

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：最適 DDS を用いたヘテロ核酸による治療法構築と薬物動態解析

Development of Heteroduplex Oligonucleotide Therapeutics Using Optimized DDS and Pharmacokinetic Analysis

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：山田 剛史
Takeshi Yamada

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
国立大学法人東京科学大学 国際医工共創研究院 核酸・ペプチド創薬治療研究センター 特任講師
Institute of Science Tokyo, Nucleic Acid and Peptide Drug Discovery Center, Specially Appointed Associate Professor

II 研究開発の概要

1. 研究開発の背景と目的

本研究開発課題では、最適 DDS(Drug Delivery System)を活用した BBB 通過型ヘテロ核酸による新規治療法の構築と薬物動態解析を目的として、令和 6 年度から令和 7 年度までの 2 年間にわたり研究開発を実施した。アンチセンス核酸 (ASO) や siRNA などに代表される核酸医薬は、従来の低分子医薬や抗体医薬では対応困難であった標的分子に対して作用可能な新たな治療モダリティである。近年の核酸医薬の進歩は非常に目覚ましく、24 製品が世界で上市されている(2026 年 4 月)。さらに、静脈内投与や皮下投与などの全身投与による脳移行性や、心筋・骨格筋への効率的な薬剤送達技術の開発が世界的に進展している。BBB 通過型ヘテロ核酸は、全身投与により血液脳関門(BBB)を越えて中枢神経系へ到達し得る次世代核酸医薬として期待される一方、安全性、体内動態、送達効率が課題であった。本課題では、非臨床 POC 取得を最終目標として、これら課題の解決を目指し、リガンドの最適化、疾患モデルをもちいた有効性評価、先端的体内動態解析技術による評価基盤整備、最先端 DDS 技術との融合を推進した。

2. 独自技術ヘテロ核酸 (HDO) の特徴

HDO (Heteroduplex Oligonucleotide) は、アンチセンス活性を有する DNA 主鎖とその配列に相補的な RNA 鎖 (cRNA) から構成される二本鎖型核酸医薬で、ASO や siRNA とは異なる独自の分子構造を有しており、世界 7 カ国で特許を取得している。相補 RNA 鎖 (cRNA) の 5'末端には各種 DDS リガンドを結合させることができる。

HDO の作用機序としては、二本鎖状態のまま細胞内へ取り込まれ、その後、RNase 等の内因性酵素により相補鎖が切断され、放出された主鎖がアンチセンス活性を発揮すると考えられている。この特徴的な作用機序により、HDO は標的臓器への送達において従来技術である ASO に対し顕著な優位性を示す。

一般に、リガンド結合型 ASO では、リガンドと細胞表面受容体との親和性が高いほど細胞内取り込み効率は

向上する一方、細胞内取り込み後に核酸が受容体から十分に解離しない場合、エンドソーム脱出効率が低下し有効性が制限される。これに対し、HDO では細胞内エンドソーム環境において相補 RNA 鎖が切断されるため、リガンド部位が主鎖から解離し、アンチセンス活性を有する主鎖が効率的にエンドソーム外へ移行できる。その結果、標的 RNA への到達効率が大きく向上し、従来型リガンド結合 ASO を上回る高い薬効を示す。

実際に、家族性アミロイドポリニューロパチーを対象とした前臨床研究では、静脈内投与条件下において、既存の一本鎖アンチセンス核酸が標的原因遺伝子発現を約 50%抑制したのに対し、HDO では約 99%抑制という極めて高い遺伝子抑制効果を示した (Nature Communications, 2015)。

さらに我々は、この HDO 技術を発展させ、BBB (Blood-Brain Barrier : 血液脳関門) を通過可能な BBB 通過型 HDO を開発した。一般的な核酸医薬は BBB を通過できないため、現在の中枢神経系 (CNS) 標的核酸医薬の多くは髄腔内投与を必要としている。これに対し、我々は 2021 年に BBB 通過型 HDO を報告し、従来の ASO や siRNA では不可能であった全身投与 (皮下投与または静脈内投与) による脳内への核酸送達に世界で初めて成功した (Nature Biotechnology, 2021)。加えて、本技術は中枢神経系への送達に留まらず、これまで従来 ASO では十分な効果が得られず臨床開発が中止されていた心筋および骨格筋においても、従来技術比で約 5 倍の有効性を示した。すなわち、BBB 通過型 HDO は、脳・脊髄などの中枢神経組織に加え、心筋・骨格筋を同時に標的化できる全身投与型核酸医薬として極めて高い独自性を有する。

