

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01966

研究課題名(和文)細胞膜透過性を有する合成核酸の開発

研究課題名(英文) Development of cell-permeable oligonucleotides bearing bio-cleavable protecting groups

研究代表者

實吉 尚郎 (Hisao, Saneyoshi)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：10564784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の成果は、有機化学的手法を用いて細胞膜透過性に乏しい核酸分子に細胞膜透過性を与え、細胞内部に豊富に存在するチオールによって活性化に変化する合成核酸を開発した点である。本研究期間では、細胞内に豊富に存在する生体内チオールの1種であるグルタチオンによって除去可能な核酸のリン酸ジエステル部位に対する生分解性保護基を開発した。保護基を結合した合成核酸は、細胞に振りかけるだけで細胞内に取り込まれた。細胞膜透過性は、保護基の結合数だけではなく結合位置によって変化することが明らかとなった。細胞内に取り込まれた合成核酸は、細胞内で保護基が除去され遺伝子発現制御活性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、チオールによって速やかに除去されるリン酸ジエステル部位保護基を開発した点である。保護基を結合した合成核酸は、細胞膜透過性を示しただけではなく細胞内部での脱保護反応により活性化され機能を示した。これらの成果は、核酸を基盤構造とする細胞内部で機能するプローブ分子や医薬品などへの応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Objective of this project is to develop synthetic oligonucleotides with high cell-membrane permeability and activatable property. In research period, glutathione-labile protecting groups for phosphodiester moiety in oligonucleotides were developed. Oligonucleotides modified with glutathione-labile protecting groups showed cell-membrane permeability without use of transfection reagent. The cell-membrane permeability increased depending on the number of protecting groups. Moreover the location of protecting groups was also influenced on the cellular uptake. Internalized oligonucleotides were activated and transformed into biologically active oligonucleotides.

研究分野：核酸化学

キーワード：保護基 細胞膜透過性 細胞内化学反応 活性化 合成核酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核酸(DNA・RNA)を細胞内に導入する技術は、生命科学研究から創薬研究に至るまで大変重要である。核酸は、糖リン酸バックボーン上に多くの負電荷を有する高極性分子であり細胞膜を透過しない。そのため、トランスフェクション試薬、ウイルスベクター、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、ソノポレーションなどを利用して核酸を細胞内へ導入してきた(*ACS Chem. Biol.*, 2016, 1180)。しかし、細胞種ごとに細かい至適条件の検討が必要である点や操作自体がむずかしく熟練の技術が必要な場合が多い。また、その物理的ダメージにより細胞生存率が低下するといった問題を抱えていた。もし、核酸分子自体が細胞膜透過性を獲得できれば、DNA/RNA 自動合成機で合成した核酸を細胞と混ぜるだけで細胞膜を透過するため細胞内導入が極めて簡便になると考えられる。これまでの研究から、核酸分子が持つリン酸ジエステル部位への生分解性保護基の導入によって細胞膜透過性が向上することは知られていた。しかしながら、一般的な核酸の化学合成工程に含まれるアンモニア水処理に保護基が不安定であり合成が容易ではなかった。そのため、アンモニア水処理に安定であるが一般的な細胞内で速やかに除去可能な保護基が必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、核酸分子に保護基を結合することで細胞膜透過性を付与し細胞内導入を簡便にする。細胞膜透過後、一般的な細胞内に存在するトリガー(細胞内チオール)によって保護基が除去され活性型へ変換されるか検討する。

3. 研究の方法

本計画は、申請者が開発してきた還元反応で活性化されて除去される保護基を改良、発展させて「細胞に振りかけるだけで浸透して活性化を受け機能する合成核酸」へと導くものである。本研究期間中には、次の3点を達成することを目標とした。(1)一般的なDNA/RNAの化学合成工程に安定に存在でき、細胞内に豊富に存在するグルタチオンではじめて除去されるリン酸ジエステル部位保護基を開発する。グルタチオンは、種々の細胞内に普遍的に存在しているため一般性が高いと期待した。保護基の構造は、申請者が報告してきた保護基構造を基盤として、グルタチオン応答性部位としてジスルフィド構造を組み込んだ設計とした。常法に従い、ホスホロアミダイトユニットを合成し、モデルオリゴヌクレオチドへ組み込んだ。(2)細胞膜透過性は、保護基の結合数だけでなく保護基の結合位置によっても変化する可能性がある。そこで、保護基の結合数および結合位置を変えた蛍光標識オリゴヌクレオチドを用いて細胞内導入への影響を検討した。(3)細胞内に取り込まれた合成核酸が、細胞内部で脱保護反応を受け活性構造へと変化しRNA干渉を誘起するかを検討した。ルシフェラーゼ遺伝子を標的としたsiRNAに保護基を結合し、細胞内部でRNA干渉効果を発揮するか検討した。

