

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06991

研究課題名（和文）遺伝子増幅法による生体試料からの核酸医薬品の測定

研究課題名（英文）Measurement of nucleic acid medicine in biomaterials by enzymatic amplification methods

研究代表者

張替 直輝（HARIKAI, Naoki）

日本大学・薬学部・教授

研究者番号：90454743

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究により、Fomivirsenに対してLigase Detection Reaction (LDR) と Deoxyuridine含有プローブを用いたPCRの改変法の2つの遺伝子増幅法による測定法を開発した。特にLDRでは、簡便な操作で血清試料から0.6～160 nMのFomivirsenが測定できた。また、Nusinersenにおいても、血清試料から0.8～100 nMのNusinersenが測定できた。そして、実際にNusinersenを髄腔内投与したマウスの血漿からNusinersenを測定することもでき、LDRを用いた本測定法が核酸医薬品の体内動態の解析に応用できることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年開発が進む核酸医薬品の有効性と安全性を高める上で、その体内動態の解析が必要である。本研究では、高い特異性と感度を持つ遺伝子増幅法に着目した。しかし、遺伝子増幅法による測定法を開発する上で、核酸医薬品は15～30塩基程度と短く、更に人工核酸が導入されていることが問題である。そこで、それらを解決するために、人工核酸に適応できる酵素を明らかにし、短い塩基数のポリヌクレオチドが測定できる遺伝子増幅法を開発した。更に、その遺伝子増幅法に適した前処理法と組み合わせることで、血漿および血清中の核酸医薬品を測定することができた。この研究成果は、他の核酸医薬品の測定法の開発にも応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed the detection methods for fomivirsen using two nucleic acid amplification methods, ligase detection reaction (LDR) and modified PCR using a deoxyuridine-containing probe. In particular, the LDR was able to detect 0.6 to 160 nM fomivirsen in serum samples with a simple procedure. In addition, we also developed the detection method for nusinersen using LDR. Nusinersen was detected from 0.8 to 100 nM in serum samples. Then, the LDR method was applied to analyze the plasma nusinersen levels in mice injected by intraspinal injection of nusinersen. This result showed that the developed LDR method could be applied to the analysis of pharmacokinetics of a nucleic acid medicine.

研究分野：分析化学

キーワード：遺伝子増幅法 核酸医薬品 Fomivirsen Nusinersen LDR

## 1. 研究開始当初の背景

核酸医薬品は、遺伝性疾患、癌、ウイルス感染症など、様々な治療に期待されており、世界では2023年4月時点で17種類が承認されている。国内では、Pegaptanib、Nusinersen、Patisiran、Givosiran、Viltolarsen、Vutrisiranの6品目が承認され、うち5品目は2017年以降のものであり、その開発と市場導入が活発化している。その核酸医薬品の開発と医薬品の安全使用を支える上で、体内動態の解析が重要である。これまでの核酸医薬品の測定に関する研究では、液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/MS)、キャピラリーゲル電気泳動などの機器分析が盛んであり、それらは精度が高く、質量分析からは構造も予測できるため、核酸医薬品の品質管理には有用である。しかし、生体試料中の核酸医薬品は、体内の核酸と構造が類似するため特異的に測定することが難しい、体内のヌクレアーゼで分解するため濃度が低い、親水性が高いためLC/MSではイオン化が難しいなどの問題があり、優れた測定法は未だ開発されていない。

一方で、Nusinersen などについては Noncompetitive Hybridization Nuclease-based Enzyme Linked Immunosorbent Assay を用いて、血中の Nusinersen 濃度の測定に成功している。このようにハイブリダイゼーションを用いた方法は、共雑物質を多く含む生体試料から特異的に対象配列を検出する上で有用な手段と考えられる。更に遺伝子増幅法は、ハイブリダイゼーションの特異性に加え、増幅によって高い感度を兼ね備えた方法である。更に、測定操作も比較的簡便である。しかし、核酸医薬品の測定に応用されていないのが現状である。その要因として、核酸医薬品は15~30塩基程度と短いものが多く、その多くの塩基に人工核酸が導入されていることが挙げられる。

それらを解決するためには、人工核酸に適応できる酵素を明らかにし、短い塩基数のポリヌクレオチドが測定できる遺伝子増幅法を開発することが必要である。そして、その遺伝子増幅法に適した生体試料の前処理法と組み合わせることで、核酸医薬品の体内動態の解析への応用が期待される。

