

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

|                   |                                                                                                                                                                                             |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 題目(和文)            | アンチセンス核酸のタンパク質相互作用を制御する塩基部及びバックボーン修飾型核酸の開発及び評価                                                                                                                                              |
| Title(English)    |                                                                                                                                                                                             |
| 著者(和文)            | 金川峻幸                                                                                                                                                                                        |
| Author(English)   | Takayuki Kanagawa                                                                                                                                                                           |
| 出典(和文)            | 学位:博士(理学),<br>学位授与機関:東京工業大学,<br>報告番号:甲第12516号,<br>授与年月日:2023年9月22日,<br>学位の種別:課程博士,<br>審査員:清尾 康志,湯浅 英哉,中村 浩之,秦 猛志,大窪 章寛                                                                      |
| Citation(English) | Degree:Doctor (Science),<br>Conferring organization: Tokyo Institute of Technology,<br>Report number:甲第12516号,<br>Conferred date:2023/9/22,<br>Degree Type:Course doctor,<br>Examiner:,,,,, |
| 学位種別(和文)          | 博士論文                                                                                                                                                                                        |
| Type(English)     | Doctoral Thesis                                                                                                                                                                             |

# 博士論文

アンチセンス核酸のタンパク質相互作用を制御する  
塩基部及びバックボーン修飾型核酸の開発及び評価

指導教員

清尾 康志 教授

東京工業大学大学院 生命理工学院 生命理工学コース

金川 峻幸

## 目次

### 略語集

### 序論

|      |                     |   |
|------|---------------------|---|
| 序-一節 | 遺伝子標的創薬と核酸医薬品       | 1 |
| 序-二節 | ASO の作用機序           | 2 |
| 序-三節 | ASO と化学修飾           | 4 |
| 序-四節 | 承認されたアンチセンス医薬品と化学修飾 | 5 |
| 序-五節 | アンチセンス医薬品の課題        | 6 |
| 序-六節 | 本博士論文の概要            | 7 |

## 第一章 配列選択性向上に向けたグアニン 2 位修飾核酸の開発及び評価

|     |                                               |    |
|-----|-----------------------------------------------|----|
| 第一節 | 序                                             | 11 |
| 第二節 | ASO の設計及び合成                                   | 16 |
| 第三節 | 相補的 RNA とミスマッチ塩基対を含む RNA に対する<br>ASO の結合親和性評価 | 20 |
| 第四節 | <i>in vitro</i> アンチセンス活性評価                    | 23 |
| 第五節 | DNA マイクロアレイによる網羅的発現変動解析                       | 25 |
| 第六節 | pyG 修飾の KD 選択性に関する詳細な解析                       | 29 |
| 第七節 | cmG, pyG 修飾の効果を説明づける因子について                    | 31 |
| 第八節 | RNase H による切断位置選択性の解析                         | 32 |
| 第九節 | 配列、修飾パターンと RNase H 切断位置選択性の解析                 | 36 |
|     | 一章のまとめ                                        | 38 |

## 第二章 バックボーン修飾及び固定化によるスルホンアミド核酸の 課題克服に向けた新規骨格合成法の開発並びに構造評価

|     |                    |    |
|-----|--------------------|----|
| 第一節 | 序                  | 40 |
| 第二節 | 固定化スルホンアミド核酸の合成    | 44 |
| 第三節 | NMR による構造の推定       | 48 |
| 第四節 | DFT 計算による構造の推定     | 49 |
| 第五節 | CD スペクトル測定による構造の推定 | 51 |
|     | 第二章のまとめ            | 53 |

|         |    |
|---------|----|
| 総括      | 54 |
| 実験の部    |    |
| 一般的な事項  | 56 |
| 第一章の実験項 | 59 |
| 第二章の実験項 | 73 |
| 引用文献    | 81 |
| 講演目録    | 86 |
| 論文目録    | 86 |
| 謝辞      | 87 |

## 略語表

|            |                                                                               |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| Ac         | : Acetyl                                                                      |
| ADME       | : Absorption Distribution Metabolism Excretion                                |
| AST        | : Aspartate aminotransferase                                                  |
| ALS        | : Amyotrophic lateral sclerosis                                               |
| ALT        | : Alanine aminotransferase                                                    |
| ATTR       | : Transthyretin amyloidosis                                                   |
| Aq         | : Aqua                                                                        |
| ASO        | : Antisense oligonucleotide                                                   |
| API        | : Active pharmaceutical ingredient                                            |
| BTT        | : 5-(Benzylthio)-1- <i>H</i> -tetrazole                                       |
| Bu         | : Butyl                                                                       |
| CD         | : Circular dichroism                                                          |
| CMV        | : Cytomegalovirus                                                             |
| CPG        | : Controlled pore glass                                                       |
| DIPEA      | : <i>N, N</i> -diisopropylethylamine                                          |
| DDTT       | : [(dimethylamino-methylidene)amino]-3 <i>H</i> -1,2,4-dithiazaoline-3-thione |
| DFT        | : Density functional theory                                                   |
| DMAP       | : 4-( <i>N, N</i> -dimethylamino)pyridine                                     |
| DMEM       | : Dulbeccos' Modified Eagle Medium                                            |
| DMF        | : <i>N, N</i> -dimethylformamide                                              |
| DMSO       | : Dimethyl sulfoxide                                                          |
| DMTr       | : 4,4'-dimetoxytrityl                                                         |
| DNA        | : Deoxyribonucleic acid                                                       |
| ESI-TOF-MS | : Electrospray ionization time of flight mass spectrometry                    |
| Et         | : Ethyl                                                                       |
| ETDA       | : Ethylenediaminetetraacetic acid                                             |
| FAM        | : Fluorescein                                                                 |
| FDA        | : Food and Drug Administration                                                |
| GWAS       | : Genome-Wide Association Study                                               |
| h          | : Hour / Human                                                                |
| HPLC       | : High performance liquid chromatography                                      |
| HFIP       | : Hexafluoroisopropyl alcohol                                                 |
| GWAS       | : Genome-Wide Association Study                                               |
| KD         | : Knockdown                                                                   |

|             |                                                                     |
|-------------|---------------------------------------------------------------------|
| LNA         | : Locked nucleic acid                                               |
| m           | : Mouse                                                             |
| MALDI       | : Matrix assisted laser desorption ionization                       |
| Me          | : Methyl                                                            |
| Min         | : Minute                                                            |
| miRNA       | : Micro RNA                                                         |
| MM          | : Mismatch                                                          |
| MOE         | : 2'- <i>O</i> -methoxyethyl nucleic acid                           |
| mRNA        | : Messenger RNA                                                     |
| Ms          | : Methanesulfonyl                                                   |
| NMR         | : Nuclear magnetic resonance                                        |
| PDB         | : Protein data bank                                                 |
| PS          | : Phosphorothioate                                                  |
| RISC        | : RNA-induced silencing complex                                     |
| RNA         | : Ribonucleic acid                                                  |
| RNase H     | : Ribonuclease H                                                    |
| rt          | : Room temperature                                                  |
| SD          | : Standard deviation                                                |
| siRNA       | : Small interfering ribonucleic acid                                |
| SMN         | : Survival of motor neuron                                          |
| SNP         | : Single nucleotide polymorphism                                    |
| SOD1        | : Superoxide dismutase 1                                            |
| <i>tert</i> | : Tertiary                                                          |
| TBS         | : <i>tert</i> -butyldimethylsilyl                                   |
| TEA         | : Triethylamine                                                     |
| THF         | : Tetrahydrofuran                                                   |
| THP         | : Tetrahydropyranyl acetal                                          |
| TLC         | : Thin-layer chromatography                                         |
| $T_m$       | : Melting temperature                                               |
| tRNA        | : Transfer RNA                                                      |
| Ts          | : Toluenesulfonyl                                                   |
| UV          | : Ultraviolet                                                       |
| HWE         | : Horner-Wadsworth-Emmons                                           |
| Xantphos    | : 9,9-dimethyl-4,5-bis(diphenylphosphino)xanthene                   |
| Xphos       | : Dicyclohexyl(2',4',6'-triisopropyl-[1,1'-biphenyl]-2-yl)phosphine |

|                |                                                                      |
|----------------|----------------------------------------------------------------------|
| A              | : Adenosine, 2'-deoxyadenosine or Adenine                            |
| T              | : Thymidine, 2'-deoxythymidine or Thymine                            |
| G              | : Guanosine, 2'-deoxyguanosine or Guanine                            |
| C              | : Cytidine, 2'-deoxycytidine or Cytosine                             |
| <sup>m</sup> C | : 5-methylcytidine, 2'-deoxy-5-methylcytidine<br>or 5-methylcytosine |

# 序論

## 序-節: 遺伝子標的創薬と核酸医薬品

ヒトゲノム計画が発起されて以来、シーケンシング効率は飛躍的に向上し<sup>1</sup>、様々な遺伝関連情報が解明されてきた。現在では、幅広い疾患においてゲノム情報やその転写産物に関連する大規模な臨床情報が蓄積している。例えば、Genome-Wide Association Study (GWAS, <https://www.ebi.ac.uk/gwas/>)<sup>2</sup>には、ヒトゲノム上の数万に上る SNP と様々な疾患・形質情報との関連が公開されている。そして、このような実臨床データを活用した疾患の原因解明や遺伝情報に基づいた疾患の層別化などが広く研究されるようになった<sup>3-8</sup>。このように疾患と遺伝子の関連が次々に明らかにされる中、原因遺伝子を直接的に制御する疾患治療法の開発が近年強く求められるようになったのは必然の流れであると言える。中でも核酸医薬品は、これまで典型的な低分子医薬品では介入の難易度が高かった、遺伝子及びその転写産物に対して多面的に介入可能なモダリティであるため注目を集めている<sup>9</sup>。(Figure 0.1)

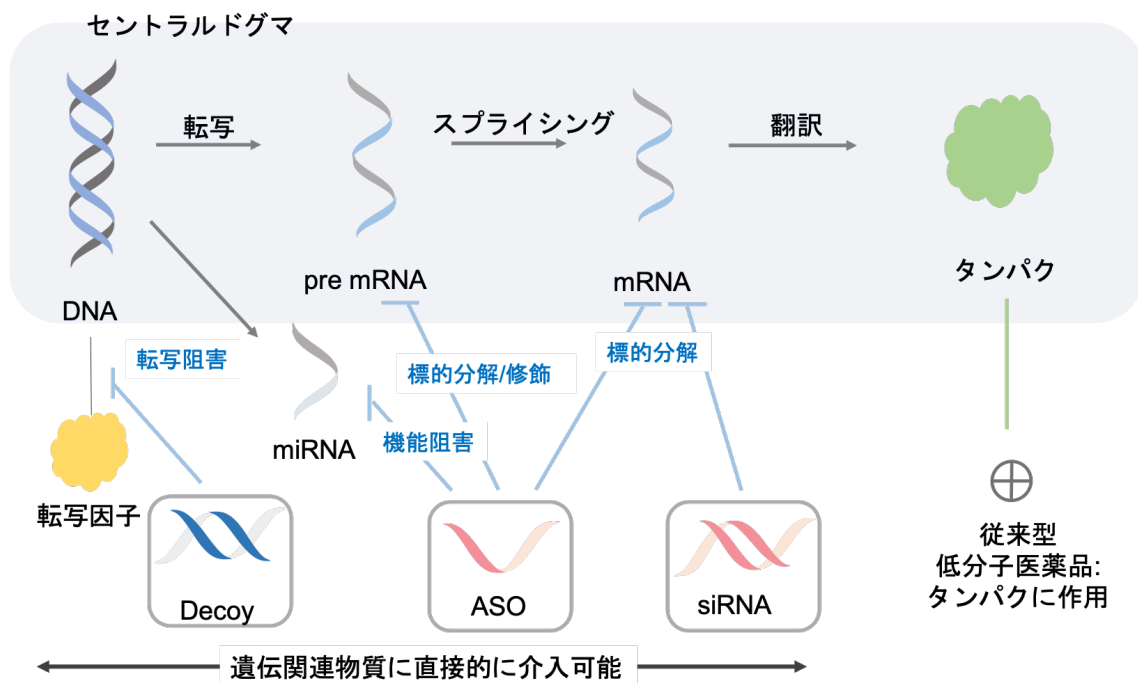


Fig. 0.1 核酸医薬品の遺伝関連物質への作用

核酸医薬品のうち siRNA は 21-23 塩基程度の二本鎖 RNA を導入することで、RNA-induced silencing complex (RISC) と二本鎖 RNA のアンチセンス鎖が複合体を形成し、標的の mRNA を knockdown (KD)することが可能である<sup>10,11</sup>。また、decoy 核酸は転写因子に認識される二本鎖 DNA 配列を導入することで、転写因

子を補足し、機能阻害を狙うことができる手法である<sup>12,13</sup>。また、一本鎖人工核酸であるアンチセンス核酸 (ASO) は mRNA の発現制御から、miRNA の機能阻害、スプライシングの制御など幅広いメカニズムで薬効を示す<sup>14</sup>。このように、核酸医薬品は多くの作用機序で標的遺伝子を制御することが可能である。特に ASO は既に複数の上市品が存在し<sup>9,15</sup>、現在も多くの臨床試験が行われている、一定の成功を収めたモダリティである。

遺伝性疾患を二つに大別すると、ある遺伝子の発現自体が有害性を持つ **gain of toxic** 型と生体の機能維持に必要な遺伝子が欠損する **loss of function** 型に分けられるが、次の節で述べるように ASO は双方のタイプの疾患に対して根本治療法を提示しており、臨床上の高い価値が認められている。一方、臨床試験の情報が蓄積するに伴い、ヒト投与時の安全性上の課題も浮き彫りとなっており<sup>16,17</sup>、次なるブレークスルーが必要不可欠である。本博士論文では幅広い作用を持つアンチセンス医薬品に着目し、その課題解決に向けた研究を行った。まず序論では、ASO のメカニズムと変遷、安全性の課題について順に概説する。

## 序-二節：ASO の作用機序

ASO のメカニズムには、上市品で使用されるものとして次の二つに大別される。一つ目は DNA/RNA 二重鎖を認識する RNase H の働きを利用して標的の RNA を分解するメカニズムである (Figure 0.2)。標的 RNA に相補的な ASO を、中央部分に DNA をもつように設計することで、標的の分解とそれに続く下流タンパクの産生抑制が可能となる。

二つ目の手法として pre-mRNA 上に存在する RNA 結合タンパクの結合位置に結合して立体障害的に作用し、そのタンパク質の働きを阻害するメカニズムを利用するものである (Figure 0.3)<sup>20</sup>。例えば pre-mRNA 上の splicing 促進タンパクが結合しているサイトに対して ASO を設計することで、タンパクの機能を阻害すれば近傍の Exon を読み飛ばす (スキップする) ことが可能である。

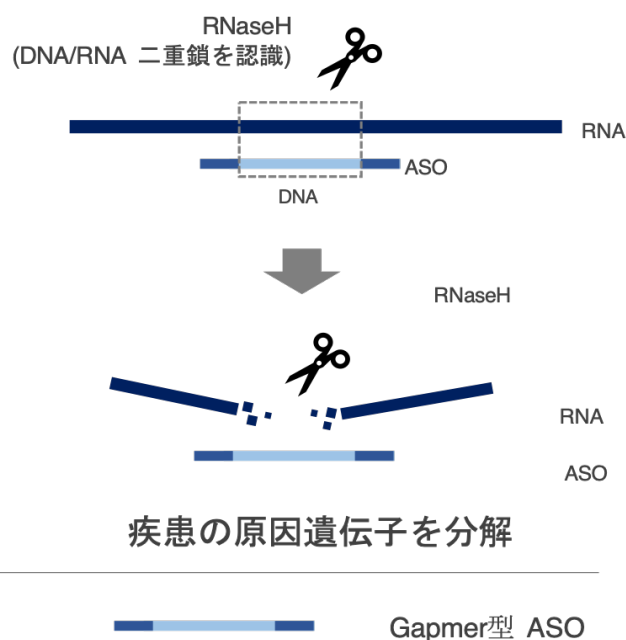


Fig. 0.2 標的分解型アンチセンスの作用機序

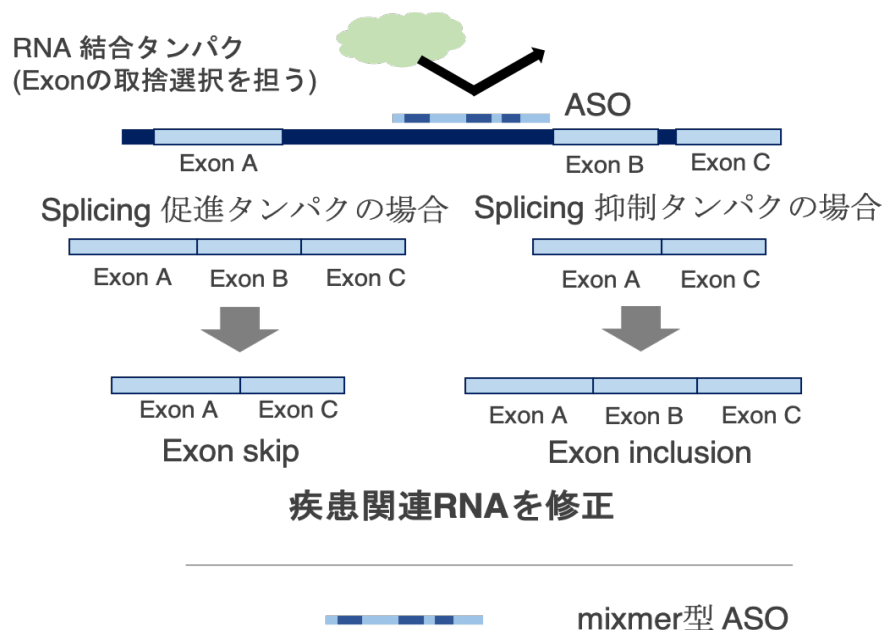


Fig. 0.3 標的修飾型アンチセンスの作用機序

実際の疾患治療では、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) に応用されている (Figure 0.4)。DMD は、遺伝子に生じた欠失などの変異がそのまま RNA に転写されることで、RNA 中の 3 塩基ごとのコドン読み枠がずれ (out-of-frame 欠失)、筋機能に必須であるジストロフィンタンパクが産生されないことが原因で発症する。そこで、立体障害的に作用する ASO を導入し、エキソンをスキップすることで読み枠を戻すことができる。例えば、ヌクレオチド長 118 の Exon52 が欠失した筋ジストロフィーの患者に対してはヌクレオチド長 212 の Exon53 をスキップすることで、欠失ヌクレオチドの合計を 3 の倍数の 330 にすることでコドンの読み枠を正常に戻すことができる。このようにして、短鎖のジストロフィンタンパクを再生し、機能改善を狙う手法が実臨床で使用されている<sup>18,19</sup>。逆に splicing 抑制タンパクを阻害すれば Exon を挿入することが可能である。本手法も脊髄性筋萎縮症の原因遺伝子である survival of motor neuron (SMN) 遺伝子を対象に、疾患治療薬として応用されている<sup>19</sup>。以上のように、アンチセンス医薬品はメカニズム上、標的遺伝子産物の量の調節や改変が直接的に行えるため、遺伝子を標的とするモダリティとして期待が高まっている。

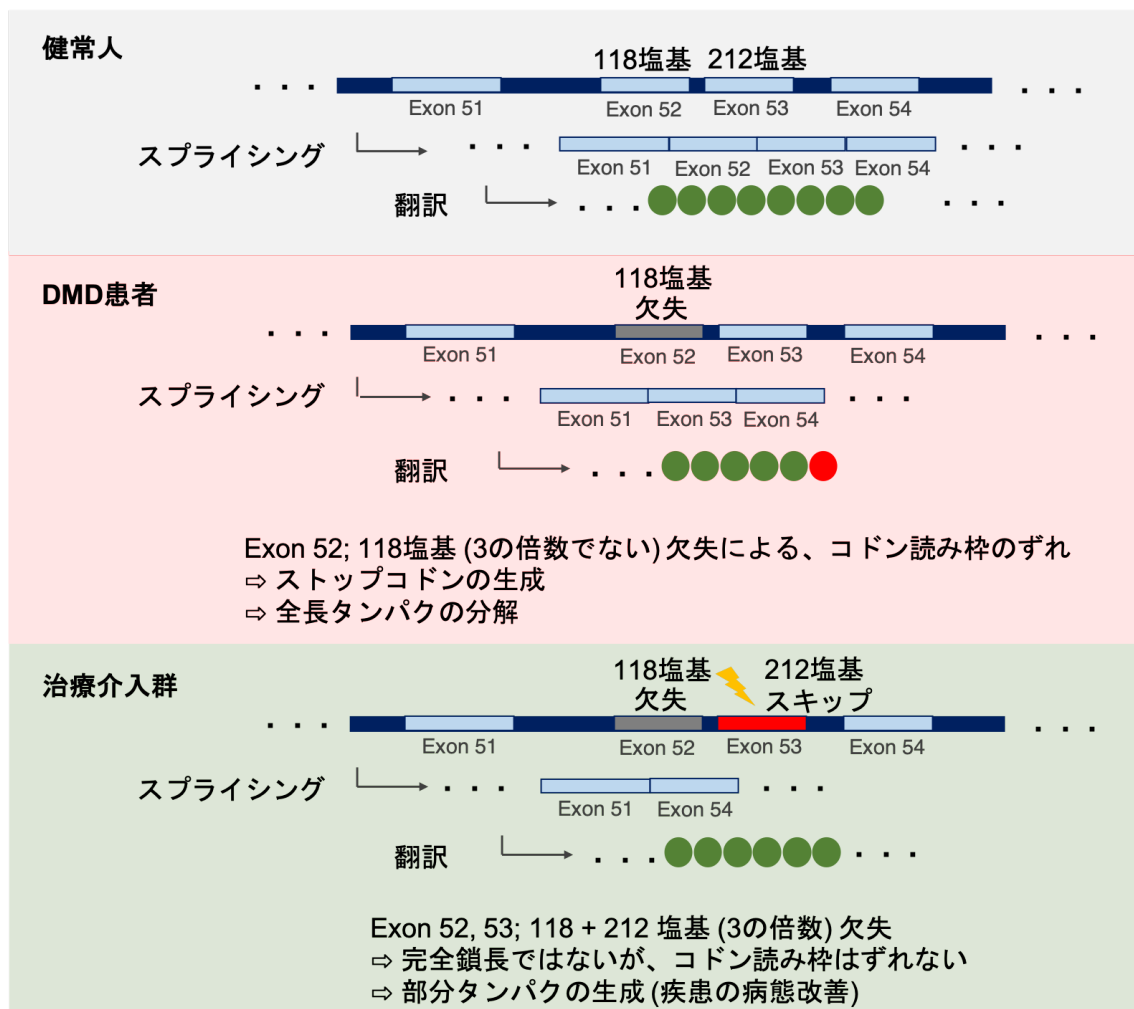


Fig. 0. 4 DMD とエキソンスキッピング

### 序-三節: ASO と化学修飾

ASO に天然の核酸構造をそのまま使用すると、活性と血中安定性の面で医薬品として目的とする薬効発現には不十分であるため、化学修飾された核酸の利用が一般的である。Figure 0.2 のような RNase H を用いて標的を分解するメカニズムの配列を設計する場合、DNA-RNA 二重鎖を酵素に認識させる必要があるため、中央の部分は DNA として合成し、化学修飾を配列の両末端に加える Gapmer 型<sup>21</sup> と呼ばれる配列設計が適用される。これに対し、Figure 0.3 のような立体障害的に働く場合では、配列中に化学修飾を散りばめる形で修飾を導入し、標的結合力、安定性を共に向上させる mixmer 型の配列設計を用いるのが一般的である。次に承認された医薬品の変遷と実際に使用されている化学修飾について概説する。

## 序-四節：承認されたアンチセンス医薬品と化学修飾

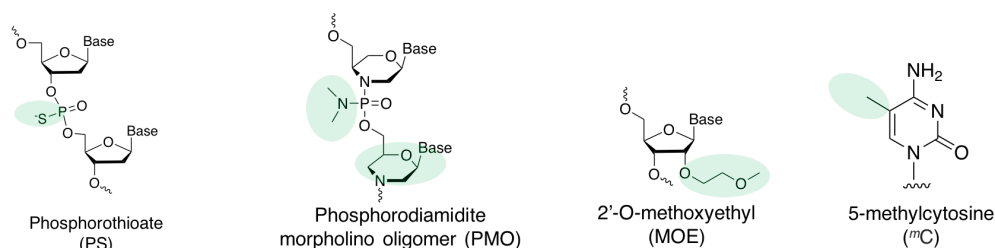
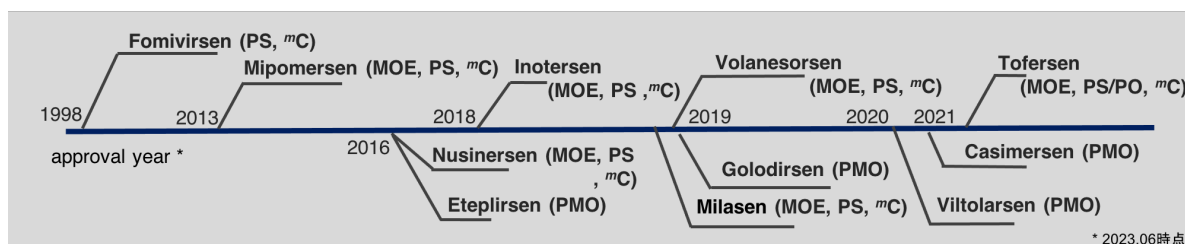


Fig. 0. 5 FDA に承認されたアンチセンス医薬品と修飾核酸

アンチセンス医薬品が FDA に承認された年と、承認薬に含まれる構造を Figure 0.5 に示す<sup>22</sup>。それぞれ年表の上側に標的分解型のアンチセンス医薬品を、下側に立体障害型のアンチセンス医薬品を記載した。1998 年の Fomivirsen の承認からしばらくの間、承認が途絶えたが、2013 年に Mipomersen が承認されたのを皮切りに、様々なアンチセンス医薬品が承認されており、近年はさらに加速度的に承認薬が増加している。

Table 0.1 承認薬の適応症と疾患領域

|              | 適応疾患                | 疾患領域   |
|--------------|---------------------|--------|
| Fomivirsen   | CMV性網膜症             | 眼      |
| Mipomersen   | ホモ接合型家族性 高コレステロール血症 | 循環器    |
| Nusinersen   | 脊髄性筋萎縮症             | 神経     |
| Eteplirsen   | デュシェンヌ型 筋ジストロフィー    | 筋      |
| Volanesorsen | 家族性高カイロミクロン血症       | 循環器    |
| Milasen      | Batten病             | 神経     |
| Inotersen    | 遺伝性ATTR アミロイドーシス    | 循環器、神経 |
| Golodirsen   | デュシェンヌ型 筋ジストロフィー    | 筋      |
| Viltolarsen  | デュシェンヌ型 筋ジストロフィー    | 筋      |
| Casimersen   | デュシェンヌ型 筋ジストロフィー    | 筋      |
| Tofersen     | SOD1変異家族性ALS        | 神経     |

また、それぞれの承認薬が適応としている疾患は Table 0.1 の通りである。眼、神経、筋、循環器などの複数の疾患領域を対象とした医薬品が開発されている。また、その他の医薬品モダリティではアプローチが難しかった、アンメットニーズの高い疾患を適応としており、ASO が医療上の高い価値を持つことが見て取れる。そして、これらの承認されたアンチセンス核酸には、先述の通り化学修飾が施されている (Figure 0.5)。用いられている修飾核酸はリン酸部に修飾が入った phosphorothioate (PS)<sup>22</sup> や Phosphoroamidate morpholino oligomer (PMO)<sup>23</sup>、糖に修飾が入った 2'-O-methoxyethyl (MOE)<sup>24</sup>、核酸塩基部に修飾が入った 5-methylcytosine (*m*C) である。非臨床の基礎研究段階では非常に多くの修飾核酸分子が開発されているにも関わらず<sup>25</sup>、上市品に含まれるものはこの 4 種類のみと限定的であり、新規の修飾型核酸の開発が望まれる。

#### 序-五節: アンチセンス医薬品の課題

修飾核酸の積極的な活用が進まない一因として、アンチセンス医薬品の課題を克服できる化学修飾が未だ開発されていないことが挙げられる。アンチセンス核酸医薬品の大きな課題の一つは、肝腎毒性や血小板減少など様々な安全性上の所見が観測されていることである<sup>16,17</sup>。その原因についてはいくつかの説が挙げられているが<sup>26-30</sup>、未だ決定的な原因については解明されていない。

核酸医薬品の毒性は、メカニズムに基づいて以下のような分類が提唱されている<sup>31</sup>。(Figure 0.6) まず毒性が ASO と相補鎖が二重鎖を形成する過程 (ハイブリダイゼーション) に起因しているかどうかについて分類し、もともと意図していた標的に結合することによって惹起された毒性はオンターゲット毒性、それ以外の配列にハイブリダイゼーションすることによって引き起こされた毒性は狭義のオフターゲット毒性とする。さらに、ハイブリダイゼーションに起因しない毒性は広義のオフターゲット毒性に分類される。広義のオフターゲットは、核酸成分が引き起こすクラスエフェクト、または核酸以外の成分に由来するものが含まれ、例えば DDS 製剤や製造上生成する不純物に由来するものなどが想定されている。実際に課題克服に向けた研究を行うにあたって、このように毒性メカニズムを分類した上で、それぞれの毒性に対する化学修飾アプローチを取ることが重要である。本博士論文では核酸医薬品の有効成分 (API: active pharmaceutical ingredient) に由来する毒性に着目し、新たな化学修飾開発による課題解決に臨んだ。

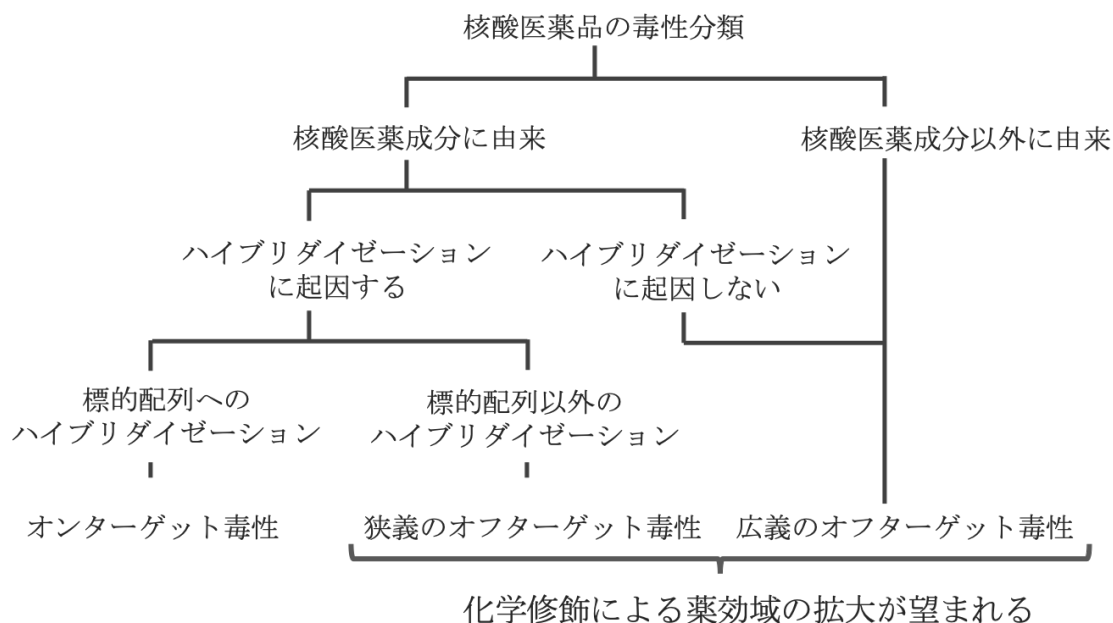


Fig. 0. 6 提唱されている核酸医薬品の毒性分類

#### 序-六節: 本博士論文の概要

本博士論文では ASO の課題克服に向けた化学修飾核酸の開発を行った。第一章では、標的以外の遺伝子への作用を制御することを志向し、グアニン修飾型核酸の開発・評価を実施した。ASO の標的分解作用は標的と形成する二重鎖の安定性に依存することが知られている。従って、二重鎖の安定性を制御することで、標的に対する選択性を向上させることを狙った。また、核酸塩基の中でもグアニンは相補的な GC 塩基対以外にも比較的安定なミスマッチ塩基対を形成するため、非特異的な切断の原因となり得る。そこで、本研究ではグアニンの修飾による、ASO の配列切断選択性向上を目指した。そして修飾核酸として、2-*N*-カルバモイルグアニン (cmG)<sup>32</sup> と 2-*N*-(2-ピリジル)グアニン (pyG)<sup>33</sup> という、一本鎖状態と二重鎖形成時で異なる安定コンホメーションを取る、特徴的な誘導体を用いることで ASO の性質変化が狙えるのではないかと考え評価を行った。実際には二重鎖融解温度 ( $T_m$  値) による二重鎖安定性試験、*in vitro* ノックダウンアッセイ、DNA マイクロアレイを用い、網羅的なトランスクリプトーム解析を実施した。その結果、pyG を組み込んだ ASO では、ミスマッチ塩基に対する認識能は低下したのに対し、マイクロアレイの評価では *in vitro* でグローバルな転写産物の変化が抑制されることも確認された。すなわち、二重鎖の形成能を選択的にすれば、配列の切断の選択性も向上するという、当初の仮説とは異なる結果

であった。従って、二重鎖の安定性以外に配列切断の選択性を説明する因子があるのではないかと考え、RNase H による配列認識を評価した。その結果、pyG は配列に依存して RNase H による切断部位の選択性が変化した。興味深いことに、RNase H による切断部位の選択性が向上した ASO では、トランスクリプトームにおける遺伝子選択性が向上し、逆に遺伝子選択性が下がった ASO では切断がより非選択的に変化することが明らかとなった。これらのことから、今回用いた修飾核酸では RNase H の標的切断位置の選択性を上げることで、標的遺伝子分解の選択性を向上させられることが示唆された。また、グアニンの 2 位のアミノ基の化学修飾により標的外遺伝子の分解を抑制し、ASO の選択性を向上させる可能性が示された。

