

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15140

研究課題名(和文)リガンド分子非依存性核酸医薬の新規開発

研究課題名(英文)Development of therapeutic oligonucleotides without ligand conjugation.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、リガンド分子を用いず二本鎖核酸医薬単独での有効性向上、並びにRNaseH非依存性の核酸医薬への応用を試みた。デュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子ジストロフィンに対するスプライシングスイッチ核酸医薬(SSO)のデザインし、二本鎖SSOでの有効性をin vitro, in vivoで検討した。対象となるジストロフィンmRNAでのエクソンスキッピング比率を検討したところ二本鎖SSOでin vitro, in vivoでのエクソンスキッピングを誘導することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Here we developed a new class of RNaseH independent therapeutics oligonucleotide without a ligand conjugation. We assessed in vitro and in vivo efficacy of double-stranded SSO (splicing switching oligonucleotide) targeting dystrophin, which is causative gene of Duchenne muscular dystrophy (DMD). We achieved exon skipping of the dystrophin mRNA by double-stranded SSO in vitro and in vivo.

研究分野：遺伝子治療

キーワード：核酸医薬

1. 研究開始当初の背景

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リガンド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、用いた核酸医薬は RNase H 依存性の核酸医薬に限られ、有効性の向上にはリガンド分子の結合を要するため応用に限界が生じていた。そこで本研究では、RNaseH「非」依存性の核酸医薬への応用を、リガンド分子を用いず2本鎖核酸医薬単独で達成することで、2本鎖 ASO の限界を克服してあらゆる核酸医薬の効果を飛躍的に向上させることを目的とする。

2. 研究の目的

本研究では、リガンド分子を用いず2本鎖核酸医薬単独での有効性向上、並びに RNaseH 非依存性の核酸医薬への応用を試みた。デュシェンヌ型筋ジストロフィーの原因遺伝子 Dystrophin(現在 splicing 制御の1種である Exon skipping による臨床治験が進んでいる)に対するスプライシングスイッチ核酸医薬(SSO)のデザインし、in vitro(筋細胞である C2C12 細胞へのトランスフェクション)、in vivo (病態モデルマウスである mdx マウスの前脛骨筋に筋肉注射投与)で exon skipping の誘導能を検討した。具体的には in vitro にて核酸医薬デザインの検討(1)、2本鎖 SSO の有効性検討を in vitro (2)、in vivo (3)にて行った。

3. 研究の方法

(1)核酸医薬デザインの検討

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 による臨床治験が進んでいる)の exon23 を skipping する効果を持つ SSO について検討した。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(Locked nucleic acid)と DNA が混在した LNA-DNA mixmer とした(図1)。

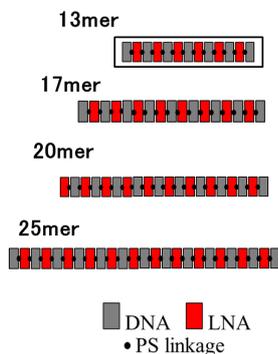


図1 : LNA-DNA mixmer の化学修飾

配列デザインとしてはエクソン 23-イントロン 23 ジャンクション部において既報で優れた exon skipping 誘導能が報告されている 20塩基部を中心に、図2のように13-20塩基長の SSO を種々の配列にて設計した。

【SSOのデザイン(dystrophin exon23-intron23 junctionをtarget)】

Dystrophin Pre-mRNA	exon23	intron23
ATAAACTTCGAAAATTTGAGGtaagccgaggtttgcctttaa		
Mixer 13mer-1	'ε-TAAAUUUUUUUU-ε	
Mixer 13mer-2	'ε-AAUUUUUUUUUU-ε	
Mixer 13mer-2+	'ε-AUUUUUUUUUUU-ε	
Mixer 13mer-3	'ε-UUUUUUUUUUUU-ε	
Mixer 13mer-3+	'ε-UUUUUUUUUUUU-ε	
Mixer 13mer-4	'ε-UUUUUUUUUUUU-ε	
Mixer 13mer-4+	'ε-UUUUUUUUUUUU-ε	
Mixer 13mer-5	'ε-UUUUUUUUUUUU-ε	
Mixer 13mer-6	'ε-UUUUUUUUUUUU-ε	
Mixer 13mer-7	'ε-UUUUUUUUUUUU-ε	
Mixer 17mer	'ε-UUUUUUUUUUUUUUU-ε	
Mixer 20mer	'ε-UUUUUUUUUUUUUUUUU-ε	
Mixer 25mer	'ε-TAAAUUUUUUUUUUUUUUU-ε	

