

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

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 次世代血液脳関門通過性ヘテロ核酸の開発による脳神経細胞種特異的分子標的治療とブレインイメージング

(英語) Brain cell type specific molecular therapy and brain imaging by development of next generation blood-brain-barrier crossing DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide

研究開発実施期間: 令和元年10月1日から令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 横田 隆徳

(英語) Takanori Yokota

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 脳神経病態学分野 教授

(英語) Professor, Department of Neurology and Neurological Science, Tokyo Medical and Dental University

II 研究開発の概要

和文

現在、核酸医薬品はこれまでに 19 種類承認されており、今後も、神経・筋疾患・希少・難治性疾患に対して新たな治療法として開発が進むと考えられる。一方で承認された薬剤は標的が肝臓由来の代謝性または神経疾患、筋膜に異常のある筋疾患であり、神経疾患では髄腔内投与に限定される。今後、核酸医薬の適応を一般化させる上で、標的臓器および細胞への特異性を上げ、投与量を減少させ、安全性を向上させることが、急務である。実際、世界的な潮流は、ペプチドや抗体を結合させることにより、標的臓器や細胞特異的に遺伝子抑制を実現させるリガンド結合型核酸医薬品の開発である。これまでに我々は、1 本鎖 DNA であるアンチセンス核酸や 2 本鎖 RNA である siRNA とは基本分子構造が異なり、独自の細胞内の作用機構を有する第 3 の核酸医薬である DNA/RNA 2 本鎖ヘテロ核酸 (HD0) を創生した。HD0 は日本独自の基盤技術であり、その高い有効性から大学発バイオベンチャーのレナセラピューティクス社が設立された。HD0 の技術発展を目的とした AMED 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業の成果として、血液脳関門 (BBB) を通過して脳内の内因性遺伝子を制御できる技術の開発に成功した (Nat. Biotechnol. 掲載 AMED と共同でプレスリリース)。この BBB 通過性 HD0 は末梢投与による中枢神経制御を可能としたブレイクスルー技術として日米のリーディングの製薬企業にライセンスされて、複数の製薬企業との共同研究が開始された。一方で、欧米の企業から類似の特許が公開されるなど、HD0 の知財の優位性は予断を許さない状況にある。その為、本事業での知財戦略として周辺の知財補強に加え、徹底した分子/化学構造の高性能化とその権利化によって BBB 通過性 HD0 の基盤技術として特許基盤を確立する。さらに、一步先の次世代 BBB 通過性 HD0 として、細胞種に特異的な受容体を認識するセカンドリガンドを付加することによって特定の細胞種に特異的な遺伝子制御と脳分子イメージング技術を開発して、画像診断と治療を融合した Theranostics (therapeutics & diagnostics) の技術開発を行い企業導出することを目的として開始した。

研究開始時点で BBB 通過性ヘテロ核酸の脳内移行経路やメカニズムは明らかではなかった。まずは脳血管内皮について損傷がないかを、検討した。人工的に薬剤で脳血管内皮を損傷させた場合は、低分子デキストランの脳内移行は観察されたが、BBB 通過性ヘテロ核酸投与後には低分子デキストランの脳内移行は観察されず損傷はないことを、確認した。そこで画像的にメカニズムの解明を行った。はじめに FRET のシステムを使い、主鎖および相補鎖にそれぞれ蛍光を結合させて、その動態を観察した。BBB 通過性ヘテロ核酸において、主鎖と相補鎖の分離は脳血管内皮細胞と神経細胞で起こっていた。このことから、脳血管内皮細胞に入った後に、一部は乖離して、一部はそのまま二本鎖構造で脳内に移動して神経細胞内で乖離していると考えられる。また同じく画像解析では脳表から、髄液で gradient が観察された。脳表に濃く、深部にかけて薄くなっており、髄液からの移行のルートも考えられた。加えて脳内移行に関連する様々な分子について、そのノックアウトマウスや阻害抗体で有効性が変化するかを検証した。BBB 通過性ヘテロ核酸投与による有効性の低下はいずれのノックアウトマウスや阻害抗体でも観察されなかった。ただし一部の臓器ではカベオリン 1 や LDL 受容体が内在化に影響している可能性が考えられた。ヘテロ核酸は臓器により、移行メカニズムが違う可能性があり、脳内移行に関しては、他のメカニズム (分子) か、直接、脂質二重膜を通過している可能性も考えられた。またヘテロ核酸のタンパク結合性を検討している。脂質を結合させていないヘテロ核酸の場合は 1 本鎖核酸よりタンパク結合性が低下していた。また HPLC による解析では 1 本鎖核酸とヘテロ核酸で結合している蛋白の違いが明らかになった。1 本鎖核酸ではホスホロチオエート結合のタンパクへの結合性が強く、リガンドの結合性を阻害するが、ヘテロ核酸化することで、リガンド結合性が向上することが明らかとなった。BBB 通過性ヘテロ核酸の効

