

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) 細胞質に直接導入できる膜透過性オリゴ核酸分子の開発
(英語) Development of membrane-permeable oligonucleotide for direct delivery to cytoplasm

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) 阿部 洋
(英語) Hiroshi Abe

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 大学院理学研究科
(英語) Graduate School of Science, Naoya University

II 研究開発の概要

アンチセンス法やRNA干渉を利用した核酸医薬の開発が進んでいる。しかしながら、核酸医薬にはオリゴ核酸分子がそのままでは細胞内に入らないという問題がある。そのため、核酸分子を細胞内に導入するために様々な方法が開発されてきた。最も汎用されている手法は、リピッドナノパーティクル(LNP)の一種であるカチオン性リポソームである。カチオン性リポソームと負電荷を有するオリゴ核酸分子を混ぜると複合体を形成し、オリゴ核酸は細胞内にエンドサイトーシスにより導入される。しかしながら、リポソームには以下のような問題があげられる。①エンドサイトーシスによる取り込みでは、オリゴ核酸分子はエンドソームに取り込まれ、そこから脱出する効率は低く、細胞質の標的 mRNA に到達するのに4時間以上かかる。②核酸分子に対して、5倍から10倍量のリポソーム材料を必要とする。③複合体であるため分子量が決まっていない。④正電荷による細胞毒性が起こる。特に、①はほとんどすべての核酸分子導入法で問題となり、エンドソームに長時間とどまることで核酸分子は分解されることになる。他の方法として、核酸分子に対して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も存在する。例えば、糖鎖誘導体であるGalNAcリガンドがあげられる。しかしながら、この手法でも受容体介在エンドサイトーシスを経て取り込まれることから、エンドソームから脱出できず、細胞質移行率0.01%程度と極めて低い。以上のように、既存の核酸分子導入技術は、エンドソームへの取り込みを回避できず、細胞質への導入効率が悪い。

この問題を解決するために、我々は「エンドソームを介さず直接細胞質内へオリゴ核酸を導入できる方法」を発明し、オリゴ核酸デリバリーに革新をもたらす研究開発を進めてきた(PCT/JP2018/030549, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2019**, 58, 6611.). これまでに、我々はオリゴ核酸の末端にジスルフィドのリピート5個を導入したアンチセンス DNA あるいは siRNA を合成した。ジスルフィドユニットを導入したオリゴ核酸を MPON (membrane permeable oligonnucleotide)、ジスルフィドユニットを用いた細胞内導入法をジスルフィド法と呼ぶこととする。蛍光標識した核酸の細胞内取り込みを蛍光顕微鏡で解析したところ、リポソームで導入した核酸はエンドソームに局在し顆粒状になっているのに対して、MPON は 10 分後すでにエンドソーム内には存在せず、細胞質移行率 95% で細胞質内に分布していた。我々はオリゴ核酸のデリバリーにおいて新規な細胞内導入経路を見つけたと考えている。MPON の細胞内取り込みの分子メカニズムの解明や、活性・取り込み効率の一層の向上、in vivo 応用における既存法に対する優位性の明確化が、本ジスルフィド法の医薬応用に向けて重要な研究課題である。

本研究では、開発してきたジスルフィド法を核酸医薬のためのプラットフォーム技術 MPON として優位性を証明することを第一の目標とする。特に、取り込み経路や効率などの分子メカニズムを明らかにしてその独自性による他技術に対する優位性を明確にし、企業導出を図る。

項目① MPON の分子構造最適化 項目② MPON の細胞取り込みメカニズムの解明
項目③ MPON の大量合成法の確立 項目④ 動物実験における評価

①:MPON の分子構造最適化

化合物 X をジスルフィドユニットとして導入したホスホロアミダイトを用いて、各種 MPON 誘導体を合成し、それらの細胞内取り込み効率および遺伝子ノックダウン効率の評価を行った。また MPON の 5' 末端にはアミダイトケミストリーを用いて、各種直鎖アルキル基を導入し、適度な脂溶性向上に伴う影響の評価を合わせて行った。その結果、アルキル基と環状ジスルフィドによる相乗効果が観測され、かつ、第一世代 MPON と比較しジスルフィドユニットのリピート数を減じても、その取り込み効率・活性が上回る結果が得られた。また第二世代 MPON の新規合成法を開発し、ジスルフィドユニットのリピート数を増やした第二世代 MPON を合成し、種々の化合物 X 修飾のアンチセンス核酸のノックダウン効果の評価を行った。その結果導入する化合物 X 数に応じたノックダウン活性の増強、無細胞毒性を確認した。さらに新たな分子デザインとして化合物 X を多分岐配置した誘導体を開発し、この構造においても膜透過性の増強、ノックダウン活性、免疫応答が無いことを確認し、今後の最適化における有用な分子設計指針を明らかにできた。

②：細胞質への直接取り込みメカニズムの解明

MPON の取り込みを促進する責任タンパク質を同定するために、ビオチン標識した MPON を合成した。この MPON プローブを細胞に作用させ、責任タンパク質のプルダウンを行った。得られたタンパク質について、LC/MS/MS 解析を行った。ジスルフィドユニット非導入のコントロールプローブとの比較において、MPON プローブ特異的に回収されるタンパク質を見出した。また回収されたタンパク質について、細胞内分布やシステイン残基の有無・分布などの観点から絞り込みを進め、想定する細胞内取り込みメカニズムに合致する複数の膜タンパク質の同定に成功した。その中で血液脳関門通過に関与することが知られているタンパク質 A が見いだされたことは特筆すべき点であり、中枢系デリバリーへの展開も見込まれる。

