

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26282136

研究課題名(和文)脳梗塞克服へ向けた虚血応答性核酸医薬の開発

研究課題名(英文)Development of Ischemia-Specific Oligonucleotide Therapeutics System for Acute stroke

研究代表者

石橋 哲 (ISHIBASHI, SATORU)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：30533369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：脳梗塞は本邦での主要な死因となる国民病で、神経細胞の虚血分子病態は明らかになっているにもかかわらず神経保護薬は開発されていない。本研究では、医学、工学の連携により世界最高水準の遺伝子抑制効果をもつ独自のヘテロ核酸と、脳梗塞病態特異的に作用する人工核酸技術を軸に、急性期脳梗塞の病態に最適化した核酸医薬を開発することを目的としている。急性期脳梗塞でpHが低下したときのみ遺伝子抑制効果を発揮する虚血応答型人工核酸を開発/最適化し、ヘテロ核酸技術と組み合わせることにより、マウス脳梗塞モデルに対して経静脈投与であっても梗塞病巣選択的に遺伝子抑制効果を示し、さらに強い治療効果を示すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Stroke remains a major cause of mortality and long-term disability worldwide. Recent studies elucidated well the complex pathogenesis of acute ischemic stroke such as dynamic alternation of genes and proteins, which could contribute to develop novel therapeutics for acute stroke.

We previously developed an heteroduplex oligonucleotide (HDO), which strongly silenced its target gene in many organs, and a peptide ribonucleic acids (PRNA), which regulated genes expression based on intracellular environmental condition (e.g. pH). By means of these two novel technologies, we aimed to create ischemia-specific oligonucleotide therapeutics system for acute stroke. In our studies, we have successfully developed a novel oligonucleotide, which could specifically and strongly inhibit gene expression in brain early in ischemic stroke and can dramatically influence its phenotype.

研究分野：Neuroscience

キーワード：脳卒中 核酸医薬 神経保護 マウス 人工核酸 環境応答型核酸 水素イオン指数 血管新生

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳梗塞は、本邦での主要な死因となる国民病で、寝たきりの最大の原因となっている。現在、急性期脳梗塞に対して血栓溶解療法が行われており、うまく血栓が溶解できた場合には梗塞病巣周辺のペナンプラ領域（障害は受けているがまだ壊死していない領域）の回復により高い治療効果が認められるが、本治療法の適応となる割合は全脳梗塞症例のわずか数%程度である。このペナンプラ領域を生存させるため、現在まで様々な神経保護薬開発研究がなされてきたが、その臨床的効果が実証された薬剤は皆無である。しかし、ペナンプラの虚血病態は分子生物学的に明らかにされており、虚血部位に選択的な分子（遺伝子）標的治療が可能となれば、発症後の脳梗塞巣を縮小して後遺症を軽減できる可能性が高い。

(2) 治療効果の最大化に向けて（ヘテロ核酸(HDO) の効果)

核酸医薬による遺伝子治療はアンチセンス核酸(ASO)で、2012年から米国で最初の臨床応用が始まっているが、その有効性はいまだ十分でない。我々はASOに相補鎖RNAを結合させ、細胞内のRNase Hを利用して相補鎖を解離させる新規の核酸医薬であるDNA/RNAヘテロ核酸(HDO)を開発した(図1)。HDOでは、静脈投与で肝臓で従来のASOの200-1000倍の飛躍的な有効性の上昇に成功した。本技術は産業界に高く評価され、さらに2015年、医科歯科大学発のバイオベンチャー「レナセラピューティクス」が設立された。共同研究も海外製薬会社を含めて複数社と行っている。

