

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) 新規修飾 siRNA と核酸デリバリーの最適化による難治性卵巣がん治療に関する研究開発

(英語) Research and development of therapies for refractory ovarian cancer using novel chemically modified siRNAs and optimized nucleic acid delivery systems.

研究開発実施期間：令和 3 年 9 月 1 日 ～ 令和 8 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 谷口 博昭

(英語) Hiroaki Taniguchi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

(日本語) 国立大学法人金沢大学・がん進展制御研究所・教授

(英語) Professor, Cancer Research Institute, Division of Innovative Cancer Control Research, Cancer Research Institute of Kanazawa University.

II 研究開発の概要

研究開発の成果・その意義 (日本語)

1. 国内外の外部環境

未だに抗がん核酸創薬で上梓されたものは無いが、本研究の先行研究で実施したキメラ型 PRDM14 siRNA + Y-shaped block cationer 複合体 (unit Poly-ion complex:uPIC)の難治性乳がん対象の第一相試験は G3 以上の有害事象なく、一部の症例では一定の薬効が得られている。他、抗がん核酸医薬の開発状況としては、非臨床ステージが主体であり、アルナイラム社の CTNNB1 標的の siRNA を LNP で内包したものが第一相試験を完遂している状況である。

2. 外部環境を踏まえた本課題の立ち位置や課題自体の必要性

標的分子の PRDM14 は腫瘍細胞 (特に、乳がん、膵がん、肺腺がん、卵巣がん等) に限局した発現を示し、がん幹細胞性に深く関与する転写因子であり、腫瘍のヘテロ性を抑止する戦略の一つとしてがん幹細胞を狙うこととした。本課題では上記の治験剤型をより発展させ、新規の siRNA 配列、化学修飾を加える事によるオフターゲット (OT) 効果の軽減と RNase 耐性を付与し、かつ DDS 剤である YBC との間で最適化を図るプロジェクトとして始動した。また、アンメットメディカルニーズであり分子標的薬が比較的乏しく、難治性の病態「腹膜播種」が頻発する卵巣がんの治療介入を目的とした。

3. 研究開発の成果

1) 候補分子 PRDM14 の強固な臨床的 POC の取得:

- 臨床症例数を増やして卵巣がん組織の発現 (mRNA/蛋白)・病理組織学的因子について解析、上皮性卵巣がん (EOC) においてPRDM14発現が認められた。

2) 修飾型 siRNA の配列/修飾部位の同定:

- Class Ia に当該一部に 2'-O メチル (2'-OMe) 化修飾等の化学修飾を付した PRDM14 siRNA 配列を複数設計、RNase 耐性化目的に改変を施した。
- PRDM14 が高発現する卵巣腫瘍細胞株に対し上記 PRDM14 siRNA をリポフェクション法で導入、*in vitro* での標的遺伝子 (PRDM14) 発現の抑制効果をqRT-PCR, Western 法にて評価、最も抑制効果が高かった 1 配列 (N3+1) を同定した。
- 腫瘍細胞の viability (抗腫瘍活性) については、ATP 産生を指標として評価し、発現抑制効果と同じく (N3+1) 配列が最も抑制効果が高く、濃度依存性に抗腫瘍活性を示した。
- OT 効果は遺伝子発現マイクロアレイにて網羅的に評価し、2'-OMe 型が最も低かった。

3) 修飾型 siRNA と核酸デリバリー剤 YBC との最適解探索:

- 1) で同定した 2'-OMe 型および特定の化学修飾を施した PRDM14 siRNA と YBC により形成される次世代型 PRDM14 uPIC を用いて、生体内における uPIC の血中滞留性を生体共焦点顕微鏡にて蛍光標識化 siRNA を用いて評価。
- 生体内における uPIC の血中滞留性は、化学修飾型 >> 2'-OMe > キメラ型 > 未修飾型 の順であった。

生体血中滞留性と単剤による皮下移植モデル評価:

