

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：画期的なアンチセンス核酸創薬のための新技術に関する研究

Study of novel technology for drug discovery of antisense oligonucleotides

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：星野 秀和

Hidekazu Hoshino

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 創薬デザイン研究センター 人工核酸スクリーニングプロジェクト サブプロジェクトリーダー

National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBN), Center for Drug Design Research Laboratory of XNA Screening and Design, Subproject Leader

II 研究開発の概要

(1) 研究開発の背景

現在、世界的に核酸医薬の開発が急速に進んできている状況にある。国内でも核酸医薬の規制整備が進んでおり、2019年～2025年まで7年連続で核酸医薬の国内での承認が下りている状況にある。2020年には Viltolarsen（日本新薬）が薬事承認されるなど核酸医薬開発の機運が高まってきている。核酸医薬の中でもアンチセンス核酸（ASO）は最多の14品目が承認されており、創薬研究が進められている。Gapmer型のASO（図1）は標的のmRNAに対して特異的に結合し、RNaseHと呼ばれるヌクレアーゼによるmRNAの切断を誘導することで

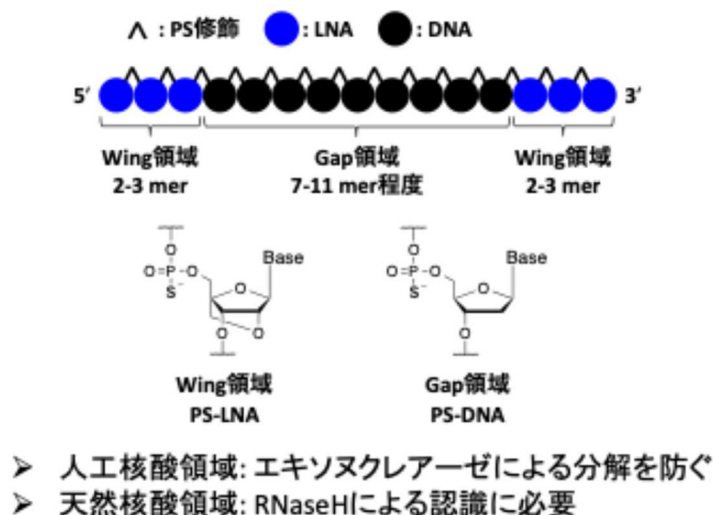


図1 Gapmer型ASOの構造

薬効を発揮する。標的さえ適切なものを選択できれば、ASO の配列を迅速にデザインすることが可能である。しかし、裏を返せば標的の探索が律速であり、将来的な標的の枯渇が懸念される。本研究では効率的に ASO を合成する手法を開発することで、ASO 創薬の迅速化・効率化を目指すものである。

(2) 研究成果

令和 5 年度

研究開発代表者はギャップマー型 ASO の効率的な合成手法の開発に取り組んだ。オリゴマーである ASO の合成を達成するために、まず初めに複数種類のモノマーについて合成を実施した。合成したモノマーについては、NMR および LC-MS にて目的の分子であることを確認した。続いて合成したモノマーを用いて ASO の合成反応の検討を行なった。その結果、目的通り ASO 配列を合成することに成功した。合成した ASO は LC-MS にて目的の配列であることを確認することができた。合成した ASO は Cell free での RNA 切断評価に用いた。その結果、RNaseH と ASO を用いた RNA 切断活性に問題は見られなかった。また、本研究で開発した ASO 合成法を用いることで、複数の配列の並列処理が可能だった。また、固相上から ASO の切り出しについて検討を行った結果、問題なく実行可能であった。以上のように、ASO の合成方法について新規手法を開発することに成功した。

令和 6 年度

新規合成手法で作製した ASO を用いて実際に細胞で標的 mRNA のノックダウンが可能か評価した。特定の酵素を発現させた A549 細胞に対して、新規手法で合成した ASO を作用させた結果、従来の合成手法で作製した ASO と同様に標的の mRNA をノックダウンできることが示された (図 2)。また、新規合成手法の汎用性について評価するために、3 種類の標的 mRNA に対して多数の ASO を作製し、スクリーニングを実施した。その結果、配列によって合成効率は異なるものの、標的 mRNA を減らすことが可能な ASO を作製できた。さらに、ASO 合成に用いる人工核酸の種類について検討を行った結果、複数種類の人工核酸を用いて ASO を作製することが可能になった。さらに ASO 合成手法について反応条件の検討を行うことで、反応効率の改善に成功した。また、研究開発分担者は ASO を効率的に評価するためのマイクロ流路の開発を実施した (阪大・荻)。PDMS を用いた流路開発に向けて、流路の設計、プロセスの条件出しと試作を実施し、作製したマイクロ流路が機能することを確認した。フッ素系界面活性剤を添加した油相と生体高分子を含む水相をマイクロ流路内で適切な流量比で送液し、直径 50-100 nm の水滴を安定して製作することができた。液滴径は、流量を適切に変化させることにより制御可能であった。そのため、ASO の評価実験の目的に適した直径の微小液滴を作製する準備ができた。以上のように、効率的な ASO 創薬のための準備を進めることができた。