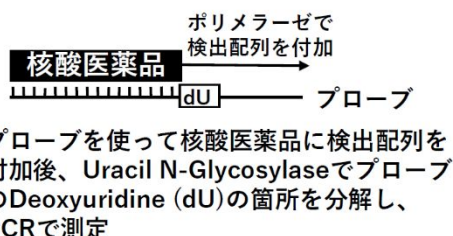
## 2. 研究の目的

遺伝子増幅法は、プライマーやプローブをハイブリダイズさせ、酵素を用いて増幅させることで、高い特異性と感度を有する測定法である。本研究では、核酸医薬品に最適化した遺伝子増幅法を開発し、血液中の核酸医薬品の定量を目指した。

中でも遺伝子増幅法として Polymerase Chain Reaction (PCR)、Ligase Chain Reaction (LCR)、リガーゼ反応とPCRを組み合わせた Ligase Detection Reaction (LDR) に着目し(下図)核酸医薬品の測定に適応できるかを検討した。核酸医薬品に導入されているヌクレオチドには、ホスホロチオエート化(S化)や2'-O-methoxyethyl化(2'-MOE化)などの化学修飾が施されているため、最初にそれらの人工核酸に対する酵素の反応性を検証した。次に、15~30塩基程度と比較的少ない塩基数で構成される核酸医薬品が測定できるように遺伝子増幅法の最適化を行い、世界初の核酸医薬品である Fomivirsen と近年開発された Nusinersen の測定法を開発を行った。

また、生体試料からの核酸医薬品の測定のためには、前処理が必要である。そこで、簡便な抽出法であるアルカリ抽出法や一般的な核酸抽出に汎用されているスピンカラム抽出法に着目し、遺伝子増幅法に適した血漿及び血清の前処理法を検証した。そして最後に、遺伝子増幅法によって実際の生体試料中の核酸医薬品を定量できるかについて検証するため、Nusinersen を髄腔内投与したマウスから採血を行い、これまでに開発した遺伝子増幅法を用いて血漿中の Nusinersen 濃度を測定した。

### ・ PCRの改変法



### ・ LDR

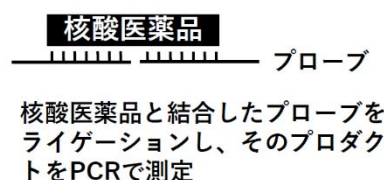


図. 遺伝子増幅法 (PCRの改変法とLDR)

### 3. 研究の方法

#### (1) 人工核酸を導入したポリヌクレオチドに対するリガーゼの反応性

19 塩基の Nusinersen の配列の DNA、RNA、S 化 DNA、2'-MOE 化及び S 化 RNA を核酸医薬品のモデル試料とした。その配列の相補鎖の約半分をそれぞれ 5'末端と 3'末端に持つ DNA を合成し、ライゲーションプローブとした。そのモデル試料とライゲーションプローブを用いて、8 種類のリガーゼと反応させた。ライゲーションを確認するため、その反応液を希釈し、その結合部位を検出する定量 PCR を行った。

#### (2) Fomivirsen の測定

##### LCR と LDR を用いた Fomivirsen の測定

LCR の検討では、LNA を挿入した 10 と 11 塩基からなる 4 つのライゲーションプローブを作成した。この LCR の反応系に SYBR Green を加え、定量 LCR を検討した。

一方、LDR の検討では、Fomivirsen の配列の相補鎖の約半分をそれぞれ 5'末端と 3'末端に持つ直鎖 DNA のライゲーションプローブを Fomivirsen とリガーゼで環状にし、その結合部位を SYBR Green を用いた定量 PCR で検出した。

##### LDR を用いた Fomivirsen の測定法の改良

Fomivirsen に対するライゲーションプローブに Deoxyuridine を導入し、定量 PCR 試薬に含まれている Uracil N-Glycosylase によって、ライゲーションで環状となったプローブを直鎖にした。更に、その検出に用いた定量 PCR では、人工核酸を導入した検出用加水分解プローブを使用した。また、生体試料由来 DNA の影響を検討するため、HeLa genomic DNA を 1 ng/ $\mu$ L を添加した Fomivirsen 水溶液からの測定も行った。

##### 血清中の Fomivirsen の測定

EDTA を添加したマウス血清に Fomivirsen を添加し、その試料 10  $\mu$ L にアルカリ抽出法を用いた Kaneka Easy DNA Extraction Kit version 2 (Kaneka 社)の Solution A 100  $\mu$ L を加え、98 °C で 8 分間反応した。その反応液に Solution B 14  $\mu$ L と水 126  $\mu$ L を加え、混和したものを LDR で測定した。

