

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H01016

研究課題名(和文) 心筋・骨格筋の任意の遺伝子制御を可能とする革新的な核酸医薬の開発

研究課題名(英文) Development of innovative nucleic acid therapy enabling any gene control in cardiac and skeletal muscle

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・プロジェクト准教授

研究者番号：50362976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 35,200,000円

研究成果の概要(和文)：ギャップマー型ヘテロ核酸を用いてコレステロールリガンドで、静脈投与にて心筋・骨格筋で従来と比較して3-7倍程度の遺伝子抑制効果を実現した。また遺伝子抑制も投与後、4-6ヶ月は50%以下となるなど、圧倒的な持続時間も認めている。皮下投与でも十分な遺伝子抑制効果も認めている。加えて、新たに脂質リガンドを合成してスクリーニングをしており、こちらでもいくつかのリガンドでコレステロールと同等の効果も認めている。加えてスキッピングでも従来と比較すると薬物動態でも血中および心臓及び骨格筋で圧倒的な向上を認め、それに伴ったスキッピングの上昇を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでアンチセンス核酸で正常の心筋・骨格筋で遺伝子抑制効果が弱かったが、今回の開発でより遺伝子効果が強く、持続時間が長いヘテロ核酸の開発に成功している。また新たに同等の効果を持つ、リガンドも獲得した。またスキッピングでも従来の核酸では心筋・横隔膜での効果が弱いことが難点であったが、それを克服したヘテロ核酸を創生した。

研究成果の概要(英文)：Cholesterol-conjugated heteroduplex oligonucleotide (HDO) with gapmer-type ASO have achieved a 3-7-fold increase of gene knockdown effect in cardiac and skeletal muscle by systemic administration compared to ASO alone. In addition, the gene knockdown was less than 50% for 4-6 months after a single administration, indicating an overwhelmingly long period of gene suppression. Subcutaneous administration has shown sufficient gene suppression. We also have synthesized new lipid ligands and screened them, and found that some ligands are as effective as cholesterol. HDO with splice-switching oligonucleotides (SSO) also have improved the pharmacokinetics (PK) in blood, heart, and skeletal muscle, and the skipping was also increased in accordance with the improvement of PK.

研究分野：核酸医薬

キーワード：ヘテロ核酸 心筋 骨格筋 遺伝性筋疾患 脂質リガンド

1. 研究開始当初の背景

核酸医薬品は抗体医薬品に続く次世代の医薬品として期待されている。2013年に家族性高コレステロール血症に対する mipomersen が承認されて以降、2016年に Duchenne 型筋ジストロフィーに対する eteplirsen が迅速承認され、また脊髄性筋萎縮症に対する nusinersen が承認された。本年は家族性アミロイドポリニューロパチーに対するアンチセンス核酸 (inotersen)、siRNA 核酸 (patisiran) がそれぞれ承認された (表 1)。2016 年以降承認された核酸医薬品は、いずれも標的疾患は遺伝性かつ難病である神経・筋疾患である。これ以外にも核酸医薬品は遺伝性神経・筋疾患において多くの臨床試験が行われており、今後もさらなる開発が進むと考えられる。また遺伝性疾患のみならず、悪性腫瘍や認知症など非遺伝性疾患にもその適応が拡大されつつある。一方で核酸医薬品の現在の問題点として、1) 標的が

表 1 2016 年以降承認された核酸医薬品の特徴

適応	薬剤名	標的遺伝子 (主な発現臓器)	対象疾患	投与経路
代謝疾患	mipomersen	ApoB100 (肝臓)	家族性高コレステロール血症	皮下投与
筋疾患	eteplirsen	DMD (骨格筋)	Duchenne 型筋ジストロフィー	静脈投与
神経疾患	nusinersen	TTR (肝臓)	家族性アミロイドポリニューロパチー	皮下投与
神経疾患	inotersen	SMN2 (脊髄)	脊髄性筋萎縮症	髄腔内投与
神経疾患	patisiran	TTR (肝臓)	家族性アミロイドポリニューロパチー	静脈投与

