

令和 5 年 4 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05748

研究課題名（和文）膜透過性オリゴ核酸の戦略的探索とその医薬応用に向けた検証

研究課題名（英文）Design and synthesis of membrane-permeable oligonucleotides and their application to therapeutic antisense oligonucleotides

研究代表者

山口 卓男（YAMAGUCHI, Takao）

大阪大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：80596601

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、細胞膜透過性を有する特殊なオリゴ核酸の創製とその医薬応用に向けた検証を目的としている。まず、我々は脂肪酸の膜透過性の高さに着目し、脂肪酸コンジュゲート型オリゴ核酸（アンチセンス核酸）を設計・合成した。続いて、その機能評価を実施した結果、パルミチン酸を2つコンジュゲートしたアンチセンス核酸について、細胞内移行性の大幅な向上を確認した。さらに、パルミチン酸とアンチセンス核酸との間にエンドソーム内で切断するリンカーを配置することで、アンチセンス核酸の細胞内移行性の向上と活性の向上を達成した。以上によって、当初目的を達成することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アンチセンス核酸をはじめとする核酸医薬は、従来医薬では治療が困難な遺伝性疾患等に対する新たな治療手段として期待されており、実際に近年難病に対する核酸医薬品が続々と誕生してきているところである。一方で、核酸医薬は高極性なオリゴ核酸を本体とすることから細胞膜透過性（細胞内への移行性）が低く、投与したものの多くが薬効には繋がらない。本研究では、膜透過性が高い脂質を結合させることで、アンチセンス核酸の細胞内移行性並びに活性の向上を達成した。これらの技術は、高い薬効を示す核酸医薬の創出につながるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research is to develop oligonucleotides with cell-membrane permeability and to verify their applicability to therapeutic oligonucleotides. Focusing on membrane-permeable lipids, we have designed, synthesized and evaluated many fatty acid-conjugated oligonucleotides (antisense oligonucleotides). As a result, it was confirmed that conjugation of two palmitic acids significantly improves cellular uptake of antisense oligonucleotides. Furthermore, it was found that placing an endosomal cleavable linker between palmitic acid and the antisense oligonucleotide can improve both cellular uptake and activity of the antisense oligonucleotide.

研究分野：核酸医薬

キーワード：オリゴ核酸 核酸医薬 細胞膜透過性 細胞内移行性 人工核酸

1. 研究開始当初の背景

近年、オリゴ核酸を本体とする核酸医薬（アンチセンス核酸、siRNA、アプタマーなど）に注目が集まっている。中でもアンチセンス核酸は、Watson-Crick 塩基対を介して標的 RNA に配列特異的に結合し、それを制御できることから、迅速な医薬開発に繋がる有力モダリティと考えられている。2023年3月現在、9品目のアンチセンス核酸医薬品が承認に至っている。一方で、核酸医薬の一つの課題として、細胞膜透過性が低く、実際の作用箇所である細胞内へ移行しにくいことが挙げられる。このような性質から、投与された核酸医薬の多くが実際には機能せずに排泄される。以上のことから、オリゴ核酸を効率的に細胞内へと送り届けることのできる技術が強く望まれている。そのような技術が開発されることで、高い薬効を持つ核酸医薬の創出が可能であり、また、低用量での治療が可能になるものと期待される。

2. 研究の目的

上記のような背景下、本研究では「細胞膜透過性を有し、細胞内へと効率的に移行性する特殊なオリゴ核酸の取得」を目標としている。また、その技術を核酸医薬（アンチセンス核酸）へと応用し、実際に活性の向上に繋がるかの検証を目的としている。

3. 研究の方法

核酸医薬の細胞内移行性を高めた実例として、細胞膜上の受容体に結合する *N*-アセチル-D-ガラクトサミン (GalNAc) とのコンジュゲート化が挙げられる。この例では、オリゴ核酸に GalNAc をコンジュゲートし、細胞膜上の受容体へと結合させることで、細胞内への移行性を高めている。我々は、細胞膜の構成成分であり、また、オリゴ核酸に脂溶性を付与することができる脂質に着目し、脂質とのコンジュゲート化によって核酸医薬の細胞膜透過性・細胞内移行性を高められるのではないかと考えた。

