

「新機能創出を目指した分子技術の構築」
平成 24 年度採択研究代表者

H25 年度
実績報告

横田 隆徳

東京医科歯科大学 脳神経病態学分野
教授

画期的な新規核酸医薬の分子技術の創出

§ 1. 研究実施体制

(1)「横田」グループ

- ① 研究代表者:横田 隆徳 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・ヘテロ2本鎖核酸の生体内および細胞内の輸送経路や標的遺伝子抑制の細胞内部位・抑制機構の検索
 - ・新規ヘテロ核酸の創成

(2)「和田」グループ

- ① 主たる共同研究者:和田 猛 (東京理科大学薬学部、教授)
- ② 研究項目
 - ・立体が制御されたホスホロチオエート結合を有する架橋型人工核酸
 - ・立体が制御されたホスホロチオエート結合を有する架橋型人工核酸と非架橋型核酸のヘテロ分子の自動合成
 - ・オリゴジアミノマンノース、オリゴジアミノガラクトースとヘテロ2本鎖核酸の相互作用
 - ・オリゴカチオンニックペプチドの設計と2本鎖核酸との相互作用、ヌクレアーゼ耐性評価

(3)「小比賀」グループ

- ① 主たる共同研究者:小比賀 聡 (大阪大学大学院薬学研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・リン原子上のキラリティー制御に資する新規な架橋型人工核酸の設計・合成・機能評価

(4)「村上」グループ

① 主たる共同研究者:村上 正裕 (大阪大谷大学薬学部、教授)

② 研究項目

「核酸分子の経口投与を達成するための分子技術の開発」

・*In vitro* 腸管上皮透過性評価モデルによる核酸製剤に用いる腸管上皮透過性を修飾する各種透過性修飾分子の効果の検討

・核酸分子の腸管透過過程における安定性に関する基礎評価系の確立

(5)「津本」グループ

① 主たる共同研究者:津本 浩平 (東京大学医科学研究所、教授)

② 研究項目

・神経細胞系への DDS 分子技術の検討

§ 2. 研究実施の概要

1) リン原子上のキラリティーを制御したヘテロ2本鎖核酸の設計(和田・小比賀グループ)

和田グループではこれまでに合成法を確立したプロトタイプの架橋型人工核酸(LNA)のリン原子上のキラリティー制御技術(オキサザホスホリジン法)を用い、立体が制御されたホスホロチオエート結合を有するプロトタイプの架橋型人工核酸と非架橋型核酸のヘテロ分子の自動合成を行った。

小比賀グループでは、プロトタイプの 2',4'-BNA/LNA モノマーの安定供給に向けて、グラムスケールでの合成を実施した。プリン塩基を導入した 2',4'-BNA/LNA モノマーに関して、リン原子上のキラリティー制御技術を検証する和田グループへと供給した。高い遺伝子発現抑制効果を維持しつつ、リン原子上のキラリティー制御に適すると予想される新たな架橋型人工核酸を複数設計し、そのうちいくつかのものに関してモノマー合成を達成し、オリゴヌクレオチドへの導入にも成功した。

2) 2本鎖核酸の主溝に静電的に結合する新規カチオン性分子の設計(和田・横田グループ)

A型2重らせん構造を有する2本鎖核酸の主溝に静電的に結合し、2本鎖の熱的安定性とエンドヌクレアーゼ耐性を向上させる機能を有する新規カチオン性分子として新たにオリゴジアミノマンノース(ODAMan)およびオリゴジアミノガラクトース誘導体(ODAGal)の合成に成功し、ヘテロ2本鎖核酸への結合能を評価した。さらに、肝臓へのデリバリーを指向した、トコフェロールが結合したオリゴジアミノガラクトース誘導体を合成し、その物性を評価した。一方、昨年度合成に成功した、種々のカチオン性人工ペプチドについて、ヘテロ2本鎖核酸との相互作用を詳細に解析し、種々のヌクレアーゼに対する耐性について評価した。

3) ヘテロ2本鎖核酸の標的遺伝子抑制の細胞内部位・抑制機構(横田グループ)

ビタミンE結合ヘテロ核酸のマウス血清中でのキャリアが high density lipoprotein (HDL)であることを Gel-shift assay 法および Fluorescence correlation spectroscopy (FCS)法で明らかにした。また、困難であった 13mer の短い核酸の絶対定量系として定量的 RT-PCR 法および ELISA 法を確立してビタミンE結合ヘテロ核酸の静脈注射による肝臓への到達効率が、1本鎖アンチセンス核酸に比較して 3.9 倍に上昇していることを明らかにした。

さらに、超解像度顕微鏡(N-STORM)を用いた解析により、マウス肝細胞内のヘテロ核酸の2本鎖の分離(unwind)は細胞質内の複数の特定の foci で起っており、核内へは主にアンチセンス鎖のみが到達していることが示された。

4) ヘテロ2本鎖核酸の DDS 分子技術の検討(津本・横田グループ)

