

# 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

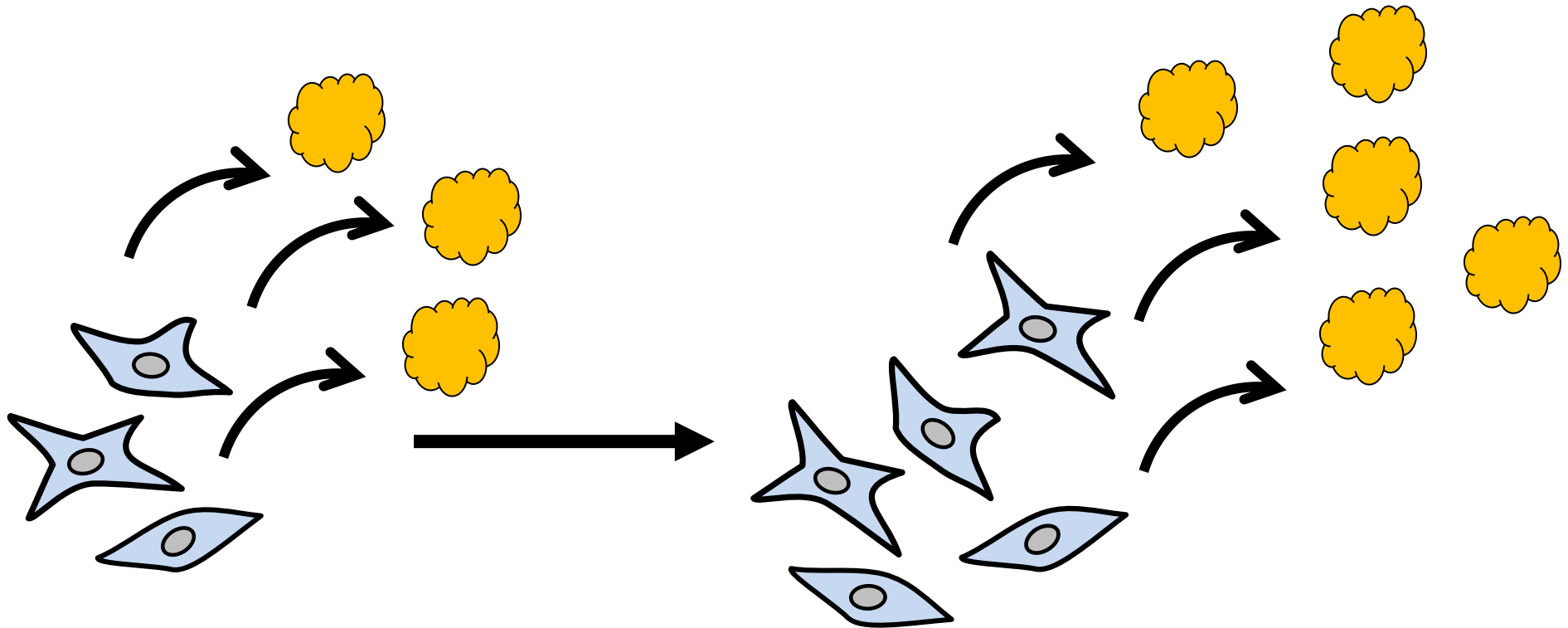
低分子化合物を投与 → タンパク質発現↑ ↓

**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

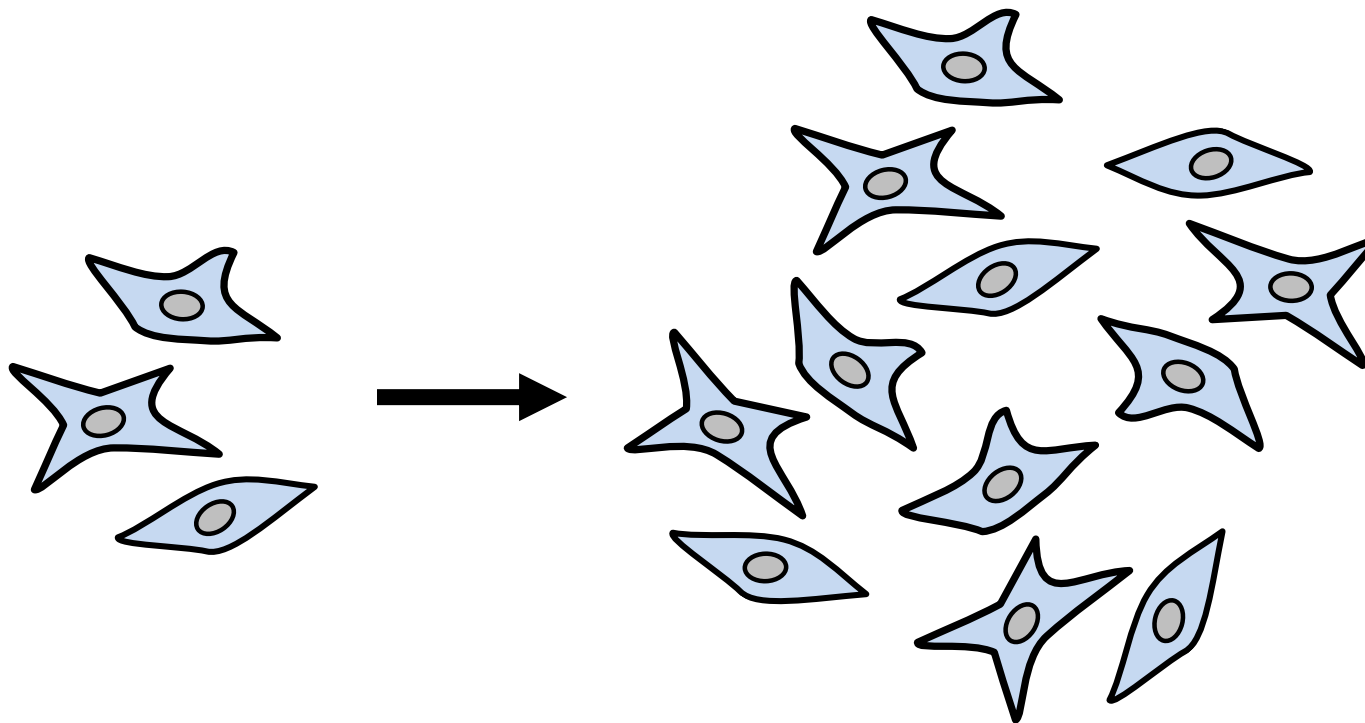
# 遺伝子スイッチ

## タンパク質（生物製剤）生産



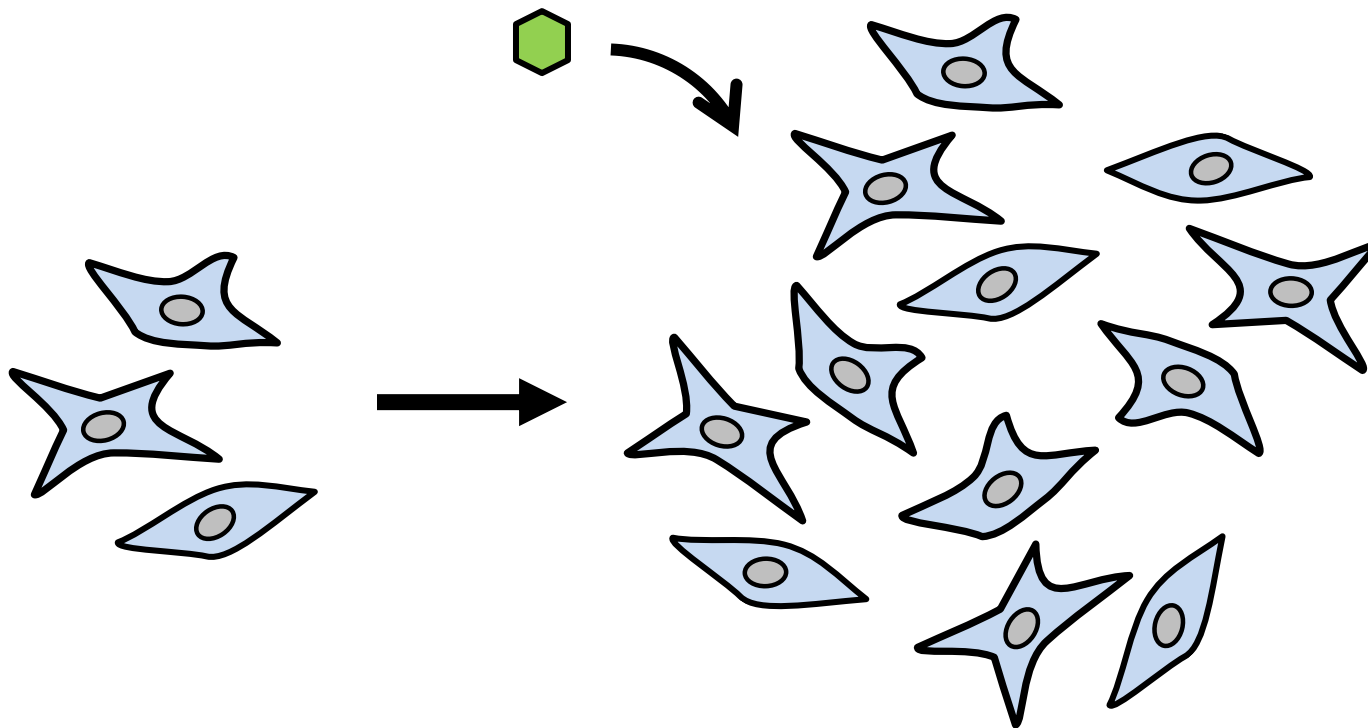
