

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14363

研究課題名(和文) アンチセンス薬の腎毒性を回避する新規設計法の構築

研究課題名(英文) Development of novel designs for avoiding the renal accumulation of antisense oligonucleotides

研究代表者

和田 郁人(WADA, FUMITO)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：90760843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アンチセンス薬の腎毒性を回避することをゴールに据え、腎臓への蓄積を回避するアンチセンス薬を創造する。

一つ目の戦略として、分子量を調節し糸球体ろ過を回避することで、腎蓄積を避けることを考えた。具体的には、多量体を形成し得るアンチセンスを設計することで分子量増大を試みた。実際に、多量体の形成と動物への有効性を確認した。

二つ目に、アンチセンスの脂溶性を高め、アルブミンと相互作用させ血中滞留性を向上させることで、腎臓への移行を回避することを考えた。実際に、コレステロールを接合することで、活性を維持したまま大幅に腎臓への移行を回避することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、アンチセンス分子の活性を損なわず様々な分子の修飾や設計を可能にしたことから、アンチセンス分子の体内動態を制御するための学術的に重要な知見である。また、アンチセンス分子の腎臓への蓄積を大幅に抑制することに成功したことから、アンチセンス医薬の主な毒性の一つである腎障害を克服し得、アンチセンスという新たな分野の医薬開発に貢献する社会的にも意義のある成果と言える。

研究成果の概要(英文)：One of the toxic effects of antisense oligonucleotides (ASOs) is renal injury due to excess accumulation of ASOs. We invented two novel designs of ASOs for avoiding the renal accumulation of ASOs.

It is known that molecules having high molecular weight are less filtered at the glomerulus. Thus, firstly, in order to increase the molecular size of ASOs, we developed ASOs that formulate the multimeric complex. We demonstrated the formulation of the tetrameric ASOs and verified the in vivo efficacy.

Secondly, we designed lipophilic ASOs. Lipophilic molecules bind albumin in the blood, and its half-life in blood is elongated. We conjugated cholesterol or palmitic acid to ASOs. Cholesterol conjugation strategy succeeded in reducing the renal accumulation of ASOs while maintaining the efficacy of ASOs.

研究分野：核酸医薬

キーワード：アンチセンス リガンド DDS

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

本研究では、アンチセンス薬の腎毒性を回避することをゴールに据え、申請者が見出したアンチセンス修飾法を応用し、腎臓への蓄積を回避するアンチセンス薬を創造する。アンチセンス薬はヒトに対しては腎毒性を顕著に示し、開発中止に至ったアンチセンス薬も存在する。治験ではアンチセンス薬の過剰蓄積を原因とする急性尿細管壊死が観察され、臨床応用するには尿細管細胞への蓄積を回避することが必須の課題である。

2. 研究の目的

アンチセンス薬は水溶性の分子であるため糸球体ろ過を受けやすく、一部が再吸収の過程で近位尿細管上皮細胞へ取り込まれ過剰に蓄積する。したがって、腎臓への蓄積を軽減するには、糸球体ろ過から逃れる必要がある。本研究では、①脂溶性の向上、②分子量の増大の観点から糸球体ろ過を逃れる新たなアンチセンス構造を設計し、活性を損なわず腎臓への蓄積を低減させる適切な設計を見出し、腎毒性回避を目指す。

3. 研究の方法

(1) 多量体形成アンチセンスの設計

3量体または4量体を形成させるための20塩基前後のタグ配列をそれぞれ3種および4種類設計し、活性本体となる13塩基長のapobに対するアンチセンス配列に対してそれぞれ連結した。多量体を想定通りに形成し得るかどうか、RNAの二次構造予測システム(IPknot)を用いてシミュレーションした。

(2) アンチセンスの多量体形成能の評価

合成した3量体または4量体を形成し得るタグ付きアンチセンスをそれぞれ等モルずつ混合し、95°Cウォーターバスで加温後、室温になるまで静置した。その後、3%アガロースゲルまたは12%TBEポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。その後、ゲルをSYBR Goldにて染色し、移動度を観察した。

