

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：12608

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04886

研究課題名（和文）核酸-タンパク質複合体形成に最適化した毒性のない核酸医薬の開発

研究課題名（英文）Development of chemical modifications optimized for oligonucleotide-protein complex formation

研究代表者

正木 慶昭 (Masaki, Yoshiaki)

東京工業大学・生命理工学院・助教

研究者番号：00578544

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,800,000円

研究成果の概要（和文）：核酸-タンパク質複合体形成に最適化した化学修飾の開発により、RNaseH依存型アンチセンス核酸のオフターゲット効果を抑制する方法論の構築を行った。X線結晶構造解析で見られた構造を初期構造に分子動力学計算によって複合体形成における構造的特徴を抽出し、複合体形成に適した構造に固定化する化学修飾を設計、合成した。再構成系でRNaseHの複合体形成位置を確認したところ、予期した通り、複合体形成の制御に成功した。またトランスクリプトーム解析より、オフターゲット遺伝子の数の抑制を確認、細胞生存率の向上がみられた。本成果により、安全性の高い核酸医薬品の開発に新たな方法論を提唱することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸医薬品は、従来は治療することのできなかつた疾患に対し、治療法を開発することができる新たな医薬品の形態です。非常に効果的な方法論である一方、予期せぬ標的外遺伝子の作用は安全性上の懸念となり、核酸医薬品の迅速な開発を妨げてきました。本研究では核酸医薬品の安全性上の懸念の解決を目指し、核酸医薬品の一種であるRNaseH依存型アンチセンス核酸において、原理的に安全性が向上する方法論を提唱しました。本成果は、核酸医薬品の今後の迅速な開発に貢献することが期待されます。

研究成果の概要（英文）：We have proposed a methodology to suppress the off-target effects of RNaseH-dependent antisense oligonucleotides by introducing chemical modifications optimized for nucleic acid-protein complex formation. We performed molecular dynamic simulations to extract structural features upon the RNaseH/DNA/RNA complex. Based on the simulated structures, we designed and synthesized chemical modification that restricts the position of complex formation. We confirmed the position of RNaseH complex formation was restricted upon the incorporation of chemical modifications. In addition, transcriptome analysis showed that the number of off-target genes was suppressed and the cell survival rate was improved. These results will contribute to the development of safer antisense oligonucleotides.

研究分野：生体関連化学

キーワード：核酸医薬 化学修飾核酸 アンチセンス核酸 RNaseH オフターゲット効果

## 1. 研究開始当初の背景

核酸医薬の一つである核酸分解酵素(RNaseH)依存型アンチセンス核酸(ASO)は、難治性疾患にも有効な次世代の治療法として期待され、数多くの臨床試験が行われている。しかし、ASOは臨床試験において予期せぬ副作用が発現することが知られており、なかでも標的外の mRNA に作用するオフターゲット効果(安全性上の懸念)は深刻である。そのため、原理的にオフターゲット効果を抑制できる方法論の開発は、核酸医薬開発において急務な課題と言える。

申請者はオフターゲット効果の発現メカニズムを解明するために、ASO 投与による網羅的な遺伝子発現変化のデータを解析した。その結果、毒性が強い 20 量体の ASO では、2000 種以上(12000 種中)の mRNA の発現が抑制されていた。それらの配列を調べたところ、わずか 6 塩基長の相補配列が数百から数千と非常に多く存在する標的外遺伝子は、遺伝子抑制の対象となっていることを見出した。RNase H は、DNA/RNA ヘテロ二重鎖を認識し、RNA 鎖のみを切断する内在性のエンドヌクレアーゼである。興味深いことに連続する DNA 鎖長を 6 塩基よりも短くすると、その活性はほぼ見られなくなることが知られている(Kurreck J *et al. Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 1911-1918.)。またヒト RNaseH と DNA/RNA の複合体の X 線結晶構造解析より、RNaseH と近接している DNA 鎖の鎖長は 5~7 塩基であることも報告されている(Nowotny *et al. Mol Cell.* **2007**, *28*, 264-76.)。よって 6 塩基長程度の部分的な二重鎖によっても、結合可能部位が多い場合、mRNA を切断しオフターゲット効果を誘導している可能性が示唆された。これらのことから、6 塩基長程度非常に短い相補性による認識を化学修飾により制御し、目的外の複合体形成を抑制する方法論の開発は、ASO のオフターゲット効果の抑制、ひいては安全性の高い ASO の開発において有効な方法論になると期待される。

## 2. 研究の目的

本研究では RNaseH 依存型アンチセンス核酸(ASO)の標的外 mRNA を切断するオフターゲット効果の抑制を目指している。標的外 mRNA のオフターゲット効果の原因となる 6 塩基長程度非常に短い相補性による認識を化学修飾により制限することで、オフターゲット候補となる切断可能部位を大幅に抑制し、標的外 mRNA の切断を抑制するという、原理的に安全性を向上させる新たな方法論の構築を行う。