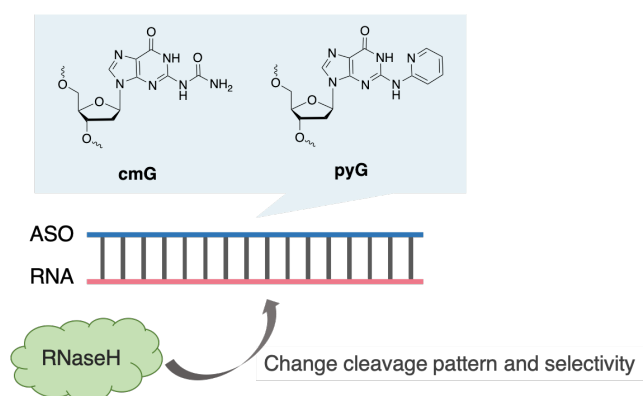


Fig. 0.7 第一章の概要

第二章では広義のオフターゲット毒性を志向し、ホスホロチオエート型核酸の代替として新規架橋型スルホンアミドを設計し、構造の固定化手法の開発及びコンホメーションの推定を行なった。先述の通り、これまでに上市された ASO は、生体内の安定性を獲得するためにリン酸部にホスホロチオエート (PS) 修飾が加えられている。PS 修飾はタンパク質と相互作用も向上し、膜透過性の向上など ASO の活性・動態面でも好影響を与えることが知られている。その一方で、数々の毒性関連タンパクとも相互作用することが知られている。本研究では、その代替構造としてスルホンアミドに着目した。スルホンアミドは PS 核酸と異なり負電荷を持たないため、様々なタンパク質に対する選択性を大きく変えることが期待される。また、スルホンアミドであればリン原子上に不斉を生じず、レギュレーション上でのメリットもある。その一方で、スルホンアミドをバックボーンとして利用すると ASO の活性や二重鎖形性能が低下することも明らかとなっている。従って、スルホンアミド核酸に対してバックボーンと塩基部の固定化を行うことで ASO への適用の妥当性を検証することとし、新規骨格のデザイン及び合成法の構築を行った。既知の化合物を出発物質とし、菌頭反応の収率改善や、大環状骨格の構築などの鍵反応を経て、目的の化合物の合成を 12 工程、総

収率 2 %で達成した。得られた化合物に対し、NMR から構造の推定を行い、糖部は S 型のコンホメーションに固定されていることが明らかとなった。また、DFT 計算や CD スペクトル測定の結果はともに、バックボーンの構造がトランス型に固定されていることを支持するものであった。また、CD 測定では昇温と共にスペクトルが大きく

変化しなかったため、構造が固定化されていることが示唆される。以上の結果から構造の固定化及び、その立体構造の推定に成功した。今後は二重鎖中への導入により、さら

に詳細な構造特性の推定が期待される。以上の通り、本博士論文では ASO とタンパクとの相互作用を制御する手法の開発および、その評価を実施した。

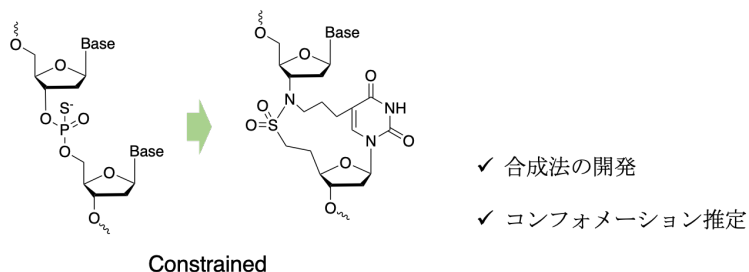


Fig. 0.8 第二章の概要

以上の研究について、各章で詳細を報告する

## 第一章

# 配列選択性向上に向けた グアニン 2 位修飾核酸の開発及び評価

## 第一節 序

細胞内に ASO の標的配列に類似する配列が存在すると、これらの配列への誤った結合と RNase H による切断が起こる<sup>34-36</sup>。このような切断は標的遺伝子以外の多数の遺伝子の発現低下を招く原因となる。この現象は、ハイブリダイゼーション依存のオフターゲット効果と呼ばれており、先行研究において、肝毒性を始めとする副作用の原因の一つとして指摘されている<sup>29,30</sup>。例えば、マウス *in vivo* の試験系において、類似した配列を持つ遺伝子が多いような標的配列に対する ASO を設計した場合には肝毒性が生じやすいことが示されている (Figure 1.1 A)<sup>37</sup>。また、ASO 中に二重鎖を大幅に安定化する修飾核酸である LNA を導入した場合にも肝毒性が見られることが示されている<sup>38</sup> (Figure 1.1 B)。これら過去の研究から ASO のハイブリダイゼーション依存のオフターゲット効果と毒性との関連が示唆される。

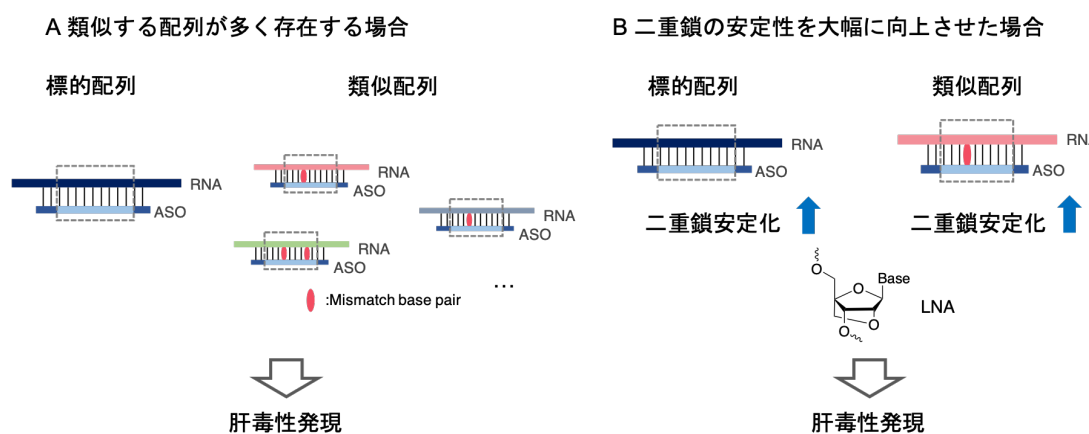


Fig. 1.1 ハイブリダイゼーション依存オフターゲットと肝毒性の関係

また、これらハイブリダイゼーション依存のオフターゲット効果が非標的 RNA の切断によるものであることもいくつかの研究から示唆されている。例えば、1-3 箇所程度 mismatches を含む、比較的標的と近い配列を持つ RNA 候補を *in silico* で検索した上で、それら RNA に対する ASO の KD 作用を評価し、誤切断の発生傾向が調べられている<sup>34</sup>。その結果、mismatches 数が少ない RNA の方が高い確率で KD されることが確認されている (Figure 1.2 A)。また、ASO と RNA との mismatches を含む二重鎖がエネルギー的により安定であるほど、RNA の切

断が起こりやすいことも示されている<sup>39</sup> (Figure 1.2 B)。このように二重鎖の相補性や安定性といったパラメータはハイブリダイゼーション依存のオフターゲット効果を考察する上での一つの鍵と言える。

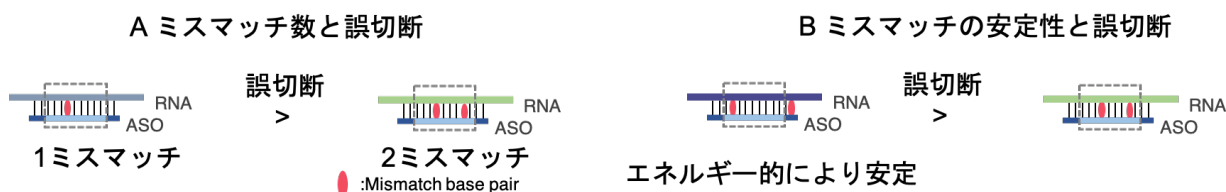


Fig. 1.2 ASO の配列とハイブリダイゼーション依存オフターゲットの関係

実際に siRNA では、二重鎖の安定性を低下させる unlocked nucleic acid (UNA) を修飾することで、配列の選択性向上に成功した例もある<sup>40</sup> (Figure 1.3)。このように、二重鎖の安定性と核酸配列の選択性は密接に関連している。従って、ASO においてもハイブリダイゼーション依存のオフターゲットを制御するためには、二重鎖形成時のエネルギー的な安定性に着目して化学修飾核酸を設計することは有効な戦略であると考えられる。



Fig. 1.3 化学修飾による siRNA の配列選択性の向上

核酸の特異的な二重鎖形成能は、それぞれアデニン-チミンとグアニン-シトシン間で安定的に形成されるワトソンクリック塩基対によって担保されている<sup>41</sup>。その一方で、実際にはそれ以外にも様々な塩基間でミスマッチ塩基対を形成することが知られている。特にグアニンはチミン、アデニン、グアニンと比較的安定なミスマッチ塩基対を形成することが知られている<sup>42</sup> (Figure 1.4)。従って、

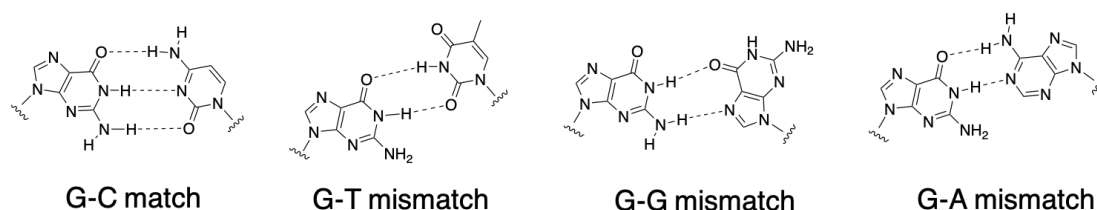


Fig. 1.4 グアニンが形成する塩基対

グアニンの形成するミスマッチ塩基対は潜在的なイブリダイゼーション依存のオフターゲットの原因になり得る。そこで、グアニンの二重鎖形成能の変化に着目した化学修飾核酸の開発を検討することとした。

グアニン誘導体に関する先行研究に目を向けてみると、過去にもグアニン誘導体をオリゴヌクレオチドに導入し、性質評価を行った研究は存在するが、その内容は tRNA<sup>43</sup>、酸化損傷塩基<sup>44,45</sup>、G-四重鎖に関する特性評価が大半である<sup>33,46</sup>。また、中には Toll 様受容体に認識される 5'-CG-3' という配列を含む一本鎖核酸 (CpG オリゴ) のグアニンの修飾による免疫刺激の抑制<sup>47</sup>や ASO の肝毒性の低減に着目しているものもあり、核酸医薬の安全性に関連する研究もある<sup>48</sup>。例えば、Obika らは *in silico* で完全相補および、1 ミスマッチとなる RNA が存在しない ASO を設計し、マウスに投与した際の肝毒性を調べた。そしてそのようなプロファイルにも関わらず、実際に *in vivo* で肝毒性マーカーの ALT/AST が上昇してしまう毒性 ASO が存在することを報告している。さらに、それぞれの ASO に修飾塩基を導入した場合の肝毒性の変化を検討している。その結果、グアニンの 7 位修飾体など、いくつかの分子では、実際に ALT を改善する結果が確認されている。このように、ハイブリダイゼーション非依存的なメカニズムに関する安全性研究も推進されている一方で、ハイブリダイゼーション依存オフターゲットとグアニンの修飾体の関係については未だ十分に研究されたものはない。従って、技術の新規性の観点でも開発の意義は大きいと考えられる。

グアニン塩基を修飾する際に注目すべき要件として、相補的なシトシンとのワトソン・クリック塩基対を阻害せず、かつ、塩基の認識能を変化させる必要がある。従って、相補鎖認識を考慮した上で修飾が可能な位置として、グアニンの 2 位に着目した (Figure 1.5)。

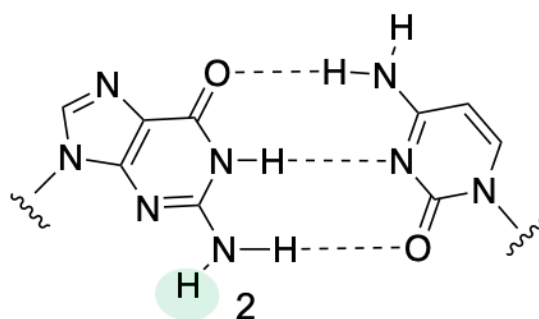
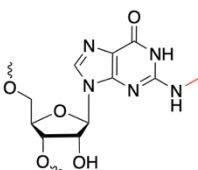


Fig. 1.5 ワトソンクリック塩基対とグアニンの 2 位修飾

グアニンの 2 位修飾核酸でこれまでに開発されたアナログとして、2-*N*-methylguanosine が挙げられる<sup>49</sup>。先行研究では  $T_m$  値測定により、2-*N*-methyl G を含む

二重鎖の安定性評価が行われている (Table 1.1)。ここで、 $T_m$  値は昇温時に二重鎖の半数が解離する温度のことを指し、一般的に二重鎖の安定性の指標に用いられる値である。結果的に、修飾によりシトシンとの相補塩基対形成時の安定性は  $71.9^{\circ}\text{C}$  から、 $72.9^{\circ}\text{C}$  へと向上する事が確認されている。一方、ミスマッチ塩基対についても修飾による安定化効果が見られており、ミスマッチ塩基対から相補塩基対の  $T_m$  値を差し引いた値をミスマッチ認識能 ( $\Delta T_m$ ) は  $-25.3^{\circ}\text{C}$  から  $-23.6^{\circ}\text{C}$  へと低下している。

Table 1.1 ワトソンクリック塩基対とグアノシンの 2 位修飾

| 2-N-methyl G                                                                      | 5'-r(GYCUAGXC)-3'<br>3'-r(CXGAUCYG)-5' | Watson-Crick<br>塩基対 | Mismatch<br>塩基対 | $\Delta T_m^*$ (mismatch - match) |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------|---------------------|-----------------|-----------------------------------|
|                                                                                   |                                        | X / Y               | C               |                                   |
|  | G                                      | 71.9                | 46.8            | - 25.1                            |
|                                                                                   | N <sup>2</sup> Methyl G                | 72.9                | 49.3            | - 23.6 (塩基認識能は低下)                 |

従って、単純に 2 位に対してメチル基を修飾するだけでは塩基選択性は向上しない。そこで、我々が注目した核酸が、Sasami らが報告している 2-N-carbamoylguanine (cmG)<sup>32</sup> 誘導体、及び Inde らが報告している 2-N-(2-pyridyl)guanine (pyG)<sup>33</sup> 誘導体である (Figure 1.6)。

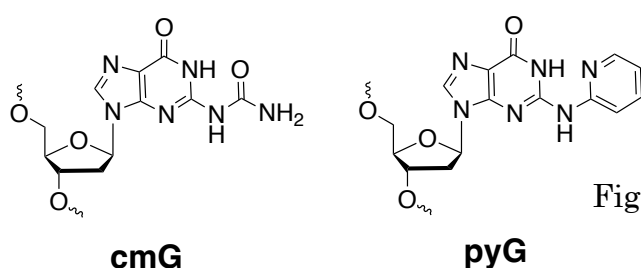


Fig. 1.6 デオキシグアノシン 2 位修飾体  
cmG, pyG の構造

これらのデオキシグアノシン誘導体は、2-アミノ基をカルバモイルあるいは、ピリジル基で修飾した人工核酸である。Figure 1.7 に示すように、理論計算では、より安定なコンホメーションはワトソン・クリック塩基対を形成できない closed 型を取ることが知られている。一方でシトシンと 3 つの水素結合により、ワトソンクリック塩基対を形成する際には、カルバモイルまたはピリジル残基が回転してより安定ではない open 型コンホメーションに変化すると考えられている。このような特徴的なコンホメーションを有する核酸類を用いることで、ASO の特異的な認識を変化させることが可能ではないかと考えた。

また、これらの修飾が DNA 二重鎖の熱安定性に及ぼす影響についても調べられており、cmG 修飾はミスマッチ塩基対に対する認識能をわずかに改善する事が明らかとなっている (Table 1.2)。例えば、未修飾の G の場合、G-T 塩基対のミスマッチ認識能 ( $\Delta T_m$ ) は -9.7 °C であったのに対し、同じ位置に cmG 修飾を加えると、-14.0 °C と認識能が向上している。また、GA 塩基対についても同様に、cmG 修飾によって -19.7 °C から -21.5 °C へと認識能の向上が確認されている。一方で、ASO への応用は研究されておらず、DNA/RNA 二重鎖の安定性に与える影響や *in vitro* での活性や選択性に与える影響について興味をもたれる。

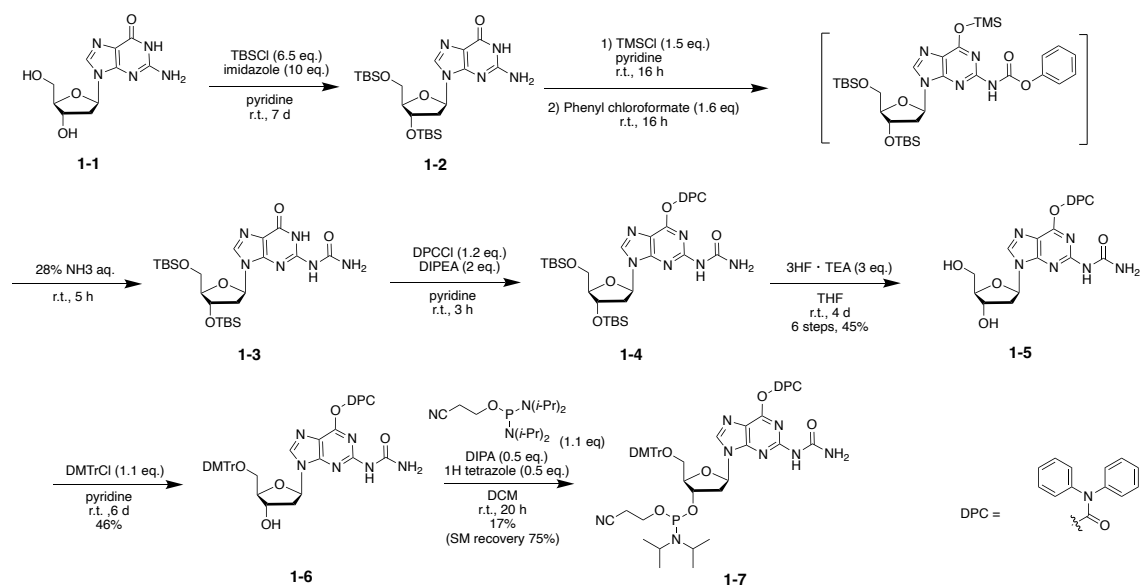
Table 1.2 cmG を含む DNA 二重鎖の安定性評価

|                                 | Watson-Crick<br>塩基対 |      | Mismatch<br>塩基対 |         |         |
|---------------------------------|---------------------|------|-----------------|---------|---------|
|                                 | X / Y               | C    | A               | G       | T       |
| 5'- d(CGGC <b>X</b> AGGAG) -3'  |                     |      |                 |         |         |
| 3'- d(GCCG <b>Y</b> TCCTC) - 5' |                     |      |                 |         |         |
|                                 | G                   | 60.2 | 40.5            | 41.7    | 50.5    |
|                                 |                     |      | (-19.7)         | (-18.5) | (-9.7)  |
| ( ) 内は $\Delta T_m$ ;           |                     |      |                 |         |         |
| mismatch – match を示す            | cmG                 | 59.9 | 38.4            | 44.1    | 45.9    |
|                                 |                     |      | (-21.5)         | (-14.2) | (-14.0) |

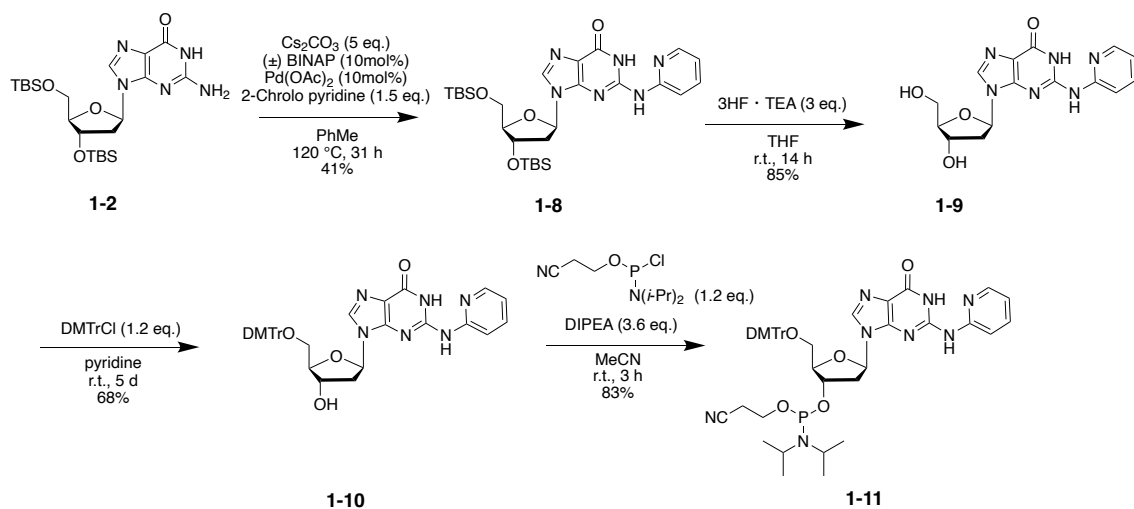
以上のように、cmG, pyG の塩基認識能力が、未修飾のグアニンと異なる可能性が示唆される。従って、これらの修飾グアニンが ASO の RNase H 切断効率やハイブリダイゼーション依存性のオフターゲットに対して、どのような影響を与えるかを検討すべく、化学的および生物学的特性について評価した。

## 第二節 ASO の設計及び合成

まず、既法に従い cmG, pyG モノマーを合成した<sup>32,33</sup>。



Scheme 1.1 cmG の合成



Scheme 1.2 pyG の合成

cmG については、**1-1** を出発物質とし糖部 3', 5'位の TBS 保護、塩基部 6 位の TMS 化、続いて 2 位を活性化し、塩基部にウレア骨格を導入した。さらに、6 位

に diphenyl calbamoyl (dpc) 保護をかけ、**1-4** へと導いた。ここまで、化合物の溶解度は低く、酢酸エチル又は、ジイソプロピルエーテルによる懸洗のみで粗精製を行い、最終工程でカラムクロマトグラフィーを実施することで、**1-4** を 6 工程 45% の収率で得た。さらに、糖部保護基の脱保護、トリチル化、アミダイト化を行い化合物 **1-7** を得た。また、pyG についても化合物 **1-2** を共通原料とし、2 位に 2-ピリジン環のカップリングを行った。さらに糖部保護基の脱保護、トリチル化、アミダイト化を行い化合物 **1-11** を得た。以上の通り、それぞれ、DNA 自動合成機に適応可能なアミダイトユニット **1-7**、**1-11** を合成し、(scheme 1.1, 1.2) 以降のオリゴ合成に用いた。

続いて、cmG および pyG の性質評価のため、16 塩基長の LNA<sup>50</sup> Gapmer を設計した。各 Gapmer ASO は、両端に 3 個ずつ LNA 残基を修飾し、リン酸部はホスホロチオエート (PS) で修飾した。PS 修飾は、モルホリノ核酸を除き、承認された全てのアンチセンス医薬品に含まれる構造で、核酸の生体内安定性を向

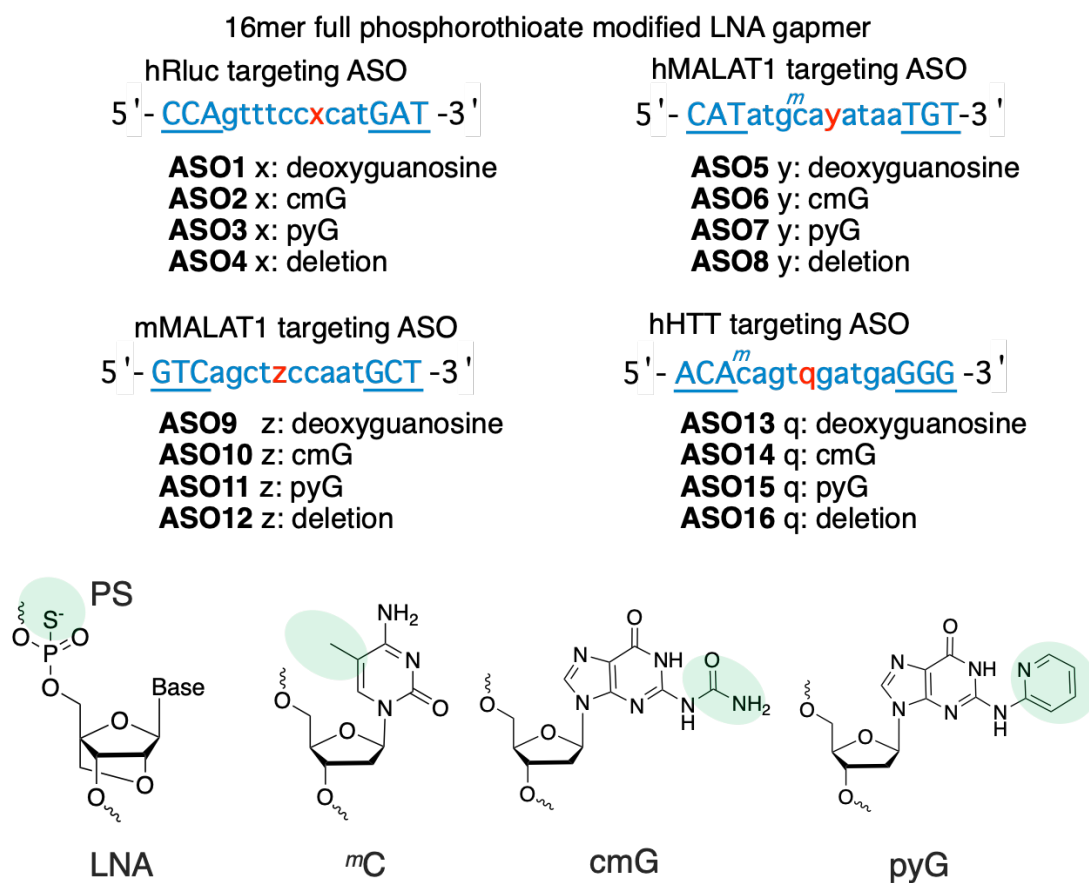


Fig. 1.8 合成した ASO と使用した修飾核酸

上させることが知られている<sup>22</sup>。また、LNA は核酸の二重鎖の安定性を著しく向上させることが知られている。どちらも有望な化学修飾ではあるが、修飾と毒

性の関連が示唆されている<sup>22,35</sup>。従って、LNA, PS を組み込んだ ASO の安全性の改善は重要であり、これらを含む ASO の特性を化学修飾によってどのように変化させられるか検証した。また、ASO の標的としては以下の 4 つの標的を選抜した。一つは、ヒト細胞での発現のためにコドンが最適化されたレニラルシフェラーゼ (hRluc) である。加えて、long-noncoding RNA (lncRNA) として知られ、先行研究においても ASO の KD 活性の評価に用いられた例の多い MALAT1 RNA のヒト配列 (hMALAT1) とマウス配列 (mMALAT1) を標的として選抜した。さらに、ハンチントン病において疾患の原因となる HTT 遺伝子の点変異を含む位置<sup>51</sup>を標的とした ASO を設計した。それぞれの配列と修飾の化学構造を Figure 1.8 に示す。ここで、下線部の大文字は LNA<sup>50</sup> (Figure 1.8 左下)、小文字は DNA を示している。hRluc の mRNA を標的とする ASO の配列は、5'- CCAGtttcc-x-catGAT-3' であり、x としてデオキシグアノシン (ASO1)、cmG (ASO2)、pyG (ASO3) 又は塩基を欠失させた (ASO4) を設計した。同様に、ヒト MALAT1 を標的とする ASO は 5'- CATatg<sup>m</sup>ca-y-ataaTGT -3' (ASO5-8)、マウス MALAT1 標的 ASO は 5'- GTCagct-z-ccaatGCT -3' (ASO9-12)、ヒト HTT 標的 ASO は 5'- ACA<sup>m</sup>cagt-q-gatgaGGG -3' (ASO13-16) であり、y, z, q にはそれぞれの x と同様の種類の修飾を設計した。それぞれ修飾の位置は hRluc ASO の 5'末端から 10 番目と hMALAT1 ASO の 9 番目、mMALAT1 ASO の 8 番目、hHTT ASO の 8 番目の位置である。実際に設計したオリゴヌクレオチドはホスホロアミダイト法により合成し、アンモニア水による切り出し、HPLC 精製によって目的物を得た。それぞれ質量分析 (MS) により目的物の生成を確認しており、理論値と実測値の一致が確認されている (Table 1.3)。

また、ASO に相補的な RNA 及びネガティブコントロールとして、標的に相補

Table 1.3 合成した ASO の MS の理論値及び観測値

| target         | name  | Calcd. | Found  | target         | name  | Calcd. | Found  |
|----------------|-------|--------|--------|----------------|-------|--------|--------|
| Rluc           | ASO1  | 5269.3 | 5269.8 | MALAT1 (human) | ASO5  | 5341.4 | 5342.2 |
|                | ASO2  | 5313.3 | 5313.3 |                | ASO6  | 5385.4 | 5385.3 |
|                | ASO3  | 5347.4 | 5347.0 |                | ASO7  | 5419.5 | 5419.1 |
|                | ASO4  | 4924.0 | 4922.2 |                | ASO8  | 4996.1 | 4996.0 |
| MALAT1 (mouse) | ASO9  | 5294.3 | 5296.4 | HTT            | ASO13 | 5432.4 | 5433.3 |
|                | ASO10 | 5338.3 | 5338.5 |                | ASO14 | 5476.4 | 5476.4 |
|                | ASO11 | 5372.4 | 5371.4 |                | ASO15 | 5510.5 | 5510.2 |
|                | ASO12 | 4949.0 | 4947.2 |                | ASO16 | 5087.1 | 5087.6 |

的でない ASO を用意し、後の実験に用いた。RNA1-4 は 5'-AUCAUG-R-GGAAACUGG-3'、RNA5-8 は 5'-ACAUAU-R-UGCAUAUG-3' (R は C、U、A または G) とし、RNA9,10 は 5'-AGCAUUGG-R-AGCUGUC-3'、RNA11,12 とし て 5'-CCCUCAUC-R-ACUGUGU-3' (R は C、U) を用いた。また、RNA1 (hRluc), RNA5 (hMALAT1), RNA9 (mMALAT1) の R = C の場合の蛍光標識体を FAM-RNA1-3 とし、hRluc 及び hMALAT1 のネガティブコントロールを NC1, NC2 とした (Figure 1.9)。

|                                                                                                           |         |      |                                                                          |         |      |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------|--------------------------------------------------------------------------|---------|------|
| Complementary RNA for hRluc<br>5'-F-AUCAUGRGGAAACUGG-3'                                                   |         |      | Complementary RNA for hMALAT1<br>5'-F-ACAUAURUGCAUAUG-3'                 |         |      |
| RNA1                                                                                                      | F: none | R: C | RNA5                                                                     | F: none | R: C |
| RNA2                                                                                                      | F: none | R: U | RNA6                                                                     | F: none | R: U |
| RNA3                                                                                                      | F: none | R: A | RNA7                                                                     | F: none | R: A |
| RNA4                                                                                                      | F: none | R: G | RNA8                                                                     | F: none | R: G |
| FAM-RNA1                                                                                                  | F: FAM  | R: C | FAM-RNA2                                                                 | F: FAM  | R: C |
| Complementary RNA for mMALAT1<br>5'-F-AGCAUUGGRAGCUGUC-3'                                                 |         |      | Complementary RNA for hHTT<br>5'-F-CCCUCAUCRACUGUGU-3'                   |         |      |
| RNA9                                                                                                      | F: none | R: C | RNA11                                                                    | F: none | R: C |
| RNA10                                                                                                     | F: none | R: U | RNA12                                                                    | F: none | R: U |
| FAM-RNA3                                                                                                  | F: FAM  | R: C |                                                                          |         |      |
| Negative control for hRluc<br>5'-TCA <u>Tga</u> <sup>m</sup> catg <u>t</u> <sup>m</sup> c <u>g</u> ACG-3' |         |      | Negative control for hMALAT1<br>5'-TCG <u>ga</u> atcatagt <u>AGT</u> -3' |         |      |
| NC1                                                                                                       |         |      | NC2                                                                      |         |      |

Fig. 1.9 本章で使した RNA およびネガティブコントロール

### 第三節 相補的 RNA とミスマッチ塩基対を含む RNA に対する

#### ASO の結合親和性評価

まず、それぞれの修飾核酸が二重鎖の結合親和性に与える影響を調べるため  $T_m$  値を測定した。はじめに、完全に相補的な ASO/RNA 二重鎖の安定性を  $T_m$  値により評価した (Table 1.4, **RNA1** の列)。完全相補の hRluc 二重鎖 (**RNA1/ASO1-4**) の場合、**ASO1** の  $T_m$  値が 67.5 °C であるのに対し、cmG を含む **ASO2** は 68.5 °C であった。同様に、より嵩高い pyG を導入した **ASO3** では、 $T_m$  値は 63.7 °C に低下した。また、x の位置のデオキシグアノシンを除去した **ASO4** の効果も評価した。その結果、塩基対を形成しない **ASO4** の安定性は 55.3 °C と著しく低下した。したがって、cmG と pyG は相補的なシチジン残基とグアニンと同等または若干低い塩基対形成能を有することが明らかとなった。

