

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20711

研究課題名（和文）全身投与で脳に到達し遺伝子制御可能な新規siRNA核酸医薬の創出

研究課題名（英文）Development of novel siRNA that can reach the brain and control genes through systemic administration

研究代表者

浅見 裕太郎（Asami, Yutaro）

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：70911858

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、全身投与で血液脳関門を越えて脳のRNAを抑制できる血液脳関門通過型siRNAの創出を目指した。申請者のDNA/DNA2本鎖核酸医薬に関する成果や、当教室の知見や文献を元に血液脳関門通過DNA/DNA-siRNAの候補構造を複数作成した。その結果、特定の構造が静脈投与後に著しく脳実質に到達することが分かった。さらにホスホロチオエート結合の位置を初めとした核酸構造を調節すると、標的遺伝子抑制効果に悪影響を及ぼさない構造を複数見出すことができた。今後はこの構造の脳到達量と標的遺伝子抑制効果を *in vivo* で検討し、さらなる構造の最適化を行い動態の特徴を評価していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

siRNAは核酸医薬の一種であり、細胞内の特定のRNAを配列依存性に分解できることから新たな分子標的薬として注目されている。実際に複数のsiRNA医薬が臨床応用されている。しかし全身投与したsiRNAはほとんど肝臓にしか到達しないため現在は標的臓器が肝臓に限られている。現在では治療法がない神経変性疾患はRNAが重要とされるものが多く、核酸医薬はその治療に相性が良いとされ期待されている。そのため静脈内や皮下に投与したsiRNAを脳に送達させRNAを抑制することで、治療が難しい中枢疾患標的の核酸医薬を創生することができ、学術的にも社会的にもインパクトが高いと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to create blood-brain barrier-crossing siRNA that can suppress brain RNA through systemic administration. Based on the applicant's achievements in DNA/DNA duplex oligonucleotide therapeutics and our laboratory's knowledge and literature, we generated multiple candidate structures of blood-brain barrier-crossing DNA/DNA-siRNA. As a result, we found specific structures that significantly reached the brain parenchyma after intravenous administration. By modulating nucleic acid structures, including the position of phosphorothioate linkages, we identified several structures that did not adversely affect the target gene suppression. Moving forward, we will examine the brain penetration and target gene suppression efficacy of these structures *in vivo*, optimize their design, and evaluate their dynamic characteristics.

研究分野：核酸医薬創薬

キーワード：核酸医薬 siRNA RNA干渉 血液脳関門通過 遺伝子抑制 中枢神経系標的医薬

### 1. 研究開始当初の背景

核酸医薬は抗体医薬に続く分子標的の可能なバイオ医薬で最近次々に臨床応用が進んできている。核酸医薬はこれまで治療がなかった神経難病に対して有望とされており脳に到達させることが重要だが、血液と脳の間強力なバリアである血液脳関門 (BBB) により脳に送達することは非常に困難であり、これまで達成されていなかった。一方で当研究室では ASO に対して RNA 相補鎖をハイブリダイズさせた新規の核酸医薬である DNA/RNA ヘテロ 2 本鎖核酸 (heteroduplex oligonucleotide; HDO) を開発 (図 1)、その卓越した標的 RNA 抑制効果を報告した (Nat Commun. 2015、特許番号 日本 6112569、米国 981689、豪州 2012353330、欧州 21815856)。さらに応募者は相補鎖の構造を主に DNA に変更し DNA/DNA 構造としても ASO の標的 RNA 抑制効果を飛躍的に高められることを見出した (Mol Ther, 2021)。そこで当研究室で HDO を化学修飾やリガンドの導入により改良し、この HDO が in vivo 全身投与後に BBB を越えて脳に到達し標的 RNA を抑制することが初めて証明された (図 2) (Nat Biotech, 2021)。しかしその効率はまだ十分とは言えない。一方で、ASO と並ぶ核酸医薬のモダリティとして siRNA があり、標的 RNA への特異性は ASO より siRNA の方が高いとされているため、siRNA を全身投与で脳に送達できれば脳の標的 RNA をより強力に抑制し、かつ副作用を減らすことができる。

