

核酸医薬品の高機能化を目指した化学的アプローチ



企業レポート

関 口 光 明*

Chemical strategy to improve pharmacological properties
of oligonucleotide therapeutics

Key Words : Oligonucleotide therapeutics, Antisense, TrNA, Ligand conjugate

1. はじめに

医薬品の歴史を振り返ってみると、1960年代から1990年代にかけては、感染症あるいは高血圧や糖尿病などの生活習慣病に対する低分子医薬の開発が中心であった。2000年代に入ると、タンパク質工学の発展に伴い、癌や自己免疫疾患を対象にした抗体医薬に創薬研究の軸が移ってきており、2016年のブロックバスター（年間売上高10億ドル超）上位トップ10のうち、抗体医薬が8品目を占めている。これまでの医薬品の標的は、細胞内の酵素、細胞膜上の受容体あるいは細胞内のシグナル伝達を司るタンパク質間相互作用であるが、年々創薬研究の難易度が高まっており、対応できる標的分子が枯渇してきているなど課題が見えつつある。一方で、核酸化学や細胞工学の進展により、核酸医薬や細胞治療薬のような新しい医薬品モダリティが登場してきている。

核酸医薬は、低分子医薬や抗体医薬がアクセスできない細胞内遺伝子やその転写産物も創薬ターゲットにできる特徴を有しており、標的遺伝子に対して配列特異的に作用することから遺伝情報に基づく迅速な分子設計が可能である。加えて、核酸医薬の基本骨格や化学修飾が薬理活性や動態、安全性に及ぼす影響を把握することが可能となれば、従来の低分子医薬より開発期間が短縮された効率の良い創薬を

行うことができると期待される。

本稿では、核酸医薬の実用化に向けた主な課題である「結合親和性と代謝安定性の改善」と「標的臓器への効率的送達」に対する弊社の取り組みの一部を紹介する。

2. アンチセンス核酸の医薬品特性を改善する 新規架橋型核酸の創製

核酸医薬の一つであるアンチセンス核酸は、疾病の原因となる遺伝子の mRNA に対して、配列特異的に結合することで二重鎖を形成する。この二重鎖形成により、翻訳阻害や mRNA の切断誘導が引き起こされ、機能性タンパク質への翻訳が阻害されることにより薬効を発揮する。しかし、DNA や RNA の天然型核酸をアンチセンス核酸として用いた場合、標的 mRNA に対して細胞内に存在する核酸と競合するため十分な結合親和性が得られないだけでなく、核酸分解酵素による代謝を受けてしまうために薬効が期待できない。1990年代後半に大阪大学の今西、小比賀らによって、架橋構造により核酸の糖部フラノース環構造の揺らぎを固定化した架橋型人工核酸 (Bridged Nucleic Acid, BNA) が開発され、RNA 鎖に対する高い結合親和性と生体内酵素に対する安定性を両立できる優れた核酸誘導体であることが報告された¹⁾。これを契機に、アンチセンス医薬の実用化に向けた架橋型核酸の合成研究が盛んになってきている。

これまでに報告されている架橋型核酸の特性を調査していると、架橋構造が形成する環サイズが大きくなるにつれ代謝安定性が増していく一方で、RNA 鎖に対する結合親和性は低下傾向にあることが分かった。また、環構造にヘテロ原子が適切に配置されることで、水和ネットワークを介して二重鎖構造を安定化することも報告されている。そこで弊



* Mitsuki SEKIGUCHI

1977年12月生まれ
大阪大学大学院 薬学研究科 博士後期
課程修了 (2005年)
現在、塩野義製薬株式会社
医薬研究本部 創薬化学研究所 中分子
創薬部門 主幹研究員 博士(薬学)
有機化学 核酸化学
TEL : 06-6331-5409
FAX : 06-6332-6385
E-mail : mitsuki.sekiguchi@shionogi.co.jp

社では、架橋構造にトリアゾール骨格を導入した3環性縮環型の核酸誘導体 (Triazole Bridged Nucleic Acid, TrNA) の開発に着手した²⁾ (図1)。この構造は、小さい架橋サイズを維持しているためRNA鎖への結合親和性が向上し、ヘテロ環による大きな立体障害のため代謝安定性が高まる。さらにヘテロ環構造により脂溶性が増加するため、これまでの架橋型核酸とは異なる特性を示すことが期待できると考えた。

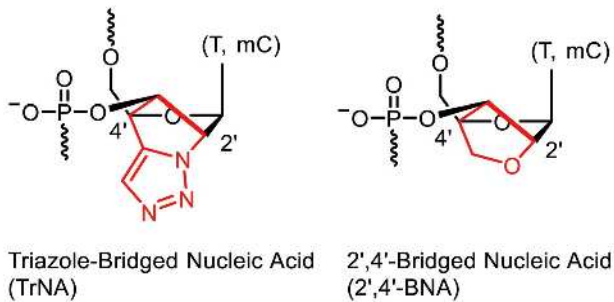


図1. 架橋型核酸誘導体の構造

紙面の都合上、詳細な合成および機能評価は割愛させていただくが、TrNAの架橋構造は糖部4'位に予めトリアゾール環を構築した後に、2'位への分子内求核置換反応を経ることで構築している。また、TrNAを導入したアンチセンス核酸の相補的な配列に対する結合親和性を評価したところ、DNA鎖に対して結合親和性が低下するものの、相補鎖RNAに対しては安定な二重鎖を形成した。さらに導入数を増加させることで、RNA選択性が向上していくことも明らかにした。加えて、TrNA誘導体そのものは核酸分解酵素の基質になりにくく、代謝安定性

