

令和 3 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H04059

研究課題名（和文）EPR増強剤 iNaDを用いた革新的医療技術の開発

研究課題名（英文）Development of innovative nucleic acid medicine using EPR enhancer iNaD

研究代表者

山本 浩文（Yamamoto, Hirofumi）

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30322184

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 34,500,000円

研究成果の概要（和文）：核酸医薬の普及にはDDS(ドラッグデリバリーシステム)が鍵を握る。本研究ではこれまでマウス疾患モデルで効果を示したスーパーアパタイトの問題点である腫瘍集積性の向上と正常臓器への副作用を回避した新しいヒト用デリバリーシステムであるiNaD (inorganic nanoparticle device)の開発を進める。また癌や臓器線維症などの難治性疾患の克服のために新たな核酸医薬を創出する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト用のDDSであるiNaDによって、既存のスーパーアパタイトに比べてマウス腫瘍への集積は大幅に向上した。一方、iNaDでは既存のDDS共通の問題点である肝臓へのデリバリーはほとんどなく、副作用の低減に寄与する。iNaDの大量生産を行いラットを用いた実験では標準投与量の50倍以上を安全に投与できたので、今後サルへの投与を行う。新しい核酸医薬であるmiR-4711は大腸癌、膵癌の癌幹細胞に対する特効薬として期待される。本研究の結果は、難治性疾患に対する治療法創造の道筋をつけるものであり、学術的、社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Drug delivery system (DDS) is key factor for successful realization of nucleic acid (NA) medicine, especially when siRNA and microRNA are employed. We have demonstrated that the super apatite delivery system provided successful treatment using siRNA and microRNA in various mice models, including cancer, inflammatory bowel disease and infectious disease. In this project, we go on developing a novel DDS, iNaD (inorganic nanoparticle device) which enables improved tumor accumulation of NA and avoidance of adverse events in normal organs. At the same time we tried to develop novel nucleic acid medicine for refractory diseases. Mir-4711 was a major product which targets KLF5, MDM2 and DP1 and exhibited inhibition of cancer stemness in colon and pancreatic cancer cells. Development of other products are also underway against hepatocellular carcinoma, lung cancer, breast cancer, esophageal cancer, ovarian cancer, biliary tract cancer and so on.

研究分野：核酸医薬、消化器癌の診断と治療

キーワード：癌幹細胞 DDS microRNA

## 1. 研究開始当初の背景

抗体医薬に続く新しい治療法として核酸医薬が期待されてきた。しかし、siRNA や microRNA などの核酸医薬は標的 RNA への直接作用や翻訳阻害を通じて個々の分子に対して切れ味のよい発現抑制効果を示すが、生体内ではその有効性は大幅に限定される。リポソームやミセルなどの従来キャリアは肝臓や腎臓への薬剤の送達には適しているが、癌組織への核酸の送達には実用的な DDS はほとんど存在しない。核酸医薬が腫瘍で効果を発揮するためには、血中安定性、肝臓・脾臓、腎臓で消費されないこと、間質の壁を速やかに通り抜けること、癌細胞への高い取り込み、速やかに細胞質全体に拡散すること、などの諸問題をクリアする必要がある。特に、固形癌では高い間質圧(間質液圧)によって粒子が腫瘍細胞まで辿り着くことを阻んでいる。またフィブリンクロットによる塞栓や腫瘍による血管圧迫による血流の不均一性も改善の必要がある。申請者はスーパーアパタイト(sCA: super carbonate apatite)ナノ粒子を DDS として癌や炎症性疾患に対する核酸治療法を開発してきた。sCA は悪性腫瘍のみならず、マウス炎症腸管の粘膜固有層に存在する樹状細胞(DC: dendritic cell)に効率よく核酸を送達できることをこれまでに報告してきた。その結果、樹状細胞から分泌される IL6, IL23 が減少し、naïve T cell から炎症性 Th17 への分化が阻止されて、マウスの DSS 腸炎の予防に成功している。このような免疫細胞ターゲティング技術は、世界でも例のない独自性があり、同じく樹状細胞やマクロファージが病態の発症に主たる役割を演じる肝線維症や肺線維症においても、新薬開発の創造性を賦与する。本研究では、核酸医薬を取り巻く諸問題をクリアした上で、現在治療法のない悪性腫瘍や臓器線維症に対してどのような核酸が最適の治療薬となるのかという問いに答える。またマウス用の DDS からヒト用へと進化させた新しい DDS である iNaD(inorganic nanoparticle device)の大量生産化への問題を解決する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、現在有効な治療法のない難治性癌、臓器線維症に対しての核酸医薬を創出すること、sCA の EPR(Enhanced Permeability and Retention)増強作用を利用して癌の低侵襲治療および各種の抗腫瘍物質との併用療法を確立すること、既存の DDS 共通の問題であった肝集積を解決した次世代型 DDS である iNaD (inorganic nanoparticle drug)を GLP グレードに仕立て前臨床試験への橋渡しとする、ことを目的とする。また核酸医薬を適した患者さんに投与するためにコンパニオン感受性試験系を確立して組織細胞バンクを作る。

