

## 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 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：32702

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21651098

研究課題名（和文） 核酸医薬デリバリーに革新をもたらすプロドラッグ型オリゴヌクレオチドの開発

研究課題名（英文） Development of novel pro-drug type oligonucleotides which are efficiently delivered into target sites in body.

研究代表者

小野 晶 (ONO AKIRA)

神奈川大学・工学部・教授

研究者番号：10183253

研究成果の概要（和文）：オリゴヌクレオチドのホスホジエステル部位に結合する生分解性保護基の開発研究を遂行した。ジオキソレノンの基本骨格とするホスホジエステル部位の保護基を結合したチミジル酸二量体（チミジルチミジン）を合成した。このものを市販のエステル分解酵素（豚肝臓由来）で処理したところ、保護基が除去され、フリーのチミジルチミジンを与えた。しかし、保護基の安定性が不足しており、より長鎖の保護オリゴヌクレオチドの合成は困難であった。

研究成果の概要（英文）：New methods for protecting the phosphodiester in oligonucleotides, with new bio-degradable protection groups, have been investigated. A thymidyl-thymidine with a new dioxolenone based protection group at the phosphodiester linkage was synthesized. By treating the protected thymidyl-thymidine with an esterase from porcine liver (Sigma-Aldrich), the dioxolenone based protecting group was released and a free thymidyl-thymidine was obtained.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	0	1,100,000
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	300,000	3,400,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

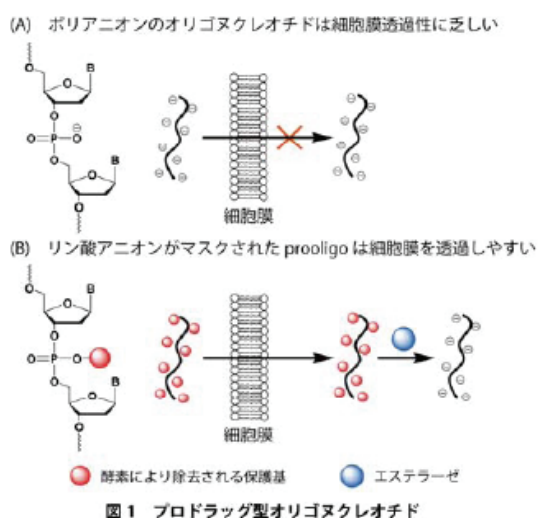
キーワード：生物活性分子の設計・合成、核酸医薬

## 1. 研究開始当初の背景

オリゴヌクレオチドを基本骨格とする医薬候補として、疾患原因となる遺伝子の発現を抑制するアンチセンス核酸や RNAi、標的とするタンパク等の生体分子と特異的に結合し機能を阻害するアプタマー核酸（抗体型核酸）、抗ウイルス作用、自然免疫活性化作用を有する 2-5A や CpG モチーフなどが知

られている。これらは一般に核酸医薬と総称される。核酸医薬は、1967年のアンチセンス核酸の概念の提唱以来(Belikova et al., 1967, Tetrahedron Lett., 37, 3557.)、40年以上にわたって精力的な研究開発が継続されてきた。更に、1998年に発見された RNAi 現象は(Fire et al., 1998, Nature, 391, 806.)、アンチセンス核酸に比べ 100 倍以上の遺伝

子抑制効果が認められたことから、核酸医薬の候補として急速に期待が高まっている。しかしながら、実際に市場に上梓された核酸医薬は極めて少数である。オリゴヌクレオチドの生体内へのデリバリーが難しい(図1)、生化学的安定性が充分でない、タンパクとの非特異的相互作用が起り得る、などの問題点がある(RNAi 法とアンチセンス法: 関根光雄[編]、2005 講談社)。オリゴヌクレオチドは、負電荷を有するリン酸ジエステル構造が連続するポリアニオンであり、疎水性の細胞膜の透過性に極めて乏しい。また、リン酸ジエステル結合は生体内の核酸分解酵素により迅速に加水分解される。これらの問題を解決するデリバリーシステムの構築が、今後の核酸医薬の成否を握っているといえる。



