

氏 名	すぎもと のりひと 杉本 紀人
学 位 の 種 類	博士(薬学)
学 位 記 番 号	甲博薬第4号
学位授与の日付	令和6年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学 位 論 文 題 目	鎖状及び環状ジスルフィドを有する還元環境応答性 プロドラッグ型ホスホトリエステルの修飾オリゴ核酸 の合成及び機能評価
論 文 審 査 委 員	(主査) 教授 平 野 智 也 (副査) 教授 浦 田 秀 仁 (副査) 教授 大喜多 守

論文内容の要旨

Antisense oligonucleotide (AON) は、標的mRNAにWatson-Crick塩基対形成を介して相互作用することでmRNAの発現を制御する一本鎖DNAである。AONの医薬への応用には、ヌクレアーゼ耐性の改善を目的としたphosphorothioate (PS) などの化学修飾や細胞膜透過性の向上を目的とした脂質ナノ粒子のようなデリバリー分子の利用が必須とされている。しかし、PS修飾やデリバリー分子の利用は深刻な細胞毒性や品質管理の困難さなどの問題を抱えている。リン酸トリエステル (PTE) 修飾は、リン酸部にアルキル基を導入した非荷電性の化学修飾であり、ヌクレアーゼ耐性及び細胞膜透過性の双方の改善が期待できる。一方で、AON中にPTE修飾が存在すると、標的認識能の低下に伴う活性低下が引き起こされるため、修飾部位、修飾数などを最適化したAONの分子設計が重要となる。当研究室ではこれらの問題を解消可能な化学修飾核酸として、ジスルフィドを基本構造とした細胞内還元環境応答性のプロドラッグ型PTEオリゴ核酸 (prodrug type SS PTE ON) の開発に取り組んできた。本分子は、細胞内の還元的環境で未修飾オリゴ核酸へと変換されることで、複雑な分子設計を行わなくとも活性の向上が期待できる。先行研究では、6員環ジスルフィドを有するprodrug type SS PTE ON

(6-membered cyclic SS PTE ON) の開発を行い本分子が優れたヌクレアーゼ耐性と細胞内取り込み能を有することを明らかにした (**Figure**)。一方で、そのアンチセンス活性は PS 修飾 ON に比べて極めて低いことが課題であった。本分子は細胞内を模した還元条件下で未修飾 ON への変換速度が極めて遅いことから、筆者は細胞内で十分に未修飾 AON に変換されないことで活性を示さなかった可能性が高いと考え、その改善方法として変換速度に着目した新規 prodrug type SS PTE ON の開発に取り組んだ。

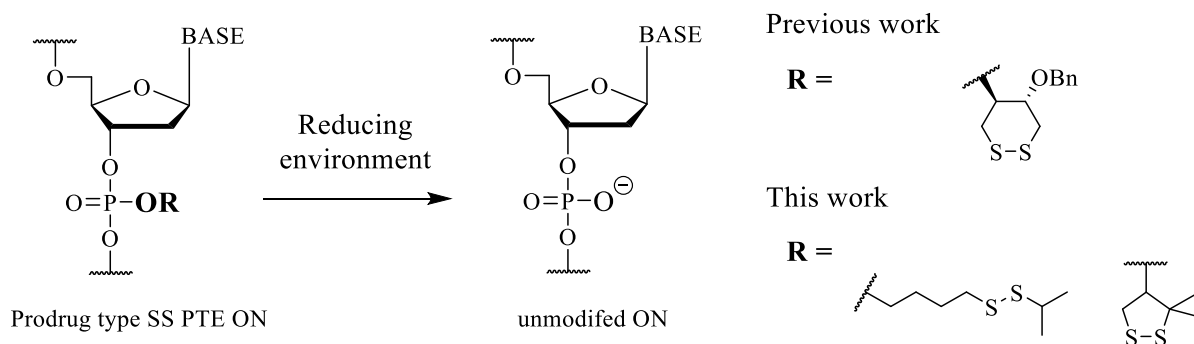


Figure. Structures of disulfide-based prodrug type phosphotriester-modified oligonucleotides and their conversion reaction into unmodified oligonucleotides in reducing environment.

