

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：ブランチポイントを標的としたエクソンスキップ型アンチセンスオリゴ核酸の新規設計法とその *in vivo* 有効性検証法の開発

Development of a novel method for designing exon-skipping antisense oligonucleotides by targeting branch points and their *in vivo* validation method

研究開発実施期間：令和 5 年 4 月 15 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：栗屋 智就
Tomonari Awaya

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
国立大学法人京都大学 大学院医学研究科 准教授
Kyoto University, Graduate School of Medicine, Associate Professor

II 研究開発の概要

本研究開発では、ブランチポイント (branchpoint: BP) を標的とする新規アンチセンスオリゴ核酸 (BP-AON) 設計法を確立し、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) の責任遺伝子である *DMD* 遺伝子を対象とした概念実証により、同一実験系において既存エクソンスキップ薬の配列を上回るエクソンスキップ効率を示す複数の有望なシーズ配列を同定した。さらに、患者細胞を用いることで、当該手法の有効性を検証し、エクソンスキップ創薬における合理的な配列設計とその評価手法を構築し、一貫した基盤技術としての有用性を示した。

本研究の独自性は、従来のエクソン配列やスプライシング調節配列 (ESE/ESS など) を標的とする設計概念とは異なり、スプライソソーム形成に必須であるブランチポイント (BP) を直接標的とする点にある。従来の AON 設計では、標的エクソンごとにスプライシング制御配列を探索し、複数の候補配列を経験的に比較する必要があり、迅速かつ汎用的な配列設計には限界があった。これに対し、BP はスプライシング反応の成立に不可欠な構造的制御点であり、これを標的とすることで、より合理的かつ再現性の高いエクソンスキップ誘導が可能になると考えた。本研究は、この BP 標的化という設計概念を、疾患関連遺伝子の構成的エクソンおよび偽エクソン生成型変異の双方に適用し、その有効性と限界を検証したものである。

研究開発項目 1 では、構成的エクソンに対する BP-AON 設計法の有用性を検証するため、*DMD* 遺伝子の構成的エクソンのうち、中間部に存在し治療標的となり得る 51 個の標的エクソンに対して BP-AON を設計・合成し、培養細胞を用いて薬効評価を行った。まず、独自の配列設計ツールを用いて 51 個の標的エクソンについて各 1 配列の BP-AON を設計し、2'-O-Methyl + Phosphorothioate (2'-OMe+PS) 修飾 RNA として合成した。これらをヒト横紋筋肉腫由来細胞株である RD 細胞にリポフェクション法で投与し、mRNA における標的エクソンのスキップ効率を評価した。また、市販のエクソン 53 スキップ薬である viltolarsen の 25-mer 配列を陽性対照として用い、同様の 2'-OMe+PS 修飾 RNA として合成した。

研究代表者らの先行研究では、同じく遺伝性筋疾患である福山型先天性筋ジストロフィーの患者由来筋芽細胞において、2'-OMe+PS 修飾 RNA によりエクソンスキップが高効率に達成されることを示していた。しかし、本研究で用いた RD 細胞系では、陽性対照である viltolarsen 配列の 2'-OMe+PS 修飾 RNA が十分なエクソンスキップ効果を示さなかった。このため、DMD に対する既承認エクソンスキップ薬で使用されている Phosphorodiamidate Morpholino Oligomer (PMO) を用いた再評価へと実験系を変更した。PMO による再評価では、特に治療上の有用性が高いと考えられる、リーディングフレームを調整するための 3 の倍数でない塩基数を持つ 22 個のエクソン、および 2'-OMe+PS 修飾でわずかに効果が認められた 3 の倍数の塩基数を持つ 2 個のエクソンを標的とする BP-AON を合成した。

これらの PMO を RD 細胞に電気穿孔法で導入し、mRNA における標的エクソンのスキップ効率を検討した。アガロースゲル電気泳動後に二本鎖核酸を可視化したゲルイメージを用い、レーン全体のバンド強度に占めるエクソンスキップバンド強度の比率として半定量したものを比較したところ、陽性対照である viltolarsen 配列では約 41.5%のエクソンスキップ率を示した。実験を行った 24 種類の BP-AON のうち 9 種が、この viltolarsen 配列のエクソンスキップ効率を上回り、BP 標的化による合理的な AON 設計が、DMD 遺伝子の構成的エクソンに対しても有効であることを示した。

研究開発項目 2 では、*in vitro*における BP-AON の薬効評価系を構築し、項目 1 で同定された有望シーズのうち、市販のエクソンスキップ薬（エクソン 51, 45, 53 スキップ）が存在せず、かつ治療対象となる患者数が比較的多いと考えられるエクソンを標的とした BP-AON を用いて検証を進めた。まず、*in vitro*での薬効評価のため、線維芽細胞に転写因子 MYOD1 を doxycycline 誘導性に発現させる古典的な誘導筋芽細胞モデルを用い、骨格筋ミオシン（MYH2）を高発現する骨格筋細胞へ分化誘導する系を確立した。この誘導筋芽細胞においてジストロフィンがタンパク質レベルで発現することを確認したうえで、当該エクソンスキップが有効と考えられるエクソン欠失を有する患者由来線維芽細胞を用いて、疾患モデル誘導筋芽細胞を作成した。

この DMD 患者由来誘導筋芽細胞に対して、膜透過性カチオン性ペプチド Endoport とともに PMO を培地中に添加し、mRNA およびタンパク質レベルでジストロフィンの変化を検証した。その結果、BP-AON 処理により、濃度依存性に mRNA における当該エクソンのスキップが誘導されるとともに、フレームが回復した短縮型ジストロフィンタンパク質の発現が観察された。これにより、当該 BP-AON は患者細胞レベルで mRNA から効率的に標的エクソンを除去し、翻訳可能な短縮型ジストロフィンの発現を誘導することが示された。この成果は、BP-AON が単にスプライシングパターンを変化させるだけでなく、疾患関連タンパク質の回復につながることを示す重要な薬効データである。

研究開発項目 3 では、BP-AON 設計法の応用範囲を構成的エクソンから偽エクソン生成型変異へと拡張することを目的として、筋疾患患者レポジトリのゲノムデータを再解析した。深部イントロンを中心とする非コード領域の疾患原性変異探索には、現在も標準化された方法が十分に確立されていない。そこで本研究では、研究代表者らが開発した偽エクソン生成型変異候補バリエーション抽出プログラムなどを複合的に運用し、全ゲノムシーケンスデータから疾患原性の偽エクソン生成型変異を抽出することを試みた。

NCNP 筋疾患レポジトリの全ゲノムシーケンスデータ 11 例を再解析した結果、3 例で病原性バリエーションを特定した。本研究開発課題開始前より進めていた解析とあわせると、偽エクソン生成型変異を有する患者は 4 遺伝子 10 例となった。このうち、線維芽細胞を有する DMD 患者 4 例について、転写因子 MYOD1 を用いた誘導筋芽細胞の作成を試み、3 例で有効な細胞株を得た。これにより、ゲノム診断により同定した非コード領域変異について、患者由来細胞を用いてスプライシング異常および BP-AON による修復可能性を評価する実験基盤を構築した。

また、BP-AON 設計法をより広く応用可能な技術へと発展させるため、*in vitro*薬効評価の結果を踏まえ、BP-AON によるエクソンスキップ誘導の成否に関与する特徴量の抽出を行った。具体的には、配列特性、標的 BP の位

置・強度、3' スプライス部位からの距離、BP 候補の冗長性などの因子について解析した。一部のエクソンについては、ミニジーンアッセイおよび内因性 BP 探索を実施し、BP-AON の作用機序を検証した。その結果、BP-AON が無効であった一部のエクソンでは、標的とした BP とは異なる位置に存在する代替 BP の利用が相対的に亢進している可能性が示唆された。この結果は、BP-AON の成否が単一の標的 BP の有無のみでは決まらず、周辺のスプライシング制御環境や代替 BP の利用可能性によって規定されることを示している。

