

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890102

研究課題名(和文) アンチセンス医薬の薬効を増大させる革新的分子デザイン法の開発

研究課題名(英文) The Development of Highly Effective BNA-based Antisense Oligonucleotides

研究代表者

山本 剛史 (Yamamoto, Tsuyoshi)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80636994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、アンチセンス分子がmRNA切断を触媒する効率に着目し、これを最大化するための分子設計指針を見出すこと、他方で薬効を向上させる低分子併用薬剤のスクリーニング探索を行った。この結果、架橋型人工核酸BNAの導入位置によりターンオーバー効率が大きく変化することを見出し、さらにターンオーバー効率とin vivoにおけるサイレンシング効果に正相関があることを明らかにした。また一方で、低分子化合物ライブラリより、アンチセンス効果を高める薬剤の存在を見出した。今回の成果から、触媒回転能の高いアンチセンス分子と本低分子化合物と併用することで、アンチセンス医薬の従来の問題点を解決する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Despite recent great progress in antisense drugs coming from the development of high-affinity modified nucleic acids such as Bridged Nucleic Acids (BNAs), there still remain efficacy and safety issues. First, to test the hypothesis that increase of turnover ability of antisense molecules is associated with the increase of efficacy, cell-free turnover detection system was devised and turnover rates were estimated. As expected, antisense oligonucleotides with slow turnover rates showed no significant silencing in vivo. On the other hand, to increase the availability of dosed antisense molecules, small molecules that activate cellular uptake of antisense molecules or increase silencing effect via unknown mechanisms were screened from a drug library and very attractive molecules were found. Correctively, high-turnover antisense oligonucleotide in combination with a small molecule would sophisticate a current antisense therapy.

研究分野：化学系薬学

科研費の分科・細目：有機化学

キーワード：核酸医薬 糖部架橋型人工核酸 ターンオーバー ホスホロチオアート アンチセンス医薬

1. 研究開始当初の背景

2012年3月、世界初の静脈内注射型アンチセンス医薬として期待されてきた「Kynamro」(世界初のホモ接合型家族性高コレステロール血症治療薬)の販売承認審査申請が米食品医薬品局に対して行われ、いよいよ上市に至ろうとしていた。近年のアンチセンス医薬分野の復興は、mRNAとの親和性と生体内安定性に優れた「修飾核酸」技術によってこれまで以上の薬効が得られるようになったためである。研究代表者らのグループでは核酸糖部の2'位と4'位を架橋した糖部架橋型人工核酸「BNA」の開発によりアンチセンスに対して大きなmRNA親和性を付すことに成功しており、その結合力はKynamroに搭載されている2'-methoxyethyl RNA (MOE)よりも格段に強力である。当グループでは、高RNA親和性を有する第一世代BNAであるLNAに端を発し、高い生体内分解耐性を併せ持つ様々な次世代BNAも新たに見いだしている。ただし、一般的にアンチセンス法ではリボヌクレアーゼH (RNase H)がアンチセンス分子とmRNAからなる二本鎖を認識し、mRNA側を切断することで薬効が得られるが、本酵素の修飾核酸認識能は非常に低く、通常利用できない。しかしながら、修飾核酸の鎖内配置を適切に行うことで、RNase H誘導活性と修飾核酸のメリットを共存させることも可能になっている。研究代表者においては、このような次世代BNAを搭載したアンチセンス医薬を用いて疾患モデルマウスやモルモットなどを用いてその治療効果・安全性を詳細に評価してきた。予想通り、2',4'-BNA^{NC}や2',4'-BNA^{AM}等の高RNA親和性と分解耐性を兼ね備えたBNAは、「送達担体なし、全身投与」というシンプルだが巨大分子には酷な条件でも非常に高い薬効を発揮し、これまでのアンチセンス医薬の効果及び毒性を改善可能であることを見出していた。一方で、克服すべき次の課題も見いだしていた。すなわち、BNA搭載型アンチセンス医薬の至適投与量は約10mg/kgであり、MOEアンチセンスの約1/5量を達成したが、依然として高用量と言え、最近では安全性の不足で臨床試験からドロップアウトするアンチセンスもいくつか報告され始めていた。また肝臓内動態を評価したところ、細胞内移行量とmRNAへのアクセス量に非常に大きな解離があることも見いだしていた。また最近になってStraarupらも13塩基長の短鎖LNAアンチセンスは従来の20塩基長よりも効果的であるという報告をするなど(*Nucleic Acids Res.*, 2010, 38, 7100)、「薬効不足」や「薬効改善の余地」について議論の対象となりつつある。以上のことから、アンチセンス医薬の薬効増強、具体的には分子デザイン法の革新がアンチセンス医薬に新たな展開をもたらすと期待でき、BNA搭載アンチセンスの薬効を高めるような革新的デザイン法を世界に先駆けて開

