

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03393

研究課題名(和文)患者フレンドリーな核酸医薬を実現する核酸経口剤化技術の新規基盤構築

研究課題名(英文) Establishment of a new platform for nucleic acid oral formulation technology to realize patient-friendly nucleic acid medicines

研究代表者

斯波 真理子 (Harada-Shiba, Mariko)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・非常勤研究員

研究者番号：70271575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：核酸医薬の多くは注射薬であるが、注射部位反応の問題があることから、安全性・低侵襲性・利便性に立脚した経口薬の開発が望まれる。本研究においては、家族性高コレステロール血症を対象として、核酸医薬の経口投与実現を目指した。腸溶性カプセル化、腸管吸収を促進する分子の探索、標的組織までの動態制御リガンドの修飾、の検討を行い、核酸医薬の経口投与後、肝臓において標的遺伝子発現を抑制することに成功した。本技術は、脂質異常症をはじめとする慢性疾患への核酸医薬の応用を促すことが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核酸を用いた技術であるmRNAワクチンは、遺伝子配列情報から設計、製造される特徴を持つからこそ、コロナパンデミックへの迅速な対応が可能であった。同じように、遺伝子配列情報から設計される核酸医薬も同様の特徴をもつ医薬モダリティであるが、安全性等や利便性の問題で、現在は患者数の少ない疾患に対する治療薬の開発が多い。本研究は、副作用の一つである注射部位反応や利便性の課題克服し、核酸医薬をより身近なものにするきっかけになると考える。

研究成果の概要(英文)：Most nucleic acid drugs are injectable, but because of the problem of injection site reactions, it is desirable to develop oral drugs based on safety, minimally invasiveness, and convenience. In this study, we aimed to realize oral administration of nucleic acid drugs for familial hypercholesterolemia. We have successfully suppressed the expression of target genes in the liver after oral administration of nucleic acid drugs. This technology is expected to promote the application of nucleic acid medicine to chronic diseases such as dyslipidemia.

研究分野：代謝学

キーワード：核酸医薬 家族性高コレステロール血症 DDS

1. 研究開始当初の背景

研究代表者 斯波は、家族性高コレステロール血症 (FH) ホモ接合体 (HoFH) などの脂質異常症難病を診療する中で、現在の治療法の限界を感じ、理論的にあらゆる分子を標的にできる核酸医薬に着目し、本研究の分担研究者であり核酸医薬専門家である山本、橘、和田ら基礎研究から非臨床試験まで開発を進めてきた (Mol Ther Nucleic Acids, 2012, 1, e22, Eur J Pharmacol, 2014, 723, 353)。核酸医薬は、このような疾患にして優れた有効性を示すことは、臨床でも十分に証明されつつある一方で、現在認可されている核酸医薬の全てが注射剤であり、副作用として重度の注射部位反応を頻発することが大きな問題の一つである。例えば、HoFH に対する治療薬として米国で承認された核酸医薬である Kynamro (現在販売中止) でも、重度の注射部位反応が報告されている (Br J Clin Pharmacol, 2016, 82, 340 他)。HoFH のように長期投与を必要とする疾患では、患者に掛かる負担がより大きく治療継続出来なくなる例も多いため、有効性が期待される数少ない治療薬を継続的に利用可能にするために、この副作用の克服は必要である。

2. 研究の目的

本研究においては、研究代表者 斯波の専門であり多く患者を診療している HoFH を対象疾患として、より安全で使いやすい、経口型核酸医薬の新規基盤を構築することを目的とする (図 1)。具体的には、下記の検討を行う。

消化管内での安定化を目的とした液体カプセル化

腸吸収を促進する分子の探索

体内動態制御のためのリガンド結合最適化

3. 研究の方法

本研究では、リポタンパク質形成や脂質クリアランスの鍵分子であるアポリipoprotein B (apoB) を標的とした核酸医薬を用いて、検討を進める。apoB は HoFH の治療薬として承認された核酸医薬である Kynamro の標的遺伝子である。

消化管内での安定化を目的とした液体カプセル化

核酸分子を水溶液の状態ではカプセル化を可能にするために、素材の探索を行い、腸溶性皮膜・保護油脂・水溶液の 3 層構造となるカプセルを使用した。胃液に近い酸性溶液における核酸そのもの、またはこのカプセルの耐久性を評価した。

腸管吸収を促進する分子の探索

- 併用分子：文献の中から探索した分子について、核酸医薬の腸管吸収を促進する分子を見出すために、caco-2 細胞を用いた in vitro 実験、マウスを用いた in vivo 実験により評価を行う。
- コンジュゲート分子：Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX 法) を応用した方法により、核酸分子の腸管吸収を促すアプタマーの探索を行った。

