

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05307

研究課題名(和文) アンチセンス核酸-核酸分解酵素複合体を内包したANCsomeの開発と利用

研究課題名(英文) Development of ANCsome containing aASO-RNaseH conjugates

研究代表者

小堀 哲生 (KOBORI, AKIO)

京都工芸繊維大学・分子化学系・教授

研究者番号：00397605

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)：本研究期間において我々は、光照射下かつ分子狭雑環境下において、核酸への結合能をもつ標的タンパク質と配列選択的に共有結合を形成する2種類の核酸誘導体(1、2)の開発に成功した。核酸誘導体(1)：DNA鎖の5'末端にジアジリン誘導体を導入したオリゴ核酸誘導体を用いることで、RNaseHとアンチセンス核酸(ASO)複合体を高効率に構築することに成功した。核酸誘導体(2)：ニトロベンジル基で保護されたクロロアルデヒド誘導体が3'末端に導入された光応答性架橋型核酸を利用することで、がん細胞に高発現しているテロメラーゼの活性を光照射をトリガーに用いて選択的に阻害することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究期間において我々は、光照射下かつ分子狭雑環境下において、標的タンパク質と選択的に共有結合を形成する2種類の核酸誘導体の開発に成功した。開発した2種類のオリゴ核酸は標的タンパクに結合している核酸を配列選択的に認識しながら、標的タンパク質表面のアミノ酸残基と光照射をトリガーとして化学結合を形成する性質を持つことから、タンパク質を標的とした核酸医薬として、これまでに報告されていない核酸医薬の新しいプラットフォームを提供する結果が得られたと考えている。今後は、得られた光架橋核酸-タンパク質共有結合体の解析を行うとともに、光架橋性核酸を利用したタンパク質活性阻害法の汎用性について検討する。

研究成果の概要(英文)：In this research period, we succeeded in developing two types of nucleic acid derivatives (1) and (2) that selectively form covalent bonds with target proteins that have the ability to bind to nucleic acids under light irradiation and in a molecularly crowded environment. Nucleic acid derivative (1)：By using oligonucleic acid derivatives with a diazirine moiety at the 5' end, RNaseH-ASO complexes were successfully constructed with high efficiency and sequence selectivity. Nucleic acid derivative (2)：we newly developed photoresponsive cross-linking nucleotides with a chloraldehyde derivative protected by a nitrobenzyl group at the 3' end. By using the oligonucleotides, the activity of telomerase, which is highly expressed in cancer cells and the highly important target protein for anticancer reagents, were selectively inhibited using light irradiation as a trigger under molecularly crowded environment.

研究分野：核酸化学

キーワード：アンチセンス 核酸医薬 光反応

1. 研究開始当初の背景

正常細胞とがん細胞の“分子レベルの違い”を利用して効果を発揮する医薬品として、生体分子を基本骨格にもつ分子標的薬が開発されている。そのなかでも核酸を基本骨格にもつアンチセンス核酸(ASO)は、化学合成可能であるため大量供給と製品の質の確保が容易である、塩基配列を選定するだけで論理的に薬剤デザインが可能である、セントラルドグマ中の翻訳過程を停止できるため、あらゆる疾患原因タンパクの生成を選択的に制御可能である、という3つの大きな特徴を持つことから、分子標的薬の有望株として日米欧の製薬会社やベンチャー企業から高い注目を集めている。しかしながら、ASOは「標的 mRNA の切断に核酸分解酵素(RNaseH)の活性を必要とするため、RNaseH 低発現細胞中ではほとんど活性を示さない」という問題を抱えている。この課題を解決するために、mRNA と高い結合能をもつ ASO の開発がされているが、現在のところ問題の根本的な解決には至っていない。そのような状況ではあるが、近年では次世代シーケンス技術の進歩と国際共同研究の加速に伴い、ガンをはじめとする様々な疾患と遺伝子変異との関係が明らかになってきており、遺伝子変異配列を直接標的とすることのできる核酸医薬品のニーズがますます高くなってきている。

