様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月　 ８ 日現在

機関番号：１２６０２

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：１６Ｋ１４６３０

研究課題名（和文）PCSK9阻害薬の応用による抗がん核酸薬DDSの技術革新

研究課題名（英文）Innovative development of DDS for microRNA therapeutics by an application of anti-PCSK9 antibody

研究代表者

稲澤　譲治（INAZAWA, Johji）

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：３０１９３５５１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,900,000円

研究成果の概要（和文）：マイクロRNA（miR）は小分子機能性RNAであり、標的遺伝子mRNAに直接結合することでその機能を負に制御する。癌抑制型miR（TS-miR）は抗癌核酸薬として期待されている。その癌細胞への送達にはdrug delivery system (DDS)の開発が不可欠である。抗PCSK9抗体処理によるがん細胞選択的miR取り込みLDPの有効性を追究した。BxPC3細胞を用いた膵臓癌担がんマウスへ癌抑制性miR-Xを内包したLNP製剤を静注投与することにより、有意な抗腫瘍効果が認められた。このことは、miR内包LNP製剤は、癌治療剤として有用である可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Tumor-suppressive microRNAs (TS-miRs) target multiple cancer-promoting genes concurrently and may be useful as a therapeutic agent for cancer therapy. The development of drug delivery system (DDS) is critical for the implementation of miR-based therapeutics. miR-X we identified effectively induces apoptosis by concurrently directly targeting multiple genes associated with cytoprotective mechanisms in esophageal cancer cells. In this project, we investigated therapeutic potential of the lipid-nanoparticle (LNP)-mediated DDS for miR-634-based cancer therapy. We confirmed the enforced expression of miR-X to be able to induce the apoptosis in various cancer cell lines. In xenograft tumors of BxPC3 cells, a pancreatic cancer cell line, in mice, the intravenous administration of the LNP incorporated miR-X significantly induced tumor growth inhibition. These results suggest therapeutic utility of LNP-mediated DDS for TS-miR(s) to cancer cells.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：がん　マイクロRNA　核酸抗がん薬　DDS　脂質ナノ粒子　PCSK9　LDLR　LNP

１．研究開始当初の背景

核酸医薬の臨床応用には、安全かつ効率的な DDS(Drug Delivery System)の開発が必須である。脂質ナノ粒子(LNP; Lipid nanoparticle)は、LDL レセプター(LDLR)を介したエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、内包した薬物や機能分子を運搬する。一方、高脂血症の治療剤として注目されている抗 PCSK9 抗体は PCSK9 の機能を阻害して細胞表面 LDLR の過剰発現およびコレステロールの細胞内取り込みを促進する。

２．研究の目的

本研究では上記の二つの要素を結びつけ「抗 PCSK9 抗体により、細胞表面 LDLR の過剰発現を介して LNP の効率的な取り込みを促進させる」という独自の発想に基づき、我々が特定したがん抑制 miRNA-X および既存抗がん剤を内包した LNP を用いて、安全かつ効率的な DDS の開発を目的とする。

３．研究の方法

主にがん細胞株を用いた in vitro、in vivo 実験系により、PCSK9 の機能阻害による LDLR の肝細胞膜ならびにがん細胞膜での発現変動の確認と、これに伴う LNP の取り込み効率の相関の有無を検討した。具体的には、(1) ヒトがん細胞株および臨床検体におけるLDLRおよびPCSK9遺伝子の発現様式を調べる。ウエスタンブロット、FACS 解析により、各がん細胞膜表面 LDLR および PCSK9 タンパク質の発現様式を決定した。各種がん組織パラフィン切片を用いた免疫組織化学によるタンパク質発現の解析により、LDLR および PCSK9 タンパク質発現の頻度や腫瘍内不均一性などを調べた。次に、(2) in vitro 実験系において PCSK9 の機能阻害による LNP 取り込み効率の促進の有無を検討した。