体内動態制御のためのリガンド結合最適化

本研究の標的臓器は肝臓になるため、山本と共同で開発を進めてきた肝臓標的化技術 (GalNAc コンジュゲート) を用いて、各種の試験の実施を通して、適応可能性を評価した。

4. 研究成果

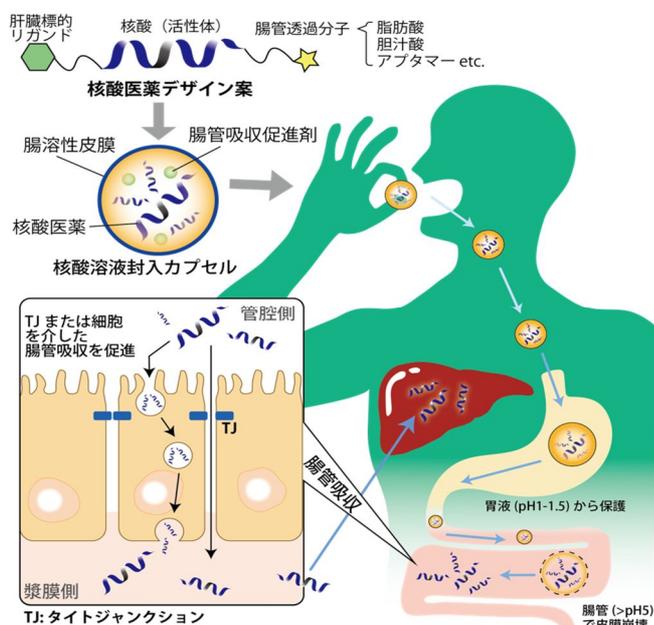


図 1 経口型核酸医薬の構想

消化管内での安定化を目的とした液体カプセル化

本研究で使用する核酸分子およびカプセルの酸 (pH1.2) 耐性を確認したところ、核酸分子は数時間のうちに少しずつ分解され、24 時間後には多くが分解された。また、カプセルについては、酸性条件では、透明な皮膜が数時間に渡り保持され、中性条件では速やかに皮膜が消失したことから、胃から腸への移行後に速やかにカプセルが崩壊することが期待された (図 2)。

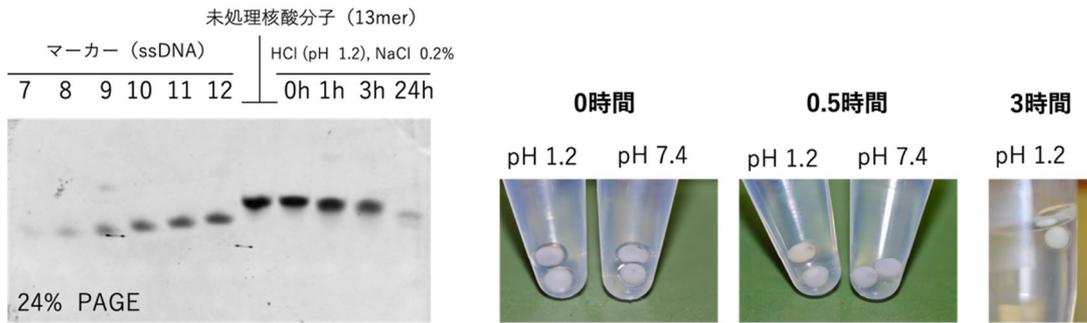


図2 核酸およびカプセルの酸耐性

② 腸管吸収を促進する分子の探索

1) 併用分子

文献で探索したいくつかの分子について、caco-2 細胞を用いた膜透過実験を実施し、核酸分子の透過を大きく促す分子を見出した (図 3)。

2) コンジュゲート分子

SELEX 法した Systematic Evolution of Permeation molecules by Exponential Enrichment (SEPEX 法) を考案し (図 4)、caco-2 細胞で形成された膜を透過

しやすいアプタマーの探索を行った。サイクルを 2 サイクル回したが、膜を透過する核酸の量が増加しなかったことから、膜を透過しやすい特定の配列が濃縮されていないことが考えられた。原因は、設計したアプタマーの分子量が大きすぎることで、または caco-2 細胞を用いた評価系の条件が適切ではなかったことが考えられ、アプタマーの取得にはより適切な分子設計や評価条件の最適化が必要と考えられた。

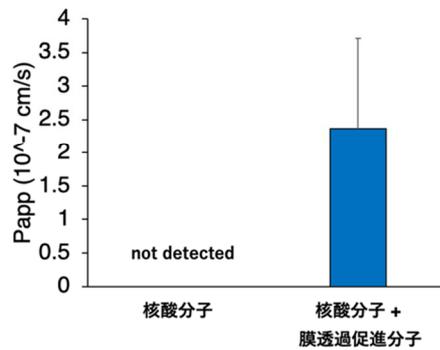


図3 caco-2細胞で形成された膜の透過性

体内動態制御のためのリガンド結合最適化

のカプセルおよび、の併用型の吸収促進分子を用いて、肝臓標的化分子を修飾した核酸医薬のマウスへの投与実験を行なった。核酸医薬は、臨床で使用実績のある Kynamro と同程度の投与量である 3 mg/kg を設定し、カプセルありなし、絶食・非絶食下の条件で経口投与を行い、4 日後に肝臓における apoB mRNA の定量を行なった。なお、投与量は、想定した量をカプセルに封入できていると仮定した際の値である。

