

## 論文の内容の要旨

論文題目 新規糖部架橋核酸の創製及び生物活性に関する研究

氏名 森田 浩 司

### 第1部 アンチセンス核酸を指向した新規架橋核酸研究

#### 【序論】

遺伝子に直接作用し発現制御する核酸分子は、新たな創薬分子「核酸医薬」として期待されている。しかしながら、体内での安定性・作用特異性・細胞内移行性の不十分さのために、現在までに実用化された核酸医薬は、眼球内局所投与薬に限られている。ここで実用化された修飾核酸である DNA ホスホロチオエート (PS-DNA) は、ヌクレアーゼ抵抗性の点で優れるが、RNA への低親和性に由来する有効性の低さや非特異的タンパク結合による副作用誘発が、より汎用的な全身投与型の核酸医薬開発において問題となっている。PS 修飾の問題点を克服するために、現在、種々の核酸化学修飾法に関する研究が精力的に行われている。中でも、今西ら、Wengel らによって近年見出された 2',4'-C-メチレン架橋核酸 (2'-O,4'-C-methylene-bridged nucleic acid / locked nucleic acid: 2',4'-BNA/LNA, Fig. 1A) は、糖パッカーリングを RNA において優勢な *N* 型に架橋固定することで、相補鎖 RNA との結合が熱力学的に有利に進行し、これまでの他の修飾核酸と比べて格段に高い RNA 親和性を有することが明らかとなっている。本研究で私は、全身投与可能な核酸医薬開発を実現するために、2',4'-BNA/LNA をより発展させ、(1) 標的細胞内外のヌクレアーゼで分解されにくく、(2) 標的遺伝子と熱的に安定な複合体を形成し配列特異的な作用を示す、新規糖部架橋核酸の創製を目指した。

#### 【方法及び結果】

#### 1-1. 2'-O,4'-C-ethylene-bridged nucleic acid (ENA)及び2'-O,4'-C-propylene-bridged nucleic acid (PrNA)の合成

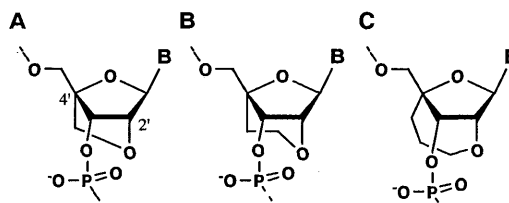


Figure 1. Structures of 2',4'-BNA/LNA, ENA and PrNA

2'-O,4'-C-架橋の炭素鎖長を2',4'-BNA/LNAのメチレン架橋より増やしたENA (Fig. 1B)及び PrNA (Fig. 1C)の合成を行った。すなわち、allofuranoseを出発原料として、4位のhydroxymethyl側鎖の導入及び増炭素化したhydroxyethylもしくはhydroxypropyl基への変換後、各種核酸塩基との縮合、ピシクロ環化を経て、ENA, PrNAのヌクレオシドユニットを合成した。いずれの架橋修飾ヌクレオシドもN型の糖パッケージに固定されていることをH-NMRもしくはX線結晶解析により確認した。核酸合成機を用いた固相ホスホロアミダイト法により、所望の配列を有するENA, PrNA修飾オリゴヌクレオチドを合成した。

## 1-2. 相補鎖RNAとの二本鎖形成能

ENA, PrNAの相補鎖RNAとの二本鎖形成能を、UVによる融解温度 $T_m$ 測定により評価した。ENAでは2',4'-BNA/LNAと同等の高度なRNA親和性( $\Delta T_m = +5.2^\circ\text{C}/\text{修飾}$ )が確認された。一方、PrNAでは逆に $T_m$ 値が低下し不安定化( $\Delta T_m = -0.5^\circ\text{C}/\text{修飾}$ )が認められた。

## 1-3. ヌクレアーゼに対する安定性

3'末端から2番目に各架橋ヌクレオシドを有するオリゴヌクレオチドを用いて、3'-エキソヌクレアーゼによる切断への抵抗性を評価した。その結果、架橋鎖長が一炭素増加していくごとに3'側リン酸ジエステル結合の抵抗性が飛躍的に増加していくことが判明した。また、エンドヌクレアーゼに対する各架橋ヌクレオシドの両隣のリン酸ジエステル結合の安定性を評価した。その結果、架橋修飾の3'側のリン酸ジエステル結合では完全な切断抵抗性を示し、5'側のリン酸ジエステル結合では、架橋鎖長に応じて高い切断抵抗性が認められた。従来のPS修飾や2'位アルキル修飾とは異なり、2'-O,4'-C-架橋修飾には5'位側のリン酸ジエステル結合の安定化効果をも有することを明らかとした。

