

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業  
(英語) Basic science and platform technology program  
for innovative biological medicine

研究開発課題名： (日本語) 第三世代ヘテロ核酸の開発  
(英語) Development of third generation DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide

研究開発担当者 (日本語) 東京医科歯科大学脳神経病態学分野 教授 横田隆徳  
所属 役職 氏名： (英語) Takanori Yokota, Professor, Tokyo Medical and Dental University,  
Department of Neurology and Neurological Science

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 特定臓器の positive/negative DDS の要素技術の開発  
開発課題名： (英語) Development of component materials of positive/negative DDS for  
site-specific oligonucleotide delivery

研究開発分担者 (日本語) 東京大学大学院工学系研究科 准教授 宮田完二郎  
所属 役職 氏名： (英語) Kanjiro Miyata, Associate Professor, The University of Tokyo,  
Graduate School of Engineering,

分担研究 (日本語) HD0 の経口・経皮投与に資する TJ modulator の創製  
開発課題名： (英語) Development of TJ modulator for oral or percutaneous administration  
of Heteroduplex oligonucleotide

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学大学院 薬学研究科 教授 八木 清仁  
所属 役職 氏名： (英語) Kiyohito Yagi, Professor, The Osaka University Graduate School of  
Pharmaceutical Sciences,

## II. 成果の概要（総括研究報告）

ヘテロ核酸毒性の軽減の為に人工核酸の最適化を行った。LNA に換えて 2 種類の新規人工核酸でヘテロ核酸を作製した。更に毒性が出るアンチセンス配列を 3 つ選択した。動物モデルでこれらの新規核酸による毒性の軽減効果を検討した。いずれの配列でも LNA を用いたヘテロ核酸では、高用量投与で全身での遺伝子抑制効果は強かったが予想通り非常に高い毒性が見られた。一方で核酸を新規核酸 X で置換した場合、標的遺伝子の遺伝子抑制効果の低下は見られなかったが、毒性の著明な軽減は認められた。検討した 3 遺伝子すべてで同じ効果が見られた。加えて、核酸を新規核酸 Y で置換した場合、標的遺伝子の遺伝子抑制効果の低下が観察された。一方、新規核酸 Y で置換した場合、毒性の著明な軽減が認められた。人工核酸の置換により、著明な毒性の軽減が可能となった。またこれらの血清について 比較検討した。炎症性サイトカインの ELISA を用いて、新規核酸に変更することで軽減したサイトカインを検討した。新規核酸に置換することで、2 種類のサイトカインが減少を確認している。

またヘテロ核酸の毒性の軽減の為にヘテロ核酸の肝臓集積の抑制、すなわちネガティブターゲティングのために、ポリエチレングリコール(PEG)とのコンジュゲートを調製した。得られた PEG-ヘテロ核酸コンジュゲートは、ヘテロ核酸単体と比べ、優れた血中滞留性を示し、また肝臓への集積が効果的に抑制されることが明らかになった。がんなどの標的細胞・組織への特異的なヘテロ核酸デリバリー、すなわちポジティブターゲティングのために、複数のリガンド分子を側鎖に導入したポリペプチド(マルチリガンドポリペプチド、MLP)を合成した。結果として、培養がん細胞に対するヘテロ核酸導入効率が上昇することが明らかになった。今後は、全身投与を介した動物実験評価を行う計画である。

### 英文

To reduce the liver toxicity of hetero deoxyribooligonucleotides (HDOs), optimization of artificial nucleic acid was carried out. HDO were prepared with two novel artificial nucleic acids instead of LNA. For this experiment, three more toxic antisense sequences were selected. We examined the toxicity reduction effect of these novel nucleic acids in a mouse model. In HDOs using LNA in any of these sequences, the administration of high doses had a strong gene-suppressing effect on the whole body but very high toxicity was observed as expected. On the other hand, when the nucleic acid was substituted with the novel nucleic acid X, no decrease in the gene suppression effect of the target gene was observed but a remarkable reduction in toxicity was observed. The same effect was seen in all three genes examined. In addition, when replacing the nucleic acid with the novel nucleic acid Y, a decrease in the gene suppression effect of the target gene was observed. On the other hand, when replaced with the novel nucleic acid Y, marked reduction of toxicity was observed. By replacing artificial nucleic acid, remarkable reduction of toxicity became possible. We compared these sera from mouse. Using the inflammatory cytokine ELISA, cytokines reduced by changing to a novel nucleic acid were examined. By replacing LNA with a new nucleic acid, two types of cytokines are confirmed to decrease. Currently, we analyze the change with time of this cytokine.

