

哺乳類細胞内のRNAを低分子で制御する技術

沖縄科学技術大学院大学 核酸化学・工学ユニット
教授 横林 洋平



OKINAWA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY GRADUATE UNIVERSITY
沖縄科学技術大学院大学

遺伝子スイッチ

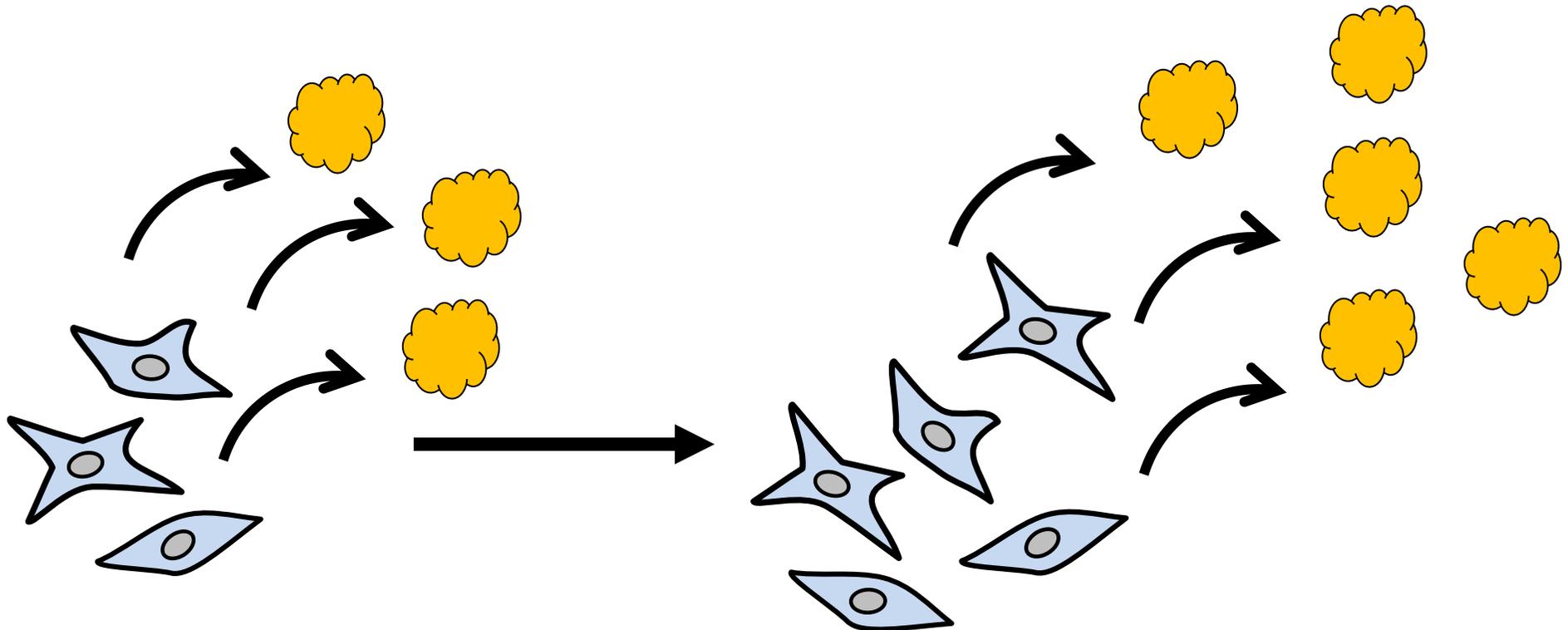
低分子化合物を投与 → タンパク質発現↑ ↓

哺乳類細胞・動物・ヒトで機能する遺伝子スイッチの応用

- 遺伝子（タンパク質）機能の解析
- 有用物質（二次代謝物・タンパク質・ウイルスベクター）の生産
