

平成22年 3月31日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005年～2007年

課題番号：17016086

研究課題名（和文） アテロコラーゲン包埋法の応用

研究課題名（英文） Atelocollagen-mediated delivery of nucleic acid medicines

研究代表者

落谷孝広 (OCHIYA TAKAHIRO)

国立がんセンター（研究所及び東病院臨床開発センター）・研究所がん転移研究室・

独立室長

研究者番号：60192530

研究成果の概要（和文）：

有効かつ安全な核酸医薬によるがん治療法の実現に向けて開発したアテロコラーゲンとsiRNAやmicroRNAの複合体は、細胞に取り込まれやすいナノサイズの粒子径であり、生体内での核酸医薬の安定性に大きく寄与していること、さらにはヒト前立腺がんで顕著に発現増加している2つの標的遺伝子に対する抑制(siRNA)療法や、転移に伴って低下している事が判明したmicroRNA16の補充療法に有効である事を示した。以上の解析から、アテロコラーゲン包埋方法の応用は、microRNAにまでその効果が及ぶ事が示唆され、今後のnon-coding RNAによる制がん研究に本法は有用であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

RNA interference (RNAi) is a relatively a novel phenomenon of posttranscriptional gene silencing to regulate the expression of multiple genes involved in a wide range of biological processes. The gene-silencing technology via RNAi has also been developed into a commonly anti-cancer method. Furthermore, in vivo data indicate that small interfering RNAs (siRNAs and miRNAs) may be used to treat human diseases. However, the most challenging issue to a successful in vivo application is the development of a delivery system that can transport RNAi molecules into the tissues and/or the cells of interest. Also, the evaluation of RNAi potency in vivo is central for the selection of therapeutic siRNAs and miRNAs. In this study, the effects of atelocollagen-delivered siRNAs and miRNAs in live animals were monitored using bioluminescence imaging. Our study indicates the therapeutic potential of siRNA and miRNA in an animal model of cancer metastasis with systemic siRNA and miRNA injection and suggest that systemic delivery of RNAi could be used to treat advanced prostate cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	9,000,000	0	9,000,000
2006年度	9,000,000	0	9,000,000
2007年度	9,000,000	0	9,000,000
2008年度	9,000,000	0	9,000,000
2009年度	9,000,000	0	9,000,000
総計	45,000,000	0	45,000,000

研究分野：がん治療

科研費の分科・細目：

キーワード：アテロコラーゲン・デリバリー・核酸医薬・siRNA・miRNA・がん・転移

1. 研究開始当初の背景

開発の当時は、RNA 干渉によるがん治療の期待が大きく高まった背景があり、そのためには有効かつ安全な核酸医薬デリバリー方法が求められていた。本研究課題であるアテロコラーゲン包埋方法は、すでに平成16年度までに、その能力を主に遺伝子ベクターを用いて検証を重ねてきた経緯があり、核酸医薬に応用するための基礎が十分に出来上がっていた。そこで本計画研究では、siRNA や miRNA の動物個体へのデリバリーとがん治療への応用を計る上で、アテロコラーゲン DDS を応用する事にした。

2. 研究の目的

有効かつ安全ながんの遺伝子・核酸医薬による治療法の実現に向けて、アテロコラーゲン・デリバリーシステムによる生体内遺伝子発現制御法を開発した。この方法はバイオマテリアルの一種であるアテロコラーゲンをキャリアとして種々の治療外来遺伝子ベクターや核酸医薬を生体内で徐放し、ヌクレアーゼによる生体内分解から核酸を保護することで、遺伝子ベクターの欠点であった生体内での非制御性を改善し、ベクターの能力を最大限に発揮せしめる画期的な方法である。本研究の目的はこの独自の核酸医薬デリバリーを siRNA, microRNA などの RNA 干渉医薬に応用し、がん治療の新たな方法論に貢献する事である。