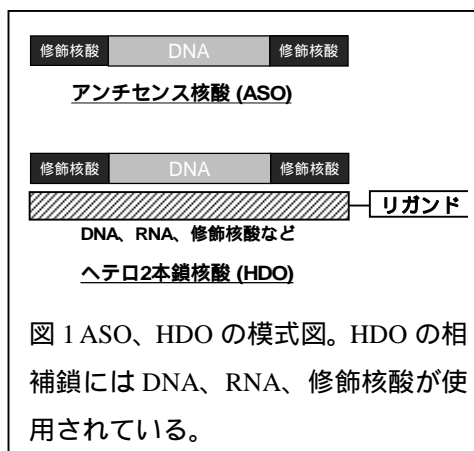


図 1 ASO、HDO の模式図。HDO の相補鎖には DNA、RNA、修飾核酸が使用されている。

### 2. 研究の目的

本研究では生体に全身投与した siRNA を BBB を越えて脳に到達させ、脳組織で標的 RNA を抑制することを目的とする。これまで siRNA が血液中から BBB を越えて脳に到達するという報告はない。そのため siRNA の BBB 通過を達成できればこれまで不可能であった全身投与での siRNA による脳の RNA 抑制が初めて可能になる。

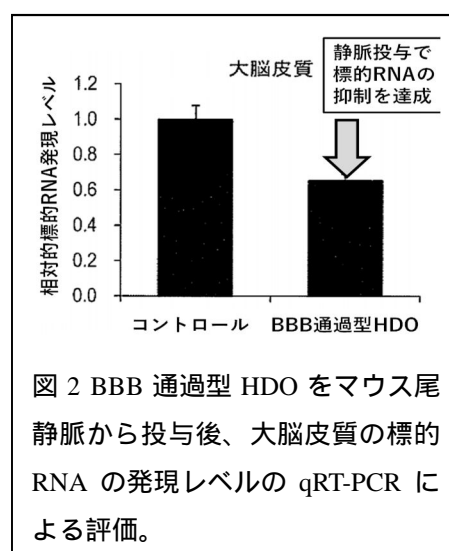


図 2 BBB 通過型 HDO をマウス尾静脈から投与後、大脳皮質の標的 RNA の発現レベルの qRT-PCR による評価。

### 3. 研究の方法

この研究では、全身投与で血液脳関門を越えて脳の RNA を抑制できる血液脳関門通過型 DNA/DNA- siRNA の創出を目的とする。

DNA/DNA-siRNA の細胞系での標的 RNA 抑制効果や in vivo 血中安定性の評価： BBB 通過型 DNA/DNA-HDO の構造を参考に siRNA に様々な糖鎖・核酸間修飾やリガンド分子を導入して DNA/DNA-siRNA の候補を 10-15 構造作成し、培養細胞に導入して標的 RNA 抑制効果を定量的 PCR で判定する。またマウス血中安定性を評価し安定性の高い構造を選出する。

DNA/DNA-siRNA のマウス肝臓や末梢臓器でのデリバリーと遺伝子抑制効果の検討： 選出した 5-10 種類の修飾 siRNA をマウスに低濃度 (2-10 mg/kg) で静脈投与し、一定期間後に採材して肝臓などの末梢臓器での標的 RNA 抑制効果を定量的 PCR にて評価する。また組織デリバリーを抗 PS (ホスホロチオエート結合) 抗体で評価する。結果より、糖鎖修飾や核酸間修飾やリガンド分子を変更し最適化し 2-3 種類の候補を選出する。

DNA/DNA-siRNA のマウス脳でのデリバリーと遺伝子抑制効果の検討： 選別、最適化した構造をマウスに高用量 (50 mg/kg) で静脈投与し、一定期間後に採材して脳での標的 RNA 抑制効果を定量的 PCR にて評価する。またデリバリーを上述の方法で評価する。脳への到達量と標的 RNA 抑制効果が最も良い構造を選抜し、より効果のよい構造へ改良する。もし脳への到達を認めなかった場合は BBB 通過型 HDO との違いを再検討し、から再度実験をし直す。

