

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19590

研究課題名(和文) マイクロRNAによる新規免疫チェックポイント阻害療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel immune checkpoint inhibitor therapy by microRNAs

研究代表者

尾野 亘(ONO, KOH)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00359275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、これまでに循環器疾患を中心としたmicroRNAの働きについて検討してきた。今回、免疫チェックポイントタンパク質のPD-1, PD-L1, CD80がmiR-15ファミリー(miR-15a/ 15b/ 16/ 195/ 424/ 497/ 503)によって制御されていることを見いだした。2本鎖RNAの生体内への投与によりmiR-15aのがん組織への「局所」導入による新規治療法の開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究の中で、生体におけるmicroRNAの働きを明らかにしてきた。さらに効果的なmiRNAの標的となる分子を探索していたところ、免疫チェックポイントタンパク質のPD-1, PD-L1, CD80がmiR-15ファミリー(miR-15a/15b/16/195/424/497/503)によって制御されていることを見いだした。すなわち、miR-15ファミリーを発現させることで、PD-1およびCTLA-4経路の両方を同時に抑制できることになる。本研究においては、miR-15aファミリーをがんの局所に導入して、免疫チェックポイント抑制による新規がん治療法の開発を試みた。

研究成果の概要(英文)：We have been focused on the functions on microRNAs mainly in cardiovascular field. This time, we have noticed that PD-1, PD-L1, and CD80 are regulated by miR-15a/ 15b/ 16/ 195 / 424/ 497/ 503 family. Therefore, we tried to develop a method to express miR-15a by the use of synthetic double strand RNAs with drug delivery system.

研究分野：循環器内科学

キーワード：PLGAナノ粒子 核酸医薬

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、がんの新たな治療法として、がん免疫療法が脚光をあびている。その契機となったのは、抗 PD-1(programmed death 1)抗体および抗 CTLA-4 (cytotoxic T -lymphocyte -associated antigen 4) 抗体ががんの治療薬として承認されたことである。いずれの医薬品も、体に備わる免疫系を操作し、がんを排除する免疫力を強化することによりがんを治療する。

腫瘍の局所ではキラーT細胞およびナチュラルキラー細胞が PD-1 を高く発現しており、これががん細胞に発現する PD-L1 や PD-L2 と相互作用することが、抗腫瘍免疫応答の減弱の原因とされている。この PD-1 シグナルを抗 PD-1 抗体あるいは抗 PD-L1 抗体を使用して阻害し、抗腫瘍免疫応答の減弱を抑制することにより、その増強効果が得られることが推察されている(Hirano et al. Cancer Res 2005)。また、悪性黒色腫自体に PD-1 が発現し、その増殖を助けているとの報告もある(Baruch-K et al. Nat Med 2016)。一方、活性化した T 細胞の表面には CTLA-4 が発現し、CD80 あるいは CD86 と相互作用して T 細胞機能が抑制される。この抑制を解除するのが抗 CTLA-4 抗体の作用機序である(Leach et al. Science 1996)。

我々は、これまでに循環器疾患、代謝性疾患を中心とした miRNA の働きについて詳細に検討してきた。

それらの研究の中で、miRNA を効果的に増加あるいは低下させて治療に応用する方法を開発してきた。幅広い分野において、さらに効果的な miRNA の標的となる分子を探索していたところ、PD-1、PD-L1、CD80 が miR-15 ファミリー(miR-15a/ 15b/ 16/ 195/ 424/ 497/ 503)によって制御されていることを見いだした(図1)。すなわち、miR-15a ファミリーを発現させることで、PD-1 および CTLA-4 経路の両方を同時に抑制できることになる。

### 2. 研究の目的

我々は、PD-1、PD-L1、CD80 が miR-15 ファミリー(miR-15a/15b/16/195/424/497/503)によって制御されていることを見いだした。特に、ヒト PD-1 遺伝子の 3'UTR には miR-15a ファミリーの結合配列が 8 箇所あり、CD80 には 4 箇所存在するなど、非常にそれらの関係性が高いことが示唆される。そこで今回、miR-15a ファミリーを腫瘍局所に導入し、PD-1 および CTLA-4 経路の両方を同時に抑制する治療法を開発する。すでに、miR-15a の導入によりヒト卵巣がん由来 Skov3 細胞と T 細胞共培養系において、T 細胞からの TNF- $\alpha$ 、INF- $\gamma$ 、IL-2 の分泌が上昇し、さらに同共培養系で生じる CD8+T 細胞のアポトーシスを miR-15a が減少させることも確認している。また、これまでに 2 本鎖 RNA を PLGA ナノ粒子に含有させ、生体の局所に導入する方法の開発にも成功している。