本研究では、脂質の例としてヘキサ酸 (C6) とパルミチン酸 (C16) を選択した。また、固相合成によりオリゴ核酸を伸長する際に、これら脂肪酸をコンジュゲートできるよう、各脂肪酸のモノマーアミダイト体を設計して、その合成に取り組んだ。また、合成した脂肪酸モノマーをアンチセンス核酸の末端へとコンジュゲートし、膜透過性や粒子径などの物性を評価するとともに、細胞を用いて脂肪酸コンジュゲート体の細胞内移行性や活性に関して評価を行った。

4. 研究成果

【脂肪酸モノマーアミダイト体の合成とアンチセンス核酸へのコンジュゲート】

まず、プロリンを母格として用い、それに脂肪酸 (C6、C16) をそれぞれ縮合した。続いて、定法に従ってそれぞれのモノマーの一級ヒドロキシ基をジメトキシトリチル化した後、残る二級ヒドロキシ基をホスフィチル化することで望みの脂肪酸モノマーアミダイト体の合成に成功した。次に、これらモノマーアミダイト体を用いて、*Malat1* を標的とするアンチセンス核酸に脂肪酸をコンジュゲートした。その際に、複数の脂肪酸をコンジュゲートさせたものも合成した。

【膜透過性と粒子径】

続いて人工膜透過性試験（PAMPA）によって各脂肪酸コンジュゲートアンチセンス核酸の膜透過性を評価した。その結果、C16を複数コンジュゲートしたアンチセンス核酸は膜透過性が大きく低下することが分かった。一方で、C6を一つあるいは複数コンジュゲートしたものは非コンジュゲート体と同等の膜透過性であった。各コンジュゲート体の粒子径を測定した結果、膜透過性が低下したものは比較的大きな粒子径を持つことが分かった。このことから、脂肪酸部分を内側に、核酸部分を外側に向けたミセル様の構造体を持ち、膜透過性も低下したと考えられる。

【細胞内移行性】

次に、これら脂肪酸コンジュゲート体を蛍光分子で標識し、細胞内移行性をFACSで評価した。その結果、予想に反して、C16を複数（2つまたは3つ）コンジュゲートしたものにおいて、細胞内への移行量の増加が確認できた。一方で、蛍光顕微鏡観察からは細胞内に移行したコンジュゲート体の多くがリソソームに囚われていることが判明した。これらの結果から、C16を複数コンジュゲートしたものに関しては、エンドサイトーシスによる細胞内移行は向上するものの、エンドソームからの脱出が遅くなっていると考えられた。

【アンチセンス活性】

一連のコンジュゲート体に関して *Malat1* の抑制効果（アンチセンス活性）を評価したところ、特にC16を複数コンジュゲートしたものに関して、活性の大幅な低下が確認された。先の細胞内移行性評価においては、C16を複数コンジュゲートしたものについて移行性が向上することが分かっており、矛盾が生じているが、ミセル様の構造体のためにエンドソームからの脱出が著しく遅いと考えれば説明がつく。そこで、エンドソーム内で脂肪酸とアンチセンス核酸とを切り離すリンカーを配置し、評価したところ、期待通り活性の回復が見られ、非コンジュゲート体と比較しても活性の向上傾向が確認された。

【まとめ】

アンチセンス核酸に脂肪酸をコンジュゲートすることで、細胞内移行性を向上させることに成功した。また、脂肪酸によって促進されるのはエンドサイトーシスであり、エンドソーム内で脂肪酸を適切に切り離すリンカーを配置することが重要であることを見出した。最終的に、パルミチン酸モノマー2つと切断性リンカーをアンチセンス核酸の末端に結合させることで、細胞内移行性を高め、活性をも向上できるということを見出した。以上、当初目的である「細胞内移行性を持つオリゴ核酸の創製」を達成するとともに、その技術がアンチセンス核酸の活性向上に繋がることを明らかにした。