# 遺伝子スイッチ

## タンパク質（生物製剤）生産



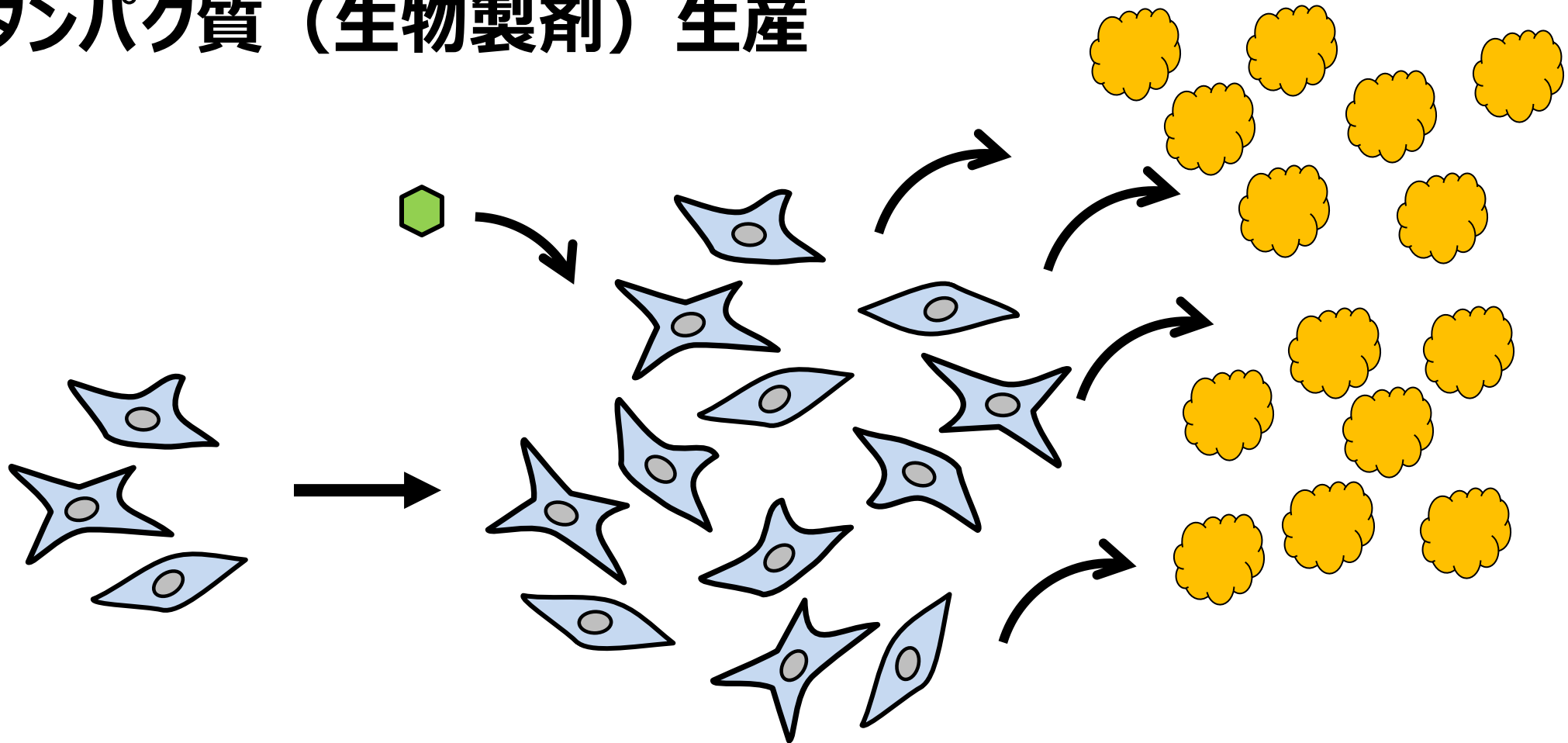
# 遺伝子スイッチ

## タンパク質（生物製剤）生産



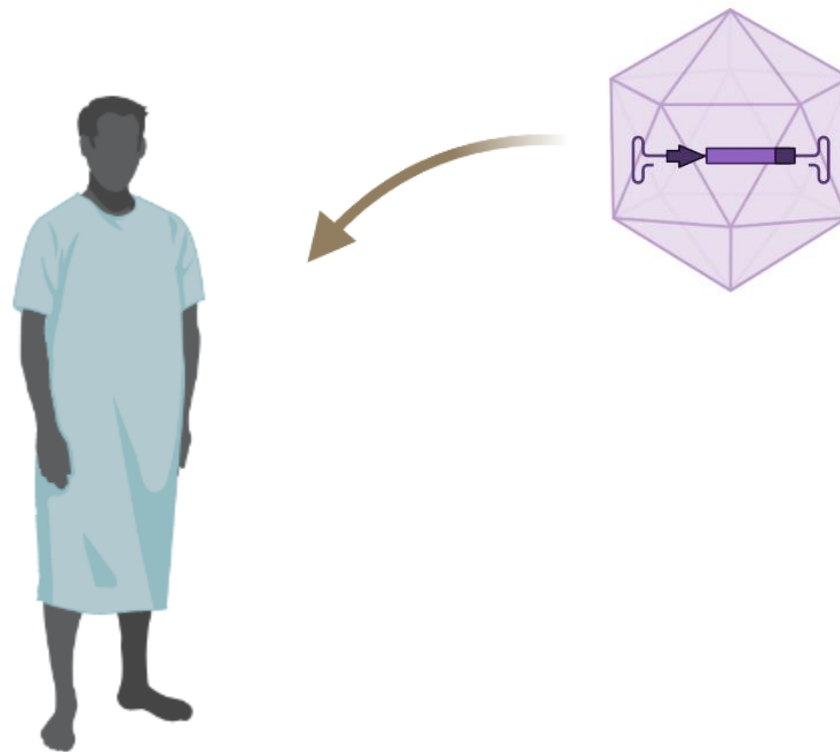
# 遺伝子スイッチ

## タンパク質（生物製剤）生産



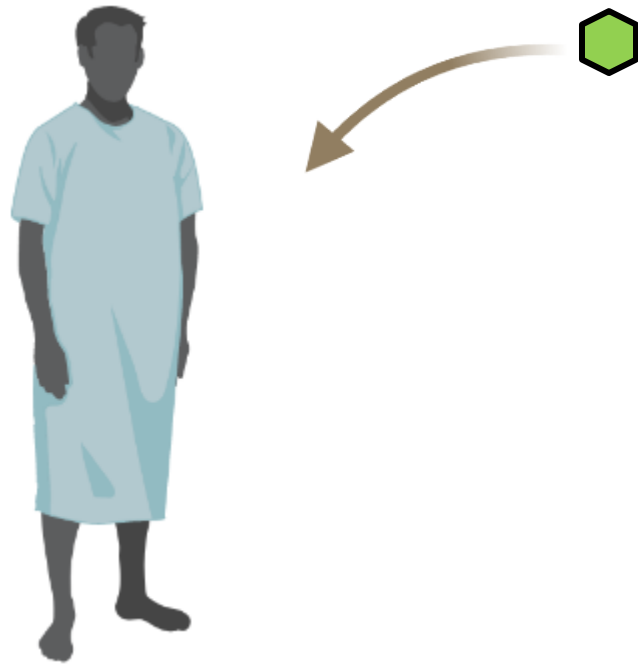
