

# 研究終了報告書

## 「Undruggable の RAS を標的とした自立型マイクロ RNA ナノ構造体の創製と RAS ネットワークの時空間的制御」

研究期間： 2019 年 10 月～2022 年 3 月

研究者： 宮本 寛子

### 1. 研究のねらい

RAS は全てのヒトのがんの 30%に共通ながん促進遺伝子であり、過去 30 年に渡り世界中で RAS の標的薬の開発がされている。しかし、RAS のタンパクの構造には低分子のポケットが狭く阻害剤の設計が難しいことから RAS は Undruggable な標的として広く認知されている。RAS を標的とした創薬には、革新的な戦略が求められる。マイクロ RNA は 22-25 塩基の短鎖ノンコーディング RNA で、細胞の運命を決定する重要な生命因子である。microRNA-143(miR-143) は、がん細胞に特徴的に低発現している腫瘍抑制型のマイクロ RNA である。miR-143 を miR-143 の低発現がん細胞へ補充すると、RAS の mRNA の 3' 非翻訳領域の 2 箇所に miR-143 が結合し、RAS ネットワークを多角的に破綻することで、アポトーシスが誘導され抗がん活性を示す。このような背景のもと、miR-143 は新規の RAS 標的医薬となることが期待される。miR-143 の実用化には、他の核酸医薬同様に遺伝子導入剤が必須である。既存の遺伝子導入剤であるカチオン性脂質は miR-143 を細胞へ送達し RAS のタンパク発現を抑制する。一方でカチオン性脂質による細胞毒性を生じることから、毒性のない遺伝子導入剤の開発が望まれる。2018 年に世界で初めて認可された RNA 医薬や 2019 年にスピード承認された COVID-19 の mRNA ワクチンは毒性を低減させた脂質ナノ粒子(LNP)が用いられている。これらの LNP の開発によって、RNA の創薬分野は急成長している。しかしながら、LNP を構成しているポリエチレングリコール脂質(PEG 脂質)に対する抗 PEG 抗体が誘導される現象 (Accelerated blood clearance; ABC 現象)や原因不明の副作用が知られ、投与された医薬品が効果を発揮できなくなる可能性や想定外の副作用の懸念が今後の課題である。本申請では、LNP とは異なる新規軸の遺伝子導入技術の開発として、自立型マイクロ RNA ナノ粒子の創製によってがん細胞の RAS を標的とした時空間的な制御を目指し研究を提案した。(730 字)

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本申請では、創薬が難航している RAS を標的とした画期的な治療薬としてマイクロ RNA に着目し、自立型マイクロ RNA ナノ粒子の創製とそのナノ粒子による miR-143 の送達によって RAS ネットワーク制御を目的に研究を実施した。本成果において、RNA 医薬自身で構造体を形成し、その構造によって遺伝子導入剤不要でマイクロ RNA を送達し、RAS ネットワークを抑制することを明らかにした。

新規軸の核酸ナノメディシン開発戦略として、人工核酸の設計によって「薬」と「運搬体」の双方を担う独自の自立型マイクロ RNA ナノ粒子を創製した(概要図)。本粒子は、負電荷の DNA と正電荷のヒストンタンパクの静電相互作用をからなるヌクレオソームに着想を得て設計した。数

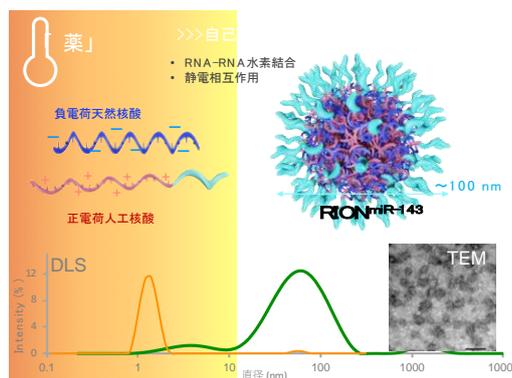


種類の分子設計から自己組織化核酸ナノ粒子を発見し、Reversibly ionic oligonucleotides-based nanostructures(RION)と命名した(搭載した核酸医薬の情報を示す場合は RION 核酸医薬と表記)。

