

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：テーラーメイドがん免疫核酸医薬の創製

Development of tailor-made cancer immuno-nucleic acid therapeutics

研究開発実施期間：令和5年4月15日～令和8年3月31日

研究開発代表者 氏名：森廣 邦彦

Kunihiko Morihiko

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻 准教授

Department of Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Engineering, The University of Tokyo

II 研究開発の概要

研究背景と目的

近年、従来型の低分子創薬の限界が顕在化しつつあり、新しい創薬モダリティの開発が世界的な課題となっている。実際、近年上市された大型医薬品には抗体医薬を筆頭に多数のバイオ医薬が多数含まれており、創薬研究の中心は急速に変化している。中でも核酸医薬は、DNA や RNA といった人工オリゴヌクレオチドを利用して疾患関連分子を直接制御できる点から大きな注目を集めている。一方で、核酸分子は生体内では「外来核酸」として認識されるため、自然免疫応答やストレス応答を引き起こすことが知られている。申請者は、この核酸認識機構を逆に積極的に利用することで、がん細胞内でのみ選択的に活性化される新しい核酸医薬の開発を目指した。

本研究では、がん細胞で高発現するマイクロ RNA (miRNA) をトリガーとして利用し、細胞内で長鎖核酸高次構造を選択的に構築する「核酸集合反応創薬技術」の開発を目的とした。具体的には、ヘアピン型核酸ペアを利用した自己集合反応により、DNA/DNA や RNA/RNA、DNA/RNA など異なるモダリティの長鎖二重鎖を形成させ、それぞれ異なる細胞内経路を活性化することで抗腫瘍効果を発揮することを目指した。さらに、正常細胞では反応が起こらない高い細胞選択性を実現し、安全性と薬効を両立したテーラーメイド型核酸医薬の創出を目指した。

研究成果と今後の展望

本研究では、miR-21 をはじめとするがん関連 miRNA に応答するヘアピン型核酸ペアを設計した。これらのヘアピン核酸は単独では安定な二次構造を形成しているが、一定量の miR-21 が存在すると逐次的に開裂・集合反応が進行し、長鎖二重鎖構造を形成する。ヘアピン型核酸ペアの配列設計には NUPACK を用い、反応効率とバックグラウンド反応の低減を両立するよう最適化を行った。また、血中安定性やヌクレアーゼ耐性を向上させるため、ホスホロチオアート修飾など人工核酸技術も導入した。

従来研究では DNA/DNA 型ヘアピンペアを中心に検討していたが、本研究では新たに RNA/RNA 型および DNA/RNA 型ヘアピンペアへとモダリティを拡張した。RNA/RNA および DNA/RNA それぞれに対してヘアピンペアを設計し、toehold 長やステム長を最適化した。ゲル電気泳動解析により、miR-21 存在下で高効率に長鎖二重鎖が形成され

ることを確認した。さらに、miR-21 非存在下ではバックグラウンド反応が抑制されており、高い反応選択性が実証できた。最適化したヘアピンペアを、miR-21 を高発現するヒトがん細胞（A549 や HeLa、MDA-MB-231 など）に導入したところ、顕著な細胞死が観察された。一方、miR-21 発現量の低い正常細胞（HEK-293T や MRC-5）では影響が小さく、高い細胞選択性が示された。特に、従来型 DNA/DNA ペアでは十分な効果が得られなかった A549 細胞に対しても、RNA/RNA 型および DNA/RNA 型ペアは有効な細胞毒性を示し、本技術の適用範囲を大きく拡張できた。RNA/RNA 型ペアについては、当初予想していた MDA5 依存的な自然免疫活性化は限定的であった。一方、RNA-seq 解析により p53-p21 経路の活性化が確認され、長鎖 RNA 二重鎖形成によるストレス応答と細胞周期停止が抗腫瘍活性の主要因である可能性が示された。さらに、DNA/RNA 型ペアについては、RNase H ノックダウンによって細胞毒性が有意に低下し、RNase H 依存的な作用機序が支持された。これらの結果は、モダリティごとに異なるメカニズムによる細胞死を誘導できることを示している。さらに、マウスメラノーマ B16 細胞を移植した担がんモデルに対して、RNA/RNA 型および DNA/RNA 型ヘアピンペアを局所投与したところ、有意な腫瘍増殖抑制効果が確認された。また、DDS を利用した全身投与条件についても検討を進めており、腫瘍移行性や体内動態を改善可能な送達条件を見出している。

本研究では miR-21 に加えて、miR-24 や miR-27a、miR-181a、miR-182、miR-210 など複数のがん関連 miRNA を標的とするヘアピン DNA ライブラリの構築も進めた。各 miRNA に対して複数の候補配列を設計し、計 25 種類のヘアピン DNA ペアを化学合成した。これにより、患者ごとの miRNA 発現プロファイルに応じて最適な核酸医薬を選択可能な「オーダーメイド型核酸医薬」実現に向けた基盤技術が整備された。本研究結果は、Angewandte Chemie International Edition や Journal of the American Chemical Society、Chemical Science などの国際誌に掲載された。また、日本核酸医薬学会や Oligonucleotide Therapeutics Society など国内外の学会で多数の口頭・ポスター発表を行い、高い注目を集めた。今後は、免疫チェックポイント阻害剤との併用療法や、患者由来腫瘍組織に基づく配列最適化を進めることで、より高い治療効果と個別化医療の実現を目指す。また、DDS 技術の高度化や GLP 試験への展開を通じて、臨床応用に向けた研究開発を加速させる予定であり、本研究で得られた成果は核酸集合反応を基盤とした次世代核酸免疫医薬の創出に大きく貢献すると期待される。

