

## 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 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24659044

研究課題名（和文）3本鎖核酸を用いた画期的核酸医薬の開発

研究課題名（英文）Development of novel triple-stranded antisense oligonucleotides

研究代表者

横田 隆徳（YOKOTA TAKANORI）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：90231688

研究成果の概要（和文）：新規開発したペプチド結合3本鎖アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）の開発を行った。まず、3本鎖ASOの鎖長及び各核酸配列に対する化学修飾の最適化を行った。次に、既報告の後根神経節細胞（DRG）へのデリバリーペプチドを用いて、DRGでの標的遺伝子の抑制を確認した。最後に、3本鎖ASOの静脈投与時にDRGにデリバリーされていることを、蛍光標識体を用いて共焦点顕微鏡で確認し、さらに定量的RT-PCR法でも確認した。

研究成果の概要（英文）：Here we developed a new class of exceptionally potent antisense oligonucleotides (ASOs) that are hybridized with complementary RNA (cRNA) strand and peptide-conjugated PNA strand. At first, we optimized the chemical modifications and length of the strands of the triple-stranded ASO (tsASO). Secondly, peptide-conjugated tsASO reduced mouse TRPV1 gene in dorsal root ganglia (DRG). Finally, we showed the delivery of DRG-delivered peptide-conjugated tsASO using confocal imaging and quantitative RT-PCR by systemic administration.

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	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：医薬分子設計

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ASOを用いた遺伝子発現抑制方法は、その遺伝子治療のツールとして臨床応用が期待されているが、ASOの多くは速やかに腎排泄され、必要投与量が増大して副作用の要因にもなり、標的臓器への有効なデリバリーも困難な状況であった。

(2) 一方、近年抗体ヤリガンドペプチドを用いた遺伝子医薬のデリバリーが報告されているが、直接ASO等の機能核酸に結合させた報告はなく、生体内での安定性等において不十分である。

(3) この問題を解決するために、通常一本

鎖核酸であるASOに相補鎖RNA(cRNA)を結合させた2本鎖ASOを着想した。この方法は、相補鎖に脂質結合等の様々な誘導分子を結合させることで臓器特異的な送達を可能にする利点がある。しかし、ペプチドと核酸の直接結合は容易ではなく、特殊なリンカーを要する。

(4) そこで、ペプチドとの結合が容易なペプチド核酸(PNA)を導入可能にした3本鎖ASOを考案し、その開発を目指す。

## 2. 研究の目的

広範な分子標的の可能な誘導分子として

ペプチドリガンドや抗体を結合するために、ペプチド核酸(PNA)を導入可能にした3本鎖ASOの開発をすることを目的にする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 3本鎖ASOの鎖長及び各種化学修飾の最適化

3本鎖ASOについて、図1のようにデザインした。

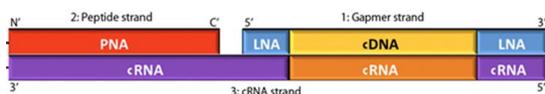


図1. 3本鎖ASOのデザイン

このうち相補鎖(図1下)については、両末端にPS及び2'-O-メチル修飾(2'-OMe)(図1紫色部)を加えているが、核内でRNaseHに認識され、切断されるために主鎖(図1右上)の中央部のDNA(図1黄色部)と相補となる部分に化学修飾を加えていない(図1オレンジ色部)。実際には3本の核酸鎖を等モル混ぜ、95°Cで5分、その後37°Cで1時間静置し、3鎖をハイブリダイズさせて3本鎖ASOを作成した。

また、PNA鎖と主鎖の間の距離が効果に影響を及ぼす可能性がある。そこで、主鎖に対してPNA鎖(図1左上鎖:赤色部)との間の距離がないものと1残基のもの2通り合成して、それぞれ細胞にリポフェクション試薬を用いて2nMでトランスフェクションを行い、定量的RT-PCR法でその主鎖の標的遺伝子発現抑制効果を確認した。

#### (2) 中枢神経系へのデリバリーに際して有効な導入ペプチド配列の検討

神経系にデリバリーする導入ペプチドとして、既報告の後根神経節細胞(DRG)へのデリバリーペプチド(DRG1)を用いて、3本鎖ASOの髄腔内投与によりDRGでの標的遺伝子の抑制を確認した。具体的には、DRGに発現する内在性遺伝子の一種であるTRPV1に対するASOを作成し、相補鎖のみとハイブリダイズさせた二本鎖ASO(dsASO)と、さらにDRG1ペプチドをN'末端に結合させたPNA鎖もハイブリダイズさせた三本鎖ASO(tsASO)を作成した。マウスを用いてPBS群、dsASO群、tsASO群をそれぞれ0.6nmolずつくも膜下投与を行い(n=3)、7日後に第4-6腰椎(L4・5・6)のDRGを採取し、定量的RT-PCR法にてTRPV1に対する3本鎖ASOの遺伝子発現抑制効果の評価した。

#### (3) 全身投与時の3本鎖ASOの生体内分布の確認

tsASO 5'末端を蛍光物質で修飾した、(2)

で用いたDRG1ペプチド結合3本鎖ASOをマウスに対して、227nmolを尾静脈よりゆっくり静脈投与した。24時間後に第5腰椎(L5)のDRGを共焦点顕微鏡で観察した。

またマウスを用いてPBS群、tsASO群をそれぞれ210nmol尾静脈より静脈投与し(n=3)、4日後にL4・5・6のDRGを採取した。ASOの定量的RT-PCR方法を用いて、DRGにおける3本鎖ASOの主鎖の量を定量的RT-PCR法によって定量した。