現在、主に検討されている核酸医薬のデリバリー手法は、オリゴヌクレオチドをキャリア分子で包み込んで細胞内に到達させる手法である。一方、リン酸ジエステルを“酵素で除去される保護基(酵素除去保護基)”でマスクし、膜透過性や核酸分解酵素耐性を付与した prooligo によるデリバリーも検討されている(Pojärvi-Vitra and Lönnberg, 2006, *Curr. Med. Chem.*, 13, 3441)。図1Bに prooligo の概念を示した。Prooligo は核酸分解酵素や胃液による分解に抵抗し(Barber et al., 1995, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 5, 563; Tosquellas et al., 1996, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 6, 457)、細胞膜透過性に優れている(Morvan et al., 2001, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 20, 1165)、核酸医薬を経口投与薬とするなど、バイオアベイラビリティの改善をもたらすのではないかと期待される。このように、高い有用性が期待されるにも関わらず、prooligo の研究例は充分ではなく、少数のグループが報告しているに過ぎない。その理由は prooligo の合成が容易ではないことにある。

一般的な核酸合成法では合成出来ない。prooligo に関する研究はここ数年を見てもごく少数で、核酸化学が盛んな日本国内でも全く研究がなされていない状況である。

一方、最近の核酸化学の進展に目を転じると、核酸合成法の最適化がさらに進み、核酸塩基部に保護基をまったく必要としない合成法が確立された(Ohkubo et al., 2004, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 10884)。これら先端合成技術が開発された今こそ、塩基部が無保護でリン酸ジエステル部に酵素除去保護基が導入された prooligo の開発に挑戦しなくてはならないと考えた。

## 2. 研究の目的

最先端の核酸合成手法を駆使して、医薬候補と成り得る prooligo の合成法を開発する。即ち、塩基部は無保護であり、リン酸ジエステル部に酵素除去保護基を導入した prooligo を開発する。酵素除去保護基は細胞内酵素(エステラーゼなど)の作用で除去されるが、酵素の良い基質となり、かつ prooligo の水溶性を低下させない保護基を開発する。核酸医薬のドラッグデリバリーを革新する核酸誘導体とその合成手法を開発するものである。

## 3. 研究の方法

塩基部無保護ホスホロアミダイト法を用い、DNA 自動合成機上で prooligo の鎖伸長を行なうには、塩基部に保護基が存在しないホスホロアミダイトユニットが必要となる。これらのホスホロアミダイトユニットは、亜リン酸部位が通常ホスホロアミダイト法で使用される 2-シアノエチル基ではなく、dioxolenone 基など酵素で除去される保護基を有する。

第一に、これらホスホロアミダイトユニットの効率的合成法を開発する。即ち、ヌクレオシドホスホロアミダイトを鍵中間体とし、リン酸部位保護基となる種々のアルコールと反応させることで、広範な誘導体が高効率で合成される。第二に、光切断型リンカーを有する固相担体を用いる prooligo の合成を遂行する。本研究で用いるホスホロアミダイトユニットは、既存のユニットと亜リン酸部位の構造が異なるため、合成条件を慎重に吟味する必要がある。dioxolenone 基を導入した prooligo を合成し、酵素による保護基の除去効率、核酸分解酵素耐性を調べる。

まとめると、ホスホロアミダイトユニットを合成し、塩基部無保護ホスホロアミダイト法による prooligo 合成に適用し、エステラーゼにより prooligo が効率的にオリゴヌクレオチドへと再生されることを評価する。結果を基に、より良好な保護基を有す prooligo の開発に進む。このサイクルを繰り返して有用な prooligo の開発に至る継続的な研究が