さらに、H28 年度で得られた in vitro 実験系による結果をもとに、PCSK9 の機能阻害による LDLR の発現変動を伴う LNP の取り込み効率の上昇の有無を in vivo で検討し、がん抑制マイクロ RNA の miR-X と抗がん剤を用いた実用的な動物治療実験を行った。

４．研究成果

核酸医薬の臨床応用には、安全かつ効率的な DDS(Drug Delivery System)の開発が必須である。脂質ナノ粒子(LNP; Lipid nanoparticle)は、LDL レセプター(LDLR)を介したエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、内包した薬物や機能分子を運搬する。高脂血症の治療剤として注目されている抗 PCSK9 抗体は PCSK9 の機能を阻害して細胞表面 LDLR の過剰発現およびコレステロールの細胞内取り込みを促進する。

本研究ではこの両者を結びつけ、PCSK9 の機能を抑制しすることで、細胞表面 LDLR の過剰発現を介して LNP の効率的な取り込みを促進させる」という独自の発想のもと、我々が特定した強力な細胞死誘導性がん抑制 miRNA の miR-X 単独、あるいは既存抗がん薬(CDDP など)とのコンビネーション（合剤化）を内包させた LNP を用いて、安全かつ効率的な DDS の開発を目的に研究を実施した。LNP は国内製薬会社より提供を受けてこれを利用した。平成 29 年度は、miR-X 内包 LNP はリポフェクタミン内包時と同レベルでがん細胞死誘導効果が示された。平成 29 年度は、LDLR および PCSK9 を発現する胃癌細胞株（NUGC4 細胞）において、(1)LDLR をノックダウンすることにより、LNP の取り込み効率が減少すること、(2)逆に PCSK9 をノックダウンすることにより、LDLR の発現増加を伴い、LNP の取り込み効率が有意に亢進することを確認した。また、BxPC3 細胞を用いた膵臓癌担がんマウスへ癌抑制性 miR-X を内包した LNP 製剤を静注投与することにより、有意な抗腫瘍効果が認められ、miR 内包 LNP 製剤は癌治療剤として有用である可能性が示された。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 15 件）

① Furusawa A, Miyamoto M, Takano M, Tsuda H, Song YS, Aoki D, Miyasaka N, Inazawa J, Inoue J. Ovarian cancer therapeutic potential of glutamine depletion based on GS expression. Carcinogenesis. 2018 May 28;39 (6):758-766. doi: 10.1093/carcin/bgy033.PMID: 29617730.査読有

② Tonouchi E, Gen Y, Muramatsu T, Hiramoto H, Tanimoto K, Inoue J, Inazawa J. miR-3140 suppresses tumor cell growth by targeting BRD4 via its coding sequence and downregulates the BRD4-NUT fusion oncoprotein. Sci Rep. 2018 Mar 14;8(1): 4482.査読有 doi:10.1038/s41598-018-22767-y.

③ Tanikawa C, Kamatani Y, Takahashi A, Momozawa Y, Leveque K, Nagayama S, Mimori K, Mori M, Ishii H, Inazawa J, Yasuda J, Tsuboi A, Shimizu A, Sasaki M, Yamaji T,Sawada N, Iwasaki M,

Tsugane S, Naito M, Wakai K, Koyama T, Takezaki T, Yuji K,Murakami Y, Nakamura Y, Kubo M, Matsuda K. GWAS identifies two novel colorectal cancer loci at 16q24.1 and 20q13.12. Carcinogenesis. 2018 May 3;39(5):652-60. doi:10.1093/carcin/bgy026. PubMed PMID: 29471430.査読有

④ Kanai Y, Nishihara H, Miyagi Y, Tsuruyama T, Taguchi K, Katoh H, Takeuchi T, Gotoh M, Kuramoto J, Arai E, Ojima H, Shibuya A, Yoshida T, Akahane T, Kasajima R, Morita KI, Inazawa J, Sasaki T, Fukayama M, Oda Y. The Japanese Society of Pathology Guidelines on the handling of pathological tissue samples for genomic research: Standard operating procedures based on empirical analyses. Pathol Int. 2018 Feb;68(2):63-90. doi:10.1111/pin.12631. PubMed PMID: 29431262.査読有

