

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08364

研究課題名(和文) 生体安定性と毒性低減とを志向した、糖部とリン酸部の構造制御による人工核酸設計

研究課題名(英文) Study on design of Artificial oligonucleotides based on structural control of sugar and phosphate moieties aiming at biostability and toxicity reduction

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、糖部5'-3'間または5'-3'間に架橋を施すことで3'エンドに糖部立体配座を固定し、かつリン酸ジエステル部をホスホロアミダートとしたり2',5'結合に制御したりした人工ヌクレオシド・オリゴヌクレオチドの合成に成功した。さらに糖構造を6員環とした3',6'結合型アロース核酸の合成へと展開した。これまでの研究で高い機能性があることを明らかにしていた人工核酸のアデノシンアナログの合成も併せて実施した。それぞれの機能性を比較することで、今回新たに設計した人工核酸の中では、化学的には6員環アナログの性質が良好である一方で、創薬用途としては5員環アナログがより好適であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸は新しい創薬モダリティとして注目されているが、天然の核酸のみでは創薬用途に耐えないことから現状は人工核酸の利用が必須である。一方で、新しい人工核酸の開発は近年世界中で停滞気味であり、創薬に資する機能性を示す人工核酸分子を創出し続けることは、核酸化学者の使命である。本研究では、核酸医薬の構造的な多様性を確保するため、またそれによって新しい機能開発につながることをめざして、新奇な核酸分子の基盤的創出研究を化学的な側面から実施した。応用研究には至らなかったものの、本研究を通じて明らかにした新たな核酸分子の性質は核酸創薬への応用を期待できるものであり、引き続き研究を進めたい。

研究成果の概要(英文)：In this study, synthesis and investigation of artificial nucleic acids in which the sugar conformation was restricted into 3'-endo and at the same time the phosphodiester moieties were replaced by amidate moiety or 2',5'-linkages were performed. Furthermore, the development of 3',6'-linked allose-nucleic-acid bearing a six membered ring sugar moiety was also achieved. An adenosine analog of artificial nucleic acids, which has been shown to be highly functional in previous studies was also synthesized. By comparing the respective functionalities, among the newly designed artificial nucleic acids, it became clear that the 6-membered ring analog is chemically better, while the 5-membered ring analog is more suitable for drug discovery.

研究分野：医薬化学 核酸化学

キーワード：人工核酸 有機合成化学 分子設計 核酸創薬 ヌクレオシド オリゴヌクレオチド 医薬化学

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

低分子創薬研究を補う新たな創薬手法として、様々な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、いずれも次世代医薬としての期待は高い。この核酸医薬は、文字通り核酸をくすりとする技術であるが、主にヒトの体内には存在しない人工核酸を用いることで、天然の核酸 (DNA や RNA) では達成できない性質をもたせている。例えば、至る所に存在している核酸分解酵素で容易に分解されるリン酸ジエステル結合をホスホロチオアート化 (S 化) して分解耐性を付与することが現在の核酸医薬設計の常套手段となっており、さらに 2' 修飾 RNA を核酸ユニットとすることで S 化により低下する標的との結合親和性を補っている。こうしたいわゆる第二世代人工核酸 (モルホリノ核酸や 2'-メトキシエトキシ (MOE) 核酸) が標的核酸の分解を伴わないエキソヌクレオザームの臨床試験で良好な成績を挙げはじめ、核酸医薬のアンメットニーズに込める高い可能性が現実になりつつある。一方で、肝臓以外の臓器を標的とした核酸医薬では、期待した効果に及ばないことを理由に大規模臨床試験に進めなかったり、特に標的核酸の分解を伴う siRNA やアンチセンス薬については毒性の懸念による開発中止が相次いだりと、問題点も未だ山積している。なお、肝臓への核酸の送達には N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) 核酸複合体が効果的に機能することが報告されている。こうした問題点の解決にはその原因を明らかとすることが何より重要であることは言うまでもないが、臨床研究における活性の低下や毒性発現の根本的な原因解明は低分子医薬同様極めて困難であり、推測・議論の域を出ず、正式に論文として明示されているものは無い。こうしたなかで体内安定性を飛躍的に向上させる S 化は、核酸をジアステレオ混合物としてしまうため (不斉中心が生じる) にいずれかの立体異性体が毒性につながる懸念を払拭出来ないことや、S 化されたオリゴ核酸 (S-oligo) を積極的に取り込む受容体 Stabilin が特定の臓器 (肝臓など) に多く発現するために体内分布に偏りが生じることなどから、現在の核酸医薬研究の殻を破り新しい次元に進むには S 化からの脱却が鍵となっていると考えられる。

