

報告番号	甲 第 14906 号
------	-------------

# 主 論 文 の 要 旨

**論文題目**     **A study on the development of chemically modified acyclic nucleic acids for next generation oligonucleotide therapeutics**  
 (次世代型核酸医薬基盤の構築に向けた修飾型非環状型人工核酸の開発に関する研究)

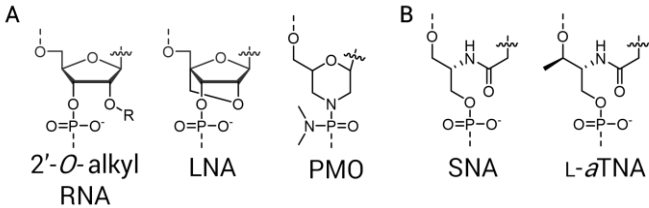
**氏 名**     佐藤 史経

## 論 文 内 容 の 要 旨

### 1. 背景

核酸医薬品とは、DNA や RNA の天然核酸を基本骨格とし、疾患関連遺伝子の発現を調節することで疾患の治療を狙う医薬品である。核酸医薬は、遺伝性難病等これまで治療が困難とされてきた疾患を治療することができる可能性があることから現在盛んに研究が行われており、2022 年までにおよそ 18 種類の核酸医薬品が上市されている。核酸医薬の基本骨格である天然核酸は生体内で速やかに分解され薬効を示さないことから、前述の核酸医薬には、化学修飾が施された人工核酸が利用されている。現在様々な人工核酸 (Fig. 1A) が開発され、医薬品への応用が試みられているが、高い活性・低毒性・製造コストが低い要素を満たす人工核酸は開発されていない。

一方で浅沼研究室では、天然核酸とは化学構造が全く異なる非環状の人工核酸 SNA や L-aTNA の開発に成功している (Fig. 1B)。SNA や L-aTNA は天然核酸と十分な親和性を持ち、分解耐性、合成容易性で他の人工核酸に圧倒的に優れる。私たちは、RNA からタンパク質への翻訳調節の役割を



**Fig.1** The chemical structures of (A) representative artificial nucleic acids (B) SNA and L-aTNA.

担う microRNA の内、多くの癌で過剰に発現するのみならず、循環器疾患・腎不全・自己免疫疾患など様々な疾患にて発現が亢進している miR-21 を標的としたアンチセンス核酸 (Anti miRNA oligonucleotide;AMO) の開発を目指した。既存の Anti miR-21 は、活性が低いために高用量の投与が必要である、オフターゲット効果等の毒性の懸念があるという問題があり、未だ臨床試験をクリアできたものはない。私たちは SNA や L-aTNA からなる高活性・低毒性・低コストを実現する次世代の Anti miR-21 医薬の実現を期待した。本論文は全 3 章で構成されている。以下に各章の要旨を示す。

Chapter 1 では、はじめに核酸の機能、人工核酸及びそれらを用いた核酸医薬品、またその問題点について紹介した。次に浅沼研で開発された人工核酸 SNA、L-aTNA の特徴を記し、核酸医薬へ応用した場合に考えられるメリットなどについて述べ、本研究に至る経緯について述べた。

Chapter 2 では、SNA や L-aTNA からなる Anti miR-21 核酸の問題点について言及した。Luciferase assay にて活性評価を行い、それらが全く活性を示さなかったことを示した。そして、SNA や L-aTNA からなる Anti miR-21 oligonucleotides が活性を示さない原因が、SNA や L-aTNA が高い自己親和性を持つために自己二重鎖を形成してしまい、miR-21 との二重鎖形成が阻害されるためと仮説を立てた。そこで、標的 RNA 非存在下での、Anti miR-21 のみの融解温度測定を行い、高次構造の安定性と活性の関連性を示し、確かに自己二重鎖形成が活性の低下に起因していることを示した。