⑤ Urayama KY, Takagi M, Kawaguchi T, Matsuo K, Tanaka Y, Ayukawa Y, Arakawa Y, Hasegawa D, Yuza Y, Kaneko T, Noguchi Y, Taneyama Y, Ota S, Inukai T, Yanagimachi M, Keino D, Koike K, Toyama D, Nakazawa Y, Kurosawa H, Nakamura K, Moriwaki K,Goto H, Sekinaka Y, Morita D, Kato M, Takita J, Tanaka T, Inazawa J, Koh K, Ishida Y, Ohara A, Mizutani S, Matsuda F, Manabe A. Regional evaluation of childhood acute lymphoblastic leukemia genetic susceptibility loci among Japanese. Sci Rep. 2018 Jan 15;8(1):789. doi:10.1038/s41598-017-19127-7. PubMed PMID: 29335448; PubMed Central PMCID: PMC5768812.査読有

⑥ Akdemir B, Nakajima Y, Inazawa J, Inoue J. miR-432 Induces NRF2 Stabilization by Directly Targeting KEAP1. Mol Cancer Res. 2017 Nov;15(11):1570-78. doi:10.1158/1541-7786.MCR-17-0232. Epub 2017 Jul 31. PubMed PMID: 28760781.査読有

⑦ Hiramoto H, Muramatsu T, Ichikawa D, Tanimoto K, Yasukawa S, Otsuji E, Inazawa J. miR-509-5p and miR-1243 increase the sensitivity to gemcitabine by inhibiting epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer. Sci Rep. 2017 Jun 21;7(1):4002. doi:10.1038/s41598-017-04191-w. PubMed PMID: 28638102; PubMed Central PMCID: PMC5479822.査読有

⑧ Nagata H, Kozaki KI, Muramatsu T, Hiramoto H, Tanimoto K, Fujiwara N, Imoto S, Ichikawa D, Otsuji E, Miyano S, Kawano T, Inazawa J. Genome-wide screening of DNA methylation associated with lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. Oncotarget. 2017 Jun 6;8(23):37740-50. doi:10.18632/oncotarget.17147. PubMed PMID: 28465481; PubMed Central PMCID:PMC5514945.査読有

⑨ Okuda M, Inoue J, Fujiwara N, Kawano T, Inazawa J. Subcloning and characterization of highly metastatic cells derived from human esophageal squamous cell carcinoma KYSE150 cells by in vivo selection. Oncotarget. 2017 May 23;8(21):34670-77.doi:10.18632/oncotarget.16668. PubMed PMID: 28410227; PubMed Central PMCID: PMC5471001.査読有

⑩ Takahashi H, Inoue J, Sakaguchi K, Takagi M, Mizutani S, Inazawa J. Autophagy is required for cell survival under L-asparaginase-induced metabolic stress in acute lymphoblastic leukemia cells. Oncogene. 2017 Jul 27;36(30):4267-76. doi:10.1038/onc.2017.59. Epub 2017 Mar 27. PubMed PMID: 28346428; PubMed Central PMCID: PMC5537607.査読有

⑪ Sakha S, Muramatsu T, Ueda K, Inazawa J. Exosomal microRNA miR-1246 induces cell motility and invasion through the regulation of DENND2D in oral squamous cell carcinoma. Sci Rep. 2016 Dec 8;6:38750. doi:10.1038/srep38750. PubMed PMID:27929118; PubMed Central PMCID: PMC5144099.査読有

⑫ Oikawa Y, Morita KI, Kayamori K, Tanimoto K, Sakamoto K, Katoh H, Ishikawa S, Inazawa J, Harada H. Receptor tyrosine kinase amplification is predictive of distant metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma. Cancer Sci. 2017 Feb;108(2):256-66. doi: 10.1111/cas.13126. PubMed PMID: 27889930; PubMed Central PMCID: PMC5329163.査読有

