

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：Staple 核酸を用いた新規核酸医薬開発

Development of a novel nucleic acid medicine by staple oligomer

研究開発実施期間：令和元年 12 月 16 日～令和 4 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：勝田 陽介

Yousuke Katsuda

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

熊本大学大学院 先端科学研究部 助教

Faculty of Advanced Science and Technology, Kumamoto University, Assistant Professor

II 研究開発の概要

本研究開発の意義

研究段階において、標的遺伝子の発現を抑制する手法の第一候補は、現在では siRNA であろう。標的遺伝子の配列情報が知られていれば簡単に siRNA を設計することができ、既存の報告を参考に一つの mRNA に対して複数の標的配列を選定することで強力に遺伝子発現を抑制することができる。現在のバイオインフォマティクスの技術向上により、目的外遺伝子の発現抑制（オフ・ターゲット効果）も最小限に止めることができる。

しかしながら、医薬品化という観点からは siRNA 開発は決して順調に進んでいるとは言えない。その理由は核酸医薬には修飾核酸を利用する必要があることにある。天然核酸には、細胞内安定性が低い、デリバリーのためのタグが化学修飾されていないため投与するのみで特定の組織の標的遺伝子に送達される (DDS) ことはない、などの弱点がある。これらの課題を解決すべく様々な魅力的な人工修飾核酸が合成されているが、医薬品としての汎用性の高い人工修飾核酸の開発は未だ継続して進められている現状にある。

人工修飾核酸の開発を困難にしている最大の原因は、siRNA が標的 mRNA の切断活性をもつ酵素反応との連動を必要とすること、すなわち、核酸に化学修飾を施すことでヌクレアーゼ耐性を獲得する一方で、酵素反応の基質としての被認識能を失うことにある。もちろんこのジレンマは、アンチセンス、アプタマー戦略においても共通する。

背景を踏まえ、酵素反応との連動を必要としない新しい遺伝子発現抑制技術を開発している (Fig. 1)。この技術では Staple 核酸と名付けた短鎖核酸が標的配列に結合し、互いに離れたグアニンの連続配列を近づけることで RNA G-quadruplex (RGq) の構造形成を誘導する。RGq は安定で嵩高い障害物となりタンパク質翻訳反応を抑制する。酵素反応との連動を必要としないことから修飾核酸の種類や数に依存することなく機能を維持することが可能で、DDS を指向した分子と連結しても効果に影響がない。また、標的外に結合しても近傍にグアニン

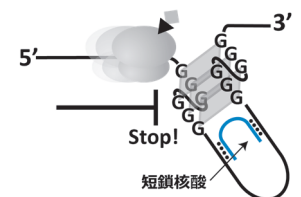


Fig. 1 Staple 核酸と名付けた短鎖核酸の導入によりグアニン繰り返し配列を近接させて RGq 構造の形成を誘導する。この構造はタンパク質翻訳反応を抑制することから、酵素非依存型のタンパク質翻訳抑制システムとなる。

の連続配列が存在しないので RGq は形成されず本システムは発動しない。この技術が動物個体内でも大きな治療効果をもつことをすでに証明しており、次世代型核酸医薬へと発展させるべく研究開発を進めている。

本研究開発課題は、遺伝子発現抑制型核酸医薬の研究開発プロセスにおいて得られた知見を利用して、今までにない核酸医薬の作用機序を生み出すものである。

本研究開発により得られた成果

申請時において提案した内容は①Staple 核酸が動物個体内でも作用することを証明する、②オフターゲット効果に関する知見を得る、③人工核酸化した staple 核酸の機能を評価する、という 3 点にまとめられるものであった。順番に得られた結果について報告する。

① Staple 核酸が動物個体内でも作用することを証明する

標的とした遺伝子は肺動脈性高血圧症の原因遺伝子としてられる TRPC6 である。TRPC6 に対して高選択的な小分子化合物は少なく、大きな治療効果を上げている医薬品はないと言える。そこで我々は心臓における同遺伝子発現を評価し、フェノタイプの挙動を観察することで肺動脈性高血圧症治療薬への可能性を探索した。Staple 核酸の投与はアデノ随伴ウイルス (AAV6) を利用した。AAV6 は心臓や肝臓に送達することが可能であるものの、腎臓には送達することができないことが知られており、各臓器における遺伝子発現量を評価することで Staple 核酸の機能評価が可能となる。