第一章では、変換速度の向上が期待できる鎖状ジスルフィドを有する prodrug type SS PTE ON (linear SS PTE ON) を設計し、その合成および変換速度に関する性質評価を行った。まず linear SS PTE ON の合成に必要な、鎖状ジスルフィドを有するホスホロアミダイトの合成検討を行った。通常、3価のリン原子を有するホスホロアミダイトは、分子内のジスルフィドと反応しやすいため目的とするホスホロアミダイトは不安定であることが予想される。そこで化学的に安定なホスホロアミダイトを得るために複数の候補化合物の合成検討を行った結果、アミダイトを安定化させるための構造要件を明らかにし、3種の鎖状ジスルフィドを有する安定ホスホロアミダイトを得ることに成功した。さらに、それらの修飾ホスホロアミダイトを用いて linear SS PTE ON の合成にも成功し、これらの ON は一般的なオリゴ核酸の合成条件を用いて容易に合成可能であることを明らかにした。次に、合成した3種の linear SS PTE ON を用いて先行研究で開発した cyclic SS PTE ON との変換速度の差を評価した。その結果、細胞内を模した還元条件下で、今回設計した ON の中で isopropylthiobutyl 基を有する linear SS PTE ON が最も

変換速度が速いことを明らかにした。

第二章では、最も変換速度が速かったisopropylidithiobutyl基を有するlinear SS PTE ONに注目し、その生物学的な性質評価を行った。まず、本linear SS PTE ONが過去に報告した6-membered cyclic SS PTE ONと同様に優れた細胞内取り込み能やスクレーパー耐性を有することを明らかにした。ここまでの性質評価からlinear SS PTE ONは、アンチセンス活性の向上も見込める有用な分子であると考えられたことから、その活性をより正確に評価するための評価系の構築を行った。他グループによるapolipoprotein Bを標的とするgapmer型AONの分子設計を参考に、LNA修飾gapmer型AONを数種合成し、RT-qPCRによるアンチセンス活性の評価を行うことで、linear SS PTE ONの活性評価を可能にした。構築した評価系を用いて、cyclic SS PTE修飾および変換速度の異なる2種のlinear SS PTE修飾を導入したgapmer AONのアンチセンス活性を評価した。その結果、変換速度が最も速かったlinear SS PTE修飾gapmer AONは、他の修飾AONよりもアンチセンス活性を早く発現し、その活性強度もやや強い傾向があることが分かった。以上の結果からprodrug type SS PTE ONの変換速度が活性の発現に影響を与えることが示唆され、変換速度の向上によってより高活性なprodrug type SS PTE ONが開発可能であると考えられた。

そこで第三章では、さらなる変換速度の向上を目指して、新たに5員環ジスルフィドを有するprodrug type SS PTE ON (5-membered cyclic SS PTE ON) の開発に取り組んだ。通常5員環ジスルフィドは、化学的に不安定であるため分子間で重合し鎖状ジスルフィドポリマーを形成しやすく、5員環ジスルフィドの汎用性の高い合成法はほとんど報告されていなかった。そこで、最近になって報告された5員環ジスルフィドの合成法に独自の改良を加え、高スケールかつ高収率で5員環ジスルフィドを得る合成法を確立した。次に、得られた5員環ジスルフィドを含むオリゴ核酸を合成し変換反応を行ったところ、還元環境下での変換速度が飛躍的に向上し、prodrug type SS PTE ONの新たなシーズを見出すとともに、これを基に新たな分子を設計及び合成できる方法論を確立できた。

本論文では、鎖状ジスルフィド修飾基の構造と変換速度の相関を明らかにするとともに、変換速度とアンチセンス活性の関連にも言及した。また、さらなる変換速度の向上を目指し、5員環ジスルフィドを有するプロドラッグ核酸の開発研究の基盤を確立した。これらの知見は、さらに優れたプロドラッグ型PTE修飾核酸の開発への貢献が期待される。