RION<sup>miR-143</sup> は、マイクロ RNA-143(miR-143)の配列を含む2本鎖 RNA の塩基の水素結合と核酸の静電相互作用から形成された。自己組織化は、相補的塩基対の水素結合と、核酸骨格の負電荷と正電荷の静電相互作用を利用している。正電荷の人工核酸はアミン種を導入した骨格の核酸配列と親水部からなるジブロックコポリマーで、相補鎖の天然核酸とアニーリングするだけで自己組織化し粒径 100 nm 程度の RION<sup>miR-143</sup> を形成する。当初、静電相互作用の利用はその強い相互作用によって非特異的に凝集してしまうため、その粒子径をナノサイズに制御することが困難であった。さらにナノ粒子を形成してもマイクロ RNA をリリースせずに薬効を示さない可能性があったが、RION<sup>miR-143</sup> は溶液中でナノサイズの粒径を保ったまま孤立分散し、核酸医薬開発課題のひとつのヌクレアーゼ耐性を向上した。さらに、がん細胞や担がんモデルマウスを用いた送達評価において、マイクロ RNA-143 の運搬による抗がん活性を誘導することが明らかになった。本成果によって Undruggable な RAS 標的とする新規核酸ナノメディシンのプルーフオブコンセプトが実証された。

### <成果概要> 自立型マイクロRNAナノ粒子の創製と核酸医薬送達

RION<sup>miR-143</sup>: Reversibly ionic oligonucleotides-based nanostructures caged microRNA-143



- アニーリング操作
- 「薬」と「運搬体」の双方を担う
- 次世代の核酸ナノメディシン
- miR-143を搭載したRION<sup>miR-143</sup>
- ~100 nmの構造を形成
- RION<sup>miR-143</sup>は抗がん活性を誘導(in vitro)
- RASネットワーク抑制
- LNPフリーな運搬体
- JST支援で特許出願(特願2021-075651)
- in vivoにて抗腫瘍効果を誘導

概要図:本研究を通して、独自に創製した自立型マイクロ RNA ナノ粒子は“Undruggable“として世界的に広く認知されているがん促進遺伝子の RAS とそのネットワークを多角的に制御し、がんの細胞死の誘導を達成

(特 2021-075651・特願 2022-026023・PCT/JP2022/19343)。

#### (2) 詳細

##### 実施期間: 2019 年度

##### 研究テーマ A「自立型マイクロ RNA ナノ粒子の材料の人工核酸の創製に関する予備検討」

本研究は、自己組織化を利用した自立型マイクロ RNA ナノ粒子の創製を目指す。自己組織化は、核酸の塩基相補性と人工核酸による静電相互作用が関与することを期待している。静電相互作用は、天然核酸の負電荷と人工核酸の正電荷の相互作用を想定し、2019 年度は、構造形成の正電荷の人工核酸の合成を検討した。一般的に、RNA は DNA よりも高価な分子であるかつ、酵素分解を受けやすい不安定な分子であることから、まずは、DNA を用いて数 pmol

~nmol の微量スケールで合成検討を行った。

### 研究テーマ B「モデル配列ルシフェラーゼ siRNA のセンス鎖のカチオン化と自己組織化の検討」

モデル配列としてルシフェラーゼの siRNA を用いた合成に展開した。正電荷導入人工核酸は、既知の合成反応であるチオール化核酸への置換反応を用いて検討し、親水部と正電荷骨格の人工核酸からなるコンジュゲート体の合成方法が確立した。さらに、自立型ルシフェラーゼ siRNA ナノ粒子の形成を評価した。蛍光分子を導入して自立型ルシフェラーゼ siRNA の共焦点顕微鏡像を観察したところ、構造体の形成が確認された。動的光散乱法(DLS)で粒径を測定したところ、粒径にばらつきはあるが構造を形成していた。構造体の細胞取り込みや、RNAi 活性の予備的検討から構造体の遺伝子導入が可能であることが示唆された。

