

# 令和2年度“オール近大”新型コロナウイルス感染症 対策支援プロジェクト研究報告書

企画題目	SARS-CoV-2 ゲノムを標的とする核酸医薬の開発
研究者所属・氏名	研究代表者：産業理工学部・藤井政幸 共同研究者：農学部・北山隆、農学部・柏崎健吾

## 1. 研究、開発・改良、提案目的・内容

SARS-CoV-2 と MHV-1 のゲノム解析に基づいて、ウイルス増殖メカニズムに必要な不可欠な配列を選抜し、その配列を標的とした核酸医薬を分子デザイン、評価することにより、COVID-19 治療新薬の開発につなげることを目指す。

1. SARS-CoV-2, MHV-1 のゲノム解析と核酸医薬標的配列の選定とスクリーニング評価
2. 化学修飾・コンジュゲートアンチセンス核酸による細胞系での MHV ウイルス増殖抑制評価
3. 化学修飾・コンジュゲート siRNA 核酸による細胞系での MHV ウイルス増殖抑制評価
4. siRNA 核酸と脂質ナノ粒子 DDS による細胞系でのウイルス増殖抑制評価

## 2. 研究、開発・改良、提案経過及び成果

### 研究結果の要約

#### 1. SARS-CoV-2, MHV-1 のゲノム解析と核酸医薬標的配列の選定とスクリーニング評価

SARS-CoV-2, MHV-1 ゲノムおよびヌクレオカプシドプロテインコード領域の解析、mRNA の2次構造解析を完了し、SARS-CoV-2, MHV-1 のヌクレオカプシドプロテインコード領域中の標的配列を特定し、その標的配列に対するアンチセンス核酸、siRNA 核酸を分子設計した。：進捗度 100%

#### 2. 化学修飾・コンジュゲートアンチセンス核酸による細胞系での MHV ウイルス増殖抑制評価

SARS-CoV-2 のモデルとして今回の抗ウイルス試験を実施する MHV-1 に対するアンチセンス核酸およびそのコンジュゲート体 6 種類を化学合成した。また、それらを用いる細胞系での MHV ウイルス増殖抑制評価試験の詳細な条件を確定した。現在、試験中である。：進捗度 100%

#### 3. 化学修飾・コンジュゲート siRNA 核酸による細胞系での MHV ウイルス増殖抑制評価

SARS-CoV-2 のモデルとして今回の抗ウイルス試験を実施する MHV-1 に対する siRNA 核酸およびそのコンジュゲート体 4 種類を化学合成した。また、それらを用いる細胞系での MHV ウイルス増殖抑制評価試験の詳細な条件を確定した。現在、試験中である。：進捗度 100%

#### 4. コンジュゲートアンチセンス核酸のクリックケミストリーによる化学合成

上記2で化学合成したアンチセンス核酸の細胞膜透過性、細胞内局在性を向上させるために、クリックケミストリーを利用して、アンチセンス核酸マルチコンジュゲートの化学合成を進行中である。4 種類のアリール修飾アンチセンス核酸と 3 種類のアジド修飾膜透過ペプチド、2 種類のアジド修飾核外輸送シグナルペプチドの合成を完了し、これらの組み合わせによりアンチセンス核酸マルチコンジュゲートを合成する。また、合成されたアンチセンス核酸マルチコンジュゲートは上記2と同様に細胞系での MHV ウイルス増殖抑制評価試験を行う。：進捗度 100%

#### 5. siRNA 核酸と脂質ナノ粒子 DDS による細胞系でのウイルス増殖抑制評価

上記2、3、4の試験結果を受けて、siRNA 核酸の抗ウイルス効果を向上させるために脂質ナノ粒子(LNP)を用いるドラッグデリバリーシステム(DDS)を検討する。特に、この後の動物試験においては重要な要素となる。：進捗度 100%

アンチセンス核酸、siRNA の細胞内での標的的特異性を向上させるために、核外輸送シグナルペプチド(NES)などのコンジュゲート体の化学合成とそれらの抗ウイルス効果の評価試験を進める。

## 6. アンチセンス核酸、siRNA 核酸の安全性評価

ニワトリ有精卵を用いてアンチセンス核酸、siRNA 核酸の安全性評価を行った結果、アンチセンス核酸 8 種類、siRNA 核酸 2 種類について、いずれも、コントロール実験との差は認められず、毒性はないとの結論を得た。：進捗度 100%

### 進捗状況の詳細

#### 1. SARS-CoV-2, MHV-1 のゲノム解析と核酸医薬標的配列の選定とスクリーニング評価

アンチセンス核酸および siRNA 核酸の標的配列を選定すべく新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)およびマウス肺炎ウイルス (murine hepatitis virus strain 1, MHV-1) の全ゲノム配列を解析した。SARS CoV-2 (Wuhan-Hu-1)のゲノムは 29903 bpRNA、MHV-1 のゲノムは 31386 bpRNA であり、それぞれ 9 個および 7 個の ORF と 5'-UTR および 3'-UTR からなる。

SARS CoV-2 Wuhan-Hu-1, 29903 bp ss-RNA, ACCESSION NC\_045512

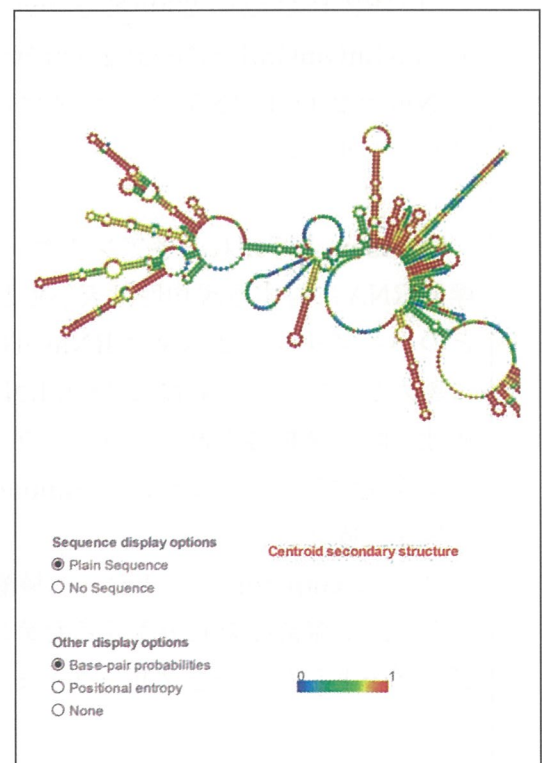
UTR	1ab	2	3a	4	5	6	7a	7b	8	9	UTR
	Pol	S		E	M					N	

