

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23249008

研究課題名(和文)ヌクレアーゼ抵抗性ヌクレオシドを搭載した細胞標的化機能性一本鎖核酸の創出

研究課題名(英文)Targeting of the nuclease-resistant functional oligonucleotides

研究代表者

松田 彰(Matsuda, Akira)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・その他

研究者番号：90157313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,800,000円

研究成果の概要(和文)：核酸医薬の細胞・組織標的化を目的にした。(1)肝臓で高発現しているmicroRNA-122に対するアンチセンス分子をヌクレアーゼ抵抗性ヌクレオシドで合成し、肝臓標的化能に優れるpH応答性カチオン性脂質から作製したリボソームに搭載しマウスに静脈注射した。その結果、microRNA-122で抑制されていたmRNAs量が回復し、血中コレステロールの低下が約2週間持続した。(2)エピジェネティクスで重要なDNA CpG配列の選択的メチル化酵素阻害剤を開発し、前立腺ガンに高発現しているPSMAを標的とするリガンドを結合した。この阻害剤はPSMA発現前立腺ガン細胞選択的に増殖抑制活性を示した。

研究成果の概要(英文)：(1) MicroRNA (miR)-122 is highly expressed in liver and controls cholesterol metabolism. We prepared antisense molecules (AMO) against miR-122 using nuclease resistant 2'-OMe-4'-thioribonucleosides. YSK05-liposome was prepared with the pH-sensitive cationic lipid, and the AMO was encapsulated. Systemic administration of the liposome induced knockdown of miR-122 and increase in target genes in the liver, and a subsequent reduction in plasma cholesterol at a dose of 1mg AMO/kg with persisting for over 2 weeks. (2) Prostate-specific membrane antigen (PSMA) ligand (GL) was attached to a dumbbell-type of the cyclic oligonucleotide (fCpG-dmDNA), which contained 5-formylCpG, giving GL-fCpG-dmDNA. fCpG-dmDNA inhibited the methylation of CpG-oligonucleotides. fCpG-dmDNA showed cytotoxicity against HeLa cells (PSMA-negative) with an IC50 value of 41 nM. On the other hand, GL-fCpG-dmDNA showed cytotoxicity against only PSMA-positive cell line such as LNCaP prostate tumor cells.

研究分野：核酸化学

キーワード：核酸医薬 組織標的化 PSMA オリゴヌクレオチド ヌクレアーゼ抵抗性 SPAAC DNMT1 stat3

1. 研究開始当初の背景

本研究開始時までは、すべてチオリン酸 (PS) 化されたアンチセンス分子は、薬物送達システム (DDS) に搭載しなくとも主に肝臓へ取り込まれるが、siRNA などの二本鎖核酸は DDS に搭載する必要があると考えられていた。従って、2012 年に米国で承認された家族性高コレステロール血症治療薬 ( mipomersen )・肝臓の ApoB100 を標的とする 20 量体のアンチセンス薬 ( ISIS 社の第 2 世代キメラギャップマーでリン酸ジエステル結合 (PO) はヌクレアーゼ抵抗性にするためにすべて PS に置換されている ) は、DDS を用いず 200 mg/週を皮下注射する。しかし、ヨーロッパの EMA からは安全性 (インフルエンザ様症状、注射部位反応、肝毒性、重大な心血管イベント) についての懸念から拒絶された。これらの毒性の原因は明らかにされていないが PS による蛋白結合がその候補として考えられている。一方、最近になってキメラギャップマー (5'-GCattggtatTCA-3', ApoB100 を標的、大文字は LNA, 小文字は未修飾 DNA, すべて PS 修飾) の肝臓取込のデータが公表された ( Table 1, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム-2014 講演「脂溶性リガンド修飾アンチセンス核酸の肝臓内分布及び mRNA 減少の評価」渡邊郁剛ら (塩野義製薬))。それによると標的化していない PS-ASO の肝臓への取込は投与した量の高々 5% であり、3' 末端にコレステロール ( chol )、ビタミン E ( V<sub>E</sub> ) または、肝臓で発現しているアジアログリコプロテインレセプターに特異的に結合する N-acetylgalactosamine をリンカーを介して 3 個結合 ( 3GalNAc ) する場合は、それぞれ 18, 21, 33% と増加する。さらに興味深いのは、3GalNAc で肝臓標的化した場合は肝臓の約 80% を占め、多くの肝臓病が発症する実質細胞に 90% が取り込まれていることである。このように組織・臓器標的化することによって投与量が減少し副作用も軽減されるはずである。