核酸医薬品の実用化にとってもう一つの大きな障壁となっているのが、デリバリーに関する問題である。

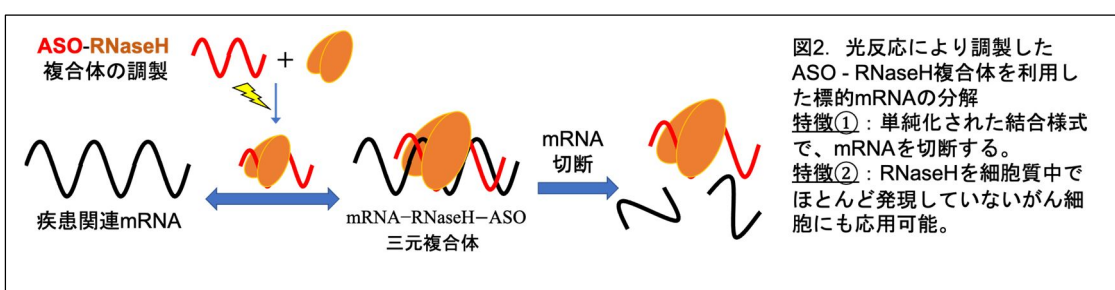
そこで我々は本研究において、既存のアンチセンス核酸(ASO)の利点をすべて兼ね備え、かつ ASO のもつ問題点を払拭した次世代分子標的薬として「核酸-RNA 分解酵素複合体を母核にもつ分子標的薬」を提案する。

2. 研究の目的

当該研究期間の大きな目標として、標的 mRNA の活性制御に利用されるアンチセンス核酸の機能強化(目標 1)を挙げていたが、研究の進捗に従って新たな研究目標として標的タンパクの活性制御を目的とした研究(目標 2)についても実施するに至った。

目的 1 : RNaseH 低発現細胞において活性を発揮できる新しい分子標的薬の開発

アンチセンス核酸(ASO)は標的 mRNA と細胞質中でヘテロ二重鎖を形成するが、RNaseH の多くは核内で発現しているため、ヘテロ二重鎖の存在する細胞質での発現は非常に低い。そのため mRNA-RNaseH-ASO 三元複合体の形成効率が低くなり、mRNA 切断活性が向上しない。また、がん細胞の代謝系は通常細胞と著しく異なるため、RNaseH が細胞質中にほとんど発現していないがん細胞が生産されることも予想される。mRNA 切断活性を向上させるためには、RNaseH 濃度が極めて低い環境下においても mRNA-RNaseH-ASO 三元複合体を効率よく形成させる工夫が必要である。そこで我々はどのような細胞においても効率的に mRNA-RNaseH-ASO 三元複合体を形成させるために、図 2 に示すように共有結合で架橋された ASO-RNaseH 複合体を分子標的薬として利用することを報告する。



