

日本医療研究開発機構
次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(RNA 標的創薬技術開発)
事後成果報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）新規 RNA 標的医薬品の研究開発
（英語）Research and Development of Novel RNA-targeted Therapeutics (R&D of Novel RNA-targeted Therapeutics)

研究開発実施期間：令和 3 年 7 月 15 日～令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：（日本語）上野 義仁
（英語）Yoshihito UENO

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
（日本語）国立大学法人東海国立大学機構 岐阜大学・応用生物科学部・教授
（英語）Gifu University, Tokai National Higher Education and Research System・Faculty of Applied Biological Sciences・Professor

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

和文：2 ページ以上

英文：1 ページ程度

核酸医薬，主に siRNA 医薬とアンチセンス医薬は，その特異性と安全性の高さから，次世代医薬品候補として大きな期待をもたれているが，体内での不安定性や，標的細胞，組織への効率的な送達が開発を行う上でボトルネックとなっている。天然型 siRNA は，直接には細胞内へ送達されないということと，ヌクレアーゼによって分解され易く不安定であるということから，これまで，医薬品として製造・販売の承認を得ることが難しかった。しかし，この分野のリーダーである米国アルナイラム社は，2018 年に，リポソーム・siRNA 複合体製剤パティシランの開発に成功し，続いて 2019 年，2020 年に，リポソームを用いない皮下投与剤である GalNAc 糖鎖リガンドを付加した RNA 干渉薬，ギボシラン，ルマシラン及びインクリシランの開発に成功している。しかしながら，パティシランは，DDS として脂溶性リポソームを含むことからその使用は肝臓へ限定的である。一方，GalNAc-siRNA コンジュゲート型 RNA 干渉薬においても，細胞内挙動に関してエンドソームから細胞質への移行効率は

0.01%以下であり改善の必要があること、また、リポソーム製剤と同様に送達先が肝臓に限られることから、肝臓経路以外の病気のための siRNA 医薬が求められており、この問題点をクリアするための研究課題は新たな DDS の開発であることが判っている。

本研究開発では、上記課題を克服する為に、岐阜大学が有する、核酸化学と糖鎖化学の力を最大限に活用することにより、1) siRNA 及びアンチセンス核酸に新規化学修飾を施して、生体内でも安定な siRNA 及びアンチセンス核酸を創出し、2) がん細胞表面に過剰発現している受容体を標的とした化合物をコンジュゲートとして、上記安定化 siRNA 及びアンチセンス核酸と組み合わせることにより、シンプルで有効性と安全性に優れた核酸医薬を創出することを目的とした。

核酸のヌクレアーゼ耐性および細胞膜浸透性を向上させる化学修飾法として、リン酸基に近い部位の修飾がヌクレアーゼ耐性向上に有効であるとの考えのもと、ヌクレオシドの糖部 4'位及び 5'位にアミノアルキル側鎖を導入した新規ヌクレオシドアナログを開発した。まず、(S)-5'-C-アミノプロピル-2'-O-メチルヌクレオシドの四塩基の合成法を確立し、これらを含む siRNA の RNA 干渉活性、熱安定性、血清安定性を評価した (ACS Advances, 2022)。その結果、以下のことが明らかとなった。1) (S)-5'-C-アミノプロピル修飾は、siRNA パッセンジャー鎖の 3'-末端および 5'-末端に配置した場合、RNAi 活性を保持した。2) 中央部に導入した場合、RNAi 活性が低下した。これは、RISC 形成時のパッセンジャー鎖切断が阻害されるためと推察された。3) 修飾ヌクレオシドを 3-4 個連続して導入しても、末端であれば活性は保持されたが、5 連続導入では活性の低下が見られた。4) ガイド鎖側への修飾は多くの位置で RNAi 活性を低下させたが、例外的に位置 7 の修飾は許容された。5) 血清中での安定性試験において、(S)-5'-C-アミノプロピル修飾は 2'-O-メチル修飾よりも高い耐性を示し、特に、パッセンジャー鎖 3'-末端の UpA 分解部位で有効であった。6) KNTC2 を標的とする siRNA でも、(S)-5'-C-アミノプロピル修飾を末端に導入した場合、RNAi 活性は保持された。このことから、(S)-5'-C-アミノプロピル-2'-O-メチルヌクレオシドを siRNA の脆弱部位 (主に 3'末端) へ適切に導入することで、RNAi 活性を維持しつつ血清中での安定性を向上できることが分かった。

