

学術交流・研究推進プロジェクト 成果報告書

研究代表者 所属 機能分子創製化学研究室
職・氏名 助教・林 淳祐

研究テーマ：

核酸医薬への応用を目指したプロドラッグ型リン酸部修飾オリゴ核酸の性質評価

研究期間：

2019 年 4 月 1 日 ～ 2021 年 3 月 31 日

研究担当者：

＜本学＞

研究代表者 (大阪薬科大学・薬学部・林 淳祐)
研究分担者 (大阪薬科大学・薬学部・浦田 秀仁、和田 俊一)

研究目的：

核酸医薬は特定の遺伝子発現を抑制可能であることから、難治性疾患の治療薬として注目を集めている。一方で核酸医薬の構成成分であるオリゴ核酸は、生体内ヌクレアーゼによって容易に分解されることや、電荷を有する極性高分子であるため細胞膜透過性が極めて低い点が医薬応用において大きな問題としてあげられる。

当研究室ではオリゴ核酸のこれらの性質改善を目的として、プロドラッグ型オリゴ核酸の開発を進めている。これまでに環状ジスルフィドユニットを搭載したプロドラッグ型オリゴ核酸の合成に成功したが、本分子は天然型オリゴ核酸への変換速度が著しく遅く、作用発現の点において不利となることが予想された。そこで本研究では変換速度を速めることを目的として、研究代表者が設計した直鎖状ジスルフィドユニットを搭載したリン酸部修飾プロドラッグ型オリゴ核酸の合成と医薬応用のための性質評価を行った。

研究内容および研究成果：

まず変換反応の反応速度を加速させるために、直鎖状ジスルフィドユニットを搭載したリン酸部修飾プロドラッグ型オリゴ核酸の合成検討を行った。その結果、isopropylidithiobutyl 基をリン酸部に導入したプロドラッグ型オリゴ核酸が最も変換反応が早く、細胞内を模倣した還元環境において 24 時間以内に完全に天然型オリゴ核酸へと変換されることが分かった。

次に得られたプロドラッグ型オリゴ核酸に関してウシ血清 (FBS) 中での安定性評価を行った。天然 T5mer (T5)、環状ジスルフィドユニットを搭載した T5mer (cyc-T5) および鎖状ジスルフィドユニットを搭載した T5mer (lin-T5) を 10 %FBS 中で処理し安定性を評価した。その結果、lin-T5 は cyc-T5 と同等以上の抵抗性を示し、優れたヌクレアーゼ耐性を有することが分かった。

次に得られたプロドラッグ型オリゴ核酸の細胞膜透過性評価を行った。蛍光標識をした T10 に 3 か所のプロドラッグ型修飾を施したオリゴ核酸を、ヒト肺がん細胞 A549 細胞の培養培地中に添加し、7 時間後の細胞内蛍光強度を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) にて確認した。その結果、過去に開発

した環状ジスルフィドユニットを搭載したオリゴ核酸よりは劣るものの、細胞内にオリゴ核酸由来の蛍光が確認され、鎖状ジスルフィドユニットを搭載したプロドラッグ型オリゴ核酸も細胞導入試薬を用いずとも細胞内デリバリーが可能であることが示唆された。

次に鎖状ジスルフィドユニットを搭載したプロドラッグ型オリゴ核酸の遺伝子発現抑制効果を評価した。アポリポプロテイン B (ApoB) を標的としたギャップマー核酸の配列内部 (ギャップ領域) に鎖状ジスルフィドユニットを導入したオリゴ核酸を合成し、ヒト肝がん由来 HuH-7 細胞へ CEM 法にて細胞内導入を行った。その結果、鎖状ジスルフィドユニットを搭載したオリゴ核酸は親化合物であるオリゴ核酸と同等の遺伝子発現抑制効果を示し、細胞内還元環境で天然型オリゴ核酸へと変換され作用を発現していることが示唆された。

以上の結果から本研究にて開発した鎖状ジスルフィドユニットを搭載したプロドラッグ型オリゴ核酸は核酸医薬へと応用していく上で重要なスクレアーゼ耐性、細胞膜透過性を有していることが明らかとなった。

成果発表：

<学会発表>

・ Syntheses and properties of reducing environment responsive prodrug-type oligonucleotides bearing cyclic and linear disulfide moieties

林 淳祐, 船木涼平, 杉本紀人, 越智洋輔, 和田俊一, 浦田秀仁

Commemorative International Symposium of the Japan Society of Nucleic Acids Chemistry
2019, 2019 年 7 月

・ 細胞内還元環境に応答する直鎖ジスルフィド修飾を施したプロドラッグ型リン酸トリエステル (PTE) 核酸の合成

林 淳祐, 船木涼平, 越智洋輔, 和田俊一, 浦田秀仁

日本薬学会第 139 年会 2019 年 3 月

・ Properties of reducing-environment-responsive prodrug-type phosphate-modified oligonucleotides for development of oligonucleotide therapeutics

林 淳祐, 船木涼平, 杉本紀人, 越智洋輔, 和田俊一, 浦田秀仁

The 46th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2019 年 10 月