

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460144

研究課題名(和文)次世代核酸医薬の開発を志向した三重鎖形成核酸創製基盤の構築

研究課題名(英文)Scientific research on triplex-forming oligonucleotides aiming at to develop next-generation of medicines

研究代表者

兒玉 哲也(Kodama, Tetsuya)

名古屋大学・創薬科学研究科・准教授

研究者番号：00432443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：核酸糖部の立体配座と核酸塩基の回転角を精密に制御した人工ヌクレオシドの合成とそのオリゴ核酸中での性質を評価することにより、アンチジーン法をはじめとした新たな核酸創薬の基盤構築を目指した。本研究では、04'エンド構造またはC3'エンド構造の糖部立体配座をもつ新しいヌクレオシドを合成し、その三重鎖核酸安定性を評価したところ、これまで高次構造を不安定化すると考えられていた2'-5'連結型のC3'エンド型人工核酸が安定に三重鎖を形成できることを明らかにした。さらに、これら人工核酸やLNA類との構造比較により、核酸塩基の回転角が高次構造の安定性を決める大きな要因になっていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We aimed to build a foundation for the next-generation of oligonucleotides drug including antigene technology by means of syntheses and evaluations of conformationally-restricted nucleosides. In this study, first, we synthesized novel nucleosides having a C4'-endo type sugar moiety or C3'-endo type one. As a result of evaluating the triple-stranded oligonucleotides' stability, it was revealed that 2'-5' linked nucleic acid restricted to a C3'-endo conformation, which was believed to destabilize the higher-order structure so far, can stably form a triplex did. Moreover, we clarified that the rotation angle around the glycosidic bond is a major factor determining the stability of the higher order structure by comparing the structure details of these artificial oligonucleotides with LNAs.

研究分野：ヌクレオシドの設計と合成、さらにそのオリゴ核酸中での機能性評価を基盤とした創薬化学

キーワード：人工核酸 構造制御 核酸化学 有機合成化学 ヌクレオシド 創薬化学

1. 研究開始当初の背景

低分子化合物を基盤としたこれまでの創薬研究を補う新たな創薬手法として、バイオ医薬に代表される高分子医薬の開発が急速に進められている。そのひとつである核酸医薬は、標的 RNA の働きを特異的に抑制することで疾病の原因となるタンパク質の発現を制御するものと、抗体のように標的分子を捕獲するものと大きく分類できるが、いずれも次世代医薬としての期待は高く、いくつもの医薬候補品が臨床試験中にある。核酸医薬に適用しようとする核酸の多くは天然には存在しない人工核酸が用いられるため、化学基盤の創薬としての要素が大きい。申請者はこれまで、有機化学を基盤とした核酸素材の設計と合成、そしてその核酸素材を用いた核酸検出技術や遺伝子発現調節技術の開発に従事し、なかでも、構造の揺らぎを抑制した架橋型人工核酸(2',4'-BNA/LNA)類の高い有用性を示してきた。生物学的安定性に優れ、相補的な RNA との結合親和性が極めて高い 2',4'-BNA/LNA は、分子生物学のツールとして広く利用され、海外では核酸医薬品としての臨床試験も進められている。一方、一本鎖 RNA 以外の核酸、例えば二重鎖 DNA を標的とした核酸医薬(三重鎖形成アンチジーン核酸)を開発するために必要な人工核酸についての情報は極めて少ない。特に、核酸の基本構造を特徴付ける糖部構造の研究は数例にとどまっている。

2. 研究の目的

報告例が少ない二重鎖核酸と強く結合する人工核酸を開発するための分子設計基盤を築くことを目的とし、これまでに申請者が構築してきた核酸糖部構造や核酸塩基回転角の制御法を三重鎖核酸等の核酸高次構造の制御法へと展開することで、三重鎖形成核酸設計に求められる構造特性を明らかにする。本計画では、糖部立体配座(パッキング)や塩基の回転角が異なる人工核酸モノマー(ヌクレオシド)を数種類合成すること、そのヌクレオシドを導入したオリゴ核酸が形成する三重鎖構造などの高次構造の熱的安定性を系統的に明らかとする事、そしてそれらオリゴ核酸の構造特性を精査することの3点が最重要である。従って、これら項目を着実に推進することで医薬品素材に資する人工核酸の創製に繋げるが、新たな医薬品素材としての価値を見いだすことを重視し、すでに世界中で研究が進められている人工核酸モノマーとは基本骨格が異なる人工核酸モノマーを設計・合成することを鍵とする。本研究では、糖部と塩基部との間に共有結合を配することで糖部立体配座と核酸塩基の回転を同時に制御する設計コンセプトを新たに導入し、DNA との三重鎖形成に重要な核酸構造因子を精査すべく人工核酸を創出する。さらに、人工核酸の構造解析について精査し、糖部立体配座と核酸塩基の回転角が

