

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09327

研究課題名(和文) siRNA結合ナノパーティクルを用いた膠芽腫に対する標的遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文) Development of targeted gene therapy for glioblastoma using siRNA crosslinked nanoparticle

研究代表者

福井 直樹 (Fukui, Naoki)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・講師

研究者番号：30752167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫において、腫瘍幹細胞を排除する治療法を開発するために、幹細胞特異的に機能する標的分子の効率的な阻害する方法の確立が必要である。本研究では、葉酸を結合したキトサンを主成分とするナノパーティクルを用いて、膠芽腫幹細胞の増殖を制御するCD146に対するsiRNAを腫瘍細胞へデリバリーする遺伝子治療法の開発を目的とした。マウスとヒト神経膠腫細胞において、このナノパーティクルの高効率な取込みが観察された。さらに、このナノパーティクルの投与はマウス神経膠腫モデルにおいて腫瘍の増殖を抑制し、完治せしめた。これらの結果は、ナノパーティクルによる遺伝子治療法が膠芽腫に対して有用であることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的に様々なナノパーティクルを用いた遺伝子治療法の開発が加速している。腫瘍の中でも極めて予後不良のである膠芽腫に対する革新的な治療法が求められている。siRNAを用いた腫瘍の遺伝子治療法の開発に、動物モデルながらも本ナノパーティクルの有用性と安全性を示唆することが出来た。また、CD146遺伝子が膠芽腫の治療標的として有望な分子であることも証明出来た。ナノパーティクルやCD146に対する阻害剤の今後の開発により最悪性の腫瘍でも回復出来る可能性を向上させることが期待出来る。

研究成果の概要(英文)：Establishment of platform evaluating stem cell-specific inhibition effect of target molecules is required to develop new therapy eliminating glioma stem cells. In this study, we employed chitosan polysaccharide lactate nanoparticles conjugated with folic acid-polyethylene glycol for delivery of CD146 small-interfering RNA (siRNA) to glioma cells and tissues. We observed in vivo accumulation of the FA-PEG-COL NPs in subcutaneous and intracranial gliomas following NP administration via mouse tail vein. Evaluation of the in vivo therapeutic effects of siCD146 cross-linked NPs in a mouse glioma model revealed significant suppression of intracranial tumor growth, with complete removal of the tumor observed in some mice by histologic examination. CD146 is a potential therapeutic target and folic acid-conjugated NPs delivering siRNA may facilitate gene therapy in malignant gliomas.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：膠芽腫 遺伝子治療 ナノパーティクル

## 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は、集学的治療法の開発を以てしても大きな予後の改善が得られていない原発性脳腫瘍であり、長年、革新的な治療法の開発が望まれている。治療成績の向上が得られない原因として、膠芽腫は、正常脳組織に活発に浸潤することや放射線療法や化学療法といった既存の治療法に対して高い治療抵抗性を示し、腫瘍の再発を来することが知られている。その治療抵抗性の一部は腫瘍内に存在する腫瘍幹細胞に起因している<sup>1)</sup>。膠芽腫の腫瘍幹細胞は、高い造腫瘍性を保持し、放射線や化学療法に対して低い感受性を示すために治療後も残存し、腫瘍再発を招いている。また、膠芽腫が幹細胞と分化細胞が混在した細胞集団であることは、この腫瘍の高い組織学的及び形態学的多様性を生み出し、免疫や治療から逃避しやすい腫瘍微小環境の構築に貢献していると考えられる。このような腫瘍幹細胞の性質からこの細胞を標的とした治療法の開発が期待されている。現時点ではよく知られた幹細胞性に関連する遺伝子を標的とした薬剤を用いた治療法の開発が進められている。