(3) 脂溶性分子接合型アンチセンスの設計

脂溶性分子として、コレステロールとパルミチン酸を選択し、それぞれリンカーを介して13塩基のapobに対するアンチセンス分子へと接合する構造を設計し、核酸自動合成機により合成を行った。

(4) 投与実験

野生型マウス(C57BL/6j, 7-9週齢, 雄)に対して8.75 - 35 nmol/kgの用量で、各群4匹ずつ尾静脈より単回投与を行った。投与3日後、採血を行ったのち、肝臓および腎臓を摘出した。肝臓における活性はapobおよびハウスキーピング遺伝子であるgapdhのmRNA発現量を定量的PCRで評価した。肝臓および腎臓におけるアンチセンス分子の蓄積量については、enzyme linked oligonucleotide sorbent assay (ELOSA)にて評価を行った。

4. 研究成果

(1, 2) 多量体アンチセンスの設計および多量体系性能の評価

糸球体によるろ過を受ける分子は、約40 kDa以下の大きさとされ、現在一般的なアンチセンス分子は5 kDa前後であるため、ろ過の対象となる。したがって、ろ過を受けにくい大きさに調整するため、自在に多量体を形成する構造体を設計し、目標の40 kDa前後となる3量体および4量体を形成しうるアンチセンス分子を合成した。多量体形成の原理は、ハイブリダイゼーションによる非共有結合であるため、アニーリング後に、ゲル電気泳動にて多量体の形成を評価した

(図1)。その結果、3量体に関しては、想定外の複合体も一部形成している可能性が示唆されたが、4量体はどちらの評価法においても単一のバンドが確認され、設計通りの構造体が形成できているものと判断した。

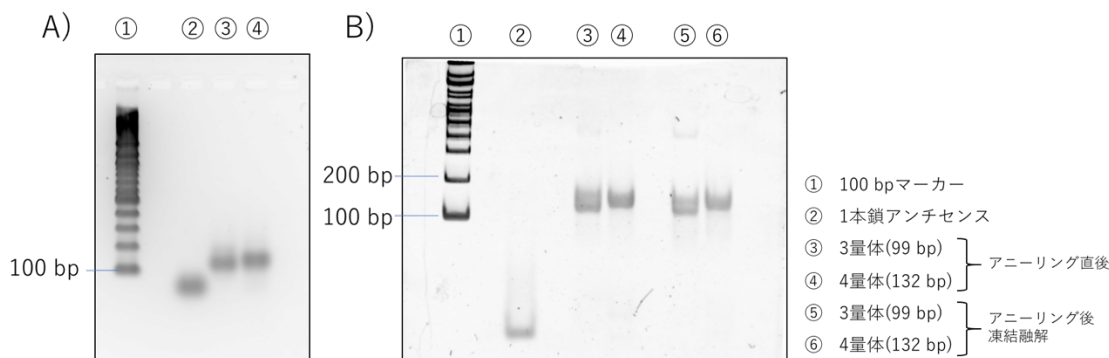


図1 ゲル電気泳動による多量体形成の評価 A)3%アガロースゲル, B)12%ポリアクリルアミドゲル

(3) 脂溶性分子接合型アンチセンスの設計

脂溶性分子は血中においてアルブミン等へのタンパク質と相互作用することで、血中半減期が長いことが知られている。一方で、水溶性の高い分子は、直ちに尿中に排泄させる。アンチセンス分子は水溶性の高い分子でほとんどが尿中に排泄される。したがって、脂溶性を高めるために、本研究では肝指向性リガンドを修飾したアンチセンスに対してコレステロールやパルミチン酸を、それぞれトリエチレングリコールリンカーおよびヘキシルアミノリンカーを介して接合する構造を設計した。設計したものを、実際に核酸自動合成機にて合成したところ、一般的な条件にてそれぞれ合成可能であった。

(4-1) 多量体形成アンチセンスの動物への投与実験

1本鎖アンチセンス（単量体アンチセンス）および上述と同様に多量体アンチセンスを形成させたものを、野生型マウスに対して 8.75 nmol/kg の用量で尾静脈より投与を行ったところ、多量体を形成させたアンチセンス分子は、1本鎖アンチセンスよりも大幅に標的である apoB の発現抑制活性を落とす結果となった（図 2A）。一方で、肝臓への蓄積量は、優位な変化がなかったことから（図 2B）、肝臓へは送達されていることが分かった。この原因として、種々のオリゴ核酸安定化修飾を導入した多量体構造が肝臓内で解離できず、アンチセンスの作用を阻害したものと考えられる。

上記結果を受けて、肝臓へ取り込まれた後に多量体構造が直ちに分解され、活性本体であるアンチセンス分子がリリースされるように、多量体形成部位の核酸修飾を見直し、再度、上記と同じ投与実験を実施した。その結果、図 2A に示す 1本鎖アンチセンスと同程度まで肝臓における活性が回復した（図 3）。

以上の結果から、アンチセンスの分子サイズが腎蓄積へ与える影響については今後の課題であるが、分子サイズを調整可能なアンチセンスを設計する上での重要な知見が得られ、これはアンチセンス分子の医薬品としての応用可能性を広げるものとする。

(4-2) 脂溶性分子接合型アンチセンスの動物への投与実験

まず、設計した脂溶性分子が活性に及ぼす影響を評価するために、肝指向性リガンドのみ（GN アンチセンス）、およびコレステロール（GN-Chol アンチセンス）もしくはパルミチン酸（GN-Pal アンチセンス）をさらに接合したアンチセンス分子を、8.75 nmol/kg で尾静脈より単回投与を行い、3日後に肝臓における apoB mRNA の定量を行った。その結果、大きな活性の低下は確認されなかった（図 4A）。この時の、腎臓へのアンチセンスの蓄積を予備的に定量したところ、コレステロールを接合したアンチセンスで、腎臓への蓄積が減少傾向にあったため、より正確に定量すべく投与量を4倍の 35 nmol/kg にして同様の試験を行った。また、肝指向性リガンドのみの影響も検証するために、何も修飾の施していないアンチセンスと、GN アンチセンスおよび GN-Chol アンチセンスの群で比較を行った。肝指向性リガンドのみでは、血中滞留性に大きな影響を与えないことから腎臓への移行にもあまり影響はないものと想定していたが、実際には、修飾なしのアンチセンスよりも腎臓への蓄積は10分の1に減少し、さらにコレステロールを修飾したことで50分の1まで抑えられていた（図 4B）。

以上の結果より、分子の脂溶性を高めて血中滞留性を向上させることは、腎臓への蓄積を抑制する戦略として有効であること実証されたものとする。さらに、全身投与され全身を循環するアンチセンスの軌道を積極的に肝臓へと修正することで、腎臓への移行も大幅に抑制可能であるという重要な知見もえられた。本研究結果は、アンチセンスの主要な毒性の一つである腎毒性を克服し得るものと期待でき、今後の実用化に向けて開発を進めたい。