# 遺伝子スイッチ

## 遺伝子治療



# 遺伝子スイッチ

## 遺伝子治療

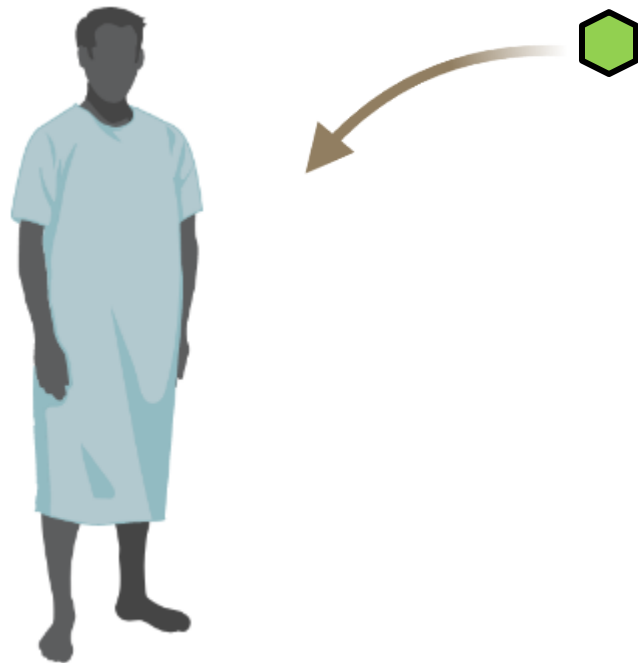


- ウイルスベクターを投与
- 低分子薬を投与することにより、治療用タンパク質発現のレベル・タイミングを制御



# 遺伝子スイッチ

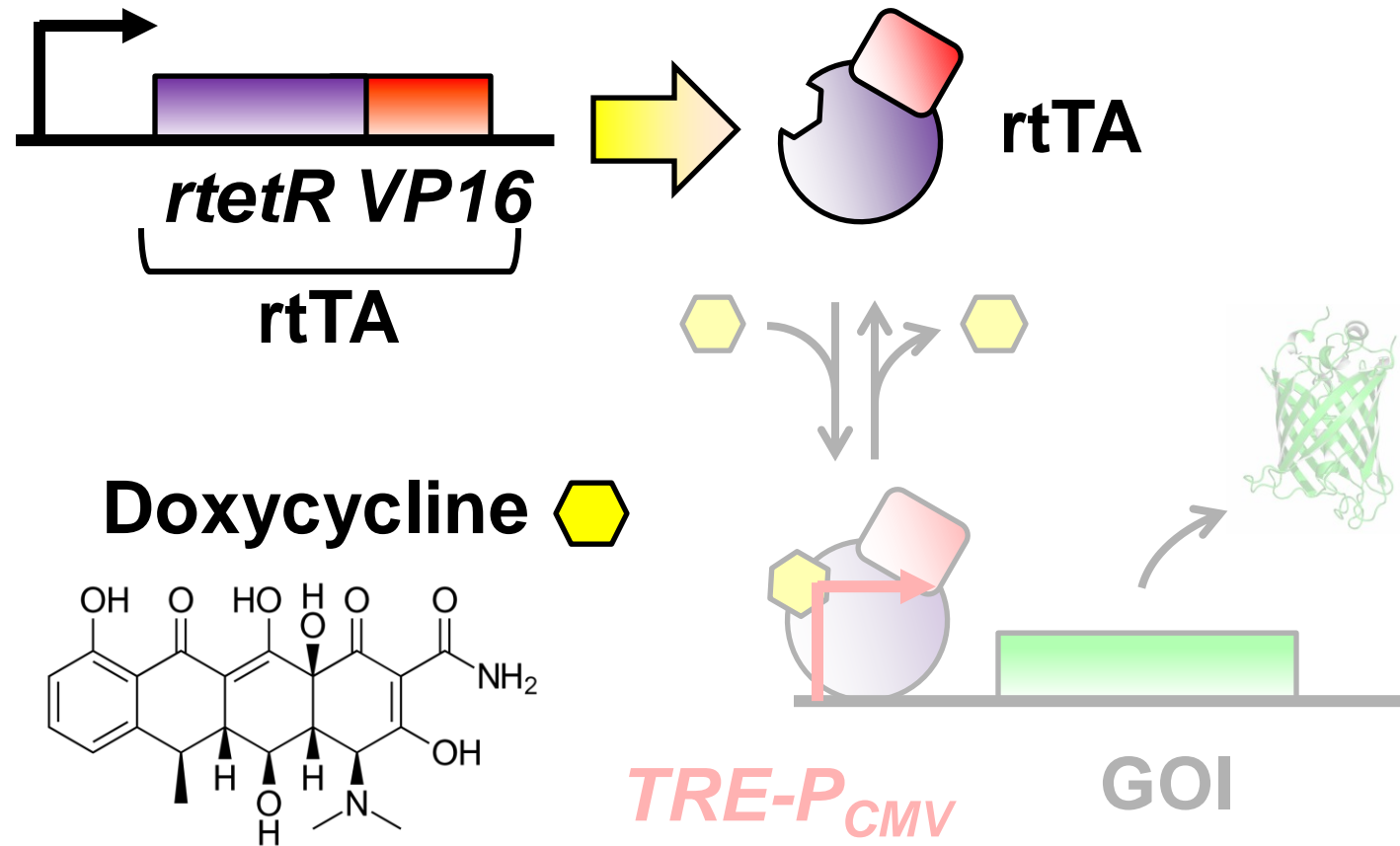
## 遺伝子治療



- 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)

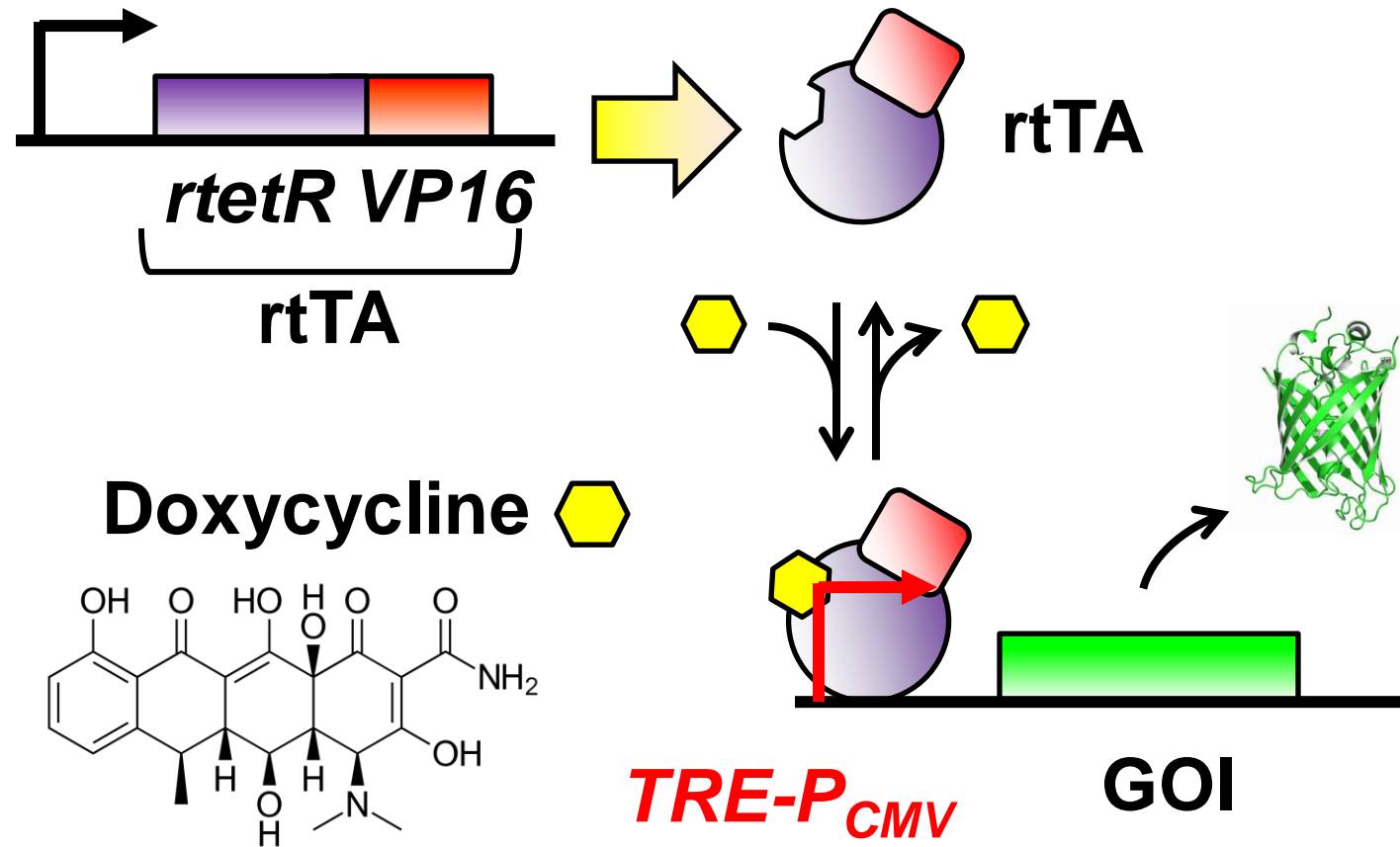
# 遺伝子スイッチ

## 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

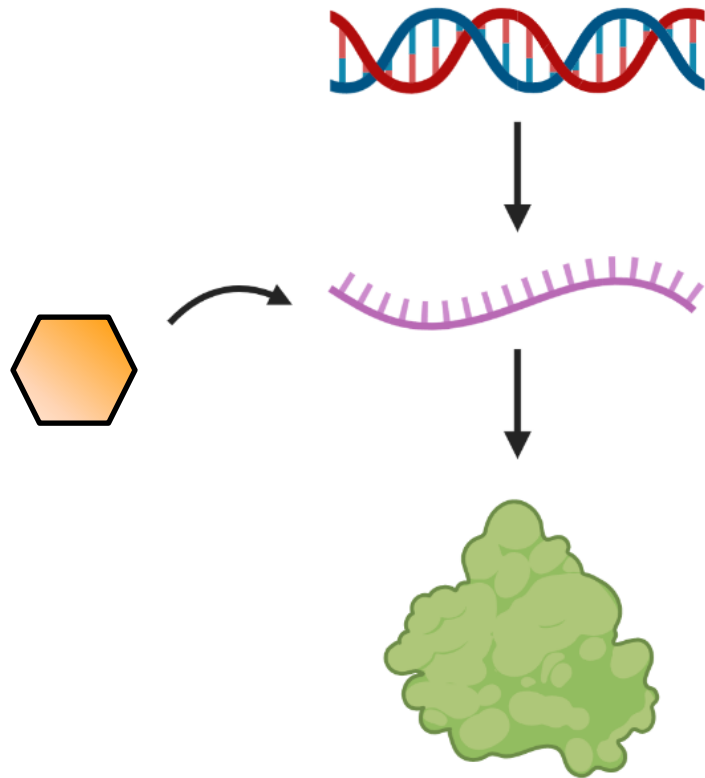
## 従来技術：人工転写因子

### 問題点

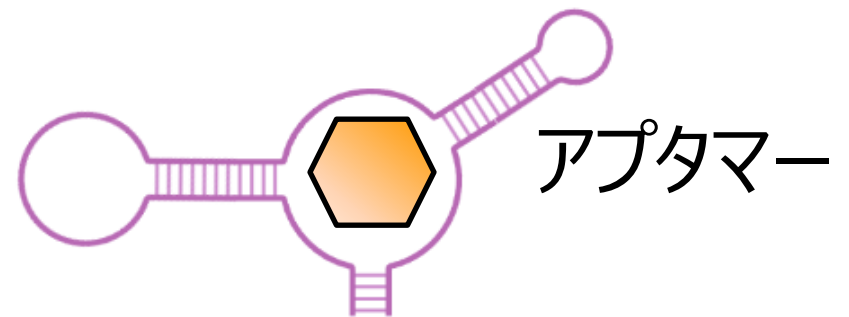
- 人工（外来性）転写因子（免疫原性、大きな遺伝子サイズ、宿主細胞代謝ストレス）
- 目的遺伝子は人工プロモーター制御下
- 転写因子とプロモーターの量比の最適化
- 新しい化合物に応答する系を構築することが困難

# 遺伝子スイッチ

## 従来技術：リボスイッチ



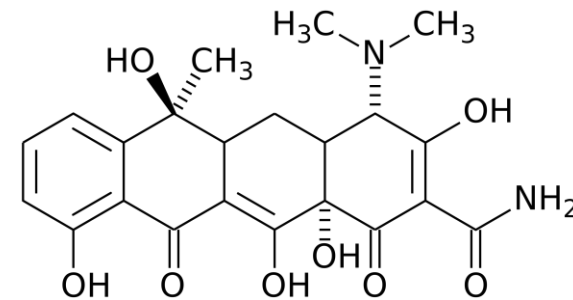
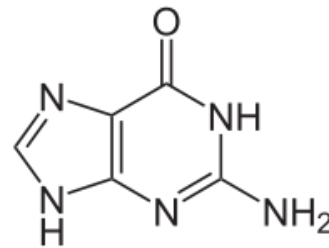
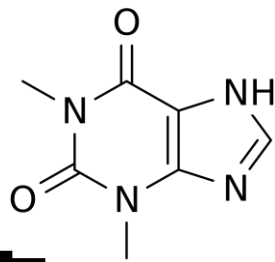
- 外来性タンパク質がない
- 遺伝子サイズが小さい
- SELEXにより、さまざまな化合物に結合するアプタマーが得られる可能性



# 遺伝子スイッチ

## 従来技術：リボスイッチ

- Theophylline, Guanine, Tetracyclineなど



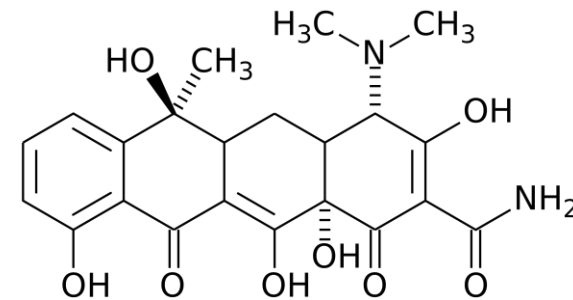
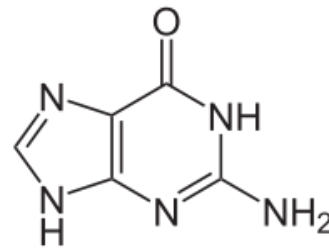
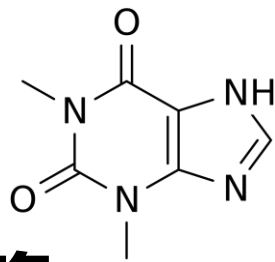
## 問題点