③：MPON の大量合成法の確立

第一世代ジスルフィドユニットのホスホロアミダイトの合成ルートの最適化を行い、最終的に 10g スケールでのホスホロアミダイト体の安定供給法の確立に成功し、A 社への受託合成も完了した。大量合成法が

確立した第一世代ジスルフィドユニットのホスホロアミダイト体を用いて、各種動物実験に用いる MPON の供給も達成した。第二世代は化合物 X を代表とする環状ジスルフィドをベースとしたジスルフィドユニットの開発を進めてきた。当初は環状ジスルフィドを含むホスホロアミダイトの合成ルートの開発を進めた。実際に大量安定供給が可能な合成ルートの確立に成功したものの、オリゴ合成時にジスルフィドユニットがダメージを受け、MPON の合成収率が大幅に低下することが見いだされた。この結果を踏まえ、アミノ基をリピートで有するオリゴ核酸を合成し、そちらに対し化合物 X のスクシンイミドエステルを反応させるポスト修飾法の検討を行った。修飾反応の最適化を行い、最終的に従来合成法を数倍上回る収率で、目的の第 2 世代 MPON の合成に成功した。

④：動物実験における評価

第一世代 MPON について、マウスでの遺伝子ノックダウン効果と脳内への分布評価を行った。遺伝子ノックダウン効果の評価では、肝臓で発現される血液凝固系関連因子 Factor VII を標的としたアンチセンス核酸、siRNA の MPON を評価した。その結果両モダリティにおいて、ジスルフィドユニット導入により数倍ものサイレンシング効果を確認できた。また脳内分布評価においては、ジスルフィドユニット導入によるアンチセンス核酸の有意な細胞内取り込み・分布特性の向上を確認した。

また化合物 X ユニットと脂肪鎖 Y を 1 つずつ導入した蛍光修飾アンチセンス核酸について、マウスへの尾静脈投与の評価を行い、非修飾のアンチセンス核酸と比べて肝臓、血液系細胞への取り込みが、それぞれ数倍向上することを確認した。

The development of nucleic acid drugs using antisense methods and RNA interference is progressing. However, nucleic acid drugs face the challenge that oligonucleotide molecules cannot enter cells directly. Various methods have been developed to introduce nucleic acid molecules into cells. The most widely used method is cationic liposomes, a type of lipid nanoparticle (LNP). Mixing cationic liposomes with negatively charged oligonucleotide molecules forms complexes that are introduced into cells via endocytosis. However, liposomes present several problems: 1) Oligonucleotide molecules are taken into endosomes through endocytosis and have a low efficiency of escaping, taking more than four hours to reach the target mRNA in the cytoplasm. 2) A 5 to 10 times greater amount of liposome material is required relative to the nucleic acid molecules. 3) The complex has an undefined molecular weight. 4) Positive charges can cause cytotoxicity.

To solve these problems, we have invented a method that allows direct introduction of oligonucleotides into the cytoplasm without going through endosomes, bringing innovation to oligonucleotide delivery research and development (Angew. Chem. Int. Ed. 2019, 58, 6611.). We believe we have discovered a novel intracellular introduction pathway for oligonucleotide delivery. Elucidating the molecular mechanism of MPON uptake, further enhancing its activity and uptake efficiency, and clarifying its advantages over existing methods in in vivo applications are important research tasks for the medical application of this disulfide method.

This study aims to demonstrate the superiority of the developed disulfide method as a platform technology MPON for nucleic acid drugs. In particular, we will clarify the molecular mechanisms of uptake pathways and efficiency to establish its uniqueness and advantages over other technologies, aiming for the corporate spin-off.

- | | |
|--|---|
| 1: Optimization of MPON molecular structure | 2: Elucidation of the cellular uptake mechanism of MPON |
| 3: Establishment of a mass synthesis method for MPON | 4: Evaluation in animal experiments |

1: Optimization of MPON Molecular Structure

We synthesized various MPON derivatives using phosphoramidite with disulfide units and evaluated their cellular uptake and gene knockdown efficiencies. We enhanced lipophilicity by introducing straight-chain alkyl groups at the MPON's 5'

end, observing a synergistic effect with cyclic disulfides that improved performance even with fewer disulfide repeats than the first generation. We also created second generation MPON with increased disulfide repeats, showing increased knockdown activity and non-cytotoxicity. Additionally, we developed multi-branched derivatives of compound X, enhancing membrane permeability and knockdown effectiveness.

2: Elucidation of Direct Cytoplasmic Uptake Mechanism

We synthesized biotin-labeled MPON and identified proteins enhancing MPON uptake through pulldown and LC/MS/MS analysis. By examining the cellular distribution and cysteine presence, we identified several membrane proteins fitting our uptake mechanism, including a significant protein involved in crossing the blood-brain barrier, suggesting potential for central system delivery.

3: Establishment of Mass Synthesis Method for MPON

We optimized the synthesis route for first-generation disulfide phosphoramidites, establishing a stable large-scale supply. Despite initial challenges with disulfide integrity during synthesis, we improved the yield by developing a post-modification method with compound X's succinimidyl ester, significantly enhancing production efficiency.

4: Evaluation in Animal Experiments

We tested the first generation MPON in mice, targeting liver-expressed Factor VII. The introduction of disulfide units significantly enhanced the gene silencing effect. We also confirmed improved intracellular uptake and distribution in the brain. Our tail vein injection evaluation showed a substantial increase in uptake into liver and blood cells compared to unmodified nucleic acids.