

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年2月15日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21350088

研究課題名（和文） リン原子修飾RNA核酸医薬の革新的不斉合成法

研究課題名（英文） Stereocontrolled synthesis of P-modified RNA nucleic acid drugs

研究代表者

和田 猛（WADA TAKESHI）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：90240548

研究成果の概要（和文）：近年、遺伝子の発現を選択的に制御可能な siRNA や microRNA を医薬として用いるための研究が盛んに行われている。これらの RNA 分子を医薬として実用化するためには、生体内における安定性の向上が必須である。本研究では、優れた安定性と薬理活性が期待される、リン原子の絶対立体配置が厳密に制御されたリン原子修飾 RNA 類縁体の新規合成法を開発し、オリゴマーの合成を達成した。

研究成果の概要（英文）：In recent years, a great deal of attention has been focused on siRNA and microRNA as drugs for selective inhibition of gene expression. Toward the practical use of these RNA molecules as therapeutic agents, stabilization of those in vivo is required. In this study, a new method for the stereocontrolled synthesis of phosphorous-modified RNA analogs, which are stable in vivo and expected to be highly effective as drugs, has been developed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2011年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：核酸医薬・リン原子修飾核酸・不斉合成・siRNA

## 1. 研究開始当初の背景

近年、siRNA、microRNA、アプタマーなど、様々な RNA 分子が核酸医薬として注目されている。これらの手法に用いる RNA は、生体内でヌクレアーゼによって加水分解されることなく長時間存在し、かつ標的の mRNA やタンパク質と選択的に相互作用する必要がある。このような条件を満たす核酸誘導体の候補として、リン酸ジエステル結合の非架橋酸素原子の一つを化学修飾し、ヌク

レアーゼ耐性を高めたリン原子修飾核酸類縁体が種々考案されて来た。しかし、現在汎用されているホスホロチオエート型核酸医薬のリン原子の絶対立体配置は制御されておらず、その絶対立体配置の違いがリン原子修飾核酸の物理化学的、生化学的性質に対してどのように影響するか、という極めて本質的な問題が全く解明されていない。このような背景から、我々は光学活性なアミノアルコールを不斉源とするホスホロチオエート

DNA の立体選択的合成法（オキサザホスホリジン法）を開発してきた。本研究では、この手法をさらに改良、発展させ、未だ達成されていないリン原子の絶対立体配置が厳密に制御された長鎖リン原子修飾 RNA 類縁体の合成法の確立を目指した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、従来報告例の無い、リン原子の絶対立体配置が厳密に制御されたリン原子修飾 RNA 類縁体の合成法を開発し、この手法を用いて合成したリン原子修飾 RNA 類縁体の核酸医薬として重要な物理化学的性質（相補的 RNA との二重鎖形成能など）、生化学的性質（ヌクレアーゼ耐性、RNAi 活性など）とリン原子の絶対立体配置の関係を解明することである。

## 3. 研究の方法

### (1) モノマーユニット合成の検討

①本研究で開発する手法は、オキサザホスホリジン法と呼ばれ、光学活性なアミノアルコールを不斉源として用いる。そこで、まずリン原子修飾 RNA 類縁体の合成に適した種々の光学活性アミノアルコールの合成を行い、これと三塩化リンを反応させてホスフィチル化剤を合成する。

②本研究では、RNA 誘導体として、高い酵素耐性、二重鎖形成能、免疫応答抑制能を有する 2'-OMe-RNA に着目した。そこで、核酸塩基部が保護された 2'-OMe リボヌクレオシド誘導体を合成し、これと上記のホスフィチル化剤を反応させてモノマーユニット（オキサザホスホリジンモノマー）を合成する。

### (2) オリゴマー合成の検討

①まず、2 量体の固相合成を行い、縮合収率、縮合反応の立体選択性を評価し、反応条件を最適化する。

②最適化された条件を用いてオリゴマーの合成を行い、脱保護条件、精製法を確立する。

### (3) 物性および生理活性評価

①得られたオリゴマーと相補的な塩基配列を有する RNA の二重鎖形成能を温度可変 UV 測定により、T<sub>m</sub> 値から評価する。

②得られたオリゴマーの種々のヌクレアーゼに対する耐性を評価する。

## 4. 研究成果

(1) 2'-OMe ホスホロチオエート RNA の立体選択的合成

①反応条件と精製法を検討し、4 種類の核酸塩基を有するオキサザホスホリジンモノマー（図 1）を高立体選択的に合成することができた。

②得られたモノマーを用い、2 量体の固相合成を行ったところ、いずれの核酸塩基の場合でも、Sp、Rp 両立体異性体について、98%以上の縮合収率、99%以上の立体選択性で目的物が得られた。

