

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「新機能創出を目指した分子技術の構築」  
研究課題「画期的な新規核酸医薬の  
分子技術の創出」

## 研究終了報告書

研究期間 2012年10月～2019年3月

研究代表者：横田 隆徳  
(東京医科歯科大学大学院  
医歯学総合研究科、教授)

## § 1 研究実施の概要

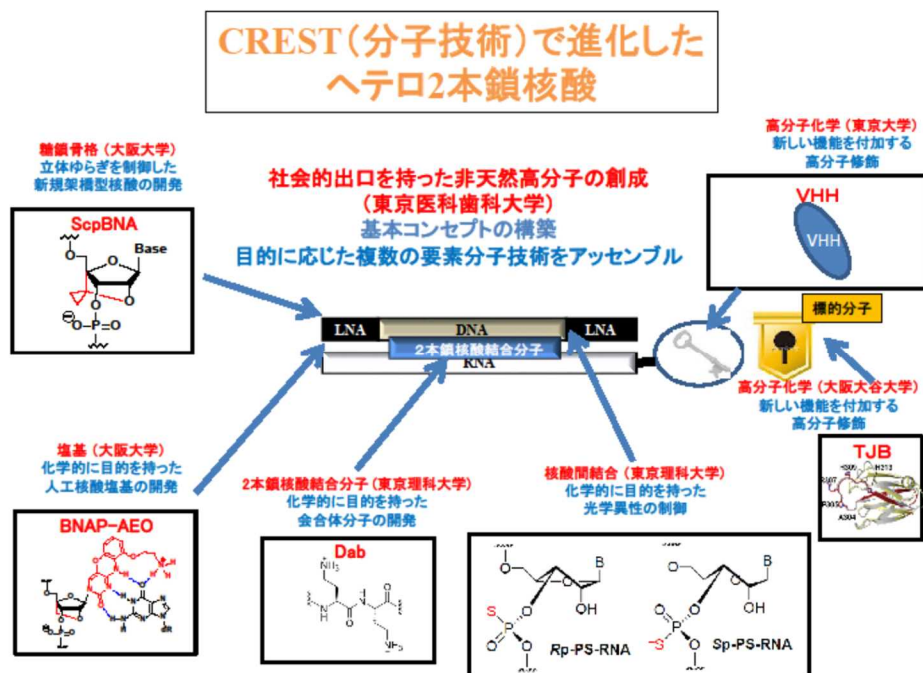
### (1) 実施概要

ヘテロ2本鎖核酸を共通のプラットフォームに、新規核酸医薬創製のための分子技術の開発を目指した。

「ヘテロ2本鎖核酸」や「リン原子上のキラリティー制御法」に対して、最大限の機能を発揮できる新たな糖鎖骨格修飾を目的とし、シクロプロパン導入型糖部架橋核酸

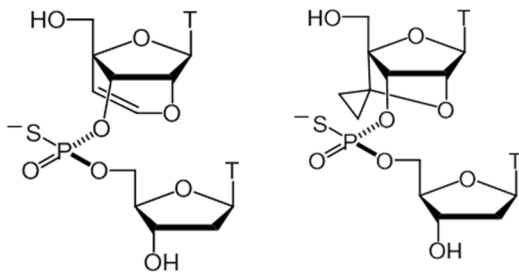
“scpBNA”、糖部エチレン架橋型核酸“DpNA”を開発した。DpNAは、DNAよりもRNAに対する選択的親和性を有し、scpBNAはプロトタイプの2',4'-BNA/LNAを上回る優れた二重鎖形成能と酵素耐性能を獲得することを見出した(小比賀グループ)。また、圧倒的な二重鎖形成能を目的として、フェノキサジン人工塩基導入型糖部架橋核酸“BNAP-AEO”を創成し、これまでに類を見ない高い二重鎖形成能に成功した(小比賀グループ)。さらに、核酸間結合の修飾としてリン原子上のキラリティーを十分に制御したホスホロチオエート型核酸誘導体を開発した(和田グループ)。

