

氏名（本籍）	鶴崎太樹（千葉県）
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	甲第71号
学位授与の日付	2024年3月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	ホスホン酸誘導体を用いた新規核酸合成法の開発

論文審査委員	（主査）教授 和田 猛
	教授 青木 伸 教授 内呂 拓実
	教授 西川 元也 教授 高橋 秀依

論文内容の要旨

近年、様々な疾患に対する治療薬として核酸医薬が注目を集めている。核酸医薬は従来の低分子医薬や抗体医薬が標的とすることができなかった、DNA や RNA といった遺伝子やその転写産物を標的とすることができる。原理的には、全てのタンパク質の発現を制御することが可能であるため、これまで治療が困難とされてきた難病の治療薬になると期待されている。そして、核酸医薬は化学合成による大量合成が可能という利点を有している。この利点を最大限に活かすことができれば、薬価の高い抗体医薬と比べ、より安価な医薬を供給することができる。しかし、現在のところ、大量合成技術の開発は十分には達成されておらず、改善の余地が残されている。特に、モルフォリノ核酸（Phosphorodiamidate Morpholino Oligonucleotide, PMO）医薬に関しては、ここ数年、連続して承認されているにも関わらず、従来の非効率的な合成法によって製造されており、莫大な費用が掛かっている。それ故に、医薬品の価格が高騰し、病気に苦しむ患者や国の負担が大きくなっている。

これらの課題を受け、本博士論文研究では、新規効率的 PMO 合成法の開発を目指した（第一章）。また、PMO 合成に関する研究を通して、明らかとなった副反応から着想を得て、新規核酸合成法の開発を目指した（第二章）。

第一章では、*H*-ホスホネート誘導体を用いた新規 PMO 合成法の開発について述べている。

この研究では、*H*ホスホネート法を使用して、PMO の新規液相合成法の開発を行った。初めに、モルフォリノアミノ基をホスホニル化することで得られる *H*ホスホンアミデートをモノマーとする合成法の開発に取り組んだ。しかし、P-N 結合は非常に不安定であったことから、合成戦略を変更し、モルフォリノヌクレオシドの 5'-OH をホスホニル化して得られる、*H*ホスホネートモノエステルをモノマーとして用いることにした。この合成戦略では、ホスホニウム型縮合剤 (PyNTP、BOMP、MNTP) を用いることで、*H*ホスホネートモノマーとモルフォリノヌクレオシドのアミノ基を直接的に縮合させることに成功した。縮合反応後に得られた *H*ホスホンアミデート結合が、非常に不安定であることが明らかとなったため、縮合反応と酸化アミノ化反応をワンポットで行うことで、安定なホスホロジアミデート結合へと変換した。これらの反応により、従来法と比較し、縮合時間が大幅に短縮された。

次に、オリゴマー同士を反応させるフラグメント縮合による鎖長伸長を行った。2種類のフラグメント (5'-*H*ホスホネートモノエステルおよび 3'-NH 誘導体) を合成し、良好な収率で得た。これらのフラグメントとホスホニウム型縮合剤を使用して、PMO では困難とされていたフラグメント縮合を達成した。しかし、*H*ホスホネート側のフラグメントは、鎖長が長くなるにつれて、反応性が低下することが明らかとなった。これに対して、反応性の高い縮合剤を用いることで解決した。最終的には、極めて良好な単離収率で、8量体 PMO の合成を達成した。また、従来法の課題の一つに、目的物とそれよりも鎖長が1つ短い N-1 量体の分離精製の難しさがあった。本手法では、フラグメント縮合による鎖長伸長を採用したことで、N-1 量体の生成は起こらず、目的物の精製操作を容易に行うことができた。

本手法は、スケールアップの容易な液相合成法かつ、フラグメント縮合による鎖長伸長方法を採用していることから、PMO の大量合成が可能となる。さらに、中間体として得られる *H*ホスホンアミデート誘導体は、適切な変換によりチオホスホロアミデートモルフォリノ核酸 (Thiophosphoramidate Morpholino Oligonucleotide, TMO) などの様々なリン原子修飾 PMO を得ることが可能である。本手法は、PMO の今後の発展に大きく貢献することが期待される。