核酸高次構造に与える影響を明確にする。

3. 研究の方法

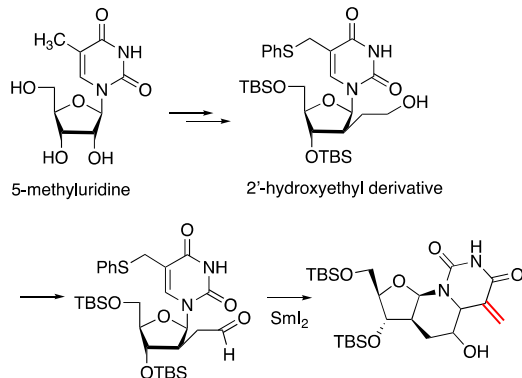
本研究では、核酸塩基の回転と糖部立体配座を同時に制御した人工ヌクレオシドを化学合成し、それが核酸高次構造の熱的安定性に与える影響を精査・比較することで、核酸創薬に資する素材創出に貢献する。核酸塩基の回転は糖部と塩基部を共有結合で架橋する事で、また、糖部立体配座は導入する架橋構造と糖部構造との間に生じる立体反発を利用することで同時に制御する。効率的な合成を実施するため安価なグルコースまたは天然ヌクレオシドを出発原料とする。合成する人工ヌクレオシドを導入したオリゴ核酸の熱的安定性と構造特性の関連は、核酸高次構造の崩壊(融解)に伴う紫外部モル吸光係数の変化や円二色性の変化を測定・解析することで総合的に議論する。

4. 研究成果

核酸糖部の立体配座と核酸塩基の回転角を精密に制御した人工ヌクレオシドの合成とそのオリゴ核酸中での性質を評価することにより、アンチジーン法をはじめとした新たな核酸創薬の基盤構築を目指した。本研究では、DNA 中で広く見られる立体配座である O4'エンド構造または C3'エンド構造の糖部立体配座をもつ新しいヌクレオシドを合成し、その基本的な化学安定性を精査するとともに、オリゴ核酸経の導入の検討、さらにそのアンチジーン法に繋がる基本的性質を評価した。

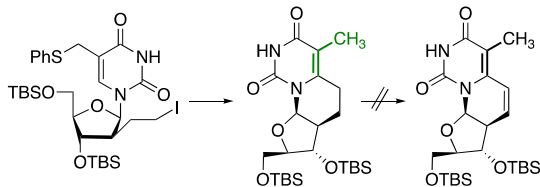
(1) O4'エンド型ヌクレオシドは、5メチルウリジンを出発原料とし、糖部 2'位と塩基部 6位との間をラジカル反応によって架橋する合成法を検討した。

「ビニル基で(エテノ)架橋したヌクレオシドの合成検討」5メチルウリジンの 3'位と 5'位とを選択的に TBDSM 基にて保護したのち、IBX を作用させることで 2'ケトン体とした。続いて、Wittig 反応により C2 増炭して得られた α,β 不飽和エステルを水素化ホウ素ナトリウムと DIBAL にて処理し、中程度の収率で 2'ヒドロキシエチル体へと誘導した。その後、低収率ながらチミン 5 位メチル基をフェニルスルフィド化し、再び IBX で処理す



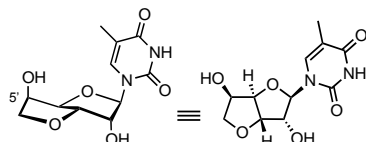
ることで第1級アルコール部位をアルデヒドへと誘導した。続いて、架橋構築のため、ヨウ化サマリウムを用いた分子内ラジカル環化反応条件を種々検討した結果、大過剰のHMPA存在下にヨウ化サマリウムで処理すると、架橋形成(ラジカル環化反応)が進行し、チミン塩基部にエキソメチレン構造をもつ化合物へと低収率ながら誘導できることがわかった。目的の内部オレフィンへの異性化を検討したが、効率的な経路を見いだすことができなかったため、この合成を断念した。

「エタノ架橋したヌクレオシドの合成検討」で合成した中間体をヨウ素化した後、水素化トリブチルスズを還元剤としたラジカル環化反応に伏したところ、40%程度の収率で目的のエタノ架橋されたチミジン誘導体を得ることに成功した。この時、のラジカル環化反応の検討で得られた化合物に類似のチミン塩基部にエキソメチレン構造をもつ化合物も同程度で得られたため、反応条件を検討したが収率の改善はできなかった。なお、得られたエタノ架橋体の脱水素反応によるエテノ架橋体への誘導を検討したが目的物は得られなかった。収率に改善の余地はあるものの、目的の化合物の合成経路を見いだすことができたため、この経路を利用してO4'エンド型のエテノ架橋したヌクレオシドを約200mg合成することに成功した。