本研究では、この BBB 通過型 HDO 技術を基盤として、ALSをはじめとする難治性神経・筋疾患に対し、全身投与で脳・脊髄・筋組織へ送達し、標的遺伝子発現抑制を介した病態改善を目指した。さらに、安全性向上および送達効率最大化を目的として DDS リガンド構造の再最適化を進め、臨床応用を見据えた次世代核酸医薬基盤の構築を推進した。

3. DDS リガンド最適化による全身投与性能の向上

BBB 通過型 HDO の実用化に向けては、中枢神経系への送達効率に加え、安全性、末梢組織への分布特性、反復投与時の忍容性を総合的に最適化することが重要である。従来、我々が開発してきた BBB 通過型 HDO では、コレステロールを DDS リガンドとして用いることで優れた脳移行性を達成してきた。一方で、より高い安全性および臨床応用適性を有する次世代 DDS リガンドの探索が課題となっていた。

そこで本研究では、既存のコレステロール結合型 HDO (Chol-HDO) を基準として、トコフェロール結合型 HDO (Toc-HDO) および複数の新規 DDS リガンド結合型 HDO を設計・合成し、その機能比較を行った。各候補化合物について、マウスへの全身投与後における中枢神経系移行性、標的遺伝子抑制効果、主要臓器分布、安全性を総合的に評価した。

まず中枢神経系への送達性を比較した結果、Toc-HDO では既存 Chol-HDO と比較して脳内移行性が低下する傾向が認められ、標的遺伝子抑制効果も限定的であった。一方、ある新規 DDS リガンド(化合物 X)結合型 HDO では、既存 Chol-HDO と同等レベルの脳移行性を維持し、大脳皮質、線条体、小脳、脳幹、脊髄など複数領域において良好な遺伝子発現抑制効果を示した。

次に安全性評価を行った結果、Chol-HDO 投与時に認められた急性毒性所見が、化合物 X 結合型 HDO では軽減される傾向が認められた。具体的には、投与直後に観察される一過性の全身状態変化や忍容性低下が改善され、反復投与を見据えた製剤として良好な特性を示した。

以上より、本研究では既存リガンドに代わる新規 DDS リガンド候補化合物 X を見出し、中枢移行性および遺伝子抑制効果を維持しつつ、安全性および臓器選択性の改善可能性を示した。これは、BBB 通過型 HDO の実用化に向けた重要な技術的進展であり、ALS、DM1、その他神経・筋疾患を対象とした全身投与型核酸医薬開発を加速する重要な成果である。

4. SOD1 型 ALS モデルに対する有効性実証

SOD1 遺伝子変異を有する家族性筋萎縮性側索硬化症 (SOD1-ALS) は、ALS の 2-3%を占め、変異 SOD1 タン

パク質の異常凝集・細胞内蓄積により、主として運動ニューロンが進行性に変性・脱落する難治性神経変性疾患である。筋力低下、嚥下障害、呼吸不全などを呈し、病態進行を十分に抑制し得る疾患修飾薬の開発が強く求められている。

SOD1-ALS に対しては、変異 SOD1 を標的としたアンチセンス核酸医薬(tofersen)が臨床応用されている。しかし、tofersen は髄腔内投与を必要とするため、患者負担が大きい。また、ALS では中枢神経系のみならず骨格筋や心筋など末梢組織の異常も病態進行に関与することが示唆されており、中枢神経のみを標的とする治療では十分でない可能性がある。

本研究では、BBB 通過型 HDO 技術を用いることで、全身投与により脳・脊髄へ核酸医薬を送達し、さらに骨格筋・心筋を含む全身病態へ同時に介入可能な新たな ALS 治療戦略の構築を目指した。標的分子としては、既存治療薬トフェルセンと同様に SOD1 遺伝子を選択し、その標的配列を基盤とした SOD1 標的 HDO を設計した。