- 遺伝子治療・細胞治療・再生医療

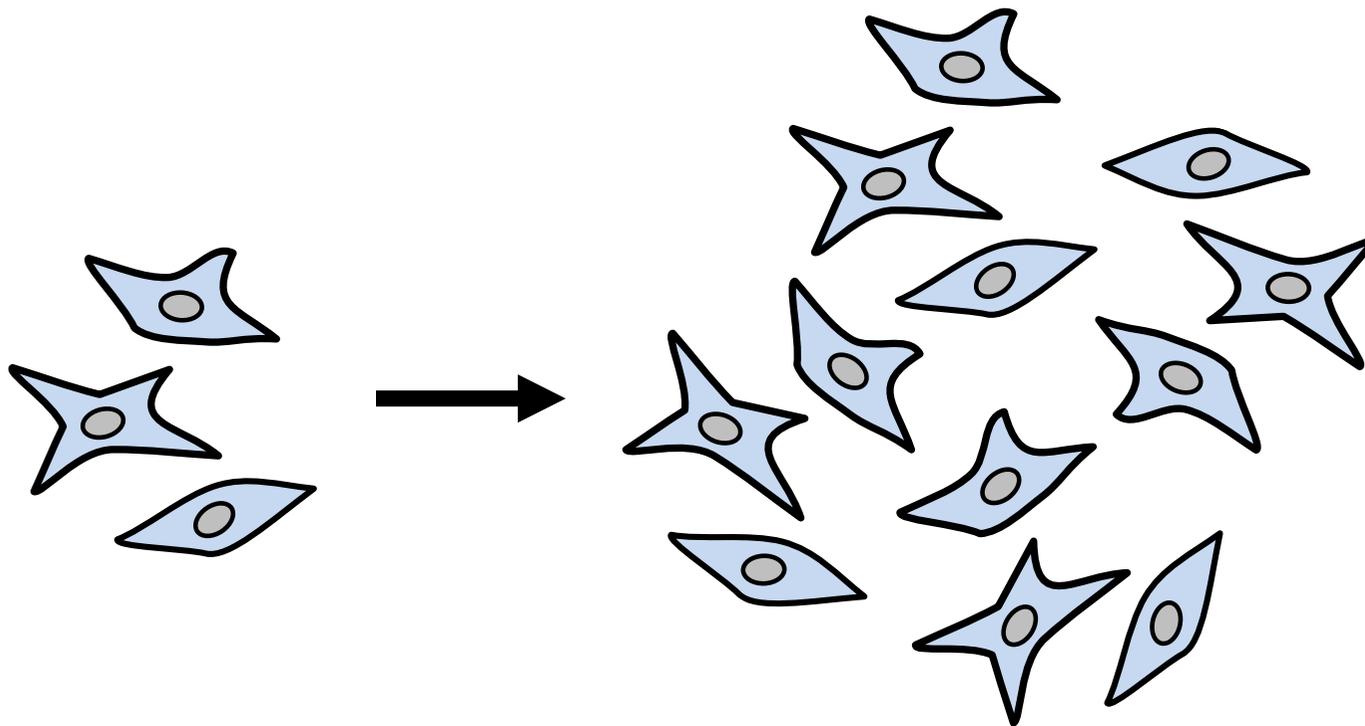
遺伝子スイッチ

タンパク質（生物製剤）生産



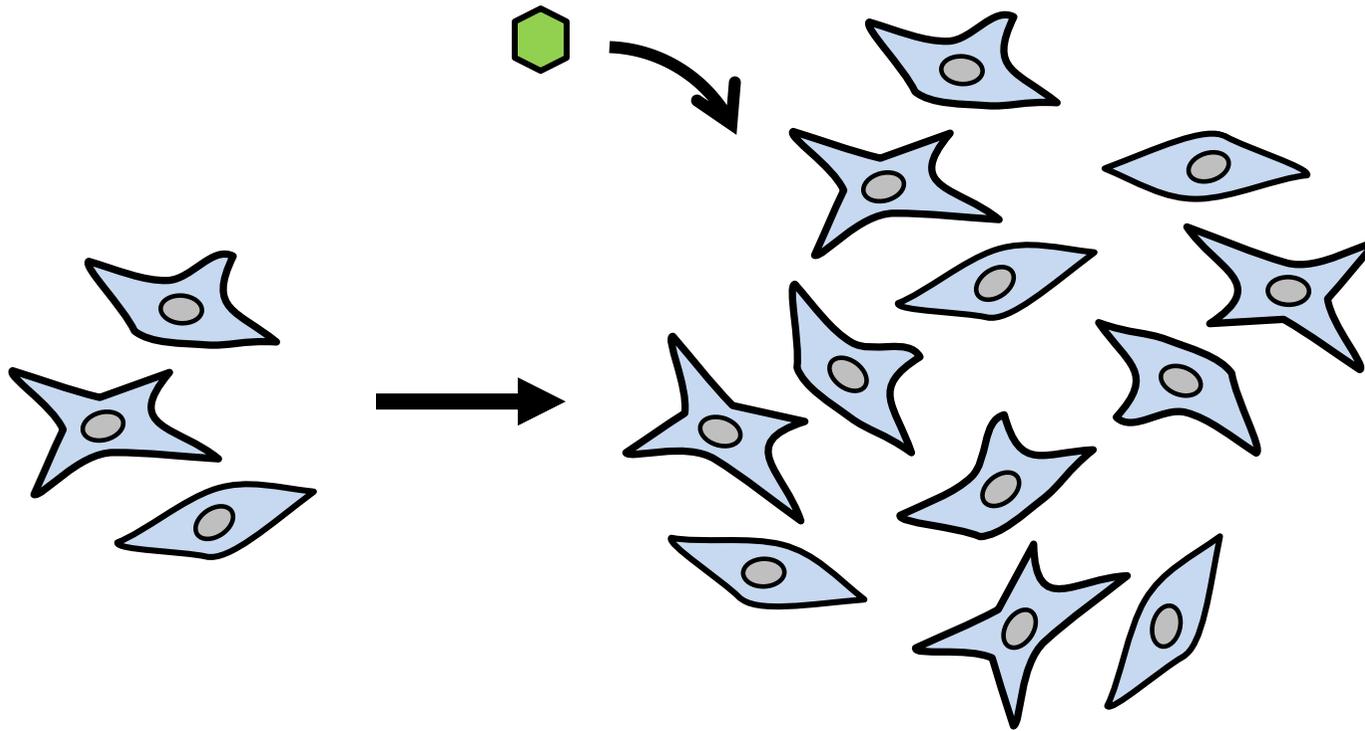
遺伝子スイッチ

タンパク質（生物製剤）生産



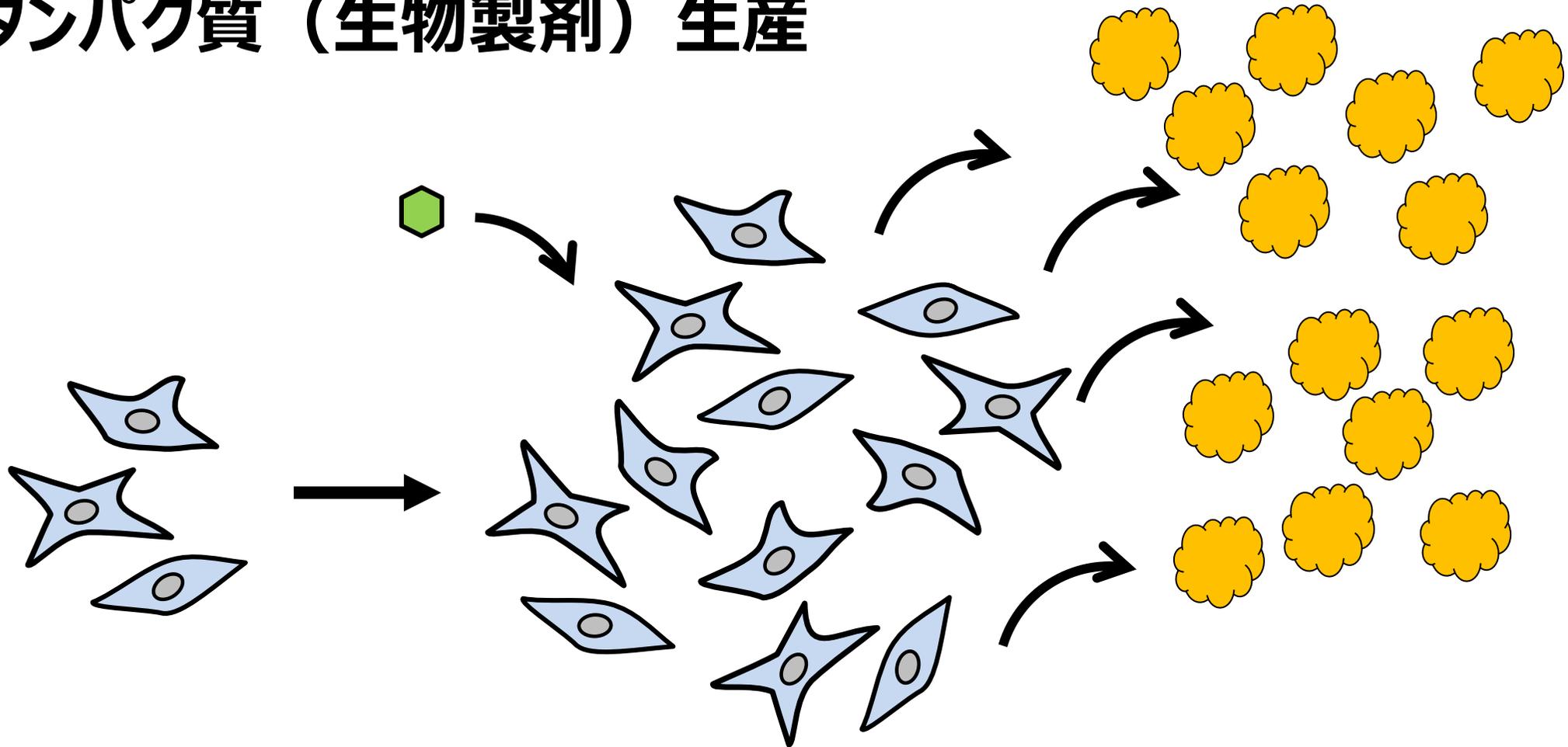
遺伝子スイッチ

タンパク質（生物製剤）生産



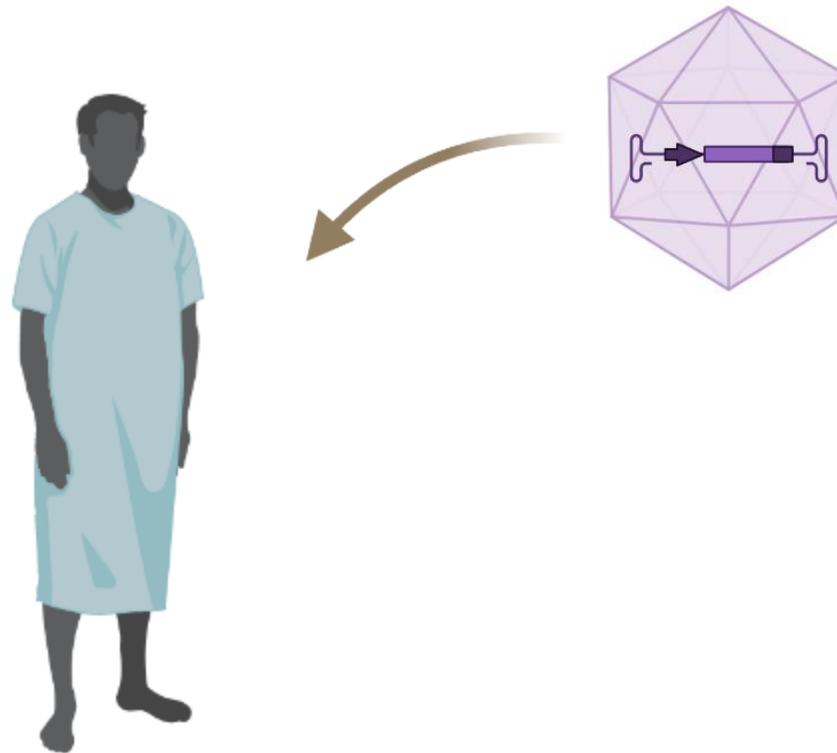
遺伝子スイッチ

タンパク質（生物製剤）生産



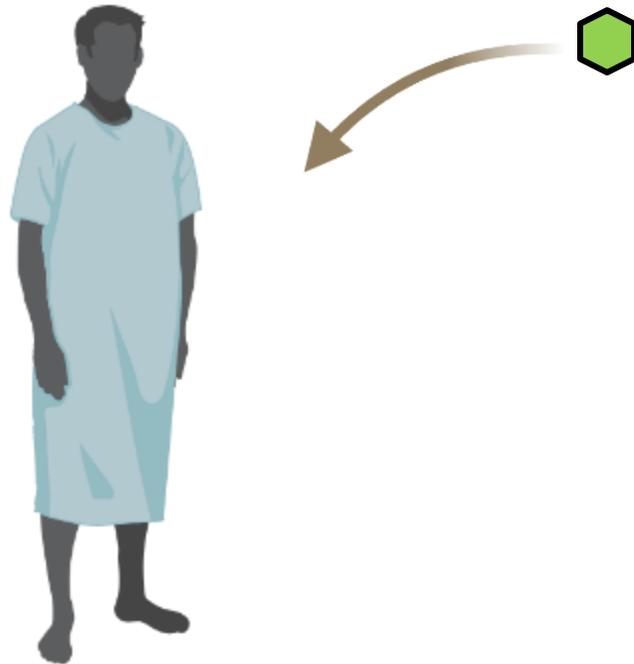
