

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06993

研究課題名(和文)優れた有効性と低い副作用を同時に実現する、人工カチオン性分子連結核酸医薬の開発

研究課題名(英文) Development of artificial cationic molecules-conjugated oligonucleotides for high efficacy and low toxicity

研究代表者

原 倫太郎 (Rintaro, Hara)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・プロジェクト講師

研究者番号：70709766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：核酸医薬のひとつであるアンチセンス核酸医薬は、標的RNAと二本鎖を形成することで作用する。申請者はこれまでに、このような二本鎖に結合する人工カチオン性分子を開発してきたが、創薬の応用においては、非共有結合により複合体形成した人工カチオン性分子が生体内で解離してしまう点が課題であった。そこで本研究では、人工カチオン性分子をアンチセンス核酸に結合した、人工カチオン性分子連結型アンチセンス核酸の創製を目指した。反応条件や精製条件の検討により人工カチオン性分子連結型アンチセンス核酸を合成・単離した。人工カチオン性分子連結型アンチセンス核酸は従来のアンチセンス核酸よりも高い二本鎖形成能を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸医薬の機能を向上させるための従来技術として核酸化学修飾があるが、これは核酸化学構造(塩基・糖・リン酸)を直接改変するものである。一方、人工カチオン性分子は、核酸医薬本体の構造は改変せずに核酸医薬の機能を向上させることができる点に特徴がある。これら二つの分子技術は相反するものではなく、人工カチオン性分子と核酸化学修飾の両方を一つの核酸医薬に同時に搭載することができる。従って、両者を組み合わせることで核酸医薬の特定の性質を相乗的に向上させる、あるいは、化学修飾で十分に向上できない性質を人工カチオン性分子により補完する、といった形で、従来よりも高性能な核酸医薬の創製につながると期待できる。

研究成果の概要(英文)： Antisense oligonucleotides are one of the most developed oligonucleotide therapeutics, and they work by hybridizing with their complementary RNAs. I have developed artificial cationic molecules which can bind to the duplexes of antisense oligonucleotides and their complementary RNAs. While their promising properties, it is necessary for therapeutic application to prevent such cationic molecules from releasing from oligonucleotides. In this study, I aimed to develop artificial cationic molecules-conjugated-antisense oligonucleotides. These oligonucleotides were isolated after optimizing reaction and purification conditions, and they showed a higher duplex-forming ability to their complementary strands than non-conjugated oligonucleotides.

研究分野：生体関連化学、核酸化学

キーワード：アンチセンス核酸 核酸医薬 人工カチオン性分子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アンチセンス核酸 (Antisense Oligonucleotide(s), ASO(s)) は、相補的な塩基配列の標的 RNA に結合し、ASO/RNA 二本鎖を形成することで疾病関連遺伝子発現を制御する。ASO は最も開発が進んでいる核酸医薬である一方、その対象の多くは予後の悪い希少疾病に限定されており、今後より様々な疾病を対象とするためには、ASO の有効性や安全性をさらに向上する手法が必要である。申請者は、ASO/RNA 二本鎖の、リン酸基が向かい合った溝 (メジャーグループ) に特異的に結合し、その性質を制御することができる人工カチオン性分子 (Artificial Cationic Molecule(s), ACM(s)) を開発してきた。これまでに、二本鎖核酸に ACM を複合体形成させることで、核酸医薬の様々な性質を向上させることができることを見出ししてきた。具体的には、核酸分解酵素であるヌクレアーゼに対する耐性を向上⁽¹⁾、や二本鎖の熱安定性 (二本鎖融解温度 (T_m 値)) の向上⁽²⁾、に加え、条件によっては RNase H 活性 (RNase H 依存型 ASO の場合、薬理活性に直結する性質) を向上させる場合があること⁽³⁾などを報告してきた。

<引用文献>

- (1) Hara, R. I. *et al. Sci. Rep.* **2018**, *8*, 4323.等
- (2) Hara, R. I. *et al. Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 1710-1717.等
- (3) Hara, R. I. *et al. Chem. Commun.*, **2018**, *54*, 8526-8529.

2. 研究の目的

核酸医薬の様々な性質を向上させることができる ACM は、概念的には有望である。一方でこれら ACM と核酸の複合体は、可逆的な非共有結合 (静電相互作用・水素結合) によるものである。従って、生体内でこれらの複合体が解離してしまうことから、実際に創薬に応用する上では課題があった。

生体内においても ACM と ASO が解離せず、ACM の機能が十分に発揮できるためには、ACM と ASO が共有結合で連結されていることが必要であると考え、本研究ではそのような ACM-ASO コンジュゲートの合成を目指すこととした。

