

令和元年6月18日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H03839

研究課題名(和文) 高活性アンチセンス核酸の分子選択とリン原子絶対立体配置の最適化

研究課題名(英文) Molecule selection and optimization of highly active antisense DNA and determination of absolute configuration of phosphorus atoms

研究代表者

和田 猛 (WADA, TAKESHI)

東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・教授

研究者番号：90240548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：核酸医薬の本体であるオリゴヌクレオチドには、生体内における安定性を高めるために、リン原子に硫黄原子が導入されたホスホロチオエート核酸が汎用されている。しかし、それらは不斉リン原子に基づく多くの立体異性体の混合物である。本研究では、多くの立体異性体の中から、最も生体内で安定であり、かつ薬理活性も高い分子を選択し、リン原子の絶対立体配置を決定する手法の基本原理を確立した。今後、この手法をさらに改良することにより、生体内で医薬として最も有効に働く分子を選択し、そのリン原子の絶対立体配置を決定する技術の確立につながることを期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、抗体医薬に続く次世代医薬として、核酸医薬の実用化に大きな期待が寄せられている。数千から数百万立体異性体の混合物である核酸医薬の中から、最も生体内で安定であり、かつ薬理活性も高い分子を選択する手法の基本原理を確立した。本技術がさらに改良されれば、核酸医薬の飛躍的な活性の向上に伴う投薬量の軽減、生産コストの削減、患者の肉体的、経済的負担の軽減、核酸医薬の安全性や品質管理の改善が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Phosphorothioate nucleic acids in which sulfur atoms are introduced to internucleotidic phosphodiester linkages are widely used as nucleic acid drugs in order to enhance the stability in vivo. However, they are a mixture of numerous stereoisomers based on the chiral phosphorus atoms. In this study, we selected the molecule that is most stable in vivo and high in pharmacological activity among many stereoisomers, and established the basic principle of the method for determining the absolute configuration of the phosphorus atoms. Further improvement of this method can be expected to lead to establishment of a technique for selecting a molecule that works most effectively as a drug in vivo and determining the absolute configuration of its phosphorus atoms.

研究分野：有機合成化学

キーワード：核酸医薬 アンチセンス核酸 ホスホロチオエート核酸 立体制御 分子選択 不斉合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在、抗体医薬に続く次世代医薬として、核酸医薬の実用化に大きな期待が寄せられている。核酸医薬の本体であるオリゴヌクレオチドには、生体内における安定性を高めるために、リン原子に硫黄原子が導入されたホスホロチオエート核酸が汎用されているが、それらは不斉リン原子に基づく数千～数百万立体異性体の混合物である。我々は、世界に先駆けてホスホロチオエート核酸の立体選択的合成に成功した。しかしながら、多くの立体異性体の中で、最も生体内で安定であり、かつ薬理活性も高い分子を多くの立体異性体の混合物の中から選択する手法は存在しなかった。本研究によって、生体内で最も有効に働く核酸医薬の分子選択とリン原子の絶対立体配置の決定法が確立されれば、リン原子修飾核酸医薬創製の車の両輪である構造決定手法と立体選択的合成手法がそろえることになり、他の追随を許さない、核酸医薬の分野における革新的なプラットフォーム技術を確立できると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、立体異性体の混合物として存在するホスホロチオエートアンチセンス DNA 分子群の中で、生体内で医薬として最も有効に働く分子を選択し、そのリン原子の絶対立体配置を決定する手法を確立し、得られた立体化学情報に基づき、個々のインターヌクレオチド結合に最適なリン原子の絶対立体配置を有する高活性なホスホロチオエートアンチセンス DNA を独自の核酸分子合成手法を用いて創製することである。

3. 研究の方法

安定同位体標識ヌクレオチドを立体異性体のマーカーとして導入したアンチセンス DNA を合成し、アンチセンス核酸として重要な種々の性質（標的親和性、血中安定性、細胞膜透過性）に関して、最も優れた分子を選択し、精密質量分析によりホスホロチオエートリン原子の絶対立体配置を決定する。さらに、マウスを用いて、生体内で最も有効に働くアンチセンス分子を選択し、ホスホロチオエートリン原子の絶対立体配置を決定する。

