

## 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：「毒性ゼロに向けた革新的核酸医薬プラットフォーム構築 ―デュアル修飾型人工核酸の創製・探索・評価―」
3. 研究開発代表者：国立大学法人大阪大学 大学院薬学研究科 附属創薬センター  
センター長・教授 小比賀 聡
4. 研究開発の成果

### 研究開発目的

核酸医薬品は従来型の医薬品とは異なり、特定の遺伝子の発現を細胞内で抑制できることから、これまでは治療困難であった疾患に対する革新的な医薬品創出につながるものが期待されている。一方で、ヒト臨床試験を見据えた核酸創薬研究が進展するにつれ、解決すべき新たな課題が顕在化している。その最たるものとしてあげられるのが、「人工オリゴヌクレオチドが潜在的に有する毒性の回避」である。これまでの核酸化学・核酸医薬に関する知見より、核酸塩基部と糖部（架橋部）への化学修飾は核酸医薬の毒性回避につながるものと期待できる。しかし核酸医薬の毒性低減については、化学修飾の種類や核酸医薬の配列等と毒性との相関が最近になって徐々に判明しつつある段階であり、今まさに黎明期を迎えたばかりである。そこで本研究では今後の核酸創薬における国際的なデファクトスタンダードとなるべく、毒性ゼロに向けた革新的核酸医薬プラットフォーム構築を行うことを目的とする。

### 研究内容

上記プラットフォーム構築において中核技術となるのが、いかなる配列においても毒性を示さない「デュアル修飾型人工核酸」である。デュアル修飾型人工核酸とは文字通り、核酸塩基部と糖部（架橋部）の双方を同時に化学修飾した人工核酸であり、極めて高度な核酸化学のノウハウ・技術が必要とされる。我々はこれまでに培ってきた核酸化学・核酸創薬の技術を最大限に駆使し、核酸塩基部(T,C,G塩基)、糖部（架橋部）にそれぞれ化学修飾を導入した複数の人工核酸を創製する。

これら化学修飾型人工核酸をオリゴヌクレオチドに搭載する際には、塩基部の化学修飾のみでも多くの組み合わせが考えられるが、さらに糖部（架橋部）修飾を加味すると、その数は膨大となる。革新的核酸医薬プラットフォームの構築には、これら組み合わせの中から、薬効・安全性の両面から最適解を見いだす必要がある。そこで、従来型の網羅的スクリーニング（薬効評価）に加えて、新たな革新的スクリーニング技術を構築し、薬効評価の大幅な効率化を行う。

安全性評価に関しては、核酸医薬品による毒性の中で最も懸念が大きい肝毒性に関して、毒性発現を予測/評価するヒト細胞を用いた*in vitro*試験法を確立する。

これらの目標を達成するため、国立大学法人大阪大学を中核機関とし、再委託先である国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所と密接に連携し、研究開発を実施する。

### 研究成果

#### （1）国立大学法人 大阪大学での実施内容

##### ①伸長後構築法による人工核酸塩基の効率的合成技術の開発

オリゴヌクレオチド上での伸長後構築技術を開発するために、ヨード置換オリゴヌクレオチドに対し菌頭カップリング反応を用いて各種アルキン類を導入するための反応条件を精査した。触媒のリガンドに着目して水溶性の高い触媒を種々調製した。これら触媒や5-ヨードウラシルを末端を含むオリゴヌクレオチドに対し、アルキンを加えて菌頭反応が進行することを質量分析およびHPLC分析の結果より確認した。その上で反応温度や触媒の添加量を最適化することで生成物を最も多く得られる条件を見出し、当該合成技術を確立した。

## ②各種人工核酸塩基を導入したヌクレオシドモノマーの開発

平成27年度は、毒性の回避に有効であろうと考えられる核酸塩基誘導体（ヌクレオチドモノマー）について、当初計画を上回る計19種（C誘導体5種、T誘導体9種、G誘導体5種、平成26年分含む）を設計し、それぞれを含むオリゴヌクレオチド合成を達成した。また、項目⑦「肝毒性を誘発するアンチセンスの選別」の毒性評価用に *in vivo* スケールにてオリゴヌクレオチド合成を行い（計6種、各4 mg以上）、マウスへ投与を行った結果、肝毒性誘導レベルを顕著に低減させる核酸塩基誘導体を見出すことに成功した。さらに、有効性評価用に0.2 μmolスケールにて各種核酸塩基誘導体（計12種）を含むオリゴヌクレオチド合成を行い、それぞれ培養細胞で活性評価を行った結果、良好な遺伝子発現抑制効果を示した。

## ③毒性の低減を志向した糖部（架橋部）修飾型人工核酸の開発

平成27年度は、当初計画を上回る計12種の糖部修飾型人工核酸について設計並びに合成法の立案を完了した（平成26年分含む）。このうち8種についてはオリゴヌクレオチド合成まで行い、うち2種（scpBNAおよびAmNA[NMe]）については有効性および肝毒性評価まで完了した。これら2種を含むオリゴヌクレオチド（有効性を担保しながら肝毒性を誘発する既知配列）を *in vivo* スケール（各 4 mg以上）にて合成し、マウスへ投与した結果、高い有効性を維持しながら肝毒性誘導レベルを顕著に低減させることを見出した。

