

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）疾患の原因となる変異遺伝子のみを正常遺伝子と区別して抑制する SNP D-siRNA 核酸医薬品実用化のための非臨床試験基盤の確立  
（英語）Development of a preclinical evaluation platform for SNP D-siRNA nucleic acid therapeutics that achieve allele-specific silencing of disease-causing mutations

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

研究開発代表者 氏名：（日本語）程 久美子  
（英語）Kumiko Ui-Tei

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：  
（日本語）国立大学法人東京大学・大学院理学系研究科・特任研究員  
（英語）Project Researcher, Graduate School of Science, The University of Tokyo

## II 研究開発の概要

本研究の目的は遺伝子の「1塩基変異」に起因する疾患である“膵臓がん肝転移”を対象疾患として、そのドライバー遺伝子である KRAS 遺伝子の1塩基変異に対する SNP D-siRNA (single nucleotide polymorphism-distinguishable small interfering RNA) 核酸医薬品の非臨床試験基盤を確立することである。

ヒトの疾患関連遺伝子は 4,000～5,000 種、がん関連遺伝子は 500 種程度と見積もられている。一方で、1塩基変異によるアミノ酸置換をもつタンパク質を原因とする疾患はがんを含めて非常に多く、ヒトの疾患に関連している遺伝子異常は 60,000 以上存在するとされているが、そのうち約半数は1塩基変異によって引き起こされると言われている。RNA interference (RNAi)法は small interfering RNA (siRNA)により疾患の原因遺伝子を抑制する優れた手法である。2018 年に最初の siRNA が医薬品として米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration, FDA) に承認されてから、すでに 8 品目が承認されるという極めてハイスピードで開発が進んでおり、そのうちの 4 品目は日本でも承認されている。これらはすべて肝臓で機能する遺伝子を標的としており、薬物送達システム (Drug Delivery System, DDS) として Lipid nanoparticle (LNP) または N-Acetylgalactosamine (GalNAc) を用いており、肝臓へ DDS はほぼ確立していると言える。

しかしながら、これらのすでに上市している siRNA はすべて、野生型遺伝子と変異型遺伝子を同時に抑制しても問題がない遺伝子、むしろ両者とも抑制したほうが良い遺伝子を対象としている。一方で、がんや遺伝性疾患の多くは遺伝子

変異が疾患の原因になる一方で、正常な野生型遺伝子の機能は生体機能を維持するために必要である。そのため、野生型遺伝子には抑制作用がなく、変異型遺伝子のみを特異的に抑制できる siRNA を開発することは喫緊の課題であった。研究代表者らは、このような siRNA の開発を試み、1塩基の違いを区別して抑制できる siRNA を開発し、SNPD-siRNA (Single nucleotide polymorphism-distinguishable siRNA)と命名した。本研究課題では、研究開始当初、膵臓がんを対象疾患として、その原因遺伝子である KRAS を標的とする SNPD-siRNA (SNPD-siKRAS)の開発を進めた。しかし、令和5年に実施された AMED FLUX 会議により、課題の方向性についてご審議いただいた結果、DDS が確立していない膵臓を標的とするのは、本課題期間に非臨床予備試験の終了を目指すのは厳しい可能性があるというご指摘をいただいた。そのため、すでに承認された DDS を利用することで、新規モダリティとしての有用性を早期に確立する道筋を検討することとした。その結果、PSPO の承認を受けて、承認済の DDS が利用可能な肝臓を標的とすることとし、対象疾患を膵臓がんから膵臓がん肝転移とするという研究開発課題の大きな変更をおこなった。このような経緯により、本課題では、膵臓がん肝転移を対象疾患として、その原因遺伝子 KRAS に適用可能な SNPD-siKRAS を開発し、非臨床予備試験を終了し非臨床試験の基盤を構築することを最終的な目的とした。

膵臓がんは初期症状が乏しいため早期発見が極めて難しいがんとされている。また、肝転移や腹膜播種を起こしやすく、抗がん剤耐性が強いことが知られている。さらに、免疫療法が効きにくい cold tumor としても知られており、上述したように、その原因となる KRAS に対する創薬が困難ながんである。さらに、膵臓がんはがんの中でも最も予後が悪いことが知られており、5年生存率は10%程度である。本成果は、このようなこれまで治療薬が存在しなかったがん種に対する新規の創薬開発に関わるものであり、社会的ニーズは極めて高い。

