【報告様式Ａ】

課題管理番号: 23am0401007h0005　作成／更新日:令和　6 年　5 月　31 日

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）核酸医薬への応用を目指した非環状型人工核酸の開発
（英　語）Development of acyclic artificial nucleic acid for application to nucleic acid medicine

研究開発実施期間：令和元年 10 月 1 日～令和 6 年 3 月 31 日

研究開発代表者　氏名：（日本語）浅沼　浩之
（英　語）Hiroyuki Asanuma

研究開発代表者　所属機関・部署・役職：
（日本語）国立大学法人東海国立大学機構　名古屋大学・工学研究科・教授
（英　語）Tokai National Higher Education and Research System, Nagoya University, Graduate School of Engineering, Professor

Ⅱ 研究開発の概要

核酸医薬に使用されてきた従来の人工核酸は、リボース部に化学修飾を加えたものがほとんどであった。そのため構造が天然のヌクレオチドと類似していることに由来する様々な問題を抱えており、酵素耐性、安全性、合成展開性、機能拡張性を兼ね備えた新規人工核酸の開発が望まれていた。一方で代表者の浅沼らは、天然のリボースとは骨格構造が全く異なる非環状型人工核酸 SNA と L-aTNA を開発し、1) DNA や RNA と安定な二重鎖が形成可能、2)極めて高い酵素耐性、3)合成展開性、機能拡張性　を兼ね備えた、核酸医薬に資する新規人工核酸であることを明らかにした。本研究では、非環状型人工核酸に化学修飾を施してさらに機能を拡張し、Nek2, SGLT2, miR21、DMD exon skipping 等を標的とした核酸医薬開発を通じて、非環状型人工核酸を使用した核酸医薬設計のための基盤技術開発を目指した。

1)　非環状型人工核酸の機能拡張

RNA との親和性向上に向け、G-クランプ、人工塩基 2,6 ジアミノプリン（D）、2-チオウラシル(sU)の SNA・L-*a*TNA モノマーの合成に成功した（図１）。D と sU を組み合わせて SNA・L-*a*TNA に導入することで、SNA・

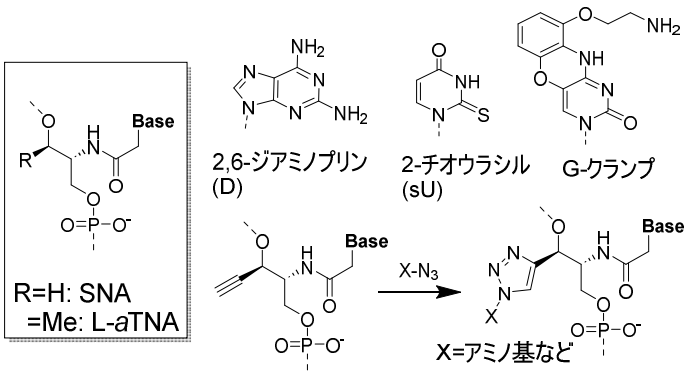

図１　代表者のグループが開発した、非環状型人工核酸 SNA・L-*a*TNA、人工塩基とアルキニル修飾主鎖

L-*a*TNA ホモ二重鎖形成を抑制し RNA との二重鎖形成を促進させることに成功した。また、L-*a*TNA の主鎖のメチル基をアルキニル基に置換した誘導体を合成し、RNA との親和性を損なうことなく様々な官能基修飾を可能にした。

X 線結晶構造解析を実施し、L-*a*TNA/RNA, SNA/RNA 二重鎖の立体構造を 1.70-1.75Å の分解能で決定し、らせんの一巻きが非常に長いユニークな構造であることを明らかにした。