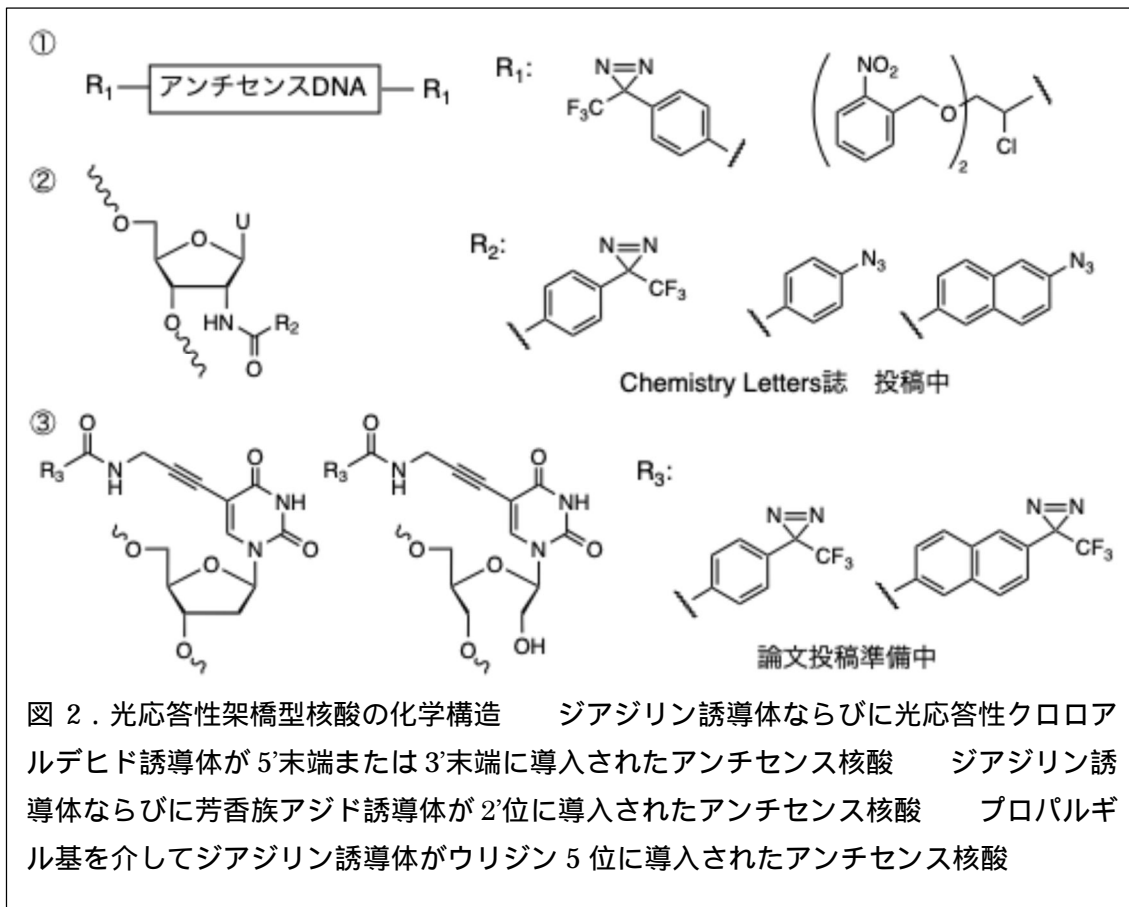
目的2：テロメラーゼを標的とした新しい核酸医薬品の開発

光照射をトリガーとして標的分子と反応する光応答性架橋剤は、タンパク質と結合するリガンドに導入することでタンパク質とリガンドとの相互作用解明ならびにタンパク質の機能制御等に利用されている。目的1に示したRNaseHを標的とした光応答性核酸も特定タンパク質を標的とした光応答性架橋剤に含まれる。我々は、特定タンパク質の制御法の新しいプラットフォーム構築を目指し、光架橋性核酸を利用した手法の開発を目指した研究を展開する。具体的には、抗がん剤のターゲットタンパク質であるテロメラーゼの活性阻害剤の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 光応答性アンチセンス核酸の設計と化学合成

図1に示す光応答性架橋型核酸を設計し、標的RNAならびに標的タンパク質との華僑特性について評価した。



(2) 光架橋特性評価

図1に示す①～③の核酸誘導体と標的生体分子との架橋反応特性について、ゲル電気泳動を利用することで評価した。

4. 研究成果

核酸誘導体 に関する知見：

5'末端にジアジリン誘導体ならびに光応答性クロロアルデヒド誘導体を導入したアンチセンスDNAは相補的なRNAと配列選択的に強固な二重鎖を形成した。また、光応答性

クロロアルデヒド誘導体を導入したアンチセンス DNA は、光照射をトリガーに用いることで RNaseH と効率的に共有結合を持つ複合体を形成することが明らかとなった。RNaseH との架橋反応効率の向上、ならびに(目的 1)の実現には架橋ぶちと反応点をより近接させる必要があることが明らかとなったため、現在は、さらに高効率に複合体を形成可能な誘導体として、ジアジリン部位の近傍に電荷を付与した誘導体の開発を行っている。

つぎに、抗がん剤の標的タンパクの一つであるテロメラーゼの活性制御についても検討した。Telomerase Repeat Amplification Protocol Assay(TRAP アッセイ)を利用して、ジアジリン誘導体または光応答性クロロアルデヒド誘導体を導入したアンチセンス DNA のテロメラーゼ阻害効果を評価した結果、3' 末端に光応答性クロロアルデヒド誘導体を導入することで阻害効果を 30 倍増強可能であることを明らかにした。現在、さらに阻害効果の高いアンチセンス核酸の開発を行うとともに、光応答性部位と反応したアミノ酸残基の同定も計画している。

核酸誘導体 に関する知見：

光照射をトリガーとして標的核酸と高効率に共有結合を形成する光架橋型核酸として、ジアジリン誘導体ならびに芳香族アジド誘導体を糖部 2' 位に導入したアンチセンス核酸の開発を行った。芳香族アジド誘導体、ジアジリン誘導体を鎖中に有する光架橋性核酸(U_{dz} -ODN, U_{pa} -ODN, U_{na} -ODN)は、糖部とのリンカーに利用したアミド結合により局所的に二重鎖が不安定化されることで、高い架橋効率を示すことが明らかとなった。さらに、架橋反応速度($t_{1/2}$)の解析結果より、 U_{na} -ODN が細胞内での mRNA 阻害に有望な光架橋性核酸であることが明らかとなった。