さらに、siRNA に限らず、アンチセンスやアプタマーも含めて現在上市されている核酸医薬品でがん原遺伝子を標的とするものは存在しない。その理由は、これまで上市した siRNA は、ほとんどすべて野生型遺伝子と変異型遺伝子を区別なく、両者を同時に抑制する siRNA であるためである。がんおよび多くの遺伝性疾患では、野生型遺伝子は正常な生命機能を維持するために必要であり、野生型遺伝子は抑制せずに、変異型遺伝子のみを特異的に抑制できる siRNA を開発することは喫緊の課題といえる。本研究は、既存の抗体医薬品や低分子薬が標的とするタンパク質ではなく mRNA を標的分子とする siRNA 核酸医薬品という第3の新しい創薬ストラテジーを用いることで、従来の創薬では長年実現できなかった様々な1塩基レベルでの遺伝子変異に起因する疾患の治療を可能とする、アンメットメディカルニーズに適した手法を開発する課題である。

さらに、本課題では膵臓がん肝転移を標的とすることで、SNPD-siKRAS の有効性を明確にし、創薬としての社会実装を目指す。そのため、さらなる展開としては、当然のことながら、膵臓がんそのものに適応できる可能性が大きく増大するという大きな展開が期待できる。さらに、近年の次世代シーケンス技術の発展により、医療の中で遺伝子解析を実施することが可能となった。がんゲノム医療における遺伝子パネル検査は2019年に保険収載され、治療法の選択へ大きく貢献することが期待されている。最先端の個別化医療が可能ながんゲノム医療では、「PleSSision 検査」により治療標的としての介入が期待される「Actionable 変異」が同定され、その中で実際に投薬可能な薬剤が存在する遺伝子変異「Druggable 変異」を特定し、診療・治療に活用している。しかしながら、現実的には治療薬が選択できるケースは1~2割とされ、残念ながら実際に投薬可能な薬剤が存在しない(un-druggable)変異が多く存在する。これは、Actionable 変異に対応する創薬開発が困難である場合が多いことが最たる要因である。さらに、1塩基の違いを区別することは、SNPD-siRNA では可能であっても、基本的にはタンパク質を標的とする低分子薬や抗体医薬では困難が想定されるため、本技術は他の手法の追随を許さない優位性を持ち、個別化医療に大きく貢献できると考える。

研究開発の概要は項目別に次のとおりである。

- 研究開発項目1. SNPD-siRNA のオフターゲット効果の検討
- 研究開発項目2. がん化パスウェイにおける遺伝子セットを抑制するカクテル siRNA の検討
- 研究開発項目3. SNPD-siRNA の薬効評価と併用薬の評価
- 研究開発項目4. 核酸送達法(Drug delivery system; DDS)の検討
- 研究開発項目5. Xenograft モデルによる薬効評価
- 研究開発項目6. CMC (Chemistry, Manufacturing and Control)における非臨床試験・臨床治験薬合成

研究開発項目は6項目に渡っているが、国立大学法人東京大学は項目1～6を並列的に実施し、国立大学法人金沢大学は項目2～5を、学校法人日本大学は項目1と3～5を、さらに株式会社ANRisが項目6を東京大学と共同で実施するという連携体制により、確実に研究が推進された。

The objective of this research is to establish a preclinical testing platform for SNPD-siRNA (single nucleotide polymorphism–distinguishable small interfering RNA) nucleic acid therapeutics targeting pancreatic cancer liver metastasis, a disease caused by single-nucleotide mutations, by selectively suppressing single-nucleotide mutations in the driver gene KRAS.

It is estimated that humans possess approximately 4,000–5,000 disease-associated genes and about 500 cancer-related genes. Meanwhile, a vast number of diseases, including cancers, are caused by proteins harboring amino acid substitutions resulting from single-nucleotide mutations. More than 60,000 gene abnormalities are believed to be associated with human diseases, and it is estimated that approximately half of these are caused by single-nucleotide mutations. RNA interference (RNAi) is a powerful approach for suppressing disease-causing genes using siRNA. Since the first siRNA therapeutic was approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) in 2018, development in this field has progressed at an exceptionally rapid pace, with eight siRNA drugs approved to date, four of which have also been approved in Japan. All of these approved siRNAs target genes that function in the liver, and they utilize either lipid nanoparticles (LNPs) or N-acetylgalactosamine (GalNAc) as drug delivery systems (DDS), indicating that liver-directed DDS technology is largely established.

However, all siRNA drugs that have already reached the market target genes for which simultaneous suppression of both the wild-type and mutant alleles poses no problem, or even genes for which suppression of both alleles is desirable. In contrast, for many cancers and hereditary diseases, gene mutations are the cause of disease, while the function of the wild-type gene is essential for maintaining normal physiological functions. Therefore, the development of siRNAs that do not suppress the wild-type gene but selectively inhibit only the mutant gene has been an urgent unmet need. The principal investigator of this project have addressed this challenge by developing siRNAs capable of discriminating single-nucleotide differences, which they designated SNPD-siRNA (single nucleotide polymorphism-distinguishable siRNA).