２）Nek2 を標的とする siRNA 開発

分担者の國料が配列設計した Nek2 を標的とする siRNA（コントロール）に対して、代表者らのこれまでの知見に基づき guide 鎖の 5’末端以外を SNA あるいは L-*a*TNA で置換した修飾 siRNA を設計した。その結果、ヒト血清下において酵素分解耐性が顕著に向上することを明らかにした(図 2)。またノックアウト活性はコントロールと同等以上であり、passenger 鎖由来のオフターゲット活性は、コントロールよりも顕著に抑制された。カニクイザル腹腔内反復投与毒性試験を行い、最大耐量を明らかにした。また SNA-siRNA/LipoTrust および L-*a*TNA-siRNA/LipoTrust 混合液投与群において、カニクイザル腹腔内反復投与毒性試験での切除標本の病理組織学的検査を行った結果、肺胞構造、間質および肺胞壁への炎症細胞の浸潤、線維化、壊死およびうっ血、また、維芽細胞の増生といった炎症を示唆する所見について、いずれも認められなかった。肝臓・腎臓・精巣においても、病理組織学的検査における異常は認められなかった。

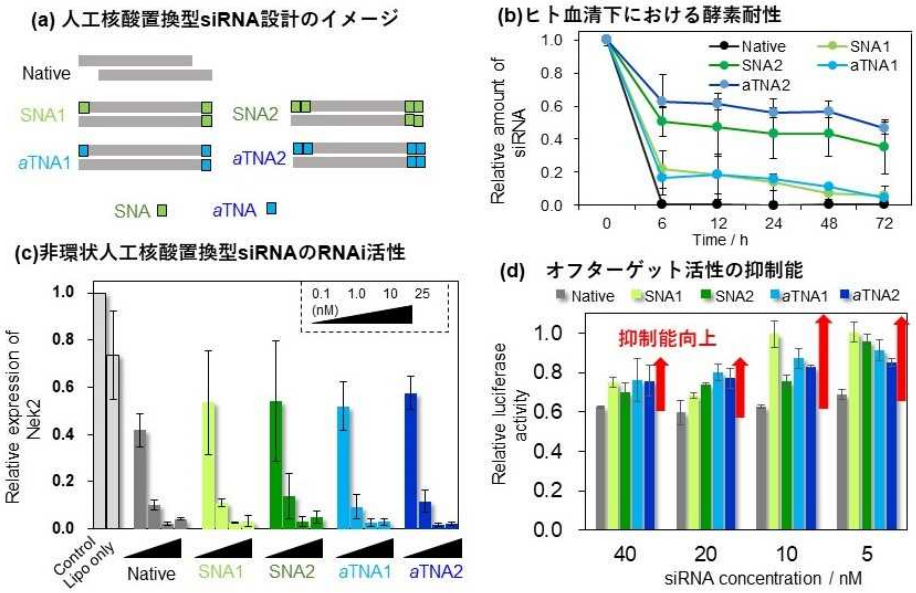

図２ 非環状型人工核酸置換型 Nek2-siRNA の設計

３）SGLT2 を標的とする Gapmer 型 ASO 開発

2’-MOE が wing 領域に導入された、SGLT2 を標的とした Gapmer ASO の設計に基づき、2’-MOE の代わりに SNA を導入した SGLT2-ASO を設計した。その結果、Wing 領域の SNA の導入数を 1 残基ずつとした SNA-ASO において、2’-MOE を使用した ASO と遜色のない活性を示すことが分かった。また SNA-ASO は、投与後 2 週間後でも SGLT2 の抑制率が 50%以上の高いアンチセンス活性を維持していた。さらに一般安全性試験を実施した。マウスに SGLT2-ASO を 10mg/kg、 週 3 日、3 週間投与し解析した結果、2’-MOE 導入型よりも非環状型人工核酸導入型において、肝毒性の指標となる AST、ALT、ALP の値が低く、非環状型人工核酸を用いることにより肝機能障害の抑制が実現できることを見出した。