有効性評価には G93A-SOD1 トランスジェニック ALS モデルマウスを用い、前項で見出した化合物 X をリガンドとする BBB 通過型 HDO を全身投与した。その結果、脳内複数領域において SOD1 mRNA 発現の有意な低下が確認され、全身投与条件下でも核酸医薬が血液脳関門を越えて中枢神経組織へ到達し、標的遺伝子抑制を達成できることが示された。特に、大脳皮質、脳幹、脊髄など ALS 病態に重要な領域で効果が認められ、本技術の臨床的意義を支持する重要な結果が得られた。

さらに、中枢神経系に加えて、大腿四頭筋（骨格筋）および心臓（心筋）においても高い SOD1 発現抑制効果が認められた。これは従来の髄腔内投与型核酸医薬では達成困難であった、中枢神経と末梢組織を同時に標的化する治療コンセプトを実証する成果である。ALS は全身性疾患としての側面を有することから、本成果は病態全体への包括的介入可能性を示す点で重要である。

また、安全性の観点では、コレステロールリガンド結合型 HDO 投与群で死亡例が認められたのに対し、化合物 X 結合型 HDO 投与群では死亡例は確認されず、明らかな異常行動も観察されなかった。これは、化合物 X が有効性のみならず安全性の面でも優れた DDS リガンド候補であることを示唆する重要な結果である。

以上より、本研究では BBB 通過型 HDO を用いることで、ALS に対し全身投与下で中枢神経および末梢組織の双方において標的遺伝子抑制が可能であることを示した。

5. DM1 モデルに対する有効性実証

筋強直性ジストロフィー1 型 (DM1) は、DMPK 遺伝子の CTG リピート伸長変異を原因とする遺伝性筋疾患であり、骨格筋障害に加えて、心筋障害や中枢神経症状など多臓器病変を呈する全身性疾患である。根本的治療法は未だ確立されておらず、骨格筋・心筋・中枢神経系へ同時に作用可能な新規治療法の開発が求められている。

本研究では、BBB 通過型 HDO 技術の疾患横展開可能性を検証する目的で、DM1 病態への関与が報告されている microRNA-23b (miR-23b) を標的とした HDO を設計した。DDS リガンドとして、コレステロール結合型 HDO、トコフェロール結合型 HDO、ならびに前項で有望性が示された化合物 X 結合型 HDO を作製し、全身投与による比較評価を行った。

その結果、コレステロール結合型 HDO 投与群では死亡例および衰弱個体が認められたのに対し、トコフェロール結合型 HDO および化合物 X 結合型 HDO 投与群では明らかな重篤有害事象は認められず、安全性の改善が示唆された。

有効性評価では、化合物 X 結合型 HDO 投与群において、中枢神経組織で高い miR-23b 抑制効果が確認され、さらに骨格筋および心筋においても良好な抑制効果が認められた。加えて、肝臓での抑制効果はコレステロール結合型 HDO と比較して低下する傾向が認められ、非標的臓器への過剰分布が抑制される可能性が示唆された。

以上より、本研究では BBB 通過型 HDO 技術が ALS のみならず DM1 にも応用可能であり、中枢神経・骨格筋・心筋を同時に標的化し得る全身投与型核酸医薬プラットフォームとして高い汎用性を有することが示された。

6. CE-MS による BBB 通過型 HDO の脳移行実証

薬物動態技術との連携では、BBB 通過型 HDO が全身投与後に脳内へ到達していることを分子レベルで直接証明することを最重要タスクとした。この目的のため、本研究期間中にキャピラリー電気泳動質量分析 (CE-MS)、PET イメージング、質量分析イメージング (MSI) を用いた共同研究を実施した。