- >100  $\mu\text{M}$  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

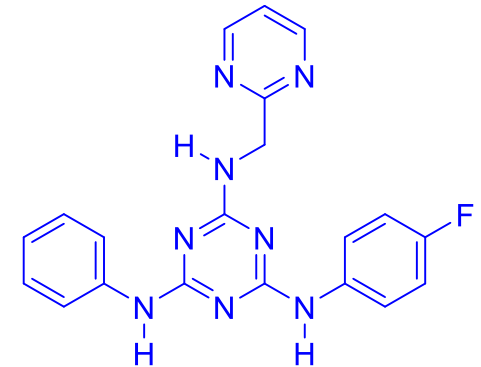
- 哺乳類リボスイッチへの応用を念頭に、化合物を選定
- それらの化合物に結合するRNAアプタマーをSELEX法により取得
- 哺乳類細胞内でリボスイッチとして機能する化合物-アプタマーペアを探索
- **2組の化合物-アプタマーペア取得に成功**

# 新規技術

## 低毒性化合物（ASP2905）結合アプタマー（AC17-4）

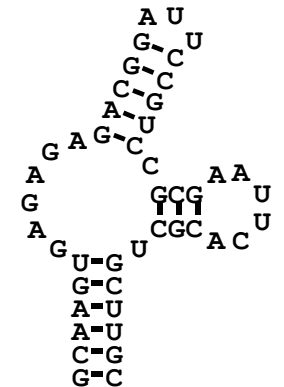
### ASP2905（アステラス製薬）

- 神経疾患医薬として開発。第I相臨床試験通過



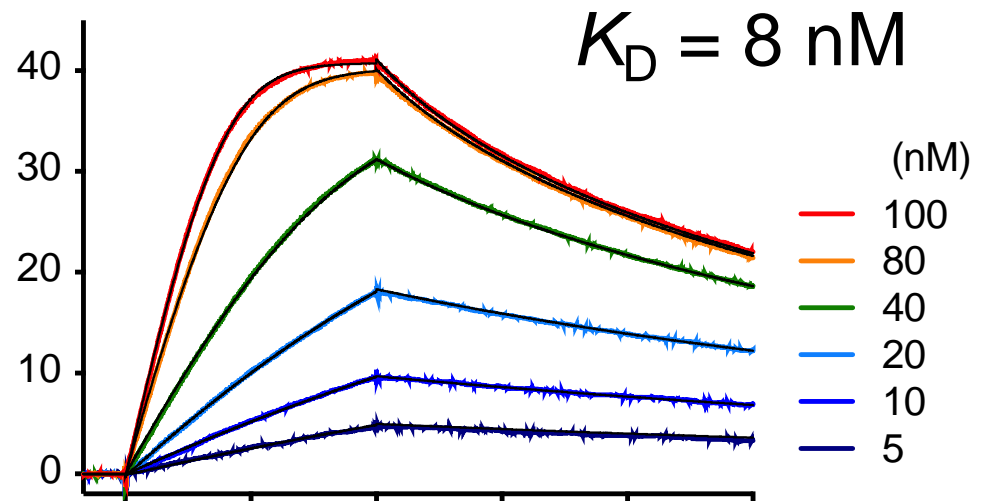
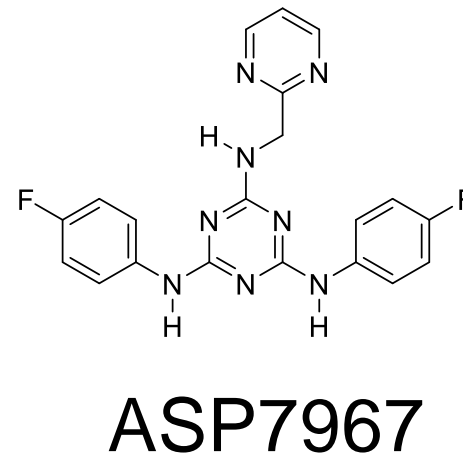
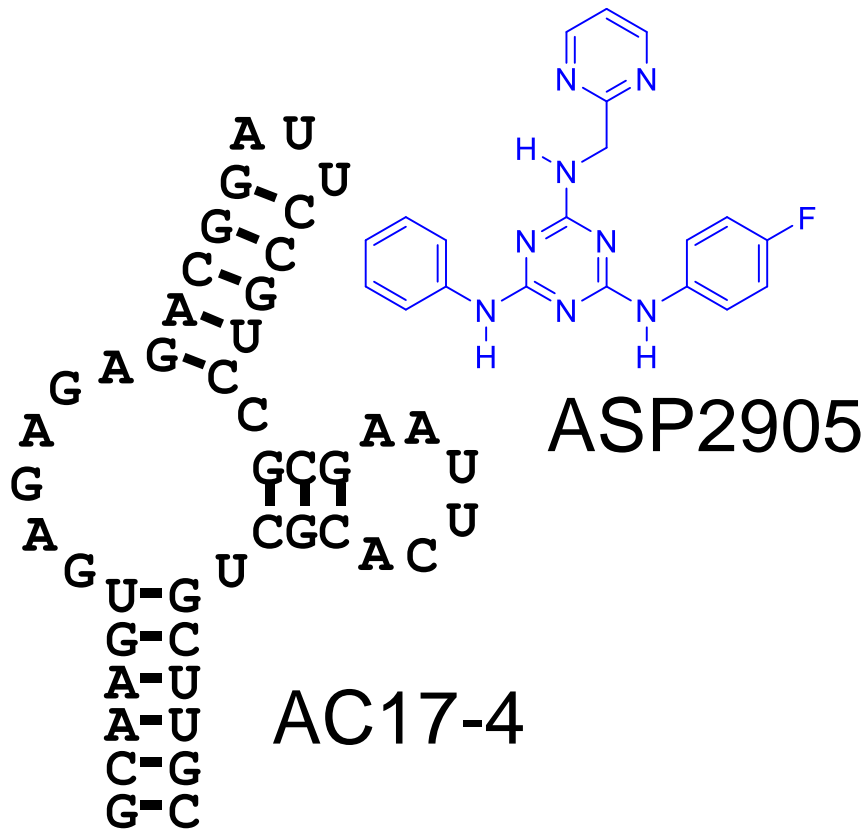
### AC17-4

