



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

氏 名 (本 国 籍)	梶野 瞭平 (愛知県)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 7 7 9 号
学 位 授 与 年 月 日	令和 4 年 3 月 1 4 日
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 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
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教授 安藤 弘 宗 副査 岐阜大学 教授 上野 義 仁 副査 静岡大学 教授 小川 直 人

論 文 の 内 容 の 要 旨

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、これまで低分子医薬及び抗体医薬等による治療が困難な疾患に対する新たな医薬品になるものと期待されている。しかし、天然のオリゴ核酸は、1) 生体内の核酸分解酵素 (ヌクレアーゼ) により容易に分解される、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、このため、siRNA や ASO の医薬品化を目指し、化学修飾した核酸並びに標的組織へ送達可能なドラッグデリバリーシステムの開発が行われている。このような背景のもと 申請者 梶野瞭平は、siRNA 及び ASO への適用が可能な化学修飾核酸の設計・合成及び機能評価を行った。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。

1. siRNA 及び ASO へ応用可能な化学修飾核酸の開発

当該研究室では、これまでにオリゴ核酸の糖-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、リボース環の配座を変化させ、siRNA 二重鎖を熱的に不安定化することも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はこれまでに報告された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示唆された。

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明らかとなった。

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*-アセチルラクタクトサミン (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が、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、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である。

審査結果の要旨

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、これまで低分子医薬及び抗体医薬等による治療が困難な疾患に対する新たな医薬品になるものと期待されている。しかし、天然のオリゴ核酸は、1) 生体内の核酸分解酵素 (ヌクレアーゼ) により容易に分解される、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、このため、siRNA や ASO の医薬品化を目指し、化学修飾した核酸並びに標的組織へ送達可能なドラッグデリバリーシステムの開発が行われている。このような背景のもと申請者 梶野瞭平は、siRNA 及び ASO への適用が可能な化学修飾核酸の設計・合成及び機能評価を行った。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。

1) siRNA 及び ASO へ応用可能な化学修飾核酸の開発

1-1) 5'-C-アミノプロピル修飾核酸の siRNA への応用

先ず、糖部 5'-位へアミノプロピル基を導入した(R)-5'-C-アミノプロピル修飾ウリジン ((R)-5'-AP-U) 及び (S)-5'-C-アミノプロピル修飾ウリジン ((S)-5'-AP-U) を設計・合成し、これらのヌクレオシドアナログを含む RNA の性質を検証した。その結果、特に(S)-5'-AP-U を含む RNA 二重鎖は、従来の 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、(S)-5'-AP-U を含むオリゴ RNA は、4'-AP-U 及び(R)-5'-AP-U を含むオリゴ RNA よりもウシ血清中で高いヌクレアーゼ抵抗性を示すことを見出した。以上の結果から、(S)-5'-AP-U は、核酸医薬に適した修飾ヌクレオシドであることが示唆された。続いて、(S)-5'-AP 修飾を siRNA 医薬へ応用するため、(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) の合成法を確立した。これら 4 塩基の(S)-5'-AP 修飾を含む siRNA の性質を詳細に検証した結果、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を見出した。

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 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を見出した。

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-アセチルラクタサミン (LacNAc)-ASO コンジュゲートを設計し、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ことに成功した。LacNAc-ASO コンジュゲートは、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、3 分子の LacNAc を結合した ASO では遺伝子発現抑制能が低下する一方、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すことを見出した。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

【基礎となる学術論文】

- 1) [Kajino, R.; Maeda, Y.; Yoshida, H.; Yamagishi, K.; Ueno, Y. "Synthesis and biophysical characterization of RNAs containing \(R\)- and \(S\)-5'-C-aminopropyl-2'-O-methyluridine" *Journal of Organic Chemistry*, 84, 3384–3404 \(2019\).](#)
- 2) [Kajino, R.; Ueno, Y. "\(S\)-5'-C-Aminopropyl-2'-O-methyl nucleosides enhance antisense activity in cultured cells and binding affinity to complementary single-stranded RNA" *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 30, 115925 \(2021\).](#)
- 3) [梶野瞭平, 上野義仁 "核酸医薬を指向したカチオン性側鎖を有する新規人工核酸の合成" *有機合成化学協会誌*, 79, 1102–1112 \(2021\).](#)

【既発表学術論文】

- 1) Uematsu, A.; Kajino, R.; Maeda, Y.; Ueno, Y. “Synthesis and characterization of 4'-C-guanidinomethyl-2'-O-methyl-modified RNA oligomers” *Nucleosides Nucleotides and Nucleic Acids*, 39, 280–291 (2020).
- 2) Tsuchihira, T.; Kajino, R.; Maeda, Y.; Ueno, Y. 4'-C-Aminomethyl-2'-deoxy-2'-fluoroarabinonucleoside increases the nuclease resistance of DNA without inhibiting the ability of a DNA/RNA duplex to activate RNase H” *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 28, 115611 (2020).
- 3) 梶野瞭平, 上野義仁 “アンチセンス核酸の毒性発現メカニズムと毒性低減に向けた化学的アプローチ” 日本核酸医薬学会誌, 24, 35–43 (2020).
- 4) Matsubara, M.; Honda, K.; Ozaki, K.; Kajino, R.; Kakisawa, Y.; Maeda, Y.; Ueno, Y. “Synthesis of siRNAs incorporated with cationic peptides R8G7 and R8A7 and the effect of the modifications on siRNA properties” *RSC Advances*, 10, 34815–34824 (2020).
- 5) Tsukimura, R.; Kajino, R.; Zhou, Y.; Chandra, A.; Ueno, Y. “4'-C-Aminoethoxy modification enhanced nuclease resistance of RNAs and improved thermal stability of RNA duplexes” *Results in Chemistry*, 3, 100231 (2021).