その結果、CE-MS を用いることで、全身投与後の脳組織中に存在する HDO 由来核酸成分の直接検出に成功した。CE-MS は、質量分析部の前段にサンプル濃縮工程としてキャピラリー電気泳動を組み込むことで、超微量の生体内標的分子を高感度に測定できる解析手法である。BBB 通過型 HDO 投与後の脳組織サンプルから HDO 由来主鎖成分を検出し、得られた推定濃度は過去に定量 PCR で推定した濃度と整合する妥当な値であった。これにより、BBB 通過型 HDO が全身投与条件下で血液脳関門を越え、脳実質内へ移行していることを直接的に実証した。

また、PET および MSI では脳内移行の直接検出には至らなかったものの、それぞれ全身動態評価、代謝物解析に活用可能であることを示すデータを取得した。

本成果は、BBB 通過型 HDO の中枢神経送達能を化学分析的に裏付ける重要な成果であり、従来困難であった核酸医薬の脳移行評価に対する新たな解析基盤となる。今後は定量解析および代謝物解析へ展開することで、非臨床開発および臨床応用に資する重要なデータ取得が期待される。

7. 本研究で得られた成果と意義

本研究では、全身投与により中枢神経系へ送達可能な核酸医薬の実現を目的として、BBB 通過型 HDO 技術の基盤構築と実用化に向けた研究開発を推進した。

第一の成果として、DDS リガンドの最適化を進め、中枢移行性を維持しつつ、安全性の改善が期待される新規リガンド候補を見出した。

第二の成果として、SOD1-ALS モデルマウスでは、全身投与下で脳・脊髄に加え、骨格筋および心筋においても標的遺伝子抑制効果を確認した。また、DM1 を対象とした検討では、中枢神経、骨格筋、心筋を含む多臓器病態への応用可能性を示した。

第三の成果として、CE-MS を活用し、BBB 通過型 HDO が全身投与後に脳実質内へ移行していることを分子レベルで直接実証した。これは、本技術の中枢神経送達能を裏付ける重要な成果である。

以上より、本研究により BBB 通過型 HDO は、中枢神経疾患に対する全身投与型核酸医薬として有望な技術基盤であることを明らかにした。

8. 今後の展望

本研究では、当初目標として非臨床 POC の取得を掲げていたが、研究期間の制約もあり、主として遺伝子発現抑制効果および送達技術の実証までを達成するに至った。今後は、本研究で得られた成果を基盤として、非臨床 POC 取得に向けた検証を本格的に進める。

SOD1-ALS に対しては、SOD1-G93A モデルマウスを用い、運動機能改善効果、生存期間延長効果、安全性を中心に評価する。DM1 に対しては、HSALR モデルマウスを用い、筋機能障害および中枢神経症状に対する改善効果を検証する。

一方で、本研究では主として遺伝子発現抑制効果を中心とした検討を行っており、タンパク質レベルでの変化および疾患表現型の改善効果については未達であり、今後の重要な課題である。これらの評価を通じて、脳・脊髄・筋組織を同時に標的とする全身投与型核酸医薬としての有効性を明確化していく。

また、CE-MS を中心とした薬物動態解析技術を発展させ、脳内移行量の定量評価、代謝物解析、臓器分布解析を進めることで、非臨床開発に資するデータ基盤を整備する。

1. Background and Objectives

This research project was conducted over a two-year period from FY2024 to FY2025 with the goal of developing a novel therapeutic strategy based on blood-brain barrier (BBB)-crossing heteroduplex oligonucleotides (HDOs) combined with optimized drug delivery system (DDS) technology, together with advanced pharmacokinetic evaluation.

Oligonucleotide therapeutics, represented by antisense oligonucleotides (ASOs) and siRNAs, have emerged as a new therapeutic modality capable of targeting molecules that are difficult to modulate using conventional small-molecule drugs or antibody therapeutics. Progress in this field has been remarkable, and as of April 2026, 24 oligonucleotide drugs have been approved worldwide. Furthermore, global efforts have accelerated toward the development of technologies enabling systemic delivery—such as intravenous or subcutaneous administration—with efficient distribution to the brain, cardiac muscle, and skeletal muscle.

BBB-crossing HDOs are expected to serve as next-generation oligonucleotide therapeutics capable of crossing the BBB and reaching the central nervous system (CNS) after systemic administration. However, several challenges remained, including safety, pharmacokinetics, and delivery efficiency.