【最も関連性の高い発表論文】

Yuya Tanaka, Yurika Tanioku, Taisuke Nakayama, Kotomi Aso, Takao Yamaguchi,* Haruhiko Kamada, Satoshi Obika*, Synthesis of multivalent fatty acid-conjugated antisense oligonucleotide: physical properties, cell internalization, and in vitro and in vivo activities. *Bioorg. Med. Chem.* **2023**, *81*, 117192.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tanaka Yuya, Tanioku Yurika, Nakayama Taisuke, Aso Kotomi, Yamaguchi Takao, Kamada Haruhiko, Obika Satoshi	4. 巻 81
2. 論文標題 Synthesis of multivalent fatty acid-conjugated antisense oligonucleotides: Cell internalization, physical properties, and in vitro and in vivo activities	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 117192 ~ 117192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2023.117192	査読の有無 有
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 Sakurai Yota, Yamaguchi Takao, Yoshida Tokuyuki, Horiba Masahiko, Inoue Takao, Obika Satoshi	4. 巻 88
2. 論文標題 Synthesis and Properties of Nucleobase-Sugar Dual Modified Nucleic Acids: 2'-OMe-RNA and scpBNA Bearing a 5-Hydroxycytosine Nucleobase	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 154 ~ 162
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.joc.2c02038	査読の有無 有
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 Yamaguchi Takao, Yamamoto Chika, Horiba Masahiko, Aoyama Hiroshi, Obika Satoshi	4. 巻 46
2. 論文標題 Synthesis and duplex-forming ability of oligonucleotides modified with 4'-C,5'-C-methylene-bridged nucleic acid (4',5'-BNA)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 116359 ~ 116359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2021.116359	査読の有無 有
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 Komine Hibiki, Mori Shohei, Morihiko Kunihiro, Ishida Kenta, Okuda Takumi, Kasahara Yuuya, Aoyama Hiroshi, Yamaguchi Takao, Obika Satoshi	4. 巻 25
2. 論文標題 Synthesis and Evaluation of Artificial Nucleic Acid Bearing an Oxanorbornane Scaffold	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 1732 ~ 1732
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules25071732	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kumagai Shinji, Sawamoto Hiroaki, Takegawa-Araki Tomo, Arai Yuuki, Yamakoshi Shuhei, Yamada Katsuya, Ohta Tetsuya, Kawanishi Eiji, Horie Naohiro, Yamaguchi Takao, Obika Satoshi	4. 巻 18
2. 論文標題 Synthesis and properties of GuNA purine/pyrimidine nucleosides and oligonucleotides	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 9461 ~ 9472
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D00B01970D	査読の有無 有
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 Horie Naohiro, Yamaguchi Takao, Kumagai Shinji, Obika Satoshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Synthesis and properties of oligonucleotides modified with an N-methylguanidine-bridged nucleic acid (GuNA[Me]) bearing adenine, guanine, or 5-methylcytosine nucleobases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Beilstein Journal of Organic Chemistry	6. 最初と最後の頁 622 ~ 629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3762/bjoc.17.54	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計34件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 10件)

