

THE CHEMICAL TIMES

2023 No.3 (通巻269号)
ISSN 0285-2446

特集 | 核酸医薬

02 Blockmer[®]を中間体とするオリゴヌクレオチドの合成

株式会社ナティアス 代表取締役、
国立大学法人 神戸大学大学院 科学技術イノベーション研究科 客員教授 片岡 正典

09 核酸集合技術とそれを利用した創薬研究

東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 教授 岡本 晃充
東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 助教 森廣 邦彦

14 個別化医療に向けたオリゴ核酸の可能性

国立研究開発法人 産業技術総合研究所バイオメディカル部門 上級主任研究員 間世田 英明

19 ゲノム由来オリゴDNAによる細胞分化制御

信州大学大学院 総合医理工学研究科 准教授 高谷 智英



KANTO CHEMICAL CO., INC.

Blockmer[®]を中間体とする オリゴヌクレオチドの合成

Synthesis of Oligonucleotides Using Blockmer[®] as an Intermediate

片岡 正典
Masanori Kataoka

株式会社ナティアス 代表取締役、
国立大学法人 神戸大学大学院 科学技術イノベーション研究科(客員教授)
Chief Executive Officer, NATIAS Inc.
Graduate School of Science, Technology and Innovation, Kobe University(Research Visiting Professor)

KEYWORD ▶ oligonucleotide APIs chemical synthesis block elongation

はじめに

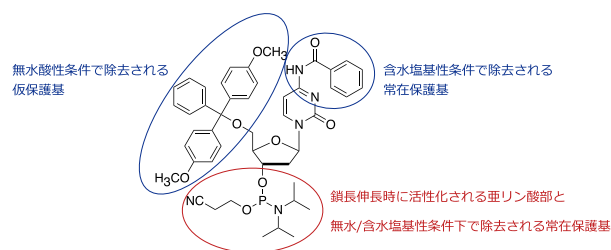
01

COVID-19の感染拡大による社会の変化により核酸の重要性が大きく増している。mRNAワクチンは最も有効なワクチンとして、real-timePCRやLamp法による遺伝子検査は信頼性の高い感染診断法として、ヌクレオチドアナログ薬はウイルス性疾患に対する最も効果の高い治療薬として、COVID-19の感染拡大の抑制に貢献し、with/postコロナ社会においても引き続き核酸の需要が伸びると予想されている。

ところで、mRNAのような数千塩基長の長鎖核酸の場合は酵素法で合成されるが、数十から百塩基程度のオリゴヌクレオチドは化学合成法で合成される。オリゴヌクレオチドは、核酸医薬品やPCR用プライマー/プローブ、コンパニオン薬、ゲノム編集用 guide RNA、核酸系アジュバントなどその応用範囲が広く、大きな市場を形成している。

オリゴヌクレオチドの化学合成においては、ヌクレオチド 3'-ホスホロアミダイトモノマーと呼ばれるモノヌクレオチドをビルディングブロックとして、任意の配列を自動合成装置に入力することで合成される。モノヌクレオチドをビルディングブロックとする合成法は1976年にLetsinger博士によるホスファイト法の発表¹⁾に端を発し、1981年にCaruthers博士がホスホロアミダイト法²⁾に発展させ、1984年にKöster博士がホスホロアミダイト原料の保護基をDMTr基、2-シアノエチル基、アシル基とすることで再現性良く核酸を合成できることを示し³⁾、ビルディングブロックの構造が固定された(図1)。現在では3'、5'両末端への官能基の導入や核酸塩基部やリボース部の化学修飾にも対応したホスホロアミダイトモノマーが市販されており、複雑な構造のオリゴヌクレオチドの合成も可能となっている。

しかし、オリゴヌクレオチドの用途の拡大によりこれまで利用されてきたオリゴヌクレオチド合成法の課題が顕在化し、核酸市場の発展におけるボトルネックとなっている。本稿ではナティアスのオリゴヌクレオチド合成技術開発の取り組みについて紹介したい。



チミジン 3'-ホスホロアミダイトモノマー

図1 構築単位(アミダイトモノマー)

Blockmer[®]の開発

02

オリゴヌクレオチドの製造上の課題は以下の通りであり、製造産業におけるQCDS(品質、コスト、納期、スケーラビリティ)全てにおいて顕在化している⁴⁾。

- (1) 多段階合成による多様な不純物の蓄積と不完全な除去
- (2) 原料・反応剤・溶媒の過剰使用、大量の廃棄物
- (3) バッチスケールの限界

上記問題を解決するための手段として複数のモノヌクレオチドが連結したものを原料/中間体とする手法がある。ペプチド合成においてはセグメント縮合法として知られ、核酸製造においてはKhoranaらによる初期のオリゴヌクレオチド合成において採用されていた⁵⁾。しかし、煩雑な操作と低い収率によりほとんど実用化に至らず、前述のように現在ではモノヌクレオチドを構築単位とする合成法でほとんどのオリゴヌクレオチドが合成されている。

オリゴヌクレオチド合成において実用化されている数量体ヌクレオチド中間体としては、三量体の構築単位が知られ⁶⁾、コドンに対応した29種の三量体中間体とその混合物が市販されている

(図2)。リン酸部の保護基をクロロフェニル基とすることで化学的に安定な三量体を完成させているが煩雑な操作の問題は完全に解決しておらず、ホスホロアミダイトモノマーと比べて非常に高価なため、使用者としては大量に購入することが難しい。

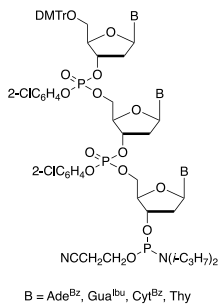


図2 コドンに対応した三量体原料

同様に、二量体中間体の市販が始まっているが、製造工程が煩雑であり、2-シアノエチル保護基は5価のリン酸エステルの中で不安定なことから、オリゴヌクレオチドの原料として求められる純度98%の二量体中間体は入手が困難であり、提供される配列も限定される(図3)。オリゴヌクレオチドの内製を目的とした数量体ヌクレオチド中間体の論文もあるが⁷⁾、いずれも不安定な2-シアノエチルホスフェート構造に基づいて設計されるため、煩雑な操作と純度の問題が解決していない。

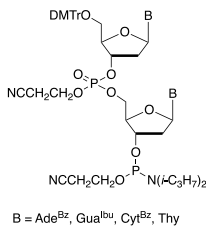


図3 2-シアノエチルホスフェート型二量体原料

一方で、ナティアスが製造する数量体ヌクレオチド中間体はBlockmer[®]という商品名で2-8量体が数mgから数百gまで様々なスケールで販売されている^{8, 9)}。Blockmer[®]は化学的に安定な構造を有しており、主に固相合成での利用を想定したリン酸部が三価の亜リン酸エステルで構成される2-シアノエチルホスファイト型、主に液相合成での利用を想定してアリル保護基を採用するアリルホスフェート型、立体制御されたホスホロチオエートオリゴヌクレオチド合成の原料となる光学活性型や加熱によって除去される熱除去型まで、用途に応じてBlockmer[®]の構造を選択できる(図4)。

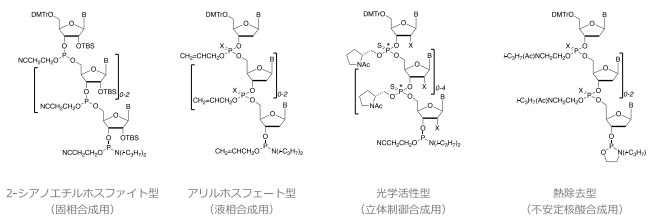


図4 ナティアス社から市販されるBlockmer[®]原料

CE-Blockmer[®]の固相法での利用

03

2-シアノエチルホスファイト型のBlockmer[®](CE-Blockmer[®])は固相法を採用する自動合成装置の利用を想定して開発された。リン酸部の保護基として広く利用される2-シアノエチル基は、前述の通りリン酸エステル中では容易に遊離し、三量体の0.05 mol/Lアセトニトリル溶液での半減期は約1日であることから自動合成装置での使用は制限される。一方、ナティアスのCE-Blockmer[®]はより安定なホスファイトを採用し、0.05 mol/Lアセトニトリル溶液での半減期は約7日であることから、百量体を越える中鎖オリゴヌクレオチド合成など、長時間を要する合成や合成スケジュールの変更など柔軟に対応できる¹⁰⁾。アモルファス状態の三量体CE-Blockmer[®]は-30℃で2年以上酸化/分解することなく保管できる。二量体、三量体の天然型リボヌクレオチド(DNA, RNA)のほか、種々の修飾ヌクレオチド(2'-OMe, 2'-OMOE, 2'-F, LNA)の供給が可能となっている。

CE-Blockmer[®]の合成は核酸塩基がアシル基で保護された5'-O-DMTrヌクレオチドを原料とし、リン酸化剤により系中でホスホロアミダイトモノマーに変換した後、系中で3'-O-アシルヌクレオチド¹¹⁾と反応させることによりヌクレオチド二量体を得る。弱塩基性条件下でアシル基を除去した後、再生された3'-水酸基をリン酸化剤によりホスホロアミダイトとし、同様の操作を繰り返すことにより三~五量体のホスホロアミダイトに変換する。必要に応じて順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーをおこない、純度98%以上のCE-Blockmer[®]を得る(図5)。5'-水酸基の保護基をシリル系保護基とした原料を使用することで、5'-水酸基を鎖長伸長前に再生可能となる。これによって得られる5'-OH Blockmer[®]とCE-Blockmer[®]と反応させることにより四~十量体のCE-Blockmer[®]を合成することも可能である。全工程を液相中でおこない、都度順相シリカゲルカラムクロマトグラフィー

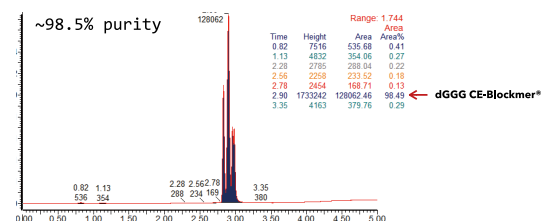


図5 CE-Blockmer[®]原料

を使用して精製する。ホスホロアミダイト化したBlockmer®の精製においては関東化学社等から市販されている低金属シリカゲルを使用することで、ホスホロアミダイトBlockmer®の純度は向上する。CE-Blockmer®の製造プロセスは日東電工社や塩野フィネス社と協力して最適化し、通算収率は大きく向上した(図6)¹²⁾。dGGGのように固相法で合成が困難な配列についてもBlockmer®は純度よく得られ、複数の修飾ヌクレオチドが含まれていても、問題なく製造できる。8種について製造経験があり、各Blockmer®間で製造条件の調整は必要なかった(図7)。

自動合成装置でCE-Blockmer®を使用する際の縮合条件は鎖

長によって異なり、二量体はホスホロアミダイトモノマーと同程度であるが、三量体は長時間を要する。縮合生成物の構造はホスホロアミダイトモノマーを用いる場合と等価であることから、キャッピング、酸化/硫化、脱トリチル化は条件を変更する必要はないが、三量体を使用して数百mg以上のスケールで合成をおこなう場合は酸化/硫化工程を2回実施するとより安定した結果が得られる(図8)。脱保護工程も条件を変更する必要はない。

三量体CE-Blockmer®を使用した予備的な固相合成試験において、製造が困難とされるポリA配列のオリゴヌクレオチドを標的として実施した。日本テクノサービス社の協力の下におこなった

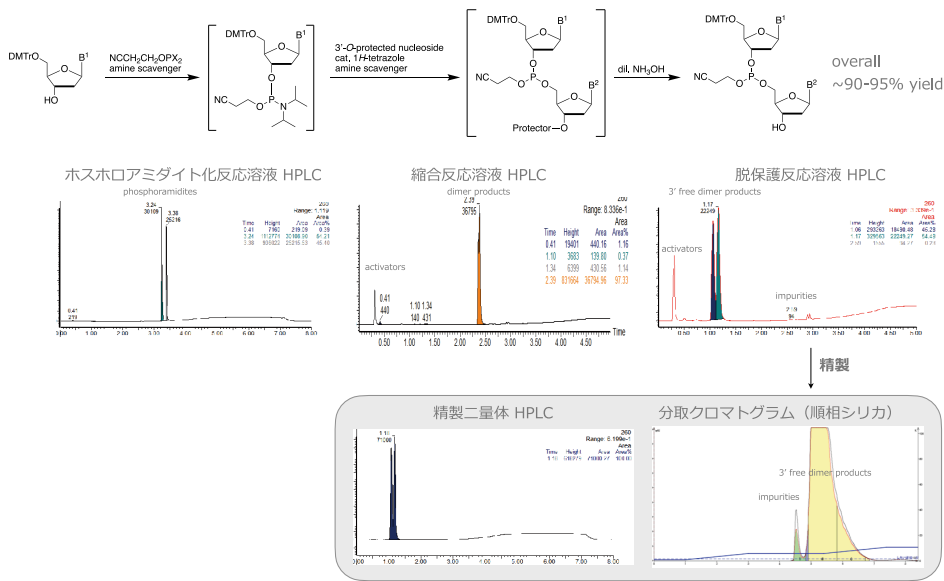


図6 CE-Blockmer®合成経路

8 modified Blockmers have been prepared.

dA ⁺ FG	rAOTBS ⁺ UJOTBS ⁺ OTBS
dC ⁺ FA ⁺ OMe ⁺ GOMe ⁺	dC ⁺ FA ⁺ OMe ⁺ UOMe ⁺
dC ⁺ FG ⁺ OMe ⁺ GOMe ⁺	dUFG ⁺ OMe ⁺ AOMe ⁺
dUFUFUF	dGLNG ⁺ GLNG ⁺ LNT

Custom Blockmers can be ordered (lead : me: 2-4 weeks).