3. 研究の方法

siRNA と並んで、small RNA としてがんの発生や悪性度に深く係る microRNA が注目されているが、我々はすでに特定の microRNA が前立腺がんや乳がんの細胞株でその発現が低下していることを突き止めており、今後はそれらの microRNA をがん細胞に導入することにより、がんの形質を抑制することが可能かどうかを検討することが、がん治療への応用のキーポイントとなる。そこで、既に確立したイメージングモデルマウスを用いて、アテロコラーゲンによる microRNA のデリバリーが可能かどうかを詳細に検討する方策として、以下の計画を実行する。まず、特定の microRNA は、その標的となる遺伝子の 3' UTR 領域に結合し、その遺伝子の発現を抑制するという事実を根拠に、ヒト前立腺がん治療の標的候補となる microRNA が確実にターゲットとする遺伝子の 3' UTR 領域をレポーター遺伝子（ここでは例えばウミホタルルシフェ

ラーゼ)の下流に組み込んだコンストラクトを作製し、これをヒト前立腺がん細胞に導入する。この細胞に目的の microRNA がデリバリーされた場合にのみ、ウミホタルルシフェラーゼの発現が抑制されるため、そのフォトンの変化をイメージングで定量し、in vitro および in vivo おけるアテロコラーゲンによる microRNA のデリバリー効率を予測することが可能となる。この方策が奏功するかどうかは、まず in vitro の培養細胞の段階で検討し、そこで microRNA 導入による発光の減弱が観察されれば、動物個体レベルの実験に移行することとする。もしこの培養細胞の段階で期待した結果が得られないときは、コンストラクトの見直し、3' UTR として用いる標的遺伝子の再検討を行うこととする。

4. 研究成果

1) イメージングによるがん転移モデル動物の作製

アテロコラーゲン包埋法の応用として、核酸医薬のデリバリーを考える上で、その有効性を実証する動物モデルは重要である。これまでにルシフェラーゼを発現するヒトがん細胞株を樹立、それらを独自の工夫により動物に投与し、全身の骨に転移するヒト前立腺がん細胞、全身のリンパ節に転移するヒト乳がん細胞、腹膜内は種するヒト胃がん細胞等の系を作製し、それぞれのがんの転移をリアルタイムにイメージング可能な系を作製した。

2) がん転移部位への siRNA のデリバリー評価

まずヒト前立腺がん細胞の骨転移モデルにおいて、マウス全身の骨転移巣に siRNA を確実にデリバリー出来ているかどうかの評価系としてイメージング技術を応用することを計画した。この場合、がん細胞の転移や増殖自体には何ら影響を及ぼさないルシフェラーゼ遺伝子そのものを抑制する anti-luciferase siRNA をデザインした。この siRNA がアテロコラーゲン DDS によって腫瘍部位に到達していれば、イメージングによるルシフェラーゼのフォトン数が減弱するはずである。尾静脈から骨転移モデルマウスにアテロコラーゲンと anti-luciferase siRNA の複合体を投与後、24時間後にイメージング計測した結果、転移部位のフォトン数は90%以上も減弱していることが判明した。コントロール siRNA を投与したグループでは優位な変化は認められないことから、

アテロコラーゲンによるデリバリー方法は、siRNA を目的とする全身の骨転移巣へと確実に到達していることを証明した。

3) ヒト前立腺がんの骨転移モデルマウスを用いた RNAi 治療実験

このモデルマウスを用いて、実際に治療の候補標的遺伝子を検討した。前立腺がんの骨転移と関連の深い EZH2 と p110a の2つの候補に絞り、これらの治療効果をアテロコラーゲン DDS によって検討した結果、双方の siRNA は、骨転移を有意に抑制することが明らかとなった。さらに、siRNA とならんで small non-coding RNA としてがんの発生や悪性度に深く係るとされる microRNA についても検討を開始した。まず PC-3 を初めとする複数のヒト前立腺がん細胞株で、発現の変動している microRNAs を同定する作業を進めた。特に正常の前立腺組織に比較して発現の低下している microRNAs に絞り込み、培養細胞での増殖能やアポトーシス誘導能についての機能を評価し、治療効果を望めそうな2つの microRNA に的を絞った。骨転移モデル動物での予備的な実験結果では、アテロコラーゲンによる投与によって転移巣の腫瘍の縮小が認められているが、今後さらにマウスの匹数を増やして慎重に検討を進める予定である。