## 3. 研究の方法

6 塩基長程度非常に短い相補性による認識を化学修飾により制限するには、RNase H と ASO/RNA の複合体形成を制御する必要がある。複合体形成の制御には、ASO を特定の構造に固定し、特定の位置でのみ複合体が形成できることが可能になる化学修飾の開発が必要になる。そこで、複合体構造の動的挙動を分子動力学計算により解析し、適切な構造をもつ化学修飾を設計、合成を行う。合成した化学修飾を ASO に導入したのちに、RNase H による DNA/RNA ヘテロ二重鎖の認識・切断を評価することで複合体形成位置の評価、また *in vitro* でのオフターゲット効果の評価による活性に対する影響、トランスクリプトーム解析によるオフターゲット効果の評価、細胞生存率による安全性への影響の評価を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 分子動力学計算を用いた分子設計

ヒト RNaseH と DNA/RNA ヘテロ二重鎖の複合体の X 線結晶構造(PDB: 2QK9)を用いて分子動力学計算を行い、ASO となる DNA の構造を推定した。切断される RNA 鎖上のリン酸基と対面にある DNA 鎖状のリン酸基を 5'にもつヌクレオチド残基を位置 0 とし、1 塩基 3'下流のヌクレオチドを+1、1 塩基上流のヌクレオチド残基を-1 とナンバリングし、解析を行なった。RNaseH からの距離として 4Å 以内の位置にある原子を解析したところ、0,+1,+2,+3,+4 の 5 残基の糖部が近接しており、核酸塩基部まで含めると、-1 から+5 までの残基が近接していることがわかった。ここで糖部の立体配座を解析すると、いくつかの分布に分類できることがわかった。特に特徴的な分布は 0 の位置のヌクレオチドであり、通常不安定な立体配座である O4'-endo 構造を示す 90°を中心とした分布も見られた。興味深いことに、二次元のヒストグラムで解析したところ、0 の位置のヌクレオチドが 90°を示す分布の構造を示した時、周辺構造の糖部の立体配座のゆらぎは抑制されることが示唆された。他の位置のヌクレオチドが示した糖部立体配座の分布の中心は 90°から 10°以上離れており、通常とは異なる 90° に固定化した化学修飾核酸を用いれば 0 の位置に複合体形成を抑制できることが示唆された。

## (2) 設計した分子の合成

分子動力学計算から予測された糖部立体配座に固定化した化学修飾核酸としてビスクロ[3.2.0]ヘプタン骨格を有する誘導体(bcT)を設計した。この誘導体は *ab initio* 計算において糖部立体配座が 91°と、目的とする 90°に非常に近い構造に固定化された誘導体である。この骨格をもつヌクレオシドの合成法は Christensen らによって報告されていたことから、その合成方法を参考に合成を実施した(*J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 5458–5463.)。途中、ジオール化および4員環を形成する反応は、塩化ルテニウムを用いた系および副反応を抑制する条件に変更することで効率的に合成できる経路を確立した。合成したホスホロアミダイト誘導体は通常の核酸合成条件を用い、ASOの導入を行った。

## (3) 再構成系を利用した複合体形成の制御効果の評価

RNaseHはDNA/RNA二重鎖を認識し、RNA鎖のみを切断するエンドヌクレアーゼである。そのため、RNA鎖を蛍光分子で標識しておき、どの位置で切断が起きたかをゲル電気泳動で評価することで、RNaseHが複合体形成していた位置を特定することが可能である。前項で合成したホスホロアミダイト誘導体をマウス Pten、Sod-1 およびヒト HTT を標的とした ASO に導入し、再構成系で評価を行なった。ここで Pten および Sod-1 はマウスにおいて顕著な肝毒性を示したことが知られる配列を採用した。また HTT に関しては、SNP による影響を評価するために選択した。これらの合成した ASO を用い、未修飾の ASO と比較することで、化学修飾による複合体形成制御を評価した。どの ASO においても主生成物として、bcT が 0 に位置する箇所での複合体形成時に生成する切断産物が得られ、未修飾の ASO とは異なる切断パターンが観測された。興味深いことに、+1, +2, +3 に bcT が位置する切断産物は、コントロールと比較し、大幅に抑制され、+4 に bcT が位置する切断産物が一部みられた。これらの結果から、本研究で設計した bcT は当初の予測通り、複合体中の 0 の位置に適した構造であり、複合体形成を制御可能な分子であることを実証した。

