



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

糖部5'-C-アミノアルキル修飾核酸の合成と核酸医薬への応用

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-06-24 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 梶野, 瞭平 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/88142

要 約

氏 名 梶 野 瞭 平

Name

題 目 糖部 5'-C-アミノアルキル修飾核酸の合成と核酸医薬への応用

Title of Dissertation

学位論文要旨(Dissertation Summary)

siRNA (small interfering RNA) やアンチセンス核酸 (ASO) 等の核酸医薬は、人工的に合成したオリゴ核酸を用いて遺伝子発現を制御する医薬品である。核酸医薬は mRNA や Pre-mRNA 等の遺伝子に直接作用するため、低分子医薬及び抗体医薬等による治療ができない疾患に対する医薬品として期待されている。しかし、オリゴ核酸は 1) 生体内の核酸分解酵素 (ヌクレアーゼ) による分解を受ける、2) 疎水性の細胞膜を透過できないため細胞内移行性が極めて低い、3) 標的組織指向性に乏しい等の課題があり、siRNA や ASO の医薬品化を目指した化学修飾核酸やドラッグデリバリーシステムの開発が行われている。本論文では、siRNA 及び ASO への適用が可能な化学修飾核酸の合成及び機能評価を行った結果について述べる。また、核酸医薬を標的組織特異的に送達する技術、特にガン細胞への核酸医薬の送達技術の開発を目指し、糖鎖をリガンド分子として用いた糖鎖-核酸コンジュゲートの合成及びその遺伝子発現抑制能について評価した結果についても述べる。

1. siRNA 及び ASO へ応用可能な化学修飾核酸の開発

我々の研究室では、オリゴ核酸の糖-リン酸バックボーン上にアミノプロピル基を有する糖部 4'-アミノプロピル修飾核酸 (4'-AP-U) が、siRNA のヌクレアーゼ抵抗性を増強することを報告している。しかしながら、リボース環内炭素原子である糖部 4'位へのアミノアルキル基の導入は、リボース環の立体配座を変化させ、siRNA 二重鎖を熱的に不安定化することが明らかとなっている。そこで本研究では、糖部 5'位炭素原子がリボース環外であることに着目し、糖部 5'-C-アミノプロピル修飾核酸を設計した。糖部 5'位炭素原子への化学修飾は立体異性体が生じるため、本研究では (R)-5'-C-アミノプロピル修飾核酸((R)-5'-AP-U) 及び(S)-5'-C-アミノプロピル修飾核酸 ((S)-5'-AP-U) を新規に合成した。

(S)-5'-AP-U 及び(R)-5'-AP-U は 4'-AP-U と比較して、糖部のコンホメーションが C3'-endo 型であり、特に(S)-5'-AP-U を含む RNA 二重鎖が 4'-AP-U 及び(R)-5'-AP-U を含む RNA 二重鎖よりも高い熱的安定性を有することが明らかとなった。加えて、(S)-5'-AP-U を含むオリゴ核酸は、4'-AP-U 及び(R)-5'-AP-U よりもウシ血清中で高いヌクレアーゼ抵抗性を示した。以上の結果から、(S)-5'-AP-U はこれまでに報告した 4'-AP-U と比べ、優れた RNA 二重鎖形成能及びヌクレアーゼ抵抗性を示し、より核酸医薬に適した修飾核酸であると考えられる。

1-1) (S)-5'-C-アミノプロピル修飾核酸の siRNA への応用

次に、(S)-5'-AP 修飾を siRNA 医薬へ応用するため、これまでに合成した(S)-5'-AP-U に加え、(S)-5'-C-

アミノプロピル修飾核酸のシチジン誘導体 ((S)-5'-AP-C), アデノシン誘導体 ((S)-5'-AP-A), グアノシン誘導体 ((S)-5'-AP-G) を新規に合成した。続いて、(S)-5'-AP 修飾を含む siRNA の性質を詳細に検証した結果、パッセンジャー鎖の中央部分に(S)-5'-AP 修飾を含む siRNA に関しては、遺伝子発現抑制能が著しく低下する一方、パッセンジャー鎖の末端部分に(S)-5'-AP 修飾を含む siRNA では、同じ位置に 2'-OMe 修飾を含む siRNA と同等の遺伝子発現抑制能を示した。加えて、パッセンジャー鎖両末端部分もしくは 3'-末端部分のみに(S)-5'-AP 修飾を含む siRNA は、同じ位置に 2'-OMe 修飾を含む siRNA よりも高いヌクレアーゼ抵抗性を示した。以上より、siRNA の末端部分、特にパッセンジャー鎖の 3'-末端部分へ(S)-5'-AP 修飾を導入することで、高い遺伝子発現抑制能を保持しながら、ヌクレアーゼ抵抗性を増強できることが示唆された。

1-2) (S)-5'-C-アミノプロピル修飾核酸のアンチセンス核酸への応用

(S)-5'-AP 修飾核酸の ASO への応用を目指し、(S)-5'-AP-U 及び(S)-5'-AP-C を含む Gapmer 型 ASO の合成と機能評価を行った。その結果、(S)-5'-AP-C を含む ASO は、同じ位置に 2'-OMe 修飾を含むものよりも標的 RNA 結合親和性が高いことが確認され、これはアミノアルキル鎖の末端アミノ基の正電荷によりリン酸バックボーンの負電荷が中和されたためであることが示唆された。さらに、(S)-5'-AP 修飾核酸を含む ASO は、同じ位置に 2'-OMe 修飾核酸を含む ASO と比べ、高い遺伝子発現抑制能を示した。以上より、(S)-5'-AP 修飾核酸を含む ASO は 2'-OMe 修飾核酸と比べ、高い標的 RNA 親和性及び遺伝子発現抑制能を有することが明らかとなった。

2. 糖鎖核酸コンジュゲートの合成及び機能評価

核酸医薬を組織特異的に送達するための新たなリガンド-核酸コンジュゲートとして、*N*-アセチルラクトサミン (LacNAc)-ASO コンジュゲートを設計した。ホスホロアミダイト法により LacNAc-ASO コンジュゲートを構築するため、*N*-アセチルグルコサミン誘導体を出発物質として、11 段階総収率 12% で目的の LacNAc-ホスホロアミダイトを合成した。続いて、LacNAc-ASO コンジュゲートの標的 RNA との二重鎖形成能及び RNase H 活性化能を評価した結果、LacNAc 分子を含まない ASO と同様に標的 RNA と熱的に安定な二重鎖を形成し、RNase H による標的 RNA 鎖の切断を引き起こすことが明らかとなった。最後に、LacNAc-ASO コンジュゲートの遺伝子発現抑制能を評価した結果、1 分子の LacNAc を結合した ASO では、LacNAc を結合していない ASO と同等の遺伝子発現抑制能を示した。一方、3 分子の LacNAc を結合した ASO では遺伝子発現抑制能が大きく低下することが明らかとなった。したがって、LacNAc 分子と ASO が結合した状態では遺伝子発現抑制能が低下することから、今後、細胞内で開裂するリンカーを介して LacNAc 分子を ASO に結合する等、新たな分子設計により高い遺伝子発現抑制能を有する LacNAc-ASO コンジュゲートの開発が可能になると考えられる。