今回、がんの局所に miR-15a を発現する 2 本鎖 RNA を導入することで、がんを抑制する新規治療法を開発を行う。これは局所でのがん免疫を高めるため、自己免疫疾患の発症の危険性は極めて低いと考えられる。また、上記抗体療法との併用も可能である。

また、抗 PD-1 抗体の投与によりインターフェロン  $\gamma$  依存性の全身の免疫反応が活性化され、脳へのマクロファージの遊走が増え、アミロイド  $\beta$  が減少してアルツハイマー病に効果を示すなど、免疫系の賦活化によるがん以外の生体への効果も期待できる。この点についても詳細に検討する。

具体的検討項目は以下の 3 点である

I. 合成核酸徐放化を用いた RNA デリバリーシステムの開発

II. miR-15a を発現する合成核酸の徐放化を用いた免疫チェックポイント阻害療法の開発

III. miR-15a 発現 2 本鎖 RNA 含有 PLGA ナノ粒子の他の効果の検討

### 3. 研究の方法

I. 合成核酸徐放化を用いた RNA デリバリーシステムの開発

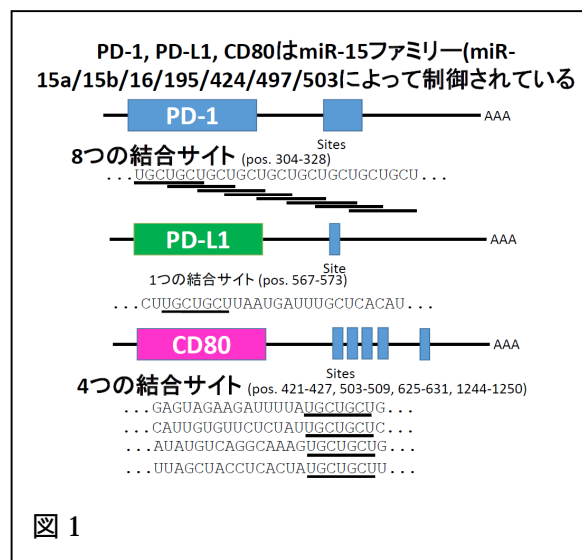
乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA) ナノ粒子を用いた二本鎖 RNA の投与方法を確立する。

II. miR-15a を発現する合成核酸の徐放化を用いた免疫チェックポイント阻害療法の開発

miR-15a 発現 2 本鎖 RNA 含有 PLGA ナノ粒子を用いて、生体内でのがんの治療に対する検討を行う。

III. miR-15a 発現 2 本鎖 RNA 含有 PLGA ナノ粒子の他の効果の検討

これまでに、アルツハイマー病に対して、抗 PD-1 抗体の効果が報告されている。アルツハイ



マーモデル、あるいは動脈硬化モデルに対する上記 RNA の効果についても検討を行う。

#### 4 . 研究成果

##### I. 合成核酸徐放化を用いた RNA デリバリーシステムの開発

安全で、副作用のない治療応用へ向けて、標的臓器局所での miRNA 制御法を開発する。miRNA の過剰発現には図 2 のような 2 本鎖 RNA を用いた。

まず、

1) miR-15a のアンチセンス鎖にコレステロールを結合させ、細胞膜透過性を恒常させた。  
2) インターフェロン応答やプロテインキナーゼ R の活性化を生じないように、22 塩基の miR-15a の両端に塩基を付加し、27 塩基の 2 本鎖として、合成 RNA を設計した。

3) miR-15a のセンス鎖の 21 塩基部分が分解を受けにくいように、ホスホロチオエート化した。

さらに、生体において、これらの合成 RNA を局所で効率よく発現させるために、乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA) ナノ粒子を応用した (図 3)。

まず、培養細胞を用いた実験において、合成 2 本鎖 RNA の添加により細胞内 miR-15a の発現が上昇すること、標的遺伝子の発現低下を確認した。また、ウサギにおいて PLGA ナノ粒子による 2 本鎖 RNA の投与を行ったところ、2 週間の徐放化が可能であった。

