

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

分担研究報告

ヒトアポ C3 に対する高活性アンチセンスのスクリーニング選抜に向けた 2',4'-BNA^{NC}、2',4'-BNA^{AM} を搭載したアンチセンス核酸の構造最適化研究

分担研究者 小比賀 聡 大阪大学大学院薬学研究科・教授

本研究では、動脈硬化症の危険因子の一つとされる高トリグリセリド血症の是正を主目的とし、トリグリセリドの代謝に関わるアポリポタンパク質 C-III (ApoC-III) に対する優れた阻害剤の開発を行う。特に、独自人工核酸技術「BNA」(2',4'-BNA、2',4'-BNA^{NC} および 2',4'-BNA^{AM} (= AmNA)) の高い標的 RNA 親和性と優れた体内動態特性、安全性に鑑み、これを搭載した ApoC-III に対する高活性・低毒性アンチセンス医薬の開発を目指す。前年度には、高活性・低毒性な 2',4'-BNA 搭載型アンチセンス医薬の同定を目指し、2',4'-BNA^{NC} 搭載型アンチセンスの設計、合成を行った。これらの BNA^{NC} 搭載アンチセンスの *in vitro* スクリーニングを行ったところ、2',4'-BNA のものより強力な細胞活性を得た。本年度は、これらの新規 BNA 搭載型アンチセンスの *in vivo* での評価とこれらの構造活性相関について *in vivo* 活性に基づき検討を進めた。またここまで得られたげっ歯類での検討を元に、ヒト ApoC-III に対するアンチセンス核酸のスクリーニング選抜を進めた。

大阪大学大学院薬学研究科

山本 剛史

脇 玲子

国立循環器病研究センター研究所

病態代謝部

斯波 真理子

和田 郁人

堀 美香

小倉 正恒

和田 俊輔

柴田 映子

高藤 義正

澤村 元気

森本 めぐむ

吉田 晶子

駒井 仁美

A. 研究目的

ここまでの検討により、アンチセンス分

子に BNA 修飾を施すことにより非常に高い mRNA 阻害効果とトリグリセリド低下効果が得られる事を確認してきた。一方で、その標的配列や BNA の種類により薬効や安全性に大きな違いが存在する事がみいだされた。このような背景からさらにメッセンジャーRNA ワイドなウォークスクリーニングを実施することにより、アンチセンス核酸に用いるケミストリーごとに最適構造を探索しなければならないことが示唆された。この点で昨年度までに 100 種を超える ApoC-III アンチセンスを設計・合成し、初代培養肝細胞を用いてスクリーニング評価を実施した。これらの検討から特に 3'-UTR を標的とした BNA アンチセンスが高い薬効を示すことを見出している。以上の結果から 3'-UTR を標的とした 2',4'-BNA^{NC} 搭載型アンチセンスも同様に高い効果を示すと予想し、表 1 に示す 34 種のアンチセンス核酸の活性を *in vitro* スクリーニングしたところ期待通り非常に活性の高い 2',4'-BNA^{NC} 搭載型アンチセンス核酸の同定に成功した。これらの *in vitro* での活性の高かった mApoC3-411-NC(14), mApoC3-436-NC(14), mApoC3-456-NC(14), mApoC3-466-NC(14)について *in vivo* での投与試験を行ったが、2',4'-BNA を有する mApoC3-471-BNA の活性を下回った。なぜこのような *in vitro* と *in vivo* 活性の差が生じたかについては現時点では定かではないが、世界的にも前例のない興味深い観察であり、BNA の構造活性相関に関する非常に重要な知見が得られる可能性がある。そ