4. 研究成果

本研究期間では、核酸のリン酸ジエステル部位に対する新しい生分解性保護基を開発した。開発した保護基は、一般的なDNA/RNA合成工程に用いられるアンモニア水に対して安定であり合成しやすい特徴を持つ。従来報告されてきたエステラーゼ感受性保護基とは、大きく異なる点がある。一方、細胞内に豊富に存在するチオールの1種であるグルタチオンを作用させると速やかに除去された。特筆すべき点は、低濃度でのグルタチオンでは除去されないが、高濃度域では速やかに除去される性質である。この濃度依存的な脱保護選択性は、細胞内に導入されて初めて活性化される合成核酸に有用である。開発した保護基を結合した蛍光標識DNAは、細胞に振りかけ

るだけで1時間以内に細胞内へ取り込まれた。細胞膜透過性は、保護基の結合数に応じて向上した。一方で、保護基の結合位置によっては少ない結合数でも多く取り込まれる様子が観測された。さらに、保護基はオリゴヌクレオチドに分散して結合するより集中して結合したほうが細胞内への取り込みが良くなるとわかった。本結果は、細胞膜透過性を向上させる保護基導入の設計指針になりえると考えている。次に、細胞内で保護基を結合した合成核酸が機能するかを検討すべく、ルシフェラーゼ遺伝子を標的とする siRNA 分子を合成した。期待していたほど高い細胞内取り込みは示さなかったが細胞内での脱保護反応により徐放的に活性を示すことが明らかになった。今後は、保護基の結合数や RNA の母核構造との組み合わせを詳細に検討することで膜透過性に関してさらに改良を進めていく。また、トランスフェクションが難しい神経細胞への応用には到達できなかったため今後の課題としたい。

合成核酸の細胞内取り込みをリアルタイムに評価する手法も重要であると考え、新規蛍光標識法も開発した。細胞外では光を発しないが細胞内に取り込まれた後、チオールを受け蛍光を発するプロ蛍光色素を設計、合成し標識試薬とした。合成した標識試薬とアルキン結合チミジル酸 20 量体を結合し、プロ蛍光色素-チミジル酸結合体を合成した。リポフェクション法により細胞内へ導入後、時間経過とともに標識体が蛍光を発する様子が観察された。また、この標識体は培地では蛍光を発しないため無洗浄で蛍光顕微鏡によって観察することができた。今後は評価対象の合成核酸を標識化し、細胞内取り込みをリアルタイムで追跡することを目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hisao Saneyoshi, Yuta Yamamoto, Takayuki Ohta, Shoji Akai, Akira Ono.	4. 巻 30
2. 論文標題 Thiol-responsive pro-fluorophore labeling: Synthesis of a pro-fluorescent labeled	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127222	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hisao Saneyoshi, Takayuki Ohta, Yuki Hiyoshi, Takeo Saneyoshi, Akira Ono.	4. 巻 21
2. 論文標題 Design, Synthesis and Cellular Uptake of Oligonucleotides Bearing Glutathione-Labile Protecting Groups	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 862-866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.orglett.8b03501	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 實吉尚郎、小野晶	4. 巻 45
2. 論文標題 Prodrug型核酸医薬に用いる保護基の開発	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 4-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hisao Saneyoshi, Akira Ono	4. 巻 66
2. 論文標題 Development of Protecting groups for Prodrug-Type Oligonucleotide Medicines	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chem. Pharm. Bull.	6. 最初と最後の頁 147-154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c17-00696	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 9件）