##### II. miR-15a を発現する合成核酸の徐放化を用いた免疫チェックポイント阻害療法の開発

局所でのがん免疫を高めるため、自己免疫疾患の発症の危険性は低いと考えられる。また、抗体療法との併用も可能である。miR-15a 発現 2 本鎖 RNA 含有 PLGA ナノ粒子を用いて、生体内でのがんの治療に対する効果を検討中である。

##### III. miR-15a 発現 2 本鎖 RNA 含有 PLGA ナノ粒子の他の効果の検討

抗 PD-1 抗体の投与によりインターフェロン 依存性の全身の免疫反応が活性化され、脳へのマクrophage の遊走が増え、アミロイド が減少してアルツハイマー病に効果を示すなど、免疫系の賦活化によるがん以外の生体への効果も期待できる。アルツハイマーモデル、および動脈硬化モデルに対する上記 RNA の効果についても検討を行っている。

#### 5 . 主な発表論文等

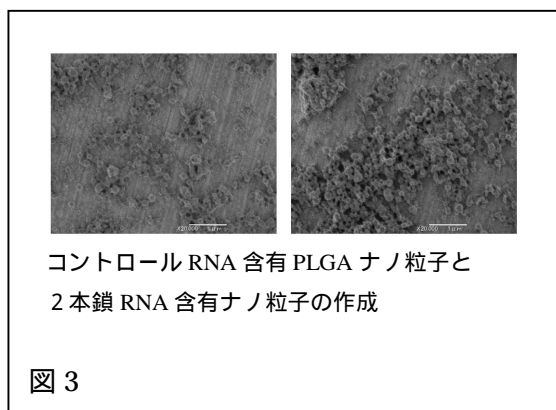
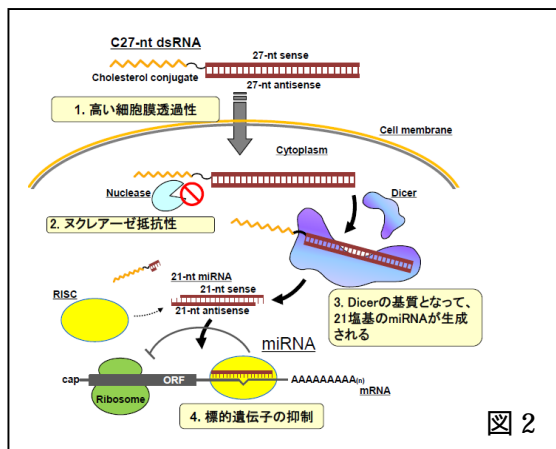
[雑誌論文](計 7 件)

1: Nakazeki F, Tsuge I, Horie T, Imamura K, Tsukita K, Hotta A, Baba O, Kuwabara Y, Nishino T, Nakao T, Nishiga M, Nishi H, Nakashima Y, Ide Y, Koyama S, Kimura M, Tsuji S, Naitoh M, Suzuki S, Izumi Y, Kawarai T, Kaji R, Kimura T, Inoue H, Ono K. MiR-33a is a therapeutic target in SPG4-related hereditary spastic paraplegia human neurons. Clin Sci (Lond). 2019 Feb 22;133(4):583-595. doi:10.1042/CS20180980. Print 2019 Feb 28. PubMed PMID: 30777884. (査読あり)

2: Hakuno D, Kimura M, Ito S, Satoh J, Nakashima Y, Horie T, Kuwabara Y, Nishiga M, Ide Y, Baba O, Nishi H, Nakao T, Nishino T, Nakazeki F, Koyama S, Hanada R, Randolph RR, Endo J, Kimura T, Ono K. Hepatokine  $\alpha$ 1-Microglobulin Signaling Exacerbates Inflammation and Disturbs Fibrotic Repair in Mouse Myocardial Infarction. Sci Rep. 2018 Nov 13;8(1):16749. doi: 10.1038/s41598-018-35194-w. PubMed PMID: 30425314; PubMed Central PMCID: PMC6233179. (査読あり)

3: Nishino T, Horie T, Baba O, Sowa N, Hanada R, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Nishi H, Nakashima Y, Nakazeki F, Ide Y, Koyama S, Kimura M, Nagata M, Yoshida K, Takagi Y, Nakamura T, Hasegawa K, Miyamoto S, Kimura T, Ono K. SREBF1/MicroRNA-33b Axis Exhibits Potent Effect on Unstable Atherosclerotic Plaque Formation In Vivo. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2018 Oct;38(10):2460-2473. doi: 10.1161/ATVBAHA.118.311409. PubMed PMID: 30354203. (査読あり)

