

令和元年6月14日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05221

研究課題名(和文) 全身投与による中枢神経制御を可能とする新規核酸医薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel HDO that enables regulation of gene expression in CNS by systemic administration

研究代表者

永田 哲也 (NAGATA, Tetsuya)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号：50362976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：新規ヘテロ核酸では、静脈投与において脳および脊髄での遺伝子抑制が可能であることが確認できた。また複数回投与でその効果は増強しており、用量依存性があることが確認できた。皮下投与でも中枢神経での有効性が確認できている。これまで核酸医薬で末梢投与において、中枢神経で遺伝子抑制効果は証明されておらず、非常に意義が高いと考えられる。またヘテロ核酸の動態が血中での動態は1本鎖核酸とは大きく違うことも発見した。更にヘテロ核酸の血中での結合蛋白や蛋白結合プロファイルの違いも同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝性神経難病に対する核酸を用いた治療法は、その標的遺伝子への特異性の高さや標的の多さなどから有望な治療法として、期待されており、すでに承認済みの医薬品があり、かつ多くの臨床試験が進んでいる。一方で投与経路は髄腔投与に限られており、長期投与・肉体的負担などが懸念されている。核酸の動態から脳血管関門(BBB)を超えることは非常に難しいと考えられていた。本技術において、静脈投与で脳および脊髄での遺伝子抑制することを確認した意義は非常に高い。本技術は粗削りながら、今後の開発により大きな成長が期待できる。

研究成果の概要(英文)：By systemic administration of new type of hetero duplex oligonucleotide (HDO), gene knockdown in the brain and spinal cord was observed. Moreover, the effect was enhanced by multiple administration, and we also confirmed that there was dose dependency. Subcutaneous administration was also effective in the central nervous system (CNS). On the other hand, no effect was observed at all by systemic administration of single stranded ASO. So far, gene knockdown effects in CNS by systemic administration of any oligonucleotide have not been demonstrated. We also found that the dynamics of HDO in the blood is significantly different from that of single-stranded ASO. Furthermore, differences in binding proteins and protein binding profiles of HDO in blood were also identified.

研究分野：核酸医薬 神経変性疾患

キーワード：核酸医薬 神経変性疾患 ヘテロ核酸 中枢移行性

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝性神経難病に対する核酸を用いた治療法は、その標的遺伝子特異性の高さや標的の多さなどから有望な治療法として、期待されている。現に下記の図にみられるように脊髄性筋萎縮症や筋萎縮性側索硬化症に対して、既に治験が開始されており、かつ第3相臨床試験まで進んでおり、非常に有望な結果が一部では得られつつある。(2016年当時)

疾患	投与経路	標的遺伝子	開発名	開発段階
脊髄性筋萎縮症(幼児)	髄腔投与	SMN2	ISIS-SMN-Rx	Phase III
脊髄性筋萎縮症(小児)	髄腔投与	SMN2	ISIS-SMN-Rx	Phase III
筋萎縮性側索硬化症	髄腔投与	SOD1	ISIS-SOD1-Rx	Phase I

しかしながら現時点では、投与経路は上記のように髄腔投与に限られている。核酸の動態から脳血管関門(BBB)を超えることは非常に難しいと考えられている。上記はいずれも致死的な神経疾患であり、その重症度を考えれば、髄腔投与でも仕方ない面もある。しかしながら、疾患の性質上、長期間にわたる投与が必要であり、患者の負担を考えると非常に肉体的負担が大きく、感染のリスクなど髄腔による長期投与は、生命の観点から問題点が存在する。

(2) 我々の開発した DNA/RNA 2 本鎖ヘテロ核酸(HDO)は既存の核酸医薬とその分子構造・作用機構が異なる第3の核酸医薬であり、既存の核酸医薬の 10-1000 倍の有効性を有する画期的な日本発の基盤技術である。これを用いて、全身投与でこのヘテロ核酸を用いて、骨格筋・心筋や腹部臓器に加え、中枢神経系の遺伝子制御を可能とする革新的な核酸医薬を創生することを目的とする。

