

革新的手法により核酸創薬の実用化へ道！

～ わずか 10 分で細胞質内に到達するオリゴ核酸医薬分子を開発 ～

このたび、名古屋大学大学院理学研究科の 阿部 洋 教授、シュー・ザオマ 大学院生、木村 康明 助教らの研究グループは、病気を治療するオリゴ核酸を細胞質内へ効率良く送達する技術を開発しました。

アンチセンス核酸^{注1)} や siRNA^{注2)} によるタンパク質発現抑制法は、従来の分子量が小さい医薬品では治療が困難な疾病に対する画期的な治療法として、大きな期待を集めています。しかしながら、薬効分子であるオリゴ核酸分子が細胞内に取り込まれにくいことが解決すべき課題でした。リポソーム^{注3)} などの細胞内導入法が一般的に用いられていますが、オリゴ核酸が細胞内小胞に 4 時間以上も留まり、細胞質内への移行が遅くなるのが問題となります。

本研究ではオリゴ核酸分子の末端にジスルフィド^{注4)} と呼ばれる分子構造を繰り返し導入することにより、10 分程度の短時間で高効率にオリゴ核酸を細胞質内に送達することが可能になりました。

本手法はオリゴ核酸の細胞内送達法として優れた手法であるため、今後、核酸医薬^{注5)} としての利用が期待されます

この研究成果は、平成 31 年 3 月 18 日付（日本時間 2 時）ドイツの国際的科学雑誌 *Angewandte Chemie International Edition* オンライン版に掲載されました。

【ポイント】

- ・ジスルフィド基がオリゴ核酸の細胞内取り込みを促進することを発見した。
- ・アンチセンス核酸・siRNA を数分程度で細胞質内へ送達できる。
- ・リポソーム法よりタンパク質発現抑制効果が高い。
- ・細胞毒性が無い。
- ・核酸医薬品として利用できる。

【研究背景と内容】

アンチセンス核酸や siRNA による遺伝子発現抑制法は、従来の低分子による医薬品では治療が困難な疾病に対する画期的な治療法として大きな期待を集めています。これらの核酸医薬品においては、薬効分子であるオリゴ核酸分子が負電荷を多く持っているため、細胞膜の透過効率が低いことが大きな問題でした。薬効を最大化するためには、細胞内へオリゴ核酸分子を入れることが重要です。この問題を解決する方法としてリポソームを用いる手法や、リガンド分子^{注6)}との複合体を用いる手法が知られていますが、これらは細胞質移行の効率の低さ、毒性、分子の不均一性などの観点で問題があるため、これらの問題を回避した新たな手法の開発が強く求められていました。

本研究では、オリゴ核酸分子の末端にジスルフィドと呼ばれる分子構造を繰り返し導入する分子設計を行いました。これはジスルフィド構造が細胞膜上のタンパク質が持つチオール^{注7)}と結合形成することで、細胞内取り込みを促進するような戦略です(図1)。

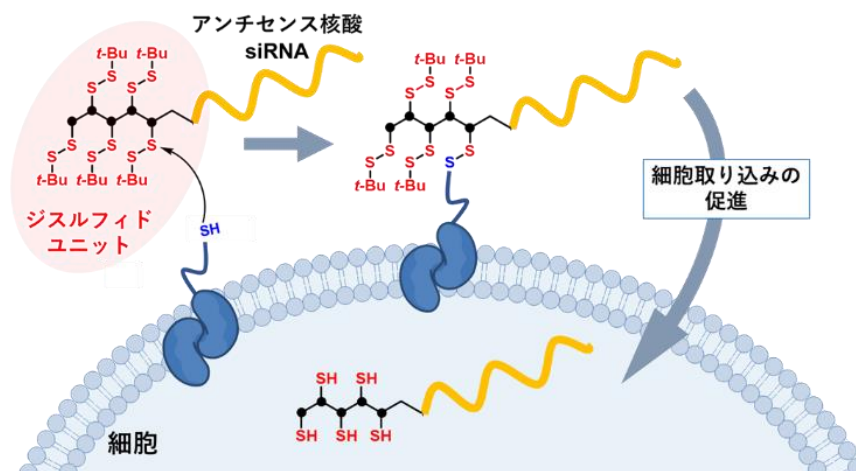


図1 開発した細胞内送達法のコンセプト

実際にジスルフィド分子ユニットを導入したオリゴ核酸(ジスルフィド核酸)の動態を解析したところ、効率よく細胞内に取り込まれることが分かりました。特筆すべきことに、この手法ではオリゴ核酸の細胞内への取り込みだけでなく、細胞質への移行も非常に効率的であることが分かりました。これらのオリゴ核酸は細胞質内に到達して初めて活性を発揮するため、細胞質内への効率的な送達は重要なファクター(要素)です。具体的には、従来法と今回の手法を用いて蛍光色素で標識したオリゴ核酸を投与し、その細胞内分布を観察しました。投与から10分後の蛍光画像が図2になります。従来のリポフェクション法^{注8)}では、オリゴ核酸はリポソーム^{注9)}と呼ばれる細胞小器官にとどまっているのに対し、新手法(ジスルフィド法)では大部

