

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24659258

研究課題名（和文）新規二本鎖アンチセンス核酸を用いた画期的遺伝子治療法の開発

研究課題名（英文）Development of gene therapy using novel double-stranded antisense oligonucleotides

研究代表者

仁科 一隆（NISHINA KAZUTAKA）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・メディカルフェロー

研究者番号：60622529

研究成果の概要（和文）：新規二本鎖アンチセンス核酸 (ASO) を用いた画期的遺伝子治療法の開発を行った。まず、二本鎖 ASO (dsASO) の各種化学修飾の最適化を行った。また肝臓において発現している複数の標的遺伝子に対して、dsASO が有効に発現抑制することを確認した。また蛍光標識した dsASO をマウスに投与し、生体イメージングシステムを用いて観察することで、ビタミン E 結合 dsASO が肝臓にほぼ限局したデリバリーを示すことを確認した。

研究成果の概要（英文）：Here we developed a new class of exceptionally potent antisense oligonucleotides (ASOs) that are hybridized with complementary RNA (cRNA) and conjugated with a ligand. At first, we optimized the chemical modifications of cRNA. Secondly, tocopherol-conjugated ASO (Toc-dsASO) reduced multiple target sequence including mouse apolipoprotein B and human transthyretin. Finally, we showed the liver specific delivery of Toc-dsASO using IVIS imaging system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：遺伝子診断・治療

1. 研究開始当初の背景

(1) ASO を用いた遺伝子発現抑制方法は、その遺伝子治療のツールとして臨床応用が期待されているが、ASO の多くは速やかに腎排泄され、必要投与量が増大して副作用の要因にもなり、標的臓器への有効なデリバリーも困難な状況であった。

(2) 一方我々が過去に行ってきた siRNA の研究において、ビタミン E を核酸に結合させることで肝への顕著な集積性が獲得され、肝特異的なデリバリーが可能となる。それにより必要投与量が減少し、より効果的かつ安全な siRNA の全身投与を可能とした (Nishina K, et al. Mol Ther. 16: 734-740, 2008)。この方法を ASO に応用す

べく ASO の 3' 末端にビタミン E を結合したが、ビタミン E 自体がアンチセンス効果を直接阻害して有効性が得られなかった。(3) そこで通常一本鎖核酸である ASO に相補鎖 RNA (cRNA) を結合させた dsASO を着想した。この方法は、相補鎖に脂質結合等の様々な誘導分子を結合させることで臓器特異的な送達を可能にする利点がある。

2. 研究の目的

dsASO の有効性を複数の遺伝子を標的として確認し、最適化すること、dsASO のデリバリーメカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 相補鎖化学修飾の最適化

マウスアポリポ蛋白 B (apoB) を標的とした LNA-DNA gapper 型の 13 塩基からなる一本鎖 ASO (ssASO) と、それと相補の配列を持つ 5' 末端にビタミン E (α -トコフェロール) を結合させた cRNA (Toc-cRNA) を合成した。下に配列及びその核酸化学修飾を示す。

a) ASO:

5' -GsCsastststsgsgstsastsTsCsA-3'

(大文字: LNA、小文字: DNA、s: 核酸間ホスホロチオエート結合)

b) Toc-cRNA(O):

5' -Toc-usgsasAUACCAUsgsc-3'

(大文字: RNA、小文字: 2' -OMe RNA、s: 核酸間ホスホロチオエート結合、Toc: α -トコフェロール)

上記 Toc-cRNA の中央部分は通常の RNA であり、RNA 分解酵素に対する耐性がない。そこで、その部分にもホスホロチオエート結合を導入したビタミン E 結合相補鎖を合成した。

c) Toc-cRNA(S):

5' -Toc-usgsasAsUsAsCsCsAsAsUsgsc-3'

(大文字: RNA、小文字: 2' -OMe RNA、s: 核酸間ホスホロチオエート結合、Toc: α -トコフェロール)