## 2. 研究の目的

(1) これまでに 1 本鎖核酸や siRNA が末梢投与により脳内に移行して、脳内遺伝子制御を可能にした事例は存在しない。我々は、予備検討において末梢投与で中枢神経の遺伝子抑制が確認している。本ヘテロ核酸構造で脳内での末梢投与による遺伝子制御を実現する。更にその薬物動態を確認する。それにより、さらに効果的な核酸構造の開発を目指す。

(2) 脳内に移行するメカニズムは不明であり、各種スカベンジャー受容体等に対する阻害抗体やノックアウトマウスを用いて、その機序を解明する。また核酸は投与後、各種血清蛋白に結合することが知られている。これらの結合蛋白がヘテロ核酸においてどのように 1 本鎖核酸と違うのか検討し、脳内移行のメカニズムを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 脳内に移行性がある新規ヘテロ核酸を用いて、単回投与および複数回投与でマウスにおける遺伝子抑制効果を中枢神経で確認する。また同様に皮下投与でも確認する。加えて単回投与後、どの程度で核酸抑制効果が持続するか確認する。また新たなりガンドに関しても検討する。加えて、蛍光付き核酸を用意して、投与後の脳内及び血清での時間的変化を検討する。同じく *in vivo* confocal を用いて、その動態を観察する。

(2) 脳内への移行性のメカニズムを検討するために、各種スカベンジャー受容体等に対する阻害

抗体やノックアウトマウスを準備する。そのマウスや阻害抗体を使いヘテロ核酸の脳内での遺伝子抑制効果が減弱または増強されるかを検討する。またゲルシフトアッセイを用いて結合蛋白を同定し、蛍光偏光法を用いて、蛋白の結合の程度を測定する。

#### 4. 研究成果

(1) 予備検討において末梢投与で中枢神経の遺伝子抑制が確認できたヘテロ核酸構造で再現性を確認した。1回投与で1本鎖アンチセンス核酸(ギャップマータイプ)ではやはり、用量を増加させても遺伝子抑制効果は見られなかった。一方でヘテロ核酸では、単回投与で遺伝子抑制効果が確認できた(図1)。その後、複数回にすることで遺伝子抑制効果を検討した。複数回にしても遺伝子抑制効果は、1本鎖アンチセンス核酸では確認できなかった。一方でヘテロ核酸では、複数回により遺伝子抑制効果は明らかに増強された(図2)。これにより用量依存性が確認できた。また効果の持続性についても検討した。高用量単回投与後、2週間程度遺伝子抑制効果の持続が確認できた。

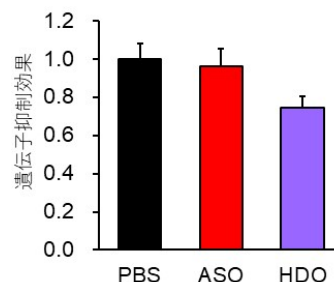


図1 単回投与による大脳皮質遺伝子抑制効果

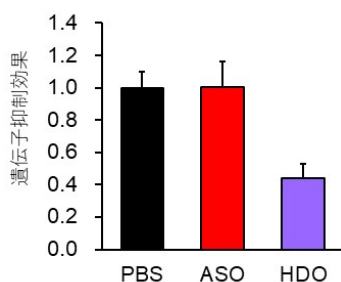


図2 複数回投与による大脳皮質遺伝子抑制効果

#### (2) 動態の検討

ヘテロ核酸のアンチセンス側の5'に蛍光を標識し、全身投与を行った。投与後数ポイントを設定し、適宜、脳および血清を回収した。その後、ホモジェナイズしてTECANにて蛍光を測定した。ヘテロ核酸では明らかに1本鎖核酸と比較して、蛍光輝度が高く遺伝子抑制効果を反映していると考えられた。ヘテロ核酸は1本鎖核酸と比して血中滞留性が高いことも判明した。また *in vivo* Confocal を用いて脳内への移行について観察した。同様にヘテロ核酸は脳血管でも滞留性が1本鎖核酸と比べて向上していることが確認された。末梢から投与した蛍光付きヘテロ核酸は脳血液関門を越えて、脳内に分布している様子が観察された。一方でコントロールとして投与した蛍光付き1本鎖核酸では脳内の移行は観察されなかった。