To suppress the liver accumulation of HDOs, that is the liver-negative targeting, we developed poly(ethylene glycol) (PEG) conjugates. The obtained conjugate, PEG-HDOs, showed much longer blood circulation property, compared with a non-conjugated control, allowing for less efficient liver accumulation. On the other hand, to increase the targetability of HDO delivery, we also developed

multiple ligands-installed polypeptides (MLPs) and conjugated it with HDO. The MLP conjugate significantly enhanced the internalization of HDO, leading to the enhanced gene silencing efficiency in the cultured cancer cells. This formulation undergoes *in vivo* experiments.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 7 件、国際誌 7 件)

1. NAITO M, AZUMA R, TAKEMOTO H, HORI M, YOSHINAGA N, OSAWA S, KAMEGAWA R, KIM HJ, ISHII T, NISHIYAMA N, MIYATA K, KATAOKA K. Multilayered polyion complexes with dissolvable silica layer covered by controlling densities of cRGD-conjugated PEG chains for cancer-targeted siRNA delivery. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*. in press (DOI: 10.1080/09205063.2017.1301775).
2. YI Y, KIM HJ, MI P, ZHENG M, TAKEMOTO H, TOH K, KIM BS, HAYASHI K, NAITO M, MATSUMOTO Y, MIYATA K, KATAOKA K. Targeted systemic delivery of siRNA to cervical cancer model using cyclic RGD-installed unimer polyion complex-assembled gold nanoparticles. *Journal of Controlled Release*. 2016, 244, 247-56.
3. HAYASHI K, CHAYA H, FUKUSHIMA S, WATANABE S, TAKEMOTO H, OSADA K, NISHIYAMA N, MIYATA K, KATAOKA K. Influence of RNA strand rigidity on polyion complex formation with block cationomers. *Macromolecular Rapid Communications*. 2016, 37, 486-93.
4. MIYATA K. Smart polymeric nanocarriers for small nucleic acid delivery. *Drug Discovery & Therapeutics*. 2016, 10, 236-47.
5. ASAMI Y, YOSHIOKA K, NISHINA K, NAGATA T, YOKOTA T. Drug delivery system of therapeutic oligonucleotides. *Drug Discoveries & Therapeutics*. 2016, 10, 256-62.
6. WATARI A, SAKAMOTO Y, HISAIE K, IWAMOTO K, FUETA M, YAGI K, KONDOH M. Rebecamycin Attenuates TNF- $\alpha$ -Induced Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Inhibiting Myosin Light Chain Kinase Production. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2017, 41, 1924-34.
7. HASHIMOTO Y, YAGI K, KONDOH M. Roles of the first-generation claudin binder, *Clostridium perfringens* enterotoxin, in the diagnosis and claudin-targeted treatment of epithelium-derived cancers. *Pflügers Archiv*. 2017, 469, 45-53.
8. 内藤瑞, 林光太郎, 宮田完二郎. 機能性高分子を基盤にした siRNA デリバリーシステム. *核酸医薬学会誌*. 2016, 4-14.
9. 宮田完二郎, 長田健介, 片岡一則. PEG-ポリアミノ酸ブロック共重合体の自己組織化体: 高分子ミセル型 DDS. *Drug Delivery System*. 2016, 31, 283-92.
10. 内藤瑞, 宮田完二郎. リガンド搭載高分子ミセルを用いた組織特異的核酸デリバリー. *日本認知症学会誌 Dementia Japan*. 2016, 30, 2-8.
11. 横田隆徳, 仁科一隆. DNA/RNA ヘテロ二本鎖核酸. *核酸医薬の創製と応用展開*. 2016, 21-8.
12. 大谷木正貴, 横田隆徳. 核酸医薬による神経変性疾患の治療. *生体の科学*. 2016, 67, 349-53.