Table 1. PSアンチセンス分子の肝臓標的化と取込み

		ASO	chol	V <sub>E</sub>	3GalNAc
肝臓への取込み (%)		5	18	21	33
実質細胞 (%)		41	48	41	90
非実質細胞 (%)		59	52	59	10

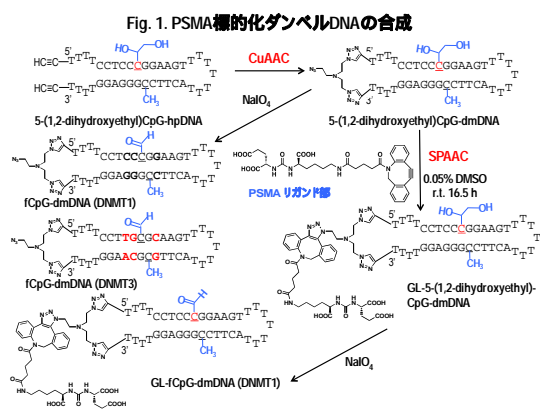
2. 研究の目的

(1) 高分子創薬の主役として期待されているのは、タンパク質と核酸であり、タンパク質

創薬が抗体医薬として開花している。しかし、抗体医薬は現状では細胞表面と細胞外に放出されたタンパク質だけが標的になるという限界がある。一方、核酸による細胞機能調節法としては、アンチセンス、アンチジーン、リボザイム、アプタマー、デコイ、RNA 干渉 ( siRNA ) などが発見・開発されており、抗体とは異なり細胞内外の両方で機能させることができるメリットを持つ。しかし、世界中の多くの研究者やバイオベンチャーが核酸医薬開発にしのぎを削っているが、現状では局所投与 ( 眼注射 ) 剤として二品目が上市されているに過ぎない。核酸医薬の解決すべき課題は、ヌクレアーゼ抵抗性の付与による作用の持続化、自然免疫活性化 ( 副作用 ) の回避、および、細胞・組織標的化による選択性の付与である。報告者はすでに、エンド・エキソヌクレアーゼ抵抗性ユニットとして 2'-O-methyl-4'-thioribonucleosides ( MS ) を開発した。さらに、MS を含む核酸は自然免疫活性化を回避できることも明らかにした。また、RNA アプタマーが siRNA の標的化分子として利用されているが、動物モデル実験では腫瘍内投与だけである。さらに、低分子化合物による標的化は核酸での例は極めて少ない。そこで本研究では、核酸に MS を搭載し、低分子化合物やリポソームにより細胞・組織標的化し、エンドサイトーシスで細胞内に送達することで上記課題 ( ) の解決を図る。(2) 本研究では、実験動物での全身投与を目指し、コレステロール ( ch; 肝臓 ) や PMSA ( 前立腺がん膜抗原 ) 結合物 ( LG; 前立腺ガン、ガン新生血管 ) などの低分子化合物で細胞・組織標的化し、すでに申請者らが開発したヌクレアーゼ抵抗性ユニット MS を搭載した、1) がんの増殖に極めて重要な転写因子 STAT3 mRNA ( Stat3 ) に対する siRNA や microRNA ( miRNA, 肝臓で過剰発現している miR-122 ) に対するアンチセンス RNA ( AMO ) を開発する。また、上記のシステムを搭載した、2) エピジェネティクスに重要な CpG 配列の維持メチル化酵素 DNMT1 と de novo メチル化酵素 DNMT3 の両方をトラップできる dumbbell 型デコイ DNA ( dmDNA ) を創出し、新規核酸創薬のための基盤技術を構築する。