を飛躍的に向上させる性質があることも明らかにした。そこでTrNAを有するアンチセンス核酸を合成して、健常マウスの肝臓移行量と肝臓中の標的遺伝子の発現抑制 (Knockdown, KD) 評価を実施した。図2に示すように、架橋型核酸として最初に報告された2',4'-BNAアンチセンスと同程度の遺伝子KD効果を示す一方で、肝臓への移行量は約3倍上昇していることが示された。このように、架橋構造を変換したTrNAは、アンチセンス核酸の体内動態を変化させることができ、医薬品として優れた特性を付与できることを明らかにした。

3. アンチセンス核酸のリガンド結合部位の拡張

優れたアンチセンス医薬を創製していくには、標的 mRNA への結合親和性と生体内の代謝安定性の改善のみならず、標的遺伝子が存在する臓器/組織へ効率よく送達する技術開発も重要となってくる。送達効率を改善する方法として、標的指向性をもつ低分子 (リガンド分子) を結合させる方法がある³⁾。例えば、体内に豊富に存在する脂質の一種であるコレステロール (Chol) をアンチセンス核酸と結合させることで、肝臓への集積量が向上することは多く報告されている。リガンド分子の導入位置は、アンチセンス核酸が鎖状の構造をしているために、合成面を考慮して5'末端あるいは3'末端が多用されている。しかし、その導入位置および数を拡張することが出来れば、複数のリガンド分子の組み合わせによる送達効率の改善あるいは物性変化に伴う動態変化が期待でき、アンチセンス核酸に医薬品としてより良い特性を付与できる可能性があると考えた。