Murine coronavirus MHV-1, complete genome, FJ647223, 31386 bp ss-RNA

UTR	1A	1B	2	3	5	6	7	UTR
	Pol	Pol	H	S	E	M	N	

#### (1) アンチセンス核酸標的配列の選定

アンチセンス核酸は RNA の相補的配列とハイブリッド 2 本鎖を形成して、RNaseH 依存的に標的 RNA を切断する。したがって、RNA の相補的配列を選定する上で標的 RNA の 2 次構造解析が重要である。SARS-CoV-2 および MHV-1 の全ゲノム長 RNA および各 ORF と 5'-UTR、3'-UTR の配列の 2 次構造をソフトウェア RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>) により解析、比較した。その結果、各配列中のアンチセンス核酸の標的となりうる 1 本鎖領域を見出すことができたが、本プロジェクトでは比較的遺伝子変異が少ないとされるヌクレオカプシドプロテインをコードする転写産物およびウイルスゲノム中の配列を特定した。ヌクレオカプシドプロテインはウイルスのゲノム RNA と結合し、ウイルス粒子の再構成などのウイルス増殖に不可欠な役割を果たしており、その発現を阻害することでウイルスの増殖を抑制できると期待される。



藤井らは、インフルエンザ A ウイルス (H1N1, H3N2) において類似の働きをするヌクレオプロテインの発現をアンチセンス核酸および siRNA 核酸により阻害することにより、市販インフル

エンザ薬ゾフルーザと同等にウイルスの増殖を約 1000 分の 1 に抑制できることを見出しており、SARS-CoV-2 および MHV-1 においても同様の効果を期待している。

上記の MHV-1 のヌクレオカプシドプロテインコード領域の 2 次構造解析により、下記の 3 か所がアンチセンス核酸の標的配列として適していることを見出した。なお、SARS-CoV-2 においては 2 か所の標的候補配列を見出した。

113-130 (18 nt) 5'-CAAAUAAUCAAAAUAGAG-3'

555-595 (41nt) 5'-GCCUCAAGGUUUUAUGUUGAAGGCUCAGGAAGGUCUGCAC-3'

1177-1208 (32 nt); 5'-CCCAAAGAAAGAGAGGGACAAAACAAAAG-3'

これらの標的配列に対するアンチセンス核酸として下記の化学修飾核酸を分子設計した。

1. MHV1-NP ASO (1180-1205)

5'-UmUmUmUmGmUmUm<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>UmUmUmCmUmUmUm-3'

2. MHV1-NP ASO (1180-1205)-Chol

Chol-5'-UmUmUmUmGmUmUm<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>UmUmUmCmUmUmUm-3'

3. MHV1-NP ASO (1180-1205)-Chol-PEG

Chol-5'-UmUmUmUmGmUmUm<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>UmUmUmCmUmUmUm-3'-PEG

4. MHV1-NP ASO (110-133)

5'-UmGmCmCmUmCmUm<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>a<sup>^</sup>UmUmUmGmGmUmGm-3'

5. MHV1-NP ASO (110-133)-Chol

Chol-5'-UmGmCmCmUmCmUm<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>a<sup>^</sup>UmUmUmGmGmUmGm-3'

6. MHV1-NP ASO (110-133)-Chol-PEG

Chol-5'-UmGmCmCmUmCmUm<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>a<sup>^</sup>UmUmUmGmGmUmGm-3'-PEG

7. EGFP ASO (210-230)(Negative Control)

5'-AmGmGmGmUm<sup>^</sup>c<sup>^</sup>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>AmGmGmUmGm-3'

Nm = 2'-OMeRNA, ^ = ホスホロチオエート, Chol = コレステロール, PEG = ポリエチレングリコール

Gapmer と呼ばれる各アンチセンス核酸の中央部分はホスホロチオエート骨格を有しており、標的 RNA に対する親和性は天然型 DNA に比べて劣るが、ヌクレアーゼによる分解に耐性で RNA とのハイブリッド 2 本鎖は RNaseH を活性化するので、標的 mRNA を切断する。また、両末端に導入している化学修飾 2'-OMeRNA は RNaseH を活性化できないが、標的 mRNA に対する親和性と配列選択性が高く、ヌクレアーゼによる分解に耐性であるため、ホスホロチオエートの弱点を補完する。このように、Gapmer アンチセンス核酸は医薬として体内で機能するための多くの特性を備えている。

さらに Gapmer アンチセンス核酸の細胞膜透過性を向上させるために 5'-末端にコレステロールを、血中滞留性を向上させるために 3'-末端にポリエチレングリコール (PEG) をそれぞれコンジュゲートしたものをクリックケミストリーにより化学合成した。

## (2) siRNA 核酸標的配列の選定

MHV-1 ヌクレオカプシドプロテインを標的とした siRNA 核酸の分子設計はソフトウェア siDirect ver. 2.0 を用いた。これらの siRNA は標的遺伝子へのサイレンシング効率を最大にし、標的外遺伝子への影響を最小限にするための要件を満たす分子設計となっている。さらに、酵素

による分解耐性を向上させるために、これらの siRNA 核酸のセンス鎖およびアンチセンス鎖の 3'-末端のオーバーハング 2 塩基を化学修飾ヌクレオシド 2'-OMeRNA で修飾した。また、核酸の細胞膜透過性を向上させるためにセンス鎖 5'-末端にコレステロールをコンジュゲートした。

選定した 4 つ siRNA の配列は下記のとおりである。これらの選定した配列の化学合成を完了し、コロナウイルス(MHV)増殖抑制効果を評価すべく、評価条件の条件を確定した。

1. MHV1-NP-siRNA1 (689-711)

センス鎖 5'-CCUGAU AUGGCCGAAGAAAUmUm-3'

アンチセンス鎖 5'-UUUCUUCGGCCAUAUCAGGUmUm-3'

2. MHV1-NP-siRNA2 (970-992)

センス鎖 5'-CUUCUUUGGAUCUAAAUUAGmAm-3'

アンチセンス鎖 5'-UAAUUUAGAUCCAAAGAAGAmAm-3'

3. MHV1-NP-siRNA4 (1263-1285)

センス鎖 5'-GAAAUGUAAGUAGAGAAUUAmAm-3'

アンチセンス鎖 5'-AAUUCUCUACUACA UUUCGmCm-3'

4. MHV1-NP-siRNA4 (1263-1285)-Chol

センス鎖 Chol-5'-GAAAUGUAAGUAGAGAAUUAmAm-3'

アンチセンス鎖 5'-AAUUCUCUACUACA UUUCGmCm-3'

5. EGFP siRNA (210-230) (Negative control)

センス鎖 5'-AGGGUCAGCUUGCCGUAGGUmGm-3'

アンチセンス鎖 5'-CCUACGGCAAGCUGACCCUGmAm-3'

Nm = 2'-OMeRNA

2. 化学修飾・コンジュゲートアンチセンス核酸による細胞系での MHV ウイルス増殖抑制評価

(1) MHV-1 ヌクレオカプシド遺伝子を標的とする Gapmer アンチセンス核酸の評価

(1-1) スクリーニングによる標的配列特定 (2 種) (1000nM, 100nM, 10nM)

(1-2) 特定した配列に対する Gapmer アンチセンス核酸-コレステロールコンジュゲート (2 種) および Gapmer アンチセンス核酸-コレステロール-PEG コンジュゲート (2 種) の評価(1000nM, 100nM, 10nM)

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)のモデルとなるマウス肺炎ウイルス (murine hepatitis virus strain 1, MHV-1) のヌクレオカプシドプロテインをコードする転写産物の 2 次構造解析結果に基づいて標的配列を特定し、分子設計した 6 種類の Gapmer アンチセンス核酸を用いてマウス脳腫瘍細胞由来 SR-CDF1 DBT (JCRB1580) 細胞を宿主としてウイルス増殖抑制効果をウイルス力価測定により評価する。