経口投与を可能とするために、2本鎖核酸に結合しヌクレアーゼ耐性を有する新規カチオン性人工オリゴ糖及び人工ペプチド(Dab)を開発した(和田グループ)。高度ヌクレアーゼ耐性ビタミンE結合型ヘテロ2本鎖核酸を、tight junction binder(TJB)であるm19と注腸併用投与することにより、*in vivo*で肝組織特異的な経腸送達に成功した(村上グループ)。また、ビタミンE結合型ヘテロ2本鎖核酸の有効性の機序として生体内の輸送蛋白を同定し、細胞質内での2本鎖分離及び細胞内輸送経路を明らかにした(横田グループ)。加えて、異なる分子構造で新規の薬効を示す各種第2世代のヘテロ核酸を複数種開発した。これによって従来型では困難であった標的分子の制御が可能となった。さらに特筆すべきは、「元気な老い」の実現に懸案であった核酸の血液脳関門の突破に成功して、アルツハイマー病など中枢神経疾患のヘテロ核酸による分子標的治療に大きな突破口ができた。(横田グループ)。標的臓器や細胞への特異的なデリバリーのために、ドメイン抗体とのコンジュゲート作製技術を確認し、一方でドメイン抗体探索を行いシングルドメイン抗体(VHH)の有力な特定配列の選定に成功した(津本グループ)。

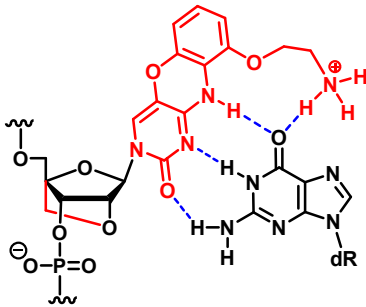


## (2) 顕著な成果

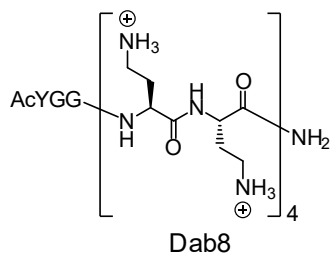
1. 新たな架橋型人工核酸としてエチレン架橋型核酸 (DpNA、左下図) 及びシクロプロパン導入型糖部架橋核酸 (scpBNA、右下図) を開発した (PCT/JP2015/054308)。scpBNA は、相補鎖 RNA に対して高い二重鎖形成能を保持しつつ、3' -エキソヌクレアーゼに対してプロトタイプ 2', 4' -BNA/LNA を上回る優れた安定性を示した。さらに、これらを用いてリン原子上のキラリティーを十分に制御したホスホロチオエート型核酸誘導体の合成にも成功し、ヘテロ 2 本鎖核酸の安全性向上に資する、そして他国に先駆けて核酸化学基盤技術を創生した。



2. プロトタイプ 2', 4' -BNA/LNA のメチレン架橋構造はそのままに、塩基部位に新たな修飾を施した糖部架橋核酸 “BNAP シリーズ” を開発した。BNAP シリーズ代表例として “BNAP-AEO (BNAP-AminoEthOxy)” (下図) を組み込んだオリゴ核酸は、グアニンを特異的に認識しつつ相補鎖核酸に対してこれまでに類を見ない圧倒的な二重鎖形成能に成功し、ヘテロ 2 本鎖核酸の更なる有効性向上に有用な塩基部修飾を見出した。



3. 人工カチオン性ペプチド Dab8 (下図) を添加することにより、RNase A による DNA/RNA 二本鎖の分解反応が阻害されるのに対し、RNase H による DNA/RNA 二本鎖の切断反応が促進されることを見出した。Dab8 が、ヘテロ 2 本鎖核酸の安定性を向上させると同時に、医薬としての活性を向上させることを期待できる特筆すべき成果である。



## < 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

### 1. ヘテロ 2 本鎖核酸の有効性機序解明及び各種第 2 世代ヘテロ 2 本鎖核酸の開発

概要：従来の核酸医薬よりはるかに高い有効性を示す「ヘテロ 2 本鎖核酸 (HD0)」の有効性の機序を明らかにして、アンチセンス核酸の副作用の軽減に成功し、これらの結果は Nature Communications に掲載された。さらに、異なる分子構造で新規の薬効を示す各種第 2 世代のヘテロ核酸を複数種開発して特許申請 (PCT/JP2014/003208、PCT/JP2014/002882、特願 2016-191548) をし、これらの知財を継承した医科歯科大発のバイオベンチャーが設立されて、ヘテロ核酸の臨床応用へ大きな進歩を果たした。

### 2. ヘテロ 2 本鎖核酸の基盤となる新規核酸化学の創成

概要：ヘテロ 2 本鎖核酸の有効性・安全性の向上の基盤となる、エチレン架橋型核酸及びシクロプロパン導入型糖部架橋核酸、BNAP シリーズ、人工カチオン性ペプチドなどの複数の新規核酸化学技術のアミダイト体の合成に成功し、安定供給可能な合成経路の確立ができたことから、製品販売化を実現できれば、現在、アカデミックや製薬企業を含めて精力的に研究が進められている核酸医薬開発において、幅広く活用できる可能性を秘めており、今後の核酸医薬・診断薬開発において大きな発展が見込める。

