

論文の内容の要旨

論文題目 DDS を指向した RNA 二重鎖結合性オリゴジアミノ糖の 合成

氏 名 岩田 倫太朗

【緒言】

近年、RS ウイルス感染症、C 型肝炎、エイズ関連性悪性リンパ腫など、様々な疾病を標的とした RNAi 医薬の開発が盛んに行われている。RNAi (RNA 干渉) とは、外来の二本鎖 RNA (siRNA) によって対応する遺伝子の発現が抑制される現象であり、これを応用した RNAi 医薬は、原因となる疾病関連遺伝子が解明されれば、効率よく新薬が生み出すことが可能な新たな医薬として期待されている。

一方で、このような二本鎖 RNA を本体とする RNAi 医薬は、細胞膜透過性、生体内安定性の低さや、効率よく標的細胞に導入する手法が確立されていない点など、多くの課題が残されている。

そこで本研究では、RNAi 医薬の効率的な細胞導入、ドラッグデリバリーシステム (DDS) への応用を展望し、RNA 二重鎖に選択的に結合する化合物の開発を目指した。

RNA 二重鎖へ選択的に結合する分子を設計するにあたり、RNA 二重鎖メ

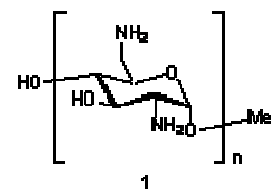


Fig. 1

ジャーグループのリン酸部位と静電相互作用によって効率的に結合することが可能な構造を考え、2,6-ジアミノ-2,6-ジデオキシグルコースが α グリコシド結合により連結したオリゴマー (Fig. 1, 1) をデザインした。この分子は、以下の理由から、RNA 二重鎖に強固に結合すると期待できる。

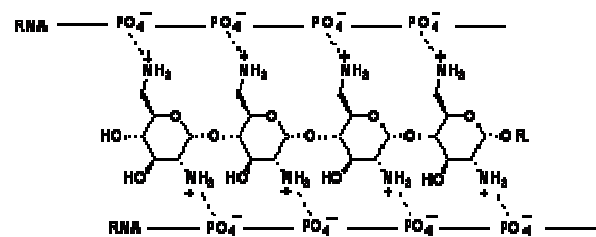


Fig. 2

1) 分子の両側にアミノ基を有し、さらに、このアミノ基間の距離 (6 Å) は、RNA 二重鎖のメジャーグループ幅 (7~8 Å) に極めて近いことから、グループの両側のリン酸部位と相互作用することが可能である (Fig. 2)

2) 全て α -グリコシド結合により連結したオリゴグルコース骨格は、天然に見られるアミロースのように、湾曲した高次構造をとることが期待できる。この湾曲した構造は、RNA 二重鎖のメジ

ャーグループに結合する際にエントロピー的に有利である。

【実験結果】

安価で入手容易な化合物である *N*-アセチルグルコサミンを出発原料として、有機合成的手法を用い、文献法と新規手法を組み合わせ糖鎖の伸長サイクルを確立し、計 26 工程の化学反応を経て、1 の 1~4 量体を合成した。RNA 二重鎖とオリゴジアミノグルコース 1 の相互作用を解析す

