

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	核酸医薬開発に有用な塩基部保護ウリジン誘導体および分岐RNAの効率的合成法に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	田胡信広
Author(English)	Nobuhiro Tago
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10081号, 授与年月日:2016年3月26日, 学位の種類:課程博士, 審査員:清尾 康志,湯浅 英哉,一瀬 宏,相澤 康則,大窪 章寛,関根 光雄
Citation(English)	Degree:, Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10081号, Conferred date:2016/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	分子生命科学	専攻	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士（理学） Doctor of
学生氏名： Student's Name	田胡信広		指導教員（主）： Academic Advisor(main)	清尾康志
			指導教員（副）： Academic Advisor(sub)	

要旨（和文 2000 字程度）

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

本博士論文では、核酸医薬開発に有用な修飾ヌクレオシドの効率的合成法の開発および、新たな修飾 RNA として、人工修飾分岐 RNA の合成法開発を行った。

核酸医薬はターゲット親和性や、ヌクレアーゼ耐性の向上を目指し、化学修飾が施された人工核酸を用いることが多い。特に糖部 2'位に修飾を有するヌクレオシドは、現在 FDA により承認されている核酸医薬にも利用されており、使用価値が高い。この修飾ヌクレオシドの問題点として、その合成に伴う高い製造コストが挙げられる。第 1 章では、その問題を解決する手段として、マイクロフローケミストリーを用いて効率的に 2'位修飾ヌクレオシドの合成中間体を合成する手法の開発を行った。本研究では、合成中間体のうち、3',5'水酸基を TIPDS 基で保護したウリジン塩基部に対する、二相系反応を用いたアシル基の導入反応の効率化検討を行った。この二相系反応は、相関移動触媒を利用した界面で進行する反応であり、体積に対する界面の面積が反応効率に影響する。その点において、マイクロフローケミストリーは、細い流路内で反応を行うため、効率的に反応が進行することが期待できる。さらに、本研究では反応効率の更なる向上を目指し、多孔質素材を導入したマイクロフローシステムを構築し、その有効性を評価した。多孔質素材として、比較的入手が容易な HPLC ガードカラムを用いた。その結果、HPLC ガードカラムを導入しないマイクロフローシステムでは、60%程度の収率が得られる条件下において、HPLC ガードカラムを導入することで、収率が 20%程度向上することがわかった。また、孔径および表面修飾が異なる HPLC ガードカラムを用いたが、どの HPLC ガードカラムにおいても一様に反応効率が向上することが確認された。この反応は、通常塩基部の保護基に用いられるベンゾイル基だけでなく、イソブチリル基などの他の酸塩化物についても同様に適用可能だとわかった。つぎに、本マイクロフローシステムが、長時間送液をする事で、大量合成に適用可能かどうかを調べた。その結果、長時間送液した際には、送液用のポンプにかかる圧力が高くなり、有機相の送液が安定しないことがわかった。本検討においてベンゾイル化反応を一時間程度送液し、70%の単離収率で目的物を得ることに成功したが、これ以上の長時間送液には、更なる装置の改良が必要だとわかった。