発することとした。

2. 研究の目的

上述のように、研究代表者のこれまでの研究から細胞内に取り込まれたアンチセンス分子の数%にも満たないフラクションのみが薬効に関与し、残りの大半が組織の貪食細胞に貪食され、あるいは細胞のエンドソームなどに捕捉され、また体外へそのまま排泄されるフラクションも60%以上に上ることが推測されていた。本研究では、アンチセンス医薬の効果をもつことを目標として、(1)薬効を発揮しているフラクションをさらに活性化するために、mRNA切断を触媒する効率(ターンオーバー効率)に着目し、これを最大化するための分子設計指針を見出すこと、(2)薬効を発揮するフラクションを増加させるための新技術の開発を行った。これらのコンセプトは研究代表者の研究成果に基づき得られた独自の着眼点であり、他に類のない取り組みである。

3. 研究の方法

(1)アンチセンス分子のターンオーバー速度の評価法の開発と多様なアンチセンス核酸のターンオーバー効率の評価

アンチセンス分子は、標的mRNAとアンチセンス分子とRNase Hの三者の間で起こる反応である。当グループがこれまでに開発してきたmRNAを強固に認識する人工核酸が、アンチセンス効果を飛躍的に高めたことからこれまでmRNAとアンチセンス核酸の二重鎖形成が律速であると考えられてきた。しかしながら近年、結合力が高すぎるとむしろ活性が低下し始めることが見出され、RNase Hによる切断反応も律速になりうることを示唆されている。本研究では、BNAを導入した強結合アンチセンスにおいては、ターンオーバー効率を高めることが薬効を高めることにつながると仮説を立て、ターンオーバー反応を検出するための無細胞システムを開発した。すなわち、蛍光色素TAMRAと消光基BHQ-2を両末端に修飾したmRNAを模倣した20塩基長のRNAを用意し、過剰量のE.coli由来RNase Hと少量のアンチセンス分子を混合することで、mRNAが切断するとFRETが解消されTAMRAの赤色蛍光が観測される定量評価システムを開発した(図1)。ここでアンチセンス分子として、人工核酸LNAをアンチセンス鎖の様々な位置においたapolipoprotein B(高コレステロール血症の治療標的)を標的とするアンチセンス分子を設計・合成し、評価に用いた(表1)。さらに、表1に示したアンチセンス分子について二本鎖融解温度(T_m)を評価した。最終的に鎖長・結合力が類似しており、ターンオーバー効率の高かったもの、および活性の低かったものについてマウスに投与し、ターンオーバー効率とapolipo-