合でも、Sp、Rp 両立体異性体について、98%以上の縮合収率、99%以上の立体選択性で目的物が得られた。

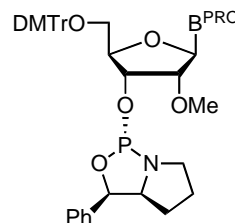


図 1. ホスホロチオエート RNA モノマーユニット

③マニュアル固相合成によるオリゴマーの合成を検討し、高収率、高立体選択的に目的物が得られる反応条件を見出した。さらに、自動合成機を用いる合成条件も確立し、オリゴマーの脱保護条件、精製法を確立した。

④4 種類の核酸塩基を有するオリゴマーの合成を行い、高純度の目的物を得た。

⑤合成したオリゴマー（10 量体）と相補的な塩基配列を有する RNA との二重鎖形成能を T<sub>m</sub> 値の測定によって評価したところ、Rp 絶対立体配置を有するオリゴマーは天然の RNA よりも二重鎖形成能が顕著に高かったのに対し、Sp 絶対立体配置を有するオリゴマーは二重鎖形成能が顕著に低下した。

⑥合成したオリゴマーのヌクレアーゼ耐性を評価した。Rp 絶対立体配置を有するオリゴマーは 3'-エキソヌクレアーゼである蛇毒ホスホジエステラーゼによってゆっくりと分解された。一方、Sp 絶対立体配置を有するオリゴマーは蛇毒ホスホジエステラーゼではほとんど分解されなかった。

(2) 2'-OMe ボラノホスフェート RNA の立体選択的合成

①ボラノホスフェート RNA 誘導体は、ホスホロチオエート誘導体の合成で用いた不斉補助基とは異なる、酸性条件下除去される構造のものを用い、立体が制御された H-ホスホネート中間体を経由して合成される。この不斉補助基は、ホスホロチオエート誘導体合成で用いたのものより立体的に嵩高く、モノマーの反応性が低い。そこで、縮合反応により酸性度の高い高活性な活性化剤を用いることが必要となる。そこで、ボラノホスフェート誘導体合成のためのモノマーの 5'-水酸基の保護基は、酸性条件下でより安定な保護基に変更し、新たな構造を有するモノマーユニットを合成した（図 2）。

②得られたモノマーを用い、ボラノホスフェート 2 量体の固相合成を行ったところ、いずれの核酸塩基の場合でも、Sp、Rp 両立体異性体について、98%以上の縮合収率、99%以上の立体選択性で目的物が得られた。

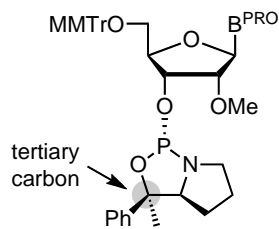


図2. ボラノホスフェート RNA モノマーユニット

③ マニュアル固相合成によるオリゴマーの合成を検討し、高収率、高立体選択的に目的物が得られる反応条件を見出した。さらに、オリゴマーの脱保護条件、精製法を確立した。

④ 4種類の核酸塩基を有するオリゴマーの合成を行い、高純度で目的物を得た。

⑤ 合成したオリゴマー (10 量体) と相補的な塩基配列を有する RNA との二重鎖形成能を  $T_m$  値の測定によって評価したところ、 $Sp$  絶対立体配置を有するオリゴマーは天然の RNA よりも二重鎖形成能が顕著に高かった。また、 $Rp$  絶対立体配置を有する対応するホスホロチオエート RNA 誘導体よりも二重鎖安定化効果は大きかった。一方、 $Rp$  絶対立体配置を有するオリゴマーは二重鎖形成能が顕著に低下した (図3)。