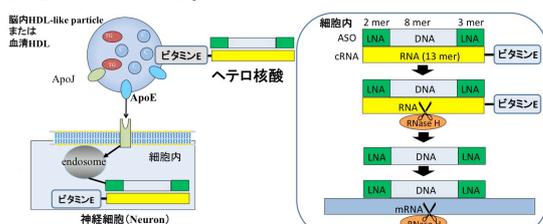


図1. DNA/RNAヘテロ核酸(HDO)の遺伝子抑制のメカニズム  
 ビタミンEをリガンドとしてデリバリーされたDNA/RNAヘテロ核酸(左)は、RNaseHによって細胞内で相補鎖RNAが切断され、単独のアンチセンスASO gapmerとなる。その後標的mRNAとハイブリダイズした後、再びRNaseHによってmRNAが切断され、標的遺伝子の発現抑制効果を生じる(右)。

(3) 病態/病態特異性の向上に向けて（虚血応答型人工核酸システムの概要）

これまで効果的な核酸医薬開発を目指し、標的RNAに対する高い親和性を持ち、少量でも優れた効果を発揮する人工核酸が多く報告されている。ところが高い親和性を示す核酸医薬分子は、標的臓器以外とも複合体を形成することによる副作用の発現など、重大な問題も指摘されている。このため、核酸医薬が必要となる環境下でのみで薬効を発現する細胞内環境変化応答型核酸医薬の開発が切望されてきた。この様な背景を踏まえ、分担研究者である和田健彦らは細胞内環境変化、癌細胞に特徴的低酸素環境に応答し、癌細胞内でのみ標的RNAとの複合体を形成し、

正常細胞では複合体が解離する、可逆的複合体形成制御を実現する人工核酸開発に取り組んでいる。具体的にはペプチド骨格に修飾RNAを核酸認識部位として導入した、ペプチドリボ核酸 (Peptide Ribonucleic Acid ; PRNA; 図2) と名づけた人工核酸の設計/合成に成功した。PRNAは、細胞内環境変化に応答し核酸塩基部の anti-syn 配向変化を駆動力とした標的RNAに対する親和性の on-off 制御機能を有し、癌細胞での低酸素環境 (pH6.2程度) では標的RNAに対する高い親和性を示しASOとして有効に機能する(図2右)のに対し、正常細胞内環境下(pH7.2: 図2左)では分子内に導入したフェニルボロン酸との分子内ボロン酸エステル形成に基づきsyn配向を優先し、核酸医薬としては機能しないことを実証している。

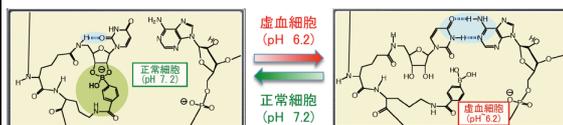


図2: 虚血応答性人工核酸の概念図

今回、脳梗塞ペナンプラ領域細胞は、癌細胞同様、虚血細胞（低酸素）環境であることに注目し、虚血細胞応答型人工核酸の開発、そしてヘテロ核酸との融合による虚血細胞応答型人工核酸システムへの展開を着想した。

2. 研究の目的

急性期脳梗塞では低酸素状態により嫌気性代謝が亢進し乳酸の蓄積とともに、脳実質細胞内pH(pHi)が6.2-6.5程度(正常pHiは7.2)に低下し、カルシウムイオンの細胞内流入により細胞死が引き起こされる。このpHiの低下は、PRNAのRNAに対する親和性が最も上がる状態である。

脳梗塞に特異的な病態にのみ効果を発現する虚血応答性核酸医薬を開発し、現在まで有効な治療法が開発できていなかった脳梗塞に対する神経保護療法を実現化させる。具体的には、医工の連合により現段階で世界最高水準の in vivo 遺伝子抑制効果を持つ独自のヘテロ核酸分子構造に、pH 応答性人工核酸技術を導入した「虚血応答型ヘテロ核酸医薬」を開発して、実際の脳梗塞の最も基本となる病態「選択的」に、かつ高い「有効性」を持つ分子（遺伝子）標的治療を実現させる画期的な新規脳梗塞治療薬を創薬する。