以上より、ENAは、2',4'-BNA/LNA, PrNAと比べ、相補鎖RNAとの高い親和性と、ヌクレアーゼに対する高い抵抗性の両性質を併せ持つ最も好適な2'-O,4'-C-架橋核酸であることが明らかとなった。以下、アンチセンス核酸としてのENAの機能評価を行った。

## 1-4. RNase HによるRNA切断の誘導能

DNAの両末端の数ヌクレオチドにENA修飾を施したENA gapmerにおいて、RNase Hによる相補鎖RNA切断活性を評価すると、DNA及びPS-DNAを用いた時よりも、速やかな相補鎖RNAの切断が観察された。すなわちENA gapmerでは、RNAと安定な二本鎖を形成し、より効率的なRNase H切断活性が誘導されたと考えられた。

## 1-5. 血漿中での安定性

ラット血漿中における安定性を評価した。ENAは、2',4'-BNA/LNAと比べ高い安定性を示した。特に、ENA gapmerでは、殆ど分解が観察されず、PS-DNAを超える高い安定性が明らかとなった。

## 1-6. ENA アンチセンスの細胞内遺伝子発現抑制活性の評価

ヒト血管内皮増殖因子(VEGF)に対する既知のPS-DNAアンチセンス(PS-AS)と同配列のENA gapmerアンチセンス(ENA-AS1, -AS2)を合成し、ヒト非小胞性肺癌細胞A549へトランスフェクトし、VEGF mRNA発現抑制活性を比較した。その結果、PS ASやミスマッチ配列を含むENAでは発現抑制が認められなかったのに対し、ENA-AS1は、90%以上のVEGF mRNA発現を抑制した。一方、ENA部分が

ENA-AS1 よりも少ない ENA-AS2 では弱い抑制に留まり、ENA ユニットの導入量に応じて発現抑制活性が向上する傾向が認められた。また、配列をより短くした ENA-AS3e~6e では、鎖長に応じた発現抑制活性の低下が認められた。以上の結果より、ENA アンチセンスは、細胞内において高い配列特異性に基づくアンチセンス効果を示す修飾核酸であることを示した。

## 第2部 2',5'-oligoadenylate (2-5A)の新規誘導体研究

### 【序論】

2',5'-Oligoadenylate (2-5A)は、I型インターフェロン (IFN) 下流の抗ウイルス機構である 2-5A system において産生される細胞内リガンドである。2-5A は、特異的に RNase L を活性化し、細胞内 RNA 分解を引き起こし、ウイルス感染細胞をアポトーシス死へと導く。近年、RNase L は癌細胞のアポトーシスとの関連も注目されている。RNase L を介した IFN の抗ウイルス・抗腫瘍効果は、2-5A の投与によりその増強が期待されるが、天然型 2-5A では細胞内外で速やかに分解されるため薬効は期待できず、生体内での安定性の高い 2-5A 誘導体の開発が前提になる。

2-5A 分子の構造(Fig. 2)は、特徴的な 2'→5'結合のアデノシン 3 mer を基本骨格とし、これまでの誘導体研究より、2 番目のアデノシンの 3'-水酸基は RNase L 活性化に必須であることが分かっている。しかしながら、この 3'-水酸基を保持したまま、切断を受けやすい隣接するリン酸ジエステル結合をヌクレアーゼ抵抗性にするのは困難であり、これまで PS 修飾以外に細胞での活性が報告されている 2-5A 誘導体は知られていない。私は、非特異的な作用が知られている PS 修飾を持たない、ヌクレアーゼに安定な 2-5A 誘導体の創製を目指した。ここで、第1部の研究で得られた新たな知見である、4'位からの架橋修飾によって修飾ヌクレオシドの 5'側のリン酸ジエステル結合がヌクレアーゼ抵抗性になる効果に着目した。すなわち、2'→5'結合が可能な 3'-O,4'-C-架橋修飾を 3 番目のアデノシンとして適用することにより、RNase L 活性化に必須な 2 番目のアデノシンの 3'-水酸基を保持しながら、隣接 2',5'リン酸ジエステル結合の安定化が図れると考えた。

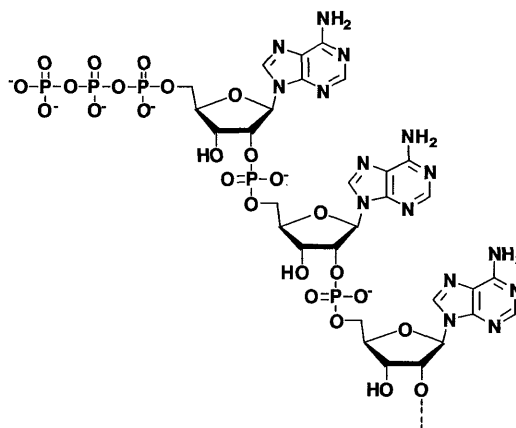


Figure 2. Structure of natural 2-5A

### 【方法及び結果】

#### 2-1. 2-5A 誘導体の合成

2'-O,4'-C-架橋ヌクレオシドの合成法を基に、3',4'位間での環化を行うことにより、3'-O,4'-C-ethylene adenosine, 3'-O,4'-C-propylene adenosine を合成した。これらは、ほぼ完全に S 型の糖コンフォメーションを取ることを H-NMR より確認した。固相ホスホロアミダイト法により、所望の構造を有する 2-5A 誘導体を合成した。