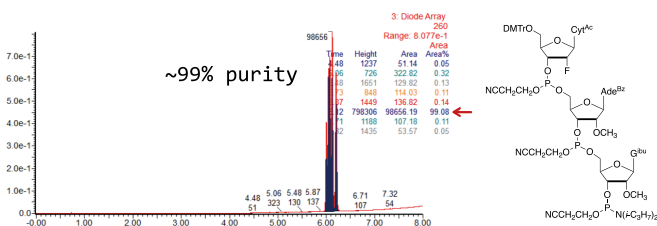


図7 修飾ヌクレオチド含有CE-Blockmer®原料

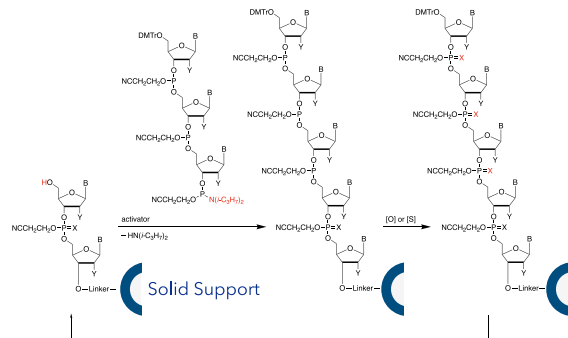


図8 Blockmer®を使用する鎖長伸長サイクル

本試験では縮合時間をホスホロアミダイトモノマーと同じメソッドで実施したことから、縮合収率は低いものの、目的鎖長から3の倍数分短い不純物のみが確認された (図9)。

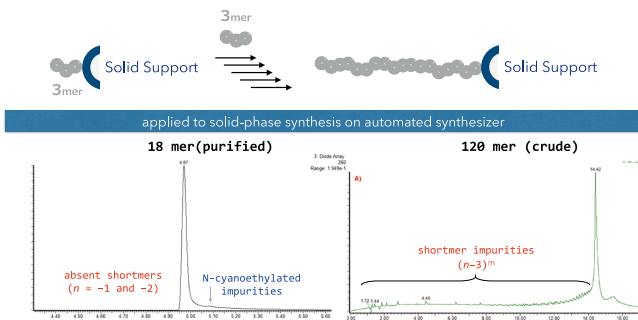


図9 CE-Blockmer®のみで鎖長伸長するオリゴヌクレオチドの固相合成

CE-Blockmer®を固相合成に使用する最も効率的な方法として、目的鎖長から使用するBlockmer®の鎖長を引いた鎖長までホスホロアミダイトモノマーを使って鎖長伸長し、最終工程にBlockmer®を使用して目的鎖長まで伸長することを提案したい。この方法では本質的にn-1およびn-2の短鎖不純物の生成を抑制し、精製負荷を下げることができる。例えば、二十量体合成において、十七量体までをモノマー原料、最終工程に三量体Blockmer®を使用することで 目的鎖長のオリゴヌクレオチドが得られる(図10)。

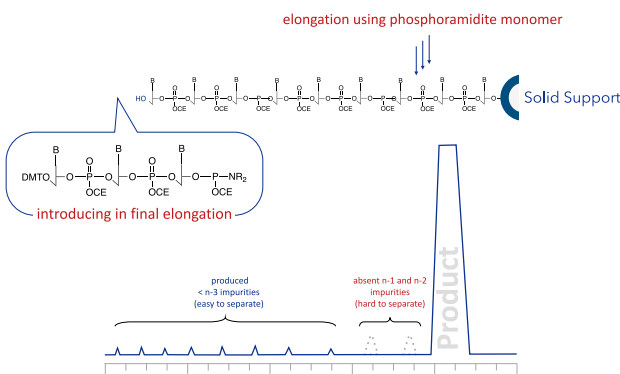


図10 Blockmer®原料を使用するオリゴヌクレオチドの固相合成

この方法で合成した硫化オリゴヌクレオチド二十一量体の精製例を示す(図11)。このサンプルは合成後に固相抽出で簡易精製をしたものであるが、簡易精製でも十分に純度の高いオリゴヌクレオチドが得られることがわかる。核酸医薬品で汎用される硫化されたオリゴヌクレオチド二十四量体のBlockmer®使用合成品と市販のHPLC精製品を比較したところ、Blockmer®使用合成品では短鎖不純物はほとんど存在しないのに対し(図12上)、市販のHPLC精製品はn-1,n-2鎖長の短鎖不純物をはじめとする多くの不純物が混在する (図12下)。

また、RNA 合成用の二量体リバース型CE-Blockmer®を使用することで、百量体を越える鎖長であっても純度良く得ることが

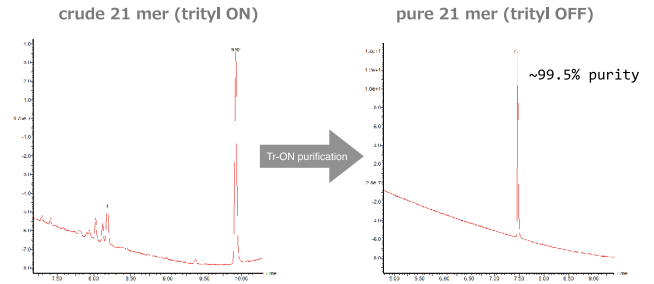


図11 Blockmer®原料で合成したオリゴヌクレオチドの簡易精製

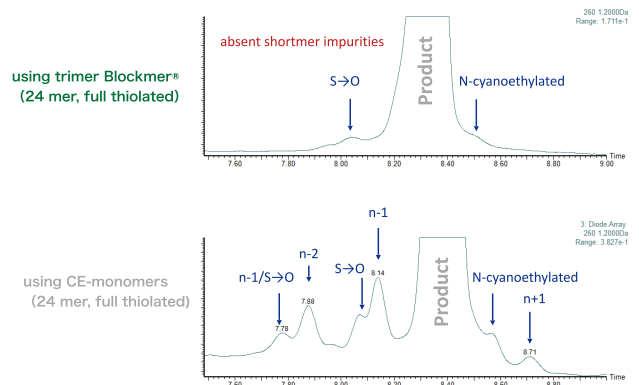


図12 精製オリゴヌクレオチドの純度比較

できる^{10, 13)}。二量体を原料とすることで鎖長伸長サイクル数が100超から半分約50に削減できることから合成上のリスクが低減する。五量体を原料とすれば約20サイクルとなり、二十量体合成と同等の工程で百量体を越えるオリゴヌクレオチドの合成が可能となるが、準備すべきBlockmer®数が著しく増加するため、不特定の配列を並列合成するような用途では現実的ではない。ナティアスでは固定された配列の数種のオリゴヌクレオチドを大量に製造する際に限定して実施している。また、合成された百量体のHPLCにおいて、メインピーク中のMS分析で短鎖不純物はほとんど含まれていないことが明らかとなり、Blockmer®の有効性が示された(図13)。

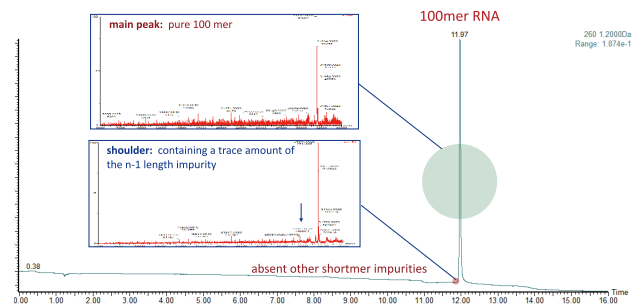


図13 百量体オリゴヌクレオチドの純度比較

AL-Blockmer®の液相法での利用

04

オリゴヌクレオチドの化学合成において、製造コストとスケラビリティを改善するための方策として液相法の採用が直接的であると考えられる⁴⁾。しかし、二十量体合成においては100工程を越える多段階となり、操作が煩雑となる液相合成の課題も強調される。1993年にBonora博士によってポリエチレングリコールを可溶性担体とする効率的液相合成法が発表され¹⁴⁾、液相法の煩雑性を低減することが可能となった。この方法では片末端がメチル基でキャップされたポリエチレンオキシドコハク酸モノエステルをヌクレオシドの3'に結合させ、ホスホロアミダイトモノマーを原料に鎖長伸長する(図14)。合成過程でヌクレオチド中間体は反応溶媒に溶解しており、各工程で沈殿化あるいはゲル濾過により中間体を精製することで煩雑性を緩和しているが、操作性の大きな改善には繋がらなかった。その後東京農工大の千葉博士がポリ脂質系担体を開発するなど、様々な可溶性担体が開発されてきたが¹⁵⁾、未だ製造コストと生産性の大きな改善に至っていない⁴⁾。

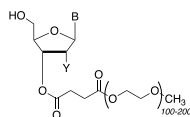


図14 ポリエチレングリコールを結合させたヌクレオチド

可溶性担体はオリゴヌクレオチド合成のコスト問題を解決するための1つの手段として一定の効果を示したが、製造上の諸問題を解決するためには多面的なアプローチが必須である。筆者は1997年に八量体のオリゴヌクレオチドの液相合成を発表している¹⁶⁾。テトラゾール活性化剤を触媒量使用してリン酸部がアリル保護された八量体中間体を合成し、これらがジクロロメタン-アセトニトリル溶液に可溶であることを示した。リン酸部がアリル保護された八量体Blockmer®が液相で合成可能であり、順相シリカゲルで精製可能であることを知識として保有しており、従来はモノマー原料に導入されていた可溶性担体を保護八量体に導入し、これを基点に鎖長伸長することを計画した。可溶性担体候補を安価な市販品を中心にスクリーニングした結果、フルオラスケミストリーで利用される炭素数6-8のポリフッ化アルキルアルコール(Ftag、図15)が最適であり、これを導入した八量体Blockmer®の有機溶媒に対する高い溶解性とシリカゲル薄層クロマトグラフィーでスミアすることなく検出されることが明らかとなった(図16)。

アリル保護されたヌクレオチド中間体(AL-Blockmer®)はCE-Blockmer®と異なり5価のリン酸型がより安定である¹⁷⁾。AL-Blockmer®は有機溶媒中で極めて安定であることから、有機溶媒中に長時間滞留する必要がある液相合成において有用である。合成はCE-Blockmer®と同様のプロセスで実施可能であり、四量体、八量体はより簡便に合成できる。核酸塩基がアシル基

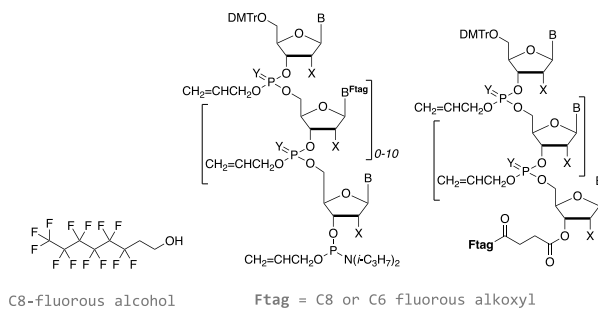


図15 フルオラスタグ化AL-Blockmer®

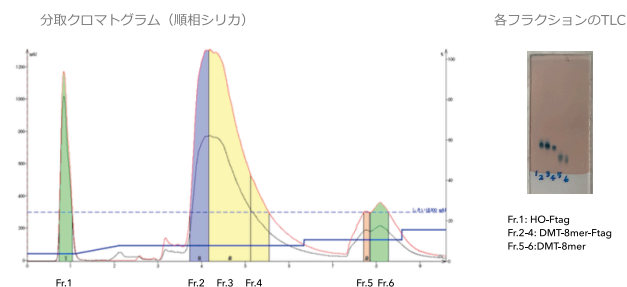


図16 フルオラスタグを導入した八量体AL-Blockmer®の順相シリカゲル精製

で保護された5'-O-DMTrヌクレオチドを原料とし、リン酸化剤により系中でホスホロアミダイトモノマーに変換した後、系中で3'-O-アシルヌクレオチドと反応させることによりヌクレオチド二量体を得て、位置選択的な脱保護をおこない、同様の操作を繰り返すことにより四量体、八量体AL-Blockmer®を得る。必要に応じて順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーをおこない、5'末端あるいは3'末端にFtagやシリル系保護基、DMTr基などが導入されたAL-Blockmer®を95%以上の純度で得ることができる(図17)。

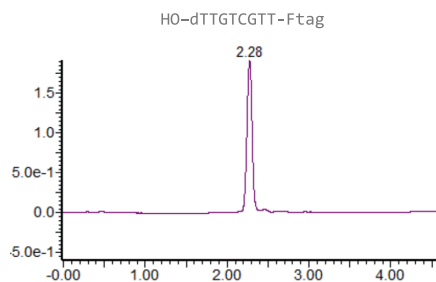


図17 フルオラスタグを導入した八量体AL-Blockmer®のHPLC図

液相法の優位点の一つとして反応のモニタリングが挙げられる。固相法では固体に担持されたヌクレオチド中間体の生成過程を正確にモニタリングすることは困難である一方、液相法ではLC-MS等を利用して簡便に反応溶液の経時変化を追うことが可能である。

ナティアスでは、AMEDの支援を受けて、24量体のオリゴヌクレオチドCpG ODN 2006の1kg製造試験を実施した。3'末端

にFtagが導入された八量体AL-Blockmer[®]を基点にホスホロアミダイト八量体AL-Blockmer[®]を用いて2回鎖長伸長をおこなうことで、CpG ODN 2006を簡便な操作で得ることができた。原料コストは固相法の10分の1以下であり、AL-Blockmer[®]を原料とする液相Block-elongation Systemの高いコスト/エネルギーパフォーマンスが示された (図18)。純度に関しては向上の余地を残しており、ナティアスでは液相法の改良を継続研究している。

今後の展開

05

ナティアスのBlockmer[®]を原料とするオリゴヌクレオチド合成が、固相法と液相法のいずれにおいても有効で、合成されるオリゴヌクレオチドの品質向上と製造コスト削減に大きく寄与することが実証された。

残す課題は2点。適用鎖長の限界に関して、Ftagを核酸塩基に導入した八量体Blockmer[®]を用いて液相、固相における合成鎖長の限界を確認したところ、固相合成においては240量体、液相合成においては128量体まで合成可能であることが明らかとなった。さらに長鎖オリゴヌクレオチドの合成に向けては固相担体の開発とオリゴヌクレオチド中間体の有機溶媒に対する溶解性の改善が必要となる。

スケラビリティの課題に対しては、液相法を発展させたフ

ロー合成の運用を進めている。十量体Blockmer[®]の安定製造が可能となったいま、フロー合成技術への展開は容易に想像できるであろう。5'末端にFtagが導入された3'-ホスホロアミダイト十量体Blockmer[®]と3'末端にFtagが導入された十量体Blockmer[®]の混合液と活性化剤溶液を送液/混合することで縮合反応をおこない、流路に脱保護液を注入することにより二十量体オリゴヌクレオチドを得る生産機を整備した。バッチスケール100kg超のGMP準拠製造施設として2023年秋からの商用生産を計画している。モニタリングには質量分析検出器と³¹P NMRを採用しているが、NIRやUV-VIS、ラマン分光等の導入も予定する。この製造工程で得られる粗生成物溶液はさらにインラインで連続精製、ダイアフィルトレーションを経てスプレードライヤによる粉末化によって完全封じ込めされた連続生産装置となる (図19)。この連続生産装置の開発は中小企業庁の支援を受けてアカデミアと共同で進めている。オイル化したBlockmer[®]による無溶媒鎖長伸長法やエステル交換型鎖長伸長反応も知財化を進めており、近い将来、オリゴヌクレオチドの連続生産がナティアスによって実現すると確信する。

1 kg ODN synthesis	Conventional Method	Block-elongation System
	solid phase	liquid phase
Solvent Wastes	8,000L	60L (started from 8 mer) 120L (started from 4 mer)
Purity	90~95%	~98%
Production Time	7 days	4 days
Length	24 mer	24 mer

図18 製造法比較

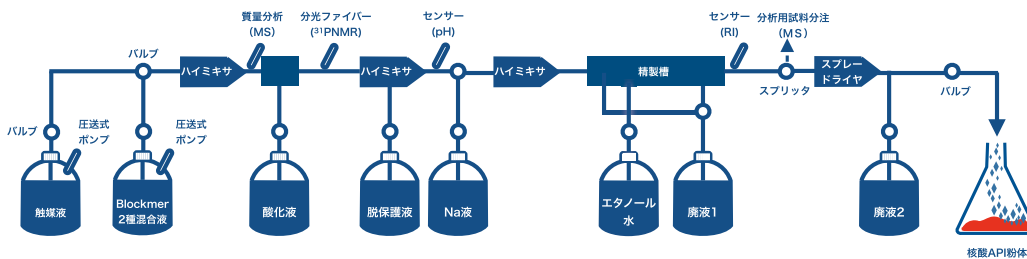


図19 フロー式核酸連続生産装置概略

参考文献

1. R. L. Letsinger, and W. B. Lunsford. Synthesis of thymidine oligonucleotides by phosphite triester intermediates. *J. Am. Chem. Soc.* 1976, 98, 12, 3655-3661.
2. S. L. Beaucage, and M. H. Caruthers. Deoxynucleoside phosphoramidites-A new class of key intermediates for deoxypolynucleotide synthesis. *Tetrahedron Lett.* 1981, 22, 20, 1859-1862.
3. H. Köster, and N. D. Sinha. Process for the preparation of oligonucleotides. United States Patent, 4,725,677(1984).
4. A. G. Molina, and Y. S. Sanghvi. Liquid-Phase Oligonucleotide Synthesis: Past, Present, and Future Predictions. *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry.* 2019, 77, 1, 1-17.
5. H. G. Khorana. Total Synthesis of the Gene for an Alanine Transfer Ribonucleic Acid from Yeast. *Nature.* 1970, 227, 27-34.
6. A. L. Kayushin, M. D. Korosteleva, A. I. Miroshnikov, W. Kosch, D. Zubov, and N. Piel. A Convenient Approach to the Synthesis of Trinucleotide Phosphoramidites-Synthons for the Generation of Oligonucleotide/Peptide Libraries. *Nucleic Acids Res.* 1996, 24, 19, 3748-3755.
7. X. Zhou, W. F. Kiesman, W. Yan, H. Jiang, F. D. Antia, J. Yang, Y. A. Fillon, L. Xiao, and X. Shi. Development of Kilogram-Scale Convergent Liquid-Phase Synthesis of Oligonucleotides. *J. Org. Chem.* 2022, 87, 4, 2087-2110
8. NATiAS Inc. <https://www.natias.co.jp/index.php/en/blockmer-3/> (参照 2023-05-02)
9. 株式会社ナティアス. 立体制御オリゴヌクレオチド合成用光学活性セグメントおよびその製造方法、ならびにそれを用いた立体制御オリゴヌクレオチドの合成方法. 特許 第 7075681 号, 優先日 20180502.
10. 片岡 正典, オリゴヌクレオチド合成用セグメントおよびその製造方法、ならびにそれを用いたオリゴヌクレオチドの合成方法. 特許 第 7075680 号, 優先日 20180502.
11. Jiří Smrč. 3'-O-Formyl-(N-acyl)-2'-deoxyribonucleosides as building units in the synthesis of oligodeoxyribonucleotides. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 1982, 47, 8, 2157-2169.
12. M. Iwamoto, and M. Kataoka. Method for producing oligonucleotide. WO2021080021A1(2020).
13. M. Kataoka, Y. Tsuji, and C. Fukui, US Prov. Appl. No. 63/499274(2023)
14. G. M. Bonora, G. Biancotto, M. Maffini, and C. L. Scremin, Large scale, liquid phase synthesis of oligonucleotides by the phosphoramidite approach. *Nucleic Acids Res.* 1993, 21, 5, 1213-1217.
15. (a) K. Chiba, Y. Kono, S. Kim, K. Nishimoto, Y. Kitano, and M. Tada. A liquid-phase peptide synthesis in cyclohexane-based biphasic thermomorphic systems. *Chem. Comm.* 2002, 16, 1766-1767. (b) S. Kim, A. Tsuruyama, A. Ohmori, and K. Chiba. Solution-phase oligosaccharide synthesis in a cycloalkane-based thermomorphic system. *Chem. Comm.* 2008, 15, 1816-1818. (c) D. Takahashi, and T. Yamamoto. Development of an efficient liquid-phase peptide synthesis protocol using a novel fluorene-derived anchor support compound with Fmoc chemistry; AJIPHASE®. *Tetrahedron Lett.* 2012, 53, 15, 1936-1939.
16. Y. Hayakawa, and M. Kataoka. Preparation of Short Oligonucleotides via the Phosphoramidite Method Using a Tetrazole Promoter in a Catalytic Manner. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, 119, 49, 11758-11762.
17. M. Kataoka, Segment for oligonucleotide synthesis, Production method for same, and oligonucleotide synthesis method using same. WO2019/212061(2020).

核酸集合技術と それを利用した創薬研究

Nucleic acid assembly technology and drug discovery research

岡本 晃充

Akimitsu Okamoto

東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻(教授)

Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo (Professor)

森廣 邦彦

Kunihiko Morihoro

東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻(助教)

Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo (Research Associate)

KEYWORD ▶

核酸集合体

核酸医薬

非天然塩基対

はじめに

01

幼少時に「スイミー」という絵本に親しんだ方も多いのではないだろうか。オランダ出身の絵本作家レオ・レオニによるもので、日本では国語の教科書に採用されていることも多い。このお話の中では、仲間を失ったスイミーという名の小さな黒い魚の周囲に同じように小さい赤い魚がたくさん集合することで、はるかに大きな強い魚に立ち向かうことができるようになる。1匹1匹の魚は小さく無力であるが、集合して見かけの大きさが増すことでこれまでにない力を発揮するという戦略である。このスイミーの戦略は我々の専門である生物有機化学分野でも有効であろうと妄想することができる。すなわち、細胞内や生体内に極微量に存在する特定の標的分子(スイミー)の存在を大きく増幅できるような分子プローブ(他の小さな魚たち)を開発できれば、標的に対する選択的なイメージング技術や標的をマーカーとした副作用の少ない治療薬を実現することができる。たとえば、様々な分子が入り混じった複雑環境の細胞内で微量に存在する標的分子を探すのは困難であるが、細胞外から導入したプローブをその周りに集合させて見かけの大きさを大きくすれば容易に見つけることができるであろう。では、それを実現するためにはどのような技術が必要だろうか?本稿では筆者らが専門としている核酸(DNAやRNA)を材料とした場合について解説する。

な形・サイズの集合体を組み上げることができる。単純な二重鎖はもちろんのこと、三重鎖や四重鎖などより複雑な高次構造も構築可能であり、核酸科学者の創作意欲をかき立てている。これらの核酸集合技術はDNAオリガミ(DNAで創られたニコちゃんマークが有名)やDNAコンピュータなど、基礎から応用研究まで幅広く利用されている¹⁾。最近では、生体内で作動するDNA型ナノロボットも作製可能になっており、医療分野への進出も目覚ましい。すなわち、核酸集合技術の利用目的は核酸で「何を創るか」から、創った核酸構造体で「何をするか」に遷りつつあると言える。また、特定のナノ構造体を構築できる核酸配列設計用のオンラインソフトウェアが公開されており、あらゆる分野の研究者が参入できる基盤が整えられ始めている(cadnanoなど)²⁾。以降では、特に細胞内で利用可能な核酸集合技術の代表例をいくつか詳細に解説したのち、我々が最近取り組んでいる抗がん核酸医薬としての応用研究について紹介したい。

2-1 Hybridization Chain Reaction (HCR)

2004年にカリフォルニア工科大学のPierceらによって開発されたhybridization chain reaction (HCR) は、短鎖の一本鎖核酸を開始剤として2種類のヘアピン型核酸分子が長鎖核酸二重鎖に変換される核酸集合技術である³⁾。すなわち、1分子の開始核酸を目印に多分子のヘアピン型核酸が直列に集合することで、開始核酸の存在シグナルを大幅に増幅することができる。この反応はまず開始核酸が一方のヘアピン型核酸と鎖置換反応を起こすことから始まる(図1)。HCRに用いられるヘアピン型核酸(HCRプローブ)は5'もしくは3'末端にtoeholdと呼ばれる一本鎖領域をもっており、配列選択的な鎖置換反応の足がかりとなる。続いて最初の鎖置換反応によってヘアピン構造が崩れることで新たな一本鎖領域が出現し、他方のヘアピン型核酸との鎖置換反応が可能となる。その後は2種類のヘアピン型核酸の連続した鎖置換反応が自発的に進行し、生成物としてニックの入った

核酸集合技術

02

核酸分子は水素結合を介してA:T(U)およびG:C塩基対を選択的に形成することでさまざまな高次構造体を構築できるため、核酸プローブの配列をうまく設計することで自発的にさまざま

長鎖核酸二重鎖が生じる。この反応は酵素や試薬を必要とせず等温で進むことから、生細胞内や生物個体内での核酸シグナル増幅に適していると考えられる。実際、Pierceらの研究グループはゼブラフィッシュ個体内で複数のmRNAイメージングを達成している⁴⁾。彼らは4種類の異なるmRNAに対するHCRプローブを用意し、4種類の異なる蛍光色素によって体内で染め分けることに成功した。従来の手法と比較して蛍光強度がおよそ200倍に増加したことから、HCRの核酸シグナル増幅法としての有用性が窺える。また、最近ではpH変化⁵⁾や光照射⁶⁾によって駆動するHCRも開発されており、様々な外部刺激を利用することで時空間的に制御された条件下で核酸シグナルを増幅することも可能になっている。

HCRプローブの配列設計にはいくつかの指針が提示されている。まず大前提として、開始核酸非存在下ではそれぞれのHCRプローブは熱力学的に安定に存在し、それぞれが干渉してはならない(バックランド反応の抑制)。一方で、開始核酸が存在すると速やかに、かつ、配列選択的に反応が進行する必要がある。Yungらのグループはこれらを満たすHCRプローブの条件として、①toehold領域のGC含量が30-40%以下である、②toehold領域の長さが12ヌクレオチド長以下である、③ステムの長さがtoehold領域の長さより長い、④ステムとtoeholdの長さが同等の場合、ステムのGC含量は60%以上であることを挙げている⁷⁾。実際、これらの条件を満たすHCRプローブはPierceらのオリジナルのものに比べて優れた反応性を示すことが分かっている。最近ではコンピュータ支援設計(CAD)によるHCRプローブの配列探索も報告されており、目的に合った反応性を容易に実現できる基盤が整いつつあると言える⁸⁾。一方で、上記の配列設計指針はあくまで細胞外での反応性に基づくものであり、生きた細胞内で機能するHCRプローブの探索には経験則を含めさらなる工夫が必要である。

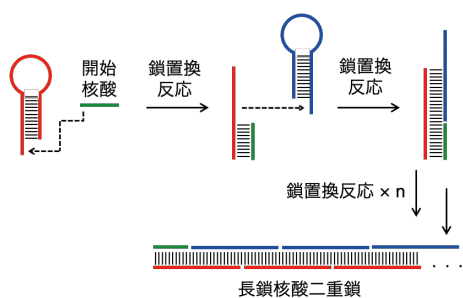


図1 HCRによる長鎖核酸二重鎖の非酵素的な構築。開始核酸を反応のトリガーとして、2種類のヘアピン型核酸の鎖置換反応がカスケード的に進行する。

2-2 Catalytic Hairpin Assembly (CHA)

生きた細胞内で利用可能な他の核酸集合技術として、catalytic hairpin assembly (CHA) が挙げられる⁹⁾。この技術も2008年にPierceらのグループによって開発されたものであり、彼らの高い創造性には驚かされるばかりである。CHAもHCRと同様に短鎖一本鎖の開始核酸と2種類のヘアピン型核酸分子(CHAプローブ)を用いる。CHAでは開始核酸は反応の触

媒として働き、生成物として短鎖の二重鎖DNAを与える。最初に開始核酸が一方のヘアピン型核酸のtoehold領域を配列選択的に認識し、鎖置換反応によってステム構造を解離させる段階はHCRと同じであるが、その後他方のヘアピン型核酸が標的核酸を追い出すように鎖置換反応を進行させる。これにより、開始核酸が再生するとともに生成物として短鎖の二重鎖核酸が構築できる。追い出された開始核酸は再度CHAプローブと反応し、触媒的に機能することで効率的に生成物が産生する。CHAも微量核酸のシグナル増幅に適しており、Tanらの研究グループは生細胞内のmRNA蛍光イメージングに成功している¹⁰⁾。この報告によると、従来型の核酸検出蛍光プローブと比較してCHAプローブはより微量のmRNAを検出可能であり、病気の診断などに用いる技術としてより優れているとされている。

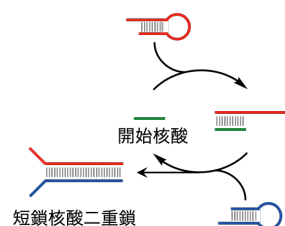


図2 CHAによる2種類のヘアピン型核酸を原料とした短鎖二重鎖の構築。開始核酸は再生されるため反応の触媒として働く。

CHAの弱点としては反応速度が遅いことが指摘されている。特に細胞内などの複雑な環境ではCHAプローブがランダムに拡散して反応が進行するため、分子間の相互作用は速度論的に不利である。また、単純なヘアピン型のDNAではヌクレアーゼ分解による反応効率の低下も無視することができない。これらを克服するため、YangらのグループはDNAでできた正四面体の頂点に2種類の異なるヘアピン型DNAを結合し、CHAが分子内で進行するシステムを開発した¹¹⁾。このシステムを用いることでCHAプローブの局所濃度が増加し、従来の分子間CHAと比較すると15倍以上反応速度が上昇することが明らかになっている。さらに、正四面体DNA構造を基盤骨格とすることでヌクレアーゼ耐性も大幅に改善され、細胞内で長時間機能性を発揮することも可能になった。通常、CHAプローブを細胞内に導入する際にはカチオン性のトランスフェクション試薬が用いられることが多いが、その毒性やプロトコルの煩雑さが問題となることが多い。興味深いことに、正四面体構造のDNAはトランスフェクション試薬なしに細胞内に効率よく侵入することができるため、細胞導入の面でも従来法と比較して優れた細胞内核酸集合技術であると言える。

核酸集合技術を利用した
抗がん核酸医薬開発

03

核酸医薬とはDNAやRNA、それらの類縁体から構成されたオリゴヌクレオチドであり、基本的には化学合成によって原薬が供

給される。2023年3月現在までに16品目の核酸医薬品が日米欧で承認されており、その数は今後も増え続けると予想される¹²⁾。創薬標的の枯渇から従来の低分子医薬開発が苦戦を強いられている一方で、核酸医薬の標的範囲はmRNAからpre-mRNA、ノンコーディングRNAと生物学の発展とともに拡大を続けており、これまでは治療が困難であった疾患に対する画期的な医薬品の創出につながることが期待されている。しかし、これまでにがんを治療標的とした核酸医薬は承認されておらず、新たな作用機序に基づく創薬技術の開発が求められている。がんは長年日本人の死因の第一位であり、その有効な核酸医薬の開発は喫緊の課題であると言える。

従来、がんに対する治療は外科手術、放射線治療、そして化学療法が主であったが、免疫チェックポイント阻害剤の開発以降、免疫療法が第四の治療法として定着しつつある。しかし、その奏効率は30-50%と高くなく、新しいメカニズムに基づくがん免疫医薬の開発が強く求められている。細胞外から侵入してきたDNAやRNAなどの核酸分子はウイルスと同様さまざまなセンサー分子によって認識されることで免疫を惹起するため、昔から免疫医薬の素材として研究が進められてきた。2017年に米国で承認されたB型肝炎予防薬であるHEPLISAV-BにはCpG配列を含むDNA(通称CpGオリゴ)が添加されており、免疫補助剤(アジュバント)として予防効果を高めている。しかし、CpGオリゴ自体が薬効本体として実用化された例はなく、あくまで補助的な役割に甘んじているのが現状である。また、長鎖のRNA二重鎖であるpoly(I:C)は細胞内のRNAセンサーに強く認識され、強力な抗がん作用を示すことからがん免疫医薬の素材として期待されたが、腫瘍選択性の乏しさから全身免疫毒性を回避することができず、単剤での臨床応用に至っていない¹³⁾。これらの状況を踏まえると、長鎖の核酸二重鎖をがん細胞内だけで構築することができれば、選択的に免疫を惹起してがん細胞だけを死に追いやるこ