次に、5'-C-アミノプロピル修飾ヌクレオシドを RNase H 依存型アンチセンス核酸へ応用することを目的として、2'-位の水酸基にアミノエチル基並びにメトキシエチル基を導入した 2 種類の新規修飾チミジンアナログ、(S)-5'-C-アミノプロピル-2'-O-アミノエチルチミジン並びに(S)-5'-C-アミノプロピル-2'-O-メトキシエチルチミジンを合成し、その物性・生物活性を評価した (Results in Chemistry, 2024)。その結果、以下のことが明らかとなった。1) 両修飾ヌクレオシドを導入した DNA は高いヌクレアーゼ耐性を示し、血清中での分解を大幅に抑制した。2) 50%融解温度 (T_m) を測定し、DNA/RNA 二重鎖の熱安定性を評価したところ、(S)-5'-C-アミノプロピル-2'-O-メトキシエチル修飾は DNA/RNA 二本鎖の熱的安定性を向上 ($\Delta T_m = +1.2$ °C) させるのに対し、2'-O-アミノエチル修飾は不安定化 ($\Delta T_m = -6.3$ °C) することが明らかとなった。3) RNase H 活性については、両修飾とも、十分な DNA ギャップがある場合は RNase H を活性化できること、ただし、2'-O-アミノエチル修飾は立体障害により切断効率が低下することが分かった。4) KRAS を標的とした LNA (Locked Nucleic Acid) ギャップマーへの応用した結果、(S)-5'-C-アミノプロピル-2'-O-メトキシエチル修飾をウイング部に導入した KRAS ギャップマーは、in vitro に於いて 5 μ M の濃度条件下で、LNA ポジティブコントロールより強いノックダウン効果を示した。このことから、(S)-5'-C-アミノプロピル-2'-O-メトキシエチル修飾は、LNA に代わる有望なアンチセンス・ウイング領域の修飾候補であることが示唆された。

更に、新規ヌクレオシド、(S)-5'-C-アミノプロピル-2'-アラビノフルオロ-5-メチルウリジン並びに(S)-5'-C-アミノプロピル-2'-アラビノフルオロ-5-メチルシチジンを LNA ギャップマーに導入し、標的遺伝子 KNTC2 の発現抑制効果を評価した (Molecules, 2022)。その結果、1) 本修飾は、RNase H 活性化能を保ちながら、二重鎖の熱的安定性およびヌクレアーゼ耐性を向上させること、2) ホスホロチオエート (PS) 結合の減少によるヌクレアーゼに対する不安定化は、本修飾の導入により補償できることが明らかとなった。また、3) A549tGFP 細胞を用いた細胞実験から、PS 修飾の数を減らし且つ、本修飾を導入した LNA キャップマーが LNA ポジティブコントロールと比較して同等またはそれ以上の機能を示したことから、本修飾により PS 修飾由来の毒性を低減出来る可能

性が示唆された。

続いて、4'-アミノエチルデオキシヌクレオシド4塩基を LNA ギャップマーのギャップ部位に網羅的に導入して、サイレンシング活性と細胞毒性を評価した。その結果、以下のことが明らかとなった。1) ギャップ領域の1、2、10番目にアナログを導入しても活性は保持され、2番目の位置にアナログを導入したものでは、非導入型よりも高い活性を示した。また、2) アナログの両端のPS結合をリン酸ジエステル(PO)に置換しても活性が保持されたことから、アナログ導入によりPS結合を減らすことが可能であることが示唆された。4'-N-メチルアミノエチル-2'-O-デオキシヌクレオシド(4'-MAE-Ns)を導入したものでは4'-AE-Nsを導入したものよりも高いサイレンシング活性を示した(Bioorg. Med. Chem, 2022)。3) ギャップ領域の3、4番目へのアナログの導入は、LNAギャップマーの細胞毒性を低下させることが分かった。

アミノ基を足掛かりとしてアルキル基を伸長させることにより、糖部4'-位にN-アルキルアミノエチル基を導入した新規チミジン誘導体である4'-N-エチルアミノエチルチミジン(4'-EAE-T)、4'-N-ブチルアミノエチルチミジン(4'-BAE-T)及び4'-N-オクチルアミノエチルチミジン(4'-OAE-T)を合成し、その物性と生物活性を評価した(Molecules, 2025)。その結果、1) T_m 測定から、4'-EAE-T及び4'-BAE-Tは4'-MAE-Tと同等の T_m 値をもち、4'-OAE-Tでは大幅に T_m 値が低下した。2) RNase H活性能については、4'-EAE-Tは未修飾体と同等の活性化能をもち、4'-BAE-T及び4'-OAE-Tでは切断効率が低下した。3) ヌクレアーゼ耐性に関しては、4'-EAE-Tが最も安定化効果が高く、最も鎖長が長い4'-OAE-Tが最も安定化効果が低かった。4) KRASを標的とした遺伝子発現抑制活性測定では、4'-EAE-Tあるいは4'-BAE-Tを含むLNAギャップマーは、未修飾体と同等のサイレンシング効果を示したのに対し、4'-OAE-Tを導入したものでは活性が低下した。このことから4'-EAE-TがLNAギャップマーに最も適した修飾体であり、ヌクレアーゼ耐性向上と優れたRNase H活性化能を両立できることが分かった。