#### 2-2. ヌクレアーゼに対する安定性を指標とした誘導体の評価

各架橋修飾を 3 番目のアデノシンに導入した 2-5A 誘導体(pAAXA)のエキソヌクレアーゼに対する切断抵抗性を比較した。pAAXA→pAAX→pAA の 2 段階の切断反応両方において、その修飾部位 (X)として 3'-O,4'-C-propylene 修飾を用いた場合に、X の 2', 5'両側のリン酸ジエステル結合が最もエキソヌクレ

アーゼ抵抗性になることを見出した。このことから、3番目のアデノシンに 3'-O,4'-C-propylene 修飾を用いることで、RNase L 活性化に必須な2番目のアデノシンの 3'-水酸基を保持しつつ、隣接するリン酸ジエステル結合が安定化できることが明らかとなった。

### 2-3. RNase L 活性化能を指標とした誘導体の評価

1番目もしくは3番目のアデノシンに各種修飾を施した 2-5A 誘導体のヒト RNase L 活性化能を調べた。1番目のアデノシンとしては、3'-O-methyl 体が最も高活性( $EC_{50} = 6.0$  nM)であった。3番目のアデノシンとしては、3'-O-methyl 体( $EC_{50} = 7.8$  nM)もしくは 3'-O,4'-C-propylene 体( $EC_{50} = 8.1$  nM)が高活性であった。上述したヌクレアーゼ抵抗性の知見と合わせると、2-5A 誘導体としては、1番目アデノシンには 3'-O-methyl が、3番目には 3'-O,4'-C-propylene である誘導体が好適であると推測された。

### 2-4. ホスファターゼに対する安定性を指標とした誘導体の評価

5'-リン酸基はホスファターゼにより速やかに切断されうることから、5'-リン酸基の誘導体展開を行った。RNase L 活性化能及びホスファターゼ抵抗性を検討した結果、2-hydroxyethyl phosphate 基を有する 2-5A 誘導体 **6a** (Fig. 3)は、天然型 2-5A ( $EC_{50} = 5.0$  nM)と同等の高い RNase L 活性化能 ( $EC_{50} = 3.2$  nM)と、ホスファターゼに対する抵抗性を併せ持つことを見出した。

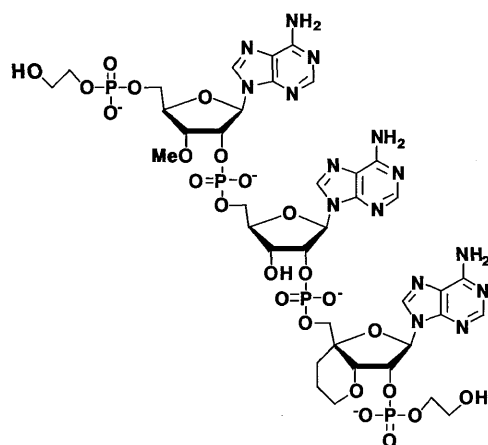


Figure 3. Structure of 2-5A analog **6a**

### 2-5. 癌細胞に対する 2-5A 誘導体の殺細胞効果

2-5A 誘導体 **6a** について、ヒト非小胞性肺癌株 A549 細胞に対する殺細胞活性を検討した。その結果、天然型 2-5A では活性が見られないのに対し、2-5A 誘導体 **6a** では培地添加のみで殺細胞効果が認められた。また、このときの細胞内 rRNA の分解パターンは、これまでに報告されている RNase L 活性による rRNA 分解パターンとよく一致すること、また RNase L を欠損しているヒト肝臓癌株 HepG2 細胞においては殺細胞活性及び rRNA 分解は全く認められないことから、**6a** の殺細胞活性は、RNase L の特異的な活性化によることが強く示唆された。

#### 【総括】

糖架橋構造に着目した合成展開を行うことにより、相補鎖核酸への高度な親和性を有し、かつヌクレアーゼに高い抵抗性を有する新規修飾核酸 ENA を見出した。ENA は、アンチセンス分子として細胞内で配列特異的に機能することを明らかとした。

また、糖架橋構造がヌクレアーゼ抵抗性をもたらす効果に着目し、これを新規 2-5A 誘導体合成へと応用した。その結果、核酸分解酵素に抵抗性を有し、RNase L の特異的な活性化により癌細胞に対して殺細胞効果を示すことのできる新規 2-5A 誘導体を見出した。