

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名：デュアル修飾型アンチセンス核酸を用いた癌種横断的な新規治療薬の研究開発

Development of dual-modified antisense oligonucleotides to treat various types of solid tumors

研究開発実施期間：令和3年5月1日～令和6年3月31日

研究開発代表者 氏名：神田 光郎

Mitsuro Kanda

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人東海国立大学機構 名古屋大学 大学院医学系研究科 消化器外科学 講師

Assistant Professor, Department of Gastroenterological Surgery, Nagoya University Graduate School of Medicine

II 研究開発の概要

切除不能・再発性消化器癌はいずれの癌種でも予後不良であり、更なる治療開発が求められている。多くの開発治験にもかかわらず未だに有効性を示す分子標的治療薬は限られており、別の作用機序から癌細胞を制御する薬剤の開発が必要である。また、低分子化合物や抗体医薬の創薬ターゲット枯渇が叫ばれる中、新たな創薬手法として核酸医薬が近年注目を集めている。

我々は、難治性癌の特徴を司り、新たな治療標的となりうる分子を同定すべく、次世代シーケンサーによる Transcriptome 解析を行った。同時性遠隔転移を有する胃癌症例群の非癌部胃粘膜組織、胃癌原発巣組織、転移巣組織を用いて 57749 分子の発現を網羅的に解析したところ、原発巣で非癌部より発現増加し、転移巣でさらに有意な発現増加を認める分子の中から、(1) 230 例からなる探索コホートで癌組織中高発現が悪性度に相関を示すこと、(2) The Cancer Genome Atlas などの外部公開データで validation されること、(3) 複数の固形癌で高発現していること、(4) 癌における機能について既報がないこと、(5) 生理的機能喪失が致死性と想定されないこと、(6) 阻害薬の安全性を見据え、心、腎、肝での発現が豊富でないこと、(7) siRNA でのノックダウンにより細胞増殖能抑制効果が確認できたこと、の全てを満たす候補として標的膜タンパクを厳選した。

本ターゲットの有望性を示す臨床的エビデンスとして、i) 名古屋大学医学部附属病院での保存検体と臨床データ (n=230)、The Cancer Genome Atlas (TCGA；米国主導の多癌種データ n>7489)、Kaplan-Meier Plotter (欧米4カ国の統合データ n=1065) があり、いずれにおいても胃癌をはじめとする各種固形癌（膀胱癌、頭頸部癌、食道癌、肺癌、直腸癌、卵巣癌、肉腫など）で組織中高発現が予後不良因子であることが示されている。また、第3相臨床試験から得られたエビデンスにより胃癌補助化学療法における key drug となっている 5-FU 系およびプラチナ系抗腫瘍剤への不応・耐性獲得が臨床上問題となっているが、組織中標的膜タンパク高発現症例では 5-FU/

プラチナ系抗腫瘍剤の生存延長効果が発揮されていないことが明らかになっている。分子標的治療薬においては、HER2 陽性胃癌に対してのみ、トラスツズマブが有効であるも、陽性率が 20%程度であることが治療選択を狭めている。胃癌臨床検体 (n=96)を用いた免疫染色で、69%の癌組織が標的膜タンパク陽性であり、特筆すべきは HER2 陰性胃癌においても 72%が陽性であったことである。HER2 陰性胃癌において、標的膜タンパク阻害薬が有力な治療法となりうると思われる。

これら臨床データから得られた結果に基づき標的膜タンパクを阻害する創薬コンセプトを着想し、アンチセンス核酸医薬開発研究を開始した。mRNA の二次構造予測システムを用いた配列デザインにおいて、自己相補的配列の回避でダイマー形成を防ぎつつ、マウス *in vivo* 試験で薬効の延長線上にみられる毒性評価を可能とするためマウスとのホモロジーも考慮した。さらに、肝毒性発現リスクが上昇することが知られているモチーフ (TCC/TGC)を回避するとともにオフターゲットを最小化する配列設計を行い、候補配列を合成した。濃度依存性ノックダウン効率をもとにスクリーニングを進め、有望アンチセンス核酸配列選定を進めた。アンチセンス核酸は標的発現癌細胞で 70%以上の増殖阻害活性を示す一方で、発現が無い癌細胞では効果がなく特異的なオンターゲット活性であることを示していた。標的分子の発現ベクターを用いて無発現細胞株に強制発現させたところ、コントロールベクターに比して細胞増殖能が増加した。癌の進展に重要な悪性形質である細胞浸潤能、増殖能についても、アンチセンス核酸によって抑制された。