とができると着想される。

筆者らは上述したHCRと呼ばれる核酸集合技術を利用することで、がん選択的な核酸免疫医薬が実現できると考えた¹⁴⁾。すなわち、特定の細胞で特徴的に発現している核酸分子をHCRのトリガーとして利用することができれば、標的細胞内でのみ長鎖核酸二重鎖を構築でき、自然免疫応答を活性化することで選択的な細胞死を導くことができるかもしれない。筆者らはまず、代表的ながん関連マイクロRNA(miRNA)であるmiR-21によって駆動するヘアピンDNAペアの設計と合成を行った。miRNAは20塩基長ほどの短い1本鎖RNAであり、さまざまながん細胞内で特定のmiRNAの発現が増加もしくは減少していることが報告されている。このヘアピンDNAペアをmiR-21が過剰発現しているHeLa細胞に導入し、細胞生存率を測定した結果、非常に強い細胞毒性を示すことが分かった(図3A)。これは強い免疫細胞毒性を示す長鎖DNA二重鎖であるpoly(dA:dT)と同程度、もしくはそれ以上の抗がん効果であった。ヘアピンDNAを片方のみ導入した場合では生存率に変化が見られなかったことから、当初の設計通りHCRによって細胞内でin situ構築された長鎖DNA二重鎖が強い細胞毒性を引き起こすことが明らかとなった。一方で、miR-21の発現量が低いHEK-293T細胞ではほとんど毒性を示さなかったため、ヘアピンDNAペアは細胞内miR-21環境を認識して細胞選択的な細胞死を誘導できることが明らかになった(図3B)。この選択的な細胞毒性が免疫惹起メカニズムによるものか確かめるため、免疫の活性化によって発現が増加するインターフェロンβ(INF-β)のmRNA量を測定した。ヘアピンDNAペアを導入したHeLa細胞ではINF-β mRNAの発現量が大きく上昇したのに対して、STINGをsiRNAでノックダウンした場合にはそれが一部低下したことから、細胞内の代表的なDNAセンサーであるcGAS-STING経路を介して自然免疫が活性化されていることが分かった(図3C)。

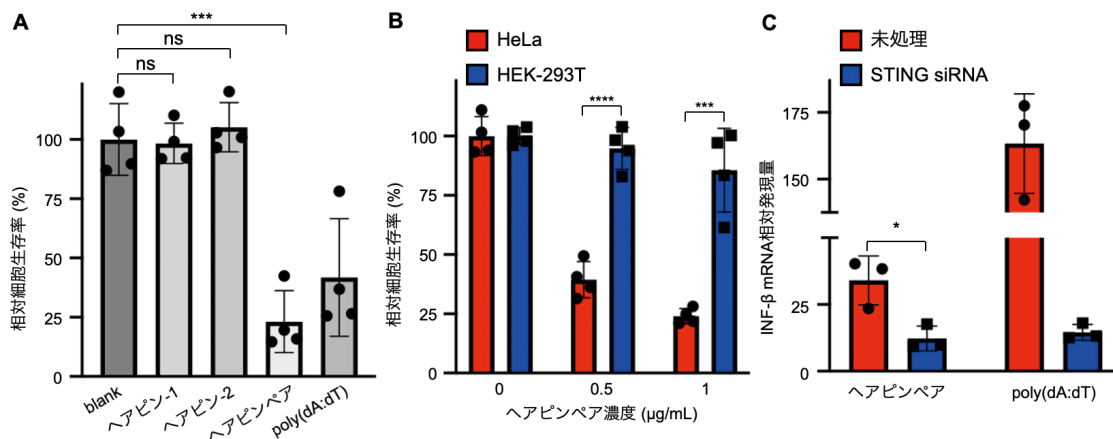


図3 培養細胞系におけるヘアピンDNAペアの薬効評価

(A) HeLa細胞に対するヘアピンDNAペアの毒性

(B) 細胞内 miR-21 量に依存した選択的な細胞毒性

(C) STING ノックダウンによる INF-β 発現量の現象

ns, not significant, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, and ****P < 0.0001 by unpaired Student's t-test.

参考文献14より引用し一部改変

Adapted with permission from Reference 14. Copyright 2023 American Chemical Society.

医薬としてさらに実践的な評価を実施するため、担がんマウスモデルを用いて動物個体に対する抗腫瘍活性を調べた。マウスメラノーマB16細胞を移植したマウスに対してヘアピンDNAペアをDDS試薬 (AteloGene® Local Use; 株式会社高研) を用いて局所注射し、腫瘍のサイズを経時的に測定することで抗腫瘍効果を評価した (図4)。その結果、実験後のマウスの写真からも分かるようにPBS投与群では腫瘍が急激に増大したのに対し、ヘアピンDNAペア投与群ではその増大を顕著に抑制することができた。これはポジティブコントロールとして投与した poly(dA:dT) と比べても強力な抗腫瘍効果であり、開発したヘアピンDNAペアの抗がん剤としての有用性を示すことができた。なお、体重減少などの顕著な全身性副作用は生じなかったことから、本医薬候補核酸は高い薬効と安全性を併せもつと期待される。最近、上記の技術を基にした核酸創薬ベンチャー「東京核酸合成株式会社」を設立した¹⁵⁾。得られた成果を論文にして終わりにするのではなく、社会実装を見据えて研究を展開していく環境を整えつつある。

通常、アデニンやグアニンなどのプリン塩基 (large) はアンチ型と呼ばれる配向をとり、ワトソン-クリック面でピリミジン塩基 (small) と塩基対を形成する。しかし、8-オキソグアニン (oxoG) と呼ばれる酸化損傷塩基では配向性がシン型を優先し、フーグスティーン面でアデニン塩基と large-large 塩基対を形成しうる (図5A)。この現象は遺伝子変異の原因となるため生物にとって望まれたものではないが、新たな非天然塩基対を設計するうえではおおいに役立つ。すなわち、人為的に塩基配向性をアンチ-シン型に制御することで、これまでになかった large-large 非天然塩基対の形成が期待できる。このコンセプトに基づき筆者らは新たに **An^N:Sy^N** 塩基対を開発した (図5B)¹⁶⁾。分子設計のポイントは、**Sy^N** 塩基の8位にかさ高い硫黄原子を導入してシン型を安定化 (アンチ型を不安定化) した点と、水素供与基と水素受容基を天然核酸塩基と直交的に配置することで選択的な塩基対形成を可能にした点にある。実際に **An^N:Sy^N** 塩基対の安定性と選択性をDNA二重鎖の融解温度測定によって評価した結果、天然のA:T塩基対と同程度の熱的安定性およびミスマッチ認識能をもっていることが明らかとなった。

著者らはHCRの開始核酸とヘアピンDNAペア中に **An^N** および **Sy^N** 塩基を導入し、**An^N:Sy^N** 塩基対の形成を駆動力とした反応の進行に成功した。ゲル電気泳動で反応を分析した結果、**Sy^N** 塩基を導入した開始核酸を系中に加えた場合のみHCRの進行が確認された。すなわち、非天然塩基対形成を利用することで、夾雑な環境下でも選択的に核酸集合体の構築を惹起できる可能性を示すことができた。このような新しい分子設計に基づく核酸集合技術の制御は、将来的にさらに高機能な核酸医薬の開発に貢献できると期待される。

天然核酸に直交的な核酸集合技術 04

HCRをはじめとする核酸集合技術を細胞内で利用する場合、標的以外の核酸分子との非特異的相互作用に由来する副反応や低い反応効率が問題となる場合がある。これらの問題を克服するためには、天然のA:TおよびG:C塩基対との相互作用を回避して直交的に作動する分子設計が必要となる。筆者らは独自に開発した非天然核酸塩基対である **An^N:Sy^N** 塩基対を搭載したHCRシステムを設計し、天然核酸と直交したHCRを開発したので最後に紹介したい。

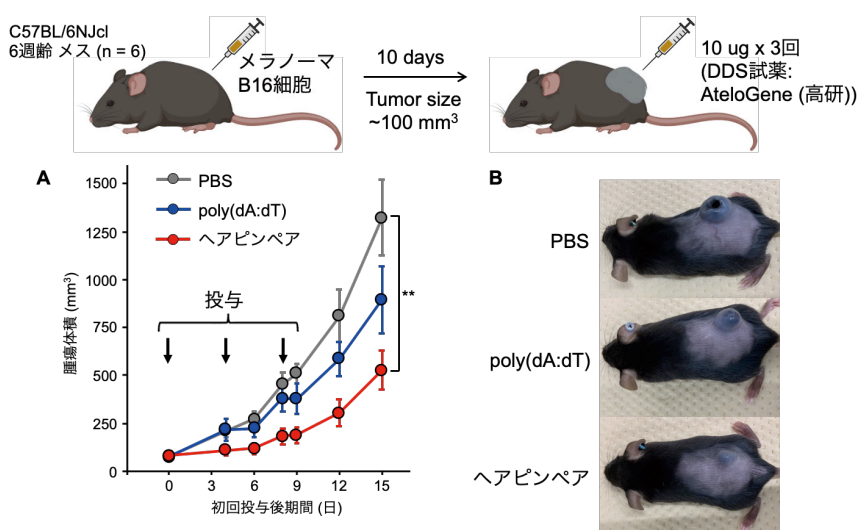


図4 担がんマウスモデルを用いたヘアピンDNAペアの薬効評価

(A) 腫瘍サイズの経時的な変化

(B) 初回投与 15 日後の代表的なマウスの写真

**P < 0.01 by unpaired Student's t-test.

参考文献14より引用し一部改変

Adapted with permission from Reference 14. Copyright 2023 American Chemical Society.

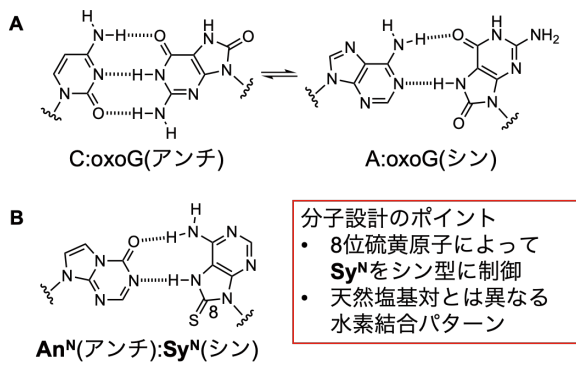


図5 アンチ-シン配向性をもつ非天然塩基対 $An^N:Sy^N$
 (A) oxoGの塩基配向性および認識塩基の変化
 (B) 非天然塩基対 $An^N:Sy^N$ の構造と分子設計のポイント

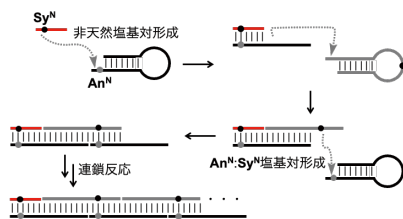


図6 非天然塩基対 $An^N:Sy^N$ 形成をHCRの駆動力とした核酸自己集合技術

おわりに

05

本稿では、細胞内で利用可能な核酸集合技術の代表例と、それを応用した新しいタイプの抗がん核酸医薬の開発を中心に最近の我々の取り組みについて紹介した。本抗がん核酸医薬候補はがん細胞内選択的に自己集合することで免疫応答を活性化するヘアピンDNAペアを素材としており、副作用を軽減したがん治療につながる可能性を有している。独自に設計した2種のヘアピン型DNAは、それ自体は全く機能性を有していないが、miR-21というマーカー分子のもとに集合した場合にのみ強い抗がん活性を示す。まさに、小さな魚が集まって巨大な魚に対抗できるようになる「スイミー」と同じ戦略を核酸分子で実現したと言える。本技術は、異なるmiRNAの配列情報からヘアピン型DNAペアの配列を設計することで様々ながんに対応できるテーラーメイド医薬としての可能性も有しており、それぞれの患者さんに最適な治療薬を届けることができると考えている。また、現在のがん免疫療法の主役である免疫チェックポイント阻害剤との併用療法により、さらなる薬効の増強も期待される。ヘアピン型DNAは化学合成によって供給できるため種々の化学修飾を搭載することができ、その利点を活用することでがん以外の対象疾患の拡大も現在検討中である。本創薬技術をきっかけに、様々な核酸集合技術を利用した新たな核酸医薬開発が進むものと期待される。

参考文献

1. N. C. Seeman, and H. F. Sleiman. DNA nanotechnology. Nat. Rev. Mater. 2017, 3, 17068.
2. <https://cadnano.org/> (参照 2023-03-31)
3. R. M. Dirks, and N. A. Pierce. Triggered amplification by hybridization chain reaction. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004, 101, 43, 15275-15278.
4. H. M. T. Choi, V. A. Beck, and N. A. Pierce. Next-Generation in Situ Hybridization Chain Reaction: Higher Gain, Lower Cost, Greater Durability. ACS Nano. 2014, 8, 5, 4284-4294.
5. A. Idili, A. Porchetta, A. Amodio, A. Vallée-Bélisle, and F. Ricci. Controlling Hybridization Chain Reactions with pH. Nano Lett. 2015, 15, 8, 5539-5544.
6. H. Chu, J. Zhao, Y. Mi, Y. Zhao, and L. Li. Near-Infrared Light-Initiated Hybridization Chain Reaction for Spatially and Temporally Resolved Signal Amplification. Angew. Chem. Int. Ed. 2019, 58, 14877-14881.
7. Y. S. Ang, and L.-Y. L. Yung. Rational design of hybridization chain reaction monomers for robust signal amplification. Chem. Commun. 2016, 52, 4219-4222.
8. X. Liu, D. Mao, Y. Song, L. Zhu, A. N. Isak, C. Lu, G. Deng, F. Chen, F. Sun, Y. Yang, X. Zhu, and W. Tan. Computer-aided design of reversible hybridization chain reaction (CAD-HCR) enables multiplexed single-cell spatial proteomics imaging. Sci. Adv. 2022, 8, 2, eabk0133.
9. P. Yin, H. M. T. Choi, C. R. Calvert, and N. A. Pierce. Programming biomolecular self-assembly pathways. Nature. 2008, 451, 318-322.
10. C. Wu, S. Cansiz, L. Zhang, I.-T. Teng, L. Qiu, J. Li, Y. Liu, C. Zhou, R. Hu, T. Zhang, C. Cui, L. Cui, and W. Tan. A Nonenzymatic Hairpin DNA Cascade Reaction Provides High Signal Gain of mRNA Imaging inside Live Cells. J. Am. Chem. Soc. 2015, 137, 15, 4900-4903.
11. Z. Qing, J. Hu, J. Xu, Z. Zou, Y. Lei, T. Qing, and R. Yang. An intramolecular catalytic hairpin assembly on a DNA tetrahedron for mRNA imaging in living cells: improving reaction kinetics and signal stability. Chem. Sci. 2020, 11, 1985-1990.
12. 国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部ホームページ, <https://www.nihhs.go.jp/mtgt/index.html> (参照 2023-03-31)
13. A. S. Levine, M. Sivulich, P. H. Wiernik, and H. B. Levy. Initial Clinical Trials in Cancer Patients of Polyriboinosinic-Polyribocytidylic Acid Stabilized with Poly-L-lysine, in Carboxymethylcellulose [PoIy(ICLC)], a Highly Effective Interferon Inducer. Cancer Res. 1979, 39, 5, 1645-1650.
14. K. Morihira, H. Osumi, S. Morita, T. Hattori, M. Baba, N. Harada, R. Ohashi, and A. Okamoto. Oncolytic Hairpin DNA Pair: Selective Cytotoxic Inducer through MicroRNA-Triggered DNA Self-Assembly. J. Am. Chem. Soc. 2023, 145, 1, 135-142.
15. 東京核酸合成株式会社ホームページ, <https://www.tkg-na.com/> (参照 2023-03-31)
16. K. Morihira, Y. Moriyama, Y. Nemoto, H. Osumi, and A. Okamoto. anti - syn Unnatural Base Pair Enables Alphabet-Expanded DNA Self-Assembly. J. Am. Chem. Soc. 2021, 143, 35, 14207-14217.