必要であると予想し、三ヵ年の計画とした。

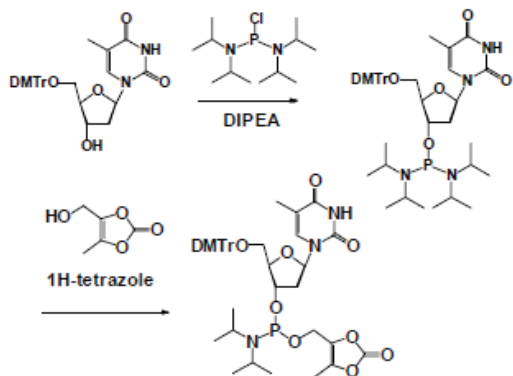
#### 4. 研究成果

主な研究成果として、ジオキソレノンの基本骨格とするリン酸ジエステル部位の生分解性保護基の開発と、キメラ型オリゴヌクレオチド合成への利用の試みがあげられる。

(1) ジオキソレノン基本骨格とするリン酸ジエステル部位の保護基の開発とオリゴヌクレオチド合成への応用

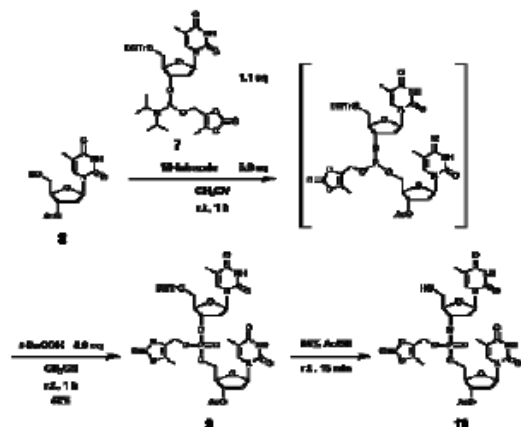
①ジオキソレノン保護基を有する DNA 合成用亜リン酸ユニットの合成

既法に従いチミジンのジアミダイトを合成し、ジオキソレノンアルコールと反応させ目的のユニット（新規化合物）を合成した。



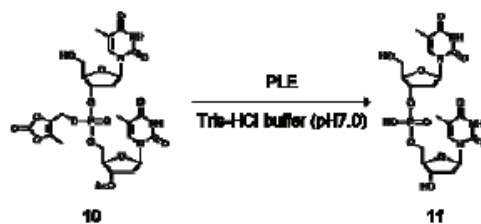
②ホスホジエステル部位がジオキソレノン保護基で保護されたチミジン二量体（チミジルチミジン）の合成

液相合成法により、ジオキソレノン保護基を結合したチミジン二量体を合成した。



③エステラーゼによるジオキソレノン保護基の除去

上記のジオキソレノン保護チミジルチミジンを市販のエステル加水分解酵素（豚肝臓由来）で処理したところ、ジオキソレノン保護基が除去され、フリーのチミジルチミジンを与えた。



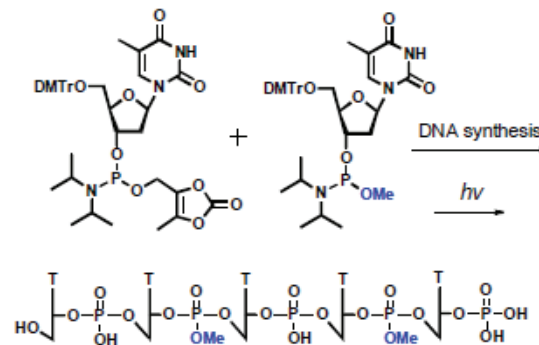
- 100  $\mu$ M of 10
- porcine liver esterase (15 units/72  $\mu$ L) in 210 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- 21 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)

④ジオキソレノン保護基を結合したオリゴヌクレオチド合成の試み

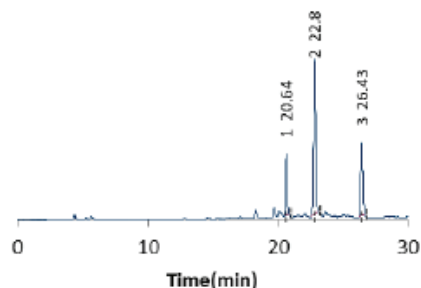
ジオキソレノン保護合成ユニットを用いて、DNA 自動合成機を用いて、ジオキソレノン保護オリゴチミジル酸の合成を試みたところ、多くの副産物の混合物を得た。ジオキソレノン保護基の安定性が不足しており、長鎖のオリゴヌクレオチドの合成は断念した。

