

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26670054

研究課題名(和文)新規マイクロRNA阻害薬の開発

研究課題名(英文)Development of a new type of microRNA inhibitor

研究代表者

横田 隆徳 (Yokota, Takanori)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：90231688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はRNA/DNA二本鎖核酸構造を有し、核酸医薬を相補RNA鎖に組込んだ二本鎖ヘテロキメラ核酸医薬を開発した。本研究ではまずマイクロRNA122阻害薬を組み込み、二本鎖構造の鎖長変化による影響をin vivoで検討した。その結果、二本鎖塩基長が7-17塩基長の範囲内では、抑制効果上昇に影響を与えないことが明らかとなった。続いてスプライシング制御を行う核酸医薬を組み込み、その有効性をin vitroで検討した。その結果、従来の一本鎖構造と比較して優れたスプライシング制御効果を有することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Here we developed a new class of therapeutics oligonucleotide, hetero-chimera-duplex oligonucleotide (HCDO). HCDO has DNA/RNA double strand and antisense oligonucleotide integrated into the RNA strand. We assessed in vivo efficacy of HCDO integrated with microRNA122 inhibitor which had a variety of length of DNA/RNA double strand. We revealed that the length of double strand ranging from 7 to 17mer did not affect efficacy of HCDO. Next, we evaluated in vitro efficacy of HCDO integrated with oligonucleotides regulating splicing. We revealed that HCDO had more efficient ability to regulate splicing than the original single strand oligonucleotide.

研究分野：神経内科

キーワード：microRNA

1. 研究開始当初の背景

我々は1本鎖であるアンチセンス核酸(ASO)に相補鎖核酸をハイブリダイズさせた全く新規の核酸医薬である DNA/RNA 2本鎖アンチセンス核酸(2本鎖 ASO)を開発した。2本鎖 ASO では ASO 主鎖の有効性に影響を与えることなく相補鎖側に誘導分子を結合することが可能となり、in vivo で ED50 が 0.03mg/kg とほぼ世界最高の肝臓の内因性遺伝子の抑制効果を達成した。一方で、遺伝子抑制に用いる核酸としては RNase H 感受性の核酸医薬しか使用できない制限があった。そこで本研究では、核酸医薬を今までの主鎖 DNA 側から相補 RNA 鎖側に組み込んだ RNA/DNA 2本鎖ヘテロキメラ核酸医薬 hetero-chimera-duplex-oligonucleotide (HCDO) という「逆転の発想」を用いることで、あらゆる核酸医薬への応用を可能とし、それらの効果を飛躍的に上昇させることを目的とする。

2. 研究の目的

(1) RNA/DNA 2本鎖構造の鎖長最適化
本研究で用いている HCDO は DNA 鎖に両末端を Locked Nucleic Acid (LNA)、中央を DNA として、核酸間を全てホスホロチオエート結合とした 12-13mer の LNA-DNA gapmer 構造を用いており、gapmer 構造の鎖長の最適化が最重要と考えられた。RNase H 非依存性の核酸医薬であるマイクロ RNA 抑制薬を組み込んだ HCDO を用いて、二本鎖構造の鎖長による抑制効果への影響を in vivo で検討した。

(2) splicing 制御核酸医薬への応用
続いて、RNaseH 非感受性の核酸医薬への応用としてスプライシング制御を行う splicing switching oligonucleotides(SSO)を考えた。特定の exon を skipping させる効果を有する SSO を HCDO に組み込み、その有効性を in vitro にて検討した。

3. 研究の方法

(1) RNA/DNA 2本鎖構造の鎖長最適化
組み込む核酸医薬として、マイクロ RNA122 (miR122; 家族性高コレステロール血症・C型肝炎ウイルスの治療 target として臨床試験が進んでいる) に対する抑制薬を用いた。具体的な化学修飾としては全てホスホロチオエート結合を基本骨格とした LNA と DNA が混在した LNA-DNA 15mer mixmer (antimiR)を用いた。上記を相補 RNA 鎖の 5' 末端に組み込み、同配列の 7-17 塩基長の gapmer 鎖を有する RNA/DNA 2本鎖構造を有する HCDO を合成した(図1)。それらを、ICR マウス 4 週齢に静脈投与し 3 日後の肝臓を採取した。肝臓 homogenate から ISOGEN 1 (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan)にて RNA を抽出し、TaqMan Small RNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA)にて