- *in vivo* の評価において、最高の薬効を示した配列は、PRDM14 (N3+1) 配列により形成される次世代型 PRDM14 uPIC であった。
- 卵巣腫瘍モデルに対する抗腫瘍効果は 2'-OMe 型と化学修飾型において後者で腫瘍径縮小効果は大きい OS には有意差が無かった。つまり、一定の血中滞留性を超えていれば、予後への影響としては大きくない可能性が示唆され、いずれの剤型も生体への明らかな毒性は観察されなかった。

【変更内容】リガンドコンジュゲーションによる Active targeting 化

- 腫瘍集積を目的に 2 種類のリガンド (A, B) を siRNA に conjugation するという 2 案について、既報告の論文を参考に linker 構造の検証、化学合成を試行錯誤し、複数のリガンドコンジュゲート型 PRDM14 siRNA を作出した。
- リガンド A 付与化学修飾型 siRNA で形成される PRDM14 uPIC において、type 1 の linker 構造を用いた際、type 2 に比較し、高い血中滞留性と皮下腫瘍への集積性が見られたが、一定時間後に血中からの siRNA が速やかに消失した。
- リガンド B 付与化学修飾型 siRNA で形成される PRDM14 uPIC において、リガンド A 付与化学修飾型 siRNA で形成される uPIC より高い血中滞留性と腫瘍集積性が見られた。
- 皮下移植モデルに対する PRDM14 uPIC の抗腫瘍効果は、リガンド B 付与化学修飾型 > リガンド A 付与化学修飾型となった。

4) *in vivo* 抗腫瘍効果の評価 (後期薬効薬理試験): 化学療法併用・腹膜播種モデルの検証

- PRDM14 分子は抗がん剤耐性形質を腫瘍細胞に付与するため、治験時併用薬の候補として、標準治療に用いられる化学療法薬 X, 化学療法薬 Y 併用モデルにおける抗腫瘍効果を検証
- 非コンジュゲート型 PRDM14 uPIC (N3+1) と化学療法薬 X, 化学療法薬 Y 併用の抗腫瘍効果 (皮下移植モデル) の検証において、化学療法薬 X 併用が最も腫瘍径を抑制したが、OS は化学療法薬 X, 化学療法薬 Y 併用群は共に単独治療群と比較し延長し、その 2 群間では差が無かった。

【計画変更内容】

- リガンド B 付与 PRDM14 uPIC (N3+1) と化学療法薬 X, 化学療法薬 Y 併用の抗腫瘍効果を皮下移植モデル、並びに腹膜播種モデルで検証した。皮下移植モデルにおいて化学療法薬 X 併用が最も腫瘍径を抑制するが、リガンド B 付与型の薬効が高く、腹膜播種モデルにおいてリガンド B 付与型 + 化学療法薬 X 併用群は播種後 45 日においてもマウス死亡が生じず、化学療法薬 X 治療群、非コンジュゲート型と比較して顕著な生命予後の改善が得られた。同様の試験計画で同所移植モデルについて検証中である。

5) 修飾型 siRNA・YBC の GMP 合成・非臨床試験:

- 最終的な次世代型 PRDM14 uPIC (N3+1) の剤型として、リガンド B 付与型 PRDM14 uPIC (N3+1) が決定した。→ここまでが当初の計画
- YBC の GMP 合成はすでに日本油脂 (株) に技術移転済みであり、先行研究での GMP 品合成の実績、並びに、YBC の物性試験の非臨床データがあるため、NANO MRNA 社のご協力の下、非臨床試験用の YBC の確保を進めた。

【計画変更内容】

- 最終剤型案であるリガンド B 付与体の化学修飾型 siRNA のスケールアップ合成が可能かどうかの評価を領域 1 と連携し合成プロセス開発を進め完遂された。

4. 研究開発の意義:

本研究は、がん幹細胞性維持に関わる転写因子 PRDM14 を標的とした修飾型 siRNA と、Y-shaped block cationer (YBC) による uPIC 製剤、さらに腫瘍指向性リガンドを組み合わせることで、難治性卵巣がん、とりわけ腹膜播種を標的とする新規核酸医薬のコンセプトを具体化し、非臨床段階から次期治験候補剤型までを一気通貫で描き出した点に意義がある。

