

日本医療研究開発機構 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(革新的中分子創薬技術の開発)
事後報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 膜透過性予測に資するオリゴ核酸の細胞内取り込み機構の分子基盤解明
(英語) Study of molecular basis for membrane permeability of oligonucleotide therapeutics

研究開発実施期間: 平成30年6月4日～令和3年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 井上 貴雄
(英語) Takao Inoue

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所・遺伝子医薬部・部長
(英語) Director, Division of Cellular and Gene Therapy Products, National Institute of Health Sciences

II 研究開発の概要

【背景】

現在、製薬業界では創薬標的の枯渇が問題となっているが、核酸医薬品は新たな標的分子である「RNA」に作用できる点が大きな特色である。核酸医薬品の標的となる RNA は pre-mRNA、mRNA に留まらず、近年、機能解明が進んでいる非コード RNA も対象であり、RNA 研究の進展と共に今後創薬標的が拡大していくと考えられる。核酸医薬品は核酸モノマーを連結したオリゴ核酸で構成されるという共通の特徴を有すること、有効性の高い配列（核酸医薬）が極めて短期間に取得可能であることなどから、一度プラットフォームが完成すれば短期間のうちに新薬を創出することが可能である。また、従来の医薬品では困難であった標的分子を減少あるいは増加させるアプローチが可能であることから、アンメットメディカルニーズに対する治療薬開発が可能である。以上のような優位性に加えて、修飾核酸技術や DDS 技術の進展により、実際に有効性の高い核酸医薬品を創出することが可能になったことから、核酸医薬品の開発が国内外で活発化している。

以上のように、遺伝性疾患や難治性疾患に対する次世代医薬品として期待されている核酸医薬品であるが、その潜在的な課題として、作用部位への送達効率が低い点が指摘されている。すなわち、RNA を標的とするため細胞内に到達する必要がある一方で、分子量の大きいポリアニオンという構造的な特性から膜との親和性が低く、細胞内への移行が限定的であるという問題がある。この点を解決する糸口として、核酸医薬品（オリゴ核酸）の細胞内取り込みの分子機構を理解することが有用と考えられるが、オリゴ核酸がどのような分子機構で細胞膜を透過し、作用部位に到達するかはこれまで明らかになっていない。

【膜透過を規定する候補分子の選定】

本研究では上記の問題を解決するため、研究代表者は哺乳細胞において 1 本鎖オリゴ核酸の膜透過ならびに細胞内動態に関与する候補分子を網羅的に探索するために、「GFP 発現細胞に対して GFP RNA を分解するアンチセンスを添加し、GFP 蛍光をモニターするバイオアッセイ系」を構築した。このスクリーニング系では、まず、GFP 発現細胞に任意の遺伝子を標的とした siRNA を作用させその遺伝子を発現抑制する。この細胞に GFP RNA を分解するアンチセンス (ASO-14S) を作用させる。通常の状態の細胞であれば抗 GFP アンチセンスの効果により細胞の GFP は消光する。しかし、予め発現抑制させていた遺伝子がアンチセンスの取り込みや輸送経路に関わる遺伝子だった場合、発現抑制によりこれらの経路が遮断されるため、GFP 蛍光は保持される。つまり、最終的な GFP 蛍光強度を観察することにより、任意の遺伝子が経路に関わるものか否か予想することができる。このスクリーニングを用いて、まずヒト全遺伝子 (18,096 遺伝子) を対象とした網羅的 RNAi スクリーニングを行い、1 本鎖オリゴ核酸の細胞内取り込みに関与する候補遺伝子の抽出を行った。候補遺伝子に対して更に、1 次スクリーニングの再現性を確認するための 2 次スクリーニング、siRNA のオフターゲット効果によるヒット遺伝子を排除するための 3 次スクリーニング、異なる配列を有する抗 GFP アンチセンス (ASO-16S) を用いた 4 次スクリーニングを行い、候補を絞り込んだ。