こで本研究では、これらの 2',4'-BNA と 2',4'-BNA^{NC} のケミストリーの差がなぜ生じたのか検討を進めることとした。

これまで我々のグループでは、2',4'-BNA^{NC} を搭載したアンチセンス核酸が、対応する 2',4'-BNA 搭載型アンチセンス核酸の活性を *in vivo* レベルで上回る事を見出してきた (Yamamoto *et al.*, *Molecular Ther-Nucleic Acids*, **2012**, 1, e22)。しかしながら、この報告においては鎖長が 20 塩基と今回の検討よりも長鎖アンチセンスを使用している点で異なる。そこでこの点に注目し、体内動態の違いが、*in vivo* での活性の差につながったと考え、2',4'-BNA^{NC} のケミストリーを用いた様々な鎖長をもつアンチセンス核酸を設計、合成し、*in vivo* でのアンチセンス活性を評価することとした。

他方で、2',4'-BNA^{NC} や 2',4'-BNA^{AM} (= AmNA) と行った次世代の BNA は、理由は定かではないが、内外の研究から 2',4'-BNA を上回る安全性が見出されている。加えて、架橋部に窒素を有する BNA アナログにおいては窒素の原子価の性質上、置換基を導入出来る点でプロトタイプの 2',4'-BNA よりも高い展開可能性を証明してきた (Yamamoto *et al.*, *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *in press*, DOI: 10.1039/c5ob00242g)。ここでは、ヒトアポ C3 に対する mRNA ワイドなウォークスクリーニングに向け、2',4'-BNA^{NC} に加えて 2',4'-BNA^{AM} (= AmNA) アンチセンス核酸についても構造最適化を目指した。

B. 研究方法

1. 投与実験

すべての動物実験は、大阪大学の実験動物委員会の承認を得て実施した。被験動物とし7週齢のマウスC57BL6/J(日本SLC、日本クレア)を購入し、CE-2(日本クレア)を付加するとともに1週間以上馴化させたのち、投与試験を行った。マウスは12時間毎の明暗周期環境下で飼育し、食餌は自由に取れる環境で飼育した。各投与群で例数4匹となるように準備した。各アンチセンス核酸を1.07 $\mu\text{mol/kg}$ の投与量で、あるいは対照群として生理食塩水200 μL を皮下より単回投与を行なった。投与後3日後あるいは7日後に、イソフルランによる麻酔下、採血および、肝臓、腎臓、脂肪の摘出を行い、液体窒素にて凍結後、 -80°C 保存した。

2. 肝臓からの total RNA の抽出

凍結した肝臓の切片約30 mgを $\mu\text{T-12}$ (タテック社)ホモジナイザーにてジルコニアビーズを用いてホモジナイズを行い(30s⁻¹ for 2 min)その後QuickGene RNA tissue kit SII(Fujifilm Life Science, Cat#634-23601)に従いtotal RNAを抽出した。抽出したtotal RNAを分光光度計で定量し、rRNAを1%アガロースゲル電気泳動で純度の確認を行った。

3. Realtime RT-PCR 解析

High capacity cDNA Reverse Transcription Kit(Applied Biosystems, Cat#4368813)を用いてtotal RNA4 μg からcDNAを作製した。

Taqman® Fast Universal Master Mix および Fast SYBY® Green Master Mix を用いて、得られた cDNA の遺伝子発現解析を行った。また、ハウスキーピング遺伝子を *Gapdh* として標準化を行った。以下のプライマーセットを用いた: TaqMan Gene Expression ID; Mm00445670_m1 (*Apoc3*), Mm99999915_g1 (*Gapdh*)。

4. 配列設計

ヒトアポ C3 mRNA (アクセッション番号: NM_000040) に対してアンチセンスの設計を行った。14, 17, 19 塩基長の3種の配列についてそれぞれ設計した(表3に14塩基長の一部を示した)。配列設計にはバイオインフォマティクスに汎用されるオープンソース言語である BioRuby のライブラリオブジェクトと local BLAST を利用し、テキストマイニングとアンチセンス配列のチェックを行った。基本的な設計指針としては、RNase H の足場となるギャップ領域が同一領域になるように3鎖長について3'末端側をアラインした。免疫刺激配列として知られる CpG モチーフを排除した。自己高次構造などをとりやすい cccc、gggg モチーフを除外した。毒性発現が示唆される ttctgc 配列を除外した。

C. 研究結果

1. 新規人工核酸搭載型アンチセンス分子の *in vivo* スクリーニング評価

昨年度、表1に示す34種のアンチセンス核酸の活性をマウス肝臓由来初代培養

にてスクリーニングしたところ期待通り、2',4'-BNA 搭載型のアンチセンス核酸に比較しても上回る活性を有する 2',4'-BNA^{NC} 搭載型アンチセンス核酸の同定に成功した。中でも特に活性の高かった mApoC3-411-NC(14), mApoC3-436-NC(14), mApoC3-456-NC(14), mApoC3-466-NC(14) の 4 種の 14 塩基長のアンチセンス核酸について *in vivo* での投与試験を行ったが、*in vivo* では 2',4'-BNA 型の活性を上回る事は出来なかった。鎖長による効果を検討するために mApoC3-471-BNA(14)の塩基配列を 14 塩基長から 20 塩基長まで前後に塩基配列を拡張し、表 2 に示したアンチセンスを 2',4'-BNA, 2',4'-BNA^{NC}, 2',4'-BNA^{AM} それぞれについて *in vivo* 実験に使用可能な大量スケールでの合成を行った。鎖長の伸長に伴ってギャップ長も 8 塩基から 13 塩基まで広げることとした。これらをマウスに対して単回投与を行い、肝臓におけるロックダウン効果を評価した。投与量は、mApoC3-471-BNA(14)にて 5 mg/kg となる 1.07 $\mu\text{mol/kg}$ とした。結果は、図 2 に示したように 14 塩基長同士で比較した場合には、2',4'-BNA と 2',4'-BNA^{AM} にて有意なアンチセンス効果を見出したが、2',4'-BNA^{NC} では全く効果は認められなかった。2',4'-BNA^{NC} については効果発現のタイミングが変化している可能性を考え、7 日後にも効果を評価したが、有意な活性を見出せなかった。一方、興味深いことに 2',4'-BNA^{NC} が最も効果を発揮したのは 17 塩基長であり、同配列の 2',4'-BNA と

2',4'-BNA^{AM} を上回る活性を見出した。同様に、2',4'-BNA^{AM} については 14 塩基長に加え、19 塩基長でも活性の極大が見出された。

D. 考察

表 2 に示した 2',4'-BNA, 2',4'-BNA^{NC}, 2',4'-BNA^{AM} それぞれのアンチセンス核酸についてロックダウン活性を評価した結果大変興味深い知見が得られた。すなわち、それぞれのケミストリーで活性を示す鎖長が異なる点である。また、2',4'-BNA^{AM} では極大活性を示す鎖長が 14 と 19 塩基長の 2 鎖長あり、これらの背景に隠れるバイオロジーは非常に興味深い。2',4'-BNA と 2',4'-BNA^{AM} はともに 14 塩基長にて有意なロックダウン活性を示した事は、おそらくこれらが、ともに五員環の架橋構造を有しており、糖部コンフォメーションや架橋部の立体的嵩高さ、生体内におけるタンパク質結合率などの点で共通点が多炒めであると考えられる。六員環架橋構造を有する 2',4'-BNA^{NC} とはこの意味で一線を画することからこのような *in vivo* における活性の差が得られたものと考えられる。実際、2',4'-BNA と 2',4'-BNA^{AM} はともに高速液体クロマトグラフィーを用いた簡易的な疎水性の評価をした場合に、非常によく似た極性を有する事を確認している。このことは、生体内におけるタンパク質結合率などの体内動態パラメータが類似してくることを意味しており、活性もこれに伴って類似する傾向を確認している(Yamamoto et

