

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21882

研究課題名（和文）血液脳関門を自由自在に通過するオーバーハング2本鎖核酸技術の創生

研究課題名（英文）Overhanging duplex oligonucleotide penetrating BBB

研究代表者

吉岡 耕太郎（YOSHIOKA, KOTARO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：70780641

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：核酸医薬は抗体医薬に続く次世代医薬として臨床開発が急速に発展しているが、その臓器送達にはデリバリー担子の特性に依存し、加えてその毒性も大きな問題であった。研究者は、従来の1本鎖アンチセンス核酸に、突出させた相補的核酸鎖を結合させ、突出した核酸分子そのものをデリバリー担体として利用した新規2本鎖核酸であるオーバーハング2本鎖核酸(ODO)を考案した。オーバーハング構造の鎖長・核酸化学修飾においてトランスフェリン結合能を大きく向上する鎖長・核酸間結合修飾および糖部化学修飾を見出し、*in vivo*遺伝子抑制効果を向上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

従来の核酸医薬とは全く分子構造が異なるODOはリガンド分子を用いないトランスフェリン介在性細胞内取り込み能という革新性を有しており、本研究により中枢神経標的の核酸医薬のブレイクスルーを起こし、アルツハイマー病などの神経難病やうつ病など超高齢社会を迎えて健康寿命を脅かす神経精神疾患の根本治療開発への大きな波及効果が期待される

研究成果の概要（英文）：Therapeutic oligonucleotides, as the next generation of medicine following antibody therapeutics, has rapidly developed in clinical research. However, targeted organ delivery of the nucleotides has depended on the characteristics of delivery vehicles, and their toxicity remains a significant concern. The researcher has developed a novel type of double-stranded nucleic acid named overhang Double-stranded Oligonucleotide (ODO), which incorporates a protruding complementary nucleic acid strand into conventional single-stranded antisense nucleotides. The protruding nucleic acid molecule itself serves as a delivery carrier. By optimizing the chain length and nucleic acid modifications in the overhang structure, as well as discovering interchain modifications and sugar chemistry modifications that greatly enhance transferrin binding ability, researchers have successfully improved the *in vivo* gene inhibition effect.

研究分野：核酸医薬

キーワード：アンチセンス核酸 脳血液関門

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

核酸医薬は抗体医薬に続く次世代医薬として臨床開発が急速に発展し、その臓器送達技術としてリガンド分子・ナノミセル等のデリバリー技術が開発されている。しかし、その臓器送達はデリバリー担子の特性に依存し、加えてその毒性も大きな問題であった。筆者は、従来の1本鎖アンチセンス核酸(ASO)に、突出させた相補的核酸鎖をハイブリダイズさせ、突出した核酸分子そのものをデリバリー担体として利用し、標的細胞内で相補鎖が切断後に1本鎖核酸医薬となる新規2本鎖核酸であるオーバーハング2本鎖核酸(ODO、図1)を考案し、①全身投与したリガンド分子「非」結合のODO単独で多臓器で遺伝子抑制効果の向上(ED50で約5倍)に成功、②中枢神経系に局所投与(髄腔内)した場合に遺伝子抑制効果を向上させるばかりでなく、1本鎖ASOが有する中枢神経毒性を回避、③トランスフェリン(Tf)結合及びTf受容体介在性組織取り込み能を有するオーバーハング部構造を発見し、その化学修飾や鎖長の変化で結合親和性を調整が可能であることを見出した。

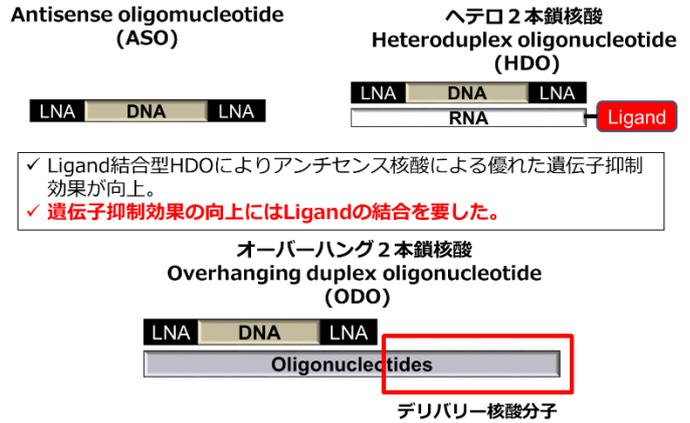


図1. 新規2本鎖核酸(ODO)