肝臓の遺伝子を中心である。2) 中枢神経疾患に対しては末梢投与からでは投与できず髄腔内投与に限られる。具体的には承認された家族性アミロイドポリニューロパチーは神経障害を起こすが原因の遺伝子異常は肝臓での遺伝子である (表 1)。脊髄性筋萎縮症は標的が脊髄であるために髄腔内投与でしか、核酸医薬品が送達できない。また筆者が開発したビルトラルセンを含め承認された Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) に関しても、本疾患の原因遺伝子が筋膜の裏打ちタンパクであり、その欠損により筋膜の脆弱性が出現し、核酸医薬品が入りやすいという利点がある。しかしながら DMD の予後に最も影響を及ぼす心筋には核酸はほとんど入らず、今後、問題となる可能性が高い。加えて他の筋疾患では、筋膜の異常がなく、筋での取り込みが期待できない。核酸医薬品の開発をさらに普及するには、肝臓以外への臓器へのデリバリーが重要となる。世界的な潮流を見ても、今後、核酸医薬品はリガンドを結合させ、標的臓器への組織移行性を上げる方向にシフトしつつある。その他の開発例では N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) を付けた核酸医薬品 (アンチセンス核酸や siRNA) である。GalNAc 自体は肝臓標的であるが、肝臓により少ない核酸量で治療を行うというコンセプトのもとに行われている。多くの開発品が臨床試験の 1 または 2 相で実施されている。また IONIS 社も大手製薬企業アストラゼネカと膵臓β細胞を標的とした核酸医薬品 (GLP-1 ペプチドを使用) の開発を行っており、今後は間違いなくリガンド付加核酸の開発が主流となる。

2. 研究の目的

ヘテロ核酸は日本発の第 3 の核酸医薬としての基盤技術であり、基本特許自体も日米欧豪で成立している。その圧倒的な独自性、進歩性からからすでに複数の企業にライセンス

アウトしており、共同研究も進捗中である。さらにヘテロ核酸では従来に比べて肝臓以外での臓器の高効率での遺伝子制御を可能としている。実際にヘテロ核酸では骨格筋・心筋で圧倒的な遺伝子抑制効果を認めている。本研究では、リガンドを更に探索しつつ、詳細にこれらの遺伝子抑制効果について検討する。また心筋・骨格筋での取り込み機構を解明することにより、より効率の心筋・骨格筋への移行を目指す。また並行して現在のリガンド以外の脂溶性リガンド、筋標的ペプチドを付加することにより、更なる効率的な骨格筋・心筋を標的とする核酸医薬品の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

心筋及び骨格筋でのヘテロ核酸の取り込みメカニズムの解明：リガンド結合ヘテロ核酸は圧倒的に骨格筋・心筋に取り込みが見られる。ヘテロ核酸は血中では LDL や HDL に結合している。そこで各種ノックアウトマウス (ApoE/LDLR/MSR1/Cav3/FcRN) および、Stabilin1/Scarb 受容体阻害抗体および食事調整マウスで遺伝子抑制効果に影響が出ないかを検討する。

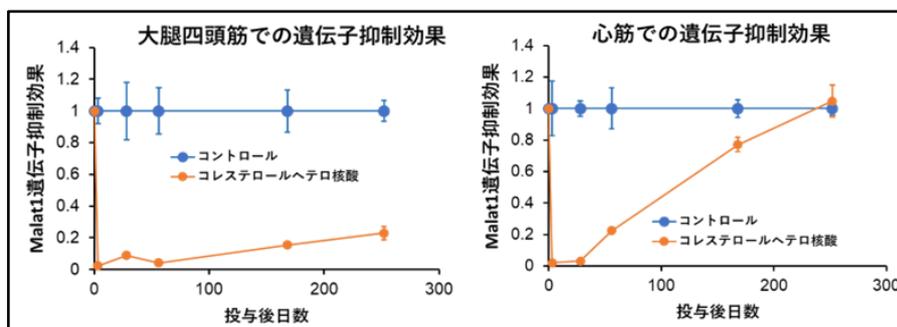
新規リガンドの合成と核酸の結合：トコフェロール以外の脂質誘導体を中心に検討を行う。新たにリガンドを合成して、心筋・骨格筋での有効性を検討する。アルキル鎖・不飽和脂肪酸等を用いて、その効果と安全性を検討する。

新規核酸の血中での結合蛋白の解明：蛍光偏光法を用いて血中でのタンパクとの結合の有無や結合定数を検討してきた。

またギャップマー型以外にもスキッピングについてもこれらのリガンドを用いて検討を行う。具体的には DMD のモデルマウスである mdx マウスを用いてエクソン・スキッピングで評価する。

