

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名：Staple 核酸を利用した新規核酸医薬機序開拓

Development of Nucleic-Acid-Medicine Mechanisms by Staple Oligomer

研究開発実施期間：令和3年10月20日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名：勝田 陽介

KATSUDA, Yousuke

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人熊本大学大学院先端科学研究部 准教授

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

II 研究開発の概要

申請者らのグループではこれまでに Staple 核酸と名付けた短鎖核酸を導入し、標的 mRNA において RNA G-quadruplex (RGq)構造の形成を誘導することでタンパク質翻訳反応を抑制する技術を開発してきた。種々の検討を進めた結果、Staple 核酸は肺動脈性高血圧症の原因遺伝子とされている TRPC6 の発現を既存技術である siRNA と比較しても大きく抑制した。さらに横大動脈弓狭窄法（TAC 法）を施して心筋の肥大を誘導したマウスにおいても Staple 核酸投与を行うと、心機能を示す EF 値および FS 値が TAC 処置を施していない正常マウスとほぼ同等の値を示すことに成功した。これらの結果を受け、申請者は以下に示す2つの骨子をもつ提案を申請し、Staple 核酸を次世代型核酸医薬に資する技術へと発展させたいと考えている。

①肺動脈性高血圧症治療薬の開発(Staple 核酸の医薬品としての可能性を追求する)

TRPC6 を標的とした検討は非常に良好な知見を得ることに成功していた。しかし現在はアデノ随伴ウイルスを使って Staple 核酸を発現させていることから、本申請においては Staple 核酸を人工修飾核酸化してマウスに投与した。さらに設計した人工修飾核酸化 Staple 核酸の薬物動態、オフターゲット効果などを詳細に検討し、本研究助成期間終了時には臨床試験に資する段階へとステップアップさせるに十分な知見の取得を試みた。

②栄養障害型表皮水疱症治療薬の開発（Staple 核酸の可能性を広げる）

デュシェンヌ型筋ジストロフィー治療薬ビルトラルセンに代表されるエクソンスキップを誘起する核酸医薬は主にスプライシング機構に変調を与えることで作用を発現する。今回申請者が提案する Ribosomal Shunting 誘起型 Staple 核酸は不要な部分の mRNA 領域をつまみ取りタンパク質翻訳反応を進行させる。つまみ取る領域に遺伝子変異によって導入されてしまった終止コドンを含むことで、今まで治療が困難だった Premature Termination

Codon を起因する疾病の治療薬開発を試みた。エクソンスキップと比較すると削除されるアミノ酸領域が非常に小さいことから大きな治療効果が期待できる。

研究成果

①肺動脈性高血圧症治療薬開発に関して

RNAh 技術の可能性を考えると、核酸医薬に特有の生体内安定性の問題を克服することである。RNAh 技術は、酵素反応のようなバイオプロセスとの協調を必要としないため、Staple 核酸を構成する核酸を人工核酸に置き換えても、効率を損なうことなく生体内での安定性を向上させることができるはずである。Staple 核酸のこのような化学的最適化可能性を実証するために、TRPC6 遺伝子を標的とするように設計された非環状 L-トレオニノール核酸 (L-aTNA) で構成された Staple 核酸を用いて、一連の *in vitro* および *in vivo* 実験を行った。予想通り、RGq は 40-nt L-aTNA の Staple 核酸によって TRPC6 標的配列で誘導することが確認できた (Fig. 1a)。この結果は、Staple 核酸の配列選択的ハイブリダイゼーション特性のみが Staple 核酸の活性発現に重要であり、ヌクレオチドユニットの化学的特性は重要ではないことを強く示唆している。さらに、L-aTNA の Staple 核酸の翻訳阻害活性を、*in vitro* 翻訳および C2C12 細胞における内因性 TRPC6 発現の western blot 分析によっても評価した (Fig. 1b)。予想通り、無細胞翻訳ではたんぱく質発現は著しく阻害され、C2C12 細胞における内因性 TRPC6 発現を濃度依存的に抑制することが可能であった (Fig. 1c and d)。これらの知見は、Staple 核酸の機序発現の特徴についての証拠となり、完全に非天然核酸のみで構成されたオリゴマーを利用した核酸治療薬の開発への道を開くものであると考えている。