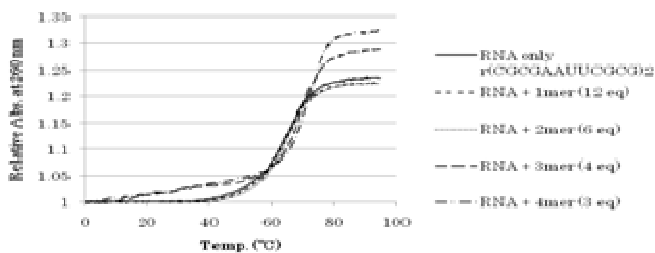


Fig. 3 1 による RNA 二重鎖 T_m 曲線の変化

るため、融解温度解析（二重鎖の熱力学的安定性の評価）、CD スペクトル（二重鎖の構造変化の観測）、ITC（相互作用により発生する熱量の観測）などの実験を行った。オリゴジアミノグルコース 1 の 1~4 量体のうち、糖鎖長の長い 3、4 量体を用いた場合に、顕著な T_m 値の上昇と CD スペクトルの若干の変化が観測された (Fig. 3)。一方、対照実験として二重鎖 DNA に対しても同様の実験を行ったところ、1 の 1~4 量体いずれを加えた場合にも T_m 値、CD スペクトルの有意な変化は観測されなかった。さらに、ITC では、1 の 4 量体を、RNA12 量体に加えることで発生する熱量が、DNA の場合と比較し 2 倍程度の値であるという結果が得られた。つまり、オリゴジアミノグルコースが、RNA 二重鎖に対し、DNA 二重鎖よりも強く結合することが示された。すなわち、1 は、二重鎖 RNA と特異的に相互作用し、構造変化を伴いながら熱力学的な安定性を向上させる一方で、DNA 二重鎖とはそのような相互作用をしないことが明らかとなった。

以上の実験結果より、湾曲した構造を有するオリゴ糖を基本骨格とし、適切な間隔でアミノ基を配置することで、RNA 二重鎖に選択的に結合する分子をデザインすることが可能であることが示された。そこで、このような RNA 二重鎖結合性分子と、臓器特異的なデリバリーが可能な機能性分子を組み合わせることで、RNAi 医薬の DDS に用いる新規キャリア分子の構築を目指すこととした。

上述したオリゴジアミノグルコースの合成では、仮説どおりの RNA 二重鎖に結合する分子が得られたものの、グリコシル化反応の立体選択性に上限があり、かつ両異性体を分離するために複数回シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行う必要があるなど、合成、精製過程が煩雑であった。そこで、より簡便に合成可能で、同等の性質を有することが期待できる分子として、 β -(1→4) 結合により連結したオリゴジアミノガラクトース誘導体 (Fig. 4 上) をデザインした。このような骨格を有する分子も、Fig. 4 下に示すように、オリゴジアミノグルコースと類似した湾曲構造をとり得る

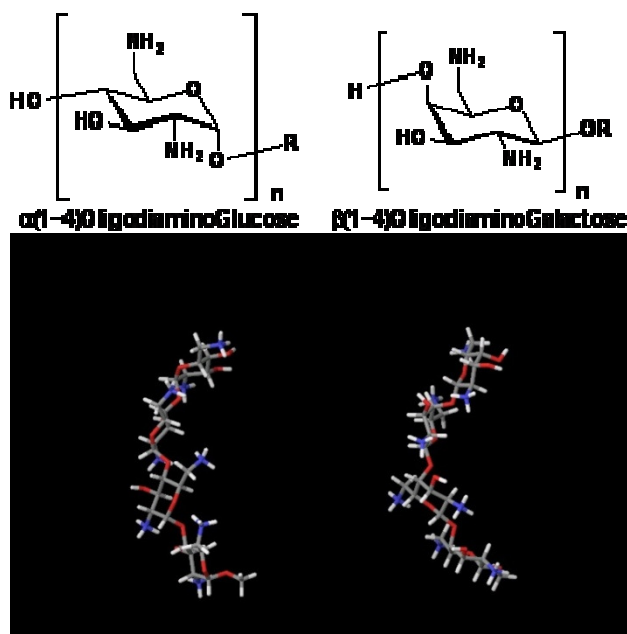


Fig. 4 オリゴジアミノグルコース (左) とオリゴジアミノガラクトース (右)

ことを、分子力学計算によって確認した。この分子の場合、グリコシル化反応において、アシル

基の隣接基関与を利用すれば、β体の目的物を高立体選択的に得られると期待できる。

本研究では、C型肝炎の治療薬への応用を目指し、ビタミンE (α-トコフェロール)、あるいはビタミンEアナログを連結させたオリゴアミノガラクトースを合成し、siRNAの肝臓への輸送を目指すこととした。

合成戦略として、オリゴアミノガラクトースユニットと、ビタミンEユニットをそれぞれ合成し、これらを Huisgen 反応 (クリック反応) によって連結させる手法を用いることとした。これにより、複数の誘導体を同じ前駆体 2 から簡便に合成することが可能となる。以上を踏まえ、天然のビタミンEが結合した 3 と、ビタミンEアナログが連結された 4 をそれぞれ合成することとした (Fig. 5)

