

日本医療研究開発機構 先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業
事後評価報告書



I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) ゲノムを標的とし転写調節可能な新奇人工核酸搭載核酸医薬の開発研究
(英語) Development of oligonucleotide therapeutics with novel artificial nucleoside analogues that can target the genome DNA

研究開発実施期間: 令和元年10月1日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 谷口 陽祐
(英語) Yosuke Taniguchi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人九州大学 薬学研究院 准教授
(英語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences Kyusyu University, Associate Professor

II 研究開発の概要

本研究課題では、独自の人工核酸を用いて次世代技術であるゲノムを標的としたアンチジーン核酸医薬の技術基盤構築を目指している。ガンなど疾患の原因となるタンパク質の発現を人工的に制御する方法の一つに、ゲノムを構成する 2 本鎖 DNA に 3 本鎖 DNA を形成させて転写の段階で阻害する手法である、アンチジーン法が知られている。しかしながら、任意の 2 本鎖 DNA に安定な 3 本鎖 DNA を形成させるには天然型の核酸のみでは不十分であり人工核酸の利用が必要不可欠な状況にあり、一般的な利用や検討はなされていない。そこで、これまでに見いだしている独自の人工核酸を用いて、人工核酸搭載アンチジーン核酸の細胞内および核内導入技術の開発、人工核酸の効率的な合成法、効率的な標的配列の探索さらにはこれらを実証するための培養細胞を用いた遺伝子発現制御機能に関して詳細を検討することにした。本手法を確立することができれば、遺伝子の異常をともなう様々な疾患に対しての根本的な治療法となる新規核酸医薬の開発につながると期待される。

核酸医薬の長年の大きな課題に、細胞への効果的な導入であり、3 本鎖 DNA 形成技術ではさらに核内への輸送も挙げられる。そこでこれらの問題を解決するため、細胞内導入法さらには核内輸送法をオリゴ核酸の特殊修飾アプローチにより検討を行った。独自に見出したガード核酸は、アンチジーン核酸の細胞内利用率を高めるため、2 本鎖 DNA という高次構造形成による保護作用を有する相補的なオリゴ核酸である。実際に、1 本鎖 DNA 状態では簡単に分解される核酸分解酵素への耐性が飛躍的に向上したことを明らかにしている。このガード核酸には、鎖の一部に 2'-デオキシウリジン (dU) を組み込む事により、核内で強い活性を示している UDG (Uracil-DNA Glycosylase) の核酸除去作用にてガード核酸を分解し、アンチジーン核酸を核内のみで放出するシステムである。このガード核酸による 2 本鎖 DNA 機能を用いることにより様々なアンチジーン核酸を 1 本鎖の状態に細胞内に導入するよりも、効果的に遺伝子発現を制御できることを明らかにした。さらに、このガード核酸の鎖の末端は化学修飾が可能なことから、細胞膜を透過できるような機能性分子 (脂溶性化合物やリガンド化合物など) で化学修飾することにより、一部の化学修飾体を用いることで細胞に播種するだけで細胞の中に導入することも明らかにした。このような化学修飾法の反応条件の検討を行い、DNA 自動合成装置を用いた固相における反応のみならず、オリゴヌクレオチド精製後の液相における効率的な反応も明らかにして、DNA 自動合成装置には適用が難しかった機能分子も効率的にオリゴヌクレオチドに導入することが可能となった。

本課題の主な検討素材となる人工核酸搭載アンチジーン核酸を数種類合成するためには、人工核酸分子の大量合成が必要であり、その合成プロセスの検討を行った。既存の合成経路で大きな問題となっているのは、最初の段階におけるヘック反応であったため、糖部位の水酸基を保護基により保護して反応条件の詳細を検討することにより収率の向上に成功した。その他の段階は基本的には保護基をつける反応であるため比較的収率が良かったため、反応の後処理に使用する試薬の量などを調整し副生成物の発生を抑える事や過剰な試薬を用いないことによる反応溶液の直接濃縮を介した連続反応法やワンポット合成法の条件を見いだした。また、精製は自動精製装置を用いた連続的自動精製を適用し、経済的かつ効率的に目的の人工核酸の化学合成を行った。その結果、全体として収率および収量の向上に成功し、数グラムスケールにてオリゴヌクレオチドへ導入する前の誘導体までの合成を達成した。DNA 合成に関しては、反応時間の検討や精製方法の検討を行い、比較的簡単な方法を用いて大量に精製する手法を見いだした。この手法を用いて、網羅的に探索した標的配列に対しての人工核酸搭載アンチジーン核酸の合成を行い検討に用いた。

