

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21241053

研究課題名（和文）

新時代の要求に対応できる革新的 RNA 合成法の開拓

研究課題名（英文）

Exploration of Innovative Methods for the synthesis of RNA Capable of Meeting Requirement for New days

研究代表者

関根 光雄（SEKINE MITSUO）

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授

研究者番号：40111679

研究成果の概要（和文）：塩基部を全く保護しないで選択的にリボヌクレオシドの 2'-水酸基にシアノエチル基や 2-(*N*-メチルカルバモイル)エチル(MCE)基を導入する新規マイケル付加反応を開拓した。この反応を用いて固相合成用モノマーユニットを合成し、2'-*O*-修飾 RNA の合成し、筋ジストロフィー治療薬の活性の目安になるエキソン・スキッピング活性を調べたところ従来の核酸医薬より優れた活性をもつことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：An innovative method for the highly 2'-*O*-selective modification of ribonucleoside derivatives with cyanoethyl and 2-(*N*-methylcarbamoylethyl (MCE) groups by Michael reaction has been developed. Various 2'-*O*-modified RNA derivatives were synthesized by using this new method. Extensive studies using these synthetic RNA derivatives showed they had more effective exon-skipping activities that indicate the efficacy as drugs for Duchenne muscular dystrophy.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|------------|------------|------------|
| 2009 年度 | 15,000,000 | 4,500,000 | 19,500,000 |
| 2010 年度 | 11,800,000 | 3,540,000 | 15,340,000 |
| 2011 年度 | 7,800,000 | 2,340,000 | 10,140,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 34,600,000 | 10,380,000 | 44,980,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生体高分子

1. 研究開始当初の背景

筋ジストロフィーは、ジストロフィンの mRNA 前駆体のエキソン部位が欠損していたり、1塩基が欠損・挿入したりすることによって、塩基配列のフレームシフトがおこり、正常なジストロフィンが合成できないため、

発症を引き起こす病気である。そのため、遺伝子レベルで、このフレームシフトを正常にさせる治療法が 1992 年に神戸大の松尾らによって動物モデルで示された。この治療法は、いわゆるエキソン・スキッピング法と呼ばれているもので、欠損している隣のエキソン部

位に相補的な塩基配列をもつ人工核酸を結合させ、スプライシング反応を制御させることによって、フレームシフトを直し、少し短い十分な活性を示すジストロフィンを合成できるようにしたものである。

現在、松尾やオランダの J. C. van Deutekom のグループらによって、エキソンに結合する人工核酸として、ホスホロチオエート型 2'-O-メチル RNA オリゴマーを使って臨床試験が世界各国で行われている。また、最近では、国立精神神経医療研究センターの武田伸一らによって、犬の筋ジストロフィー動物モデルによってモルホリノ核酸がきわめて強いエキソンスキッピング活性を示すことが見いだされ、現在最も有望な核酸医薬として期待されている。

しかし、既存のホスホロチオエート型 2'-O-メチル RNA オリゴマーは、酵素耐性や標的エキソンに対する結合能力に関しては、まだまだ理想的なレベルにはほど遠く、治療効果を得るためには大量の人工核酸が必要なため、飛躍的に酵素耐性と塩基対結合能が改善された人工核酸の開発が真に求められている。また、モルホリノ核酸は、GeenTools 社がこれまで物質特許と合成上のノウハウを保持していたこともあり、この一社からでしか、入手できなかったこともあり、さらに莫大なコストがかかるため、人工核酸を用いる筋ジストロフィー治療薬開発の大きなネックになっている。

2. 研究の目的

本研究では、高効率合成を可能とする世界最小の 2' 水酸基の保護基を用いる RNA の新規化学合成法の開発を行う。この際、RNA を医薬品あるいは遺伝子診断ツールとして活用する際の最大の問題点である酵素学的不安定性を克服した新規 RNA 誘導体も同じ RNA 合