まずマウスにおける心筋 TRPC6 の発現抑制能を western blot により評価したところ 70%以上の遺伝子発現抑制能を確認することに成功した。また肝臓においても同等の遺伝子発現抑制能を確認できた。一方で、AAV6 が送達できない腎臓においては遺伝子発現能に変化はなかった。既存技術と異なり Staple 核酸は標的 mRNA を切断することなく翻訳レベルで遺伝子発現を抑制することから、qPCR にて各臓器における TRPC6 mRNA 量を評価したところ、いずれの臓器でも mRNA 量に変化はなく我々が期待した機序により遺伝子発現抑制効果を発揮していることが明らかになった。

また、遺伝子発現を抑制する効果に関して siRNA と比較して検討をおこなった。論文報告においては、siRNA の機序を利用した TRPC6 発現抑制実験においては細胞実験レベルでの報告にとどまっており、さらに同検討においても 3 箇所を標的に siRNA を導入し 50%程度の遺伝子発現抑制能を示していた。この事実を踏まえると我々が開発している Staple 核酸には強力な遺伝子発現抑制能があることが言えると思われる。

Staple 核酸の大きな遺伝子発現抑制効果が確認できたことから、心筋肥大の抑制効果を評価することにした。残念ながら肺動脈性高血圧症のモデルマウスは致死性が高いことから存在せず、TAC と呼ばれる大動脈弓を物理的に縮窄させることで心臓に負荷を与え、肥大を誘発させる検討で評価されている。我々も同方法により Staple 核酸のフェノタイプ評価を行うこととした。具体的には心エコーを利用することで心筋の拍動を追跡し心機能評価を行った。その結果、Staple 核酸非存在化においては心臓が顕著に肥大化し、心筋機能の低下が確認できたのに対し、Staple 核酸存在下においては心臓の肥大抑制および心機能の維持が確認できた。

さらに心臓の肥大に伴う心筋繊維化に関しても抑制効果があることを確認することに成功した。以上より、Staple 核酸は動物個体内においても標的細胞に到達することができれば目的遺伝子の発現を抑制することが可能であることが明らかになった。

② オフターゲット効果に関する評価

Staple 核酸は効果を発揮するために標的配列に結合し、近傍に存在するグアニン繰り返し配列を手繰り寄せるという二つの段階をクリアすることで機能を発揮する。つまり想定外の位置に結合しても都合良くグアニン繰り返し配列が 4 ヶ所存在することはほとんどないと言える。この機序により Staple 核酸の標的選択性は非常に高いことが期待される。そこでプロテオーム解析を行うことで網羅的な遺伝子発現量解析を行なった。その結果、実験間誤差と思われるいくつかの遺伝子発現量に変動が認められたものの、顕著な非特異結合に依存する遺伝子

発現抑制効果は認められなかった。

③ 人工核酸化した Staple 核酸の機能評価

Staple 核酸の優位性の一つに酵素反応との連動性を不要とする点が挙げられる。既存の遺伝子発現抑制型の核酸医薬は非天然塩基から構成されるオリゴ核酸を導入すると体内酵素の基質能を失い効果が大きく減弱することが知られている。一方で Staple 核酸は標的配列に結合するのみで機序を発動することが可能であることから、Staple 核酸としての構成塩基の全てを非天然化しても効果に影響はないと期待できる。そこで我々は 4 つの人工修飾核酸を Staple 核酸として設計し、評価を行うに至った。4 種類の人工核酸を選定した理由に関しては以下の通り。

4 種人工核酸のうち 2 種類に関しては既に上市された核酸医薬に採用されているもので、安全性に関して信頼性が高いと考えたため、他の 2 種類に関しては標的 mRNA に対して強い結合力を示すことが報告されている。この特徴は導入する Staple 核酸の短鎖化に大きな寄与をもたらすと考えられる。

評価の結果に関して結論から述べると、どの人工修飾核酸を利用しても遺伝子発現の抑制効果を確認することができた。さらにある人工核酸に関しては AteloGene という *in vivo* トランスフェクション試薬を利用しマウスに尾静脈注射に投与したところ、標的指向性を有していない核酸医薬分子であるにもかかわらず心臓における TRPC6 の発現を抑制できていることが確認された。これは Staple 核酸として設計した核酸の全塩基を人工修飾核酸に変換し、分子全体の安全性が飛躍的に向上していることに起因しているものと考えられる。

現状、上市されている核酸医薬では心臓関連疾病に適応するものではなく今後の治療薬開発に大きな期待が持てるものと考えている。

The application could be summarized in three points: (1) to prove that Staple nucleic acids are able to work in mammalian fauna, (2) to obtain knowledge on off-target effects, and (3) to evaluate the function of nucleic acid analogue Staple oligomers. We report on the results obtained.