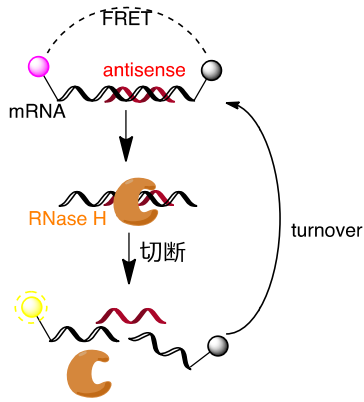


図 1 アンチセンス反応の無細胞検出系

表 1 アンチセンス分子の配列一覧

Sequence ID	Sequence
ApoB-20a	5'-TTCAGcattggtattCAGTG-3'
ApoB-20b	5'-T ^o T ^c A ^o GcattggtattC ^o A ^o G ^o T ^o G-3'
ApoB-20c	5'-t ^o t ^c a ^o g ^o c ^o a ^o t ^o g ^o t ^o a ^o t ^o c ^o a ^o g ^o t ^o g-3'
ApoB-16a	5'-CAGcattggtatTCAG-3'
ApoB-14a	5'-AGCattggtatTCA-3'
ApoB-14b	5'-AgCattggtatTcA-3'
ApoB-13a	5'-GCattggtatTCA-3'
ApoB-13b	5'-G ^o CattggtatT ^o C ^o A-3'
ApoB-13c	5'-gCattGgtatTCA-3'
ApoB-13d	5'-GcattggtatTCA-3'
ApoB-13e	5'-GCattggtatTCA-3'
ApoB-13f	5'-G ^o CattggtattC ^o A-3'
ApoB-13g	5'-GCattggtatTcA-3'
ApoB-13h	5'-gcattggtatTCA-3'
ApoB-13i	5'-GCattggtattca-3'
ApoB-12a	5'-GCattggtatTC-3'
ApoB-12b	5'-GCattggtatTc-3'
ApoB-12c	5'-G ^o CattggtatT ^o C-3'
ApoB-11a	5'-CAttggtatTC-3'
ApoB-11b	5'-C ^o AttggtatT ^o C-3'
ApoB-10a	5'-CattggtatT-3'
ApoB-10b	5'-CAttggtatTT-3'
ApoB-10c	5'-C ^o AttggtatT ^o T-3'
ApoB-10d	5'-cattggtATT-3'
DL-MRNA	5'-R-cacugaauaccaaugcugaa-Q-3'
NL-MRNA	5'-cacugaauaccaaugcugaa-3'
MRNA-1	5'-cacugaauac-3'
MRNA-2	5'-caaugcugaa-3'

Upper case, lower case, lower italic and superscript circle indicate LNA, DNA, RNA and phosphodiester linkage, respectively. All internucleotide linkages are phosphorothioated unless otherwise noted. All RNAs have phosphodiester internucleotide linkages.

protein B のノックダウン効果との相関を評価した。

(2) 薬効を発揮するフラクションを増加させるための技術の開発

アンチセンス分子の体内動態を改善し、必要十分な分子数を標的細胞内の標的部位に

効率的に届けるための技術の開発を行う。核酸の動態を制御するために、これまで CPP などと呼ばれるカチオン性ペプチドが見出されており、オリゴヌクレオチドにおいてもそのような細胞内移行を高める配列が存在し得るが、生体内安定性・検出感度・増幅などの問題で探索が困難であった。本研究では、低分子ライブラリの中から同様にアンチセンス分子を細胞内の適切な位置に送り込み、ノックダウン活性を増強する化合物の探索を試みた。具体的には、緑色蛍光蛋白質を標的とするアンチセンス分子を設計し、緑色蛍光蛋白質を恒常的に発現する培養細胞を構築する。これらのツールを用いて、医薬品を中心とする 2000 種余りの化合物ライブラリからアンチセンス活性を高める化合物の選択を試みる。

4. 研究成果

(1) 高コレステロール血症の原因因子あるいは治療標的として知られる apolipoprotein B に対する既知の高活性アンチセンス分子 (ApoB-13a, 表 1) を中心に 10-20 塩基長の様々な数や位置に LNA を導入したアンチセンスを設計・合成した (表 1)。まず、各アンチセンス分子の標的 RNA (NL-MRNA) との親和性を評価した (図 2A)。In vivo にてアンチセンス活性を得るためにはリン酸のホスホロチオアート化が必要であるが、標的 mRNA との結合力を低下させることが知られている。ここでは部分的にホスホロチオアートを外し、結合力を微調整し、幅広い結合力を有するアンチセンスの設計に成功した (図 2A)。TAMRA と BHQ2 を両端に有する DL-MRNA (800 nM うち 600 nM NL-MRNA) と過剰量の E.coli 由来 RNase H (60 U/well) を少量のアンチセンス (10 nM) を混合し、15

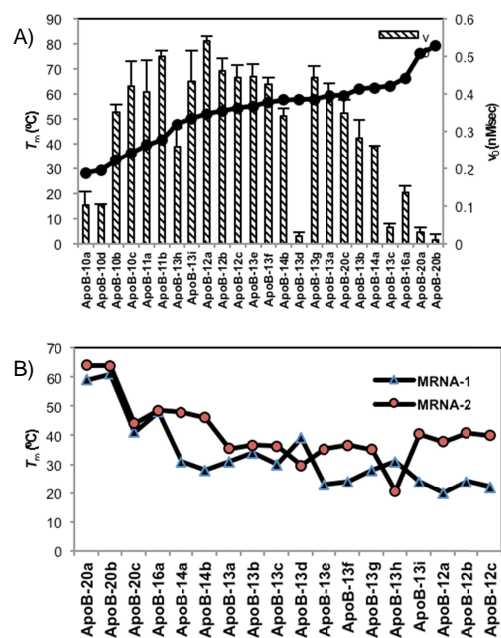


図 2 標的結合力とターンオーバー速度

秒毎に蛍光強度を測定した。結果、結合力が中程度のアンチセンス分子において高いターンオーバー速度が得られた(図2A)。一方、ApoB-13h や ApoB-13d においては、結合力は十分に高いことが予想されるが、ターンオーバー効率が極めて低いことが明らかとなった。これについて、切断後の断片化 RNA とアンチセンス分子との解離が非効率化しているものと予想し、さらに切断断片を模倣した MRNA-1 と MRNA-2 を用意し、これらとアンチセンスの二本鎖融解温度 (T_m) を測定したところ、ApoB-13h および ApoB-13d においてのみ、断片の結合力の逆転が認められた(図2B)。このことは、RNase H が基本的に 5' -RNA/3' -アンチセンス側と結合し、3' -RNA 側を切断するために、断片が長くなり解離が起こりにくくなるためと考えられる。

これらのターンオーバー効率が *in vivo* における薬効に影響を与えているかどうかを検討するために、ApoB-13h および ApoB-13d を含む 13 塩基長のアンチセンスについてそれぞれマウスに 0.75mg/kg の投与量で単回投与を行った。驚くべきことに、ターンオーバー効率の低かった ApoB-13h および ApoB-13d のみ有意なノックダウン効果が得られなかった(図3)。以上のことから、アンチセンス分子の鎖長、BNA の導入数や位置を微調整することにより、アンチセンス効果の最大化が可能であることが示唆された。高い活性を示すアンチセンス分子を得るためのアルゴリズムは未だ開発されていないが、今回の報告は高活性分子を合理的に得るための方法論を示した初めての有用な報告である。

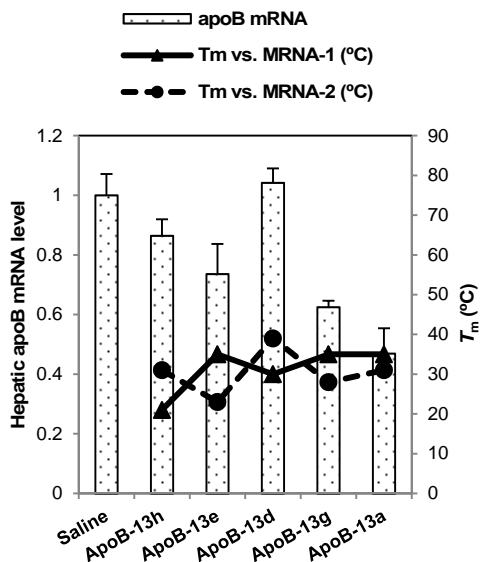


図3 各アンチセンス分子のマウスにおけるノックダウン効果と標的結合力

(2) アンチセンス分子の活性を高め得る低分子化合物の探索を目指し、レポーター系の構築を行った。まずウイルスベクターを用いて緑色蛍光蛋白質 (ZsGreen1-N1) をヒト肝癌由来培養細胞 (HLE) に安定発現させた。

この細胞を用いて、ZsGreen に対する高活性アンチセンス分子のスクリーニングを行った。実際のハイスループットスクリーニングに向けて、細胞数とアンチセンス濃度を厳密に検討し、ZsGreen の緑色蛍光を効率よく、再現性良く低下させるための至適条件を探索した。同時に本系では、補正のために DsRed と呼ばれる赤色蛍光タンパク質も安定的に発現しており、緑色蛍光強度を赤色蛍光で割り算することにより緑色蛍光の変動を特異的に評価可能である。この結果、スクリーニング評価系の精度を表す Z-prime 値が 0.5 を超える優れた評価系の構築に成功した。本系を用いて、ZsGreen に対するアンチセンスとライブラリ化合物 (2300 種) をそれぞれ添加し、48 時間後に緑色蛍光強度を蛍光プレートリーダーを用いて評価した。図4に示した

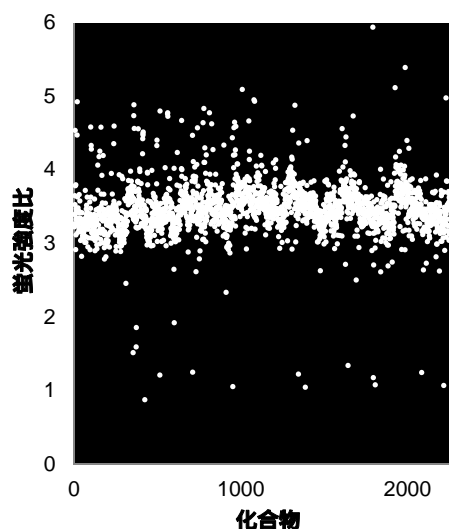


図4 アンチセンス反応の無細胞検出系

ように、いくつかの化合物において蛍光強度を大幅に低下させる化合物を見出した。このような低分子化合物は、将来的にアンチセンスと併用あるいはコンジュゲートすることでアンチセンス医薬の効果をも *in vivo* でも高め得る新しい治療薬の開発につながる。さらに、これらのメカニズムを阻害する阻害剤を探すことによりアンチセンスの細胞内取り込みあるいは活性化メカニズムを明らかにすることが出来、分子標的薬の開発にもつながり得る。