成モノマーユニットから創出できる画期的な新規 RNA 合成法の開発を行うものである。

3. 研究の方法

研究の目的を果たすため、本研究では、まず短工程で 2'-O-シアノエチル RNA の合成に必要なリボヌクレオシドモノマーユニットの合成法について新しい合成反応の開拓に取りくんだ。また、2'-O-MCE-RNA の合成については、この新反応をさらに拡張することによって実現する方針とした。また、2'-O-修飾 RNA の筋ジストロフィー治療薬としての活性評価は国立精神神経センターの武田伸一部長の研究室に依頼することにした。

4. 研究成果

本研究では、シアノエチル基を 2'-水酸基の保護基として用いる RNA 合成法の確立のため、G と A の合成ユニットについて詳細に検討した。その結果、両者のモノマーユニットであるアミダイト誘導体の短工程合成法に成功した。G のユニットは、マルキービッツの保護基で保護された 2-アミノアデニンリボヌクレオシドを出発原料に選び、塩基部位の 2つのアミノ基が無保護でも 2' 水酸基に高収率で Cs₂CO₃ を塩基触媒として tBuOH 中アクリロニトリルを反応させるマイケル付加反応によって導入することができた (図 1)。

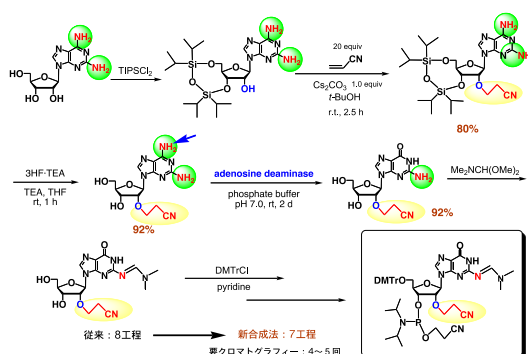


図 1. グアノシンモノマーユニットの合成

に導入することができた。さらに、マルキービッツの保護基で保護されたリボヌクレオシド誘導体の脱保護を $\text{Et}_3\text{N}\cdot 3\text{HF}$ でおこなうことができた。この際、シアノエチル基の脱離は観察されなかった。そこで、この 3', 5'-水酸基フリーな生成物に対して、5'-DMTr 化と引き続きホスフィチル化反応を検討したところ、いずれも収率よく反応が振興し、最終的には 3'-ホスホロアミダイト合成モノマーを得ることができた (図 4)。

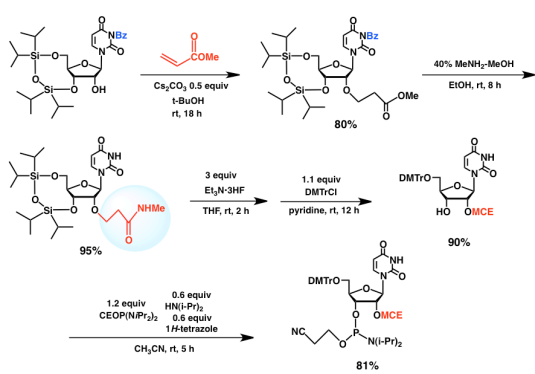


図 4. 2'-O-MCE-ウリジン 3'-ホスホロアミダイト誘導体の合成

次に、このモノマーを用いて固相合成法によって、2' 水酸基がシアノエチル化されたオリゴヌクレオチドを収率よく合成することができた。このシアノエチル基は Bu_4NF で簡単に除去することができるため、実質上は新しい RNA の合成法を確立することができた。

さらに、2' 水酸基に 2-(*N*-メチルカルバモイル)エチル (MCE) 基を導入した酵素耐性能をもつ新規 RNA の合成法を検討した。

その結果、塩基部位を無保護で、アデノシンや 2-アミノアデノシンの 3', 5'-*O*-(1, 1, 3, 3-テトライソプロピルジシラン-1, 3-ジイル)誘導体を出発原料として、アクリル酸アルキルとメチルアミンを連続的に反応させることによって、2' 水酸基に MCE 基を高収率で導入することができた。この反

