

DDS を指向した樹状型核酸の構築

柴田 綾*

Development of Dendritic Nucleic Acids for Nucleic Acid Delivery

Aya SHIBATA*

Recently, nucleic acid medicines have been attracting attention because they can target molecules that traditional small molecule medicines could not deal with. However, nucleic acid medicines have problems such as low cell selectivity. Therefore, drug delivery systems (DDS) are being developed for efficient delivery of nucleic acids to target cells. In this study, we aimed to construct a dendritic nucleic acid with multiple sugar molecules displayed on its surface for the purpose to improve intracellular permeability. We synthesized an azido-modified branched linker, and confirmed that it is possible to synthesize a triantennary oligonucleotide using it.

1. 研究の背景と目的

近年では核酸を利用した医薬品である核酸医薬が注目を集め盛んに研究が行われている¹。siRNA やアンチセンス核酸、アプタマーなどに代表される核酸医薬は、従来の医薬品である低分子医薬品や抗体医薬品では標的とすることのできない mRNA や miRNA など創薬ターゲットとすることが可能であるため、次世代の医薬品として大きな期待が寄せられている。しかしながら、核酸医薬品は高分子かつ負電荷を有する特性から細胞膜透過性が低いという課題を抱えていた。そのため、核酸に優れた細胞選択性や細胞膜透過性を付与するドラッグデリバリーシステム (DDS) 技術の開発が求められている。これらの問題を解決する手法の一つとして、細胞膜表面に発現している受容体が認識する機能性分子を利用する方法がある。特に、細胞膜表面に発現している受容体には糖分子を特異的に認識するものが多くあり、核酸に糖類を修飾することによる DDS が積極的に研究されている。実際に日本で上市されている核酸医薬品の Givlaari は *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) が修飾されており、アシアロ糖タンパク質受容体 (ASGPR) を介して肝臓選択的に送達される²。しかしながら、細胞膜上に存在する受容体は糖との結合様式を含め未だ不明な点が多く、GalNAc-ASGPR の組み合わせに続く有用な糖修飾は見つかっていない。

我々の研究室ではクリック反応を用いて、RNA に様々な糖分子修飾を施した糖修飾 RNA ライブラリーの構築に成功しており、複数のがん細胞に対し構築した糖修飾 RNA ライブラリーを用いて核酸の導入のスクリーニングを行っている。結果、乳がん細胞である MCF7 細胞において、グルコース修飾 siRNA が核酸導入試薬なしで細胞内に導入され遺伝子発現抑制を示すことを見出した。しかし、この糖修飾ライブラリーの研究では 1 分子の糖に 1 分子の RNA を修飾していたため受容体との結合力が弱く、核酸の細胞内への導入量に課題が残った。そこで、この課題を克服するため受容体のクラスター効果とデンドリマー構造に着目し、樹状型核酸を構築しその末端に多数の糖分子を提示することによる受容体相互作用と細胞膜透過性の改善を試みることにした(図 1)。

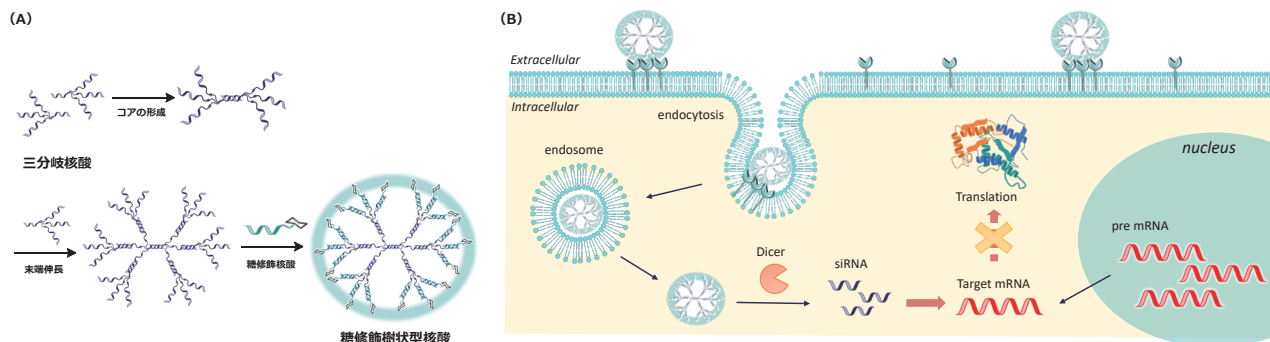


図 1 (A) 三分岐核酸からの糖修飾樹状核酸の構築, (B) 樹状型核酸による RNA 干渉.