al., *Org. Biomol. Chem.*, **2015**, *in press*, DOI: 10.1039/c5ob00242g)。

2',4'-BNA^{NC}において、17塩基長で極大活性が得られた点については、これまでの *in vitro* の知見とは一致せず、非常に興味深い。我々は、以前に apoB を標的とした 2',4'-BNA^{NC} 搭載型アンチセンス核酸についてより短鎖の 14 塩基長で極大活性が得られることを培養細胞の実験で示している (Yamamoto et al., *J Nucleic Acid*, **2012**, 707323)。 *in vitro* においては 14 塩基長などの短い 2',4'-BNA^{NC} アンチセンスが高い活性を示すことは、昨年度の研究成果からも明らかであり、 *in vivo* での活性が *in vitro* の試験では十分に予測できないことを示唆する。このことは、 *in vitro* 試験では、細胞内導入試薬を利用しているのに対して、 *in vivo* では裸のまま投与している点で動態の効果を十分に考慮できていない点が主たる要因であると想像される。この意味から考えると、肝実質細胞内の apoC3 mRNA の存在するコンパートメント (おそらく細胞核内) に効率的に 2',4'-BNA^{NC} アンチセンスを送達できれば *in vitro* での効果を反映した *in vivo* の結果が得られると考えられる。引き続き、invivofectamine®や GalNac などの *in vivo* で利用可能なデリバリー剤を活用して検討を進めていきたい。

他方で、今回の結果から、14, 17, 19 塩基長で大きく活性が変動することが見出された。これらの結果はヒトアポ C3 に対する 2',4'-BNA^{NC} アンチセンスや 2',4'-BNA^{AM} アンチセンスを開発するにあ

たり、14, 17, 19 塩基長の 3 種の鎖長のアンチセンス核酸をそれぞれについて設計し、mRNA ワイドに網羅的 *in vitro* スクリーニングを実施するとともに、選抜された候補品を実際に *in vivo* (げっ歯類、霊長類) 評価系の有効性評価を併用して開発候補を選定する必要性を強く支持するものである。この点を鑑みて、3 種の鎖長についてギャップ部分をアラインしたアンチセンスをデザインした。

E. 結論

2',4'-BNA^{AM} についても、A, T, G, ^mC の 4 種の塩基を持つ 2',4'-BNA^{AM} のルート貫通、 *in vivo* での使用に耐えうるスケールアップ合成が可能となり、また固相合成の最適化により多様な塩基配列を持つ 2',4'-BNA^{AM} 搭載型アンチセンスの合成が可能になった。これらを用いて今回は、ケミストリーが異なると最大活性が得られる鎖長や最適なギャップサイズが異なる事を見出した。これらの実験事実を元に、ヒトアポ C3 アンチセンスのスクリーニング計画を立案した。次年度から具体的に選抜試験を実施していく予定である。また、非臨床・臨床試験の実施に向け、大量合成の検討を行うとともに、品質評価方法ならびに品質管理の方法についても検討を進める。

F. 健康危険情報

本研究では現在のところ健康に危険を及ぼす可能性はない。

G. 研究発表

論文

1. Yamamoto T, Yahara A, Waki R, Yasuhara H, Wada F, Harada-Shiba M, Obika S, Amido-bridged Nucleic Acids with Small Hydrophobic Residues Enhance Hepatic Tropism of Antisense Oligonucleotides *in vivo*, *Org. Biomol. Chem.*, 2015, *in revision*.
2. Mori K, Kodama T, Obika S, Synthesis and Hybridization Property of a Boat-shaped Pyranosyl Nucleic Acid Containing an Exocyclic Methylene Group in the Sugar Moiety, *Bioorg. Med. Chem.*, 2015, *23*, 33-37.
3. Mitsuoka Y, Fujimura Y, Waki R, Kugimiya A, Yamamoto T, Hari Y, Obika S, Sulfonamide-Bridged Nucleic Acid: Synthesis, High RNA Selective Hybridization, and High Nuclease Resistance, *Org. Lett.*, 2014, *16*, 5640-5643.
4. Mori S, Morihiro K, Obika S, C5-Azobenzene-substituted 2'-Deoxyuridine-containing-oligodeoxynucleotides for Photo-switching Hybridization Ability, *Molecules*, 2014, *19*, 5109-5118.
5. Morihiro K, Kodama T, Mori S, Obika S, Photoinduced Changes in Hydrogen Bonding Patterns of 8-Thiopurine Nucleobase Analogues in a DNA Strand, *Org. Biomol. Chem.*, 2014, *12*, 2468-2473.
6. Shimo T, Tachibana K, Saito K, Yoshida T, Tomita E, Waki R, Yamamoto T, Doi T, Inoue T, Kawakami J, Obika S, Design and Evaluation of 2',4'-BNA/LNA Based Splice-switching Oligonucleotides *in Vitro*, *Nucleic Acids Res.*, 2014, *42*, 8174-8187.
7. Yamamoto T, Wada S, Wada F, Shigesada H, Harada-Shiba M, Obika S, Evaluation of Multiple-Turnover Capability of Locked Nucleic Acid Antisense Oligonucleotides *in Cell-Free RNase H-Mediated Antisense Reaction and in Mice*, *Nucleic Acid Therapeutics*, 2014, *24*, 283-290.