(1) Proof of concept that Staple oligomers also work in mammals fauna.

We attempted to evaluate the inhibitory effect of Staple oligomers on cardiac TRPC6 gene expression, a known cause of pulmonary arterial hypertension, because there are few small molecule compounds that are highly selective against TRPC6. To explore the potential of Staple oligomers targeting TRPC6 as a therapeutic agent for pulmonary arterial hypertension, we evaluated the gene expression level of TRPC6 in the heart and observed its phenotypic behavior.

Adeno-associated virus (AAV6) was used to express Staple oligomers from within the mouse. Since it is known that AAV6 can be delivered to the heart and liver, but not to the kidney, it is possible to evaluate the function of Staple oligomers by assessing gene expression levels in each organ.

First, TRPC6 expression in mouse myocardium was evaluated by western blotting, which successfully confirmed more than 70% suppression of gene expression level and similar suppression of gene expression level was also confirmed in the liver. On the other hand, no change in TRPC6 expression was observed in the kidney, where AAV6 cannot be delivered.

Since Staple oligomer suppresses gene expression at the translational level without cleaving the target mRNA, there should be no change in the amount of TRPC6 mRNA in each organ. To confirm this fact, we evaluated the amount of TRPC6 mRNA in each organ with and without Staple oligomers by qPCR. The results confirmed that there was no difference.

Having confirmed the great gene expression suppression effect of Staple oligomers, we decided to evaluate their effect on myocardial hypertrophy. Unfortunately, there are no mouse models of pulmonary arterial hypertension due to its high mortality rate, and cardiac hypertrophic effects have been evaluated by physically compressing the aortic arch, called TAC, and inducing hypertrophy by loading the heart. We decided to use a similar approach for phenotypic evaluation using Staple oligomers. Specifically, we used echo-cardiography to track the beating of the myocardium and evaluate cardiac function. The results showed that in the absence of Staple oligomer, the hearts were significantly hypertrophied and cardiac function was impaired, whereas in the presence of Staple oligomer, cardiac hypertrophy was suppressed, and cardiac function was maintained. And inhibition of myocardial fibrosis associated with cardiac hypertrophy was also observed. These results indicate that if Staple nucleic acid can reach target cells, it can suppress the expression of target genes in mammalian fauna cells.

(2) Assessment of off-target effects

Staple oligomers must go through two steps: binding to the target sequence to be effective and bringing each guanine repeat sequence (G-tract) into close proximity. In other words, even if a nucleic acid binds to an unexpected position, there are rarely four G-tracts present. By this mechanism, Staple oligomers are expected to be highly selective for their targets. Therefore, we performed a comprehensive gene expression analysis using proteome analysis. The results showed no significant suppression of gene expression dependent on nonspecific binding, although there were variations in gene expression levels that may be due to errors between experiments.

(3) Functional evaluation of nucleic acids analogue staple oligomer

We evaluated four nucleic acid analogue Staple oligomers. Two of these oligomers are already used in commercial

nucleic-acid drugs and are recognized as reliable with respect to safety. The other two nucleic acid analogues have been reported to exhibit strong binding to target mRNAs. This feature may contribute significantly to the shortening of the Staple oligomers to be introduced. As a conclusion of the evaluation results, we were able to confirm that all of the nucleic acid analogues were effective in suppressing gene expression level. Furthermore, when one of the nucleic acid analogue was injected into mice by tail vein injection using an in vivo transfection reagent called AteloGene, it was confirmed that TRPC6 expression in the heart was suppressed even though the nucleic-acid drug molecules were not target directed. This may be attributed to the fact that all bases of the nucleic acid designed as a Staple oligomers were converted to an artificially modified nucleic acid, which dramatically improved the overall stability of the molecule. Currently, there are no nucleic acid drugs on the market for the indication of heart disease, and we believe that there are great expectations for the future development of therapeutic drugs.