遺伝子スイッチ

遺伝子治療



遺伝子スイッチ

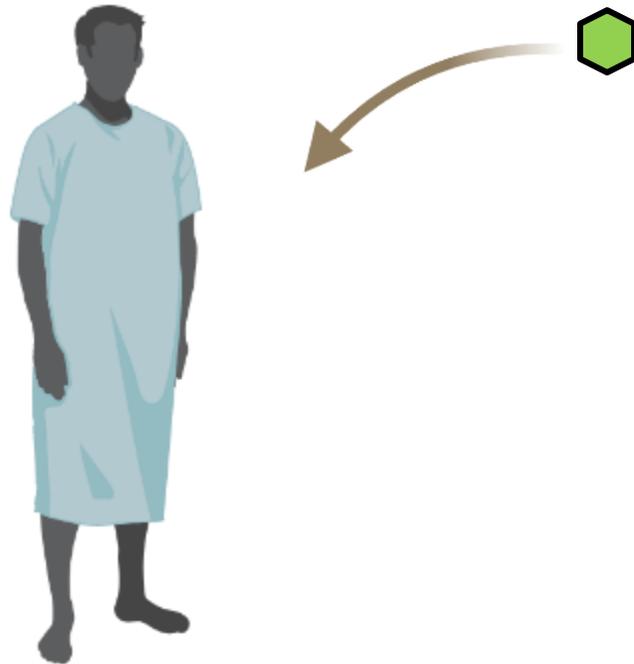
遺伝子治療



- ウイルスベクターを投与
- 低分子薬を投与することにより、治療用タンパク質発現のレベル・タイミングを制御

遺伝子スイッチ

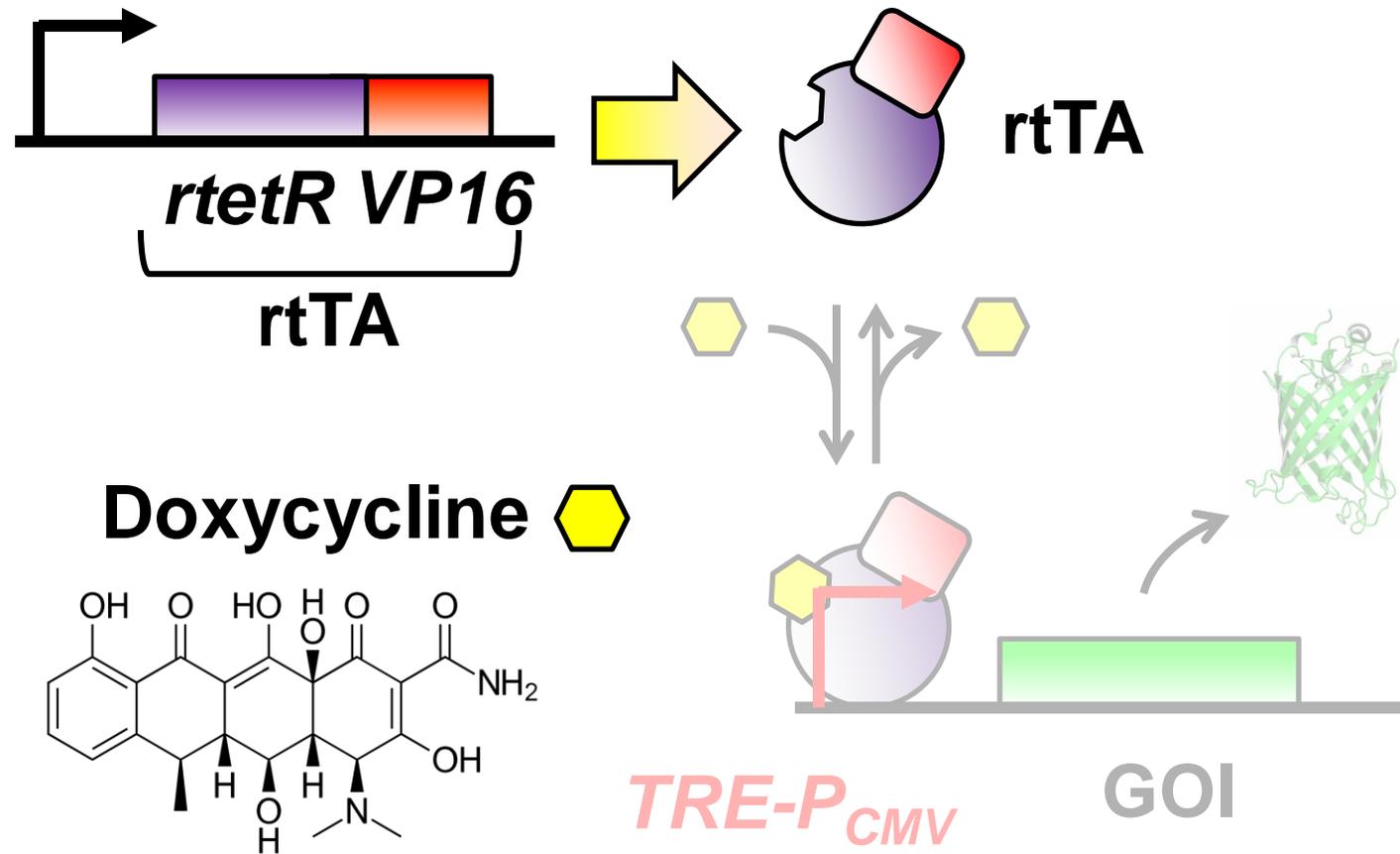
遺伝子治療



- ウイルスベクターを投与
- 低分子薬を投与することにより、治療用タンパク質発現のレベル・タイミングを制御
- 重大な副作用→タンパク質発現ストップ・ベクター除去 (Kill switch)