果の向上を図るために新たなリガンドの探索を行った。これまでのコレステロールと同様に脳内に移行する分子を見出し、新たに特許申請した。また核酸修飾の最適化により BBB 通過性ヘテロ核酸の効果の向上が観察された。これまでの脂質リガンドでは脳内投与で 1 本鎖核酸と比較して効果の向上は認めないが、新たなリガンドを結合させたヘテロ核酸を脳内投与することで 1 本鎖核酸と比較して効果の向上を認めるリガンドを見出した。このリガンドはヘテロ核酸のみで有効性の向上が見られ、1 本鎖核酸に結合した場合は効果の向上は見られなかった。髄腔内投与が現在は中枢神経疾患に対しては、顕著な急性毒性を防ぎ、安全性の向上に成功する改良を見出して特許出願した。また調整費で小比賀グループから供与を受けた新規核酸を利用することにより神経毒性を改善し、特許申請した。脳内の標的細胞特異的なリガンド作製・評価においては神経細胞・ミクログリアの脳内細胞腫に対する低分子やペプチドによる評価を 6 種類行った。受容体 X に対するリガンド Y において発現細胞全てで内在化が観測された。リガンド Y を結合させた HD0 においても脳内でのリガンド効果を確認している。また脳内での結合力を見るために Y 誘導体の標識剤の開発も進めた。加えて受容体 Z に対するリガンド W においても、細胞内での取り込みに加えて脳内でのリガンド効果を確認している。受容体 V に対するリガンド U の開発においては蛍光標識させた U のイメージング評価を推進した。加えてイメージングの応用では、同化合物をマウス脳室内および大槽内に投与し、脳を摘出後に透明化してライトシート顕微鏡で観察し、脳実質内における受容体 V への結合が示された。また受容体 V が減少するモデルマウスにおいても、その結合の減少が観察された。更にリガンド U の ^{11}C 標識体を作成し PET リガンドとしてマウス脳イメージングに応用したところ、前述したモデルマウスで対照マウスに比して脳の広い領域でプローブ保持減少が見出された。このリガンド U を結合させた HD0 でも脳内遺伝子抑制効果の向上を認めている。また BBB 通過性 HD0 の動態を観察した。BBB 通過性 HD0 に付与した錯体 (DOTA) へ、 ^{64}Cu (物理的半減期 13 時間) をキレートして放射性標識を行った。標識体を Wistar ラットに静脈内投与し、小動専用ポジトロン断層撮影 (PET) 装置を用いて、経時的な撮像を行ったが、脳実質内に移行した標識体の濃度は低く、脳周囲や血管内の濃度を下回ることが示された。次いで HD0 の脳内移行が抗体染色により確認されている C57BL/6J マウスで同様の評価を試みた。その結果、ラットと異なり脳室付近に比較的高い集積が見られたが、HD0 と AS0 で明確な違いが見出されなかった。この理由として、静注後の標識 HD0 は生体内で十分安定でなく、髄注などの投与方法が必要となることが考えられた。核酸が脳内でいかなる細胞に取り込まれるかを調べるため、蛍光標識核酸を脳室内および大槽内に投与し、一定時間後に脳を摘出して核酸の分布を調べたところ、大槽内投与では 4 時間後から、脳表に近い実質の神経細胞や血管周囲マクロファージへの核酸の取り込みが認められた。

これまでに我々は、ペプチドオリゴマーと BBB 通過性 HD0 を共投与することで、HD0 による出血性の副作用が軽減することを見出している。ペプチドオリゴマーは HD0 のような A 型 2 重らせんのメジャーグループにはまり込む分子設計となっており、インターヌクレオチド結合であるホスホロチオエート結合と静電相互作用し、タンパク質との結合を阻害することでこのような効果があったものと考えられる。そこで、このペプチドオリゴマーの長さについて検討を行った結果、BBB 通過性 HD0 の長さに応じて最適なペプチドオリゴマーの長さが存在することを見出し、出血性を示す APTT の延長や血小板の減少といった副作用を低減可能であることを示した。さらに、*in vivo* における実験の結果、脳細胞の壊死を完全に回避することも見出した。このように、ペプチドオリゴマーとの組み合わせによって BBB 通過性 HD0 の投与時の安全性を大きく向上させることに成功した。一方で、高用量で共投与した場合、凝集体を形成するという新たな問題を見出した。これは正電荷を有するペプチドオリゴマーが、負電荷を有する BBB 通過性 HD0 を架橋する形で凝集体を形成していると考えられる。そこで、このような凝集体を形成しないペプチドの検討を行った。側鎖の置

換基について検討を行ったところ、新たなペプチドオリゴマーの開発を行い、凝集体を抑制することは判明しており、現在最適化中である。ペプチドオリゴマーに標的へのデリバリーを促進するリガンドを導入する研究も開始した。

英文

At the start of the study, the brain penetration routes and mechanisms of blood-brain barrier (BBB)-permeable HDO were not clear. First, we examined whether there was any damage to the BBB. When the Brain vascular endothelium was artificially damaged with compound, the brain penetration of low molecular weight dextran was observed; however, after the administration of BBB-permeable HDO, the brain penetration of low molecular weight dextran was not observed, confirming no damage. We then elucidated the mechanism using imaging techniques. Initially, using a FRET system, we observed the dynamics by attaching fluorescence to the main strand and complementary strand, respectively. In BBB-permeable HDO, separation of the main strand and complementary strand occurred in brain vascular endothelium and neurons. It was speculated that after entering brain vascular endothelium, some dissociated, while others moved into the brain intact as double-stranded structures and then dissociated within neurons. Similarly, gradient was observed from the brain surface to the cerebrospinal fluid (CSF) in imaging analysis. It was thought that there might be a route of transition from the brain surface, suggesting a possible transition of BBB-HDO from the CSF. Additionally, various molecules related to brain penetration were investigated for changes in efficacy of BBB-HDO using knockout mice or inhibitory antibodies. Decreased efficacy of BBB-permeable HDO administration was not observed in any knockout mice or inhibitory antibodies tested. However, in some organs, caveolin-1 or LDL receptor was suggested to affect internalization of BBB-HDO. It was considered that the transition mechanism of HDO might differ depending on the organ, and for brain penetration, the possibility of other mechanisms (molecules) or direct passage through the lipid bilayer was also considered. Furthermore, protein binding of HDO was investigated. In the case of HDO without lipid binding, the protein binding capacity was lower than that of single-stranded nucleic acids (ASO). Additionally, analysis by HPLC revealed differences in the proteins bound between ASO and HDO. In ASO, binding to proteins with phosphorothioate bonds was strong, inhibiting ligand binding, but HDO showed an improvement in ligand binding affinity. To improve the effectiveness of BBB-permeable HDO, a search for new ligands was conducted. Molecules that cross into the brain similar to cholesterol were identified, and a new patent was applied for. Additionally, optimization of HDO modifications resulted in improved efficacy of BBB-permeable HDO. While previous lipid ligands did not improve efficacy compared to ASO when administered intracranially, a ligand newly attached to HDO improved efficacy compared to ASO when administered intracranially. This ligand showed improved effectiveness only when bound to HDO; no improvement was observed when bound to ASO. We successfully improved safety by finding modifications to avoid significant acute toxicity in central nervous system diseases by intrathecal administration and applied for a patent. Furthermore, by using newly provided nucleic acids from the Obika group, we improved

neurotoxicity and applied for a patent. In the production and evaluation of target cell-specific ligands in the brain, evaluations using low molecular weight or peptide-based ligands targeting neurons and microglia were conducted. Internalization was observed in all expressing cells for ligand Y against receptor X. The effect of the ligand Y was also confirmed in the brain when bound to HDO. Additionally, development of a labeling agent for Y derivatives was advanced to assess binding strength in the brain. Moreover, for ligand W against receptor Z, not only cellular uptake but also the effect in the brain was confirmed. In the development of ligand U against receptor V, imaging evaluation of fluorescently labeled U was promoted. Additionally, in imaging applications, mice were administered the same compounds intracranially and intraventricularly, brain tissues were cleared and observed using light sheet microscopy, demonstrating binding to receptor V within the brain parenchyma. Decreased binding was observed in model mice with reduced receptor V expression. Furthermore, a ^{11}C -labeled compound of ligand U was created and applied as a PET ligand for mouse brain imaging, revealing decreased probe retention in a wide area of the brain compared to control mice in the model mice mentioned earlier. This ligand U also showed improved gene suppression effects when bound to HDO in the brain. Additionally, the dynamics of BBB-permeable HDO were observed. Radioactive labeling was performed by chelating ^{64}Cu (physical half-life of 13 hours) to a complex (DOTA) attached to BBB-permeable HDO. After intravenous administration of the labeled compound to Wistar rats, time-course imaging was performed using a small animal-dedicated positron emission tomography device, showing low concentrations of the labeled compound in the brain parenchyma, below the concentrations in the brain periphery or blood vessels. Subsequently, similar evaluations were attempted in C57BL/6J mice, where HDO uptake was confirmed by antibody staining. Unlike rats, relatively high accumulation was observed near the brain ventricles, but no clear differences were found between HDO and ASO. It was considered that after intravenous administration, labeled HDO was not sufficiently stable in vivo, and administration methods such as intrathecal injection might be necessary. To examine which cells take up ASO in the brain, fluorescently labeled ASO were administered into the brain ventricles and subarachnoid space, and after a certain time, brain tissue was excised to examine the distribution of nucleic acids. After intraventricular administration, uptake of ASO by neuronal cells near the brain surface and macrophages around blood vessels was observed starting at 4 hours. We have discovered that co-administration of peptide oligomers with BBB-permeable HDO can mitigate hemorrhagic side effects caused by HDO administration. The peptide oligomer is designed to fit into the major groove of A-type double helixes like HDO, and it inhibits binding with proteins through internucleotide phosphorothioate bonds and electrostatic interactions. Thus, an optimal length of peptide oligomer was found depending on the length of BBB-permeable HDO, demonstrating the ability to reduce side effects such as prolongation of APTT and reduction of platelets. Furthermore, in in vivo experiments, complete avoidance of necrosis in brain cells was also found. In contrast, when co-administered at high doses, a new problem of forming aggregates was discovered. It is considered that positively charged peptide oligomers bridge negatively charged BBB-

permeable HDO to form aggregates. Therefore, investigation of peptides that do not form such aggregates was conducted. Substitution of side chain substituents led to the development of new peptide oligomers that suppress aggregate formation, currently under optimization. Research has also begun on introducing ligands into peptide oligomers to facilitate delivery to targets.