Table 1.4 デオキシグアノシン修飾体を含む hRluc 二重鎖の親和性評価

| hRluc-targeting ASO                           |                                                         |             |             |             |
|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
| ASO: 5'- <u>CCA</u> gtttccxcat <u>GAT</u> -3' |                                                         |             |             |             |
| RNA: 3'- GGUCAAAGGRGUACUA -5'                 |                                                         |             |             |             |
|                                               | $T_m$ (°C) ( $T_m$ mismatch – $T_m$ perfect match (°C)) |             |             |             |
|                                               | <b>RNA1</b>                                             | <b>RNA2</b> | <b>RNA3</b> | <b>RNA4</b> |
|                                               | (R = C)                                                 | (R = U)     | (R = A)     | (R = G)     |
| <b>ASO1</b>                                   | 67.5                                                    | 58.5        | 56.6        | 58.4        |
| (x = G)                                       |                                                         | (–9.0)      | (–10.9)     | (–9.1)      |
| <b>ASO2</b>                                   | 68.5                                                    | 58.6        | 56.3        | 59.6        |
| (x = cmG)                                     |                                                         | (–9.9)      | (–12.2)     | (–8.9)      |
| <b>ASO3</b>                                   | 63.7                                                    | 62.2        | 61.0        | 61.2        |
| (x = pyG)                                     |                                                         | (–1.5)      | (–2.7)      | (–2.5)      |
| <b>ASO4</b>                                   | 55.3                                                    | 55.0        | 55.0        | 57.7        |
| (x = deletion)                                |                                                         | (–0.3)      | (–0.3)      | (2.4)       |

Table 1.5 デオキシグアノシン修飾体を含む hMALAT1 二重鎖の親和性

hMALAT1-targeting ASO

ASO: 5'- CATatg<sup>m</sup>cayataaTGT-3'

RNA: 3'- GUAUAC GURUAUUACA-5'

|                | $T_m$ (°C) ( $T_m$ mismatch – $T_m$ perfect match (°C)) |             |             |             |
|----------------|---------------------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|
|                | <b>RNA5</b>                                             | <b>RNA6</b> | <b>RNA7</b> | <b>RNA8</b> |
|                | (R = C)                                                 | (R = U)     | (R = A)     | (R = G)     |
| <b>ASO5</b>    | 51.3                                                    | 38.8        | 38.5        | 39.5        |
| (y = G)        |                                                         | (–12.5)     | (–12.8)     | (–11.8)     |
| <b>ASO6</b>    | 52.0                                                    | 39.1        | 39.1        | 41.9        |
| (y = cmG)      |                                                         | (–12.9)     | (–12.9)     | (–10.1)     |
| <b>ASO7</b>    | 46.8                                                    | 43.3        | 43.0        | 42.6        |
| (y = pyG)      |                                                         | (–3.5)      | (–3.8)      | (–4.2)      |
| <b>ASO8</b>    | 30.5                                                    | 33.4        | 38.1        | 36.0        |
| (y = deletion) |                                                         | (2.9)       | (7.6)       | (5.5)       |

Table 1.6 デオキシグアノシン修飾体を含む mMALAT1 及び hHTT 二重鎖の親和性

mMALAT1-targeting ASO

ASO: 5'- GTCagctzccaatGCT -3'

RNA: 3'- CUGUCGARGGUUACGA -5'

hHTT-targeting ASO

ASO: 5'- ACA<sup>m</sup>cagtqatgaGGG -3'

RNA: 3'- UGU GUCARCUACUCCC -5'

|                | $T_m$ (°C) ( $T_m$ mismatch – $T_m$ perfect match (°C)) |              |                |              |
|----------------|---------------------------------------------------------|--------------|----------------|--------------|
|                | <b>RNA9</b>                                             | <b>RNA10</b> | <b>RNA11</b>   | <b>RNA12</b> |
|                | (R = C)                                                 | (R = U)      | (R = C)        | (R = U)      |
| <b>ASO9</b>    | 72.9                                                    | 64.7         | <b>ASO13</b>   | 67.5         |
| (y = G)        |                                                         | (–8.2)       | (y = G)        | (–9.0)       |
| <b>ASO10</b>   | 74.3                                                    | 63.1         | <b>ASO14</b>   | 68.5         |
| (y = cmG)      |                                                         | (–11.2)      | (y = cmG)      | (–9.9)       |
| <b>ASO11</b>   | 69.4                                                    | 66.5         | <b>ASO15</b>   | 63.7         |
| (y = pyG)      |                                                         | (–2.9)       | (y = pyG)      | (–1.5)       |
| <b>ASO12</b>   | 58.5                                                    | 59.0         | <b>ASO16</b>   | 55.3         |
| (y = deletion) |                                                         | (0.5)        | (y = deletion) | (–0.3)       |

また、hMALAT1 を標的とする **ASO5-8** (Table 1.4, **RNA5** の列) の場合、**RNA5** との二重鎖の  $T_m$  は 51.3, 52.0, 46.8, 30.5 °C で、**ASO1-4/RNA1** 二重鎖よりも全体的に  $T_m$  値が低かったが、修飾による二重鎖形成能の変化はほぼ同様の傾向であった。さらに、mMALAT1 (Table 1.5, **RNA9** の列) についても **ASO9-12/RNA9** 72.9, 74.3, 69.4, 58.5 °C、hHTT (Table 1.6, **RNA11** の列) についても **ASO13-16/RNA11** 67.5, 68.5, 63.7, 55.3 °C といずれにおいても、修飾ごとの安定性変化は同様の傾向であった。

次に、ASO とミスマッチを含む二重鎖の安定性について比較検討を行った (Table 1.4 ~ 1.6)。ミスマッチ塩基を含む **RNA2, 3, 4** を **ASO1 (G)** と二重鎖形成させた場合、 $T_m$  値はそれぞれ 58.5, 56.6, 58.4 °C であった。そして、完全相補二重鎖 **ASO1/RNA1** との差はそれぞれ -9.0, -10.9, -9.1 °C であった。したがって、hRluc 配列では、**ASO1/RNA2** で形成される G-U ミスマッチが最も安定であることが確認された。

**ASO2 (cmG)** の場合、**RNA2, 3, 4** との二重鎖の  $T_m$  は 58.6, 56.3, 59.6 °C となり、**RNA3** との二重鎖よりそれぞれ -9.9, -12.2, -8.9 °C 低くなっている。これらの値は上記 **ASO1** と **RNA2, 3** より得られた値よりも絶対値が大きかった。このことから、cmG による修飾を導入した **ASO2** は未修飾の **ASO1** よりは、ミスマッチ形成時、特に G-U および G-A ミスマッチの場合  $T_m$  の低下が多い、すなわちより優れたミスマッチ認識を有する事が明らかとなった。

一方、**ASO3 (pyG)** は塩基認識能力を低下させ、完全相補二重鎖と比較して、二重鎖の安定性はわずかな差しか見られなかった。例えば、**RNA2** と **ASO3** の二重鎖の  $T_m$  値は 62.2 °C であり、**RNA1** との完全相補の二重鎖の  $T_m$  値より -1.5 °C 低いのみである。一方、Table 1.4 の最終行に示すように、デオキシグアノシンを欠失した **ASO4** ではミスマッチ塩基に対して全く認識能が見られないことも確認されており、pyG 修飾の対面の RNA 残基がミスマッチ塩基の場合にもミスマッチ認識能力は G と比較して低下するものの残っていた。

また、hMALAT1 (Table 1.5), HTT (Table 1.6), mMALAT1 (Table 1.6) それぞれの二重鎖におけるミスマッチ識別能力について同様の傾向が見られた。例えば、**RNA5/ASO5** 二重鎖と **RNA6/ASO5** 二重鎖の  $T_m$  値の差は -12.5 °C であるのに対して、pyG 修飾を含む **RNA6/ASO5** 二重鎖と **RNA6/ASO7** 二重鎖の  $T_m$  値の差は -3.5 °C であり、pyG の塩基認識能の低下が確認されている。また、GU ミスマッチ認識能力はグアニンに比べて cmG 修飾によって向上し、同様の傾向は **ASO2/RNA2**, **ASO6/RNA6**, **ASO10/RNA10**, **ASO14/RNA12** 全てについて観察された。先行研究でも DNA 二重鎖の場合に cmG の GU 認識能の向上が確認されており、RNA-DNA 二重鎖においても過去の結果と一致する事が確認された<sup>32</sup>。

特に、HTT 配列における GU ミスマッチに対する認識能向上は、疾患治療への応用が期待される結果である。ハンチントン病では、点変異の入った HTT 遺伝子が原因で発症する疾患である。疾患関連の変異アレルをノックダウンすることで疾患の治療ができると考えられている。その一方で、点変異の入っていない正常アレルも生体に必須の機能を担っているため、変異アレルのみを選択的に分解する必要がある。今回標的とした配列は変異型のアレル (**RNA12**) と正常アレル (**RNA11**) をモデルとした配列となっており、それぞれに対する選択性が cmG で向上していることから、このようなアレル選択的な KD に応用できる可能性がある。疾患細胞によってより高次の検討が期待される。

いずれにしても、cmG、pyG に関する熱的な安定性が明らかになったため、以降では細胞を用いた ASO の活性・選択性の評価を行った。*In vitro* 評価では、cell line で発現している hMALAT1 (**ASO5-8**) を中心に評価を行い、類似配列を含む遺伝子がヒト細胞中で発現していない hRluc (**ASO1-4**) の評価を比較対象として検討を行った。

## 第四節 *in vitro* アンチセンス活性評価

各 ASO が標的 RNA を knockdown (KD) する活性を評価した。それぞれの ASO を HeLa 細胞に対してトランスフェクション法により導入し、hRluc ASO の KD アッセイはレポーター遺伝子の発光によって (Figure 1.10)、hMALAT1 ASO については qRT-PCR によって評価した (Figure 1.11)。その結果、いずれの場合も概ね用量依存的な KD が観察された。例えば、0.5 nM の **ASO1** の場合、hRluc の発現量はコントロール (ASO-) の 56% であり、**ASO1** の濃度が 2.5~10 nM に増加するにつれて発現量は減少した。同様に、**ASO2**、**ASO3** の場合、0.5 nM で hRluc の発現は 65%、78% であり、**ASO1** の濃度が 2.5~10 nM に増加するにつれて発現は減少した。**ASO4** の場合、hRluc は 0.5 nM では減少しないが、2.5 nM 以上で用量依存的に発現低下が検出された。また、**ASO5**、**ASO6**、**ASO7** では、1 nM から 2.5 nM まで濃度を上げると hMALAT1 の発現が減少した。hMALAT1 の KD が明確に観察された 1 nM と比較して、**ASO5**、**6**、**7** を処理すると、hMALAT1 の発現は 26%、55%、47% に減少した。したがって、デオキシグアノシン欠失 ASO を除く各 ASO では、標的 hRluc と hMALAT1 の発現が著しく低下し、pyG と cmG の修飾により、いずれの場合も KD 活性が維持された。このような活性維

持について、特にカルバモイル基については細胞内で分解され、Gに変化している可能性も挙げられる。しかし、後述のマイクロアレイ解析の結果、cmGを導入した **ASO6** と Gを導入した **ASO5** ではグローバルな転写産物の変化の様相が大幅に異なることから、細胞内環境でもカルバモイル基が分解されずに残っていると考えられる。cmG、pyG 修飾を含む ASO について、標的遺伝子に対する同等の発現抑制作用が確認されたため、次章では非標的遺伝子の KD について比較検討を行う。

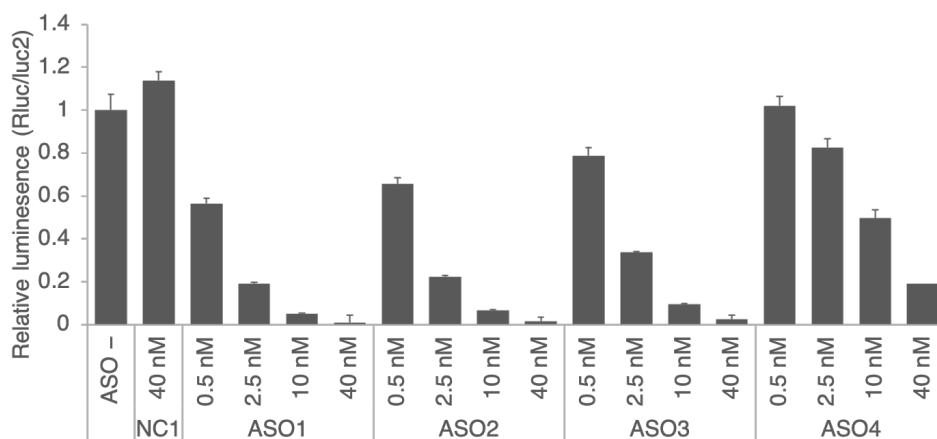


Fig. 1.10 ルシフェラーゼアッセイによる hRluc の KD 評価

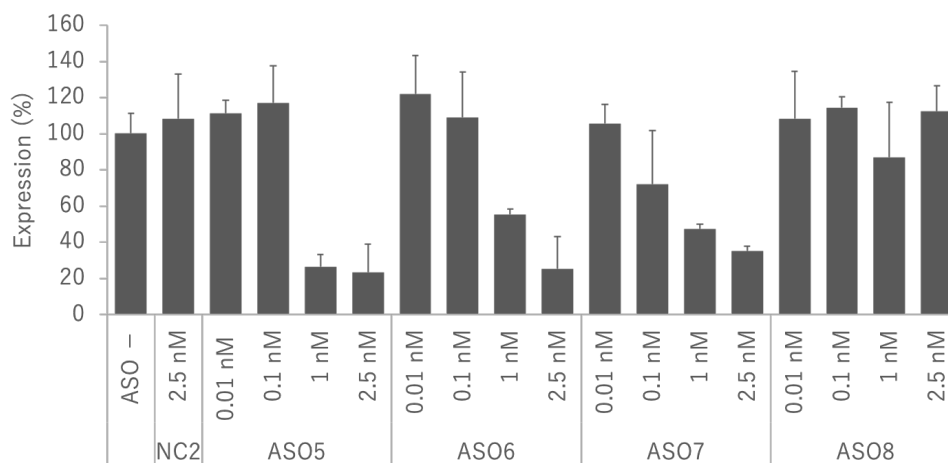


Fig. 1.11 hMALAT1 の KD 評価

## 第五節 DNA マイクロアレイによる網羅的発現変動解析

ASO の *in vitro* での配列選択性を調べるために、マイクロアレイを用いて転写物の網羅的な発現変動評価を行った。まず、実験に先立ち、ヒト全 pre-mRNA と各 ASO がどのように結合し得るかを、*in silico* で調べた。具体的には ASO と様々な RNA が各々二重鎖を形成した際のミスマッチ数+挿入+欠損の合計値を distance として定義した (Figure 1.12)。そして、ASO の標的配列と類似する配列が全 pre-mRNA 中と mRNA 中どの程度存在するかを見積もるため、高速ゲノム検索プログラム gggenome (<https://gggenome.dbcls.jp/ja/>) を用いた検索を行い、distance  $\leq 3$  に該当する pre-mRNA、及び mRNA (以降、これをマイクロアレイ実験の通例に従い遺伝子と呼称する) の総数を Table 1.7 にまとめた。

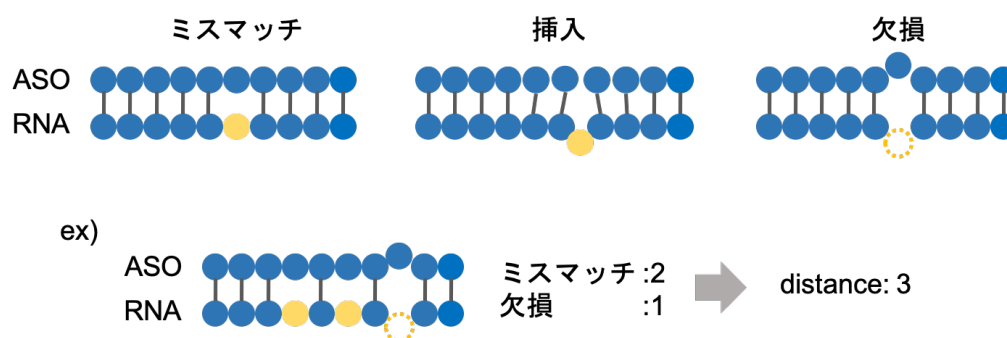


Fig. 1.12 ミスマッチ、挿入、欠損及び distance の定義

Table 1.7 *in silico* による類似配列検索結果

| ASO                        | sequence         | distance* |    |      |       |
|----------------------------|------------------|-----------|----|------|-------|
|                            |                  | 0         | 1  | 2    | 3     |
| <b>ASO1-3</b><br>(hRluc)   | ATCATGCGGAACTGG  | 0         | 16 | 616  | 7853  |
| <b>ASO5-7</b><br>(hMALAT1) | ATATTATCTGCATATG | 1         | 69 | 2476 | 10737 |

\* x distance で二重鎖を形成する遺伝子数; “Human pre-spliced RNA, RefSeq curated on hg38.p12, D3G 21.01 (released Jan, 2021)” 及び “Human spliced RNA, RefSeq curated on hg38.p12, D3G 21.01 (released Jan, 2021)” をヒト pre mRNA 及び mature mRNA 配列とし、該当する distance の遺伝子を抽出し、1 遺伝子に対して複数箇所に類似する配列が存在した場合は 1 遺伝子として処理した後に該当する遺伝子数の合計値を算出した。

検索の結果、distance = 0 のカラムから分かるように、hRluc 標的 **ASO1-3** はヒトに完全一致する遺伝子がなく、hMALAT 標的 **ASO5-7** は完全に相補的な配列は標的の MALAT1 以外には存在しないことが確認された。また、hMALAT1 標的 ASO (distance=2 ; 2476 遺伝子) の方が hRluc 標的 ASO (distance=2 ; 616 遺伝子) よりもミスマッチを形成して結合する遺伝子数が多いことが確認された (Table 1.7)。実験的に観察される発現変動遺伝子は、ある遺伝子の変動した影響を受けて他の遺伝子の変動する二次的、三次的変動を含むことから、厳密にはハイブリダイゼーションに依存するオフターゲットのみを比較することは困難である。従って、先行研究で distance が小さい遺伝子の方が配列のハイブリダイゼーション依存のオフターゲットが生じやすいことが報告されていること<sup>34</sup>を踏まえ、以降では、distance  $\leq 2$  の遺伝子をハイブリダイゼーション依存のオフターゲットの可能性が高い遺伝子として絞ってより確度の高い比較のために用いた。

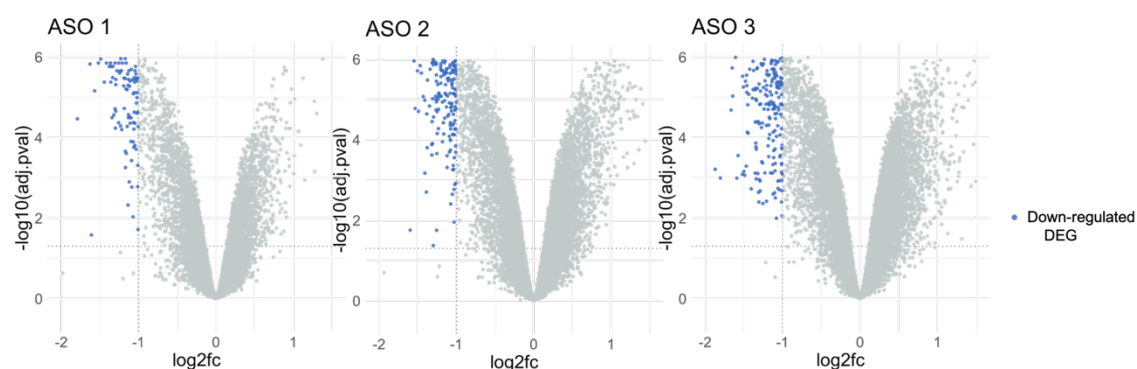


Fig.1.13 hRluc ASO 添加時の網羅的発現変動

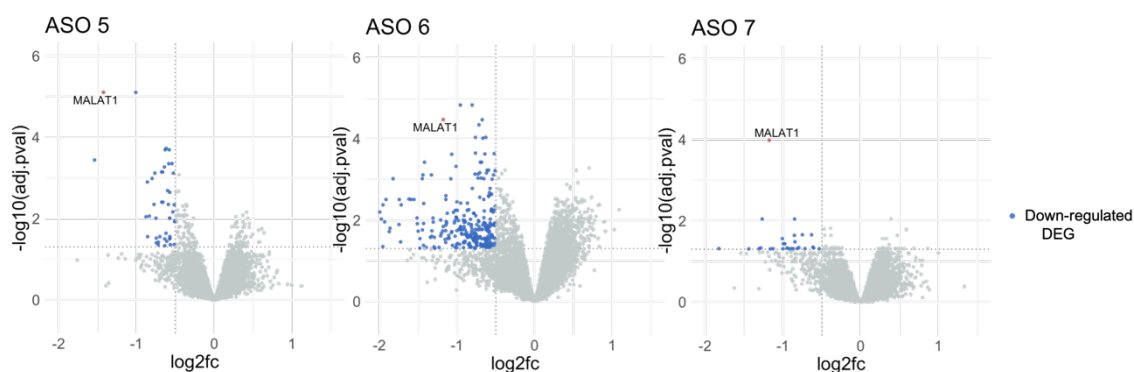


Fig. 1.14 hMALAT1 ASO 添加時の網羅的発現変動

続いて、マイクロアレイ実験を行った。HeLa 細胞を 10 nM の ASO で処理し、ASO の有無による発現変動差を解析した。データは、ボルケーノプロットを用いて可視化した (Figure 1.13, 1.14)。ここで、ボルケーノプロットは、x 軸に遺伝子の発現変動倍数に対して 2 を底とする対数値を、y 軸に p 値の 10 を底とする対数値にマイナスをかけた値をとったものである。x 軸において、より絶対値が大きな値をとる遺伝子の発現変動が大きく、y 軸で一定以上の値を取る遺伝子が有意に発現変動した遺伝子である。まずは、マイクロアレイ実験における **ASO5-7** の標的とする MALAT1 の KD 活性を比較した (Figure 1.15, 標的遺伝子 hMALAT1 の発現変動は Figure 1.14 の赤い点)。その結果、これらの ASO は、hMALAT1 発現量を 37 % (**ASO5**)、44 % (**ASO6**) および 44 % (**ASO7**) に抑制していた。従って、マイクロアレイの評価でも第四節で述べた *in vitro* KD 評価と同等の結果が得られていることが確認された。なお、Figure 1.13 に示す hRluc ASO は先述の通り完全に相補的な配列をもつ遺伝子は存在しないため、*in vitro* KD 評価との比較はできなかった。

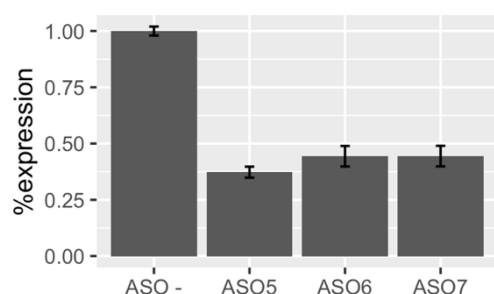


Figure 1.15 MALAT1 の発現変動

次に、ASO の各遺伝子に対する選択性を比較するため、以下の通り閾値を設定した。まず、多重検定を加味して補正した変動の有意差を表す p 値、発現変動が 2 の何乗倍であるかを表した  $\log_2$  fold change ( $\log_2$  fc)、及び各遺伝子の distance をもとに閾値を設定した。**ASO1-3** については、p 値  $< 0.05$ 、 $\log_2$  fc  $< -1.0$ 、すなわち有意かつ 50 %以上発現低下をした遺伝子について発現低下遺伝子として定義した (Figure 1.13, 1.14 で青いドットで示した遺伝子)。さらに、これらの発現低下遺伝子のうち、ハイブリダイゼーション依存の可能性が高い発現低下遺伝子を p 値  $< 0.05$ 、 $\log_2$  fc  $< -1.0$ 、distance  $\leq 2$  という閾値で定義した (Table 1.8 左表の 2 行目)。一方 hMALAT1 を標的とする **ASO5-7** については、閾値として  $\log_2$  fold change  $< -1.0$  を用いると、該当する遺伝子数が **ASO5**、**ASO7** で 10 未満となり、比較にあたって十分な遺伝子数が検出されない。従って、Table 1.8 右表の 1 行目に示すように発現低下遺伝子の閾値を p 値  $< 0.05$ 、 $\log_2$  fc  $< -0.5$  に変更して、比較を行った。同様にハイブリダイゼーションに依存する可能性の高い、発現低

下遺伝子についても、 $\log_2 \text{fc} < -0.5$  という閾値を使用した。

Table 1.8 各閾値に該当する遺伝子数

|                                                                                                       | Number of genes (hRluc) |             |             |                                                                                                         | Number of genes (hMALAT1) |             |             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|-------------|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------------|-------------|
|                                                                                                       | ASO1<br>G               | ASO2<br>cmG | ASO3<br>pyG |                                                                                                         | ASO5<br>G                 | ASO6<br>cmG | ASO7<br>pyG |
| 発現低下遺伝子<br>( $p$ 値 $< 0.05$<br>& $\log_2 \text{fc} < -1$ )                                            | 98                      | 181         | 266         | 発現低下遺伝子<br>( $p$ 値 $< 0.05$<br>& $\log_2 \text{fc} < -0.5$ )                                            | 45                        | 285         | 27          |
| ハイブリダイゼーション依存の可能性が高い発現低下遺伝子<br>( $p$ 値 $< 0.05$<br>& $\log_2 \text{fc} < -1$<br>& distance $\leq 2$ ) | 33                      | 68          | 102         | ハイブリダイゼーション依存の可能性が高い発現低下遺伝子<br>( $p$ 値 $< 0.05$<br>& $\log_2 \text{fc} < -0.5$<br>& distance $\leq 2$ ) | 26                        | 46          | 4           |

まず、各化学修飾による発現低下遺伝子の数を比較した。hMALAT1 における発現低下遺伝子の数は、**ASO5** (G) では 45 遺伝子、**ASO6** (cmG) では 285 遺伝子、**ASO7** (pyG) では 27 遺伝子であった。従って、cmG では増加したが、pyG ではより選択的な KD が可能となった。一方、hRluc を標的とする ASO では、**ASO1** (G) で 98 遺伝子、**ASO2** (cmG) で 181 遺伝子、**ASO3** (pyG) で 266 遺伝子が発現低下し、cmG および pyG 修飾により標的外遺伝子に対する KD 作用が増加した。また、ハイブリダイゼーションに依存する可能性が高い発現低下遺伝子数についても、上記の発現低下遺伝子と同様の変質の傾向を示した。以上の結果から、pyG を hMALAT1 に対する ASO に導入した場合には標的外遺伝子に対する KD 作用を制御し、選択性を上げる効果があることが示された。その一方で、その効果は hRluc に対する ASO には見られず配列依存性があることも明らかとなった。また、cmG 修飾では、どちらの遺伝子についてもハイブリダイゼーションに依存する非標的遺伝子の切断の増加が見られた。例えば、hRluc では、**ASO1** (G) の発現低下遺伝子は 98 遺伝子であったのに対し、**ASO2** (cmG) では 181 遺伝子であった。また、hMALAT1 でも、**ASO5** (G) では 45 遺伝子であったのに対して **ASO6** (cmG) の発現低下遺伝子数は 285 であり、未修飾に比べて cmG 修飾では該当遺伝子数が大幅に増加していることがわかる (Table 1.8)。従って、cmG 修飾による変動遺伝子数はハイブリダイゼーションとは別の要因で発現低下した多くの遺伝子が含まれている可能性がある。以上の解析は、標的に対する主作用の影響を加味しておらず、pyG の効果についても、主作用の減弱とともに、オフターゲットが減弱した可能性を否定できない。そこで、pyG に着目してさらに詳細な解析を行った。

## 第六節 pyG 修飾の KD 選択性に関する詳細な解析

pyG 修飾によるハイブリダイゼーション依存的な KD をより詳細に調べるために、**ASO5 (G)** と **ASO7 (pyG)** を投与した際にどちらかの投与群で発現が低下した 65 遺伝子 ( $\log_2 \text{fc} < 0$ , adjusted p value  $< 0.05$ , distance  $\leq 2$ ) を新たに抽出し、それぞれの発現低下量を x, y 軸にプロットして比較した (Figure 1.16)。ここでは、**ASO5** と **ASO7** の標的遺伝子 (hMALAT1) に対する KD 活性の違いを考慮するため以下の手法を用いた。まず、**ASO5**, **ASO7** の hMALAT1 に対する活性 ( $\log_2 \text{fc}$ ) は約 1.2 : 1 程度であり、若干 **ASO5 (G)** の方が **ASO7 (pyG)** よりも標的に対する活性が高い。従って、このまま並列に比較を行うと、pyG は選択性が上がっているわけではなく、標的に対しても非標的遺伝子に対しても共に発現抑制効果が低下している可能性が否定できない。そこで、MALAT1 に対するそれぞれの活性をプロットした上で原点と結び、**ASO5**, **ASO7** の比活性が 1:1 になる補助線を引いた。つまり、この描画において、この補助線より右下側の遺伝子は、標的遺伝子に対する活性を同じ比率に補正した上でなお、**ASO5 (G)** より **ASO7 (pyG)** の方がより KD が抑制された遺伝子である (= 標的外遺伝子に対する KD が抑えられている) と判断される。このように補正した上で比較した結果 50 個の遺伝子は **ASO5 (G)** でより強い発現低下を示し、8 個は **ASO7 (pyG)** でより強い発現低下を示し、7 個の遺伝子はほとんど変化がなかった ( $\log_2 \text{fc}$  の差  $< 0.05$ )。従って、標的遺伝子に対する KD 活性の差を考慮しても、pyG はハイブリダイゼーション依存のオフターゲットを抑制する効果を有していることが明らかとなった。

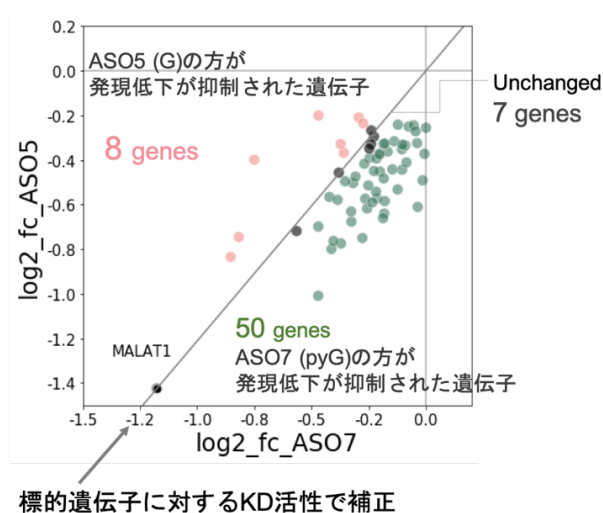


Fig. 1.16 標的遺伝子への効果で補正した際の **ASO5 (G)**, **ASO7 (pyG)** の発現変動の比較

最後に、pyG 修飾によって発現低下が抑えられた遺伝子の配列を解析することで、pyG がどのような位置に非ワトソンクリック塩基対を形成する遺伝子に対して KD 選択性を上げる効果を発揮しているか検証した。Figure 1.16 にて pyG 修飾により発現低下が抑えられた 50 遺伝子と、発現低下を促進した 8 遺伝子の塩基配列を抽出し、これらの遺伝子の各塩基をミスマッチ (「X」)、RNA 配列中の挿入 (「I」)、RNA 配列中の欠失 (「D」) の 3 種類に分類した (詳細は、実験項: 主活性で補正した ASO5 及び ASO7 の配列選択性評価を参照)。発現低下が抑えられた 50 個の遺伝子の配列を整列させると、pyG の 3' 下流の領域に非ワトソンクリック塩基対を形成しているものが多いことが明らかとなった。この傾向は、発現低下を促進した 8 つの遺伝子では見られなかった (同じく実験項の表を参照)。加えて、「Human pre-spliced RNA, RefSeq curated on hg38.p12, D3G 21.01 (released Jan, 2021)」から抽出した distance  $\leq 2$  に該当する pre-mRNA 遺伝子全てについても同様の解析を行ったが、非ワトソンクリック塩基対の位置に 5', 3' 側の偏りは見られなかった。この傾向を定量化するために、pyG 修飾の 3' 下流側と 5' 上流側に該当する領域に分けてそれぞれ全ての "X", "I", "D" の数を合計した (Figure 1.17)。その結果、50 個の遺伝子において、pyG の 3' 下流側の非ワトソンクリック塩基対は 65 個、5' 上流側の非ワトソンクリック塩基対は 22 個であった。このように、pyG の 3' 下流にミスマッチを持つ遺伝子は、非特的な発現低下が抑制されやすい傾向があることがわかった。一方、より発現量が低下した 8 つの遺伝子と pre-mRNA (distance  $\leq 2$ ) では、pyG の 3' 下流のミスマッチはそれぞれ 6 と 2376 であり、5' 上流のそれは 8 と 2138 であり、ともに 3', 5' 領域に対する偏りは確認されなかった。構造的には、3' 下流の核酸塩基にはグアニンの 2-アミノ基が重なっており、ミスマッチは pyG の部位によってさらに構造的に歪められ、結果として発現低下が抑制される可能性が示唆された。

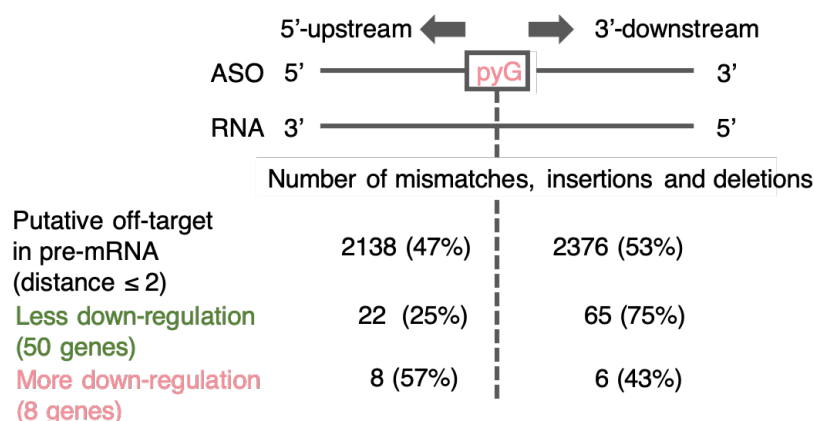


Fig. 1.17 pyG に対して 3', 5' 側のミスマッチ、欠損、挿入の合計値

## 第七節 cmG, pyG 修飾の効果の説明づける因子について

マイクロアレイの評価では、hMALAT1 配列に pyG を修飾した場合のみ、選択性の向上が見られた。一方、 $T_m$  値によるミスマッチ認識能評価では、hMALAT1, hRluc とともに、cmG はミスマッチ認識能を向上させたが、pyG はミスマッチ認識能を低下させた (Table 1.9)。すなわちマイクロアレイでは、配列によって pyG が標的に対する選択性を高める効果が確認された一方で、 $T_m$  値による塩基認識能の評価結果ではマイクロアレイによる細胞評価の結果の説明がつかないことが確認された。