### 4. 研究成果

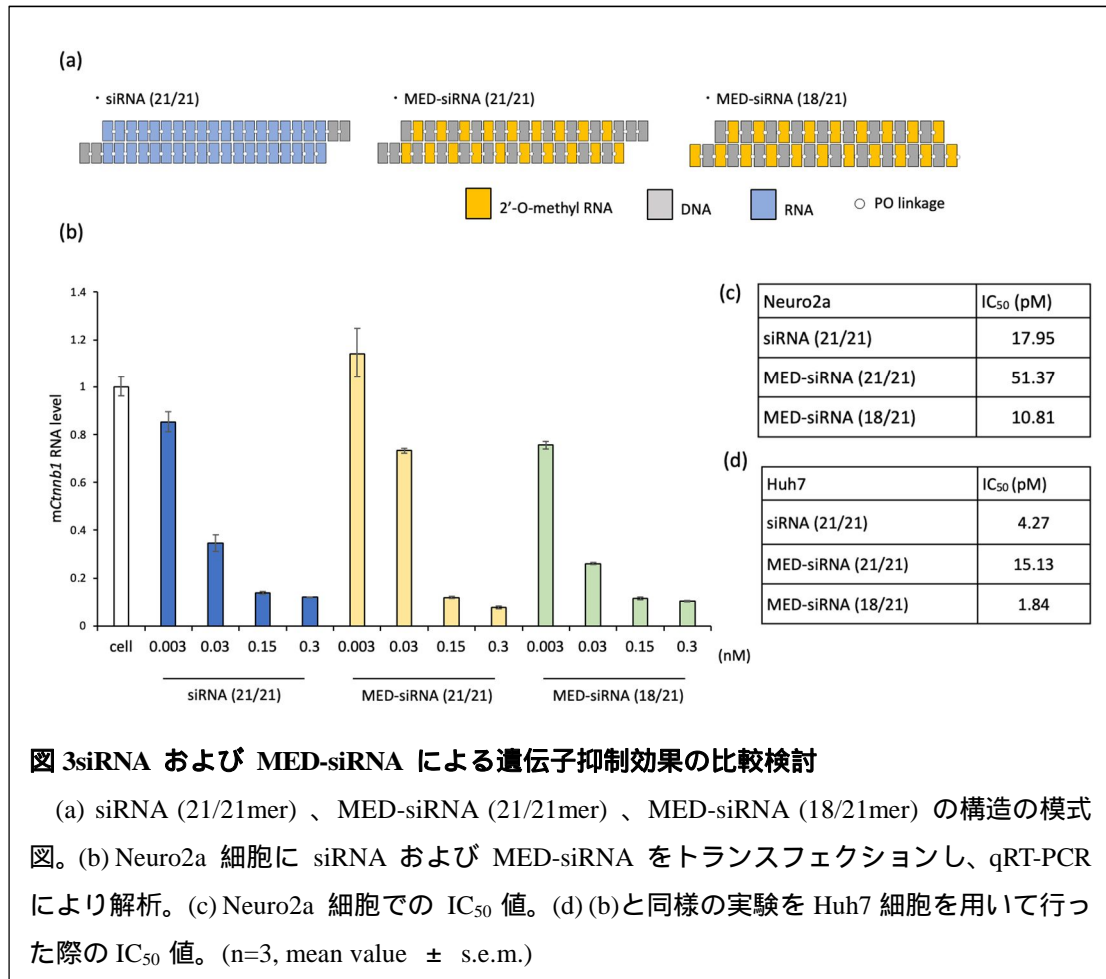


図 3 siRNA および MED-siRNA による遺伝子抑制効果の比較検討

(a) siRNA (21/21mer)、MED-siRNA (21/21mer)、MED-siRNA (18/21mer) の構造の模式図。(b) Neuro2a 細胞に siRNA および MED-siRNA をトランスフェクションし、qRT-PCR により解析。(c) Neuro2a 細胞での IC<sub>50</sub> 値。(d) (b)と同様の実験を Huh7 細胞を用いて行った際の IC<sub>50</sub> 値。(n=3, mean value ± s.e.m.)