以上の成果により、本研究で確立した BP-AON 設計法は、*DMD* 遺伝子を対象とした概念実証を通じて、構成的エクソンに対しても有効なエクソンスkip誘導戦略となり得ることが示された。また、患者由来細胞を用いた誘導筋芽細胞モデルを用いた評価により、mRNA レベルのスプライシング修正からタンパク質レベルの機能回復に至る一連の評価系を構築した。加えて、偽エクソン生成型変異に対するゲノム診断から BP-AON 設計・薬効評価への接続可能性を示したことで、診断と治療開発を連結する個別化核酸医療の基盤技術としての展開可能性が示された。

本研究で得られた知見は、従来のエクソンスkip創薬における設計上の制約を克服するだけでなく、非コード領域変異や希少疾患に対する迅速な治療法開発にも応用可能である。特に、偽エクソン生成型変異に対しては、原因変異の同定後に、異常に挿入された配列を標的として除去するという明確な治療戦略を立てることが可能であり、BP-AON 設計法はこのような N-of-1 治療や個別化医療に適した技術である。

今後は、本研究で同定した有望シーズ配列について、薬剤送達技術や新規修飾核酸技術との統合を進め、より高い有効性と臓器送達性を有する核酸医薬候補へと発展させる。また、BP-AON の有効性を事前に予測するための解析基盤を高度化し、ゲノム情報から治療候補配列の設計・検証へと迅速に移行できるプラットフォームの構築を目指す。これにより、遺伝性疾患に対する核酸医薬開発を加速し、将来的には個別化医療や N-of-1 治療を含む次世代創薬基盤としての社会実装を推進する。

This research project aimed to establish a novel antisense oligonucleotide design strategy targeting the splicing branchpoint (BP-AON) as a platform for exon-skipping drug discovery. Using the *DMD* gene, the causative gene for Duchenne muscular dystrophy, as a model, we demonstrated that BP-targeted oligonucleotides can induce exon skipping in constitutive exons and identified multiple candidate sequences with promising activity. Patient-derived cellular models were used to evaluate the approach, supporting its potential as an integrated platform for rational design and preclinical evaluation.

Unlike conventional antisense oligonucleotide strategies that target splicing regulatory elements such as ESEs and ESSs, this approach directly targets the splicing branchpoint (BP), an essential *cis*-element for spliceosome assembly. Because conventional design often requires empirical screening of many candidate sequences, BP targeting provides a more rational and potentially broadly applicable strategy for inducing exon skipping.

In cultured cells, BP-AONs designed against therapeutically relevant regions of the *DMD* gene showed exon-skipping activity, and several candidates exceeded the activity of a benchmark sequence derived from an approved exon-skipping drug under the same experimental conditions. The identified lead sequences are being considered for further development, and a patent application has been filed to protect these findings. In patient-derived induced myogenic cells, BP-AON treatment induced the intended exon-skipping event and restored expression of a shortened dystrophin protein, indicating that the approach can lead to functional protein recovery.

We also explored the applicability of BP-AONs to pseudoexon-generating variants identified from genome sequencing data in muscle disease patients. This workflow links genomic diagnosis to therapeutic oligonucleotide design and may serve as a basis for individualized or N-of-1 nucleic acid therapies. Mechanistic analyses further suggested that BP-AON efficacy is influenced not only by the targeted BP but also by surrounding splicing architecture, including alternative BP usage.

Overall, this project established BP-AON design as a promising strategy for exon-skipping drug discovery. Future work will focus on improving delivery, optimizing oligonucleotide chemistry, and developing predictive models for BP-AON efficacy, with the goal of accelerating the development of nucleic acid therapeutics for genetic diseases.