2. 研究の目的

核酸医薬における現在の最重要課題は、薬物動態の改善と予測の難しい毒性の低減である。本研究では、これら課題の解決を核酸の化学構造の改新により達成することを目的に、核酸の三次元構造を精密に制御した、もしくは構造を刷新した人工ヌクレオシドを新たに設計・合成し、それらを含むオリゴ核酸の特性を化学的ならびに生物学的に精査する。特に、糖部とリン酸ジエステル結合部の構造を同時に制御した人工核酸を創出することで、現在核酸医薬で主流となっているホスホロチオアート修飾 (S 化) や脂質膜などのキャリアを利用せずに核酸医薬の生物学的安定性を改善し、また核酸特有の動態を変化させることを目指す。複雑化しつつある核酸医薬を出来る限り単純な機構とすることで毒性の低減につなげ、核酸医薬の開発基盤となる研究を目指す。

3. 研究の方法

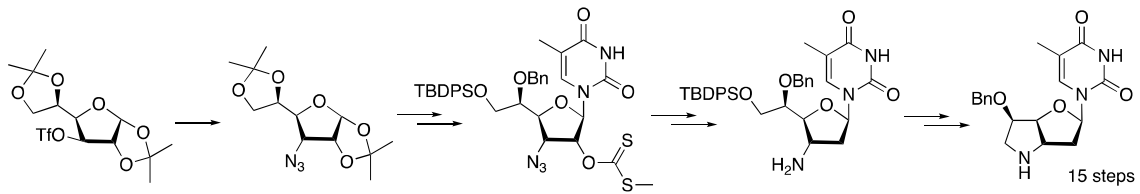
本研究では、核酸の糖部立体配座とリン酸ジエステル結合部の構造を同時に制御した人工ヌクレオシドを化学合成し、それが核酸高次構造の熱的安定性や分解酵素耐性さらには薬物動態に与える影響を比較することで、核酸創薬に資する素材を創出する。効率的な合成を実施するため安価な糖または天然ヌクレオシドを出発原料とし、リン酸ジエステル部と糖部立体配座は、ヒドロキシル基の配向を制御したり、各間を炭素架橋したりすることで同時に制御する。合成する人工ヌクレオシドを導入したオリゴ核酸の熱的安定性と構造特性の関連は、核酸高次構造の融解に伴う紫外外部モル吸光係数の変化や核酸分解耐性実験などを網羅的に実施することで総合的に議論する。

4. 研究成果

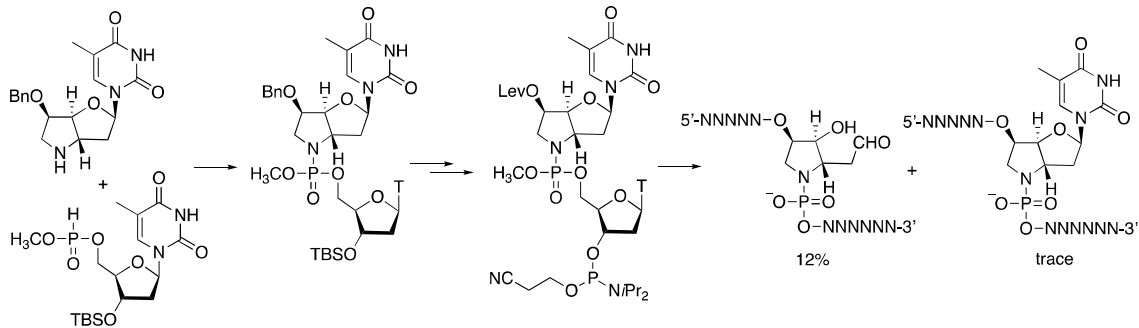
本研究では、核酸の糖部立体配座とリン酸ジエステル結合部の構造を同時に制御した人工ヌクレオシドを化学合成し、それが核酸高次構造の熱的安定性や分解酵素耐性などに与える影響を比較することで、核酸創薬に資する素材を創出することを目指した。

(1) C5'-N3'間に架橋を施したヌクレオシドの創出：本研究では、糖部立体配座を 3'エンド型に強固に固定し、同時にホスホロアミダート結合様式とすることで生物学的に安定な人工核酸の創出を目指した。