3. 研究の方法

(1) マウス由来神経細胞、グリア細胞、血管内皮細胞を使用した in vitro 虚血細胞モデル及びマウス脳梗塞モデルを用いて、ペナンプラ領域の pH 測定を行い、その pH に最適化した虚血応答型人工核酸の分子設計・合成を調整する

(2) マウス脳梗塞モデルを用いて投与したヘテロ核酸の脳実質内の分布を追跡するこ

とにより、至適投与時期/投与量を決定し、実際の脳細胞特異的な遺伝子抑制効果を検証する

(3) マウス脳梗塞モデルを用いて、虚血反応性ヘテロ核酸システムの実際の治療効果を検討する

#### 4. 研究成果

(1) 至適な細胞内 pH (pHi) 範囲の測定及び虚血応答型人工核酸の分子設計・合成  
研究分担者 (和田) が当初開発した虚血応答性核酸の RNA に対する親和性が最も上がる状態は、細胞内 pH が 6.2 程度であった。しかしながら、蛍光 pH 指示薬 (BCECF) を用いた *in vitro* 虚血細胞モデルや、マウス脳梗塞モデルで細胞内 pH 及び脳実質 pH を測定した所、すでに組織が壊死している梗塞部位では pH が 6.2-6.4 程度に低下するが、周辺に存在する神経保護療法の治療標的部位であるペナンプラ領域は pH 6.5-6.8 程度の低下であることが判明した。

そこで、分子内導入フェニルボロン酸部位への置換基導入など、さらなる分子設計・合成を行った。結果として、フェニルボロン酸部位へのメトキシ基やニトロ基など各種置換基導入により、ボロン酸部位の酸性度 (pKa) が制御可能であり、この pKa の制御により分子内ボロン酸エステル形成の on-off 制御 pH のコントロールも可能である事を明らかにした (図 3)。

| 分子間             |  |  |  |  |
|-----------------|---|---|---|---|
| $\sigma$        | 0.00  | 0.11  | 0.68  | 0.93  |
| pK <sub>s</sub> | 8.1   | 7.8   | 6.7   | 6.1   |
| 分子内             |  |  |   |   |
| $\sigma$        | 0.36  | 1.04  |   |   |
| pK <sub>s</sub> | 5.8   | 4.4   |   |   |

図 3: 図 2 で示したフェニルボロン酸に種々の官能基を導入し、on-off する pH の最適化が可能となった

この化学的知見から、虚血病態に最適化した虚血応答性ヘテロ核酸の作成が可能となった。

(2) マウス脳梗塞モデルでの投与したヘテロ核酸の遺伝子抑制効果と脳実質内での分布解析

ヘテロ核酸の脳実質細胞への到達性を確認するために、蛍光色素で標識し、脳梗塞モデルマウスに経静脈的投与を行った。脳梗塞 3, 6, 12, 24 時間後に、それぞれ 50mg/kg のヘテロ核酸を投与したところ、すべてのタイミングで脳実質内において蛍光色素が検出された。特に、治療目的とする神経細胞及び血管内皮細胞での検出率が高く、その細胞特異性は、人工核酸のデリバリーリガンドに用いた VitE の作用である可能性が考えられた。

また、経静脈投与による脳実質内細胞へのデリバリーに成功しただけではなく、脳実質細胞の明らかな標的遺伝子抑制にも成功し、その効果は従来の一本鎖核酸 (ASO) と比較しても格段に良好な効果であった。また、この遺伝子抑制効果は正常脳では認められず、虚血部位選択的に認められ、病態特異的な遺伝子抑制が可能と考えられた (図 4)。