4: Nakazeki F, Nishiga M, Horie T, Nishi H, Nakashima Y, Baba O, Kuwabara Y, Nishino T, Nakao T, Ide Y, Koyama S, Kimura M, Tsuji S, Sowa N, Yoshida S, Conway SJ, Yanagita M, Kimura T, Ono K. Loss of periostin ameliorates adipose tissue inflammation and fibrosis in vivo. Sci Rep. 2018 Jun



4;8(1):8553. doi:10.1038/s41598-018-27009-9. PubMed PMID: 29867212; PubMed Central PMCID: PMC5986813. (査読あり)

5: Baba O, Horie T, Nakao T, Hakuno D, Nakashima Y, Nishi H, Kuwabara Y, Nishiga M, Nishino T, Ide Y, Nakazeki F, Koyama S, Kimura M, Hanada R, Kawahara M, Kimura T, Ono K. MicroRNA 33 Regulates the Population of Peripheral Inflammatory Ly6C(high) Monocytes through Dual Pathways. *Mol Cell Biol*. 2018 Jun 28;38(14). pii: e00604-17. doi: 10.1128/MCB.00604-17. Print 2018 Jul 15. PubMed PMID:29712758; PubMed Central PMCID: PMC6024165. (査読あり)

6: Ono K, Kuwabara Y, Horie T, Kimura T. Long Non-Coding RNAs as Key Regulators of Cardiovascular Diseases. *Circ J*. 2018 Apr 25;82(5):1231-1236. doi: 10.1253/circj.CJ-18-0169. Epub 2018 Mar 10. PubMed PMID: 29526985. (査読あり)

7: Tsumaru S, Masumoto H, Minakata K, Izuhara M, Yamazaki K, Ikeda T, Ono K, Sakata R, Minatoya K. Therapeutic angiogenesis by local sustained release of microRNA-126 using poly lactic-co-glycolic acid nanoparticles in murine hindlimb ischemia. *J Vasc Surg*. 2018 Oct;68(4):1209-1215. doi: 10.1016/j.jvs.2017.08.097. Epub 2017 Dec 11. PubMed PMID: 29242072. (査読あり)

〔学会発表〕(計 21 件)

1: 2nd International Symposium for Noncoding RNA Neo-taxonomy In conjunction with Tokyo RNA Club 23rd meeting Monday, 26th June 2017 Takeda Hall, University of Tokyo 「Roles of microRNAs in cardiovascular diseases」 Koh Ono

2: 43rd Naito Conference Noncoding RNA : Biology, Chemistry, & Diseases June 27-30, 2017 CHÂTERAISÉ Gateaux Kingdom SAPPORO, Japan. Ono K, Nishino T, Horie T, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Ide Y, Nakazeki F, Koyama S, Kimura M, Kimura T. MicroRNA-33b promotes atherosclerotic plaque formation in Apoe<sup>-/-</sup> mice.

3: 平成 29 年 8 月 10 日 第 9 回大動脈分子病態研究会 久留米大学 築水ホール Genetic Ablation of MicroRNA-33 Attenuates Inflammation and Abdominal Aortic Aneurysm Formation via Several Anti-inflammatory Pathways 尾野 亘

4: 平成 29 年 9 月 9 日 第 51 回河口湖心臓討論会 グランドニッコー東京台場 Functions of non-codingRNAs in cardiovascular diseases 尾野 亘

5: 平成 29 年 10 月 14 日 第 21 回 日本心不全学会 シンポジウム 13 「心肥大・心不全に関わる長鎖非コード RNA の解明」 尾野 亘 秋田キャッスルホテル

6: American Heart Association Scientific Sessions 2017, Nov 11-15, Anaheim. Nishino T, Horie T, Kuwabara Y, Nakao T, Nishiga M, Ide Y, Nakazeki F, Koyama S, Kimura M, Kimura T, Ono K: MicroRNA-33b promotes atherosclerotic plaque formation in Apoe<sup>-/-</sup> mice. USA

7: 平成 30 年 1 月 7 日 第 1 回日本循環器学会基礎研究フォーラム Invited lecture 4 「A Novel Long Intergenic Noncoding RNA, LincRNA-Hy5, Underlies the Heart Development and Guards the Heart from Pressure Overload」 尾野 亘 品川インターシティホール