1. 発表者名 小野 晶、三上 智紀、鈴木 海斗、堀川 匡嗣、寺澤 一馬、太田 貴之、中村 康大、實吉 尚郎
2. 発表標題 細胞内で除去される保護基を結合したプロドラッグ型核酸医薬の合成手法の開発研究
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 實吉尚郎
2. 発表標題 細胞内で活性化されて機能するオリゴヌクレオチドの創製
3. 学会等名 第17回有機合成化学協会関西支部賞受賞講演会（招待講演）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kazuma Terasawa, Akira Ono, Hisao Saneyoshi
2. 発表標題 Development of a reduction cleavable linker for solid-phase synthesis
3. 学会等名 第46回国際核酸化学シンポジウム（国際学会）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takayuki Ohta, Zhaoma Shu, Hiroshi Abe, Akira Ono, Hisao Saneyoshi
2. 発表標題 Synthesis of cell-permeable and GSH-activatable oligonucleotides
3. 学会等名 第46回国際核酸化学シンポジウム（国際学会）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺澤一馬、中村康大、小野晶、實吉尚郎
2. 発表標題 細胞内還元条件で除去されるRNA糖部保護基の開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第5回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田貴之、山本祐太、小野晶、實吉尚郎
2. 発表標題 細胞内で蛍光を発する発光標識核酸の合成
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第5回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 實吉尚郎、山本祐太、太田貴之、小野晶
2. 発表標題 発蛍光色素が結合したオリゴヌクレオチドの合成
3. 学会等名 日本化学会第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野晶、中村康大、實吉尚郎
2. 発表標題 2' 位に還元環境で脱離する保護基を結合した RNA の合成：プロドラッグ型核酸医薬開発に向けて
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hisao Saneyoshi, Takayuki Ohta, Yuki Hiyoshi, Akira Ono
2. 発表標題 Synthesis of cell-membrane permeable oligonucleotides bearing GSH-activated protecting groups on the internucleotide linkages
3. 学会等名 第45回国際核酸化学シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 プロドラッグ型核酸の合成と細胞内取り込み
2. 発表標題 實吉尚郎、太田貴之、日吉祐貴、小野晶
3. 学会等名 第12回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kodai Nakamura, Akira Ono, Hisao Saneyoshi
2. 発表標題 Development of reduction-activated protecting groups for siRNA prodrugs
3. 学会等名 23th International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (XXIII IRT) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayuki Ohta, Akira Ono, Hisao Saneyoshi
2. 発表標題 Development of cell-permeable oligonucleotides bearing GSH-activated protecting groups
3. 学会等名 23th International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (XXIII IRT) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuma Terasawa, Akira Ono, Hisao Saneyoshi
2. 発表標題 Synthetic study of bio-reduction cleavable linker for oligonucleotides
3. 学会等名 23th International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids (XXIII IRT) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 實吉尚郎、山本祐太、太田貴之、小野晶
2. 発表標題 蛍光発生型色素が結合したオリゴヌクレオチドの合成
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第4回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 寺澤一馬、小野晶、實吉尚郎
2. 発表標題 癌細胞内で開裂するリンカーの開発研究
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第4回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村康大、小野晶、實吉尚郎
2. 発表標題 細胞内還元条件で除去されるRNA糖部保護基の開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第4回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田貴之、小野晶、實吉尚郎
2. 発表標題 細胞膜透過性を有するグルタチオン応答性プロドラッグ型核酸の合成
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第4回年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hisao Saneyoshi, Takayuki Ohta, Kazuma Terasawa, Yuta Yamamoto, Akira Ono.
2. 発表標題 Design and synthesis of bio-labile protecting groups for oligonucleotide prodrugs
3. 学会等名 第44回国際核酸化学シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takayuki Ohta, Yuta Yamamoto, Akira Ono, Hisao Saneyoshi
2. 発表標題 Glutathione-labile protecting groups for phosphodiester moieties
3. 学会等名 第44回国際核酸化学シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuta Yamamoto, Akira Ono, Hisao Saneyoshi
2. 発表標題 Synthesis of cell-permeable fluorogenic oligonucleotides
3. 学会等名 第44回国際核酸化学シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 ヌクレオシド又はそのヌクレオチドの誘導体、それを構成単位として含むRNA誘導体、核酸 医薬、及びRNA誘導体若しくはRNAの製造方法.	発明者 小野晶、實吉尚郎	権利者 神奈川大学
産業財産権の種類、番号 特許、特開2018-184351	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 化合物、蛍光標識導入剤、及び蛍光標識導入方法	発明者 小野晶、實吉尚郎	権利者 神奈川大学
産業財産権の種類、番号 特許、特開2019-196349	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----