1本鎖ASOの有効性向上のため開発したヘテロ2本鎖核酸はリガンド分子依存性の限界があり、核酸分子単体でデリバリー能も有する新規2本鎖核酸(ODO)を考案した。

2. 研究の目的

そこで、Tfの有する受容体介在性の脳血流関門(BBB)通過能を生かして、従来の1本鎖核酸医薬では不可能であった、デリバリー分子を用いない「核酸分子単体の全身投与による、毒性の無い中枢神経遺伝子制御」を世界で初めて可能とする核酸医薬の創生を目指した。

3. 研究の方法

ODOの構造最適化を目的とし、

- ① 突出部分のトランスフェリン結合親和性の最適化として i) 化学修飾の種類・数、また ii) 鎖長を種々に調整したODOを合成し、A) トランスフェリンとの結合親和性の検証をゲルシフトアッセイ法(図2)、B) 有効性の検証として、マウスに投与して標的RNAの発現量変化を定量的PCR法にて行った。

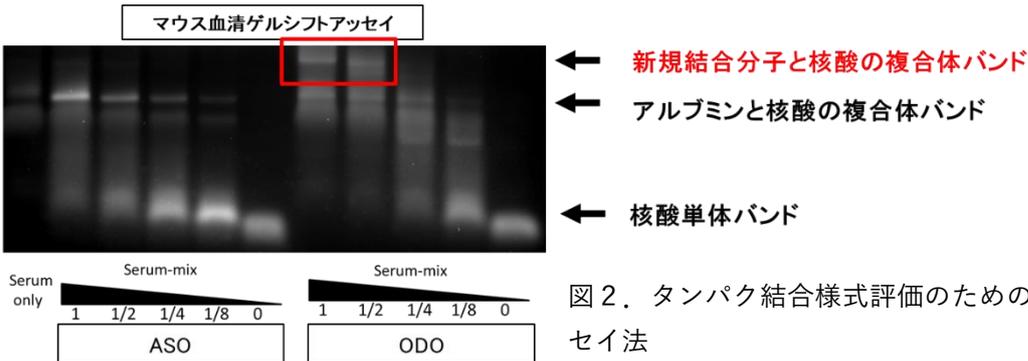


図2. タンパク結合様式評価のためのゲルシフトアッセイ法

②ODOの安全性の最適化として化学修飾の種類・数を種々に調整したODOを合成し、マウスに投与した際の、in vivo 毒性の検証をマウス神経機能評価系(acute tolerability scoring system、図3)および自発運動評価系(オープンフィールドテストを用いたvideo trackingソフトでの運動パラメータの定量解析)にて行った。

図3. 中枢神経安全性評価のための acute tolerability score system

		Score 1	Score 2	Score 3	Score 4
Category 1 Consciousness	Decreased exploration or involuntary movement	Decreased exploration	Decreased exploration	No exploration	No exploration
	Decreased responsiveness	Normal	Slightly (e.g. reduced response to touch or handling)	Moderately (e.g. reduced response to lift, no blink)	Marked (e.g. reduced response to a tail pinch)
Category 2 Motor function	Ataxia	(-)	Mild (e.g. slow righting response, swaying)	Moderate (e.g. staggering, impaired walking)	Severe (e.g. crawling)
	Strength	Decreased strength of lower limbs	No ability to climb a slope	No ability to walk	No ability to right
Category 3 Appearance	Abnormal posture	Slight	Mild (e.g. hunched, extended, low posture, straub tail)	Moderate (e.g. ventral recumbency)	Severe (e.g. lateral recumbency)
	Abnormal breathing	Normal	Normal	Shallow	Labored
Category 4 Hyperactivity	Increased home cage exploration	Slightly increased (e.g. increased exploration)	Increased (e.g. digging, burying)	Moderately increased (e.g. scratching limbs)	Marked increased
	Stereotype	(-)	Slight (e.g. increased grooming)	Moderate (e.g. circling, repetitive behavior)	Marked
Category 5 Involuntary movement	Tremor	Detectable	Marked	N.A.	N.A.
	Seizure (e.g. running, bouching, clonic and/or tonic)	(-)	(-)	Few or partial	Repeated or continuous (e.g. more than 1 min)