個別化医療に向けた オリゴ核酸の可能性

Potential of Oligonucleic Acids for Personalized Medicine

間世田 英明
HIDEAKI MASEDA

国立研究開発法人 産業技術総合研究所バイオメディカル部門(上級主任研究員)
National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)
Biomedical Research Institute (Chief Senior Researcher)

KEYWORD ▶

オリゴ核酸

個別化医療

ゲノム編集薬

個別化医療とは

01

個別化医療とは、同じ疾患の患者に対して一律に同じ治療を行うのではなく、患者の遺伝子、ライフスタイル、環境などの多様な要因を評価し、それに基づいて個々に適した治療法を選択する医療のことを指す。疾患の診断を早期且つ精密に行うことができ、副作用のリスクを最小限に抑えながら、より効果的な治療が可能となるため、将来の医療の基盤になるものと考えられている。また、個別化医療によって得られる情報を活用することで、新しい治療法の開発や医療費の削減に繋がることも期待されている。

個別化医療では、ゲノム・遺伝子の解析技術がいままで以上に重要な役割を果たすことになる。解析技術の拡充はもとより、ゲノムに紐付けられた様々な技術革新、思いっただけでも4つのプラットフォームの構築(データプラットフォーム、アルゴリズムプラットフォーム、コミュニケーションプラットフォーム、セキュリティプラットフォーム)、規制および法律などの取り決め、核酸を基本とする薬の安全性の評価法の拡充とそれに関わるガイドラインの作成など、種々の枠組みの構築が必要となる。当然、そこに携わる医療従事者・研究者などの拡充・教育も合わせて必要と予想されることから、産学官のより親密な連携が求められる。

- データプラットフォーム:患者の健康データを収集、管理、分析するためのプラットフォーム。これには、電子カルテや遺伝子解析のデータなど、患者の健康に関連するデータを収集するためのシステムが含まれる。
- アルゴリズムプラットフォーム:データを分析し、適切な診断や治療法を提案するためのアルゴリズムを開発提供するプラットフォーム。これには、機械学習や人工知能の技術を利用して、個々の患者の状態に応じた最適な治療法を提供するシステムが含まれる。
- コミュニケーションプラットフォーム:医療従事者、患者、家族、およびケアコーディネーターなどの間でのコミュニケーション

ンを促進するためのプラットフォーム。これには、テレヘルスやモバイルアプリケーション、オンラインプラットフォームが含まれる。

- セキュリティプラットフォーム:個人情報の保護や、医療データの安全な共有に関するプラットフォーム。これには、データ暗号化やアクセス制御の仕組みが含まれる。

個別化医療に必要な技術と治療薬

02

個別化医療の実現・実施に必要な技術革新とはどのようなものがあるであろうか?

- 次世代シーケンサーのデータを用いて患者の遺伝子情報を解析する技術。
- 個人の生体情報をプロファイリングするために必要な血液中のタンパク質、代謝物、ホルモンなどを測定する技術。
- 大量の生体情報データを処理するためのバイオインフォマティクス技術。遺伝子変異の解析やバリエーション、生体情報プロファイルの構築などが行われる。
- 大量の遺伝・生体情報データを総合的に分析する技術。個人の遺伝・生体情報プロファイルから最適な治療方針の推論が可能になる。
- 遺伝・生体情報プロファイルから、疾患の発症や進行に関わる生物学的プロセスを解明する技術。個人に合った精度の高い疾病発症予防・疾病進行制御も可能になる。

これらの技術の進歩と組み合わせによって個別化医療の精度や効果が向上し、患者の遺伝子情報や生体情報プロファイルを基にした、より効果的な治療が実施されていくものと期待される。治療の実施に当たっては、個別化医療に対応可能な特に以下に分類される薬の開発と技術の拡充を進める必要がある。

- **核酸医薬品:** DNAやRNAを標的として、遺伝子の発現を制御することで疾患の治療を目指す医薬品。具体的には、アンチセンスオリゴヌクレオチドやsiRNA (small interfering RNA)、miRNA (micro RNA) などが挙げられる(図1)。
- **遺伝子治療薬(ゲノム編集薬を含む):** 遺伝子进行操作することによって疾患を治療する治療薬。一般的に、疾患の原因となる異常な遺伝子の修正、削除、置換、あるいは正常遺伝子を補うことによって治療効果を発揮する。修正においては、

特にCRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated proteins) やTALEN (transcription activator-like effector nuclease) といったゲノム編集技術を用いてゲノムに直接変更を加えるゲノム編集薬もこの一部として考えられる(図1、2)。

- **ファーマコゲノミクス薬:** 患者の遺伝子情報を基に、薬の代謝能力や副作用リスクを予測し、最適な用量(投与量や投与頻度など)を決定し投与する薬。
- **免疫療法薬:** 患者の免疫細胞を活性化させる薬。例えばがん細胞を攻撃する治療薬など。免疫チェックポイント阻害剤など、免疫システムを活性化させてがん細胞を攻撃する薬剤もこの分類に含まれる。

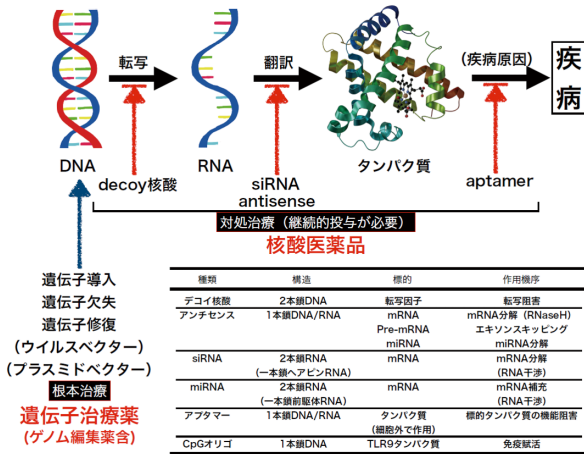


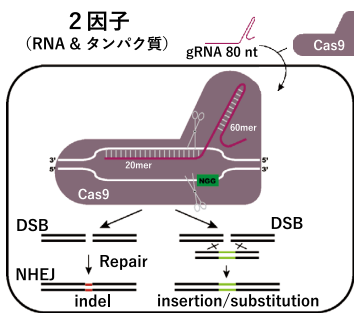
図1 核酸医薬品と遺伝子治療薬

核酸薬の種類と作用機序 03

多くの核酸医薬品と遺伝子治療薬(特にゲノム編集薬)は、DNAやRNAのオリゴ核酸から構成される核酸薬である。その標的は患者のDNAやRNAであり、ゲノム情報を活用することで個々の患者に応じてカスタマイズすることができる。即ち、患者のゲノム配列を解析し、変異や異常が認められた特定の遺伝子を修正するための核酸薬が個別に設計されるのである。このアプローチのメリットは非常に大きく、患者のゲノム情報に基づいているため、副作用のリスクを低く抑えながら治療薬の効果を最大限発揮させることができ、より効果的な治療を行うことが可能となる。さらに、一般的な医薬品とは異なり本体が核酸であることから、原料や合成プロセスを画一化することができ、その物性に由来する副作用は極めて画一的でバリエーションが少ない。臨床試験や安全性試験のコストが大幅に軽減されるため、一般的な医薬品と比べて核酸薬はその開発コストを低く抑えることができる。このような観点からも、核酸薬はまさに個別化医療の要となる治療薬と言える。

核酸医薬品とゲノム編集薬は核酸薬である点において共通であるが、適応範囲、作用機序、安全性においては大きな相違がある。

CRISPR-Cas9 法



ST (Sense strand Technology) 法

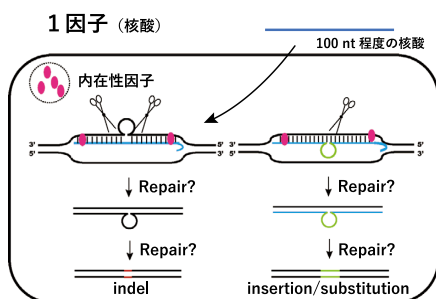


図2 CRISPR-Cas9法とST法

- **適用範囲:** 核酸医薬品は、DNAやRNAを利用して、がんやウイルス感染症などの様々な疾患の治療に用いられる。一方、ゲノム編集薬は、CRISPR-Cas9などの技術を利用して、先天性疾患など遺伝子異常に起因する疾患の治療に主に利用される。

- **作用機序:** 核酸医薬品の多くは、遺伝子の発現を制御することで治療効果を発揮する。一方、ゲノム編集薬は、遺伝子の塩基配列を直接修正することで疾患を根本的に治療する。核酸医薬品は永続的に投与を続ける必要があることがほとんどであるが、ゲノム編集薬は治療効果が確認されればそれ以降投与の必要はない。

■ 安全性: 核酸医薬品には、副作用として免疫反応や炎症が起こることがある。一方、ゲノム編集薬にはオフターゲットや不完全な遺伝子修復による予期しない影響が懸念される。

このように核酸医薬品とゲノム編集薬は、どちらも最先端の医薬品技術であり、遺伝子进行操作して疾患を治療することを目的としているが、それぞれ明確に異なる位置付けの治療薬である。繰り返しになるが核酸医薬品は、DNAやRNAなどの核酸分子を用いた医薬品であり、遺伝子を直接的に修正することはしない。代表的な核酸医薬品としてはmRNAワクチンやRNAi医薬品などが挙げられる。mRNAワクチンは、遺伝子情報を含むmRNAを生体内に接種し、生体内の免疫システムを利用して抗原(免疫源)を産生する。RNAi医薬品は、RNA干渉によって遺伝子の発現を抑制し、がんや遺伝性疾患などの治療に応用されている。一方、ゲノム編集薬は、治療において非常に革新的な方法であり、多くの研究が進んでいるが、まだ臨床応用は限定的であり、安全性や倫理的問題が議論されている段階である。核酸医薬品もゲノム編集薬も革新的な技術であり、今後の医薬品開発の進展が切望されている。以下に、この二つの医薬品の現状についてさらに詳細に記載する。

核酸医薬品の現状と実用性

04

COVID-19のパンデミックは、大きな医療革命を起こした。核酸医薬品の一つであるmRNAワクチンの緊急使用承認・許可が行われ、欧米をはじめ多くの人々に迅速に投与された結果、COVID-19が引き起こす重篤化を極めて効果的に抑制することに成功した。同時に、人種を超え、核酸医薬品の安全性はもとより、利便性・迅速性についても広く認知されるに至った。周知のように、今回ワクチンとして真っ先に開発された核酸医薬品は、新型コロナウイルスの構造タンパク質をコードするmRNAを生体内に接種し、体内で抗原となる異種タンパク質を産生させ、新型コロナウイルスの感染前に体内に抗体を予め産生させておくものであった。この成功はワクチンとしてのmRNAの利用を加速的に促進した。国立医薬品食品衛生研究所のホームページには、感染予防用のmRNAワクチンとがん治療用として開発されているmRNAワクチンがまとめられている¹⁾。驚いたことに、感染予防用72種・がん治療用12種と、従来の開発ペースをはるかに超えてmRNAワクチンの開発が進んでいることがわかる。核酸医薬品の用途はワクチンとしての利用がその最たるものとなった。COVID-19が流行する以前には、mRNAワクチンは核酸医薬品開発においてマイナーな部類に入っていた。COVID-19以前に開発が進められていた核酸医薬品の多くは、投与核酸の配列とターゲットとなるDNAやRNAの配列の相補性を利用して、問題となる遺伝子由来のタンパク質の発現を制御しようとするものがほとんどであった。mRNAワクチン同様に、国立医薬品食品衛生研究所のホームページ²⁾の中に日米欧で承認された核酸医薬品がまとめられている。ぜひ

一読していただきたい。COVID-19以前から利用され、すでに17種の核酸医薬品が承認されていることがわかる。ヒト一人の全ゲノム配列決定に対する費用がすでに10万円程度、しかも一日で決定できる時代になっている昨今、遺伝子解析技術が進み、遺伝子変異と疾病の原因が紐付けされていき、DDS(Drug Delivery System)などの開発が進めば、多くの核酸医薬品が実治療に利用されていくことは疑いようがない。医療改革、特に個別化医療が進んでいくことは揺るぎないものである。そして、今回のパンデミックがもたらしたmRNAワクチンの緊急使用承認・利用のように、薬や技術の利用と需要は社会情勢の予想できない変化とともに突然にやってくる。その恩恵を患者が遺憾なく享受し、現状の素晴らしい医療システムを維持していくためには、核酸医薬品の原料の製造および管理・輸送システムの構築や、核酸医薬品の各種グレード評価と用途に合わせた品質管理、当該技術分野の開発者・研究者・医師の教育と確保を早急に行うことが必要である。

もう一つの核酸薬:ゲノム編集薬

05

核酸医薬品は上記のように生命の設計図を書き換えるものではないことから、安全性を担保しやすいという利点がある。一方で、原因となる遺伝子をダイレクトに書き換えるわけではないため、基本的に投与を続ける必要があり、対処薬としての性質が強いと言える。しかし、2020年ノーベル化学賞の受賞対象になったCRISPR-Cas9(図2)をはじめとするゲノム編集の技術は、問題となる遺伝子を直接改変する治療法であることから、根本治療の要素が高く、治療回数の観点では患者への負担が比較的少ない治療であると言える。CRISPR-Cas9をはじめとするゲノム編集法については優れた総説・書籍・解説³⁾がいくつも存在しているので、それを参照していただきたい。核酸医薬品に続いて間違いなく必要とされる次世代の技術である。しかし、核酸医薬品と同様に実治療に利用するためにはいくつかの問題点をクリアする必要がある。まず、最も大きい問題は目的以外の箇所を改変してしまうオフターゲットである。ゲノム編集法の代表的立場にあるCRISPR-Cas9法を例にあげると、その構成要素は、細菌由来のCas9タンパク質とターゲットを認識するためのgRNA(guide RNA)である(実際には核内で遺伝子編集を行う必要があるため、Cas9タンパク質にはその生物で機能する核移行シグナルが多くの場合付与されている)。それらを細胞あるいは個体に導入することで、ターゲットサイトの改変・編集を行う。ターゲットサイトの認識には80 merからなるgRNAを利用することが多いが、その80 merの内、20 merがターゲット認識を担い、残りの60 merがCas9との複合体形成に使われる。種々の研究結果から示されているように、この認識に関わる20 merがターゲットサイトと配列が似ているゲノム上の別の箇所に結合すると、不幸にして意図しない編集が起こってしまう。これがオフターゲットである。オフターゲットが起こった細胞を治療では除く必要があり、配列の決定に伴うクローン化やなんらかの形態変化をセルソー

ターなどで検出して分離する。また、治療にあたっては、仮にオフターゲットを生じさせない革新的技術が構築されたとしても、Cas9タンパク質が細菌由来であることから、当然個体への投与 (*in vivo*) においては異種タンパク質と認識され、抗体産生が促され、免疫学的問題が生じてしまう。現時点ではゲノム編集薬を哺乳類の個体に直接利用することは不可能に近く、細胞治療・細胞移植などでの利用 (*ex vivo*) に限定されている。*ex vivo* 治療が不可能な疾患に対して *in vivo* 治療を行うためには、革新的な技術開発 (オフターゲットが限りなく少なく、異種由来のタンパク質を利用しないゲノム編集法) が求められ、開発が進んでいる。次章では、著者らが取り組み、最近マウス個体内での *in vivo* ゲノム編集に成功した、核酸のみによるゲノム編集法 (Sense-strand Technology:ST) について概説する。