4 次スクリーニングまでに使用したアンチセンスは、主に核内において標的 RNA と結合し、RNaseH の作用によって標的 RNA を分解する、RNA 分解型アンチセンス (Gapmer) である。そこで、Gapmer とは異なる機構で作用するスプライシング制御型アンチセンス (SSO: Splice-switching oligonucleotide) を用いたスクリーニング系を新たに構築し、5 次スクリーニングを実施した。SSO は、標的 RNA と結合することにより、スプライシング因子が結合することを立体的にブロックすることにより、発現を制御する。スプライシング制御型アンチセンスをスクリーニング系としては、内在性のジストロフィン遺伝子を標的としたエクソンスキップモデルを採用した。ジストロフィン遺伝子が発現するヒト筋由来細胞を用いて、エクソン 58 をスプライスアウト（すなわち、エクソンスキップ）させるアンチセンス SS018-1 を特定した。SS018-1 はジストロフィン遺伝子の pre-mRNA のエクソン 58 に結合し、スプライシング因子と pre-mRNA の結合を阻害することで、エクソン 58 が含まれない短いジストロフィン mRNA が産生されると

考えられる。SS018-1 を用いた評価系においては、エクソン 58 を挟む領域を PCR で増幅・泳動することで、エクソンスキップの有無を判定することができる（すなわち、アンチセンスが正常に核内まで到達し機能すれば、短い PCR 産物が得られるが、核内に到達するまで過程が障害を受けると長い PCR 産物が得られる。この 2 種の PCR 産物のバンド強度を比較することで、アンチセンスの有効性の程度を数値化できる）。以上の 5 次スクリーニングにより、最終的に 22 種の候補遺伝子を特定することに成功した。

これらの中から、細胞内取り込みに関与する可能性のあると思われる遺伝子を選定し、遺伝子破壊株及び過剰発現株を樹立した。遺伝子破壊株については、CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集を行い、10 数遺伝子について破壊株の作製を完了し、性状解析を行った。複数の遺伝子破壊株において、Gapmer アンチセンスの効果解析した結果、有効性の顕著な低下が確認された。過剰発現株においては、複数の遺伝子の過剰発現株で、アンチセンスの RNA 分解活性の増大が観測された。

【核酸医薬品を実用化する上での問題点の洗い出し】

さらに、本研究では、核酸医薬を実用化する上での問題点について、特に製造・分析に関する課題点を整理・抽出した。事前準備としてシンポジウム「核酸医薬品開発の現状と課題 -原料供給・製造・品質担保の観点から-」を開催し、産官学の製造・分析の専門家とパネルディスカッションを通して意見交換を行った（平成 30 年 12 月 11 日開催）。本シンポジウムの議論内容を踏まえ、平成 31 年度（令和元年度）より「核酸医薬品を実用化する上での課題」を精査するサブグループを設置し、核酸医薬の原料供給・製造・品質担保に関する課題を抽出するためのアンケートを実施した。具体的には、核酸医薬の研究開発と関連の深い 96 機関（製薬企業、製造企業、分析機器メーカー等）にアンケートを送付し、得られた回答を分析した。アンケートの調査結果を「国内の課題は何か」や「今後どのようなところに力を入れるべきか」の項目を中心に整理した。核酸医薬の製造工程は、原料調達、オリゴ合成、分離・精製、分析（原薬の品質確認）、製剤化といった流れになる。ここにアンケートによって得られた課題を当てはめていくと、原料調達、オリゴ合成に関しては、原料や汎用試薬が海外に依存していること、生産能力が低い点や製造コストが高い点が課題として挙げられた。さらに分離・精製においては、不純物（副生成物）の分離が困難であることが課題として回答されていた。また、分析においては、閾値を示すガイドラインがないことや汎用試験法がないことなどが課題として多く挙げられた。工程全体においては、国内の臨床開発案件が現時点で少ないために、原薬（実サンプル）の製造や分離・精製、分析に関する経験値が乏しいとのコメントが多かった。

