

平成 31 年 4 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19455

研究課題名(和文) siRNAによるEGFR分子標的薬耐性の克服

研究課題名(英文) Overcome resistance against EGFR molecular targeting drugs by siRNA

研究代表者

頼 冠名 (RAI, KAMMEI)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：40729092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：EGFR siRNAの抗腫瘍効果はexon 19欠失細胞株と、exon 21 L858R点突然変異株ではEGFR蛋白の抑制がいずれも強く認められたが、細胞死は後者において弱かった。CDP-AD-PEG-TfでEGFR siRNAをナノ粒子化し投与すると、EGFRトランスジェニックマウスでは粒状影が軽快した。xenograftモデルにおいては尾静脈投与を行ったが、明確な縮小効果は得られなかった。また投与方法として皮下注射を選択した場合は腫瘍増殖抑制効果が認められた。PEG抗体による検討で本研究ではナノ粒子化によるsiRNA奏効率は、腫瘍のEGFR依存性と送達率に依存しているものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

siRNAの抗腫瘍効果はin vitroにおいて予想されてきたが、in vivoでの抗腫瘍効果は毒性などのため十分に証明されていない。本研究では生体毒性の少ないサイクロデキストリンポリマーやポリエチレングリコールを主成分としたナノ粒子によりsiRNAを腫瘍に送達しその効果を評価した。変異EGFRにより腫瘍を形成するトランスジェニックマウスでは抗腫瘍効果が得られ、EGFR変異肺がん細胞株の異種移植モデルにおいても投与方法の変更や濃度の検証は必要であるが抗腫瘍効果が得られた。本研究で得られた抗腫瘍効果の違いは創薬における基礎データとして有用なものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：EGFR siRNA showed weaker antitumor effect in exon L858R point mutation cell lines, compared with exon 19 deletion cell lines. Nanoparticles formed by CDP-AD-PEG and EGFR-siRNA showed antitumor effect by becoming smaller nodules in lung. Tail injection failed show significant antitumor effect in xenograft model, but subcutaneous injection showed antitumor effect. Results of anti-PEG antibody stain of these models indicate antitumor effect by siRNA is depend on the degree of EGFR addiction of the cell and efficacy of delivery by nanoparticles to the tumors.

研究分野：呼吸器腫瘍

キーワード：siRNA ナノ粒子 EGFR 耐性克服

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

1. 研究開始当初の背景

driver mutation は細胞の癌化と増殖に強くかかわっており、日本人の非小細胞肺癌のほぼ 8 割が driver mutation と関連しているといわれる。これは我が国を含めたアジア人に多く、わが国主導での新薬の開発が待たれていた driver mutation の代表であるヒト EGFR 遺伝子変異をもつ遺伝子改変を施したマウスモデルは肺に発現するようにプロモーターを組み込めば発癌する。また xenograft を用いると、RNA 干渉が抗腫瘍効果をもたらすことが知られている。更に、従来問題の多かった siRNA のデリバリーシステムについては、California Institute of Technology(CALTECH)の Mark E. Davis Research Group により、RNA 干渉の効果を持つ核酸をヒトへ安全に投与することが可能なデリバリーシステムが確立していた。一方、従来の分子標的薬の EGFR 抗体、EGFR チロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)は翻訳後の蛋白やリン酸化に対して抑制をかけることで抗腫瘍効果を得ている。しかし、癌細胞の遺伝子レベルでのさらなる変異(2 次変異)によってもたらされた蛋白の構造変化に対応できず、癌細胞はそれらの薬物に対し耐性化をきたしてしまうが、siRNA は変異部位に特化し、かつ mRNA レベルに変異した配列特異的に直接作用することが可能であるため、耐性化をきたしても oncogene addiction の状態に変化がないことが多いことから、依然として driver mutation をきたした遺伝子の産物は治療の標的となりうると考えられた。