(2)C3'エンド型ヌクレオシドとしては、3'位と5'位とをオキサエタノトランス架橋した化合物を設計し、以下のように合成した。なお、このC3'エンド型ヌクレオシドを用いて核酸合成をする場合は、2'-5'結合型核酸となる。このまず、イソプロピリデン-D-グルコースを出発原料とし、8行程を経てアロフラノシルチミン保護体へと誘導した。続いて、2'位と3'位のヒドロキシル基の保護基をイソプロピリデン基へと掛け換えたのち、第一級アルコール部位を脱離基へと変換、次いでイソプロピリデン基を除去した。得られたジオールをHMPA存在下にLHMDSを作用させると、分子内求核置換反応が進行して架橋形成に成功した。さらに、接触水素添加により5'位のベンジル基を除去して、目的のオキサエタノトランス架橋によるC3'エンド型ヌクレオシドの合成を達成した。この合成経路に従って合成したヌクレオシドのホスホロアミダイト体を約600mgで合成した。ヌクレオシドの構造

はNMRとX線結晶構造解析などに



よって詳細に解析し、設計通りの極めて剛直な三次元立体化学構造を確認した。このテトラヒドロフラン構造でトランス縮環した基本骨格はこれまでに報告がなく、基礎化学としてもまた興味深い。

(3)続いて、アンチジーン法を志向した性質解析を行なった。

「オリゴヌクレオチドへの各ヌクレオシドの導入」エタノ架橋したヌクレオシドは、定法に従ってオリゴDNA中に導入した。まず、15塩基長のピリミジンDNAを1ヶ所、2ヶ所、3ヶ所、または11ヶ所のエタノ架橋ヌクレオシドで修飾した。一方で、オキサエタノトランス架橋したチミジンは酸性下で容易に分解することが明らかとなり、定法の核酸合成法を用いるとトランス縮環したテトラヒドロフラン構造の分解が原因で目的のオリゴ核酸を合成する事ができなかった。種々検討した結果、酸性水溶液を使う操作を経ない方法を選択すれば低収率ながら合成が可能であることを見出した。なお、さらに効率的な合成法を検討したが、DNA合成機の故障により使用できなくなったため、それ以上の検討はできなかった。

「三重鎖安定性の評価」三重鎖形成能を三重鎖核酸の50%融解温度で評価した。その結果、オリゴDNAをエタノ架橋したO4'エンド型ヌクレオシドで修飾すると、一修飾あたり9□程度の融解温度の低下が観察され、この糖部構造をもつ人工核酸は三重鎖形成核酸としては不向きである事がわかった。一方で、オキサエタノトランス架橋したC3'エンド型ヌクレオシドで修飾した場合、その50%融解温度はDNA三重鎖のものとはほぼ同じであった。このオキサエタノトランス架橋したC3'エンド型ヌクレオシドは通常のDNAなどに見られる3'-5'結合型核酸とは異なり、2'-5'結合型核酸である。これまでの他の研究者による報告では、C3'エンド型の2'-5'結合型核酸による修飾は核酸の高次構造を大きく不安定する事が報告されていたが、本ヌクレオシドによる修飾では不安定化は確認されなかった。既報のヌクレオシドは適切な構造制御が達成できていなかったことが示唆されており、今回我々の研究で合成したヌクレオシドのように適切にC3'エンド型に固定する事ができれば、既報の説とは異なり、少なくともその高次構造の安定性は低下しない事がわかった。

「二重鎖安定性の評価」合成したヌクレオシド類のアンチジーン法以外へ適用について考察するため、相補的なRNA配列との二重鎖形成能を二重鎖核酸の50%融解温度で評価した。その結果、いずれのヌクレオシドの場合も、三重鎖核酸形成能と同じような傾向を示した。すなわち、エタノ架橋したO4'エンド型ヌクレオシドでの修飾では一修飾あたり8□程度の融解温度の低下が観察され、オキサエタノトランス架橋によりC3'エンド

型に固定した 2'-5'結合型核酸による修飾は天然核酸と同程度の二重鎖安定性を示した。これらのヌクレオシドの核酸塩基の回転角は、それぞれハイアンチとアンチを取っており、この塩基の回転角が少なからず RNA との親和性に影響している。塩基部周りの回転角が二重鎖形成に影響することはこれまでに我々は明らかにして来たが、RNA との高い親和性を示す LNA においても塩基部周りの回転角が RNA との二重鎖安定性に大きく影響することを明確にした。すなわち、二重鎖形成時に塩基部周りの回転角がハイアンチにあるものは RNA との二重鎖形成時エンタルピー上で不利になる。今回合成した 2 種類のヌクレオシドについてもこの現象は当てはまっており、普遍的な現象である事を改めて示す事ができた。