上記 a と b、または a と c を 95°C で 5 分、その後 37°C で 1 時間静置し、両者をハイブリダイズさせてビタミン E 結合 dsASO (Toc-dsASO(O), Toc-dsASO(S)) を作成した。ICR マウスに対して尾静脈から 0.75mg/kg で静脈内投与し、投与 3 日後の肝臓を用いて定量的 RT-PCR により標的遺伝子の発現抑制効果を確認した。

(2) 複数の標的遺伝子に対する有効性確認

肝臓において発現している各種内在性遺伝子のうち、ヒトトランスサイレチン (hTTR) に対する dsASO の合成を行った。以下に配列を示す。

a) ASO:

5' -TsGstscstscstsgscscsTsGsG-3'

(大文字: LNA、小文字: DNA、s: 核酸間ホスホロチオエート結合)

b) Toc-cRNA(O):

5' -Toc-cscsasGGCAGAGAscsa-3'

(大文字: RNA、小文字: 2' -OMe RNA、s: 核酸間ホスホロチオエート結合、Toc: α -トコフェロール)

上記 a と b を 95°C で 5 分、その後 37°C で 1 時間静置し、両者をハイブリダイズさせて hTTR に対するビタミン E 結合 dsASO (Toc-dsASO) を作成した。hTTR のトランスジェニックマウスに対してマウス尾静脈から 0.75mg/kg で静脈内投与し、投与 3 日

後の肝臓を用いて定量的 RT-PCR により標的遺伝子の発現抑制効果を確認した。

(3) Toc-dsASO の生体内分布の確認

蛍光標識した Toc-dsASO (配列は上記(1)参照) をマウス尾静脈から 0.75mg/kg で静脈内投与し、生体イメージングシステム IVIS imaging system を用いて生体内での VE-dsASO の分布を経時的に観察した。

4. 研究成果

(1) 相補鎖化学修飾の最適化

定量的 RT-PCR 法を用いて、それぞれの Toc-dsASO の標的遺伝子発現抑制効果を評価した (図 1)。その結果、相補鎖の中央部にホスホロチオエート結合を加えた Toc-cRNA を用いた Toc-dsASO(S) でも有効性が保たれることが分かった。ホスホロチオエート結合により RNA 分解酵素に対する耐性が上昇していると考えられ、経口投与等今後の投与方法の拡大に向けて有用と思われる。

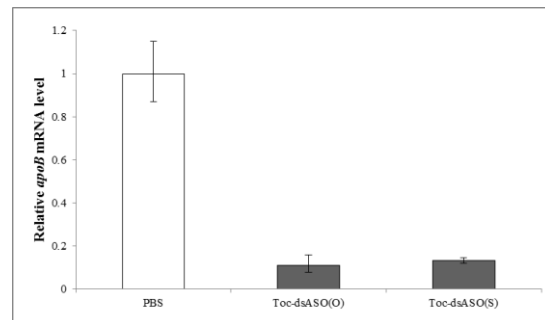


図 1. Toc-dsASO(S) の標的遺伝子発現抑制効果

(2) 複数の標的遺伝子に対する有効性確認

hTTR の変異は家族性アミロイドポリニューロパチーの原因であり、その発現抑制は本疾患の根治的治療法となり得る。定量的 RT-PCR 法を用いて、hTTR に対する Toc-dsASO の標的遺伝子発現抑制効果を評価した (図 2)。その結果、0.75mg/kg という少量の投与で 95%以上の標的遺伝子発現抑制効果を確認しており、これは一本鎖 ASO (ssASO) が同量の投与で 50%程度の発現抑制効果であることを考慮すると、臨床応用に向けた大きな進展と考えられた。

(3) Toc-dsASO の生体内分布の確認

投与 5 分、6 時間、7 日後の体内における分布を IVIS imaging system を用いてそれぞれ撮像した (図 3)。その結果、ssASO において 7 日後でも生体内に広汎に分布しているのに対し、Toc-dsASO では投与 6 時間後にはほぼ肝に集積しており、ビタミン E を結合することにより大幅な生体内分布