#### 実施期間: 2020 年度

### 研究テーマ C「RAS 標的配列 miR-143 の P 鎖のカチオン化と自己組織化の検討」(成果図(A))

自立型マイクロ RNA ナノ粒子の創製とその構造体による miR-143 の送達によって RAS ネットワーク制御を達成することを目的に、マイクロ RNA-143 配列を用いて正電荷人工核酸の合成と負電荷核酸とのアニーリングによる構造形成評価、さらに K-Ras 変異大腸癌細胞(DLD-1)を用いて RAS ネットワーク制御の評価を行なった。直径 100 nm 程度の自立型マイクロ RNA ナノ粒子の創製を達成し、miR-143 の配列からなるナノ粒子を Reversibly ionic oligonucleotides-based nanostructure(RION<sup>miR-143</sup>)と命名した。RION<sup>miR-143</sup> は、有効な血清耐性を示した。

### 研究テーマ D「RION<sup>miR-143</sup> の in vitro での送達評価」(成果図(B))

マイクロ RNA 送達評価において、RION<sup>miR-143</sup> は DLD-1 の細胞生存率を低下させた。タンパク発現評価より、K-Ras、Akt の K-Ras ネットワークを抑制していることがわかった。共焦点顕微鏡の観察により RION<sup>miR-143</sup> を構成するマイクロ RNA-143 のガイド鎖は細胞に取り込まれ細胞質に局在していることがわかった。スクラッチ評価による細胞の遊走の抑制と 3D 培養による細胞増殖抑制においても有効性が示された。研究開始当初は、強い相互作用の静電相互作用を利用した構造体はナノ粒子を形成してもマイクロ RNA をリリースせずに送達効果がない可能性があったが、本成果によって自立型マイクロ RNA ナノ粒子の RION<sup>miR-143</sup> は K-Ras ネットワークタンパク質の発現を抑制し DLD-1 増殖を抑制する次世代の RAS 医薬となる可能性が示された。

#### 実施期間: 2021 年度

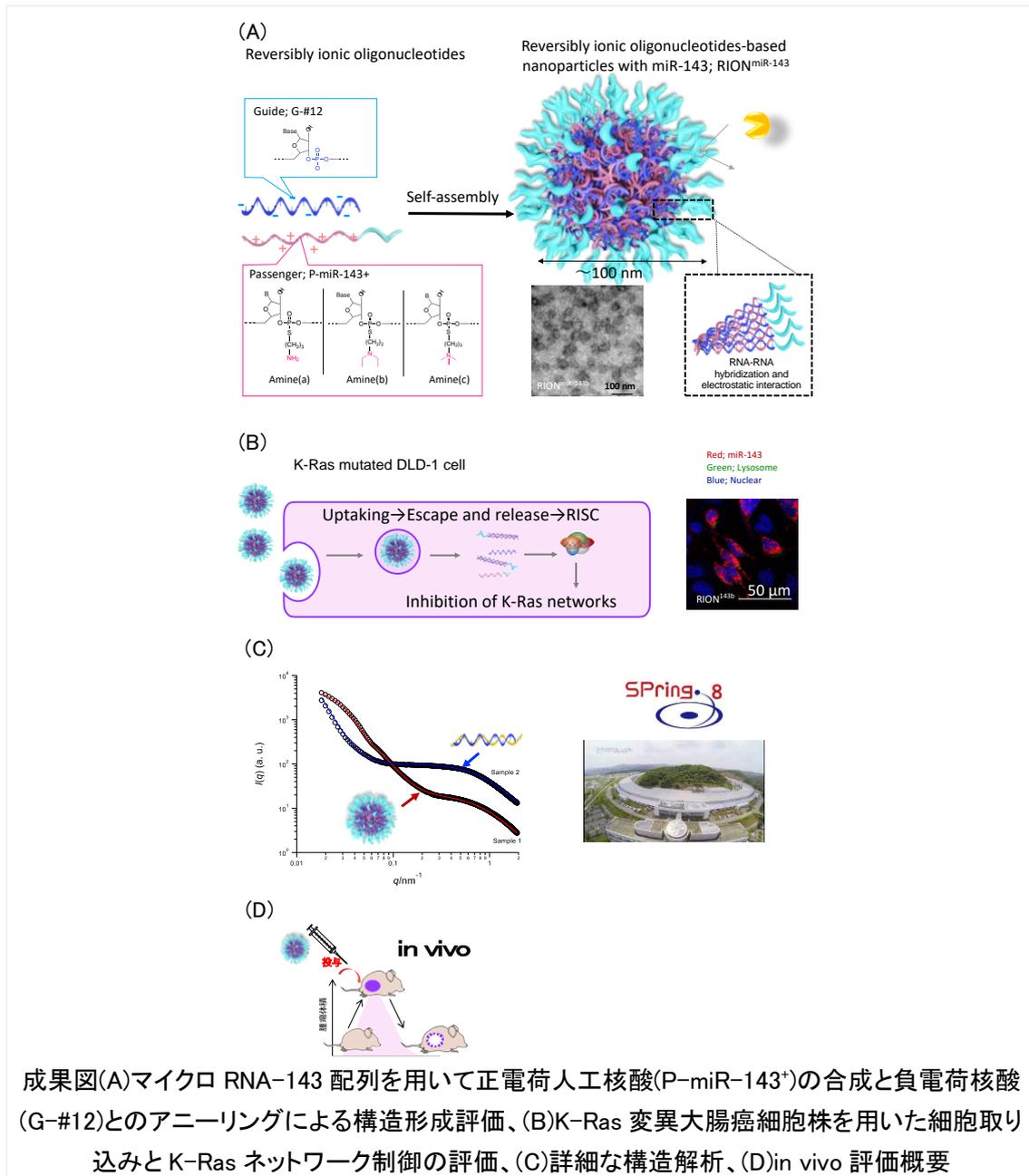
### 研究テーマ E「RION<sup>miR-143</sup> の構造の精密評価」

