

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： 人工核酸医薬の細胞質内デリバリー

Direct intracellular delivery of synthetic oligonucleotide therapeutics

研究開発実施期間： 令和2年6月1日～令和5年3月31日

研究開発代表者 氏名：木村 康明

Yasuaki Kimura

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学大学院理学研究科 物質理学専攻 准教授

Department of Chemistry, Graduate School of Science Nagoya University, Associate Professor

II 研究開発の概要

アンチセンス法やRNA干渉などのmRNAの分解を介した標的遺伝子発現抑制を誘導するオリゴ核酸医薬の開発が進んでいるが、薬効分子であるオリゴ核酸の細胞内送達効率に課題がある。そのため、核酸分子を細胞内に導入するために様々などが開発されてきた。例えば、カチオン性リポソームをデリバリー基材とするLipid Nanoparticle (LNP)法や、細胞膜上の受容体リガンドを連結させるコンジュゲート法などのデリバリー手法が有用な手法として広く用いられているが、細胞内取り込み後のエンドソームから細胞質への送達効率が低い点、細胞毒性、組成の不均一性、過剰量のデリバリー基材を必要とするなどの、様々な課題が存在する。

本研究では新たなオリゴ核酸のデリバリー法として、ジスルフィド構造を導入した膜透過型オリゴ核酸を開発し、高効率かつ無毒性でオリゴ核酸を細胞質内に送達する手法の確立を目指した。主な研究項目は、このジスルフィド法の分子メカニズム解析、膜透過性ユニットの構造誘導化に基づくデリバリー効率の向上、膜透過性オリゴ核酸の体内動態評価、疾患治療応用目指した核酸医薬開発、である。

メカニズム解析実験では、膜透過性オリゴ核酸にビオチン修飾したオリゴ核酸プローブを合成し、それを用いてオリゴ核酸の膜透過に関与する標的タンパク質を、プローブ分子とのジスルフィド結合形成反応に基づき回収した。回収タンパクについてプロテアーゼ処理、続くLC/MS/MS解析により、複数の関連タンパクが

同定された。特にヒット順位が高かったタンパク質 X については、表面にジスルフィド交換を起こしうるシステイン残基が存在しており、想定する細胞内取り込みメカニズムに合致する関連タンパクの同定に至った。今後、種々の構造誘導体についても取り込みに関与するタンパク質の同定を進め、その特異性に応じた医薬応用の選定を行う予定である。

構造誘導化においては、従来の直鎖状のジスルフィドからその化学的反応性を向上することで細胞膜状のタンパク質との相互作用の効率向上を図ることを計画し、構造活性相関研究を行った。新たな構造として環歪みにより反応性が向上した 5, 6 員環ジスルフィドやジセレニドについて合成とその活性について機能評価を行った。合成に関しては、ジスルフィドユニットについて当初対応するホスホロアミダイト体での合成を検討した。膜透過性ユニットのリピート数が少ない誘導体については合成が可能であったが、5 回以上のリピート数のサンプルでは核酸自動合成時に膜透過性ユニットの非特異的酸化に伴う分解反応が競合し合成が困難であったため、オリゴ核酸の膜透過性ユニットをオリゴ核酸合成後に導入する手法を開発した。この方法により構造活性相関の研究を容易に行うことが可能となった。環状ジスルフィド構造に基づく新規膜透過性ユニットについて、リピート数に応じた細胞膜透過性の向上及びノックダウン効果の向上を確認し、新たな有望な膜透過性ユニットの同定に成功した。

体内動態評価については、環状ジスルフィドと脂溶性ユニットを用いた細胞膜透過性オリゴ核酸について、尾静脈注射におけるマウス体内での動態評価を行った。その結果、肝臓や血液系細胞に分布について、ジスルフィドユニットと脂溶性ユニットの相乗効果が確認された。このように環状ジスルフィドをベースとした膜透過性オリゴ核酸の各種誘導体について特徴的な分布特性を見出しており、今後の誘導体開発に有用な情報が得られた。

治療応用に向けた検討では、膜透過性ユニットを 5 回リピートで導入した Cy5 標識オリゴ核酸をマウスに経鼻肺投与し、体内分布の評価を行った。気管上皮細胞および肺胞にまで到達し、そこでの取り込みが確認した、主に I 型肺胞上皮細胞に分布していることが明らかとなった。また、細胞内分布解析においては、投与後長時間のインキュベーションにより核内への分布が確認した。この結果に基づき mdx モデルマウス由来の筋管細胞系でのエキソンスキッピング効果を評価したところ、膜透過性ユニットを導入したオリゴ核酸サンプルにおいて、エキソンスキッピング効率の大幅な促進を確認でき、筋ジストロフィー治療薬応用の可能性を示唆する結果が得られた。