In recent years, the limitations of conventional small-molecule drug discovery have become increasingly apparent, creating a global demand for new therapeutic modalities. Indeed, many recently approved blockbuster drugs are biopharmaceuticals, particularly antibody therapeutics, reflecting a rapid shift in the landscape of pharmaceutical research. Among these emerging modalities, nucleic acid therapeutics have attracted considerable attention because artificial oligonucleotides such as DNA and RNA can directly regulate disease-associated biomolecules. On the other hand, nucleic acids introduced into living systems are recognized as “foreign nucleic acids” and are known to induce innate immune and cellular stress responses. The applicant therefore sought to exploit these nucleic acid recognition mechanisms positively to develop novel nucleic acid therapeutics that are selectively activated only within cancer cells. The objective of this study was to establish a “nucleic acid assembly reaction–based drug discovery platform” in which intracellular long nucleic acid superstructures are selectively constructed using cancer-associated microRNAs (miRNAs) as molecular triggers. Specifically, self-assembly reactions mediated by hairpin-type nucleic acid pairs were designed to generate long duplex structures with different modalities, including DNA/DNA, RNA/RNA, and DNA/RNA hybrids. These structures were expected to exert antitumor effects through activation of distinct intracellular pathways. Furthermore, the study aimed to achieve high cancer-cell selectivity, whereby the reactions occur only in diseased cells but not in normal cells, thereby enabling the development of tailor-made nucleic acid therapeutics with both high efficacy and safety.

In this study, we designed hairpin-type nucleic acid pairs responsive to cancer-associated miRNAs, particularly miR-21. Individually, these hairpin nucleic acids formed stable secondary structures; however, in the presence of a sufficient amount of miR-21, sequential strand-opening and assembly reactions proceeded autonomously, resulting in the formation of long duplex structures. Sequence optimization of the hairpin pairs was performed using the nucleic acid structure prediction software NUPACK to maximize reaction efficiency while minimizing background reactions. In addition, artificial nucleic acid technologies, including phosphorothioate modification, were introduced to improve serum stability and nuclease resistance. Whereas our previous studies mainly focused on DNA/DNA-type hairpin pairs, the present study successfully expanded the modality to include RNA/RNA-type and DNA/RNA-type hairpin pairs. Hairpin pairs were designed independently for the RNA/RNA and DNA/RNA systems, and parameters such as toehold length and stem length were optimized. Gel electrophoresis analyses demonstrated efficient formation of long duplex structures in the presence of miR-21. Importantly, background reactions were strongly suppressed in the absence of miR-21, demonstrating high reaction selectivity. When the optimized hairpin pairs were introduced into human cancer cells with high miR-21 expression, including A549, HeLa, and MDA-MB-231 cells, pronounced cytotoxicity was observed. In contrast, minimal effects were detected in normal cells with low miR-21 expression, such as HEK-293T and MRC-5 cells, indicating high cancer-cell selectivity. Notably, the RNA/RNA-type and DNA/RNA-type pairs exhibited strong cytotoxicity even in A549 cells, where conventional DNA/DNA systems had shown limited efficacy, thereby substantially broadening the applicability of this platform. Mechanistic analyses further revealed modality-dependent differences in the mode of action. For the RNA/RNA-type pairs, MDA5-dependent innate immune activation was unexpectedly limited. Instead, RNA-seq analyses revealed activation of the p53–p21 pathway, suggesting that stress responses induced by intracellular long double-stranded RNA formation and subsequent cell-cycle arrest are major contributors to the observed antitumor activity. In contrast, cytotoxicity induced by DNA/RNA-type pairs was significantly attenuated by RNase H knockdown, strongly supporting an RNase H–dependent mechanism. These findings demonstrate that distinct nucleic acid modalities can induce cancer cell death through different intracellular pathways. Furthermore, local administration of RNA/RNA-type and DNA/RNA-type hairpin pairs into B16 melanoma-bearing mice resulted in significant suppression of tumor growth. We also investigated systemic delivery conditions using DDS technologies and identified delivery formulations capable of improving tumor accumulation and in vivo pharmacokinetics. In addition to miR-21, we constructed hairpin DNA libraries targeting multiple cancer-associated miRNAs, including miR-24, miR-27a, miR-181a, miR-182, and miR-210. Multiple candidate sequences were designed for

each miRNA, and a total of 25 hairpin DNA pairs were chemically synthesized. These efforts established a technological basis for the future realization of “tailor-made nucleic acid therapeutics” optimized according to the miRNA expression profiles of individual patients. The outcomes of this research were published in leading international journals, including *Angewandte Chemie International Edition*, *Journal of the American Chemical Society*, and *Chemical Science*. In addition, the results were presented at numerous domestic and international conferences, including meetings of the Nucleic Acids Therapeutics Society of Japan and the Oligonucleotide Therapeutics Society, attracting significant attention. Future studies will focus on combination therapies with immune checkpoint inhibitors and optimization of nucleic acid sequences based on patient-derived tumor tissues to further enhance therapeutic efficacy and realize personalized medicine. Moreover, we plan to accelerate translational development toward clinical applications through advanced DDS technologies and GLP studies. Overall, the findings obtained in this study are expected to make significant contributions to the development of next-generation nucleic acid immunotherapeutics based on intracellular nucleic acid assembly reactions.