Table 1.9 マイクロアレイの結果と  $T_m$  値評価の関係

|                          | MALAT1 |     | Rluc |     |
|--------------------------|--------|-----|------|-----|
|                          | cmG    | pyG | cmG  | pyG |
| 配列選択性<br>(microarray)    | ↓低下    | ↑向上 | ↓低下  | ↓低下 |
| ミスマッチ認識能<br>( $T_m$ 値評価) | ↑向上    | ↓低下 | ↑向上  | ↓低下 |

そこでハイブリダイゼーション依存のオフターゲット効果の変化を規定する別の因子を精査するため、RNase H が ASO に結合した RNA を切断するメカニズムに立ち返って考察した (Figure 1.18)。まず、ASO と RNA が二重鎖を形成し、その後 RNase H が DNA/RNA 二重鎖を認識することで標的の RNA が切断される。当初は前者の二重鎖形成過程が重要であるとし、選択性の変化に着目したが、後者の RNase H による切断選択性についても配列選択性に関与する可能性がある。また、先行研究によると、実際に RNase H は結合する塩基配列に志向性があることも知られている<sup>52,53</sup>。従って、以降ではグアニン 2 位修飾と RNase H の切断位置の関係を精査した。

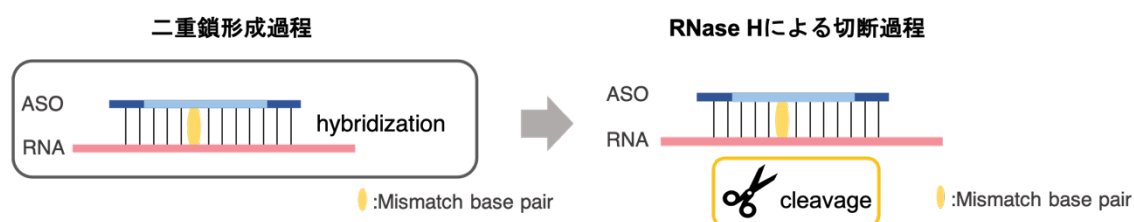


Fig. 1.18 ASO の標的分解に関わる工程

## 第八節 RNase H による切断位置選択性の解析

RNase H は DNA/RNA 二重鎖を認識し、標的の RNA を分解する酵素である。Nowotny らによって報告されたヒト RNase H 触媒ドメインの X 線構造<sup>54</sup> (PDB;2QK9) によると、RNase H には DNA 鎖と相互作用する重要な部位が存在する (Figure 1.19)。この相互作用部位は、Arg179, Thr191, Asn240 で形成される Phosphate binding pocket と呼ばれ、デオキシヌクレオチド残基の 3'-リン酸を認識する。RNase H はリン酸結合ポケットに捕捉された上記デオキシヌクレオチドの 5'上流にある 3'-デオキシヌクレオチド残基と塩基対を形成したリボヌクレオチド残基の 3'-ホスホジエステル結合を切断する。その他に切断位置の近辺では DNA, RNA ともに塩基部・リン酸部・糖部と RNase H 上の様々な残基が相互作用する。注意が必要な点として、RNase H は標的を一箇所のみで切断するわけではない。つまり、DNA/RNA 二重鎖のどの位置に結合するかによって、Phosphate binding pocket が認識するリン酸基や配列切断位置は変化する。

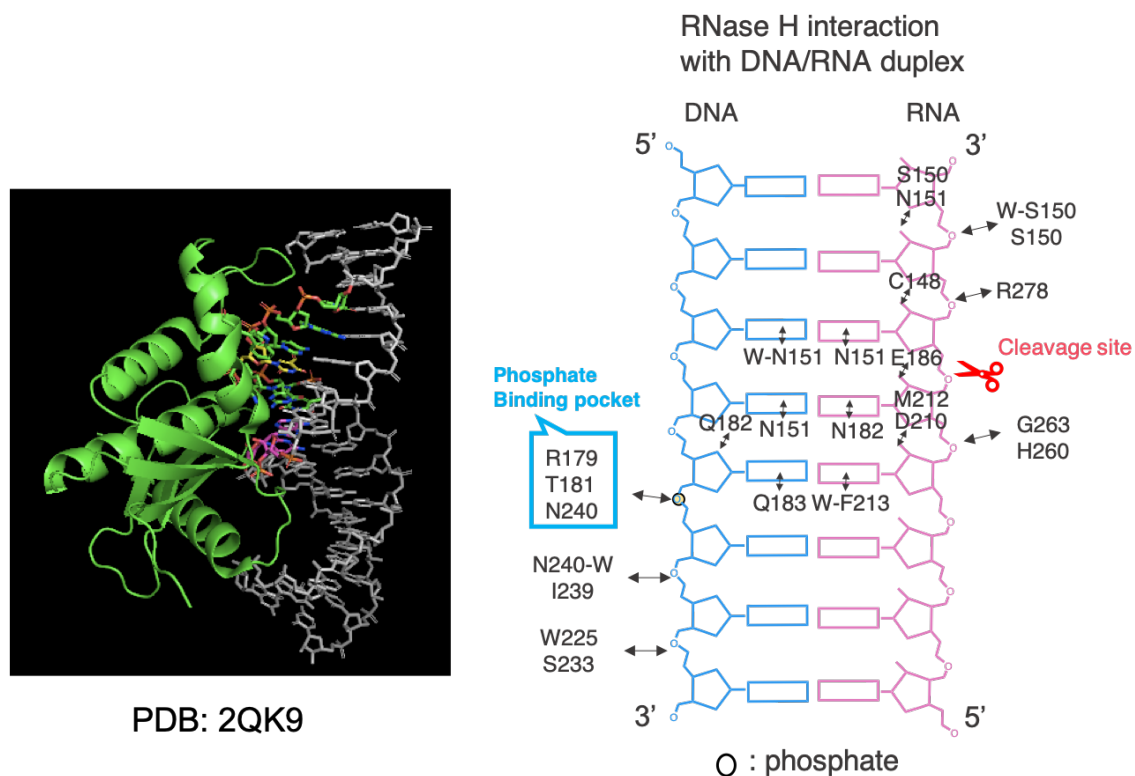


Fig. 1.19 RNase H による DNA/RNA 二重鎖の認識

次に、RNase H による標的分解後に生成する RNA 断片をゲル電気泳動で解析し、グアニン修飾による RNase H の切断位置選択性の変化を調べた (Figure 1.20, 21)。まず先述のように、RNase H は標的 RNA を複数の部位で切断するため、切断の可能性がある部位を修飾位置に近い位置から順に a-g と定義した (Figure 1.20)。

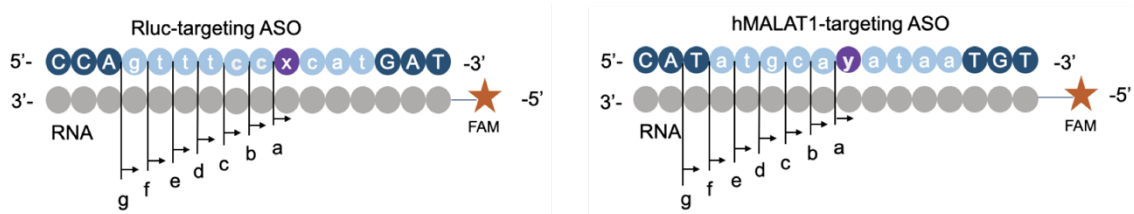


Figure 1.20 hRluc, hMALAT1 の配列切断位置の定義

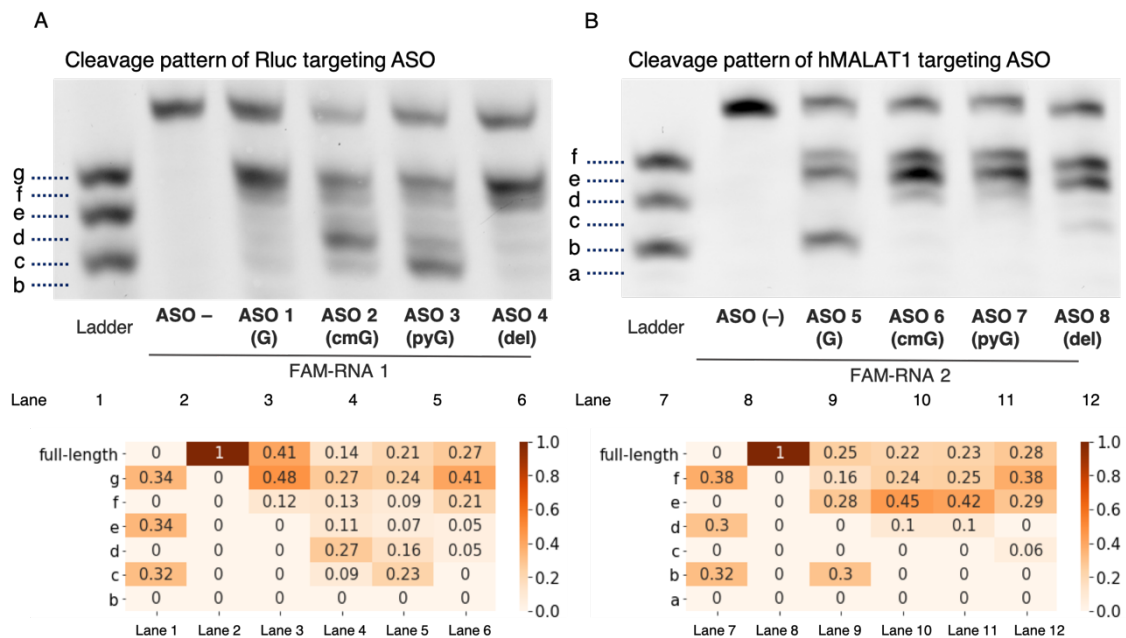


Fig. 1.21 RNase H による分解物の電気泳動の結果及びバンドの定量

そして、ASO1-4 および ASO5-8 の存在下で、FAM-RNA1 および FAM-RNA2 をそれぞれ RNase H で分解した (Figure 1.21 A, B)。通常、RNase H による標的 RNA の切断は経時的に複数回起こり、小さな断片へと分解されていくが、今回の実験では一段階目の分解における切断を観測し、選択性を比較するため、比較的短時間である 5 分後に反応を停止し、生成物をバンドの濃淡で定量し、切断生成物の比率を比較した。また、RNA 断片の長さを推定するため、hRluc の g, e,

c 位置と hMALAT1 の f, d, b 位置で切断された断片に相当する 13, 11, 9mer 長に短縮した 5'FAM-RNA をラダーとしてレーン 1 およびレーン 7 にアプライした。そして、レーン 2, 8 には ASO を加えず、それぞれ **FAM-RNA1**、**FAM-RNA2** 及び RNase H のみを加えた群をネガティブコントロールとして設定した。また、レーン 3-6 には **FAM-RNA1** の切断産物を、9-12 には **FAM-RNA2** の切断産物をそれぞれアプライした。ここで、レーン 3-6 の生成物は **ASO1-4** の存在下で得られたものであり、レーン 9-12 の生成物は **ASO5-8** の存在下で得られたものである。ゲル画像の下には、切断位置ごとのバンド量をヒートマップで示した。この際、バックグラウンドとの差が曖昧であるため各レーンで 5 %未満の微量なバンドは定量の対象外とした。まず、レーン 3 (**ASO1: G**) では、全長 RNA の 41 %が残存し、g の位置で切断された 13 mer RNA の 48%が生成していた。また、13 mer と 11mer のバンドの間に f の位置で切断された断片が 12%存在していた。したがって、**ASO1** と RNase H で処理することにより、**FAM-RNA1** は主に g の位置で切断されたことがわかる。同様に、レーン 4 (**ASO2: cmG**) では、全長 RNA が 14%残存し、g: 27%、f: 13%、e: 11%、d: 27%、c: 9%で切断されたフラグメントが観察された。レーン 5 (**ASO3 : pyG**) では、全長 RNA が 21%残存し、g: 24%、f: 9%、e: 7%、d: 16%、c: 23%の位置で切断された生成物が観察され、レーン 6 (**ASO4: del**) では全長 RNA が 27%残存し、g: 41%、f: 21%、e: 5%、d: 5%で切断された。このように、未修飾の G (41%) に比べ、cmG (14%)、pyG (21%)、del (27%) の修飾の場合、残存する全長 RNA が減少することが確認された (Figure 1.21 A)。一方、hMALAT1 を標的とする ASO の場合、レーン 9 (**ASO5: G**) では 25%の全長 RNA が残存し、f: 16%、e: 28%、b: 30%で切断された。レーン 10 (y: cmG) では全長 RNA の 22%が残存し f: 24%、e: 45%、d: 10%で切断され、レーン 11 (y: pyG) では全長 RNA の 23%が残存し、f: 25%、e: 42%、d: 10%で切断され、レーン 12 (y: del) では全長 RNA の 28%が残存し、f: 38%、e: 29%、c: 6%で切断された。このように、cmG (22%)、pyG (23%)、del (28%) 修飾の場合、未修飾の G (25%) と比較して、残存する全長 RNA は同等であることが確認された (Figure 1.21 B)。したがって、切断活性に対する修飾の効果には、配列依存性が見られた。また、全体的な切断活性に加え、切断パターンも変化していた。hRluc では、グアニンに修飾を加えない場合、g の位置での選択的な切断が確認されたのに対し、修飾を加えることで非特異的な切断へと変化していることが分かった。一方で hMALA1 の場合は、未修飾の場合の切断パターンが f, e, b であったのに対し、修飾を加えることで f, e, d へと変化しており、hRluc のケースとは逆に修飾を加えたことで、e の位置でより選択的な切断が起きていることを確認した。マイクロアレイでは pyG 修飾時の非標的遺伝子の切断が hRluc では増加していたのに対して、hMALAT1 では減少していた

が、RNase H の選択性についても同様に、hRluc では切断位置の増加、hMALAT1 ではより選択的に変化していることがわかる。従って、RNase H の切断位置選択性は、マイクロアレイの選択性変化を説明するひとつの因子であるといえる。このように、RNase H というタンパク質に着目し、ASO との相互作用を制御することで、*in vitro* での標的以外の遺伝子に対する作用を抑制できる可能性が示唆された。

このような RNase H の切断位置選択性が変化した理由として、以下のような理由が考えられる。hMALAT1 標的 ASO の場合 (Figure 1.21 B)、いずれの修飾 ASO でも切断産物 b は消失した。Figure 1.22 左に示すように、b の位置で切断される際に、塩基部は RNase H の Q183 に認識される箇所である。従って RNase H が 2 位アミノ基に置換基を許容しなかったと予想される。一方、hRluc 標的 ASO の場合 (Figure 1.21 A)、予想外に c の切断産物が増加した。切断産物 c が生じる際の RNase H の認識 (Figure 1.22 右) は、cmG, pyG の修飾部位の周辺には知られていない。従って、RNase H が修飾を許容したものと思われる。また、直接的な認識ではないが立体構造によると、c で切断される場合の cmG, pyG の塩基部周辺で最も近いアミノ酸残基としてフェニルアラニン (F213) が存在する。置換基がフェニルアラニン残基に入り込み上手くスタッキングした場合に、認識が大きく変化し切断の有無が変化した可能性もあげられる。

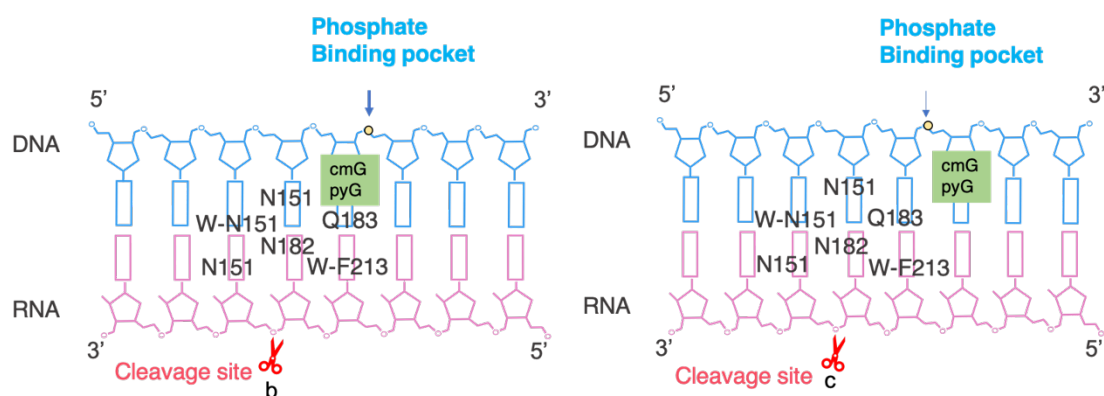


Fig. 1.22 RNA が b, c の位置で切断される場合の RNase H/ASO, RNA 複合体の位置関係

## 第九節 配列、修飾パターンと RNase H 切断位置選択性の解析

さらなる RNase H への選択性を調べ、今後のグアニン修飾の ASO への適応に活用可能な知見を得るため、周辺の配列切断についても検討した。まずは、hMALAT1 ASO に対して pyG を 2 箇所導入した ASO について評価した (Figure 1.23)。その結果、配列の切断が f の位置のみと非常に選択的に変化した。先述の通り、y<sub>2</sub> における一箇所修飾の場合、1 残基 3' 下流の RNA のリン酸部での切断 (b での切断) は抑制される。

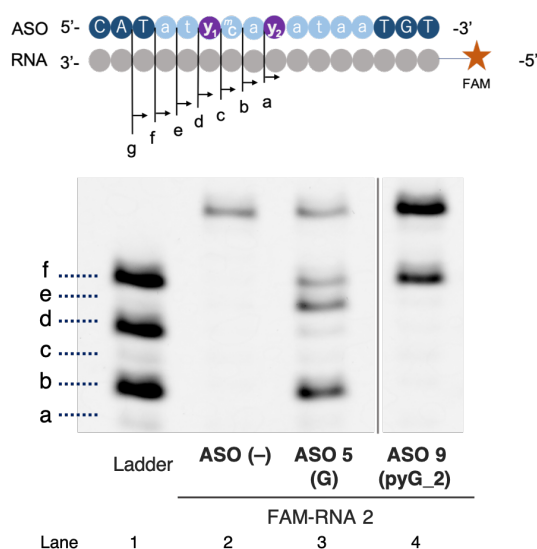


Fig. 1.23 pyG を二箇所を導入した場合の RNase H 切断パターン

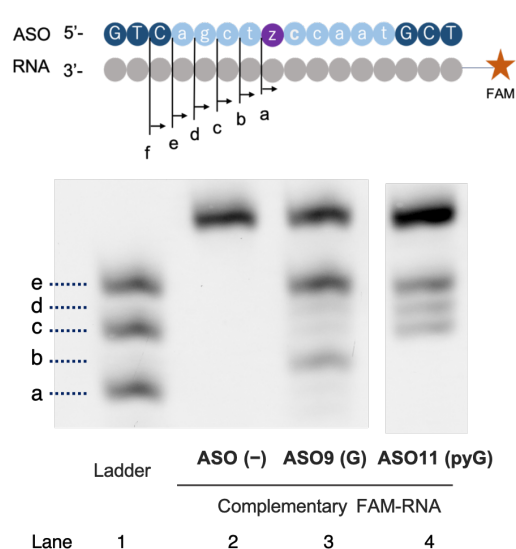


Fig. 1.24 mMALAT1 への pyG 修飾時の RNase H 切断パターン

従って、今回 y<sub>1</sub> に対して 1 残基 3' 下流の RNA である e の位置での切断についても抑制されたのは、辻褄の合う結果である。加えて、f は y<sub>1</sub> にとっては 2 残基上流のため y<sub>2</sub> における c の位置である。前章で述べた通り、c の位置は配列によっては許容されることが示されているため、同様に予想通りの結果である。一方、全長 RNA の半分以上が未切断のままであり、アンチセンス活性が低下することも示された。cmG と pyG が修飾できる位置は ASO のグアニン位置に限られるため、さらなる構造活性相関を調べるためには、別の配列でより詳細に検証する必要がある。将来的に、修飾位置と活性の最適な組み合わせの検討、他の塩基修飾核酸との組み合わせを行うことで、これらのグアニン修飾体の効果を増強できる可能性もある。いずれにしても、本検証では、修飾のパターンによって

さらに切断位置の制御が可能であることが示された。

最後に、ここまで評価した以外の配列として、mMALAT1 についても評価を行った (Figure 1.24)。その結果、もともと a-e までの位置で切断されていた配列が、c-e の切断へ変化した。b の位置での切断が抑制される傾向はこれまでと同様であった。このように未修飾の ASO の元々の切断位置によっては、複数箇所の切断を抑制し、より選択的に変化させることも可能であることが明らかとなった。また、配列の 5'側から 6-9 番目の位置に修飾を加えることで、ある程度、予想の範囲内で切断を制御できる可能性も示唆された。本手法を活用して、ASO の配列選択性を変化・向上させることが期待される。

## 一章のまとめ

本章では、2 位に修飾を組み込んだ修飾グアニン **cmG** および **pyG** は、未修飾のグアニンとは異なる物理化学的および生物学的性質を持つことを明らかにした。まず、 $T_m$  値評価によって、**cmG** は GU の塩基認識能を向上させる効果が確認された。また、**pyG** の修飾により、hMALAT1 標的 ASO におけるハイブリダイゼーションに依存するオフターゲット効果を抑制することに成功した。 $T_m$  値の評価結果と実際の細胞評価における選択性の傾向が異なったため、細胞評価の結果を説明するパラメータとして RNase H の切断パターンに着目した。その結果、**pyG** 修飾によりオフターゲット効果が悪化した配列では RNase H の切断も非特異的に変化し、オフターゲット効果が抑制された配列では RNase H の切断がより選択的に変化した。従って、ASO の配列選択性を向上する上で、RNase H というタンパク質との相互作用を制御した結果、オフターゲット効果の抑制を達成したと考えられる。また、先行研究においても糖部<sup>55-57</sup>、核酸塩基部<sup>58</sup>、リン酸部<sup>59-62</sup>への修飾により RNase H 選択性の変化は報告されているが、グアニンの修飾で RNase H との相互作用を変化させた報告はない。従って今回の結果は、RNase H の志向を変化させる核酸塩基の拡充という意味も持つ。

実際の ASO 治療開発では、安全性を最大限に高めるために、*in silico* で予測されるオフターゲット遺伝子の数ができるだけ少なくなるよう配列設計が行われる<sup>36,63</sup>。しかし、そのような努力にもかかわらず、臨床試験では安全性上の懸念が見られた ASO も多く存在する。従って、さらに修飾核酸アナログを使用することで ASO のオフターゲットプロファイルを変更することができれば、実際の治療薬の開発にも有用である。このような用途を考えた際、現在のデータを見る限り **cmG** よりも **pyG** の方が有用であると考えられる。ただし、**pyG** によるオフターゲット遺伝子の数の減少は配列に依存するため、すべての ASO に普遍的に適用できない点には注意が必要である。また、RNase H の切断位置選択性とマイクロアレイの切断パターンには相関があったことから、RNase H の切断位置選択性を早期に検討しておくことで、修飾の配列依存性について予測することができる可能性があることも明らかとなった。**pyG** を組み込んだ ASO の特性をさらに評価するためには、様々なオフターゲット RNA との  $T_m$  値評価、ASO-ターゲット二重鎖の 3 次元構造、*in vivo* 活性や毒性について今後検討する必要がある。また、**pyG** を組み込んだ ASO と細胞内外の様々なタンパク質との相互作用も、*in vivo* での副作用や ADME とともに明らかにされるかもしれない<sup>14</sup>。実際の医薬品応用に向けて更なる検討が必要であるが、本論文ではグアニンの 2 位の修飾がハイブリダイゼーション依存性のオフターゲット効果を抑制する可能性を明らかにし、今後の ASO 開発への応用に期待できる知見が得られた。

## 第二章

バックボーン修飾及び固定化による  
スルホンアミド核酸の課題克服に向けた  
新規骨格合成法の開発並びに構造評価

## 第一節 序

ホスホロチオエート (PS) は核酸リン酸部の O 原子を S に置換した構造であり、様々な薬物動態面での利点を有するバックボーン修飾である。例えば、核酸の血清中の安定性を大幅に向上し、組織に分布するまでの分解を大幅に抑制することが知られている。さらに、タンパク結合能を向上することも知られており<sup>22</sup>、組織への送達、細胞内移行性に関しても重要な役割を担っている。また、細胞内では、ASO が標的 RNA に結合してその働きを制御したり RNA 自体を分解する productive な経路と ASO 自体が分解経路へと向かい、薬効に寄与しない non-productive な経路が存在することが知られているが、PS 修飾を施すことで ASO が productive な経路で活用されやすいということも示唆されている<sup>64,65</sup>。このように PS で修飾された核酸（以下 PS 核酸）は薬物動態面で非常に魅力的な修飾核酸である。そして、実際にこれまでに上市した全てのアンチセンス医薬品は PMO 骨格を有するものを除きホスホロチオエート修飾を含んでおり、現状アンチセンス医薬品に必須の構造であると言える。その一方で、PS 修飾には安全性上の懸念も存在する。例えば、PS 核酸の特徴であるタンパク結合能の向上は利点だけでなく、毒性への関与が示唆されている。具体的には PS 核酸は活性化部分トロンボプラスチン時間 (PTT) を延長することが知られており<sup>66</sup>、血小板減少と関連する。また、代替補体経路を活性化し、免疫活性につながる安全性上の懸念が知られている<sup>67</sup>。また、2'fluoro 修飾核酸と PS 核酸を組み合わせることで、*in vivo* で肝腎毒性が発現することも確認されている<sup>68</sup>。そのほかにも、P54nrb, PSF, HSP90-AA1 など、ASO の毒性と関連すると想定されているタンパクとの相互作用も示唆されている<sup>22</sup>。さらに安全性上の懸念に加えて、レギュレーション上の課題も存在する。O 原子が S 原子に置換されることで、リン酸上に立体異性体を生じてしまうため、N 塩基長の核酸の各リン酸部を PS で修飾すると 2<sup>N-1</sup>

の立体異性体が混在することとなる。従って、医薬品としても安全性・有効性上で性質の異なる様々なジアステレオマーの混合物となってしまう。

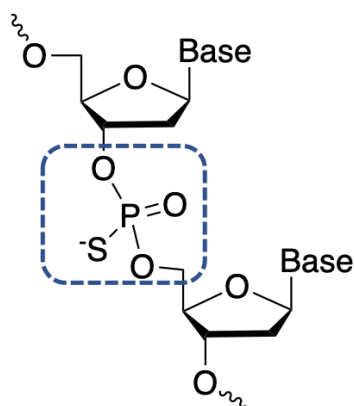


Fig. 2.1 ホスホロチオエートの構造

以上のように、PS 核酸は魅力的な性質を持つ一方、様々な問題を孕んでおり、PS 核酸への依存は核酸医薬品の大きな課題の一つである。そのため先行研究でも、代替構造の探索が盛んに行われている。バックボーンの構造変換による毒性改善研究として代表的な構造を Figure 2.2 に示す。リン酸部の直接的な置換体としては、リン酸の O 原子の置換体としてスルホンアミドを導入した Mesyl phosphoramidite<sup>60,61</sup> やリン酸部の O 原子をアルキル化した alkyl phosphate<sup>69</sup>、リン原子上にメトキシプロピル基を直接導入した MOP などが挙げられる。また、5' Methyl 修飾により、リン酸の近傍の立体的な環境を変える試みや<sup>70</sup>、ホスホロチオエートを立体選択的に合成することによって、立体ごとのタンパク結合や分解耐性のプロファイルの違いが明らかにされてきた<sup>28,62</sup>。これらの修飾体の一部については、*in vitro* で細胞毒性の指標である caspase3/7 の活性化を抑制することや、*in vivo* で実際に肝毒性が低減することが明らかとなっている。以上のように、リン酸部の修飾による PS 核酸の課題解決戦略の有効性は一定程度示されているが、リン酸部の安全性の課題や異性体の課題を完全に克服したといえる修飾核酸は未だ見つかっていない。

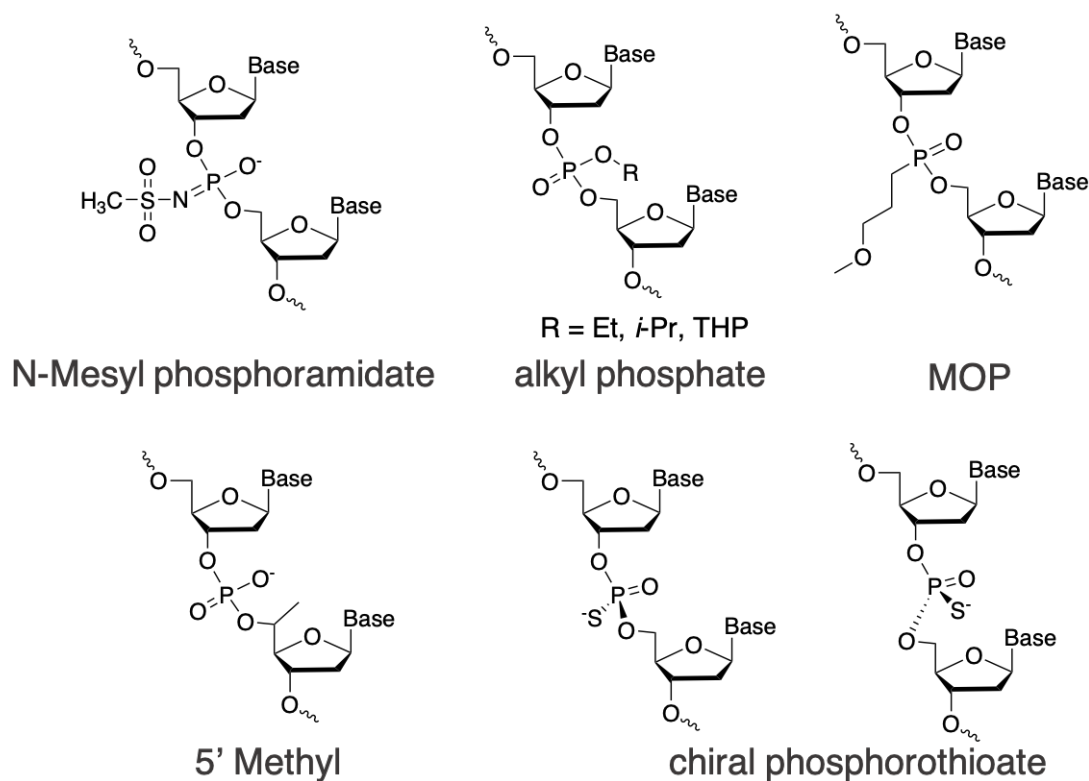


Fig. 2.2 PS の代替として開発されたリン酸部修飾体

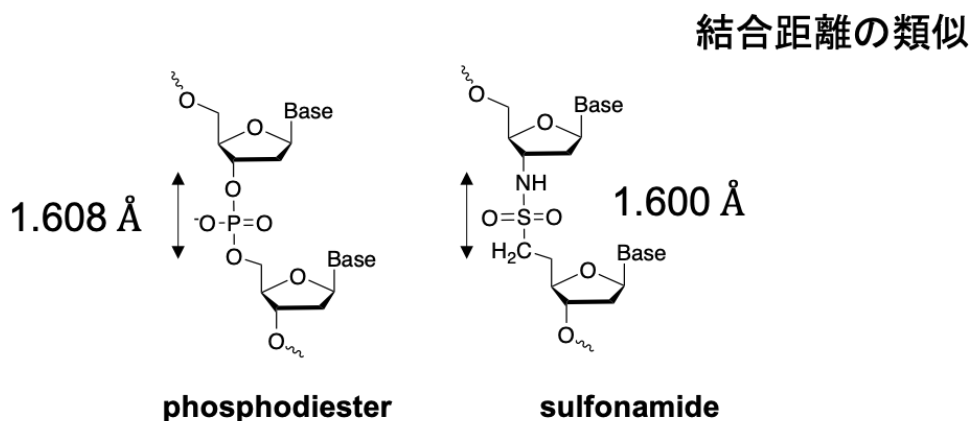


Fig. 2.3 リン酸ジエステルとスルホンアミドバックボーンの結合距離

そこで、本博士論文では PS 核酸の性質を大きく変える構造を新規に拡充するため、リンを使わない代替構造としてスルホンアミドバックボーン<sup>71</sup>に着目した。天然核酸を構成するリン酸ジエステルの結合距離は 1.608Å であるが、スルホンアミドで修飾された核酸の結合距離は 1.600Å<sup>72</sup> とリン酸ジエステルと類似しており、核酸分子として認識される可能性が高い (Figure 2.3)。また、リン酸のように負電荷を持たないため、タンパクとの相互作用の変化、膜透過性が向上、二重鎖形成時の静電反発の軽減などの利点を持つ可能性が示唆される<sup>73</sup>。そして、PS 核酸と異なり立体異性体が生じないという点もレギュレーション上の大きな利点である。さらに、実際にスルホンアミド核酸を修飾した場合にも RNase H に認識されアンチセンス活性が見られることが明らかとなっている<sup>74</sup>。以上のような観点から、スルホンアミドは PS 核酸の代替構造として非常に魅力的である。一方、性質上の欠点も明らかとなっている。スルホンアミドを一箇所修飾すると、相補鎖との親和性が  $T_m$  値で 2~3 °C 低下し<sup>73</sup>、*in vitro* KD 活性も、PS 核酸に比べると低下することが明らかとなっている。従って、安全性と活性のバランスを向上させるには二重鎖の安定性を改善する必要がある。