4. 研究成果

まず、立体制御ホスホロチオエート結合導入のための立体化学的に純粋な安定同位体標識/非標識オキサザホスホリジンモノマーの合成に成功した。2量体を固相合成することにより、安定同位体標識/非標識オキサザホスホリジンモノマーの反応性を比較し、オリゴマーの合成条件を確立した。これらと、立体非制御ホスホロチオエート結合導入のための標準的なホスホロアミダイトモノマーを用い、確立したオリゴマーの固相合成反応条件を適用し、アンチセンス DNA (13量体) の合成を行った。合成した立体制御/非制御ホスホロチオエート結合を含むアンチセンス DNA の相補的 RNA との結合親和性、ヌクレアーゼ耐性など、種々の性質を調査した。それぞれの調査項目に対して、アンチセンス核酸として優れた性質を有するオリゴマーを単離し、質量分析を行うことにより安定同位体標識が導入されたヌクレオチドの 3'-位に結合するホスホロチオエートジエステル結合の立体化学を同定することに成功した。このことにより、当初計画していた本研究のコンセプトが有効であることを証明することができた。今後、この手法をさらに改良することにより、多くの立体異性体の混合物として存在するホスホロチオエートアンチセンス DNA から、生体内で医薬として最も有効に働く分子を選択し、そのリン原子の絶対立体配置を決定する技術の確立につながることを期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 20 件)

和田猛、リン原子の立体化学を制御した核酸医薬の開発、Medical Science Digest、45巻、67-71、2019。(査読無)

和田猛、リン原子の立体化学を厳密に制御したリン原子修飾核酸医薬の開発、医薬ジャーナル、55巻、75-81、2019。(査読無)

Yusuke Maeda, Rintaro Iwata Hara, Kazutaka Nishina, Kie Yoshida-Tanaka, Taiichi Sakamoto, Takanori Yokota, Takeshi Wada, Artificial cationic peptides that increase nuclease resistance of siRNA without disturbing RNAi activity, Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids, 38, 2018. (査読有)

DOI: 10.1080/15257770.2018.1543890

Yohei Nukaga, Takeshi Wada, Chemical Synthesis of Boranophosphate Deoxy-ribonucleotides, Synthesis of Therapeutic Oligonucleotides, 271-284, 2018. (査読有)

DOI: 10.1007/978-981-13-1912-9_16

原倫太郎、和田猛、核酸医薬の安定化と高活性化を実現する新規分子技術、日本認知症学会誌、32巻、4号、597-606、2018年。(査読有)

Rintaro Iwata Hara, Yusuke Maeda, Haruna Fujimaki, Takeshi Wada, Enhancement in RNase H activity of a DNA/RNA hybrid duplex using artificial cationic oligopeptides, Chemical Communications, 54, pp5826-5829, 2018. (査読有)

DOI: 10.1039/c8cc04082f

Rintaro Iwata Hara, Yuki Hisada, Yusuke Maeda, Takanori Yokota, Takeshi Wada, Artificial cationic oligosaccharides for heteroduplex oligonucleotide-type drugs, *Scientific Reports*, 8, 4323, 2018. (査読有)
DOI: 10.1038/s41598-018-22161-8

Rintaro Iwata Hara, Aya Yaoita, Katsuya Takeda, Hiroaki Ueki, Ayumu Ishii, Hideyuki Imoto, Satoshi Kobayashi, Michi Sano, Mihoko Noro, Kazuki Sato, Takeshi Wada, Solid-Phase Synthesis of Fluorinated Analogues of Glycosyl 1-Phosphate Repeating Structures from *Leishmania* using the Phosphoramidite Method, *ChemistryOpen*, 7, pp.439-446, 2018. (査読有)
DOI: 10.1002/open.201800030