8: 2018 年 3 月 23-25 日 第 82 回日本循環器学会 大阪 Kuwabara Y, Horie T, Baba O, Nishiga M, Nakao M, Nishino T, Nakazeki F, Koyama S, Kimura T, Ono K. Novel Long Intergenic Noncoding RNA, Lionheart, Guards the Heart from Pressure Overload

9: 2018 年 3 月 23-25 日 第 82 回日本循環器学会 大阪 Nishino T, Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Hakuno D, Nakashima Y, Nakao T, Nishiga M, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33b promotes atherosclerotic plaque formation in Apoe<sup>-/-</sup> mice

10: 2018 年 3 月 23-25 日 第 82 回日本循環器学会 大阪 Nakao T, Horie T, Baba O, Nishiga M, Nakao M, Nishino T, Nakazeki F, Koyama S, Kimura T, Ono K. Mir-33a-5p is up-regulated at the central zone of human abdominal aortic aneurysm and its deletion ameliorates mouse model.

11: 平成 30 年 5 月 23 日 Future Pharmacotherapy for Atherosclerosis: Basic Science for the Clinician. 23rd Annual Scientific Meeting of the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy, SREBF1/MicroRNA-33b axis exhibits potent effect on unstable atherosclerotic plaque formation in vivo. Koh Ono, Rits Carton Kyoto

12: 平成 30 年 6 月 11 日 XVIIIth International Symposium on Atherosclerosis. SREBF1/MicroRNA-33b axis exhibits potent effect on unstable atherosclerotic plaque formation in vivo. Koh Ono, Toronto, Canada

13: 平成 30 年 6 月 14 日 第 60 回 日本老年医学会 教育講演 3 「高齢者の急性心事故」 尾野 亘 国立京都国際会議場

14: 平成 30 年 7 月 13 日 第 50 回日本動脈硬化学会総会・学術集会 Cutting-Edge Symposium 8 「SREBF1/MicroRNA-33b axis は不安定プラークの形成に重要である」 尾野 亘 大阪国際会議場

15: 平成 30 年 8 月 30 日 China-Japan International Conference on Atherosclerosis 2018

16: ' Functions of microRNA-33a/b on inflammation and atherosclerosis ' Koh Ono, 西安建国飯店、西安、中国

17: 平成 30 年 9 月 9 日 第 66 回日本心臓病学会 トピック 7 「マイクロ RNA と心血管疾患、代謝性疾患」、尾野 亘、大阪国際会議場

- 18: 平成 30 年 10 月 25 日 第 59 回日本脈管学会総会 特別企画 1 「MicroRNA-33 の欠損は複数の抗炎症経路を介して大動脈瘤の形成を抑制する」 尾野 亘、広島グランピアホテル
- 19: 平成 31 年 2 月 27 日 新学術領域研究 ノンコーディング RNA ネオタクソノミ 班会議 尾野 亘 「非コード RNA の循環器疾患における役割」 東大武田会館
- 20: 平成 31 年 3 月 30 日 第 83 回 日本循環器学会学術集会 横浜 シンポジウム 14 非コード RNA とエピジェネティクス 尾野 亘 「A Novel Long Intergenic Noncoding RNA, Lionheart, Protects the Heart from Pressure Overload」
- 21: 平成 31 年 3 月 30 日 第 83 回 日本循環器学会学術集会 横浜 Horie T, Koyama S, Nishino T, Nakao T, Nishiga M, Kimura T, Ono K. The identification of differential roles of microRNA-33a and -33b during atherosclerosis progression with genetically modified mice

〔産業財産権〕

○出願状況(計 1 件)

名称：遺伝性痙性対麻痺(Hereditary Spastic Paraplegia; HSP)SPG4

発明者：井上治久、尾野亘、今村 恵子、堀江貴裕、中関 典子

権利者：京都大学

種類：

番号：特願 2018-119251

出願年：2018 年

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

[kyoto-u-cardio.jp/kisokenkyu/metabolic/](http://kyoto-u-cardio.jp/kisokenkyu/metabolic/)

## 6 . 研究組織

### (1)研究協力者

研究協力者氏名：出原正康

ローマ字氏名：Izuhara Masayasu

研究協力者氏名：Randolph Ruiz Roriguez

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。