## 3. 研究の方法

### (1) 癌に対する核酸医薬の創出

①正常細胞と比べて癌細胞で発現減少する microRNA を RNAseq や Microarray によって網羅的に探索し、文献的にこれまでに報告がなくかつ強力な抗腫瘍効果を有する microRNA を同定する。

②標的分子を先に決め、これを含めて複合的に相加的な抗腫瘍効果を示す microRNA を同定する。MicroRNA の多分子制御を利用したアプローチである。

### (2) 臓器線維症に対する核酸医薬の創出

①肺線維症に対するマウスモデルを作成する。線維化肺を採取し、microRNA、siRNA 探索を行う。両者の組み合わせから治療に有効な microRNA を同定する。

②肝線維症も同様のアプローチを進める。

### (3) 抗癌剤、光感受性物質の効果増強

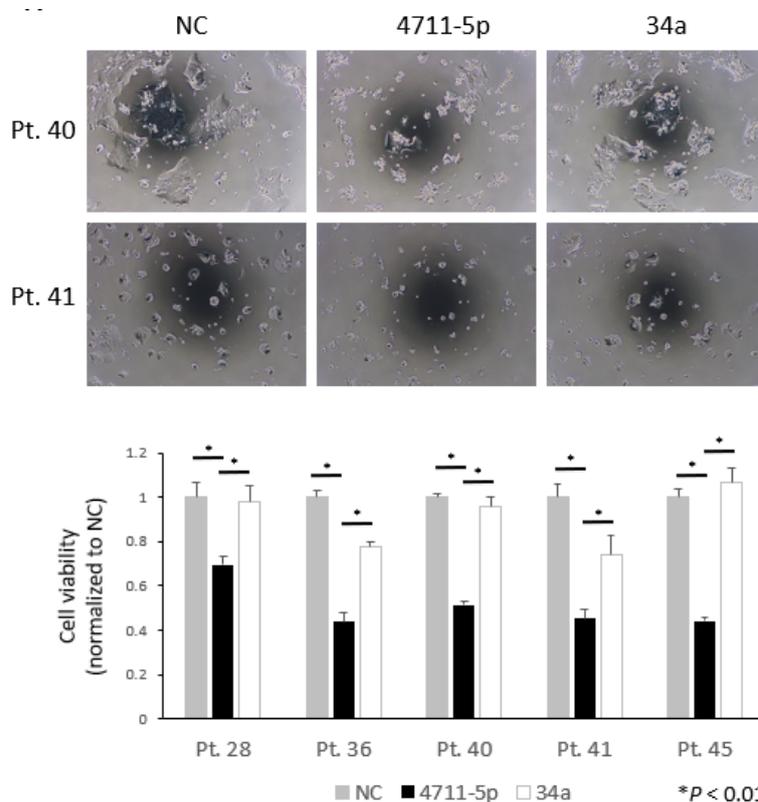
P-THP、P-ZnPP を担癌マウスに i. v. し、IVIS で腫瘍集積を測定する。sCA を併用することで腫瘍集積の増強効果を調べる。P-THP では併用による抗腫瘍効果の増強を、P-ZnPP では光治療の効果増強効果を検討する。磁性造影剤と sCA を併用して電磁波照射をした時の効果について

検討する。

(4) ヒト用 DDS iNaD 製造の最適化をはかる。

#### 4. 研究成果

(1) 大腸癌、膵癌に対する新規核酸医薬として miR-4711 を同定した。miR-4711 は癌幹細胞関連遺伝子 KLF5、癌抑止遺伝子 p53 を阻害する MDM2, 細胞周期進行に働く E2F のヘテロダイマーである DP1 を標的としてこれらの分子発現を低下させる。その結果、癌幹細胞性を抑制し、細胞周期遅延、アポトーシスの増加をもたらすことで複合的に強い抗腫瘍効果を発揮する。大腸癌切除組織からスフェロイド培養を行いマウス腫瘍を経由して、癌幹細胞を含む二次元培養展開する系を確立できた。通常、初代培養では線維芽細胞が混在し、腫瘍細胞は退縮してゆくが、特殊な方法で癌幹細胞を混じた細胞セットを作ることに成功し、凍結保存した後も再生利用できることから各種の核酸医薬の感受性試験が可能となった。miR-4711 は大腸癌患者サンプル由来の癌細胞培養系で抗腫瘍 miR として知られる miR-34a よりも強い抗腫瘍効果を示した(図1)。現在、大腸癌細胞のバンク化を進めている。