「その他の性質」

エタノ架橋した O4'エンド型ヌクレオシド修飾したオリゴヌクレオチドの 3'-5'エキソヌクレアーゼによる分解特性を評価した。その結果、LNA が 20 分で全て切り出される条件下、本化合物はほぼ切り出されることはなかった。一方、本化合物の 3'側の塩基の切り出しは LNA 修飾よりも早く、修飾方法によってオリゴヌクレオチドの酵素耐性を制御できることを示した。続いて、オキサエタノトランス架橋により C3'エンド型に固定した 2'-5'結合型核酸の物性を調べた。興味深いことに、ヌクレオシドレベルでは酸性条件下で分解性を示したオキサエタノトランス架橋した骨格がオリゴ核酸中では安定であり、エンドソーム内よりも酸性と考えられる水溶液 (pH 4) 中でも少なくとも 1 時間は分解が認められず、細胞への適用が可能であることを確認した。

今回合成した O4'エンド構造をもつオリゴ核酸は、アンチジーン法への適用は難しいと考えられるものの、C3'エンド構造をもつオリゴ核酸の性質は十分にこれを期待でき、引き続きこの類縁化合物の開発がこの研究領域の理解に役立つことを示すことができた。

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 1 件)

Takashi Hara, Tetsuya Kodama, Yumi Takegaki, Kunihiko Morihiko, Kosuke Ramon Ito, Satoshi Obika, Synthesis and Properties of 7-Deazapurine and 8-Aza-7-deazapurine-Locked Nucleic Acid Analogues: Effect of the Glycosidic Torsion Angle, The Journal of Organic Chemistry, 査読あり, Vol. 82, 2017, pp.25-36, DOI:10.1021/acs.joc.6b02525

〔学会発表〕(計 8 件)

牧野亜衣、廣明秀一、兒玉哲也、二面角ガンマを固定した 2'-5'連結型核酸分子含有オリゴ核酸の合成とその二重鎖、三重鎖核酸の安定性、日本核酸医薬学会第 2 回年会、名古屋大学—ラクオリア創薬シンポジウム、2016 年 11 月 15 日—2016 年 11 月 17 日、東京理科大学(東京・葛飾区)

兒玉哲也、オリゴ核酸の創薬研究:化学者の立場からみる問題点とその解決に向けた試み、第 2 回名古屋大学—ラクオリア創薬シンポジウム、2016 年 1 月 26 日、名古屋大学(愛知・名古屋)

Ai Makino, Hidekazu Hiroaki, Tetsuya Kodama, Synthetic study of 2',5'-linked oligonucleotides containing the dihedral-angle- γ -locked ribosyl thymine, The 42nd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2015 年 9 月 23 日-2015 年 9 月 25 日、イーグレ姫路(兵庫・姫路) 百相義大、武田修一、松本友治、廣明秀一、小比賀聡、兒玉哲也、架橋型シクロヘキセニル核酸の機能性評価及び構造解析、第 135 回日本薬学会、2015 年 3 月 26 日-2015 年 3 月 28 日、神戸学院大学(兵庫・神戸) 牧野亜衣、廣明秀一、兒玉哲也、3',5'位間に架橋構造を導入した 2'-5'結合人工核酸の合成研究、第 135 回日本薬学会、2015 年 3 月 26 日-2015 年 3 月 28 日、神戸学院大学(兵庫・神戸)

守屋彩子、廣明秀一、兒玉哲也、6,2'-エタノ架橋型チミジンの合成とその特性評価、第 135 回日本薬学会、2015 年 3 月 26 日-2015 年 3 月 28 日、神戸学院大学(兵庫・神戸)

兒玉哲也、守屋彩子、廣明秀一、核酸塩基の回転を制限したチミジン誘導体の合成研究、第 44 回複素環化学討論会、2014 年 9 月 10 日-2014 年 9 月 12 日、札幌市民ホール(北海道・札幌)

百相義大、武田修一、松本友治、廣明秀一、小比賀聡、兒玉哲也、3H2 型シクロヘキセニル核酸の設計と合成、及び機能性評価、第 60 回日本薬学会東海支部大会、2014 年 7 月 5 日、鈴鹿医療大学(三重・鈴鹿)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

兒玉 哲也 (KODAMA, Tetsuya)
名古屋大学・大学院創薬科学研究科・准教授
研究者番号: 0 0 4 3 2 4 4 3

(4) 研究協力者

牧野 亜衣 (MAKINO, Ai)
原 孝志 (HARA, Takashi)
近田 達也 (KONDA, Tatsuya)