

研究種目:基盤研究(C)

研究期間:2007-2008

課題番号:19591323

研究課題名(和文)ナノ DDS によるメラノーマ特異的分子標的 RNA インターフェレンス療法

研究課題名(英文) RNA interference-based therapeutic molecular targeting strategy using nano drug delivery systems to eradicate malignant melanoma

研究代表者 岸本 三郎(Saburo Kishimoto)
 京都府立医科大学・医学研究科・教授
 研究者番号:90079913

研究成果の概要:

我々は最近、メラノーマに発現する bHLH 転写因子、MITF を RNAi にて抑制すると、メラノーマがアポトーシスに陥り、増殖が阻止できることを見出した。本研究では、さらなる発展として、IL-12 免疫遺伝子療法との併用により、それらの相乗作用によるより強力なメラノーマの抑制に成功した。さらに、ナノ DDS による siRNA 導入を試みるとともに、膜透過性ペプチドによる MITF 特異的分子標的療法の試みを行った。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度			
2010年度			
2011年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード:悪性黒色腫、分子標的治療、RNA インタフェレンス、サイトカイン、免疫療法

1. 研究開始当初の背景

メラノーマは、色素細胞由来の極めて悪性度の高い腫瘍であり、本邦においても近年発症率が上昇している。早期には手術療法が有効であるが、進行性のメラノーマは化学療法、放射線療法に抵抗性であり、新しい治療法が求められてきた。

bHLH-LZ ドメインを有する転写因子、MITF (Microphthalmia-associated transcrip-

tion factor) は、メラノサイトの発生と分化に必須の分子である。しかしながら、メラノーマの生存に必須であるか否かについては、相反する報告もあり、コンセンサスは得られていなかった。我々は最近、MITF を RNA interference (RNAi) により抑制すると、メラノーマがアポトーシスを起こすことを *in vitro* で確認した。さらに、B16 メラノーマ細胞を移植して作成した担癌マウスの腫瘍内に、MITF 特異的 short interfering RNA

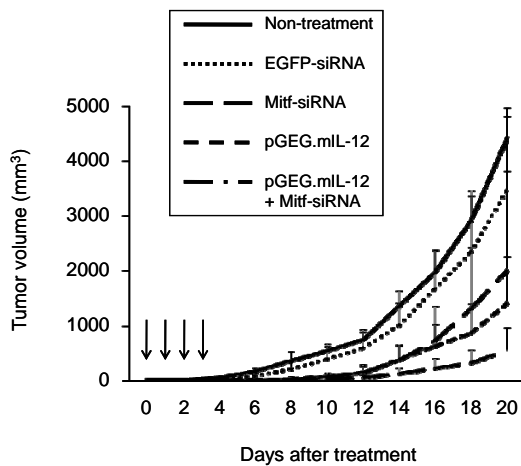


図1 MITF 特異的 siRNA と IL-12 発現ベクターの腫瘍内共導入による B16 メラノーマの抑制。5x10⁵ 個の B16 細胞を側腹部皮下に移植した C57BL/6 マウスに、B16 皮下腫瘍が樹立したことを、移植 3 日後に確認し、この日を第 0 日とした。第 1 から 4 日目に、毎日 1 回、その腫瘍内に MITF-siRNA、または非特異的 siRNA、および/または IL-12 発現プラスミドベクター (pGEG. mIL-12) を導入後、腫瘍の体積を経時的に測定した。MITF-siRNA 単独、および pGEG. mIL-12 単独でも有意に腫瘍増殖を抑制するが、その抑制の程度は中等度であった。一方で、これらを共導入した群では、もっとも強力にメラノーマの増殖が抑制された。

(siRNA) を直接導入すると、メラノーマの増殖が抑制され、マウスの延命効果が得られること、その原因として、メラノーマに *in vivo* でアポトーシスが誘導されていることを明らかにした (Nakai et al., Gene Ther. 14(4):357-65, 2007)。これらの結果は、MITF を標的分子とする RNAi 療法が、メラノーマに対する新しい治療手段となる可能性を示している。

一方で、RNAi 分子標的治療をメラノーマに応用するためには、メラノーマ細胞に効率よく siRNA を導入し配列特異的サイレンシングを誘導する導入法が必要になるが、我々はナノ DDS を用いた種々生体機能分子のデリバリーシステムを開発してきた。このナノ DDS 技術を応用すれば、メラノーマ細胞内に治療用の siRNA を安全かつ効率的に導入できる可能性がある。

他方、メラノーマはもっとも免疫原性の高い腫瘍のひとつとして知られ、多くのメラノーマ特異抗原、メラノーマ関連抗原が同定されるとともに、さまざまな免疫療法が試みられ、ある程度の有効性が示されたものも多い。免疫療法のうちでも、我々は樹状細胞

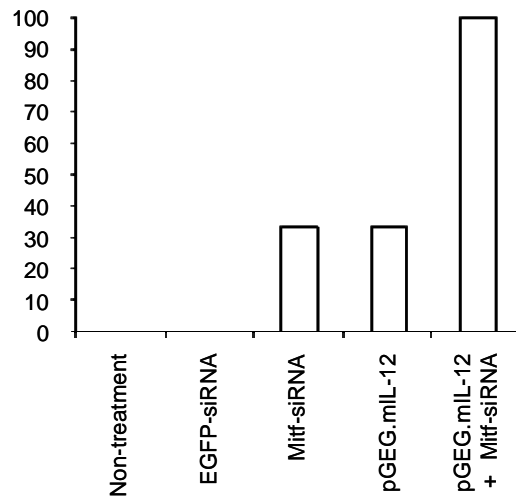


図2 MITF-siRNA と IL-12 遺伝子の両者の投与を受けた担癌マウス群では、メラノーマの増殖が遅延したマウスの比率が高かった。非治療群では、腫瘍移植後 20 日までに癌死する個体があり、また生き残っているマウスでも全例が 20 日までに腫瘍が体重の 10% 以上となっていた。そこで、全群のマウスを腫瘍移植後 20 日に安楽死させた。我々のこれまでの実験の経験では、腫瘍体積が 1,500 mm³ を超えると急速に腫瘍が増大し、死亡するマウスも増えるので、各群の予後の指標として、腫瘍移植後 20 日における 1,500 mm³ より小さい腫瘍を有するマウスの比率を示した。非治療群および非特異的 siRNA 投与群では全例の腫瘍が 1,500 mm³ よりも大きかったのに対して、MITF-siRNA あるいは pGEG. mIL-12 それぞれの単独投与群では、約 33% のマウスがこの指標にて進行度の低い腫瘍を有していた。一方、MITF-siRNA と pGEG. mIL-12 の共導入群では、全例の腫瘍が増殖遅延であり、これらの併用療法が生命予後を向上できる可能性があるものと示唆された。

(DC) を用いたワクチン療法の臨床治験を行ってきたが、サイトカインを用いたものとして、IL-12 遺伝子を担癌マウスの腫瘍内に直接導入し、メラノーマ特異的な CTL の誘導と NK の活性化、それらを介した皮下移植メラノーマの抑制を確認してきた (Kishida T., Asada, H., et al., Gene Ther. 8 (16): 1234-1240, 2001)

2. 研究の目的

本研究では、メラノーマに対する効果的な治療法を確立することを目標に、MITF 特異的 siRNA と Th1 タイプのサイトカインである IL-12 の遺伝子の併用による、メラノーマに対する相乗治療効果を検討した。また、siRNA を腫瘍内に導入するためのナノ DDS の組成と投与法を検討した。さらに、メラノーマに対

する siRNA 以外の分子標的療法として、MITF を標的とする細胞内透過ペプチドを試みた。これらの革新的技術を組み合わせることにより、新しい効果的なメラノーマの治療手段を提案することを目的とした。

3. 研究の方法

C57BL/6 マウスの皮下に 5×10^5 個の B16 メラノーマ細胞を移植し、その後①無治療、② Control siRNA 投与および IL-12 遺伝子導入、③ MITF 特異的 siRNA 投与、④ MITF 特異的 siRNA 投与および IL-12 遺伝子導入を行った。IL-12 遺伝子投与と siMITF の腫瘍内投与の条件を、種々に変えて行った。抗腫瘍効果は、移植腫瘍の増殖により判定した。また、ナノ DDS として、種々の組成のキャリアー分子を合成し、MITF-siRNA を封入し、*in vitro* および *in vivo* において B16 への導入を検討した。一方で、MITF の RNAi 療法に比して、より新しい MITF 標的療法として、MITF のトランスアクティベーション、および DNA 結合をそれぞれ抑制するペプチドを数種デザインし、それらを導入する実験も用いた。B16 の増殖能、アポトーシス、MITF の下流の制御分子である tyrosinase の mRNA 発現と活性、およびメラニン合成能を指標として測定した。

4. 研究成果

担癌マウスに対する *in vivo* 導入実験を、方法を種々改変して試みたところ、5 μg の IL-12 遺伝子発現プラスミドベクター (pGEG.mIL-12) と 20 μg の MITF-siRNA を投与した場合に、もっとも有望な結果が得られ、このとき腫瘍増殖は、IL-12 遺伝子導入発現ベクター単独投与群、および MITF 特異的 siRNA 単独投与群で、無治療群と比較して有意な抑制効果を示した。さらに、MITF-siRNA と IL-12 遺伝子の共導入群では、単独導入群よりも有意に腫瘍増殖が抑制されており、両者の相乗作用を示唆する結果が得られた (図 1)。本研究では、実験動物に対する愛護の観点から、腫瘍細胞移植後 20 日に生存していたマウス全例を安楽死させたが、延命効果の指標として、1,500 mm^3 よりも体積の小さな腫瘍を有するマウスの比率を各群で比較すると、MITF-siRNA と IL-12 遺伝子の共導入群ではこの指標による増殖遅延した腫瘍を有するマウスが全例を占めており、併用療法を受けたマウスが余命の延長効果を受ける可能性が示唆された。

我々は以前、アポトーシスしたメラノーマ細胞を樹状細胞 (DC) と共培養すると、DC がアポトーティックメラノーマ細胞を貪食し、さらにその DC をワクチンとしてメラ

ノーマ移植マウスに接種すると、メラノーマ特異的 CTL が誘導されることから、アポトーティックメラノーマ細胞腫瘍抗原が効率よく DC に取り込まれ抗原プロセッシングされたことを示唆した (Asada *et al.*, *Mol. Ther.* 5 (5): 609-616, 2002)。このことと、MITF のノックダウンによりメラノーマがアポトーシスに陥るといふ我々の以前の研究結果を考え合わせると、今回の結果は、MITF のノックダウンによってアポトーシスに陥った B16 腫瘍細胞が、担癌マウス内で DC に貪食され、メラノーマ抗原が効率よく T 細胞に提示され、さらに IL-12 による Th1 誘導と CTL 活性化と相まって、強力な抗腫瘍免疫応答が誘導され、このことが MITF に対する RNAi 療法と IL-12 免疫遺伝子治療が相乗作用を示した機構であることが推察される。すなわち、MITF の抑制と IL-12 による抗腫瘍免疫応答は、一見互いに関与しない別々の現象であって、両者の併用による効果は偶発てきな結果と見えるが、実は DC と T 細胞の相互作用という接点から俯瞰すると互いに補い合い高めあうことにより相乗的にメラノーマの特異的排除に向かう、極めて合目的な方法論であると考えられる。しかしながら、この相乗作用の機構については、今後さらなる検討が必要である。一方で、IL-12 の作用としては、免疫の制御を介せず血管新生抑制にて腫瘍を抑制する機序も知られているので、このような作用と MITF の抑制によるメラノーマの増殖抑制、およびアポトーシス誘導の関連も、今後検討すべき課題であると考えられる。

本併用療法の特色として、MITF-siRNA はメラノーマと色素細胞に特異的に影響を与え、その他の正常細胞には影響しないと考えられる。また IL-12 により誘導される CTL はメラノーマ抗原を特異的に認識しメラノーマを傷害するであろうと考えられる。そこで、これら 2 つの治療法のコンビネーションにより、相乗的に強力に排除される標的細胞は、MITF 抑制によって傷害され、なおかつメラノーマ抗原を有する細胞であると考えられ、本法はメラノーマに特異性を有する 2 つの手法の掛け算により、さらに特異性が高くメラノーマを排除し、したがって副作用が少なく安全なメラノーマの治療法が確立できるものと期待できる。メラノーマ特異的免疫療法としては、我々は DC ワクチン療法の臨床試験にて、有意な免疫応答の誘導を認めており (Nakai *et al.*, *J Dermatol Sci.* 54 (1): 31-37, 2009 ; Nakai *et al.*, *J Dermatol Sci.* 53(1):40-47, 2009)、IL-12 のみならず DC ワクチン療法との併用も極めて有望と考えられるが、さらに他の Th1 サイトカイン等も考慮に入れて将来の集学的療法を確立していく

必要があるものと考えられる。

一方で、ナノ DDS の MITF-siRNA のデリバリーへの応用については、*in vitro* の段階での検討の結果、B16 への導入は必ずしも効率は高くなく、さらなる改変が必要であろうと考えられた。この点については、RNA 内包ナノ粒子が細胞膜を透過する透過性の効率の問題、RNA の安定性、とくにナノ粒子外からのヌクレアーゼの攻撃にたいしてナノ DDS がどの程度のバリア機能を発揮できるか、細胞内にデリバリー後の RNA のナノ DDS からのリリースの効率の問題、等を個々に検証する必要があると考えられる。さらに *in vivo* での投与、とくに経皮的なナノ DDS の投与の場合、角質を透過する必要があるため、この際の透過性と安定性（ナノ粒子自体の安定性と内包された RNA の安定性）を最大化する技術が必要となる。本研究ではこれらの点は未解明として残されたので、今後の課題として検討を続ける必要がある。

RNAi を用いた MITF ノックダウンの実験が示唆する、メラノーマ治療に対する方向性のひとつは、上記のように siRNA 自身を治療のためのツールとして用いようとするものであるが、べつの方向性としては、MITF を標的分子とするメラノーマの分子標的療法が極めて有効であろうとの展望があり、MITF-siRNA を用いた結果からは、たとえばどの程度の抑制効果をどの程度の期間得られれば治療効果が期待できるかが推測されるものと期待できる。この方向性にとつて、本研究では MITF を標的とする細胞内透過ペプチドを数種合成し、これらを用いたメラノーマへの添加実験を行い、MITF の特異的機能阻害を誘導する検討を行ったが、いずれのペプチドも MITF の転写活性、メラニン合成能、および B16 の *viability* を著明に低下させるには至らなかった。しかしながら、ペプチドの配列予測、とくに構造計算に基づくたんぱく：たんぱく相互作用を抑制するペプチドの *prediction* は現状では極めて困難なのが実情である。今後の課題として、MITF を抑制する膜透過型ペプチドを作成できれば、siRNA では困難であった、合成、保存、そして投与方法の問題が容易になり、実際に臨床応用が行いやすい分子標的医薬に siRNA よりも近い成果がもたらされるであろうと考えられるため、今後配列をさらにソフィステイケートしたペプチドを種々試みて確立していく必要があるものと考えられる。

以上のように、RNAi-based の MITF 抑制は、メラノーマの新しい治療法となりうる可能性があるが、さらに IL-12 免疫療法を併用することにより、相乗的なメラノーマ抑制効果が発揮される可能性が示された。この併用療法によるメラノーマ抑制は、メラノーマ

に極めて特異性が高いことが期待できる。この治療法を臨床的に実現するためには、siRNA を効率的、かつ安全に患者腫瘍内にトランスフェクションする技術を開発するか、あるいは siRNA を使わずに薬剤等で MITF を抑制するか、いずれかの方法が確立する必要がある。前者については我々が検討したナノ DDS が、有力な候補と考えられるが、今回の研究ではまだ満足のいく結果が得られておらず、siRNA の配列と標的細胞の性質に応じた分子デザインと投与方法の改変を今後とも続けていく必要であると考えられる。後者については、ペプチドによる分子標的療法を試みたところ、細胞内導入と MITF の抑制に寄与する配列のそれぞれについてさらなる向上を行う必要性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Nakai N, Katoh N, Kitagawa T, Ueda E, Takenaka H, Kishimoto S. Immunoregulatory T cells in the peripheral blood of melanoma patients treated with melanoma antigen-pulsed mature monocyte-derived dendritic cell vaccination
J Dermatol Sci. 54 (1): 31-37, 2009. (査読有)
- ② Nakai N, Katoh N, Germeraad WT, Kishida T, Ueda E, Takenaka H, Mazda O, Kishimoto S. Immunohistological analysis of peptide-induced delayed-type hypersensitivity in advanced melanoma patients treated with melanoma antigen-pulsed mature monocyte-derived dendritic cell vaccination
J Dermatol Sci. 53(1):40-47, 2009 (査読有)
- ③ Nakai N, Katoh N, Kitagawa T, Ueda E, Takenaka H, Kishimoto S. Evaluation of survival in Japanese stage IV melanoma patients treated with melanoma antigen-pulsed mature monocyte-derived dendritic cells.
J Dermatol. 35(12):801-3, 2008 (査読有)

- ④ Kishida, T., H. Asada, K. Kubo, Y. Sato, M. Shin-Ya, J. Imanishi, K. Yoshikawa & O. Mazda
Pleiotropic Functions of Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen-1 (EBNA-1) and oriP Differentially Contribute to the Efficacy of Transfection/expression of Exogenous Gene in Mammalian Cells
J. Biotechnol. 133 (2): 201-207, 2008
(査読有)
- ⑤ Kishida, T., Y. Hiromura, M. Shin-Ya, H. Asada, H. Kuriyama, M. Sugai, A. Shimizu, Y. Yokota, T. Hama, J. Imanishi, Y. Hisa & O. Mazda
IL-21 induces inhibitor of differentiation 2 (Id2) and leads to complete abrogation of anaphylaxis in mice.
J. Immunol. 179 (12): 8554-8561, 2007
(査読有)

[学会発表] (計 1 件)

- ① Tsuji M, Nakai N, Ueda E, Takenaka H, Katoh N, Kishimoto S. Double Cancer of Planter Malignant Melanoma and Vulvar Extramammary Paget's Disease. The 10th China-Japan Joint Meeting of Dermatology. 2008 Oct 30-Nov 2; Hangzhou, China.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

(平成 19 年 4 月—平成 20 年 6 月)
浅田 秀基 (Hidetsugu Asada)
京都府立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号：20399041

(平成 20 年 7 月—21 年 4 月)
岸本 三郎 (Saburo Kishimoto)
京都府立医科大学・医学研究科・教授
研究者番号：90079913

(2) 研究分担者

(平成 19 年 4 月—平成 20 年 6 月)
岸本 三郎 (Saburo Kishimoto)
京都府立医科大学・医学研究科・教授