第二章では、第一章で明らかとなった副反応から着想を得て、*H*ホスホンアミデート誘導体をモノマーとして用いる新規核酸合成法について述べている。

PMO 合成において、*H*ホスホンアミデート結合が非常に不安定であったことに着目し、モルフォリノ基などのヘテロサイクリックアミノ基を有する *H*ホスホンアミデートを用いると、アミノ基を優れた脱離基として利用することができると考えた。初めに、モルフォリン、チオモルフォリン、*N*-メチルピペラジンを導入した *H*ホスホンアミデート誘導体を合成した。合成した *H*ホスホンアミデート誘導体を用いて検討を行った結果、ピリジン共沸操作時に縮合反応が進行していることが明らかとなった。これは、共沸操作した時に加熱濃縮されるこ

とで縮合反応が進行したと考えられる。本反応を利用し、二つの化合物をピリジン溶媒中、混合・加熱するだけで、縮合反応が進行する新規核酸合成法を開発した。本手法は、添加剤を必要としないことから、液相法での大量合成への応用が期待される。

第二章後半では、ピリジン溶媒中、酸性活性化剤を加えることで、縮合反応が効率的に進行することを明らかとした。本反応には、溶媒、脱離基、酸性活性化剤の選択が重要である。特に、溶媒と脱離基の種類によっては全く縮合反応が進行しない。溶媒と脱離基の選択は、*H*-ホスホンアミデート誘導体のホスファイト型への互変異性化反応へと影響を与え、酸性活性化剤の選択は、*H*-ホスホンアミデート誘導体を与える中間体の反応性に影響を与えることを明らかとした。また、DFT 計算と実験結果を組み合わせ、反応機構の解明と縮合条件の最適化を達成した。前述のピリジン中で混合、加熱を行う反応系では、加熱が必要にも関わらず、縮合反応に時間を要するが、本反応は室温かつ 30 分で完結するため、反応性を大きく向上させることに成功した。

また、いずれの合成法でも、過剰に用いたモノマーは抽出操作によって、水層へと除去されるように合成サイクルを構築した。これにより、純度の高い中間体を 1 度の抽出操作のみで得ることができるため、煩雑な精製操作を必要としない。本手法は液相でのオリゴ核酸大量合成を可能にすると期待される。

以上のように、本博士論文研究で、核酸医薬品製造における克服すべき課題の一つである「大量合成技術の開発」へと繋がる研究を達成した。本論文で述べた手法が核酸医薬の発展に貢献することが期待される。

論文審査の結果の要旨

近年、様々な疾患に対する治療薬として核酸医薬が注目を集めている。核酸医薬は従来の低分子医薬や抗体医薬が標的とすることができなかった、DNA や RNA といった遺伝子やその転写産物を標的とすることができる。原理的には、全てのタンパク質の発現を制御することが可能であるため、これまで治療が困難とされてきた難病の治療薬になると期待されている。そして、核酸医薬は化学合成による大量合成が可能という利点を有している。この利点を最大限に活かすことができれば、薬価の高い抗体医薬と比べ、より安価な医薬を供給することができる。しかし、現在のところ、大量合成技術の開発は十分には達成されておらず、改善の余地が残されていた。特に、モルフォリノ核酸 (Phosphorodiamidate Morpholino Oligonucleotide, PMO) 医薬に関しては、ここ数年、連続して承認されているにも関わらず、従来の非効率的な合成法によって製造されており、莫大な費用がかかっていた。そのため、医薬品の価格が高騰し、病気に苦しむ患者や国の負担が大きくなっていった。

これらの課題を受け、申請者は、新規効率的 PMO 合成法の開発を行った（第一章）。また、PMO 合成に関する研究を通して、明らかとなった副反応から着想を得て、新規核酸合成法の開発を行った（第二章）。

第一章では、*H*-ホスホネート誘導体を用いた新規 PMO 合成法の開発について述べている。

この研究では、*H*-ホスホネート法を使用して、PMO の新規液相合成法の開発を行った。申請者は、初めに、モルフォリノアミノ基をホスホニル化することで得られる *H*-ホスホンアミデートをモノマーとする合成法の開発に取り組んだ。しかし、P-N 結合は極めて不安定であったことから、合成戦略を変更し、モルフォリノヌクレオシドの 5'-OH をホスホニル化して得られる、*H*-ホスホネートモノエステルをモノマーとして用いた。この合成戦略では、ホスホニウム型縮合剤 (PyNTP、BOMP、MNTP) を用いることで、*H*-ホスホネートモノマーとモルフォリノヌクレオシドのアミノ基を直接的に縮合させることに成功した。縮合反応後に得られた *H*-ホスホンアミデート結合が、非常に不安定であることが明らかとなったため、縮合反応と酸化的アミノ化反応をワンポットで行うことで、安定なホスホロジアミデート結合へと変換した。これらの反応により、従来法と比較し、縮合時間が大幅に短縮された。