標的配列の網羅的探索では、3 本鎖形成配列検索データベース (<http://ttsmi.bii.a-star.edu.sg>) を用いて、候補となる標的配列を探索した。本サイトによると、核酸医薬の開発の問題点の一つである非特異的な結合 (オフターゲット効果) を防ぐための配列選択として、(1)標的塩基は 15-30 塩基対、(2)グアニン (dG) 含量が 20-90%、(3) 少なくとも 1 カ所の 3 本鎖 DNA 形成障害部位 (CG や TA 塩基対) を含める、以上の 3

つの条件を満たす必要があるとしているため、それらの条件を満たした標的配列をいくつか見いだした。また、過去の文献に報告されている標的配列に対しても適用可能なものも選別し、標的となる 2 本鎖 DNA 配列の検討を行った。これらの配列に対して、人工核酸搭載アンチジーン核酸および比較となる天然型アンチジーン核酸の合成および精製を行った。蛍光標識した標的 2 本鎖 DNA に対して、化学合成したアンチジーン核酸の濃度を徐々に増やして添加して、未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動に 3 本鎖 DNA 形成能の評価を行った。観測されたバンドの蛍光強度より算出可能な錯体形成定数を求めることにより、人工核酸搭載アンチジーン核酸の方が天然型アンチジーン核酸よりも 5 倍から 50 倍程度より強く 3 本鎖 DNA を形成可能な領域を明らかにした。ここで、3 本鎖 DNA を形成することができなかった標的配列や天然型とほぼ同等な錯体形成定数を示す結果も得られた。この場合、アンチジーン核酸の長さや標的配列を少しずらす等で調整することにより、人工核酸搭載アンチジーン核酸の方がより安定な 3 本鎖 DNA を形成できることも示された。また、ある標的 2 本鎖 DNA 配列においては、3 本鎖 DNA 形成においてミスマッチ塩基対を含む配列が存在し、その領域に対して天然型アンチジーン核酸は非常に安定な 3 本鎖 DNA 形成が観測されたのに対して、人工核酸搭載アンチジーン核酸は 3 本鎖 DNA を全く形成しないという結果が得られ、人工核酸を導入することの重要性が示された。これらのことにより、標的可能な 2 本鎖 DNA 領域として、4 つの遺伝子と 5 つの標的配列を明らかにすることができた。

3 本鎖 DNA 形成によるアンチジーン効果を実証するために、実際に効果的に 3 本鎖 DNA を形成可能な領域を標的としたアンチジーン核酸を培養細胞に導入して、どのような効果が得られるのかの検証を行った。まずは、一般的なトランスフェクション試薬を用いてアンチジーン核酸を細胞に導入後、その細胞の形態を経時的に観察した結果、細胞が死滅しているのが観測された。この効果は、使用したアンチジーン核酸や播種した細胞種によって異なるが、アンチジーン核酸の濃度依存的、時間依存的に強く表れることが明らかとなった。そこで、生存細胞を比色定量にて算出した結果、80%以上の細胞が死滅していることを明らかにした。このとき、より強く 3 本鎖 DNA を形成可能であると明らかにした人工核酸搭載アンチジーン核酸の方が天然型アンチジーン核酸よりも強く細胞増殖を阻害していた。また、同じ遺伝子ではあるが論文にて報告例のある mRNA を標的としたアンチセンス核酸を用いて同様の効果を調べたところ、同濃度で同条件においてアンチジーン核酸の方がより強く細胞増殖阻害活性があることも明らかにした。この時、アンチジーン核酸の鎖の配向性が異なる配列を用いた場合、全く効果が確認されなかったことから、今回確認された細胞増殖阻害活性は、標的 2 本鎖 DNA 配列に対しての 3 本鎖 DNA 形成が関与していることが強く示唆される結果である。