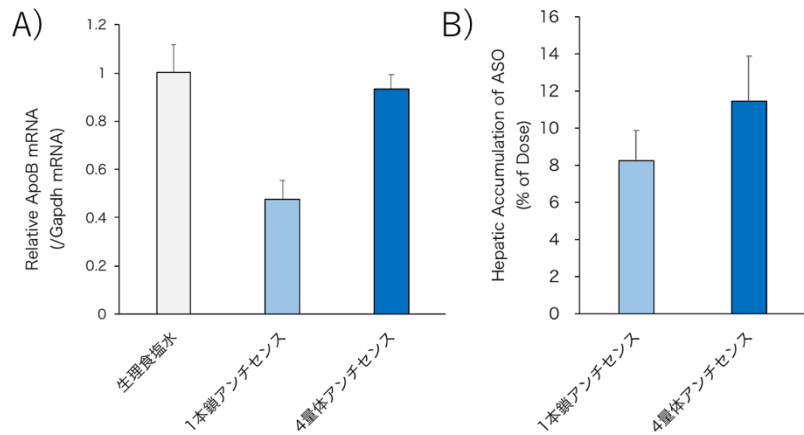


図2 多量体アンチセンスのマウスへの投与試験
A)肝臓中ApoB mRNA発現量, B)肝臓へのアンチセンスの蓄積量

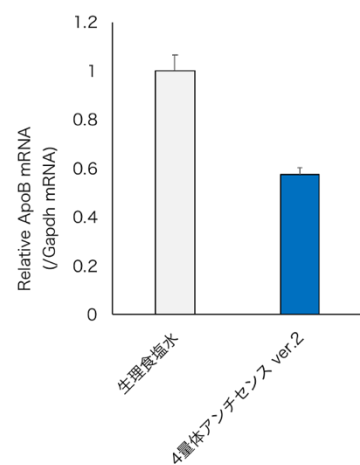


図3 改善型多量体アンチセンスのマウスへの投与試験

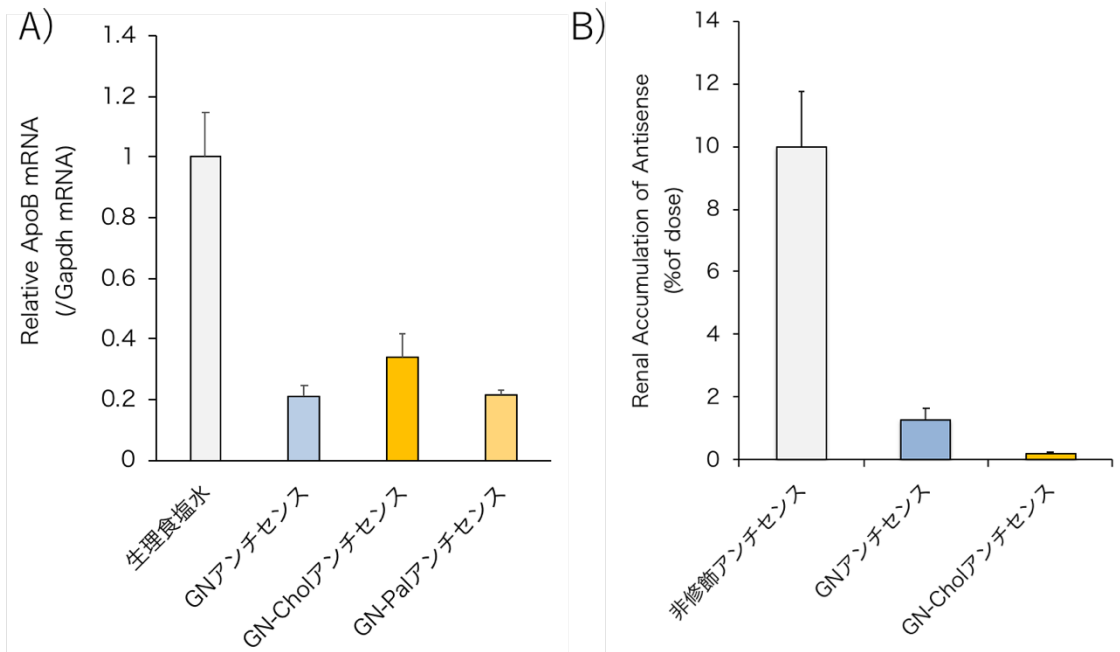


図4 脂溶性分子接合型アンチセンスのマウスへの投与試験
 A)肝臓中ApoB mRNA発現量, B)腎臓へのアンチセンスの蓄積量

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Yamamoto Tsuyoshi, Sawamura Motoki, Terada Chisato, Kashiwada Koki, Wada Fumito, Yamayoshi Asako, Obika Satoshi, Harada-Shiba Mariko	4. 巻 39
2. 論文標題 Effect of modular conjugation strategy for N-acetylgalactosamine-targeted antisense oligonucleotides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 109 ~ 118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15257770.2019.1677911	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Wada F, Kakuni M, Harada-Shiba M
2. 発表標題 valuation of Antisense Oligonucleotides Targeting Human mRNA Using Chimeric Mice with Humanized Liver
3. 学会等名 15th OTS（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田郁人, 加国雅和, 斯波真理子
2. 発表標題 ヒト肝臓キメラマウスを核酸医薬の評価モデルに応用するための基礎検討と実用性評価
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第5回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Wada F, Yamamoto T, Tachibana K, Kobayashi T, Harada-Shiba M
2. 発表標題 Preclinical pharmacology and safety studies of GalNAc-conjugated antisense oligonucleotides targeting human PCSK9
3. 学会等名 ISA 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----