オリゴ核酸のみを利用するゲノム編集法: ST法など 06

ST法とは、オリゴ核酸のみを導入してゲノム編集をする方法である。緑膿菌の抗生物質耐性獲得機構の解析から見出された、ほぼ全ての生物が有すると考えられる自己ゲノム編集機構を応用した技術であり、上記システムをmimicした100 mer程度の一本鎖オリゴ核酸を編集したいターゲットサイト用に調製し、細胞に導入することによって行われる (図2)。まだまだ解析すべき点は残されているものの、現時点ではオフターゲットがほぼ観察されておらず、*in vivo*での遺伝子治療に利用できる可能性を十分に秘めている。そのメカニズムは、CRISPR-Cas9法に代表される異種生物由来のヌクレアーゼを導入する従来のゲノム編集法と根本的に異なり、導入オリゴ核酸を介した修復により行われていると推察されている。全てのサイトで高効率に行えるとは言い難い (CRISPR-Cas9でも同様) が、ターゲットによっては、ヒト細胞を用いた実験において導入から正確な編集までを最高で数%程度で行えるところまで改良が進んでいる。

本節冒頭にも触れたように、ST法の開発のきっかけとなったのは緑膿菌の抗生物質耐性獲得機構の解析にある^{4,6)}。緑膿菌は医療現場において極めて注視すべき細菌の一つであり、水があればどこにでも存在する環境常在菌であるばかりか、免疫力の低下した患者に度々感染する日和見感染症の原因菌である。本菌は元来抗生物質に耐性を示すが、厄介なことに抗生物質に曝露されると容易にさらなる耐性化を果たしてしまう。このような急激な耐性の獲得は本菌が有する耐性獲得機構の巧みさにあることがわかっている。この耐性獲得機構は、外膜の透過障壁性と様々な薬剤を排出するRND型の異物薬物排出トランスポーターの発現による⁷⁾。本菌はゲノム中に12種のRND型異物薬物排出トランスポーターを有しており、どれか一つでも高発現すれば多剤耐性化を果たす^{7,8)}。野生株ではMexAB-OprMポンプのみを中程度レベルで発現しており、一般的な細菌よりも抗生物質に対して耐性を示す。残りの11種に関しては、(発現の揺らぎや一過的条件で発現することもあるが) 通常発現が抑制されサイレ

ントな状態にあり、MexAB-OprMを含めてレギュレーター遺伝子の変異により高発現化し、種々高度多剤耐性化を果たす。その中の一つにMexEF-OprNを高発現する*nfxC*変異株がある。この株は、臨床でしばしば現れる変異株であるが、この耐性獲得機構が非常にユニークである。著者らが解析を続け見出した自己ゲノム編集機構により、ゲノム中の遺伝子が存在しない領域に正のレギュレーター*mexT*遺伝子を作り出すことで、通常サイレントなMexEF-OprN異物薬物排出トランスポーターの高発現を促し、本菌を多剤耐性株へと誘導する。その後の解析から、この自己ゲノム編集機構はある特徴的な構造を形成する遺伝子配列が自ら特殊な核酸を作り出し、その核酸を介してターゲットサイト (遺伝子領域) を書き換え、遺伝子を作りだしたり壊したりして環境に適応しようゲノムを意図的に変化させていることがわかった。その後、解析をさらに続け、この核酸を人工的にデザインしてゲノム編集を人為的に起こさせることに成功した。すなわち、100 mer程度のオリゴ核酸を細胞に導入するだけで遺伝子をデザイン通りに編集できることを明らかにし、本手法をST法と名付けて基本の知財の獲得を果たした⁹⁻¹²⁾。繰り返しになるが、本法の特徴は100 mer程度の核酸を導入するだけでターゲットサイトのゲノム編集を行える点にあり、タンパク質成分を導入する必要がない。本機構に必要なタンパク質因子はほぼ全ての生物が有していると考えられ、実際、ST法は細菌でもマウスでもヒト細胞でも起こすことが可能であった。少々機構が異なるようであるが、オリゴ核酸のみで編集が可能な方法としてオリゴヌクレオチド誘発突然変異導入技術 (Oligonucleotide Directed Mutagenesis:ODM法) がある。これらの方法は、導入したタンパク質成分に対して抗体が産生される *in vivo* 治療や、塩基置換に代表されるゲノム・遺伝子改変に特に有用であると思われ、さらなる改良が楽しみな技術である。なお、ODM法に関しても、編集の効率を高めるさまざまな取り組み、投与核酸への修飾や extra配列の導入によるループ化などの工夫が行われている。また、ST法の研究開発を行う中で、本手法では全くゲノム編集が起こらない領域が存在することも明らかになった。面白いことに、その領域ではゲノム編集を妨げる因子の存在が疑われ、その因子をタンパク質成分の導入なしに、単純な核酸によって除くことにも成功した。その結果、全く編集を起こせない領域においても、比較的高頻度で編集を可能にすることにも成功している。さらに、ST法を基盤技術として近年設立されたベンチャー企業のNexuspiral株式会社¹³⁾は、マウス個体に対してST法でゲノム編集を行い、効率こそまだ低いもののターゲットサイトの正確な編集に成功している。実用化に向けて安全性の確認などを詳細に検討しているところであるが、*ex vivo*による遺伝子治療では効果・治療が期待できない希少疾患などへの治療に光明を指すものとして大いに期待されている。技術は日進月歩であり、その有効性や優位性から今後ますますゲノム編集法の利用・改良が行われ、近い将来、幾つものゲノム編集の手法の中から用途に合わせて選択できるようになると期待される。

ゲノム編集法、特にCRISPR-Cas9法はその知財のほぼ全てが海外のものとなっているが、今回紹介したST法や徳島大学 刑部敬史教授・東京工業大学 刑部祐里子教授らが開発したTiD法¹⁴⁾は本国オリジナルのゲノム編集技術である。今後の医療の一端をゲノム編集法が担う可能性はとて高いと思われ、安全性が担保されればオリゴ核酸のみによる遺伝子治療の実用が進んでいくものと思われる。その実現のためには、安全性の確認はもとより、オリゴ核酸の種々の実用に即した品質評価法の確立が必須であると思われる。そして、核酸医薬品を含めゲノム編集法で利用するオリゴ核酸の需要は拡大の一步を辿ることは疑いようがなく、国策としての供給体制の充実とそのプラットフォームの確立が急務となる。法整備を含め、産学官の協調・連携を早急に進めていく必要がある。

一方、オリゴ核酸自体は自動合成機と原料さえあればどのような配列であっても自由に合成することができる。上記のガイドラインに従ったグレードの核酸を合成できる合成機を開発することで、近い将来より身近に核酸薬による個別化医療などが進んでいくと想像される。その場合、on site(薬局でなくとも、公民館、コンビニ、はたまた患者の自宅)で自分に合った核酸薬の入手が可能になると信じており、これにより医師のいない地域であっても、ポツンと一軒家であっても、インターネットとのコラボレーションによって安価で患者ファーストな個別化治療が進む未来が訪れることを著者は夢見ている(図3)。高齢化社会が進む特に本国においては、まさに核酸薬の存在は医療システムの維持発展に必須な技術の一つであると思われ、これは世界共通のシステムの構築に向けてまさに本国が先導して進めていく問題であると感じてやまない。

参考文献

1. 国立医薬品食品衛生研究所, 感染症予防用 mRNA ワクチンの臨床開発状況, <https://www.nihs.go.jp/mtgt/pdf/section3-2.pdf> (参照 2023-04-03)
2. 国立医薬品食品衛生研究所遺伝子医薬部, <https://www.nihs.go.jp/mtgt/index.html> (参照 2023-04-03)
3. 山本卓. ゲノム編集の歴史と基礎 https://www.kanto.co.jp/dcms_media/other/CT_251_01.pdf THE CHEMICAL TIMES. 2019, 1, 3-6.
4. H. MASEDA, H. YONEYAMA, and T. NAKAE. Assignment of the Substrate-Selective Subunits of the MexEF-OprN Multidrug Efflux Pump of Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob. Agents Chemother. 2000, 44, 3, 658-664.
5. H. Maseda, K. Saito, A. Nakajima, and T. Nakae. Variation of the mexT gene, a regulator of the MexEF-OprN efflux pump expression in wild-type strains of Pseudomonas aeruginosa. FEMS Microbiol. Lett. 2000, 192, 1, 107-112.
6. H. Maseda, M. Uwate, and T. Nakae. Transcriptional regulation of the mexEF-oprN multidrug efflux pump operon by MexT and an unidentified repressor in nfxC-type mutant of Pseudomonas aeruginosa. FEMS Microbiol. Lett. 2010, 311, 1, 36-43.
7. C. K. Stover, X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warren, M. J. Hickey, F. S. L. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K.-S. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. W. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson. Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. Nature. 2000, 406, 959-964.
8. Y. Ichise, T. Kosuge, M. Uwate, T. Nakae, and H. Maseda. Complete Genome Sequence of Pseudomonas aeruginosa Strain 8380, Isolated from the Human Gut. Genome Announc. 2015, 3, 3, e00520-15.
9. 間世田 英明, 上手 麻希, ゲノム編集方法. 特許 第 6899564 号, 優先日 20160812.
10. 間世田 英明, 上手 麻希, ゲノム編集方法. 特許 第 6952315 号, 優先日 20160812.
11. 間世田 英明, 上手 麻希, ゲノム編集方法. 特許 第 7029741 号, 優先日 20160812.
12. 間世田 英明, 上手 麻希, ゲノム編集方法. 特許 第 7078946 号, 優先日 20160812.
13. Nexuspiral 株式会社 <https://nexuspiral.co.jp/> (参照 2023-04-03)
14. K. Osakabe, N. Wada, T. Miyaji, E. Murakami, K. Marui, R. Ueta, R. Hashimoto, C. Abe-Hara, B. Kong, K. Yano, and Y. Osakabe. Genome editing in plants using CRISPR type I-D nuclease. Commun. Biol. 2020, 3, 648.

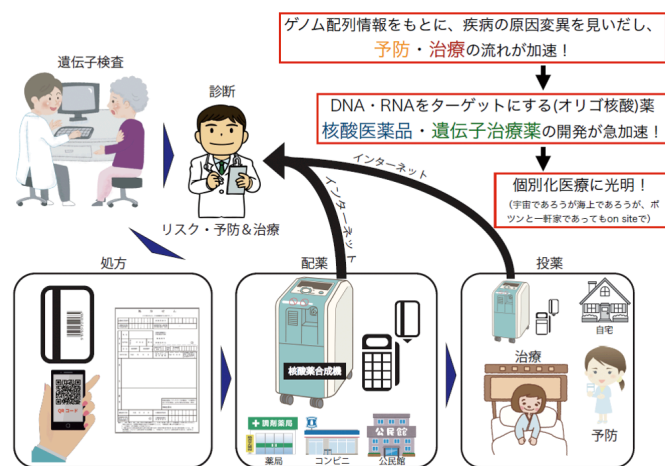


図3 核酸薬が導く将来の医療

ゲノム由来オリゴDNAによる 細胞分化制御

Regulating cell differentiation by genome-derived oligodeoxynucleotides

高谷 智英
Tomohide Takaya

信州大学大学院 総合医理工学研究科(准教授)
Graduate School of Medicine, Science and Technology, Shinshu University (Associate Professor)

KEYWORD ▶

核酸医薬品

アプタマー

細胞分化

はじめに

01

細菌やミトコンドリアのゲノムに由来するオリゴDNA (oligodeoxynucleotide:ODN)は、Toll様受容体(Toll-like receptor:TLR)のリガンドとして自然免疫系を調節することが知られる。しかし、近年一部のゲノム由来ODNが、非免疫細胞の分化にも影響することが明らかになってきた。筆者は、乳酸菌ゲノムを起源とするODNライブラリから、筋・骨組織の前駆細胞に作用する配列を同定し、筋萎縮や骨粗鬆症に有効な核酸医薬品のシーズとして研究を進めている。本稿では、これらODNの背景や作用機序、そして応用展開について紹介する。

核酸医薬品とゲノム由来ODN

02

核酸医薬品は、数十塩基のオリゴ核酸を基本骨格とし、タンパク質へと翻訳されず、標的に直接作用する薬物である。分子量1万前後の核酸医薬品は、低分子化合物のように合成可能なことに加え、抗体医薬品や細胞医薬品と同等以上の特異性や効果を発揮する、次世代の創薬モダリティである。抗原抗体反応に依拠する抗体医薬品とは異なり、核酸医薬品の作用原理は多様で、シード配列のプラットフォームは目的に応じて選択される。

核酸医薬品の中で最も実用化が進んでいるのは、アンチセンス核酸やsiRNA (small interfering RNA) など、標的遺伝子と配列依存的に結合し、その発現を調節するタイプである。これまでに、デュシェンヌ型筋ジストロフィーやトランスサイレチン型アミロイドポリニューロパチーを対象とするアンチセンス核酸が米国で承認されている。核酸標的型の核酸医薬品は、1993年に線虫で発見され、2001年以降に報告が急増したmiRNA (microRNA) やRNA干渉が着想の一つにある。これらのシードは標的遺伝子と相同・相補的な配列であり、その開発の歴史は、多細胞生物では線虫で初めて整備されたゲノムデータベースの発展と軌を一

にする。

これとは別に、病原体関連分子パターン (pathogen-associated molecular patterns:PAMPs)としてオリゴ核酸を用い、免疫応答を調節する核酸医薬品がある。元来、細菌やウイルスのゲノムには非メチル化CpG配列が偏在しており、宿主のTLR9はこれを非自己の侵襲と認識して自然免疫系を活性化する¹⁾。この性質を利用し、非メチル化CpGモチーフを有するODN (CpG-ODN)はワクチンアジュバンド(免疫賦活剤)として利用することができ²⁾、米国では2017年にB型肝炎ワクチンのアジュバンドとして承認されている。他にも、TLR3/7/9がテロメア様の核酸パターンを感知し、免疫系を制御することが知られる。このため、CpG-ODNやテロメアODNのように、TLRリガンドとして自然免疫系に作用するPAMPs型ODNは、感染症、アレルギー、自己免疫疾患などに有用な核酸医薬品となり得る。その由来から、PAMPs型ODNのシード配列は、細菌、ウイルス、ミトコンドリアなどのゲノム配列から探索される。

また、立体構造依存的に標的分子と結合するアプタマー(核酸抗体)も、核酸医薬品への展開が期待される。アプタマーは、折り畳まれて熱力学的に安定な高次構造を形成するオリゴ核酸で、抗体のように標的と特異的に結合し、多くは阻害剤として働く。一般的にアプタマーは、細胞膜ないし細胞外タンパク質を標的に設定し、SELEX(systematic evolution of ligands by exponential enrichment)法で作製される³⁾。これは、ランダム配列の核酸ライブラリから、標的結合配列の選抜とPCRによる濃縮を反復してアプタマーを得る、リバーススクリーニングの手法である。タンパク質である抗体と比べ、核酸アプタマーは免疫原性が低く、有機合成が可能で保存性にも優れる。しかし、実用化されたのは2004年に米国で承認された抗VEGFアプタマーのみで、臨床応用では抗体医薬品に及んでいない。

このように、オリゴ核酸の基礎研究と核酸医薬品の開発は、互いに関連しながら進展してきた。他方、この枠組みに収まらない、ユニークな機能を示す配列も報告されている。2002年には、細菌のmRNAの5'側非翻訳領域がアプタマーとして低分子と結合し、自身の構造を変化させることで転写や翻訳を制御するリボス