上記の本アンケート調査の概要を広く周知するため、シンポジウム「核酸医薬の原料供給・製造・品質担保に関する課題の抽出とその解決に向けた提言」を開催し、パネルディスカッションを通して意見交換を行った（2019 年 10 月 8 日開催、AMED 協賛：約 250 名が参加）。本シンポジウムにおいて、大きく 3 つの解決策を提示した。まず 1 つ目は、製造や分析の強化に関して、例えば、天然型のアミダイト体や汎用試薬に関してはすでに海外製造品が主流となっているものの、国産の優れた人工核酸に関してはその製造や管理を国内で実施できないか、という議論が交わされた。また、核酸医薬に特化した精製メディアや分析技術を開発し、生産能力や不純物分離の課題に対して取り組めないか、という提案を行った。生産能力や製造コストに関しては、国内の需要の増加や生産設備の増強によって今後改善する見込みがあるとの意見交換になった。2 つ目は、ガイドライン制定に向けた根拠となるデータの取得に関して、分離・精製・分析に係る技術開発や技術共有を行う拠点を整備し、そこで実施するのが効率的ではないかとの意見を交換した。3 つ目は、経験値の増強について、アンケートにおいても複数意見が出ていたように、国内臨床開発案件に対する支援が有効ではないかとの議論になった。例えば、実サンプルの分析（品質確認）や製剤化などが支援できるのではないかと、という意見が交わされた。シンポジウムのパネルディスカッションでは、今回のアンケートで明らかになった複数の課題に対して、核酸医薬の精製や分析等に特化した拠点を整備して取り組むことが可能ではないかと、具体案を提示してまとめた。本シンポジウムにおける議論の概要は文書として取り纏めて、PHARM TECH JAPAN 誌に発表した（PHARM

TECH JAPAN, Vol. 36, No. 8, 109-113, 2020)。さらに、調査研究の一環として核酸医薬品の製造・分析の現状とアウトソーシングについて取りまとめを行い、核酸医薬品の製造受託や分析受託、分析機開発を実施しているメーカーの取り組みについて文書として取り纏めた (PHARM TECH JAPAN, Vol. 36, No. 12, 47-56, 2020)。以上の文書は幅広く認知されることが重要であるため、出版社の許諾を得て、日本核酸医薬学会のホームページに掲載し、ダウンロードにより入手可能とした (<http://nats.kenkyuukai.jp/special/?id=27807>)。

Gapmer antisense oligonucleotide (ASO) and short interference RNA (siRNA) are a type of oligonucleotide therapeutics that exert their efficacy by cleaving the target RNA, unlike conventional small molecule or antibody therapeutics that generally interact with proteins. This mode of action has received considerable attention in recent years as a novel therapeutic strategy for the treatment of a wide range of diseases, including previously intractable human disorders.

Gapmer ASOs are single-stranded oligonucleotides that bind to RNA by sequence-specific Watson-Crick base pairing. Gapmer ASOs contain a variety of chemical modifications to improve their physical and pharmacological properties, such as resistance to nucleases that degrade ASOs, binding affinity to complementary RNAs, and permeability to cell membranes. Typically, gapmer ASOs contain high-affinity ribose modifications such as 2'-methoxyethyl or LNA on the wings and DNA in the central gap region with a phosphorothioate-modified backbone. When gapmer ASO binds to the target RNA, RNA/DNA heteroduplex is formed in the central gap region and RNA strand of the heteroduplex is cleaved by RNase H, an endoribonuclease that recognizes the RNA/DNA hybrid. Currently, three gapmer ASOs, Kynamro, Tegsedi, and Waylivra have been used in clinical setting. These gapmer ASOs are administered systemically by subcutaneous injection without carriers like lipid nanoparticles. siRNAs are about 20-mer double-stranded oligonucleotides that cleave the complementary target RNA via an RNA interference (RNAi) mechanism. To date, four siRNA therapeutics, Onpattro, Givlaari, Oxlumo, and Leqvio have been approved for clinical use. Onpattro is an siRNA therapeutic that are packaged within a lipid nanoparticle and are administered systemically by intravenous injection. In contrast, Givlaari, Oxlumo, and Leqvio are N-acetylgalactosamine (GalNAc)-conjugated siRNAs that are administered systemically by subcutaneous injection without carriers like lipid nanoparticles. The carrier-free "naked" GalNAc-conjugated siRNAs are incorporated into the hepatocytes via the interaction with asialoglycoprotein receptors.

Oligonucleotides composing gapmer ASOs or siRNA need to pass through cell membranes to reach the cleavage machineries to exert their activity. Thus, the mechanism of incorporation of naked oligonucleotides into the cells is one of the interests in the development of oligonucleotide therapeutics. In this study, we developed a screening system to identify genes which is involved in incorporation of oligonucleotides into cells using GFP-expressing cells and gapmer ASOs against GFP RNA. As a result, we successfully identified 22 genes as candidate genes that encode proteins involved in the uptake of oligonucleotides into the cells. We generated the knockout cells and overexpressing cells of these candidate genes and analyzed the change in the RNA-cleaving activities and the intracellular localization of ASOs and siRNAs. Some of these cells showed the interesting features on oligonucleotide dynamics.