2. 研究の目的

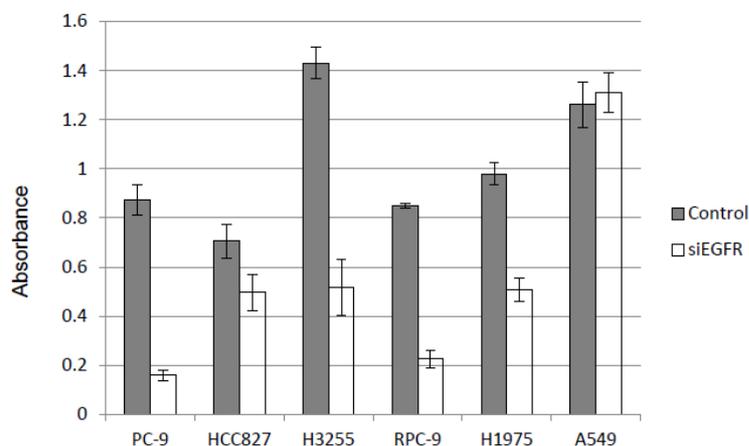
mRNA レベルで変異遺伝子産物を特異的に破壊しうる siRNA に着眼し、過去の siRNA の EGFR oncogene addiction に対する抗腫瘍効果の報告を検討したが、具体的な配列が記載してあるものは 60 篇ほどにすぎず、かつ、検討の結果臨床的に意味のある低濃度での RNA 干渉を行い得ているものはわずか 2 篇であった。しかし、そのうちの 1 篇をベースとした siRNA で構成した新薬は、臨床的に応用可能な低濃度で mRNA を効率的に破壊し、EGFR oncogene addiction を解除しており、既存の分子標的薬が無効となった耐性細胞株においても抗腫瘍効果を明確に示した。本研究は更に EGFR oncogene addiction をきたしている変異 mRNA のみを標的とする siRNA の探索を行い、in silico での有効配列の予測によって、候補を絞り込み、in vitro での効果を検証した。これら siRNA に基づいた新薬を生体に毒性の低いサイクロデキストリンポリマー(CDP)と、ポリエチレングリコール(PEG)および生体内のレセプターに効率的に結合するトランスフェリン(Tf)を主成分としたナノ粒子に siRNA を内包し、siRNA の抗腫瘍効果 既存の分子標的薬に対する耐性の克服のヒトへの応用への足がかりをつかむことが目的である。

3. 研究の方法

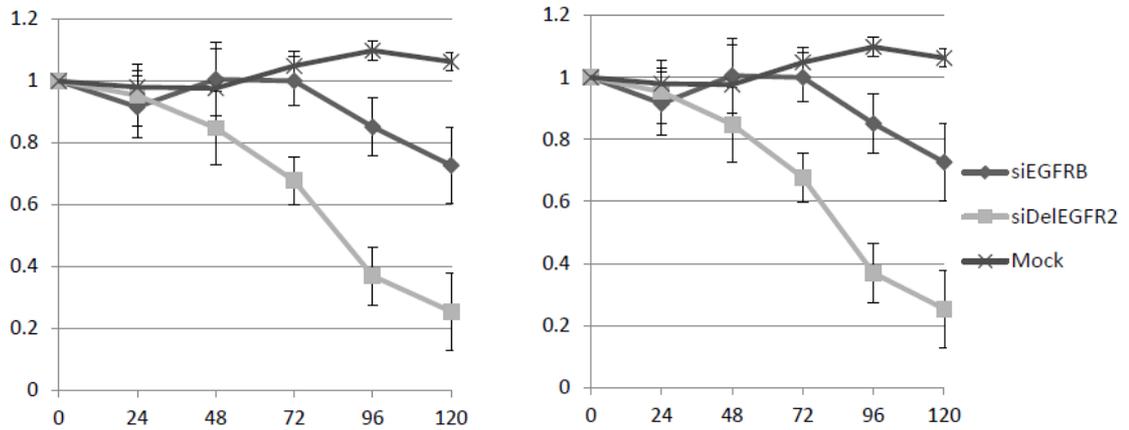
1nM で抗腫瘍効果、EGFR シグナル伝達の抑制がみられる siRNA を同定する。また、in silico で有効性の想定される変異部位特異的な siRNA について探索的效果判定を行う。In vitro の研究にこれらの siRNA と、CDP-AD-PEG-Tf により形成したナノ粒子を用い、動物モデルとしては BALB/c nu/nu と EGFR トランスジェニックマウスを使用する。各系統 20 匹でコントロール群および RNAi 群の計 2 群(1 群 10 匹)に分けて薬物を投与する。なお、サンプルサイズは $\pm 5\%$ 、検出力 80%とした場合、標準偏差 $SD=4mm$ 、検出すべき差 $=5mm$ の設定で $n=10$ が妥当と考えられるため 10 匹に設定した。Xenograft モデルにおいては BALB/c nu/nu にイソフルレン吸入麻酔下で、皮下背部に市販されているヒト肺癌腫瘍細胞(2×10^6)を注入し xenograft を作成する。腫瘍細胞移植後 2 週後に腫瘍形成確認ののち投与薬物として siRNA ($3 \mu g=0.1mL/匹$ 、2 回/週、投与期間 8 週間)を尾静脈投与する。トランスジェニックマウスにおいては腫瘍形成確認後 3 週後において同様の薬物投与を行い、投与期間は 4 週間とする。投与は、尾静脈投与で行う。実験結果に従い投与方法を皮下投与に変更した。