At the initial stage of this research project, pancreatic cancer was selected as the target disease, and development of SNPD-siRNA targeting its causative gene, KRAS (SNPD-siKRAS), was initiated. However, following discussions at the AMED FLUX meeting held in FY2023, it was pointed out that targeting the pancreas—where DDS technology has not yet been established—would make it difficult to complete nonclinical exploratory studies within the project period. Consequently, we decided to explore a development strategy that would enable early demonstration of utility as a novel modality by leveraging an already approved DDS. Based on this background, the ultimate goal of this project is to develop an SNPD-siKRAS applicable to pancreatic cancer liver metastasis, complete nonclinical exploratory studies, and thereby establish a robust nonclinical testing foundation for this therapeutic approach.

Pancreatic cancer is considered one of the most difficult cancers to detect at an early stage because it presents with few initial symptoms. It is also known to metastasize readily to the liver and peritoneum, to exhibit strong resistance to anticancer drugs, and to respond poorly to immunotherapy as a so-called *cold tumor*. As described above, pancreatic cancer is a malignancy for which drug discovery targeting its causative driver gene, KRAS, has been particularly challenging. Moreover, pancreatic cancer is recognized as having one of the worst prognoses among all cancers, with a five-year survival rate of

approximately 10%. The outcomes of this research directly address the development of novel therapeutics for a cancer type for which no effective treatments have previously existed, and the societal need is extremely high.

Furthermore, among currently marketed nucleic acid therapeutics—including not only siRNAs but also antisense oligonucleotides and aptamers—none target oncogenes. The primary reason for this is that nearly all siRNAs that have reached the market to date suppress both the wild-type and mutant genes indiscriminately. In cancer and many hereditary diseases, however, the wild-type gene is essential for maintaining normal physiological functions. Consequently, the development of siRNAs that do not suppress the wild-type gene but selectively inhibit only the mutant gene represents an urgent unmet challenge.

In addition, by targeting pancreatic cancer liver metastasis, this project aims to unequivocally demonstrate the therapeutic efficacy of SNP-D-siKRAS and to facilitate its translation toward clinical and societal implementation as a novel therapeutic modality. Importantly, successful validation in this context is expected to substantially expand the feasibility of applying this approach to pancreatic cancer itself as a natural and highly impactful extension. Furthermore, in recent years, advances in next-generation sequencing technologies have enabled routine genetic analysis in clinical practice. In Japan, cancer gene panel testing was incorporated into the national health insurance system in 2019 and is anticipated to play a pivotal role in guiding treatment selection. Within this cutting-edge framework of precision oncology, so-called *actionable mutations*—genetic alterations that represent potential targets for therapeutic intervention—are identified through assays such as the PleSSision test. Among these, only a subset of *druggable mutations*, for which effective therapeutic agents are currently available, can be translated into actual clinical treatment. However, in practice, it is estimated that only 10–20% of patients ultimately benefit from genotype-matched therapies, while the majority harbor mutations that remain undruggable, with no clinically applicable drugs available. This limitation primarily reflects the intrinsic difficulty of developing therapeutics capable of precisely targeting disease-driving genetic alterations, particularly at the level of single-nucleotide mutations. While SNP-D-siRNA technology enables precise discrimination at the single-nucleotide level, achieving such specificity is generally infeasible with conventional protein-targeting small-molecule drugs or antibody therapeutics. Consequently, this technology offers a clear and unparalleled advantage over existing therapeutic approaches and is expected to make a significant contribution to the advancement of precision and personalized medicine.

The research and development plan consists of the following components:

1. Evaluation of off-target effects of SNP-D-siRNA
2. Investigation of cocktail siRNAs targeting gene sets involved in oncogenic pathways
3. Evaluation of the pharmacological efficacy of SNP-D-siRNA and combination therapies
4. Investigation of nucleic acid delivery methods (Drug Delivery Systems; DDS)
5. Evaluation of therapeutic efficacy using xenograft models
6. Non-clinical studies and synthesis of clinical trial materials under CMC (Chemistry, Manufacturing, and Control)

The research and development program comprised six work packages. Under a coordinated collaborative framework, The University of Tokyo conducted work packages 1 through 6 in parallel, Kanazawa University implemented work packages 2 through 5, Nihon University carried out work packages 1 and 3 through 5, and ANRis Co., Ltd. jointly executed work package 6 in collaboration with the University of Tokyo. Through this structured division of responsibilities, the research activities were advanced steadily and reliably.