Thus, the primary objective of this project was to obtain the nonclinical proof-of-concept (POC) and sought to address these challenges through ligand optimization, efficacy studies in disease models, establishment of advanced biodistribution analysis platforms, and integration with cutting-edge DDS technologies.

2. Heteroduplex Oligonucleotide (HDO) Technology

HDO (Heteroduplex Oligonucleotide) is a double-stranded nucleic acid therapeutic composed of an antisense-active DNA strand and a complementary RNA strand (cRNA). It possesses a unique molecular structure distinct from conventional antisense oligonucleotides (ASOs) and siRNAs, and has been granted patents in seven countries worldwide. Various DDS ligands can be conjugated to the 5' end of the complementary RNA strand.

The proposed mechanism of action of HDO involves cellular uptake in its duplex form, followed by intracellular cleavage of the complementary RNA strand by endogenous enzymes such as RNases. The released DNA strand subsequently exerts antisense activity against the target RNA. Owing to this characteristic mechanism, HDO exhibits substantial advantages over conventional ASOs in tissue delivery.

In general, ligand-conjugated ASOs show improved cellular uptake when ligand-receptor affinity is high; however, insufficient dissociation from cell-surface receptors after internalization can reduce endosomal escape efficiency and limit therapeutic efficacy. In contrast, in HDOs, cleavage of the complementary RNA strand within the endosomal environment functionally enables the separation of the ligand moiety from the antisense-active strand, thereby facilitating efficient escape of the active strand into the cytoplasm. As a result, target RNA engagement is markedly enhanced, leading to superior pharmacological activity compared with conventional ligand-conjugated ASOs.

Indeed, in a preclinical study of familial amyloid polyneuropathy, intravenously administered HDO achieved approximately 99% suppression of the causative target gene, whereas a conventional single-stranded antisense oligonucleotide achieved approximately 50% suppression (Nature Communications, 2015).

Based on this HDO platform, we further developed a BBB-crossing HDO capable of traversing the blood-brain barrier (BBB). Because most conventional oligonucleotide therapeutics cannot cross the BBB, current CNS-targeting oligonucleotide drugs generally require intrathecal (IT) administration. In contrast, in 2021 we reported the first successful systemic delivery (subcutaneous or intravenous administration) of oligonucleotides into the brain using BBB-crossing HDO technology (Nature Biotechnology, 2021).

In this project, we further advanced this BBB-crossing HDO platform toward the treatment of intractable neurological and neuromuscular disorders, including ALS, by enabling systemic delivery to the brain, spinal cord, and muscle tissues, thereby

improving disease pathology through target gene suppression. In parallel, DDS ligand structures were re-optimized to enhance safety and maximize delivery efficiency for future clinical translation.

3. Improvement of Systemic Delivery Performance Through DDS Ligand Optimization

For the practical application of BBB-crossing HDOs, it is essential to optimize not only delivery efficiency to the central nervous system, but also safety, peripheral tissue distribution, and tolerability during repeated administration. Our previously developed BBB-crossing HDO utilized cholesterol as the DDS ligand and achieved robust brain delivery. However, identification of next-generation ligands with improved safety profiles and greater clinical suitability remained an important challenge.

Thus, in this study, conventional cholesterol-conjugated HDO (Chol-HDO) was used as the benchmark, and tocopherol-conjugated HDO (Toc-HDO), together with multiple newly designed ligand-conjugated HDOs, were synthesized and comparatively evaluated. Each candidate was assessed following systemic administration in mice for CNS delivery, target gene suppression, major organ distribution, and safety.

Comparison of CNS delivery demonstrated that Toc-HDO showed reduced brain distribution relative to Chol-HDO, accompanied by limited target gene suppression. In contrast, one novel ligand-conjugated HDO (Compound X) maintained brain delivery comparable to that of Chol-HDO and produced robust gene silencing across multiple CNS regions, including the cerebral cortex, striatum, cerebellum, brainstem, and spinal cord.

Safety evaluation further revealed that acute toxic findings observed after Chol-HDO administration were alleviated in mice treated with Compound X-conjugated HDO. Specifically, transient deterioration in general condition and reduced tolerability immediately after dosing were improved, indicating favorable properties for repeated administration.