図2 : SSO の配列デザイン

上記の SSO を最終濃度が 1μM となるようにそれぞれを Lipofectamine 3000 (Life Technologies, Carlsbad, CA) を用いて C2C12 細胞へ transfection を行った(n=3)。Transfection72 時間後に、ISOGEN (日本ジーン)にて RNA を抽出し、one-step RT-PCR (QIAGEN® OneStep PCR Kit)を以下の primer を用いて行った(forward: ATCCAGCAGTCAGAAAAGCAAA, reverse: CAGCCATCCATTTCTGTAAAGGT)。上記最終産物を 4%アガロースゲルにて電気泳動し、exon23 の skipping 比率を導出し、比較検討し優れた exon skipping 誘導能を有する SSO デザインを導出した。

(2) 2本鎖 SSO の有効性検討 (in vitro)

上記にて導出された1本鎖 SSO とそれを相補的な RNA 鎖をアニーリングさせ、2本鎖 SSO を作成した。具体的には1本鎖 SSO、2本鎖 SSO を等モル量にて混合し、95 で5分間加熱し、その後37 に冷却して1時間保持しアニーリングさせた。上記の1本鎖及び2本鎖 SSO を(1)と同様に C1C12 細胞に transfection させ、同様に exon skipping 効率を検討した。

(3) 2本鎖 SSO の有効性検討 (in vivo)

上記と同様の1本鎖及び2本鎖 SSO をデュシェンヌ型筋ジストロフィーの病態モデルマウスである mdx マウスにて有効性検討を行った。具体的には上記 SSO を6週齢の mdx マウスの両側前脛骨筋にそれぞれ7nmol(350nmol/kg)を筋肉内投与した。(n=4, 陰性対象群として PBS 投与群を n=2 にて行った)筋肉内投与の2週間後に屠殺し、前脛骨筋を採取した。上記を ISOGEN (日本ジーン)にて RNA を抽出し、(1)と同様に one-step RT-PCR 法にて exon skipping 効率を算出した。

4. 研究成果

(1) 核酸医薬デザインの検討

(A) 配列の検討

13塩基長のSSOを図2の如くデザインし、Lipofectamine 3000を用いてC2C12細胞へ1 μ Mにてtransfectionしたところ、exon skipping誘導を認めた(図3)。(図3において、陰性対象群であるlipofectamineのみtransfectionした群では認めない下方のバンドが各種SSOのtransfection群で出現し、同バンドをsequenceしexon23 skippingが誘導されていることを確認した)。以上から優れたexon skipping誘導率を有するSSO配列(4+)を導出した。(図3、4)

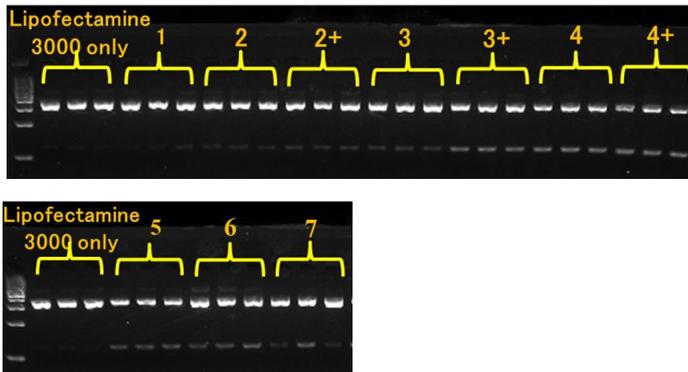


図3: 13塩基長SSOでの配列検討におけるRT-PCR結果 (n=3)

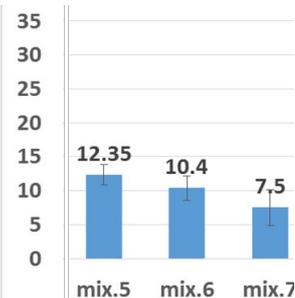
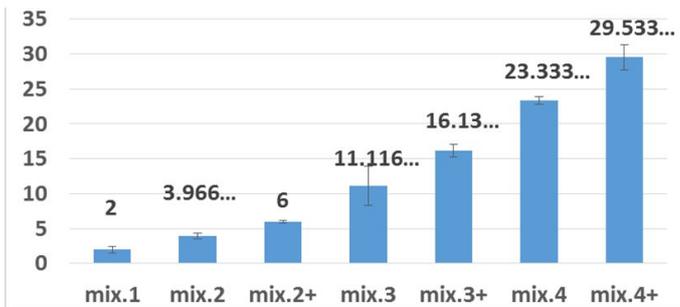