RION のプループオブコンセプトが実証されたが、導入するアミンの種類や親水部の導入によって、粒子径や送達効率に違いがあることがわかってきた。分子設計を変えることで(人工核酸の正電荷の分子の種類や親水部の体積分率の違い)、細胞に取り込まれず、抗がん活性を誘導しない 100 nm 程度の RION や異なる粒子系の RION がみついている。「安定な構造形成による運搬の向上」と「構造体崩壊による薬理の向上」は科学的には二律背反した現象であり

RION の構造体の形成について詳細な理解が必要である。大型放射光施設(SPring-8)の小角 X 線散乱(SAXS)にて構造体の詳細を評価した(成果図 C)。まず、RAS ネットワークを多角的に抑制した第 3 級アミンを導入した RION<sup>miR-143</sup> の構造形成を評価した。その結果、RION<sup>miR-143</sup> は溶液中でナノサイズの粒径を保ったまま孤立分散し、従来の LNP のようなベシクルやミセルではなく、高分子鎖が会合した球状のナノ粒子であることが明らかとなった。このとき、コアシェル様構造体ではないこともわかった。今後、構造形成の形成過程と崩壊をリアルタイムで解析しさらに理解を深めたい。

#### 研究テーマ F「RION<sup>miR-143</sup> の in vivo での抗腫瘍効果の検討」

In vitro で有効性が実証された RION を in vivo へ展開し大腸がん担持マウスにおける抗腫瘍効果を評価した(成果図 D)。独自に創製した自立型マイクロ RNA ナノ粒子の RION<sup>miR-143</sup> は K-Ras ネットワークタンパク質の発現を抑制し DLD-1 の生存率の低下を誘導したことから RAS 医薬となる可能性が示された。得られた成果を元に JST 支援で特許出願した(特願 2021-075651・特願 2022-026023・PCT/JP2022/19343)。



成果図(A)マイクロ RNA-143 配列を用いて正電荷人工核酸(P-miR-143<sup>+</sup>)の合成と負電荷核酸(G-#12)とのアニーリングによる構造形成評価、(B)K-Ras 変異大腸癌細胞株を用いた細胞取り込みと K-Ras ネットワーク制御の評価、(C)詳細な構造解析、(D)in vivo 評価概要