現在までに下記の Gapmer アンチセンス核酸の合成を完了し、それらの抗ウイルス活性を評価の条件の細部を下記の通り確定した。現在、評価試験を実施中である。評価試験の詳細は以下のとおりである。

Gapmer アンチセンス核酸 : ASO/Serum Free MEM, total 250ul/well

導入剤 : LP2000™, 0.5ul/well,

ウイルス : Murine hepatitis virus (MHV, ATCC VR-261)

宿主細胞 : SR-CDF1 DBT (JCRB1580)

## 1. 接種ウイルス液の精製及び調製

### 1.1. 接種ウイルス液の精製及び調製の使用試薬

- 1) Fetal Bovine Serum (以下 FBS、GE Healthcare Life Sciences)
- 2) Dulbecco's Modified Eagle Medium (以下 DMEM、SIGMA)
- 3) 0.05%トリプシン (Life Technology Corporation)
- 4) Minimum Essential Medium (Life Technology Corporation)
- 5) DEAE デキストラン (DEAE-Dextran、pK chemicals A/S)
- 6) 炭酸水素ナトリウム (富士フィルム和光純薬株式会社)
- 7) L-グルタミン (東京化成工業株式会社)
- 8) グルコース (東京化成株式会社)
- 9) アルブミン (富士フィルム和光純薬株式会社)
- 10) ニュートラルレッド (富士フィルム和光純薬株式会社)
- 11) アガロース (Agar Noble、Becton, Dickinson and Company)
- 12) PBS (Life Technology Corporation)

### 1.2. 培地及び試薬の調製

#### (1) 超純水

水道水を純水製造装置 (Direct-Q UV3、メルク株式会社) で精製する。

#### (2) 滅菌水

超純水を高圧蒸気滅菌 (小型オートクレーブ、LSX-500、株式会社トミー精工、滅菌条件: 121°C、15分) する。

#### (3) 10%FBS 添加 DMEM

DMEM 45 mL に FBS 5 mL、抗菌薬 0.5 mL の割合で加える。

#### (4) 10×MEM

Minimum Essential Medium (autoclavable) 9.39 g に超純水 100 mL の割合で加え溶解後、高圧蒸気滅菌 (滅菌条件: 121°C、15分) する。

#### (5) 7.5% NaHCO<sub>3</sub>

炭酸水素ナトリウム 7.5 g に超純水 100 mL の割合で加え溶解後、メンブレンフィルター (0.22 μm、MILLEX® GS、MILLIPORE) で濾過する。

#### (6) 200 mmol/L L-グルタミン

L-グルタミン 1.46 g に超純水 100 mL の割合で加え溶解後、メンブレンフィルターで濾過する。

#### (7) 1%DEAE デキストラン

DEAE デキストラン 1 g に超純水 100 mL の割合で加え溶解後、メンブレンフィルターで濾過する。

#### (8) 15%グルコース

グルコース 15 g に超純水 100 mL の割合で加え溶解後、メンブレンフィルターで濾過する。

#### (9) 10% BSA

アルブミン 10 g に超純水 100 mL の割合で加え溶解後、メンブレンフィルターで濾過する。

#### (10) 1%ニュートラルレッド

ニュートラルレッド 1 g に超純水 100 mL の割合で加え溶解後、メンブレンフィルターで濾過する。

### 1. 3. 1. 継代方法

(1) 凍結保管中の宿主細胞を約 37°C に設定した恒温槽で融解後、15 mL 遠心管に培養液 10 mL を入れ、融解した細胞液 1 mL を添加し懸濁する。

(2) 5 分間遠心分離 (1000 rpm、190 × g、24°C) して上清を除去する。

(3) 15 mL 遠心管に培養液 1 mL を加えて再懸濁する。10%FBS 添加 DMEM 5 mL を加えた 25 cm<sup>2</sup> 培養フラスコに細胞懸濁液 0.5 mL を添加し、炭酸ガス培養装置 (設定温度 : 37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 : 5%、型式 : MCO-170AICUV-PJ、パナソニックヘルスケア株式会社) で数日間培養する。

(4) 細胞が 25 cm<sup>2</sup> 培養フラスコの底に単層シート状になっていることを確認する。培養液を除去し、PBS で細胞を 2 回洗浄後に 0.05%トリプシン 1 mL を加えて細胞を剥離し、回収液を 15 mL 遠心管に移す。

(5) 回収液と等量の 10%FBS 添加 DMEM を混合し、5 分間遠心分離 (1000 rpm、190 × g、24°C) して上清を除去する。

(6) 15 mL 遠心管に培養液 1 mL を加えて再懸濁する。10%FBS 添加 DMEM 5 mL を加えた 25 cm<sup>2</sup> 培養フラスコに懸濁液 0.1 mL を添加し、炭酸ガス培養装置で数日間培養する。

(7) 単層シート状になったら(4)~(6)を繰り返し、細胞を継代する。

### 1. 3. 2. 75 cm<sup>2</sup> 培養フラスコ作製方法

(1) 継代培養し、25 cm<sup>2</sup> 培養フラスコの底で単層シート状になった宿主細胞の培養液を除去し、PBS で細胞を 2 回洗浄後、0.05%トリプシンを 25 cm<sup>2</sup> 培養フラスコ 1 本に対して 1 mL を加えて細胞を剥離し、回収液を 15 mL 遠心管に移す。

(2) 回収液と等量の 10%FBS 添加 DMEM を混合し、5 分間遠心分離 (1000 rpm、190 × g、24°C) して上清を除去する。

(3) 15 mL 遠心管に 10%FBS 添加 DMEM を 1 mL 加え再懸濁する。再懸濁した全量を滅菌済みメディウム瓶に入れ、さらに 10%FBS 添加 DMEM を加えて、75 cm<sup>2</sup> 培養フラスコに 15 mL ずつを播種し、炭酸ガス培養装置で培養する。

(4) 宿主細胞が 75 cm<sup>2</sup> 培養フラスコの底に単層シート状になっていることを確認し、接種ウイルス液の精製に用いる。

### 1. 3. 3. 6 ウェルプレート作製方法

(1) 継代培養し、25 cm<sup>2</sup> 培養フラスコの底で単層シート状になった宿主細胞の培養液を除去し、PBS で細胞を 2 回洗浄後、0.05%トリプシンを 25 cm<sup>2</sup> 培養フラスコ 1 本に対して 1 mL を加えて細胞を剥離し、回収液を 15 mL 遠心管に移す。

(2) 回収液と等量の 10%FBS 添加 DMEM を混合し、5 分間遠心分離 (1000 rpm、190 × g、24°C) して上清を除去する。

(3) 15 mL 遠心管に培養液 1 mL を加えて再懸濁する。再懸濁した全量を滅菌済みメディウム瓶に入れ、10%FBS 添加 DMEM を加え、6 ウェルプレートに 2 mL ずつを播種し、炭酸ガス培養装置で培養する。