- ASP2905およびASP7967を哺乳類細胞内で選択的に認識・結合



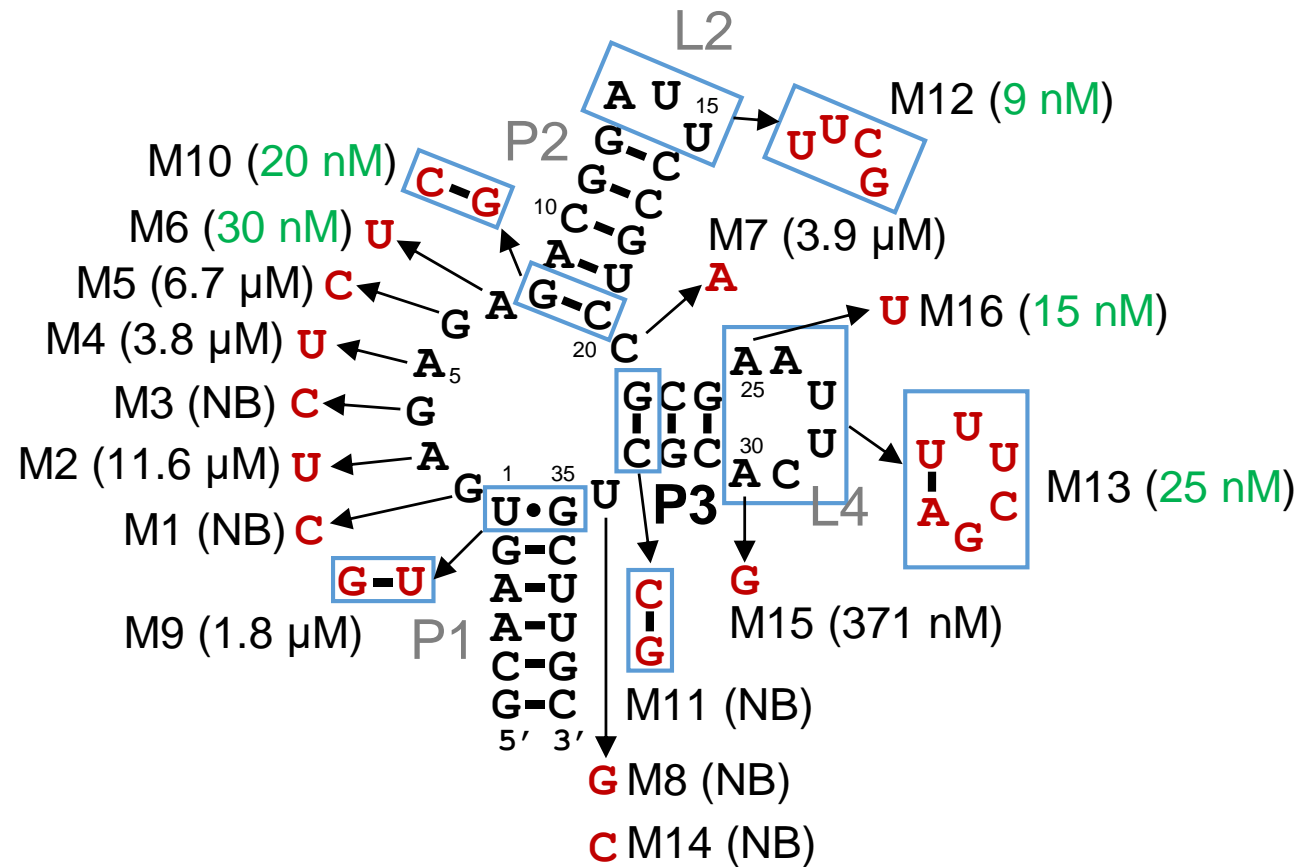


# 新規技術



# 新規技術

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

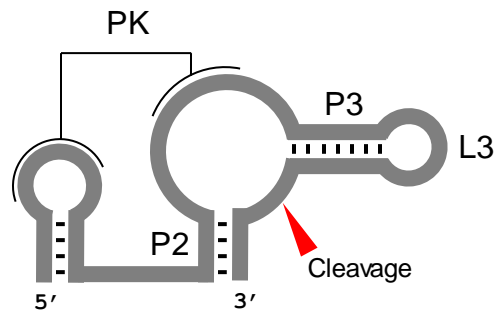


# 新規技術：リボスイッチ

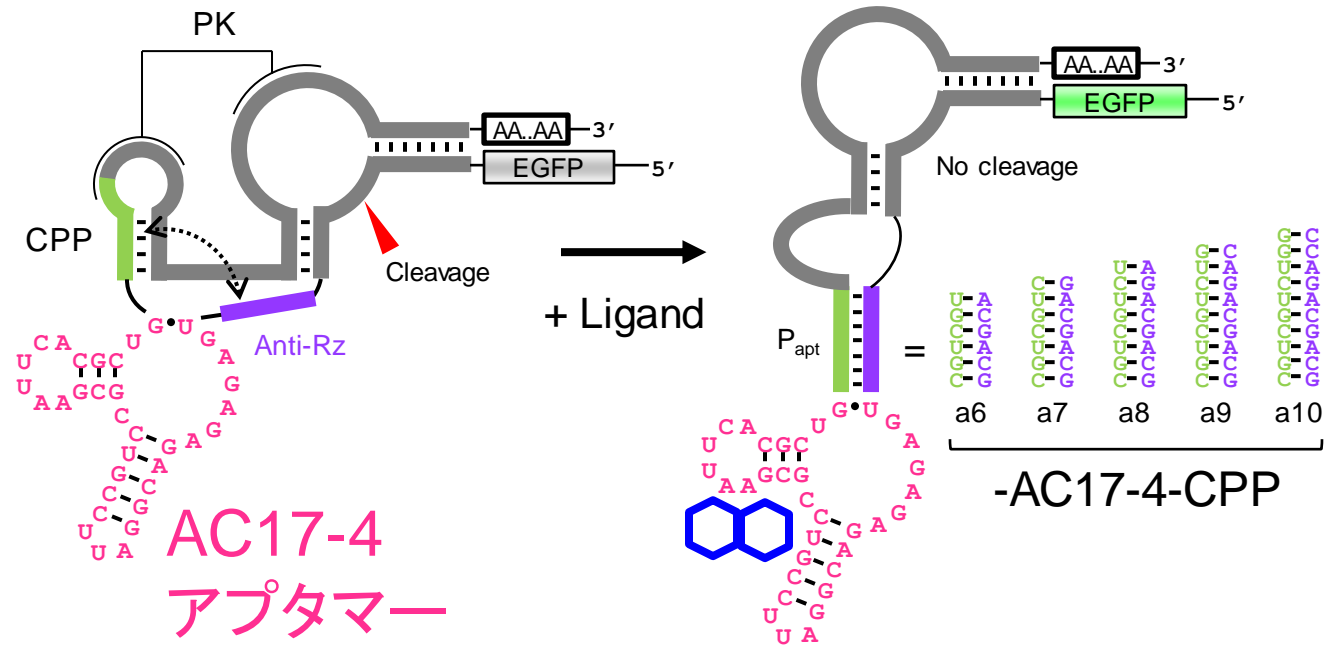
哺乳類細胞内 (*in cellulo*) でのAC17-4・ASP2905 (ASP7967) の結合は？