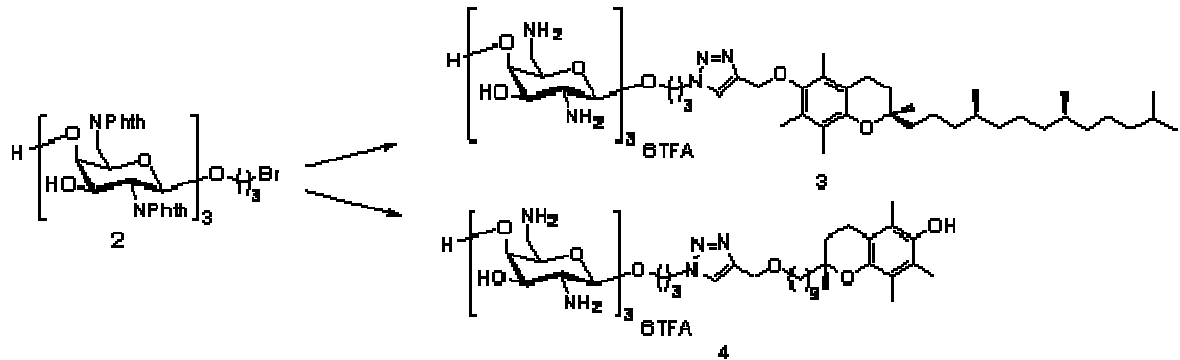
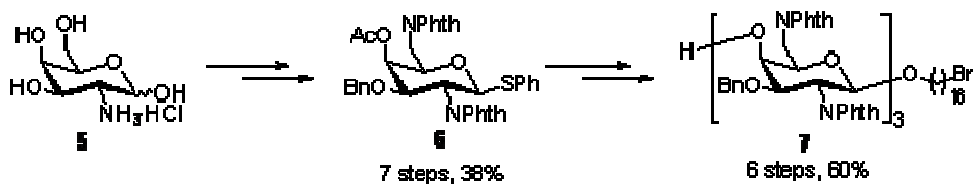


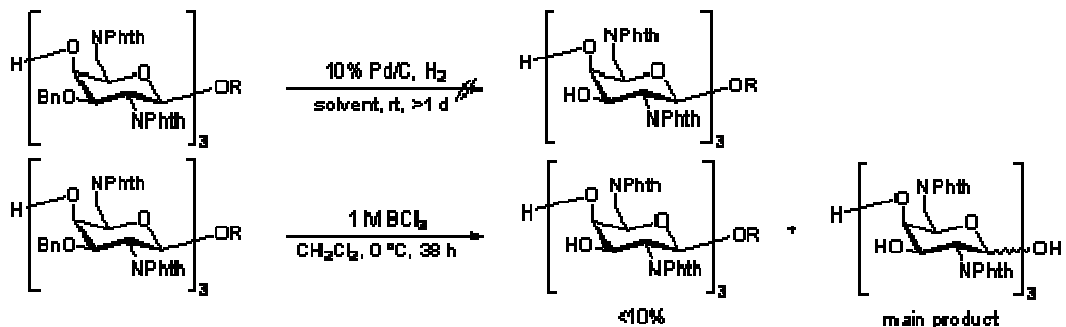
Fig. 5 VE 結合型オリゴアミノガラクトース

グリコシル化と 4 位水酸基保護基の脱保護を繰り返すことによって糖鎖を伸長するため、グリコシルドナー6をガラクトサミン塩酸塩 5 から 7 段階、38%で合成した。グリコシル化反応では、目的のβグリコシドのみを選択的に得ることに成功し、糖鎖の伸長を問題なく行うことができた (Scheme 1)。しかしながら、Scheme 2 に示すように、ベンジル基の適切な脱保護条件を見出すことができなかった。ベンジル基の脱保護に一般的に用いられる接触還元では、2 個目以降のベンジル基の脱保護反応がほとんど進行せず (Scheme 2 上)、ルイス酸による脱保護では、わずかに目的物の生成も確認できたものの、還元末端側の糖のグリコシド結合が切断をはじめ、多数の副反応が観測された (Scheme 2 下)。