スフェロイド培養は幹細胞の集団を増加させ、膠芽腫を含む神経膠腫の幹細胞を分析するのに用いられる方法である。我々は、マウス神経膠腫細胞をスフェロイド培養に移すと様々ながんの転移浸潤関連遺伝子の発現上昇を伴い、浸潤能が亢進することを報告した<sup>2)</sup>。また、これらの遺伝子の中で CD146 は、ヒト膠芽腫幹細胞でも高発現し、細胞周期を制御していることを明らかにした<sup>3)</sup>。CD146 は、当初は悪性黒色腫の進展と転移のマーカーとして同定されたイムノグロブリンスーパーファミリーに属する遺伝子で、多くの腫瘍で高発現し、腫瘍の浸潤や転移、薬剤抵抗性との相関性が示唆されている<sup>4)</sup>。我々の研究では、siRNA (small interfering RNA)を用いて CD146 を発現抑制すると細胞周期の制御を介して腫瘍幹細胞の増殖が阻害されることが分かった。CD146 遺伝子は、神経膠腫の WHO グレード III 以上で発現頻度が高く、膠芽腫や悪性神経膠腫に対する治療標的分子であることが考えられた。しかしながら、生体内の脳腫瘍組織内において、腫瘍幹細胞を標的として CD146 遺伝子を抑制することで治療効果が得られるかどうかは明らかになっていなかった。

siRNA を用いた RNA 干渉は標的分子の発現を低下させるパワフルなツールであり、様々な疾患の遺伝子治療において選択的に任意の RNA を標的化する有望な技術である。siRNA を用いた遺伝子治療の大きな欠点は、生体内における RNA の不安定な性質にある。この問題を解決するために、ナノパーティクルはキャリアーや RNA の安定化剤として用いられてきた。ナノパーティクルは、1-100 nm 程度の大きさで定義され、治療用分子を安定に効率よく腫瘍にデリバリーする媒体として開発されてきた。キトサンは、非毒性かつ生分解性の天然多糖で高い生体適合性の分子であり、生物医学の領域で汎用されたよく知られた高分子である<sup>5)</sup>。

膠芽腫におけるナノパーティクルを用いた治療法は十数年来、研究されてきた。それらの多くは、抗がん剤のデリバリーにナノパーティクルを用いて腫瘍部位における抗がん剤の濃度を局所的に上昇させることで治療効果の向上と副作用の低減化を目指したものであった。一方、様々ながんの遺伝子治療において、siRNA のデリバリーにナノパーティクルを用いた研究が数多く報告されているが、膠芽腫の遺伝子治療においてナノパーティクルを応用した研究は、極僅かである。

## 2. 研究の目的

マウス神経膠腫モデルにおいて葉酸を結合したキトサンを主成分とするナノパーティクルを用いた CD146 に対する siRNA のデリバリーによる遺伝子治療の効果を検討し、CD146 の治療標的分子としての評価を行う。

### 3. 研究の方法

(1) ナノパーティクルの合成。高い溶解性と低い粘度、高度な脱アセチル化を示す低分子のキトサンオリゴ糖乳酸 (COL) を使用した。これにポリエチレングリコール(PEG)のリンカーを介して葉酸 (FA) を結合した FA-PEG-COL 溶液からトリポリリン酸(TPP)を用いて調製し、ナノパーティクル (FA-PEG-COL NPs) を形成した。

(2) 腫瘍細胞のナノパーティクル取込み頻度の測定。FITC または AlexaFluor 647 でラベルしたナノパーティクルを用いた。神経膠腫の培養細胞に添加し、48 時間後に細胞を回収し、フローサイトメトリーにてナノパーティクルの取込みを計測した。また、マウス神経膠腫モデルにおいて、腫瘍細胞移植 3 週後に尾静注でナノパーティクルを投与し、腫瘍組織への集積や標的遺伝子の発現減少を観察した。

(3) CD146 を標的とする siRNA のデリバリーによる遺伝子治療法の効果の検討。培養細胞とマウス神経膠腫モデルにおいてこの遺伝子治療の腫瘍抑制効果を観察した。マウス内における腫瘍の増殖は、ルシフェリン投与によりルシフェラーゼを発現する腫瘍細胞の増減を *in vivo* イメージャーを用いて経時的に計測した。

(4) 本遺伝子治療による腫瘍抑制機構の検討。治療実験のマウス神経膠腫モデルの腫瘍組織について、H&E 染色、または Ki-67 と Vimentin の発現を免疫組織化学染色により評価した。ヒト膠芽腫幹細胞において、CD146 リガンドの一つガレクチン 1 に対する阻害剤の細胞増殖に対する効果を測定した。CD146 の KD(ノックダウン)後の間葉系細胞への転換効率を細胞化学染色により評価した。

### 4. 研究成果

(1) FA-PEG-COL NPs(ナノパーティクル)の性質。調製した NPs は正に荷電し、走査電顕により 100 nm 程度の球状であることが確かめられた(図 1)。また、溶血、リンパ球に対する細胞毒性、赤血球の凝集といった血液適合性には問題が無かった。また、siRNA は、本ナノパーティクルに結合することで、血清中における安定性が大きく向上することが確認されている。

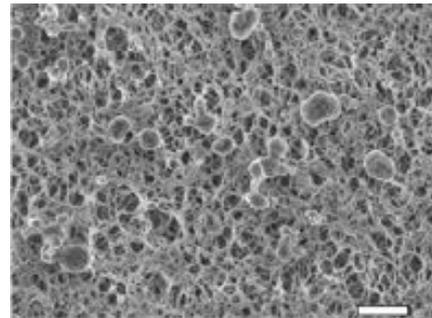


図 1 ナノパーティクルの走査電子顕微鏡像 Bar = 100 nm

(2) 神経膠腫細胞の NPs の取込み頻度。ヒト神経膠腫細胞と腫瘍組織において、RT-PCR により、葉酸受容体の発現を検討した。一つの細胞株を除いて、発現が確認され、葉酸(FA)を結合したナノパーティクルによる標的化が可能と考えられた。次に、マウスとヒト神経膠腫の培養細胞において、NPs の取込みをフローサイトメトリーを用いて測定した。FA を非結合の NPs(PEG-COL NPs) と結合した NPs (FA-PEG-COL NPs) では、葉酸を結合した NPs で取込み頻度や量の増加が観察された。腫瘍細胞を標的とする場合の葉酸の有用性が示された。さらに、CD146 に対する siRNA を結合した FA-PEG-COL NPs を投与したマウス脳腫瘍モデルにおいて、腫瘍組織内で FA-PEG-COL NPs を取り込んでいる細胞は CD146 を発現していなかったことから、FA-PEG-COL NPs による siRNA のデリバリーで CD146 のノックダウンが可能であることが示された。また、重要なことに、腫瘍血管の内皮細胞の殆どが FA-PEG-COL NPs を取り込んでいなかったことから、本 FA-PEG-COL

NPs の腫瘍特異性が考えられた。

(3) 葉酸結合ナノパーティクルを用いた siCD146 を標的とする遺伝子治療の効果。腫瘍細胞のマウス脳内移植後 4 週間、週に一度、尾静脈から FA-PEG-COL NPs を用いて siRNA を投与した (図 2)。

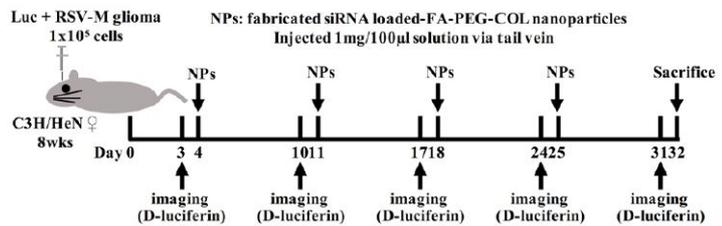


図 2 本遺伝子治療のプロトコール

CD146 に対する siRNA を投与したマウス (siCD146/NPs) では増殖抑制が観察された (図 3) <sup>6)</sup>。

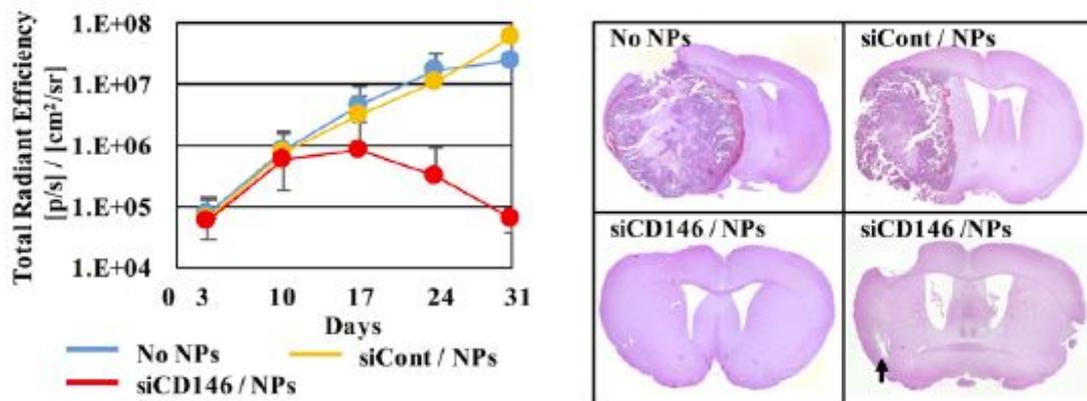


図 3 本遺伝治療の抗腫瘍効果。腫瘍の増殖 (左) 脳組織像 (右)