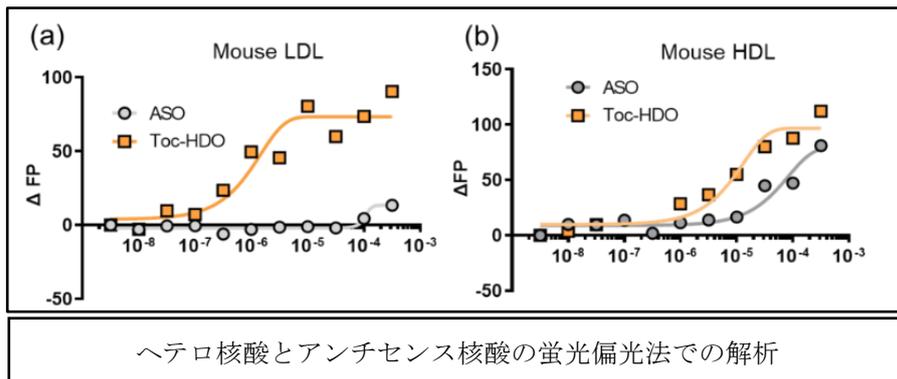
### 4. 研究成果

コレステロール結合ヘテロ核酸では、アンチセンス核酸と比較して、非常に強い遺伝子抑制効果を示した。静脈単回投与 50 mg/kg では 95%以上の遺伝子抑制効果を認めている。さらに心臓及び骨格筋での単回投与後の遺伝子抑制効果の持続時間を検討した。大腿四頭筋や背筋では半年後でも 80%以上の十分な遺伝子抑制効果が確認できている。心臓と横隔膜では、骨格筋と比較すると早期に遺伝子抑制効果は減弱したが、4ヶ月後でも 50%以上の遺伝子抑制効果を認めた。現在の全身投与の主流は皮下投与である。皮下投与であれば将来的にクリニックや在宅で治療可能であり、こちらに関しても検討した。皮下投与でも心筋・骨



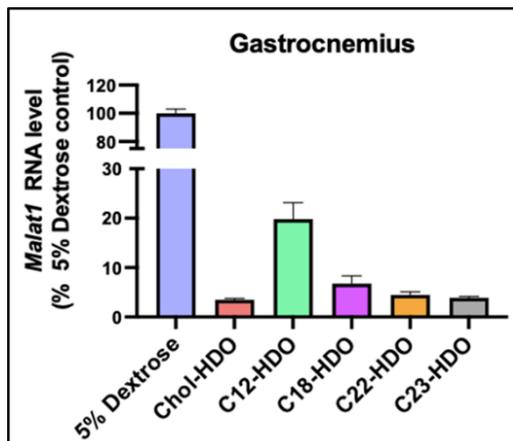
格筋・横隔膜でアンチセンス核酸と比較して、非常に強い遺伝子抑制効果を示した。静脈投与と比較すると、遺伝子抑制効果はやや減弱していたが、それでも 50 mg/kg 単回投与で 90-85%の遺伝子抑制効果が認められた。静脈投与時に見られる 20%程度の減少を伴う血小板減少は全く見られなかった。また単回皮下投与後の遺伝子抑制効果の継続についても検討した。投与後 1ヶ月の時点でも 90%近い

遺伝子抑制効果が継続して認められた蛍光偏光法を用いて血中でのタンパクとの結合を *ex vivo* で検討した。従来、我々が報告してきた通り LDL/HDL を結合しやすいことがはっきり



ヘテロ核酸とアンチセンス核酸の蛍光偏光法での解析

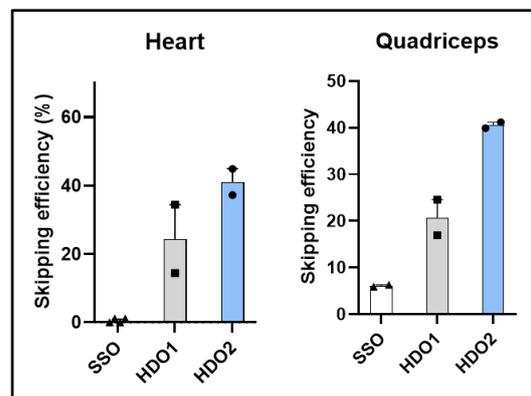
した。特にマウス LDL に対してはアンチセンス核酸と劇的に結合性が違った。他の血中タンパクでも解析を行った。ヘテロ核酸は脂質リガンドを通して、血中では LDL や HDL に結合しているため、これらに関係している ApoE および LDLR ノックアウトマウスにて静脈単回投与 50 mg/kg でその効果を検討したが、全くの変化がなかった。加えて高脂肪食や肝硬変モデルを用いて、血中の HDL/LDL を極端に上げたり下げたりしたが、明らかな遺伝子抑制効果には影響はなかった。次に核酸自体の取り込みに関係しているスカベンジャーレセプター MSR1、Scarb1 および Stabilin1 についてノックアウトマウス及び阻害抗体を用いて、その遺伝子抑制効果を調べたが、ヘテロ核酸においては核酸の取り込みには全く影響しなかった。カベオリン3やアルブミン・グロブリンの取り込みに関与



