

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K17886

研究課題名(和文) アンチセンス核酸医薬のハイスループットスクリーニング法の開発

研究課題名(英文) Development of high-throughput screening methods for antisense oligonucleotides

研究代表者

原 倫太郎 (Hara, Rintaro)

東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・助教

研究者番号：70709766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アンチセンス核酸(ASO)から成るアンチセンス医薬は最も開発が進んでいる核酸医薬であるが、高活性で副作用の少ないASOを効率的に選抜する手法は十分確立されていない。本研究では高活性なASOに印をつける新たなスクリーニング手法の開発を目指した。良好な反応性を示す官能基を見出すことはできたものの、十分効率的なスクリーニング手法の確立には至らなかった。一方、当初意図しなかった実験結果ではあるものの、本研究の過程で、副作用に直結するミスマッチRNA切断反応を抑制するカチオン性人工分子を見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：Antisense oligonucleotides (ASOs) are a promising candidate for nucleic acid drugs. In this study, we aimed to develop high-throughput screening methods in which high-active ASOs are chemically marked. Although we found some functional groups which have appropriate reactivity for these methods, we could not establish the efficient high-throughput screening method. On the other hand, I unintentionally found that some artificial cationic molecules could inhibit the cleavage reaction of mismatched RNAs by ASO and RNase H, which lead directly to side-effects of ASO-type drugs.

研究分野：生体関連化学

キーワード：アンチセンス核酸医薬 リボヌクレアーゼH (RNase H) スクリーニング カチオン性オリゴ糖 カチオン性オリゴペプチド

1. 研究開始当初の背景

核酸医薬の中で最も開発が進んでいるのはアンチセンス核酸 (ASO) から成るアンチセンス医薬である。典型的なアンチセンス医薬の作用機序は、まず ASO が標的 mRNA と二本鎖を形成する。次に、形成された ASO/RNA 二本鎖がリボヌクレアーゼ H (RNase H) により認識、RNA 鎖が切断され、疾病関連遺伝子の発現が抑制される。核酸オリゴマーは通常、体内に存在するヌクレアーゼにより迅速に分解されてしまうため、ASO ではヌクレアーゼに耐性な化学修飾が導入される。化学修飾は生体内安定性だけでなく、体内動態や RNase H 活性、副作用など、種々の性質にも影響を与えるため、その種類や組み合わせ方は重要である。一方、ASO の化学修飾を最適化するにあたっては、その組み合わせパターンが極めて多いことが問題である。例えば、二十量体の核酸分子において、リン酸ジエステル結合 (PO、天然型) と、ホスホチオエート結合 (PS、化学修飾型) というわずか二種類を組み合わせることを考えた場合ですら、それらの組み合わせの数は、 $2^{19} = 50$ 万通り以上となる。このような数の分子を、一つ一つ合成し、性質を評価する、ということは現実的に不可能である。また、申請者のこれまでの研究において、ASO/RNA 二本鎖への結合能を有するカチオン性人工オリゴ糖、オリゴペプチドを開発し、核酸医薬の添加剤としての応用を検討してきた (*J. Org. Chem.* **2011**, 5895 等)。これらのカチオン性分子は、ASO/RNA 二本鎖の安定性や RNase H 活性に大きな影響を与えることが分かっている。上述の化学修飾と、このようなカチオン性分子を組み合わせ、さらに高性能な核酸医薬を創製することを目指しているが、最終的に現れる性質が、単純に「化学修飾の効果とカチオン性分子の効果の総和」とはならない点が問題である。これらの組み合わせまで最適化するには「化学修飾のパターン数 × カチオン性分子」という膨大な組み合わせを探索しなければならない。上述のように化学修飾のみですら完全網羅的に調べることは不可能であるから、これは現実的とは言えない。

2. 研究の目的

数十万、数百万種類ある化合物ライブラリから良好な活性を有するものを選別する手法として、「ハイスループットスクリーニング」がある。しかしながら、ASO でスクリーニングを行う場合、一分子の ASO が繰り返し作用し、多数の mRNA を分解することとなるため、単位時間、一分子あたり、どれだけの mRNA を分解するか (回転数: turnover) が重要であり、単純な「結合の強さ」という要素では選別できない。そこで本研究では、ASO の特徴に則した ASO のスクリーニング技術の開発を目指した。

3. 研究の方法

本研究では、アンチセンス分子が作用する際の反応速度に応じて印のつく数が変わるような分子設計により、アンチセンス医薬に特化したスクリーニング手法の確立を目指した。それにあたり、DNA-templated Synthesis (DTS) に注目した。これは、核酸の二本鎖形成を利用して反応基質同士を近接させ、低濃度溶液中では起こらない反応を実現する手法である (*Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 4848 等)。そこで、DTS が可能な官能基を多数導入した核酸オリゴマーを用いることで、RNase H 活性が高いほど、すなわち反応回数が多くなるほど、ASO に多くの目印がつく手法を考えた。