定量 RT-PCR にて miR122 相対的発現量(内因性コントロールとして U6 を用いた)を測定した。

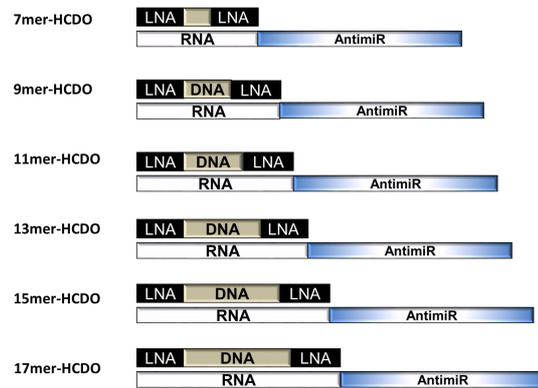


図1: anti-miR122-HCDO 構造

(2) splicing 制御核酸医薬への応用

組み込む核酸医薬として、デュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子 Dystrophin(現在 SSO による臨床試験が進んでいる)の exon58 を skipping する効果を持つ SSO を用いた。化学修飾としては全てホスホロチオエート結合を基本骨格とした LNA と DNA が混在した LNA-DNA 15mer mixmer を用いた。従来の1本鎖 SSO とそれを相補 RNA 鎖の 5' 末端に組み込んだ HCDO を合成した。human の dystrophin exon57-59 の周辺配列を含んだ reporter minigene を安定発現させた細胞株(図2)にそれぞれを Lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies, Carlsbad, CA) を用いて transfection を行った。

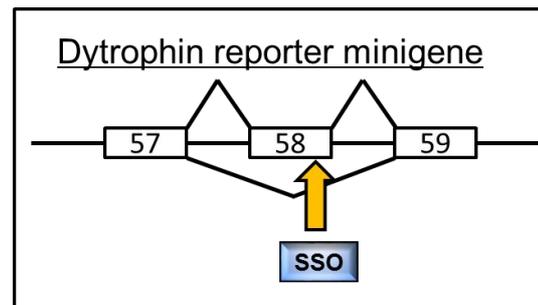


図2: 安定発現 reporter minigene と SSO 標的の関係

transfection24 時間後に、ISOGEN 1 にて RNA を抽出し、Transcriptor Universal cDNA Master (Roche Diagnostics)にて cDNA を合成した。Exon skipping 効率の評価は以下の2種の primer を用いて、定性的 RT-PCR と定量的 RT-PCR(skipping 後の exon57-59 junction を認識するように設計した primer)にて行った(図3)

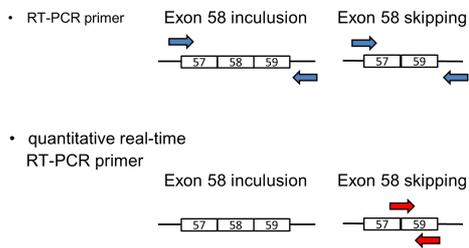


図3：RT-PCR 評価用 primer 設計

4. 研究成果

(1) RNA/DNA 2 本鎖構造の鎖長最適化
二本鎖構造の塩基長が 7-17 塩基長の HCDO-antimiR をそれぞれ 5.4 nmol/kg にて投与したところ、どの塩基長でも miR122 抑制効果は保たれ、明らかな有意差は認めなかった(図4)

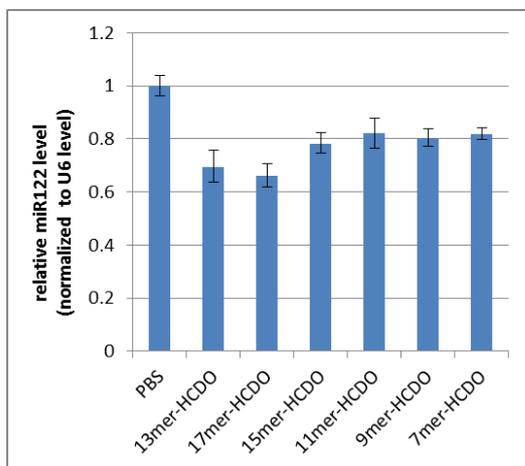


図4：二本鎖構造の塩基長と miR 抑制効果の関係 ($n = 5$, mean values \pm s.e.m.)

(2) HCDO-antimiR の miR 抑制効果上昇
従来の一本鎖 antimiR と HCDO-antimiR(二本鎖塩基長は 13mer を用いた)をそれぞれ 23.6 nmol/kg にて投与比較したところ、HCDO は有意に高い miR 抑制効果を確認した(図5)。また、off target 効果として let7a の発現量を定量 RT-PCR で解析し、どの群でも let7a の抑制効果は認めなかった

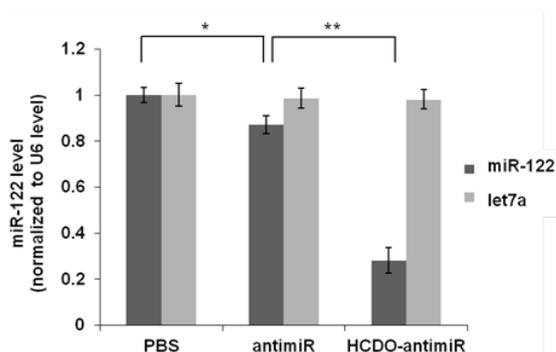


図5：1 本鎖 antimiR と HCDO-antimiR 抑制効果比較 ($n = 5$, mean values \pm s.e.m., ** $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