の改善を確認でき、off-target 効果等の副作用抑制に向け重要な結果と考えられた。

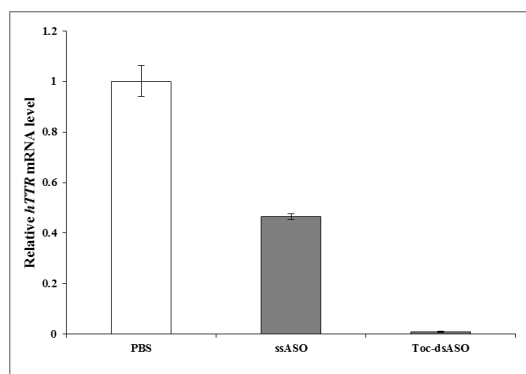


図 2. hTTR に対する Toc-dsASO の標的遺伝子発現抑制効果

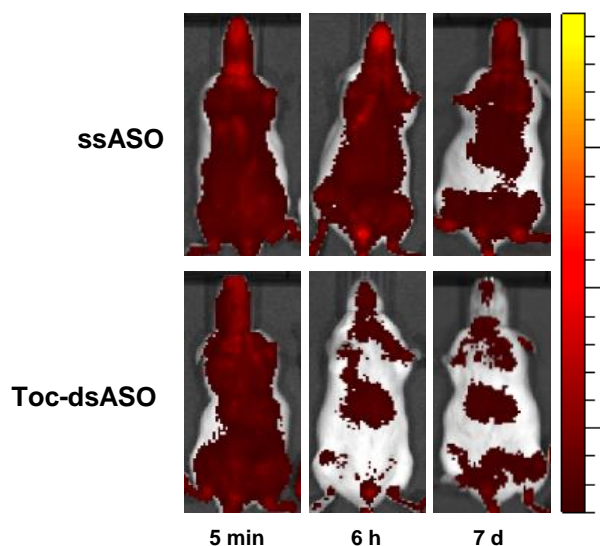


図 3. マウスに対して蛍光標識 ssASO と Toc-dsASO を 0.75 mg/kg で静脈注射後、5 分、6 時間、7 日後における ASO の体内分布

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 2 件)

(1) Kazutaka Nishina, Hidehiro Mizusawa, Takanori Yokota. siRNA and the CNS: Development of non-viral gene delivery systems.

Expert Opinion on Drug Delivery, 査読有, vol.10, No.3, 2013, pp.289-292. doi: 10.1517/17425247.2013.748746

(2) Wenying Piao, Kazutaka Nishina, Kie Yoshida-Tanaka, Hiroya Kuwahara, Tomoko

Nishina, Mina Sakata, Hidehiro Mizusawa, Takanori Yokota. Efficient *in vivo* delivery of antisense oligonucleotide to choroid plexus. Journal of Medical and Dental Sciences, 査読有, vol.60, No. 1, 2013, pp.9-16. <http://www.tmd.ac.jp/english/labs/toshozyouhou/lib/6001/index.html>

[学会発表] (計 3 件)

(1) Kazutaka Nishina, Yoshitaka Uno, Wenying Piao, Kie Tanaka-Yoshida, Hidehiro Mizusawa, Takanori Yokota. Efficient *in vivo* delivery of alpha-tocopherol-conjugated siRNA with HDL to the brain. 8th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, 2012.10.29, The conference center at Harvard Medical School, Boston, USA

(2) 仁科一隆, 朴文英, 田中規恵, 坂田美奈, 桑原宏哉, 仁科智子, 水澤英洋, 横田隆徳. アンチセンス核酸の脳脈絡叢へのデリバリー. アンチセンス・遺伝子・デリバリーシンポジウム 2012, 2012. 9.24, 仙台市民会館

(3) 仁科一隆, 吉田規恵, 桑原宏哉, 朴文英, 仁科智子, 横田隆徳, 水澤英洋. ビタミン E 結合 siRNA の注腸投与による家族性アミロイドポリニューロパチーの治療法の検討. 第 53 回日本神経学会学術大会, 2012. 5.23, 東京国際フォーラム

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仁科 一隆 (NISHINA KAZUTAKA)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・メディカルフェロー
研究者番号：60622529

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：