イチチの概念が提唱された⁴⁾。また、CpG-ODNの非免疫的な作用として、2009年にはCpG-1826がTLR9依存的に破骨細胞の分化を抑制すること⁵⁾、2010年にはCpG-2006がTLR9非依存的に間葉系幹細胞の骨分化を阻害することが示された⁶⁾。2011年には、ミトコンドリアゲノム由来の非CpG-ODNが骨芽細胞の分化を促進することが報告された⁷⁾。これらの成果は、ゲノム由来配列がアダプターとなり得ること、細胞の分化に影響し得ることを示唆する。筆者は、幹細胞に作用するゲノム由来ODNを探索することで、ODNによる新しい細胞制御技術を開発できないかと考えた。加齢や疾患に伴い、成体幹細胞や前駆細胞の機能は低下し、組織の恒常性維持に支障が生じる。幹細胞の活性化は、抗加齢や疾患治療にとって重要な課題である。ODNによる細胞制御が可能になれば、超高齢社会のニーズに応える核酸医薬品の創出につながると期待される。

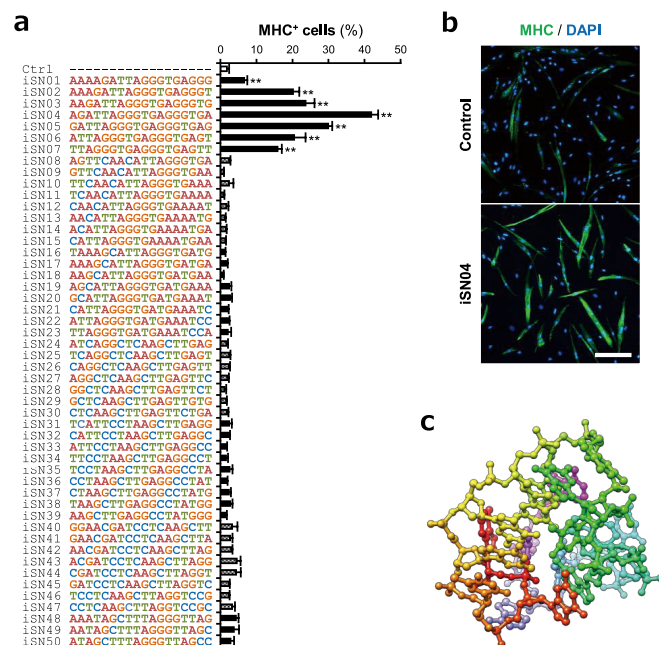


図1 myoDNの同定 (文献8を改変)
 (a) 10 μmol/Lの乳酸菌ゲノム由来ODNを48時間投与したマウス初代培養筋芽細胞ミオシン重鎖(myosin heavy chain:MHC)陽性率。**** p < 0.01**。(b) 10 μmol/LのiSN04を48時間投与したヒト初代培養筋芽細胞のMHC免疫染色像。スケールバー:200 μm。(c) TTP-McMDで計算した310 K水分子中のiSN04の最安定構造(信州大学・梅澤公二先生)。

は直鎖化による活性向上が見込まれるが、一部のmyoDNは熱変性で失活した。つまり、iSN04は核酸標的型のODNではなく、構造依存的に機能すると考えられる。

次に、iSN04の免疫原性を検証した。テロメア配列を含むODNは、TLR3/7/9を介して免疫応答を抑制し得るが¹⁰⁾、iSN04を投与した筋芽細胞では、TLR下流の遺伝子群の発現に変動はなかった。また、既知のTLRリガンドODNは筋分化に影響せず、iSN04の活性も阻害しなかった。iSN04の筋分化促進活性はTLR非依存的であると結論される。

以上の結果から、iSN04がアダプターである蓋然性が高まった。単純軌跡和マルチカノニカル分子動力学法(TTP-McMD)により、310 Kの水分子中で熱力学的に安定なiSN04の構造を計算すると、半径約1 nmの球状構造が示された(図1c)。特に、テロメア反復配列後半の3連グアニンは互いに近接し、構造の中心を占める。実験的にも、このグアニン中核を1塩基ずつ削除するごとにiSN04の活性が低下した。ゲノムDNAでは、テロメア様の配列がグアニン四重鎖と呼ばれる高次構造を形成し、テロメア結合タンパク質や転写因子複合体と相互作用する¹¹⁾。iSN04も、テロメア反復配列中のグアニンを介してタンパク質と結合すると推測された。iSN04で培養細胞の可溶性画分を沈降すると、結合タンパク質としてヌクレオリンが単離された。ヌクレオリンは真核生物でユビキタスに発現する多機能タンパク質で、N末端の被リン酸化領域、中央のRNA結合ドメイン、C末端のタンパク質結合領域からなる。ヌクレオリンは、核、細胞質、細胞膜などに移動・局在し、遺伝子の転写や翻訳、細胞の増殖や分化、炎症や細胞死などに関与するが¹²⁾、筋分化での役割は不明であった。

免疫染色の結果、筋芽細胞のヌクレオリンの大部分は核内に

筋形成ODNの同定 03

人体最大の組織である骨格筋は、運動に加え、熱生産、エネルギー貯蔵、糖代謝でも主要な役割を担う。筋力や筋量の減少は、運動機能の低下を招くだけでなく、心不全、がん、糖尿病などによる死亡の危険因子でもある。骨格筋は、多核の巨大細胞である筋線維が集合した組織である。筋形成の初期には、筋線維と基底膜の間に存在する筋幹細胞(衛星細胞)が活性化し、筋前駆細胞(筋芽細胞)となる。筋芽細胞は増殖後、収縮性の筋細胞へと分化して筋組織を構築する。しかし、加齢や疾患によって筋芽細胞の分化能は減退し、これが筋萎縮の一因と考えられている。過去に報告された筋分化促進剤は、特異性の低いヒストン脱アセチル化酵素阻害剤や、血中半減期が1時間未満のトリテルペン酸など、臨床応用にはいくつかの課題があった。そのため、抗体医薬品と比肩する特異性を達成でき、化学修飾により体内安定性や細胞毒性を調節できる、核酸ベースの筋萎縮治療薬の需要は大きい。

筆者は、ヒト腸内に存在し、乳製品にも用いられる乳酸菌 *Lactocaseibacillus rhamnosus* GGのゲノム配列に由来する18塩基のODNライブラリから、筋分化を促進する配列を探索した。筋芽細胞にODNを投与して培養し、骨格筋マーカーであるミオシン陽性細胞の割合を指標にスクリーニングした。その結果、テロメア反復配列(TTA GGG TGA GGG)を有するODN群(iSN01~iSN07)が筋分化を誘導することがわかり(図1a)、これらを筋形成ODN(myogenetic oligodeoxynucleotide: myoDN)と呼称した⁸⁾。このうち、最も活性の高いiSN04(AGA TTA GGG TGA GGG TGA)の作用機序を解析した。

まず、iSN04が核酸を標的とするかを検討した。iSN04は、ヒト、マウス、ニワトリの筋芽細胞に作用したことから(図1b)^{8, 9)}、アンチセンス核酸様に働いたら、各動物種の相同遺伝子座にiSN04類似配列が存在するはずである。しかし、ゲノムデータベースではそのような座位を確認できなかった。また、アンチセンス核酸

存在し、特に核小体に局在することがわかった。iSN04がヌクレオリンと結合するには、細胞膜を通過する必要がある。一般的にODNは、キャリアなしで細胞内に移行する(gymnosis)。ODNは二本鎖DNAより分子量が小さく、RNAより疎水性が高いため、比較的効率良くエンドサイトーシスで取り込まれる。エンドソームから細胞質に移行したODNの一部は、シャペロンやRNA結合タンパク質によって、さらに核内に運ばれる¹³⁾。蛍光標識したiSN04を筋芽細胞に投与すると、2時間以内に細胞内での蓄積が観察され、iSN04は核内のヌクレオリンとも相互作用し得ることが示された。がん細胞のヌクレオリンは、p53 mRNAの5'側非翻訳領域に結合し、p53タンパク質への翻訳を阻害する。また、筋芽細胞のp53タンパク質は、筋原性転写因子MyoDと協働して筋分化を誘導する。これらの知見から、iSN04は筋芽細胞のヌクレオリンと結合し、p53 mRNAをヌクレオリンから解放してp53シグナルを活性化すると考えられた。実験的にも、iSN04を投与した筋芽細胞では、p53 mRNA量とは独立にp53タンパク質量が増加し、p53下流の遺伝子群の発現が誘導された。

本研究から、乳酸菌のゲノム配列に由来する18塩基のiSN04は、高次構造を形成して筋芽細胞に取り込まれ、ヌクレオリンと結合してその機能を阻害し、p53シグナルを増強して筋分化を促

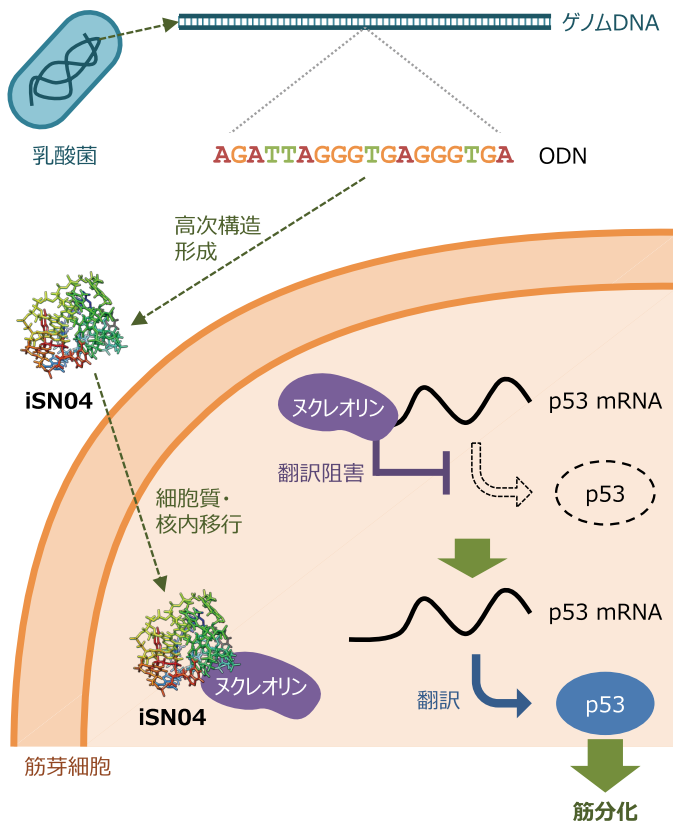


図2 iSN04の作用機序

乳酸菌ゲノム配列に由来するiSN04は、テロメア反復配列後半の3連グアニンを中心に高次構造を形成し、筋芽細胞内のヌクレオリンと結合する。結果、p53 mRNAがヌクレオリンから解放されてp53シグナル経路が活性化し、筋分化が促進される。

進ることがわかった(図2)。iSN04は、ゲノム由来ODNがアプタマーとして働き、細胞分化を制御することを示した世界初の例である⁸⁾。

iSN04の応用展開

04

筋分化を誘導するiSN04は、加齢に伴う筋力や筋量の減少(サルコペニア)の予防や、各種疾患が合併する筋萎縮の治療に有用な核酸医薬品シーズとして期待される。1型および2型糖尿病では、酸化ストレス、慢性炎症、細胞外マトリクスの異常、遺伝子発現の攪乱などにより筋分化能が低下し、これを一因に骨格筋が萎縮する。糖尿病患者の筋芽細胞を用いた実験では、iSN04が糖尿病で増悪する筋分化を回復することが示された(図3a)¹⁴⁾。また、進行性がん患者の約8割が、筋消耗を主徴とする悪液質(カヘキシー)を合併する。機序の一端として、がん細胞が分泌する悪性因子が筋芽細胞の炎症やアポトーシスを誘導し、筋分化を阻害することが指摘されている。筆者らの実験でも、がん分泌物を含む培養上清は筋芽細胞の分化を著明に悪化させたが、iSN04を投与すると、がん細胞培養上清中でも正常な筋分化が

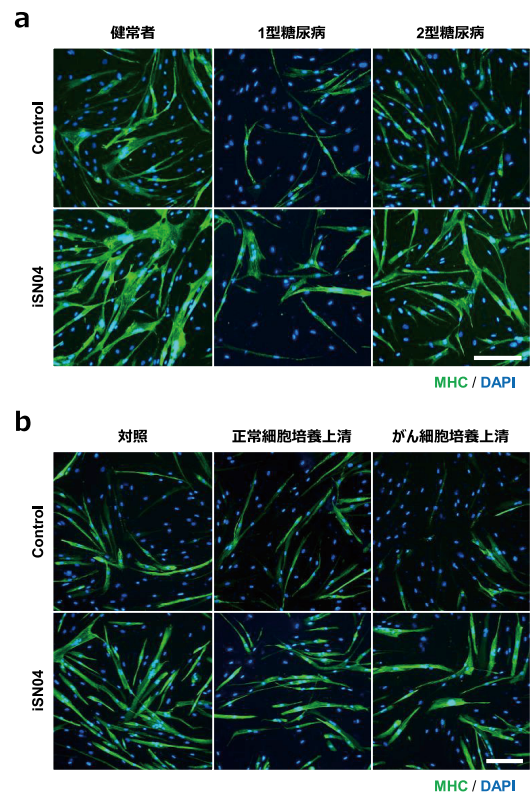


図3 iSN04による筋分化能の改善(文献14, 15を改変)

(a) 健康者と比べ、1型および2型糖尿病患者の筋芽細胞ではMHC陽性率が低い(上段)、10-30 $\mu\text{mol/L}$ のiSN04を48時間投与すると改善される(下段)。(b) 大腸がん細胞の培養上清で培養したヒト筋芽細胞のMHC陽性率は低い(上段)、30 $\mu\text{mol/L}$ のiSN04を投与すると改善される(下段)。スケールバー:200 μm 。

観察される(図3b)¹⁵。これら糖尿病・がんモデルでは、筋芽細胞は慢性的な炎症状態にあるが、iSN04は抗炎症作用を示すこともわかってきた。iSN04の標的であるヌクレオリンは、GSK-3βのリン酸化を介してβカテニンの分解を制御する¹⁶。iSN04がヌクレオリンを阻害すると、炎症刺激によるβカテニンの細胞内蓄積が減少し、βカテニンと複合体を形成する転写因子NF-κBの核内移行が制限され、炎症応答が低減する¹⁷。糖尿病やがんを含め、筋萎縮を合併する疾患の多くが慢性炎症を伴うことから、筋分化促進と抗炎症というiSN04の二重作用は、臨床的にも有用性が高い。

ヌクレオリンは全細胞に発現するタンパク質であり、iSN04は様々な細胞で効果を発揮する。筋細胞が腫瘍化した横紋筋肉腫は、筋分化能が潜在化した細胞だが、iSN04で分化誘導することで増殖を抑制できる。筆者らの実験では、iSN04が、3次元培養した横紋筋肉腫細胞の腫瘍塊形成を阻害した(図4)¹⁸。元来、ヌクレオリンはがん治療の標的として知られ、iSN04にも抗腫瘍作用が想定されたが、特に、筋分化誘導が可能な横紋筋肉腫には著効が期待される。

骨形成ODNの同定

05

iSN04が提示する、ゲノム由来ODNによる細胞制御技術は、核酸医薬品の創薬モダリティとなるだろうか。先行研究では、ヒトミトコンドリア配列に由来する27塩基のMT01([ACC CCC TCT]₃)が、骨芽細胞や間葉系幹細胞の骨分化を促進し、ラット歯周病モデルにおける歯槽骨量の減少を改善している^{7, 19}。MT01はERK/MAPK経路を活性化し、骨形成に必須の転写因子Runx2のリン酸化を亢進するが、直接の標的は不明である。筆者らも、iSN04を同定した乳酸菌ODNライブラリを再利用し、MT01のように骨分化を誘導する骨形成ODN(osteogenetic oligodeoxynucleotide:osteoDN)の探索を試みた。骨芽細胞にODNを投与して培養し、骨形成マーカーであるアルカリフォスファターゼの活性を指標にスクリーニングした結果、CpGモチーフを含むiSN40(GGA ACG ATC CTC AAG CTT)が骨分化を促進することがわかった(図5a)²⁰。iSN40を長期投与した骨芽細胞は、細胞外基質が石灰化した骨細胞へと成熟する(図5b)。