これまでに核酸の二重鎖形成能を向上させるために様々な修飾戦略が取られてきたが、中でも最も効果を発揮したものの一つに環固定修飾が挙げられる。

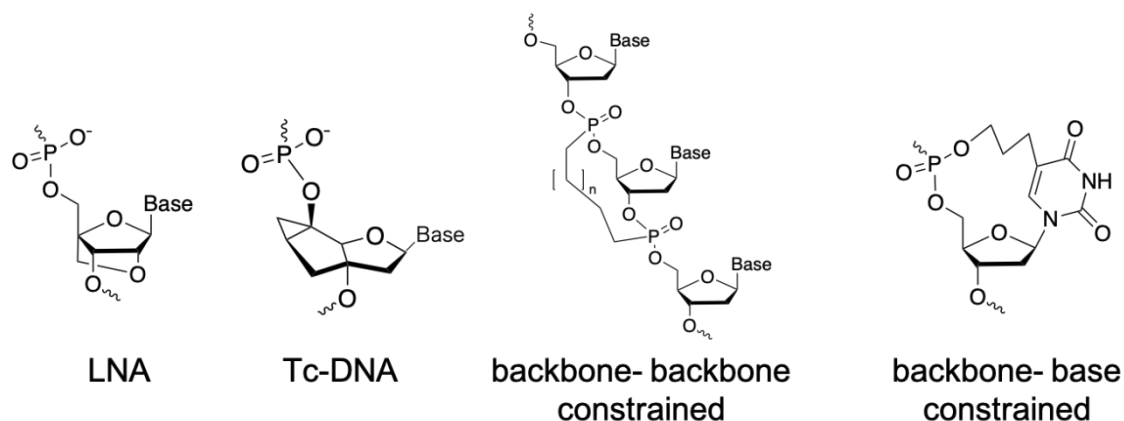


Fig. 2.4 環固定による ASO の活性向上戦略

例えば、LNA は糖部 2'4'位を架橋することで、コンホメーションを N 型 (RNA 型の配座) に固定した核酸である<sup>75</sup>。配座を固定することで二重鎖形成時にエントロピーの損失を防ぎ、高い相補鎖親和性を獲得することに成功した核酸である。その他にも、トリシクロ環によって、バックボーン角度を調整した tc-DNA も二重鎖の安定化に成功した例として挙げられる<sup>76</sup>。また、二重鎖形成時の  $K_{on}$ ,  $K_{off}$  に着目し、バックボーン間の固定化戦略をとり、 $K_{on}$  の向上並びに  $K_{off}$  の低下に成功した例も見られる<sup>77</sup>。また、核酸のリン酸部並びに塩基部の炭素鎖で結ぶことによって、コンホメーションを固定化した例も存在する<sup>78</sup>。スルホンアミドの二重鎖形成能の低下を考えた際に、バックボーンの歪みや自由度の高さを原因と仮定すると、バックボーンを直接的に固定する方法が最も有力であると考えられる。従って、スルホンアミド核酸にバックボーン、塩基部架橋を組み合わせることで、新たに PS 核酸の代替構造を創出できるのではないかと考え、化合物を設計した (Figure 2.5)。難易度の高い大環状構造の構築を含むため、合成法の検討及び構造の評価を行った。

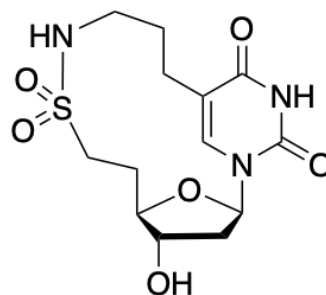
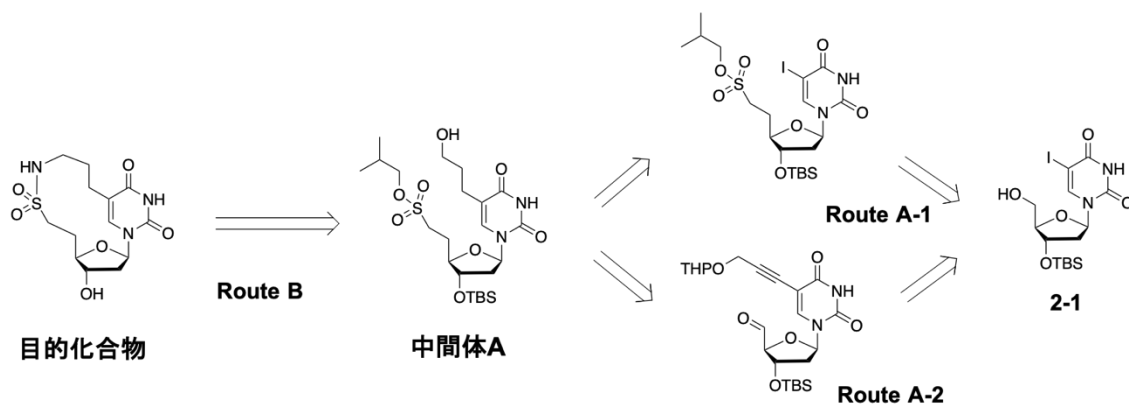


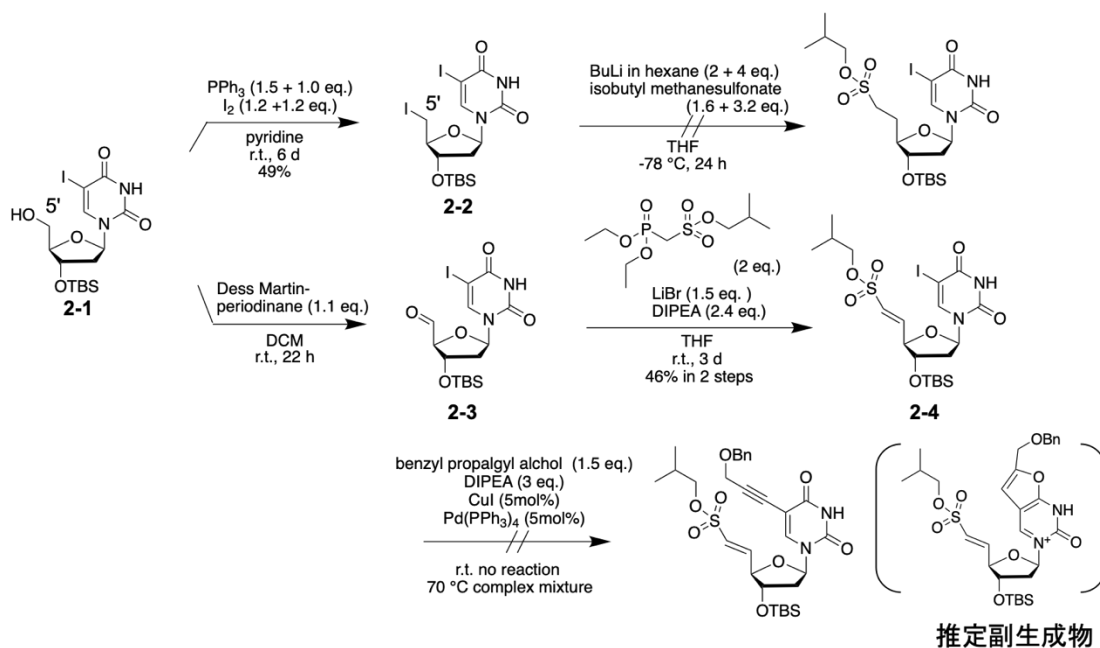
Fig. 2.5 設計した架橋型  
スルホンアミド核酸

## 第二節 固定化スルホンアミド核酸の合成



Scheme 2.1 逆合成解析

合成に先立って逆合成解析を行った。まず、最終物の前駆体として、スルホン酸エステル骨格をバックボーンに、ヒドロキシアルキルを塩基部に有する中間体 A を設定した。さらに、中間体 A の合成方法として、先にスルホン酸エステル骨格を導入する RouteA-1 と、先に塩基部にアルキンを導入する RouteA-2 を設定した。さらに、これらに共通する原料として、既知化合物 **2-1** を設定した。



Scheme 2.2 Route A-1 の検討

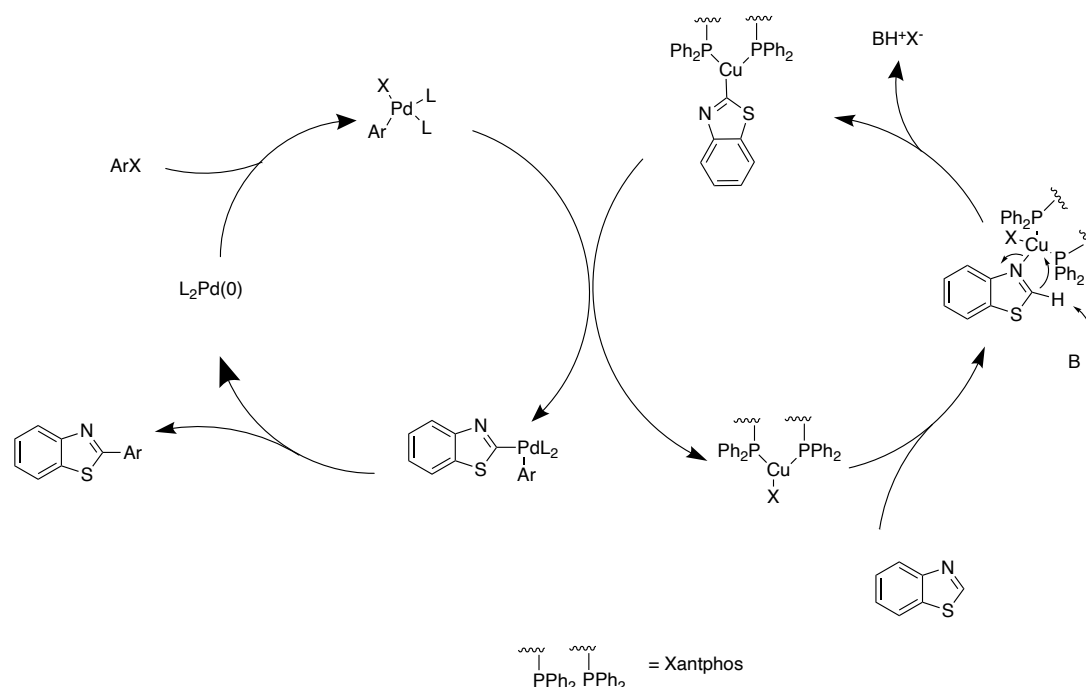
まず、route A-1 を検討した。(Scheme 2.2) 原料 **2-1** に対してアップル反応により 5'位にヨウ素を導入したのちに、*n*-BuLi を用いてスルホン酸エステル骨格を導入しようと試みたが、反応系が複雑化することが確認された。そこで、原料の 5'位の酸化反応を行ったのちに、Horner-Wadsworth-Emmons (HWE) 反応によってスルホン酸エステル骨格を導入する手法<sup>79</sup>に変更することで、骨格の構築に成功した。さらに、化合物 **2-4** に対して菌頭反応を行うことで、化合物 **5** への誘導を試みたが反応の進行は見られず、昇温と共に基質の損壊が確認された。この際に、TLC 上で蛍光色の発光が見られたことから、Scheme 2.2 括弧内のような環化体を経て基質が分解していることを想定した。従って、より温和な条件での反応進行が必要であり、立体的な混み合いが少ないより初期の段階でスルホンアミドを導入する Route A-2 の方が適切なルートであると考えられる。

Table 2.1 菌頭反応の条件検討

| Entry | [Pd] (mol%)                                | Additive /Ligand          | base                                      | Conversion ratio<br>TM / SM ( <sup>1</sup> H NMR) | Isolated yield (%) |
|-------|--------------------------------------------|---------------------------|-------------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------|
| 1     | Pd(PPh <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (5mol%) | -                         | DIPEA (3.6 eq.)                           | 2% / 98%                                          | N.D.               |
| 2     | Pd(OAc) <sub>2</sub> (5mol%)               | -                         | DIPEA (3.6 eq.)                           | 49% / 51%                                         | 29.7               |
| 3     | Pd(OAc) <sub>2</sub> (2.5mol%)             | -                         | DIPEA (3.6 eq.)                           | 4% / 96%                                          | trace              |
| 4     | Pd(OAc) <sub>2</sub> (5mol%)               | PPh <sub>3</sub> (10mol%) | DIPEA (3.6 eq.)                           | 15% / 85%                                         | -                  |
| 5     | Pd(OAc) <sub>2</sub> (5mol%)               | Xphos (5mol%)             | DIPEA (3.6 eq.)                           | 100% / N.D.                                       | 62                 |
| 6     | Pd(OAc) <sub>2</sub> (5mol%)               | Xphos (5mol%)             | Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3.6 eq.) | N.D. / 100%                                       | -                  |
| 7     | Pd(OAc) <sub>2</sub> (5mol%)               | Xantphos (5mol%)          | DIPEA (3.6 eq.)                           | 100% / N.D.                                       | 84                 |
| 8     | Pd(OAc) <sub>2</sub> (5mol%)               | Xantphos (5mol%)          | Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (3.6 eq.) | N.D. / 100%                                       | -                  |

続いて、Route A-2 の一工程目の菌頭反応によるアルキン導入の反応条件を検討した。(Table 2.1) まず、基質 **2-1** に対して tetrakis(triphenylphosphine)palladium を用いて反応を実施した際に、室温下でも僅かに目的物が生成することを確認した。さらに、Pd(OAc)<sub>2</sub> を Pd 源として用いたところ、予想外に反応の進行が確認された。また、Pd 量を減らす、あるいはトリフェニルホスフィンを添加することで反応の効率が低下することが確認された。従って Pd(OAc)<sub>2</sub> 5mol% に固定し、ligand の検討を行った。Xphos や Xantphos などの ligand を加えた際に目的物への変換効率が大幅に向上することが確認された。特に Xantphos について

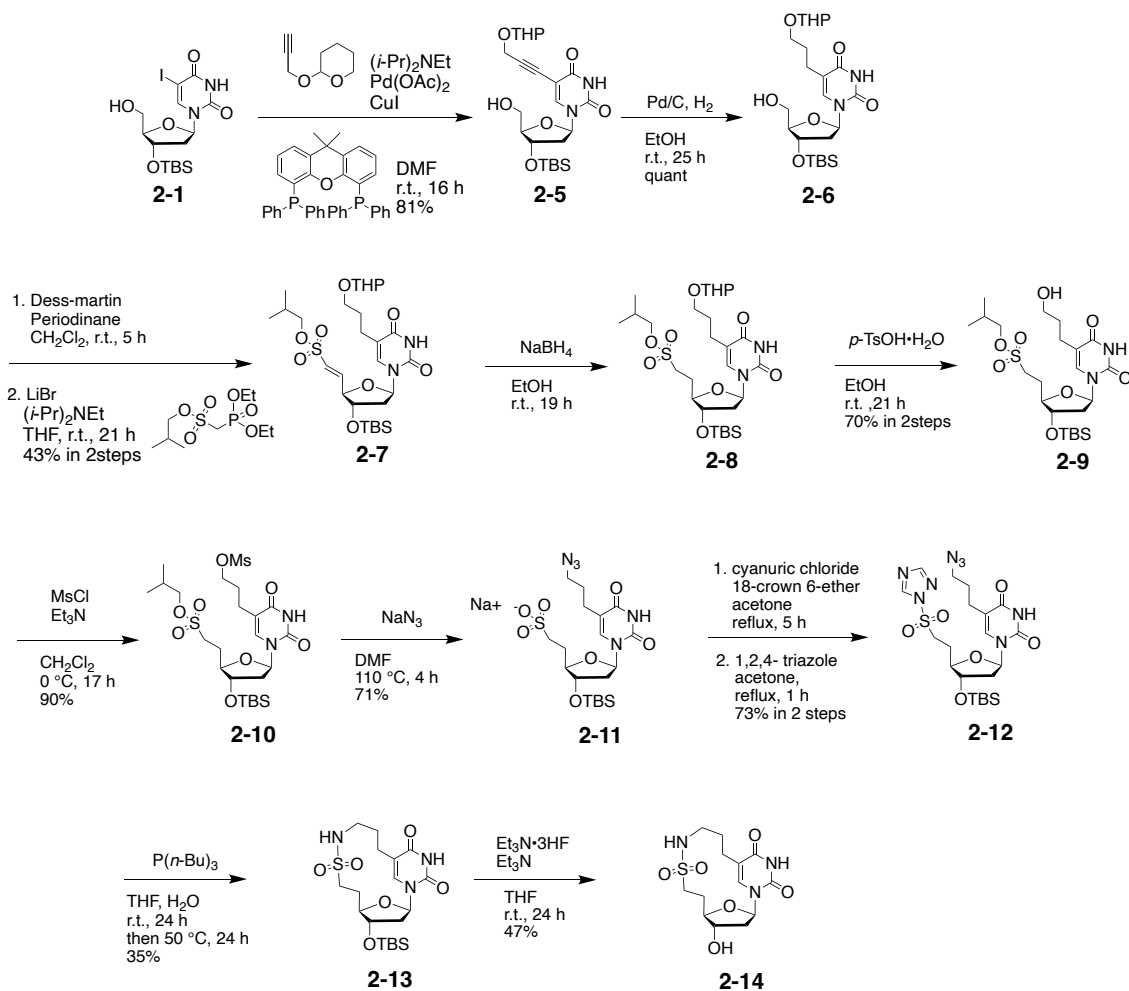
は、目的物以外の副生成物をほぼ生じなかった。Xantphos は実際に、過去の研究においても菌頭反応や C-H activation、鈴木・宮浦カップリング反応を効率化する事が知られており<sup>80,81</sup> (Scheme 2.3)、Cu に対して配位（下図の右下の構造から右上の構造）することで菌頭反応におけるトランスメタル化工程を促進している可能性が挙げられる。また、DIPEA 以外の塩基として Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> についても検討を行ったが、反応は全く進行しなかった。従って、Entry7 を最適条件として、以降の反応を実施した。



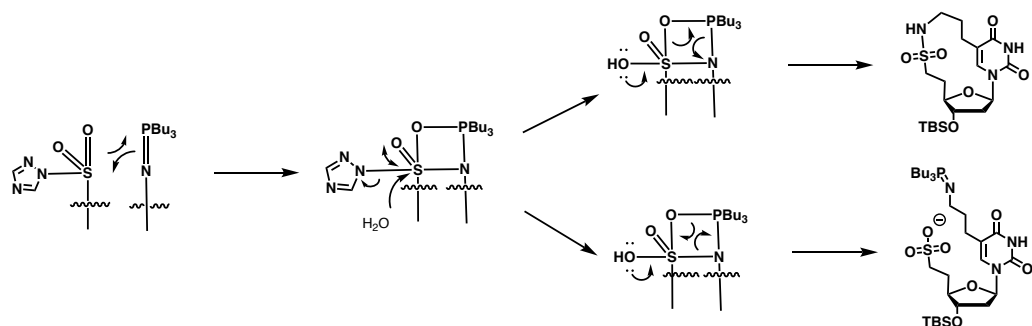
Scheme 2.3 先行研究で提唱されている Xantphos の C-H activation 反応  
効率化の反応機構

化合物 **2-1** を出発物質として、スルホンアミド骨格が固定化されたヌクレオシドを合成した (Scheme 2.4)。上述の通り、Xantphos を配位子として用いて化合物 **2-5** へと導いた。次に、触媒的水素添加によるアルキンの還元により、**2-6** が定量的に得られた。さらに、Dess-Martin 酸化を経て、HWE 反応により、2 ステップ 43%で **2-7** を合成した。その後、還元して THP 基を脱保護することで、2 ステップ、70%の収率で **2-9** が得られた。その後、水酸基から直接的にアジド化を試みたが、これらの反応は進行しなかった。そこで、水酸基をメシル化し、さらにワンポットでアジド化とスルホニル脱保護を行うことで化合物 **2-11** が 71%の収率で得られた。シアヌル酸クロリドを用いて塩化スルホニルを生成させた後、これをより安定で単離可能なトリアゾール活性化中間体に変換し<sup>82</sup>、2 ステップで 73%の収率で **2-12** が得られた。最後に、Staudinger 反応を用いてアジド

の還元と環化反応を一挙に行い、**2-13** を 35% で得た。環化反応の収率が中程度であったのは、大環状体形成の反応性が低く、副産物としてイミノホスホランが生成したためであると考えられる。(Scheme 2.5) 3'位の TBS 基を脱保護した後、目的物 **2-14** を全 12 工程、総収率 2% で得ることに成功した。



Scheme 2.4 Route A-2 及び B による固定化スルホンアミドの合成



Scheme 2.5 大環状骨格構築時に想定される副反応

### 第三節 NMR による構造の推定

架橋型スルホンアミドヌクレオシドの合成法を確立したため、得られた化合物を用いて、400 MHz  $^1\text{H}$ -NMR による配座推定を行った。得られた化合物を  $\text{CD}_3\text{OD}$  で NMR 測定し、カップリング定数を確認した後、コンホメーションを推定した (Figure 2.6)。注目すべき糖部分のプロトンシグナルは、1'位で約 6.6 ppm、2'位で約 2.25 ppm、3'位で約 4.3 ppm、4'位で約 3.9 ppm であった。また、カップリング定数はそれぞれ、 $J_{1',2'}: 9.2 \text{ Hz}$ ,  $J_{1',2'': 6.4 \text{ Hz}$ ,  $J_{2',3'}: 4.6 \text{ Hz}$ ,  $J_{2'',3'}: 0 \text{ Hz}$ ,  $J_{4',5'}: 12.9 \text{ Hz}$ ,  $J_{4',5'': 2.4 \text{ Hz}$  となっている。これらの結果と Karplus の式から、糖部分が S 型コンホメーションであることが推測される。バックボーン骨格の詳細な構造は NMR だけでは判断できないが、 $\gamma$  角 ( $\text{C6}'\text{-C5}'\text{-C4}'\text{-C3}'$ ) はトランス型かゴーシュ型 (-) のどちらかに固定されていると考えられる。天然核酸がゴーシュ (+) 型であることを考慮すると、合成核酸のバックボーンの向きはそれとは異なることが推測される。続いて塩基の配座を確認するために、密度汎関数法 (DFT) 計算と円二色性 (CD) スペクトル測定を実施した。

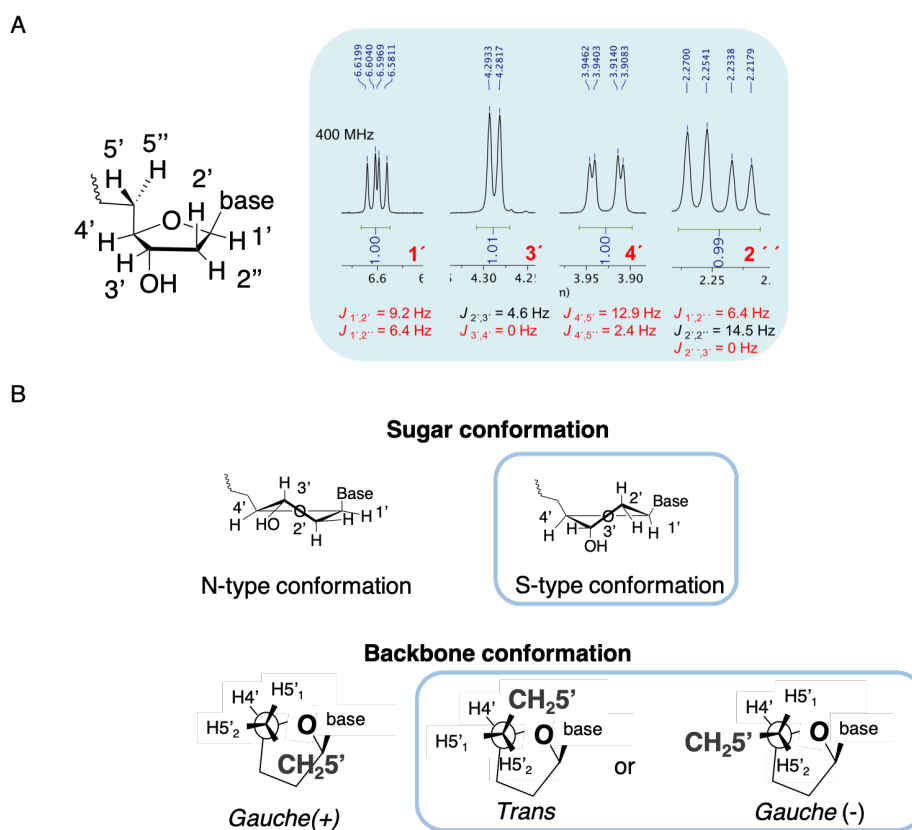
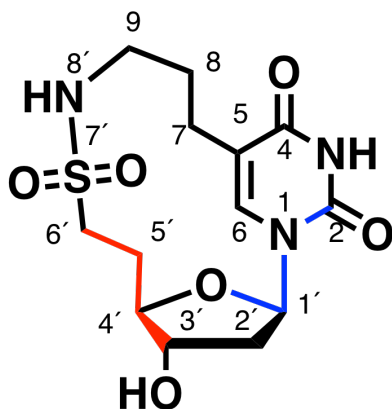


Fig. 2.6 NMR に基づく最安定配座の推定

## 第四節 DFT 計算による構造の推定

次に、合成した核酸の最も安定なコンホメーションを決定するために、Gaussian16/B01 を用いた密度汎関数理論 (DFT) 計算を実施した。最初に 500 個のランダムなコンホメーションを生成し、Opt+Freq, B3LYP/6-31G(d)の手法で真空下条件で DFT 計算による構造最適化と振動解析を行った。そして、エネルギー的に最も安定なコンホメーションを決定した。さらに、最も安定なコンホメーションに対して、水和を考慮して水中で再度計算して最安定配座を計算し、その構造を用いて二面角を求めた (Figure 2.7)。糖の二面角はそれぞれ、H1'-C1'-C2'-H2'が 148.7°、H1'-C1'-C2'-H2''が 27.1°、H2'-C2'-C3'-H3'が -34.4°、H2''-C2'-C3'-H3'が 86.0°、H3'-C3'-C4'-H4'が -95.1°、H4'-C4'-C5'-H5'が 174.1°、H4'-C4'-C5'-H5''が 57.2°であった。これらの値は、NMR 解析で示された S 型糖鎖のコンホメーションを支持するものである。また、バックボーンとベースの二面角はそれぞれ、 $\alpha$  (N8'-S7'-C6'-C5') が 72.5°、 $\beta$  (S7'-C6'-C5'-C4')は -162.7°、 $\gamma$  (C6'-C5'-C4'-C3') 171.5°、 $\delta$  (C5'-C4'-C3'-O3') 154.0°、 $\chi$  (O-C1'-N1-C2) -110.7°、 $\mu$  (C1'-C2'-C3'-C4') は -33.5°であった。



|                                                      |                          |
|------------------------------------------------------|--------------------------|
| $\alpha$ : 72.5° (N8'-S7'-C6'-C5')                   | 148.7° (H1'-C1'-C2'-H2') |
| $\beta$ : -162.7° (S7'-C6'-C5'-C4')                  | 27.1° (H1'-C1'-C2'-H2'') |
| <b><math>\gamma</math>: 171.5° (C6'-C5'-C4'-C3')</b> | -34.4° (H2'-C2'-C3'-H3') |
| $\delta$ : 154.0° (C5'-C4'-C3'-O3')                  | 86.0° (H2''-C2'-C3'-H3') |
| <b><math>\chi</math>: -110.7° (O-C1'-N1-C2)</b>      | -95.1° (H3'-C3'-C4'-H4') |
| $\mu$ : -33.5° (C1'-C2'-C3'-C4')                     | 174.1° (H4'-C4'-C5'-H5') |
| $P$ : 183.4° (in this study,                         | 57.2° (H4'-C4'-C5'-H5'') |
| -90° < $P$ < 270°)                                   |                          |

$$\text{Pseudorotation phase angle}(P): \tan P = \{(\mu_4 + \mu_1) - (\mu_3 + \mu_0)\} / \{2\mu_2(\sin 36^\circ + \sin 72^\circ)\}$$

Fig. 2.7 DFT 計算に基づく最安定配座の二面角

また、擬回転位相角 (Pseudorotation phase angle;  $P$ ) は  $183.4^\circ$  と算出された。ここで、擬回転位相角は糖部 5 員環の 5 つのねじれ角 ( $\mu_0 - \mu_4$ ) を用いて定義される疑似的な回転角である (Figure 2.8)。環の向きと環平面からのねじれ角を表現する上で簡便であるため、核酸の糖部構造を表現する際に用いられる手法である。 $P=0^\circ$  付近で糖骨格が N 型を、 $P=180^\circ$  付近で S 型を取ることが知られている。

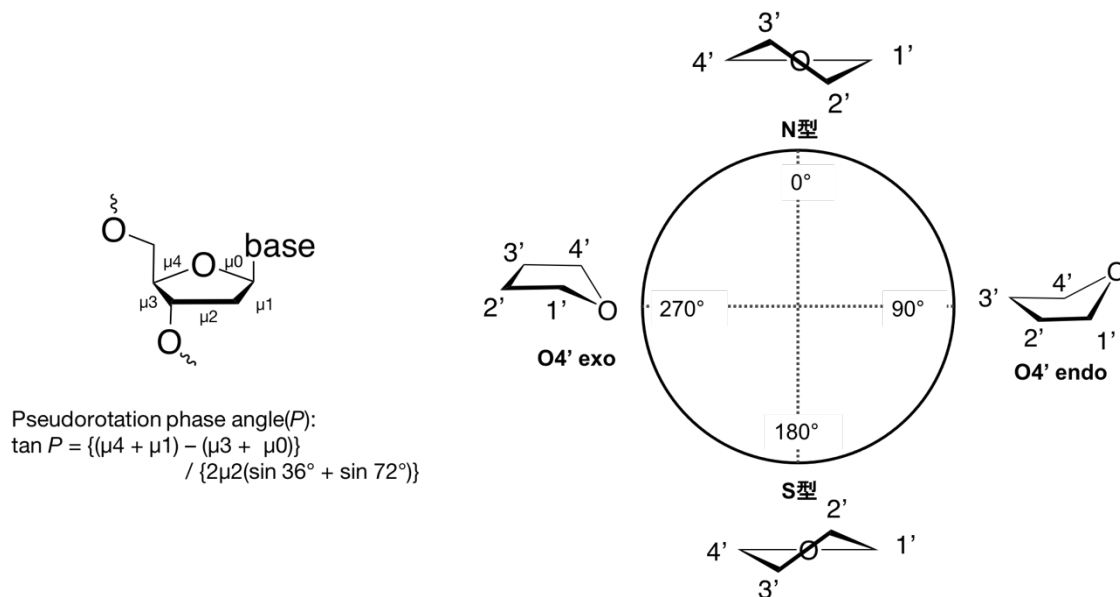


Fig. 2.8 擬回転位相角の定義と糖部コンフォメーション

以上の結果は、NMR のデータと一致し、糖骨格が S 型であり、バックボーンがトランスコンホメーションであることを示唆している (Figure 2.9)。

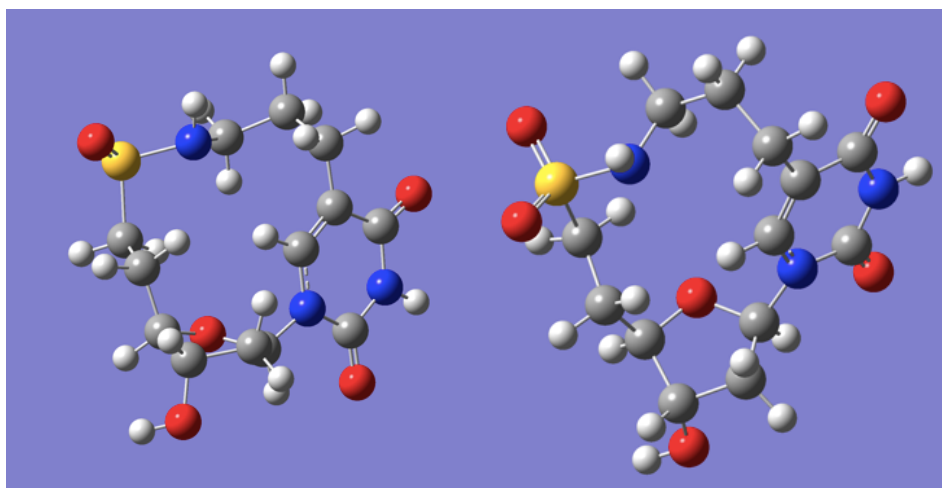


Fig. 2.9 DFT 計算で算出された真空中の最安定配座の三次元構造  
 左) 糖を横から見た構造 右) 糖を上から見た構造

## 第五節 CD スペクトル測定による構造の推定

最後に、DFT から予測した CD スペクトルと実測値の CD スペクトルを評価し、固定化したスルホンアミド核酸のコンホメーションを確認した。まず、DFT 計算で得られた最も安定なコンホメーションの二面角の値から時間依存 DFT 法 (TD-DFT 法) を用いて、CD スペクトルを予測した (Figure 2.10 A)。その結果、255 nm 付近に強い負のコットン効果が、223 nm 付近に弱い正のコットン効果が予想された。次に、合成した化合物 **2-14** を用いて CD スペクトルを実際に測定した (Figure 2.10 B)。その結果、270 nm 付近に強い負のコットン効果が観測され、236 nm 付近に弱い正のコットン効果が観測された。このように、計算と実測の CD スペクトルは、陰性/陽性コットン効果の最大値/最小値の波長差が約 15 nm であり、全体として良好な一致を示した。なお、チミジンの場合、240 nm 付近で強い負のコットン効果が、275 nm で負のコットン効果が観測されることが知られている。従って固定型スルホンアミドヌクレオシドの骨格は、チミジンとは異なるということを示す。また、過去の研究では、6-C および 3'-C メチレン架橋ウリジンの CD スペクトルが評価されている<sup>83</sup>。この化合物は 230 nm 付近で弱い正のコットン効果を示し、260 nm 付近で強い負のコットン効果を示すことから、この化合物と固定型スルホンアミドのコンホメーションが類似していることがわかった。また、この架橋ウリジンの  $\chi$  角は  $-95.0^\circ$  であり、化合物 **2-14** の  $\chi$  角  $-110.7^\circ$  に近いことが確認された。これらの CD の結果は、NMR や DFT による計算結果とよく一致しており、糖のコンホメーションが S 型であり、バックボーンがトランス型コンホメーションである可能性が支持される結果である。最後に、昇温時の CD スペクトルの測定を実施したが、温度の上昇に伴うスペクトルの大きな変化は見られなかった。(Figure 2.10 B) この結果は、今回合成した化合物 **2-14** がある程度固定されていることを示すものである。