次に、申請者は、オリゴマー同士を反応させるフラグメント縮合による鎖長伸長を検討した。2 種類のフラグメント (5'-*H*-ホスホネートモノエステルおよび 3'-NH 誘導体) を合成し、良好な収率で得た。これらのフラグメントとホスホニウム型縮合剤を使用して、PMO では困難とされていたフラグメント縮合を達成した。しかし、*H*-ホスホネート側のフラグメントは、鎖長が長くなるにつれて、反応性が低下することが明らかとなった。これに対して、反応性の高い縮合剤を用いることで解決した。最終的には、極めて良好な単離収率で、8 量体 PMO の合成を達成した。また、従来法の課題の一つに、目的物とそれよりも鎖長が 1 つ短い N-1 量体の分離精製の難しさがあった。申請者は、フラグメント縮合による鎖長伸長を採用したことで、N-1 量体の生成は起こらず、目的物の精製操作を容易に行うことができた。

申請者が開発した方法では、スケールアップの容易な液相合成法かつ、フラグメント縮合による鎖長伸長方法を採用していることから、PMO の大量合成が可能となる。さらに、中間体として得られる *H*-ホスホンアミデート誘導体は、適切な変換によりチオホスホロアミデートモルフォリノ核酸 (Thiophosphoramidate Morpholino Oligonucleotide, TMO) などの様々なリン原子修飾 PMO を得ることが可能であるため、PMO の今後の発展に大きく貢献することが期待される。

第二章では、第一章で明らかとなった副反応から着想を得て、*H*-ホスホンアミデート誘導体をモノマーとして用いる新規核酸合成法を開発したことについて述べている。

申請者は、PMO 合成において、*H*-ホスホンアミデート結合が非常に不安定であったことに着目し、モルフォリノ基などのヘテロサイクリックアミノ基を有する *H*-ホスホンアミデートを用いると、アミノ基を優れた脱離基として利用することができると考えた。

初めに、モルフォリン、チオモルフォリン、*N*-メチルピペラジンを導入した *H*-ホスホンアミデート誘導体の合成を行った。合成した *H*-ホスホンアミデート誘導体を用いて検討を行った結果、ピリジン共沸操作時に縮合反応が進行していることを明らかとした。申請者は、共沸操作した時に加熱濃縮されることで縮合反応が進行したと推察した。申請者は、本反応を利用し、二つの化合物をピリジン溶媒中、混合・加熱するだけで、縮合反応が進行する新規核酸合成法を開発した。本手法は、添加剤を必要としないことから、液相法での大量合成への応用が期待される。

第二章後半で申請者は、ピリジン溶媒中、酸性活性化剤を加えることで、縮合反応が効率的に進行することを見出した。本反応には、溶媒、脱離基、酸性活性化剤の選択が重要であることを明らかとした。特に、溶媒と脱離基の種類によっては全く縮合反応が進行しないという結果を得た。溶媒と脱離基の選択は、*H*-ホスホンアミデート誘導体のホスファイト型への互変異性化反応に大きく影響を与え、酸性活性化剤の選択は、*H*-ホスホンアミデート誘導体が与える中間体の反応性に影響を与えることを明らかとした。また、分子軌道 (DFT) 計算と実験結果を組み合わせ、反応機構の解明と縮合条件の最適化を達成した。前述のピリジン中で混合、加熱を行う反応系では、加熱が必要にも関わらず、縮合反応に時間を要していたが、本反応は室温かつ 30 分で完結するため、反応性を大きく向上させることに成功した。

また、申請者は、いずれの合成法でも、過剰に用いたモノマーは抽出操作によって、水層へと除去されるように合成サイクルを構築した。これにより、純度の高い中間体を 1 度の抽出操作のみで得ることができるため、煩雑な精製操作を必要としない。本手法は液相でのオリゴ核酸大量合成を可能にすると期待される。

以上のように、申請者は、核酸医薬品製造における克服すべき課題の一つである「大量合成技術の開発」へと繋がる研究を達成した。

以上より、本論文は博士 (薬科学) の学位論文として十分に価値あるものと認められる。