応を用いて、4 種類の合成モノマーユニットの合成法を確立し、さらに、この MCE 基で修飾された RNA 誘導体を数多く合成することができた。

上述した 2'-*O*-シアノエチル誘導体の合成の検討中に見いだしたアクリル酸メチル誘導体との新しいリボヌクレオシドの 2'-水酸基に対する選択的なマイケル反応を徹底的に活用し、2' 水酸基に MCE 基を導入した酵素耐性能をもつ新規 RNA の合成法の確立を行った。

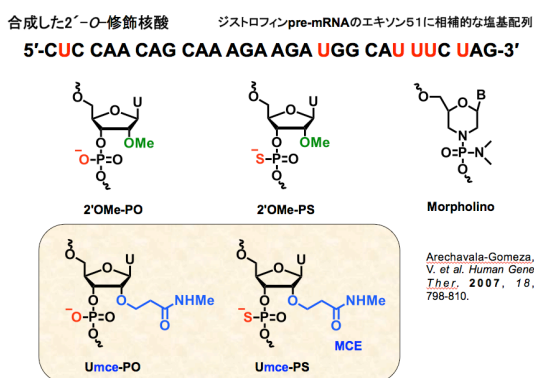


図 5. 2'-O-MCE-U を 6 個導入した 2'-O-Me-RNA 誘導体の合成

とくに筋ジストロフィー病の治療を指向して、モデルマウスである MDX52 の標的エクソン部位に強力に結合できる相補的な塩基配列をもつ 2' 位に MCE 基を導入した酵素耐性能をもつホスホロチオエート型の RNA30 量体の合成にとりくみ、種々検討した結果、収率よく合成することに成功した (図 5)。

この化学合成されたホスホロチオエート型の RNA30 量体は実際に、MDX52 に投与したところ、現在知られている 2'-*O*-メチル RNA 誘導体よりもエクソン・スキッピング活性が強いことがわかった。

さらに、マイケル反応を活用して、2'-水酸基に 2-(*N*-フェニルカルバモイル)エチル (PCE) 基を導入した対応するホスホロチオ

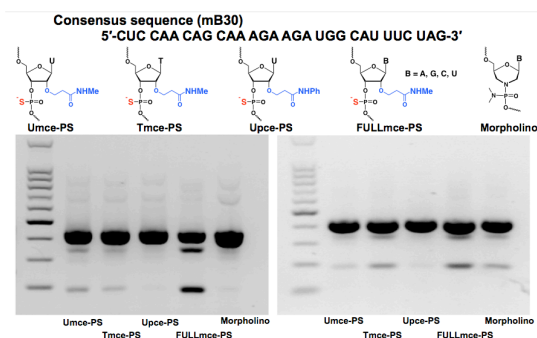


図6. 2'-O-MCE 修飾 RNA のエキソンスキッピング活性

エート型の RNA30 量体も合成することに成功したが、このもののエキソン・スキッピング活性は弱いことがわかった (図6)。

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 13 件)