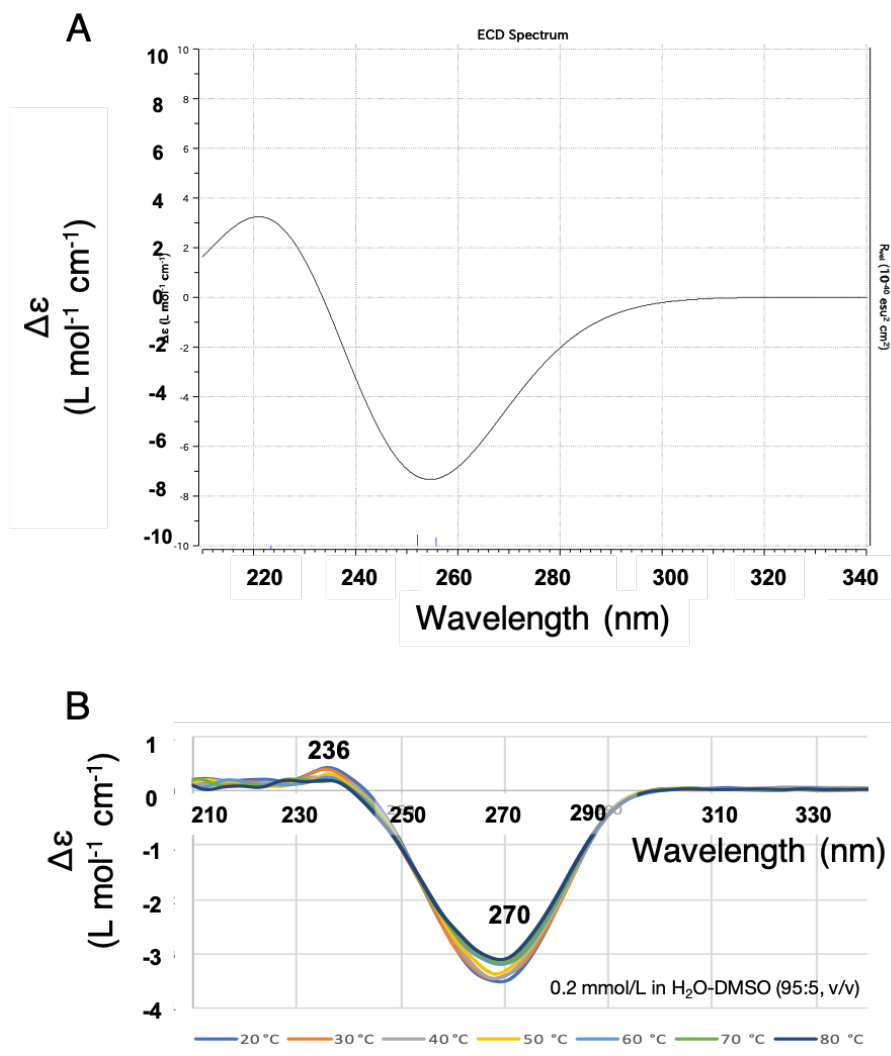


Fig. 2.10 A) 化合物 **2-14** の DFT 計算から予測された CD スペクトル B) CD スペクトルの実測値

以上のことから、今回合成した **2-14** はモノマーとしては、DNA 型の糖部配座を有しながら、バックボーンは *trans* 型に固定されたユニークな配座を有する事が明らかとなった。一方で、二重鎖形成時には隣接塩基間でのスタッキング効果が加わるため、より DNA, RNA に近い構造に変化すると考えられる。構造解析結果から、今回合成した **2-14** では二重鎖の大幅な安定化効果を付与することは難しいかもしれないが、モノマーのバックボーン構造の違いに由来する構造の特徴がタンパク質に対する選択性に影響与える可能性も十分に考えられる。また、今回の結果をもとに、リン酸、塩基部の固定リンカー長の増炭、減炭により構造の更なる最適化を実施することも可能である。今後、ASO に活用可能な機能性核酸の開発に対して新たな知見を与える結果が得られた。

## 二章のまとめ

本章では、PS 核酸の代替として、固定化スルホンアミドバックボーンを設計した。まず、合成難易度の高い大環状骨格を含むモノマーの合成検討を行った。既知化合物に対して、菌頭反応によるアルキン骨格導入の条件を最適化し、 $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  と Xantphos を組み合わせることで、効率的に目的物が得られることを見出した。さらに、HWE 反応を経てスルホン骨格の構築にも成功し、鍵中間体を得た。さらに、大環状骨格の構築に成功し、全 12 工程、総収率 2% で環固定化スルホンアミドモノマーを得ることに成功した。得られたモノマーに対して、NMR, DFT, CD から配座の推定を行った。その結果、糖部配座は S 型に、バックボーン構造はトランス型に固定されていることがわかった。また、NMR, CD, DFT 計算は、いずれも同様のコンホメーションを支持しており、それぞれ結果に矛盾がないことが確認された。また、CD により構造がある程度固定化されていることも確認された。モノマーを二重鎖に導入した際には隣接塩基間でのスタッキング効果が加わるため、DNA, RNA に近い構造への変化が予測されるが、特徴的なバックボーンの構造がタンパク質に対する選択性を変化させることが期待される。

## 総括

アンチセンス核酸は遺伝子に対して様々な作用を及ぼすことが可能であるため、医薬品モダリティの一つとして注目を集めている。その一方、臨床で安全性上の懸念も明らかとなっており、課題解決が望まれている。本博士論文では、ASO の毒性懸念に関して、標的外の遺伝子へのオフターゲット作用と非特異的なタンパク質への作用に分けて二つの化学修飾アプローチを検討した。

第一章では塩基部修飾による、ASO の標的選択性向上を志向した研究を行った。特徴的なコンホメーションをとるグアノシン 2 位修飾体 **cmG**, **pyG** 誘導体を用いることで ASO の標的認識性能に影響を与えられるのではないかと考え、評価を行った。 $T_m$  値評価では **cmG** がミスマッチ認識能を向上させ、**pyG** は低下することを明らかにした。その一方で、標的に対する親和性は大きく変化しないことが確認された。また、*in vitro* においても標的配列に対する活性は、修飾の有無でほぼ変化しないことが確認された。さらに、DNA マイクロアレイによって配列選択性を検討したところ、配列によっては **pyG** を修飾することで非特異的な配列への作用を抑制することが見出された。 $T_m$  値評価では標的認識能が低下していたのに対し、*in vitro* では標的に対する親和性が向上したことから、標的選択性に寄与する別のパラメータがあるのではないかと仮説を立て、新たに RNase H による切断活性を比較した。その結果、**pyG** 修飾により RNase H で切断される位置が選択的になった配列においては、*in vitro* でも切断が選択的に、逆に切断位置が非特異的になった配列では切断が非選択的に変化していることが確認された。以上より、**pyG** の配列選択性について、RNase H の切断位置選択性向上という因子の寄与が示唆された。また、化学修飾による ASO の配列選択性向上が確認された。

第二章では、ASO の非特異的なタンパク質との相互作用を志向し、バックボーン修飾を検討した。核酸医薬品に広く用いられているバックボーン修飾である **phosphorothioate** 構造はタンパク結合能を高め毒性を惹起することが示唆されている。したがって、新たなバックボーン修飾として架橋型スルホンアミド核酸をデザインし、合成法の確立及びコンホメーション解析を行った。まず、菌頭反応によるアルキン導入反応を検討し、**Xantphos** を用いることで効率的に反応が進行することを見出した。さらに、HWE 反応によるスルホンアミドの導入、スルホンの活性化などを経て大環状化合物の合成を達成した。得られた化合物について NMR, DFT, CD を用いて構造解析を行った。その結果、糖部構

造は S 型にバックボーン構造はトランス型に固定されていることが明らかとなった。Phosphorothioate と異なるバックボーンの固定化に成功したため、様々なタンパクとの相互作用様式も大きく変化する可能性が示唆された。

以上の通り、本博士論文では塩基部、バックボーン部の修飾体を用いて ASO の安全性改善に関連する研究を実施した。ここまで述べてきたように、臨床、非臨床研究において、ASO 投与による肝/腎毒性の所見が確認されている。そのため、これまで開発されてきた核酸医薬品の適応疾患は、安全域確保の観点からも重篤度の高い希少疾患が主となっているのが現実である。そのため、核酸医薬品の対象とする疾患を広げるためにも、毒性の回避は鍵となる。しかし、次なる課題として、毒性の原因が明らかでないため、安全性を評価する *in vitro* の評価系が充実していないことがボトルネックとなっている。従って、本博士論文のように新たな核酸アナログを合成し、生物学的な性質を評価するというボトムアップ型のアプローチは、安全性を改善する化学構造を探索することのみならず、適切な *in vitro* 評価系の設定、毒性の原因追求といった課題解決につなげていく上でも重要な意義を持つ。また、今回開発した核酸は薬物動態面にフォーカスした設計ではないため、臓器特異性は期待できない。従って、DDS 研究との組み合わせ検討も重要である。近年の核酸医薬研究の大きな潮流として、核酸医薬品の薬物動態を改善する為、DDS 研究が活発に行われている<sup>84</sup>。核酸医薬品の分布する臓器は限られているため、その範囲を広げるために DDS 研究を行うことは高い意義を持つ。しかし、DDS のみで分布容積の大きい肝臓、腎臓に対して選択性を持って標的組織のみへの移行を達成するのは、未だ技術的ハードルが高い。今回開発した、標的組織内での安全性を改善可能な核酸アナログと標的組織内の薬物濃度を高める DDS 技術の組み合わせによるシナジーが期待される。

本博士論文の今後の展望として、第一章のグアニン修飾体に関しては *in vivo* での評価を、第二章の架橋型スルホンアミドについては *in vitro* の評価など、より高次の検討を行うことで、化学的な性質評価、cell free、*in vitro*、*in vivo* での評価についてそれぞれの関連や位置付けについてより深い議論が可能になる。また、広義、狭義の毒性に対するそれぞれの修飾核酸の寄与について、その一端を明らかにすることが可能となると考えられる。そして、それらの結果を持って、修飾核酸の開発方針として広義の毒性、狭義の毒性どちらかに重きを置いて実施すべきなのか、ケースバイケースでどちらかの毒性に注視する必要があるのか、あるいは両修飾体を組み合わせることで相乗的な効果が得られるのかといった知見が得られると考えられる。いずれにせよ、本研究で開発した修飾核酸はアンチセンス医薬品の課題克服に向け活用可能であり、今後の核酸医薬品の発展への貢献が期待される。

## 実験の部

### 一般的な事項

実験に用いた試薬・機器、実験の手順は以下の通りである。

#### 有機合成試薬、有機溶媒

試薬と有機溶媒は、和光純薬工業株式会社、東京化成工業株式会社、関東化学株式会社、シグマアルドリッチ株式会社から購入した。試薬および有機溶媒はそれぞれの試薬は精製することなく使用した。

#### 酵素および酵素反応試薬

酵素反応に用いる酵素および試薬はシグマアルドリッチ株式会社、タカラバイオ株式会社、プロメガ株式会社、Life Technologies Inc.から購入した。

#### 薄層クロマトグラフィー (TLC)

Kieselgel 60F-245 (Merck Ltd.) を用い、ヘキサン、酢酸エチル、ジクロロメタン、メタノール、エタノール、アセトニトリルの適当な混合液で展開した。また、化合物の検出は主にUV 254 nm、呈色試薬としては、アニスアルデヒド、5%硫酸メタノール溶液などを用いた。

#### カラムクロマトグラフィー

Biotage® Selektを使用し、フラッシュカラム精製により目的物の単離を行った。カラムはSfär Silica HC D High Capacity Duo 20 μm (10 g, 25 g, 50 g, 100 g) を用いた。溶出溶媒としてはヘキサン、酢酸エチル、ジクロロメタン、メタノールを用い、適当な混合比で目的物を溶出させた。

#### <sup>1</sup>H-NMR スペクトル測定

CDCl<sub>3</sub> または CH<sub>3</sub>OD、DMSO-d<sub>6</sub> を溶媒として、Varian AS500 (500 MHz)、日本電子社・JNM-ECZL400S (400 MHz) を用いて測定した。また、測定溶媒に由来するピーク (CDCl<sub>3</sub>: 7.26 ppm, CH<sub>3</sub>OD-d<sub>4</sub>: 3.31 ppm および DMSO-d<sub>6</sub>: 2.49 ppm) を内部標準とした。

#### <sup>13</sup>C-NMR スペクトル測定

CDCl<sub>3</sub> または CH<sub>3</sub>OD、DMSO-d<sub>6</sub> を溶媒として Bruker biospin・AVANCE III

HD500型 (126 MHz)、日本電子社・JNM-ECZL400S (101 MHz) を用いて測定した。また、測定溶媒に由来するピーク(CDCl<sub>3</sub>: 77.2 ppm, CH<sub>3</sub>OD-d<sub>4</sub>: 49.0 ppm, DMSO-d<sub>6</sub>: 39.5 ppm)を内部基準として校正した。

### **<sup>31</sup>P-NMR スペクトル測定**

CDCl<sub>3</sub>を溶媒として、Varian AS500 (500 MHz) を用いて測定した。

### **ESI-TOF-MS 分析**

すずかけ台分析支援センターに依頼し、brukers社製microTOF II にて測定した。

### **MALDI-TOF-MS 分析**

すずかけ台分析支援センターに依頼し、島津製作所製AXIMA-CFR plusにて測定した。

### **オリゴヌクレオチド合成**

オリゴヌクレオチド合成は、ジーンデザイン社製の自動オリゴ合成機 nS-8 II を用いて行った。固相は CPG-universal、アクチベーターは 5-ベンジルチオテトラゾール BTT、硫化剤は 3*H*-1,2,4-dithiazaoline-3-thione (DDTT)を用い、キャップ A, B 及び各種 DNA アミダイトを含めた試薬類は Glen research から購入した。また、デブロッキング (3 % w/v トリクロロ酢酸 in ジクロロメタン) 及びアセトニトリル (超脱水) は富士フィルム Wako 純薬から、各種 LNA アミダイトは Honegene 社製の試薬を用いた。オリゴヌクレオチド鎖の伸長時に、LNA はダブルカップリングでカップリング時間は 20 分、末端は DMTr-on で合成を行った。その後、28 % NH<sub>4</sub>OH aq., 55 °C, 16 時間処理で切り出しと脱保護を行った。遠心エバポレーターでアンモニアを除去し、Sep-pak C18 Plus Short Cartridge (waters 社) 上で、2 % TFA/H<sub>2</sub>O 処理により脱トリチル化反応を行い、簡易的に精製を行った。その後、RP-HPLC を用いて目的のオリゴの分取と純度分析を行った。また、一部の ASO については日本テクノサービス社で委託合成を行い、相補鎖 RNA や RNase H で用いたラダーは Eurofin 社から購入した。

### **RP-HPLC**

RP-HPLC精製は 島津 LC-6AD systemを用いて実施した。カラムはWaters XBridgeC18 5 µm 10 × 250 mm を用いた。移動相としては、8 mM TEA and 0.1 M hexafluoroisopropyl alcohol (HFIP)/MeOH の系で5 % から 45 % に40分間で

1% / 1 min のグラジエントをかけて溶出させた。

### 融解温度 ( $T_m$ ) 測定

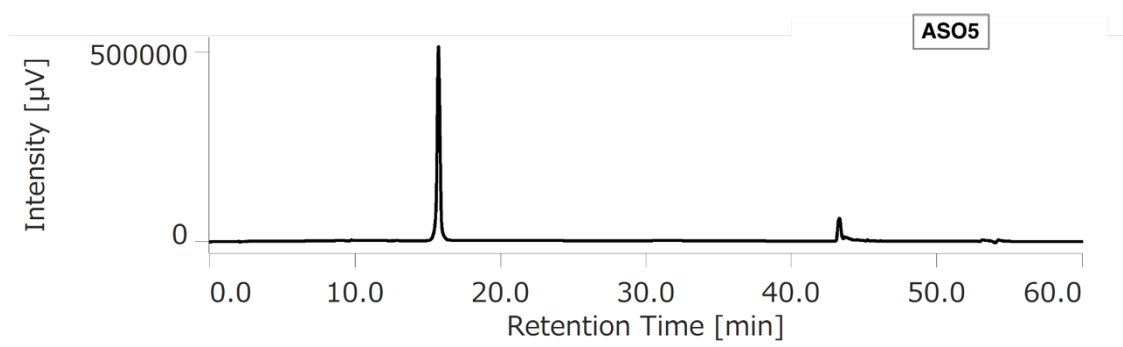
ASOと相補的RNAを終濃度が2  $\mu$ Mとなるように、10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (0.1 M NaClおよび0.1 mM EDTA、pH 7) に溶解した。混合液を95 °Cで3分間加熱後、室温まで冷却してアニーリングを行った。混合物を石英セルに入れ、25 °Cまで冷却した後、0.5 °C /分の速度で95 °Cまで加熱した。260 nmの吸収をJASCOV-730分光計でUV融解曲線として記録し、Svitzky-Golay法で平滑化した。測定は3回の独立した実験で行い、各 $T_m$ 値には各融解曲線の一次微分の値が最大となる温度の平均値を用いた。

## 第一章の実験

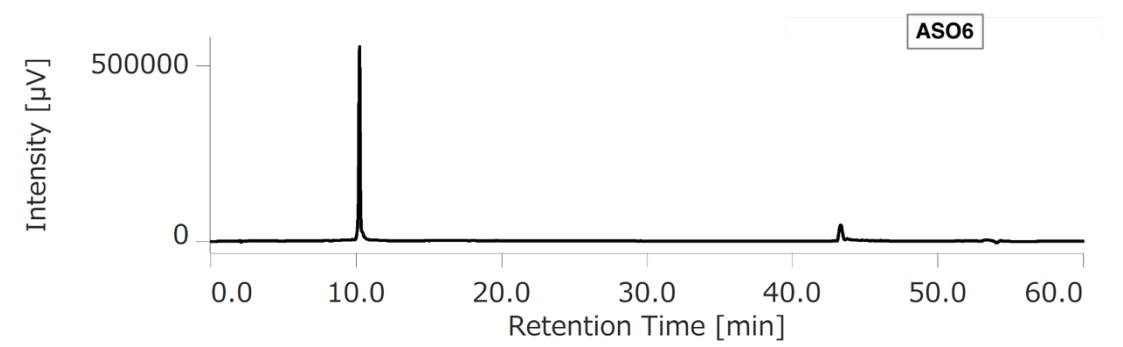
### オリゴヌクレオチドの合成と精製

オリゴヌクレオチドの合成および、精製は一般的な実験項に記載のとおり実施した。

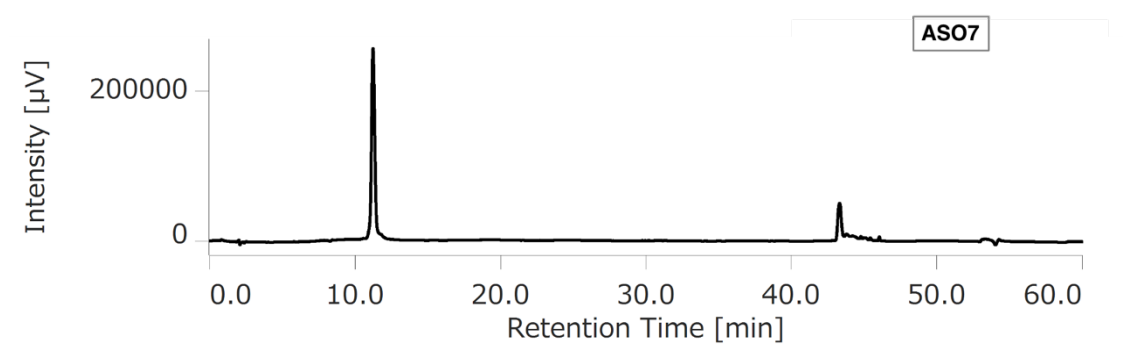
以下に、**ASO5-8** の HPLC チャート及び、MS の測定結果を示す。



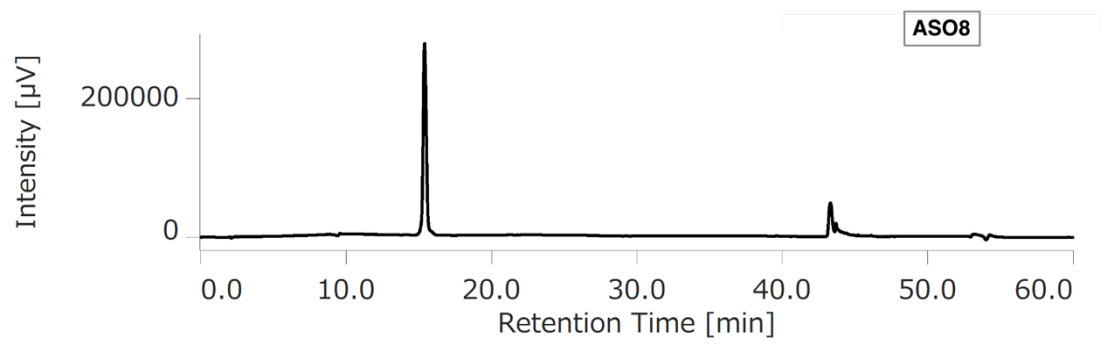
**ASO5** の RP-HPLC チャート



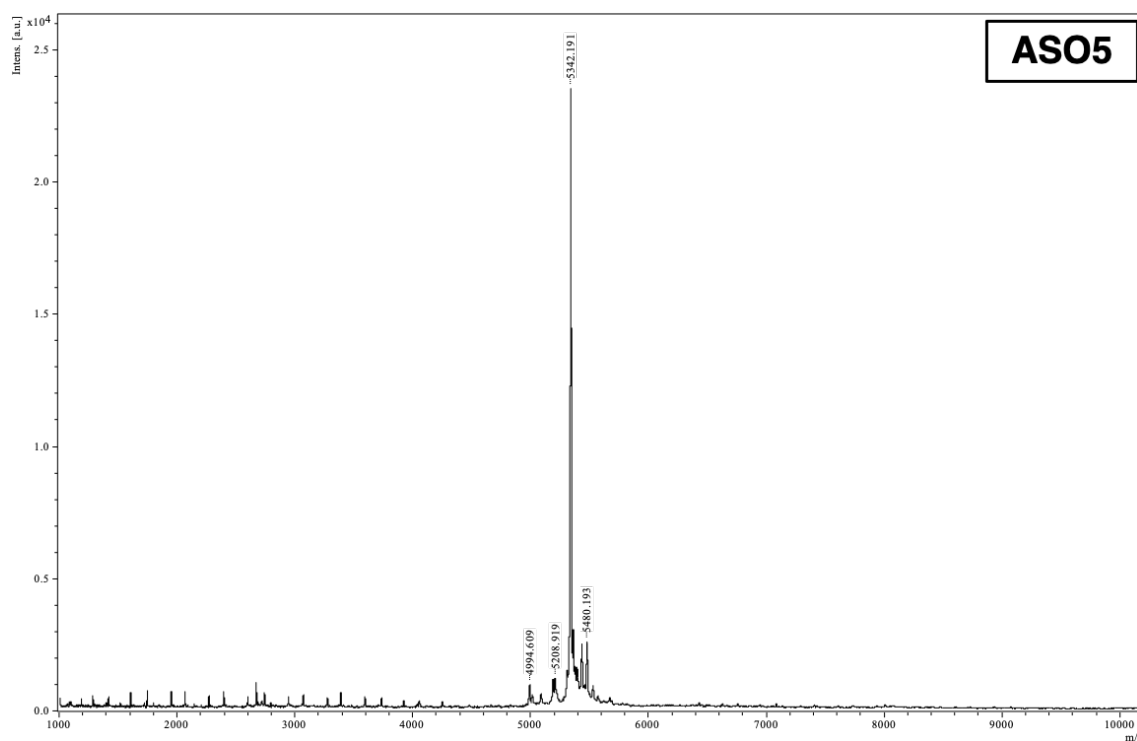
**ASO6** の RP-HPLC チャート



**ASO7** の RP-HPLC チャート

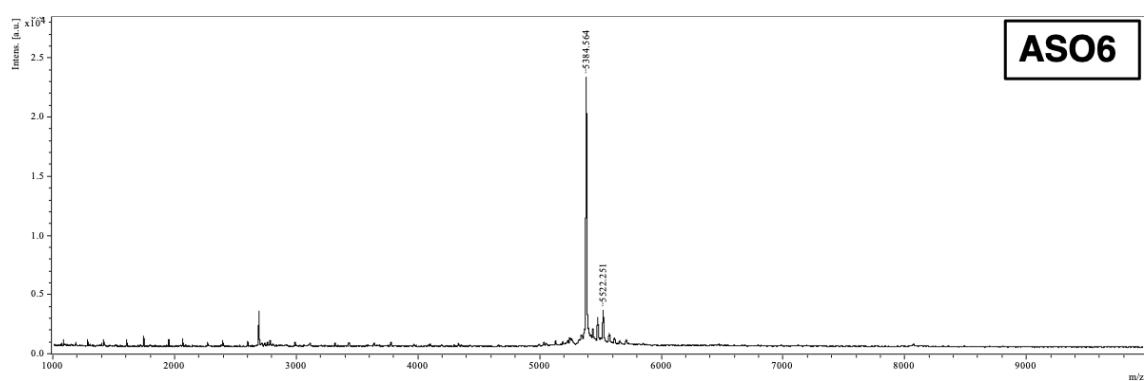


ASO8 の RP-HPLC チャート



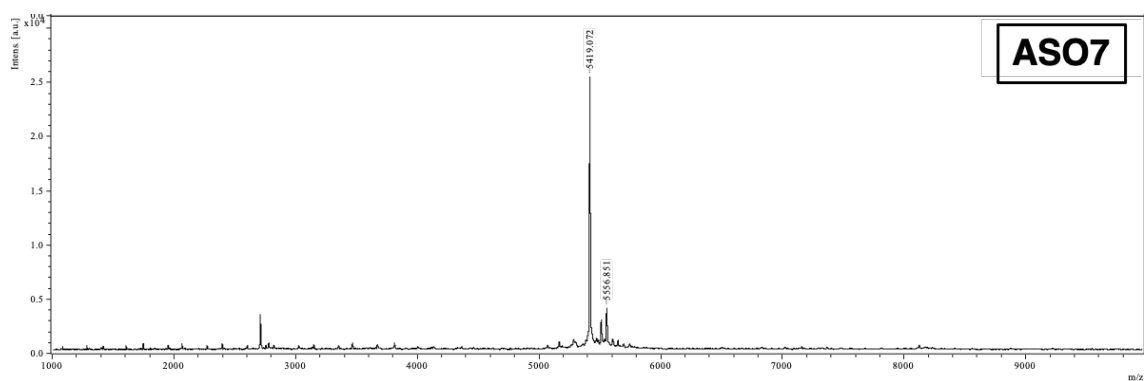
ASO5 の MS 分析結果

ASO5: calculated for  $\text{C}_{166}\text{H}_{202}\text{N}_{61}\text{O}_{84}\text{P}_{15}\text{S}_{15}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ : 5341.3, found: 5342.2



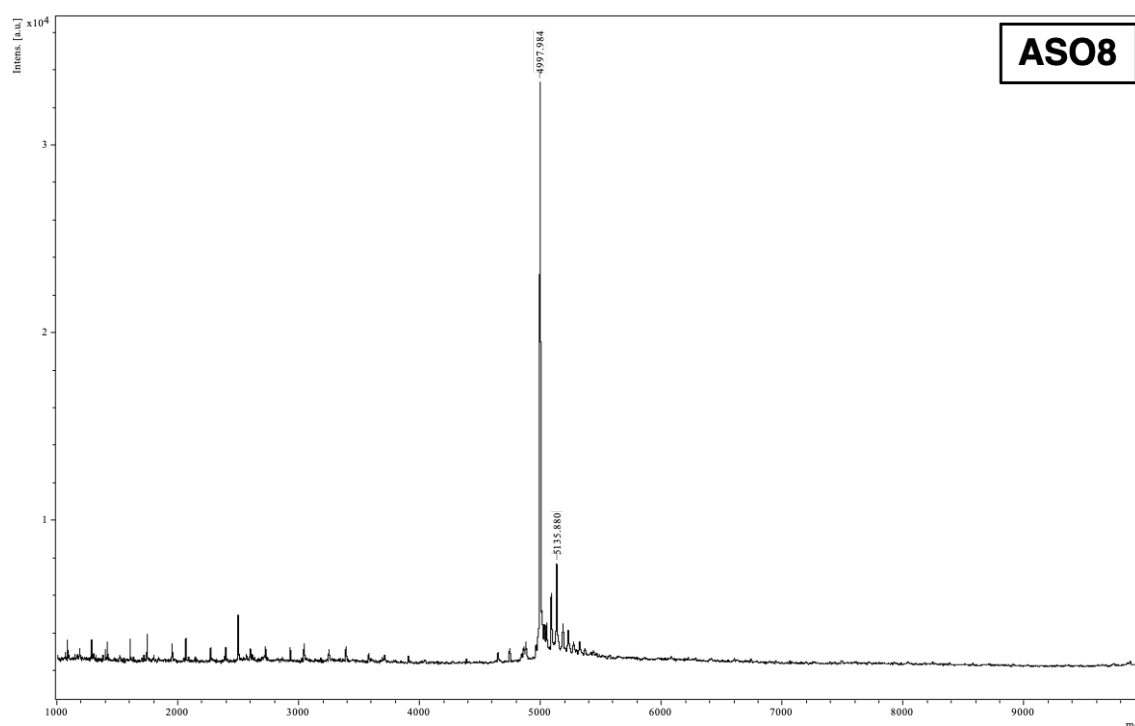
#### ASO6 の MS 分析結果

ASO6: calculated for  $C_{167}H_{203}N_{62}O_{85}P_{15}S_{15}$   $[M+H]^+$ : 5384.3, found: 5384.6



#### ASO7 の MS 分析結果

ASO7: calculated for  $C_{171}H_{205}N_{62}O_{84}P_{15}S_{15}$   $[M+H]^+$ : 5418.4, found: 5419.1

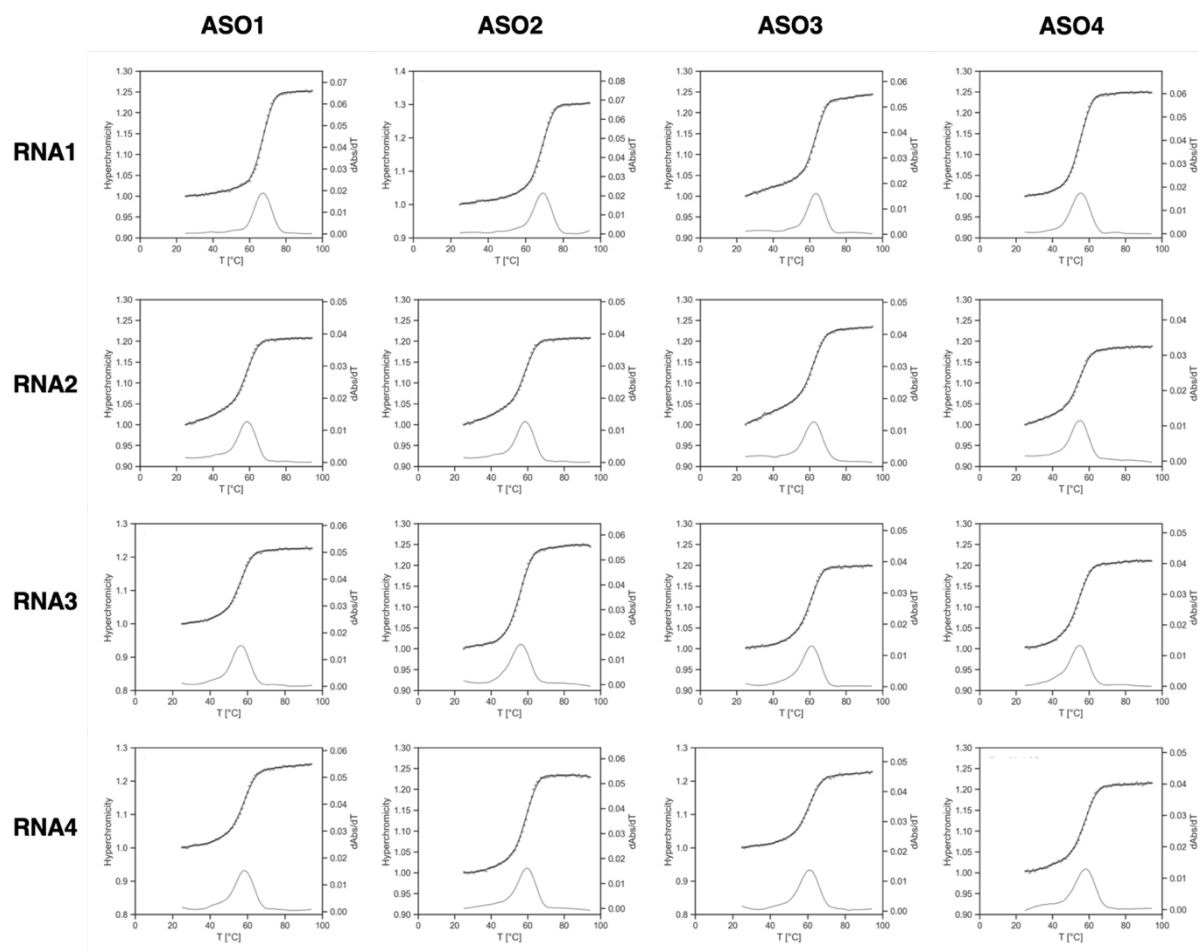


#### ASO8 の MS 分析結果

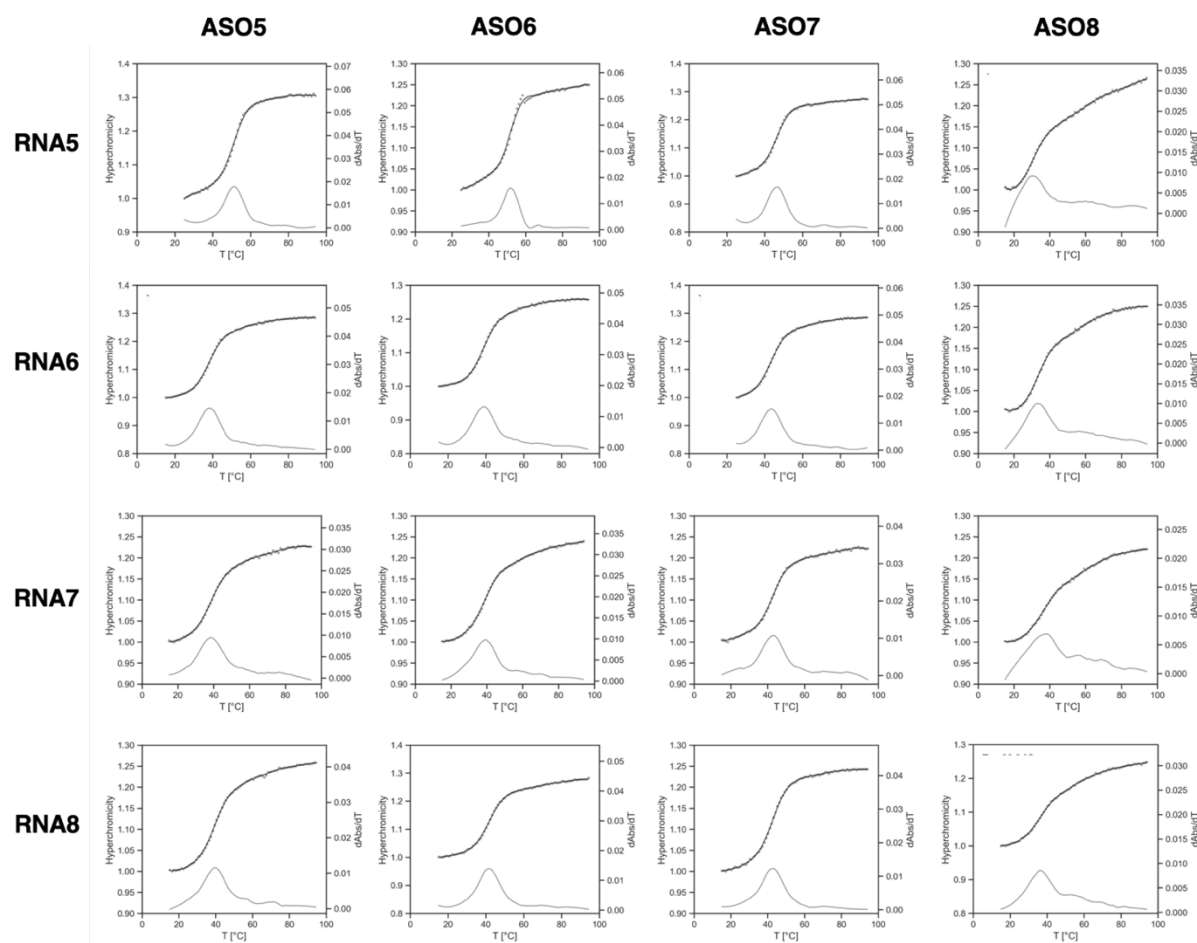
ASO8: calculated for  $C_{156}H_{190}N_{56}O_{79}P_{14}S_{14}$   $[M+H]^+$ : 4996.0, found: 4998.0

