2'-deoxyguanosine, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 66(6), 624-631 (2018) DOI: <https://doi.org/10.1248/cpb.c18-00043> 査読有

Lei Wang, Yosuke Taniguchi, Hidenori Okamura, Shigeki Sasaki, Modification of the aminopyridine unit of 2'-deoxyaminopyridinyl-pseudocytidine allowing triplex formation at CG interruptions in homopurine sequences, *Nucleic Acids Research*, 46(17) 8679-8688 (2018) DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gky704> 査読有

Lei Wang, Yosuke Taniguchi, Hidenori Okamura, Shigeki Sasaki, Effect of the 3-halosubstitution of the 2'-deoxy aminopyridinyl-pseudocytidine derivatives on the selectivity and stability of antiparallel triplex DNA with a CG inversion site, *Bioorg. Med. Chem.* 25(14), 3853-3860 (2017) DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.05.035> 査読有

[学会発表](計 25件)

小薄孝行、谷口陽祐、真方裕哉、佐々木茂貴、三本鎖形成配列の拡張を目的としたTA塩基対

認識可能な C-ヌクレオシド誘導体の合成と評価、日本薬学会第 139 回年会、2019 年

Yosuke Taniguchi, Triplex DNA as an antigene method: Design, synthesis and evaluation of artificial nucleic acid, Kyushu University-University Malaya Pharmacy Symposium 2018, 2018 年

Yosuke Taniguchi, Lei Wang, Hidenori Okamura, Shigeki Sasaki, Development of the pseudo-dC derivatives for their recognition of CG inversion sites by an antiparallel triplex DNA for the antigene strategy, Functional Nucleic Acids PERTH 2018, 2018 年

Takayuki Osuki, Yosuke Taniguchi, Yuya Magata, Shigeki Sasaki, Development of C-nucleoside analogues for a TA base pair recognition in antiparallel triplex DNA, 第 45 回国際核酸化学シンポジウム、2018 年

Lei Wang, Yosuke Taniguchi, Hidenori Okamura, Shigeki Sasaki, Chemical modifications of aminopyridine unit of 2'-deoxyaminopyridinyl-pseudocytidine to tune the recognition ability for the formation of the triplex DNA with CG inversion sites, 第 45 回国際核酸化学シンポジウム、2018 年

Yosuke Taniguchi, Design and Synthesis of Artificial nucleoside Analogue for the Expansion of the Triplex DNA Forming Code with High Stability and Selectivity, Asian 3 Roundtable on Nucleic Acids A3RONA 2018, 2018 年

王磊、谷口陽祐、岡村秀紀、佐々木茂貴、Substitution effect on aminopyridinyl-pseudodeoxycytidine derivatives on the selectivity and stability of antiparallel triplex DNA with CG inversion site, 第 4 回日本核酸医薬学会、2018 年

小簿孝行、谷口陽祐、真方祐哉、佐々木茂貴、TA 塩基対認識能の向上を目指した C-ヌクレオシド誘導体の合成と 3 本鎖形成能の評価、第 55 回化学関連支部合同九州大会、2018 年

楊昊、谷口陽祐、岡村秀紀、Lei WANG、佐々木茂貴、CpG アイランドを認識する人工ペプチド核酸の設計と合成、日本薬学会第 138 回年会、2018 年

真方祐哉、谷口陽祐、岡村秀紀、佐々木茂貴、3 本鎖 DNA 中の TA 塩基対の認識を目指した C-ヌクレオシドの合成と 3 本鎖形成能評価、日本薬学会第 138 回年会、2018 年

谷口陽祐、非ワトソンクリック型水素結合可能な人工核酸による非天然型 3 本鎖 DNA 形成とその核酸医薬への展開、非ワトソン・クリック型核酸に関する九州地区セミナー、2018 年

真方祐哉、谷口陽祐、岡村秀紀、佐々木茂貴、DNA 中の TA 塩基対の認識を目指した C-ヌクレオシドの合成と機能評価、第 34 回日本薬学会九州支部大会、2017 年

Lei Wang, Yosuke Taniguchi, Hidenori Okamura, Shigeki Sasaki, Effect of the 3-position modifications of the 2'-deoxyaminopyridinyl-pseudocytidine derivatives on the selectivity and stability of antiparallel triplex DNA with a CG inversion site, The 1st Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry, 2017 年

Hao Yang, Yosuke Taniguchi, Hidenori Okamura, Lei Wang, Shigeki Sasaki, Design and synthesis of peptide nucleic acids (PNA) for binding to CpG island, The 1st Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry, 2017 年

谷口陽祐、岡村秀紀、王磊、佐々木茂貴、CG 塩基対を選択的に認識する擬シチジン誘導体の合成と 3 本鎖 DNA 形成能の機能評価、第 43 回反応と合成の進歩シンポジウム、2017 年

谷口陽祐、尹貽貞、石卉、重松慶治、佐々木茂貴、8 位修飾 7 デアザグアノシン誘導体による核酸修復酵素阻害剤の創製、第 3 5 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2017 年

谷口陽祐、アンチジーン核酸創薬を志向した非天然型 3 本鎖 DNA 形成可能な核酸誘導体の開発、日本核酸医薬学会第 3 回年会、2017 年

真方祐哉、谷口陽祐、岡村秀紀、佐々木茂貴、3 本鎖 DNA 中の TA 塩基対の認識を目指した人工核酸の合成と 3 本鎖形成能評価、第 54 回化学関連支部合同九州大会、2017 年

谷口陽祐、尹貽貞、石卉、重松慶治、佐々木茂貴、核酸修復酵素阻害剤を目指した損傷類似人工核酸の開発、日本ケミカルバイオロジー学会第 12 回年会、2017 年

真方祐哉、谷口陽祐、岡村秀紀、佐々木茂貴、3 本鎖 DNA 中の TA 塩基対を選択的に認識可能な人工核酸の合成、日本薬学会第 137 回年会、2017 年

①宮崎芽依、谷口陽祐、佐々木茂貴、N2-フェニル置換グアノシン誘導体による PhdG/GC3 重鎖塩基対特異性の向上、第 3 3 回日本薬学会九州支部大会、2016 年

②谷口陽祐、岡村秀紀、佐々木茂貴、非天然型 3 本鎖 DNA 形成可能な擬シチジン誘導体の開発とアンチジーン核酸医薬の創製、第 3 4 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2016 年

③谷口陽祐、岡村秀紀、佐々木茂貴、アンチパラレル型 3 本鎖 DNA 形成可能な擬シチジン誘導体の開発と遺伝子発現制御法への展開、日本核酸医薬学会第 2 回年会、2016 年

④Mei Miyazaki, Yosuke Taniguchi, Nozomu Matsueda and Shigeki Sasaki, Synthesis of the N2-substituted 2'-deoxyguanosine derivatives and the binding evaluation for the triplex DNA formation, 第 43 回国際核酸化学シンポジウム、2016 年

⑤Hidenori Okamura, Yosuke Taniguchi and Shigeki Sasaki, Non-natural nucleoside derivatives for selective stabilization of the antiparallel triplex DNA with multiple inversion sites, 2016 年

Yosuke Taniguchi and Shigeki Sasaki, Development of Triplex Forming Oligonucleotide Including Artificial Nucleoside Analogues for the Antigen Strategy, Springer, Synthesis of Therapeutic Oligonucleotides p253-270 (2018)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0件）

取得状況（計 0件）

〔その他〕

ホームページ等：<http://bioorg.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6 . 研究組織