

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	核酸医薬開発を指向した新規修飾核酸の合成研究
Title(English)	
著者(和文)	西澤周平
Author(English)	Shuuhei Nishizawa
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11897号, 授与年月日:2021年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:大窪 章寛,湯浅 英哉,清尾 康志,秦 猛志,,小倉 俊一郎
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11897号, Conferred date:2021/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース
学生氏名： Student's Name	西澤 周平	

申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 (理学) Doctor of
指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	大窪 章寛 准教授
指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)	

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

生物の遺伝子情報はゲノム DNA に保存されており、DNA の塩基配列情報が mRNA に転写され、mRNA から体組織を形成するタンパク質へ翻訳される。正確に遺伝情報が伝達されることで生命活動の維持がされるものの、遺伝子情報にエラーが入ることで病気を引き起こすタンパク質が発現し、遺伝子疾患を発症する。これに対して、核酸医薬品は人工合成した核酸分子を用いて遺伝子発現制御ができるため、遺伝子疾患に対して効率的に治療効果を示すことができる。例えば、アンチセンス核酸や siRNA は特異的に標的 mRNA に結合することで翻訳過程を阻害する。また、三重鎖形成核酸(TFO)はゲノム DNA に結合し転写過程を阻害する。このように遺伝子発現を制御できる核酸医薬品は様々な開発されてきた。さらに、近年核酸化学の研究が進み、遺伝子発現制御だけでなく、標的分子に特異的に結合できる抗体のような機能を持つ核酸アプタマーや自然免疫を惹起できる核酸アジュバントなどが開発されてきており、核酸分子を利用した治療法は多岐にわたる可能性が示されている。しかし、核酸医薬品は生体内安定性や標的分子への選択的な結合能力、薬剤毒性、ドラッグデリバリーシステム(DDS)に課題があり、未だ医薬品承認されている例は少ない。本論文では新しい核酸医薬品創出及び化学修飾による核酸医薬品の課題解決を目指した開発研究を行った。

第一章では、TFO の課題解決のために新規化学修飾を有するアンチパラレル型 TFO の研究開発を行なった。アンチジーン法は、TFO を用いてゲノム二重鎖 DNA に結合し mRNA への転写を阻害する機構で遺伝子発現制御を行う。医薬品応用を目標に研究されているものの、現状承認された核酸医薬品のほとんどがアンチセンス核酸、siRNA である。この原因は天然核酸で構成された TFO では結合できる配列が A-T または G-C などのホモプリン-ホモピリミジン塩基配列しか結合できないからである。この配列制限が、TFO の医薬品応用の障壁となっている。そこで、本章ではアンチパラレル型 TFO における認識配列の拡張を目指し、T-A 塩基対を認識できるキノリン誘導体を有するアンチパラレル型 TFO の開発研究をおこなった。新しく開発した ${}^6\text{DAQ}_{\text{Ac}}$ は T-A 塩基対と優先的に結合するだけでなく、他の修飾塩基と併用することも明らかになり、アンチパラレル型 TFO によるアンチジーン法に応用できる可能性を示した。

第二章では新たな核酸医薬品候補となりうる U1 snRNA 誘導体の合成法開発研究を行なった。U1 snRNA はスプライスサイトに結合しスプライシングの初期段階を触媒する重要な役割を担う分子である。この特性を活かして、遺伝子変異により引き起こされるスプライシングエラーに対して、変異に合わせた修飾 U1 snRNA を用いて正しくスプライシングさせる遺伝子治療が期待できる。また、U1 snRNA の結合が Pre-mRNA のポリアデニル化を阻害する役割を持つことが発見されており、この手法も新しい遺伝子制御法として期待できる。さらに、U1 snRNA が