Chapter 3 では、SNA や L-aTNA に自己親和性を低下させる修飾核酸塩基対 ; 2,6-ジアミノプリン (D) と 2-チオウラシル (sU) を導入する方法を開発した。これらは A-T 核酸塩基対の誘導体であるが、アミノ基とチオカルボニル基の立体障害により塩基対形成ができないため、SNA や L-aTNA に導入することで自己親和性の低下が見込める (Fig. 2)。

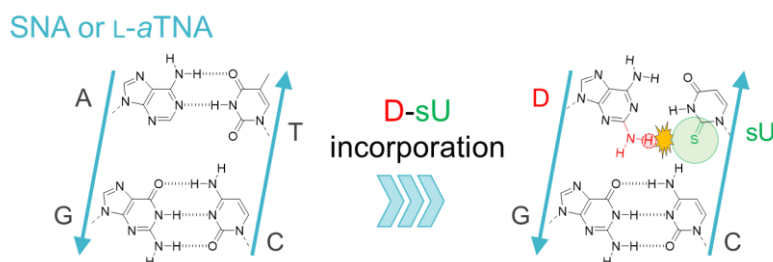
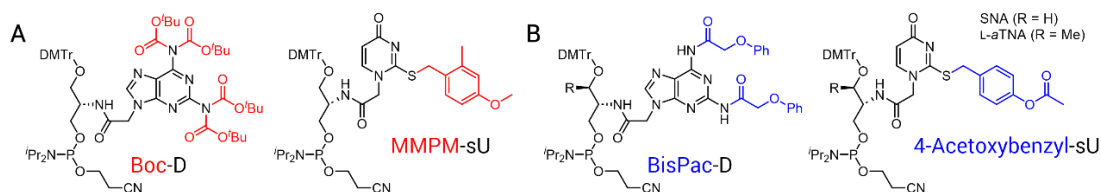


Fig. 2 D and sU for suppressing self-hybridization of SNA and L-aTNA.

SNA や L-aTNA に D, sU を導入する際、反応性官能基を適切な保護基で保護したホスホロアミダイトモノマーを合成する必要があるため、その設計・合成の検討を行った。ホスホロアミダイト法による固相合成では、固相担体上で配列合成を終えた後、濃アンモニア水等の塩基条件で切り出し・及び保護基類の脱保護を行うことから、核酸塩基の保護基は通常、

塩基で脱保護可能なものが選択される。これに倣い私たちも当初塩基で脱保護可能なアシル系または dialkylformamidinium 系保護基を検討したが、D に関しては合成ができたものの脱保護効率が悪く、sU に関しては化合物が不安定で、ホスホロアミダイトモノマーの合成に至らなかった。そこで強酸で脱保護可能な保護基 (D に対しては Boc 基、sU に対しては MMPM 基) で保護したホスホロアミダイトモノマー (Fig. 3A) を合成し、配列合成後に固相担体上で強酸で処理するステップを追加することで、D, sU 導入 SNA 配列合成に成功した。

しかし上記手法には、強酸で処理する際に合成末端の Trityl 基が脱離し、Trityl 基を利用した簡易精製ができないために HPLC 精製が難化するという問題点があった。核酸医薬への応用を見据え、スケールアップして合成した際には、精製ができず、純度の高い配列を得られなかった。そのため再度、塩基で脱離可能な保護基で保護したアミダイトモノマーの設計・合成を行った。D はアシル系保護基の中で特に塩基に弱い保護基である Pac 基で保護し、sU は Acetyl 基の脱離に伴い電子移動を起こすことで脱保護される 4-Acetoxybenzyl 基で保護したモノマーを設計・合成した (Fig.3B)。



**Fig. 3** The chemical structures of (A) acid-labile (B) base-labile D and sU phosphoroamidite monomers synthesized in this study.