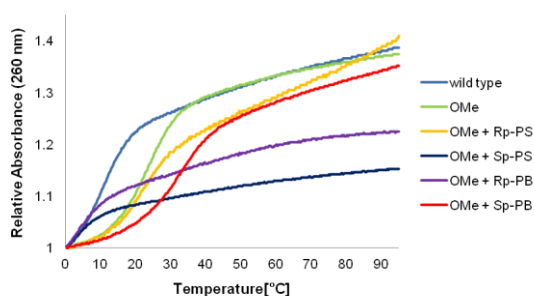


図3. 二重鎖の熱安定性評価

⑥ 合成したオリゴマーのヌクレアーゼ耐性を評価した。 $Sp$  絶対立体配置を有するオリゴマーは蛇毒ホスホジエステラーゼによってゆっくりと分解された。一方、 $Rp$  絶対立体配置を有するオリゴマーは蛇毒ホスホジエステラーゼではほとんど分解されなかった。

以上得られた研究成果は、核酸医薬の実用化に大きく貢献することが期待できる。すなわち、 $siRNA$  の任意の位置に任意の数のリン原子修飾ヌクレオチドを導入することにより、優れた核酸医薬が創製できる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 26 件)

- ① 和田猛, 核酸医薬品に求められるもの, 医薬ジャーナル, 査読有, 2012, 48, 61-63.
- ② 和田猛, リン原子修飾核酸の合成と医薬への応用, 医薬ジャーナル, 査読有, 2012, 48, 71-76.
- ③ Nukaga, Y., Yamada, K., Ogata, T., Oka, N., Wada, T., Stereocontrolled Solid-Phase Synthesis of Phosphorothioate Oligoribonucleotides Using 2'-O-(2-Cyanoethoxymethyl)-Nucleoside 3'-O-Oxazaphospholidine Monomers, J. Org. Chem., 査読有, 2012, 77, 7913-7922.
- ④ Oka, N., Wada, T., Stereocontrolled synthesis of oligonucleotide analogs containing chiral internucleotidic phosphorus atoms, Chem. Soc. Rev. 査読有, 2011, 40, 5829-5843.

[学会発表] (計 28 件)

- ① 和田猛, P-Chiral Nucleic Acids as New Therapeutic Agents, 第34回日本分子生物学会年会, 招待講演, 2011. 12. 13, パシフィコ横浜.
- ② 和田猛, リン原子修飾核酸医薬の化学的創製, 第8回分子複合医薬研究会, 2011. 12. 9, 招待講演, 産業技術総合研究所関西センター.
- ③ 和田猛, 核酸医薬の新機軸, 第38回BMBコンファレンス, 2011. 7. 10, 招待講演, 箱根高原ホテル.
- ④ 和田猛, リン原子修飾核酸医薬の化学的創製, 第27回日本DDS学会, 2011. 6. 9, 招待講演, 東京大学.

[図書] (計 4 件)

- ① 和田猛, 他, シーエムシー出版, RNA 工学の基礎と応用, 2011.
- ② 和田猛(監修), 他, シーエムシー出版, 核酸医薬の最前線, 2009.

[産業財産権]

○出願状況 (計 13 件)

- ① 名称: 中性条件下除去可能な 2'-水酸基保護基を用いる RNA の製造法  
発明者: 和田猛, 他  
権利者: 東京大学  
種類: 特許  
番号: US61/600, 095  
出願年月日: 2012. 2. 17  
国内外の別: 国外
- ② 名称: リボヌクレオシドホスホロチオエートの製造方法  
発明者: 和田猛, 他  
権利者: 株式会社キラルジェン  
種類: 特許

番号：PCT/JP2011/055018

出願年月日：2011. 3. 9

国内外の別：国内・国外

③ 名称：2'-O-修飾 RNA

発明者：和田猛、他

権利者：東京大学・株式会社キラルジェン

種類：特許

番号：US61/418, 384

出願年月日：2010. 11. 30

国内外の別：国外

④ 名称：リボヌクレオシドホスホロチオエートの製造方法

発明者：和田猛、他

権利者：株式会社キラルジェン

種類：特許

番号：特願 2010-048824

出願年月日：2010. 3. 5

国内外の別：国内

○取得状況（計4件）

① 名称：立体規則性の高いリボヌクレオチド類縁体及びデオキシリボヌクレオチド類縁体の製造法

発明者：和田猛、他

権利者：株式会社キラルジェン

種類：特許

番号：特許第 4865544 号

取得年月日：2011. 10. 25

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 猛 (WADA TAKESHI)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：90240548