

「新規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

H27 年度
実績報告書

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

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本鎖核酸の血中キャリアー蛋白・細胞内取り込み機構の解明
- ・ヘテロ2本鎖核酸の副作用評価(肝毒性・off target 効果)

(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新規架橋型人工核酸の合成
- ・立体が制御されたホスホロチオエート結合を有するホスフェート/ホスホロチオエート(PO/PS)キメラ型人工核酸の合成
- ・高活性核酸医薬の分子選択とリン原子絶対立体配置の決定手法の開発
- ・オリゴカチオンニックペプチドによるヘテロ2本鎖核酸の安定化

(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 生物有機化学分野、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 薬剤学講座、教授)

② 研究項目

「核酸分子の経腸管投与を達成するための分子技術の開発」

- ・核酸分子の大腸粘膜透過制御に関する検討
- ・核酸分子の腸管における安定性の制御に関する検討

(5)「津本」グループ

① 主たる共同研究者:津本 浩平 (東京大学 大学院工学系研究科 バイオエンジニアリング専攻、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)

和田グループでは昨年度に引き続き、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および小比賀グループが合成した新規架橋型人工核酸を含むオリゴマーの固相合成を行った。

また、ヘテロ2本鎖核酸の合成において必須な、ホスフェート結合と立体が制御されたホスホロチオエート結合を適切な場所に配置した PO/PS キメラ型核酸の立体選択的合成を検討した。

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)

昨年度までに、L-2,4-ジアミノブタン酸オリゴマー (Dab8) 及び L-2-アミノ-4-グアニジノブタン酸オリゴマー (Agb8) が、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本鎖の熱的安定性を顕著に向上させることを明らかにした。今年度は、それらの ApoB を標的とするヘテロ2本鎖核酸への結合能とヌクレアーゼ耐性に及ぼす効果を評価した。

3) 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 (小比賀グループ)

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資すると予想される新たな人工核酸として、三環性人工塩基を有する糖部架橋型人工核酸 BNAP を設計し、そのヌクレオシド体及びオリゴヌクレオチドへの導入に成功した。BNAP は相補鎖 DNA 及び RNA に対して、プロトタイプの 2',4'-BNA/LNA を上回る優れた二重鎖形成能を有することを見出した。一方、既にシクロプロパン導入型糖部架橋型核酸 *scpBNA* が、プロトタイプの 2',4'-BNA/LNA と同等の優れた二重鎖形成能と分解酵素に対する安定性を有することを見出している。本年度は全 4 塩基を有する *scpBNA* のヌクレオシド体の合成を達成し、そのオリゴヌクレオチドへの導入にも成功した。

4) ヘテロ2本鎖核酸の血中キャリアー・細胞内取り込み機構及び副作用の解明(横田グループ)

昨年度までにビタミン E 結合ヘテロ2本鎖核酸のマウス血清中でのキャリアーに lipoprotein が関与していることを見出していた。本年度は lipoprotein が血中キャリアー機能を有するだけでなく、細胞内取り込みにも関与することを明らかにした。また、ビタミン E 結合ヘテロ2本鎖核酸における副作用の詳細な評価から、高い LDL 抑制効果を保持したまま肝毒性の軽減に成功した。一方で、off target 効果の評価として ApolipoproteinB (ApoB) mRNA 標的のアンチセンス核酸を用いてマイクロアレイ解析を行い、従来の1本鎖核酸、ビタミン E 結合ヘテロ2本鎖核酸の両者において複数の off target 遺伝子が存在し、今後の clinical application に off target 回避は大きな課題であることが明らかとなった。一方で、両者の off target 遺伝子は共通であり、ビタミン E 結合ヘテロ2本鎖核酸の off target 遺伝子は主鎖である1本鎖核酸の配列に依存することが明らかとなった。

5) 核酸分子の経腸管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)

当チームで新規に開発されたヘテロ2本鎖核酸を、マウスの大腸から標的臓器である肝臓に選択的に送達することに成功した。また、これに基づく標的遺伝子の発現抑制を確認し、さらに、この核

酸分子が大腸上皮を透過する過程では、透過促進剤のみならず、ビタミン E による分子修飾が重要であることを、*in vitro* の検討から明らかにした。

6) 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。この研究では、抗体の特異性をもち、かつ熱安定性・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シングルドメイン抗体を用いる。ドメイン抗体に対して高効率に核酸分子を融合する手法については前年度までにすでに確立されている。デリバリー分子の開発においては、前年度に引き続き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を行っている。本年度は前年度の探索系の課題点を改善した探索を新たに行い、取得されたドメイン抗体の評価系構築を開始した。

代表的な原著論文:

● Kazutaka Nishina, Wenying Piao, Kie Yoshida-Tanaka, Yumiko Sujino, Tomoko Nishina, Tsuyoshi Yamamoto, Keiko Nitta, Kotaro Yoshioka, Hiroya Kuwahara, Hidenori Yasuhara, Takeshi Baba, Fumiko Ono, Kanjiro Miyata, Koichi Miyake, Punit P. Seth, Audrey Low, Masayuki Yoshida, C. Frank Bennett, Kazunori Kataoka, Hidehiro Mizusawa, Satoshi Obika and Takanori Yokota. "DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide for highly efficient gene silencing", *Nat Commun.* vol. 10, pp.7969-7981, 2015

● Nukaga, Y., Oka, N., Wada, T. "Stereocontrolled Solid-Phase Synthesis of Phosphate/Phosphorothioate (PO/PS) Chimeric Oligodeoxyribonucleotides on an Automated Synthesizer Using an Oxazaphospholidine-Phosphoramidite Method", *J. Org. Chem.* **81**, 2753-2762, 2016.

● Takao Yamaguchi, Masahiko Horiba and Satoshi Obika, "Synthesis and properties of 2'-O,4'-C-spirocyclopropylene bridged nucleic acid (scpBNA), an analogue of 2',4'-BNA/LNA bearing a cyclopropane ring", *Chem. Commun.*, vol.51, pp.9737-9740, 2015.