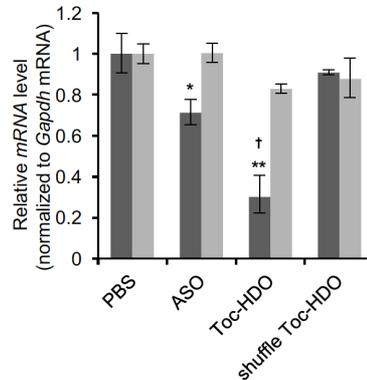


図 4: マウス脳梗塞モデル脳で定量した mRNA 量。脳梗塞側の脳 (濃いグレー) 及び非梗塞側の脳 (薄いグレー)。HDO 治療群は対照群 (PBS) や ASO 治療群と比較して強い遺伝子抑制効果を発揮し、その有意な遺伝子抑制効果は梗塞脳選択的であり、非梗塞脳では遺伝子抑制は見られなかった。

(3) マウス脳梗塞モデルでのヘテロ核酸の治療効果検討

マウス脳梗塞モデルに対して、我々の開発したヘテロ核酸の実際に治療効果を発揮することが出来るかどうかを確認するため、いくつかの脳梗塞の病態に関連した標的遺伝子に対するヘテロ核酸を作成し、梗塞体積測定、神経機能解析、組織学的検討などを行った。脳梗塞作成 3 時間後に 50mg/kg の経静脈投与を行ったところ、梗塞体積、神経機能は有意に変化し、その原因として新生血管や神経保護作用を修飾したものであると免疫組織学的検討により考えられた。

当初の実験計画を超え、治療効果発現メカニズムを解明するため、治療群、非治療群のマイクロアレイ解析を行っている (図 5)。

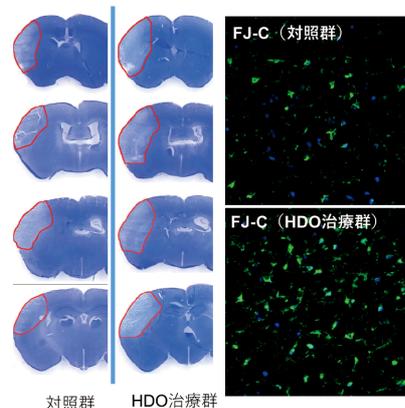


図 5: 中枢神経系でも、特に神経細胞や血管内皮細胞に発現が強い MALAT-1 (metastasis

associated lung adenocarcinoma transcript  
1) 遺伝子をヘテロ核酸で抑制した結果を示す。梗塞体積の比較 (左)。虚血により変性した神経細胞 (緑色の細胞) の検出 (右)。MALAT-1 遺伝子の場合、ヘテロ核酸治療により有意に梗塞体積の拡大と、変性神経細胞の増加を認めた。