### 3. ヘテロ 2 本鎖核酸の DDS の開発

概要：細胞間隙経路特異的に腸管上皮透過を亢進する tight junction modulator とビタミン E 化学修飾を組み合わせることで、ヘテロ 2 本鎖核酸を消化管から有効に送達しできる技術を確立した。本技術は、新規合成核酸分子の経腸製剤化の基盤技術の一つとして、その実用化に寄与するものと期待される。さらに、血液脳関門の通過のヘテロ 2 本鎖核酸の分子構造の開発に成功して、アルツハイマー病など中枢神経疾患のヘテロ核酸による分子標的治療に大きな突破口ができた。

## § 2 研究実施体制

### (1) 研究チームの体制について

#### ① 横田グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
横田 隆徳	東京医科歯科大学脳神経病態学分野	教授	H24.10～H31.3
永田 哲也	同上	プロジェクト講師	H26.11～H31.3
仁科 一隆	同上	特任助教	H24.10～H28.3
石黒 太郎	同上	特任助教	H27.4～H27.9
由井 大錦	同上	特任助教	H27.4～H28.9
坂上 史佳	同上	特任助教	H27.4～H31.3
吉岡 耕太郎	同上	博士 特任助教	H25.4～H28.3 H28.4～H31.3
桑原 宏哉	同上	特任助教	H24.10～H30.3
浅田 健	同上	特任助教	H29.4～H30.3
朴 文英	同上	特任研究員	H24.10～H28.3
井原 健介	同上	特任研究員	H27.4～H28.3
吉田 規恵	同上	技術補佐員	H24.10～H31.3
宮田 悠	同上	技術補佐員	H29.4～H30.3
広瀬 貴子	同上	研究補助員	H26.4～H27.6
内田 紀美子	同上	研究補助員	H27.7～H29.3
仁科 智子	同上	博士	H24.10～H28.3
國枝 泰希	同上	博士	H26.4～H31.3
長谷川 樹里	同上	博士	H27.4～H31.3
浅見 裕太郎	同上	博士	H29.4～H31.3
Su Su Lei Mon	同上	博士	H29.4～H31.3
東 美和	同上	博士	H27.4～H29.3
銭谷 怜史	同上	博士	H27.4～H29.3
大谷木 正貴	同上	博士	H29.4～H31.3
小野 大介	同上	博士	H29.4～H31.3
佐野 達彦	同上	博士	H29.4～H31.3
沼田 純奈	同上	修士	H24.10～H26.3
筋野 裕美子	同上	修士	H25.4～H27.3
新田 佳子	同上	修士	H25.4～H27.3
下浦 貴大	同上	修士	H26.4～H28.3
安田 永智	同上	修士	H29.4～

研究項目

- ・ヘテロ2本鎖核酸の生体内および細胞内の輸送経路や標的遺伝子抑制の細胞内部位・抑制機構の検索
- ・新規ヘテロ核酸の創生

②和田グループ

研究参加者研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
和田 猛	東京理科大学 薬学部生命創薬科学科	教授	H25.4～H31.3
	東京大学大学院 新領域創成科学研究科	准教授	H24.10～H25.3
原(岩田) 倫太朗	東京理科大学 薬学部生命創薬科学科	助教	H25.4～H30.3
	東京大学大学院 新領域創成科学研究科	特任研究員(*)	H24.10～H25.3
額賀 陽平	東京理科大学 薬学部生命創薬科学科	博士研究員	H25.4～H29.3
	東京大学大学院 新領域創成科学研究科	博士	H24.10～H25.3
前田 雄介	東京理科大学 薬学部生命創薬科学科	博士研究員	H25.4～H28.3
	東京大学大学院 新領域創成科学研究科	博士	H24.10～H25.3
堀尾 裕人	東京大学大学院 新領域創成科学研究科	博士	H24.10～H27.3
植原 渉	同上	博士	H25.4～H26.3
土井 明子	同上	修士	H24.10～H25.3
濱村 友香	同上	修士	H24.10～H26.3
久田 有希	同上	修士	H25.4～H27.3
藤巻 春奈	同上	修士	H25.4～H27.3
佐伯 祐樹	東京理科大学 薬学部薬学科	学士	H27.4～H29.3
齋藤 竜也	東京理科大学 薬学研究科薬科学専攻	修士	H27.4～H29.3
吉野 怜次郎	同上	修士	H27.4～H29.3
小暮 智紀	同上	修士	H29.4～H30.3
末永 拓	同上	修士	H29.4～H31.3
佐藤 一樹	東京理科大学 薬学部生命創薬科学科	助教	H30.4～H31.3
松田 浩昌	東京理科大学 薬学部生命創薬科学科	社会人ドクター	H30.4～H31.3
高木 一憲	東京理科大学 薬学研究科薬科学専攻	修士	H30.4～H31.3