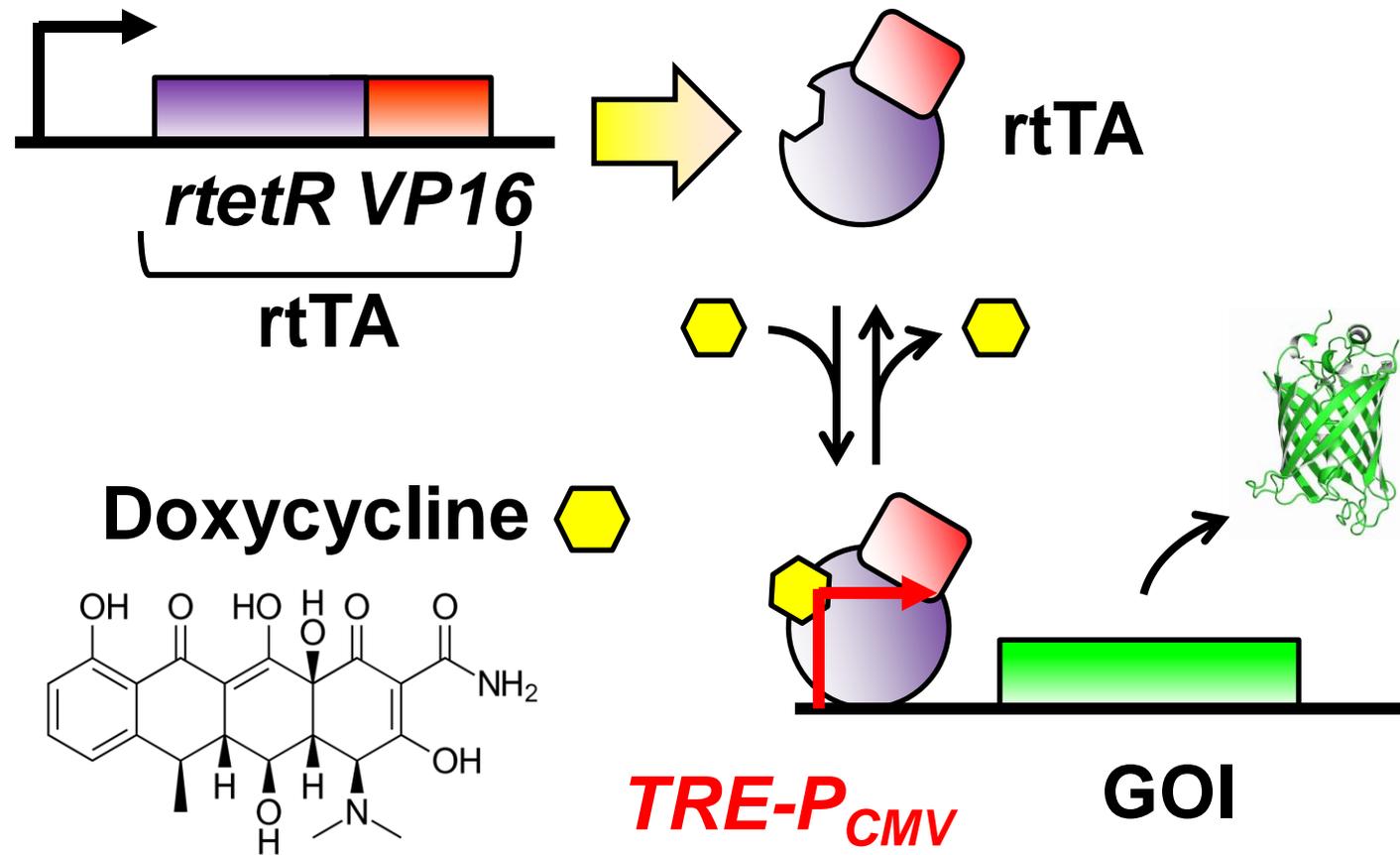
遺伝子スイッチ

従来技術：人工転写因子



遺伝子スイッチ

従来技術：人工転写因子



遺伝子スイッチ

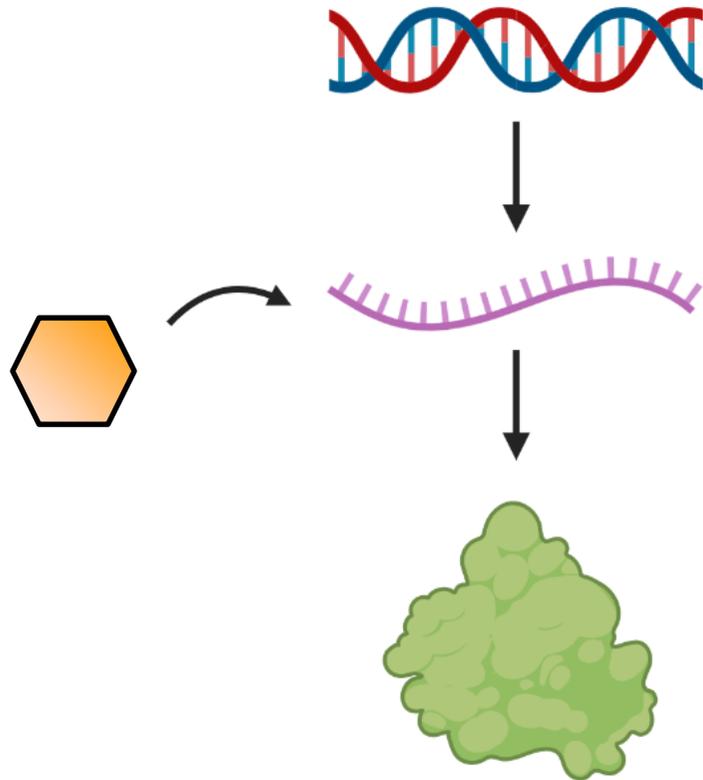
従来技術：人工転写因子

問題点

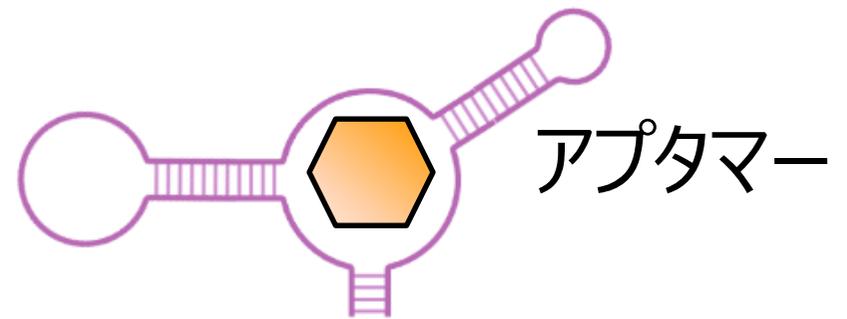
- 人工（外来性）転写因子（免疫原性、大きな遺伝子サイズ、宿主細胞代謝ストレス）
- 目的遺伝子は人工プロモーター制御下
- 転写因子とプロモーターの量比の最適化
- 新しい化合物に応答する系を構築することが困難

遺伝子スイッチ

従来技術：リボスイッチ



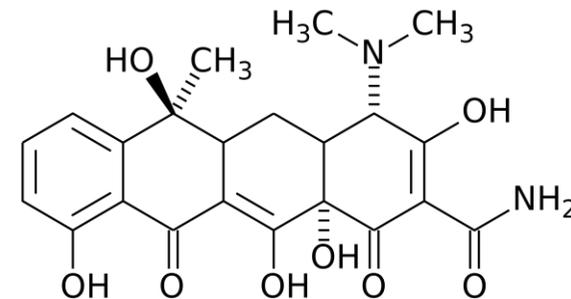
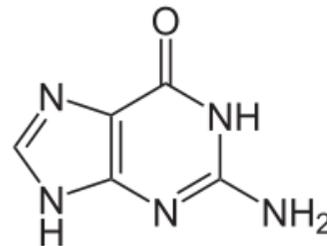
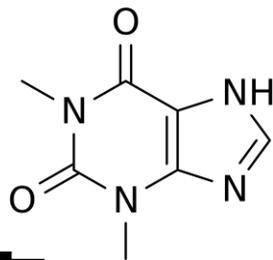
- 外来性タンパク質がない
- 遺伝子サイズが小さい
- SELEXにより、さまざまな化合物に結合するアプタマーが得られる可能性



遺伝子スイッチ

従来技術：リボスイッチ

- Theophylline, Guanine, Tetracyclineなど



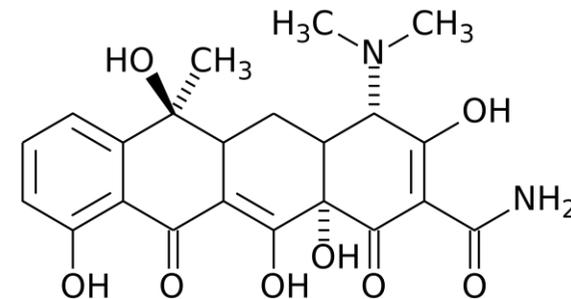
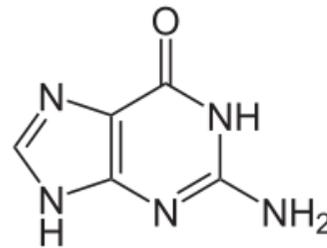
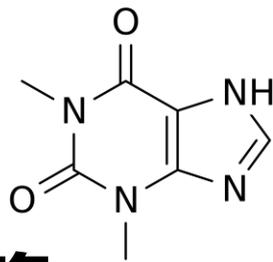
問題点

- >100 μM 投与が必要
- そもそも哺乳類リボスイッチへの応用を念頭においた、低分子化合物の選定が行われていない（低毒性、細胞透過性など）
- SELEXで得られたアプタマーが、哺乳類細胞内で結合能を示し、リボスイッチとして機能するという保証がない（実際機能しないことが多い）

遺伝子スイッチ

従来技術：リボスイッチ

- Theophylline, Guanine, Tetracyclineなど



解決策

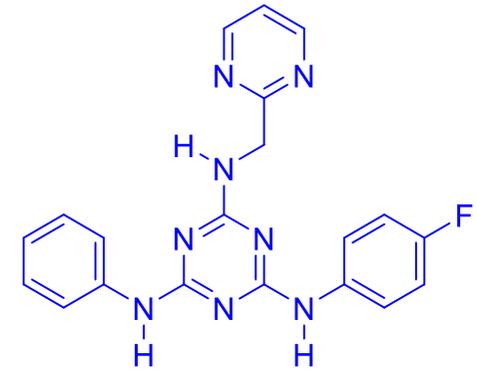
- 哺乳類リボスイッチへの応用を念頭に、化合物を選定
- それらの化合物に結合するRNAアプタマーをSELEX法により取得
- 哺乳類細胞内でリボスイッチとして機能する化合物-アプタマーペアを探索
- **2組の化合物-アプタマーペア取得に成功**