本成果は既存のアンチセンス医薬の活性を飛躍的に高めるものであり、臨床応用の直接的な推進力にもなり得るものと期待できる。

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3件)

Tsuyoshi Yamamoto, Hidenori Yasuhara, Fumito Wada, Mariko Harada-Shiba, Takeshi Imanishi, and Satoshi Obika. Superior Silencing by 2',4'-BNA^{NC}-Based Short Antisense Oligonucleotides Compared to 2',4'-BNA/LNA-Based Apolipoprotein B Antisense Inhibitors, *Journal of Nucleic Acids*, **2012**, ArticleID707323, doi:10.1155/2012/707323 (査読有)

Tsuyoshi Yamamoto, Satoshi Obika, Moeka Nakatani, Hidenori Yasuhara, Fumito Wada, Masa-Aki Shibata, Mariko Harada-Shiba. Locked nucleic acid antisense inhibitor targeting apolipoprotein C-III efficiently and preferentially removes triglyceride from large very low-density lipoprotein particles in murine plasma. *European Journal of Pharmacology*, **2014**, 723, 353-359, (査読有)

Tsuyoshi Yamamoto, Naoko Fujii, Hidenori Yasuhara, Shunsuke Wada, Fumito Wada, Naoya Shigesada, Mariko Harada-Shiba, Satoshi Obika. Evaluation of Multiple-Turnover Capability of Locked Nucleic Acid Antisense Oligonucleotides in Cell-Free RNase H-Mediated Antisense Reaction and in Mice, *Nucleic Acid Therapeutics*, **2014**, a head of Epub. 10.1089/nat.2013.0470 (査読有)

[学会発表](計7件、うち招待講演1件)

下剛典、橘敬祐、齋藤究、脇玲子、山本剛史、土井健史、小比賀聡、架橋型人工核酸を用いた splice-switching oligo nucleotides の配列設計、2014年3月27-30日、日本薬学会第134年会(熊本)熊本大学(熊本)

和田郁人、山本剛史、斯波真理子、小比賀聡、肝臓内取り込みの上昇を目的としたコレステロール修飾型アンチセンス核酸の体内及び肝臓内動態解析、2014年3月27-30日、日本薬学会第134年会(熊本)

脇玲子、山本剛史、矢原愛子、安原秀典、斯波真理子、田原早織、川上純司、小比賀聡、さまざまな置換基を施したアミド架橋型人工核酸の in vitro 機能評価、第23回アンチセンスシンポジウム、2013年11月27-28日、徳島大学大塚講堂(徳島)

下剛典、橘敬祐、齋藤究、脇玲子、山本剛史、土井健史、小比賀聡、2',4'-BNA/LNA導入型SSOsの配列設計に関する検討、第23回アンチセンスシンポジウム、2013年11月28-29日、徳島大学大塚講堂(徳島)

Tsuyoshi Yamamoto, Naoko Fujii, Naoya Shigesada, Satoshi Obika. BNA Antisense Oligonucleotide with Adequate Affinity

Hopscotches Across Target RNAs in RNase H-mediated Mechanism. *The 9th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutic Society*, 2013, 6th October, Naple, Italy.

山本剛史、糖部架橋型人工核酸BNAを搭載したアンチセンス医薬の開発、第29回日本DDS学会学術集会、2013年7月4-5日、京都テルサ(京都)(招待講演)和田郁人、山本剛史、和田俊輔、安原秀典、小比賀聡、斯波真理子、2',4'-BNAを搭載した高活性なApolipoprotein C-III標的型アンチセンス核酸の開発、遺伝子・デリバリー研究会第13回シンポジウム、2013年5月11日、帝京大学板橋キャンパス(千葉)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)
なし

取得状況(計0件)
なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b007/articles/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本剛史(Tsuyoshi YAMAMOTO)

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号: 80636994

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし