

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14743

研究課題名（和文）アンチセンス核酸の薬効を向上させる人工核酸アプタマーの開発

研究課題名（英文）Development of artificial nucleic acid aptamers to improve the efficacy of antisense oligonucleotide

研究代表者

笠原 勇矢（Kasahara, Yuuya）

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 創薬デザイン研究センター・副センター長

研究者番号：10740673

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、人工核酸により機能を向上させたライブラリ（配列群）を作製し、機能を指標にしたスクリーニングによってデリバリー担体として有用なアプタマーの創出を試みた。核酸分解酵素に対する安定性を向上させるために核酸糖部の2'位にメトキシ基を修飾し、細胞内移行性を向上させるためにリンカーを介してウラシル塩基の5位にインドール環を修飾した塩基部/糖部デュアル修飾型人工核酸三リン酸体を合成し、酵素合成時の各反応条件を精査することで、効率的にライブラリを作製する条件を見出した。また、血液脳関門（BBB）モデルを用いたスクリーニングによってBBB透過性を向上させた人工核酸アプタマーを得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を通して、人工核酸を搭載したライブラリの効率的な酵素合成方法の確立と、機能に着目したスクリーニングによるデリバリー担体としての機能を有したアプタマーの効率的な取得方法を確立することができた。本研究成果は、従来の天然のDNAやRNAで構成されたアプタマーを生体内で利用する際の最大の課題である核酸分解酵素に対する安定性を解決することにつながるため、学術的意義は大きい。今後は、本研究で得られた知見をいかして様々な機能を有した人工核酸アプタマーの創出に応用展開していく予定である。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to create aptamers that could be used as delivery carriers. To this end, libraries with improved functions were created using artificial nucleic acids and screened based on their functions. Dual-modified artificial nucleic acid triphosphates were synthesized by modifying a methoxy group at the 2' position of the sugar moiety of the nucleic acid to enhance nuclease stability and an indole ring at the 5-position of the uracil base via a linker to facilitate intracellular translocation. Subsequently, the conditions for efficient library production were identified by refining each reaction condition during enzyme synthesis. In addition, artificial nucleic acid aptamers with improved blood-brain barrier (BBB) permeability were successfully obtained by screening using an in vitro BBB model.

研究分野：核酸化学

キーワード：アプタマー SELEX ポリメラーゼ 人工核酸

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

化学修飾により機能が向上した核酸医薬は原理的には遺伝子を介した疾患全てに対して治療効果が見込まれるため、抗体に続くバイオ医薬としての期待が高い。直近の5年間だけでも9品目が認可されており、続々と新たな核酸医薬品が実用化に結びついている。核酸医薬には様々なタイプがあり、アンチセンス核酸 (ASO) や siRNA などのようにその多くが細胞内で機能する。一方で、核酸はポリアニオンという性質上、細胞内への移行性が乏しい。そのため、核酸医薬を細胞内に送達するデリバリー技術の開発が精力的に行われている。デリバリー技術はキャリア型、コンジュゲート型、複合体型に大別され、核酸医薬にリンカーを介してデリバリー担体 (リガンド分子) を共有結合するコンジュゲート型は最もシンプルなデリバリー技術である。中でも肝臓で多く発現しているアシアロ糖タンパク質受容体 (ASGPR) に対するリガンドである N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) をコンジュゲートした ASO や siRNA が肝臓へのデリバリーにおいて顕著な成果を挙げている [Seth P.P. *et al.*, *Nucleic Acids Res*, 2014]。その他の糖誘導体をデリバリー担体として利用した例も報告されているが、これらはすでにリガンドとして知られている糖を元に設計しているため、適応できる臓器 (疾患) は限定的である。また、細胞表面タンパク質に対して特異性を持つ抗体 [Shoichet M.S. *et al.*, *Mol Ther Nucleic Acids*, 2018] をデリバリー担体として利用することで標的臓器への移行性を向上させる方法も報告されているが、コンジュゲートする位置や数の制御が難しい。いずれのアプローチにおいてもリンカー構造の精査が必須でありコンジュゲート方法の最適化に多大な労力が必要となる。コンジュゲート方法の最適化を必要とせず、標的臓器 (細胞) への特異性と核酸医薬の活性向上の両方の機能を兼ね備えたデリバリー担体を簡便に開発できれば、核酸医薬の対象疾患拡大と薬効向上、副作用低減が期待できる。

2. 研究の目的

申請者はデリバリー担体として、核酸医薬の一つであるアプタマーに着目した。アプタマーは1本鎖の DNA や RNA が高次構造を形成することで、抗体のように標的分子に特異的に結合することができる核酸分子である。SELEX 法と呼ばれる試験管内の選別方法で創出することができ、機能に着目した選別を組み込むことで望みの機能を持つアプタマーを効率的に取得できるという特徴を持っている。そこで本研究では、SELEX 時に遺伝子抑制効果を指標とした選別方法を組み込むことで、特異性と活性向上の両方の機能を兼ね備えたアンチセンス核酸-人工核酸アプタマー複合体 (ASO-Apt) を創出するためのプラットフォームを構築することを目的とする。なお、DNA や RNA などの天然型アプタマーでは抗原に対する結合親和性が十分でないことに加えて核酸分解酵素耐性が低いため ASO をデリバリーする前に分解されてしまうため、核酸分解酵素耐性向上のための糖部修飾と親和性向上のための塩基部修飾を組み合わせた塩基部/糖部デュアル修飾型人工核酸を利用する。

3. 研究の方法

上記目的を達成するために、(1) ライブラリの構築、および (2) アプタマーの創出、を実施する。(1) ライブラリの構築については、得られたアプタマーが生体内でも十分な機能を発揮できるように、核酸分解酵素に代謝されない人工核酸を使用する。(2) アプタマーの創出については、機能に着目したスクリーニング系を採用することで、得られるアプタマーの機能を担保する。各項目の詳細については研究成果とともに記載した。

4. 研究成果

(1) ライブラリの構築

まず初めに、SELEX に使用するライブラリの構築を進めた。ライブラリに使用する核酸の基本構造としては、核酸分解酵素に対する安定性を高めるために核酸糖部の 2' 位にメトキシ基を修飾した 2' -OMe-RNA を採用した。また、チミジン/ウリジンには、ウラシルの 5 位にリンカーを介してインドール環を修飾した塩基部/糖部デュアル修飾型人工核酸 (2' -OMe-U^{TP}) を用いることにした。インドール環はこれまでの知見でアプタマーの細胞内移行性が向上することを見出した官能基である。市販されている 5-Iodo-2' -OMe-uridine を出発原料として、4 工程で酵素合成が可能な三リン酸体 (2' -OMe-U^{TP}-TP) を合成した。続いて、2' -OMe-U^{TP}-TP および 2' -OMe-ATP/GTP/CTP を用いた酵素合成時の各反応条件を精査した。この際、通常のポリメラーゼでは 2' -OMe-RNA などの糖部 2' 位を修飾した人工核酸の伸長は難しいが、先行研究において既存の KOD ポリメラーゼの様々なドメインに変異を導入することで糖部修飾人工核酸を効率的に取り込むことが可能になった改変ポリメラーゼ [Hoshino H. *et al.*, *J Am Chem Soc*, 2020] を用いた。反応時間や反応温度、ポリメラーゼ濃度、Mn²⁺濃度が反応効率に与える影響を検証したところ、1.0 mM の Mn²⁺存在下で 600 ng/μL のポリメラーゼを用いて 62°C で 4 h 反応させることで天然型 DNA とほぼ同程度まで反抗効率を向上させることに成功した。また、その向上効果は 50 塩基長伸長させる場合よりも 80 塩基長伸長させる場合の方が顕著であった。続いて、各反応条件が酵素合成時の正確性に及ぼす影響を検証した。各反応条件のもと人工核酸鎖を酵素合成

し、酵素合成した人工核酸鎖を鋳型に逆転写反応によって DNA 鎖へと変換した。その後、次世代シーケンサーによって配列解析を実施することで正確性を評価した。その結果、反応効率が向上した反応条件においてはエラー率が 3.5×10^{-3} /base と正確性が高く、SELEX に十分適応可能であることを明らかにした。なお、 Mn^{2+} 濃度を 2.0 mM や 4.0 mM と濃くすると正確性が低下することも確認された。その他、ライブラリの多様性を拡張するために、核酸糖部 2' 位への修飾に着目し、構造の異なる 6 種類の 2' -*O*-アルキル修飾を施した三リン酸体を合成し、改変ポリメラーゼによる酵素合成が可能か検証した。2' -*O*-アルキル修飾としては、2' -*O*-ethyl (2' -*O*Et)、2' -*O*-propyl (2' -*O*Pr)、2' -*O*-butyl (2' -*O*Bu)、2' -*O*-isopropyl (2' -*O*iPr)、2' -*O*-hydroxyethyl (2' -*O*HE)、2' -*O*-methoxyethyl (2' -*O*MOE) を選択した。各 2' -*O*-アルキル修飾した 5-メチルウリジン三リン酸 (2' -*R*-5mUTP) を合成し、改変ポリメラーゼを用いた酵素合成を実施したところ、いずれの三リン酸もオリゴ核酸中に取り込むことが可能であった (図 1) [Ishida K. *et al.*, *Molecules*, 2023]。特に、2' -*O*Bu は、アルキル鎖長が比較的長いにも関わらず高い伸長効率を有していた。一方で、2' -*O*iPr の伸長効率は直鎖アルキル修飾に比べて著しく低下することが明らかになった。

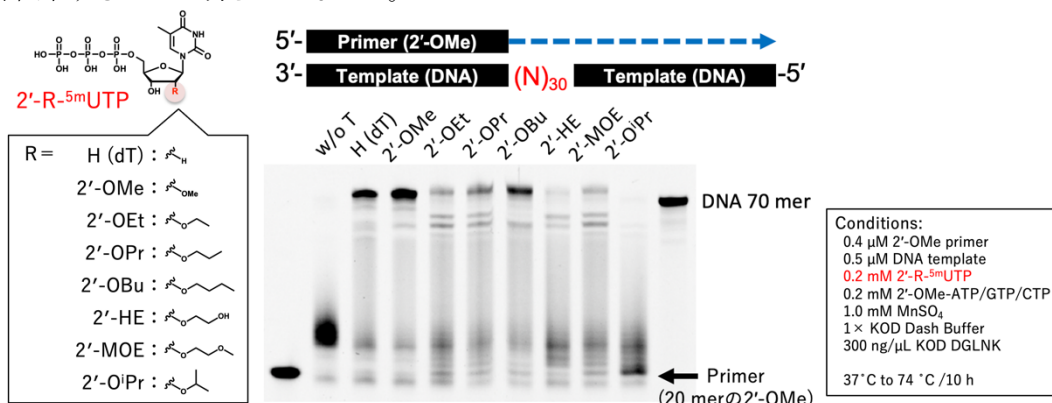


図 1 合成した 2' -*O*-アルキル修飾三リン酸の取り込み評価結果

(2) アプタマーの創出

特異性と活性向上の両方の機能を兼ね備えたアンチセンス核酸-人工核酸アプタマー複合体 (ASO-Apt) を創出するために、遺伝子抑制効果を指標とした選別方法を組み込んだスクリーニング系の構築を試みた。培養細胞に対してトランスフェクション試薬を用いてプラスミドをトランスフェクションし、導入した遺伝子の発現量を指標に最適なトランスフェクション条件 (細胞播種数、プラスミド濃度、トランスフェクション試薬、トランスフェクション時間等) を検証した。その後、最適な条件を用いて遺伝子抑制効果を指標とした選別方法の構築を試みたが、当初の想定以上に難航したため、計画を変更し、別の選別方法によってデリバリー担体として有用なアプタマーの創出を試みた。アンチセンス核酸の課題の一つに全身投与した際の中枢への移行性が挙げられる。中枢への局所投与も可能であるが、侵襲性が高く中枢毒性リスクもあるため、全身投与した場合でも中枢への移行性が向上する技術の確立が求められている。そこで、*in vitro* 血液脳関門 (BBB) モデル [Zhang H. *et al.*, *Fluids Barriers CNS*, 2023] を用いた BBB 透過性を指標にした選別を組み込んだ SELEX によって BBB 透過性を向上させた人工核酸アプタマーの創出を試みた。BBB 透過性のハードルは細胞内移行よりもハードルが高いことが予想されるため、核酸分解酵素に対する耐性をさらに向上させるためにチミジンの糖部には架橋型人工核酸 (LNA) を採用したライブラリを使用した。BBB 透過性を指標にした選別工程を含む SELEX を 8 ラウンド実施し、次世代シーケンサーによる網羅的な配列解析により 16 種類のアプタマーを同定した。続いて、同定したアプタマーの BBB 透過性を qPCR により評価したところ、BBB 透過能が 20 倍以上向上したアプタマーを見出すことに成功した。

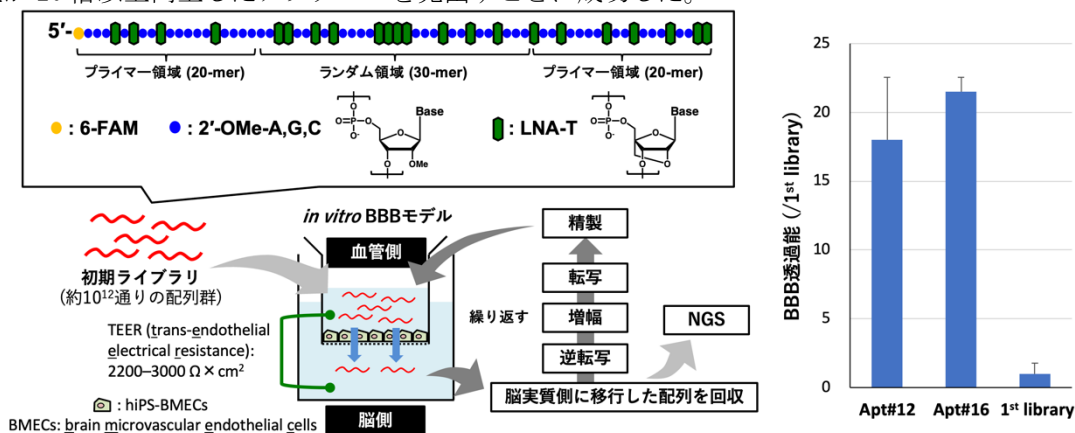


図 2 SELEX の模式図 (左) と得られたアプタマーの BBB 透過能 (右)