(4) 宿主細胞が 6 ウェルプレートの底に単層シート状になっていることを確認し、接種ウイルス液の濃度測定及びウイルス増殖抑制試験に用いる。

## 1. 4. 接種ウイルス原液の精製方法

凍結保存のコロナウイルスを解凍し、RPMI1640 で適宜希釈し、HCT-8 細胞を培養した 75 cm<sup>2</sup>

培養フラスコに添加し、炭酸ガス培養装置で、細胞にウイルスを1時間吸着させる。

その後、ウイルス液を除去し、RPMI1640を加え、炭酸ガス培養装置（設定温度：33°C、CO<sub>2</sub>濃度：5%、型式：BAA-111、エスベック株式会社）で培養する。培養は、細胞変性効果（CPE）が出現するまで実施し、ウイルス液を含む上清を採取する。

採取後、遠心分離（2000 rpm、780×g、4°C、5分間）し、上清を接種ウイルス原液とする。接種ウイルス原液は1 mL ずつセラムチューブに分注し、超低温フリーザーに使用時まで凍結（-80°C）保存する。

#### 1. 5. 接種ウイルス液の濃度測定

接種ウイルス原液をMEMで段階希釈液（10<sup>1</sup>～10<sup>6</sup>）を調製する。HCT-8細胞を培養した6ウェルプレートに各ウイルス希釈液を1ウェルに0.5 mL ずつ添加し、15分毎に6ウェルプレートを振盪し、細胞にウイルスを1時間吸着させる。

その後、培地Aと培地Bを等量混ぜ合わせ、速やかに2 mL ずつ吸着の終わったシャーレに加える。アガロースが固まるまで室温に放置し、炭酸ガス培養装置で数日間培養し、ニュートラルレッドを加えた培地（培地A+培地B）を2 mL 重層し、一晩炭酸ガス培養装置で培養後、プラーク数を算定する。各濃度の例数は4とする。

培地A：10×MEM 10 mL、7.5% 炭酸水素ナトリウム 3 mL、200 mmol/L L-グルタミン 2 mL、1%DEAE デキストラン 1 mL、15%グルコース 1 mL、10% BSA 1 mL、抗菌薬 1 mL、滅菌蒸留水 31 mL

培地B：アガロース 0.8 g、蒸留水 50 mL

#### 1. 6. 接種ウイルス液の調製

凍結保存してある接種ウイルス原液を用時に融解して、そのまま接種ウイルス液として用いる。使用後の残余接種ウイルス原液は、オートクレーブ（LSX-500、株式会社トミー精工）処理（121°C、15分間）した後、廃棄する。

#### 1. 7. アンチセンス核酸のウイルス増殖抑制効果

24ウェルプレートにDBT細胞を播種（5×10<sup>4</sup> cells/mL）し、炭酸ガス培養器で約24時間培養する。培養後、アンチセンス核酸+Lipofectamine 2000™を0.2 mL 添加し、培養する。約6時間後に培養液を交換する。アンチセンス核酸+Lipofectamine 2000™の添加から約18時間後に、培養液を取り除き、1 mLのMEMで培地を洗浄する。接種ウイルス液を各ウェルに0.2 mL ずつ添加し、細胞にウイルスを1時間吸着させる。その後、接種ウイルス液を取り除き、接種ウイルス原液の濃度測定時に用いた培地Aと培地Bを等量混ぜ合わせ、速やかに1ウェルに1.5 mL ずつ細胞に重層し、アガロースが固まったら炭酸ガス培養装置で約24時間培養する。陰性対照として、アンチセンス核酸+Lipofectamine 2000™の代わりにEGFP アンチセンス核酸+Lipofectamine 2000™を用いる。

その後、培地Aと培地Bを混ぜ合わせた培地にニュートラルレッドを加えた培地を重層し、翌日、ウイルスプラーク数を測定する。例数は3とする。その後、培地Aと培地Bを混ぜ合わせた培地にニュートラルレッドを加えた培地を重層し、翌日、ウイルスプラーク数を測定する。例数は3とする。

プラーク数からウイルス感染価（log<sub>10</sub> PFU/mL）及びLog reductionを算出する。

Log reductionの計算方法は次式とする。

Log reduction = A - B

A : 陰性対照のウイルス感染価 (log<sub>10</sub> PFU/mL)

B : 被験物質のウイルス感染価 (log<sub>10</sub> PFU/mL)

## 結果

### 核酸医薬のコロनावirus(MHV)増殖抑制効果の評価

マウス肺炎ウイルス (MHV) のヌクレオカプシド mRNA の二つの領域 1180-1205 および 110-133 を標的とした gapmer アンチセンス核酸 (1, 4) およびその 5'-コレステロール(Chol)コンジュゲート(2, 5)、5'-コレステロール-3'-ポリエチレングリコール(PEG)コンジュゲート(3, 6)によるウイルス増殖抑制効果の評価した。ネガティブコントロールとしてヒト遺伝子とは相同配列を有しないことがわかっている EGFP (210 - 230) を標的とした gapmer アンチセンス核酸 EGFP ASO(210-230)を用いた。導入剤には LP2000™を用いた。その結果を Table 1 に示した。

#### 1. MHV1-NP ASO(1180-1205)

5'-UmUmUmUmGmUmUm<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>UmUmUmCmUmUmUm-3'

#### 2. MHV1-NP ASO(1180-1205)-Chol

Chol-5'-UmUmUmUmGmUmUm<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>UmUmUmCmUmUmUm-3'

#### 3. MHV1-NP ASO(1180-1205)-Chol-PEG

Chol-5'-UmUmUmUmGmUmUm<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>UmUmUmCmUmUmUm-3'-

PEG

#### 4. MHV1-NP ASO(110-133)

5'-UmGmCmCmUmCmUm<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>a<sup>^</sup>UmUmUmGmGmUmGm-3'

#### 5. MHV1-NP ASO(110-133)-Chol

Chol-5'-UmGmCmCmUmCmUm<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>a<sup>^</sup>UmUmUmGmGmUmGm-3'

#### 6. MHV1-NP ASO(110-133)-Chol-PEG

Chol-5'-UmGmCmCmUmCmUm<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>a<sup>^</sup>UmUmUmGmGmUmGm-3'-PEG

#### 7. EGFP ASO(210-230) (Negative Control)

5'-AmGmGmGmUm<sup>^</sup>c<sup>^</sup>a<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>AmGmGmUmGm-3'

Nm = 2'-OMeRNA、<sup>^</sup> = ホスホロチオエート、Chol = コレステロール、PEG = -(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>9</sub>-



Table 2. アンチセンス核酸およびコンジュゲートアンチセンス核酸による MHV 増殖抑制効果  
(Number of plaques)

Sample No.	Number of plaques														
	MHV1-NP ASO (1180-1205)			MHV1-NP ASO (1180-1205)-Chol			MHV1-NP ASO (1180-1205)-Chol-PEG			MHV1-NP ASO (110-133)			MHV1-NP ASO (110-133)-Chol		
	10 nM	100 nM	1000 nM	10 nM	100 nM	1000 nM	10 nM	100 nM	1000 nM	10 nM	100 nM	1000 nM	10 nM	100 nM	1000 nM
1	48	32	21	44	27	20	28	24	17	38	15	8	37	29	18
2	49	33	26	46	19	22	25	27	14	41	12	6	35	32	16
3	50	31	19	44	29	18	33	21	20	34	17	10	36	27	21
Number of samples	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Mean	49	32	22	45	25	20	29	24	17	38	15	8	36	29	18
S.E.	1	1	2	1	3	1	2	2	2	2	1	1	1	1	1