4. 研究成果

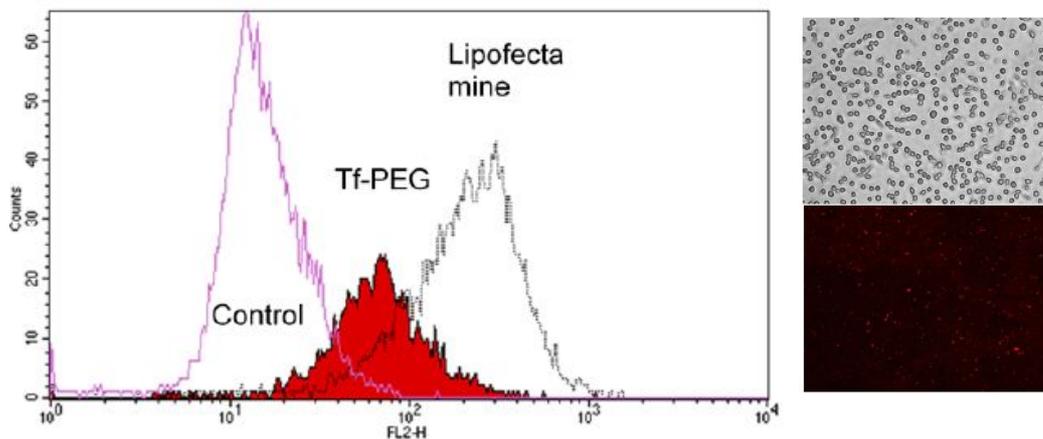
In vitro における EGFR siRNA の抗腫瘍効果は exon 19 欠失細胞株と、exon 21 L858R 点突然変異株で認められた。EGFR 蛋白の抑制がいずれも強く認められた。(図 1)



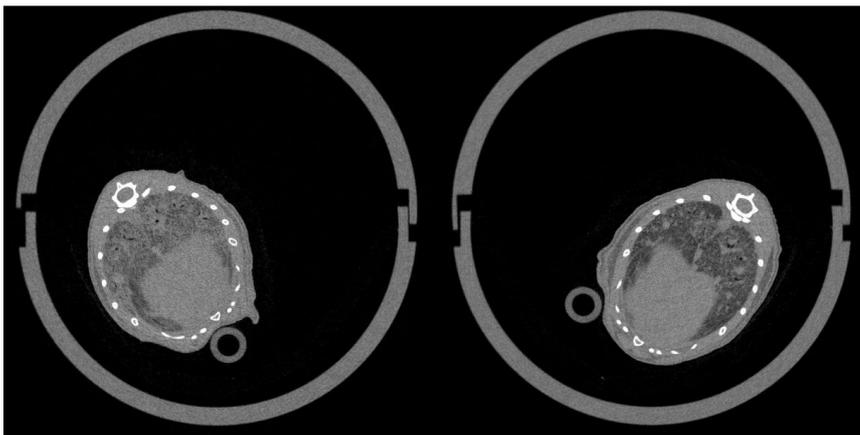
遺伝子変異特異的 siRNA (siDelEGFR2) は, 1nM では十分な効果を得ることは困難であった。また, EGFR を優位に抑制しても抗腫瘍効果の認められない siRNA (siEGFRB) も認められた。(図 2)



CDP-AD-PEG-Tf は肺がん細胞において良好な取り込みを確認できた。(図 3)



CDP-AD-PEG-Tf で EGFR siRNA をナノ粒子化し投与すると, EGFR トランスジェニックマウスでは粒状影が軽快した。(図 4)



xenograft モデルにおいては尾静脈投与を行ったが, 明確な縮小効果は得られなかった。また投与方法として皮下注射を選択した場合は腫瘍増殖抑制効果が認められた。PEG 抗体による検討で本研究ではナノ粒子化による siRNA 奏効率は, 腫瘍の EGFR 依存性と送達率に依存しているものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：40729092

(2)研究協力者

研究協力者氏名：Mark E Davis

ローマ字氏名：Mark E Davis

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。