立体電子効果による核酸二重鎖の安定化を目指し、アミノアルキルリンカーが4'-位炭素に酸素原子を介して結合した新規修飾ヌクレオシドである4'-C-アミノエトキシ-2'-O-メチルウリジンを設計・合成し、4'-C-アミノプロピル-2'-O-メチルウリジンとの性質比較を行った(Results in Chemistry, 2021)。その結果、1) 4'-C-アミノエトキシ-2'-O-メチルウリジンを導入したRNA及びsiRNAは、4'-C-アミノプロピル-2'-O-メチルウリジンを導入したものに比べて高い T_m 値をもち、血清を含む培地中でのヌクレアーゼ耐性も大幅に向上した。2) また、4'-C-アミノエトキシ-2'-O-メチルウリジンの導入はヌクレオシド糖部の立体配座をC3'-endoへシフトさせ、これが熱安定性向上の一因と考えられた。3) siRNAへの応用では、パッセンジャー鎖に少数導入する場合、RNAi活性は保持される一方、多数導入すると立体障害により活性低下が見られた。

続いて、ヌクレオシド糖部4'-位にアミノエトキシ基、塩基部5'-位にプロピニル基を導入した4'-アミノエトキシ-2'-O-メチル-5-プロピニルウリジンを設計・合成し、その性質を検証した(RSC Advances, 2024)。その結果、4'-アミノエトキシ-2'-O-メチル-5-プロピニルウリジンは二重鎖の T_m 値を大きく上昇させた($\Delta T_m = +4.2$ °C/mod.)。これは、5'-位のプロピニル基と隣接する塩基との間のスタッキング相互作用が寄与していると考えられた。2) 分子動力学解析から、アナログの糖部がC3'-endo立体配座を優先し、A型二重鎖形成に有利に働いていることが示唆された。また、3) アナログの導入はヌクレアーゼ耐性を大幅に向上させること、3) RNase H活性化を若干低下させるもののDNAギャップを確保することによってRNase H活性化が可能であることが分かった。4) KRAS標的としたin vitroでのアンチセンス活性測定から、アナログを3'-ウイング部位へ導入したLNAギャップマーは、ポジティブコントロールと同等の活性を示したことから、4'-アミノエトキシ-2'-O-メチル-5-プロピニルウリジンはLNAの代替修飾として有望であることが示唆された。

レクチンをはじめとする糖結合性タンパク質は、細胞特異的に発現することが知られており、細胞選択的な薬物送達の基本原則としての高い潜在能力を秘めている。本研究開発では、糖鎖を認識素子として有する新たな核酸-糖鎖コンジュゲートを開発し、アミノアルキルヌクレオシドの核酸安定化技術と組み合わせることにより、LNP等のキャリアーを必要とせずに、標的細胞内に効率的に安定に送達されるsiRNA及びアンチセンス核酸を創出することを目的とした。具体的な標的として、A受容体を高発現するBがん及びC受容体を高発現するD腫瘍を設定し、各受容体のリガンドとなるX及びYをモチーフとした標的送達モジュールを開発した。siRNA

と連結するためのリンカーを結合させた X 及び Y 誘導体を合成した後に、亜リン酸化することで核酸自動合成機に適応可能なアミダイト体を合成することに成功した。また、合成したアミダイトを用いて X 及び Y 誘導体をクラスター状に結合させた siRNA 並びにアンチセンス核酸を構築することに成功した。X 及び Y 誘導体をクラスター状に結合させた siRNA は、マウスを用いた *in vivo* 実験に於いて腫瘍に集積することを確認した。