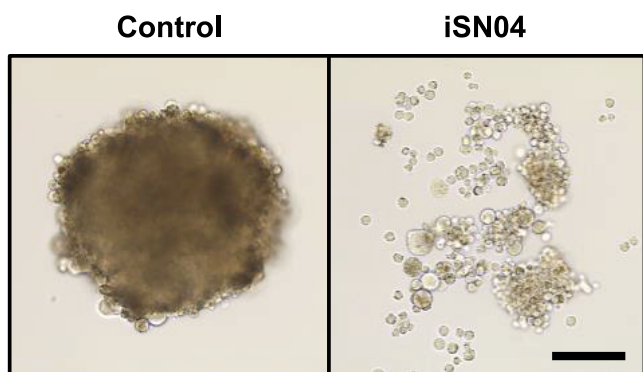


図4 iSN04による横紋筋肉腫の増殖抑制(文献18を改変)
10 μmol/LのiSN04は、3次元培養した横紋筋肉腫細胞の腫瘍塊形成を阻害する。スケールバー:100 μm。

また、ヌクレオリンは骨格筋と近縁の心筋や血管平滑筋、さらに脂肪の分化にも関与しており、iSN04によって、これらの細胞の分化や炎症が制御可能になりつつある(特許出願中)。心臓、血管、脂肪はメタボリックシンドロームを基盤とする循環器疾患の治療対象であり、核酸医薬品シーズとしてのiSN04の適用拡大が期待される。現在、iSN04の臨床応用を目指して動物試験を進めている。

同時に、多様な細胞に作用するiSN04を、標的細胞へ選択的に到達させるドラッグデリバリーシステムも必要である。18塩基(分子量5,957)のiSN04は、既知のアプタマー(平均長51塩基)より短く、化学修飾や脂質ナノ粒子による製剤化に有利である。この観点から、iSN04の構造データを元に設計した、iSN04と同等の活性を有する12塩基(分子量3,958)のODNも開発している(特許出願中)。配列の短縮は、合成コストの低減、分子の安定化、吸収率の向上とも関連し、核酸医薬品としての実用性にとって重要である。

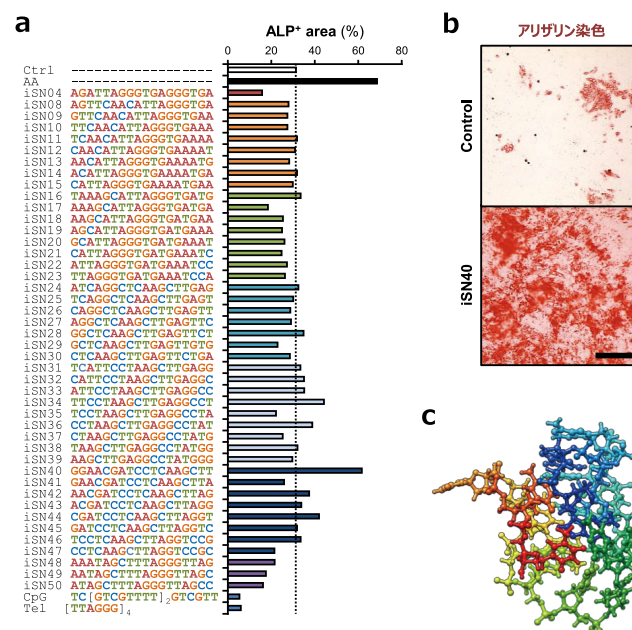


図5 iSN40の同定(文献20を改変)
(a) 10 μmol/Lの乳酸菌ゲノム由来ODNを48時間投与したマウス骨芽細胞株MC3T3-E1のアルカリフォスファターゼ(alkaline phosphatase:ALP)陽性率。アスコルビン酸(ascorbic acid:AA)は骨分化誘導の陽性対照。(b) 10 μmol/LのiSN40を12日間投与したMC3T3-E1のアリザリン染色像。スケールバー:200 μm。(c) TTP-McMDで計算した310 K水分子中のiSN40の最安定構造(信州大学・梅澤公二先生)。

CpG配列を有するiSN40は、CpG-ODNとしてTLR9に受容され得る。しかし、CpGモチーフ(CG)をGCに置換した変異iSN40も骨分化を促進する一方、TLR9リガンドであるCpG-2006は骨分化に影響しない。さらに、本研究で用いた骨芽細胞株はTLR9を発現しないことから、iSN40による骨分化誘導はTLR9非依存

的であると結論される。分子シミュレーションでは、iSN40は半径約1 nmの球状構造を形成した(図5c)。iSN40と変異iSN40はともに、30分以内に骨芽細胞内に移行したため、iSN04同様、アプタマーとして機能すると考えられる。しかし、現時点で標的分子は不明である²⁰⁾。

骨は代謝が活発な組織で、骨芽細胞による骨形成と、破骨細胞による骨吸収の均衡によって恒常性が維持される。骨芽細胞の分化能の低下は、骨量や骨密度の減少、ひいては骨粗鬆症の原因となる。治療薬としてデノスマブ(抗RANKL抗体)やロモソズマブ(抗スクレロスチン抗体)が承認されているが、核酸医薬品は存在しない。興味深いことに、TLR9非依存的に骨分化を誘導するiSN40は、同時に、TLR9依存的に破骨細胞の形成を阻害することがわかってきた(投稿中)。骨形成を促進し、骨吸収を抑制するiSN40は、骨リモデリングのバランスを改善し、骨粗鬆症の治療に有効な創薬シーズとして期待される。

おわりに

06

わずか50種類の配列からなる乳酸菌ODNライブラリから、筋形成型のiSN04と、骨形成型のiSN40という、細胞分化を制御する2種類のODNが同定された。一連の成果は、ゲノム配列が核酸医薬品のシーズ開発に有用なプラットフォームであることを示唆する。ゲノムDNAやmRNAは、それら単体では機能しない。ゲノムDNAには、転写因子複合体、クロマチンタンパク質、核酸修飾酵素、開裂・複製・修復・切断に関する様々なタンパク質が結合する。RNAには、スプライシング、ポリアデニル化、輸送、翻訳に寄与する多彩なRNA結合タンパク質が働き、その数はヒト遺伝子の7.5%に達する。つまり、ゲノム配列は何らかのタンパク質と相互作用する確率が極めて高く、短くとも機能性に富むアプタマーの探索に好適といえる。筆者らは、ゲノム由来ODNライブラリを、標的分子を設定しないフォワードスクリーニングに供したが、これをSELEX法のスタートライブラリに応用することもできる。今後、ゲノム配列に着目したアプタマー研究が進展し、ユニークな核酸医薬品シーズがさらに登場することを願う。

参考文献

1. A. M. Krieg. CpG Motifs in Bacterial DNA and Their Immune Effects. *Annu. Rev. Immunol.* 2002, 20, 709-760.
2. J. Vollmer, and A. M. Krieg. Immunotherapeutic applications of CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonists. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2009, 61, 3, 195-204.
3. T. Wang, C. Chen, L. M. Larcher, R. A. Barrero, and R. N. Veedu. Three decades of nucleic acid aptamer technologies: Lessons learned, progress and opportunities on aptamer development. *Biotechnol. Adv.* 2019, 37, 28-50.
4. E. M. Aghdam, M. S. Hejazi, and A. Barzegar. Riboswitches: From living biosensors to novel targets of antibiotics. *Gene.* 2016, 592, 2, 244-259.
5. J. H. Chang, E. J. Chang, H. H. Kim, and S. K. Kim. Enhanced inhibitory effects of a novel CpG motif on osteoclast differentiation via TREM-2 down-regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009, 389, 1, 28-33.
6. N. N. Nørgaard, T. Holien, S. Jönsson, H. Hella, T. Espevik, A. Sundan, and T. Standal. CpG-Oligodeoxynucleotide Inhibits Smad-Dependent Bone Morphogenetic Protein Signaling: Effects on Myeloma Cell Apoptosis and In Vitro Osteoblastogenesis. *J. Immunol.* 2010, 185, 6, 3131-3139.
7. Z. Feng, Y. Shen, L. Wang, L. Cheng, J. Wang, Q. Li, W. Shi, and X. Sun. An Oligodeoxynucleotide with Promising Modulation Activity for the Proliferation and Activation of Osteoblast. *Int. J. Mol. Sci.* 2011, 12, 4, 2543-2555.
8. S. Shinji, K. Umezawa, Y. Nihashi, S. Nakamura, T. Shimosato, and T. Takaya. Identification of the Myogenetic Oligodeoxynucleotides (myoDNs) That Promote Differentiation of Skeletal Muscle Myoblasts by Targeting Nucleolin. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021, 8, 616706.
9. Y. Nihashi, S. Shinji, K. Umezawa, T. Shimosato, T. Ono, H. Kagami, and T. Takaya. Myogenetic oligodeoxynucleotide complexed with berberine promotes differentiation of chicken myoblasts. *Anim. Sci. J.* 2021, 92, 1, e13597.
10. F. J. Barrat, and R. L. Coffman. Development of TLR inhibitors for the treatment of autoimmune diseases. *Immunol. Rev.* 2008, 223, 1, 271-283.
11. T. M. Ou, Y. J. Lu, J. H. Tan, Z. S. Huang, K. Y. Wong, and L. Q. Gu. G-Quadruplexes: Targets in Anticancer Drug Design. *ChemMedChem.* 2008, 3, 5, 690-713.
12. W. Jia, Z. Yao, J. Zhao, Q. Guan, and L. Gao. New Perspectives of Physiological and Pathological Functions of Nucleolin (NCL). *Life Sci.* 2017, 186, 1-10.
13. R.L. Juliano. Intracellular Trafficking and Endosomal Release of Oligonucleotides: What We Know and What We Do Not. *Nucleic Acid Ther.* 2018, 28, 3, 166-177.
14. S. Nakamura, S. Yonekura, T. Shimosato, and T. Takaya. Myogenetic Oligodeoxynucleotide (myoDN) Recovers the Differentiation of Skeletal Muscle Myoblasts Deteriorated by Diabetes Mellitus. *Front. Physiol.* 2021, 12, 679152.
15. Y. Nihashi, M. Yamamoto, T. Shimosato, and T. Takaya. Myogenetic Oligodeoxynucleotide Restores Differentiation and Reverses Inflammation of Myoblasts Aggravated by Cancer-Conditioned Medium. *Muscles.* 2022, 1, 2, 111-120.
16. S. Reister, C. Mahotka, N. van den Höfel, and E. Grinstein. Nucleolin promotes Wnt signaling in human hematopoietic stem/progenitor cells. *Leukemia.* 2019, 33, 1052-1054.
17. Y. Yamamoto, M. Miyoshi, K. Morioka, T. Mitani, and T. Takaya. Anti-nucleolin aptamer, iSN04, inhibits the inflammatory responses in C2C12 myoblasts by modulating the β -catenin/NF- κ B signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2023, 664, 1-8.
18. N. Nohira, S. Shinji, S. Nakamura, Y. Nihashi, T. Shimosato, and T. Takaya. Myogenetic Oligodeoxynucleotides as Anti-Nucleolin Aptamers Inhibit the Growth of Embryonal Rhabdomyosarcoma Cells. *Biomedicines.* 2022, 10, 11, 2691.
19. Y. Shen, Z. Feng, C. Lin, X. Hou, X. Wang, J. Wang, Y. Yu, L. Wang, and X. Sun. An Oligodeoxynucleotide That Induces Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Osteoblasts in Vitro and Reduces Alveolar Bone Loss in Rats with Periodontitis. *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13, 3, 2877-2892.
20. Y. Nihashi, M. Miyoshi, K. Umezawa, T. Shimosato, and T. Takaya. Identification of a Novel Osteogenic Oligodeoxynucleotide (osteodN) That Promotes Osteoblast Differentiation in a TLR9-Independent Manner. *Nanomaterials.* 2022, 12, 10, 1680.

キーワード解説

■ オリゴヌクレオチド

塩基、糖、リン酸からなるヌクレオチドがホスホジエステル結合で連なった生体高分子である核酸塩基が、直鎖状に数個から100個程度結合した状態の化合物を指す。核酸医薬品以外にも様々な医療分野における応用が研究されている。

■ 核酸医薬(品)

近年注目されている次世代の創薬モダリティ。体内で遺伝子発現してタンパク質をつくるmRNA医薬(数千塩基から1万塩基を超えるものまで)と遺伝子発現を介さずに直接生体に作用する天然型または化学修飾型オリゴヌクレオチド(二十前後~百塩基程度)に大別される。

CE-phosphite Blockmer®

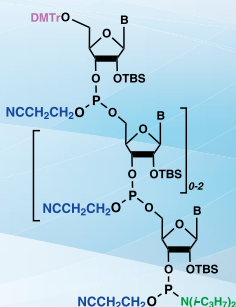
デオキシリボヌクレオチドで構成される二~四量体原料を各種販売しております。

【在庫ラインナップ】

16 dimers are in stock.				16 tetramers are in stock.			
dAA	dAG	dAC	dAT	dAAAA	dATGA	dGGGG	dGCGT
dGA	dGG	dGC	dGT	dCGAG	dCGAC	dCGTT	dCCCC
dCA	dCG	dCC	dCT	dTGAA	dTGAC	dTCGT	dCTCT
dTA	dTG	dTC	dTT	dTTGT	dTTCG	dTTTA	dTTTT

64 trimers are in stock (gray panels are custom).

dAAA	dAAG	dAAC	dAAT	dAGA	dAGG	dAGC	dAGT
dACA	dACG	dACC	dACT	dATA	dATG	dATC	dATT
dGAA	dGAG	dGAC	dGAT	dGGA	dGGG	dGGC	dGGT
dGCA	dGCG	dGCC	dGCT	dGTA	dGTG	dGTC	dGTT
dCAA	dCAG	dCAC	dCAT	dCGA	dCGG	dCGC	dCGT
dCCA	dCCG	dCCC	dCCT	dCTA	dCTG	dCTC	dCTT
dTAA	dTAG	dTAC	dTAT	dTGA	dTGG	dTGC	dTGT
dTCA	dTCG	dTCC	dTCT	dTTA	dTTG	dTTC	dTTT



ご要望に応じて、
種々の修飾ヌクレオチド
(2'-OMe、2'-OMOE、
2'-F、LNA)の
供給も可能!

NATIAS

核酸合成関連製品

✓ キャッピング試薬

- 15vol% 1-メチルイミダゾール, アセトニトリル溶液
- 1-メチルイミダゾール

今後もラインナップ追加予定!

✓ 硫化試薬

- N,N-ジメチル-N'- (3-チオキソ-3H-1,2,4-ジチアゾール-5-イル) メタンイミドアミド (別名: DDTT)

✓ 2mol/L TEAA溶液, pH7.0 3L

Cica 関東化学株式会社

当社HPでは、ケミカルタイムス最新号、バックナンバーを公開しております。

ケミカルタイムス URL

<https://www.kanto.co.jp/times.html>

関東化学 URL

<https://www.kanto.co.jp/>

2次元バーコードはこちらです ▶▶▶



※無断転載および複製を禁じます。

Cica 関東化学株式会社

〒103-0022 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号
室町東三井ビルディング

電話(03)6214-1090 FAX(03)3241-1047

E-mail: chemiti-info@kanto.co.jp 編集責任者: 菅 孝剛

2023年7月発行