13. 小野大介, 吉岡耕太郎, 永田哲也, 横田隆徳. DNA/RNA ヘテロ 2 本鎖核酸の開発. *Medical Science Digest*. 2016, 42, 18-21.
14. 佐野達彦, 吉岡耕太郎, 永田哲也, 横田隆徳. 神経疾患の核酸医学と遺伝子治療. *Mebio*. 2016, 33, 89-98.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. ナノマシンによるがん治療の最前線, 口頭, 宮田完二郎, 先端ナノデバイス・材料テクノロジー第 151 委員会, 2017/3/2, 国内.
2. Polymer-based oligonucleotide delivery, 口頭, MIYATA K, 11<sup>th</sup> Annual Symposium on Nanobiotechnology 2017, 2017/2/27, 国外.
3. ユニット PIC/金ナノ粒子によるハイブリッドナノキャリアによるがん標的 siRNA デリバリー, 口頭, 宮田完二郎, 内藤瑞, 易宇, キムヒョンジン, 片岡一則, 第 26 回日本 MRS 年次大会, 2016/12/19, 国内.
4. Development of smart polymeric nanocarriers for targeted siRNA delivery. 口頭, MIYATA K, EPFL/UTokyo Joint Symposium 2016, 2016/12/5, 国外.
5. 高分子ナノキャリアを用いた核酸医薬デリバリー, 口頭, 宮田完二郎, 第 1 回 RNA 創薬セミナー, 2016/10/31, 国内.
6. 高分子ナノテクノロジーが切り拓く核酸医薬デリバリー, 口頭, 宮田完二郎, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6, 国内
7. Smart polymeric nanocarriers for systemic nucleic acid delivery, 口頭, MIYATA K, 12<sup>th</sup> Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics, 2016/9/25, 国外.
8. ブロック共重合体を用いた siRNA 封入ポリイオンコンプレックスの構造制御とデリバリーへの展開, 口頭, 宮田完二郎, 林光太郎, 内藤瑞, キムヒョンジン, 片岡一則, 第 65 回高分子討論会, 2016/9/16, 国内.
9. Ligand-installed polymeric nanocarriers for targeted drug and nucleic acid delivery, 口頭, MIYATA K, Drug Carriers in Medicine & Biology in Gordon Research Conference, 2016/8/7, 国外.
10. リガンド搭載高分子ナノ粒子を用いた腫瘍組織特異的核酸デリバリー, 口頭, 宮田完二郎, 内藤瑞, 林光太郎, 武元宏泰, 易宇, キムヒョンジン, 片岡一則, 第 32 回日本 DDS 学会学術集会, 2016/6/30, 国内.
11. DNA/RNA Heteroduplex Oligonucleotide as a Novel Concept of Therapeutic Oligonucleotide, 口頭, YOKOTA T, 18th TIDES: Oligonucleotide and Peptide Therapeutics 2016, 2016/5/11, 国外.
12. DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide: a 3rd class of oligonucleotide drug, 口頭, YOKOTA T, 第 32 回日本 DDS 学会学術集会, 2016/7/1, 国内.
13. 新規の核酸医薬, ヘテロ核酸の創生, 口頭, 横田隆徳, 第 90 回日本薬理学会年会, 2017/3/15, 国内
14. Novel oligonucleotide based on DNA/RNA heteroduplex structures, 口頭, NISHINA K, YOSHIOKA K, NISHINA T, KUWAHARA H, NAGATA T, YOKOTA T, 第 57 回日本神経学会

学術大会, 2016/5/19, 国内.

