

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：83901
 研究種目：基盤研究（A）
 研究期間：2008～2012
 課題番号：20249062
 研究課題名（和文） Nek2 を標的にした包括的癌治療法の開発とそのトランスレーショナルリサーチ
 研究課題名（英文） Comprehensive cancer therapy targeted Nek2 and translational research
 研究代表者
 二村 雄次（NIMURA YUJI）
 愛知県がんセンター（研究所）・名誉総長
 研究者番号：80126888

研究成果の概要（和文）：

大腸癌皮下発癌モデルに対して Nek2 siRNA と S1 併用投与群は Nek2 siRNA 単独投与群より有効であった。Nek2 siRNA と CDDP 併用投与群においても有効であり、相加効果であった。ラットでの Nek2 siRNA の血中移行は局所投与後 15min で最高となり 60min でほぼ消失していた。また Nek2 siRNA の毒性試験より無毒性量 (NOAEL: No Observed Adverse Effect Levels) は 3.7 (mg/kg) で、Nek2 siRNA の最大推奨初期投与量 (MRSD: Maximum Recommended Starting Dose) は 0.0285 (mg/kg) であった。

研究成果の概要（英文）：

The combination treatment using Nek2 siRNA and S1 suppressed the tumor growth in colorectal cancer model, more efficiently than Nek2 siRNA. The combined treatment of Nek2 siRNA with CDDP was also more effective than the administration of Nek2 siRNA alone. The combination exerted additive growth inhibition. The transmission of Nek2 siRNA to blood was the highest at 15 min and was less than 0.2 μ M (0.04% of doses). Nek2 siRNA disappeared within 1 h after the administration. No abnormalities in blood tests were observed. The No Observed Adverse Effect Level (NOAEL: No Observed Adverse Effect Levels) was 3.7 (mg/kg). Based on the data, we decided the Maximum Recommended Starting Dose (MRSD) as 0.0285 (mg/kg).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	17,500,000	5,250,000	22,750,000
2009年度	7,147,618	2,160,000	9,307,618
2010年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2012年度	3,100,000	930,000	4,030,000
総計	37,547,618	11,280,000	48,827,618

2009年度は補助金を返金しているため、交付確定額を記入している。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：NeK2, 分子標的治療、トランスレーショナルリサーチ

1. 研究開始当初の背景

近年、診断法、手術手技の発達、癌に対する新たな治療法としての分子標的治療薬などが開発され消化器癌の多くは治療成績が漸

次向上しつつある。しかし膵癌は解剖学的、腫瘍学的特性より浸潤転移をおこしやすい難治性悪性腫瘍であり、手術以外に有効な治療法がなく、根治術可能症例の5年生存率は

未だ約 15%と治療成績は極めて不良である (Isaji S et al. *Pancreas*. 2004;28(3):231-4.)。膵癌は原発巣の切除が可能な場合でも、肝転移、腹膜播種のために手術適外になることも少なくなく、また拡大リンパ節郭清、他臓器合併切除などの拡大手術をおこなっても生存率などの予後の改善には貢献しないことが明らかになっている (Nimura Y, Nagino M, et al. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2012;19:225-229.)。また肝門部胆管癌においてもその根治切除例の 5 年生存率は 20-30%であり胆膵領域癌の治療成績は未だ満足すべきものではない。かかる現状から現在の治療法だけによる胆膵領域癌の治療には限界があり、新たな治療法の開発が必要である。

われわれは癌特異的遺伝子 Nek2 (NIMA related kinase 2) を標的とした siRNA による分子標的治療法を開発している。Nek2 は染色体の分裂に関わるセリンスレオニンキナーゼで、これまでの研究において胆管癌、膵癌をはじめとする様々な癌での Nek2 の高発現および増殖、浸潤との関連、さらに Nek2 siRNA を用いて、マウス胆管癌皮下発癌モデルでの腫瘍増殖抑制および腹膜播種モデルでの生存期間の延長に成功している (Kokuryo T et al. *Cancer Res*. 2007 ;67(20):9637-42.)。siRNA の臨床応用に関して解決しなければならない問題として安全性の確立と薬剤投与方法がある。安全性に関しては、安全性試験、毒性試験を行う。また siRNA の薬剤投与方法に関してはウイルスベクターを使用し生体内で siRNA を合成させる Endogenous delivery 法と合成した siRNA を生体内へ投与する Exogenous delivery 法がある。Endogenous delivery 法では、毒性などのためヒトに安全に使用できるウイルスベクターがまだ開発されておらず、早期の臨床応用は困難である。一方 Exogenous delivery 法では、siRNA の効果発現が、生体内のヌクレアーゼによる易分解性のため不安定であり siRNA の安定性の向上、標的臓器への特異的な投与方法、さらに細胞への効率的な導入方法が必要とされている。Exogenous delivery 法としてバイオコーラゲンをを用いた siRNA の薬剤投与方法を行なう。