スクリーニングを進め 29 種類の初期候補配列から標的ノックダウン効率、*in vitro* での胃癌細胞機能阻害効果、*pilot study* としての *in vivo* 活性（マウス腹膜播種モデル）および毒性をもとに 2 つの有望配列を得た。しかし、さらなる *in vivo* 活性評価（皮下腫瘍モデル）に向けて、高濃度でアンチセンス核酸を投与した場合の毒性について評価したところ、最高濃度群のマウスは投与開始 2 週以内に 4 匹全て死亡した。このように想定外の毒性致死をきたしたため、新規配列をデザインした。同様のスクリーニング過程を経て、有望 3 配列を選抜した。これら配列は濃度依存性かつ癌種横断的（食道癌、膵癌、大腸癌、肝癌、乳癌、肺癌）に細胞株に対する細胞増殖阻害活性を示した。*in vitro* Caspase assay では、いずれも細胞毒性は容認可能なレベルであった。3 種（MKN1、HGC-27、GCIY）のヒト胃癌細胞株を対象としアンチセンス核酸による細胞接着能、浸潤能を評価したところ、いずれも有意に抑制された。

10 mg/kg もしくは 30 mg/kg のアンチセンス核酸を週 1 回腹腔内投与することにより、胃癌細胞 MKN1 および膵癌細胞 As-PC1 による腹膜播種モデルで腫瘍増殖抑制効果を示した。アンチセンス核酸腹腔内投与（30 mg/kg、週 1 回腹腔内投与、4 週間）の腫瘍増殖抑制効果を評価したところ、有意な腫瘍抑制効果を示した。50mm³ 以上の皮下腫瘍が形成されたのちにアンチセンス核酸を投与し、治療効果を評価したところ皮下腫瘍の増大を有意に抑制された。

同時に、同分子阻害の癌細胞抑制作用メカニズムを明らかにすべく、ターゲットバリデーションを進めた。ゲノム編集により標的遺伝子を欠損させた遺伝子改変マウスを作製し、Wild type, hetero, homo の 3 群間で比較解析した。生殖、発育（体重等）、主要臓器形成に異常を認めなかった。認知・運動機能評価として rota-rod 試験を実施したが、これも差を認めなかった。血液検査上、肝機能・腎機能・骨髓造血機能は同等であった。アンチセンス核酸添加による癌細胞の細胞内シグナル伝達系リン酸化状態を網羅的に調査し、変化のみられたシグナル系を個別に Simple Western 法で評価したところ、標的分子のノックダウンにより b-カテニン、細胞周期調節因子等に干渉し細胞機能を調節していることが示唆された。標的膜タンパク強制発現による細胞形態の変化を観察するために発現ベクターを用いて HEK293 細胞に安定的発現させイメージング分析を行ったが、強制発現による細胞形態の明らかな変化は検出されなかった。The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org>)における public data 検索では、脳神経系組織、内分泌組織（副甲状腺、下垂体など）、膵組織で標的膜タンパク発現が比較的豊富であっ

た。さらにヒト正常胃組織、大腸組織、食道組織、膵組織、肝臓組織、乳腺組織で免疫染色を実施し、消化管組織、肝組織、乳腺組織では標的膜タンパク発現は乏しいことを確認した。

アンチセンス核酸の有害事象として肝毒性が報告されており、投与量をエスカレーションした場合の安全性を担保するためマウスの AST 等を指標に最良配列およびバックアップ配列の各濃度域での肝毒性や、休薬によってどの程度回復するかについて調査した。新規 3 配列について、肝毒性を含めた毒性評価を行った。それぞれ 10mg/kg、30mg/kg、100mg/kg の週 1 回腹腔内投与を 2 週間行い、Day 8、Day 15、Day 29 の 3 回血液検査を実施した。Day 29 でマウスを犠死させ、肝臓を含めた主要臓器を観察した。いずれも 100mg/kg 群で肝胆道系酵素の上昇を認めたが、休薬により回復した。

マイクロアレイおよび *in silico* 解析でのオフターゲット探索を行った。D3G データベースおよび GGGenome を用いて 2 塩基ミスマッチの範囲で候補遺伝子の絞り込みを行い、マイクロアレイ解析においても発現変化が認められた遺伝子を抽出した。

胃癌症例の外科的切除組織検体を対象に免疫染色法を実施し、組織中の標的膜タンパク発現を調べた。染色強度により no staining、weak staining、strong staining に患者を分類可能であった。術後生存期間は、no staining、weak staining、strong staining の順に短縮しており、組織中膜タンパク発現評価による患者層別化が可能と考えられた。

本研究開発の成果から、全く新しい癌治療アンチセンス核酸について複数の癌種で非臨床の有効性データを取得し、作用機序を説明するデータ、コンパニオン診断技術に関するデータを構築できた。今後の最適化研究により毒性軽減と活性強化を経て臨床推定用量が決定し、GLP 非臨床安全性試験へと進めて行きたいと考えている。

Unresectable and recurrent gastrointestinal cancers have a poor prognosis and require further therapeutic development. Despite numerous clinical trials, only a limited number of molecular-targeted therapies have yet shown efficacy, and there is a need to develop drugs that can control cancer cells through alternative mechanisms of action. In addition, nucleic acid medicine has been attracting attention as a new drug discovery method in recent years because of depletion of drug targets for low-molecular-weight compounds and antibody drugs.