3. 研究の方法

(1) MSIは、報告者がすでに開発した反応 (*J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 7233-7243) を用いて 4'-thioribonucleosidesを合成し、さらに2'-水酸基をメチル化 (*Nucleic Acids Res.* 2013, 41, 10659-10667) して合成した。これらのヌクレオシドはホスホロアミダイト体に誘導後、DNA/RNA自動固相合成機で縮合して望みとするRNAオリゴマーに導入した。(2)がん標的化分子として前立腺ガンやガン新生血管に特異的に発現している前立腺ガン特異的膜抗原 (PSMA) に結合するリガンドとしてウレア型ジペプチドPSMA結合物 (GL) を選択して文献既知の方法 (*J. Am. Chem. Soc.* 2009, 131, 17090-17092) で合成した。(3) エピジェネティクスに重要なCpG配列のメチル化酵素DNMT1および、DNMT3をトラップできる5-formylCpG (fCpG)を含むdumbbell型デコイ核酸 (dmDNA) は、Fig. 1に示すように、まず、3', 5'



両末端にアセチレンを持ち、fCpGの前駆体となる5-(1,2-dihydroxyethyl)CpG-hpDNAを合成し、これを原料として、申請者がすでに開発したダンベル化試薬 (tris(azidoethyl)amine) をCuAAC (Cu(I) catalyzed alkyne-azide cycloaddition) 反応で環化し5-(1,2-dihydroxyethyl)CpG-dmDNAを合成した (*Org. Lett.* 2013, 15, 694-697)。これをNaIO<sub>4</sub>と処理してジオール部分を酸化してfCpG-dmDNAを得た (*Nucleic Acids Res.* 2001, 29, 2456-2463)。(4) 5-(1,2-dihydroxyethyl)CpG-dmDNAの末端アジド基と、PSMA標的化分子をSPAAC (strain-promoted azide-alkyne cycloaddition) 反応で結合し、NaIO<sub>4</sub>酸化して標的分子GL-fCpG-dmDNAを合成した。一方、がんの増殖に極めて重要な転写因子STAT3 mRNA (Stat3) に対するsiRNAについては、センス鎖3'末端にほぼ同様の方法でGLを結合した。(5) 肝臓指向性リポソームを形成するpH応答性脂質 (YSK05) は、連携研究者であ

る佐藤悠介らの方法で合成した (*J. Control. Release.* 2012, 163, 267-276)。

#### 4. 研究成果

(1) 肝臓で選択的に高発現しているmicroRNA-122 (miR-122)を標的にした。miR-122は、肝におけるコレステロールや、脂肪酸の代謝制御に関与し、その制御異常は代謝性疾患や循環器系疾患の原因になる。従って、miR-122に対するアンチセンス分子AMOは、血中コレステロールを低下させることができる。AMOは、miRNAと完全相補配列を持ち、miRISC内のmiRNAに結合することにより、miRISCの標的mRNAへの結合を妨げてmiRNAの機能を抑制する。miRNAは標的mRNAとAMOへ競争的に結合するが、標的mRNAの配列とは部分相補的であるのに対して、AMOとは完全相補であり、熱的により安定なAMOとmiRNAは優先的に二本鎖を形成し機能を発揮する。また、一本鎖オリゴヌクレオチドは細胞内外のヌクレアーゼにより速やかに分解されるので、一本鎖であるAMOを生体内で使用するためには、高いヌクレアーゼ抵抗性が必要である。さらに、標的とするmiRNAによっては様々な組織に分布しているものもあり、このようなmiRNAをin vivoで標的組織特異的に抑制する場合には、組