ホスホロアミダイト法における固相合成に対する適合性を調べたところ、問題なく、通常の D, sU を導入していない SNA や L-aTNA オリゴマーと同等の収率で配列合成を行うことができた。また回文配列からなる自己親和性を融解温度測定で調べたところ、SNA, L-aTNA 両場合においても自己二重鎖を不安定化させられることが分かった (Table 1)。また融解温度測定などを行うことで、D-sU の導入により、SNA や L-aTNA の二重鎖安定性が大きく低下し、RNA 親和性が向上することも示した。

**Table 1** Yields and  $T_m$ s of palindrome SNA and L-aTNA.

	Sequence	Yield(%)	$T_m$ (°C)
SNA	(S)-TACTGCAGTA-(A)	20	58.8
	(S)-TDCsUGCDGsUA-(A)	17	48.3
L-aTNA	3'-TACTGCAGTA-1'	26	71.1
	3'-TDCsUGCDGsUA-1'	18	61.9

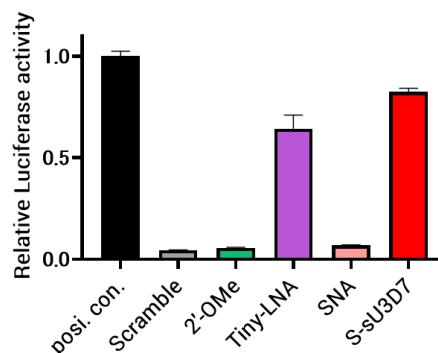
Chapter 4 では、前章で開発した D, sU 導入方法を用い、D, sU を miR-21 を標的とした SNA-AMO に導入することで、その自己二重鎖形成を抑制し、活性を向上させることを目指した。SNA-AMO の二次構造形成に関わる部位に適切に D, sU を導入した配列 (S-sU3D7) を調製し、融解温度測定を行ったところ自己親和性を大幅に減少させ、RNA 親和性を大き

く向上させたことが分かった (Table 2)。続いて HeLa 細胞を用いて Luciferase assay により、S-sU3D7 の活性評価を行ったところ、D, sU 未導入のものに比べて、miR-21 阻害活性を劇的に向上させることが明らかとなった。またこの活性は既存の Anti miR-21 である、2'OMe-ベースの AMO や LNA ベースの AMO(Tiny-LNA) よりも高活性であった (Fig. 4)。また、qRT-PCR や Western Blotting 解析によって、S-sU3D7 によって、miR-21 のノックダウンや標的 mRNA 及びタンパク質の発現が回復することを確認した。以上のように、細胞実験系で非常に高い miR-21 阻害活性を示す S-sU3D7 を設計することに成功したため、Syngeneic マウスによる抗腫瘍活性評価を行うこととした。

**Table 2** Sequences, and  $T_m$ s of AMO/AMO duplexes and miR-21/AMO duplexes.

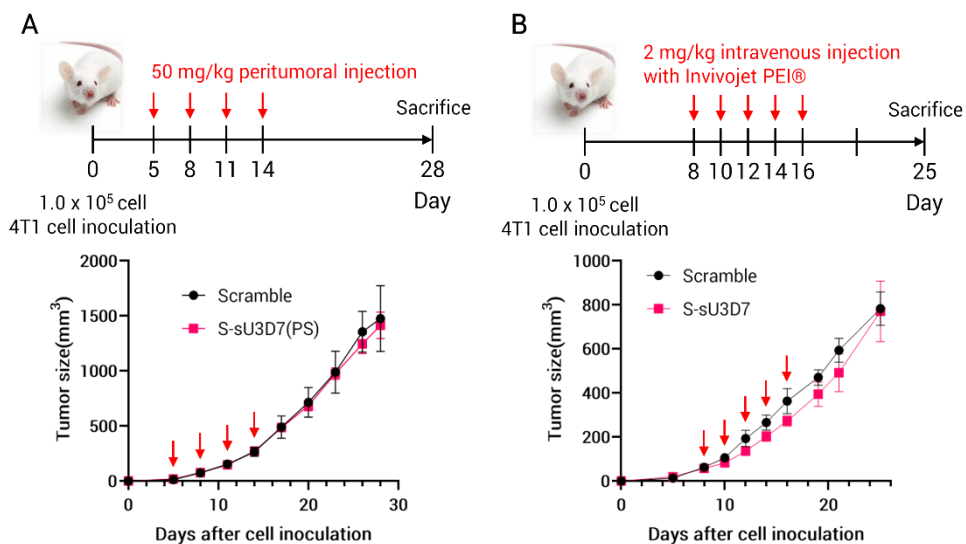
	Sequence(underline: complementary region)	$T_m$ s of AMO/AMO duplex	$T_m$ s of miR-21/AMO duplex
miR-21	5'-UAG CUU <u>AUCAG A CUGAU</u> GUU GA-3'	—	—
SNA	(R)-ATC GAA <u>TAGTC T GACTA</u> CAA C-(S)	62.3	67.3
S-sU3D7	(R)-ATC GDD <u>sUDGsUC T GDCsUD</u> CDD C-(S)	Not detected	76.6

