

インテリジェント人工核酸を搭載したナノ DDS による 革新的分子標的治療薬の研究

Study on Innovative Molecular Target Nano-Medicines Using Nano Delivery System Encapsulating Smart Synthetic Oligodeoxynucleotides

佐々木 茂貴 (SASAKI SHIGEKI)

九州大学・大学院薬学研究院・教授



研究の概要

本研究では、遺伝子応答性インテリジェント人工核酸を搭載した臓器特異的ナノ DDS を合成し、疾患モデル動物での機能検証を経て、2型糖尿病関連 mRNA および miRNA を標的とするナノ分子標的治療薬の創製を目指している。これまで、膵 β 細胞 MIN6 細胞における抗 miRNA-375 活性によるインスリン分泌増加に成功した。新しいアポトーシス阻害剤としてボンクレキシン酸アナログを開発した。高肝臓指向性 DDS としての MEND およびミトコンドリア最内部マトリクスへの高い送達能をもつ多重型 MITO-Porter を確立した。ノックアウトマウス作製によって肝臓 Drp1 遺伝子が 2型糖尿病の新しい治療標的として決定された。このように、目的達成に向け各要素技術が進歩し、さらにそれらの融合研究が順調に進んでいる。

研究分野：創薬化学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：核酸医薬、薬物送達、ナノメディスン、糖尿病、疾患モデルマウス

1. 研究開始当初の背景

アンチセンスや siRNA などの核酸医薬は標的 mRNA に作用して遺伝子発現を効果的に抑制する。また、核酸医薬の新しい作用として抑制的な役割の miRNA を阻害して結果的に発現を促進する効果が注目されている。しかし、これまで認可された核酸医薬は2種類しかなく、安定性を高める化学修飾技術、標的臓器への達性を高める DDS 技術、効果的な細胞内作用の実現など多くの課題が残されている。

2. 研究の目的

本研究では、有機合成化学、薬物送達学および内分泌代謝学を専門とするグループが連携し、2型糖尿病を具体的な標的疾患として核酸医薬の基盤技術を確立する。具体的には、遺伝子応答性インテリジェント人工核酸を搭載した臓器特異的ナノ DDS を合成し、疾患モデル動物での機能検証を経て、疾患関連 mRNA および miRNA を標的とするナノ分子標的治療薬の創製を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、糖尿病など複数遺伝子が関与する疾患に対する次世代医薬の基盤構築を目的に、疾患関連遺伝子を正確に標的化できる核酸医薬を搭載した臓器特異性をもつエ

ンベローブ型ナノ輸送システムによるナノ分子標的薬の創製を目指し、次の項目について検討する。

- (1)核酸医薬の設計 (佐々木、永次、新藤)
- (2)標的遺伝子の決定 (原島、野村)
- (3)目的臓器への輸送 (原島)
- (4)疾患モデル動物による検証 (野村)

4. これまでの成果

人工核酸：遺伝子配列特異的な応答性をもつ人工核酸の研究は佐々木グループと永次グループで行い、アデニン、シトシン、ウラシル、グアニン、それぞれに選択的な5種類の新しいクロスリンク核酸の開発に成功した。4種の塩基それぞれに特異的なクロスリンク分子は本グループの大きな特徴である。クロスリンク核酸安定誘導体であるメチルスルフィド体を2'-O-メチルRNAオリゴ核酸に組み込み、ルシフェラーゼ定常発現 HeLa 細胞に導入したところ、天然核酸に比べて効率的なルシフェラーゼ阻害活性を示した。クロスリンク部位依存的な遺伝子発現制御能を調べる目的で、中性条件下ウラシルとの選択的なクロスリンク分子を組み込んだ2'-O-メチルRNAを用いルシフェラーゼ mRNA と反応させた後、細胞内に導入したところ、翻訳領域でのクロスリンクは翻訳阻害を誘起し、

miRNA 結合領域でのクロスリンク mRNA では蛋白質発現活性化が起こることを明らかにした。インスリン分泌を制御する miRNA-375 制御配列を含むモデルルシフェラーゼ発現系を含む MIN6 細胞を用いて抗 miRNA 効果を評価し、ルシフェラーゼ活性が上昇することを確認した。さらに miRNA-375 制御系を含む MIN6 細胞でグルコース刺激によるインスリン分泌への効果を調べたところ、有意なインスリン分泌増加が確認された。部位特異的な RNA 修飾能をもつ人工核酸を開発し、条件をコントロールすることによって特異的にシトシン修飾とグアニン修飾を使い分けることが可能になった。さらにクリック反応を組み合わせ、様々な分子を RNA に導入する技術を確認し、遺伝子発現制御および検出法の基盤となる独自の技術の確立に成功した mRNA に対する簡便な部位特異的の化学修飾法はこれまでにない技術であり、化学修飾による RNA 機能の改変技術につながる学術的な価値があるものと考えられる。