Fig. 2. Evaluation of AMO-122 activity

miR-122 sense	3'-GUUUGUGGUAACAGUGUGAGG-5'	
Antisense (23mer)	sequences	Tm (°C)
MS-PO	5'-A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> U <sub>2</sub> G <sub>2</sub> U <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> U <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A-3'	65.8
MS-PS	5'-A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> U <sub>2</sub> G <sub>2</sub> U <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> U <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A-3'	64.8
MS-PS-mm6	5'-A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> U <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> U <sub>2</sub> C <sub>2</sub> U <sub>2</sub> U <sub>2</sub> C <sub>2</sub> U <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> G <sub>2</sub> A <sub>2</sub> G <sub>2</sub> U <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A-3'	n. d.
M-PO	5'-A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> U <sub>2</sub> G <sub>2</sub> U <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> U <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A-3'	62.9
M-PS	5'-A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> U <sub>2</sub> G <sub>2</sub> U <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> U <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A-3'	58.0
M-PS-mm6	5'-A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> U <sub>2</sub> A <sub>2</sub> C <sub>2</sub> U <sub>2</sub> C <sub>2</sub> U <sub>2</sub> U <sub>2</sub> C <sub>2</sub> U <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A <sub>2</sub> G <sub>2</sub> A <sub>2</sub> G <sub>2</sub> U <sub>2</sub> C <sub>2</sub> A-3'	n. d.

T<sub>m</sub>: 10 mM phosphate buffer (pH 7.0), 0.1 mM EDTA, 1 mM NaCl, 3 μM strand concentration  
mm: mismatch



織特異的なデリバリー技術が必要である。Fig. 2にAMO-122の配列と構造を示した。リン酸ジエステル結合 (PO) の修飾も調べることにし、すべてチオリン酸 (PS) 化した誘導體や 2'-O-Me-ribonucleosides体と活性を比較した。Fig. 3に濃度を変えて測定した結果を示した。予想通りMS-PS体がMS-PS-mm6やM-PO体よりも高活性であり24時間後で66%の阻害効果を示したが、MS-PO体もほぼ同様 (60%) の活性を示した。さらに、72時間までの活性を測定したところ、MS-PS体は活性が86%まで上昇したが、

MS-PO体は約50%にまで活性が低下した。この差は、PS体の蛋白結合の強さを表しており、培地中や細胞内蛋白と結合して除放射し

ているのではないかと考えている。MS-PS-AMO-122の更なる創薬展開を計るためには、肝臓特異的なデリバリーを考慮する必要がある。そこで、次にMS-PS-AMO-122の5'末端にコレステロール (chol) または、トコフェロール (Toc) 3'末端にcholを結合した化合物を合成し、先と同様にin vitroでの活性を調べた。その結果、何れの化合物もMS-PS-AMO-122とほぼ同等の濃度依存的活性が長時間維持されることが示された。以上の結果より、デリバリー分子結合型SM122-PS の有効性が示され、これらの創薬展開への可能性が期待できる。そこで次に、MS-PS-AMO-122をpH応答性カチオン性脂質 YSK05 (Fig. 4) と POPE:chol:PEG-DMG (50:25:25:3) から作製した肝臓標的化に優れたリポソームに搭載し、マウスを用いるin vivo実

Fig. 5. Gene expression of AldoA, Bclck, & Ndr3 in vivo

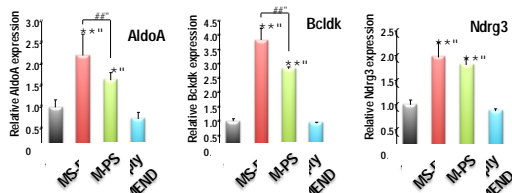


Fig. 6. Blood cholesterol level

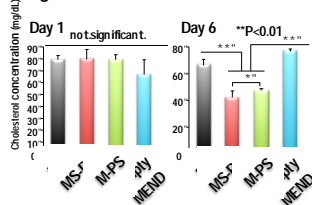
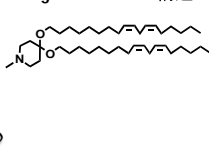