- ① K.Seio, M.Tokugawa, T.Kanamori, H.Tsunoda, A.Ohkubo, and M.Sekine, Synthesis and Properties of Cationic 2'-O-[N-(4-aminobutyl)carbamoyl]modified Oligonucleotides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読有,22巻,2012,2470-2473.
- ② T.Kanamori, Y.Masaki, M.Mizuta, H. Tsunoda, A. Ohkubo, M.Sekine, and K.Seio, DNA Duplexes and Triplex-Forming Oligodeoxynucleotides Incorporating Modified Nucleosides Forming Stable and Selective Triplexes. *Org. Biomol. Chem.*, 査読有,10巻2012,1007-1013.
- ③ A.Ohkubo, Y. Nishino, Y.Ito, H.Tsunoda, K. Seio, and M. Sekine, Formation of New Base Pairs between Inosine and 5-Methyl-2-thiocytidine Derivatives. *Org. Biomol. Chem.*, 査読有,10巻,2012, 10-13.
- ④ T. Yamada, N. Okaniwa, H. Saneyoshi, A. Ohkubo, K. Seio, T. Nagata, Y. Aoki, S. Takeda, and M. Sekine, Synthesis of 2'-O-[2-(N-Methylcarbamoyl)ethyl]ribonucleosides Using Oxa-Michael Reaction and Chemical and Biological Properties of Oligonucleotide Derivatives Incorporating These Modified Ribonucleosides. *J. Org. Chem.*, 査読有,76巻,2011,3042-3053.
- ⑤ M. Sekine, Y. Oeda, Y. Iijima, H. Taguchi, A. Ohkubo, and K. Seio, Synthesis and Hybridization Properties of 2'-O-Methylated Oligoribonucleotides

Incorporating 2'-O-Naphthyluridines. *Org. Biomol. Chem.*, 査読有, 9巻,2011,210-218.

- ⑥ Y. Masaki, R. Miyasaka, A. Ohkubo, K. Seio, and M. Sekine, Linear Relationship between Deformability and Thermal Stability of 2'-O-Modified RNA Hetero Duplexes. *J. Phys. Chem. (B)*, 査読有,114巻, 2010, 2517-2524.
- ⑦ Y. Masaki, A. Ohkubo, K. Seio, and M. Sekine, Synthesis of 6-N-(Benzothiazol-2-yl)deoxyadenosine and Its Exciton-coupled Circular Dichroism. *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有,18巻, 2010,567-572.
- ⑧ Y. Oeda, Y. Iijima, H. Taguchi, A. Ohkubo, K.Seio,and M. Sekine, Microwave-Assisted Synthesis of 2'-O-Aryluridine Derivatives, *Org. Lett.*, 査読有, 11巻,2009,5582-5585.
- ⑨ K. Seio, R. Tawarada, T. Sasami, M. Serizawa, M. Ise, A. Ohkubo, and M. Sekine, Synthesis and hybridization of 2'-O-methyl-RNAs incorporating 2'-O-carbamoyluridine and unique participation of the carbamoyl group in U-G base pair, *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有,17巻,2009,7275-7280.
- ⑩ A. Ohkubo, K. Sasaki, Y. Noma, H. Tsunoda, K. Seio, and M. Sekine, Efficient solid-phase synthesis of oligodeoxynucleotides having a 5' -terminal 2,2,7-trimethylguanosine pyrophosphate linkage, *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有,17巻,2009,4819-4824.
- ⑪ K. Yamada, H. Taguchi, A. Ohkubo, K. Seio, and M. Sekine, Synthesis and Properties of Nucleoside Derivatives Masked by the Chemically Stable 2-(Trimethylsilyl)benzoyl Group, *Bioorg. Med. Chem.*, 査読有, 17巻,2009,5928-5932.
- ⑫ K. Seio, Y. Takaku, K. Miyazaki, Y. Masaki, A. Ohkubo, and M. Sekine, Synthesis of terminally modified oligonucleotides and their hybridization dependence on the size of the target RNAs, *Org. Biomol. Chem.*, 査読有, 7巻,2009,2440-2451.
- ⑬ A. Ohkubo, Y. Noma, K. Aoki, H. Tsunoda, K. Seio and M. Sekine, Introduction of 3'-Terminal Nucleosides Having a Silyl Linker into Polymer Supports without Base Protection, *J. Org. Chem.*, 査読有,74巻, 2009,2817-2823.