4. 研究成果

本研究の proof of concept のために以下の二点について確立する必要があり、それぞれ検証した。

(1) 二本鎖形成時に迅速に反応し、目印となる反応性官能基

DTS としてよく研究が行われているのは、二つの核酸鎖間を連結する反応であるが、本研究の目的ではこのような反応は適さない。本目的に適合した DTS 反応として、スルホン酸メチルエステルとチオール間反応 (チオールのメチル化反応) に注目し、検討を行った。モデル反応として化合物 2 や、メタンスルホン酸メチルエステル 3 を用いて、水溶液中での反応を試みた (図 1)。チオールとしてメルカプトブタノールを用いた場合、pH 7.0 では 8 時間経過しても原料のチオールが消失せず、さらに一部反応がメチルチオエーテルの生成で停止せずに、ジメチルスルホニウム体の生成が確認された。pH 8.2 の弱アル

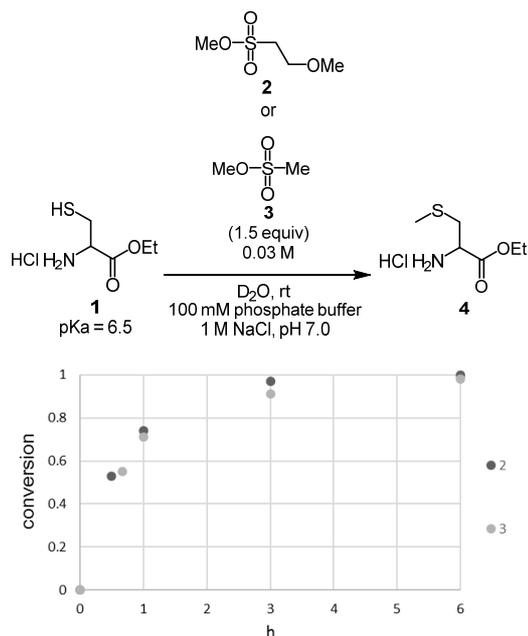


図 1 スルホン酸メチルエステルによるチオールのメチル化反応

カリ性条件下で反応を行うと結果は改善され、1時間で半量以上のチオール基がメチル化された。これはチオラートアニオンの存在比が増大したことによると考えられ、より大きな pH で反応を行えば、より迅速に反応が進行すると期待される。しかし、本研究の目的を考えると、このような pH 条件の最適化すること自体には意味なく、中性 pH で十分反応が進行するような官能基の組み合わせを見出す必要がある。そこで、通常のアシルチオールと比較してチオール基の酸性度が高い、L-システインエチルエステルを用いて同様の反応を試みたところ、顕著な副反応なく中性 pH にてメチル化反応が進行した(図1)。

次に、これらの反応性官能基の、核酸オリゴマーへの導入を試みた。しかしながら、種々条件を検討したものの、目的の核酸オリゴマーを得ることができなかった(図2)。生成物について十分同定ができていないものの、一つの副反応としてはスルホン酸メチルエステル5の加水分解反応が進行したと考えられる。これは図1においてもごくわずかながら観測されていた副反応である。他の官能基の検討も含め、結果として十分な反応性で本研究目的に適した DTS 反応が起こるような核酸オリゴマーの合成には至っていない。官能基の水中での安定性と、二本鎖形成時の迅速な反応性(RNase Hの触媒的サイクルよりも速いことが求められる)を両立させるために、さらなる分子設計を行う必要がある。

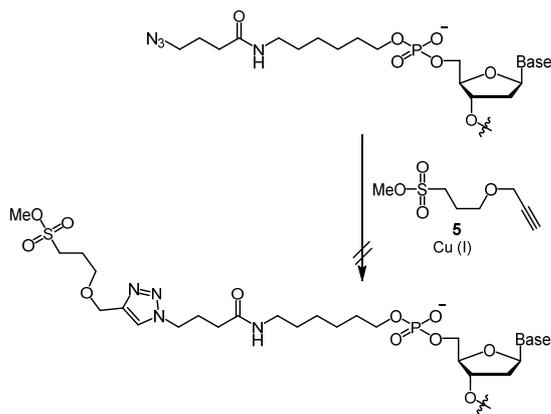


図2 Huisgen 反応による核酸オリゴマーへのスルホン酸メチルエステルの導入反応

(2) RNase H 切断反応の実験系の確立

本研究の proof of concept のための適切な実験系として、完全相補的な ASO/RNA の RNase H による切断反応と比較し反応速度が十分低いと考えられる、一塩基ミスマッチ RNA の利用を考えた。すなわち、ASO/マッチ RNA 二本鎖では多くの目印がつき(DTS が何回も

進行し) ASO/ミスマッチ RNA 二本鎖ではあまり目印が見つからない、というような実験系を確立することを目的に、様々な ASO/RNA を用いて RNase H の評価を行った。これらの検討において、当初予想していなかった事象が複数確認され、適宜計画の変更を余儀なくされた。以下に具体例を記述する。