ペプチド・抗体を基盤としたデリバリー分子の開発と、それらの核酸分子への融合法について検討を行っている。本年度は、前者においては、血管内皮細胞に対して結合するシングルドメイン抗体の探索系を検討し、これを立ち上げた。シングルドメイン抗体は、熱安定性・修飾容易性・デリバリーにおける拡散能にすぐれた分子である。また、後者においては、融合法、そのためのシングルドメイン抗体の取得法について検討を行った。

5) 核酸分子の経口投与を達成するための分子技術の開発(村上・横田グループ)

新規の機能性キメラ核酸分子の経口製剤(DDS)の開発に必要な分子技術基盤の確立を目的として、今年度は、(1)腸管粘膜透過の制御に関する技術基盤に関する検討及び(2)核酸分子の安定性評価に関する基礎研究を実施した。すなわち、前年度に導入したヒト大腸上皮細胞 Caco-2

単層培養系において、各種の透過性修飾分子の効果の比較検討を実施し、従来の脂肪酸類に加えて、透過性亢進作用を示す新規の透過性修飾分子を発見した。また、モデル核酸であるビタミンEを結合した siRNA (VE-siRNA)の膜透過に及ぼす効果を評価した。一方、RNase 類の酵素活性を指標に腸管粘膜ホモジネートを用いた核酸分子の分解性の *in vitro* 評価系を確立するための基礎検討を実施し、核酸分子の安定性に関する予備的検討を通じて本評価系の妥当性を検証した。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

論文詳細情報(国内)

なし

論文詳細情報(国際)

1. Hirai T, Enomoto M, Kaburagi H, Sotome S, Yoshida-Tanaka K, Ukegawa M, Kuwahara H, Yamamoto M, Tajiri M, Miyata H, Hirai Y, Tominaga M, Shinomiya K, Mizusawa H, Okawa A, Yokota T. Intrathecal AAV Serotype 9-mediated Delivery of shRNA Against TRPV1 Attenuates Thermal Hyperalgesia in a Mouse Model of Peripheral Nerve Injury. *Mol Ther* 2014; 22(2): 409-419. (doi: 10.1038/mt.2013.247.)
2. Machida A, Kuwahara H, Mayra A, Kubodera T, Hirai T, Sunaga F, Tajiri M, Hirai Y, Shimada T, Mizusawa H, Yokota T. Intraperitoneal administration of AAV9-shRNA inhibits target gene expression in the dorsal root ganglia of neonatal mice. *Mol Pain* 2013; 18: 9-36. (doi: 10.1186/1744-8069-9-36.)
3. Nishina K, Mizusawa H, Yokota T. Short interfering RNA and the central nervous system: development of nonviral delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv* 2013 ;10(3): 289-292. (doi: 10.1517/17425247.2013.748746.)
4. Piao W, Nishina K, Yoshida-Tanaka K, Kuwahara H, Nishina T, Sakata M, Mizusawa H, Yokota T. Efficient *in vivo* delivery of antisense oligonucleotide to choroid plexus. *Journal of Medical and Dental Sciences* 2013; 60 (1): 9-16.
5. Oka N, Tatsumi S, Matsumura F, Wada T. Glycosylation of alcohols using glycosyl boranophosphates as glycosyl donors. *Tetrahedron Lett* 2013; 54: 3731-3734. (DOI:

10.1016/j.tetlet.2013.04.032)

6. Ohmuro-Matsuyama Y, Nakano K, Kimura A, Ayabe K, Ihara M, Wada T, Ueda H. A Protein-Protein Interaction Assay Based on the Functional Complementation of Mutant Firefly Luciferases. *Anal. Chem* 2013; 85: 7935-7940.(DOI: 10.1021/ac4016825)
7. Noro M, Fujita S, Wada T. Stereoselective Synthesis of P-Modified α -Glycosyl Phosphates by the Oxazaphospholidine Approach. *Org. Lett* 2013; 15: 5948-5951. (DOI: 10.1021/ol402785h)
8. * Iwata R, Nishina K, Yokota T, Wada T. Synthesis and properties of double-stranded RNA-bindable oligodiaminogalactose derivatives conjugated with vitamin E. *Bioorg Med Chem* 2014; 22: 1394-1403.(DOI: 10.1016/j.bmc.2013.12.060)
9. Saito K, Wada T. 3-Nitro-1,2,4-triazol-1-yl-tris(pyrrolidin-1-yl)phosphonium hexafluorophosphate (PyNTP) as a condensing reagent for solid-phase peptide synthesis. *Tetrahedron Lett* 2014; 55: 1991-1993.(DOI: 10.1016/j.tetlet.2014.02.013)
10. Uehara S, Hiura S, Higashida R, Oka N, Wada T. Solid-phase Synthesis of P-Boronated Oligonucleotides by the H-Boranophosphonate Method. *J Org Chem* (in press)
11. Oka N, Murakami R, Kondo T, Wada T. Stereocontrolled synthesis of dinucleoside phosphorothioates using a fluorous tag. *J. Fluor. Chem.* 2013; 150: 85-91.(DOI: 10.1016/j.jfluchem.2013.03.013)
12. Maeda Y, Iwata R, Wada T. Synthesis of novel oligocationic peptides binding to RNA duplexes. *Peptide Science* 2012 2013; 23-24.

(3-2) 知財出願

- ① 平成 25 年度特許出願件数(国内 3 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 3 件)