Table 1. アンチセンス核酸およびコンジュゲートアンチセンス核酸による MHV 増殖抑制効果  
(続き)

Sample No.	Number of plaques						
	MHV1-NP ASO (110-133)-Chol-PEG			EGFP ASO (210-230)			LP2000
	10 nM	100 nM	1000 nM	10 nM	100 nM	1000 nM	
1	38	22	16	49	39	29	43
2	41	23	14	47	41	27	46
3	39	22	18	48	37	33	47
Number of samples	3	3	3	3	3	3	3
Mean	39	22	16	48	39	30	45
S.E.	1	0	1	1	1	2	1

アンチセンス核酸のプラーク数は、MHV1-NP ASO(180-1205)では、10 nM で  $49 \pm 1$ 、100 nM で  $32 \pm 1$ 、1000 nM で  $22 \pm 2$  であった。MHV1-NP ASO(1180-1205)-Chol では、10 nM で  $45 \pm 1$ 、100 nM で  $25 \pm 3$ 、1000 nM で  $20 \pm 1$  であった。MHV1-NP ASO(1180-1205)-Chol-PEG では、10 nM で  $29 \pm 2$ 、100 nM で  $24 \pm 2$ 、1000 nM で  $17 \pm 2$  であった。MHV1-NP ASO(110-133)では、10 nM で  $38 \pm 2$ 、100 nM で  $15 \pm 1$ 、1000 nM で  $8 \pm 1$  であった。MHV1-NP ASO(110-133)-Chol では、10 nM で  $36 \pm 1$ 、100 nM で  $29 \pm 1$ 、1000 nM で  $18 \pm 1$  であった。MHV1-NP ASO(110-133)-Chol-PEG では、10 nM で  $39 \pm 1$ 、100 nM で  $22 \pm 0$ 、1000 nM で  $16 \pm 1$  であった。陰性対照の EGFP ASO(210-230)では、10 nM で  $48 \pm 1$ 、100 nM で  $39 \pm 1$ 、1000 nM で  $30 \pm 2$  であった。陰性対照の LP2000™では、 $45 \pm 1$  であった。

この中で、MHV1-NP ASO(110-133)が濃度依存的にウイルスの増殖を抑制し、LP2000™に比較して、1000 nM で 84%、100 nM で 67%、10 nM で 20%それぞれ抑制した。しかしながら、細胞膜透過性の向上を期待した MHV1-NP ASO(110-133)-Chol および MHV1-NP ASO(110-133)-Chol-PEG では 1000 nM においてそれぞれ 60%および 67%とむしろ効果が低下し、5'-コレステロール、3'-PEG はともに有効に機能しなかった。また、MHV1-NP ASO(1180-1205)とそのコンジュゲート MHV1-NP ASO(1180-1205)-Chol および MHV1-NP ASO(110-133)-Chol-PEG では

1000 nM においてそれぞれ 51%, 56%, 62%といずれも MHV1-NP ASO(110-133)よりも効果が低く、標的配列としてヌクレオカプシド mRNA(110-133)の方が効果的であることを示した。同時に、この場合も 5'-コレステロール、3'-PEG はともに有効に機能しなかった。

### 3. 化学修飾・コンジュゲート siRNA 核酸による細胞系での MHV ウイルス増殖抑制評価

(1-1) スクリーニングによる標的配列特定 (2種) (100nM, 10nM, 1nM)

(1-2) 特定した配列(2種)に対する siRNA 核酸-コレステロールコンジュゲートの評価(100nM, 10nM, 1nM)

新型コロナウイルス(SARS-CoV-2)のモデルとなるマウス肺炎ウイルス (murine hepatitis virus strain 1, MHV-1) のヌクレオカプシドプロテインをコードする転写産物の siRNA 分子設計ソフトウェアによる解析結果に基づいて標的配列を特定し、分子設計した 4 種類の siRNA 核酸を用いてマウス脳腫瘍細胞由来 SR-CDF1 DBT (JCRB1580) 細胞でのウイルス増殖抑制効果をウイルス力価測定により評価する。

現在までに 4 種類の siRNA 核酸の合成を完了し、それらの抗ウイルス活性を評価の条件の細部を下記の通り確定した。現在、評価試験を実施中である。評価試験の詳細は以下のとおりである。

siRNA 核酸 : siRNA/Serum Free MEM, total 250 ul/well

導入剤 : RNAiMAX™, 0.5 ul/well,

ウイルス : Murine hepatitis virus (MHV, ATCC VR-261)

宿主細胞 : SR-CDF1 DBT (JCRB1580)

接種ウイルス液の精製及び調製はすべて上記 2 と同様に行う。

#### 3.1. siRNA 核酸のウイルス増殖抑制効果

24 ウェルプレートに DBT 細胞を播種 ( $5 \times 10^4$  cells/mL) し、炭酸ガス培養器で約 24 時間培養する。培養後、siRNA+RNAiMax を 0.2mL 添加し、培養する。約 6 時間後に培養液を交換する。siRNA+RNAiMax の添加から約 18 時間後に、培養液を取り除き、1 mL の MEM で培地を洗浄する。接種ウイルス液を各ウェルに 0.2 mL ずつ添加し、細胞にウイルスを 1 時間吸着させる。その後、接種ウイルス液を取り除き、接種ウイルス原液の濃度測定時に用いた培地 A と培地 B を等量混ぜ合わせ、速やかに 1 ウェルに 1.5 mL ずつ細胞に重層し、アガロースが固まったら炭酸ガス培養装置で約 24 時間培養する。陰性対照として、siRNA+RNAiMax の代わりに EGFPsiRNA+RNAiMax を用いる。

その後、培地 A と培地 B を混ぜ合わせた培地にニュートラルレッドを加えた培地を重層し、翌日、ウイルスプラーク数を測定する。例数は 3 とする。

プラーク数からウイルス感染価 ( $\log_{10}$  PFU/mL) 及び Log reduction を算出する。

Log reduction の計算方法は次式とする。

$\text{Log reduction} = A - B$

A : 陰性対照のウイルス感染価 ( $\log_{10}$  PFU/mL)

B : 被験物質のウイルス感染価 ( $\log_{10}$  PFU/mL)

結果

siRNA 核酸のコロナウイルス(MHV)増殖抑制効果の評価

マウス肺炎ウイルス (MHV) のヌクレオカプシド mRNA の三つの領域 689-711、970-992 および 1263-1285 を標的とした 3 種の siRNA 核酸 MHV1-NP-siRNA1 (689-711)、MHV1-NP-siRNA2 (970-992)、MHV1-NP-siRNA4 (1263-1285) およびその 5'-コレステロール(Chol) コンジュゲート MHV1-NP-siRNA4 (1263-1285)-Chol によるウイルス増殖抑制効果を評価した。ネガティブコントロールとしてヒト遺伝子とは相同配列を有しないことがわかっている EGFP (210-230) を標的とした EGFP siRNA(210-230)を用いた。導入剤には RNAiMax を用いた。その結果を Table 2 に示した。