2023年3月3日 受理

* 豊田理研スカラー

岐阜大学工学部化学・生命工学科

2. 三分岐アジドリンカーの合成

三分岐核酸の合成は、デンドリマーコアとなるオリゴヌクレオチドに人工分子である三分岐アジドリンカーを修飾し、クリック反応によりリンカー末端をオリゴヌクレオチドで伸長することで行う。そこで、まず初めに三分岐アジドリンカーの合成を行った(図2)。

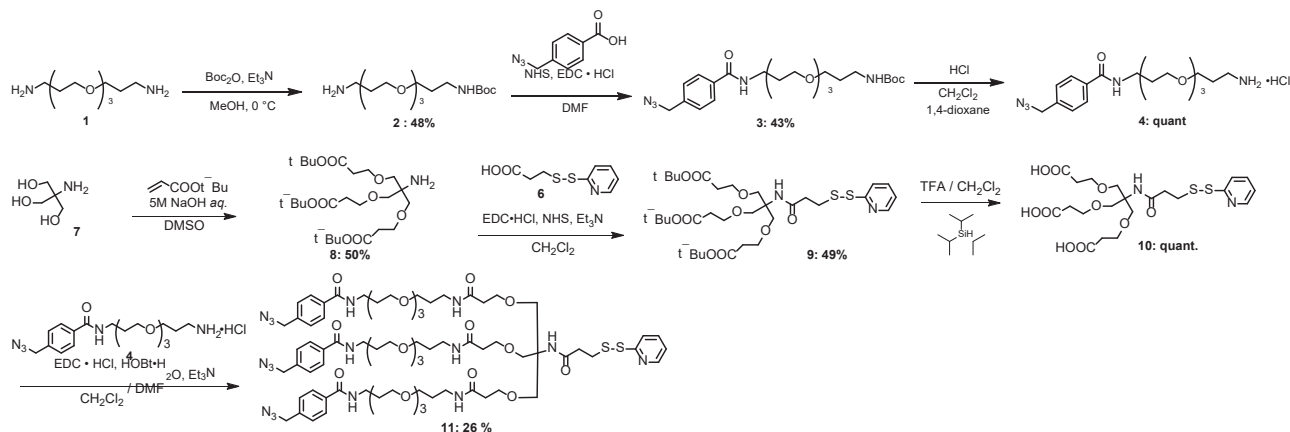


図2 三分岐アジドリンカーの合成.

化合物 **1** を出発物質として、Boc 保護反応を行うことで化合物 **2** を 48% で得た。次に、化合物 **2** に p -アジドメチル安息香酸を縮合付加させることで化合物 **3** を 43% で得た。この化合物 **4** を 4 M HCl / 1,4-dioxane で処理することで脱 Boc 保護を行い、化合物 **4** を定量的に得た。次に、化合物 **7** を出発物質としてアクリル酸 t -Bu と反応させることで化合物 **8** を 50% で得た。この化合物 **8** と化合物 **6** を縮合することで化合物 **9** を収率 49% で得た。化合物 **9** を TFA/ CH_2Cl_2 混合溶液で処理し t -Bu 基を除去した中間体 **10** を定量的に得た後に、化合物 **10** と化合物 **4** を縮合させることで、最終目的化合物である三分岐アジドリンカー(化合物 **11**)を収率 26% で得た。

3. 三分岐アジドリンカーとエチニル修飾 RNA との Click 反応

合成したリンカー**11**とエチニル基を修飾した RNA (25 mer) を用いて、三分岐核酸を合成するための一段階目の反応であるクリック反応を試みた。クリック反応では 1 等量のリンカー**11** に対して 5 等量の RNA を反応させ、反応後はエタノール沈殿により得られた核酸をキャピラリー電気泳動にて分析した。分析の結果、エチニル修飾 RNA のみのコントロール(図3下段)と比較して、反応物には原料である 25 mer のピークの他に予測サイズ 50 と 75 mer 付近に新たなピークが確認された(図3上段)。リンカー末端に三つの RNA が修飾された目的物である 75 mer のピークがみられることから、反応の進行が確認できた。しかしながら、メインピークは原料もしくはリンカー分子と 1 : 1 で結合したものであることから反応条件のさらなる検討が必須である。

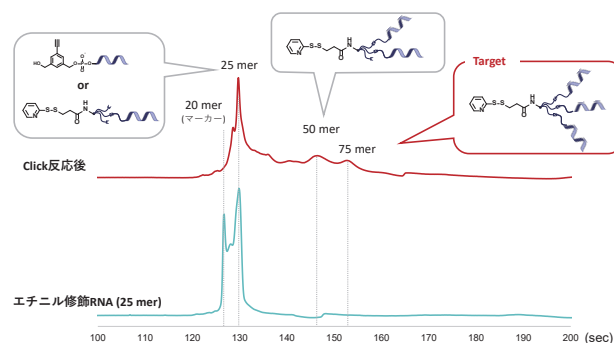


図3 キャピラリー電気泳動の解析結果.

4. 結語

樹状型核酸の構成単位である三分岐核酸を合成するために必要な三分岐アジドリンカーを合成した。また、反応条件のさらなる検討は必要であるものの、この分子とエチニル修飾 RNA と Click 反応により三分岐核酸の構築を確認することができた。樹状型核酸による多価の糖分子の提示は、課題となっていた受容体との親和性の大きな改善が期待される。

REFERENCES

- 1) A. Khvorova and J. K. Watts, *Nat. Biotechnol.*, **35** (2017) 238-248.
- 2) J. K. Nair, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **136** (2014) 16958-16961.
- 3) R. Horikawa, *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **55** (2016) 13023-13027.