

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651236

研究課題名（和文）高機能性人工核酸を用いた自在なスプライシング制御技術の開発

研究課題名（英文）Regulation of RNA Splicing by BNA Antisense Oligonucleotides

研究代表者

小比賀 聡 (OBIKA SATOSHI)

大阪大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：80243252

研究成果の概要(和文):高機能性人工核酸を用いたスプライシング制御技術を開発するために、まず、蛍光を利用してスプライシングの違いを簡便・迅速に評価できるスクリーニング系を構築した。次に、多数の BNA アンチセンス分子を設計し、構築したスクリーニング系を用いてスプライシングを制御するか否かを評価した。その結果、エクソンスキップを促す分子を多数得ると共に、アンチセンス分子の標的として効果的な領域を同定することに成功した。

研究成果の概要(英文): First, we established cell lines containing the reporter gene for antisense oligonucleotides that modify the RNA splicing. Next, we designed and analyzed various BNA antisense oligonucleotides using these screening cell lines, which allowed us to obtain several antisense oligonucleotides that induce exon skipping. We also identified three regions in the dystrophin gene as a good target for antisense oligonucleotide-mediated exon skipping.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：高機能性人工核酸、BNA、アンチセンス分子、スプライシング制御、エクソンスキップ、筋ジストロフィー、家族性高コレステロール血症

1. 研究開始当初の背景

ヒト遺伝子の総数は約 22,000 であり、20-30 万種のタンパク質ができるためには、一つの遺伝子から複数のアイソフォームができる選択的スプライシングが重要である。一方、遺伝子に変異が入りスプライシング異常が起こることによって生活習慣病などの疾患が発症すること、また、筋ジストロフィーなどの遺伝性疾患に対してスプライシングを制御することにより治療する方法などが報告されている。このように、スプライシングは

生命活動や疾患の発症・治療などにおいて重要な役割を担っている。

脂質の取り込みに関わる LDL 受容体 (LDLR) 遺伝子の 12 番目のエクソンのスプライシングシス因子 (ESE) に変異が入ると、エクソンがスキップし、フレームシフトが起こり異常なタンパク質が発現する。その結果、血中コレステロールの取り込みが減少し、早期に心筋梗塞を引き起こす (家族性高コレステロール血症)。従って、スキップするエク

ソンを回復し、機能するタンパク質を発現させることで家族性高コレステロール血症の新たな治療法の開発が期待できる。

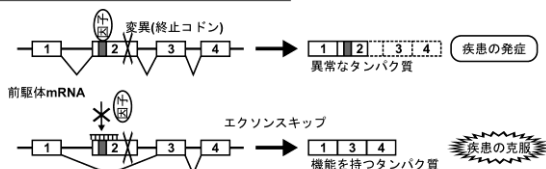
一方、Duchenne 型筋ジストロフィーとは、年齢と共に筋力の低下が進行し、20歳前後で死に至る重篤な疾患である。本疾患は、原因遺伝子であるジストロフィン遺伝子の変異により、異常なジストロフィンタンパク質が産生されることにより生じる疾患である。近年、ジストロフィン遺伝子のエクソンをスキップさせ、機能を持つジストロフィンタンパク質の発現を促すことで、治療が可能であるとする報告がなされている。このような遺伝子のスプライシングを制御することによる治療法を実現するためには、自在で緻密なスプライシング制御技術を確立することが必要不可欠である。

スプライシングを自在に制御するためには、エクソンのスキップ、および、スキップするエクソンを回復し mRNA に包含するという、2つの方法論を確立しなければならない。エクソンのスキップに関しては、ジストロフィン遺伝子に対する研究などいくつか報告されているが、その効果は不十分である。また、スキップしたエクソンを回復させる研究に至っては、脊髄性筋萎縮症の治療標的である SMN2 遺伝子に関する例しか報告されていない。さらに、これまではそれら方法が単独で検討されてきており、自在にスプライシングを制御するためには不十分であり、両者の包括的な解析が必要である。

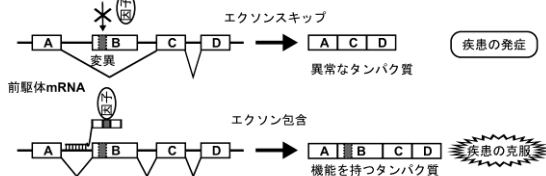
スプライシング制御技術を開発する上では、標的遺伝子配列に対して高い特異性・親和性を持つ核酸分子を活用することが非常に有効である。しかし、Sオリゴなど既存の人工核酸は、標的配列に対する選択性の低さや、タンパク質との非特異的な相互作用など問題がある。このように現在の技術では効果が限定されており、応用展開がなされておらず、緻密で自在なスプライシングの制御の実現は困難な状況である。