塩基配列や化学修飾に依存するが、マッチ RNA とミスマッチ RNA で、ASO, RNase H による切断反応速度があまり変わらないケースが多々あり、これらが逆転する場合すらあることが明らかとなった。

当初は長さの揃った ASO/RNA 二本鎖(例えば 13mer ASO/13mer RNA)を用いて実験を行っていたが、より ASO が作用する際の実験に近づけようと RNA 鎖側のみ長くして実験を行ったところ、大きく異なる実験結果が得られた。特に、申請者らが開発した人工カチオン性分子を加えた場合の挙動は、RNA 鎖の長さによって大きく異なった。

本研究ではこれらの現象を追求していく過程で、特に、人工カチオン性分子存在下での RNase H 活性について興味深い実験結果が得られた。まず、カチオン性人工オリゴ糖が、二本鎖型 ASO であるヘテロ二本鎖核酸(HDO)に結合し、RNase A 耐性を顕著に向上させるにも関わらず、RNase H 活性を低下させないことを見出した(雑誌論文1他)。さらに、カチオン性人工性オリゴ糖 ODAGal4 存在下、標的 RNA の複数の一塩基ミスマッチ RNA の RNase H 切断反応が抑制されることが明らかとなった(図3)。ASO として天然型 DNA を用いた場合、十量体以下の DNA において、ODAGal4 存在下での顕著なミスマッチ RNA 切断抑制効果が見られた(学会発表1)。また、適切な化学修飾核酸と組み合わせることで、12 量体以上の ASO を用いた場

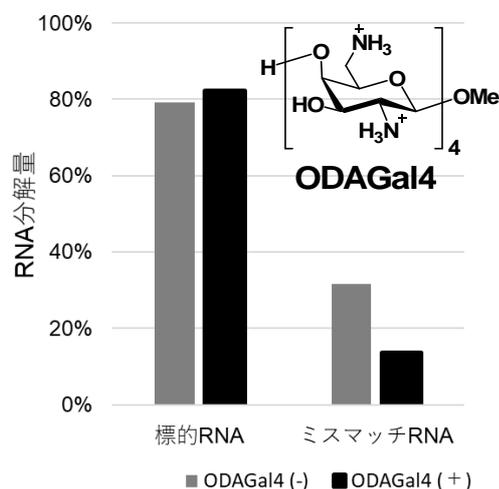


図3 RNase H 切断反応における、カチオン性人工オリゴ糖 ODAGal4 によるミスマッチ RNA 切断反応の抑制

合にも ODAGal4 によりミスマッチ RNA 切断反応を抑制する系を見出した。以上のように、当初主にモデル実験系の確立のために行うつもりであった RNase H を用いた実験系において、予想外の実験結果が得られ、ASO の安定性やミスマッチ識別能等を向上させる性質を見出すことができた。

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)

本科研費申請時における研究代表者の姓は岩田であり、本欄にも旧姓表記のものがある。

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Hara, R. I.; Hisada, Y.; Maeda, Y.; Yokota, T.; Wada, T. “Artificial cationic oligosaccharides for heteroduplex oligonucleotide-type drugs” *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 4323. 査読あり DOI: 10.1038/s41598-018-22161-8

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Hara, R.; Wada, T. 「Improvement of single mismatch discrimination in RNase H cleavage by artificial cationic oligosaccharides」、『日本化学会第 98 春季年会』、船橋、2018 年 3 月 23 日(口頭)
2. Suenaga, T.; Maeda, Y.; Hara, R.; Wada, T. 「Synthesis and properties of L-2,4-diaminobutyric acid (Dab) oligomer-conjugated antisense oligonucleotides」、『日本化学会第 98 春季年会』、船橋、2018 年 3 月 21 日(ポスター)
3. Suenaga, T.; Maeda, Y.; Hara, R.; Wada, T. “Synthesis and properties of L-2,4-diaminobutyric acid 8mer (Dab8)-conjugated antisense oligonucleotides” The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Tokyo (Japan), 14 Nov, 2017. (poster)
4. 原(岩田)倫太郎、前田雄介、久田有希、二俣沙央里、秋本和憲、和田猛 「カチオン性人工オリゴ糖による二本鎖型核酸医薬の高機能化」、『日本核酸医薬学会第 2 回年会』、東京、2016 年 11 月 15 日(ポスター)
5. 前田雄介、岩田倫太郎、坂本泰一、和田猛 「核酸医薬に結合する新規カチオン性人工ペプチドの合成と性質」、『日本化学会第 96 春季年会』、京都、2016 年 3 月 25 日(口頭)

〔図書〕(計 1 件)

原(岩田)倫太郎、前田雄介、和田猛 「核酸医薬の創製と応用展開」シーエムシー出版、2016 年 2 月、p218-228.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

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：国立大学法人 東京医科歯科大学

種類：特許

番号：特許第 6300212 号

取得年月日：2018 年 3 月 9 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

原 倫太郎 (Hara Rintaro)

東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・助教

研究者番号：70709766