マウストリプルネガティブ乳癌細胞株である 4T1 細胞を Balb/c に同所性移植し作製した担癌モデルマウスに対し、ホスホロチオエート (PS) 修飾した S-sU3D7(PS) を 50 mg/kg/3 days で 4 回局所投与した。PS 修飾は核酸医薬には必須の化学修飾であり、核酸のタンパク質との親和性を高め、細胞膜透過性・血中滞留性を向上させる効果がある。しかし、残念なことに全く抗腫瘍活性が見られなかった (Fig. 5A)。disulfoCy5 修飾 S-sU3D7 の Ex vivo imaging より、腫瘍組織へ S-sU3D7(PS) が集積していることを確認したため、S-sU3D7 が腫瘍に取り込まれるが、エンドサイトーシスから脱出できず、リソソームまたはリンパ管に滞留していると考えた。核酸医薬は、投与方法に関わらず、エンドサイトーシス経路にて取り込まれ、その大部分がエンドサイトーシス経路を脱出できずにリソソームへ輸送され分解されるといわれる。SNA 型 Anti miR-21 も例にもれず、エンドサイトーシスから脱出できず、リソソームに輸送されていると考えた。そこで、核酸のエンドサイトーシス脱出を促進する in vivo 用核酸導入試薬である、Polyethylenimine ベースの Invivojet PEI® を使用し抗腫瘍活性を行った。Invivojet PEI® は腫瘍集積性が低いながらも、取り込まれた組織にて、プロトン sponge 効果によりエンドソーム膜を不安定化し、効率的に核酸を細胞質へ放出する。製品プロトコルに従い、PS 修飾されていない S-sU3D7 を 2 mg/kg/2 days で 5 回静脈投与したところ、わずかであるが投与量を大幅に減らしたにもかかわらず、S-sU3D7 投与群にて抗腫瘍活性を確認した (Fig. 5B)。今後は腫瘍集積性・エンドサイトーシス放出能の両方に優れた LNP を使用すればより明瞭な抗腫瘍効果得られるかもしれない。本章では、L-aTNA ベースの Anti miR-21 の活性や他数種類の癌細胞株で活性評価を行った結果についても記している。



**Fig. 4** miR-21 inhibitory activities of Anti miR-21 oligos.

以上のように、明瞭な抗腫瘍効果を見ることはできなかったが、SNA と修飾人工核酸を用いることで、細胞実験レベルでは既存の Anti miR-21 の活性を超える新規の Anti miR-21 核酸を開発し、非環状型人工核酸の問題点を克服する化学修飾や設計基盤を確立した。



**Fig. 5** Tumor growth curves of 4T1-bearing mice monitored (A) for 28 days after tumor inoculation following treatment with Scramble and S-sU3D7(PS). (n = 3 per group) (B) for 25 days after tumor inoculation following treatment with Scramble and S-sU3D7. (n = 6 per group)