Fig. 4. YSK05の構造



験を行った。このpH応答性脂質のpKaは6.5であり、体循環中 (pH 7.4) はほとんどプロトン化されず、エンドサイトーシスで細胞内に取り込まれエンドソーム中 (pH 6.5~6.8) でプロトン化されエンドソーム膜と融合し細胞質中に内容物を放出 (エンドソーム脱出) する。このリポソームに1 mg/kgのMS-PS-AMO-122を搭載し、2日おきに3回静脈注射し最後の投与から48時間後にmiR-122の標的mRNAs (AldoA,

Bclck, Ndr3) 量を調べた。その結果、miR-122によって発現抑制されていたmRNAsはAMO-122投与により発現が回復することが明らかになり、その活性はMS-PS-AMO-122 > M-PS-AMO-122であった (Fig. 5)。さらに、血中chol量は最終投与6日後で53%低下し (Fig. 6) その効果は2週間以上持続した。また、この投与量では肝毒性は全く示さなかった。この時、投与した約80%のMS-PS-AMO-122は肝臓中に取り込まれ、実質細胞:非実質細胞の比はほぼ1:1であった。従って、Table 1に示した値と比較すると肝臓への取込量は圧倒的に改善されていることが明確に示された。本研究では、一本鎖核酸も組織標的化により低投与量で高効率に肝臓に送達できることを示した。今後、実質細胞への取込を改善することによって更に臨床応用に近づくことができる。

(2)エピジェネティクスは、CpG配列のC5位メチル化やヒストンテイルを構成するアミノ酸側鎖のメチル化やアセチル化を中心とする化学修飾・脱化学修飾により転写調節をする、所謂、遺伝子配列によらない遺伝子発現調節機構である。上述の化学修飾・脱修飾の調節異常がガン化やガンの悪性化に関与しており、非選択的ではあるがCpGのメチル化阻害剤が骨髄異形性症候群治療薬として、また、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤も皮膚T細胞性リンパ腫治療薬として臨床使用されている。本研究では、CpGメチル化酵素 (DNMT) 選択的な阻害剤の開発とPSMA発現前立腺がん標的化を目指した。5MeCpGの5位メチル基は、TETにより5-CH<sub>2</sub>OH 5-CH=O 5-CO<sub>2</sub>H体へと酸化されることが知られている。それらの酸化体の幾つかがチミンDNAグリコシラーゼの基質になり塩基除去修復 (BER) 機構でシトシンに置換して脱メチル化が完成すると考えられているが、中間体の生理的な役割については不明な点が多い。我々は、DNMTの作用メカニズムの解析から活性部位のシステインSHは5-CH=O (f) シトシン体の6位へ付加してDNMTの選択的阻害剤になると考えた。fCpGを含むDNA二本鎖 (fCpG-dsDNA) は、予想通りバクテリアDNMTであるM. HpaIIとメチル基ドナーであるS-adenosylmethionine (SAM)の添加とは無関係にM. HpaII-fCpG-dsDNA複合体を形成し、CpGのメチル化を阻害した。また、ヒトリコンビナントDNMT1 (MW; 183kDa)とも同様に複合体を形成してメチル化を阻害した。そこで、Fig.