Taken together, this study identified Compound X as a promising next-generation DDS ligand that preserves CNS delivery and gene silencing efficacy while potentially improving safety and organ selectivity. These findings represent an important technological advance toward the practical application of BBB-crossing HDOs and are expected to accelerate development of systemically administered nucleic acid therapeutics for ALS, DM1, and other neurological or neuromuscular disorders.

4. Demonstration of Efficacy in a SOD1-ALS Model

Familial amyotrophic lateral sclerosis caused by SOD1 mutations (SOD1-ALS) accounts for approximately 2–3% of all ALS cases. The disease is characterized by intracellular accumulation and abnormal aggregation of mutant SOD1 protein, leading predominantly to progressive degeneration and loss of motor neurons. Patients develop muscle weakness, dysphagia, respiratory failure, and other severe manifestations, highlighting the urgent need for disease-modifying therapies capable of slowing disease progression.

For SOD1-ALS, the antisense oligonucleotide tofersen, which targets mutant SOD1, has already reached clinical use. However, tofersen requires intrathecal administration, imposing a substantial burden on patients. In addition, increasing evidence suggests that ALS pathology involves not only the central nervous system but also peripheral tissues such as skeletal muscle and cardiac muscle, indicating that therapies targeting only the CNS may be insufficient.

In this study, we aimed to establish a novel therapeutic strategy for ALS using BBB-crossing HDO technology, enabling systemic delivery of nucleic acid therapeutics to the brain and spinal cord while simultaneously targeting peripheral pathology in skeletal and cardiac muscle. SOD1 was selected as the target molecule, and an HDO sharing the same target sequence concept as tofersen was designed.

Efficacy was evaluated in G93A-SOD1 transgenic ALS model mice treated systemically with BBB-crossing HDO conjugated to Compound X identified in the previous section. Significant reductions in SOD1 mRNA expression were observed across multiple brain regions, demonstrating that the HDO can cross the BBB and achieve target gene suppression in the CNS

following systemic administration. Importantly, robust effects were confirmed in disease-relevant regions including the cerebral cortex, brainstem, and spinal cord.

In addition to the CNS, marked suppression of SOD1 expression was also observed in the quadriceps muscle (skeletal muscle) and heart (cardiac muscle). These findings validate a therapeutic concept that is difficult to achieve with conventional intrathecally administered oligonucleotide drugs: simultaneous targeting of the CNS and peripheral tissues. Given the systemic nature of ALS, this represents an important step toward comprehensive disease intervention.

From a safety perspective, mortality was observed in mice receiving cholesterol-conjugated HDO, whereas no deaths or overt abnormal behaviors were detected in the Compound X-conjugated HDO group. This finding suggests that Compound X may be superior not only in efficacy but also in tolerability as a DDS ligand.

Collectively, these results demonstrate that BBB-crossing HDO enables target gene suppression in both central and peripheral tissues following systemic administration, supporting its potential as a next-generation therapeutic approach for ALS.

5. Demonstration of Efficacy in a DM1 Model

Myotonic dystrophy type 1 (DM1) is an inherited neuromuscular disorder caused by CTG repeat expansion in the DMPK gene. In addition to skeletal muscle pathology, DM1 is a multisystem disease involving cardiac abnormalities, central nervous system manifestations, and dysfunction in multiple organs. No curative therapy has yet been established, and there remains a strong need for novel treatments capable of simultaneously targeting skeletal muscle, cardiac muscle, and the CNS.

In this study, to examine the broader disease applicability of BBB-crossing HDO technology, we designed an HDO targeting microRNA-23b (miR-23b), which has been implicated in DM1 pathology. As DDS ligands, cholesterol-conjugated HDO, tocopherol-conjugated HDO, and Compound X-conjugated HDO identified in the previous section were prepared and comparatively evaluated following systemic administration.

Cholesterol-conjugated HDO treatment resulted in mortality and severe deterioration in some mice. In contrast, no obvious serious adverse events were observed in mice treated with tocopherol-conjugated HDO or Compound X-conjugated HDO, suggesting an improved safety profile.