[学会発表] (計 14 件)

- ① 服部勇作・印出健志・山田健司・伊藤優・

- 角田浩佑・大窪章寛・清尾康志・関根光雄, 6-チオプリンおよび4-チオピリミジン誘導体を含むオリゴヌクレオチドの合成とその三重鎖形成能, 第92春季年会, 2012. 3. 25, 慶應大学
- ② 金森功史・山口慧・角田浩佑・大窪章寛・関根光雄・清尾康志, DNA二重鎖および三重鎖に導入したデオキシシュードイソシチジンの塩基対形成能の評価, 第92春季年会, 2012. 3. 25, 慶應大学
- ③ 伊藤優・山田健司・角田浩佑・大窪章寛・清尾康志・関根光雄, 4-O-(アミノエチル)ウリジン誘導体を含む新規三重鎖形成核酸の合成とその性質, 第92春季年会, 2012. 3. 25, 慶應大学
- ④ 山田研・横内瑛・鈴木真・角田浩佑・大窪章寛・清尾康志・関根光雄, TMG キャップアナログを有するモルフォリノ核酸の合成, 第 21 回アンチセンスシンポジウムおよび第 11 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム, 2011. 9. 1, 大阪大学コンベンションセンター
- ⑤ 関根光雄, 新規人工核酸の創成研究, 日本化学会関東支部主催群馬地区講演会, 2011. 7. 8, 群馬大学
- ⑥ M.Sekine, Synthesis and Biological Properties of Synthesis and Biological Properties of 2'-O-Modified Oligoribonucleotide Derivatives, XVth Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Components SCNAC 2011, 2011.6.9, Cechy, Česká republika,
- ⑦ M.Sekine, Synthesis and Properties of Modified Oligonucleotides Capable Triplex Formation with DNA Duplexes under Neutral Conditions, 2010環太平洋国際化学会議, 2010,12.15,Hawaii, Convention Center, USA
- ⑧ 山田剛史、岡庭夏己、武田伸一、永田哲也、實吉尚郎、大窪章寛、関根光雄, 2'-O-MCE オリゴヌクレオチドの合成と性質, 第 20 回アンチセンスシンポジウム, 2010. 12. 2, 甲南大学
- ⑨ R.Miyasaka, Y.Masaki, H.Tsunoda, A. Ohkubo, K.Seio, and M.Sekine, Synergetic effects of 2-thiolation and 5-propynylation of the uracil base on the stability of RNA duplexes,第 37 回国際核酸化学シンポジウム,2010.11.10,よこはま・はまぎんホール
- ⑩ T.Yamada, N.Okaniwa, H.Saneyoshi, A. Ohkubo, K.Seio, T.Nagata, S.Takeda, and M. Sekine, Synthesis and Properties of 2'-O-[2-(N-methyl) carbamoyl]ethyl-RNAs, 第 37 回国際核酸化学シンポジウム,2010.11.10,よこはま・はまぎんホール
- ⑪ 関根光雄, 新規核酸医薬の創成を指向し

- た合成研究, 第 54 回日本薬学会関東支部大会, 2010. 10. 2, 東京薬科大学
- ⑫ 正木慶昭・宮坂隆太・角田浩佑・大窪章寛・清尾康志・関根光雄, Relationship Between Thermal Stability and Deformability of Modified RNA, XIX International Round Table on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids, 2010. 9. 1, クロードベルナルリオン第一大学
- ⑬ M.Sekine, New Triplex Forming Oligonucleotides Capable of Binding to DNA Duplexes under Neutral Conditions, Heidelberg University-Tokyo Institute of Technology Joint Symposium on ,2010.7.16,Wroclaw University, Poland
- ⑭ M.Sekine, Triplex Forming lignonucleotides Containing Thiolated Nucleobases, ICPC2010-Symposium on Biophosphates, 2010.7.16,Wroclaw University, Poland

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.skn.bio.titech.ac.jp/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関根 光雄 (SEKINE MITSUO)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・教授
研究者番号：40111679

(2) 研究分担者

大窪 章寛 (OHKUBO AKIHIRO)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教
研究者番号：60373960