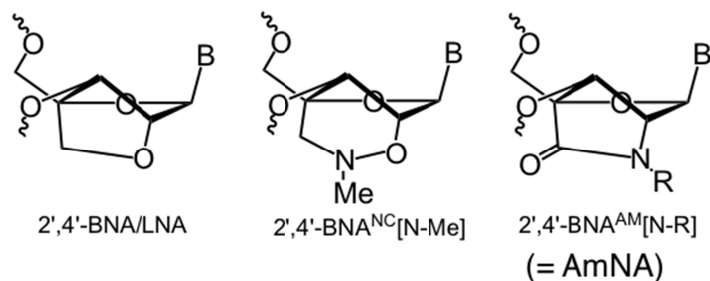


図 1. 各種糖部架橋型人工核酸の化学構造。B は塩基、R は種々の置換基を指す。

表 1 本研究で設計・合成した $2',4'$ -BNA^{NC} 搭載アンチセンスオリゴヌクレオチド一覧

遺伝子名-標的位置-BNA 種(鎖長)	遺伝子-標的位置-BNA 種(鎖長)
mApoC3-96-NC(14)	mApoC3-426-NC(14)
mApoC3-306-NC(14)	mApoC3-431-NC(14)
mApoC3-316-NC(14)	mApoC3-436-NC(14)
mApoC3-321-NC(14)	mApoC3-441-NC(14)
mApoC3-331-NC(14)	mApoC3-446-NC(14)
mApoC3-336-NC(14)	mApoC3-451-NC(14)
mApoC3-346-NC(14)	mApoC3-456-NC(14)
mApoC3-351-NC(14)	mApoC3-461-NC(14)
mApoC3-361-NC(14)	mApoC3-466-NC(14)
mApoC3-366-NC(14)	mApoC3-471-NC(14)
mApoC3-376-NC(14)	mApoC3-476-NC(14)
mApoC3-381-NC(14)	mApoC3-486-NC(14)
mApoC3-391-NC(14)	mApoC3-491-NC(14)
mApoC3-396-NC(14)	mApoC3-496-NC(14)
mApoC3-406-NC(14)	mApoC3-501-NC(14)
mApoC3-411-NC(14)	mApoC3-506-NC(14)
mApoC3-416-NC(14)	mApoC3-511-NC(14)

骨格は全てホスホロチオアート化。各配列で 5 カ所に $2',4'$ -BNA^{NC} を導入。

表 2 本研究で使用した各種 BNA 搭載型アンチセンス核酸一覧

Length	Sequence	Gap
14	TT aggtgagat CT a	8
14-2	TT aggtgagat CT a	9
16	TTT aggtgagat CTA g	9
17	GTT aggtgagat CTA g	10
18	TGT ttagtgagat CTA g	11
19	TGT ttagtgagat cTAG g	12
20	ATG ttagtgagat cTAG g	13

Upper case : 2',4'-BNA or 2',4'-BNA^{NC} or 2',4'-BNA^{AM}, C = 5-methyl-C, Lower case : DNA, Linkage : all phosphorothioate.