Gene expression **OFF**

Gene expression **ON**

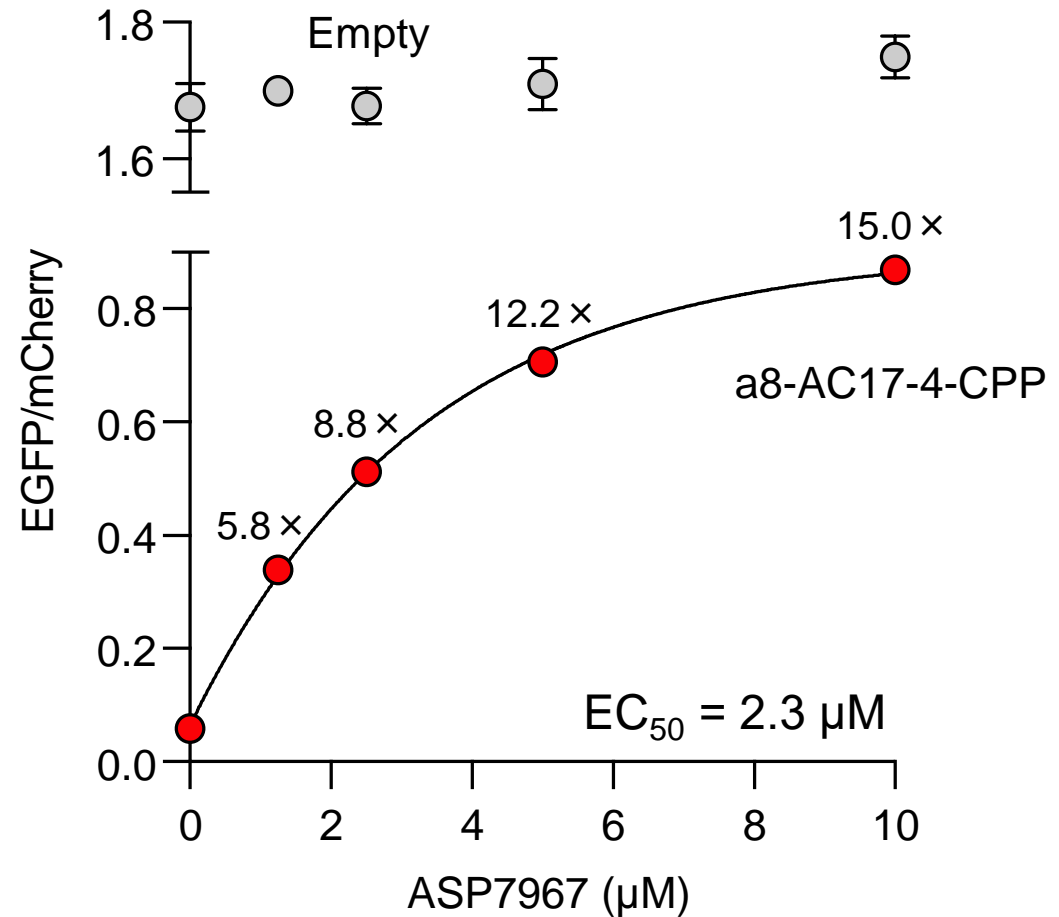
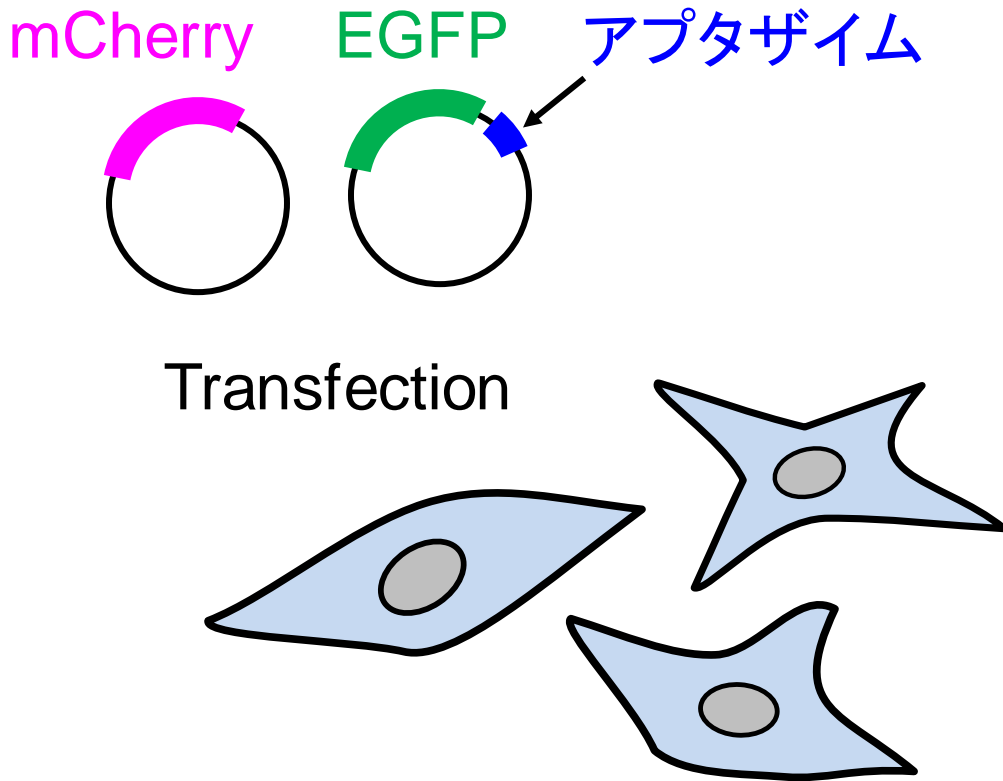


Pistol ribozyme  
(自己切断リボザイム)



# 新規技術：リボスイッチ

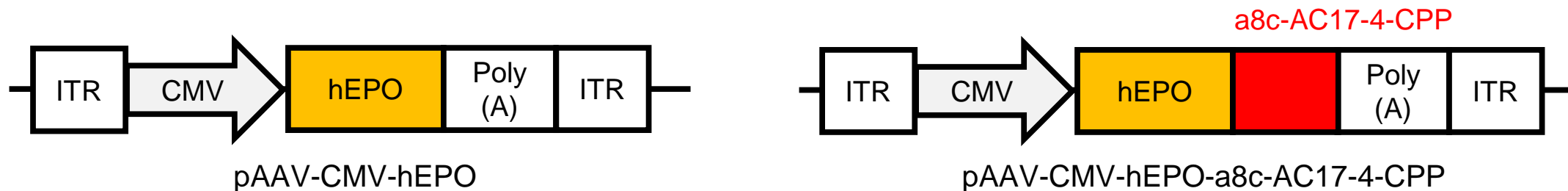
哺乳類細胞内 (*in cellulo*) でのAC17-4・ASP2905 (ASP7967) の結合は？



# 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

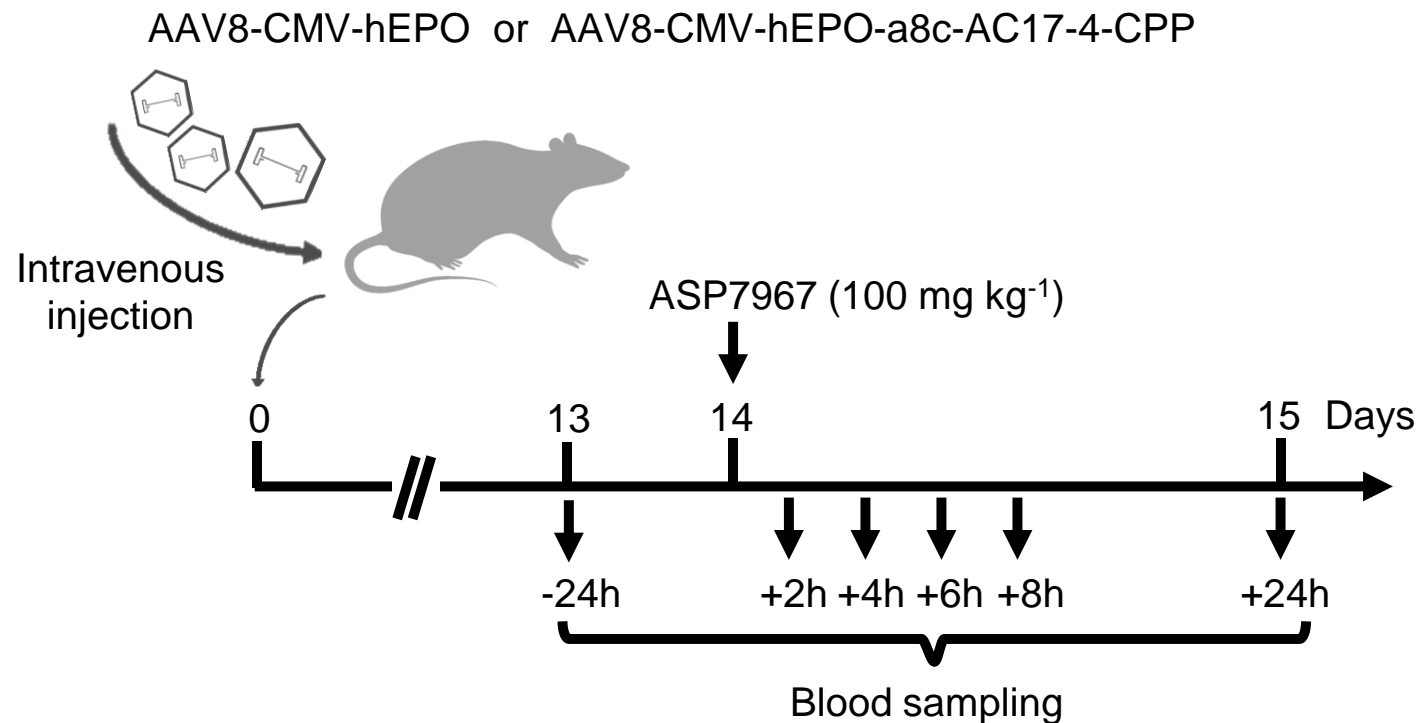
- 制御対象遺伝子：ヒトエリスロポエチン (hEPO)
- ベクター：AAV8
- 化合物投与：経口 (ASP7967, 100 mg kg<sup>-1</sup>)