図4: 13塩基長SSOでの配列検討におけるexon skipping誘導率(%) (n=3, mean values \pm s.e.m)

(B) 鎖長の検討

13-20塩基長のSSOを図2の如くデザインし、Lipofectamine 3000を用いてC2C12細胞へ1 μ Mにてtransfectionしたところ、図5のexon skipping誘導能を認め、優れたexon

skipping誘導率を有するSSO塩基長(13塩基長)を明らかにした。

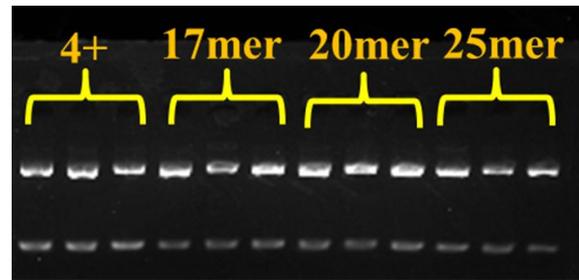


図5: SSOでの塩基長検討におけるRT-PCR結果 (n=3)

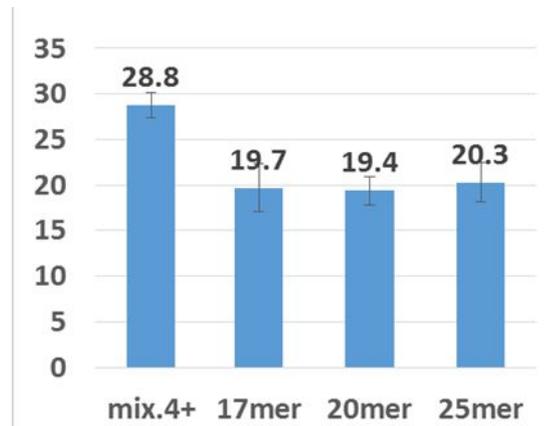


図6: SSOでの塩基長検討におけるexon skipping誘導率(%) (n=3, mean values \pm s.e.m)

(2) 2本鎖SSOの有効性検討 (in vitro)

(1)により明らかとなった優れたexon skipping誘導能を有するSSO(4+)を用いて2本鎖SSOを合成し、(1)と同様にLipofectamine 3000を用いてC2C12細胞へ1 μ Mにてtransfectionしたところ、2本鎖SSOにおいてもexon skippingを誘導することに成功した。(図7)

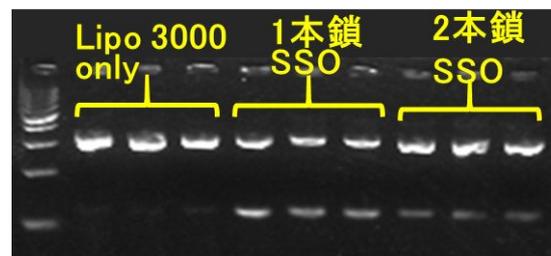


図7: in vitroでの1本鎖及び2本鎖SSOによるexon skipping誘導検討におけるRT-PCR結果 (n=3)

(3) 2本鎖SSOの有効性検討 (in vivo)

(1)により明らかとなった優れたexon skipping誘導能を有するSSO(4+)を用いて2本鎖SSOを合成し、有効性検討を行った。具体的には上記SSOを6週齢のmdxマウスの

両側前脛骨筋に 7nmol(350nmol/kg)を筋肉内投与し (n=4, PBS 投与 n=2)、2 週間後に exon skipping 誘導を評価したところ、2 本鎖 SSO においても exon skipping を誘導することを *in vivo* でも明らかとした。(図 8)

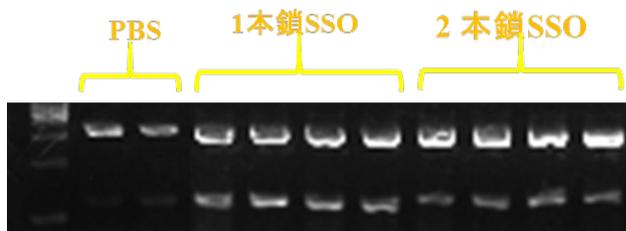


図 8: *in vivo* における 1 本鎖及び 2 本鎖 SSO による exon skipping 誘導検討における RT-PCR 結果 (n=3)

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)

(計 0 件)

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