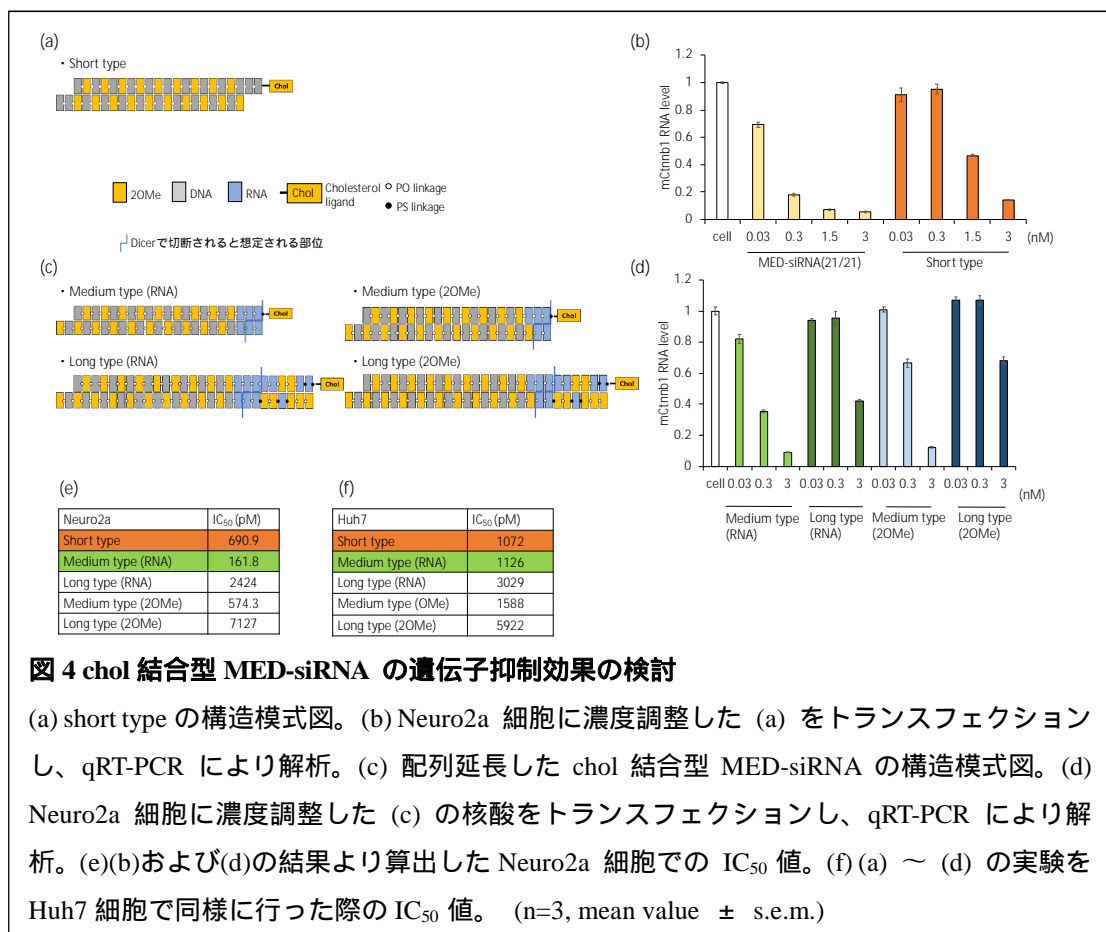


図 4 chol 結合型 MED-siRNA の遺伝子抑制効果の検討

(a) short type の構造模式図。(b) Neuro2a 細胞に濃度調整した (a) をトランスフェクションし、qRT-PCR により解析。(c) 配列延長した chol 結合型 MED-siRNA の構造模式図。(d) Neuro2a 細胞に濃度調整した (c) の核酸をトランスフェクションし、qRT-PCR により解析。(e)(b)および(d)の結果より算出した Neuro2a 細胞での IC<sub>50</sub> 値。(f) (a) ~ (d) の実験を Huh7 細胞で同様に行った際の IC<sub>50</sub> 値。(n=3, mean value ± s.e.m.)