Nucleic acid therapeutics, particularly small interfering RNA (siRNA) and antisense oligonucleotides (ASOs), have emerged as highly promising next-generation drug modalities due to their remarkable target specificity and safety. However, two major barriers have impeded their clinical development: (1) instability in biological systems caused by rapid nuclease degradation, and (2) extremely low efficiency of intracellular delivery to target cells and tissues. Native siRNA cannot independently penetrate cell membranes and is rapidly degraded *in vivo*, making it difficult historically to obtain regulatory approval. A transformative advance occurred when Alnylam Pharmaceuticals (USA) succeeded in developing patisiran, a liposomal siRNA formulation, approved in 2018. This was followed by the approval of GalNAc-conjugated subcutaneous RNAi therapeutics, including givosiran, lumasiran, and inclisiran between 2019–2020. Nevertheless, patisiran depends on liposomal lipid carriers and is therefore restricted primarily to hepatic delivery. Likewise, GalNAc-siRNA conjugates, although simpler and safer, are also limited to liver targeting and suffer from extremely low endosomal escape efficiency (<0.01%). Thus, the urgent unmet need is the development of a novel delivery system enabling efficient cytosolic release and targeting beyond the liver, especially for diseases such as cancer.

The present research project aims to overcome these limitations by maximizing the nucleic acid and glycoconjugate chemistry capabilities at Gifu University. The goal is twofold: (1) to develop chemically modified siRNA and antisense oligonucleotides with substantially improved nuclease resistance and *in vivo* stability, and (2) to conjugate these stabilized nucleic acids with ligands targeting receptors overexpressed on cancer cell surfaces, enabling carrier-free, highly selective delivery.

Novel nucleosides bearing aminoalkyl side chains at the 4' and 5' positions of the ribose moiety were synthesized, including (*S*)-5'-*C*-aminopropyl-2'-*O*-methyl-modified nucleosides. Evaluation of siRNAs incorporating these analogues revealed: RNAi activity was retained when modifications were introduced at either the 3'- or 5'-terminus of the passenger strand. Central-region modifications caused loss of RNAi activity due to interference with passenger-strand cleavage during RISC activation. Serum stability was significantly improved compared with conventional 2'-*O*-methyl modifications, particularly at vulnerable UpA cleavage sites. Terminal incorporation preserved RNAi function even for the KNTC2 target siRNA. These findings demonstrate that site-specific introduction of (*S*)-5'-*C*-aminopropyl-2'-*O*-methyl nucleosides improves serum stability without compromising RNAi potency. Two new modified thymidine analogues—(*S*)-5'-*C*-aminopropyl-2'-*O*-aminoethyl and (*S*)-5'-*C*-aminopropyl-2'-*O*-methoxyethyl—were synthesized and evaluated: Both modifications greatly enhanced nuclease resistance. The 2'-*O*-methoxyethyl analogue increased duplex thermal stability ($\Delta T_m = +1.2$ °C), whereas the 2'-*O*-aminoethyl analogue reduced it. KRAS-targeting LNA gapmers incorporating the 2'-*O*-methoxyethyl analogue showed stronger knockdown effects than positive controls at 5 μ M *in vitro*. These results indicate that the 2'-*O*-methoxyethyl derivative is a promising alternative to LNA as a wing-region modification. Additional analogues, including aminoalkyl-modified arabino-fluoro nucleosides and 4'-*N*-alkylaminoethyl thymidines, were also synthesized. They successfully enhanced nuclease resistance and RNase H activation while enabling reduction of phosphorothioate (PS) linkages, suggesting a potential path toward lowering toxicity typically associated with PS chemistry. 4'-*C*-aminoethoxy-2'-*O*-methyluridine derivatives showed: Significantly increased thermal duplex stability and nuclease resistance relative to 4'-*C*-aminopropyl analogues. Favorable shift towards C3'-endo sugar conformation, supporting A-form helix stabilization. Preservation of RNAi activity when introduced at limited positions in siRNA.

To achieve selective, carrier-free uptake, new nucleic acid-glycan conjugates were developed targeting: A receptor-overexpressing B cancer, and C-high D malignancies. After synthesis of glycan derivatives equipped with linkers and phosphoramidite modification, cluster-type glycan-conjugated siRNA and antisense molecules were constructed. *In vivo* mouse studies confirmed their accumulation within tumors, indicating successful receptor-mediated targeting. This research establishes a comprehensive platform that combines innovative aminoalkyl nucleoside chemistry with glycan-based receptor targeting to enhance stability, delivery, and therapeutic efficacy of siRNA and antisense nucleic acid drugs without reliance on lipid carriers. The outcomes pave the way toward developing nucleic acid medicines applicable beyond hepatic diseases,

particularly for cancer treatment.