1. 発表者名 山口卓男
2. 発表標題 核酸医薬の基礎から最先端まで
3. 学会等名 生命科学研究所セミナー (東北大学) (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口卓男
2. 発表標題 核酸医薬の基礎と分析ニーズ
3. 学会等名 ニューモダリティ医薬のLC/MS分析フォーラム (日本ウォーターズ株式会社) (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口卓男
2. 発表標題 核酸医薬の基礎から最新の研究動向まで
3. 学会等名 日本薬学会第143年会ランチョンセミナー（東ソー株式会社）（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山口卓男
2. 発表標題 いま注目される核酸医薬 - アンチセンス核酸の魅力 -
3. 学会等名 CPHI Japan 2023（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林田桃香、鈴木里沙、堀江真之介、山口卓男、小比賀聡
2. 発表標題 オリゴ核酸分析における超臨界流体クロマトグラフィーの利用：添加剤濃度の検討
3. 学会等名 第29回クロマトグラフィーシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口卓男、羽淵貴紀、杉浦隆也、加藤 剛、吉田徳幸、井上貴雄、小比賀聡
2. 発表標題 5'-シクロプロピレン修飾核酸の合成と機能評価
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口卓男、櫻井耀太、山本知佳、杉田 慧、吉田徳幸、井上貴雄、小比賀聡
2. 発表標題 1 -C,3 -O-架橋型 D-アルトリトール核酸の合成と機能評価
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口卓男
2. 発表標題 新規人工核酸の導入によるアンチセンス核酸の毒性軽減
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林田桃香、鈴木里沙、堀江真之介、山口卓男、小比賀聡
2. 発表標題 オリゴ核酸分析における超臨界流体クロマトグラフィーの可能性検討
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Momoka Hayashida, Shinnosuke Horie, Takao Yamaguchi, Satoshi Obika
2. 発表標題 Investigation of supercritical fluid chromatography (SFC) analytical conditions for oligonucleotides
3. 学会等名 33rd International Symposium on Chromatography (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuya Tanaka, Yurika Tanioku, Kotomi Aso, Takao Yamaguchi, Satoshi Obika
2. 発表標題 Fatty acid and cell-penetrating motif conjugation for efficient intracellular delivery of antisense oligonucleotides
3. 学会等名 18th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society (OTS) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kei Sugita, Chika Yamamoto, Yota Sakurai, Takao Yamaguchi, Satoshi Obika
2. 発表標題 Synthesis and properties of 1',3'-O-butylene-bridged D-altritol nucleic acid
3. 学会等名 The 49th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 熊谷陸、杉浦隆也、小峯飛々暉、山口卓男、小比賀聡
2. 発表標題 2'-O,4'-C-スピロシクロペンチレン架橋核酸のグアニン誘導体の合成
3. 学会等名 日本薬学会第143回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Chika Yamamoto, Yota Sakurai, Takao Yamaguchi, Tokuyuki Yoshida, Takao Inoue, Satoshi Obika
2. 発表標題 Synthesis and Evaluation of 1',3'-Bridged Altritol Nucleic Acids (BANAs)
3. 学会等名 17th Oligonucleotide Therapeutics Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryusuke Hatanaka, Naohiro Horie, Takao Yamaguchi, Masaki Yamagami, Tadashi Uemoto, Satoshi Obika
2. 発表標題 Robust synthetic approach of oligonucleotides modified with N-(tert-butyl) guanidine-bridged nucleic acid
3. 学会等名 17th Oligonucleotide Therapeutics Society (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yurika Tanioku, Yuya Tanaka, Yuuya Kasahara, Taisuke Nakayama, Haruhiko Kamada, Takao Yamaguchi, Satoshi Obika
2. 発表標題 Synthesis and evaluation of antisense oligonucleotides multiply conjugated with hexose-type sugar monomers
3. 学会等名 The 48th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuya Tanaka, Yurika Tanioku, Kotomi Aso, Taisuke Nakayama, Haruhiko Kamada, Takao Yamaguchi, Satoshi Obika
2. 発表標題 Effect of multivalent fatty acid conjugation on the activity and membrane permeability of antisense oligonucleotides