In efficacy studies, Compound X-conjugated HDO achieved robust suppression of miR-23b in CNS tissues. Favorable target suppression was also observed in skeletal muscle and cardiac muscle. In addition, suppression in the liver tended to be lower than that observed with cholesterol-conjugated HDO, suggesting reduced excessive distribution to non-target organs.

Taken together, these findings demonstrate that BBB-crossing HDO technology is applicable not only to ALS but also to DM1. The ability to simultaneously target the CNS, skeletal muscle, and cardiac muscle highlights the broad therapeutic potential of systemically administered HDO-based therapeutics.

6. Direct Demonstration of Brain Delivery of BBB-Crossing HDO by CE-MS

In collaboration with advanced pharmacokinetic analysis technologies, the highest priority was to directly demonstrate at the molecular level that BBB-crossing HDO reaches the brain following systemic administration. To this end, collaborative studies were conducted during the project period using capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS), positron emission tomography (PET) imaging, and mass spectrometry imaging (MSI).

Using CE-MS, we successfully achieved direct detection of HDO-derived nucleic acid components in brain tissue after systemic administration. CE-MS is a highly sensitive analytical platform that integrates capillary electrophoresis as a separation step upstream of mass spectrometry, enabling detection of ultra-trace biomolecules in complex biological samples. HDO-derived parent strand components were detected in brain tissue samples collected after administration of BBB-crossing HDO. The estimated concentrations were consistent with values previously inferred by quantitative PCR, supporting the

validity of the measurements. These findings directly demonstrate that BBB-crossing HDO crosses the blood-brain barrier and reaches the brain parenchyma after systemic dosing.

Although PET and MSI did not directly detect brain delivery under the conditions examined, useful datasets were obtained for whole-body biodistribution analysis and metabolite characterization, respectively.

Collectively, these results provide chemical analytical evidence supporting CNS delivery of BBB-crossing HDO and establish a new evaluation platform for assessing brain delivery of nucleic acid therapeutics, which has been challenging. Further development of quantitative and metabolite analyses is expected to support future nonclinical development and clinical translation.

7. Key Outcomes and Significance of This Study

The objective of this study was to establish the technological foundation for systemically administered nucleic acid therapeutics capable of reaching the central nervous system through BBB-crossing HDO technology and to advance its path toward practical application.

The first major outcome was optimization of DDS ligands, leading to the identification of a novel ligand candidate that maintained CNS delivery while offering the potential for improved safety.

The second major outcome was demonstration of therapeutic applicability in disease models. In SOD1-ALS model mice, systemic administration achieved target gene suppression not only in the brain and spinal cord but also in skeletal and cardiac muscle. In studies targeting DM1, the technology also showed applicability to multisystem pathology involving the CNS, skeletal muscle, and cardiac muscle.

The third major outcome was the use of CE-MS to directly demonstrate, at the molecular level, that BBB-crossing HDO reaches the brain parenchyma after systemic administration. This finding provides important evidence supporting the CNS delivery capability of the platform.

Taken together, these results establish BBB-crossing HDO as a promising technological foundation for the development of systemically administered nucleic acid therapeutics for central nervous system disorders.

8. Future Perspectives

Although the original objective of this project was to obtain nonclinical proof-of-concept (POC), the limited project period allowed us to primarily establish delivery technology and demonstrate target gene suppression. Building on these achievements, the next stage will focus on full nonclinical POC studies.

For SOD1-ALS, studies using SOD1-G93A model mice will evaluate motor function improvement, survival extension, and safety. For DM1, studies using HSALR model mice will assess therapeutic effects on muscle dysfunction as well as central nervous system manifestations.

At the same time, the present study mainly focused on gene expression suppression, and changes at the protein level as well as improvement of disease phenotypes remain to be demonstrated. These represent important next steps for validating the therapeutic potential of a systemically administered nucleic acid medicine capable of simultaneously targeting the brain, spinal cord, and muscle tissues.

In parallel, CE-MS-based pharmacokinetic analyses will be further expanded to quantify brain exposure, characterize metabolites, and evaluate organ distribution, thereby establishing a data platform to support future nonclinical development.