

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：抗がん性核酸集合体医薬の送達に関する研究開発

Study on delivery of anti-cancer nucleic acid assembly drugs

研究開発実施期間：令和6年4月16日 ～ 令和8年3月31日

研究開発代表者 氏名：岡本 晃充

Akimitsu Okamoto

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 教授

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

II 研究開発の概要

抗がん性を示す新しいモダリティとして核酸が挙げられる。核酸を用いてがんメカニズムに直接働きかける方法はリーズナブルだろう。我々は新規の抗がん性核酸医薬品候補である化学合成短鎖ヘアピン核酸対（oHPs）を開発し、自己免疫惹起による良好な腫瘍増殖抑制効果を見出した。しかし、核酸分子に共通して言えることとして、低い細胞膜透過性、高い肝臓蓄積性、早い分解などの理由により標的送達能力が低いことが問題になっている。これまでに上市された核酸医薬品18種類のほとんどにおいてnakedのままの投与が肝臓を標的にしたGalNAc修飾核酸が利用されている。我々の系でもコラーゲンとの複合体を作成して局所投与を行っていたが、より良い送達分子と複合体を作ることによって腫瘍増殖抑制効果を最大化することができるだろうと考えている。また、核酸を使って肝臓以外の箇所のがんを標的にすることは現状では容易ではなく、適切な送達分子との併用を検討することが必要である。したがって、本研究課題では、DDS 評価研究者と連携して効果的なoHPs 送達剤の探索を実施するとともに、標的がん（本研究課題では乳がん）へのoHPs の送達・集積および腫瘍増殖抑制効果の向上を達成する。

・腫瘍内投与による腫瘍増殖抑制効果の検討

B16を皮下異所移植したC57BL/6マウスに対してoHPs-DDS複合体の溶液（oHPsの成分が0.4 mg/kg）の腫瘍内投与を実施した。これまでに検討したDDSを含めて5種類のDDSを検討した結果、強い腫瘍増殖抑制効果を示すDDSが見つかった。乳がん皮下移植マウスを用いた場合には4日おき3回投与で6例中2例で腫瘍の消滅を確認した。また、B16担がんマウスへのoHPs-DDS複合体投与ののちの当該部位の免疫染色において腫瘍周縁部にCD4⁺ T細胞およびCD8⁺ T細胞の存在を確認しており、免疫チェックポイント阻害剤のアジュバントとして働く可能性についても示唆された。事実、抗CD4抗体や抗CD8抗体で処置したマウスに対してoHPs-DDS複合体を投与した場合には、腫瘍増殖抑制効果は減弱した。さらに、抗PD1抗体とともにoHPs-DDS複合体を投与した場合には、免疫原性が低いB16担がんマウスにおいても、抗PD1抗体単独やoHPs-DDS複合体単独と比べて高い腫瘍増殖抑制効果を示した。

・尾部静脈投与による腫瘍増殖抑制効果の検討

連携研究者が有するDDSを用いて、乳がん皮下移植マウスに対して尾部静脈投与による腫瘍増殖抑制効果を検討した。その結果、連携研究者が有する一つのDDSが強い腫瘍増殖抑制を示した。他のDDSでは、腫瘍増殖抑制効果が微弱であったり、強いアナフィラキシー反応による体重減少、臓器の出血や脾臓肥大が観察される場合があった。今回最後の候補に残ったDDSは、脾臓の肥大を起こすことなく、強い腫瘍増殖抑制を示した。一方で、鱗屑、発赤がそれぞれ若干みられた。また、投与直後に弱いアナフィラキシー反応による体重減少が認められたが数日以内に体重は回復した。また、投与量を調整することで、アナフィラキシー反応を抑制しつつ、薬効が得られる投与量を定めることができた。また、腫瘍増殖抑制試験を実施した後に、腫瘍周縁部も含めた組織を切り出して、CD8免疫染色を行った。その結果、oHPs-DSG複合体投与によってCD8陽性細胞が多く現れることを見出した。