Rintaro Iwata Hara, Yuta Mitsunashi, Keita Saito, Yusuke Maeda, Takeshi Wada, Solid-Phase Synthesis of Oligopeptides Containing Sterically Hindered Amino Acids on Nonswellable Resin Using 3-Nitro-1,2,4-triazol-1-yl-tris(pyrrolidin-1-yl) phosphonium Hexafluorophosphate (PyNTP) as the Condensing Reagent, *ACS Combinatorial Science*, 20, 132-136, 2018. (査読有)
DOI: 10.1021/acscombsci.7b00184

Rintaro Iwata Hara, Masayuki Kageyama, Koichiro Arai, Naoki Uchiyama, Takeshi Wada, Synthesis of 2'-O-monohaloethoxymethyl-modified RNAs and their duplex formation ability, *RSC Advances*, 7, 41297-41303, 2017. (査読有)
DOI: 10.1039/c7ra07767j

Rintaro Iwata Hara, Satoshi Kobayashi, Mihoko Noro, Kazuki Sato, Takeshi Wada, Synthesis and properties of 2-deoxy-2-fluoromannosyl phosphate derivatives, *Tetrahedron*, 73, 4560-4565, 2017. (査読有)
DOI: 10.1016/j.tet.2017.06.015

Rintaro Iwata Hara, Yuki Ogawa, Mihoko Noro, Takeshi Wada, Stereocontrolled Synthesis of P-Modified N-Acetylmannosamine-1-phosphate Analogs, *Chemistry Letters*, 46, 1051-1053, 2017. (査読有)
DOI: 10.1246/cl.170349

Rintaro Iwata Hara, Yusuke Maeda, Taiichi Sakamoto, Takeshi Wada, Double-stranded RNA-binding artificial cationic oligosaccharides stabilizing siRNAs with a low N/P ratio, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 15, 1710-1717, 2017. (査読有)
DOI: 10.1039/C6OB02690G

Kazuki Sato, Takeshi Wada, One-pot conversion reactions of glycosyl boranophosphates into glycosyl phosphate derivatives via acyl phosphite intermediates, *Organic & Biomolecular Chemistry*, 14, 11092 - 11095, 2016. (査読有)
DOI: 10.1039/c6ob02309f

Yohei Nukaga, Natsuhisa Oka, Takeshi Wada, Stereocontrolled Solid-Phase Synthesis of Phosphate/ Phosphorothioate (PO/PS) Chimeric Oligodeoxyribonucleotides on an Automated Synthesizer Using an Oxazaphospholidine- Phosphoramidite Method, *Journal of Organic Chemistry*, 81, 2753 - 2762, 2016. (査読有)
DOI: 10.1021/acs.joc.5b02793

和田猛、核酸医薬への化学的アプローチ、*MEDCHEM NEWS*、26巻、1号、18-21、2016。(査読無)

岡夏央、和田猛、リン原子修飾オリゴ核酸の立体選択的合成、*有機合成化学協会誌*、74巻、1号、31-44、2016。(査読有)

Rintaro Iwata, Futoshi Nakayama, Sakie Hirochi, Kazuki Sato, Wenying Piao, Kazutaka Nishina, Takanori Yokota, Takeshi Wada, Synthesis and properties of vitamin E analog-conjugated neomycin for delivery of RNAi drugs to liver cells, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25, 4, 815-819, 2015. (査読有)
DOI: 10.1016/j.bmcl.2014.12.079

Yohei Nukaga, Tetsuhiko Takemura, Naoki Iwamoto, Natsuhisa Oka, Takeshi Wada, Enhancement of affinity of 2'-O-Me-oligonucleotides for complementary RNA by incorporating a stereoregulated boranophosphate backbone, *RSC Advances*, 5, 2392 - 2395, 2015. (査読有)
DOI: 10.1039/c4ra11335g

Tomoko Nishina, Junna Numata, Kazutaka Nishina, Kie Yoshida-Tanaka, Keiko Nitta, Wenying Piao, Rintaro Iwata, Shingo Ito, Hiroya Kuwahara, Takeshi Wada, Hidehiro Mizusawa, Takanori Yokota, Chimeric Antisense Oligonucleotide Conjugated to -Tocopherol, *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 4, e220, 2015. (査読有)
DOI: 10.1038/mtna.2014.72