(図1)大腸癌の臨床サンプル5症例から腫瘍細胞を培養し、miR-4711とmiR-34aの抗腫瘍効果(増殖抑制)をトランスフェクション後72時間で検討した。miR-4711は強い抗腫瘍効果を示した。

- (2) 胆管癌、肺癌、食道癌、乳癌について新たに Microarray, または microRNAseq を行い、正常細胞に比べて発現低下する microRNA セットを同定した。種々検討し、新規の治療的 microRNA の絞り込みを進めている。
- (3) 肝細胞癌に対して sCA-CpG 核酸の治療は CpG 単独に対して強い抗腫瘍効果を有することを in vivo 担癌マウス実験で示した。
- (4) 糖部架橋型人工核酸 (bridged nucleic acids) BNA 技術により相補鎖核酸に対して高い親和性を獲得した Bcl2 アンチセンスを 300 種類以上デザインし、この中から濃度依存的にノックダウン効果が高い配列ひとつに絞り込んだ。この配列を用いて胃癌細胞 MKN45 でシスプラチンとの併用効果を確認した。現在、腹膜播種を対象に治療実験を進めている。
- (5) MRI 用の造影剤リゾビストを酸化鉄を原料として利用し、sCA との併用効果を検討したがリゾビスト中の酸化鉄量が十分ではなく、磁性ナノ粒子を新たに作成することも検討

- したが、結果的に達成できず断念した。最終的に sCA に直接リゾビストを内包させて、マウス腫瘍に局注し、電磁波を照射し腫瘍の治療を行った結果、リゾビスト単独を局注した場合と比べて強い抗腫瘍効果を示した。この結果を論文化した。
- (6) ポリマー型抗癌剤 P-THP を sCA と併用した場合、P-THP の有意な腫瘍への取り込み増強と抗腫瘍効果の増強を認めた。
  - (7) ポリマー型 ZnPP をマウスに投与し、大腸癌で光をあてて著明な腫瘍縮小効果を認めた。内視鏡治療を想定して食道癌細胞を用いた治療実験を行っている。
  - (8) ブレオマイシンを投与して作成した間質性肺炎モデルから肺組織を摘出し、組織破碎後に、CD11c<sup>+</sup>DC を磁気ビーズによって分離し、microRNAseq と RNAseq によって発現減少した miR と発現変動した mRNA をリストアップし、12 種類の miRNA に絞り込みを行った。また 2 種類の方法で肝線維化モデルを作製した。
  - (9) イヌ、ネコの自然発症モデルから細胞株を複数樹立した。
  - (10) 種々の化合物を用いて試行的に iNaD の改良を行った。従来の sCA に比べて核酸搭載量の向上を示しつつ、肝臓をはじめとする正常臓器への集積がないように製造材料や工程の最適化を行った。これにより従来の sCA よりも副作用なく腫瘍へのデリバリー効率が高まりより少量で抗腫瘍効果を得られるようになった(図 2)。