これまでに我々は、核酸医薬による難治性疾患の治療法を開発するために、RNA に対する強い親和性、高い酵素耐性能、高い配列選択性を持つ高機能性人工核酸 BNA (Bridged Nucleic Acid) を世界に先駆け合成し、アンチセンス分子などに応用し、遺伝子発現の自在な制御を実現してきた。本研究課題では、この BNA アンチセンス分子を用いて、特異的で正確なスプライシング制御技術の開発を行う。

1. 高機能性人工核酸BNAを用いたエクソンスキップ



2. 高機能性人工核酸BNAを用いたエクソンの回復



- BNAを用いたオリゴヌクレオチドの利点
- ④: スプライシング因子
 - : RNAとの高い親和性
 - : 高い配列選択性
 - : 高い酵素耐性能
 - ④: スプライシングシス因子
 - : BNAを含むオリゴヌクレオチド
 - ④: スプライシングシス因子を架げたBNAを含むオリゴヌクレオチド

図1 アンチセンス分子を用いたスプライシング制御法

2. 研究の目的 (図1)

(1) エクソンを回復させる BNA アンチセンス分子の開発

家族性高コレステロール血症の治療薬開発を目指して、原因遺伝子 LDLR 遺伝子のスキップするエクソンを回復させるアンチセンス分子の開発を行う。

(2) エクソンをスキップさせる BNA アンチセンス分子の開発

筋ジストロフィーの治療薬開発を目指して、原因遺伝子ジストロフィン遺伝子のエクソンをスキップさせるアンチセンス分子の開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 我々はすでに、家族性高コレステロール血症の原因遺伝子 LDLR 遺伝子のエクソン 11 から 13 までの領域を用いた、スプライシングの違いを検出できる評価系を構築している。具体的には、蛍光タンパク質 DsRed (赤色) と EGFP (緑色) の遺伝子を連結させ、さらにその 5'側に、LDLR 遺伝子のエクソン 11 から 13 までの領域を挿入したレポーターミニジーンを構築している。このレポーターミニジーンを導入した Flp-In293 細胞株を、スプライシングの違いを識別できるスクリーニング細胞株として用いる。なお、本レポーターミニジーンは、エクソンのスキップの有無でコドンの読み枠がずれるように設計しており、スプライシングの違いにより異なる蛍光色 (赤色もしくは緑色) を発する。従って、このスクリーニング細胞株を用いることで、スプライシングの違いを可視化でき、多数のアンチセンス分子を簡便・迅速にスク

リーニングすることが可能になる (図 2)。

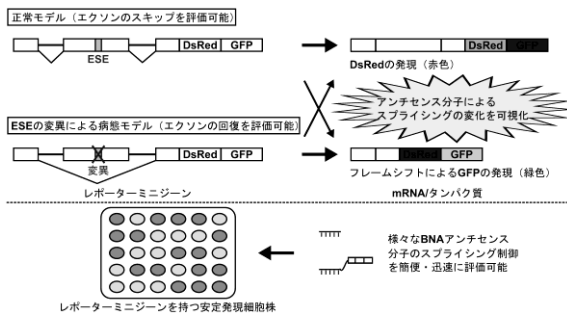


図 2 スプライシングの違いにより蛍光が変化するレポーターを用いた評価系

今回本スクリーニング系を改良するために、エクソン間のイントロンの領域を短くし、転写・翻訳の効率を上げることで蛍光強度を増強させ、評価系の感度を上げることを試みる。

さらに、エクソンの含有を促進する ESE 配列を有する BNA アンチセンス分子を設計し、その効果を本評価系を用いて検証する。

(2) 上記と同様の手法で、エクソンのスキップを検出する系を構築する。具体的には、蛍光タンパク質 DsRed と EGFP の遺伝子を連結させ、さらにその 5'側に、ジストロフィン遺伝子のエクソン 50 から 52、または、エクソン 57 から 59 までを挿入したレポーターミニジーンを構築する。このレポーターミニジーンをそれぞれ Flp-In293 細胞に導入して、スプライシングの違いを識別できるスクリーニング細胞株を樹立する。

次に、標的エクソンを網羅的にカバーするように、15 mer からなる BNA アンチセンス分子を多数設計する。それぞれのアンチセンス分子を単独、あるいは複数組み合わせることで、エクソンをスキップさせる効果を検証する。

4. 研究成果

(1) まず、スプライシングの違いを検出できる評価系の感度を上げるために、LDLR 遺伝子のエクソン間のイントロンの領域を短縮したレポーターミニジーンを作製した。作製したレポーターミニジーンを用いて転写・翻訳の効率を上げることで、蛍光強度を増強させることに成功した。