核酸誘導体 に関する知見：

これまでにプロパルギル基を介してウリジンの 5 位にピレンを導入した誘導体(Base - discrimination fluorescent : BDF) が塩基対の形成の有無を用いて点変異を識別可能であることが報告されている。そこで我々は点変異遺伝子の活性を制御することを目指し、プロパルギル基を介してジアジリン誘導体がウリジン 5 位に導入されたヌクレオシドユニットを設計した。ゲル電気泳動を用いて標的核酸との架橋反応特性を評価した結果、核酸誘導体 は、ミスマッチ塩基対を形成した時のみ相補鎖と共有結合を形成することが明らかとなった。また、二重鎖融解温度を用いた様々な条件検討の結果、共有結合形成反応効率はジアジリン誘導体の導入されている部位近傍の局所構造の安定性に大きく依存することが明らかとなったことから、Unlocked Nucleic Acid(UNA)を導入した誘導体についても設計した。その結果、UNA を導入することにより架橋効率を大きく向上させることに成功した。これらの知見は点変異に起因するガン化に対抗可能な医薬品の開発につながることから、抗がん剤の新たなプラットフォームとして大変重要な知見が得られたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 1. Yu Watari, Kaito Nakatani, Kazuya Matsuo, Tomonori Waku, Akio Kobori	4. 巻 7
2. 論文標題 Wash-free FISH of bacterial ribosomal RNAs by benzo[a]pyrene-modified oligonucleotides.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Results in Chemistry	6. 最初と最後の頁 101214
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rechem.2023.101214	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 Yu Watari, Kaito Nakatani, Kentaro Kobata, Kazuya Matsuo, Tomonori Waku and Akio Kobori	4. 巻 -
2. 論文標題 Ratiometric sandwich-type assays for RNAs with a point mutation using benzo[a]pyrene-modified probes	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D4CC02188F	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 北村 真知子
2. 発表標題 多環芳香族アジド誘導体を有する新規光架橋性核酸の開発
3. 学会等名 第13回4大学連携フォーラム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小畑 健太郎
2. 発表標題 光架橋性核酸を用いたDNA-RNase H複合体の構築
3. 学会等名 第13回4大学連携フォーラム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宇仁田 大樹
2. 発表標題 点変異を標的としたジアジリン修飾光架橋性核酸の開発
3. 学会等名 第13回4大学連携フォーラム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kentaro Kobata, Kazuya Matsuo, Tomonori Waku, Akio Kobori
2. 発表標題 Construction of DNA-RNase H conjugates using photo-cross-linking ODNs
3. 学会等名 ISNAC2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松原一稀、辰巳颯一、松尾和哉、和久友則、小堀哲生
2. 発表標題 ジアジリン残基を導入した光架橋性拡散によるテロメラーゼ活性阻害
3. 学会等名 日本核酸医薬学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松原一稀、松尾和哉、和久友則、小堀哲生
2. 発表標題 細胞抽出液中における光架橋性核酸の反応性
3. 学会等名 第12回4大学連携研究フォーラム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小畑健太郎、松原一稀、松尾和哉、和久友則、小堀哲生
2. 発表標題 Reactivity of photo-cross-linking ODNs in cellular extracts
3. 学会等名 ISNAC2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 宇仁田 大樹、小畑健太郎、松原一稀、松尾和哉、和久友則、小堀哲生
2. 発表標題 点変異を標的としたジアジリン修飾光架橋性核酸の開発
3. 学会等名 日本化学会第103回春季年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小畑健太郎、Ivana dvorakova、太田良、辰巳颯一、和久友則、小堀哲生
2. 発表標題 点変異mRNA選択的な遺伝子発現抑制を志向した光応答性 -プロモアルデヒド修飾核酸の開発
3. 学会等名 第15回バイオ関連化学シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小畑健太郎、Ivana dvorakova、太田良、辰巳颯一、和久友則、小堀哲生
2. 発表標題 光応答性 -ハロアルデヒドを鎖中に導入したアンチセンス核酸の開発と架橋特性評価
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6回年会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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