Scheme 1

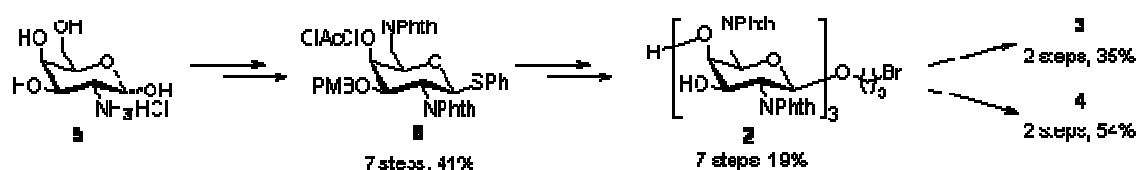


Scheme 2



そこで、3位水酸基の保護基として、ベンジル基よりも酸性あるいは還元条件下で脱保護が容易な、*p*-メトキシベンジル基 (PMB 基) を検討することとした。また、PMB 基は 6 で導入していた 4-*O*-アセチル基の脱保護条件に耐えないことが予想されたため、この保護基を、穏和な塩基性条件下で脱保護が可能な、クロロアセチル基に変更することとした。このように改めてデザインしたグリコシルドナー 8 を、ガラクトサミン塩酸塩 4 より 7 段階、41% で得た後、グリコシル化反応、4位水酸基の脱保護を繰り返すことで、3糖 2 を得た。これに対しビタミン E 及びビタミン E 誘導体を、Husigen 反応によって連結し、目的化合物 3、4 をそれぞれ得ることに成功した (Scheme 3)。

Scheme 3



続いて、このように合成した 3、4 が、オリゴジアミノグルコース同様に RNA 二重鎖と相互作用するか調べるため、融解温度解析を行った。3 を加えた場合、RNA 二重鎖の T_m の上昇は観測されなかったが、4 を加えた場合、

有意な T_m の上昇が観測された (Fig. 6)。4 を加えた系については CD スペクトルの測定も行い、オリゴジアミノグルコースの 3 量体を加えた場合と類似したピークシフト、ピーク強度の増大起こることが明らかとなった。

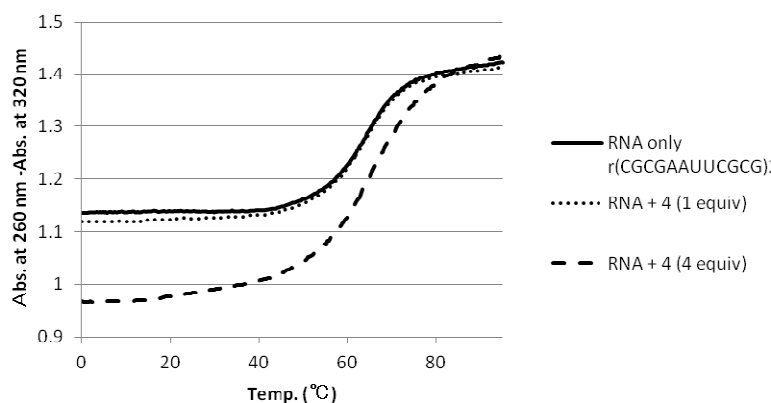


Fig. 6 4 による RNA 二重鎖 T_m 曲線の変化

【結論】

以上のように本研究では、 α - (1 \rightarrow 4) 結合により連結したオリゴジアミノグルコースの合成に成功し、これらのうち、糖鎖長が長い 3、4 糖が RNA 二重鎖に結合し、特異的に相互作用することを見出した。この結果をふまえ、オリゴジアミノグルコースと類似した性質を有し、かつ合成が簡便な化合物として、 β - (1 \rightarrow 4) 結合により連結したオリゴジアミノガラクトースを考案した。さらに、siRNA の肝臓への効率的輸送を展望し、オリゴジアミノガラクトースとビタミン E (α -トコフェロール) 及びそのアナログを組み合わせたオリゴジアミノ糖誘導体の合成に成功した。また、これらのうち、ビタミン E アナログ結合型オリゴジアミノガラクトース (化合物 4) が、オリゴジアミノグルコース同様に RNA 二重鎖と相互作用することを強く示唆する実験結果を得た。本合成手法を利用すれば、ビタミン E に限らず、様々な機能性分子が連結したオリゴジアミノガラクトースを合成することも容易であることから、種々の臓器に特異的な siRNA のデリバリーキャリア分子を、簡便に構築する手法となることが期待できる。