そこで、アンチジーン核酸を作用させた細胞より RNA を抽出して、標的としているそれぞれの遺伝子発現産物となる mRNA の量をリアルタイム PCR (RT-PCR) にて定量を行った。その結果、遺伝子発現の阻害効果は 10~20%程度であり、最大でも 50%程度であった。このことは、アンチジーン効果に伴う細胞死が確認されており、生存細胞から抽出した mRNA 発現量解析を行った結果となっているため、それほど抑えることができていると考えられる。そこで、同条件にて全 RNA を抽出して、全遺伝子発現に関して RNAseq により発現増減に関して定量を行った結果、多くの RNA の発現に大きな変動が確認された。特に、細胞死に関与する遺伝子の発現の増大、腫瘍細胞の浸潤に関与する遺伝子や細胞分裂に関与している遺伝子の発現の減少が確認され、アンチジーン核酸の作用により、がん細胞死に繋がるような有用な情報を得ることに成功した。

本研究課題で得られた成果は、癌や稀少疾病など遺伝子の異常がそれぞれの疾患の発症に深く関与していると考えられる遺伝子配列に対して、3 本鎖 DNA を形成可能な人工核酸を含むアンチジーン核酸を創成するための基盤的な情報を含んでおり、これまでに天然型の核酸のみでは標的とすることができなかった配列に対しても遺伝子発現制御に展開が可能である。さらには、ドラッグデリバリーシステム技術開発研究者と有機的な融合研究へ展開できれば人工核酸を組み込んだアンチジーン核酸を特定の臓器に特異的に輸送し、

異常となっている特定の細胞の中に導入して、アンチジーン効果を特定の細胞のみで働かせることができる
新技術の創出など、これまでにない新しい技術、新しい創薬モダリティとしての展開も期待される。

This research project aims to establish the technology of genome-targeted antigene oligonucleotides therapeutics, using original artificial nucleoside analogues. Antigene method, in which triplex DNA is formed with the duplex DNA is inhibited at the transcription steps. However, the use of artificial nucleic acids is essential to form stable triplex DNA. Therefore, using the original artificial nucleoside analogues we have discovered so far, we decided to test in detail the development of intracellular and intranuclear introduction techniques of antigene oligonucleotides, efficient synthesis methods of artificial nucleic acids, search for target sequences, and gene expression control functions using cultured cells to demonstrate these methods. We have established a method for the synthesis of artificial nucleic acids. The establishment of this method is expected to lead to the development of novel oligonucleotide therapeutics, which will be a fundamental therapy for various diseases associated with genetic abnormalities.

In order to improve the intracellular utilization of the antigene oligonucleotides including artificial nucleoside analogues, we created a complementary strand that forms a double stranded DNA with the antigene oligonucleotides. By chemically modifying the complementary strand, we have shown that the inhibitory effect on gene expression is enhanced through efficient introduction of the complementary strand into the nucleus. Furthermore, we have identified a useful modification unit by binding an intracellular transfection unit to the complementary strand and verifying its cellular transfection function. Efficient chemical synthesis of monomer unit of artificial nucleoside analogue was achieved, and after exhaustive search for sequences capable of forming triplex DNA, multiple oligonucleotides for the sequences were successfully chemically synthesized. By comparing the complex formation ability with natural-type antigene oligonucleotides, it was clarified that the antigene oligonucleotides including artificial nucleoside analogues can form more stable triplex DNA. When the antigene oligonucleotides including artificial nucleoside analogues targeting genes involved in cell proliferation was transfected into cells, it was found to have specific gene expression inhibition and cell proliferation inhibition activity.

The results obtained in this project contain fundamental information for the creation of antigene oligonucleotides, including artificial nucleoside analogues capable of forming stable triplex DNA, for gene sequences such as cancer and rare diseases in which genetic abnormalities are thought to be deeply involved in the pathogenesis of the respective diseases. It can be deployed to control gene expression for sequences that could not be targeted by natural-type antigene oligonucleotides. Furthermore, when we can expand our study to collaborative with drug delivery system technology, we can create a new technology that can specifically transport antigene oligonucleotides containing artificial nucleoside analogues to specific organs, introduce them into specific cells that are abnormal, and make the antigene effect only in specific cells. The development of new technologies and new drug discovery modalities that have never been seen before is also expected.