#### 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 15 件) すべて査読あり

- ① Numasawa Y, Hattori T, Ishiai S, Kobayashi Z, Kamata T, Kotera M, Ishibashi S, Sanjo N, Mizusawa H, Yokota T. Depressive disorder is associated with raphe nuclei lesions in patients with brainstem infarction. *J Affective Disorders* 2017;213:191-198. DOI: 10.1016/j.jad.2017.02.005
- ② Itoh Y, Murata A, Sakamoto S, Nanatani K, Wada T, Takahashi S, Kamagata K. Activation of p53 Facilitates the Target Search in DNA by Enhancing the Target Recognition Probability. *J Mol Biol.* 2016;428:2916-30. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.06.001.
- ③ Iwasawa E, Ichijo M, Ishibashi S, Yokota T. Acute development of collateral circulation and therapeutic prospects in ischemic stroke. *Neural Regen Res.* 2016;11:368-71. DOI: 10.4103/1673-5374.179033
- ④ Nishina K, Piao W, Yoshida-Tanaka K, Sujino Y, Nishina T, Yamamoto T, Nitta K, Yoshioka K, Kuwahara H, Yasuhara H, Baba T, Ono F, Miyata K, Miyake K, Seth PP, Low A, Yoshida M, Bennett CF, Kataoka K, Mizusawa H, Obika S, Yokota T. DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide for highly efficient gene silencing. *Nat Commun.* 2015;6:7969. DOI: 10.1038/ncomms8969
- ⑤ Yui D, Nishida Y, Nishina T, Mogushi K, Tajiri M, Ishibashi S, Ajioka I, Ishikawa K, Mizusawa H, Murayama S, Yokota T. Enhanced Phospholipase A2 Group 3 Expression by Oxidative Stress Decreases the Insulin-Degrading Enzyme. *PLoS One.* 2015;10(12):e0143518. DOI: 10.1371/journal.pone.0143518
- ⑥ Ichijo M, Ishibashi S, Li F, Miki K, Yui D, Mizusawa H, Yokota T. Sphingosine-1-phosphate receptor-1 selective agonist enhances collateral growth and protects against subsequent stroke. 2015. *PLoS One*;10:e0138029. DOI: 10.1371/journal.pone.0138029
- ⑦ Sakai H, Shinto S, Kumar J, Araki Y, Sakanoue T, Takenobu T, Wada T, Kawai T, Hasobe T. Module Strategy for Peptide Ribonucleic Acid (PRNA)-DNA and PRNA-Peptide Nucleic Acid (PNA)-DNA Chimeras: Synthesis and Interaction of Chimeras with DNA and RNA. *Chemistry Letters* 2015;44:1650-1652. DOI: org/10.1246/cl.151157
- ⑧ Nishijima M, Goto M, Fujikawa M, Yang C, Mori T, Wada T, Inoue Y. Mammalian serum albumins as a chiral mediator library for bio-supramolecular photochirogenesis: optimizing enantiodifferentiating photocyclodimerization of 2-anthracenecarboxylate. *Chem Commun (Camb).* 2014;50:14082-5. DOI: 10.1039/c4cc04818k
- ⑨ Miyahara T, Nakatsuji H, Wada T. Circular dichroism spectra of uridine derivatives: ChiraSac study. *J Phys Chem A.* 2014;118:2931-41. DOI: 10.1021/jp501906u
- ⑩ Hirayama S, Sakai H, Araki Y, Tanaka M, Imakawa M, Wada T, Takenobu T, Hasobe T. Systematic control of the excited-state dynamics and carrier-transport properties of functionalized benzo[ghi]perylene and coronene derivatives. *Chemistry* 2014;20:9081-93. DOI: 10.1002/chem.201304679
- ⑪ Shinozaki Y, Richards G, Ogawa K, Yamano A, Ohara K, Yamaguchi K, Kawano S, Tanaka K, Araki Y, Wada T, Otsuki J. Double helices of a pyridine-appended zinc chlorophyll derivative. *J Am Chem Soc.* 2014;43:5262-5. DOI: 10.1021/ja400493e
- ⑫ Fukuhara G, Umehara H, Higashino S, Nishijima M, Yang C, Mori T, Wada T, Inoue Y. Supramolecular

photocyclodimerization of 2-hydroxyanthracene with a chiral hydrogen-bonding template, cyclodextrin and serum albumin. Photochem Photobiol Sci. 2014;13:162-71. DOI: 10.1039/c3pp50127b

- ⑬ Ichijo M, **Ishibashi S**, Ohkubo T, Nomura S, Sanjo N, **Yokota T**, Mizusawa H. Elevated platelet microparticle levels after acute ischemic stroke with concurrent idiopathic thrombocytopenic purpura. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2014;23:587-9. DOI:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2013.04.032
- ⑭ Nishina T, Numata J, Nishina K, Yoshida-Tanaka K, Nitta K, Piao W, Iwata R, Ito S, Kuwahara H, Wada T, Mizusawa H, **Yokota T**. Chimeric Antisense Oligonucleotide Conjugated to  $\alpha$ -Tocopherol. Mol Ther Nucleic Acids. 2014;4:e220. DOI: 10.1038/mtna.2014.72.
- ⑮ Iwata R, Nishina K, **Yokota T**, Wada T. Synthesis and properties of double-stranded RNA-bindable oligodiaminogalactose derivatives conjugated with vitamin E. Bioorg Med Chem. 2014;22:1394-1403. DOI: 10.1016/j.bmc.2013.12.060