15. A new type of double-stranded structure improved potency of antisense oligonucleotide for FAP, 口頭, YOSHIOKA K, KUNIEDA T, TANAKA K, PIAO W, KUWAHARA H, NISHINA K, NAGATA T, YOKOTA T, 第 57 回日本神経学会学術大会, 2016/5/19, 国内.
16. DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide for highly efficient gene silencing, 口頭, YOKOTA T, 3rd International Conference on Biomaterials Science, 2016/11/30, 国内.
17. DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide for highly efficient gene silencing, ポスター, YOKOTA T, Oligonucleotide Therapeutics & Delivery 2016, 2016/4/4, 国外.
18. 二本鎖核酸をデリバリー担体として利用した新規核酸医薬の開発, ポスター, 國枝泰希, 吉岡耕太郎, 筋野裕美子, 田中規恵, 朴文英, 桑原宏哉, 仁科一隆, 永田哲也, 横田隆徳, 遺伝子・デリバリー研究会第 16 回シンポジウム, 2016/5/16, 国内.
19. ビタミン E 修飾 siRNA-脂質ナノ粒子の経腸的リンパ移行動態評価, ポスター, 渡辺知恵, 松本有, 藤加珠子, 宮田完二郎, 片岡一則, 横田隆徳, 村上正裕, 遺伝子・デリバリー研究会第 16 回シンポジウム, 2016/5/16, 国内.
20. Development of antisense oligonucleotide with a new type of a double stranded structure, ポスター, KUNIEDA T, YOSHIOKA K, SUJINO Y, TANAKA K, PIAO W, KUWAHARA H, NISHINA K, NAGATA T, YOKOTA T, The 21st annual meeting of the RNA society, 2016/6/29, 国内.
21. A new mechanism of microRNA inhibition by a new type of duplex oligonucleotide, ポスター, YOSHIOKA K, SUJINO Y, KUNIEDA T, TANAKA K, PIAO W, KUWAHARA H, NISHINA K, NAGATA T, YOKOTA T, The 21st annual meeting of the RNA society, 2016/6/29, 国内.
22. DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide (HDO) for highly efficient gene silencing, ポスター, NISHINA K, TANAKA K, PIAO W, YOKOTA T, The 21st annual meeting of the RNA society, 2016/6/30, 国内.
23. Liver-specific delivery of a novel DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide via enteral routes produced by the combination of alpha-tocopherol conjugation and permeation enhancers, ポスター, WATANABE C, CHENG Y, WATARI A, KONDOH M, YAGI K, MATSUMOTO Y, TOH K, MIYATA K, KATAOKA K, OBIKA S, TANAKA K, NISHINA K, YOKOTA T, MURAKAMI M, Controlled Release Society Annual Meeting & Exposition, Annual meeting, 2016/7/17-20, 国外.
24. Pharmacokinetic study of double stranded antisense oligonucleotide: Hetero Chimera Duplex Oligonucleotide (HCDO), ポスター, KUNIEDA T, YOSHIOKA K, SUJINO Y, TANAKA K, PIAO W, KUWAHARA H, NISHINA K, NAGATA T, YOKOTA T, 12th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, 2016/9/26, 国外.
25. Intracellular mechanisms of microRNA inhibition by a new double-stranded structure for therapeutic oligonucleotide, ポスター, YOSHIOKA K, SUJINO Y, KUNIEDA T, TANAKA K, PIAO W, KUWAHARA H, NISHINA K, NAGATA T, YOKOTA T, 12th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, 2016/9/27, 国外.
26. DNA/RNA heteroduplex oligonucleotide, ポスター, YOKOTA T, 12th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, 2016/9/27, 国外.

27. デュアルオーバーハング 2 本鎖核酸医薬の開発, ポスター, 吉岡耕太郎, 國枝泰希, 筋野裕美子, 浅見裕太郎, 田中規恵, 朴文英, 桑原宏哉, 仁科一隆, 永田哲也, 横田隆徳, 日本核酸医薬学会第2回年会, 2016/11/15, 国内.
28. 新規の二本鎖核酸医薬: オーバーハング二本鎖核酸, ポスター, 國枝泰希, 吉岡耕太郎, 浅見裕太郎, 田中規恵, 朴文英, 桑原宏哉, 仁科一隆, 永田哲也, 横田隆徳, 日本核酸医薬学会第2回年会, 2016/11/16, 国内.
29. TR-FRETによる低分子 CLDN-4 binder スクリーニング系の構築, 口頭, 坂本雄太, 渡利彰浩, 小高美樹, 久家広大, 八木清仁, 近藤昌夫, 日本薬学会第137年会, 2017/3/25-27, 国内.
30. Homoharringtonineによる核酸医薬の経皮投与基盤技術の開発, 口頭, 藤原果奈, 渡利彰浩, 永田哲也, 近藤昌夫, 横田隆徳, 八木清仁, 日本薬学会第137年会, 2017/3/25-27, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

(4) 特許出願

出願番号: 特願 2017-014957

出願日: 2017年1月31日

発明の名称: 経皮吸収促進剤

出願人: 国立大学法人大阪大学/国立大学法人東京医科歯科大学

発明者: 渡利彰浩, 八木清仁, 近藤昌夫, 横田隆徳, 永田哲也

出願番号: PCT/JP2016/085474

出願日: 2016年11月30日

発明の名称: 核酸を含む経腸投与用組成物

出願人: 国立大学法人大阪大学/国立大学法人東京医科歯科大学

発明者: 八木清仁, 近藤昌夫, 渡利彰浩, 村上正裕, 永浜政博, 横田隆徳, 永田哲也, 渡辺知恵