新規技術

低毒性化合物（ASP2905）結合アプタマー（AC17-4）

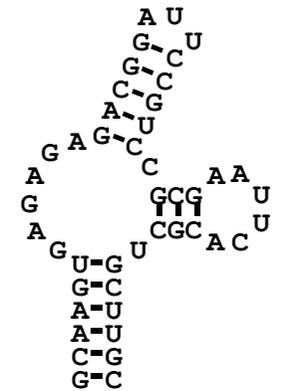
ASP2905（アステラス製薬）

- 神経疾患医薬として開発。第I相臨床試験通過

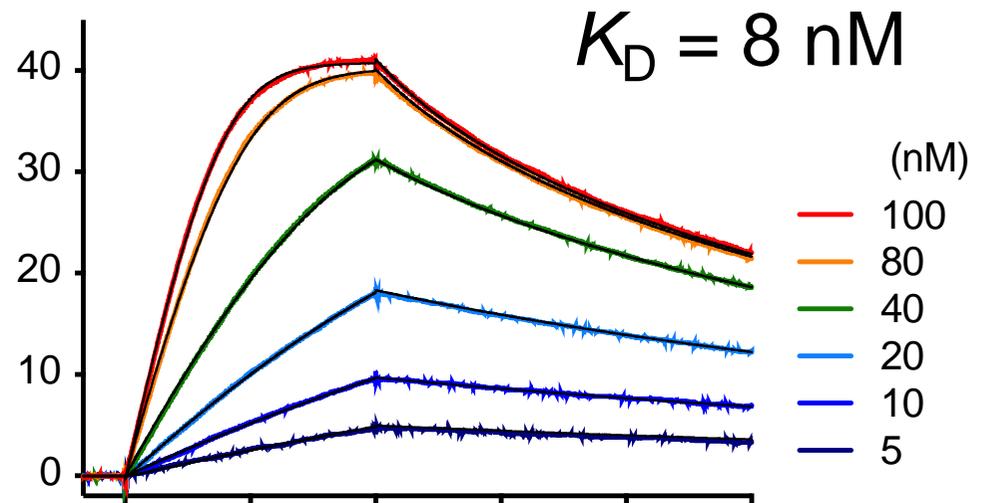
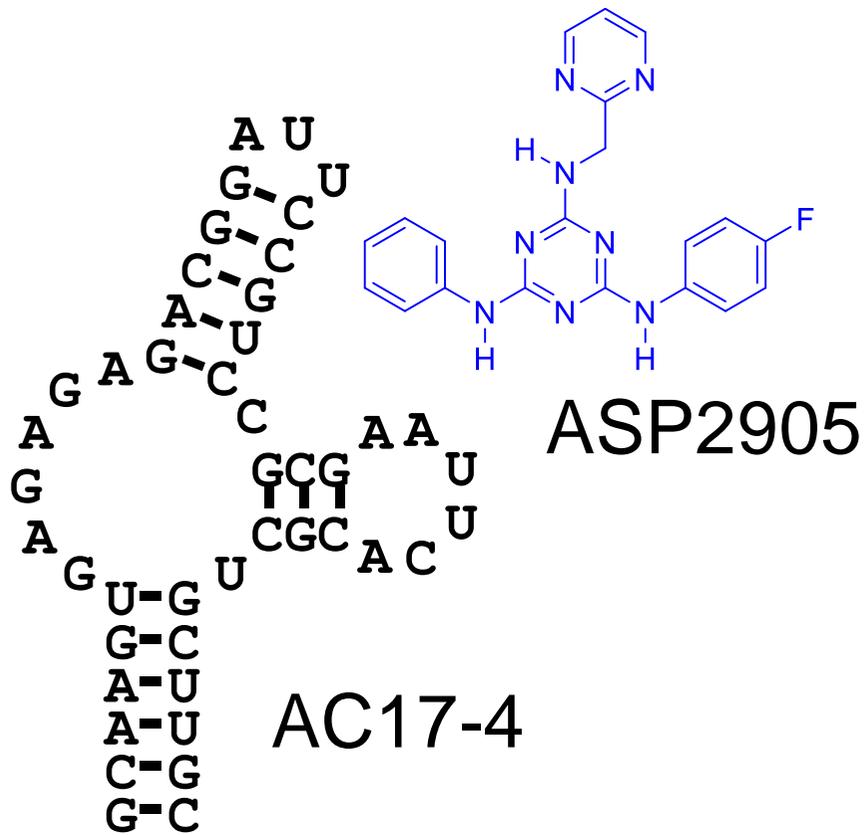