4. 研究成果

COVID-19 によるパンデミックの影響にて研究進捗に大きく影響を与えたが、下記の重要な知見・技術開発を成果として挙げた。

①トランスフェリンへの結合能に関してオーバーハング構造の鎖長が大きく関与することを明らかにし、最適となる鎖長を同定（図4，5）した。また核酸化学修飾の中でも、トランスフェリン結合能を大きく向上する核酸間結合修飾および糖部化学修飾を見出し、in vivo 遺伝子抑制効果を向上することに成功した。これら発見は従前の ODO 技術の可能性を大きく飛躍させる成果と考える。

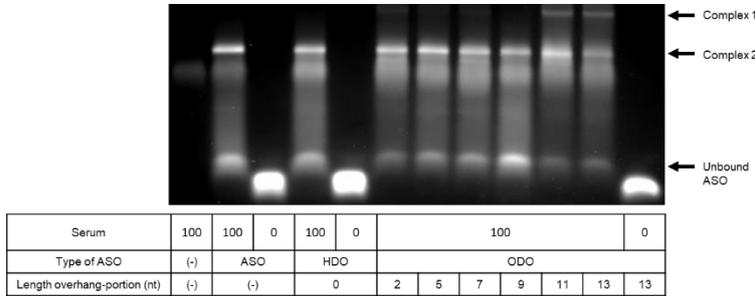


図4. ODO オーバーハング領域の鎖長による血中内タンパク結合様式変化を検証

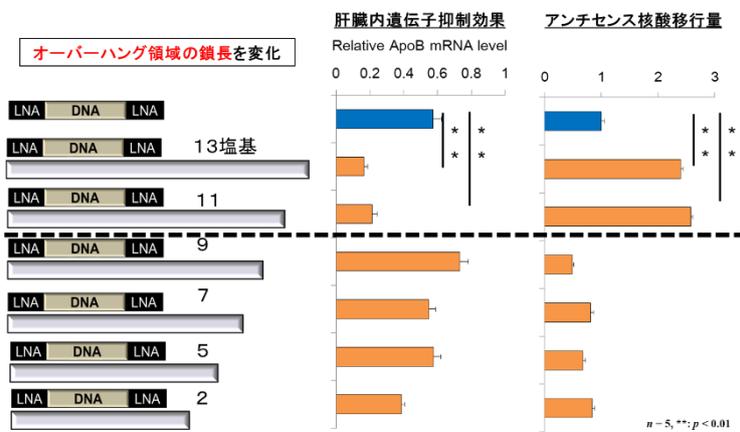


図5. ODO オーバーハング領域の鎖長による標的遺伝子制御能および臓器核酸移行能を検証

② in vivo の安全性に関して核酸化学修飾が大きく関与することを明らかに（図6）し、最適となる化学修飾パターンを同定した。またマウスに投与した際の全身での臓器分布および標的遺伝子抑制効果を明らかにした。これら発見は ODO 技術の臨床応用の推進に重要な結果と考える。