##### Deoxyuridine 含有プローブを用いた PCR の改変法による Fomivirsen の測定

Fomivirsen の相補鎖を含む Deoxyuridine 含有プローブ、試料、DNA ポリメラーゼを混合したのち、伸長反応させた。その反応液を 50 倍希釈し、定量 PCR 試薬、FAM 標識加水分解プローブ、プライマー、Uracil N-Glycosylase を加え、Deoxyuridine 含有プローブを分解した。その後、伸長反応で得られたプロダクトを定量 PCR で測定した。

#### (3) Nusinersen の測定

##### LDR を用いた Nusinersen の測定

Deoxyuridine を導入した Nusinersen に対するライゲーションプローブをライゲーションし、環状のプロダクトを生成させた。定量 PCR 試薬に含まれている Uracil N-Glycosylase によってそのプローブを直鎖にした後、定量 PCR で測定した。その測定には、人工核酸を導入した検出用加水分解プローブを使用した。また、生体試料由来 DNA の影響を検討するため、HeLa genomic DNA を 1 ng/ $\mu$ L を添加した Nusinersen 水溶液からの測定も行った。

##### Nusinersen 髄腔内投与マウスの血中濃度の解析

Fomivirsen で用いたアルカリ抽出法では、血清試料から Nusinersen を定量的に検出することができなかった。そこで、マウス血清に Nusinersen を添加し、固相抽出法を検討した。更に、7.5  $\mu$ g の Nusinersen をマウスの髄腔内に単回投与し、0、1、2、4、6 時間後に採血した。それらの血漿試料から LDR 法にて Nusinersen を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) 人工核酸を導入したポリヌクレオチドに対するリガーゼの反応性

8 種類のリガーゼを用いて、人工核酸を導入した各ポリヌクレオチドとのハイブリダイゼーションに伴うライゲーションを検討したところ、その内の 6 つの酵素が DNA と S 化 DNA の試料で、2 つの酵素が DNA、RNA、S 化 DNA でライゲーションに伴う PCR による増幅が認められた。一方、RNA と 2'-MOE 化・S 化 RNA の試料には 1 つの酵素で増幅が認められた。これらの結果から、人工核酸を導入したポリヌクレオチドには適したリガーゼが存在し、LCR や LDR を行う際にはその適性を考慮する必要があった。

#### (2) Fomivirsen の測定

##### LCR と LDR を用いた Fomivirsen の測定

LCR では、Fomivirsen の濃度に依存した増幅曲線が得られず、Fomivirsen を定量的に測定することはできなかった。しかし、その増幅産物をゲル電気泳動で解析することで 1.6 nM までの Fomivirsen を検出することができた。

一方、LDR では Fomivirsen の濃度に依存した増幅曲線が得られ、1 ~ 100 nM の濃度で定量的に検出することができた。しかし、その反応液をゲル電気泳動で解析したところ、ラダー状に複数の増幅産物が確認された。

#### LDR による Fomivirsen の測定法の改良

改良した測定法の反応液をゲル電気泳動で解析したところ、増幅領域の長さとも一致する位置に単一のバンドを得ることができた。そして、0.025 ~ 6.4 nM Fomivirsen 水溶液の測定では、濃度の増加に伴い Ct 値が低くなり、濃度の対数と Ct 値の間に直線関係が得られた ( $r^2 = 0.990$ )。また、HeLa genomic DNA を加えた 0.025 ~ 6.4 nM Fomivirsen 溶液でも、濃度の対数と Ct 値の間に直線関係が得られた ( $r^2 = 0.974$ )。従って、本改良により Fomivirsen の検出感度を 40 倍向上させることができた。

#### LDR による血清中の Fomivirsen の測定

0.6 ~ 160 nM の Fomivirsen を含む血清試料を LDR で測定したところ、濃度の増加に伴い Ct 値が低くなり、濃度の対数と Ct 値の間に直線関係が得られた ( $r^2 = 0.988$ )。また、この反応液を電気泳動で確認したところ、増幅領域の長さとも一致する位置に単一のバンドが認められた。PCR に用いられる簡易 DNA 抽出試薬と LDR を組み合わせることで、簡便に血清中の Fomivirsen を測定することができた。