## ④デュアル修飾型人工核酸の開発

平成27年度は、8-アザ-7-デアザグアニンを有する2',4'-BNAの合成および効率的合成法の確立を達成した。昨年度合成した誘導体を含め、5位アルキン置換型2',4'-BNAを1種（エチニルアゾベンゼン含有2',4'-BNA）、7位デアザグアニン型2',4'-BNAとして2種（7-デアザグアニン および 8-アザ-7-デアザグアニン含有2',4'-BNA）、当初計画を上回る計3種のデュアル修飾型人工核酸の合成を達成し、効率的合成法を確立した。それぞれオリゴヌクレオチドへ導入し、基礎的な物性評価（*T<sub>m</sub>*測定および酵素耐性能）を実施した。

## ⑤オフターゲット効果による毒性を回避するアンチセンスの選別

アンチセンス等の短い塩基配列と相補性を有する遺伝子を高速に漏れなく抽出する検索アルゴリズムを利用して、ヒト及びマウスゲノムとヒットしないアンチセンス配列をコンピュータ上で作成した。平成26年度に引き続き、「GGGenome」を用い、かつ抽出プログラムを最適化することで「できるだけヒト及びマウスのゲノムとヒットしないアンチセンス」について、当初計画していた3000本の候補アンチセンスの設計を完了した。

## ⑥TLRの活性化による毒性を回避するアンチセンスの選別

上記項目⑤にて作成したアンチセンス配列をTLR9発現細胞に添加し、ハイブリダイゼーション依存的なオフターゲット効果がなく、かつTLR9を介する自然免疫系を活性化しないアンチセンス配列を抽出した。検証した約250本のアンチセンス全てでTLR9の活性化は認められなかった。これまでの研究成果と本結果を受け、今回検証したアンチセンス核酸については、ギャップマー構造となるように2',4'-BNA/LNAを導入していることがTLR9の活性化を示さなかったと考えられた。以上より、今後効率よく研究を遂行するため、当該マイルストーンの順序を入れ替え、候補アンチセンスの「肝毒性誘発の有無」を確認した後、「肝毒性を誘導するアンチセンス」のみについて実施することとした。

## ⑦肝毒性を誘発するアンチセンスの選別

既報の肝毒性を誘発するアンチセンスをマウスに投与し、肝毒性の評価条件を決定した。肝毒性については、肝毒性マーカーとして知られるALT（アラニンアミノトランスフェラーゼ：主に肝臓に多く含まれる酵素で、肝毒性が起こると血中に漏出する）を指標に評価した。評価系を構築した後、順次項目⑤⑥で選別した「オフターゲット効果およびTLR活性化を回避したアンチセンス」について肝毒性誘導の有無を評価し、平成27年度終了時において3本の肝毒性アンチセンスの選別を完了した。また、当初計画を前倒しし、平成28年度下半期から開始予定であったマイルストーン「塩基部and/or糖部修飾オリゴ核酸 毒性解析」も開始した。項目②で合成したオリゴヌクレオチドを用いて検証した結果、肝毒性誘導レベルを著しく低減させる塩基部修飾オリゴ核酸を見出すことに成功し、順調に計画が進行している。

## ⑧作業仮説「核酸医薬品の肝毒性が特定の遺伝子シグナルを介して誘導される可能性」の検証

本研究の目的である肝毒性評価法の確立に向けて、上記作業仮説を検証した。なお、計画

段階では「マウス個体由来の肝臓」を用いて解析する予定であったが、当初の計画に追加した研究項目であったため、コスト面の問題から「マウス肝由来細胞」を用いて本検証を実施した。⑦で選別した3本の「肝毒性を誘発するアンチセンス」をマウス肝細胞に作用させ、マイクロアレイ解析を行い遺伝子発現の変動を解析した。遺伝子発現の変動を統計学的に解析したところ、肝毒性の強度と相関して発現変動が認められた遺伝子を検出することができた。

(2) 再委託先 国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所での実施内容

①標的mRNA配列に基づいた人工核酸ライブラリの構築

前年度に引き続き、6種類の標的mRNAの配列情報を基に、各々の標的ごとに数十から百種類程度のアンチセンス核酸の合成を継続して行った。アンチセンス核酸の構造は、両末端に人工核酸として2',4'-BNA/LNAを2塩基ずつ導入した全長14塩基からなるギャップマー構造を基本とし、それらを等量ずつ混合した人工核酸ライブラリ（混合人工核酸ライブラリ）の調製を6種全ての標的mRNAについて完了させた。

②人工核酸ライブラリを用いた*in vitro*アンチセンス評価技術の開発

上記項目①にて合成・調製した混合人工核酸ライブラリの中からアンチセンス核酸の配列スクリーニングを行い、高活性を示す配列を選出した。次に、各種培養細胞に対するアンチセンス核酸の濃度およびその導入時間を詳細に検討した。さらに、標的mRNA切断面の分解状況について経時変化を追うことで細胞からの抽出条件を探るとともに、次世代シーケンサーを用いてmRNAの切断面の絞り込みを行えるスクリーニング系の構築に着手した。以上の通り、平成27年度はこれらアンチセンス核酸の導入や標的mRNA抽出の条件検討を完了させるとともに、単一配列を用いて次世代シーケンサーによるスクリーニング系の構築を完了した。これに加えて、混合ライブラリを用いた条件検討を実施し、課題点を抽出した。