3. 研究の方法

申請者が開発した ACM には、大きく分けてオリゴ糖を基盤とした人工カチオン性オリゴ糖と、ペプチドを基盤とした人工カチオン性ペプチドの2種類の系列があり、それぞれ結合特性を始めとする種々の性質に特色がある。一方で、人工カチオン性オリゴ糖の合成は液相合成により、モノマー (グリコシルドナー) の合成や、糖鎖伸長 (グリコシル化反応) を繰り返し行う必要がある、合成・精製が煩雑である^(1, 2)のに対し、人工カチオン性ペプチドは、固相合成法により比較的簡便に合成・精製を行うことができる。これらを踏まえ本研究では、まずは合成の簡便さを優先し、人工カチオン性ペプチドを基盤とする ACM-ASO の合成を検討することとした。また、ACM が ASO/RNA 二本鎖に与える影響について評価するための、各種物性評価系の検討も並行して行った。

4. 研究成果

ACM として、高い二本鎖結合能を有する L-2,4-ジアミノブタン酸 8 量体 (Dab8) を用い、システインを導入した Cys-Dab8 を合成した。一方、マレイミド基が連結した ASO を別途準備し、チオール・マレイミド共役付加による連結反応により ACM-ASO コンジュゲート体の合成を試みた。生成物 (ACM-ASO) が多数のカチオン性/アニオン性官能基を有することから、反応~精製において、通常の核酸オリゴマー合成やオリゴペプチド合成で用いる標準的なプロトコルでは凝集を防ぐことが困難であった。そこで、分子内の静電相互作用を抑制するため、反応~精製を可能な限りリン酸緩衝液中行うことで、目的物を得ることができた。また、合成・精製後の核酸オリゴマーの質量分析において MALDI-TOF MS が汎用されるが、多量の無機塩が存在する状態では、多数の金属イオン付加体が生じ、検出感度が著しく低下することが想定される。そこで、このような緩衝液中の核酸オリゴマーの MALDI-TOF MS 測定の条件検討を行った。、検討の結果、緩衝液中の試料であっても、数~数十 fmol オーダーの核酸オリゴマーのピークを検出することができ、緩衝液中の核酸オリゴマーを分析できる条件を確立した。

次に、得られた ACM-ASO の性質評価を行った。ACM-ASO/RNA の二本鎖の融解温度は ASO/RNA 二本鎖に ACM を添加する場合よりも高く、ASO と ACM を共有結合により連結することで、より熱安定の高い二本鎖を形成することが示された。また、二本鎖における相補 RNA の RNase A 耐性を向上し、RNase H 切断パターンを変化させるなど、共有結合による連結しても ACM の特性は損なわれないことも確認できた。

一方、ASO の化学修飾の種類や導入量によっては、ACM-ASO が合成・精製が困難であることも明らかとなった。相性の悪い ASO と ACM の組み合わせの具体的な例として、リン酸基にホスホロチオエート (PS) 修飾を多数有する特定の ASO を用いた場合で一部、ACM-ASO の単離に至っていない。反応中・精製中で、通常の核酸の場合と比較してさらに凝集が起こりやすいた

めと考えているが、現時点で詳細は分かっていない。解決を目指し、様々なコンジュゲーションの方法（官能基の組み合わせ）の検討や、固相担体上で ACM、リンカー、ASO を順に合成する合成法の検討も行っている。

また、従来の非共有結合型の系において、ACM としてオリゴ糖をベースとする人工カチオン性オリゴ糖であるオリゴジアミノガラクトースを、ASO/RNA 二本鎖中に添加することで、 mismatches RNA の切断を抑制する成果を論文誌にて発表した⁽⁴⁾。本成果では、ASO 鎖に、電荷を有さないリン原子修飾であるメチルホスホネート結合を部分的に導入することで、ACM の結合位置が制御し、さらには RNase H による RNA 鎖の切断位置を制御できる可能性を示すことができた。

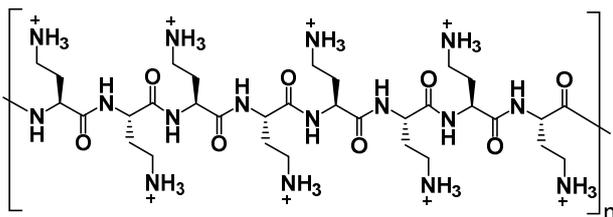


図 1 Dab8 の化学構造

< 引用文献 >

(4) Hara, R. I. *et al. Org. Biomol. Chem.* **2021**, *19*, 6865-6870.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Hara Rintaro Iwata, Wada Takeshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Inhibition of off-target cleavage by RNase H using an artificial cationic oligosaccharide	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 6865 ~ 6870
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D10B00983D	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高木一憲、大原正裕、吉田規恵、前田雄介、原倫太郎、佐藤一樹、永田哲也、横田隆徳、和田猛
2. 発表標題 人工カチオン性ペプチドによるヘテロ二本鎖核酸の機能制御
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 Ohara, M., Takagi, K., Yoshida, K., Maeda, Y., Hara, R., Sato, K., Nagata, T., Wada, T., Yokota, T.
2. 発表標題 Development of antidote for therapeutic oligonucleotides which reduces the acute toxicity
3. 学会等名 第61回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 核酸医薬副作用軽減剤、該核酸医薬副作用軽減剤を含む医薬組成物、並びに核酸医薬の副作用惹起性を軽減する方法	発明者 原倫太郎 他7名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-120908	出願年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------