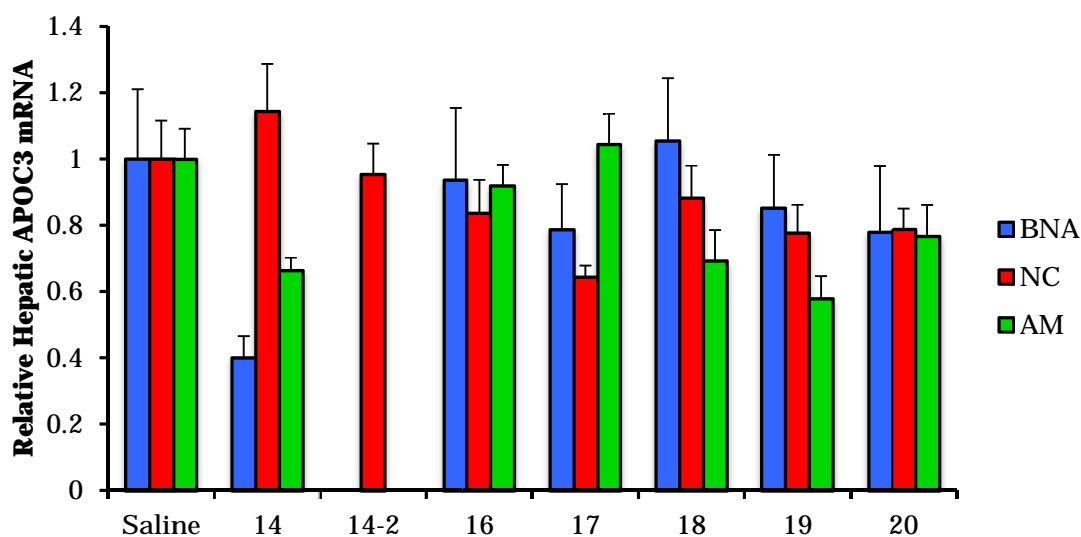


図 2. 用いるケミストリーの違いによる鎖長ごとのアンチセンス活性

表 3. ヒトアポ C3 スクリーニングに向けたアンチセンスデザイン (一部)

No.	ASO ID	CpG	cccc	gggg
1	hApoC3-2-AM(14)	なし	なし	なし
2	hApoC3-12-AM(14)	なし	なし	なし
3	hApoC3-32-AM(14)	なし	なし	なし
4	hApoC3-57-AM(14)	なし	なし	なし
5	hApoC3-67-AM(14)	なし	なし	なし
6	hApoC3-117-AM(14)	なし	なし	なし
7	hApoC3-137-AM(14)	なし	なし	なし
8	hApoC3-202-AM(14)	なし	なし	なし

9	hApoC3-237-AM(14)	なし	なし	なし
10	hApoC3-247-AM(14)	なし	なし	なし
11	hApoC3-257-AM(14)	なし	なし	なし
12	hApoC3-282-AM(14)	なし	なし	なし
13	hApoC3-287-AM(14)	なし	なし	なし
14	hApoC3-302-AM(14)	なし	なし	なし
15	hApoC3-307-AM(14)	なし	なし	なし
16	hApoC3-312-AM(14)	なし	なし	なし
17	hApoC3-317-AM(14)	なし	なし	なし
18	hApoC3-332-AM(14)	なし	なし	なし
19	hApoC3-337-AM(14)	なし	なし	なし
20	hApoC3-342-AM(14)	なし	なし	なし
21	hApoC3-347-AM(14)	なし	なし	あり
22	hApoC3-362-AM(14)	なし	なし	なし
23	hApoC3-367-AM(14)	なし	なし	なし
24	hApoC3-392-AM(14)	なし	なし	なし
25	hApoC3-422-AM(14)	なし	なし	なし
26	hApoC3-437-AM(14)	なし	なし	なし
27	hApoC3-442-AM(14)	なし	なし	なし
28	hApoC3-447-AM(14)	なし	なし	なし
29	hApoC3-492-AM(14)	なし	なし	なし
30	hApoC3-497-AM(14)	なし	なし	なし
31	hApoC3-502-AM(14)	なし	なし	なし
32	hApoC3-512-AM(14)	なし	なし	なし