#### (3) メカニズム解明

脳移行性ヘテロ核酸のメカニズム解析を行った。2種類の脂質関連分子(LDLR および ApoE)のノックアウトマウスに脳移行性ヘテロ核酸を投与して、その効果が減弱するか検討した。更に、核酸の細胞内取り込みに関連している2つの分子に対する阻害抗体および脳内脂質代謝関連阻害剤を用いて、その効果に変動が見られるかを検討した。しかしながら、それらの阻害剤を用いても、脳移行性ヘテロ核酸の脳内移行に減弱はなく、現在、他のリガンドのノックアウトマウスを検討中である。

#### (4) 結合蛋白の検討

ゲルシフトアッセイ後、ヘテロ核酸と共に移動するバンドを切り出しMS解析で蛋白の同定を検討した。MS解析の結果、結合していると考えられている分子8種類を同定した。それぞれに対して蛍光偏光法で、その直接結合を検討し、Kd値を算出した。1本鎖核酸では、これまで知られている通りアルブミンに結合しやすく、血清脂質分子とは結合が強くなかった。一方で2本鎖にすることで、検討したどの分子に対しても、著しく蛋白結合は減少した。これにヘテロ核酸にリガンドを結合させると、血清脂質分子やアルブミンに対する結合は著しく上昇した。これらの違いがリガンド結合ヘテロ核酸の血中滞留性の上昇や脳移行性に関与していると考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

- ① Lim KRQ\*, Echigoya Y\*, Nagata T\*, Kuraoka M, Kobayashi M, Aoki Y, Partridge T, Maruyama R, Takeda S, Yokota T (\*equal to contribution) Efficacy of Multi-exon Skipping Treatment in Duchenne Muscular Dystrophy Dog Model Neonates. *Mol Ther.* 27(1):76-86 (2019) doi: 10.1016/j.ymthe.2018.10.011.
- ② Watanabe N\*, Nagata T\*, Satou Y, Masuda S, Saito T, Kitagawa H, Komaki H, Takagaki K, Takeda S. (\*equal to contribution) NS-065/NCNP-01: An Antisense Oligonucleotide for Potential Treatment of Exon 53 Skipping in Duchenne Muscular Dystrophy. *Mol Ther Nucleic Acids.*;13:442-449. (2018) doi: 10.1016/j.omtn.2018.09.017.
- ③ Tanihata J, Nagata T, Ito N, Saito T, Nakamura A, Minamisawa S, Aoki Y, Ruegg UT, Takeda S. Truncated dystrophin ameliorates the dystrophic phenotype of mdx mice by reducing sarcolipin-mediated SERCA inhibition. *Biochem Biophys Res Commun.* 505(1):51-59. (2018) doi: 10.1016/j.bbrc.2018.09.039.
- ④ Zeniya S, Kuwahara H, Daizo K, Watari A, Kondoh M, Yoshida-Tanaka K, Kaburagi H, Asada K, Nagata T, Nagahama M, Yagi K, Yokota T. Angubindin-1 opens the blood-brain barrier in vivo for delivery of antisense oligonucleotide to the central nervous system. *Journal of controlled release.* 10; 283:126-134. (2018) doi: 10.1016/j.jconrel.2018.05.010.
- ⑤ Guo H, Yoshioka K, Kunieda T, Asami Y, Miyata H, Yoshida-Tanaka K, Nagata T, Yokota T. Efficacy of microRNA silencing by lipid-conjugated double-stranded antisense oligonucleotides. *Journal of Medical and Dental Sciences.* 65 (2): 83-88. (2018) doi.org/10.11480/jmds.650205
- ⑥ Kuwahara H, Song J, Shimoura T, Yoshida-Tanaka K, Mizuno T, Mochizuki T, Zeniya S, Li F, Nishina K, Nagata T, Ito S, Kusuhara H, Yokota T. Modulation of blood-brain barrier function by a heteroduplex oligonucleotide in vivo. *Scientific reports* 8(1) (2018),4377 doi: 10.1038/s41598-018-22577-2.