## (4) in vitro でのオフターゲット効果抑制効果の検証

合成した3種のASOのうち、マウス脳微小血管細胞株 b.End3 において遺伝子発現がみられる Sod-1 を標的とした ASO の *in vitro* での効果の評価した。トランスフェクションは、*in vivo* の試験をよく再現するとされる CEM 法を用い、72 時間後の遺伝子発現量を qPCR で評価した。その結果、未修飾の ASO と比較し、化学修飾を導入した ASO は同等のオンターゲット活性 (Sod-1 抑制効果) を示した。これは、bcT がオンターゲット活性を阻害することなく利用できることを意味する。次に、オフターゲット効果を調べるために、投与後 24 時間後のトランスクリプトームを調べたところ、50%以上発現抑制した遺伝子が未修飾 ASO では 760 個であるのに対し修飾 ASO は 564 個であった。共通する抑制された遺伝子は 399 個であり、未修飾 ASO に固有の抑制された遺伝子は 361 個、修飾 ASO に固有の抑制された遺伝子は 165 個であった。興味深いことに、ASO の 6 塩基長の相補性の濃縮を解析したところ、修飾 ASO に固有の抑制された遺伝子は、抑制されなかった遺伝子(バックグラウンド) と同等の濃縮であった一方、未修飾 ASO に固有の抑制された遺伝子は、共通で抑制された遺伝子群と同様に 6 塩基長の相補性の出現回数が濃縮されていた。これら解析から、RNaseH 依存のオフターゲット遺伝子は 760 個あり、うち 361 個は本研究でもちいた化学修飾により回避できたことを示唆している。最後に細胞生存率の評価をおこなった。今回用いた Sod-1 は強い肝毒性を示すことが知られている。そこで *in vitro* の評価系として細胞生存率を未修飾 ASO で評価したところ、投与量依存的に細胞生存率の低下がみられた。その一方で、化学修飾を導入した ASO 投与によって細胞生存率の低下はみられなかった。これらの結果より、本研究で開発した化学修飾は、*in vitro* の系において、オフターゲット効果を抑制し、細胞毒性を回避できるより安全性が高いアンチセンス核酸であることを実証した。