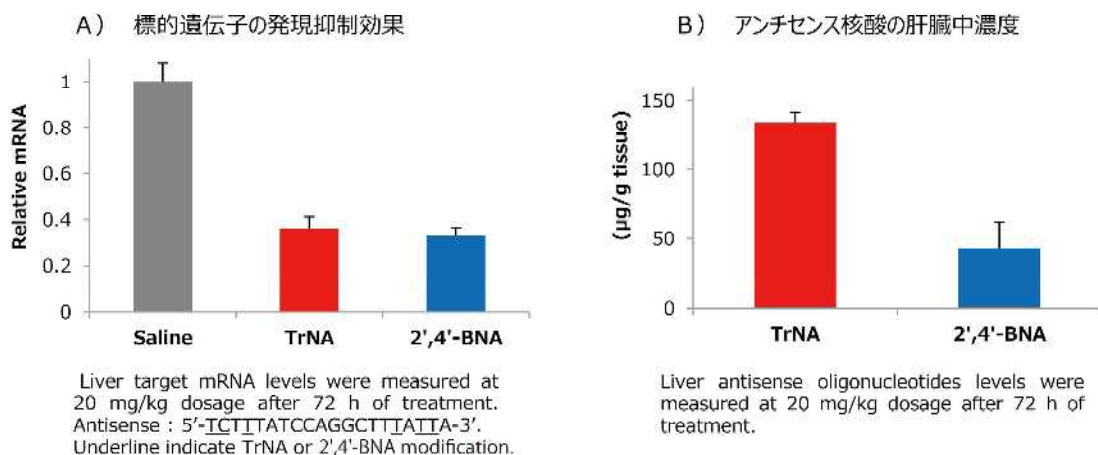


図2. 各アンチセンス核酸の in vivo 評価

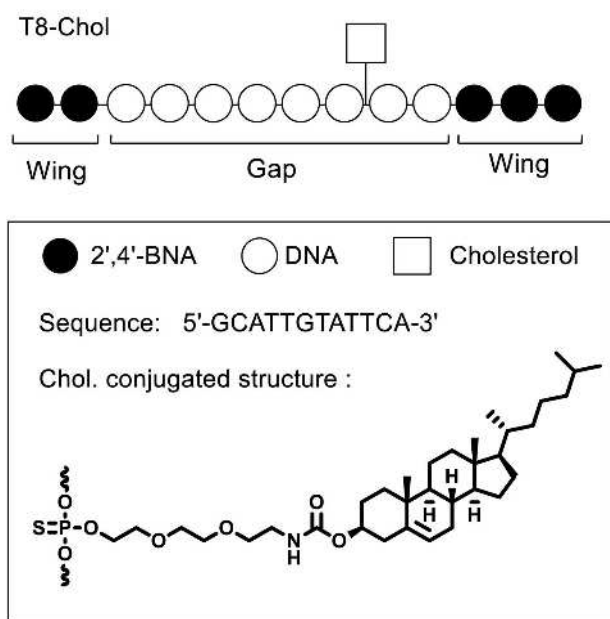
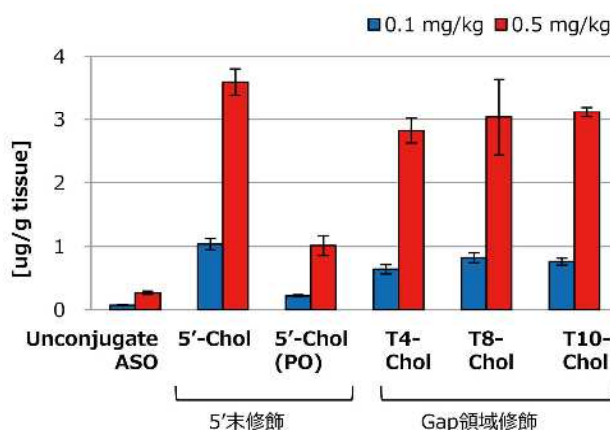


図3. Gap領域にコレステロールを結合したアンチセンス核酸

一般的にアンチセンス核酸は Gapmer 設計が用いられる。図3上に示すように、前節で述べた核酸誘導体を配置した wing 領域と DNA が連続する Gap 領域から成る。そこで、弊社では Gap 領域に着目して、各 DNA が連結するリン酸ジエステル部位への Chol 体の導入とそれらアンチセンス核酸の動態変化並びに遺伝子 KD 効果について検証を行った⁴⁾。概略を図3に示すが、DNA アミダイト体合成に1ステップ加えることで、Chol 体を予め結合させたチミンアミダイト体を調製して、固相合成により Gap 領域の導入位置の異なる複数の Chol-アンチセンス核酸を合成した(例:T8-Cholは5'末から8番目へのChol導入を表している)。図4に、健常マウスに静脈投与した後の各アンチセンス核酸の肝臓集積量の変化を示した。Gap領域にChol体を有するアンチセンス核酸群は、一般的に用いられている5'末端Chol体と同様に、Cholを持たないアンチセンス核酸と比較して10倍以上の集積量向上が認められた。この結果は、アンチセンス核酸のリガンド修飾がGap領域にも展開可能であることを示しており、化学修飾の幅を広げることができると考えている。しかしながら、詳細は割愛するが、このときの遺伝子KD効果は5'-Chol(PO)体のみが高いKD効果を示す結果となった。これは、Chol(PO)体が細胞内で代謝を受けやすいリン酸エステル結合である一方、他のChol体は代謝を受けにくいリン酸チオエ



Liver antisense oligonucleotides levels were measured at 0.1 and 0.5 mg/kg dosage after 3days of treatment.

図4. コレステロール結合アンチセンス核酸の肝臓中濃度

ステルで結合していることが原因であると考えている。この研究を通して、アンチセンス核酸の送達効率と遺伝子KD効果を両立するためには、リガンド分子をアンチセンス核酸本体から切り離すことができる構造設計が重要であると考えている。

4. おわりに

2013年にアンチセンス医薬(KYNAMRO[®])が米国において3番目の核酸医薬品として承認されたことを契機に、ここ2、3年は毎年1~2品目のペースで承認され、これまでに8品目が上市に至っている。日本でも昨年アンチセンス医薬品(SPINRAZA[®])が承認され、また複数の開発品が臨床段階にあるなど、核酸医薬は確実に次世代医薬品としての道を進んでいる。その背景には、核酸医薬が適応可能な疾患への解明と理解が進むとともに、核酸化合物を医薬品として捉えた場合の課題である「結合親和性と代謝安定性」と「標的臓器への効率的送達」に対して、化学的アプローチによる地道な改良研究の進展がある。この領域はまさに製薬企業が得意とするところである。弊社においても、低分子医薬開発で培った化学合成力と評価アセットの技術基盤を利用することで、低分子医薬に続く創薬プラットフォーム構築を目指して、アカデミアからの技術導入と社内独自の核酸創薬研究を積極的に進めている。

参考文献

- 1) S Obika, D Nanbu, Y Hari, K Morio, Y In, T Ishida and T Imanishi, *Tetrahedron Lett.*, **1997**,

- 38, 8735-8738.
- 2) Y Mitsuoka, T Yamamoto, A Kugimiya, R Waki, F Wada, S Tahara, M Sawamura, M Noda, Y Fujimura, Y Kato, Y Hari and S Obika, *J. Org. Chem.*, **2017**, 82, 12-24.
- 3) K Craig, M Abrams and M Amiji, *Expert Opinion on Drug Delivery*, **2018**, 15, 629-640.
- 4) M Nakajima, T Kasuya, S Yokota, R Onishi, T Ikehara, A Kugimiya and A Watanabe, *Nucleic Acid Ther.*, **2017**, 27, 232-237.