Oligonucleotide therapeutics that induce suppression of target gene expression through degradation of mRNA, such as antisense methods and RNA interference, are being developed, but the efficiency of intracellular delivery of oligonucleotides, the medicinal molecules, is an issue. Therefore, various methods have been developed to introduce nucleic acid molecules into cells. For example, the Lipid Nanoparticle (LNP) method using cationic liposomes as delivery substrates and the conjugation method using receptor ligands on the cell membrane are widely used as useful delivery methods, but they are not efficient in terms of delivery from endosomes to the cytosol after intracellular uptake. However, there are various challenges such as low efficiency, cytotoxicity, heterogeneity of composition, and the need for excessive amounts of delivery substrates after cellular uptake.

In this study, we developed membrane-permeable oligonucleotides with disulfide structures as a new delivery method for oligonucleotides, aiming to establish a highly efficient and non-toxic delivery method of oligonucleotides into the cytoplasm. The main research topics are molecular mechanism analysis of the disulfide method, improvement of delivery efficiency based on structural induction of membrane-permeable units, evaluation of the pharmacokinetics of membrane-permeable oligonucleotides in the body, and development of nucleic acid drugs for therapeutic application.

In the mechanism analysis experiment, biotin-modified oligonucleotide probes were synthesized, and the target proteins involved in membrane permeation of oligonucleotides were recovered by disulfide bond formation reaction with the probe molecules. Protease treatment of the recovered proteins, followed by LC/MS/MS analysis, identified several related proteins. Protein X, in particular, had a cysteine residue on its surface that can cause disulfide exchange, leading to the identification of a related protein that matches the assumed intracellular uptake mechanism. In the future, we plan to identify proteins involved in the uptake of various structural derivatives and select pharmaceutical applications according to their specificity.

In structure-derivatization, we plan to improve the efficiency of interaction with membrane proteins by enhancing the chemical reactivity of disulfide structures, instead of the conventional linear disulfide structures and have conducted structure-activity relationship studies. We synthesized new structures of 5- and 6-membered ring disulfides and diselenides with enhanced reactivity due to ring distortion, and evaluated their activities. For the synthesis of the disulfide units, we initially investigated the synthesis of the corresponding phosphoramidite forms. However, the synthesis of derivatives with a small number of repeats of the membrane-permeable unit was possible, but the degradation reaction accompanying nonspecific oxidation of the membrane-permeable unit competed with the automatic synthesis of the oligonucleotide with five or more repeats of the membrane-permeable units, making the synthesis difficult. This method facilitates the study of structure-activity relationships. This method facilitates the study of structure-activity relationships. For the new membrane-permeable units based on cyclic disulfide structures, we confirmed the enhancement of

membrane permeability and knockdown effect depending on the number of repeats, and succeeded in identifying new promising membrane-permeable units.

For pharmacokinetic evaluation, we evaluated the kinetics of membrane-permeable oligonucleotides with cyclic disulfide and liposoluble units in the mouse body during tail vein injection. As a result, the synergistic effects of the disulfide unit and the liposoluble unit were confirmed concerning distribution in liver and blood system cells. Thus, characteristic distribution characteristics were found for various derivatives of membrane-permeable oligonucleotides based on cyclic disulfides, providing useful information for future derivative development.

For the investigation of therapeutic application, Cy5-labeled oligonucleotides with five repeats of membrane-permeable units were intranasally lung administered to mice, and their distribution in the body was evaluated. It was found to reach tracheal epithelial cells and alveoli, where uptake was confirmed, mainly in type I alveolar epithelial cells. In addition, the intracellular distribution analysis confirmed that the drug was distributed into the nucleus after a long incubation period after administration. Based on these results, we evaluated the exon-skipping effect in myotubular cell lines derived from mdx model mice and found that the exon-skipping efficiency was greatly enhanced in oligonucleotide samples with membrane-permeable units, suggesting the possibility of application as a therapeutic agent for muscular dystrophy. The results suggest the possibility of developing this technology for the application of therapeutic drugs for muscular dystrophy.