

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後評価報告書

I 基本情報

研究開発課題名：最適化 DDS 搭載がん核酸医薬療法の前臨床試験と薬物動態解析

Preclinical and Pharmacokinetic Study for the Development of Optimized DDS-loaded ASO Therapy
against Cancers

研究開発実施期間：令和 5 年 4 月 15 日～令和 7 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：吉見 昭秀

Akihide Yoshimi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立研究開発法人国立がん研究センター 研究所 がん RNA 研究分野・分野長

Chief, Division of Cancer RNA Research, National Cancer Center Research Institute

II 研究開発の概要

がん抑制遺伝子はがんの病態に重要な役割を果たすが、特異的治療法が臨床応用されているものは非常に限られている。我々は、個々の遺伝子の exon-intron junction 領域に存在する splice site を破壊し、自身に Intron retention (IR) を誘導するような遺伝子変異 (Intron Retention-Associated Variant:IRAV) を RNA sequence (RNA-seq) データのみから正確に抽出する IRAVNet を開発し、23 万例以上の大規模データに適用して、網羅的に検索することにより、遺伝子 A における IRAV による IR を修正する Antisense Oligonucleotide (ASO) の標的を複数同定した。

まず、遺伝子 A-IRAV の中でも頻度の高い数種類の IRAV に特に注目した。IRAVNet で検出した IRAV が実際に IR を誘導することを確認するために、遺伝子 A に異常のないがん細胞株に CRISPR Cas9 システムを用いて IRAV をノックインしたところ、実際に想定する IR が誘導されることを RT-PCR、RNA-seq で確認するとともに、遺伝子 A にコードされる蛋白質の発現が低下すること、遺伝子 A に関連したパスウェイが有意に変動すること、また遺伝子 A 機能喪失に関連する細胞生物学的形質として DNA 損傷を生じる抗癌剤への耐性化を確認した。

さらに、遺伝子 A-IRAV 近傍のあるエレメントに注目し、標的配列に対して ASO を 15 種類設計した結果、2 種類の ASO による IR の修正に成功した。一方で、がんに対する核酸医薬開発は未だに国内外での承認例がなく、in vitro で活性が確認されていても、in vivo において安定性やがん細胞への送達が不十分であることなどから十分な治療効果が得られていないのが現状である。そこで、本研究開発では様々な DDS 技術と連携し、DDS 搭載 ASO を用いて in vivo における活性を CDX/PDX モデルにより評価し、並行して国立がん研究センター濱田の ASO の薬物動態解析技術を用いて作用部位への集積性を確認することにより、遺伝子 A-IRAV に対して最適化した

DDS を搭載した遺伝子 A-ASO を開発し、初の遺伝子 A 変異特異的がん核酸医薬療法としての非臨床 POC 取得を目的とした。

まず、遺伝子 A-ASO 単剤で *in vitro* における増殖抑制効果を検討したところ、遺伝子 A にコードされる蛋白質タンパク質の発現量は遺伝子 A-ASO により回復するものの、増殖抑制効果は *marginal* であった。遺伝子 A-IRAV 陽性細胞の増殖は遺伝子 A 機能喪失に依存しないことから、この結果は想定した通りであった。

そこで、次に遺伝子 A 機能喪失が DNA 傷害性抗がん剤への耐性の原因となることに注目し、遺伝子 A-IRAV 陽性細胞への遺伝子 A-ASO+CDDP（シスプラチン）併用効果を検討したところ、予想通り両者の併用により優れた細胞増殖抑制効果が得られ、アポトーシスを誘導することが確認された。

上記の結果を踏まえ、遺伝子 A-ASO と CDDP の併用による遺伝子 A-ASO の *proof-of-concept* (POC) 取得を目指すこととした。