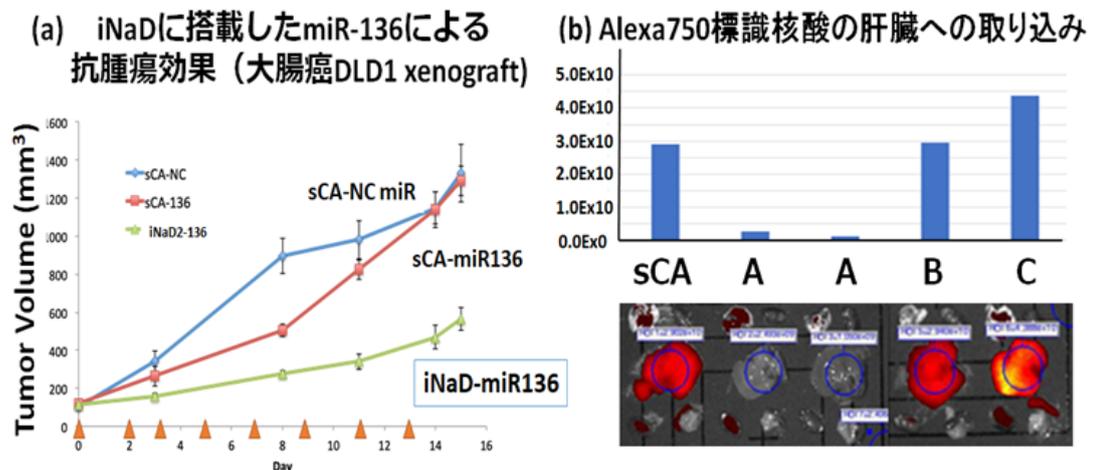


図 2. iNaD A, B, C の比較

(a) sCA には 20  $\mu\text{g}$  を iNaD には 5  $\mu\text{g}$  の miR-136 を搭載し静注した。iNaD は 5  $\mu\text{g}$  という少量の核酸でも優れた抗腫瘍効果を示した。(b) iNaD Type A は肝臓への核酸の取り込みを sCA の 1/10-20 に低減した。上段は肝臓の蛍光数値。下段は肝臓 (中央) とその他の臓器を IVIS で撮影したもの。臓器は上段から肺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓と膵臓。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Morimoto Yoshihiro, Mizushima Tsunekazu, Wu Xin, Okuzaki Daisuke, Yokoyama Yuhki, Inoue Akira, Hata Tsuyoshi, Hirose Haruka, Qian Yamin, Wang Jiaqi, Miyoshi Norikatsu, Takahashi Hidekazu, Haraguchi Naotsugu, Matsuda Chu, Doki Yuichiro, Mori Masaki, Yamamoto Hirofumi	4. 巻 122
2. 論文標題 miR-4711-5p regulates cancer stemness and cell cycle progression via KLF5, MDM2 and TFDP1 in colon cancer cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1037 ~ 1049
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-020-0758-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Fukata T, Mizushima T, Nishimura J, Okuzaki D, Wu X, Hirose H, Yokoyama Y, Kubota Y, Nagata K, Tsujimura N, Inoue A, Miyoshi N, Haraguchi N, Takahashi H, Hata T, Matsuda C, Kayama H, Takeda K, Doki Y, Mori M, Yamamoto H	4. 巻 12
2. 論文標題 The Supercarbonate Apatite-MicroRNA Complex Inhibits Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Therapy - Nucleic Acids	6. 最初と最後の頁 658 ~ 671
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omtn.2018.07.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tamai K, Mizushima T, Wu X, Inoue A, Ota M, Yokoyama Y, Miyoshi N, Haraguchi N, Takahashi H, Nishimura J, Hata T, Matsuda C, Doki Y, Mori M, Yamamoto H	4. 巻 17
2. 論文標題 Photodynamic Therapy Using Indocyanine Green Loaded on Super Carbonate Apatite as Minimally Invasive Cancer Treatment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1613 ~ 1622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-17-0788	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inoue A, Mizushima T, Wu X, Okuzaki D, Kambara N, Ishikawa S, Wang J, Qian Y, Hirose H, Yokoyama Y, Ikeshima R, Hiraki M, Miyoshi N, Takahashi H, Haraguchi N, Hata T, Matsuda C, Doki Y, Mori M, Yamamoto H	4. 巻 17
2. 論文標題 A miR-29b Byproduct Sequence Exhibits Potent Tumor-Suppressive Activities via Inhibition of NF- $\kappa$ B Signaling in KRAS-Mutant Colon Cancer Cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 977 ~ 987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1535-7163.MCT-17-0850	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 五島碧, 横山雄起, 入江侑馬, 廣瀬遥香, 木島貴志, 三好康雄, 柴田理志, 山本浩文
2. 発表標題 難治性癌に対する核酸医薬MIRTIXの抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 入江侑馬, 横山雄起, 石川翔, 錢雅敏, 廣瀬遥香, 山本浩文
2. 発表標題 膵癌細胞におけるmiR-29b-1-5pの抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第30回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本浩文, 森正樹
2. 発表標題 EPRを促進するsCAの中につめない利用法
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 石川翔, 横山雄起, 井上彬, 三吉範克, 高橋秀和, 原口直紹, 水島恒和, 土岐祐一郎, 森正樹, 山本浩文
2. 発表標題 KRAS変異型大腸癌に対するmiR-29b-1-5pの抗腫瘍効果の検討
3. 学会等名 第27回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田みのり、玉井皓己、横山雄起、井上彬、畑泰司、松田宙、水島恒和、土岐祐一郎、森正樹、山本浩文
2. 発表標題 大腸癌に対するICG光線力学療法
3. 学会等名 第27回日本がん転移学会学術集会・総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	土岐 祐一郎  (Doki Yuichiro)  (20291445)	大阪大学・医学系研究科・教授   (14401)	
研究分担者	中川 貴之  (Nakagawa Takayuki)  (40447363)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・准教授   (12601)	
研究分担者	村瀬 研也  (Murase Kenya)  (50157773)	大阪大学・医学系研究科・名誉教授   (14401)	
研究分担者	前田 浩  (Maeda Hiroshi)  (90004613)	大阪大学・医学系研究科・招へい教授   (14401)	
研究分担者	木島 貴志  (Kijima Takashi)  (90372614)	兵庫医科大学・医学部・教授   (34519)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	奥崎 大介  (Okuzaki Daisuke)  (00346131)	大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任准教授 (常勤)  (14401)	
研究分担者	森 正樹  (Mori Masaki)  (70190999)	大阪大学・医学系研究科・教授  (14401)	削除：2018年11月27日

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関