

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08660

研究課題名(和文) microRNA創薬の実現～医工薬集約による難治性癌の克服～

研究課題名(英文) Realization of microRNA drug discovery, overcoming intractable cancer through medicine-engineering-pharmacy collaboration

研究代表者

内山 和久 (Uchiyama, Kazuhisa)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：80232867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：当課題では、難治性癌に対しmicroRNA(miRNA)を新規治療法として確立するための検証を行った。研究期間中の成果として、以下の三点が挙げられる。第一に、対象疾患である難治性癌の一つに大腸癌骨盤内再発が存在することから、大腸癌骨盤内再発マウスモデルを作製した。第二に、共同研究者が開発したペプチドキャリアを用いてmiRNAの癌細胞導入効果を示した。第三に、共同研究者が開発した新規合成miRNA-145の抗癌効果をトリプルネガティブ乳癌に対して検証した。第一、第二の結果に関しては論文で成果を報告した。第三の結果に関しては、検証を継続している状況である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、現存の治療法で根治不能な難治性固形癌に対し、癌抑制型miRNA補充療法の実現を目指した。miRNA創薬の実現には、投与した癌抑制型miRNAが治療目的とする臓器で適切に作用することが必要で、有効なmiRNA輸送システムを構築しなければならない。本研究の遂行から、対象疾患の状況を反映した動物モデルが作成でき、miRNAの抗腫瘍効果を検証することが可能となった。また、miRNA運搬キャリアの候補としてペプチドキャリアが有効性が示唆されると共に、合成miRNAを用いたmiRNA補充療法の有効性も一部確認されたことは、今後、癌抑制型miRNA補充療法の実現に向けた検証に繋がる成果となった。

研究成果の概要(英文)：We performed several experiments to establish the microRNA(miRNA) therapy as a novel therapeutic strategy for intractable cancer in this project. We achieved the following three main results during our research period. First, to examine the effects of miRNA, we tried to create a mouse model of pelvic recurrence of colorectal cancer, and we succeeded in the mouse model. Second, we indicated the induction effect of miRNA to cancer cells using peptide-carrier developed by our collaborators. Third, we examined the anti-cancer effects of novel synthetic miRNA-145 developed by our collaborators in triple-negative breast cancer cells.

The first and second results have already been reported as articles. Regarding the third result, we are currently continuing with the verification process.

研究分野：難治性固形癌

キーワード：microRNA 核酸医薬 大腸癌 乳癌 ドラッグデリバリー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの固形癌は、様々な遺伝子の度重なる変異により発症するため、確固たるドライバー遺伝子の同定が困難であり、プレシジョンメディシンが導入されたが依然として癌の克服には至っていない。また低分子や抗体医薬で標的に出来る遺伝子には限界があり、創薬シーズの枯渇が危惧されている。即ち、一遺伝子に着目した分子標的治療には限界があり、発癌進展機構をより包括的に捉えた次世代を担う薬剤の創製が必要である。

核酸医薬は従来の分子標的治療剤では扱えない細胞内の分子を創薬標的にすることが可能であり、低分子阻害剤・抗体医薬に次ぐ革新的な次世代医薬として、その開発が期待されている。核酸医薬の内、本課題では microRNA(miRNA)の創薬化に向けた研究を実施した。miRNA は、20 塩基程度からなる微小機能性核酸であり、標的遺伝子の非翻訳領域に結合し、標的遺伝子の発現を抑制することでその機能を発揮する。癌抑制的に作用する miRNA(癌抑制型 miRNA)は、癌の発育・進展過程で発現低下することが自験例を含め報告されている。また健全状態で我々の体に内在し、一種の miRNA が数百に及ぶ標的遺伝子の翻訳や転写を抑制する特徴を有する。従って、癌抑制型 miRNA を補充することで、癌を促進させる多数の遺伝子変化を体系的に調節し、体内システムを修復する治療が可能である。

2. 研究の目的

癌抑制型 miRNA が治療目的とする臓器で適切に作用するためには、生体内に存在する RNA 分解酵素の制御や、異物反応を主とした過剰な免疫応答を回避するための有効な miRNA 輸送システムを構築することが必要で、輸送システムの確立に向けた検討が望まれている。そこで本研究では、miRNA 創薬の実現に向けた検証を実施した。

3. 研究の方法

具体的な、検証課題として以下の3点を中心に研究に取り組んだ。

- (1)miRNA の抗腫瘍効果を検証するための動物モデルの開発
- (2)新規 miRNA 輸送システムの機能評価
- (3)合成 miRNA の機能評価

(1)に関しては、大腸癌骨盤内再発動物モデルの作製に取り組んだ。

大腸癌骨盤内再発に対する外科的切除術では、周辺臓器を広範囲に合併切除する必要があり、著しく患者の生活の質が損なわれる。よって、外科的切除に代わる治療法の確立が急務であり、代替療法の効果を検証する必要があると判断し動物モデルの作製に着手した。

(2)に関しては、ペプチドキャリアである MAP(Aib)の miRNA 導入効果を検証した。

用いたペプチドキャリアは、膜透過性上昇と RNA 分解酵素耐性を目的に疎水性アミノ酸と塩基性アミノ酸を組み合わせた両親媒性ヘリックスペプチドに、癌細胞膜上で高発現する α_3 インテグリンレセプターに特異的に結合する RGD(Arg-Gly-Asp)配列を付与させた輸送キャリアである。研究協力者より開発され MAP(Aib)と命名されている。導入する miRNA として、これまで取り扱った経験が豊富で、標的遺伝子や導入後の効果がある程度推測し易い miRNA-145 を選択した。導入を実施する癌細胞として、miRNA-145 の発現低下が立証されており、頻用している大腸癌細胞株を利用した。

(3)に関しては、2種の合成 miRNA (合成 miRNA-143/合成 miRNA-145) で検証を実施した。

合成 miRNA-143 は、(1)で開発した大腸癌骨盤内再発動物モデルに対する抗腫瘍効果の検証を実施した。合成 miRNA-145 は、切除不能乳癌に対する新規治療法としての有用性の検証を進めた。

4. 研究成果

(1)大腸癌骨盤内再発動物モデルの作製

まずは、6-8 週の雌ヌードマウス (BALB/c nude mouse) に対してルシフェラーゼが導入された DLD-1 clone#1-Luc を注入する方法で実験を開始した。様々な注入部位や穿刺深度を検証した結果、27G 針、0.5-1.0cm の深度で、膣・肛門・座骨棘で形成される三角領域に注入すると骨盤内に癌細胞が定着することが示された。生着率も高く再現性を得た。また生着した腫瘍は、IVIS Imaging System や、実験動物用 X 線 CT で同定可能で、経時的な変化を追うことも可能であった(図1)。またおそらく腸閉塞に起因する体重減少を認め、7 週程度で屠殺基準に達するため、治療評価を検証するモデルとして有用であると考えられた¹。雄に関しては雌に比して骨盤腔が狭いことから生着が確認できなかった。Wild Type BALB/c マウスに対しては、マウス由来大腸癌細胞株 Colon26-Luc の移植が同様に

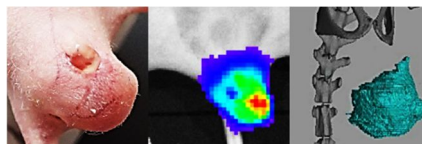


図1：大腸癌骨盤内再発モデル

左：移植腫瘍肉眼所見、
中央：光 *in vivo* イメージング
右：X線CT

可能であり、免疫系の検証にも利用できると考えている¹。

(2)ペプチドキャリア MAP(Aib)の miRNA 導入効果の検証

末梢血単核球細胞に曝露した検証では、2000nM までは細胞毒性を認めなかった。miRNA-145 との含有比率の検証では、MAP(Aib)対 miRNA-145 を 50 対 1 で混合した結果が miRNA の分解抑制能が良好であった(図2)。

miRNA-145 の代表的な標的遺伝子である FSC N1 の発現抑制を調べたところ、既存のカチオン性リポソーム製剤と同等の発現抑制程度を有していた。細胞増殖抑制効果に対しては、アポトーシスの誘導、浸潤能の抑制など幅広い機能を有しており、miRNA の多機能効果が改めて示唆された。また、代償性の変化として Akt のリン酸化が亢進していたため、AKT 阻害剤を併用したところ、細胞増殖抑制の上乗せ効果を認めた。このことから治療方法として、分子標的治療剤と miRNA の併用が有用である可能性が示唆された²。

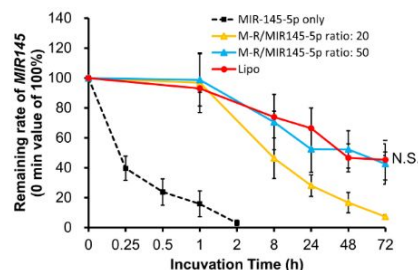


図2：MAP(Aib)と miRNA の混合に対する miRNA 分解能

(3)合成 miRNA の機能評価

現在、継続中の実験として、合成 miRNA-143 の大腸癌骨盤内再発モデルに対する抗腫瘍効果の検証と、合成 miRNA-145 の切除不能乳癌に対する治療効果の検証実験がある。前者では(1)で開発した動物モデルに対して、合成 miRNA-143 を尾静脈から投与し抗腫瘍効果を検証する内容である。合成 miRNA-143 は研究分担者によって最適化学修飾や合成塩基の付加を行い作製された miRNA で、ヌクレアーゼ耐性が確認されている。既に、膀胱癌の同所移植動物モデルに対して抗腫瘍効果を得ている³。miRNA の運搬システムとして、まずは、既存のカチオン性リポソームで検証を開始した。研究期間では、予備実験として大腸癌細胞株 DLD-1 clone#1-Luc を皮下移植し尾静脈投与を実施したところ、著名な抗腫瘍効果を確認した(図3)。この予備検討から、合成 miRNA-143 とカチオン性リポソームの配分を結論付けた。現在、骨盤内再発モデルに対して検証を進めている。

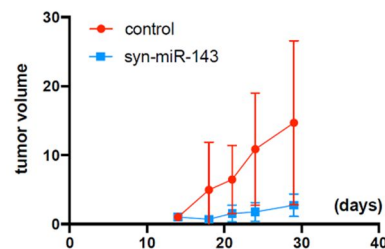


図3：合成 miR-143 の大腸癌皮下移植モデルに対する抗腫瘍効果

一方、切除不能乳癌の内、トリプルネガティブ乳癌(TNBC)は、ホルモン・HER2 受容体発現が陰性で、ホルモン療法および抗 HER2 療法の適応が無く予後不良であり、若年発症の乳癌に多いことから、乳癌の中で特に新規治療法の確立が望まれている疾患である。そこで、本研究では、切除不能 TNBC に対する miRNA 両方の可能性を探索した。まず、使用する細胞として、我々の施設で樹立した、高転移性マウス由来乳癌細胞株 BJMC3879Luc2 を選択した。この細胞は、乳腺同所移植後、約 8 週でほぼ 100%リンパ節転移を経て肺を中心とした他臓器に転移することが確認されており、治療効果を検証するモデルとして有用であると判断した⁴。抗腫瘍効果の検証の前に、BJMC3879Luc2 の分子学的特徴を解析した。临床上重要となる分子である ESR1、PGR、HER2 の発現を mRNA およびタンパクレベルで解析した。何れの分子もコントロールとして設定したポジティブ細胞に対して発現が低下しており、TNBC 細胞であることが示唆された。また、miRNA-145 の発現を移植腫瘍片や、臨床検体、公開されているデータベースを用いて解析した。何れの検証でも、正常組織に比べ発現が低下しており、miRNA-145 を補充療法として TNBC に用いることの妥当性が示唆された。しかしながら、非合成 miRNA-145 と合成 miRNA-145 の細胞増殖抑制能を細胞実験で検証したが明らかな優位性を認めることは出来なかった。また、BJMC3879Luc2 の乳腺同所移植モデルに対する局所注入療法の検証では、合成 miRNA-145 投与群で 5 週目まで優位な腫瘍径の縮小を認めたが、6 週時点では統計学的に有意差を認めなかった。採取した腫瘍片における miRNA-145 の発現量も十分ではなかった。この検証では、転移抑制効果を検証するために、移植後 6 週間に渡り腫瘍局所投与を実施したが、腫瘍径の増大により miRNA-145 の腫瘍内浸透度が十分でなかった可能性を考慮している。引き続き詳細な検討を実施しており、多角的視点より結論を導く予定である。

<引用文献>

Yamamoto M, Taniguchi K, Masubuchi S, Tominaga T, Inomata Y, Miyamoto A, Ishizuka TA, Murakami T, Osumi W, Hamamoto H, Tanaka K, Okuda J, Uchiyama K. An In Vivo Mouse Model of Pelvic Recurrence of Human Colorectal Cancer. Sci Rep. 2019 Dec 23;9(1):19630.

Taniguchi K, Wada SI, Ito Y, Hayashi J, Inomata Y, Lee SW, Tanaka T, Komura K, Akao Y, Urata H, Uchiyama K. -Aminoisobutyric Acid-Containing Amphipathic Helical Peptide-Cyclic RGD Conjugation as a Potential Drug Delivery System for MicroRNA

Replacement Therapy in Vitro. *Mol Pharm.* 2019 Nov 4;16(11):4542-4550.

Yoshikawa Y, Taniguchi K, Tsujino T, Heishima K, Inamoto T, Takai T, Minami K, Azuma H, Miyata K, Hayashi K, Kataoka K, Akao Y. Anti-cancer Effects of a Chemically Modified miR-143 on Bladder Cancer by Either Systemic or Intravesical Treatment. *Mol Ther Methods Clin Dev.* 2019 Feb 20;13:290-302.