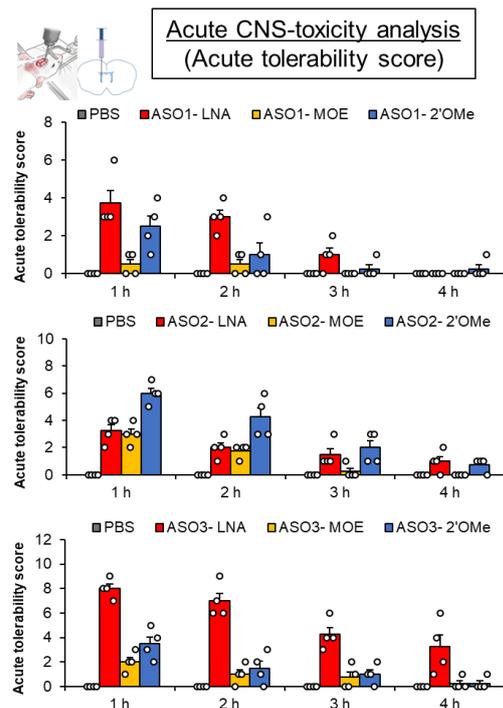
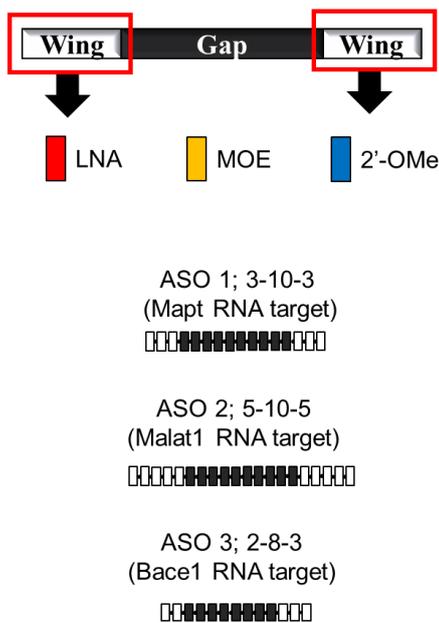


図6. 核酸化学修飾による中枢神経毒性の相関関係の検証

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1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 Li Fuying, Ichinose Keiko, Ishibashi Satoru, Yamamoto Syunsuke, Iwasawa Eri, Suzuki Motohiro, Yoshida-Tanaka Kie, Yoshioka Kotaro, Nagata Tetsuya, Hirabayashi Hideki, Mogushi Kaoru, Yokota Takanori	4. 巻 31
2. 論文標題 Preferential delivery of lipid-ligand conjugated DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide to ischemic brain in hyperacute stage	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 1106 ~ 1122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2023.01.016	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 Jia Chunyan, Lei Mon Su Su, Yang Ying, Katsuyama Maho, Yoshida-Tanaka Kie, Nagata Tetsuya, Yoshioka Kotaro, Yokota Takanori	4. 巻 31
2. 論文標題 Change of intracellular calcium level causes acute neurotoxicity by antisense oligonucleotides via CSF route	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 182 ~ 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2022.12.010	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 吉岡耕太郎	4. 巻 39
2. 論文標題 神経難病に対する核酸医薬品の開発	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 2834-2840
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 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5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Chunyan Jia, Kotaro Yoshioka, Su Su Lei Mon, Maho Katsuyama, Kie Tanaka-Yoshida, Tetsuya Nagata, Takanori Yokota.
2. 発表標題 Heteroduplex oligonucleotide mitigates various types of acute CNS toxicities via CSF route
3. 学会等名 62回日本神経学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshioka K, Katsuyama M, Lei Mon SS, Jia C, Matsubayashi T, Hara R, Nagata T, Yokota T.
2. 発表標題 Heteroduplex-structure reduces CNS-toxicity of ASO with intrathecal administration and enhances therapeutic index in rodents and non-human primates
3. 学会等名 17th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshioka K, Kunieda T, Asami Y, Lei Mon SS, Sujino Y, Tanaka K, Piao W, Kuwahara H, Nishina K, Nagata T, Yokota T
2. 発表標題 Overhanging duplex oligonucleotides for enhanced systemic delivery
3. 学会等名 16th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society. Virtual (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kotaro Yoshioka, Taiki Kunieda, Yutaro Asami, Kie Tanaka, Wenying Piao, Hiroya Kuwahara, Kazutaka Nishina, Tetsuya Nagata, Takanori Yokota
2. 発表標題 Overhanging duplex oligonucleotide with transferrin-mediated delivery
3. 学会等名 TIDES US 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉岡耕太郎
2. 発表標題 新規2本鎖核酸による遺伝子制御効果・安全性の向上および生体内核酸分子機構の解明
3. 学会等名 核酸医薬シンポジウム2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 2' - 修飾ヌクレオシドを含むヘテロ核酸	発明者 横田 隆徳、吉岡 耕太郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-150310	出願年 2021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
---------	---------