### 3. 今後の展開

COVID-19 が世界に蔓延し、パンデミックで未曾有な危機の最中、革新的なバイオテクノロジーの結集が 1 年弱という凄まじいスピードで mRNA ワクチンを生み出した。パンデミック以前に基礎研究が十分なされていたことが本成果を齎した。mRNA ワクチンは、最適化された mRNA の核酸分子と運搬体の脂質ナノ粒子が用いられた核酸ナノメディシンである。このコロナ危機の技術革新を通して、核酸ナノメディシンの開発は大きくパラダイムシフトした。

本研究はこの核酸ナノメディシンの分野の研究であり実用化への展開を期待する。本研究で独自に開発した自己組織化核酸ナノ粒子の RION は、生体分子の核酸を改良したもので従来の核酸自動合成にて設計でき、天然核酸と相補鎖の人工核酸のアニーリングのみの簡単な操作によって形成される。LNP などの運搬体の添加が不要な運搬システムである。開発が難航し

た RAS ネットワークを制御する miR-143 の送達によって有用性が示された。今後は、他の核酸医薬の送達や体内動態の制御技術の確立を通し社会に貢献できるよう基礎研究を推進したい。

#### 4. 自己評価

本研究では、人工核酸の設計によって「薬」と「運搬体」の双方を担う新規軸の核酸ナノメディシン開発戦略を構想し、独自の自立型マイクロ RNA ナノ構造体を創製し、RAS ネットワークの制御を達成した。本領域では研究総括及び領域アドバイザーより成果が全くない時点で独自構想を評価してもらい、チャレンジする機会を得て、プラットフォームとしてのプルーフオブコンセプトを達成することができた。本構想はシンプルな発想ではあるが、実際は核酸分子を扱うのは難しく、やってみないとわからない、つまり、失敗する可能性がある中でプルーフオブコンセプトを達成した。本研究を通して、研究者としてステップアップしたと自己評価したい。次のステップとしては、RION の可能性をさらに追求することであり、研究者として取り組むべきテーマに出会えた。

「生命と化学」領域では“生命の不思議”にチャレンジする多くの魅力的な研究者の方がいることは大変刺激になった。本研究は応用の研究分野であることから他の分野の人に魅力を伝える難しさと学術意義について、幾度となく自問自答した。そのような中、コロナ危機に直面し、基礎研究でありながら応用出口に近い本研究の研究意義と有用性を確信した。本研究で着目した正電荷の核酸分子自体は 1980 年代に開発された分子であるが、本研究において自己組織化科学と融合し核酸運搬体としての新たな価値を創出した。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:0件 (投稿中 1件)

##### (2) 特許出願

研究期間全出願件数:1 件(特許公開前のもも含む)

1	発 明 者	宮本 寛子
	発 明 の 名 称	カチオン性人工核酸を用いた DNA・RNA 医薬の導入法
	出 願 人	国立研究開発法人科学技術振興機構
	出 願 日	2021/4/28
	出 願 番 号	特願 2021-075651・特願 2022-026023・PCT/JP2022/19343
	概 要	本発明の目的は、動物細胞へ安全に核酸医薬を導入しその医薬の有効性を発揮できる、新しい核酸医薬導入法を提供することにある。 本発明は、カチオン含有人工核酸誘導体を合成し、静電相互作用によって天然核酸と構造体形成するナノ粒子が、動物細胞へ核酸医薬を導入し、さらにその医薬が機能することを見出した。

##### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

<学会発表(国内)>

宮本寛子・北出幸夫, RAS ネットワーク抑制マイクロ RNA 送達技術の開発, 第 37 回日本 DDS



学術集会, 千葉(ハイブリット), 2021 年 6 月 29-30 日

<学会発表(国外)>

Miyamoto Noriko and Kitade Yukio, Self-assembled nanostructure of reversible ion oligonucleotides (RIO), including microRNA-143, inhibits the growth of K-Ras mutant colon cancer, Pacificchem 2021, Hawaii(visual), US, December 16-21 2021

<招待講演>

宮本寛子、核酸ナノメディシンの開発、第 3 回 Deut-Swotch セミナー、オンライン開催、2021 年 7 月 16 日