まず、各連携施設で実施する *in vivo* 実験の治療プロトコールをなるべく共通のものにし、実験結果を比較可能とするために、CDDP による治療を 4 週にわたり実施しても、レシピエントである Nude マウスが生存するような治療レジメンを策定するために、遺伝子 A WT-KI (synonymous mutation を knock-in した対照群) および遺伝子 A-IRAV1 陽性細胞を Nude マウスの皮内に移植し、3 mg/kg、4 mg/kg、5 mg/kg の 3 種類の dose で移植後 7 日目から毎週腹腔内投与したところ、5 mg/kg で WT の増殖が軽度に抑制可能な傾向があり、また 35 日目の時点で全例が生存し、採血で血算異常を認めなかったため、第 4 回連携班会議で議論の上、CDDP 5 mg/kg/week ip を共通治療プロトコールとして採用した。

そこで、国立がん研究センターにおいて遺伝子 A-ASO(morpholino)の腫瘍内投与と CDDP の併用の効果について遺伝子 A-IRAV 導入 A549 細胞を用いた CDX モデルにて評価した。その結果、遺伝子 A-ASO(morpholino) + CDDP は著明に腫瘍増殖を抑制した。特に、遺伝子 A-ASO(morpholino)+CDDP 併用群では、Day 37 の IVIS 評価でシグナルが消える個体が出始め、結果として Day 71 までの観察で遺伝子 A-ASO(morpholino)+CDDP 治療群は死亡例がなく、治癒に結びついた可能性が非常に高い。一方、治療期間を含めた Day 49 までの評価でレシピエントマウスの体重変化は各群で特に認められず、Day 14、Day 28 採血検査においても特に異常は認められなかった。

この間、研究開発協力者の国立がん研究センター濱田が、Morpholino 体の血中濃度測定系の構築に成功し、上記の遺伝子 A-ASO 腫瘍内投与モデルでも血中濃度を測定して頂いた。その結果、腫瘍内投与モデルにおいても全身循環する遺伝子 A-ASO は一定量存在することが判明した。一方、濱田の薬物動態解析のために *Vivo morpholino* をマウスに投与した際に、10 mg/kg あるいは 20 mg/kg の投与で一部のマウスが即死し、著しい炎症反応や強力な血栓形成傾向を示すことが判明したことから、全身投与（静注）用の遺伝子 A-ASO Morpholino 体の開発は中止とした。

そこで次に、研究開発協力者の西山（東京科学大学）、浅井（静岡県立大学）が保有する DDS 技術を用いて遺伝子 A-ASO を内包し、静注可能な製剤とした上で、その薬効を同じく CDX モデルにて評価した。

まず、西山・喜納らの DDS 搭載遺伝子 A-ASO については、2 種類の塩基修飾を施して評価を行ったところ、血中滞留性は遺伝子 A-ASO1 の方が遺伝子 A-ASO2 よりも血中滞留性が良好であった。一方、腫瘍組織への浸透率については遺伝子 A-ASO1 が良好であったことから、*in vivo* の薬効試験では遺伝子 A-ASO1 を用いることとした。

CDX モデルにおける遺伝子 A-ASO1 と CDDP の併用治療の結果、遺伝子 A-ASO1 と CDDP 併用群で良好な増殖抑制効果が観察されたが、一方で、本来 CDDP に抵抗性の遺伝子 A-IRAV 細胞が Control ASO + DDS + CDDP

による治療に一定の感受性を示したことから、実験施設間での差異・あるいは DDS 自体の非特異的作用が考えられた。

一方、浅井らの遺伝子 A-ASO-LNP については、上記の Morpholino 体の腫瘍内投与と同様の良好な結果が得られた。

以上の比較検討により、各 DDS 技術の薬効や毒性の比較が可能となった。要約すると、下記ようになる。

Morpholino (吉見)：腫瘍内投与モデルにおいて、一部で治癒したと思われる個体が出るなど非常に良好な抗腫瘍効果を示した。Morpholino 体はすでに臨床応用されている核酸医薬があり (Eteplirsen、Viltolarsen など)、製剤化プラットフォームが構築済みで安全性が (ASO 配列特異的な effect を除き) 担保されているという利点もあるが、今回準備した Vivo-Morpholino はマウスへの副作用が強く、評価が困難であったため、これ以上の開発を中止した。