4) アテロコラーゲンによる siRNA の細胞内への取り込みに関する解析

アテロコラーゲンと siRNA の複合体は、細胞内へどのような方法で取り込まれているかを検証するために、pH-sensitive な蛍光色素を用いた取り込み実験を行った。この色素は、エンドサイトーシスによって取り込まれた場合、エンドソーム内の低 pH により、強い赤色発光を生ずる。まずアテロコラーゲンと蛍光色素を結合させ、siRNA を従来通りの方法で混合し、複合体を形成させた。この時点で発光は無いが、細胞へ導入した結果、24 時間程度で強い赤色発光を認めた。その発光部位は細胞質であり、明らかにエンドサイトーシスによる取り込みであろうと示唆された。

5) 研究成果のまとめ

これらのデリバリー技術や動物個体でのイメージング技術を用いて、RNA 干渉を利用したがん治療の戦略の実現に向けて、ヒト乳がん細胞や前立腺がん細胞の転移モデルを用いて、siRNA や microRNA の転移がん病巣への集積を検討した。まず、ルシフェラーゼを発現するヒト乳がんのリンパ節転移モデルを用いて、アテロコラーゲンとアンチ・ルシフェラーゼ siRNA の複合体を全身性に投与することで、乳房組織に移植したがん組織に効率よく導入され、なおかつルシフェラーゼの発現を 80% 以上も抑制した。また、前立腺がん細胞に、microRNA 16 の標的特異的配列である Bcl2 遺伝子の 3' UTR 配列を結合させたルシフェラーゼのコンストラクトを組み込

み、その細胞を用いて昨年度までに樹立した骨転移モデルを作成した。この動物に、アテロコラーゲンと複合体を形成させた microRNA16 を尾静脈から導入した結果、大腿骨などのがん転移部位のルシフェラーゼの発現が 60% 以上も抑制された。以上の研究成果は、アテロコラーゲンのデリバリー技術は、siRNA のみならず、microRNA をも、全身の腫瘍部位に導入するために有効な方法であることを強く示唆するものである。

6) 考察

本研究の目的の一つは、がん治療に有効なデリバリー方法の確立であり、アテロコラーゲン包埋法を核酸医薬である siRNA の生体内安定化と転移巣へのデリバリーに特化した方法として開発する点にある。これまでに、アテロコラーゲンは siRNA と静電的に結合し、その結合比はおそらく siRNA 1 分子に対してアテロコラーゲン 4-5 分子であり、直径が 100 nm 以下のナノ粒子であることを明らかにしてきた。さらにこの複合体が生体内で安定である性質を見いだしたことは、全身性に生体内に投与出来る可能性を広げるものであり、その後の尾静脈への投与による全身のがんの転移巣への siRNA のデリバリーに道を開いた。実証研究として、ヒト前立腺がんの骨転移モデルを開発し、複数の治療候補の siRNA の効果を検討するに至ったことは、一部本研究の目的を達成した成果である。この研究の過程で生じた問題点は、siRNA や miRNA のアテロコラーゲンによるデリバリーの効率を動物個体レベルでどのように評価すべきか、という点であったが、これもイメージング技術を利用することで、RNAi 核酸医薬の腫瘍へのデリバリーとその生物学的効果の発現を同時にモニター可能な系を確立するに至ったことは大きな進展となった。さらに、最近特に注目を集める microRNA のデリバリーと治療への応用の可能性を明らかにした点は非常に意義があると考えられる。

siRNA や microRNA によるがんの治療法開発には、がんの部位へ、それらの核酸医薬を確実にデリバリーする方法が求められる。アテロコラーゲン包埋法を siRNA に用いることで、その全身性のデリバリー能力を既に証明してきた。さらに microRNA のデリバリーにもアテロコラーゲン包埋法が応用可能であることが明らかになれば、がん治療分野での貢献は大であると言える。

我々のアテロコラーゲン包埋法は、すでに領域内外の研究者の手で用いられ、論文発表もなされてきた。本研究により、siRNA のみならず、microRNA のデリバリーにも有効であることが明らかになり、すでにがんの治療標的を絞っている場合には、その動物個体での validation に有効であると考えられる。

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 17 件)

- 1) Ochiya T, Honma K, Takeshita F, Nagahara S. Atelocollagen-mediated Drug Discovery Technology. *Expert Opin. Drug Discov.* 2: 159-167, 2007.
- 2) Honma K, Miyata T, Ochiya T. Type I collagen gene suppresses tumor growth and invasion of malignant human glioma cells. *Cancer Cell Int*, 7: 12, 2007
- 3) Matoba T, Orba Y, Suzuki T, Makino Y, Shichinohe H, Kuroda S, Ochiya T, Itoh H, Tanaka S, Nagashima K, Sawa H. An siRNA against JC virus (JCV) agnoprotein inhibits JCV infection in JCV-producing cells inoculated in nude mice. *Neuropathology.* 28: 286-294, 2008
- 4) Hokaiwado N, Takeshita F, Banas A, Ochiya T. RNAi-based drug discovery and its application to therapeutics. *IDrugs*, 11:274-278, 2008
- 5) Honma K, Iwao-Koizumi K, Takeshita F, Yamamoto Y, Yoshida T, Nishio K, Nagahara S, Kato K, Ochiya T. *RPN2* gene confers docetaxel resistance in breast cancer. *Nat Med*, 14:939-948, 2008
- 6) Takahashi R, Kanesashi S, Inoue T, Enomoto T, Kawano M, Tsukamoto H, Takeshita F, Imai T, Ochiya T, Kataoka K, Yamaguchi Y, Handa H. Presentation of functional foreign peptides on the surface of SV40 virus-like particles. *J Biotechnol*, 135:385-392, 2008
- 7) Nakajima TE, Yanagihara K, Takigahira M, Yasunaga M, Kato K, Hamaguchi T, Yamada Y, Shimada Y, Mihara K, Ochiya T, Matsumura Y. Antitumor effect of SN-38-releasing polymeric micelles, NK012, on spontaneous peritoneal metastases from orthotopic gastric cancer in mice compared with irinotecan. *Cancer Res*, 68:9318-9322, 2008
- 8) Ochiya T, Honma K, Takeshita F, Nagahara S. Optical imaging of RNAi-mediated silencing of cancer. *Proc of SPIE*, 6868, 2008
- 9) Yu D, Sekine E, Fujimori A, Ochiya T, Okayasu R. Down regulation of BRCA2 causes radio-sensitization of human tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Sci*, 99:810-815, 2008
- 10) Hokaiwado N, Takeshita F, Naiki-Ito A, Asamoto M, Ochiya T, Shirai T. Glutathione S-transferase Pi mediates proliferation of androgen-independent prostate cancer cells. *Carcinogenesis*, 29:1134-1138, 2008
- 11) Osaki M, Takeshita F, Ochiya T. MicroRNAs as biomarkers and therapeutic drugs in human cancer. *Biomarkers*, 13:658-670, 2008
- 12) Kosaka N, Sugiura K, Yamamoto Y, Yoshioka Y, Miyazaki H, Komatsu N, Ochiya T, Kato T. Identification of erythropoietin-induced microRNAs in haematopoietic cells during erythroid differentiation. *Br J Haematol*, 142:293-300, 2008
- 13) Honma K, Takemasa I, Matoba R, Yamamoto Y, Takeshita F, Mori M, Monden M, Matsubara K, Ochiya T. Screening of potential molecular targets for colorectal cancer therapy. *Int J Gen Med*, 2:243-257, 2009
- 14) Yamamoto Y, Kosaka N, Tanaka M, Koizumi F, Kanai Y, Mizutani T, Murakami Y, Kuroda M, Miyajima A, Kato T, Ochiya T. MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Biomarkers*, 14:529-538, 2009
- 15) Morita S, Hara A, Kojima I, Horii T, Kimura M, Kitamura T, Ochiya T, Nakanishi K, Matoba R, Matsubara K, Hatada I. Dicer is required for maintaining adult pancreas. *PLoS ONE*, 4:e4212, 2009
- 16) Takeshita F, Patrawala L, Osaki M, Takahashi R, Yamamoto Y, Kosaka N, Kawamata M, Kelnar K, Bader AG, Brown D, Ochiya T. Systemic delivery of synthetic microRNA-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol Ther*, 18:181-187, 2010
- 17) Tanooka H, Tatsumi K, Tsuji H, Noda Y, Katsube T, Ishii H, Ootsuyama A, Takeshita F, Ochiya T. Mutant mouse *p53* transgene elevates the chemical induction of tumors that respond to gene silencing with siRNA. *Cancer Gene Ther*, 17:1-10, 2010