新藤グループでは Bongkreikic acid (BKA) の量的供給可能な合成法を検討し、極めて効率的な合成法の確立に成功した。BKA が大量に確保できたことから、BKA のアポトーシス阻害作用の定量的評価が可能になり、さらに BKA の詳細な構造活性相関研究を達成した。

核酸デリバリーシステムの構築：原島グループでは膜透過性ペプチドであるオクタアルギニン (R8) を *in vivo* 肝臓へのデリバリーシステムに適用するため R8 ペプチドと細胞内のエンドソーム脱出促進可能な pH 応答性膜融合促進ペプチド (GALA) を組み合わせることで、pDNA 及び siRNA を肝臓に送達可能な R8-GALA-MEND の構築に成功した。ミトコンドリア標的型 DDS である MITO-Porter に細胞膜融合能を付加した多重型 MITO-Porter (Dual Function (DF)-MITO-Porter) を構築し、ミトコンドリア送達能を飛躍的に向上させた。さらに、本 DDS はミトコンドリア最内部マトリクスへの機能分子送達を実現し、mtDNA の標的化が可能である事を確認した。新藤グループとの共同で BKA 搭載 MITO-Porter が BKA の抗アポトーシス効果を 10-100 倍向上させることに成功し、マルチ標的化の可能性を示した。

疾患モデルマウス 野村グループでは膵β細胞株 MIN6 細胞を用いてオリゴ核酸による miR-375 の機能阻害によるインスリン分泌促進効果を確認した。肝臓は神経系を介した臓器間連関による代謝調節の担い手として現在注目されている。ミトコンドリア分裂因子である Drp1 の肝臓特異的ノックアウトマウスを作製したところ、インスリン抵抗性の改善と耐糖能の著明な改善、ならびに脂肪組

織におけるインスリン感受性の亢進が認められた。本実験結果は、肝臓の Drp1 が糖尿病治療の分子標的となることを示唆しており、今後、グループ間共同研究で siRNA および人工核酸を搭載した MEND を用い、肝臓での Drp1 阻害による全身のインスリン抵抗性改善治療効果の検証を行う。

5. 今後の計画

これまで各要素技術の開発は順調に進行し、共同研究へと展開してきた。今後はさらに融合研究を遂行しマウスによる *in vivo* での機能検証を行う。クロスリンク人工核酸はすでに MIN6 細胞における抗 miRNA-375 活性によるインスリン分泌増加に成功しているのので、膵β細胞(MIN6 細胞)を標的とした治療効果の検証を行う。さらに、ミトコンドリア tRNALeu(UUR) (A3243G 変異)の標的化について検討する。BKA アナログを人工核酸に搭載しマルチ標的化を検討する。官能基転移反を使った RNA 修飾によってタンパク質機能の制御法を確認する。肝臓 Drp1 遺伝子が 2 型糖尿病の新たな治療標的として決定されたので、肝臓指向性の高い MEND デリバリーシステムに siRNA および人工核酸を搭載し実験動物を用いて *in vivo* 機能を検証する。このように、研究期間内に各要素技術の集積により 2 型糖尿病を標的とした新しい治療標的を決定し、革新的な分子標的治療の基盤技術が確立できるものと確信している。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- (1) S. Sasaki, K. Onizuka, Y. Taniguchi, The oligodeoxynucleotide probes for the site-specific modification of RNA. *Chem. Soc. Rev.* **40** (12) 5698- 5706 (2011)
- (2) Y. Taniguchi, Y. Kurose, T. Nishioka, F. Nagatsugi, S. Sasaki, The alkyl-connected 2-amino-6-vinylpurine (AVP) cross-linking agent for improved selectivity to the cytosine. *Bioorg. Med. Chem.* **18**, 2894-2901 (2010)
- (3) K. Onizuka, Y. Taniguchi, S. Sasaki, A new usage of functionalized oligodeoxynucleotide probe for site-specific modification of a guanine base within RNA. *Nucleic Acids Res.* **38**, 1760-1766 (2010)
- (4) S. Imoto, T. Hori, S. Hagihara, Y. Taniguchi, S. Sasaki, F. Nagatsugi, Alteration of cross-linking selectivity with the 2'-OMe analogue of 2-amino-6-vinylpurine and evaluation of antisense effects. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20** 6121-6124 (2010)
- (5) Yamada Y, Harashima H. Delivery of bioactive molecules to the mitochondrial genome using a membrane-fusing, liposome-based carrier, DF-MITO-Porter. *Biomaterials*, **33**, 1589-95 (2012).

ホームページ等

<http://bioorg.phar.kyushu-u.ac.jp/>
e-mail:sasaki@phar.kyushu-u.ac.jp