西山 DDS：良好な血中滞留性、腫瘍移行性が観察され、優れた抗腫瘍効果が見られたが、CDDP との併用において想定するような効果が見られず (CDDP 抵抗性であるはずの遺伝子 A-IRAV 陽性 CDX モデルに対して CDDP が抗腫瘍効果を示したことに起因する)、その意味で抗腫瘍効果の判定が困難であった。

浅井 DDS：CDDP 抵抗性の遺伝子 A-IRAV 陽性 CDX モデルにおいて、想定されるような良好な併用効果が観察され、また体重減少についても CDDP の影響と考えられたことから、遺伝子 A-ASO の毒性はかなり限定的であることが考えられた。

したがって、西山あるいは浅井の DDS 技術を搭載した遺伝子 A-ASO はいずれも全身投与が可能な有効な核酸医薬と考えられた。また、CDDP との併用によって、いずれの DDS 技術を用いても非臨床 POC を取得することに成功した。

本成果は、遺伝子 A-ASO の今後の臨床開発への可能性を示すものであり、非臨床開発に進むために企業導出、予算獲得を今後目指した。また、本研究開発のシエ化から、これまでに undruggable であった標的についても、スプライシング異常/IRAV に注目することによって治療標的化が可能なこと、DDS 技術との融合によって、全身投与による非臨床 POC の取得が可能なが示された。我々の解析により、これまでに遺伝子 A に限らず多数の ASO 標的が、がんに限らず様々な疾患、病態関連遺伝子に同定されたことから、本成果はそれらの疾患・病態にも拡張可能なことが示唆される。

Tumor suppressor genes play a critical role in cancer pathogenesis, but clinically approved, mutation-specific therapies targeting them remain extremely limited. To address this challenge, we developed IRANet, a computational pipeline that accurately detects Intron Retention-Associated Variants (IRAVs)—mutations that disrupt splice sites at exon-intron junctions and induce intron retention (IR)—using RNA-seq data alone. We applied IRANet to over 230,000 samples and identified multiple IRAVs in Gene A that induce IR and may be correctable by antisense oligonucleotides (ASOs).

We initially focused on several high-frequency Gene A IRAVs. To validate whether these IRAVs indeed cause IR, we introduced them into cancer cell lines without Gene A abnormalities using CRISPR-Cas9. RT-PCR and RNA-seq confirmed that these IRAVs induce the expected IR, decrease Gene A protein expression, and significantly alter Gene A-related pathways. Furthermore, Gene A-IRAVs conferred resistance to DNA-damaging agents, consistent with Gene A loss-of-function.

Next, we designed 15 ASOs targeting sequences near the IRAVs and successfully identified two that corrected IR. However, no gene-specific nucleic acid drugs for cancer have been approved globally. Even if in vitro activity is confirmed, in vivo delivery and stability remain major barriers. Thus, in this project, we aimed to develop a Gene A-specific ASO optimized with Drug Delivery Systems (DDS) by testing in CDX/PDX models and performing pharmacokinetic analyses in collaboration with Dr. Akinobu Hamada at the National Cancer Center.

In vitro, Gene A-ASOs restored Gene A protein expression but showed only marginal growth inhibition, likely because Gene A loss is not essential for proliferation in these cells. However, Gene A loss does confer resistance to DNA-damaging agents. Accordingly, we tested the combination of Gene A-ASO and cisplatin (CDDP) in Gene A-IRAV-positive cells. The combination yielded strong synergistic anti-proliferative and pro-apoptotic effects.