### 4. 研究成果

#### (1) 3本鎖ASOの鎖長及び各種化学修飾の最適化

PNA鎖については、PNA鎖と主鎖の間の距離は0(cRNA 21mer)若しくは1残基(cRNA 22mer)で影響しないことを見出した(図2)。

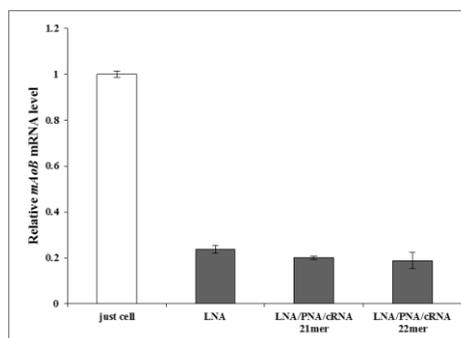


図2. 相補鎖の鎖長が主鎖の効果に対して及ぼす影響

#### (2) 中枢神経系へのデリバリーに際して有効な導入ペプチド配列の検討

定量的RT-PCR法での評価で、2本鎖ASOではなくも膜下投与での有効性が認められないのに対し、3本鎖ASOでは4割程度の標的遺伝子発現抑制効果が認められた(図3)。

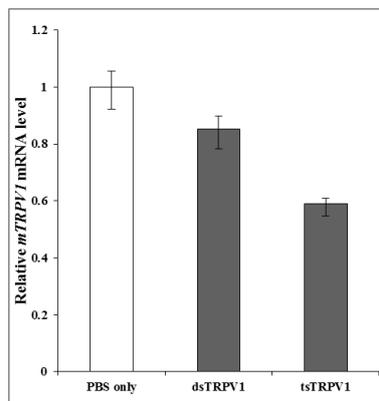


図3. 3本鎖ASOの標的遺伝子発現抑制効果の確認

まだ有効性は低いものの、DRGに対するデリバリーペプチドを結合させた3本鎖

ASOのみ標的遺伝子発現抑制効果を認めており、デリバリーペプチドの有効性を示したものと考えられた。また TRPV1 は疼痛に関与する遺伝子の一種であり、これの抑制は疼痛コントロールに有用であることが示されていることから、本方法を改良することで新たな鎮痛剤の開発に繋がると考えられる。

(3) 3本鎖 ASO の生体内分布の確認

主鎖 5' 末端を蛍光物質で修飾した DRG1 ペプチド結合 3 本鎖 ASO の静脈投与にて、DRG の一部に蛍光色素が導入されることが認められた (図 4)。

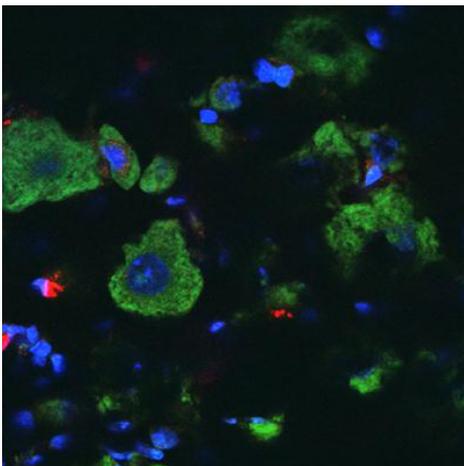


図 4. 蛍光標識 DRG1 ペプチド結合 3 本鎖 ASO 静脈投与時の DRG (赤: 主鎖、緑: DRG 細胞、青: 核)

また、主鎖を検出する定量的 RT-PCR 法を確立し、DRG1 ペプチド結合 3 本鎖 ASO を全身投与した後の DRG を用いて施行したところ、DRG に主鎖がデリバリーされていることが示された (図 5)。

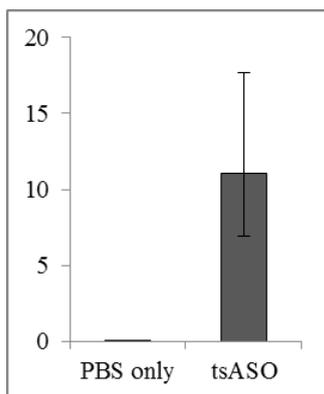


図 5. DRG1 物質結合 3 本鎖 ASO 静脈投与時の DRG における定量的 RT-PCR 法を用いた主鎖の検出

以上の結果、マウスへの静脈投与でも、主鎖のシグナルを弱いながらも観察でき

た。主鎖核酸の定量方法として定量的 RT-PCR 法を開発して、3 本鎖 ASO の主鎖の有効な後根神経節細胞へのデリバリーを定量的 RT-PCR 法によって確認した。

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 2 件)

1. Takashi Hirai, Mitsuhiro Enomoto, Akira Machida, Mariko Yamamoto, Hiroya Kuwahara, Mio Tajiri, Yukihiko Hirai, Shinichi Sotome, Hidehiro Mizusawa, Kenichi Shinomiya, Atsushi Okawa, Takanori Yokota. Intrathecal shRNA-AAV9 inhibits target protein expression in the spinal cord and dorsal root ganglia of adult mice. Hum Gene Ther Methods, 査読有, vol. 23, No. 2, 2012, pp119-27. doi: 10.1089/hgtb.2012.035. Epub 2012 May 14
2. Kazutaka Nishina, Hidehiro Mizusawa, Takanori Yokota. Short interfering RNA and the central nervous system: development of nonviral delivery systems. Expert Opin Drug Deliv, 査読有, vol.10, No. 3, 2013, pp. 289-292. doi: 10.1517/17425247.2013.748746. Epub 2013 Jan 6

[学会発表] (計 1 件)

横田隆徳. 神経疾患に対する核酸医薬による遺伝子治療. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012. 5. 25, 東京国際フォーラム

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:

番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

横田 隆徳 (YOKOTA TAKANORI )  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・教授  
研究者番号：90231688

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：