分のオリゴ核酸が細胞質内に分布しているのが分かります。なお、従来法では1時間を経過しても大部分のオリゴ核酸はリソソームにとどまっていたことから、今回の新手法の優位性が示されました。

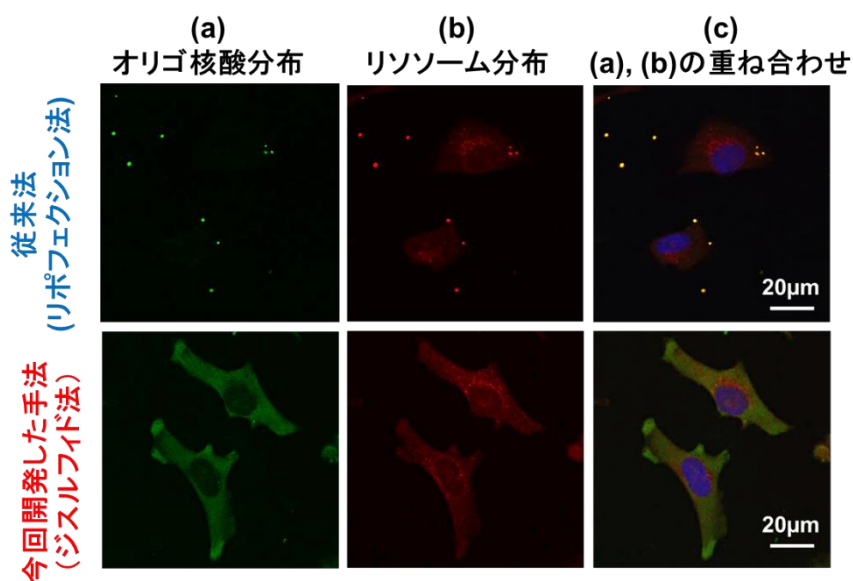


図2 従来法と新手法によるオリゴ核酸の細胞内送達の様子

さらに、ジスルフィドユニットを導入したオリゴ核酸は、リポフェクション法を上回る遺伝子発現抑制効果を示し、細胞毒性も観測されませんでした。

メカニズムに関する研究では、ジスルフィド核酸はミセル^{註1 0)}を形成していないことも分かりました。これは、分子組成をコントロールして投与することが可能であることを意味しており、医薬応用に向けて重要な性質です。また、細胞膜上のチオール分子と反応する試薬を投与すると、ジスルフィド核酸の細胞内取り込みが抑制されることから、設計どおりに、この分子は細胞膜上タンパク質のチオールを介して細胞内取り込みが促進されることが示唆されました。この新規の細胞内取り込み経路が、迅速な細胞質分布を可能にしていると推定されます。

【成果の意義】

本手法はオリゴ核酸医薬における長年の課題であったオリゴ核酸の細胞質内への迅速な送達を可能にした画期的な手法です。また、細胞質送達に加え、低毒性・単分散性など医薬応用に最適な分子特性も備えており、オリゴ核酸医薬の開発に大きなインパクトを与える研究成果であると言えます。実際に製薬会社との共同研究プロジェクトに向けて準備を進めています。この革新的手法が、患者さんを救う実用的技術となることを目指し、研究を推進しています。

【用語説明】

注1) アンチセンス核酸: 標的のメッセンジャーRNA に結合し、そのタンパク質合成を阻害する1本鎖オリゴ核酸分子。

注2) siRNA: 相補的な塩基配列を持つメッセンジャーRNA の酵素的分解を誘発する2本鎖RNA分子。

- 注 3)リポソーム:カプセル状の脂質 2 重膜でオリゴ核酸の送達技術として用いられる。
- 注 4)ジスルフィド:硫黄同士が共有結合で連結した分子の総称。
- 注 5)核酸医薬:オリゴ核酸分子を用いた医薬品。遺伝的疾患の治療を得意とする。
- 注 6)リガンド:受容体と結合する分子の総称。
- 注 7)チオール:水素化された硫黄を持つ有機化合物の総称。タンパク質中ではシステインの残基の部分構造である。
- 注 8)リポフェクション法:リポソームと呼ばれる両親媒性の分子から構成される複合体とオリゴ核酸を混合することで、オリゴ核酸の細胞内送達を行う手法。
- 注 9)リソソーム:様々な加水分解酵素を含む酸性環境の細胞小器官。細胞に取り込まれた生体高分子はこの小器官で分解される。
- 注 10)ミセル:両親媒性分子などが分子間力で会合して形成されるコロイド粒子。

【論文情報】

雑誌名 : Angewandte Chemie International Edition

論文タイトル : Disulfide-unit conjugation enables ultrafast cytosolic internalization of antisense DNA and siRNA

著者 : Zhaoma Shu, Iku Tanaka, Azumi Ota, Daichi Fushihara, Naoko Abe, Saki, Kawaguchi, Kosuke Nakamoto, Fumiaki Tomoike, Seiichi Tada, Yoshihiro Ito, Yasuaki Kimura and Hiroshi Abe

DOI: [10.1002/anie.201900993](https://doi.org/10.1002/anie.201900993)