#### Deoxyuridine 含有プローブを用いた PCR の改変法による Fomivirsen の測定

0.1 ~ 100 nM Fomivirsen 水溶液の測定では、濃度の増加に伴い Ct 値が低くなり、濃度の対数と Ct 値の間に直線関係が得られた ( $r^2 = 0.963$ )。更に反応液をゲル電気泳動で解析したところ、増幅領域の長さとも一致する位置に単一のバンドを得ることができた。これらの結果から、dU 含有プローブを用いた PCR 法によって、Fomivirsen を測定することができた。

### ( 3 ) Nusinersen の測定

#### LDR を用いた Nusinersen の測定

0.1 ~ 10 nM Nusinersen 水溶液の測定では、濃度の増加に伴い Ct 値が低くなり、濃度の対数と Ct 値の間に直線関係が得られた ( $r^2 = 0.994$ )。更に反応液をゲル電気泳動で解析したところ、増幅領域の長さとも一致する位置に単一のバンドを得ることができた。また、HeLa genomic DNA を加えた 0.1 ~ 10 nM Nusinersen 水溶液でも、濃度の対数と Ct 値の間に直線関係が得られた ( $r^2 = 0.975$ )。これらの結果から、LDR を用いることで生体由来 DNA の存在下でも Nusinersen を定量的に測定できることが示された。

#### Nusinersen 髄腔内投与マウスの血中濃度の解析

マウス血清試料を固相抽出することで、血清中の Nusinersen を 0.8 ~ 100 nM の濃度で定量的に検出することができた。更に、その抽出法を使って Nusinersen 髄腔内投与マウスの血中濃度を測定したところ、投与後 1 時間で 17 nM、2 時間で 6.8 nM の Nusinersen が検出され、4 時間以降は検出されなかった。これらの結果から、今回開発した方法が実際の血中濃度解析にも応用できることが明らかとなった。

### ( 4 ) まとめ

本研究により、S 化 DNA で構成される Fomivirsen に対して、LDR と Deoxyuridine 含有プローブを用いた PCR の改変法の 2 つの遺伝子増幅法を用いた測定法を開発することができた。特に LDR では、簡便な操作で血清試料から 0.6 ~ 160 nM の Fomivirsen を測定可能であった。また、2'-MOE 化と S 化の修飾を受けた RNA である Nusinersen においても、血清試料から 0.8 ~ 100 nM の Nusinersen を測定可能であった。そして、実際に Nusinersen を髄腔内投与したマウスの血漿から Nusinersen を測定することもでき、LDR を用いた本測定法が核酸医薬品の体内動態の解析に応用できることが示された。今回の遺伝子増幅法による核酸医薬品の測定法は、他の核酸医薬品の測定にも応用が期待できる。

#### < 参考文献 >

- 1) 張替直輝, 角田遙香, 在間一将, 四宮一総, Ligase detection reaction による核酸医薬品 fomivirsen の定量, 日本薬学会第 142 年会 (名古屋), 2022
- 2) 角田遙香, 張替直輝, 内山拓海, 在間一将, 四宮一総, Ligase detection reaction による生体試料からの核酸医薬品 fomivirsen の定量, 第 34 回バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS 2022), 2022
- 3) 張替直輝\*, 生体試料からの核酸医薬品の測定, BIO Clinic, 36(14), 2021, 60-64

- 4) Harikai N\*, Tanaka Y, Miyashita S, Zaima K, Shinomiya K, Real-time PCR method for detection of short DNA using a deoxyuridine probe and application for detection of fomivirsen, *Biotechniques*, 73(6), 2022, 281-287

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 張替直輝	4. 巻 36巻14号
2. 論文標題 生体試料からの核酸医薬品の測定	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 60-64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Harikai N*, Tanaka Y, Miyashita S, Zaima K, Shinomiya K	4. 巻 73(6)
2. 論文標題 Real-time PCR method for detection of short DNA using a deoxyuridine probe and application for detection of fomivirsen.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biotechniques	6. 最初と最後の頁 281-287
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2144/btn-2022-0068	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 張替直輝, 角田遙香, 在間一将, 四宮一総
2. 発表標題 Ligase detection reactionによる核酸医薬品fomivirsenの定量
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 角田遙香, 張替直輝, 内山拓海, 在間一将, 四宮一総
2. 発表標題 Ligase detection reactionによる生体試料からの核酸医薬品fomivirsenの定量
3. 学会等名 第34回バイオメディカル分析科学シンポジウム(BMAS 2022)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本大学 薬学部 薬学科 張替 直輝  
<https://kenkyu-web.cin.nihon-u.ac.jp/Profiles/101/0010001/profile.html>

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
---------	---------