AC17-4

- ASP2905およびASP7967を哺乳類細胞内で選択的に認識・結合

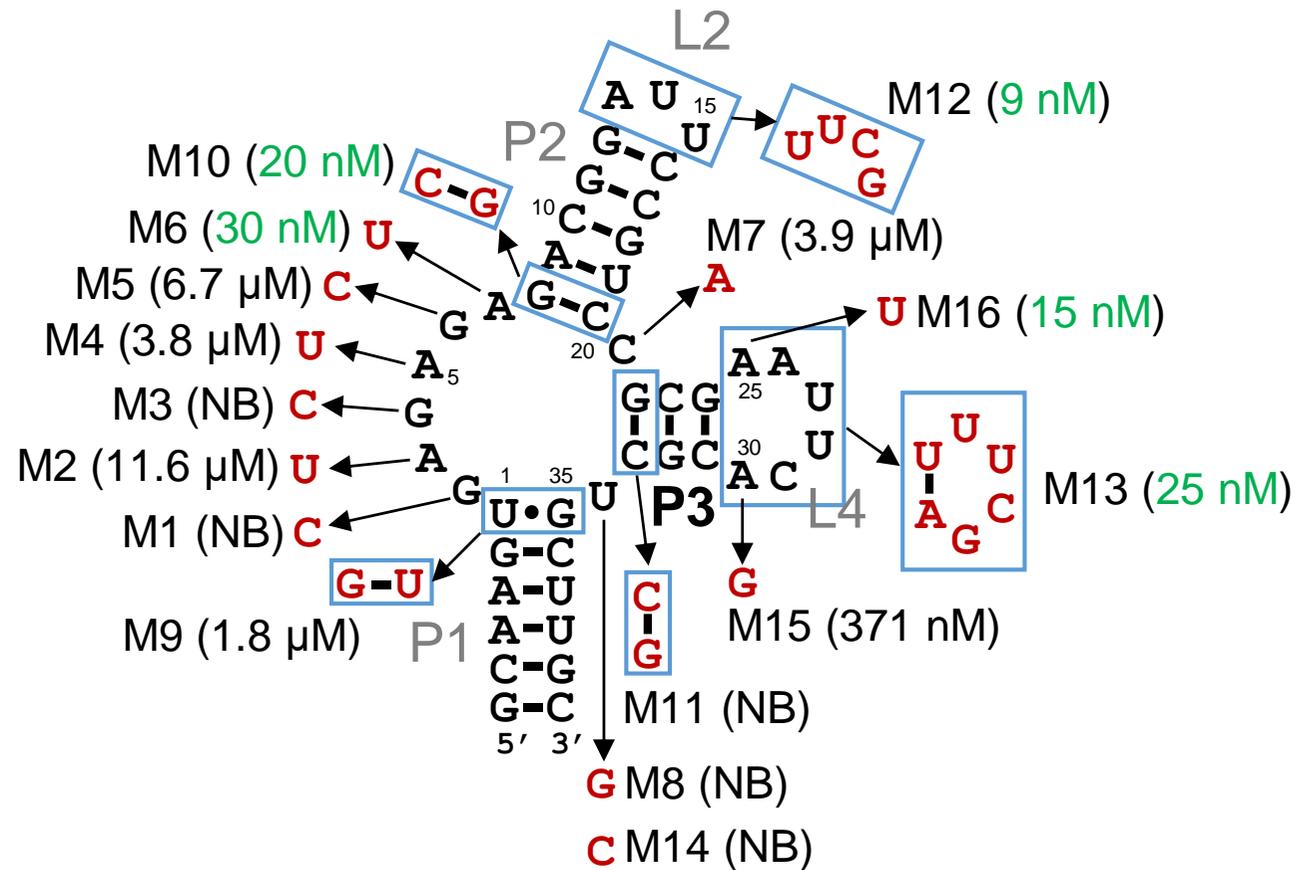


新規技術



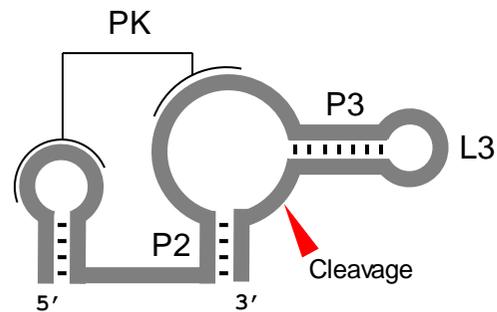
新規技術

試験管内 (*in vitro*) でのAC17-4・ASP2905 (ASP7967) の結合を確認



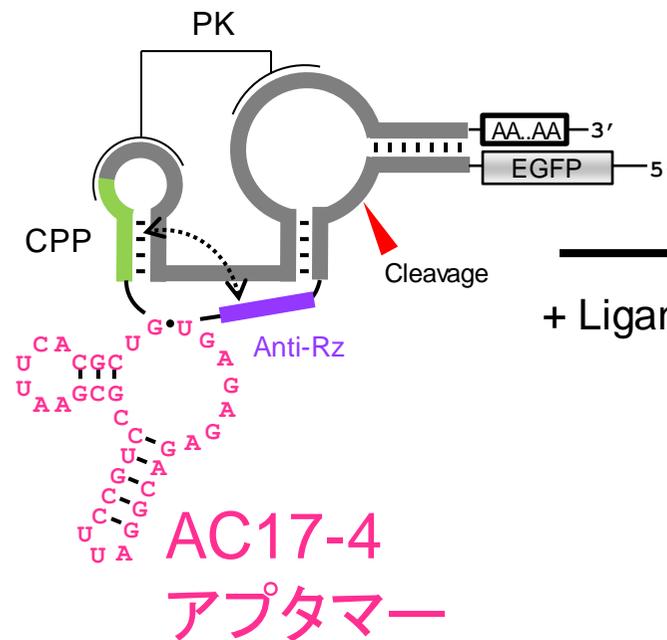
新規技術：リボスイッチ

哺乳類細胞内 (*in cellulo*) でのAC17-4・ASP2905 (ASP7967) の結合は？

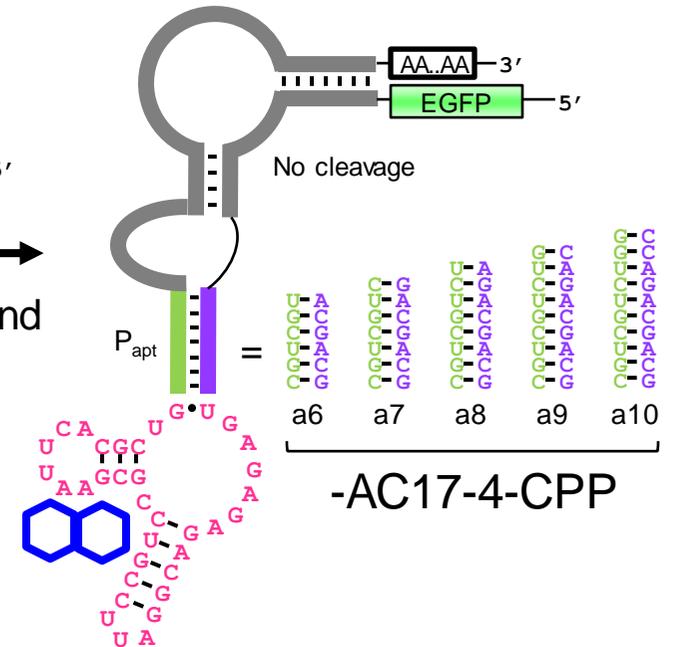


Pistol ribozyme
(自己切断リボザイム)

Gene expression **OFF**



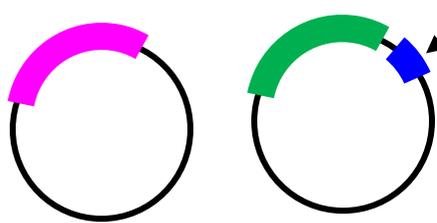
Gene expression **ON**



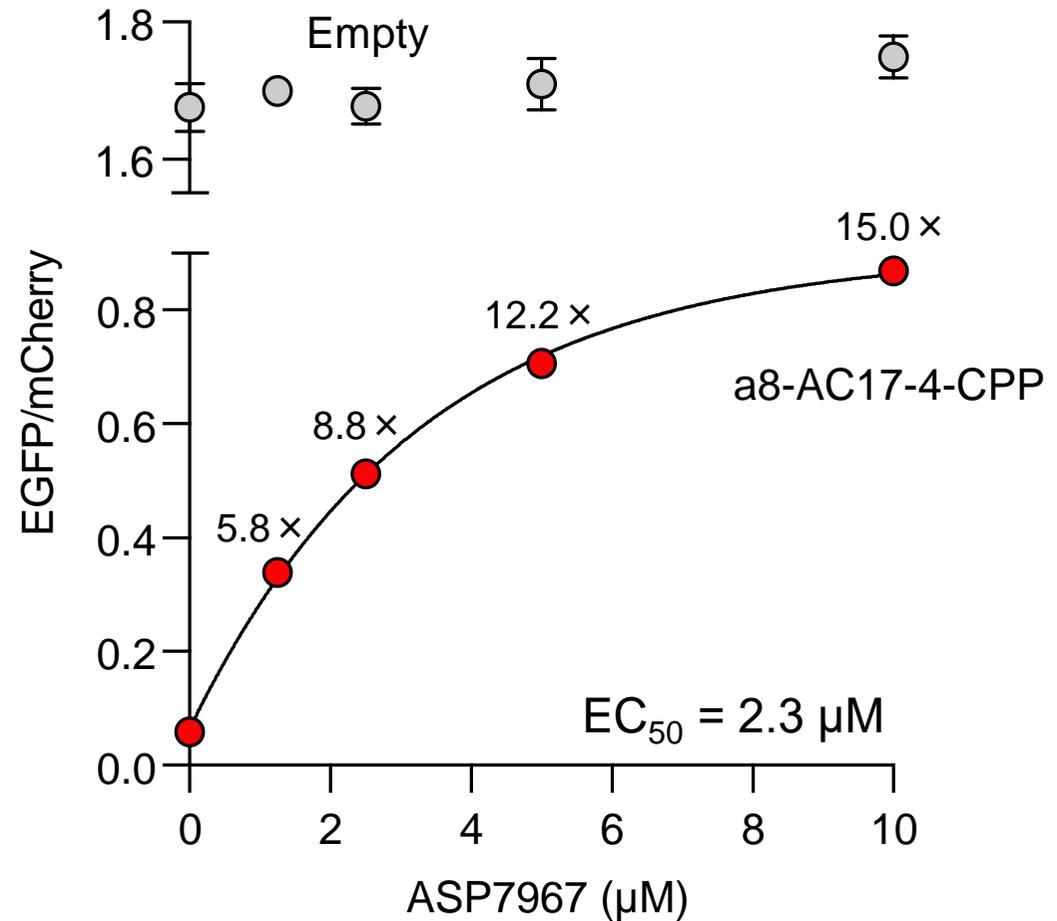
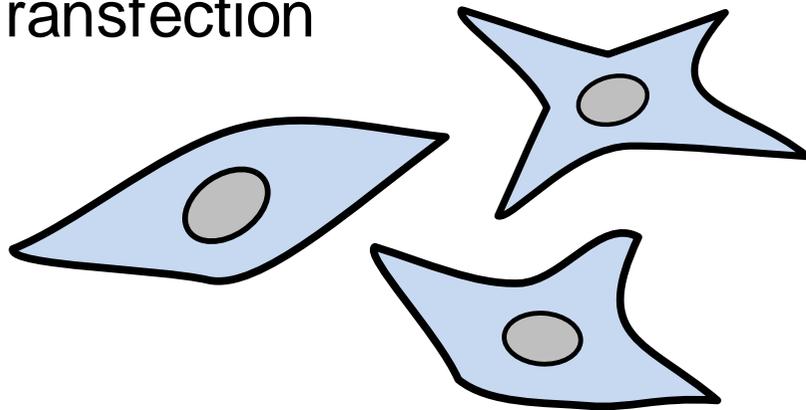
新規技術：リボスイッチ