続いて、antimiR と HCDO-antimiR の用量依存的な miR 抑制効果を検討した。HCDO-antimiR は容量依存的な miR 抑制効果の向上を認め(図6)、ED50 は HCDO-antimiR は 3.55 nmol/kg となり、antimiR は 46.4 nmol/kg となった。HCDO-antimiR は既存の antimiR と比較して 10 倍以上の高い有効性を示すことが明らかとなった。

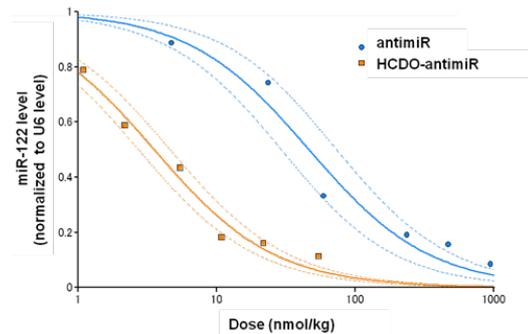


図6：用量反応曲線

(3) splicing 制御核酸医薬への応用

従来の1本鎖 SSO と HCDO-SSO をそれぞれ 10nM で transfection し、HCDO-SSO は有意に SSO よりも高い exon skipping 効率を認めた(図7A,7B)。一方で HCDO-SSO で用いる DNA 鎖単独では exon skipping 効果を確認できなかった。

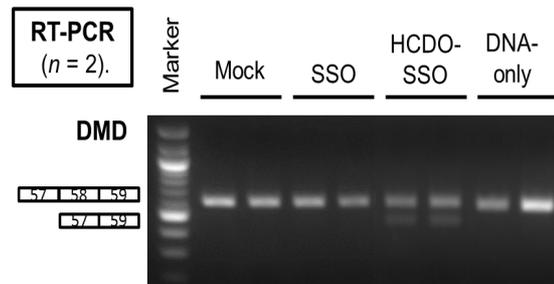


図7A：定性 RT-PCR

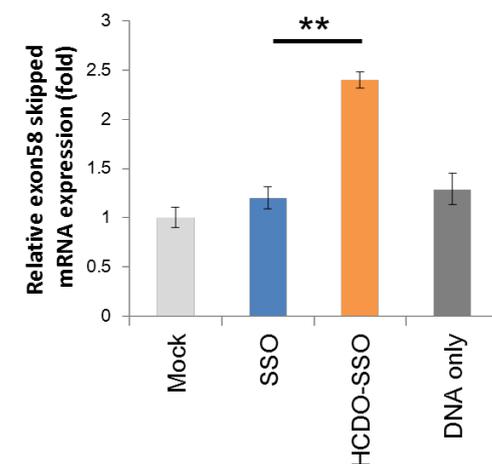


図7B：定量 RT-PCR ($n = 3$, mean values \pm s.e.m., ** $P < 0.01$)

続いて、HCDO-SSO の濃度依存的な exon skipping 効率の向上を検討した(100, 20, 5nM にて transfection)。いずれの濃度においても一本鎖 SSO よりも HCDO-SSO は有

意に高い exon skipping 効果を確認した(図 8 A, 8 B)。

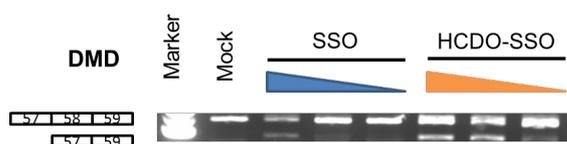


図 8A : 定性 RT-PCR

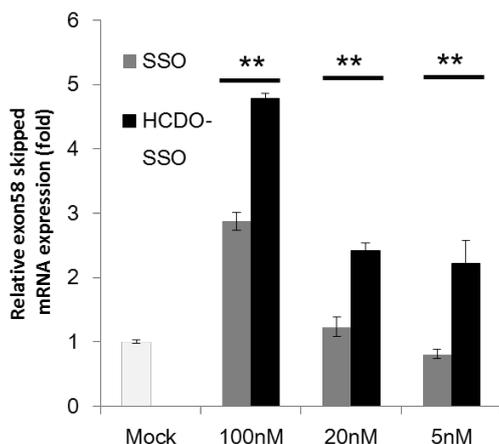


図 8B : 定量 RT-PCR ($n = 3$, mean values \pm s.e.m., ** $P < 0.01$)

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)

[学会発表](計1件)

吉岡耕太郎, 筋野裕美子, 田中規恵, 朴文英, 仁科智子, 桑原宏哉, 仁科一隆, 横田隆徳. 新規二本鎖ヘテロキメラ構造によるマイクロ RNA 抑制薬の増強効果. 第6回日本 RNAi 研究会. 2014.8.28. 広島.

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・脳神経病態学分野・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: