

令和元年6月12日現在

機関番号：35408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01939

研究課題名(和文) マルチ遺伝子サイレンシング法を利用したがん転移を抑制する脂質修飾 siRNAの開発

研究課題名(英文) Antitumor Effect of Lipid-Conjugated siRNA using multi-gene silencing method

研究代表者

久保 貴紀 (Kubo, Takanori)

安田女子大学・薬学部・講師

研究者番号：90435751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脂質修飾siRNAを用い複数のがん関連遺伝子を標的としたマルチ遺伝子サイレンシング法での抗腫瘍効果を評価し、臨床での応用を目指すことを目的とした。血管新生増殖因子(VEGF)およびβ-カテニン(β-CAT)遺伝子を標的としたin vivoにおける脂質修飾siRNAの抗腫瘍効果を皮下腫瘍および肝転移マウスモデルにて評価した。その結果、VEGFとβ-CATの2つの遺伝子を標的としたマルチ遺伝子サイレンシング法を利用することで相乗的な抗腫瘍効果を達成した。以上、本研究で用いた脂質修飾siRNAとマルチ遺伝子サイレンシング法は優れた抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

通常、RNAi法では1種類の遺伝子を標的としたsiRNAで評価するが、本研究では、脂質修飾siRNAを用いてVEGFとβ-CATの2つの遺伝子を同時に標的としたマルチ遺伝子サイレンシング法を利用し、相乗的な抗腫瘍効果を評価した。その結果、マルチ遺伝子サイレンシング法はその相乗効果で非常に強い抗腫瘍効果を示し、また、皮下に移植した腫瘍に対する局所的な投与系でも、肝転移した腫瘍を標的とした全身投与の系でも強い効果を示した。これらの結果は、これまでのRNA干渉法における問題点を一掃できる可能性があり、脂質修飾siRNAを用いたマルチ遺伝子サイレンシング法は医療への応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we synthesized siRNAs conjugated with lipids at the 5'-end of the sense strand (Lipid-siRNAs), and examined its RNAi effect on VEGF and b-catenin as a target gene in a colon cancer cell line, HT29Luc, both in vitro and in vivo. We examined the in vitro RNAi effect in HT29Luc cells and found that Lipid-siRNAs strongly inhibited expression of the VEGF and b-catenin gene in comparison with non-modified siRNA. In regard to the in vivo RNAi effects, Lipid-siRNA complexed with InvivoFectamine targeting the both VEGF and b-catenin gene at one time were systemically or locally administered to a liver-metastatic or subcutaneous tumor mouse models formed by implantation of HT29Luc cells. As a result, Lipid-siRNAs strongly inhibited the growth of tumors compared with non-modified siRNA. Our results suggest that Lipid-siRNA should be vigorously pursued as a novel nucleic acid medicine for clinical treatment of cancer.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：RNAi コンジュゲート 核酸医薬 DDS 抗腫瘍効果 マルチ遺伝子サイレンシング in vivo RNAi

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

短い2本鎖 RNA (siRNA) を用いる RNA 干渉 (RNAi) は、がんなどの難治性疾患の新たな治療法として期待されており、国内外において様々な疾病を対象とした siRNA が開発されている。その一方で、siRNA の体内でのデリバリー法や標的細胞への導入法、安定性の向上などは確立されておらず、*in vivo* での RNAi 効果も乏しいのが現状であり、臨床への応用には多くの課題が残されている。近年、コレステロールや長鎖脂肪酸が直接 siRNA に結合した脂質修飾 siRNA (Lipid-siRNA) が注目されており、*in vivo* で安定な RNAi 効果を示すと期待されている。しかし、これまでに報告された Lipid-siRNA は細胞導入性や安定性は向上するものの、脂質結合位置や siRNA の構造 (多くが 21 塩基長) に制限があるために、RNAi 反応に関わるタンパク質 (RISC 等) との相互作用を妨げ、RNAi 効果自体は減少する。また、Lipid-siRNA の合成法自体も汎用性に乏しく、臨床応用を含めた *in vivo* 利用での障害となっている。