1に示したfCpG-dmDNAおよび、PSMAリガンドを結合したGL-fCpG-dmDNAについてPSMA発現細胞（LNCaP前立腺ガン細胞）と非発現細胞（PC-3前立腺ガン細胞、HeLa子宮頸ガン細胞）を用いて細胞増殖抑制効果を調べた。HeLa細胞に対して、fCpGを含む二本鎖DNA、fCpG-dmDNA (DNMT1配列)、fCpG-dmDNA (DNMT3配列)をトランスフェクション試薬lipofectamin 2000と混合して加え、72時間培養後のIC<sub>50</sub>値は、夫々66, 41, 18 nMと計算された (Fig. 7)。DNMT1およびDNMT3選択的配列はFig. 1に示した。対応するdmDNAを蛍光ラベルしてHeLa細胞抽出液にこれらを加えて酵素複合体を検出しよう

Fig. 7. Cell growth inhibitory activity

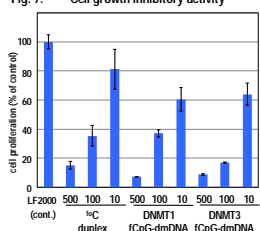
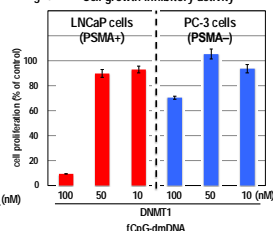


Fig. 8. Cell growth inhibitory activity



としたが、DNMT1の分子量に対応するバンド（183kDa）は検出されたが、DNMT3に対応するバンド（100kDa）は検出されなかったため、これ以降の実験はDNMT1配列を用いて行った。次に、PSMA発現、非発現前立腺ガン細胞を用いて細胞増殖抑制活性を調べた（この実験ではトランスフェクション試薬は使用していない）。結果をFig. 8に示したが、DL-fCpG-dmDNAはLNCaP細胞に対しては100 nMで約90%の増殖抑制活性を示したが、PC-3細胞に対しては約30%の抑制活性しか示さなかった。この結果は、トランスフェクション試薬を用いなくともGLがPSMAと結合して細胞内に内在化していることを示しているが、今後、in vivo試験を行うためにはエンドソーム脱出や核移行性の向上を計る必要がある。一方、STAT3に対するDLを結合したsiRNAの効果も上記の場合とほぼ同様の傾向を示したが更なる検討が必要である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 34 件) すべて査読有