論文審査の結果の要旨

アンチセンスオリゴ核酸 (Antisense oligonucleotide, AON) は、標的 mRNA に Watson-Crick 塩基対形成を介して相互作用することで mRNA の発現を制御する一本鎖 DNA である。AON の医薬応用のためには、ヌクレアーゼ耐性の改善を目的としたチオリン酸(phosphorothioate, PS)などの化学修飾や細胞膜透過性の向上を目的とした脂質ナノ粒子のようなデリバリー分子の利用が必須とされている。しかし、PS 修飾やデリバリー分子の利用は深刻な細胞毒性や品質管理の困難さなどの問題を抱えている。一方、リン酸部にアルキル基を導入した非荷電性の化学修飾であるリン酸トリエステル (PTE) 修飾は、ヌクレアーゼ耐性及び細胞膜透過性の双方を同時に改善させることが期待できる。しかし、AON 中に PTE 修飾が存在すると、標的認識能の低下に伴う活性低下が引き起こされうるため、修飾部位、数などを最適化した AON の分子設計が重要となる。本学位論文提出者の所属研究室では、これらの問題の解消可能な化学修飾としてジスルフィド構造を導入した細胞内還元環境応答性のプロドラッグ型 PTE オリゴ核酸の開発に取り組んできた。本分子は細胞内の還元的環境で活性体である未修飾のオリゴ核酸へと変換される。先行研究では、6員環ジスルフィド構造を有する分子の開発を行い、その優れたヌクレアーゼ耐性と細胞内取り込み能を明らかにしたが、そのアンチセンス活性が低いことが課題であった。これは、細胞内を模した還元条件下での活性体への変換速度が極めて遅かったことから、活性体が十分に生成しなかったためと考えられる。そこで本研究では、変換速度の改善を志向した新規プロドラッグ型 PTE オリゴ核酸の開発を行った。

第一章では、変換速度の向上が期待できる鎖状ジスルフィド構造を有する分子群を設計し、それらの合成および機能評価を行った。鎖状ジスルフィド構造を有するホスホロアミダイトをまず合成し、それらを用いて三種類のオリゴ核酸の合成に成功した。先行研究で開発された6員環ジスルフィド構造を有するオリゴ核酸とともに細胞内を模した還元条件下での活性体への変換速度を評価した結果、isopropylidithiobutyl基を有するオリゴ核酸が最も変換速度が速いことが明らかとなった。

第二章では、第一章で開発し鎖状ジスルフィド構造を有するオリゴ核酸の生物学的な機能評価を行った。その結果まず、開発した分子が先行研究で開発された6員環ジスルフィド骨格を有するオリゴ核酸と同様の、優れた細胞内取り込み能とヌクレアーゼ耐性を有することが明らかとなった。続いて、そのアンチセンス活性を評価するために、他の研究グループによって報告されたapolipoprotein Bを標的としたAONを参考に

して、RT-qPCRによるアンチセンス活性の評価系を構築した。この系を用いて、二種の鎖状ジスルフィドおよび6員環ジスルフィドそれぞれを有するAONのアンチセンス活性を評価した。その結果、第一章の研究において活性体への変換速度が最も速いことが示されていたisopropylidithiobutyl基を有するAONが、他の修飾AONよりもアンチセンス活性が早く発現し、その活性強度もやや強いことが明らかとなった。以上から、ジスルフィド構造を有するオリゴ核酸のAONとしての機能には、その活性体への変換速度が影響を与えることが示唆された。すなわち、変換速度の向上によってより有効なAONの開発が可能になると考えられる。

そこで第三章では、さらなる変換速度の向上を目指して、新たに5員環ジスルフィド構造を有するオリゴ核酸の開発に取り組んだ。一般に5員環ジスルフィドは化学的に不安定であり、分子間で重合して鎖状ジスルフィドポリマーを形成しやすいため、汎用性の高い合成法はほとんど報告されていなかった。そこで、最近報告された合成法に独自の改良を加えることにより、高スケールかつ高収率な合成法を確立することに成功した。得られた5員環ジスルフィドを含むオリゴ核酸も合成し、細胞内を模した還元条件下での変換反応を評価したところ、変換速度が飛躍的に向上することが明らかとなった。本分子はプロドラッグ型PTEオリゴ核酸の新たなシーズとなりえる。

本研究では、新規プロドラッグ型PTEオリゴ核酸として鎖状ジスルフィド構造を有する分子群を合成し、その活性体への変換速度とアンチセンス活性との相関を示唆する結果を得た。また、さらなる変換速度の向上が期待できる5員環ジスルフィドを有するプロドラッグ型PTEオリゴ核酸の開発のための基盤を確立した。これらの知見は、優れたAONとその医薬応用への貢献が期待できる重要な研究成果である。

以上により、上記の論文は博士（薬学）論文として適当と判断する。