## $T_m$ 値測定

$T_m$  値測定は一般的な実験の項目に記載の通り実施した。  
代表的な melting curve は以下の通りである。



Representative melting curve and primary differential curve of hRluc targeting ASO (ASO1-4) / RNA1-4



Representative melting curve and primary differential curve of hMALAT1 targeting ASO (ASO5-8) / RNA5-8

### レポーターアッセイ

10%不活化ウシ胎児血清 (FBS)、100 U/mL ペニシリン 100  $\mu$ g/mL ストレプトマイシンを添加した Dulbeccos' Modified Eagle Medium (DMEM) を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で HeLa 細胞をサブコンフルエンスまで培養した。10%FBS を含む DMEM を用い、細胞を 96 ウェルプレートに 2 $\times$ 10<sup>4</sup> 細胞/100  $\mu$ L/ウェルで播種した。翌日、細胞を Opti-MEM で 2 回洗浄し、培地を 100  $\mu$ L/ウェルの Opti-MEM に交換した。Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社)、各 ASO、プラスミド pGL4.13 (luc2 / SV40; 0.1 ng/well; Promega 社) および pGL4.73 (hRluc / SV40; 0.1 ng/well; Promega

社) を Opti-MEM と混合した。この混合物を細胞にトランスフェクションし、5% CO<sub>2</sub> 下、37 °C でインキュベートした。翌日、細胞を回収し、1×PLB (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Promega 社) 40 µL/well で 1 回洗浄し、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 社) を用いて、標準プロトコルに従って解析した。Renilla ルシフェラーゼの発光シグナルは、Stop & Go 試薬を添加して測定した。最後に、ルシフェラーゼ活性を、各ウェルにおけるレニラルシフェラーゼのシグナルとホタルのシグナルの比 (hRluc/luc2) として算出し、さらに Lipofectamine+/ASO-コントロールから得られた値を用いて正規化を行った。各処理は n = 3 で行った。

### ***In vitro* ノックダウン活性評価**

HeLa 細胞を、10% FBS、100 U/mL ペニシリン 100 µg/mL ストレプトマイシンを添加した DMEM 中で、サブコンフルエンスになるまで 5% CO<sub>2</sub> 下、37 °C で培養した。細胞を、10% FBS を含む DMEM を用いた 96 ウェルプレートに 2×10<sup>4</sup> 細胞/100 µL/ウェルで播種した。翌日、細胞を PBS で 2 回洗浄し、培地を 100µL/ウェルの Opti-MEM に交換した。MALAT1 ASO、Lipofectamine 2000 (0.5µL/ウェル; Invitrogen 社)、Opti-MEM の混合物を細胞培養に加え、5% CO<sub>2</sub> 下、37 °C で 24 時間培養した。その後、細胞を回収し、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Reverse (TOYOBO 社) を用いて、熱変性、DNase 処理、RT-PCR を行った。最後に、TaqMan プローブを用いて qPCR を行った。フォワードプライマーは 5'-GCTTGGCTTCTTCTGGACTCA-3'、リバープライマーは 5'-TCGCGAGCTTCACCATGA-3'を使用した。得られた結果は GAPDH の発現レベルで正規化し、各処理は n = 3 で行った。

### **Microarray による網羅的変動遺伝子解析及び *in silico* オフターゲット解析**

マイクロアレイ解析は、Agilent SurePrint G3 Human GE v3 8× 60 K システム (Agilent 社) を用いて行った。HeLa 細胞に対し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen 社) を用いて 10 nM の hRluc および hMALAT1 標的 ASO をリポフェクションし、24 時間インキュベートした。各処理は n = 3 で行った。データは R 4.1 と Python 3.7 を用いて処理し、遺伝子ごとに median polish を用いて発現量を要約したのち、quantile normalization で前処理を行った。また、p 値は R の library の limma<sup>85</sup> を用いて計算し、Benjamini-Hochberg 手順を用いて補正し、補正 p 値として使用した。発現低下遺伝子は、補正 p 値 < 0.05、log<sub>2</sub> fold-change < -1.0 と定義した。但し、hMALAT1 標的 ASO では遺伝子発現の変動が小さかったため、修飾の違いの傾向を捉えるために、log<sub>2</sub> fold-change < -0.5 という閾値を適用し

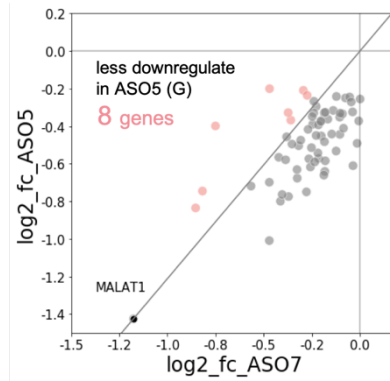
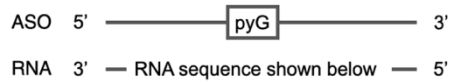
た。オフターゲット遺伝子の数は、GGGenome (<https://gggenome.dbcls.jp/>) を用いて解析を行った。ヒト pre mRNA または mature mRNA のリファレンス配列配列としては "Human pre-spliced RNA, RefSeq curated on hg38.p12, D3G 21.01 (released Jan 2021) "と "Human spliced RNA, RefSeq curated on hg38.p12, D3G 21.01 (released Jan 2021) "を使用し、重複を除いた遺伝子名を抽出した。また、GGGenome を用いて解析したミスマッチ+挿入+欠損の数を distance と定義した。そして、ハイブリダイゼーション依存のオフターゲットの可能性が高い遺伝子として、hRluc については補正 p 値  $<0.05$ 、 $\log_2fc < -1$ 、 $distance \leq 2$ 、hMALAT1 については補正 p 値  $<0.05$ 、 $\log_2fc < -0.5$ 、 $distance \leq 2$  と定義した

### 主活性で補正した ASO5 及び ASO7 の配列選択性評価

ASO5 (G) と ASO7 (pyG) のハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果の比較は、ハイブリダイゼーション依存のオフターゲットの可能性が高い遺伝子に焦点を当てて解析を行った。各遺伝子は、オンターゲット hMALAT1 のノックダウン (KD) 効果が等しい割合になるように引いた補助線を用いて補正した。fold change が絶対値で 0 より大きい遺伝子を抽出し、Figure 1.16 の左上と右下にプロットした。これらの遺伝子のミスマッチ+挿入+欠損の数について GGGenome を用いて解析した。結果は次ページに表で示す。これらの表において、"="はこの位置のリボヌクレオチド残基の塩基がワトソン-クリック塩基対を形成していることを意味する。"X"はワトソン-クリック塩基対以外のミスペアを意味し、"I"はこの位置の塩基に対塩基がないことを意味する。"D"はこの位置にヌクレオチド残基がないことを意味する。例えば ASO が 5'-CATatgca-[pyG]-ataaTGT-3'、RNA が 3'-GTATAC-CCTATTACA-5'の場合、表記は=====DX=====となる。そして最後に、修飾位置に対する 5'領域と 3'領域のそれぞれの "X"、"D"、"I"数の合計を計算することにより、pyG 効果のミスマッチ依存性の位置を解析した。

Gene list whose KD was accelerated by pyG modification

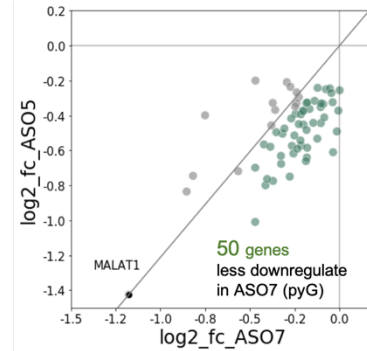
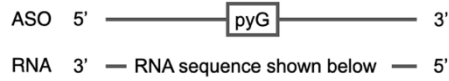
(The 8 genes in red in the figure below are the relevant genes)



| Gene Symbol | Pattern (3'-5') | RNA sequence (3'-5') |
|-------------|-----------------|----------------------|
| APPBP2      | =====DX=====    | GTATAC-CCTATTACA     |
| GPC5        | =X=D=====       | GGA-ACGTCTATTACA     |
| HS6ST3      | =====X====D==== | GTATACGTATAT-ACA     |
| LOC284930   | =====X==X====   | GTATACGTCAATCACA     |
| LRBA        | =====X====D==== | GTATACGTATAT-ACA     |
| LRP1B       | X====D=====     | ATAT-CGTCTATTACA     |
| LRRIQ3      | ====D=====D==== | GTAT-CGTCTAT-ACA     |
| RNF150      | ==X=====D=====  | GTGTACGTCT-TTACA     |

Gene list whose KD was suppressed by pyG modification

(The 50 genes in green in the figure above are the relevant genes)



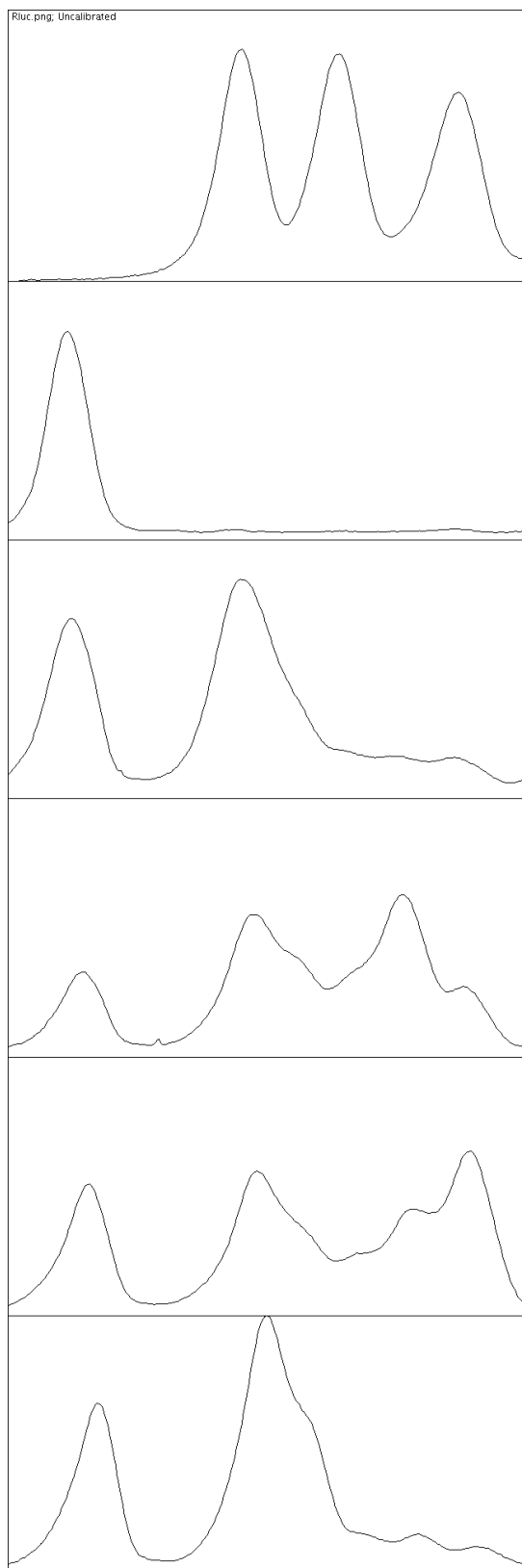
| Gene Symbol  | Pattern (3'-5') | Target sequence (3'-5') |
|--------------|-----------------|-------------------------|
| ARHGAP10     | =====XX=====    | GTATACGTCTAAGACA        |
| ARHGAP17     | =====I==I=====  | GTATACGTCTGATGTACA      |
| ATF2         | =====X==D=====  | GTATACGTCCAT-ACA        |
| BCAS3        | =====X===D=     | GTATACGTCTGTTA-A        |
| C15orf41     | =====I==X=      | GTATACGTCTATCTAGA       |
| CDH2         | =====X=         | GTATACGTCTATTAGA        |
| CDK14        | =X=====D=====   | GAATACGT-TATTACA        |
| CENPP        | =====X=====X=   | GTATATGTCTATTAAA        |
| CHSY3        | =====DX=====    | GTATACGTCTA-AACA        |
| CTIF         | ==D=====        | GT-TACGTCTATTACA        |
| ERBB4        | =====X=====     | GTATACTTCTATTACA        |
| FAF1         | ==DX=====       | GTA-GCGTCTATTACA        |
| FAM133B      | X=====          | TTATACGTCTATTACA        |
| FAM160A1     | =====X==X       | GTATACGTCTATGACT        |
| FAM239B      | =====D=X=       | GTATACGTCTAT-AAA        |
| FBXO34       | =====XX=        | GTATACGTCTATATCA        |
| FHIT         | =====D=====     | GTATACGTC-ATTACA        |
| FMNL2        | =====X===D===== | GTATACGTATAT-ACA        |
| HMBOX1       | =====D=X=       | GTATACGTCTAT-AAA        |
| IDE          | =====X=====     | GTATACGTCTAGTACA        |
| LOC100288798 | =====IX=====    | GTATACGTCTATTTGCA       |
| LOC389906    | =====D=X=       | GTATACGTCTAT-AAA        |
| LRMDA        | ==X=====X=      | GTTTACGTCTATTAAA        |
| MATR3        | ==X=====        | GTTTACGTCTATTACA        |

前ページの続き

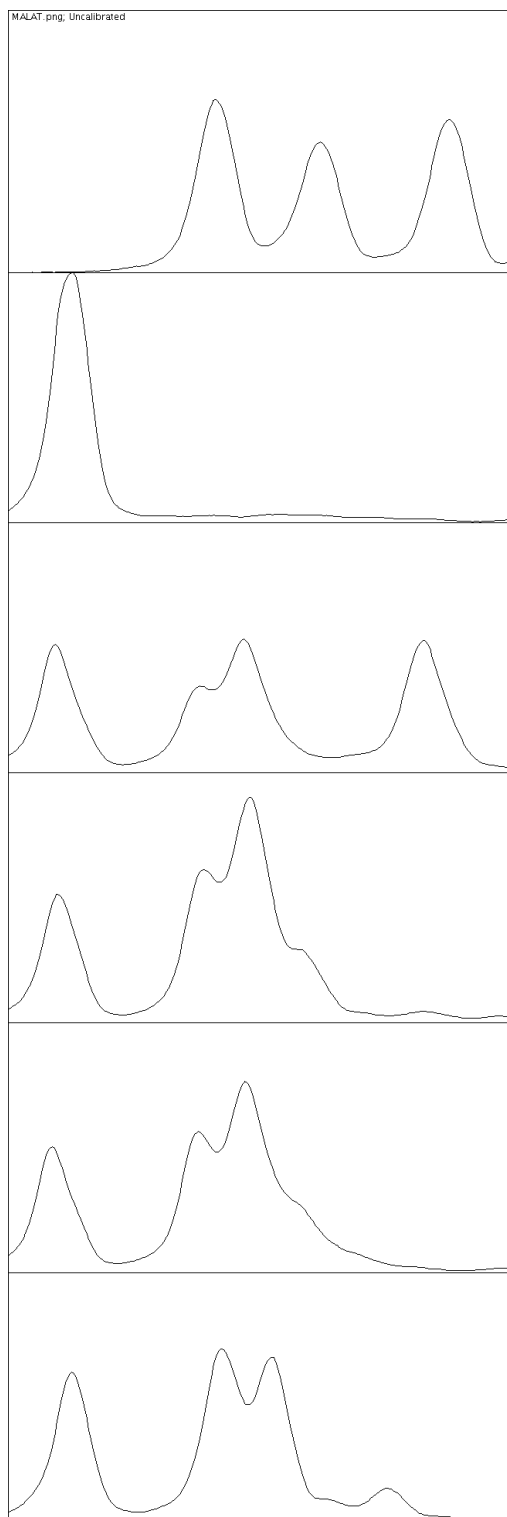
| Gene Symbol | Pattern (3'-5') | Target sequence (3'-5') |
|-------------|-----------------|-------------------------|
| NBAS        | =====D=====D==  | GTATA-GTCTATT-CA        |
| NR6A1       | =====D==X       | GTATACGTCTAT-ACT        |
| NRDC        | =====I====X     | GTATACGTCTAATTACC       |
| NT5C2       | =====D=D===     | GTATACGTCT-T-ACA        |
| PARD3       | =====X===X===   | GTATACGTTTATGACA        |
| PBX1        | =====X=====D=== | GTATACATCTAT-ACA        |
| PDE4B       | =====DD=====    | GTATA--TCTATTACA        |
| PMF1-BGLAP  | =====XX=        | GTATACGTCTATTTAA        |
| PMF1        | =====XX=        | GTATACGTCTATTTAA        |
| PPP1CB      | =====X===X      | GTATACGTCTAGTACT        |
| RABL3       | ===X==D=====    | GTACAC-TCTATTACA        |
| SCFD2       | =====X===D=     | GTATACGTCTTTTA-A        |
| SENP1       | =====I====X     | GTATACGTCTATGTACC       |
| SLC4A7      | X==I=====       | CTACTACGTCTATTACA       |
| SNTB2       | X=====          | ATATACGTCTATTACA        |
| SNX7        | =====D==X       | GTATACGTCTAT-ACG        |
| TAF3        | =====D=D=       | GTATACGTCTAT-A-A        |
| TBL1XR1     | =====I===       | GTATACGTCTATTGACA       |
| TMED5       | =====D==X       | GTATACGTCTAT-ACT        |
| TMEM135     | =====XX==       | GTATACGTCTATGTCA        |
| TTC28       | =====X===D=     | GTATACGTCTTTTA-A        |
| UBTD1       | X=====D===      | TTATACGTCTAT-ACA        |
| UST         | ===D=====I===   | GTA-ACGTCTATTGACA       |
| VTI1A       | =====D=====X=   | GTATA-GTCTATTATA        |
| ZDHHC14     | =====X=====X=   | GTATAGGTCTATTAAA        |
| ZNF839      | =====D=X=       | GTATACGTCTAT-AAA        |

### **RNase H 切断アッセイ**

ASO と相補的な 5'FAM 標識 RNA を 50 mM Tris-HCl、75 mM KCl、125  $\mu$ M EDTA を含むバッファーに溶解し（ASO と RNA の最終濃度は 100 nM）、60 °C で 2 分間アニーリングした後、37 °C に冷却した。次に、50 mM Tris-HCl、75 mM KCl、20 mM MgCl<sub>2</sub>、および 5 mM DTT 中の RNase H（0.005 U/ $\mu$ L、大腸菌、TaKaRa Bio、大津、日本）5  $\mu$ L を、ASO/RNA 含有混合物各 100  $\mu$ L に加え、37 °C で 5 分間インキュベートした。次に、反応混合物 10  $\mu$ L を集め、10 M 尿素、50 mM EDTA  $\cdot$  2Na、0.1wt% Bromophenol Blue を含む溶液 10  $\mu$ L に加えた。最後に、8  $\mu$ L のサンプルを 20%変性ポリアクリルアミドゲルにアプライし、60 °C、60 W で 30 分間電気泳動した。コントロールとして、ASO の代わりに蒸留水を加えた。さらに、hRluc と hMALAT1 の RNA を 5'側から短くした 13、11、9 mer FAM-RNA（100 nM）のラダーをサイズマーカーとして用いた。分離したバンドを Typhoon<sup>TM</sup> FLA を用いて定量し、分解産物の比率について、ImageJ ソフトウェア（ver.1.53）を用いて算出した。バックグラウンドノイズと思われるマイナーな値（レーン中の全 RNA の 5 %未満）は含めずに定量を行った。ImageJ による、バンドの定量結果は以下に添付する。



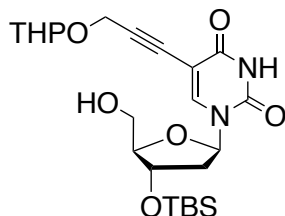
Quantification of RNase H digestion product of hRluc targeting ASO (**ASO1-4**)



Quantification of RNase H digestion product of hMALAT1 targeting ASO (**ASO5-8**)

## 第二章の実験

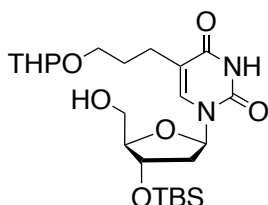
### 3'-*O*-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5-{3-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]prop-1-yn-1-yl}-2'-deoxyuridine (**2-5**)



To a stirring solution of compound **2-1** (1.0 g, 2.14 mmol) in DMF (21.4 mL) was added 2-(2-Propynyloxy)tetrahydropyran (609.9 mg, 4.28 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (24.1 mg, 0.11 mmol), CuI (15.1 mg, 0.11 mmol), Xantphos (60.4 mg, 0.11 mmol) and diisopropylethylamine (1.5 mL). The resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 16 h, after which it was concentrated *in vacuo*. *n*-hexane (80 mL) and EtOAc (80 mL) were added, and the organic layer was separated and washed twice with H<sub>2</sub>O (160 mL), saturated NaHCO<sub>3</sub> (160 mL) solution and saturated NaCl (160 mL) solution. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo* to give crude, which was purified using flash chromatography on silica gel using a gradient from 0 to 60 % EtOAc in *n*-hexane and gave **2-5** in 81% yield (829 mg, 1.72 mmol).

MS (ESI) calcd. for C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>7</sub>Si<sup>+</sup> [M + Na]<sup>+</sup> 503.2184, found 503.2170. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.10 (s, 1H), 8.05 (d, *J* = 6.8 Hz, 1H), 6.17 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 4.86 (t, *J* = 3.5 Hz, 1H), 4.51-4.41 (m, 3H), 3.96-3.94 (m, 2H), 3.88-3.84 (m, 1H), 3.79 (d, *J* = 11.9 Hz, 1H), 3.57-3.54 (m, 1H), 2.32-2.18 (m, 3H), 1.86-1.79 (m, 1H), 1.77-1.71 (m, 1H), 1.66-1.57 (m, 3H), 0.89 (s, 9H), 0.09 (s, 6H). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 161.2, 149.1, 144.2, 99.4, 96.8, 89.6, 87.7, 86.5, 71.3, 61.8, 61.6, 54.8, 41.2, 30.1, 25.6, 25.2, 18.8, 17.8, -4.9.

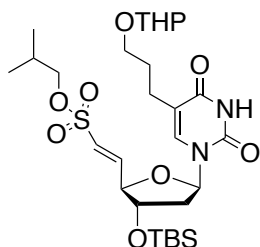
**3'-O-(tert-butyldimethylsilyl)-5-{3-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]prop-1-yl}-2'-deoxyuridine (2-6)**



To a solution of compound **2-5** (4.7 g, 9.8 mmol) in EtOH (98 mL) was added Pd/C (0.94 g) under hydrogen. The mixture was vigorously stirred at room temperature for 25 h. After being filtered, the mixture was concentrated *in vacuo* to give the **2-6** in quantitative yield (4.7 g, 9.8 mmol).

MS (ESI) calcd. for  $C_{23}H_{40}N_2NaO_7Si^+$   $[M + Na]^+$  507.2497, found 507.2504.  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO):  $\delta$  11.28 (s, 1H), 7.64 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 6.17-6.13 (m, 1H), 5.08 (s, 1H), 4.52 (dd,  $J = 7.3, 3.6$  Hz, 1H), 4.42-4.40 (m, 1H), 3.76 (dd,  $J = 6.9, 3.6$  Hz, 1H), 3.74-3.70 (m, 1H), 3.64-3.52 (m, 3H), 3.43-3.39 (m, 1H), 2.30-2.16 (m, 3H), 2.07-2.02 (m, 1H), 1.74-1.65 (m, 3H), 1.63-1.57 (m, 1H), 1.50-1.38 (m, 5H), 0.87 (t,  $J = 3.0$  Hz, 9H), 0.08 (t,  $J = 3.1$  Hz, 6H).  $^{13}C\{^1H\}$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  163.8, 150.8, 136.6, 113.2, 98.5, 87.9, 84.3, 72.6, 66.5, 61.8, 61.4, 30.8, 28.3, 26.2, 25.5, 23.9, 19.7, 18.2, -4.3, -4.4.

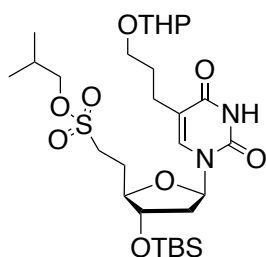
**3'-O-(tert-butyldimethylsilyl)-5'-deoxy-5'-(isobutyloxysulfonylmethylene)-5-{3-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]propyl}-2'-deoxyuridine (2-7)**



To a stirring solution of compound **2-6** (4.7 g, 9.8 mmol) in  $CH_2Cl_2$  (27 mL) was added Dess-Martin reagent (5.1 g, 11.6 mmol). The resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 5 h, after which  $H_2O$  (100 mL) was added, and the organic layer

was separated avoiding the insoluble compound. Then, the solution was quenched with saturated Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> solution (35 mL) and saturated NaHCO<sub>3</sub> solution (70 mL). CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL) was added, and the organic layer was separated and washed by adding a small amount of H<sub>2</sub>O. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo* to give crude (5.8 g). To a stirring suspension of the crude in THF (54 mL) was added isobutyl (diethoxyphosphoryl)methanesulfonate (5.7 g, 19.4 mmol), diisopropylethylamine (5.2 mL, 29.1 mmol), and LiBr (2.7 g, 29.1 mmol). The resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 21 h, after which was quenched with NH<sub>4</sub>Cl solution (180 mL). The aqueous layer was extracted twice with EtOAc (350 mL), the organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo* to give crude, which was purified using flash chromatography on silica gel using a gradient from 20 to 80% EtOAc in *n*-hexane and gave **2-7** in 43% yield (2.6 g, 4.2 mmol, 2steps). MS (ESI) calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>48</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>9</sub>SSi<sup>+</sup> [M + Na]<sup>+</sup> 639.2742, found 639.2761. (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>: δ 7.98 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 6.95 (dd, *J*= 15.0, 4.5 Hz, 1H), 6.51 (dd, *J*= 15.3, 1.8 Hz, 1H), 6.25-6.19 (m, 1H), 4.56 (s, 1H), 4.41 (s, 1H), 4.34 (dd, *J*= 10.8, 4.8 Hz, 1H), 3.94-3.90 (m, 2H), 3.88-3.84 (m, 1H), 3.77 (m, 1H), 3.50-3.43 (m, 2H), 2.48-2.42 (m, 2H), 2.36-2.25 (m, 2H), 2.05-2.00 (m, 1H), 1.86-1.78 (m, 3H), 1.74-1.71 (m, 1H), 1.59-1.48 (m, 3H), 0.97 (d, *J*= 6.8 Hz, 7 H), 0.91 (s, 9H), 0.11 (d, *J*= 3.9 Hz, 6H). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 162.9, 149.8, 143.2, 135.8, 125.8, 115.3, 99.0, 85.9, 83.9, 76.5, 74.6, 66.4, 62.5, 39.4, 30.7, 28.0, 25.5, 25.3, 23.8, 19.7, 18.5, 17.8, -4.8, -4.9.

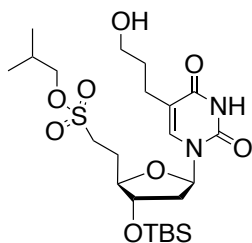
**3'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-deoxy-5'-[2-(isobutyloxy)sulfonylmethyl]-5-{3-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]propyl}-2'-deoxyuridine (**2-8**)**



To a stirring solution of compound **2-7** (1.5 g, 2.4 mmol) in EtOH (12 mL) was added NaBH<sub>4</sub> (138 mg, 3.6 mmol). The resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 19 h, after which was quenched with NH<sub>4</sub>Cl solution (40 mL). The aqueous layer was extracted twice with EtOAc (80 mL), the organic layer was dried over

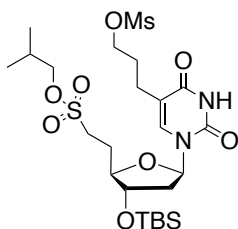
Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo* to give crude **2-8** (1.4 g), which was used in the next step without further purification. MS (ESI) calcd. for C<sub>28</sub>H<sub>50</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>9</sub>SSi<sup>+</sup> [M + Na]<sup>+</sup> 641.2898, found 641.2905. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8.91 (s, 1H), 7.04 (t, *J* = 1.0 Hz, 1H), 6.13-6.08 (m, 1H), 4.57-4.54 (m, 1H), 4.17-4.13 (m, 1H), 4.01-3.96 (m, 2H), 3.88-3.83 (m, 1H), 3.82-3.73 (m, 2H), 3.52-3.47 (m, 1H), 3.46-3.41 (m, 1H), 3.33-3.27 (m, 1H), 3.21-3.15 (m, 1H), 2.50-2.39 (m, 2H), 2.30-2.20 (m, 3H), 2.10-1.99 (m, 2H), 1.88-1.78 (m, 3H), 1.76-1.67 (m, 1H), 1.57-1.48 (m, 4H), 0.97 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H), 0.88 (t, *J* = 3.0 Hz, 9H), 0.08 (t, *J* = 3.8 Hz, 6H). <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 163.3, 150.1, 136.2, 115.2, 99.2, 85.7, 84.0, 75.8, 74.9, 66.6, 62.8, 47.1, 40.0, 30.9, 28.4, 28.3, 27.5, 25.8, 25.6, 24.0, 20.0, 18.8, 18.0, -4.4, -4.7.

**3'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-deoxy-5'-[2-(isobutyloxy)sulfonylmethyl]-5-(3-hydroxypropyl)-2'-deoxyuridine (2-9)**



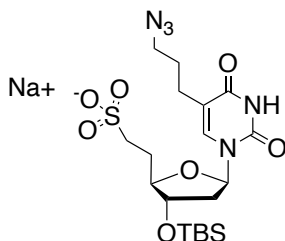
To a stirring solution of compound **2-8** (2.0 g, 3.2 mmol) in EtOH (25 mL) was added *p*-TsOH·H<sub>2</sub>O (38.2 mg, 0.2 mmol). The resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 21 h, after which was quenched with diisopropylethylamine (1 mL). The reaction mixture was concentrated *in vacuo* to give crude, which was purified using flash chromatography on silica gel using a gradient from 30 to 70 % EtOAc in *n*-hexane and obtained **2-9** in 70 % yield (1.2 g, 2.2 mmol, 2steps). MS (ESI) calcd. for C<sub>23</sub>H<sub>42</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>8</sub>SSi<sup>+</sup> [M + Na]<sup>+</sup> 557.2323, found 557.2326. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.14 (s, 1H), 7.13 (s, 1H), 6.18 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H), 4.17-4.14 (m, 1H), 4.03-3.97 (m, 2H), 3.84-3.80 (m, 1H), 3.62 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H), 3.35-3.29 (m, 1H), 3.22-3.16 (m, 1H), 2.53-2.43 (m, 2H), 2.29-2.18 (m, 4H), 2.09-1.99 (m, 2H), 1.79-1.72 (m, 2H), 0.97 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H), 0.88 (t, *J* = 3.0 Hz, 9H), 0.08 (d, *J* = 3.0 Hz, 6H). <sup>13</sup>C {<sup>1</sup>H} NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 164.0, 150.2, 136.6, 114.9, 85.6, 84.1, 75.9, 74.9, 61.0, 47.1, 40.1, 31.6, 28.4, 27.6, 25.8, 22.9, 18.8, 18.0, -4.5, -4.7.