- Hatakeyama, H.; Murata, M.; Sato, Y.; Takahashi, M.; Minakawa, N.; Matsuda, A.; Harashima, H. The systemic administration of an anti-miRNA oligonucleotide encapsulated pH-sensitive liposome results in reduced level of hepatic microRNA-122 in mice. *J. Control. Release* **2014**, *173*, 43-50. (DOI, 10.1016/j.jconrel.2013.10.023)
- Nomura, Y.; Kashiwagi, S.; Sato, K.; Matsuda, A. Selective transcription of an unnatural naphthyridine:imidazopyrimidine base pair containing four hydrogen bonds by using T7 RNA polymerase. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, *53*, 12844-12848. (DOI, 10.1002/anie.201406402)
- Saito, Y.; Hashimoto, Y.; Arai, M.; Tarashima, N.; Miyazawa, T.; Miki, K.; Takahashi, M.; Furukawa, K.; Yamazaki, N.; Matsuda, A.; Ishida, T.; Minakawa, N. Chemistry, properties, and *in vitro* and *in vivo* applications of 2'-O-methoxyethyl-4'-thioRNA, a novel hybrid type of chemically-modified RNA. *ChemBioChem* **2014**, *15*, 2535-2540. (DOI, 10.1002/cbic.201402398)
- Tarashima, N.; Hayashi, K.; Terasaki, M.; Taniike, H.; Inagaki, Y.; Hirose, K.; Furukawa, K.; Matsuda, A.; Minakawa, N. First synthesis of fully-modified 4'-selenoRNA and 2'-OMe-4'-selenoRNA based on the mechanistic considerations of an unexpected strand-break. *Org. Lett.* **2014**, *16*, 4710-4713. (DOI, 10.1021/ol502077h)
- Maruyama, H.; Nakashima, Y.; Shuto, S.; Matsuda, A.; Itoh, Y.; Abe, H. An intracellular buildup reaction of active siRNA species from short RNA fragments. *Chem. Commun.* **2014**, *50*, 1284-1287. (DOI, 10.1039/c3cc47529h)
- Takahashi, M.; Yamada, N.; Hatakeyama, H.; Murata, M.; Sato, Y.; Minakawa, N.; Harashima, H.; Matsuda, A. *In vitro* optimization of 2'-OMe-4'-thioribonucleoside modified anti-microRNA oligonucleotides (AMOs) and its targeting delivery to mouse liver using a liposomal nanoparticle. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, 10659-10667. (DOI, 10.1093/nar/gkt823)
- Abe, N.; Hiroshima, M.; Maruyama, H.; Nakashima, Y.; Nakano, Y.; Matsuda, A.; Sako, Y.; Ito, Y.; Abe, H. Rolling circle amplification in a prokaryotic translation system using small circular RNA. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52*, 7004-7008. (DOI, 10.1002/anie.201302044)
- Kojima, T.; Furukawa, K.; Maruyama, H.; Inoue, N.; Tarashima, N.; Matsuda, A.; Minakawa, N. PCR amplification of 4'-thioDNA using 2'-deoxy-4'-thionucleoside 5'-triphosphates. *ACS Synthetic Biol.* **2013**, *2*, 529-536. (DOI, 10.1021/sb400074w)
- Ichikawa, S.; Ueno, H.; Sunadome, T.; Sato, K.; Matsuda, A. Tris(azidoethyl)amine hydrochloride; a versatile reagent for synthesis of functionalized dumbbell oligonucleotides. *Org. Lett.* **2013**, *15*, 694-697. (DOI, 10.1021/ol400001w)
- Takahashi, M.; Nagai, C.; Hatakeyama, H.; Minakawa, N.; Harashima, H.; Matsuda, A. Intracellular stability of 2'-OMe-4'-thioribonucleoside modified siRNA leads to long-term RNAi effect. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 5787-5793. (DOI, 10.1093/nar/gks204)
- Shibata, A.; Ueno, Y.; Iwata, M.; Wakita, H.; Matsuda, A.; Kitade, Y. Double-stranded oligonucleotides containing 5-aminomethyl-2'-deoxyuridine form thermostable anti-parallel

- triplexes with single-stranded DNA or RNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 2681-2683. (DOI, 10.1016/j.bmcl.2012.03.024)
- 12) Sato, K.; Sasaki, A.; Matsuda, A. Highly fluorescent 5-(5,6-dimethoxybenzothiazol-2-yl)-2'-deoxyuridine 5'-triphosphate as an efficient substrate for DNA polymerases. *ChemBioChem* **2011**, *12*, 2341-2346. (DOI, 10.1002/cbic.201100452)
- 13) Hirose, W.; Sato, K.; Matsuda, A. Fluorescence properties of 5-(5,6-dimethoxybenzothiazol-2-yl)-2'-deoxyuridine (<sup>h</sup>dU) and oligodeoxyribonucleotides containing <sup>h</sup>dU. *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 6206-6217. (DOI, 10.1002/ejoc.201100818)
- 14) Kuramoto, K.; Tarashima, N.; Hiram, Y.; Kikuchi, Y.; Minakawa, N.; Matsuda, A. New imidazopyridopyrimidine:naphthyridine base-pairing motif, ImN<sup>N</sup>:NaO<sup>o</sup>, consisting of a DAAD:ADDA hydrogen bonding pattern, markedly stabilize DNA duplexes. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 10818-10820. (DOI, 10.1039/c1cc13805g)
- 15) Kataoka, M.; Kouda, Y.; Sato, K.; Minakawa, N.; Matsuda, A. Highly efficient enzymatic synthesis of 3'-deoxyapionucleic acid (apioNA) having the four natural nucleobases. *Chem. Commun.* **2011**, 47, 8700-8702. (DOI, 10.1039/c1cc12980e)
- 16) Furuita, K.; Murata, S.; Jee, G.-J.; Ichikawa, S.; Matsuda, A.; Kojima, C. Structural feature of bent DNA recognized by HMGB1. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5788-5790. (DOI, 10.1021/ja2013399)