[学会発表] (計 2 6 件)
(国外)

1. Ochiya T. RNAi-based therapeutics against cancer. RNAi World Congress 2008, Boston, USA
2. Ochiya T, Honma K, Takeshita F, Nagahara S. Optical imaging of RNAi-mediated silencing of cancer. Progress in Biomedical Optics and Imaging - SPIE 2008, San Jose, CA, USA
3. Yamamoto Y, Ochiya T. Global expression profiling of miRNA in liver development. FASEB Summer Research Conference, Colorado, USA
4. Ochiya T. Therapeutic potential of microRNA against cancer. The Right RNAi Meeting in 2008, Brussels, Belgium
5. Ochiya T and Takeshita F. Therapeutic potential of microRNA against cancer. MicroRNAi-meeting. RNAi World Congress Boston, USA. May 12-13, 2009
6. Ochiya T and Takeshita F. CRS (Controlled Release Society). Oligonucleotides delivery 36TH ANNUAL MEETING AND EXPOSITION OF THE CONTROLLED RELEASE SOCIETY, Copenhagen, Denmark. July 16-24, 2009
7. Ochiya T. RPN2 as a novel therapeutic target for cancer drug resistance. 9th Jenner Glycobiology and Medicine Symposium, Brussels, Belgium. September 12-18, 2009

(国内)

1. MicroRNAs AS THERAPEUTIC TARGETS: POTENTIAL EFFECT ON PROSTATE CANCER MANAGEMENT. Takahiro Ochiya 第 14 回日本遺伝子治療学会総会 (2008. 6. 13-15 札幌)
2. 幹細胞の持つ肝細胞分化能と肝疾患治療 RNAi によるがんの予防・診断・治療 (シンポジウム)、落谷孝広、第 36 回薬物活性シンポジウム (2008. 10. 23-25 徳島)
3. RNAi-mediated silencing of cancer. Takahiro Ochiya. 第 67 回日本癌学会学術総会 (2008. 10. 28-30 名古屋)
4. Identification of MicroRNAs Involved in Drug Resistance in Human Breast Cancer Cell Lines. Fumitaka Takeshita, Yusuke Yamamoto, Kaho Minoura, Ryou-u Takahashi, Nobuyuki Kosaka, Kimi Honma, Takahiro Ochiya. 第 67 回日本癌学会学術総会 (2008. 10. 28-30 名古屋)
5. Detection of lung metastasis-related microRNA in human osteosarcoma cell. Mitsuhiro Osaki, Fumitaka Takeshita, Hisao Ito, Mitsuo Oshimura, Takahiro Ochiya. 第 67 回日本癌学会学術総会 (2008. 10. 28-30 名古屋)
6. The inhibition of human prostate cancer cells on bone-metastatic site by treatment with miR-16. Ryou-u Takahashi, Fumitaka Takeshita, Takahiro Ochiya. 第 67 回日本癌学会学術総会 (2008. 10. 28-30 名古屋)
7. Identification and characterization of a novel tumor suppressor gene on chromosome arm 18q in human pancreatic cancer. Satoru Yokoyama, Fuyuhiko Motoi, Hideo Ohtsuka, Masaharu Ishida, Nobukazu Tsukamoto, Naoyuki Kaneko, Shinichi Egawa, Michiaki Unno, Toru Furukawa, Makoto Sunamura, Takahiro Ochiya, Akira Horii. 第 67 回日本癌学会学術総会 (2008. 10. 28-30 名古屋)
8. Development of a mouse model for suppression of peritoneal metastasis for diffuse-type gastric cancer. Takeshi Fujita, Fumitaka Takeshita, Kazuyoshi Yanagihara, Hiroyuki Ohta, Tomoko Mabuchi, Kazuhiko Aoyagi, Takeo Fukagawa, Hitoshi Katai, Takeshi Sano, Takahiro Ochiya, Teruhiko Yoshida, Hiroki Sasaki. 第 67 回日本癌学会学術総会 (2008. 10. 28-30 名古屋)
9. Potential of miRNA as cancer diagnosis and a target for therapy. Takahiro Ochiya. 第 67 回日本癌学会学術総会 (2008. 10. 28-30 名古屋)
10. Highly efficient microRNA delivery to tumor metastasis. Takahiro Ochiya. 第