・尾部静脈投与による体内動態の検討

まず、腫瘍内投与に用いたoHPs-DDS複合体については、尾部静脈投与後に肝臓へ送達されて、腫瘍組織には送達されないことを確認した。

次に、上述の尾部静脈投与によって腫瘍増殖抑制が認められたoHPs-DDS複合体については、以下の通りの結果が得られた。

DDS側を蛍光標識した複合体を乳がん皮下移植マウスの尾部静脈に投与した結果、1～5時間で体内からの蛍光が強く現れ、その後徐々に減弱していき48時間後まで観察した。48時間後にex vivo観察を行ったところ、肝臓、脾臓、リンパ節4か所に加え、腫瘍組織からも強い蛍光が観察された。

oHPs側を蛍光標識した複合体を乳がん皮下移植マウスの尾部静脈に投与した結果、1～5時間で体内全体からの蛍光が強く現れ、その後48時間後までに速やかに減弱した。48時間後のex vivo観察では、肝臓および脾臓からの蛍光は微弱であった一方で、腫瘍組織から強い蛍光が観察され、腎臓からも弱い蛍光が現れた。oHPs送達の高い腫瘍組織選択性が明らかになった。

oHPs-DDS複合体をB16メラノーマ移植マウスに3日おき3回投与して8日後にマウスを解剖して採血し、その血漿を生化学検査した。肝機能 (LDH, AST, ALT, ALP)、腎機能 (TP, ALB)、脂質代謝系 (T-Bil) の項目を測定した結果、ALPで1割程度の数値の上昇が認められた以外は、個体差はあるものの、総じて大きな変化はなく、異常値でもなかった。

したがって、本研究課題では、DDS 評価研究者と連携して効果的な oHPs 送達剤の探索を実施し、乳がん、メラノーマへの oHPs の送達・集積および腫瘍増殖抑制効果の向上を達成した。

Nucleic acids represent a promising therapeutic modality for cancer treatment because they can directly target mechanisms underlying tumor progression. We developed chemically synthesized short hairpin oligonucleotide pairs (oHPs), a novel anticancer nucleic acid therapeutic candidate that suppresses tumor growth through activation of innate immunity. However, like many nucleic acid therapeutics, oHPs face major delivery challenges, including poor cellular uptake, rapid degradation, and preferential accumulation in the liver. Indeed, most currently approved nucleic acid drugs are either administered in naked form or utilize GalNAc conjugation for liver targeting. Therefore, efficient delivery to tumors outside the liver remains a critical challenge.

To address this issue, we collaborated with DDS researchers to identify effective delivery systems for oHPs and improve their tumor accumulation and antitumor efficacy in breast cancer and melanoma models. First, we evaluated intratumoral administration of oHPs-DDS complexes in mice bearing subcutaneous B16 melanoma tumors. Among five tested DDS formulations, one showed particularly strong tumor growth suppression. In a breast cancer model, administration three times at four-day intervals resulted in complete tumor disappearance in two of six mice. Immunohistochemical analyses revealed accumulation of CD4-positive and CD8-positive T cells around tumors following treatment, suggesting activation of antitumor immunity. Furthermore, depletion of CD4 or CD8 T cells reduced the therapeutic effect, indicating that T-cell-mediated immunity contributes substantially to tumor suppression. Combination therapy with anti-PD-1 antibody further enhanced antitumor efficacy even in poorly immunogenic B16 melanoma models, suggesting that oHPs may function as an effective adjuvant for immune checkpoint inhibitors.

We next examined systemic administration via tail vein injection. Among several DDS candidates, one formulation achieved strong tumor growth suppression without severe toxicity such as splenomegaly or organ hemorrhage, although mild transient anaphylactic responses and skin symptoms were observed. Optimization of dosing conditions successfully reduced these adverse reactions while preserving therapeutic efficacy. CD8 immunostaining demonstrated increased infiltration of CD8-positive cells into tumors following systemic administration of the oHPs-DDS complex.

Biodistribution studies using fluorescent labeling demonstrated the importance of DDS optimization. A DDS previously used for intratumoral injection accumulated mainly in the liver after intravenous administration and failed to reach tumors efficiently. In contrast, the optimized DDS enabled strong accumulation of oHPs within tumor tissues. Fluorescence imaging revealed selective tumor localization of oHPs with relatively weak retention in normal organs such as the liver and spleen. Safety evaluation after repeated intravenous administration showed no major abnormalities in liver or kidney function parameters, except for a slight increase in ALP levels that remained within normal ranges.

Overall, this study identified an effective DDS capable of improving delivery, tumor accumulation, and antitumor efficacy of oHPs in breast cancer and melanoma models. These findings highlight the potential of combining nucleic acid therapeutics with advanced delivery technologies to develop next-generation cancer immunotherapies.