- ⑦ Komaki H\*, Nagata T\*, Saito T\*, Masuda S, Takeshita E, Sasaki M, Tachimori H, Nakamura M, Aoki Y, Takeda S: Systemic administration of the morpholino antisense NS-065/NCNP-01 for exon-53 skipping in Duchenne muscular dystrophy: A phase I study. *Science Translational Medicine*. (2018) (\*equal to contribution) 10(437) doi: 10.1126/scitranslmed.aan0713.
- ⑧ Kishimoto Y, Fujii A, Nakagawa O, Nagata T, Yokota T, Hari Y, Obika S: Synthesis and thermal stabilities of oligonucleotides containing 2'-O,4'-C-methylene bridged nucleic acid with a phenoxazine base. *Organic & biomolecular chemistry*, 15:8145-52. (2017), 3.564 doi: 10.1039/c7ob01874f.

〔学会発表〕（計7件）

- ① 永田哲也 核酸医薬品開発の現状 BioJapan 2018, 横浜, 10.10.2018
- ② Nagata T : Development of oligonucleotide therapies for neurodegenerative disease. 第41回日本神経科学大会, 神戸, 7.28.2018
- ③ Nagata T : Recent progress of DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide. 第59回日本神経学会学術大会, 札幌, 5.23.2018
- ④ 永田哲也、横田 隆徳 : DNA/RNA ヘテロ核酸による遺伝子発現抑制. 第34回日本DDS学会, 長崎, 6.21.2018
- ⑤ 永田哲也 : 核酸医薬品の開発の現状. 第36回日本認知症学会学術集会, 金沢, 11.24, 2017
- ⑥ Nagata T, Ohyagi M, Ihara K, Kaburagi H, Nishina K, Piao W, Yoshida-Tanaka K, Huijia G, Kuwahara H, Yoshioka K, Yokota T : The effect of DNA/RNA heteroduplex oligonucleotides on muscle. 23th World Congress of Neurology, Kyoto, 9.19, 2017
- ⑦ Kunieda T, Yoshioka K, Sujino Y, Tanaka K, Piao W, Kuwahara H, Nishina N, Nagata T, Yokota T.: Development of antisense oligonucleotide with a new type of a double stranded structure. The 21st annual meeting of the RNA society, Kyoto, 6.29, 2016.

〔図書〕（計2件）

- ① 永田哲也, 吉岡耕太郎, 横田隆徳 : 核酸治療、神経疾患治療ストラテジー、中山出版、pp 288-296、2017
- ② 永田哲也, 吉岡耕太郎, 横田隆徳 .: 運動ニューロン疾患に対する核酸医療は将来どうなりますか? 運動ニューロン疾患 (神経内科 Clinical Questions & Pearls)、中外医学社、pp 180-188、2017

〔産業財産権〕

○出願状況（計3件）

名称：脳血液関門通過型ヘテロ2本鎖核酸

発明者：横田隆徳、永田哲也

権利者：東京医科歯科大学

種類：特許

番号：特願2018-540337

出願年：2019

国内外の別：国内

名称：脳血液関門通過型ヘテロ2本鎖核酸

発明者：横田隆徳、永田哲也

権利者：東京医科歯科大学

種類：特許

番号：17853209.9

出願年：2019

国内外の別：国外

名称：脳血液関門通過型ヘテロ2本鎖核酸

発明者：横田隆徳、永田哲也

権利者：東京医科歯科大学

種類：特許

番号：16/335017

出願年：2019

国内外の別：国外

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：宮田完二郎

ローマ字氏名：(MIYATA, Kanjiro)