1) 医学的・臨床的意義

- PRDM14 は乳がん、膵がん、肺腺がん、卵巣がんなど限局した腫瘍で高発現し、がん幹細胞性や薬剤耐性に関与する分子であるが、本研究により、上皮性卵巣がん組織における mRNA/蛋白レベルの発現と病理学的背景との関連を整理し、卵巣がん領域における標的分子としての臨床的 POC を強化した。
- 標準治療選択肢が限られ、腹膜播種を伴うと極めて予後不良となる難治性卵巣がんに対し、PRDM14 siRNA/uPIC と化学療法薬との併用により、皮下移植モデルのみならず腹膜播種モデルでも生存期間延長が得られたことは、従来分子標的薬とは異なる作用機序を有する新たな治療選択肢の可能性を示すものである。
- 先行する乳がん対象の第一相試験で、安全性シグナルと一定の薬効が示唆された PRDM14 siRNA+YBC の知見に、本研究で得られた卵巣がん・腹膜播種モデルでのエビデンスを加えることで、再発・難治性卵巣がんを主対象とした次期臨床試験デザインの検討に必要な科学的根拠が大きく補強された。

2) 科学・技術的意義

- PRDM14 siRNA について、2'-OMe 化を中心とした Class Ia 相当の一部の領域に対する化学修飾や全長への化学修飾を系統的に検証し、RNase 耐性と標的遺伝子抑制効果、OT (off-target) プロファイル、抗腫瘍活性のバランスが最も良好な N3+1 配列を同定したことは、腫瘍標的 siRNA における修飾パターン設計の一つの指針を与えるものである。
- YBC との複合体形成により得られる次世代型 PRDM14 uPIC について、修飾様式の違いが血中滞留性・腫瘍集積性・抗腫瘍効果に与える影響を、生体共焦点顕微鏡を用いた in vivo イメージングと皮下移植モデルの薬効評価から定量的に整理した点は、核酸医薬における PK/PD 連関の理解や最適化戦略に資する。
- さらに、2 種類のリガンド構造 (A, B) や linker 様式の違いが、uPIC の血中滞留性・腫瘍集積性・抗腫瘍効果に与える影響を比較検証し、リガンド B 付与 PRDM14 uPIC (N3+1) が最も優れた腫瘍指向性と薬効を示すことを明らかにしたことは、今後、他標的 siRNA や他がん種へ展開しうる「リガンドコンジュゲート型 uPIC」のプラットフォーム設計にとって重要な知見である。
- OT 効果についても遺伝子発現マイクロアレイを用いて網羅的に評価し、2'-OMe 型で OT が低減される傾向を示したことから、安全性と有効性の両立を目指した修飾戦略の妥当性が支持された。

3) 産業的・社会的意義

- 国内では依然としてがん領域の核酸医薬は非臨床段階の開発が中心であり、世界的にも固形がんを標的とした siRNA 治療薬の臨床開発例は限られている。本研究は、国内企業との連携のもとで修飾型 PRDM14 siRNA および YBC の GMP 合成体制と非臨床試験用供給体制を具体化し、日本発のがん核酸医薬シーズを治験薬レベルに引き上げるための実務的な基盤整備を進めた点で、産業的意義が大きい。
- リガンド B 付与型 PRDM14 uPIC (N3+1) という最終剤型案を明確化し、そのスケールアップ合成プロセス開発に目処をつけたことは、今後の治験薬製造、品質評価、規制当局との対話 (PMDA 対面助言等) に直結する成果であり、がん核酸創薬分野における国際的な競争力強化にも資する。
- 難治性卵巣がん、特に腹膜播種を伴う症例に対しては、新規治療選択肢の確立が喫緊の課題である。本研究で構築した PRDM14 siRNA/uPIC プラットフォームは、今後の臨床試験の成否にかかわらず、がん幹細胞性を標的とした治療コンセプトや、リガンドコンジュゲート核酸×高分子キャリアというモダリティ設計の実例として、将来的な革新的治療法の創出や医療イノベーションの促進に寄与しうる。