1. MHV1-NP-siRNA1 (689-711)

センス鎖 5'-CCUGAUAUGGCCGAAGAAUmUm-3'

アンチセンス鎖 5'-UUUCUUCGGCCAUAUCAGGUmUm-3'

2. MHV1-NP-siRNA2 (970-992)

センス鎖 5'-CUUCUUUGGAUCUAAAUUAGmAm-3'

アンチセンス鎖 5'-UAAUUUAGAUCCAAAGAAGAmAm-3'

3. MHV1-NP-siRNA4 (1263-1285)

センス鎖 5'-GAAAUGUAAGUAGAGAAUUmAm-3'

アンチセンス鎖 5'-AAUUCUCUACUUACAUUUCGmCm-3'

4. MHV1-NP-siRNA4 (1263-1285)-Chol

センス鎖 Chol-5'-GAAAUGUAAGUAGAGAAUUmAm-3'

アンチセンス鎖 5'-AAUUCUCUACUUACAUUUCGmCm-3'

5. EGFP siRNA(210-230) (Negative control)

センス鎖 5'-AGGGUCAGCUUGCCGUAGGUmGm-3'

アンチセンス鎖 5'-CCUACGGCAAGCUGACCCUGmAm-3'

Nm = 2'-OMeRNA

Table 2. siRNA および siRNA コンジュゲートによるコロナウイルス(MHV)増殖抑制 (Number of plaques)

Sample No.	Number of plaques															RNAiMax
	MHV1-NP-siRNA1 (689-711)			MHV1-NP-siRNA2 (970-992)			MHV1-NP-siRNA3 (1263-1285)			MHV1-NP-siRNA4 (1263-1285)-Chol			EGFP siRNA (210-230)			
	1 nM	10 nM	100 nM	1 nM	10 nM	100 nM	1 nM	10 nM	100 nM	1 nM	10 nM	100 nM	1 nM	10 nM	100 nM	
1	46	43	41	38	31	24	41	40	40	30	28	22	47	48	43	41
2	47	46	39	36	29	22	42	39	37	29	27	20	48	48	40	44
3	46	42	42	39	35	19	40	38	37	31	28	19	47	47	39	46
Number of samples	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Mean	46	44	41	38	32	22	41	39	38	30	28	20	47	48	41	44
SE	0	1	1	1	2	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1

siRNA 核酸のプラーク数は、MHV1-NP-siRNA1(689-711)では、1 nM で  $46 \pm 0$ 、10 nM で  $44 \pm 1$ 、100 nM で  $41 \pm 1$  であった。MHV1-NP-siRNA2(970-992)では、1 nM で  $38 \pm 1$ 、10 nM で  $32 \pm 2$ 、100 nM で  $22 \pm 1$  であった。MHV1-NP-siRNA3(1263-1285)では 1 nM で  $41 \pm 1$ 、10 nM で  $39 \pm 1$ 、100 nM で  $38 \pm 1$  であった。MHV1-NP-siRNA4(1263-1285)-Chol では、1 nM で  $30 \pm 1$ 、10 nM で  $28 \pm 0$ 、100 nM で  $20 \pm 1$  であった。陰性対照の EGFP siRNA(210-230)では、1 nM で  $47 \pm 0$ 、10 nM で  $48 \pm 0$ 、100 nM で  $41 \pm 1$  であった。陰性対照の RNAiMax では、 $44 \pm 1$  であった。

これらの中で最も効果の高かったのはコンジュゲート体 MHV1-NP-siRNA4(1263-1285)-Chol

で 100 nM において 55%、10 nM において 36%、1 nM において 32%それぞれウイルスの増殖を抑制した。同じ配列を標的とした MHV1-NP-siRNA3(1263-1285)では 100 nM において 14%しか抑制効果が見られなかったのでこの場合はセンス鎖 5'-コレステロールコンジュゲートにより効果が向上した。しかし、siRNA の標的配列の選定にはさらに検討が必要であると言える。

#### 4. コンジュゲート核酸の化学合成

上記 2 で化学合成したアンチセンス核酸の細胞膜透過性、細胞内局在性を向上させるために、クリックケミストリーを利用して、アンチセンス核酸マルチコンジュゲートの化学合成を進行中である。用いているアンチセンス核酸及びペプチドは下記のとおりである。

##### (1) MHV1-NP ASO (1180-1205)-X

X-5'-UmUmUmUmGmUmUm<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>UmUmUmCmUmUmUm-3'

##### (2) MHV1-NP ASO (1180-1205)-X-Cho

X-5'-UmUmUmUmGmUmUm<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>c<sup>^</sup>t<sup>^</sup>UmUmUmCmUmUmUm-3'-  
Cho

##### (3) MHV1-NP ASO (110-133)-X

X-5'-UmGmCmCmUmCmUm<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>a<sup>^</sup>UmUmUmGmGmUmGm-3'

##### (4) MHV1-NP ASO (110-133)-X-Cho

X-5'-UmGmCmCmUmCmUm<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>g<sup>^</sup>a<sup>^</sup>t<sup>^</sup>t<sup>^</sup>a<sup>^</sup>UmUmUmGmGmUmGm-3'- Cho

Nm = 2'-OMeRNA, ^ = ホスホロチオエート, Chol = コレステロール, X = アルキニル基  
膜透過性ペプチド

##### (1) XX- RLRLRLRLRLRLRL

##### (2) XX-GRKKRRQRRRPPQ-OH : HIV-1 tat NLS

##### (3) XX-ALGDSLYGAASLN-OH : 血液脳関門透過ペプチド

核外輸送シグナルペプチド (NES)

##### (4) XX- HNCH2CH2CH2CO-LVLDKLT-L-OH : TFIIA NES

##### (5) XX- LPPLERLTL-KG-OH : HIV-1 REV NES

XX = アジド基

#### 4.1. アルキン含有アンチセンス核酸 (ASO) の HPLC 分析の条件検討

アルキン含有 ASO とアジ化ペプチドのクリック反応を HPLC により追跡する際の条件を探るため、まずは ASO を下記の条件で分析した。

カラム : COSMOSIL, 5C18-MS-II, 4.6ID x 150 mm

移動相 : 0-100%, 20% 100 mM TEAA in MeCN / 100 mM TEAA

流速 : 1.0 mL/min

検出波長 : 260 nm, 280 nm

カラムオーブン : 40°C

注入量 : 0.1 nmol

その結果、コレステロールを含まない ASO (1) および (3) は約 12 分後の溶出を確認できたが、モデル実験用のコレステロール含有 ASO は溶出を確認することができなかった。この問題はコレステロールによる疎水性の高さにより引き起こされていると考えられるが、ヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) の利用により同様の ASO を溶出している例に倣い、次の移動相で検討を行いたく試薬は購入済みである。

検討すべき移動相：30–90%, 20 min, 100 mM HFIP in 8 mM TEAA / MeOH

#### 4.2. アジ化ペプチドの HPLC 分析の条件検討

アジ化ペプチド (1) についても注入量を 10 nmol とし「4.1.」の条件で分析を試みたが、バックグラウンドからの新規ピークは確認できなかった。そこでペプチド結合による 225 nm の吸収を検出しようとしたが、11 分から 15 分に生じた大きなバックグラウンドピークにより分析が妨げられた。移動相を調製し直しても改善が見られず、この問題は解決されていない。ただしこの際に用いた TEAA 原液は以前に調製したものである。