非絶食下では、カプセルの有無で活性に差は認められなかったものの、絶食下においては、カプセルに封入することで、安定して標的遺伝子の発現を抑えることに成功した。

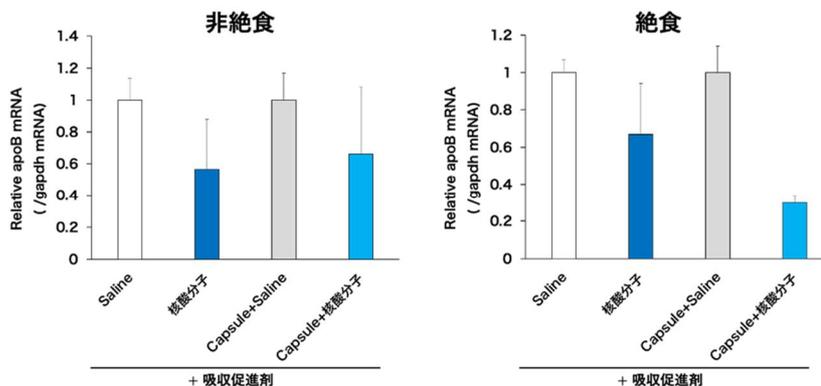


図4 マウスに対する投与実験：肝臓における標的遺伝子発現量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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, Terada Chisato, Kashiwada Koki, Yamayoshi Asako, Harada Shiba Mariko, Obika Satoshi | 4. 巻 78 |
| 2. 論文標題 Synthesis of Monovalent N Acetylgalactosamine Phosphoramidite for Liver Targeting Oligonucleotides | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry | 6. 最初と最後の頁 1~18 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cpnc.99 | 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 - |
| 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 - |
| 1. 著者名 Yamamoto Tsuyoshi, Mukai Yahiro, Wada Fumito, Terada Chisato, Kayaba Yukina, Oh Kaho, Yamayoshi Asako, Obika Satoshi, Harada?Shiba Mariko | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Highly Potent GalNAc-Conjugated Tiny LNA Anti-miRNA-122 Antisense Oligonucleotides | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Pharmaceutics | 6. 最初と最後の頁 817~817 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics13060817 | 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 - |
| 1. 著者名 Wada Fumito, Yamamoto Tsuyoshi, Kobayashi Tadayuki, Tachibana Keisuke, Ito Kosuke Ramon, Hamasaki Mayumi, Kayaba Yukina, Terada Chisato, Yamayoshi Asako, Obika Satoshi, Harada-Shiba Mariko | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 Drug discovery and development scheme for liver-targeting bridged nucleic acid antisense oligonucleotides | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Therapy - Nucleic Acids | 6. 最初と最後の頁 957~969 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omtn.2021.10.008 | 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 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Terada Chisato, Wada Fumito, Uchida Mei, Yasutomi Yukari, Oh Kaho, Kawamoto Seiya, Kayaba Yukina, Yamayoshi Asako, Harada-Shiba Mariko, Obika Satoshi, Yamamoto Tsuyoshi | 4. 巻 31 |
| 2. 論文標題 Programmed Instability of Ligand Conjugation Manifold for Efficient Hepatocyte Delivery of Therapeutic Oligonucleotides | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Nucleic Acid Therapeutics | 6. 最初と最後の頁 404 ~ 416 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/nat.2021.0036 | 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4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Wada F, Kakuni M, Harada-Shiba M |
| 2. 発表標題 Evaluation 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 ~ 2020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 ~ 2020年 |

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 斯波真理子, 和田郁人, 山本剛史 |
| 2. 発表標題 脂質異常症を対象としたアンチセンスの開発 |
| 3. 学会等名 第35回日本DDS学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 ~ 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 斯波 真理子 |
| 2. 発表標題 原発性高カイトミクロン血症の病態とアンチセンスを用いた新規治療法の開発 |
| 3. 学会等名 第20回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年～2022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 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 橋 敬祐 (Keisuke Tachibana) (30432446) | 大阪大学・薬学研究科・講師 (14401) | |
| 研究分担者 | 山本 剛史 (Tsuyoshi Yamamoto) (80636994) | 長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授 (17301) | |
| 研究分担者 | 和田 郁人 (Fumito Wada) (90760843) | 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 (84404) | |

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 |
|---------|---------|