[学会発表] (計 9 件)

- ① **Ishibashi S**, Li F, Iwasawa E, Song J, Ichijo M, Zhang Y, Piao W, Yoshida K, Kuwahara H, Yoshioka K, Nagata T, **Yokota T**. SILENCING OF MALAT1 LONG NON-CODING RNA WITH DNA/RNA HETERODUPLEX OLIGONUCLEOTIDES EXACERBATES CEREBRAL ISCHEMIA. World Congress of Neurology. Kyoto (Japan). 2017. 9. 16-21.
- ② **Wada T**, Uematsu R, Asai M, Inagaki M, Sugai H, Araki Y, Sakamoto S, **Ishibashi S**, **Yokota T**. Creation of Ischemia-Specific Oligonucleotide Therapeutics System with Intracellular Environmental Condition - Responsive Peptide Ribonucleic Acids (PRNAs). The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Kumamoto, Japan. 2016. 09. 27-29.
- ③ 上松 亮平, 稲垣 雅仁, 荒木 保幸, 坂本 清志, **石橋 哲**, **横田 隆徳**, **和田 健彦**

**健彦**. 細胞内環境応答性ペプチドリボ核酸 (PRNA) を利用したイスキミア特異的核酸医薬の創成 -pH 応答モジュールを有する PRNA-DNA キメラによる遺伝情報発現制御-. 第 26 回バイオ・高分子シンポジウム. 2016. 7. 28-7. 29. 東京工業大学 (東京) .

- ④ **WADA T**. "Remarkable Enhancement of RNaseH Cleavage Activities of RNA Complexed with Peptide Ribonucleic Acid (PRNA) - DNA Chimera for Effective Cancer Cell Specific Oligonucleotide Therapeutics" (Invited Lecture). Institut Européen de Chimie et Biologie Symposium 2016. 2016. 11. 7. Bordeaux Univ. Talence (France).
- ⑤ **和田健彦**. 「ハイポキシア細胞特異的核酸医薬創製を指向した新規人工核酸の開発」(招待講演). 第 17 回核酸化学最前線フォーラム. 2016 年 7 月 6-8 日. 甲南大学 (神戸)
- ⑥ **Yokota T**. DNA/RNA Heteroduplex Oligonucleotide as a New Class of Oligonucleotide. 第 7 回 Asia TIDES (招待講演). 2015 年 03 月 03 日~2015 年 03 月 03 日. ハイアットリージェンシー大阪 (大阪)
- ⑦ **石橋哲**, 一條真彦, 李富宝, 三木 一徳, 水澤 英洋, **横田隆徳**. S1PR1 expression and endothelial cell proliferation after focal ischemia in mice. 第 56 回日本神経学会学術集会. 2015 年 05 月 20 日~05 月 20 日. 朱鷺メッセ (新潟)
- ⑧ **横田隆徳**. 核酸医薬創薬の問題点と今後の方向性. 日本化学会第 95 春季年会 (招待講演). 2015 年 03 月 29 日~03 月 29 日. 日本大学 (船橋) .
- ⑨ FuYing Li, **石橋哲**, 一條真彦, **和田健彦**, **横田隆徳**. Oligonucleotide reduced gene expression in focal ischemic brain in mice. 第 56 回日本神経学会学術集会. 2015 年 05 月 21 日~05 月 21 日. 朱鷺メッセ (新潟) .

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石橋 哲 (ISHIBASHI Satoru)  
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師  
研究者番号 : 30533369

### (2) 研究分担者

和田 健彦 (WADA Takehiko)

東北大学・多元物質化学研究所・教授  
研究者番号：20220957

(3) 研究分担者（平成 26 年度）

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