3. 学会等名 The 48th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takao Yamaguchi, Yota Sakurai, Chika Yamamoto, Tokuyuki Yoshida, Takao Inoue, Satoshi Obika
2. 発表標題 Synthesis and biophysical properties of 1',3'-bridged D-altritol nucleic acids (BANAs)
3. 学会等名 PacifiChem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ryusuke Hatanaka, Naohiro Horie, Takao Yamaguchi, Masaki Yamagami, Tadashi Umemoto, Satoshi Obika
2. 発表標題 Facile synthesis of oligonucleotides modified with N-tert-butylguanidine-bridged nucleic acid
3. 学会等名 PacifiChem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chika Yamamoto, Masahiko Horiba, Hiroshi Aoyama, Takao Yamaguchi, Satoshi Obika
2. 発表標題 Synthesis of 4',5'-bridged nucleic acid having distorted torsion angle
3. 学会等名 PacifiChem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口卓男
2. 発表標題 核酸医薬の創製：人工核酸が切り拓く有効性と安全性の両立
3. 学会等名 創薬懇話会2021 in 京都 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口卓男
2. 発表標題 アンチセンス核酸医薬開発における人工核酸の役割
3. 学会等名 理研セミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉浦隆也、羽瀨貴紀、山口卓男、吉田徳幸、井上貴雄、小比賀聡
2. 発表標題 5'-シクロプロピレン修飾型アンチセンス核酸の合成と活性評価
3. 学会等名 創薬懇話会2021 in 京都
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畑中隆佑、堀江直宏、山口卓男、小比賀聡
2. 発表標題 2' 位に疎水性置換基を配置した新規架橋型人工核酸の二重鎖形成能
3. 学会等名 日本核酸医薬学会 第6回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉田慧、山本知佳、山口卓男、小比賀聡
2. 発表標題 1' 位と3' 位間をブチレン架橋したアルトリツール核酸の合成と機能
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阪上詩織、小峯 飛々暉、山口 卓男、吉田 徳幸、井上 貴雄、小比賀聡
2. 発表標題 5'位にシクロペンタン環を有する新規修飾核酸の合成とその物性評価
3. 学会等名 日本薬学会 第142回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松村朋紀、山口卓男、小比賀聡
2. 発表標題 5位にアミノメチル基を有するピリミジン塩基の合成と特性解析
3. 学会等名 日本薬学会 第142回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 吉田匠、山口卓男、小比賀聡
2. 発表標題 二重鎖形成を利用した標的タンパク質のラベル化と精製法の開発
3. 学会等名 日本薬学会 第142回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅田和輝、羽淵貴紀、杉浦隆也、山口卓男、小比賀聡
2. 発表標題 5'位にシクロプロパン環を有する2',4'-架橋型人工核酸の合成と物性評価
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷奥有里花、山口卓男、小比賀聡
2. 発表標題 標的臓器へのデリバリーを志向した糖コンジュゲート型オリゴ核酸の合成
3. 学会等名 第70回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中佑弥、谷奥有里花、阿曾古都美、中山泰亮、鎌田春彦、山口卓男、小比賀聡
2. 発表標題 複数導入可能な脂質アミダイトの合成とそのアンチセンス核酸への応用
3. 学会等名 日本薬学会第141回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山本知佳、櫻井耀太、山口卓男、小比賀聡
2. 発表標題 1,3 -プロピレンオキシ架橋型ピラノースを母核とする新規人工核酸の創製
3. 学会等名 日本薬学会第141回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉浦隆也、小峯飛々暉、山口卓男、小比賀聡
2. 発表標題 スピロシクロペンチレン架橋を有する人工核酸の合成及び物性評価
3. 学会等名 日本薬学会第141回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 畑中隆佑、堀江直宏、山口卓男、小比賀聡
2. 発表標題 二重鎖副溝との相互作用を志向した疎水性置換基を有する新規架橋型人工核酸の開発
3. 学会等名 日本薬学会第141回年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 架橋型ヌクレオシドおよびそれをを用いたヌクレオチド	発明者 小比賀 聡、山口 卓 男、櫻井 耀太、など	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/006017	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 架橋型ヌクレオシドおよびそれをを用いたヌクレオチド	発明者 小比賀 聡、山口 卓 男、小峯 飛々暉、な ど	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/006222	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

研究室ホームページ http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b007/index.html
--

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------