[学会発表](計29件)(総件数:98件)

浪岡優吉、五十嵐愛弓、原倫太郎、佐藤一樹、和田猛、ボラノホスフェートDNAを出発物

- 質としたリン原子修飾 DNA の固相合成、日本薬学会第 139 年会 (千葉)、2019 年。
半澤壯太、小暮智紀、斎藤竜也、額賀陽平、原倫太郎、佐藤一樹、和田猛、リン原子の立体化学が制御された PB/PS-キメラ DNA の合成、日本化学会第 99 春季年会、2019 年。
和田猛、核酸医薬への新しいアプローチ、“未来へのバイオ技術”勉強会「核酸医薬開発の動向と課題」、2019 年。
和田猛、核酸医薬への有機合成化学的アプローチ、平成 30 年度後期 (秋季) 有機合成化学講習会、2018 年。
Hiroki Imai, Tomohito Shuto, Rintaro Hara, Kazuki Sato, Takeshi Wada, Solid-phase synthesis of phosphate/boranophosphate (P0/PB) chimeric oligodeoxyribonucleotides by the H-boranophosphonate-Hphosphonate method, The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2018 (ISNAC2018), 2018.
Taku Suenaga, Yuta Mitsunashi, Yusuke Maeda, Rintaro Hara, Kazuki Sato, Takeshi Wada, Control of cleavage sites by RNase H using cationic oligopeptides, The 45th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2018 (ISNAC2018), 2018.
Takeshi Wada, Functional Control of Nucleic Acid Drugs Based on Strict Three-dimensional Structure Recognition, Asian 3 Roundtable on Nucleic Acids 2018 (A3RONA 2018), 2018.
和田猛、厳密な立体構造認識に基づく核酸医薬の機能制御、第 34 回創薬セミナー、2018 年。
和田猛、リン原子の立体化学を厳密に制御したリン原子修飾核酸医薬の開発、日本核酸医薬学会第 4 回年会、2018 年。
松田浩昌、伊藤弘暁、首藤智仁、植原渉、原倫太郎、和田猛、H-ボラノホスホネート法によるボラン修飾型 RNA の固相合成、日本核酸医薬学会第 4 回年会、2018 年。
Takeshi Wada, Functional control of nucleic acid drugs based on strict three-dimensional structure recognition, FIBER International Summit for Nucleic Acids 2018 (FISNA2018), 2018.
和田猛、RNAi 医薬の安定化と活性化に向けた新分子技術の開発、2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 ConBio2017 (第 40 回分子生物学会年会、第 90 回日本生化学会大会)、2017 年。
和田猛、核酸医薬の安定化と高活性化へ向けた分子技術の開発、大塚有機合成シンポジウム、2017 年。
和田猛、核酸医薬の安定化と高活性化を実現する分子技術、第 36 回日本認知症学会学術集会、2017 年。
和田猛、核酸医薬の安定化と高活性化へ向けた分子技術の開発、BioJapan2017、2017 年。
和田猛、リン原子修飾核酸の立体選択的合成と医薬への応用、第 3 回日本筋学会学術集会、2017 年。
Takeshi Wada, Stereocontrolled synthesis and properties of boranophosphate DNA, FISNA2017, 2017.
和田猛、核酸医薬の安定化と高活性化に向けた新しい分子技術の開発、第 17 回 CBSM 2017、2017 年。
和田猛、核酸医薬への有機化学的アプローチ、第 2 回 LiHub フォーラム、2017 年。
Takeshi Wada, Artificial cationic oligopeptides that stabilize and activate nucleic acid therapeutics, International symposium for the drug-discovery of the pyrrole-imidazole polyamides as novel biomedicines, 2017.
- 21 和田猛、核酸医薬の安定化と薬理活性の向上を実現する分子技術、技術情報協会セミナー (No.611119) 2016.
 - 22 和田猛、核酸医薬の安定化と高活性化に向けた新規分子技術の開発、BioJapan2016、2016.
 - 23 Takeshi Wada, New molecular technologies for stabilization and activation of oligonucleotide therapeutics, The First A3 Roundtable Meeting on Chemical Probe Research Hub (A3RONA&CPRH Fukuoka2016), 2016.
 - 24 和田猛、RNA 医薬の安定化と活性化に向けた新分子技術の開発、第 8 回日本 RNAi 研究会、第 3 回細胞外小胞学会、2016.
 - 25 Takeshi Wada, Stabilization and Activation of Double-stranded Nucleic Acid Drugs by Artificial Cationic Molecules, AsiaTIDES 2016, 2016.
 - 26 Takeshi Wada, Stereocontrolled synthesis of boron-containing oligonucleotides as therapeutic agents, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 (Pacifichem 2015), 2015.
 - 27 和田猛、核酸医薬の安定化と高活性化へ向けた分子技術の創製、日本核酸医薬学会第 1 回年会、2015 年。
 - 28 Takeshi Wada, New Synthetic Approaches to Oligonucleotide Therapeutics, Asian 3 Roundtable on Nucleic Acids 2015, 2015.
 - 29 和田猛、核酸医薬への有機合成化学的アプローチ、第 52 回薬剤学懇談会研究討論会、2015 年。