⑬ Shiraishi K, Okada Y, Takahashi A, Kamatani Y, Momozawa Y, Ashikawa K, Kunitoh H, Matsumoto S, Takano A, Shimizu K, Goto A, Tsuta K, Watanabe S, Ohe Y, Watanabe Y, Goto Y, Nokihara H, Furuta K, Yoshida A, Goto K, Hishida T, Tsuboi M, Tsuchihara K, Miyagi Y, Nakayama H, Yokose T, Tanaka K, Nagashima T, Ohtaki Y, Maeda D, Imai K, Minamiya Y, Sakamoto H, Saito A, Shimada Y, Sunami K, Saito M, Inazawa J, Nakamura Y, Yoshida T, Yokota J, Matsuda F, Matsuo K, Daigo Y, Kubo M, Kohno T. Association of variations in HLA class II and other loci with susceptibility to EGFR-mutated lung adenocarcinoma. Nat Commun. 2016 Aug 9;7:12451. doi:10.1038/ncomms12451. PubMed PMID: 27501781; PubMed Central PMCID:PMC4980483.査読有

⑭ Nuylan M, Kawano T, Inazawa J, Inoue J. Down-regulation of LAPTM5 in human cancer cells. Oncotarget. 2016 May 10;7(19):28320-28. doi:10.18632/oncotarget.8614. PubMed PMID: 27058622; PubMed Central PMCID: PMC5053729.査読有

⑮ Muramatsu T, Kozaki KI, Imoto S, Yamaguchi R, Tsuda H, Kawano T, Fujiwara N, Morishita M, Miyano S, Inazawa J. The hypusine cascade promotes cancer progression and metastasis through the regulation of RhoA in squamous cell carcinoma. Oncogene. 2016 Oct 6;35(40): 5304-16. doi:10.1038/onc.2016.71. Epub 2016 Apr 4. PubMed PMID: 27041563.査読有

〔学会発表〕（計 16 件）

①Inazawa J: Exploring novel cancer-related microRNAs and their diagnostic and therapeutic potentials in Precision Cancer Medicine (PCM). TMU-TMDU Joint Symposium 2018. Tokyo Medical and Dental University, Tokyo. 24/Mar/2018.

②Inazawa J: Exploring novel cancer-related microRNAs and their diagnostic and therapeutic potentials in Precision Cancer Medicine (PCM).

The 2nd International Symposium of Internaional Society of Precision Cancer Medicine. Shilla Stay Haeundae, Busan, Korea. 15-19 /Mar/2018

③Inazawa J: Exploring novel cancer-related microRNAs and their diagnostic and therapeutic potentialsin precision cancer medicine (PCM). 8th International Conference on Nutrition and Physical Activity. Chiang Mai, Thailand. 10-13/Dec/2017

④Inazawa J: Exploring novel cancer-related microRNAs and their diagnostic and therapeutic potentials in Precision Cancer Medicine. International Conference for Precision Cancer Medicine 2017. Tokyo Medical and Dental University, Tokyo. 29/Jun/2017

⑤Inazawa J: Autophagy, p62-NRF2-Keap1-ARE Pathway and Micro RNAs in Overian Cancer. The 4th Annual Meeting of the International Ovarian Cancer Consortium on Tumor Microenviroment and Drug Discovery. Seoul, Korea. 23-25/Feb/2017

⑥Inazawa J: Autophagy,Nutrition and Cancer. Wellness Symposium with NAPA2016. Seoul National University, Korea. 3-5/Nov/2016

⑦Inazawa J: Identification of Novel Tumor- suppressor Micro-RNAs and Their Application for Cancer Diagnosis and Therapeutics. Third Annual Meeting of the International Ovarian Cancer Consortium in conjunction with International Symposium on Tumor Microenvironment and Therapy Resistance. Oklahoma City,USA. 28-30/Aug/2016

⑧Inazawa J: Cancer Omics for Precision Medicine. 19th Annual Meeting of the Korean Urogynecologic Society. Soul, Korea. 2-3/July/2016