We performed transcriptome analysis using next-generation sequencing to identify molecules that govern the characteristics of refractory cancer and are potential new therapeutic targets. We comprehensively analyzed the expression of 57749 molecules in non-cancerous gastric mucosal tissues, primary gastric cancer tissues, and metastases of gastric cancer patients with concurrent distant metastasis. Target membrane proteins were carefully selected from molecules whose expression is increased in primary tumors compared to non-cancerous areas and is further significantly increased in metastatic areas.

We initiated research on development of antisense oligonucleotides (ASOs) by designing sequences using mRNA secondary structure prediction system. Screening was conducted based on the efficiency of concentration-dependent knockdown, and selection of promising ASO sequences was proceeded. The ASOs showed more than 70% growth inhibitory activity in target-expressing cancer cells, while they were ineffective in cancer cells without expression, indicating specific on-target activity. Forced expression of the target molecule in a no-expression cell line using an expression vector increased cell proliferative capacity compared to the control vector. Cell invasiveness and proliferative capacity, which are malignant traits important for cancer progression, were also suppressed by the ASOs.

From the 29 initial candidate sequences screened, two promising sequences were obtained based on target knockdown efficiency, in vitro gastric cancer cell function inhibitory effect, in vivo activity as a pilot study (mouse peritoneal seeding model), and toxicity. However, we evaluated the toxicity of ASOs when administered at high concentrations, and all four mice in the highest concentration group died within 2 weeks of administration. Because of this unexpected toxic lethality, new sequences were designed. Through a similar screening process, three promising sequences were selected. In vitro caspase assays showed acceptable levels of cytotoxicity in all three cell lines (MKN1, HGC-27, GCIY). Cell adhesion and invasive ability were evaluated in three human gastric cancer cell lines (MKN1, HGC-27, and GCIY), and all were significantly inhibited.

Weekly intraperitoneal administration of ASOs at 10 mg/kg or 30 mg/kg showed tumor growth inhibitory effect in a peritoneal seeding model with gastric cancer cell MKN1 and pancreatic cancer cell As-PC1. Intraperitoneal administration of ASOs (30 mg/kg, weekly intraperitoneal administration, 4 weeks) showed significant tumor growth inhibition effect.

The target gene deficient mice were generated, and comparative analysis was performed among the three groups: wild type, hetero, and homo. No abnormalities were observed in reproduction, growth (body weight, etc.), or major organ formation. The rota-rod test was performed to evaluate cognitive and motor functions, but no differences were found. Blood tests showed that liver function, renal function, and bone marrow hematopoietic function were comparable. The phosphorylation state of intracellular signaling pathways in cancer cells was comprehensively investigated by adding ASOs, and the altered signaling pathways were individually evaluated by the Simple Western method. The results suggest that knockdown of target molecules interferes with b-catenin, cell cycle regulators, and other factors to regulate cell functions.

The three new sequences were evaluated for toxicity, including hepatotoxicity. Mice were sacrificed on Day 29 and major organs including the liver were observed. In all cases, hepatobiliary enzymes were elevated in the 100 mg/kg group, but recovered with drug withdrawal.

Off-target risks were explored by microarray and in silico analysis: candidate genes were narrowed down within a two-base mismatch range using the D3G database and GGGenome, and genes with altered expression were also extracted by microarray analysis.

Immunostaining was performed on surgically resected tissue samples of gastric cancer cases to examine the expression of target membrane proteins in the tissues. Patients could be classified into no staining, weak staining, and strong staining according to staining intensity. Postoperative survival was shorter in the order of no staining, weak staining, and strong staining, and it was considered possible to stratify patients by evaluation of membrane protein expression in tissues.

In this study, nonclinical efficacy data for a completely new cancer therapeutic ASOs in multiple cancer types was obtained and build data explaining its mechanism of action and companion diagnostic technology. Next step, the estimated clinical dose after toxicity reduction and activity enhancement are determined through future optimization studies, and proceed to GLP non-clinical safety studies.