A549 細胞のエンドソーム内の Toll-like receptor3 を活性化し免疫調節できることが報告されている。この知見から、抗原提示細胞の自然免疫を活性化できれば、U1 snRNA は免疫賦活剤としても期待できる。しかし、U1 snRNA を医薬品へ応用するためには生体内安定性向上等の化学修飾導入や大量合成を行う必要があるが、U1 snRNA は 164 塩基の長鎖 RNA である事と 5'末端にトリリン酸結合を介しトリメチルグアノシンキャップ構造を有するため化学合成が難しい。そこで、本章では複数の RNA 断片から U1 snRNA 誘導体の合成検討を行なった。また、合成した U1 snRNA 誘導体を用いて免疫応答の評価を行なった。

第三章では核酸医薬品全般における DDS の問題点に注目し、それらを改善できるような化学修飾を設計した。核酸分子は生体中の核酸分解酵素により速やかに分解されてしまう。さらに、多くのリン酸部を有するため負に帯電している事で細胞膜のリン脂質と負電荷反発を引き起こし細胞内に取り込まれにくい。そこで、これらの課題を解決すべく、核酸分解酵素により分解されず、生体内で機能できる構造体としてアシル基を 5'、3'末端に導入し、リンカーを介して環化したオリゴヌクレオチドを合成し、DDS の問題点を改善できる可能性を検討した。設計したアシル基を有するオリゴヌクレオチドの環状化は、ジスルフィド結合形成によって成し遂げた。合成した環化したオリゴヌクレオチドの血清安定性評価を行なった結果、天然型オリゴヌクレオチドと比較して約 100 倍以上の耐性を有することがわかった。また、細胞内において天然型オリゴヌクレオチドへ変換できるかを検証するために *in vitro* でのエステラーゼ分解評価を行なった結果、還元条件により開環後、天然型オリゴヌクレオチドに変化することがわかった。さらに、細胞取り込み能力を評価した結果、未修飾の核酸と比較して、低量のトランスフェクション試薬で細胞取り込みできることがわかったことから、DDS の問題点を改善できる可能性を見出した。

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

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

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

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	西澤 周平		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	大窪 章寛 准教授	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Nucleic acid drugs with chemical modification are useful for new gene therapy based on various mechanisms such as gene regulation and immune response. However, nucleic acid drugs have problems with *in vivo* stability, binding affinity, side effects, and drug delivery system (DDS). In this study, I designed and synthesized artificial oligonucleotides to overcome these problems.

In chapter 1, I described synthesis of chemically modified triplex-forming oligonucleotides (TFOs) that can bind to the major groove of DNA duplex without sequence dependent and inhibit the targeted gene expression, because the binding sites of unmodified TFOs are only homopurine sequences. I developed the modified antiparallel TFOs containing quinoline derivatives as nucleobases(⁶DAQ_{Ac}), for improvement of sequence-dependencies. It was revealed that the TFOs containing ⁶DAQ_{Ac} can bind to T-A base pair most stably compared to other base pairs.

In chapter 2, I focused on the chemical synthesis of U1 snRNA which is the important molecules involved in the splicing reactions. U1 snRNA is a useful molecule for downregulation of gene expression and splicing regulation for gene therapy. Addition to this, U1 snRNA is expected as new RNA adjuvant based on the previous reports. However, there are few reports on chemical synthesis of U1 snRNA. In chapter 2, I described the chemical synthesis of U1 snRNA analogs containing 2,2,7-*N*-trimethylguanosine (m₃^{2,2,7}G) cap derivatives by ligation using T4 DNA ligase in the presence of splint DNA. Moreover, I observed the immune response properties of these U1 snRNA analogs.

In chapter 3, I developed new DDS for nucleic acid drugs. Nucleic acid drugs have two drawbacks: low permeability and low nuclease resistance. In order to improve these problems, I designed and synthesized the cyclic oligonucleotide containing acyl groups in 5'- and 3'- terminal sites. It was found that this cyclic oligonucleotide improved serum stability. Further, I also reported the binding regulation by changing the chemical structure, and the cell introduction by using lipofectamine.

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

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

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

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).