研究項目

- ・立体が制御されたホスホロチオエート結合を有する新規架橋型人工核酸の合成
- ・立体が制御されたボラノスフェート結合を有する人工核酸の合成
- ・高活性核酸医薬の分子選択とリン原子絶対立体配置の決定手法の開発
- ・カチオン性人工オリゴ糖および人工ペプチドによるヘテロ2本鎖核酸の安定化

③小比賀グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
小比賀 聡	大阪大学薬学研究科	教授	H24.10～H31.3
山本 剛史	同上	助教	H24.10～H27.3
中川 治	同上	特任講師(常勤)	H26.4～H31.3
山口 卓男	同上	特任助教(常勤)	H25.2～H26.3
大澤 昂志	同上	博士	H24.10～H27.3
下 剛典	同上	博士 修士	H26.4～H30.3 H25.4～H26.3
原 孝志	同上	博士 修士	H26.4～H29.3 H24.10～H26.3
堀場 昌彦	同上	博士 修士	H28.4～H31.3 H26.4～H28.3
岸本 悠希	同上	博士 修士	H29.4～H31.3 H28.4～H29.3
安原 秀典	同上	修士	H24.10～H26.3
藤井 茜	同上	修士	H29.4～H31.3

研究項目

- ・リン原子上のキラリティー制御に資する新規な架橋型人工核酸の設計・合成・機能評価

④村上グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
村上 正裕	大阪大谷大学薬学部薬学科	教授	H24.10～H30.3
堀切 勇児	同上	准教授	H26.10～H30.3
高間 雅志	同上	助教	H24.10～H26.3
渡辺 知恵	同上	CREST 研究員	H24.10～H26.3
渡辺 知恵	同上	助教	H26.4～H30.3
村上 かよこ	同上	非常勤職員	H26.4～H30.3
程 禎	同上	CREST 研究員	H26.4～H30.3
村尾 聡	同上	CREST 研究員	H29.2～H30.3

研究項目

- ・経口投与の達成のための分子技術の開発
- ・核酸分子の経腸送達技術に関する検討
- ・新規ヘテロ核酸分子の消化管安定性の評価

⑤津本グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
津本 浩平	東京大学大学院工学系研究科	教授	H24.10～H29.3
長門石 暁	同上	助教	H24.10～H29.3
Jose Manuel Martinez	同上	主幹研究員	H24.10～H29.1

Caaveiro			
秋葉 宏樹	同上	特任研究員	H26.4～H28.9
山崎 昌子	同上	研究補助員	H27.10～H28.3
西田 亜季	同上	学術支援専門職員	H28.1～H28.3
宮鍋 一紘	同上	研究補助員	H28.4～H29.3
坪倉 由美	同上	研究補助員	H28.6～H28.11
Adam Marcin Wawro	同上	特任研究員	H28.10～H29.3

#### 研究項目

・神経細胞系への DDS 分子技術の検討

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

#### 横田グループ

ヘテロ 2 本鎖核酸の MOE・cEt など IONIS 社独自の化学修飾核酸における有効性を共同研究で行い、共著で論文発表した。

#### 和田グループ

高活性核酸医薬の分子選択とリン原子絶対立体配置の決定手法の開発の研究項目に関して、東京大学工学部の鈴木勉教授との連携のもと、研究を遂行した。カチオン性人工オリゴ糖および人工ペプチドによるヘテロ2本鎖核酸の安定化の研究項目に関して、千葉工業大学の坂本泰一教授との連携のもと、研究を遂行した。

#### 村上グループ

吸収促進剤による核酸分子の腸管上皮透過及び脈管系(とくにリンパ系)を介した体内移行過程を可視化するために、動的評価については、川崎市産業振興財団ナノ医療イノベーションセンター・片岡一則センター長(前東京大学医学部及び工学部教授)、東京大学医学部耳鼻咽喉科・松本有助教、東京大学工学部・宮田完二郎准教授らのグループと、静的評価については、弘前大学医学部下田浩教授と協働して検討を行い重要な成果が得られた。

経消化管粘膜送達システムの基礎開発に関しては、大阪大谷大学及びCBC株式会社からの支援により、その基盤となる薬物担体を設計・試作し、特許出願(ヤヌス微粒子及びその製造方法PCT/JP2015/083082)した。