哺乳類細胞内 (*in cellulo*) でのAC17-4・ASP2905 (ASP7967) の結合は？

mCherry EGFP アプタザイム



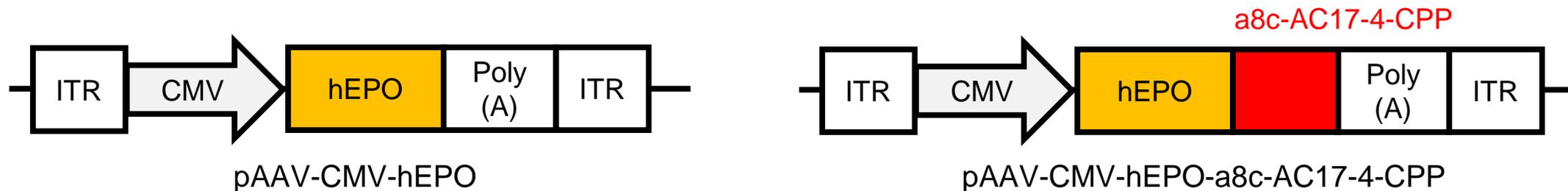
Transfection



新規技術：リボスイッチ

マウス (*in vivo*) におけるリボスイッチ機能の実証

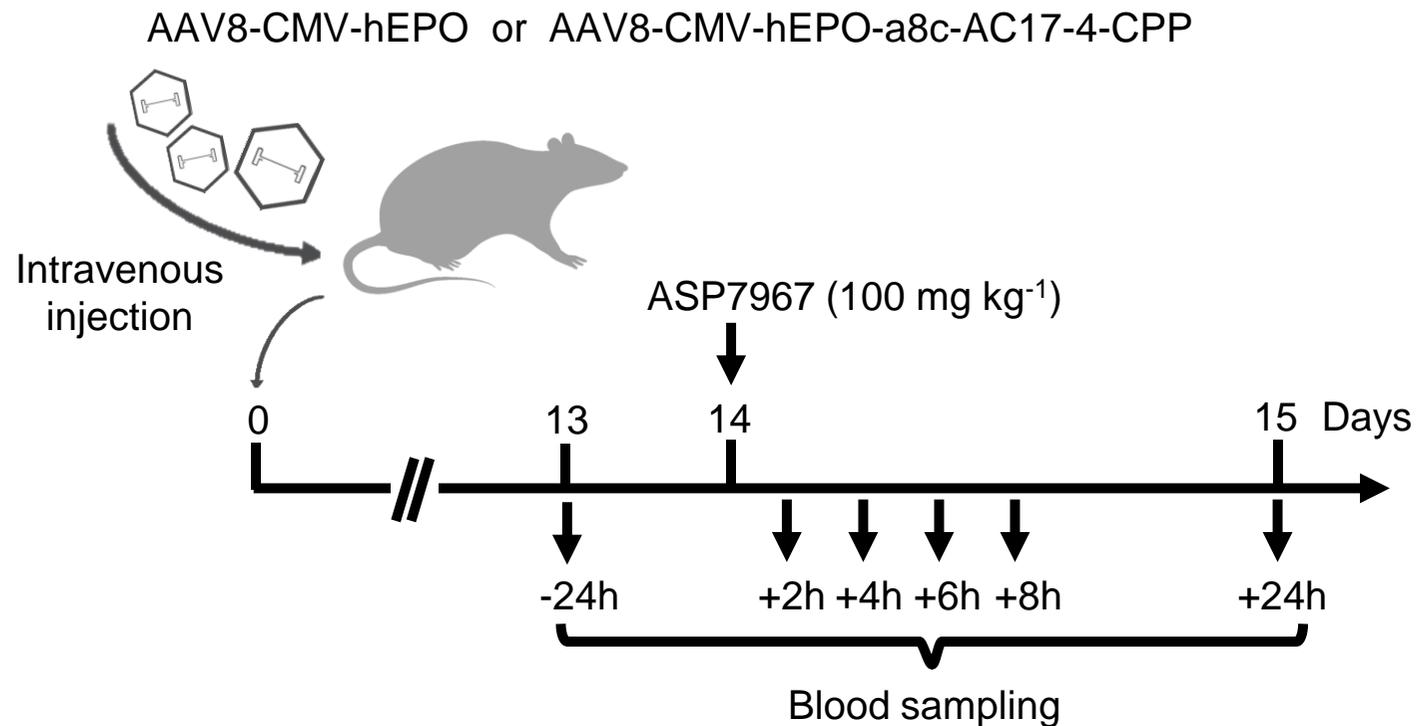
- 制御対象遺伝子：ヒトエリスロポエチン (hEPO)
- ベクター：AAV8
- 化合物投与：経口 (ASP7967, 100 mg kg⁻¹)