〔図書〕(計6件)

Takeshi Wada, Yohei Nukaga, Satoshi Obika, Mitsuo Sekine Eds., Springer, Synthesis of Therapeutic Oligonucleotides, 2018, 284.

和田猛、他、シーエムシー出版、中分子創薬に資するペプチド・核酸・糖鎖の合成技術、2018年、317.

和田猛、他、化学同人、ブルース有機化学概説 第3版、2016年、212-249, 250-306, 562-577.

和田猛、原倫太郎、前田雄介、額賀陽平、他、シーエムシー出版、核酸医薬の創製と応用展開、2016年、60-69, 218-228.

和田猛、他、丸善出版、有機合成実験法ハンドブック 第2版、2015年、371-374.

和田猛、他、シーエムシー出版、複合糖質の化学と最新応用技術《普及版》、2015年、28-36.

〔産業財産権〕

出願状況(計4件)

名称：リン原子の立体化学が制御されたヘテロ二本鎖核酸医薬

発明者：和田猛、横田隆徳、清水護

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2019-057175

出願年：2019年

国内外の別：国内

名称：カチオン性人工オリゴ糖による二重鎖RNAの安定化

発明者：和田猛、原倫太郎、佐藤一樹、芝崎太、入江敦

権利者：東京都医学総合研究所、東京理科大学

種類：特許

番号：特願 2018-204172

出願年：2018年

国内外の別：国内

名称：重合性化合物、化合物、及び、ボラノホスフェートオリゴマーの製造方法

発明者：和田猛、齋藤竜也、石井友香、額賀陽平

権利者：東京理科大学

種類：特許

番号：特願 2016-221656

出願年：2016年

国内外の別：国内

名称：RNAハイブリッド形成用核酸オリゴマー

発明者：和田猛、吉野怜次郎、岩田倫太郎

権利者：東京理科大学

種類：特許

番号：特願 2016-046181

出願年：2016年

国内外の別：国内

取得状況(計1件)

名称：二重鎖核酸結合剤、当該結合剤 二重鎖核酸複合体、当該複合体を含有する医薬品組成物、及び、当該複合体の製造方法

発明者：横田隆徳、仁科一隆、和田猛、岩田倫太郎、前田雄介

権利者：東京医科歯科大学

種類：特許

番号：特許第 6300212号

取得年：2018年

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ URL : https://www.tus.ac.jp/fac_grad/p/intro.php?6791

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：鈴木 勉

ローマ字氏名：Suzuki Tsutomu

研究協力者氏名：横田 隆徳

ローマ字氏名：Yokota Takanori

研究協力者氏名：原 倫太郎

ローマ字氏名：Hara Rintaro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。