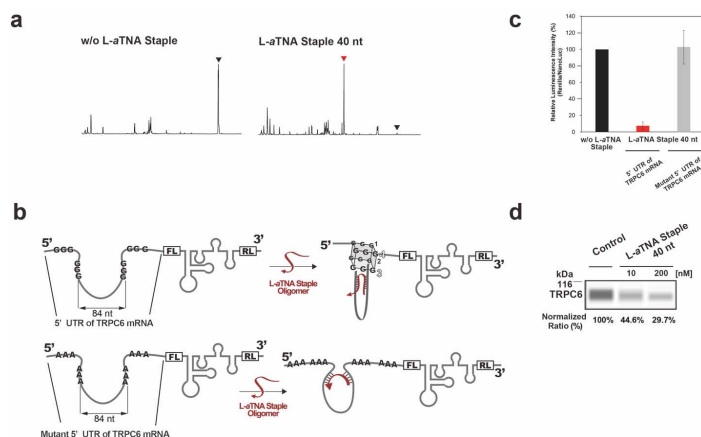


Fig. 1 L-aTNA で構成された Staple 核酸の機能評価。

続くステップでは、40-nt L-aTNA の Staple 核酸をマウスの内因性 TRPC6 遺伝子に適用した。L-aTNA の Staple 核酸は、*in-vivo* トランスフェクション試薬を用いて、静脈注射でマウスの心臓に直接投与した。原理的には心臓への導入に選択的ではないが、L-aTNA 型 Staple 核酸は心臓細胞へ導入されていた。注目すべきことに、注入された二重蛍光標識 L-aTNA Staple 核酸の Cy5 および FITC 蛍光シグナルは、心臓切片において 6 週間まで高度に共局在したままであり、このことは、これらの Staple 核酸が心臓において 6 週間程度まで検出可能な状態にあることを示している。実際、L-aTNA 型 Staple 核酸を 1 回注射すると、マウスの心臓において TRPC6 の発現が用量依存的に 6 週間まで効果的に抑制された。

②栄養障害型表皮水疱症治療薬の開発に関して

改変型 Luciferase 遺伝子を利用してレポーターアッセイを展開した。その結果、細胞内でも Ribosomal Shunting の効果を確認することに成功した。さらに *in vitro* での結果と比較すると *in cell* 系における Ribosomal Shunting 効果の方が効率的であることが明らかになった。この事実は細胞内が分子強雑系にあり、水系の *in vitro* と比較して RNA G-quadruplex の構造がより安定であるという知見が報告されており、このポイントが Ribosomal Shunting 効率に強く影響を与えたものと予想している。一方で、*in vitro* 系の評価で利用した Staple 核酸は *in cell* 系においては顕著な発光回復効果を確認するに至らなかった。つまり、*in vitro* 系で最適化した Staple 核酸が必ずしも *in cell* 系で効果を発揮するわけではないということになる。この知見より、Ribosomal Shunting を試行した Staple 核

酸は *in vitro* で最適化するのではなく、*in cell* 系において最適化する必要があるということが明らかになった。

さらに本プロジェクトの分担者である福島らが担当する患者の *COL7A1* に適合する *Staple* 核酸を設計したところ、2803 番から 2822 番目のアミノ酸が脱落することが明らかになった。したがってこの周辺を削除した *COL7A1* Δ 2803-2821 および *COL7A1* Δ 2803-2822 を作製した。

7 型コラーゲンは 3 本鎖を形成することで細胞外に分泌され機能を発揮することが知られている。そこで *COL7A1* Δ 2803-2821 および *COL7A1* Δ 2803-2822 を Western blot により 3 量体形成を確認することで、Ribosomal Shunting 後の 7 型コラーゲンが機能を有したものの可否かを評価した。その結果、夏賀らが確立した系が現状、うまく動いて

いないことが明らかになった (Fig. 2)。そこで、細胞上清における *COL7A1* の発現量を評価することで機能性 7 型コラーゲンの評価を行うことにした。その結果、テクニカルには改善の余地があるものの、アッセイ系は作動していると考えられ、我々が期待した通り上清に *COL7A1* が分泌されていることが明らかになった。この結果を受けて、Ribosomal Shunting 誘起後の 7 型コラーゲンは機能を有していると判断するに至った (Fig. 3)。

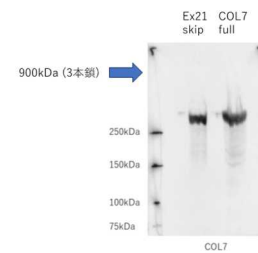


Fig. 2 7 型コラーゲンを標的とした Western blot を行った結果。7 型コラーゲンの野生型の場合においても 3 量体形成を確認することができず、システムとしてうまく機能していないことが示唆される。