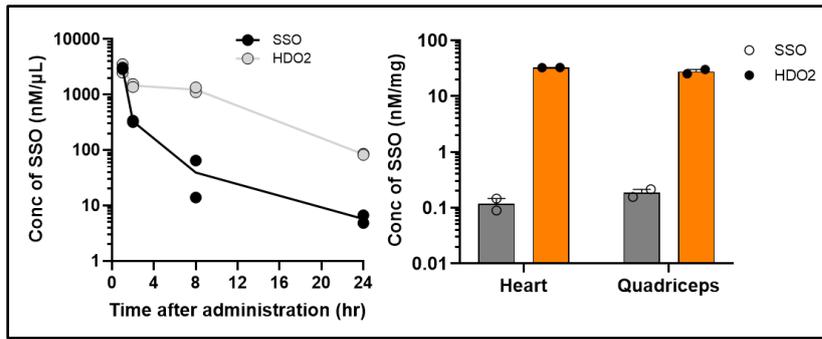
する胎児性 Fc 受容体のノックアウトマウスも用いたが、やはり遺伝子抑制効果には全く影響せずヘテロ核酸の取り込みのメカニズムは既報告とは全く違う可能性が示唆された。

新たなリガンドとして不飽和脂肪酸を含めて直鎖状のアルキル鎖を検討した。C22/C23 でコレステロールと同等の骨格筋での遺伝子抑制効果を認めた。一方で不飽和脂肪酸ではむしろ効果が減弱した。

加えて、スキッピング (Splice-switching oligonucleotides (SSO)) に関して、ヘテロ核酸を適応して mdx を用いて評価した。図で示すのはエクソン 23 スキッピングの結果である。心臓では単回投与で従来の SSO では既報告通り、ほとんどスキッピングが見られないが HD01 では 22%前後、HD02 では 40%前後のスキッピングが見られた。大腿四頭筋では従来の SSO では 5-6%前後であったが、同じく HD01 では 22%前後、HD02 では 40%前後のスキッピングが見られた。ジストロフィン染色でもスキッピングに相当するジストロフィンの発現が見られた。更に新たに確立した SSO に対する Hybridization ELISA 法を用いた薬物動態についても検討した。SSO は従来の報告通り、投与後、急速に血中から消退した。一方で HD02 に関しては、非常に血中滞留性が延長していた。24 時間までの AUC に関しては 5 倍まで上昇し



ている。一方で組織中の薬物動態についても検討した。投与後、48 時間後の組織濃度であるが、心臓では 200 倍近い SS0 の移行が HDO2 で観察された。大腿四頭筋でも 180 倍近い SS0 の移行が HDO2 で観察された。この結果から、ヘテロ核酸化することで、



るが、心臓では 200 倍近い SS0 の移行が HDO2 で観察された。大腿四頭筋でも 180 倍近い SS0 の移行が HDO2 で観察された。この結果から、ヘテロ核酸化することで、