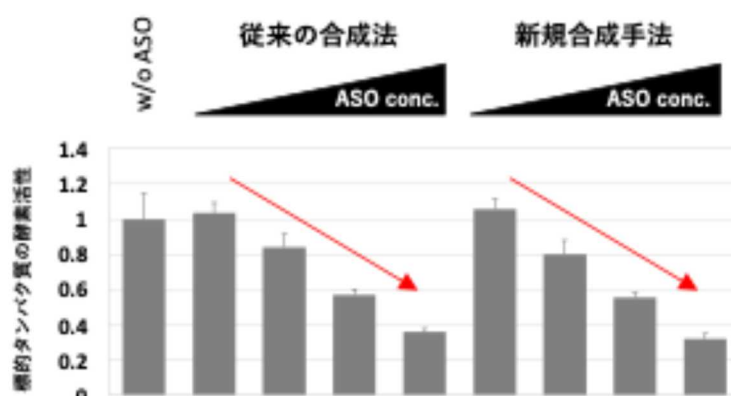


図 2 従来法と新規合成法の ASO の活性

令和 7 年度

令和 6 年度の実験において、複数の標的に対する ASO の活性評価で、ノックダウン活性が低いものが見られた。そこで、反応の改善を実施し、ノックダウン活性の再評価を実施した。その結果、十分な mRNA ノックダウン活性を確認することができ、スクリーニングに足るレベルの品質の ASO を合成できていることが示された。また、本技術で作製した ASO をスクリーニングに用いるための周辺技術開発を行い、ASO のヒット率を高めるための技術を開発した。研究開発分担者は ASO を効率的に評価するためのマイクロ流路の開発を実施した（阪大・荻）。製作したマイクロ流路を用いて条件の最適化を実施した。フッ素系界面活性剤を添加した油相と生体高分子を含む水相の流量比を最適化することで、ASO の評価に適したサイズの水滴を安定して製作することができた。このマイクロ流路を用いて水滴への細胞の封入を検証した結果、条件の最適化により細胞を問題なく封入することができた。以上のように、効率的な ASO 創薬のための基盤技術の開発を行うことができた。

(1) Background

Recently, the development of nucleic acid therapeutics has been advancing rapidly worldwide. In Japan, the regulatory framework for nucleic acid therapeutics is advancing and these therapeutics have been approved for seven consecutive years. Among nucleic acid therapeutics, antisense oligonucleotides (ASOs) are a modality with many approved drugs and active ongoing research. Gapmer ASO specifically binds to the target mRNA and induces its cleavage by a nuclease called RNase H. ASO sequences can be designed logically and quickly. However, target discovery is the rate-limiting step, and there are concerns about a future shortage of targets. In this study, we aim to accelerate and improve the efficiency of ASO drug discovery by developing a method for the efficient synthesis of ASOs.

(2) Results

FY2023 (R5)

First, we synthesized several types of nucleic acid monomers. We confirmed the synthesized products using NMR and LC-MS. Next, we investigated the ASO synthesis reaction. As a result, we successfully synthesized ASOs by novel method. The synthesized ASO was confirmed by LC-MS. The synthesized ASO was used to evaluate its cell-free RNA cleavage activity. As a result, there were no problems with RNA cleavage induction by RNaseH. Additionally, the novel ASO synthesis method allowed for the parallel processing of several sequences. We investigated the extraction of ASO from the solid phase and found no problems. In summary, we developed a novel method for synthesizing ASO.

FY2024 (R6)

We evaluated the target mRNA knockdown activity of ASO synthesized using a novel synthesis method. The ASO synthesized by novel method was applied to A549 cells expressing a certain enzyme. The results showed that the ASO could knock down the target mRNA at the same level as ASO produced using conventional synthesis methods. Furthermore, to evaluate the adaptability of the novel synthesis method, numerous ASOs were synthesized for three targets and screened. As a result, although the synthesis efficiency differed depending on the sequence, it was possible to create ASOs capable of decrease the target mRNA. We could synthesis ASOs using various modified nucleic acids. Dr. Ogi, a co-researcher, worked on developing microfluidic technology to efficiently evaluate ASO. They designed the microfluidics, determined process conditions, and created prototypes for the development of the PDMS-based fluid pathway. Water droplets with a diameter of 50-100 nm were created by flowing fluorine oil and water in the appropriate ratio.

FY2025 (R7)

Some samples showed low knockdown activity in the evaluation of ASO activity. Therefore, we improved the reaction and re-evaluated the knockdown activity. As a result, sufficient mRNA knockdown activity was confirmed, demonstrating that ASOs of sufficient quality for screening could be synthesized. Furthermore, we have developed a technology to enhance the hit rate of ASO. Dr. Ogi optimized the experimental conditions using microfluidic devices. The encapsulation of cells in water droplets was achieved using a microfluidic device. We were able to develop foundational technologies for efficient ASO drug discovery.