

「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

H26 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
 - ・新規キメラアンチセンス核酸の創成
 - ・第2世代ヘテロ2本鎖核酸の創成
 - ・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

(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
 - ・立体が制御されたボラノホスフェート結合を有する人工核酸の合成
 - ・グアニジル化されたオリゴジアミノガラクトースの合成とヘテロ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

(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
- ・核酸分子の腸上皮透過性に及ぼす各種吸収促進剤の効果の検討
- ・核酸分子の腸管内での安定性の *in vitro* 評価

(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、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、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。

小比賀グループは、新たな糖部架橋型人工核酸を設計・合成し、和田グループではそれらをオキサザホスホリジン法に適用し、2量体を合成することにより立体選択性と縮合効率を評価した。さらに、ホスホロチオエートに続く次世代のリン原子修飾核酸類縁体として期待されるボラノホスフェート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)

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グアニジル基を有するオリゴジアミノガラクトース誘導体(ODGGal)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。また、種々の鎖長の異なるカチオン性人工ペプチド(Dab)について、ヘテロ2本鎖核酸への結合能を評価した。

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糖部架橋型人工核酸を設計・合成し、相補鎖RNAに対してプロトタイプの2',4'-BNA/LNAと同等の高い二重鎖形成能と、2',4'-BNA/LNAを上回る優れた酵素耐性能を有することを見出した。またヘテロ2本鎖核酸、及びリン原子上のキラリティー制御技術へ展開すべく、本分子を横田・和田グループへ提供した。更に本年度はこれまでの成果に基づき、新たな切り口から糖部架橋型人工核酸を設計し、そのヌクレオシド体の合成に成功した。

4)新規キメラアンチセンス核酸の創成・第2世代ヘテロ2本鎖核酸の創成(横田グループ)

従来の核酸医薬にはドラッグデリバリーシステムが内包されておらず、多くはデリバリー分子を直接結合させると標的遺伝子発現制御効果が減弱してしまう傾向があった。それを解決するために様々なリンカーを介してデリバリー分子と核酸医薬を結合させる方法が報告されているが、リンカーの組成や結合方式が複雑で、実用化の目途は立っていない。そこで我々は、リンカーとして人工核酸を用いて、核酸医薬とデリバリー分子を結合させた新規キメラ核酸を開発した。デリバリー分子として α -tocopherolを用いた場合、肝臓へのデリバリー効率が向上し、肝臓における標的遺伝子発現抑制効果が増強されることを示した。

また、既存のヘテロ2本鎖核酸ではDNA鎖側に目的の核酸医薬を配するのに対し、新たに相補RNA鎖側に核酸医薬(microRNA阻害薬)が組み込まれた第2世代ヘテロ2本鎖核酸医薬である「ヘテロキメラ2本鎖核酸医薬」を考案・合成し、microRNA阻害効果の向上、microRNAによって制御されるmRNA、表現型への効果においても従来の核酸医薬を上回る優れた制御能を確認した。

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)

・核酸分子の腸上皮透過性に及ぼす各種吸収促進剤の効果の検討:

In vitro 評価系及び *in vivo* における検討により、腸管上皮の tight junction 結合剤が核酸分子の大腸からの経腸デリバリーに利用できることを明らかとした。また、腸管上皮透過後の脈管系への移行性を制御する技術を開発するための検討に着手した。

・核酸分子の腸管内での安定性の *in vitro* 評価:

前年度に確立した核酸分子の腸管における安定性の *in vitro* 評価系において、モデル核酸分子の安定性を評価したところ、BNA gapmer (LNA-DNA-LNA) 及び BNA gapmer と RNA とのヘテロ核酸分子の腸管において比較的安定であることが明らかとなった。和田グループとの共同により、ヘテロ2本鎖核酸に対するペプチド分子あるいはオリゴジアミノ糖分子複合化が更に腸管内における安定性向上効果の検討を進めている。

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。本年度、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を開始し、1回目のセレクションが終了した。現在結果についての解析を行っている。また、後者においては、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確立することができた。

代表的な原著論文

●

Nukaga Y, Takemura T, Iwamoto N, Oka N, Wada T. Enhancement of affinity of 2'-O-Me-oligonucleotides for complementary RNA by incorporating a stereoregulated boranophosphate backbone. RSC Adv. 2015; 5: 2392-2395. (DOI: 10.1039/c4ra11335g)

●

Nishina T, Numata J, Nishina K, Yoshida-Tanaka K, Nitta K, Piao W, Iwata R, Ito S, Kuwahara H, Wada T, Mizusawa H, Yokota T. Chimeric Antisense Oligonucleotide Conjugated to α -Tocopherol. Mol Ther Nucleic Acids. 2015; 4: e220. (DOI: 10.1038/mtna.2014.72)