なお、本研究で得られた知見はいずれも非臨床段階のものであり、ヒトにおける最終的な安全性・有効性の検証は今後の臨床試験に委ねられる。しかし、標的分子の臨床的 POC、修飾型 siRNA 設計指針、uPIC およびリガンドコンジュゲートの最適化、GMP 合成・供給体制の見通しまでを一体的に示した点で、本課題は「抗がん核酸創薬が未だ上梓されていない」という国内外の外部環境に対し、実行可能性の高い解決策を提示したと評価できる。

Outcomes and Significance of the R&D Project

To date, no anticancer nucleic acid therapeutic has been approved. In our preceding work, a phase I trial of a chimeric PRDM14-targeting siRNA formulated with a Y-shaped block cationer complex (unit poly-ion complex; uPIC) in refractory breast cancer showed no grade ≥ 3 adverse events and suggested antitumor activity in a subset of patients. Overall, development of anticancer nucleic acid drugs remains largely at the preclinical stage; one example is an LNP-encapsulated, CTNNB1-targeting siRNA by Alnylam that has completed a phase I trial.

PRDM14 is a transcription factor with largely tumor-restricted expression, especially in breast, pancreatic, lung, and ovarian cancers, and is implicated in cancer stemness and drug resistance. As a strategy to address intratumoral heterogeneity, this project focused on PRDM14-positive cancer stem-like cells and aimed to advance the prior clinical formulation by (i) designing novel, chemically modified *PRDM14* siRNAs to reduce off-target (OT) effects and enhance RNase resistance, and (ii) optimizing their compatibility with the Y-shaped block cationer (YBC) as a drug delivery system. The main clinical focus was refractory ovarian cancer, particularly peritoneal dissemination, an area with high unmet medical need and limited molecular-targeted options.

In ovarian cancer specimens, we confirmed PRDM14 expression at the mRNA and protein levels and clarified its association with histopathological features, thereby strengthening clinical proof-of-concept (POC) for PRDM14 as a therapeutic target in epithelial ovarian cancer. Multiple *PRDM14* siRNA sequences incorporating 2'-OMe and related modifications in the part and/or full length were generated and tested. Among these, the N3+1 sequence showed the most potent suppression of PRDM14 expression, the strongest, dose-dependent antitumor activity, and the lowest OT profile on gene-expression microarrays.

Using YBC, we generated next-generation *PRDM14* uPICs and evaluated blood retention and tumor accumulation by intravital confocal microscopy and subcutaneous xenograft models. Fully modified uPICs showed the longest blood retention, followed by 2'-OMe, chimeric, and unmodified types. In vivo, the *PRDM14*(N3+1) uPIC provided the strongest antitumor effect. Although fully modified siRNA induced greater tumor shrinkage than 2'-OMe in ovarian tumor models, overall survival did not differ significantly once a certain threshold of blood exposure was achieved, and no clear systemic toxicity was observed.

To further enhance tumor targeting, we created multiple ligand-conjugated *PRDM14* siRNAs based on two ligand types (A and B) and different linker designs. Ligand B-conjugated, chemically modified PRDM14 uPICs showed superior blood retention, tumor accumulation, and antitumor activity compared with ligand A-conjugated formulations. In combination studies using standard chemotherapy drugs X and Y, non-conjugated *PRDM14* uPIC (N3+1) plus X yielded marked tumor volume reduction and extended survival versus monotherapy. Importantly, in a peritoneal dissemination model, ligand B-conjugated *PRDM14* uPIC (N3+1) combined with drug X produced prominent survival benefit, with no deaths observed by day 45 after dissemination compared with drug X alone or non-conjugated uPIC.

We selected the ligand B-bound PRDM14 uPIC (N3+1) as the final candidate. While securing non-clinical-grade YBC under our established GMP manufacturing system, we also initiated the development of a scalable synthesis process for chemically modified siRNA and have made significant progress toward its completion.

Overall, this project concretely established the concept of a *PRDM14*-targeting, ligand-conjugated siRNA/uPIC platform for refractory ovarian cancer, especially peritoneal dissemination, and linked nonclinical evidence to a realistic next-generation clinical candidate. It provided design principles for tumor-targeting modified siRNA, clarified how uPIC and ligand design influence PK/PD and efficacy, and outlined a feasible path toward GMP manufacturing and future clinical trials in a field where no anticancer nucleic acid therapeutic has yet reached approval.