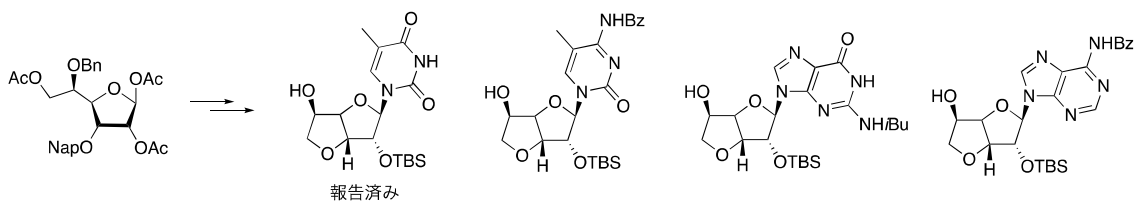
まず、安価なジアセトン糖を出発原料とし、3 位のアジド化と 1 位へのチミン塩基の導入を行った。アジド化ではベータ脱離体の生成が謙虚であったが、種々条件を検討することで 60% の収率でアジド体へと誘導することができた。続いて、2'位のデオキシ化と 3'位アジド基の還元をラジカル還元条件で実施し、およそ 50% の収率で 3'-アミノ-2'-デオキシ体へと誘導した。さらに、6'位と 3'位アミノ基との間で分子内求核置換反応を実施することで、C5'-N3'間に架橋をもつチミンアナログの合成に成功した。NMR 解析から、合成した C5-N3 間に架橋をもつ 2-デオキシリボース骨格が設計通りに 3'エンド型に固定されていることを明らかにした。この骨格はこれまでに報告されていない新規骨格であり化学的に重要と考えている。



続いて、このC5'-N3'間に架橋を施したヌクレオシドのオリゴヌクレオチドへの導入を目指した。DNA合成機を用いたホスホロアミダイト法によるホスホロアミダイト型核酸の合成が過去の報告から困難であると想定されたため、まずは、このアナログを含む二量体アミダイトを用いたオリゴ核酸合成を目指した。種々条件を検討したところ、H-ホスホナート法を用いた二量体合成により、ホスホロアミダイト構造で二量化したアミダイトブロックの合成に成功した。そこで、合成した二量化型アミダイトブロックを用いてホスホロアミダイト法によるオリゴヌクレオチド合成を実施したが、目的のオリゴヌクレオチドは痕跡量しか得られなかった。主生成物として得られたオリゴ核酸は核酸塩基が脱離した分解物であり、アミダイト骨格は導入されていることから、核酸合成中のいずれかの工程で脱塩基したと推定される。研究実施期間中、核酸アナログの種類によってはホスホロアミダイト法によるホスホロアミダイト型核酸の合成が可能であることが報告されたことから、単量体のままの導入を検討したが、やはり分解物の生成が抑制できず、目的物は痕跡量しか得られなかった。



(2) C5'-O3'間に架橋を施したヌクレオシドの創出：本研究では、これまでに開発を続けてきた糖部立体配座を3'エンド型に強固に固定し、併せてリン酸ジエステル部を2',5'-結合型に制御し人工核酸の核酸塩基4種類全てを合成し、さらにその効率的なオリゴ核酸への導入方法を詳細に検討することで、糖部C5'-N3'間に架橋を持つヌクレオチドの合成基盤を固めることとした。その合成は、いずれのアナログにも共通のジアセトングルコースを出発原料とし、すでに報告したチミジンアナログの合成法を踏襲、一部改良して適用することで、20工程から23行程の合成経路にて、3%から10%の通算収率で合成することに成功した。

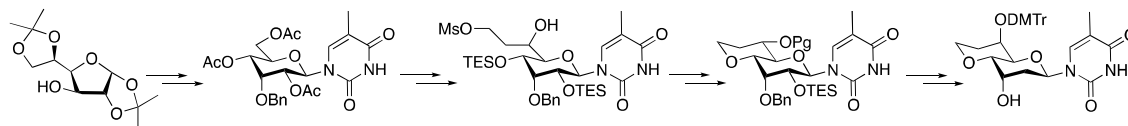


さらに、詳細な合成方法の再検討を実施することで、全ての塩基アナログをオリゴDNAへ導入すること成功した。その二重鎖安定性を評価したところ、このC5'-O3'間に架橋を施したヌクレオシドを導入したオリゴDNAが、相補DNAとの安定な二重鎖を形成することを見出した。これまでの報告では、2',5'-結合型核酸はDNAとは安定な二重鎖を形成せず、またRNAと形成する際には糖部立体配座が2'エンド型を取ることが明らかにされていたため、糖部立体配座を3'エンド型に固定した2',5'-結合型核酸はDNAとは安定な二重鎖を形成しないと考えられてきた。また、他の研究グループによって報告された糖部立体配座を3'エンド型に固定したとされる2',5'-結合型核酸はやはり安定な二重鎖を形成できないと報告されている。すなわち、本研究の成果はこれまでの定説となりうる現象とは異なるものであり、極めて興味深い。今後機会があれば、より詳細な研究を進めたい。