2. 研究の目的

これまでの研究で、RNAi 法の問題を解決できる新しい Lipid-siRNA の開発に成功した。この Lipid-siRNA の特徴として、脂質結合位置をセンス鎖の 5' 末端に限定している。また、本研究で開発した新規合成法は従来の合成法に比べ、簡便かつ高収率、高純度で目的の Lipid-siRNA を合成できる。さらに、結合させる脂肪酸は理論上 siRNA あらゆる位置に結合可能である。これまでの研究で、申請者らが開発した Lipid-siRNA は *in vitro* において、細胞内導入性および分解酵素耐性が向上し、RNAi 効果も極めて強いことを明らかにした。これらの結果を基に、本研究では、Lipid-siRNA を全身投与し、肝臓に転移した腫瘍に対する抗腫瘍効果を 2 つの遺伝子を同時に標的とするマルチ遺伝子サイレンシング法を利用して評価した。さらに、皮下に形成された腫瘍に対し局所投与した Lipid-siRNA についても、マルチ遺伝子サイレンシング法を利用して評価した。このマルチ遺伝子サイレンシング法を利用した Lipid-siRNA の *in vivo* における抗腫瘍効果を確立し、臨床での応用を目指すことが本研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究では、皮下腫瘍マウスモデルおよび肝転移マウスモデルに対する Lipid-siRNA の抗腫瘍効果を定量的に評価した。そのために、ルシフェラーゼを発現するがん細胞をヌードマウスに移植した皮下腫瘍マウスモデルおよび肝転移マウスモデルを作製し、Lipid-siRNA を局所投与または全身投与した後、IVIS を用いて非侵襲的かつ経時的に測定した。標的遺伝子は、腫瘍の増殖・転移に関係する VEGF と -CAT を選択した。

まず、1 つの標的遺伝子についての Lipid-siRNA の抗腫瘍効果を評価するために、肝臓に転移した腫瘍をターゲットとし、尾静脈導入による Lipid-siRNA の RNAi 効果を IVIS を用いて非侵襲的に評価した。肝臓への腫瘍形成は、ルシフェラーゼ遺伝子を恒常的に発現できる大腸癌細胞 (HT29Luc) を用いた。がん細胞を門脈より移植し、数日後、VEGF または -CAT 遺伝子を標的とした Lipid-siRNA と *in vivo* 用導入剤との複合体を尾静脈より投与した。投与は 72 時間毎に 3 回行い、IVIS を用いて全身のルシフェラーゼの発光を観察した。次に、VEGF 遺伝子および -CAT 遺伝子を同時に標的とした 2 つの Lipid-siRNA を併用した。この 2 つの遺伝子を同時に標的としたマルチ遺伝子サイレンシング法を利用することにより、相乗的な抗腫瘍効果が期待できる。細胞は、上記同様 HT29Luc 細胞を用い、ヌードマウスの皮下に移植し形成された腫瘍、および門脈より移植し肝臓に転移した腫瘍に対して、Lipid-siRNA を局所投与または全身投与した。投与方法、スケジュールは上記同様である。IVIS によるルシフェラーゼ発光を経時的に計測して腫瘍の増殖・転移の有無を確認した。

さらに、本研究では肝転移マウスモデルの、リンパ行性転移に対する Lipid-siRNA の RNAi 効果も検討した。標的部位は、鼠径リンパ節とし、投与方法、スケジュールは上記同様とした。鼠径リンパ節でのルシフェラーゼ発光強度をコントロール群と比較し、Lipid-siRNA の抗腫瘍効果を評価した。

4. 研究成果

血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) または -カテニン (-CAT) の 1 つの遺伝子を標的とした Lipid-siRNA の肝転移マウスモデルに対する抗腫瘍効果について評価した。Lipid-siRNA としてはパルミチン酸結合型 siRNA (C16-siRNA) を用いた。まず、ルシフェラーゼを発現するがん細胞をヌードマウスに移植した肝転移マウスモデルを作製した。肝臓への腫瘍形成は、ルシフェラーゼ遺伝子を恒常的に発現できる大腸癌細胞 (HT29Luc) を用いた。また、本研究で用いた C16-siRNA は、*in vivo* 用導入剤である Invivofectamine との複合体を形成し肝臓へ蓄積するので、これを利用し、VEGF または -CAT を標的とした C16-siRNA を Invivofectamine と複合体を形成させ、尾静脈から全身投与した。投与は 72 時間毎に 3 回

行い、IVISを用いて全身のルシフェラーゼの発光を観察した。その結果、C16-siRNAを投与したマウス群はコントロールマウス群（未処理群）に比べ、肝臓に転移した腫瘍の増大が抑制されていた。また、C16-siRNAを投与したマウス群の方が未修飾 siRNA を投与したマウス群に比べ腫瘍増大の抑制効果が高かったことから、C16-siRNA は優れた抗腫瘍効果が期待できることが明らかとなった。

次に、C16-siRNA だけではなく、飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸を siRNA に直接結合させた Lipid-siRNA を合成し、恒常的にルシフェラーゼ遺伝子を発現できる大腸がん細胞 (HT29Luc) に対する細胞導入性、血管新生増殖因子(VEGF)および β -カテニン (β -CAT) 遺伝子をターゲットとした *in vitro* および *in vivo* での RNAi 効果を評価した。*In vitro* での RNAi 効果を評価した結果、Lipid-siRNA は未修飾の siRNA に比べ HT29Luc 細胞に対し高い細胞導入性を示し、かつ、*in vitro* において標的遺伝子の発現を著しく抑制した。マルチ遺伝子サイレンシング法を利用した Lipid-siRNA の *in vivo* における抗腫瘍効果を皮下腫瘍マウスモデルおよび肝転移マウスモデルにて評価した。VEGF および β -CAT の2つ遺伝子を同時に標的とした2つの Lipid-siRNA を使い、Invivofectamine との間で複合体を形成させ、担マウスに対する腫瘍部位への局所投与、または、尾静脈からの全身投与を行った後、IVIS を用いて腫瘍のルシフェラーゼ発光を観察した。その結果、VEGF および β -CAT 遺伝子の2つを同時に標的とした Lipid-siRNA を投与した個体群は、未処理群や1つの遺伝子を標的とした個体群に比べ標的腫瘍の増殖を強く抑制し、マルチ遺伝子サイレンシング法の相乗的な抗腫瘍効果を達成することに成功した(図 1)。

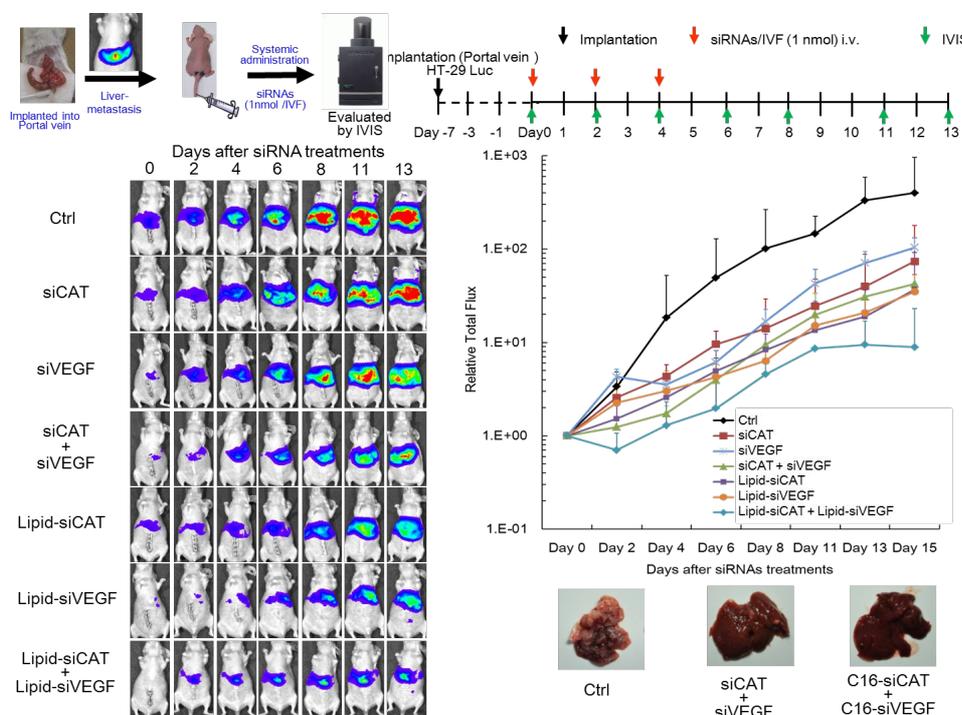


図 1. 肝転移マウスモデルに対するLipid-siRNAのマルチ遺伝子サイレンシング効果

これまでに評価した肝転移マウスモデルの結果を基に、リンパ行性転移に対する Lipid-siRNA の抗腫瘍効果についても検討した。残念ながら、肝転移マウスモデルにおいてリンパ行性転移の確率が低かったこと、また、Lipid-siRNA 自体のリンパ節へのデリバリーが困難なことから、当初計画していたリンパ行性転移に対する Lipid-siRNA の抗腫瘍効果は現在のところ確認することが出来なかった。しかしながら、マルチ遺伝子サイレンシング法を利用した Lipid-siRNA の *in vivo* での抗腫瘍効果は極めて強く、医薬への応用が期待できる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7件)

1. Sato Y, Matsubara K, Kubo T, Sunayama H, Hatori Y, Morimoto K, Seyama T. High Mannose Binding Lectin (PFL) from *Pseudomonas fluorescens* Down-Regulates Cancer-Associated Integrins and Immune Checkpoint Ligand B7-H4. *Cancers*, 11, e604, (2019). 査読有 doi: 10.3390/cancers11050604.
2. Yanagihara K, Kubo T, Iino Y, Mihara K, Morimoto C, Seyama T, Takeshi K, Ochiai A, Yokozaki H. Development and characterization of a cancer cachexia model employing a

- rare human duodenal neuroendocrine carcinoma-originating cell line. *Oncotarget*, 10, 2435-2450 (2019). 査読有 doi: 10.18632/oncotarget.26764
3. Kubo T, Nishimura Y, Hatori Y, Akagi R, Mihara K, Yanagihara K, Seyama T. Antitumor effect of palmitic acid-conjugated DsiRNA for colon cancer in a mouse subcutaneous tumor model. *Chem Biol Drug Des.*, 93, 570-581 (2019). 査読有 doi: 10.1111/cbdd.13454.
 4. Yanagihara K, Kubo T, Mihara K, Kuwata T, Ochiai A, Seyama T, Yokozaki H. Development and Biological Analysis of a Novel Orthotopic Peritoneal Dissemination Mouse Model Generated Using a Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Line. *Pancreas*, 48, 315-322 (2019). 査読有 doi: 10.1097/MPA.0000000000001253.
 5. Yanagihara K, Kubo T, Mihara K, Kuwata T, Ochiai A, Seyama T, Yokozaki H. Establishment of a novel cell line from a rare human duodenal poorly differentiated neuroendocrine carcinoma. *Oncotarget*, 9, 36503-36514 (2018). 査読有 doi: 10.18632/oncotarget.26367
 6. Inouye S, Hatori Y, Kubo T, Saito S, Kitamura H, Akagi R. NRF2 and HSF1 coordinately regulate heme oxygenase-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun*, 506, 7-11 (2018). 査読有 doi: 10.1016/j.bbrc.2018.10.030.
 7. Nishimura Y, Kubo T, Okamoto Y, Cho H. Convergent synthesis of 4,6-unsubstituted 5-acyl-2-aminodihydropyrimidines using Weinreb amide. *Tetrahedron Letters*, 58, 4236-4239 (2017) 査読有 doi:10.1016/j.tetlet.2016.08.077

〔学会発表〕(計 22 件)

1. 久保貴紀, 西村良夫, 羽鳥勇太, 赤木玲子, 柳原五吉, 瀬山敏雄: 強力な RNAi 効果を有するパルミチン酸コンジュゲート Dicer-substrate siRNA の開発、日本薬学会第 139 年会、千葉、3/19-22 (2019)
2. 菊地 秀与、西村 良夫、久保 貴紀、袁 博、須永 克佳、日比野 康英、長 秀連: HL-60 細胞に対する新規 dihydropyrimidine 誘導体の細胞毒性誘導、日本薬学会第 139 年会、千葉、3/19-22 (2019)
3. 西村良夫、極樂寺侑希、久保貴紀、長秀連: 酸触媒を用いた閉環反応による 6-無置換ジヒドロピリミジンの合成、第 57 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、鳥取、11/10-11 (2018)
4. Kazuyoshi Yanagihara, Takanori Kubo, Keichiro Mihara, Takeshi Kuwata, Atsushi Ochiai, Toshio Seyama, Hiroshi Yokozaki: Development and biological analysis of a novel orthotopic peritoneal dissemination mouse model using newly established pancreatic cancer cell line. 第 77 回日本癌学会学術総会、大阪、9/27-29 (2018)
5. 久保貴紀, 西村良夫, 羽鳥勇太, 赤木玲子, 柳原五吉, 瀬山敏雄: 脂肪酸コンジュゲート Dicer-substrate siRNA の大腸がん肝転移マウスモデルに対する抗腫瘍効果、第 91 回日本生化学会大会、京都、9/24-26 (2018)
6. 久保貴紀, 西村良夫, 柳原五吉, 瀬山敏雄: In vitro および in vivo で高い RNAi 効果を示す脂肪酸 siRNA コンジュゲートの開発、日本核酸医薬学会第 4 回年会、福岡、7/9-11 (2018)
7. 久保貴紀, 西村良夫, 柳原五吉, 瀬山敏雄: RNAi 効果が高い脂肪酸結合型 siRNA の開発、日本薬学会第 138 年会 (2018)、金沢、3/25-3/28 (2018)
8. 西村良夫、久保貴紀、長秀連: Weinreb アミド基を利用する 2-アミノ-5-アシルジヒドロピリミジンの収束的合成、日本化学会 第 98 春季年会 (2018) 千葉、3/20-23 (2018)
9. 久保貴紀, 柳原五吉, 瀬山敏雄: パルミチン酸結合型 Dicer-substrate siRNA の in vivo での遺伝子発現抑制効果、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会)、神戸、12/6-12/9 (2017)
10. Takanori Kubo, Yoshio Nishimura, Makoto Hirano, Kazuyoshi Yanagihara, Toshio Seyama: Development of lipid-siRNA conjugates having efficient cellular uptake and a potent RNAi effect, The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2017 / The 1st Annual Meeting of Japan Society of Nucleic Acids Chemistry, Tokyo, 11/14-11/16 (2017)
11. 久保貴紀, 橋本優里、西村良夫、平野真、柳原五吉、瀬山敏雄: パルミチン酸結合型 DsiRNA の肝転移マウスモデルに対する抗腫瘍効果、第 56 回 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、徳島、10/21-10/22 (2017)
12. 岩尾采未、久保貴紀、橋本優里、上藤明日香、田中一絵、西村良夫、平野真、柳原五吉、瀬山敏雄: 標的遺伝子の発現を効果的にノックダウンできる脂肪酸コンジュゲート siRNA の開発、第 56 回 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、徳島、10/21-10/22 (2017)
13. 上藤明日香、久保貴紀、岩尾采未、田中一絵、橋本優里、西村良夫、平野真、柳原五吉、瀬山敏雄: シス型不飽和脂肪酸結合 siRNA の高い細胞導入性と強い遺伝子発現抑制効果について、第 56 回 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、

- 徳島、10/21-10/22 (2017)
14. 橋本優里、久保貴紀、岩尾采未、西村良夫、平野真、柳原五吉、瀬山敏雄：RNA干渉効果が高いパルミチン酸結合型 Dicer-substrate siRNA の開発、第 56 回 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、徳島、10/21-10/22 (2017)
 15. 西村良夫、久保貴紀、長秀連：Weinred アミド基を有する 4,6-無置換ジヒドロピリミジン誘導体の合成と 5-アシル体への変換反応、第 56 回 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、徳島、10/21-10/22 (2017)
 16. 久保貴紀、柳原五吉、瀬山敏雄：脂質結合型 siRNA の肝転移マウスモデルに対する抗腫瘍効果、第 9 回 日本 RNAi 研究会 / 第 4 回 日本細胞外小胞学会、広島、8/30-9/1 (2017)
 17. 柳原五吉、久保貴紀、森本千恵、桑田健、落合淳志、横崎 宏：希少癌である十二指腸神経内分泌癌より細胞株を樹立し悪液質マウスモデルを開発した、第 76 回 日本癌学会学術総会、横浜、9/28-9/30 (2017)
 18. 柳原五吉、久保貴紀、落合淳志、横崎 宏：膵がん同所移植モデルは患者の病態と薬物応答を反映したモデルとなり得るか、第 36 回 分子病理学研究会、宮崎、7/21-7/23 (2017)
 19. 井上幸江、羽鳥勇太、久保貴紀、赤木玲子：ヘムオキシゲナーゼ-1 遺伝子の熱ショック応答における転写因子群の核移行解析、第 89 回日本生化学会大会、仙台、9/25-27 (2016)
 20. 久保貴紀、木本絵理華、河野麻弥、柳原五吉、瀬山敏雄：パルミチン酸結合型 siRNA の肝転移マウスモデルに対する抗腫瘍効果、第 8 回日本 RNAi 研究会、広島、8/31-9/2 (2016)
 21. 河野麻弥、木本絵理華、久保貴紀、瀬山敏雄：慢性骨髄性白血病細胞に対する脂肪酸コンジュゲート siRNA の RNAi 効果、第 8 回日本 RNAi 研究会、広島、8/31-9/2 (2016)
 22. 木本絵理華、河野麻弥、橋本優里、久保貴紀、瀬山敏雄：優れた細胞導入性および RNA 干渉効果が高い脂肪酸結合型 siRNA の開発、第 8 回日本 RNAi 研究会、広島、8/31-9/2 (2016)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：瀬山 敏雄

ローマ字氏名：Toshio Seyama

所属研究機関名：安田女子大学

部局名：薬学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：90163120

研究分担者氏名：柳原 五吉

ローマ字氏名：Kazuyoshi Yanagihara

所属研究機関名：国立研究開発法人国立がん研究センター

部局名：先端医療開発センター

職名：特任研究員

研究者番号 (8 桁)：20158025

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。