(2) キメラ型オリゴヌクレオチドの新規合成手法の開発

リン酸ジエステル部位とリン酸トリエステル部位を有するキメラ型オリゴヌクレオチドは、水溶性とヌクレアーゼ耐性を併せ持つ核酸医薬のリードに成りうる。本研究における新発見であるが、ジオキソレノン保護アミダイトユニットは、DNA 合成サイクルの“ヨウ素酸化”のステップで除去され、ホスホジエステル部位を与えることを見出した。この特性を利用すると、脱保護反応（通常は濃アンモニア処理）無しでも、ホスホジエステル結合部位が生成する。下記のように、市販のメチルホスホアミダイトと組み合わせ、メチルトリエステル部位とホスホジエステル部位を有するキメラ型オリゴヌクレオチドを合成することに成功した。即ち、光反応性リンカーを結合した固相担体を用い、ジオキソレノン保護ユニット、メチル保護ユニットを順次結合し、光照射により合成オリゴヌクレオチドを担体から切り離す。濃アンモニア処理を行わないことが重要なポイントである。



得られたオリゴヌクレオチドの純度を HPLC で調べた。メチルトリエステル部位にジアステレオマーがあることから、複数のピークを与えたと説明される。保持時間の最も長いピークはジオキソレノン保護基が残っているものである。



## 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0件)

〔学会発表〕(計6件)

① 三田晃央、佐川直樹、岡本到、小野晶、“酵素分解性の長鎖アルキル基を結合したオリゴデオキシリボヌクレオチドの合成研究”日本化学会第92 春季年会(2011 年3 月25 日、慶応義塾大学日吉キャンパス)

② 佐川直樹、友利貴人、岡本到、小野晶、“酵素分解性保護基を有するプロドラック型オリゴヌクレオチドの開発研究”日本化学会第92 春季年会(2011 年3 月25 日、慶応義塾大学日吉キャンパス)

③ 友利貴人、佐川直樹、岡本到、小野晶、“酵素分解性保護基を有する短鎖オリゴヌクレオチドの合成研究”日本化学会第92 春季年会(2011 年3 月25 日、慶応義塾大学日吉キャンパス)

④ Takahito Tomori, Shota Ito, Naoki Sagawa, Shintaro Kousaka, Itaru Okamoto, Akira Ono, “Synthesis of short oligonucleotides with enzyme degradable protection groups”, The 38<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC2011) (11月10日, 北海道大学)

⑤ Akihiro Mita, Shota Ito, Itaru Okamoto, Akira Ono, “Solid phased synthesis of oligodeoxyribonucleotide with enzymedegradable protection groups” The 38<sup>th</sup> International Symposium on Nucleic Acid Chemistry (ISNAC2011) (11月10日, 北海道大学)

⑥ Shota Ito, Itaru Okamoto, Akira Ono, “The synthesis of novel oligonucleotides

with biodegradable phosphate-protection groups” 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM 2010), Honolulu (ハワイコンベンションセンター), (12月17日, 2010).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: ホスホジエステル部位とホスホトリエルテル部位を有するキメラ核酸の新規合成法

発明者: 小野晶、岡本到

権利者: 神奈川大学

種類: 特許

番号: 2012-068494

出願年月日: 平成24年3月24日

国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

[http://apchem2.kanagawa-u.ac.jp/~onolab/newpage2\\_Report081017.html](http://apchem2.kanagawa-u.ac.jp/~onolab/newpage2_Report081017.html)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 晶 (ONO AKIRA)

神奈川大学・工学部・教授

研究者番号: 10183253

(2) 研究分担者

岡本 到 (OKAMOTO ITARU)

神奈川大学・工学部・特別助教

研究者番号: 40460133

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: