

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09198

研究課題名(和文) 高分子ナノミセルに搭載した癌抑制マイクロRNAによる膀胱癌の新規核酸医薬の開発

研究課題名(英文) New oligonucleotide therapeutics using polymeric nano-micelles conjugated with tumor suppressive microRNA in bladder cancer

研究代表者

山田 保俊 (YAMADA, Yasutoshi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・講師

研究者番号：40437968

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)：癌抑制型マイクロRNA miR-218の配列をキメラ型2重鎖miRNAに人工合成しuPICと調整して培養細胞に添加したところ、miRNAの細胞内濃度は投与前に比べ100倍以上に上昇した。MagicRed解析ではアポトーシスが誘導された。次にエクソソーム内に癌抑制型マイクロRNAとして知られているmiR-1を発現させ別な細胞に添加すると、細胞内のmiR-1の発現が40倍に増加することを確認した。またエクソソームmiR-1を添加した細胞では、細胞増殖・遊走・浸潤能が抑制された。また、エクソソームmiR-1をマウスに投与すると、皮下に形成した腫瘍がコントロール群と比べて著明に縮小することを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一連の研究により、癌抑制型マイクロRNAをin vitroあるいはin vivoで投与する新規マイクロRNA投与手段を開発できた。さらに抗腫瘍効果を確認できた。最適化のためさらなる条件の検討が必要ではあるが、これまでin vitroでリポフェクタミン法によるトランスフェクションしか導入手段がなかったため、今後、癌抑制型マイクロRNAの臨床応用の可能性を拓くことが出来たことは学術的意義が大きい。実臨床で治療手段の少ない膀胱癌患者にとって福音となり得る。

研究成果の概要(英文)：We synthesized chimeric double strand microRNA (miR) containing nucleotide sequence of tumor suppressive miR-218. When miR-218 conjugated with unit PIC administrated to bladder cancer (BC) cell lines, the intra-cellular concentration of miR-218 increased more than one hundred time compared to before administration. Apoptosis was induced in the treated cells by the MagicRed analysis. Next, administrating the exosome with high expression of tumor suppressive miR-1 to BC cells repressed cell proliferation, migration and invasion compared to the controls. In vivo study showed that the xenograft size was significantly reduced in the mice with injection of the miR-1 exosome compared to the controls.

研究分野：泌尿器癌

キーワード：膀胱癌 microRNA ナノミセル ドラッグデリバリー miR-218 miR-1

1. 研究開始当初の背景

進行性膀胱癌の予後は不良であり、再発・転移症例に対する抗癌剤治療や放射線治療は一時的に奏功しても必ず再発し死への転帰を辿る。特に抗癌剤治療は GC 療法(Gemcitabine+Cisplatin) がファーストラインとして行われるが、種々の分子標的薬の臨床試験は有効性を示せず、有効なセカンドライン抗癌剤治療は現在も確立されていない。最近では米国 FDA で抗 PD-1 抗体薬である Pembrolizumab が膀胱癌に対して承認され、本邦でも使用可能になったが、その奏功率は 25% 程度でありセカンドライン治療として十分とは言えない。このように他の泌尿器癌(前立腺癌や腎癌) に比べて明らかに治療手段が少なく、治療成績の向上のために新規治療法の開発は急務である。

2. 研究の目的

申請者は、次世代シーケンサーを用いて、膀胱癌組織から低分子 RNA の網羅的な発現解析を行い、独自に今後のスタンダードとなる「膀胱癌マイクロ RNA 発現プロファイル」を作成した。これに基づき、膀胱癌細胞で発現が亢進しているマイクロ RNA を基点として、進行膀胱癌における増殖/転移の分子メカニズムを明らかにしてきた。今後、癌抑制型マイクロ RNA の臨床応用を可能にすべく、in vivo におけるナノミセルを用いた DDS を開発する研究は創造的であり、治療手段の少ない膀胱癌患者にとって大きな福音となり得る。本研究の目的は、「癌抑制型マイクロ RNA」の抗腫瘍効果を in vivo において証明し、マイクロ RNA を用いた新規核酸治療法の確立を加速させる事である。

3. 研究の方法

独自の「膀胱癌マイクロ RNA 発現プロファイル」を軸に、「増殖・転移抑制型マイクロ RNA」の候補を探索し、最終的に効果的な癌抑制型マイクロ RNA の候補を 20 個程度に絞り込む。高分子ナノミセル (uPIC) に搭載する「増殖・転移抑制型マイクロ RNA」を選択する。3次元スフェロイド培養により膀胱癌細胞の立体培養を行い、in vivo に近い条件下で高分子ナノミセル DDS 搭載マイクロ RNA の導入実験を行う。導入効率の検討は miR-218 導入による標的遺伝子 CAV2 のノックダウン効率を検討した。また抗腫瘍効果の検討は Magic Red を用いたアポトーシス実験を行った。引き続きゼノグラフトマウスを用いた in vivo 実験を行う予定である。

4. 研究成果

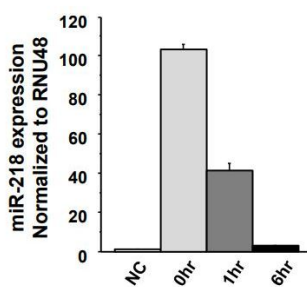
本研究の課題は二つあり、一つは RNase で分解されやすい miRNA を体内で如何に安定させるかであり、もう一つは体内で miRNA を腫瘍まで効率よく運搬するドラッグデリバリーシステム (DDS) の確立である。前者は一本鎖である miRNA の 3 末側約 10 塩基を DNA に置換したキメラ miRNA を合成し、さらにこれを 2 重鎖とすることで従来の miRNA と比べて遥かに安定した体内動態を確立できた。またアンチセンス鎖は DNA に置き換わっているために、オフターゲット効果を抑制できる利点もある。これを unit polyion complexes (u-PIC) とキメラ miRNA を調整し、その内部にキメラ miRNA を効率よく包有できるナノミセル型 DDS を確立した。そこで、今回はまず in vivo 実験のための至適条件を探るための in vitro 実験を行った。これまでの in vitro 実験で著名な抗腫瘍効果があった 4 種類の miRNA (miR-1, miR-133a, miR-145, miR-218) の配列を

キメラ型 2 重鎖 miRNA として人工合成した。uPIC と調整して 40nM の濃度で培養細胞に添加したところ、各 miRNA の細胞内濃度は投与前に比べて 100 倍以上に上昇することが観察された。細胞内濃度のターンオーバーは早く、投与 6 時間後にはほぼゼロとなった。次に miR-218 細胞内導入による CAV2 ノックダウン効果をリアルタイム PCR 法で検討したところ、細胞株によってややばらつきはあるが 20 ~ 50% のノックダウン効果を得た。MagicRed 解析によるアポトーシス実験では miR-218 を 100nM 濃度で投与すると、確実にアポトーシスが誘導された。今回の一連の研究により、uPIC はキメラ型 2 重鎖 miRNA を内包することが可能であり、膀胱癌培養細胞に効率よく取り込まれて抗腫瘍効果を発揮することが確認できた。しかしながらゼノグラフトを用いた in vivo 投与実験では至適条件の確定に時間を要したため、次年度の実績として、エクソソーム内に癌抑制型マイクロ RNA として知られている miR-1 を発現させ、それを別な細胞に添加することでエクソソーム miR-1 が細胞内に取り込まれ、細胞内の miR-1 の発現が 10 倍から 40 倍に増加することを確認した。更にエクソソーム miR-1 を添加した細胞はコントロール細胞と比べて、細胞の増殖・遊走・浸潤能が抑制された。また、エクソソーム miR-1 を添加した細胞を用いて RNAseq を行った結果、多くの遺伝子の発現が変化していることを確認した。そして、それをマウスに投与することで、皮下に形成した腫瘍がコントロール群と比べて縮小することを確認した。これらの結果より、in vivo における「癌抑制型マイクロ RNA」の抗腫瘍効果の可能性を示すことができた。

miR-218-uPIC細胞内導入実験

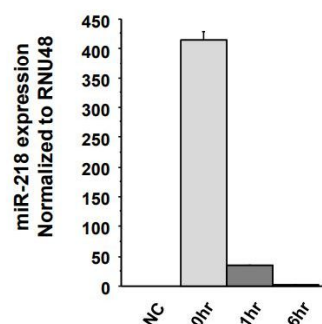
(細胞株T24)