新規技術：リボスイッチ

マウス (*in vivo*) におけるリボスイッチ機能の実証

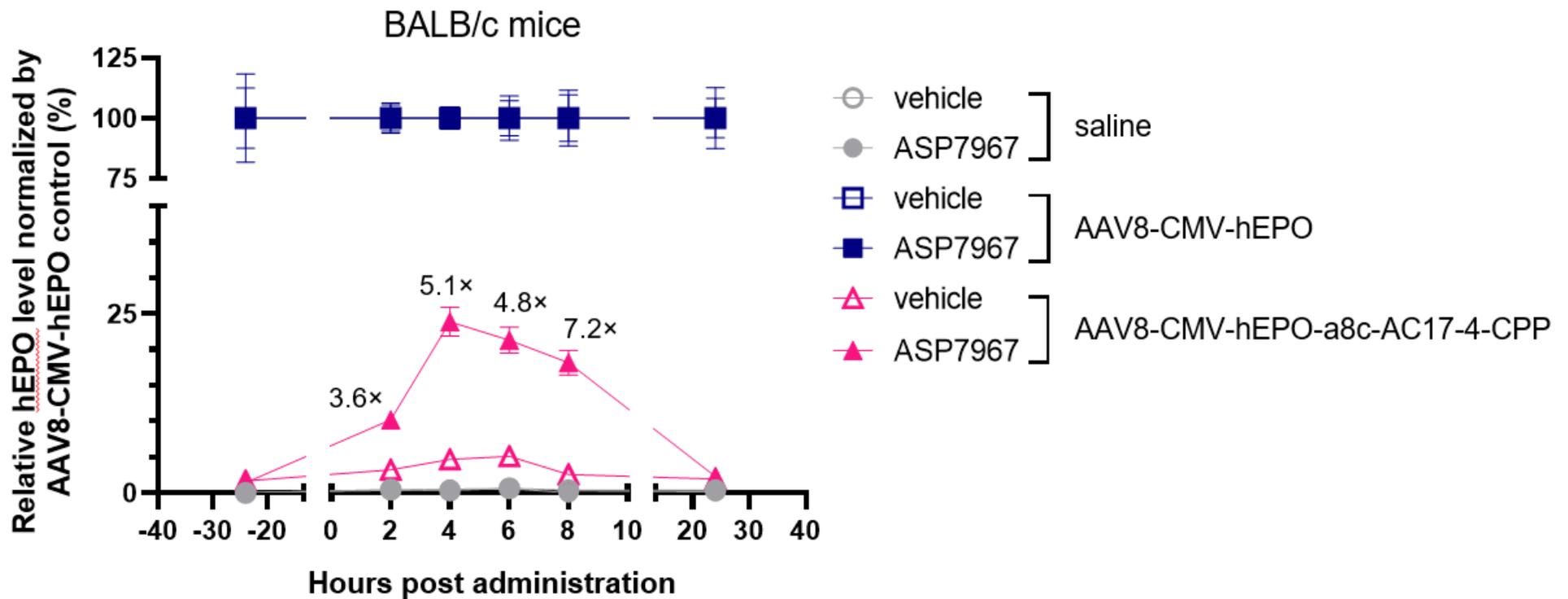
- ASP7967を経口投与後、血中hEPO濃度測定



新規技術：リボスイッチ

マウス (*in vivo*) におけるリボスイッチ機能の実証

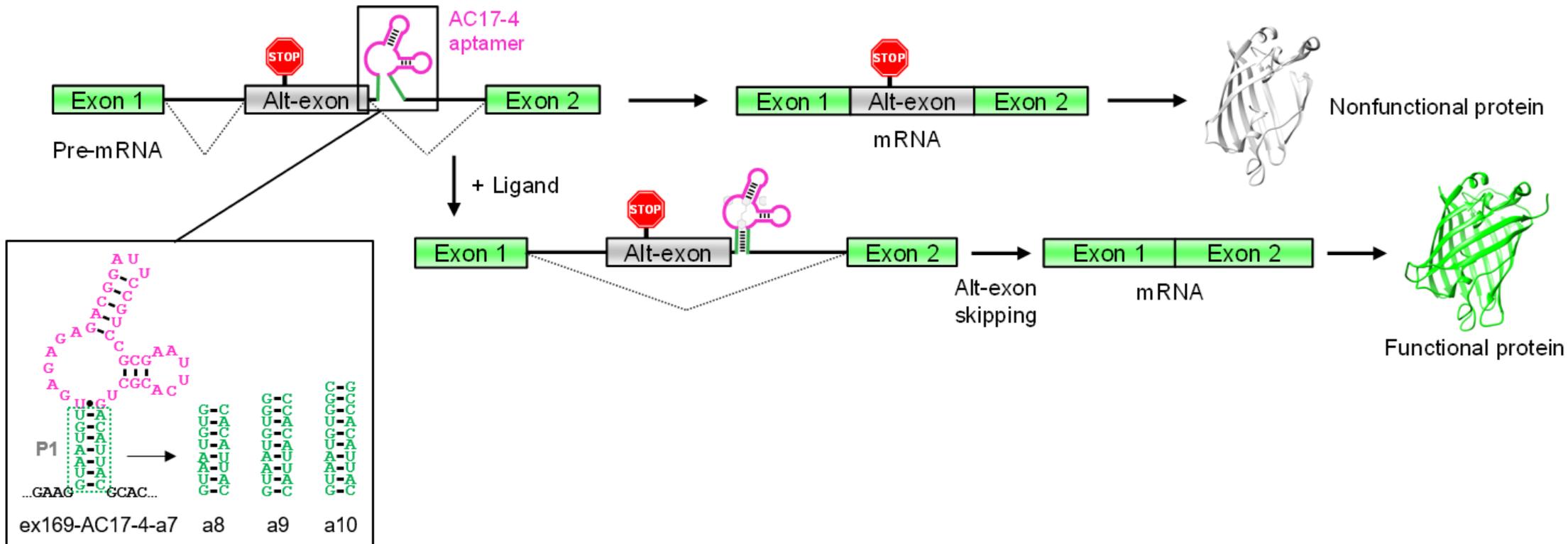
- hEPOレベルが5.1 – 7.2倍に上昇



新規技術：リボスイッチ

ON/OFF比の向上

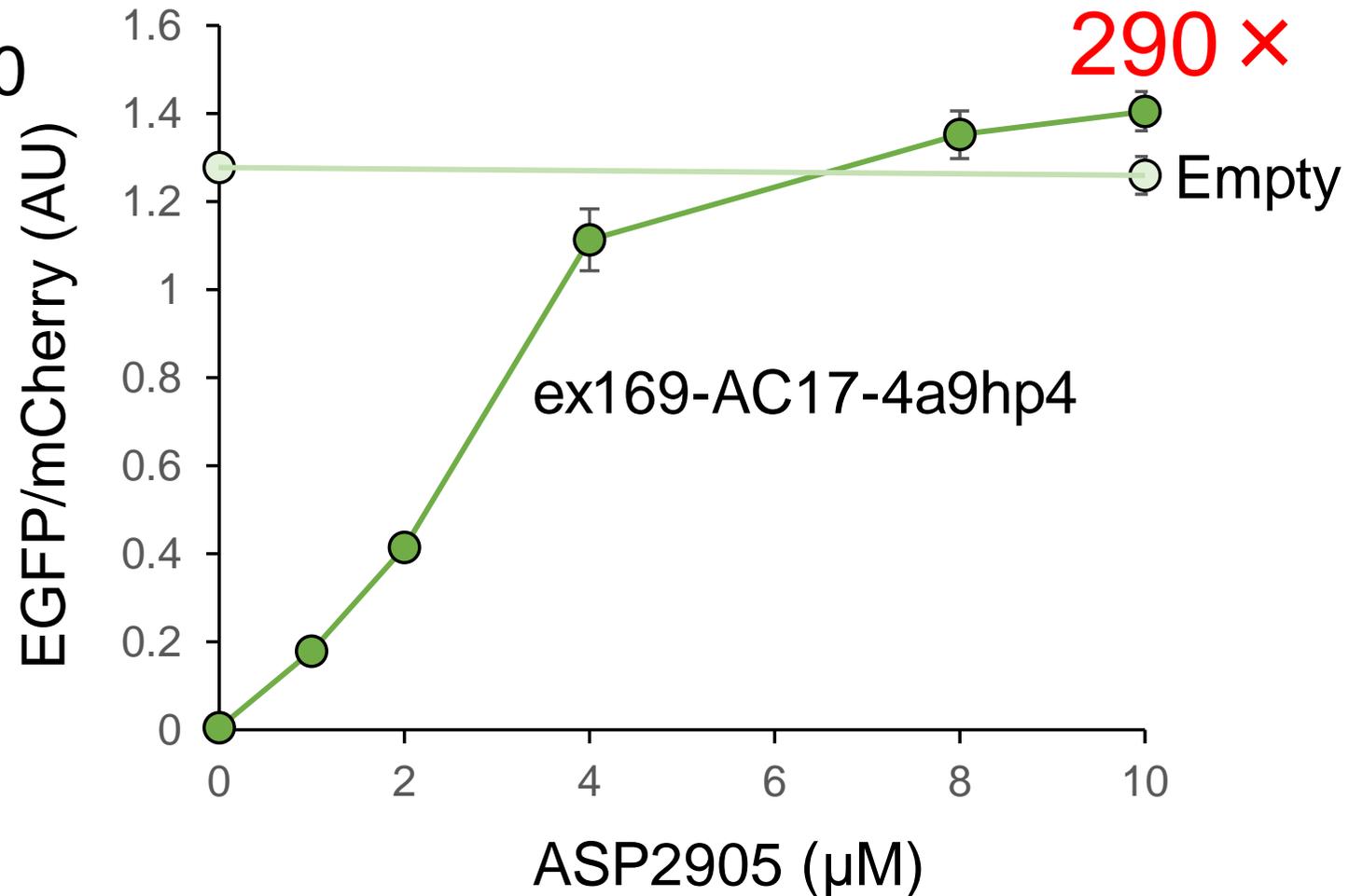
- Exon-skippingを制御するリボスイッチ（他社特許技術）



新規技術：リボスイッチ

ON/OFF比の向上

- ON/OFF比 = 290



新技術の特徴・従来技術との比較

- **細胞透過性が高く、低毒性の低分子**（医薬品候補化合物）に対するRNAアプタマーを開発した
- このRNAアプタマーを利用して開発したリボスイッチは、ヒト由来培養において、低濃度（10 μ M以下・従来技術では100 μ M以上）で機能する
- 低分子投与によって、最大300倍程度のタンパク質発現量の活性化を示す
- マウスへの経口投与による、生体内における遺伝子発現レベルの制御に成功

想定される用途

- 哺乳類細胞を用いた**生物製剤**（タンパク質・ウイルスベクターなど）の生産性向上
- **遺伝子治療・細胞治療**：治療用遺伝子発現のタイミング・レベル調節による、治療効果向上と副作用軽減
- **再生医療**：幹細胞の分化因子の発現タイミングを制御し、分化効率および生産性を向上させる
- **核酸医薬など**：合成mRNA、sgRNA (CRISPR/Cas)、siRNAなど、機能性RNAの化学的制御

実用化に向けた課題

- **培養細胞・動物においては、用途にもよるが既に実用性はある**と考えられるが、臨床応用には化合物の安全性評価、さらなる低毒性化、リボスイッチのさらなる高感度化（低濃度でのスイッチング）などが必要と考えられる
- アプタザイム機構によるリボスイッチのON/OFF比は、10-20程度に留まる
- Exon-skipping機構によるリボスイッチは他社の特許技術

企業への期待

- 開発済みの哺乳類細胞リボスイッチの非臨床応用（細胞・動物レベル）のアイデアを持つ企業との共同研究もしくはライセンス
- 臨床応用可能な人工リボスイッチの実現を目指し、医薬品・創薬化学の技術・ノウハウを持つ企業との共同研究を希望。ASP2905などの誘導体合成・毒性評価など
- 哺乳類細胞以外（植物、昆虫、酵母など）の細胞・生物へのリボスイッチ応用に関心がある企業との共同研究も希望

本技術に関する知的財産権

Patent application status

発明の名称：ASP7967またはその類似体に結合するRNAアプタマー

原題 「AN RNA APTAMER THAT BINDS TO ASP7967 OR AN ANALOGUE THEREOF」

出願番号：特願2022-162289

出願人：学校法人沖縄科学技術大学院大学学園

発明者：横林 洋平、ダモダラン ヴェヌゴパル、福永 圭佑、宮平 奈央、
藤安 次郎、石川 静麻、大住 康晃

お問い合わせ先

Contact

沖縄科学技術大学院大学

OIST | **Innovation**

TEL : 098-966-8937

FAX : 098-982-3424

E-mail : tls@oist.jp



OIST

OKINAWA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY GRADUATE UNIVERSITY
沖縄科学技術大学院大学