４）Anti-miR21 の開発

miR21 はガン細胞中で過剰発現しており、がん抑制遺伝子を阻害することが知られている。したがって miR21 を標的とした anti-microRNA oligonucleotide(AMO)は、ガン細胞増殖抑制が期待できる。miR21 は、配列内部に自己相補部位が存在するため、対応する AMO は、必然的に自己相補部位を持つことになる（図 3 上：青で囲った部位）。SNA と L-*a*TNA は、安定なホモ二重鎖を形成しやすいため、SNA で設計した AMO は miR21 との二重鎖形成よりも AMO 同士が二重鎖形成してしまう。これを避けるため、1.で設計した擬似塩基対 D と sU を SNA-AMO 中のアデニン及びチミンの代わりに導入することで、AMO 同士のホモ二重鎖

形成を回避しつつ RNA に対する親和性の向上を狙った。その結果 AMO 活性が飛躍的に向上し、これまで世界最高活性の tiny-LNA を凌駕する高活性化を実現できた。骨格を SNA から L-*a*TNA に変えることで更なる高活性化も実現した。この結果を受けて担癌マウスにリン酸ジエステル結合をチオ化(PS 化)した AMO-21（SNA）を投与した結果、腫瘍増殖が抑制された。

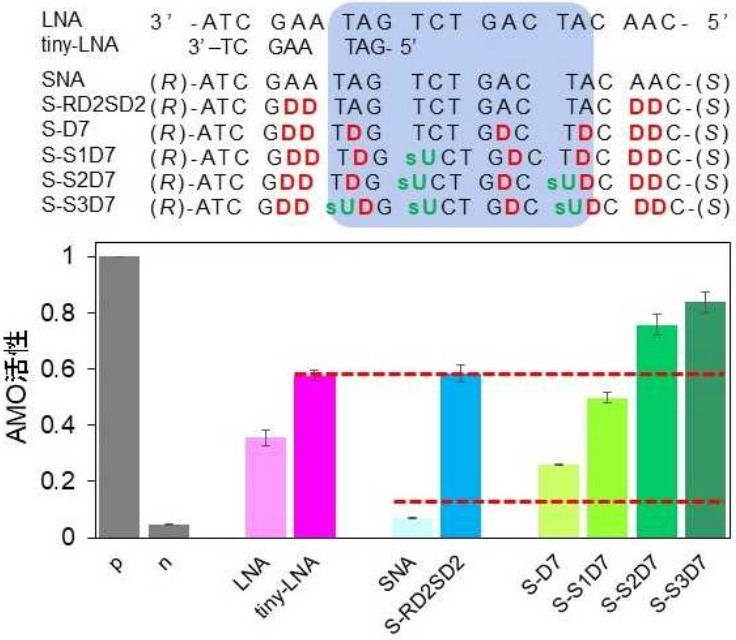

図 3　D-sU 対導入 SNA-AMO の開発

常染色体顕性多発性嚢胞腎(ADPKD)は、腎臓内に嚢胞ができ、それが増大する最も頻度の高い遺伝性の嚢胞性腎疾患であり、そのまま放置すると維持透析が必要となる。分担者の加藤は、1) ADPKD で miR21 が多く発現していること、2)アルポート症候群マウスに Anti-miR21 投与で腎機能が保持されたという報告（*J. Cln. Invest.* **2015**, *125*(1), 141） に着目し、PS 化 Anti-miR21（SNA）を 10 mg/kg 3 回/週の頻度で 6 週間皮下注射で投与したところ、顕著な嚢胞抑制が観察された。蛍光色素標識したオリゴによる腎臓への高い集積、従来の LNA を凌駕する顕著な miR21 の抑制が確認され、腎臓における高い抗 miR21 に基づくものと結論づけた。また Anti-miR21 投与の際、PS 化に伴う腎毒性と肝毒性は全く認められず、むしろ腎機能の回復が見られた。

５）DMD-exon skipping ASO の開発

ジストロフィン遺伝子の Exon53 のスキップを可能にする核酸医薬 viltolarsen および golodirsen の設計に基づき、SNA あるいは L-*a*TNA のみからなるエキソンスキップ型アンチセンス核酸を調製した。これらのアンチセンス核酸のエキソンスキッピングを誘導する活性を in vitro で評価したところ、SNA および L-*a*TNA からなるアンチセンス核酸は共に、エキソンスキップ活性を示した。さらに RNA-U に対して三本の水素結合を形成する人工塩基 2,6-diaminopurine をアンチセンス核酸へ導入し PS 化した SNA および L-aTNA は、PMO で構成されている核酸医薬 viltolarsen および golodirsen よりも、同等以上のエキソンスキッピング活性を持つことが判明した。

Overview of research and development

In this project, we chemically modify acyclic artificial nucleic acids SNA and L-*a*TNA which we have developed, to further expand their functions, and develop nucleic acid drugs that target Nek2, SGLT2, miR21, DMD exon skipping, and so on.