miR218-uPIC (40nM)
細胞回収までmedium交換せず



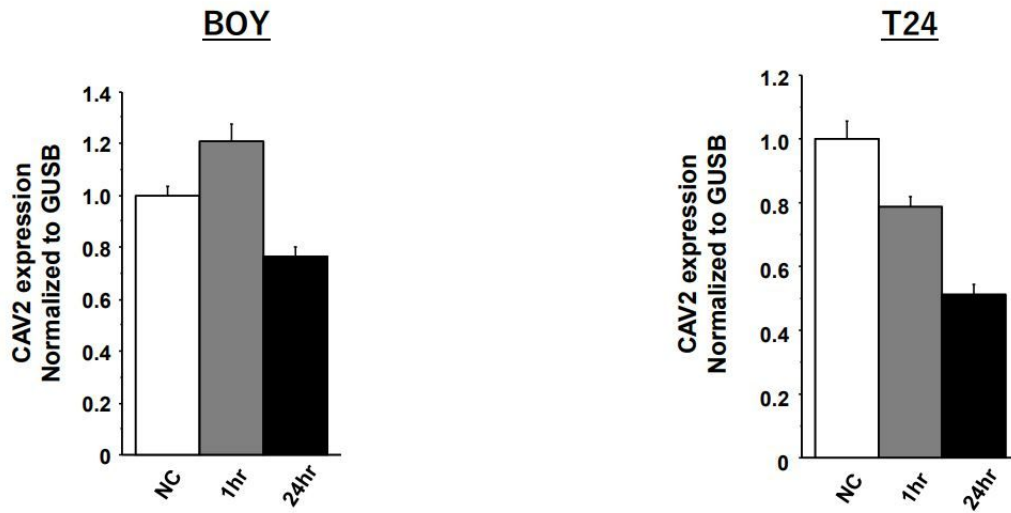
他のmiRNAsも同じ傾向

miR218-uPIC (40nM)
添加1時間後 medium 交換
(uPIC回収)



メディウム交換すると 1h・6h後
は細胞内発現量がかなり低下した

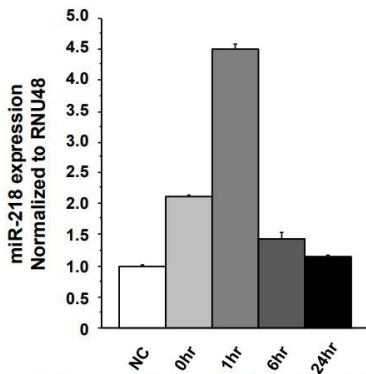
miR-218-uPIC による CAV2 ノックダウン効果



24 h後のCAV2ノックダウン効率はBOYで約20%、T24で約50%程度

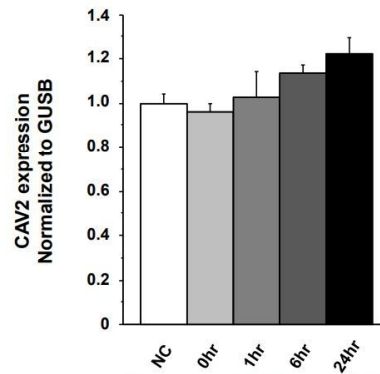
uPICで調整しなかった場合

miR-218 (40nM)単独による細胞内導入実験



ネガコンと比べて僅かしか導入されない

miR-218 (40nM)単独によるCAV2ノックダウン実験



全くノックダウンされない

uPICが細胞内に導入されている証拠

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 榎田英樹
2. 発表標題 膀胱癌に対するナノミセル型薬物搬送システムを介した癌抑制型マイクロRNAによる新規核酸治療の開発
3. 学会等名 第107回 日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 腫瘍学講座泌尿器科学分野 http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~urology/
--

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	榎田 英樹 (ENOKIDA Hideki) (80347103)	鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授 (17701)	
研究分担者	吉野 裕史 (YOSHINO Hirofumi) (90642611)	鹿児島大学・医歯学域医学系・助教 (17701)	

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	坂口 大 (SAKAGUCHI Takashi) (70779008)		
研究協力者	大迫 洋一 (OSAKO Yoichi) (60793354)		
研究協力者	林 光太郎 (HAYASHI Kotaro)		
連携研究者	片岡 一則 (KATAOKA Kazunori) (00130245)	ナノ医療イノベーションセンター・ナノ医療イノベーションセンター・センター長 (82731)	

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