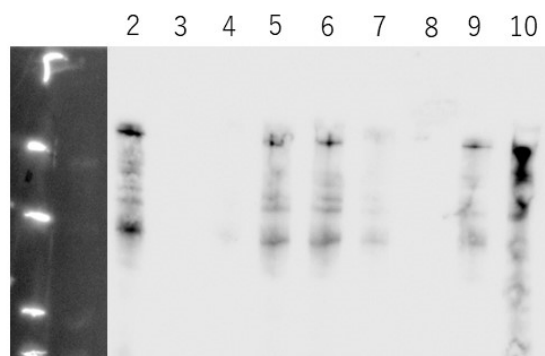


Fig. 3 培養細胞上清液から分泌される 7 型コラーゲンを Western blot により評価した。いくつかのレーンにおいては Col7A1 を確認することができなかったが、これは主義の問題であると考えている。以前、3 量体形成の確認はできなかったものの、細胞上清液から確認できたことより、機能性 7 型コラーゲンであると考えている。

【総括】

Staple 核酸技術を基盤とした日本発の核酸医薬技術として、本研究開発課題では、肺動脈性高血圧症治療薬と栄養障害型表皮水疱症治療薬の開発を目指し、基礎検討を行った。その結果、*Staple* 核酸はオフターゲット効果が極めて少なく、遺伝子変異によって誘導される疾患を改善する可能性が明らかとなった。その特性を鑑みると様々な遺伝性疾患に応用できると思われ、様々な治療薬への応用が期待でき、さらなる理論構築を図るとともに、種々疾患の治療薬開発に応用展開を進めていく。

Our group has developed a technology to suppress protein translation reactions by introducing short-chain nucleic acids named Staple oligomer, which induce the formation of RNA G-quadruplex (RGq) structures in target mRNA. Through various investigations, it has been shown that Staple oligomers significantly inhibit the expression of TRPC6, a gene implicated in pulmonary arterial hypertension, compared to existing siRNA techniques. Furthermore, in mice induced with myocardial hypertrophy using the transverse aortic constriction (TAC) method, administration of Staple nucleic acids resulted in EF and FS values indicating cardiac function comparable to those of normal mice without TAC treatment. Based on these results, the applicants propose the following two main points and aim to advance Staple nucleic acids as a next-generation nucleic acid medicine technology.

1. Development of pulmonary arterial hypertension therapy (Exploring the potential of Staple oligomers as pharmaceuticals). The investigation targeting TRPC6 has yielded very promising insights. However, since Staple oligomers are currently expressed using adeno-associated virus, in this proposal, Staple oligomers were artificially modified and administered to mice. Furthermore, the pharmacokinetics and off-target effects of the designed artificially modified Staple oligomers were thoroughly investigated. The goal was to obtain sufficient knowledge by the end of the research grant period to advance to the stage of clinical trials.

2. Development of therapy for nutritional deficiency-type epidermolysis bullosa (Expanding the potential of Staple nucleic acids).

Nucleic acid medicines inducing exon skipping, exemplified by the Duchenne muscular dystrophy therapy drug eteplirsen, mainly exert their effects by modulating the splicing mechanism. The Ribosomal Shunting-induced Staple oligomers proposed by the applicants progress protein translation by grabbing unnecessary regions of mRNA. By including premature termination codons introduced by genetic mutations in the grabbed regions, attempts were made to develop therapies for diseases caused by Premature Termination Codons, which were previously difficult to treat. Compared to exon skipping, the deletion of amino acid regions is very small, thus a significant therapeutic effect can be expected.

Regarding the development of pulmonary arterial hypertension therapy, In this study, L-aTNA developed at Nagoya University Asanuma Laboratory was evaluated as a component of Staple oligomers. Originally, RNAh does not require cooperation with enzymes present in the body, and the artificial formation of RGq is induced by Staple oligomers binding to the target region. It is expected that even if all nucleic acids constituting Staple oligomers are converted to artificial nucleic acids, the effect will not diminish. Indeed, using various artificial nucleic acid type Staple oligomers such as L-aTNA, we successfully obtained results that were no different from when Staple oligomers were administered using AAV as expected. Furthermore, by converting all Staple oligomers to L-aTNA-type artificial nucleic acids, remarkable resistance to nucleases present in the body was significantly improved, resulting in successful confirmation of the presence of the nucleic acid medicine at a considerably low dose of 2 mg/kg, with a single administration continuing for 8 weeks in the heart, and further confirming the sustained efficacy.

Regarding the development of therapy for nutritional deficiency-type epidermolysis bullosa, When designing Staple oligomers that match COL7A1 in patients handled by Fukushima, it was revealed that amino acids from 2803rd to 2822nd would be omitted. Therefore, COL7A1 Δ 2803-2821 and COL7A1 Δ 2803-2822, which omit the surrounding region, were prepared. In Ribosomal Shunting using Staple oligomers, several tens of amino acids are missing in the target protein. Therefore, it is necessary to prove that the above COL7A1 Δ 2803-2821 and COL7A1 Δ 2803-2822 are functional type 7 collagen genes. By using the evaluation method established by Natsuka et al., it was confirmed that the partially deleted type 7 collagen maintained its function as expected.