血中滞留性の向上とそれに伴う、非常に高い組織移行性が実現した。横隔膜でも非常に効率的なスキッピングが見られている。DMD では心不全と呼吸不全が死因となることを考えるとヘテロ核酸による効果は DMD の治療を更に促進することが期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ohyagi Masaki, Nagata Tetsuya, Ihara Kensuke, Yoshida-Tanaka Kie, Nishi Rieko, Miyata Haruka, Abe Aya, Mabuchi Yo, Akazawa Chihiro, Yokota Takanori	4. 巻 12
2. 論文標題 DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide technology for regulating lymphocytes in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-26902-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nagata Tetsuya, Dwyer Chrissa A., Yoshida-Tanaka Kie, Ihara Kensuke, Ohyagi Masaki, Kaburagi Hidetoshi, Miyata Haruka, Ebihara Satoe, Yoshioka Kotaro, Ishii Takashi, Miyata Kanjiro, Miyata Kenichi, Powers Berit, Bennett C. Frank, Seth Punit P., Rigo Frank, Yokota Takanori	4. 巻 39
2. 論文標題 Cholesterol-functionalized DNA/RNA heteroduplexes cross the blood?brain barrier and knock down genes in the rodent CNS	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Biotechnology	6. 最初と最後の頁 1529 ~ 1536
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41587-021-00972-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Suzuki Motohiro, Ishibashi Satoru, Iwasawa Eri, Oguma Takahiro, Saito Yasuhiro, Li Fuying, Otsu Shinichi, Ichinose Keiko, Yoshioka Kotaro, Nagata Tetsuya, Yokota Takanori	4. 巻 11
2. 論文標題 Effective silencing of miR-126 after ischemic stroke by means of intravenous - tocopherol?conjugated heteroduplex oligonucleotide in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-93666-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Asada Ken, Sakaue Fumika, Nagata Tetsuya, Zhang Ji-chun, Yoshida-Tanaka Kie, Abe Aya, Nawa Makiko, Nishina Kazutaka, Yokota Takanori	4. 巻 49
2. 論文標題 Short DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide interacting proteins are key regulators of target gene silencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 4864 ~ 4876
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab258	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ono Daisuke, Asada Ken, Yui Daishi, Sakaue Fumika, Yoshioka Kotaro, Nagata Tetsuya, Yokota Takanori	4. 巻 23
2. 論文標題 Separation-related rapid nuclear transport of DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide: unveiling distinctive intracellular trafficking	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 1360 ~ 1370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2020.11.022	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naito Mitsuru, Chaya Hiroyuki, Toh Kazuko, Kim Beob Soo, Hayashi Kotaro, Fukushima Shigeto, Nagata Tetsuya, Yokota Takanori, Kataoka Kazunori, Miyata Kanjiro	4. 巻 330
2. 論文標題 Structural tuning of oligonucleotides for enhanced blood circulation properties of unit polyion complexes prepared from two-branched poly(ethylene glycol)-block-poly(L-lysine)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Controlled Release	6. 最初と最後の頁 812 ~ 820
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2021.01.001	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Asami Yutaro, Nagata Tetsuya, Yoshioka Kotaro, Kunieda Taiki, Yoshida-Tanaka Kie, Bennett C. Frank, Seth Punit P., Yokota Takanori	4. 巻 29
2. 論文標題 Efficient Gene Suppression by DNA/DNA Double-Stranded Oligonucleotide In Vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Therapy	6. 最初と最後の頁 838 ~ 847
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ymthe.2020.10.017	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uehara Takuya, Choong Chi-Jing, Nakamori Masayuki, Hayakawa Hideki, Nishiyama Kumiko, Kasahara Yuuya, Baba Kousuke, Nagata Tetsuya, Yokota Takanori, Tsuda Hiroshi, Obika Satoshi, Mochizuki Hideki	4. 巻 9
2. 論文標題 Amido-bridged nucleic acid (AmNA)-modified antisense oligonucleotides targeting $\alpha$ -synuclein as a novel therapy for Parkinson's disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43772-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshioka Kotaro, Kunieda Taiki, Asami Yutaro, Guo Huijia, Miyata Haruka, Yoshida-Tanaka Kie, Sujino Yumiko, Piao Wenying, Kuwahara Hiroya, Nishina Kazutaka, Hara Rintaro Iwata, Nagata Tetsuya, Wada Takeshi, Obika Satoshi, Yokota Takanori	4. 巻 47
2. 論文標題 Highly efficient silencing of microRNA by heteroduplex oligonucleotides	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 7321 ~ 7332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkz492	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 永田哲也
2. 発表標題 デュシャンヌ型筋ジストロフィーに対する核酸医薬
3. 学会等名 第38回日本神経治療学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tetsuya Nagata
2. 発表標題 Gene therapy with therapeutic oligonucleotide
3. 学会等名 第60回日本神経学会学術大会 NeuroscienceFrontierSymposium02 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永田哲也
2. 発表標題 「誰でも分かる核酸医薬品の基本と臨床」核酸医薬の生物学
3. 学会等名 第37回日本神経治療学会学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永田哲也
2. 発表標題 「誰でも分かる核酸医薬品の基本と臨床」核酸医薬の臨床応用
3. 学会等名 第37回日本神経治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 筋疾患治療用医薬組成物	発明者 永田哲也 横田隆徳	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-073832	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	原 倫太郎 (Hara Rintaro) (70709766)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・プロジェクト講師  (12602)	
研究分担者	横田 隆徳 (Yokota Takanori) (90231688)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授  (12602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------