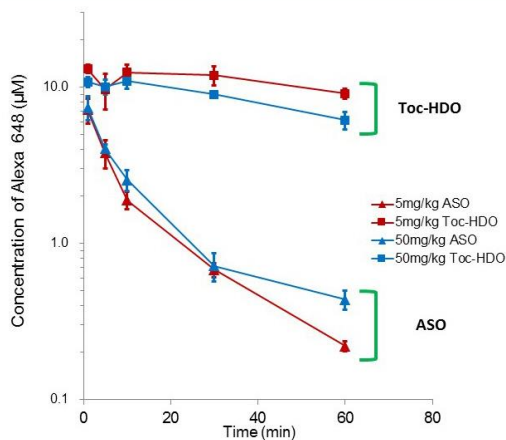


平成 27 年度 全体研究開発報告書

1. 事業名：革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業
2. 研究開発課題名：第3世代ヘテロ核酸の開発
3. 研究開発代表者：横田 隆徳
4. 研究開発の成果

本年度は、本事業の目的は第3世代ヘテロ核酸に認められる肝毒性を回避するために、まずその副作用のメカニズムの解明を優先的に行う。そのために、副作用のメカニズムの基盤となる生体内でのDNA/RNAの生物学的機序の解明を平行して行う。また肝臓へのnegative DDSの技術を開発するために、HDOとビタミンEとの間のエチレングリコール(EG)リンカーの最適化と、Toc-HDOと生体適合性高分子であるポリエチレングリコール(PEG)のコンジュゲート体の合成を行い、その効果をマウスで実証する。並行して、positive ターゲティングのproof-of-concept (POC)の確立のために、標的細胞表面に結合するペプチドリガンドもしくは抗体リガンドを1つか2つ選び、HDOのコンジュゲート体を新たに合成する。また現在の核酸医薬品は、皮下または静脈投与であるが、より非侵襲性投与方法の開発のために、腸管上皮(小腸)細胞層のバリア機能を担うタイトジャンクション(TJ)に着目し、TJ機能を制御することによりHDOの経口投与を可能かどうかについて検討する。加えてTJ機能を制御することによってHDOの経皮吸収の可能性についても併せて検討する。

Toc-HDOの血中薬物動態



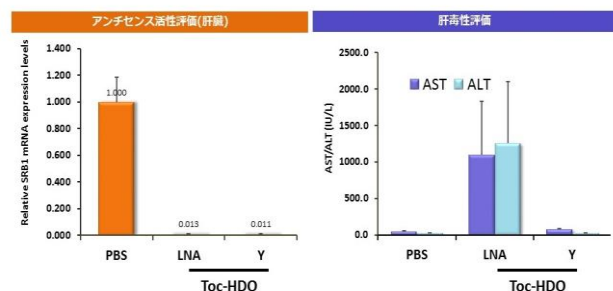
東京医科歯科大学担当として、1)ヘテロ核酸(HDO)による副作用の機序の解明のために以下の項目について検討を行った。a)血中動態の解明 b) 配列や配列長による副作用の変化 c)新規人工核酸を用いた毒性軽減の有無について検討を行った。a)に関してはマウスに一部に蛍光を付加したアンチセンス核酸(ASO)およびHDOを高用量群と低用量群を投与し経時的に、血清を回収し、その血中動態を解析した。図のようにHDOではASOと比較して著明に血中滞留性が增强されており、これがHDOの効果を反映していると考えられた。

b)に関しては新たな標的遺伝子でも、配列の調整や長さの調整により肝毒性が出現しなくなることを確認している。これらは複数回投与でも特に肝毒性を誘発しなかった。c)に関しては新規人工核酸を用いることでHDOの毒性を軽減することが可能か検討した。従来のLNAではなく、共同研究者から供与された新規人工核酸に置換して、投与したところ、効果は殆ど変化せず、肝機能障害は右の図のように劇的に軽減していた。もう1種類の新規人工核酸でも遺伝子抑制効果は、やや減弱したが、劇的に肝毒性は軽減しており、HDOの毒性軽減に成功している。

また2)副作用の基盤となるHDOの生物学的機序の解明のためにHDO投与後3時間後の肝臓のMS解析をした。その結果、HDOと結合すると考えられる蛋白質の候補がいくつか同定された。生体内に内因性の短鎖DNA/RNAが存在するか否かを検証する

ために、マウス肝組織からRNase Hへの抗体を用いてpull downしたサンプルから、ssDNAと考えら

Toc-HDOの遺伝子発現抑制効果と肝毒性試験



れる DNA を次世代シーケンスにて確認した。

東京大学での分担研究では、トコフェロール結合型ヘテロ核酸 (Toc-HDO) の肝臓への集積 (もしくは肝毒性) の回避 (ネガティブターゲティング)、および標的組織・細胞への積極的な集積 (ポジティブターゲティング) を目標とし、機能性高分子-HDO コンジュゲートの分子設計を行った。ネガティブターゲティングに向けた取り組みとして、Toc-HDO と生体適合性高分子のコンジュゲート体を合成した。組成が異なる種々の生体適合性高分子を用いてコンジュゲート体の比較検討を行ったところ、一定の組成において肝毒性の低減が認められた。また、生体適合性高分子の導入法も検討し、簡便な導入法を確立した。ポジティブターゲティングに向けた取り組みとしては、積極的に標的細胞表面に結合するリガンド分子搭載高分子の合成を検討した。実際に、がん細胞表面などに過剰発現することで知られる受容体に特異的に結合するリガンド分子を搭載した高分子を合成することに成功している。

ヘテロ核酸の経口・経皮投与に資する **Tight Junction (TJ) modulator** の創製として大阪大学分担研究では以下の成果を得た。(1) TJ バリアを構成する主要分子 **claudin** に対する **binder** である **C-CPE** と **m19**、および **angulin binder** である **Ib421-664** によるヘテロ核酸の経腸吸収促進効果を検証した結果、**C-CPE** および **m19** によりヘテロ核酸がマウス小腸から吸収され、肝臓に送達されることを明らかにした。ヘテロ核酸および **TJ binder** を作用させた後の小腸組織を病理解析したところ、組織障害性は認められなかった。また、本技術に関する特許出願を行った。(2) **TJ binder** による経口投与技術開発のための予備検討として、**TJB** を経口投与した際の安全性評価を行った結果、障害性は認められなかったものの、微量ながら血清 **IgG** の上昇が確認された。(3) ヘテロ核酸の吸収促進活性向上を目指した改良型 **TJ binder** を開発する準備として、ヘテロ核酸の細胞間隙透過性を *in vitro* で評価する系を構築した。(4) **TJ modulator** による経皮吸収促進活性を評価するため、**TJ modulator** である化合物 **X** によるマウス皮膚における薬物吸収促進効果を検証した結果、モデル薬物である分子量 **4kDa** の **FITC-dextran (FD-4)** が皮膚から吸収され血中にまで移行することを明らかとなった。