〔学会発表〕(計 31 件)

- 1) 松田 彰、核酸医薬の組織標的化、抗体医薬・核酸医薬開発コンソーシアムシンポジウム、2015 年 1 月 30 日、コクヨホール、東京
- 2) 松田 彰、核酸医薬の組織標的化、アンチセンス DNA/RNA 研究会特別シンポジウム、2014 年 9 月 7 日、東京ガーデンパレス、東京
- 3) 松田 彰、バイオ創薬のススメ、理研シンポジウム・第 9 回有機合成化学のフロンティア、2014 年 6 月 27 日、理研鈴木ホール、和光
- 4) 松田 彰、バイオ創薬のススメ、第 32 回白金シンポジウム-創薬研究の最前線、2014 年 2 月 5 日、北里大学薬学部、東京
- 5) 松田 彰、バイオ創薬のすすめ、第 3 回 CSJ フェスタ 2013(創薬化学-こうやってクスリは創られる)、2013 年 10 月 23 日、タワーホール船堀、東京
- 6) 松田 彰、バイオ創薬のすすめ、創薬懇話会 2013 in Sapporo、2013 年 7 月 5 日、定山溪ビューホテル、札幌
- 7) Akira Matsuda, Development of sugar-modified cytosine nucleosides as antitumor agents-old stories for future success-, The 20<sup>th</sup> International Round Table for Nucleosides, Nucleotides, & Nucleic Acids, August 8, 2012, Montreal, Canada

〔図書〕(計 4 件)

- 1) Minakawa, N.; Matsuda, A. Design, characterization, and application of imidazopyridopyrimidine: naphthyridine base-pairing motifs consisting of four hydrogen bonds. In *Chemical Biology of Nucleic Acids*, RNA Technologies, Eds. by V. A. Erdman, W. T. Markiewicz & J. Barciszewski, Springer Heidelberg New York Dordrecht London, pp113-129, (total 599 pages), 2014.
- 2) 松田 彰、次世代がん戦略研究 update がん基盤生物学-革新的シーズ育成に向けて-、IV. がんエピゲノム異常を標的とした治療・診断法の開発. 6. エピジェネティクス異常を標的とする新規抗がん剤の開発、pp241-247, (総ページ 375) 南山堂 (2013)
- 3) 松田 彰、核酸創薬: CSJ カレントレビュー 06, 核酸化学のニュートレンド, pp166-172, (総ページ 218) 南山堂化学同人 (2011)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

- 1) 名称: オリゴヌクレオチド誘導体、オリゴヌクレオチド誘導体を含む治療用医薬組成物及び診断用医薬組成物、並びに miRNA 機能抑制用オリゴヌクレオチド誘導体  
発明者: 松田彰, 高橋真由美  
権利者: 北海道大学  
種類: 特許  
番号: 特願 2011-125734 / PCT/JP2012/064276  
出願年月日: 平成 23 年 6 月 3 日 / 平成 24 年 6 月 1 日  
国内外の別: 国際

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
松田 彰 (MATSUDA Akira)  
北海道大学・大学院薬学研究院・特任教授  
(名誉教授)  
研究者番号: 90157313
- (2) 連携研究者  
佐藤 浩輔 (SATO Kosuke)  
北海道大学・大学院薬学研究院・助教  
研究者番号: 70415686
- (3) 連携研究者  
佐藤 悠介 (SATO Yusuke)  
北海道大学・大学院薬学研究院・特任助教  
研究者番号: 10735624