## (5) まとめ

本研究では RNaseH 依存アンチセンス核酸の安全性向上を目指して、RNaseH-DNA/RNA 複合体形成を制御する化学修飾の開発を行った。分子動力学計算を用いて設計されたビスクロ[3.2.0]ヘプタン骨格をもつヌクレオシド誘導体は、複合体中において 0 の位置に適した構造であり、その予測は再構成系の実験で確認された。またオフターゲット抑制効果、安全性の向上についても *in vitro* の系で評価し、実証できた。本研究成果により、安全性の高い核酸医薬の開発に向けて、新たな方法論を提唱することができた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masaki Yoshiaki, Yamamoto Keishi, Yoshida Keita, Maruyama Atsuya, Tomori Takahito, Iriyama Yusuke, Nakajima Hiroyuki, Kanaki Tatsuro, Seio Kohji	4. 巻 17
2. 論文標題 Modification of oligonucleotides with weak basic residues via the 2'-O-carbamoylethyl linker for improving nuclease resistance without loss of duplex stability and antisense activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 4835 ~ 4842
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9ob00668k	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masaki Yoshiaki, Yamamoto Keishi, Inde Takeshi, Yoshida Keita, Maruyama Atsuya, Nagata Tetsuya, Tanihata Jun, Takeda Shin'ichi, Sekine Mitsuo, Seio Kohji	4. 巻 29
2. 論文標題 Synthesis of 2'-O-(N-methylcarbamoylethyl) 5-methyl-2-thiouridine and its application to splice-switching oligonucleotides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 160 ~ 163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2018.12.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masaki Yoshiaki, Inde Takeshi, Maruyama Atsuya, Seio Kohji	4. 巻 17
2. 論文標題 Tolerance of N2-heteroaryl modifications on guanine bases in a DNA G-quadruplex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 859 ~ 866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8OB03100B	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masaki Yoshiaki, Yamamoto Keishi, Inde Takeshi, Yoshida Keita, Maruyama Atsuya, Nagata Tetsuya, Tanihata Jun, Takeda Shin'ichi, Sekine Mitsuo, Seio Kohji	4. 巻 29
2. 論文標題 Synthesis of 2'-O-(N-methylcarbamoylethyl) 5-methyl-2-thiouridine and its application to splice-switching oligonucleotides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 160 ~ 163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2018.12.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masaki Yoshiaki, Inde Takeshi, Maruyama Atsuya, Seio Kohji	4. 巻 17
2. 論文標題 Tolerance of N2-heteroaryl modifications on guanine bases in a DNA G-quadruplex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 859 ~ 866
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/C8OB03100B	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inde Takeshi, Nishizawa Shuhei, Hattori Yuusaku, Kanamori Takashi, Yuasa Hideya, Seio Kohji, Sekine Mitsuo, Ohkubo Akihiro	4. 巻 26
2. 論文標題 Synthesis of and triplex formation in oligonucleotides containing 2'-deoxy-6-thioxanthosine	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 3785 ~ 3790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2018.06.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masaki Yoshiaki, Iriyama Yusuke, Nakajima Hiroyuki, Kuroda Yusuke, Kanaki Tatsuro, Furukawa Satoshi, Sekine Mitsuo, Seio Kohji	4. 巻 28
2. 論文標題 Application of 2'-O-(2-N-Methylcarbamoyl) Nucleotides in RNase H-Dependent Antisense Oligonucleotides	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nucleic Acid Therapeutics	6. 最初と最後の頁 307 ~ 311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/nat.2018.0738	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 2件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 正木 慶昭, 井上 敦, 入山 友輔, 金木 達朗, 中嶋 宏之, 清尾 康志
2. 発表標題 化学修飾によるアンチセンス核酸の RNaseH依存オプターゲット効果の抑制
3. 学会等名 第13回バイオ関連化学シンポジウム2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki, Y.; Yamamoto, K.; Yoshida, Y.; Maruyama, A.; Tomori, T.; Iriyama, Y.; Nakajima, H.; Kanaki, T.; Seio, K.
2. 発表標題 Synthesis and properties of 2'-O-modified oligonucleotides having carbamoylethyl linker
3. 学会等名 日本核酸医薬学会 第5回年会 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki, Y.; Inde, T.; Maruyama, A.; Seio, K.
2. 発表標題 (4)Tolerance of N2-heteroaryl modifications on guanine bases in G-quadruplex structure
3. 学会等名 CISNAC 2019日本核酸化学会設立記念国際シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masaki, Y.; Yamamoto, K.; Yoshida, K.; Iriyama, Y.; Nakajima, H.; Kanaki, T.; Tomori, T.; Seio, K.
2. 発表標題 Application of 2'-O-carbamoylethyl-type modifications in antisense oligonucleotide
3. 学会等名 The 14th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masaki, Y.; Inde, T.; Maruyama, A.; Seio, Kohji
2. 発表標題 Synthesis of oligodeoxyribonucleotides containing N2-heteroarylguanine residues and their properties in G-quadruplex structures
3. 学会等名 XXIII International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 正木 慶昭, 井上 敦, 入山 友輔, 金木 達朗, 中嶋 宏之, 清尾 康志
2. 発表標題 RNaseH依存型アンチセンス核酸への応用に向けた化学修飾核酸の開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会 第4回年会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井上敦, 正木慶昭, 清尾康志
2. 発表標題 2',3'-糖部架橋型アラビノフラノシルチミン誘導体の効率的な合成研究
3. 学会等名 日本化学会 第99春季年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 正木 慶昭, 宮坂 隆太, 山本 恵士, 吉田 圭汰, 関根 光雄, 清尾 康志
2. 発表標題 糖部修飾オリゴヌクレオチドの変形能解析と二重鎖融解温度の関係
3. 学会等名 日本核酸医薬学会 第3回年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 清尾康志, 正木慶昭, 山本恵士, 印出健志, 入山友輔, 中嶋宏之, 金木達朗, 黒田雄介, 古川賢, 谷端 淳, 永田哲也, 武田伸一, 関根光雄
2. 発表標題 2'-水酸基にカルバモイルエチル型修飾を有する人工核酸を用いたアンチセンス核酸の開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会 第3回年会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masaki, Y.; Sekine, M.; Seio, K.
2. 発表標題 Relationship between deformability of sugar-modified RNA duplexes and their melting temperatures
3. 学会等名 13th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井上敦, 正木慶昭, 清尾康志
2. 発表標題 2',3'-糖部架橋型化学修飾核酸の合成
3. 学会等名 日本化学会第98回春季年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Masaki, Y.; Ohkubo, A.; Seio, K.; Sekine, M. (Obika, S. Sekine, M. eds)	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer Singapore	5. 総ページ数 284 (13)
3. 書名 Synthesis of Therapeutic Oligonucleotides (38.Effects of 2'-O-Modifications on RNA Duplex Stability)	

〔出願〕 計3件

産業財産権の名称 毒性が低減されたアンチセンスオリゴヌクレオチド	発明者 正木慶昭 清尾康志 井上敦 入山友輔 金 木達朗 中嶋宏之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、W02019/182037	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 毒性が低減されたアンチセンスオリゴヌクレオチド	発明者 正木慶昭 他5名	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/011801	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 毒性が低減されたアンチセンスオリゴヌクレオチド	発明者 正木慶昭 清尾康志 井上敦 入山友輔 金 木達朗 中嶋宏之	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-052578	出願年 2018年	国内・外国の別 国内



〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------