**3'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-deoxy-5'-[2-(isobutyloxy)sulfonylmethyl]-5-[3-(methanesulfonyloxy)propyl]-2'-deoxyuridine (2-10)**



To a stirring solution of compound **2-9** (2.1 g, 4.0 mmol) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15.8 mL) was added Et<sub>3</sub>N (614 μL, 4.4 mmol) and MsCl (339 μL, 4.4 mmol). The resulting reaction mixture was stirred at 0 °C for 17 h. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (150 mL) was added, and the organic layer was separated and washed twice with saturated NaHCO<sub>3</sub> (150 mL) solution, and saturated NaCl (150 mL) solution. The organic layer was dried over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtered, and concentrated *in vacuo* to give crude, which was purified using flash chromatography on silica gel using a gradient from 30 to 80 % EtOAc in *n*-hexane and gave the desired product **2-10** in 90% yield (2.2 g, 3.6 mmol). MS (ESI) calcd. for C<sub>24</sub>H<sub>44</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>10</sub>S<sub>2</sub>Si<sup>+</sup> [M + Na]<sup>+</sup> 635.2099, found 635.2110. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 9.05 (s, 1H), 7.25 (s, 1H), 6.22 (t, *J* = 6.7 Hz, 1H), 4.25-4.16 (m, 3H), 4.02-3.96 (m, 2H), 3.81-3.78 (m, 1H), 3.37-3.31 (m, 1H), 3.21-3.15 (m, 1H), 3.04 (s, 3H), 2.57-2.45 (m, 2H), 2.29-2.22 (m, 3H), 2.16-2.09 (m, 1H), 2.07-1.97 (m, 3H), 0.98 (d, *J* = 6.8 Hz, 6H), 0.88 (t, *J* = 3.0 Hz, 9H), 0.08 (d, *J* = 4.0 Hz, 6H). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 163.3, 150.2, 137.6, 112.9, 84.9, 84.0, 75.9, 74.7, 68.1, 47.1, 40.1, 37.7, 28.4, 27.2, 27.1, 25.8, 23.2, 18.8, 18.0, -4.5, -4.8.

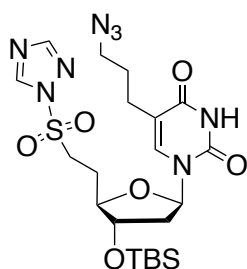
**3'-O-(*tert*-butyldimethylsilyl)-5'-deoxy-5'-(sulfonylmethyl)-5-(3-azidepropyl)-2'-deoxyuridine sodium salt (2-11)**



To a stirring solution of compound **2-10** (972 mg, 1.6 mmol) in DMF (6.4 mL) was added NaN<sub>3</sub> (310.1 mg, 4.8 mmol). The resulting reaction mixture was stirred at 110 °C

for 4 h, after which was diluted with EtOAc (around 500 mL) and the precipitation was removed. The solution was purified using flash chromatography on silica gel using a gradient from 1 to 15 % MeOH in EtOAc and gave **2-11** in 71 % yield (596 mg, 1.6 mmol, 2 steps). MS (ESI) calcd. for  $C_{19}H_{32}N_5O_7SSi^- [M]^-$  502.1797, found 502.1788.  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  7.46 (s, 1H), 6.23 (t,  $J$ = 6.9 Hz, 1H), 4.33-4.31 (m, 1H), 3.91-3.88 (m, 1H), 3.36-3.35 (m, 2H), 3.03-2.97 (m, 1H), 2.92-2.86 (m, 1H), 2.44 (t,  $J$ =7.5 Hz, 2H), 2.29-2.17 (m, 3H), 2.10-2.02 (m, 1H), 1.84-1.79 (m, 2H), 0.94 (s, 9H), 0.14 (d,  $J$ = 4.4 Hz, 6H).  $^{13}C\{^1H\}$  NMR (126 MHz,  $CD_3OD$ ):  $\delta$  165.7, 152.2, 138.2, 115.2, 87.0, 86.3, 76.5, 51.9, 40.8, 30.4, 28.9, 26.2, 25.3, 18.8, -4.6, -4.7.

**3'-O-(tert-butyldimethylsilyl)-5'-deoxy-5'-[2-(1,2,4-triazol-1-yl)-sulfonylmethyl]-5-(3-azidepropyl)-2'-deoxyuridine (2-12)**

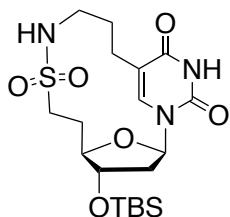


Compound **2-11** (100 mg, 0.2 mmol) with 18-crown-6-ether (51.2 mg, 0.2 mmol) was rendered anhydrous by co-evaporation with dry acetone three times. To a stirring solution of the mixture in acetone (1.9 mL) was added cyanuric chloride (53.6 mg, 0.3 mmol). The resulting reaction mixture was refluxed for 5 h and then cooled down to room temperature. Then, to the stirring suspension was added 1,2,4-triazole (262.4 mg, 3.9 mmol). The resulting reaction mixture was refluxed for 1 h and then cooled down to room temperature. After being filtered by using Celite, the mixture was concentrated *in vacuo* to give crude, which was purified using flash chromatography on silica gel using a gradient from 10 to 50 % EtOAc in *n*-hexane and gave **2-12** in 73 % yield (79 mg, 0.14 mmol).

MS (ESI) calcd. for  $C_{21}H_{34}N_8NaO_6SSi^+ [M]^+$  577.1983, found 577.2000.

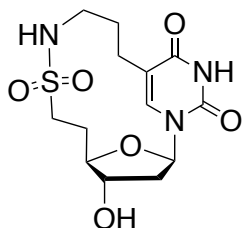
$^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8.69 (s, 1H), 8.16 (s, 1H), 7.96 (s, 1H), 7.01 (s, 1H), 6.03 (t,  $J$ = 6.7 Hz, 1H), 4.17-4.13 (m, 1H), 3.80-3.74 (m, 2H), 3.67-3.61 (m, 1H), 3.33 (t,  $J$ = 6.4 Hz, 2H), 2.45 (t,  $J$ = 7.4 Hz, 2H), 2.32-2.22 (m, 2H), 2.20-2.13 (m, 1H), 2.09-2.01 (m, 1H), 1.88-1.82 (m, 2H), 0.88 (s, 9H), 0.07 (s, 6H).  $^{13}C\{^1H\}$  NMR (101 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  162.4, 154.3, 149.4, 145.0, 136.7, 113.8, 86.2, 83.2, 74.4, 51.1, 50.4, 39.5, 27.2, 26.3, 25.5, 24.3, 17.7, -4.8, -5.1.

### Cyclonucleoside 2-13



To a stirring solution of compound **2-12** (736 mg, 1.3 mmol) in THF-H<sub>2</sub>O (13.2 mL, 10:1, v/v) was added P(*n*-Bu)<sub>3</sub> (1.6 mg, 6.6 mmol). The resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h, after which was heated to 50 °C and was stirred for 24 h. The solution was purified using flash chromatography on silica gel using a gradient from 10 to 75 % EtOAc in *n*-hexane and gain **2-13** in 35 % yield (208 mg, 0.45 mmol). MS (ESI) calcd. for C<sub>19</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>SSi<sup>-</sup> [M]<sup>-</sup> 458.1787, found 458.1774. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.39 (s, 1H), 6.57 (dd, *J* = 9.5, 6.0 Hz, 1H), 4.41 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 3.91 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 3.15-3.12 (m, 1H), 3.03-2.96 (m, 1H), 2.71-2.64 (m, 2H), 2.43-2.30 (m, 2H), 2.20 (dd, *J* = 14.3, 6.0 Hz, 1H), 2.11 (dd, *J* = 20.8, 13.9 Hz, 1H), 1.82-1.73 (m, 3H), 0.92 (s, 9H), 0.13 (d, *J* = 5.0 Hz, 6H). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 165.4, 153.0, 139.1, 113.1, 86.8, 86.6, 78.1, 45.6, 40.5, 38.5, 30.3, 26.2, 25.4, 22.8, 18.8, -4.8, -4.8.

### Cyclonucleoside 2-14



To a stirring solution of compound **2-13** (75 mg, 0.2 mmol) in THF (1.6 mL) was added Et<sub>3</sub>N (46 μL, 0.3 mmol) and Et<sub>3</sub>N·3HF (110 μL, 0.7 mmol). The resulting reaction mixture was stirred at room temperature for 24 h, after which was quenched with trimethyl ethoxysilane (135.4 μL). The solution was purified using flash chromatography on silica gel using a gradient from 0 to 15% MeOH in EtOAc and obtained the desired product **2-14** in 47 % yield (27 mg, 0.45 mmol). MS (ESI) calcd. for C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S<sup>-</sup> [M]<sup>-</sup> 344.0922, found 344.0915. <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.39 (s, 1H), 6.60 (dd, *J* = 9.2, 6.3 Hz, 1H), 4.28 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 3.92 (dd, *J* = 12.9, 2.4 Hz, 1H), 3.34-3.24 (m, 1H), 3.13-3.08 (m, 1H), 3.00-2.91 (m, 1H), 2.69-2.61 (m, 2H), 2.42-2.28 (m, 2H), 2.24 (dd, *J* = 14.5, 6.3 Hz, 1H), 2.14-2.06 (m, 1H). <sup>13</sup>C{<sup>1</sup>H} NMR (101 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 164.1, 151.6, 137.8, 111.7, 85.3, 85.0, 75.4, 44.4, 39.2, 36.4, 29.0, 24.1, 21.5.

## DFT 計算

ChemDraw を使って SMILES 環状スルホンアミド二量体の SMILES を発生させた (O=C(CCCNS1(=O)=O)=CN2[C@H]3C[C@H](O)[C@H](CC1)O3)NC2=O)。次に、RDkit (ver.2022.03.02) を用いて、ランダムな 500 コンホメーションからなる構造情報を含む sdf ファイルを作成した。まず、Chem.MolFromSmiles を用いて smiles から mol オブジェクトを作成した。次に、Chem.AddHs を用いて水素原子を追加し、AllChem.EmbedMultipleConfs を用いてランダムなコンホメーションを生成した。引数として、numConfs はコンホメーションの数、randomSeed は randomseed の設定、pruneRmsThresh はどれだけ類似した構造を除外するかなどを指定できる。本研究では、numConfs = 500、randomSeed = 1234、pruneRmsThresh = 0 でコンホメーションを生成し、Chem.SDWriter を用いて構造情報を sdf ファイルとして出力した。さらに、openbabel を使用して sdf ファイルを gjf ファイルに変換し、計算方法と結合情報を挿入した。openbabel のコマンドは、obabel -isdf (input-file).sdf -ogjf -O (output-file).gjf である。最後に gjf ファイルを用いて、各構造を Gaussian16/B01 を用いた DFT 計算により最適化した。計算条件は Opt+Freq, B3LYP/6-31G(d) in vacuo である。得られたログファイルからエネルギーを抽出した。また、openbabel を用いてログファイルを sdf ファイルに変換した。openbabel のコマンドは obabel -ilog (input-file).log -osdf -O (output-file).sdf である。各配座における二面角は sdf ファイルから抽出した。さらに、最安定構造に対して水中で再計算を行った。これらを組み合わせることで、各配座における二面角とエネルギーを算出した。エネルギーが最も小さい立体配座を最も安定な立体配座として決定し、得られた二面角から構造を解析した。また、再安定構造の CD スペクトルの予測値は TD-DFT により、B3LYP/6-31G(d) in water にて計算を行った。

## CD測定

円偏光二色性 (CD) は分光偏光度計 J725 (JASCO) で分析した。各核酸を 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) / DMSO = 95 / 5 に溶解し、石英セル (5 mm) に入れ、10 °C で測定を行った。350 nm から 200 nm までの吸光度スペクトルを、100 nm/分の速度、1nm 間隔で 8 回測定した。

## 参考文献

- 1 <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/DNA-Sequencing-Costs-Data>.
- 2 J. MacArthur, E. Bowler, M. Cerezo, L. Gil, P. Hall, E. Hastings, H. Junkins, A. McMahon, A. Milano, J. Morales, Z. MayPendlington, D. Welter, T. Burdett, L. Hindorff, P. Flicek, F. Cunningham and H. Parkinson, *Nucleic Acids Res.*, **2017**, *45*, D896–D901.
- 3 D. Marques-Coelho, L. da C. C. Iohan, A. R. Melo de Farias, A. Flaig, F. Letournel, M. L. Martin-Négrier, F. Chapon, M. Faisant, C. Godfraind, C. A. Maurage, V. Deramecourt, M. Duchesne, D. Meyronnet, N. Streichenberger, A. M. de Paula, V. Rigau, F. Vandenbos-Burel, C. Duyckaerts, D. Seilhean, S. Milin, D. C. Chiforeanu, A. Laquerrière, F. Marguet, B. Lannes, J. C. Lambert and M. R. Costa, *NPJ Aging Mech. Dis.*, **2021**, *7*, 1-15.
- 4 S. Srivastava, J. A. Love-Nichols, K. A. Dies, D. H. Ledbetter, C. L. Martin, W. K. Chung, H. V Firth, T. Frazier, R. L. Hansen, L. Prock, H. Brunner, N. Hoang, S. W. Scherer, M. Sahin and D. T. Miller, *Genet. Med.*, **2021**, *11*, 2413-2421.
- 5 D. J. Stavropoulos, D. Merico, R. Jobling, S. Bowdin, N. Monfared, B. Thiruvahindrapuram, T. Nalpathamkalam, G. Pellecchia, R. K. C. Yuen, M. J. Szego, R. Z. Hayeems, R. Z. Shaul, M. Brudno, M. Girdea, B. Frey, B. Alipanahi, S. Ahmed, R. Babul-Hirji, R. B. Porras, M. T. Carter, L. Chad, A. Chaudhry, D. Chitayat, S. J. Doust, C. Cytrynbaum, L. Dupuis, R. Ejaz, L. Fishman, A. Guerin, B. Hashemi, M. Helal, S. Hewson, M. Inbar-Feigenberg, P. Kannu, N. Karp, R. H. Kim, J. Kronick, E. Liston, H. MacDonald, S. Mercimek-Mahmutoglu, R. Mendoza-Londono, E. Nasr, G. Nimmo, N. Parkinson, N. Quercia, J. Raiman, M. Roifman, A. Schulze, A. Shugar, C. Shuman, P. Sinajon, K. Siriwardena, R. Weksberg, G. Yoon, C. Carew, R. Erickson, R. A. Leach, R. Klein, P. N. Ray, M. S. Meyn, S. W. Scherer, R. D. Cohn and C. R. Marshall, *NPJ Genom. Med.*, **2016**, *1*, 15012
- 6 A. C. Lionel, G. Costain, N. Monfared, S. Walker, M. S. Reuter, S. M. Hosseini, B. Thiruvahindrapuram, D. Merico, R. Jobling, T. Nalpathamkalam, G. Pellecchia, W. W. L. Sung, Z. Wang, P. Bikangaga, C. Boelman, M. T. Carter, D. Cordeiro, C. Cytrynbaum, S. D. Dell, P. Dhir, J. J. Dowling, E. Heon, S. Hewson, L. Hiraki, M. Inbar-Feigenberg, R. Klatt, J. Kronick, R. M. Laxer, C. Licht, H. MacDonald, S. Mercimek-Andrews, R. Mendoza-Londono, T. Piscione, R. Schneider, A. Schulze, E. Silverman, K. Siriwardena, O. C. Snead, N. Sondheimer, J. Sutherland, A. Vincent, J. D. Wasserman, R. Weksberg, C. Shuman, C. Carew, M. J. Szego, R. Z. Hayeems, R. Basran, D. J. Stavropoulos, P. N. Ray, S. Bowdin, M. S. Meyn, R. D. Cohn, S. W. Scherer and C. R. Marshall, *Genet. Med.*, **2018**, *20*, 435–443.
- 7 B. Györfy, *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, **2021**, *19*, 4101–4109.
- 8 L. Yin, C. K. L. Chau, P. C. Sham and H. C. So, *Am. J. Hum. Genet.*, **2019**, *105*, 1193–1212.
- 9 K. Dhuri, C. Bechtold, E. Quijano, H. Pham, A. Gupta, A. Vikram and R. Bahal, *Biochem.*

- Pharmacol.*, **2021**, *9*, 2004.
- 10 B. Hu, L. Zhong, Y. Weng, L. Peng, Y. Huang, Y. Zhao and X. J. Liang, *Signal Transduct. Target Ther.*, **2020**, *5*.
  - 11 H. Dana, G. Mahmoodi Chalbatani, H. Mahmoodzadeh, R. Karimloo, O. Rezaiean, A. Moradzadeh, N. Mehmandoost, F. Moazzen, A. Mazraeh, V. Marmari, M. Ebrahimi, M. Menati Rashno, S. Jan Abadi, E. Gharagouzlo and V. Marmari, *Int. J. Biomed. Sci.*, **2017**, *13*, 48-57.
  - 12 M. J. Mann and V. J. Dzau, *J. Clin. Investig.*, **2000**, *106*, 1071–1075.
  - 13 R. Morishita, J. Higaki, N. Tomita and T. Ogihara, *Circ. Res.*, **1998**, *82*, 1023-1028.
  - 14 S. T. Crooke, X. H. Liang, B. F. Baker and R. M. Crooke, *J. Biol. Chem.*, **2021**, *296*.
  - 15 S. T. Crooke, X. hai Liang, R. M. Crooke, B. F. Baker and R. S. Geary, *Biochem. Pharmacol.*, **2021**, *189*, 1-28.
  - 16 K. S. Frazier, *Toxicol. Pathol.*, **2015**, *43*, 78–89.
  - 17 F. Alhamadani, K. Zhang, R. Parikh, H. Wu, T. P. Rasmussen, R. Bahal, X. Zhong and J. E. Manautou, *Drug Metab. Dispos.*, **2022**, *51*, 1–45.
  - 18 R. Kole and A. M. Krieg, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2015**, *87*, 104–107.
  - 19 A. G. L. Douglas and M. J. A. Wood, *Mol. Cell. Neurosci.*, **2013**, *56*, 169–185.
  - 20 M. A. Havens and M. L. Hastings, *Nucleic Acids Res.*, **2016**, *44*, 6549–6563.
  - 21 B. P. Monia, E. A. Lesnik, C. Gonzalez, W. F. Lima, D. McGee, C. J. Guinasso, A. M. Kawasaki, P. D. Cook and S. M. Freier, *J. Biol. Chem.*, **1993**, *268*, 14514–14522.
  - 22 S. T. Crooke, T. A. Vickers and X. H. Liang, *Nucleic Acids Res.*, **2021**, *48*, 5235–5253.
  - 23 S. James and W. Dwight, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, **1997**, *7*, 187–195.
  - 24 P. Martin, *Helv. Chim. Acta*, **1995**, *78*, 486–504.
  - 25 M. Bege and A. Borbás, *Pharmaceuticals*, **2022**, *15*, 909.
  - 26 X. Chi, P. Gatti and T. Papoian, *Drug Discov. Today*, **2017**, *22*, 823–833.
  - 27 W. Shen, C. L. de Hoyos, M. T. Migawa, T. A. Vickers, H. Sun, A. Low, T. A. Bell, M. Rahdar, S. Mukhopadhyay, C. E. Hart, M. Bell, S. Riney, S. F. Murray, S. Greenlee, R. M. Crooke, X. hai Liang, P. P. Seth and S. T. Crooke, *Nat. Biotechnol.*, **2019**, *37*, 640–650.
  - 28 L. Zhang, T. A. Vickers, H. Sun, X. H. Liang and S. T. Crooke, *Nucleic Acids Res.*, **2021**, *49*, 2721–2739.
  - 29 T. Kasuya, S. I. Hori, A. Watanabe, M. Nakajima, Y. Gahara, M. Rokushima, T. Yanagimoto and A. Kugimiya, *Sci. Rep.*, **2016**, *6*, 1–12.
  - 30 S. A. Burel, C. E. Hart, P. Cauntay, J. Hsiao, T. Machemer, M. Katz, A. Watt, H.-H. Bui, H. Younis, M. Sabripour, S. M. Freier, G. Hung, A. Dan, T. P. Prakash, P. P. Seth, E. E. Swayze, C. F. Bennett, S. T. Crooke and S. P. Henry, *Nucleic Acids Res.*, **2015**, *44*, 2093–2109.
  - 31 Y. Hirabayashi, K. Maki, K. Kinoshita, T. Nakazawa, S. Obika, M. Naota, K. Watanabe, M.

- Suzuki, T. Arato, A. Fujisaka, O. Fueki, K. Ito and H. Onodera, *Nucleic Acid Ther.*, **2021**, *31*, 114–125.
- 32 T. Sasami, Y. Odawara, A. Ohkubo, M. Sekine and K. Seio, *Tetrahedron Lett.*, **2007**, *48*, 5325–5329.
- 33 T. Inde, Y. Masaki, A. Maruyama, Y. Ito, N. Makio, Y. Miyatake, T. Tomori, M. Sekine and K. Seio, *Org. Biomol. Chem.*, **2017**, *15*, 8371–8383.
- 34 T. Yoshida, Y. Naito, H. Yasuhara, K. Sasaki, H. Kawaji, J. Kawai, M. Naito, H. Okuda, S. Obika and T. Inoue, *Genes to Cells*, **2019**, *24*, 827–835.
- 35 P. H. Hagedorn, M. Pontoppidan, T. S. Bisgaard, M. Berrera, A. Dieckmann, M. Ebeling, M. R. Møller, H. Hudlebusch, M. L. Jensen, H. F. Hansen, T. Koch and M. Lindow, *Nucleic Acids Res.*, **2018**, *46*, 5366–5380.
- 36 P. J. Kamola, J. D. A. Kitson, G. Turner, K. Maratou, S. Eriksson, A. Panjwani, L. C. Warnock, G. A. D. Guilloux, K. Moores, E. L. Koppe, W. E. Wixted, P. A. Wilson, N. J. Gooderham, T. W. Gant, K. L. Clark, S. A. Hughes, M. R. Edbrooke and J. D. Parry, *Nucleic Acids Res.*, **2015**, *43*, 8638–8650.
- 37 P. J. Kamola, K. Maratou, P. A. Wilson, K. Rush, T. Mullaney, T. McKevitt, P. Evans, J. Ridings, P. Chowdhury, A. Roulois, A. Fairchild, S. McCawley, K. Cartwright, N. J. Gooderham, T. W. Gant, K. Moores, S. A. Hughes, M. R. Edbrooke, K. Clark and J. D. Parry, *Mol. Ther. Nucleic. Acids.*, **2017**, *8*, 383–394.
- 38 P. H. Hagedorn, R. Persson, E. D. Funder, N. Albæk, S. L. Diemer, D. J. Hansen, M. R. Møller, N. Papargyri, H. Christiansen, B. R. Hansen, H. F. Hansen, M. A. Jensen and T. Koch, *Drug Discov. Today*, **2018**, *23*, 101–114.
- 39 A. T. Watt, G. Swayze, E. E. Swayze and S. M. Freier, *Nucleic Acid Ther.*, **2020**, *30*, 215–228.
- 40 M. B. Laursen, M. M. Pakula, S. Gao, K. Fluiter, O. R. Mook, F. Baas, N. Langklær, S. L. Wengel, J. Wengel, J. Kjems and J. B. Bramsen, *Mol. Biosyst.*, **2010**, *6*, 862–870.
- 41 J. D. Watson and F. H. Crick, *Nature*, **1953**, *171*, 737–728.
- 42 A. Granzhan, N. Kotera and M. P. Teulade-Fichou, *Chem. Soc. Rev.*, **2014**, *43*, 3630–3665.
- 43 J. E. Jackman and J. D. Alfonzo, *WIREs RNA*, **2013**, *4*, 35–48.
- 44 H. Zang, Q. Fang, A. E. Pegg and F. P. Guengerich, *J. Biol. Chem.*, **2005**, *280*, 30873–30881.
- 45 A. Mazurek, M. Berardini and R. Fishel, *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 8260–8266.
- 46 C. J. Lech, J. K. Cheow Lim, J. M. Wen Lim, S. Amrane, B. Heddi and A. T. Phan, *Biophys. J.*, **2011**, *101*, 1987–1998.
- 47 E. R. Kandimalla, D. Yu, Q. Zhao and S. Agrawal, *Bioorg. Med. Chem.*, **2001**, *9*, 807–813.
- 48 T. Yoshida, K. Morihiro, Y. Naito, A. Mikami, Y. Kasahara, T. Inoue and S. Obika, *Nucleic Acids Res.*, **2022**, *50*, 7224–7234.
- 49 J. P. Rife, C. S. Cheng, P. B. Moore and S. A. Strobel, *Nucleic Acids Res.*, **1998**, *26*, 3640–

- 3644.
- 50 M. Petersen and J. Wengel, *Trends Biotechnol.*, **2003**, *21*, 74–81.
  - 51 J. R. C. Miller, E. L. Pfister, W. Liu, R. Andre, U. Träger, L. A. Kennington, K. Lo, S. Dijkstra, D. Macdonald, G. Ostroff, N. Aronin and S. J. Tabrizi, *Sci. Rep.*, **2017**, *7*, 46740.
  - 52 Ł. J. Kiełpiński, P. H. Hagedorn, M. Lindow and J. Vinther, *Nucleic Acids Res.*, **2017**, *45*, 12932–12944.
  - 53 O. V. Matveeva, A. D. Tsodikov, M. Giddings, S. M. Freier, J. R. Wyatt, A. N. Spiridonov, S. A. Shabalina, R. F. Gesteland and J. F. Atkins, *Nucleic Acids Res.*, **2000**, *28*, 2862–2865.
  - 54 M. Nowotny, S. A. Gaidamakov, R. Ghirlando, S. M. Cerritelli, R. J. Crouch and W. Yang, *Mol. Cell*, **2007**, *28*, 264–276.
  - 55 D. Honcharenko, J. Barman, O. P. Varghese and J. Chattopadhyaya, *Biochemistry*, **2007**, *46*, 5635–5646.
  - 56 M. B. Danielsen, C. Lou, J. Lisowiec-Wachnicka, A. Pasternak, P. T. Jørgensen and J. Wengel, *Chem. Eur. J.*, **2020**, *26*, 1368–1379.
  - 57 M. E. Østergaard, J. Nichols, T. A. Dwight, W. Lima, M. E. Jung, E. E. Swayze and P. P. Seth, *Mol. Ther. Nucleic Acids*, **2017**, *7*, 20–30.
  - 58 M. E. Østergaard, P. Kumar, J. Nichols, A. Watt, P. K. Sharma, P. Nielsen and P. P. Seth, *Nucleic Acid Ther.*, **2015**, *25*, 266–274.
  - 59 Y. Masaki, A. Tabira, S. Hattori, S. Wakatsuki and K. Seio, *Org. Biomol. Chem.*, **2022**, *20*, 8917–8924.
  - 60 B. A. Anderson, G. C. Freestone, A. Low, C. L. De-Hoyos, W. J. Drury, M. E. Østergaard, M. T. Migawa, M. Fazio, W. B. Wan, A. Berdeja, E. Scandalis, S. A. Burel, T. A. Vickers, S. T. Crooke, E. E. Swayze, X. Liang and P. P. Seth, *Nucleic Acids Res.*, **2021**, *49*, 9026–9041.
  - 61 L. Zhang, X. H. Liang, C. L. de Hoyos, M. Migawa, J. G. Nichols, G. Freestone, J. Tian, P. P. Seth and S. T. Crooke, *Nucleic Acid Ther.*, **2022**, *32*, 401–411.
  - 62 M. E. Østergaard, C. L. de Hoyos, W. B. Wan, W. Shen, A. Low, A. Berdeja, G. Vasquez, S. Murray, M. T. Migawa, X. H. Liang, E. E. Swayze, S. T. Crooke and P. P. Seth, *Nucleic Acids Res.*, **2020**, *48*, 1691–1700.
  - 63 M. Lindow, H. P. Vornlocher, D. Riley, D. J. Kornbrust, J. Burchard, L. O. Whiteley, J. Kamens, J. D. Thompson, S. Nochur, H. Younis, S. Bartz, J. Parry, N. Ferrari, S. P. Henry and A. A. Levin, *Nat. Biotechnol.*, **2012**, *30*, 920–923.
  - 64 E. Koller, T. M. Vincent, A. Chappell, S. De, M. Manoharan and C. F. Bennett, *Nucleic Acids Res.*, **2011**, *39*, 4795–4807.
  - 65 S. T. Crooke, S. Wang, T. A. Vickers, W. Shen and X. H. Liang, *Nat. Biotechnol.*, **2017**, *35*, 230–237.
  - 66 J. M. Glover, J. M. Leeds, T. G. K. Mant, D. Amin, D. L. Kisner, J. E. Zuckerman, R. S. Geary,

- A. A. Levin and W. R. Shanahan, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1997**, 282, 1173–1180.
- 67 S. P. Henry, G. Beattie, G. Yeh, A. Chappel, P. Giclas, A. Mortari, M. A. Jagels, D. J. Kornbrust and A. A. Levin, *Int Immunopharmacol.*, **2002**, 2, 1657-1666.
- 68 W. Shen, C. L. De Hoyos, H. Sun, T. A. Vickers, X. H. Liang and S. T. Crooke, *Nucleic Acids Res.*, **2018**, 46, 2204–2217.
- 69 G. Vasquez, M. T. Migawa, W. B. Wan, A. Low, M. Tanowitz, E. E. Swayze and P. P. Seth, *Nucleic Acid Ther.*, **2022**, 32, 40–50.
- 70 G. Vasquez, G. C. Freestone, W. B. Wan, A. Low, C. L. De Hoyos, J. Yu, T. P. Prakash, M. E. Ostergaard, X. H. Liang, S. T. Crooke, E. E. Swayze, M. T. Migawa and P. P. Seth, *Nucleic Acids Res.*, **2021**, 49, 1828–1839.
- 71 E. B. Mcelroy, R. Bandaru, J. Huang and T. S. Widlanski, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1994**, 4, 1071-1076.
- 72 R. L. David, *CRC Handb. Chem. Phys.*, **2000**, 81, 9–11.
- 73 R. Clemens, L. R. Andrew and A. B. Steven, *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 4618–4531.
- 74 大西里絵 2022年 東京工業大学修士論文
- 75 S. Obika, D. Nanbu, Y. Hari, J. Andoh, K. Morio, T. Doi and T. Imanishi, *Tetrahedron Lett.*, **1998**, 39, 5401-5404.
- 76 D. Renneberg, E. Bouliong, U. Reber, D. Schümperli and C. J. Leumann, *Nucleic Acids Res.*, **2002**, 30, 2751-2757.
- 77 T. Rajasekaran, G. C. Freestone, R. G. Murillo, B. Lugato, L. Rico, J. C. Salinas, H. Gaus, M. T. Migawa, E. E. Swayze, T. E. Cheatham, S. Hanessian, P. P. Seth, *J. Am. Chem. Soc.*, **2022**, 144, 1941-1950.
- 78 M. Sekine, O. Kurasawa, K. I. Shohda, K. Seio and T. Wada, *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 3571–3578.
- 79 V. Korotkovs, L. F. Reichenbach, C. Pescheteau, G. A. Burley and R. M. J. Liskamp, *J. Org. Chem.*, **2019**, 84, 10635–10648.
- 80 J. Huang, J. Chan, Y. Chen, C. J. Borths, K. D. Baucom, R. D. Larsen, M. M. Faul, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, 132, 3674–3675.
- 81 M. Liu, M. Ye, Y. Xue, G. Yin, D. Wang and J. Huang, *Tetrahedron Lett.*, 2016, **57**, 3137–3139.
- 82 T. Tomori, K. Uekusa, A. Koyama, T. Kanagawa, Y. Masaki and K. Seio, *Bioorg. Med. Chem.*, **2022**, 73, 117002.
- 83 Y. Yoshimura, B. A. Otter, T. Ueda and A. Matsuda, *Chem. Pharm. Bull.*, **1992**, 40, 1761-1769.
- 84 M. E. Ritchie, B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C. W. Law, W. Shi and G. K. Smyth, *Nucleic Acids Res.*, **2015**, 43, 1–13.
- 85 T. C. Roberts, R. Langer and M. J. A. Wood, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2020**, 19, 673–694.

## 講演目録

The alternation of target cleavage pattern and off-target reduction of antisense oligonucleotides incorporating modified guanine ○Takayuki Kanagawa, Aya Koyama, Yoshiaki Masaki, Kohji Seio 日本核酸医薬学会第 7 回年会

Study of the synthesis of thymidine derivative whose base and the 5' position are linked through sulfonamide backbone Takayuki Kanagawa, ○Shigetoshi Tachibana, Yoshiaki Masaki, Kohji Seio 日本化学会第 102 春季年会

## 論文目録

Alteration of target cleavage patterns and off-target reduction of antisense oligonucleotides incorporating 2-*N*-carbamoyl- or (2-pyridyl)guanine, T. Kanagawa, A. Koyoma, Y. Masaki, K. Seio, *Org. Biomol. Chem*, **2023**, 21, 5214-5224

## 謝辞

本研究に際し、終始懇切なる御指導御鞭撻を賜りました、本学生命理工学院 生命理工学コース 清尾 康志 教授に心より感謝いたします。

本研究の推進にあたり、討論をさせていただき、有用な御助言を賜りました、本学生命理工学院 生命理工学コース 正木 慶昭 助教に深く感謝いたします。

本研究を行う機会をいただき、有益な御助言を賜りました、田辺三菱製薬株式会社 竹宮 明広 氏、熊谷 新司 氏に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、*in vitro* 評価に多大な御尽力をいただきました、本学生命理工学院 生命理工学コース 小山 彩 氏、江利川 友紀 氏に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、有機合成、構造計算に関して、様々な議論を重ねるとともに、多大な御尽力をいただきました、本学生命理工学院 生命理工学コース 立花 茂載 氏に深く感謝いたします。

本研究を進めるにあたり、様々な実験の補助や試薬、オリゴの購入などサポートいただきました、大西 有希子 氏に深く感謝いたします。

学士、修士、時代に核酸医薬品研究の基礎をご指導いただきました、大阪大学 薬学研究科 小比賀 聡 教授に深く感謝いたします。

質量分析測定をしていただきました、本学生命理工学院 生命理工学コース 小泉 公人 氏に深く感謝いたします。

本研究を推進するにあたり、有益な御助言、激励を賜りました、田辺三菱製薬株式会社 村田 俊平 氏、竹川 友 氏、小笠原 彬 氏に深く感謝いたします。

産学での研究生活を両立するにあたり、研究や業務で様々なご助力をいただいた、本学生命理工学院 生命理工学コース 清尾研究室の皆様、並びに田辺三菱製薬株式会社 関係者の皆様に深く感謝いたします。

最後にこれまでの研究生活を支えていただきました、家族に深く感謝いたします。