67 回日本癌学会学術総会 (2008. 10. 28-30 名古屋)

11. ヒト乳がん細胞株における薬剤抵抗性に関与する miRNA の同定. 高橋陵宇, 竹下文隆, 山本雄介, 箕浦加穂, 田谷敏貴, 小坂展慶, 落谷孝広. 第 31 回日本分子生物学会 (2008. 12. 9-12 神戸)
12. ヒト骨肉腫細胞における肺転移関連マイクロ RNA の検出. 尾崎充彦, 竹下文隆, 小坂展慶, 井藤久雄, 押村光雄, 落谷孝広. 第 31 回日本分子生物学会 (2008. 12. 9-12 神戸)
13. 「micro RNA as a Novel Modality for Cancer Therapy」、落谷孝広、第 2 回 DKFZ-NCC Workshop on Cancer Research Tokyo (2009. 7. 7-9 がんセンター研究所)
14. 「核酸デリバリーが拓く non-coding small RNA による疾患解明」、落谷孝広、遺伝子・デリバリー研究会 第 9 回シンポジウム (2009. 7. 9-11 大阪)
15. 「microRNA によるがんの診断治療」、落谷孝広、第 1 回日本 RNAi 研究会 (2009. 8. 28-29 広島大学)
16. 「マイクロ RNA によるがんの診断と治療」、落谷孝広、第 68 回日本癌学会学術総会 (がんにおける microRNA 制御異常シンポジウム/講演) (2009. 10. 1-3 横浜)
17. 「RPN2 による糖鎖修飾を介した薬剤耐性、浸潤転移の制御機構」、落谷孝広、第 82 回日本生化学会学会 (/講演) (2009. 10. 21-25 神戸)
18. 「 RNAi-based oligonucleotides therapy」、落谷孝広、Kashiwa Symposium on Cancer Biology 2009 (2009. 11. 13 がんセンター東病院)
19. 「microRNA による Cancer Stem Cell Therapy の可能性」、落谷孝広、第 32 回日本分子生物学会 (/講演) (2009. 12. 9-12 横浜)

[図書] (計 1 件)

Takeshita F, Hokaiwado N, Honma K, Banas A, Ochiya T. Local and systemic delivery of siRNAs for oligonucleotide therapy. In: Sioud M (ed), siRNA and miRNA Gene Silencing. USA, Humana Press, pp 83-92, 2009

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称：核酸導入を促進させる方法
発明者：落谷孝広、寺田雅昭、阿蘇雄
権利者：大日本住友製薬株式会社、株式会社高研
種類：新規発明特許
番号：特許第 4081436 号

出願年月日：平成 20 年 2 月 15 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/15meta/15meta.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

落谷孝広 (国立がんセンター (研究所及び東病院臨床開発センター)・研究所がん転移研究室)

研究者番号：60192530

(2) 研究分担者

竹下文隆 (国立がんセンター (研究所及び東病院臨床開発センター)・研究所がん転移研究室)

研究者番号：40466199

石川哲也 (国立がんセンター (研究所及び東病院臨床開発センター)・研究所がん転移研究室)

研究者番号：90398743