

「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

H24 年度 実績報告

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
 - ・キメラ2本鎖核酸の標的遺伝子抑制の細胞内部位・抑制機構
 - ・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

(2)「和田」グループ

- ① 主たる共同研究者:和田 猛 (東京大学大学院新領域創成科学研究科、准教授)
- 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キメラ分子の自動合成
 - ・オリゴジアミノグルコースとキメラ2本鎖核酸の相互作用、ヌクレアーゼ耐性、アンチセンス活性評価
 - ・オリゴカチオニックペプチドの設計と2本鎖核酸との相互作用

(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

(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

「経口吸収のための上皮透過促進分子の開発と製剤化」

・*In vitro* 腸管上皮透過性評価モデルの確立

・上記モデルを用いたトコフェロール修飾核酸分子の腸管上皮透過機構の解明

(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. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

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

小比賀グループの合成したプロトタイプの 2',4'-BNA/LNA モノマーを用いて、和田グループは糖部架橋構造を有するモノマーの合成、ホスホロチオエート2量体合成における縮合反応効率と立体選択性を評価したところ、非架橋型核酸誘導体と同等の収率、立体選択性で目的物が得られ、オキサザホスホリジン法が架橋型人工核酸にも適用可能であることがわかった。また、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キメラ分子の自動合成を小スケールで試験的にを行い、目的物の単離精製に成功した。

これに加えて、小比賀グループは次年度以降の検証に備え Amide-bridged nucleic acid (AmNA)や Hydroxamate-bridged nucleic acid (HxNA)等の架橋構造の異なる人工核酸モノマーの合成を進めた。また、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、その合成に着手した。

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の設計と合成を検討した。オリゴジアミノグルコース4量体を合成し、キメラ型2本鎖核酸と複合体を形成させたところ、その熱的安定性を向上させ、ヌクレアーゼ耐性が向上する効果を有することが確認できた。また、オリゴジアミノグルコースはキメラ型2本鎖核酸の遺伝子発現抑制効果に影響を及ぼさないことも確かめられた。一方、オリゴジアミノグルコースと同様の機能を有することが期待される種々のカチオン性人工ペプチドを設計、合成し、2本鎖核酸との相互作用を解析したところ、L-2,4-ジアミノブタン酸8量体とL-2-アミノ-3-グアニジノプロピオン酸8量体は、同じ正電荷を有するジアミノグルコース4量体よりも強く A 型2重らせん構造を有する2本鎖核酸に結合し、熱的安定化効果も大きいことがわかった。

3)キメラ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)

キメラ2本鎖核酸の標的遺伝子抑制の細胞内部位を、マウス肝臓の細胞質・核分画を分離して得られた mRNA を定量することで検討して、その両者において遺伝子抑制が起っている結果を得た。また、培養細胞系では、2本鎖の分離 (unwind) は細胞質内で起っていることが示された。

4)キメラ2本鎖核酸の DDS 分子技術の検討(津本グループ)

核酸が細胞組織内部へ効率的かつ安定に浸潤できる輸送分子として、分子サイズが小さく標的分子に対する特異性の高いシングルドメイン抗体 sdAb を採用した。まず sdAb の有用性を示すために、EGFR に対する抗体を作製し輸送効率の検討を行うこととした。高い結合親和性を示すシングルドメイン抗体 EG2 を採用し、その抗体作製を試みた。EG2 の発現ベクターを作製して、

大腸菌を用いて発現検討を行ない、その可溶性画分において EG2 に対応する分子サイズの蛋白質を大量発現にて確認できた。さらに、His タグに対するウェスタンブロッティングから、この蛋白質が目的の EG2 であることが示された。抗 EGFR シングルドメイン抗体 EG2 の発現ベクターを構築し、上記と同様に EG2 の発現を確認することに成功した。この抗 EGFR シングルドメイン抗体 EG2 を発現・精製後、核酸分子(2本鎖キメラ核酸)を融合させ、培養細胞に対する分子動態を追跡し、sdAb の輸送分子としての有用性を示す。

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(村上グループ)

核酸分子の経腸デリバリーを最適化するためには上皮透過性を改善するための分子技術の開発が必須である。*in vitro* 評価系として、上皮透過モデルであるヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞の単層培養系を選択し、製剤処方としては、マウスにおいて著効を示した脂質ミセル(MM)と核酸分子との複合体(LNP)を設計の基本として検討を開始した。LNP を *in vivo* で有効となる 5mM 以上の濃度で用いるために、刷子縁膜上に水性ゲルを積層する改良を施した。LNP(10mM MM)からの Cy3 標識 siRNA の膜透過を共焦点顕微鏡法によって評価したところ、トコフェロール修飾 siRNA は投与後 30 分から 90 分にかけて単層内への移行が観察されたが、トコフェロール非修飾 siRNA の単層内への移行は殆ど観察されず、本評価系が *in vivo* の結果をよく反映することが示唆された。今後、本モデルを用いて、各種核酸分子の腸管上皮透過過程の詳細と促進分子の系統的評価を実施する。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Nishina K, Mizusawa H, Yokota T. siRNA and the CNS: Development of delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv* 2013; 10(3): 289-292.(doi: 10.1517/17425247.2013.748746)
2. *Maeda Y, Iwata R, Wada T. Synthesis and properties of cationic oligopeptides with different side chain lengths that bind to RNA duplexes. *Bioorg Med Chem* 2013; 21(7): 1717-1723.(DOI: 10.1016/j.bmc.2013.01.053)
3. Oka N, Murakami R, Kondo T, Wada T. Stereocontrolled synthesis of dinucleoside phosphorothioates using a fluorous tag. *J. Fluor Chem* (in press)(DOI: 10.1016/j.jfluchem.2013.03.013)
4. Yumura K, Ui M, Doi H, Hamakubo T, Kodama T, Tsumoto K, Sugiyama A. Mutations for decreasing the immunogenicity and maintaining the function of core streptavidin (Article). *Protein Sci* 2013; 22(2): 213-221.(DOI: 10.1002/pro.2203)
5. Yoshimura C, Miyafusa T, Tsumoto K. Identification of small-molecule inhibitors of the human S100B-p53 interaction and evaluation of their activity in human melanoma cells (Article). *Bioorg Med Chem* 2013; 21(5): 1109-1115. (DOI: 10.1016/j.bmc.2012.12.042)
6. Maeda Y, Iwata R, Wada T. Synthesis of novel oligo cationic peptides binding to RNA duplexes. *Peptide Science* (in press)