# 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

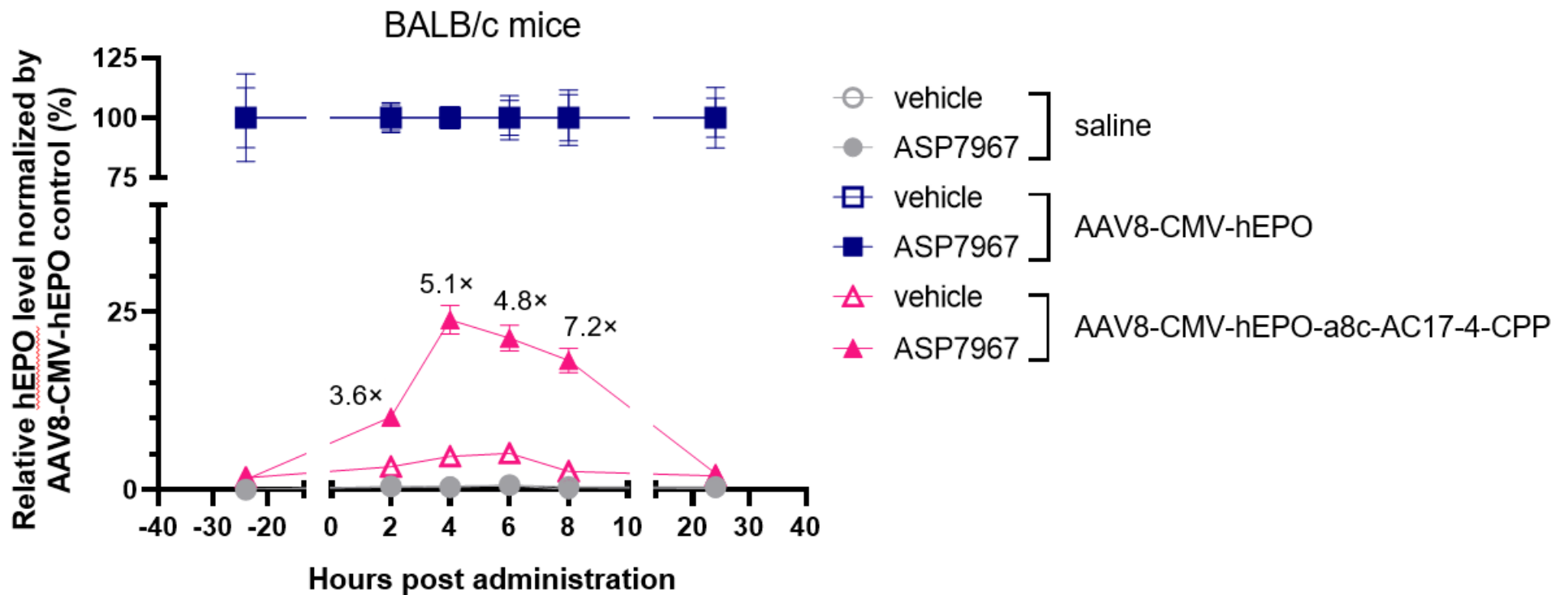
- ASP7967を経口投与後、血中hEPO濃度測定



# 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



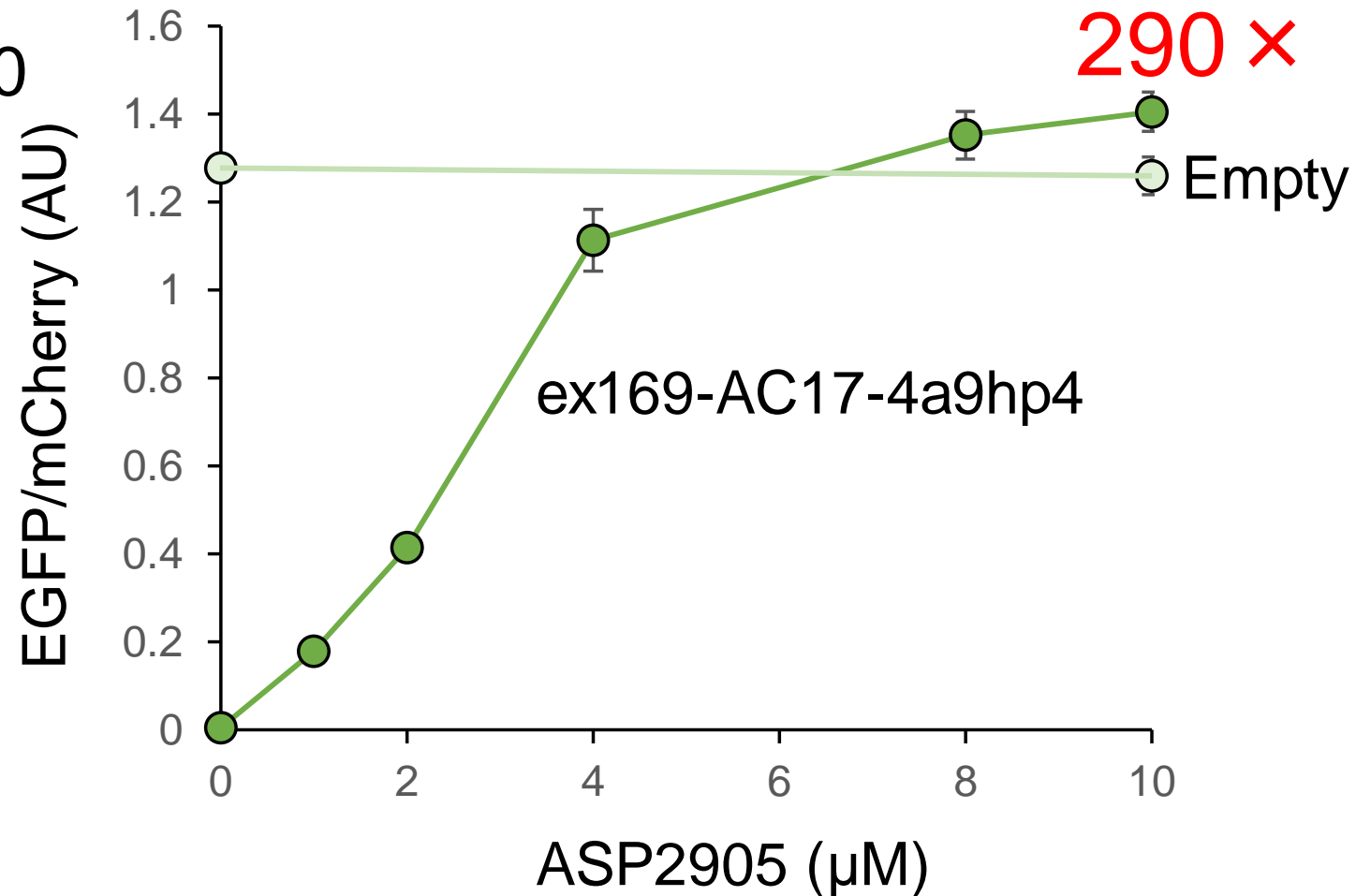




# 新規技術：リボスイッチ

ON/OFF比の向上

- 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  $\mu$ M以下・従来技術では100  $\mu$ 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](mailto:tls@oist.jp)



OIST

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