⑨稲澤譲治:がんの増殖を抑える小さな分子、マイクロRNA. 第7回山梨医学フォーラム. 山梨大学医学部 臨床大講堂. 山梨. 2018年2月28日

⑩稲澤譲治：ゲノム医療に必要な遺伝子異常の基礎知識. 第76回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2017年9月30日

⑪稲澤譲治: がんの特性を制御するマイクロ RNA の探索と核酸抗がん薬への応用. 第 49 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会. じゅうろくプラザ. 岐阜. 2017 年 9 月 15 日

⑫稲澤譲治: がん抑制マイクロ RNA の探索と診断・治療への応用. 第 75 回日本癌学会学術総会. パシフィコ横浜. 神奈川. 2016 年 10 月 6 日

⑬稲澤譲治:頭頸部・食道がん精密医療（Precision Medicine）拠点形成への期待. お茶の水 SC クラブ第４回学術集会. お茶の水医学会館. 東京. 2016 年 9 月 9 日

⑭稲澤譲治: がんの特性を制御するマイクロ RNA の探索と核酸抗がん薬への応用. ゲノム・エピゲノム標的分子療法の最前線.シンポジウム. 第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会. 別府国際コンベンションセンター B-CON PLAZA. 大分. 2016 年 6 月 1 日

⑮稲澤譲治:乳がんにおけるゲノム・エピゲノム標的分子療法の最前線. 東山乳癌会議 2016. ホテルグランヴィア京都. 京都. 2016 年 5 月 14 日

⑯稲澤譲治:がん細胞におけるアミノ酸欠乏時細胞文脈応答とオートファジー機能.

千里ライフサイエンス新適塾･｢難病への挑戦｣第26回会合．千里ライフサイエンスセンタービル．大阪．2016年5月9日

〔図書〕（計3件）

①(分担)村松智輝、稲澤譲治：次世代がん治療「ハイプシン経路によるがん浸潤・転移メカニズム」．(株)エヌ・ティー・エス（東京）．2017/6/8(386P).

②(分担)村松智輝、稲澤譲治：日本臨床増刊号　がん転移学上「In vivo 選択法による高転移がん細胞亜株の分離」．日本臨床社（東京）．2017/11/20(305P)

③(分担)稲澤譲治：CGH法・造血器腫瘍アトラス.日本医事新報社（東京）．2016/8/15(863P)

〔産業財産権〕

○出願状況（計3件）

名称：マイクロRNA及びその誘導体を有効成分とするがん治療剤
発明者：稲澤譲治、玄泰行、村松智輝、外内えり奈
権利者：国立大学法人東京医科歯科大学
種類：特許
番号：特願2017-229046
出願年月日：2017年11月29日
国内外の別：国内

名称：食道がんのリンパ節転移可能性のデータ取得方法
発明者：稲澤譲治、村松智輝、永田啓明、谷本幸介、河野辰幸、井元清哉、宮野悟
権利者：国立大学法人東京医科歯科大学、国立大学法人東京大学、株式会社ビー・エム・エル
種類：特許
番号：特願2017-036122
出願年月日：2017年2月28日
国内外の別：国内

名称：がんに対するL-アスパラギナーゼ剤とオートファジー阻害剤の併用療法の効果の予測方法、及びがん治療剤
発明者：稲澤譲治、井上純、高橋寛吉
権利者：国立大学法人東京医科歯科大学
種類：特許
番号：PCT/JP2016/87989
出願年月日：2016年12月20日
国内外の別：国外

○取得状況（計1件）

名称：核酸マイクロアレイの異常スポットを検出する方法
発明者：稲澤譲治・井本逸勢
権利者：国立大学法人東京医科歯科大学・富士フィルム株式会社
種類：特許
番号：特許第2261370号
取得年月日：2016年8月24日
国内外の別：　国外（EP）

〔その他〕
ホームページ等：http://www.tmd.ac.jp/mri/cgen/framepage.htm

６．研究組織

(1)研究代表者
稲澤譲治（Inazawa Johji）
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授
研究者番号：30193551

(2)研究分担者
（　　　）

研究者番号：

(3)連携研究者
（　　　）

研究者番号：

(4)研究協力者
（　　　）