1) Functional expansion of SNA and L-*a*TNA

To improve affinity with RNA, we synthesized SNA/L-*a*TNA monomers involving artificial nucleobases, G-clamp, 2,6-diaminopurine (D), and 2-thiouracil (sU). By introducing D and sU into SNA/L-*a*TNA simultaneously, we succeeded in suppressing SNA(L-*a*TNA) homoduplex formation and promoting duplex formation with RNA. X-ray crystal structure analysis revealed that L-*a*TNA/RNA and SNA/RNA duplexes have a unique structure with a very long helical turn.

2) siRNA targeting Nek2

For designing siRNA targeting Nek2, terminal nucleotides other than the 5'-end of the guide strand were replaced with SNA or L-*a*TNA. As a result, resistance to enzymatic degradation was significantly improved under human serum. Furthermore, the knockout activity was equal to or higher than that of the control, and the off-target activity derived from the passenger chain was suppressed more markedly than the control. We also administered modified siRNA to cynomolgus monkeys, but abnormalities were not observed.

3) Gapmer ASO targeting SGLT2

We designed gapmer SGLT2-ASO, in which SNA or 2'-MOE is introduced at both wing regions. SNA-ASO showed comparable activity to 2'-MOE-ASO. Furthermore, SNA-ASO maintained high antisense activity with an SGLT2 inhibition rate of over 50% even 2 weeks after administration. Blood test revealed that the values of AST, ALT, and ALP, which are indicators of hepatotoxicity, were lower in the SNA-ASO than in the 2'-MOE-ASO.

4) Anti-miR21

Anti-microRNA oligonucleotide (AMO) targeting miR21 is designed to suppress cancer cell proliferation. Since miR21 has a self-complementary site within its sequence, the corresponding AMO will inevitably have a self-complementary site. Since SNA and L-*a*TNA tend to form stable homoduplexes, AMOs designed with SNA form duplexes with each other rather than with miR21. To avoid this, by introducing the pseudo base pair D and sU in place of adenine and thymine in SNA-AMO, the affinity for RNA can be improved while avoiding homoduplex formation between AMOs. As a result, AMO activity was dramatically improved, and we were able to achieve a high level of activation that surpassed that of tiny-LNA, which had the highest activity. Even higher activation was achieved by changing the backbone from SNA to L-*a*TNA. Based on these results, phosphorothiolated AMO (SNA) was administered to tumor-bearing mice, and was successfully suppressed tumor growth.

Autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) is the most common hereditary cystic kidney disease in which cysts form and grow within the kidneys. Since miR21 is overexpressed in ADPKD, we administered above anti-miR21 AMO (PS-SNA) to pcy mouse. As a result, significant cyst suppression was observed. Furthermore, when anti-miR21 was administered, no nephrotoxicity or hepatotoxicity was observed; rather, recovery of renal function was observed.

5) DMD-exon skipping ASO

Based on the design of nucleic acid drugs viltolarsen and golodirsen, which enable skipping of Exon 53 of the dystrophin gene, we prepared exon-skipping antisense nucleic acids consisting only of SNA or L-*a*TNA. Both ASO consisting of SNA and L-*a*TNA showed exon skipping activity. Introduction of 2,6-diaminopurine into phosphorothiolated SNA and L-*a*TNA further increased exon skipping efficiency, which was equivalent to or higher than those of PMO-based nucleic acid drugs viltolarsen and golodirsen.