#### 4.3. クリック反応の HPLC 分析

「4.1.」の問題を踏まえ ASO としてコレステロールを含まないモデル実験用 ASO を選択し、アジ化ペプチド (1) は「4.2.」の通り検出がうまく行えていないもののクリック反応が進行すれば原料である ASO のピークの消失と新規ピークが現れるものと考え、次の条件で反応を試みた。

硫酸銅 (2.0 nmol, 1.0  $\mu$ L) と tris(3-hydroxypropyltriazolylmethyl)amine (THPTA) (10 nmol, 1.0  $\mu$ L) を混合後室温で 30 分静置し、そこへ ASO (1.0 nmol, 10  $\mu$ L) とアジ化ペプチド (2.0 nmol, 0.4  $\mu$ L) を追加した。室温で 10 分静置し、用事調製したアスコルビン酸ナトリウム (100 nmol, 1.0  $\mu$ L) を添加し、HPLC に試料を注入した。しかし、生成物として想定される ASO コンジュゲートのピークが見られないのみならず原料の ASO も検出できなくなるという結果であった。反応溶液中に多種類の化合物が混在するため要因を特定するのは容易でないと考え、NAP カラムによるオリゴ DNA の簡易精製を行った後に HPLC 分析を試みようと考え、カラムを購入済みである。

以上の通り引き続きアンチセンス核酸マルチコンジュゲートに取り組み、上記 2 と同様に、抗ウイルス活性評価を行う。

### 5. siRNA 核酸と脂質ナノ粒子 DDS による細胞系でのウイルス増殖抑制評価

上記 2 及び 3 の試験結果を受けて、siRNA 核酸の抗ウイルス効果を向上させるために脂質ナノ粒子(LNP)を用いるドラッグデリバリーシステム(DDS)を検討する。特に、この後の動物試験においては重要な要素となる。

本研究の主たる対象であるマウス肺炎ウイルス (MHV) を用いる脂質ナノ粒子により包摂した siRNA (siRNA-LNP)の増殖抑制効果を評価する前試験として、研究室で取り扱い可能なインフルエンザウイルス H3N2 株を用いてニワトリ有精卵における siRNA-LNP のウイルス増殖抑制効果を評価した。

脂質ナノ粒子化 siRNA 350  $\mu$ L または 100  $\mu$ L と インフルエンザウイルス H3N2 (10 TCID<sub>50</sub>) 100  $\mu$ L を混和し、Total 450  $\mu$ L または 200  $\mu$ L の脂質ナノ粒子化 siRNA およびウイルス液を産卵後 3 日のニワトリ有精卵の尿膜腔へ投与した。24 時間後に尿液回収し、ウイルス力価を標準法により測定した。その結果を Table 3 に示す。

Table 3 に示す通り、siRNA-LNP は siRNA・LP2000™ と比較して効果の向上は観測できず、脂質ナノ粒子化の有効性は示されなかった。この結果および 3.1. siRNA 核酸のウイルス増殖抑制効果の結果を受けて、より最適な siRNA 核酸の標的配列の選定を優先することとし、siRNA-LNP の MHV に対する増殖抑制効果の評価試験は見合わせることにした。

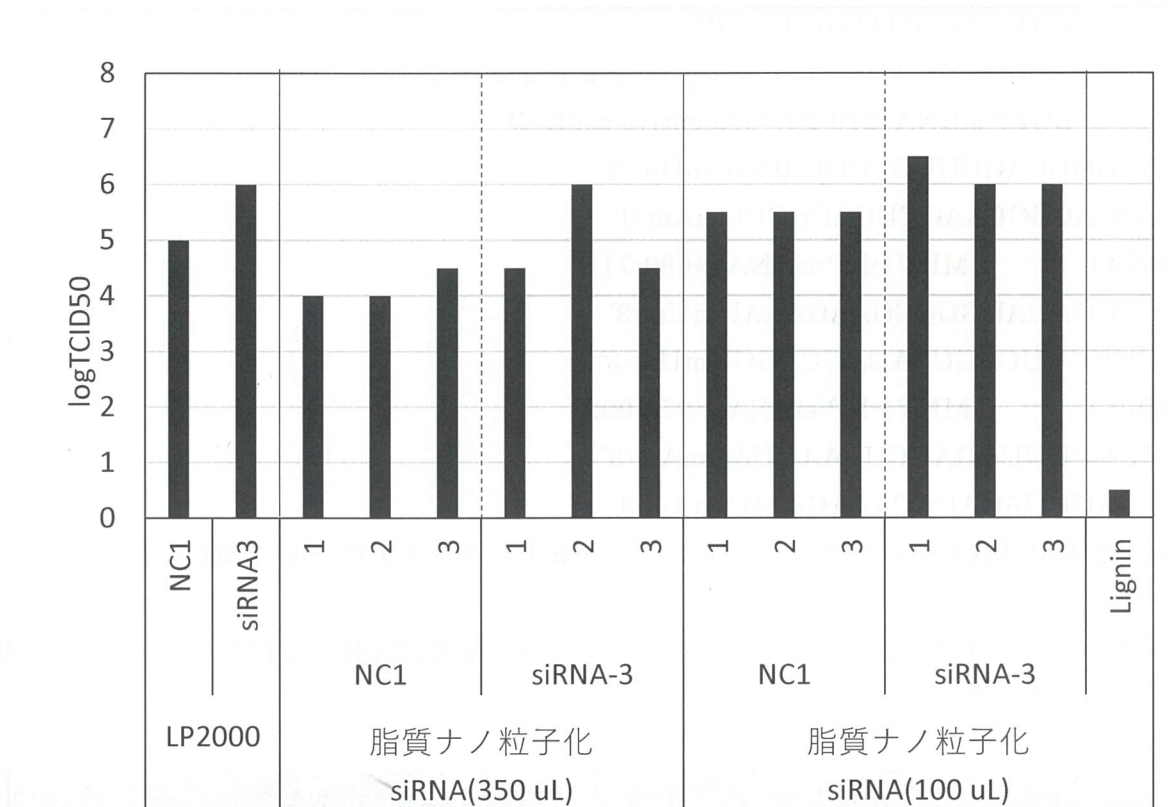


Table 3. siRNA-LNP によるインフルエンザウイルス H3N2 の増殖抑制効果

#### 6. アンチセンス核酸、siRNA 核酸の安全性評価

ニワトリ有精卵を用いてアンチセンス核酸、siRNA 核酸の安全性評価を行った結果、アンチセンス核酸 8 種類、siRNA 核酸 2 種類について、いずれも、コントロール実験との差は認められず、毒性はないとの結論を得た。評価試験は 100uM アンチセンス核酸 50 uL + RNAiMAX 25 uL、または 50 uM siRNA50 uL + HilyMax 50 uL を尿膜腔へ投与し、24 時間後にニワトリ胎児の生育を観察した。

Control. EGFP ASO (210-230) (Negative Control)