Based on these results, we aimed to establish proof-of-concept (POC) for Gene A-ASO + CDDP. We unified in vivo treatment protocols across participating institutions and established a regimen of CDDP 5 mg/kg/week that was tolerable in Nude mice with Gene A-WT or Gene A-IRAV1 xenografts.

At the National Cancer Center, the combination of intratumoral morpholino-based Gene A-ASO and CDDP was tested using a Gene A-IRAV A549 CDX model. This combination significantly suppressed tumor growth. In some cases, IVIS imaging at day 37 showed signal disappearance, and no mice in this group died by day 71, indicating potential cures. No body weight loss or hematologic toxicity was observed during or after treatment.

Dr. Hamada also established a method for quantifying morpholino ASO concentrations in blood and confirmed systemic circulation even after intratumoral injection. However, systemic administration of Vivo-morpholinos at 10–20 mg/kg led to acute toxicity, inflammation, and thrombosis, so systemic development using morpholinos was discontinued.

Next, we used DDS technologies developed by Dr. Nishiyama (Science Tokyo) and Dr. Asai (University of Shizuoka) to formulate ASOs into injectable nanoparticles. Two chemically modified ASOs were tested. ASO1 showed superior circulation and tumor penetration and was selected for in vivo testing. ASO1 combined with CDDP significantly inhibited tumor growth. Interestingly, control ASO + DDS + CDDP also had some effect, suggesting possible nonspecific DDS effects. In contrast, Dr. Asai's ASO-LNP formulation

reproduced the excellent results of the morpholino group, including expected synergistic effects in the CDDP-resistant Gene A-IRAV model, with limited toxicity.

In summary:

- Morpholino ASOs showed the strongest efficacy via intratumoral injection, with some cured mice. Clinical formulation platforms already exist (e.g., Eteplirsén, Viltolarsén). However, systemic use caused unacceptable toxicity.
- Nishiyama DDS-ASO showed good PK and tumor accumulation but unexpectedly high response to CDDP alone complicated interpretation.
- Asai DDS-ASO (LNP) showed excellent efficacy and safety, supporting its continued development.

Both DDS platforms successfully achieved systemic delivery and demonstrated nonclinical POC when combined with CDDP. These findings suggest the potential for clinical translation of Gene A-ASOs. This work also illustrates that previously "undruggable" targets can be addressed by focusing on splicing abnormalities like IRAVs and combining ASOs with advanced DDS technology to achieve systemic delivery and POC. Our pipeline has already identified many additional ASO targets across various diseases, indicating broad future applicability beyond Gene A or cancer.

公表資料（事後評価報告書）の作成にあたっての注意事項

研究成果の公表により、特許権を取得できない、ノウハウとして秘匿すべき事項（例えば、製造条件の詳細）が第三者に知られる、研究開発において第三者に先を越されるといった事態が起こり得ます。特に、創薬研究については、化合物情報(有効成分)、生物活性情報と治療対象疾患の情報から第三者が容易に研究内容を把握できてしまうため、下記のように、化合物情報と生物活性情報（治療対象疾患）のいずれかを公表しないといった工夫をすることが必要です。公表資料に記載する事項については、各研究機関の知財担当者等と相談することをお勧めします。

例 1. ある化合物の生物活性が新規である場合

× 課題名：A B 1 2（名称から化学構造式が明らか）の Y Z キナーゼ阻害活性

○ 課題名：化合物 X の Y Z キナーゼ阻害活性

→ 公表資料においては、例えば、化合物情報の具体的な開示を避ける。

例 2. 標的（Y Z キナーゼ）が抗がん剤のターゲットとして新規である場合

× 課題名：化合物 X を有効成分とする Y Z キナーゼ阻害剤－新規機序による抗がん剤の開発

○ 課題名：化合物 X を有効成分とする新規抗がん剤の開発

→ 公表資料においては、Y Z キナーゼが抗がん剤の新規ターゲットとなることは、できる限り開示しない。化合物 X の具体的な開示も避ける。