本研究では、全身投与で血液脳関門を越えて脳の RNA を抑制できる血液脳関門通過型 DNA/DNA-siRNA の創出を目指した。そのために in vivo で siRNA が安定して存在する必要があるが、siRNA

は RNA から成り in vivo 血中ではごく短時間で分解されてしまう。そこで血中で安定な DNA と 2' -O-myethyl RNA を交互に配置した MED-siRNA を用いた。MED-siRNA の構造を検討し、siRNA に比べて遺伝子抑制効果が劣っていないことを確認した (図 3)。次に臓器送達効率を向上させることが知られているコレステロールを sense 鎖の 3' 末端に結合した。さらにホスホロチオエート結合 (PS) を sense 鎖に導入し、結合部位や方法による遺伝子抑制効果の影響を調べ、最も有効性が高い構造を決定した (図 4)。

すると、マウスへの静脈投与で肝臓へのデリバリーと標的 RNA 抑制効果を認めた (図 5)。

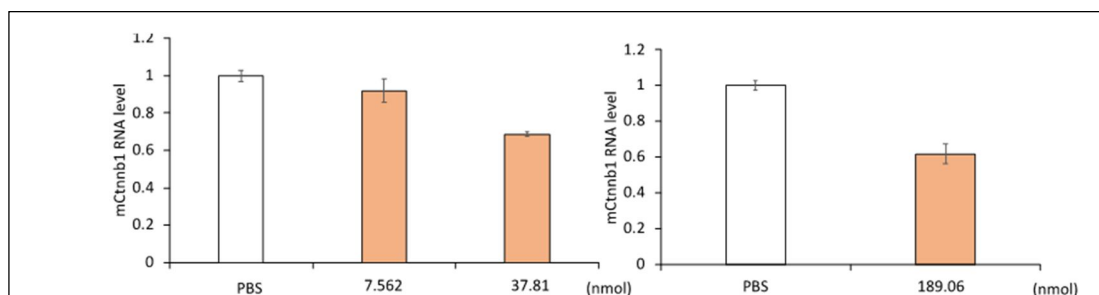


図 5 chol 結合型 MED-siRNA の sense 鎖 full PS 修飾核酸を用いた遺伝子抑制効果の検討

マウス尾静脈に核酸投与し、7 日後に肝臓を採取し、*Ctnnb1* ターゲット mRNA を qRT-PCR にて定量。(n=4)(mean value ± s.e.m.)

肝臓以外への臓器、特に脳に到達させるために、当研究室で脳への到達に成功しているヘテロ核酸の構造と比較し、申請者本人の研究成果や文献を元に血液脳関門通過 DNA/DNA-siRNA の候補構造を複数作成した。マウス全身投与後 24 時間でマウスの脳で抗 PS 抗体による免疫組織染色を行うと、脳内毛細血管や脈絡叢に核酸が届いていることが分かった。しかし脳実質内への到達量は十分とは言えない状態であったため、ヘテロ核酸を参考に PS の導入部位を様々に変化させた。その結果、特定の構造が静脈投与後に著しく脳実質に到達することが分かった (権利関係や共同研究者の関係で図は提示できません)。しかし、事前に予測した範囲内であったがその構造は細胞内での siRNA の標的遺伝子抑制効果を一定程度減弱してしまうことが判明した。それを踏まえて PS の位置を初めとした核酸構造を調節すると、標的遺伝子抑制効果にほとんど悪影響を及ぼさない構造を複数見出すことができた。今後はこれらの PS 化 DNA/DNA-siRNA の脳到達量と脳での標的遺伝子抑制効果を in vivo で複数回検討し、さらなる構造の最適化や動態の特徴を検証していく方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浅見裕太郎
2. 発表標題 2'-O-methyl RNAとDNAからなるsiRNAによるin vivo標的遺伝子抑制
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会
4. 発表年 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
---------------------------	-----------------------	----

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