(3) SeLNA：本研究では、これまでに開発を続けてきたSeLNAのアデノシンアナログの合成研究を対照実験に用いるために実施した。SeLNAは非常に高い核酸分解酵素耐や二重鎖形成能を示すため、より利用価値を高めるためにアデノシンアナログの合成を検討したところ、SeLNAヌクレオシドは熱的に不安定であり、脱塩基反応が容易に進行することがわかった。オリゴ核酸へ

の導入にはより詳細な検討が必要である。

(4) C6'-O4'間に架橋を施したピラノースヌクレオシドの創出：アロースを糖部とすることでC6'-O4'間に架橋を施すことで糖部大きく刷新し、併せてリン酸ジエステル部を3',6'-結合型に制御した人工核酸を新たに合成し、さらにそのオリゴ核酸の性質を検討した。その合成はまず、市販のグルコースを出発原料として6工程でアロース型ヌクレオシドへと誘導した。その後、6'位でのアリル化を経たC2増炭、続けて4'位との環化反応により目的の架橋型ピラノシドの骨格構築に成功した。さらに、2'位のラジカル的デオキシ化と6'位の立体反転を経て目的のヌクレオシド合成に成功した。



合成したヌクレオシドのオリゴ核酸への導入はホスホロアミダイト法により実施し、目的のオリゴ核酸を約3%の収率で得ることに成功した。このヌクレオシドアナログは、上述の(2)で合成した5員環状アナログと比べて化学的に極めて安定だったが、核酸の熱的安定性は低くなる傾向があった。

本研究を通して、核酸糖部立体配座を固定するために糖部を歪んだ5員環とし、かつリン酸ジエステル結合部の構造を同時に制御した場合には、オリゴ核酸合成に課題は残るものの、核酸創薬に用いることのできる性質を有している可能性を示すことができた。一方で、6員環状アナログは化学的には安定であるが、その性質改善にはさらなる精密設計が必要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Moai Yoshihiro, Hiroaki Hidekazu, Obika Saoshi, Kodama Tetsuya	4. 巻 39
2. 論文標題 Synthesis of selenomethylene-locked nucleic acids (SeLNA) nucleoside unit bearing an adenine base	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 131 ~ 140
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15257770.2019.1675169	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Moai Yoshihiro, Kodama Tetsuya	4. 巻 61
2. 論文標題 Recent developments of artificial functional oligo nucleic acids	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 151708 ~ 151708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2020.151708	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中野篤志、牧野亜衣、廣明秀一、兒玉哲也
2. 発表標題 N型立体配座に制御した2'5'-結合核酸の合成と特性評価に関する研究
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石倉大輔、廣明秀一、兒玉哲也
2. 発表標題 ピラノシド核酸の高機能化によるDNAアナログの創製研究
3. 学会等名 第6回将来を見据えた生体分子の構造・機能解析から分子設計に関する研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野篤志、牧野亜衣、廣明秀一、兒玉哲也
2. 発表標題 N型に糖部立体配座を制御した2',5'-結合核酸の合成と機能性評価に関する研究
3. 学会等名 第6回将来を見据えた生体分子の構造・機能解析から分子設計に関する研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大石和馬、廣明秀一、兒玉哲也
2. 発表標題 N4' P6'ホスホロアミダート結合ヘキントール核酸の開発研究
3. 学会等名 第6回将来を見据えた生体分子の構造・機能解析から分子設計に関する研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 兒玉哲也、牧野亜衣、近田達哉、中野篤志、大石和馬、廣明秀一
2. 発表標題 歪んだトランス縮環骨格を糖部骨格とするヌクレオシド類の合成
3. 学会等名 第113回有機合成シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近田達哉、廣明秀一、兒玉哲也
2. 発表標題 Synthetic study of an N3'→P5' phosphoramidate-type nucleic acid
3. 学会等名 第44回国際核酸化学シンポジウム/日本核酸化学会 第1回年会(国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 兒玉哲也
2. 発表標題 糖部構造を刷新した人工核酸の設計と合成
3. 学会等名 第2回 BINDS 合成勉強会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石倉大輔, 廣明秀一, 兒玉哲也
2. 発表標題 修飾アロース骨格を糖部に有する3',6'-結合核酸の合成研究
3. 学会等名 日本薬学会第140回年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	百相 義大 (Moai Yoshihiro)		
研究協力者	近田 達哉 (Konda Tatsuya)		
研究協力者	中野 篤志 (Nakano Atsushi)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	大石 和馬 (Ohishi Kazuma)		
研究協力者	石倉 大輔 (Ishikura Daisuke)		