第 2 章では生体内でスプライシングの副生成物として生じるラリアット RNA のアナログである、分岐 RNA を合成し、核酸医薬としての応用を目指し研究を行った。ラリアット RNA は通常、生体内で脱分岐酵素である Dbr1 によって速やかに加水分解されるが、過去に Dbr1 の発現を阻害したモデルマウスにおいて、ラリアット RNA が細胞質中に蓄積することで、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の毒性タンパク質である TDP-43 の毒性が低減できることが報告された。そこで本研究では、修飾分岐 RNA を合成し、Dbr1 の阻害剤として利用することで、ラリアット RNA を細胞質中に蓄積させ、ALS の治療法として利用できるのではないかと考え、研究をおこなった。本研究では、従来のホスホジエステル結合を介して分岐している部位をホスホロアミデート結合に置換した人工修飾分岐 RNA:2'N-bRNA および 5'N-bRNA をデザインした。2'N-bRNA の合成においては、保護基の組み合わせが異なる二つのモノマーユニットを合成した。それぞれの RNA 合成機への適用可能性を確認したところ、2'アミノ基に電子供与性の保護基である MMTTr 基を有するモノマーユニット A は、RNA 合成条件下において安定な分子内環状化合物を形成し、RNA 合成に適用することが難しいことがわかった。一方 2'アミノ基を電子吸引性の保護基である Fmoc 基を用いて保護したモノマーユニット B においては、分子内環状化合物を同様に形成するものの、その生成速度は遅く、RNA 合成が可能だとわかった。そこでモノマーユニット B を用いて 2'N-bRNA を合成し、Dbr1 に対する阻害能を評価した。その結果、2'N-bRNA は、Dbr1 の基質となるものの、ホスホジエステル結合を介して分岐した bRNA に比べて加水分解速度は非常に遅く、Dbr1 の阻害剤として利用することがわかった。また、本実験系において半阻害濃度は 40 nM 程度であることがわかった。次に新たなホスホロアミデート結合を介して分岐した修飾分岐 RNA として、分岐部位 2'位から一塩基下流のグアノシン 5'位をアミノ基に置換した 5'N-bRNA の合成を行った。5'N-bRNA の合成のために、分岐部位として、2'水酸基にホスホロアミダイトユニットを有するモノマーユニットおよび、5'水酸基をアミノ基に置換したグアノシンホスホロアミダイトユニットを合成し、RNA 合成機にて 5'N-bRNA の合成の合成を試みた。その結果、5'N-bRNA の合成は行えたものの、その安定性は 2'N-bRNA に比べ低く、合成後の陰イオン交換 HPLC での精製中および、-30 ℃ 中で保存中に、分岐部位のホスホロアミデート結合が加水分解されることがわかり、Dbr1 に対する性質評価を行うことは困難であることがわかった。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻：	分子生命科学	専攻	申請学位 (専攻分野)：	博士	(理学)
Department of			Academic Degree Requested	Doctor of	
学生氏名：	田胡信広		指導教員 (主)：	清尾康志	
Student's Name			Academic Advisor(main)		
			指導教員 (副)：		
			Academic Advisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)
Thesis Summary (approx.300 English Words)

This thesis consists of two chapters. In the first chapter, an efficient synthetic method of a modified nucleoside for the development of nucleic acid therapeutics is described.

2'-O-modification is one of the major modifications for artificial nucleosides to use as nucleic acid drug. This modification is known to improve target selectivities, nuclease resistances. One of the drawbacks of this modification is high cost of supply due to the difficult synthesis of protected intermediates. To solve this drawback, the author researched an efficient method of synthesis the intermediates. In this research, a benzylation to the 3',5'-O,0-TIPDS-uridine derivatives was optimized. Microfluidic chemistry was applied to improve the efficiency of this reaction. The author introduced a porous material into a microfluidic system as a mixer for further improvement of reaction efficiency. As a result, the yield improved from 60% to 80% by incorporating the porous material. To achieve a large scale synthesis, the continuous flowing reaction was also performed. However, this attempt resulted in an unstable flowing and lower isolated yield than the previous examinations. In the end, the author established an efficient synthetic method of the important intermediate for 2'-O-modified nucleoside using microfluidic chemistry especially with the porous material.

In the second chapter, the syntheses of artificial branch RNAs (bRNA) are described aiming to explore a new nucleic acid therapeutic method. These bRNAs are mimics of lariat RNA that generates as byproduct of RNA splicing. In ALS patient, inhibition of lariat RNA debranching enzyme can suppress the toxicity. Based on this, two types of the mimics, 2'-N-bRNA and 5'-N-bRNA were designed and synthesized to inhibit Dbr1. These mimics have phosphoramidate linkage at 2' position at a branched point instead of phosphodiester linkage. This modification is expected to improve the resistance towards hydrolysis by Dbr1 whereas the affinity remains. The synthesis was successful for 2'-N-bRNA while 5'-N-bRNA showed instability during purification. Finally, 2'-N-bRNA was found to inhibit Dbr1 efficiently ($IC_{50} \approx 40$ nM).

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。
Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).