本研究を通して、人工核酸を搭載したライブラリの効率的な酵素合成方法の確立と、機能に着目したスクリーニングによるデリバリー担体としての機能を有したアプタマーの効率的な取得方法を確立することができた。今後は得られたアプタマーに ASO をコンジュゲートし、脳室側における ASO 活性向上効果を評価することでアプタマーの有用性を検証するとともに、本研究で得られた知見をいかして様々な機能を有した人工核酸アプタマーの創出に応用展開していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ishida Kenta, Kasahara Yuuya, Hoshino Hidekazu, Okuda Takumi, Obika Satoshi	4. 巻 28
2. 論文標題 Systematic Analysis of 2'-O-Alkyl Modified Analogs for Enzymatic Synthesis and Their Oligonucleotide Properties	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 7911 ~ 7911
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules28237911	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 Uemachi Hiro, Kasahara Yuuya, Tanaka Keisuke, Okuda Takumi, Yoneda Yoshihiro, Obika Satoshi	4. 巻 13
2. 論文標題 Hybrid-Type SELEX for the Selection of Artificial Nucleic Acid Aptamers Exhibiting Cell Internalization Activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 888 ~ 888
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics13060888	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 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 千賀陽子、山口朋子、星野秀和、小比賀聡、川端健二、笠原勇矢
2. 発表標題 血液脳関門モデルを用いた人工核酸アプタマーの探索
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第8回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石田健太、千賀陽子、長尾知生子、新山真由美、鎌田春彦、水口賢司、小比賀聡、笠原勇矢
2. 発表標題 抗IL-6Rアプタマーの構造最適化に向けた核酸分解酵素の利用
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第8回年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 仁田峠海斗、石田健太、星野秀和、笠原勇矢、小比賀聡
2. 発表標題 デュアル修飾型核酸導入オリゴ核酸の酵素合成条件探索と正確性に関する検証
3. 学会等名 日本薬学会 第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Ishida K., Hoshino H., Obika S., Kasahara Y.
2. 発表標題 Enzymatic synthesis of several 2'-O-alkyl modified oligonucleotides with wide range of hydrophobicity
3. 学会等名 The 50th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry/The 7th Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石田健太、笠原勇矢、星野秀和、小比賀聡
2. 発表標題 2'位や5'位を修飾した人工核酸の改変ポリメラーゼによる酵素伸長
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笠原勇矢、千賀陽子、石田健太、奥田匠、長尾知生子、新山真由美、鎌田春彦、水口賢司、小比賀聡
2. 発表標題 塩基部修飾人工核酸を用いた抗IL-6Rアダプターの開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第7回年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石田健太、千賀陽子、仁田峠海斗、岡正啓、大岡伸通、星野秀和、出水庸介、井上貴雄、小比賀聡、笠原勇矢
2. 発表標題 糖・塩基部デュアル修飾型人工核酸を用いた抗CHIP/STUB1アダプターの創出
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 仁田峠海斗、石田健太、星野秀和、笠原勇矢、小比賀聡
2. 発表標題 ランダム領域を拡張した修飾オリゴヌクレオチドの酵素合成
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 星野秀和、笠原勇矢、小比賀聡
2. 発表標題 ポリアミンによる人工核酸の酵素伸長への影響
3. 学会等名 日本薬学会 第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ishida K., Kasahara Y., Hoshino H., Obika S.
2. 発表標題 Enzymatic synthesis of oligonucleotide with 2'-MOE modification
3. 学会等名 The 18th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kasahara Y., Senga Y., Ishida K., Okuda T., Nagao C., Niiyama M., Kamada H., Mizuguchi K., Obika S.
2. 発表標題 Development of antagonist aptamers to interleukin-6 receptor
3. 学会等名 The 18th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笠原勇矢, 神田光郎, 山隈晴美, 亀岡なつ実, 小比賀聡
2. 発表標題 胃がん腹膜播種治療に向けたSYT13標的アンチセンス核酸の毒性評価およびオフターゲット解析
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田健太, 笠原勇矢, 星野秀和, 小比賀聡
2. 発表標題 Development of xeno nucleic acid aptamers targeting the SARS-CoV-2 spike protein for COVID-19 therapeutics
3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内堀友紀, 笠原勇矢, 真柳浩太, 杉本のぞみ, 藤田雅俊
2. 発表標題 人工核酸アプタマーを利用したMCM8-9阻害剤の開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田健太, 笠原勇矢, 星野秀和, 米田悦啓, 小比賀聡
2. 発表標題 アプタマー創薬を志向した2-MOEオリゴ核酸の酵素合成
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 笠原勇矢
2. 発表標題 タンパク質標的型核酸医薬の新たな可能性
3. 学会等名 第3回モダリティ創薬デザイン研究会シンポジウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	小比賀 聡 (Obika Satoshi)		
研究協力者	星野 秀和 (Hoshino Hidekazu)		
研究協力者	石田 健太 (Ishida Kenta)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	仁田峠 海斗 (Nitatouge Kaito)		
研究協力者	千賀 陽子 (Senga Yoko)		

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