次に、スキップするエクソンを回復させる BNA アンチセンス分子の開発を行った。LDLR 遺伝子の配列を参考に、エクソンの含

有を促進する ESE 配列を設計し、BNA アンチセンス分子と繋いだ。このアンチセンス分子の効果をスクリーニング細胞株を用いて検証した結果、エクソンの回復は認められなかった。一方で、予想に反してエクソンのスキップを亢進するアンチセンス分子が数種得られた。このことは、今回用いた ESE 配列が機能しないのではなく、エクソン含有に寄与する因子をトラップし、デコイとして機能したためにスプライシングを阻害したという可能性が考えられる。今後、ESE 配列並びにアンチセンスの配列を改善することで、効果的なエクソン回復の実現を目指す。

(2) エクソンスキップを促すアンチセンス分子を開発するために、まず、ジストロフィン遺伝子のエクソン 50 から 52、または、57 から 59 までの領域のクローニングを行い、これら配列を持つレポーターミニジーンを構築した。この際、上記 (1) で得られた知見をもとに、イントロンを短縮することで蛍光強度が強くなるような工夫を施した。このレポーターミニジーンを Flp-In293 細胞に導入し、エクソンスキップを評価できる系を構築した。

次に、エクソン 58 に対する BNA アンチセンス分子を 9 種類設計した。作製したアンチセンス分子を 100 nM で投与し、効果のある BNA アンチセンス分子を探索した。その結果、エクソン 58 に対しては 3 種類のアンチセンス分子にエクソンをスキップさせる効果が認められた。さらに詳細に解析するために、この配列をもとにアンチセンス分子を 48 種類作製し、検討を行った。その結果、アンチセンス分子によってエクソンがスキップする標的領域として、強く効果の認められる 2ヶ所、また、弱いながらも効果のある 1ヶ所を同定することができた (図 3)。今後、用いるアンチセンス分子の長さや導入する BNA 分子の数の検討を行い、さらなる効果の増強を図る。

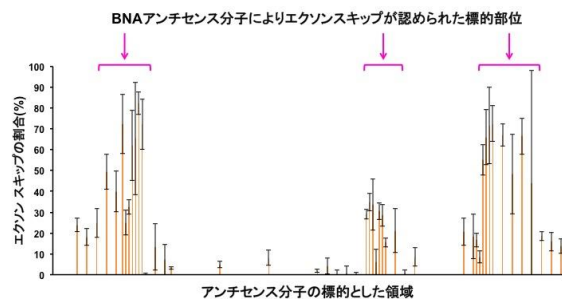


図 3 アンチセンス分子によるスプライシングの効果

同様に、エクソン 51 に対する BNA アンチセンス分子を 16 種類設計し、100 nM になるように投与した。その結果、エクソン 51 に関しては単独では効果のあるアンチセンス分子は得られなかったものの、2 種類以上の分子を混合して用いた時にエクソンスキップの効果が認められるという大変興味深い結果を得た。今後、これらの組み合わせを精査することで、新たなスプライシング制御機構の解明が期待できる。

以上本研究は、アンチセンス分子を用いたスプライシング制御技術の開発に大きく貢献するものであり、本研究を進展させることでスプライシング制御に基づく難治性疾患を治療できる新たな核酸医薬の開発に繋がることが期待できる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ①A. Yahara, A. R. Shrestha, T. Yamamoto, Y. Hari, T. Osawa, M. Yamaguchi, M. Nishida, T. Kodama, S. Obika, Amido-Bridged Nucleic Acids (AmNAs): Synthesis, Duplex Stability, Nuclease Resistance, and In Vitro Antisense Potency, ChemBioChem, 13, 2513-2516 (2012), 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ①A. Yahara, A. R. Shrestha, T. Yamamoto, Y. Hari, T. Osawa, M. Yamaguchi, M. Nishida, T. Kodama, S. Obika, Amido-bridged Nucleic Acid: Synthesis, Duplex Stability, Nuclease Resistance, and In Vitro Antisense Potency, 8th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, 2012 年 10 月 28 日 -10 月 31 日, Boston (USA)
- ②壽 悠太郎, 張 功幸, Shrestha Ajaya Ram, 小比賀 聡, 新規架橋型人工核酸の合成と機能評価; グアニジノ基による架橋部へのカチオン導入の効果, アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012, 2012 年 9 月 24 日-9 月 26 日, 仙台

[その他]

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b007/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小比賀 聡 (OBIKA SATOSHI)
大阪大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：80243252

(2) 研究分担者

橋 敬祐 (TACHIBANA KEISUKE)
大阪大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：30432446