Shibata MA, Ambati J, Shibata E, Albuquerque RJ, Morimoto J, Ito Y, Otsuki Y. The endogenous soluble VEGF receptor-2 isoform suppresses lymph node metastasis in a mouse immunocompetent mammary cancer model. *BMC Med.* 2010 Nov 3;8:69.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wada Shun-ichi, Taniguchi Kohei, Hamazaki Hiroaki, Yamada Azusa, Hayashi Junsuke, Uchiyama Kazuhisa, Urata Hidehito	4. 巻 29
2. 論文標題 Influence of lysine residue in amphipathic helical peptides on targeted delivery of RNA into cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1934 ~ 1937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2019.05.044	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 Taniguchi Kohei, Wada Shun-ichi, Ito Yuko, Hayashi Junsuke, Inomata Yosuke, Lee Sang-Woong, Tanaka Tomohito, Komura Kazumasa, Akao Yukihiro, Urata Hidehito, Uchiyama Kazuhisa	4. 巻 16
2. 論文標題 -Aminoisobutyric Acid-Containing Amphipathic Helical Peptide-Cyclic RGD Conjugation as a Potential Drug Delivery System for MicroRNA Replacement Therapy in Vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 4542 ~ 4550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00680	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 Yamamoto Masashi, Taniguchi Kohei, Masubuchi Shinsuke, Tominaga Tomo, Inomata Yosuke, Miyamoto Akiko, Ishizuka Taka-Aki, Murakami Takashi, Osumi Wataru, Hamamoto Hiroki, Tanaka Keitaro, Okuda Junji, Uchiyama Kazuhisa	4. 巻 9
2. 論文標題 An In Vivo Mouse Model of Pelvic Recurrence of Human Colorectal Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56152-0	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 谷口高平	4. 巻 77
2. 論文標題 microRNA創薬による次世代がん治療	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 大阪医科大学雑誌	6. 最初と最後の頁 57-69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富永智、谷口高平、柴田雅朗、岩本充彦、赤尾幸博、内山和久
2. 発表標題 乳癌高転移マウスモデルにおけるmiR-145-5pの抗癌作用について
3. 学会等名 第57回 日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷口高平、山本誠士、鱒淵真介、富永智、猪俣陽介、大住涉、濱元宏喜、田中慶太郎、奥田準二、内山和久
2. 発表標題 大腸癌骨盤内再発マウスモデルの検討
3. 学会等名 第57回 日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田俊一、谷口高平、林淳祐、内山和久、浦田秀仁
2. 発表標題 Aib 含有ペプチドによる microRNA-145 の細胞内導入および大腸癌細胞増殖抑制効果
3. 学会等名 第 37回 メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷口高平、猪俣陽介、和田俊一、浦田秀仁、宮田完二郎、内山和久、赤尾幸博
2. 発表標題 難治性固形癌に対するmicroRNA創薬の可能性
3. 学会等名 第53回 制癌剤適応研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shun-ichi Wada, Kohei Taniguchi, Hiroaki Hamazaki, Azusa Yamada, Junsuke Hayashi, Kazuhisa Uchiyama, Hidehito Urata.
2. 発表標題 Delivery of siRNA and microRNA into cells by Aib-containing amphipathic helical peptides
3. 学会等名 10th International Peptide Symposium
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 和田俊一、谷口高平、林淳祐、内山和久、浦田秀仁
2. 発表標題 ペプチド性キャリアMAP(Aib)-cRGDによるmicroRNA-145の細胞内導入
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>大阪医科大学 一般・消化器外科 研究紹介 https://www.osaka-med.ac.jp/~sur000/html/laboratory.html 大阪医科大学 研究支援センター トランスレーショナルリサーチ部門 https://www.osaka-medrd.com/transregular/ 大阪医科大学 一般・消化器外科学教室 研究室 https://www.osaka-med.ac.jp/deps/sur/html/laboratory.html</p>
--

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	赤尾 幸博 (Akao Yukihiko) (00222505)	岐阜大学・大学院連合創薬医療情報研究科・特任教授 (13701)	

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	谷口 高平 (Taniguchi Kohei) (70779686)	大阪医科大学・医学部・講師 (34401)	

	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 協力者	宮田 完二郎 (Miyata Kanjiro)		
研究 協力者	浦田 秀仁 (Urata Hidehito)		
研究 協力者	和田 俊一 (Wada Shun-Ichi)		
研究 協力者	柴田 雅朗 (Shibata Masa-aki)		
研究 協力者	伊藤 裕子 (Ito Yuko)		
研究 協力者	朝日 通雄 (Asahi michio)		

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
研究協力者	森脇 一将 (Moriwaki Kazumasa)		

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