癌は多段階の遺伝子変異により発生し、複数の癌特異的遺伝子の発現により癌の複雑な病態が作り出されると考えられる。Nek2 siRNA の単独投与のような単一遺伝子のみを標的とした分子標的治療には限界があると考えており、効果的な癌治療のためには、Nek2 siRNA 分子標的治療と既存の抗癌剤治療、放射線治療を融合させた新たな包括的治療

の開発が重要である。

2. 研究の目的

癌における Nek2 siRNA の成果を基に包括的治療法の開発、そのトランスレーショナルリサーチへの発展応用、さらに臨床への応用を目的とする。

3. 研究の方法

(1) Nek2 の基礎的研究と臨床病理学的研究

胆管癌、膵癌細胞株への Nek2 siRNA の投与後、DNA アレイ法による網羅的遺伝子解析をおこない、シグナル伝達系、特に免疫誘導に関するシグナルについて検討する。

(2) Nek2 siRNA の前臨床研究

ラットを用いて Nek2 siRNA の単回投与、複数回投与後の安全性試験、毒性試験を行なう。

(3) 抗癌剤、放射線との併用による包括的治療法の開発

胆管癌、膵癌由来細胞株を用いて Nek2 siRNA と抗癌剤、放射線併用時の Nek2 の発現抑制およびその効果について検討する。

(4) 担癌動物実験モデルを用いた包括的治療法の効果および安全性の検討

腹膜播種モデル、肝転移モデルを用いて抗癌剤と Nek2 siRNA 同時投与下の Nek2 siRNA の癌細胞への導入効率、抗腫瘍効果、副作用の有無を明らかにする。

(5) 外科手技を併用した薬剤投与方法の開発

腹膜播種モデル、肝転移モデルの結果をもとに、リザーバーまたは徐放性カプセルを用いた siRNA の門脈内投与、腹腔内直接注入など腫瘍局所に持続的投与方法の確立およびその効果を検討する。

(6) Nek2 siRNA 包括的分子標的治療法のトランスレーショナルリサーチ

胆管癌、膵癌症例を選択しトランスレーショナルリサーチをおこなう。

4. 研究成果

(1) Nek2 の基礎的研究と臨床病理学的研究

胆管癌細胞株 HuCCT1、膵癌細胞株 KLM へ Nek2 siRNA の投与し、その 24 時間後に DNA アレイ法による網羅的遺伝子解析をおこなった。Nek2 siRNA の投与の有無により異なる遺伝子群の発現を認めており、これらの遺伝子に関する機能解析を行っている。胆管癌症例 100 例に対して real time PCR による Nek2 発現の検討を行ない、Nek2 の発現と術後生存期間との関連性について検討した。Nek2 の発現は正常部と比較して癌部で上昇していた。Nek2 の高発現症例における術後生存期間は、

低発現量症例より有意に短く、予後不良であったが、有意差を認めなかった。また Nek2 の発現量と腫瘍マーカーCA19-9 には相関を認めしたが、CEA には相関を認めなかった。

(2) Nek2 siRNA の前臨床研究

非 GLP 下の Nek2 siRNA の毒性試験を行った。神経学的異常所見、血液学的異常所見は認めなかった。Nek2 siRNA の抗腫瘍効果のための有効量は、腫瘍容積約 1cm³ あたり 148 μg であり、無毒性量 (NOAEL : No Observed Adverse Effect Levels) は 3.7(mg/kg)、ヒト等価用量 (HED : Human Equivalent Dose) は 0.57 (mg/kg) であった。これらの結果より Nek2 siRNA の最大推奨初期投与量 (MRSD : Maximum Recommended Starting Dose) が 0.0285 (mg/kg) であることを明らかにした。

(3) 抗癌剤、放射線との併用による包括的治療法の開発

胆管癌、膵癌細胞株において Nek2 siRNA と 5FU の併用投与は増殖抑制と細胞死の亢進に有効であり、相加効果であった。また胆管癌細胞株への Nek2 siRNA と 5FU または CDDP の併用投与後の遺伝子発現について DNA アレイ法を用いて網羅的遺伝子解析を行った。併用投与群においては Nek2 siRNA 単独投与、抗癌剤単独投与群の場合とは異なる遺伝子群の発現を認め、EGR1 を同定した。EGR1 に対する shRNA (short hairpin RNA) を作成し、恒常的に EGR1 の抑制が可能な膵癌細胞株 KLM1 の樹立を行った。この細胞株を用いたインベーションアッセイにより EGR1 が浸潤に関与していることを明らかにした。

さらに大腸癌細胞株に関しても Nek2 siRNA と CDDP 併用投与後の遺伝子発現について PCR アレイによる遺伝子解析を行った。この結果アポトーシス関連遺伝子である BCL2L1 およびカスパー活性関連遺伝子である APAF-1 (apoptotic protease activating factor 1) の亢進を認め、増殖に関連する遺伝子である FOS と JUN の減弱を認めた(表 1)。

(4) 担癌動物実験モデルを用いた包括的治療法の効果および安全性の検討

大腸癌皮下発癌モデルに対して Nek2 siRNA の単独投与群と S1 単独投与群はほぼ同様の効果があり、Nek2 siRNA と S1 併用投与群では Nek2 siRNA 単独投与群、S1 単独投与群と比較して有効性を認めるも有意差はなかった。しかし Nek2 siRNA と CDDP 併用投与群においては相加効果を認めた(図 1)。

膵癌細胞株 KLM によるマウス腹膜播種モデル、ラット肝転移モデルを用いて抗癌剤投与時の Nek2 siRNA 同時投与による癌細胞への導入効率、副作用の検討を行った。併用による

副作用等は認めなかった。

(5) 外科手技を併用した薬剤投与法の開発

膵癌肝転移モデルを作成し、蛍光標識した Nek2 siRNA を投与した。蛍光顕微鏡により Nek2 siRNA の肝臓への導入は認めしたが、肝転移への特異的な集積は認めなかった。

(6) Nek2 siRNA 包括的分子標的治療法のトランスレーショナルリサーチ

Nek2 siRNA をラット血清に投与し、各濃度 (0-500 μM) に調整し、血清中の Nek2 siRNA をノーザンブロット法にて測定した。Nek2 siRNA の同定は 1 μM まで可能であり、濃度依存性を認めた。standard exposure では Nek2 siRNA は同定できなかつたため、long exposure による検討を行なった。Nek2 siRNA (500 μM) をラット皮下に投与し、投与後経時的 (5, 15, 30, 60 min) に採血を行ない、各時間での血清中の Nek2 siRNA をノーザンブロット法にて測定した。Nek2 siRNA の血中移行は投与後 15min で最高となり、0.2 μM (投与量の 0.04%) 以下であった(図 2)。また Nek2 siRNA の多くは分解されており、投与後 60min にてほぼ消失していた。

名古屋大学倫理委員会により膵癌手術不能症例に対する Nek2 siRNA の局所投与によるトランスレーショナルリサーチとして承認され、現在 GMP 基準の Nek2 siRNA を作成している。GMP 基準の Nek2 siRNA 完成後、Nek2 siRNA のヒトへの投与を開始する。

Suppressed genes
TNF, CDKN2A, MMP1, GZMA, FOS, IFNA1, ITGB3, JUN, TNFRSF25, SERPINE5, SERPINE1, MCAM, PLAUR, S100A4
Over expressed genes
FGFR, BRCA1, ITGAV, PDGFA, ITGA2, MYC, NFKB1, PIK3R1, BCL2L1, VEGFA, MET, ITGB5, ITGA3, APAF1, RB1, PDGFB, RAF1, MTSS1, CHEK2, FAS

表 1. 大腸癌細胞株に対する Nek2 siRNA と CDDP 併用投与後の遺伝子発現

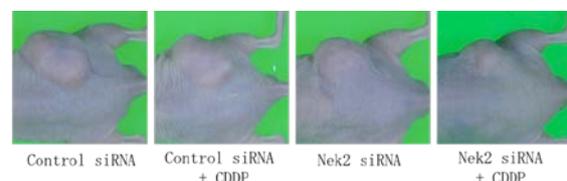
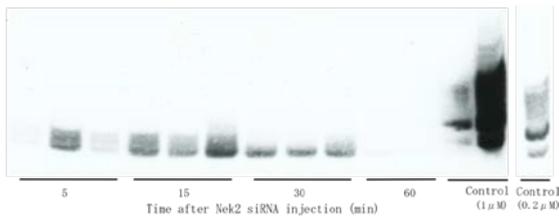


図 1. 大腸癌皮下発癌モデルでの Nek2 siRNA と CDDP 併用投与における抗腫瘍効果



投与後時間 (min)	5	5	5	15	15	15	30	30	30	60	60	Control (1 μM)	Control (0.2 μM)
Nek2 siRNA算出濃度 (μM)	0.022	0.114	0.034	0.110	0.077	0.158	0.069	0.058	0.068	0.021	0.023		

図2. Nek2 siRNA 局所投与による血中移行の経時的変化

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- (1) Fukutomi A, Furuse J, Okusaka T, Miyazaki M, Taketsuna M, Koshiji M, Nimura Y. Effect of biliary drainage on chemotherapy in patients with biliary tract cancer: an exploratory analysis of the BT22 study. HPB (Oxford). 14(4):221-7, 2012 査読有
- (2) Takayama Y, Kokuryo T, Yokoyama Y, Ito S, Nagino M, Hamaguchi M, Senga T. Silencing of Tausled-like kinase 1 sensitizes cholangiocarcinoma cells to cisplatin-induced apoptosis. Cancer Lett. 296(1): 27-34, 2010 査読有
- (3) Suzuki K, Kokuryo T, Senga T, Yokoyama Y, Nagino M, Hamaguchi M. Novel combination treatment for colorectal cancer using Nek2 siRNA and cisplatin. Cancer Sci. 101(5) :1163-1169, 2010 査読有
- (4) Okusaka T, Nakachi K, Fukutomi A, Mizuno N, Ohkawa S, Funakoshi A, Nagino M, Kondo S, Nagaoka S, Funai J, Koshiji M, Nambu Y, Furuse J, Miyazaki M, Nimura Y. Gemcitabine alone or in combination with cisplatin in patients with biliary tract cancer: a comparative multicentre study in Japan. Br J Cancer. 103(4):469-74, 2010 査読有

[学会発表] (計5件)

- (1) 第67回 日本消化器外科学会総会 2012.7.19. 富山国際会議場(富山) 國料俊男, 横山幸浩, 江畑智希, 菅原 元, 高橋 祐, 伊神 剛, 深谷昌秀, 上原圭介, 板津慶太, 吉岡裕一郎, 榑野正人. Nek2 siRNAの非臨床試験と臨床応用
- (2) AACR 103rd annual meeting Apr 1, 2012. McCormick Place (Chicago, USA) Kokuryo T, Yokoyama Y, Nagino M. The

efficiency of Nek2 siRNA for liver metastasis of pancreatic cancer.

- (3) AACR 102nd annual meeting

Apr 4, 2011.

Orange County Convention Center (Orlando, USA)

T Kokuryo, Y Yokoyama, K Suzuki, T Ebata, N Tsunoda, T Igami, G Sugawara, M Fukaya, Y Takahashi, K Uehara, Y Yoshioka, M Nagino. The combination treatments using siRNA and CDDP are effective therapeutic options for cancers.

- (4) JDDW 2010

2010.10.15.

パシフィコ横浜 (神奈川県)

國料俊男, 横山幸浩, 榑野正人. siRNAを用いた癌分子標的治療のトランスレシヨナルリサーチ

- (5) AACR 101st annual meeting.

Apr 19, 2010.

Walter E. Washington Convention Center (Washington DC, USA)

Kokuryo T, Senga T, Yokoyama Y, Nagino M, Hamaguchi M. Nek2 as an effective molecular target for cancer treatment.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計0件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

- (1) 研究代表者

二村 雄次 (NIMURA YUJI)

愛知県がんセンター（研究所）・名誉総長
研究者番号：80126888

(2) 研究分担者

佐野 力 (SANO TSUYOSHI)
愛知県がんセンター（研究所）・腫瘍病理
学部・研究員
研究者番号：60303632
安部 哲也 (ABE TETSUYA)
愛知県がんセンター（研究所）・疫学・予
防部・研究員
研究者番号：90378092 (H20, H22)
棚野 正人 (NAGINO MASATO)
名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教
授
研究者番号：20237564
横山 幸浩 (YOKOYAMA YUKIHIRO)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：80378091
國料 俊男 (KOKURYOU TOSHIO)
名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・講
師
研究者番号：60378023
千賀 威 (SENGA TAKESHI)
名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准
教授
研究者番号：80419431
西尾 秀樹 (NISHIO HIDEKI)
名古屋大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30345891 (H20, H21)

(3) 連携研究者