5'-AmGmGmGmUm^c^a^g^c^t^t^g^c^c^g^t^AmGmGmUmGm-3'

ASO1. MHV1-NP ASO (1180-1205)

5'-UmUmUmUmGmUmUm^t^t^g^t^c^c^c^t^c^t^c^t^UmUmUmCmUmUmUm-3'

ASO2. MHV1-NP ASO (1180-1205)-Chol

Chol-5'-UmUmUmUmGmUmUm^t^t^g^t^c^c^c^t^c^t^c^t^UmUmUmCmUmUmUm-3'

ASO3. MHV1-NP ASO (1180-1205)-Chol-PEG

Chol-5'-UmUmUmUmGmUmUm^t^t^g^t^c^c^c^t^c^t^c^t^UmUmUmCmUmUmUm-3'-PEG

ASO4. MHV1-NP ASO (1180-1205)-PS

5'-t^t^t^t^g^t^t^t^g^t^c^c^c^t^c^t^c^t^t^t^t^c^t^t^t-3'

ASO5. MHV1-NP ASO (110-133)

5'-UmGmCmCmUmCmUm^a^t^t^t^t^g^a^t^t^a^UmUmUmGmGmUmGm-3'

ASO6. MHV1-NP ASO (110-133)-Chol

Chol-5'-UmGmCmCmUmCmUm^a^t^t^t^t^g^a^t^t^a^UmUmUmGmGmUmGm-3'

ASO7. MHV1-NP ASO (110-133)-Chol-PEG

Chol-5'-UmGmCmCmUmCmUm^a^t^t^t^t^g^a^t^t^a^UmUmUmGmGmUmGm-3'-PEG

ASO8. MHV1-NP ASO (110-133)-PS

5'-t^g^c^c^t^c^t^a^t^t^t^t^g^a^t^t^a^t^t^t^g^g^t^g-3'

Control. EGFP siRNA (210-230) (Negative control)

5'-AGGGUCAGCUUGCCGUAGGUmGm-3'

5'-CCUACGGCAAGCUGACCCUGmAm-3'

siRNA1. MHV1-NP-siRNA1 (689-711)

5'-CCUGAUAUGGCCGAAGAAUmUm-3'

5'-UUUCUUCGGCCAUAUCAGGUmUm-3'

siRNA3. MHV1-NP-siRNA2 (970-992)

5'-CUUCUUUGGAUCUAAAUUAGmAm-3'

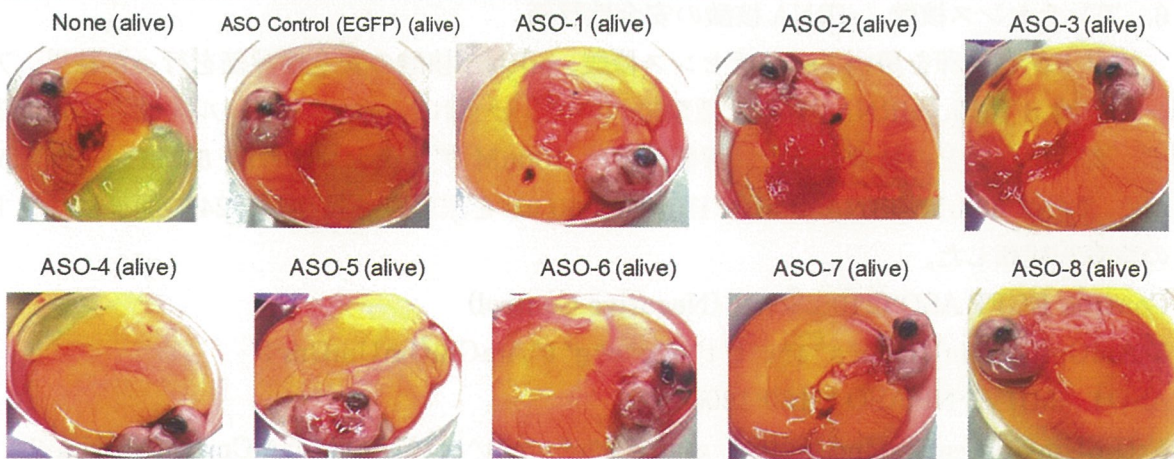
5'-UAAUUUAGAUCCAAAGAAGmAm-3'

Nm = 2'-OMeRNA, ^ = ホスホロチオエート, Chol = コレステロール, PEG = ポリエチレングリコール

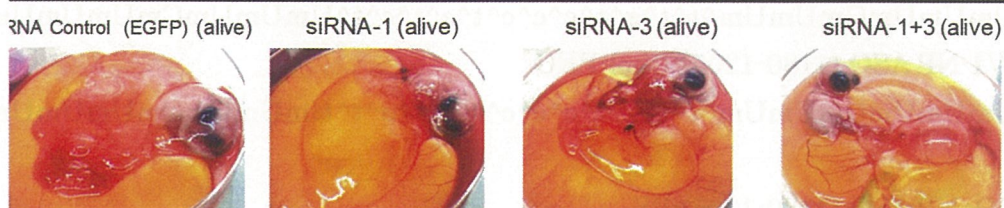
その結果、いずれにおいてもコントロールと同様に胎児は成長しており、単回投与急性毒性は認められなかった。

### ニワトリ有精卵を用いたアンチセンス核酸およびsiRNA核酸の安全性評価

0.00 uM ASO 50 uL + RNAiMAX 25 uL (Opti-MEM 25 uL)



0.00 uM siRNA 50 uL + HilyMax 50 uL



3. 本研究と関連した今後の研究、開発・改良、提案計画

上記 2、3、4、5 の評価試験の結果を受けて、必要な場合はさらに異なる標的配列に対する Gapmer アンチセンス核酸および siRNA 核酸を化学合成し、より最適な標的配列を探索する。今回選定した配列で高い活性が確認できれば、その抗ウイルス効果を向上させるために siRNA 核酸の抗ウイルス効果を向上させるために脂質ナノ粒子(LNP)を用いるドラッグデリバリーシステム(DDS)を検討する。この後の動物試験においては重要な要素となる。

さらにアンチセンス核酸、siRNA の細胞内での標的特異性を向上させるために、核外輸送シグナルペプチド(NES)などのコンジュゲート体の化学合成とそれらの抗ウイルス効果の評価試験を進める。その上で、アンチセンス核酸、siRNA の最適な分子構造を探索できれば、動物試験など医薬への応用を目指してその可能性を評価する。

4. 研究成果の発表等

発表機関名	種類(著書・雑誌・口頭)	発表年月日(予定を含む)
Applied Sciences, 2021, 11, 1174-1188.	雑誌	2021年1月
Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids 2020, 39, 1-3, 407-425.	雑誌	2020年4月20日
核酸科学ハンドブック(分担執筆)、 (株)講談社サイエンティフィック、監 修 杉本直己、藤井政幸 第II部 核酸科学の最前線、41. 核酸-ペプチ ドコンジュゲート p.541-545.	著書	2020年12月22日
The Journal of Organic Chemistry 85 8371 - 8386	雑誌	2020年6月11日
第64回香料・テルペンおよび精油化 学に関する討論会	口頭	2020年10月25日

5. 開発・改良、提案課題の成果発表等