組織学的解析は、対照のマウスにおいて大きな腫瘍塊がある一方、治療を 4 週間受けたマウスは小さな腫瘍か腫瘍がないか以前腫瘍があった部位に僅かな痕跡のみであった。これらの結果は、FA-PEG-COL NPs を用いた siRNA のデリバリーによる CD146 のノックダウンが腫瘍細胞の増殖を抑制したことを示唆している。マウス神経膠腫モデルの治療実験における腫瘍組織の解析では、Ki-67 と Vimentin の減少が観察されたことから、本遺伝子治療は腫瘍の細胞増殖を抑制と同時に間葉系への細胞の転換 (Proneural-Mesenchymal Transition: PMT) を抑制する可能性が考えられた。

(4) CD146 の阻害による腫瘍抑制機構の検討。CD146 のリガンドであるガレクチン 1 と 3 に着目し、その膠芽腫幹細胞の増殖制御における機能を検討した。ガレクチン阻害剤 OTX-008 は膠芽腫幹細胞の増殖を抑制した。ガレクチン 1 の添加は、部分的に抑制効果をキャンセルし、増殖を回復させた。ガレクチン 3 ではこの活性は観察されなかった。膠芽腫の幹細胞の増殖をガレクチン 1 が制御していることが示唆された。また、CD146 を KD した細胞で間葉系タイプへの分化誘導を試みると間葉系に分化し難いことが観察され、この遺伝子の膠芽腫の PMT への関与が考えられた。

(5) 膠芽腫に対する本遺伝子治療は、以下の特徴や長所により構成されている。 ナノパーティクルの EPR 効果が得られる適切な大きさや高い生体適合性による腫瘍組織特異的な集積と安全性の担保。 葉酸を結合したナノパーティクルによる悪性度の高い葉酸受容体を発現している細胞への能動的な siRNA のデリバリー。 siRNA を用いた幹細胞特異的遺伝子の抑制による膠芽腫幹細胞の標的化。つまり、ナノパーティクルの工夫によって、組織、細胞レベルでの標的化を可能にし、siRNA の標的遺伝子によって標的とする細胞種や表現型も厳密に限定可能な治

療法であり、大きな治療効果と安全性の向上が見込まれる。

膠芽腫はトランスクリプトーム解析により Proneural、Neural、Classical、Mesenchymal(間葉系)を含む4グループに分類される<sup>(7)</sup>。このうち間葉系グループに属する膠芽腫は予後不良であることが報告されている。様々な腫瘍の間葉系の表現型は発がん、浸潤、転移、生存期間と関連している。本遺伝子治療で発現抑制したCD146遺伝子は、間葉系幹細胞のマーカーとしても知られ、浸潤能、血管新生、治療抵抗性が高い間葉系タイプの膠芽腫幹細胞を誘導することが明らかにされている<sup>(8)</sup>。つまり、本遺伝子治療によるCD146の発現抑制は、膠芽腫の多面的な病態に関わる形質を根本から阻害する治療法である可能性が高い。

#### <引用文献>

Singh S.K., Clarke I.D., Hide T., et al., Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene*, 23, 2004, 7267-73.

Nonaka M., Yawata T., Takemura M., et al., Elevated cell invasion in a tumor sphere culture of RSV-M mouse glioma cells. *Neurol Med Chir (Tokyo)*, 55, 2015, 60-70

Yawata T., Higashi Y., Kawanishi Y., et al., CD146 is highly expressed in glioma stem cells and acts as a cell cycle regulator. *J Neurooncol*, 144, 2019, 21-32

Johnson J.P., Rothbacher U., Sers C., The progression associated antigen MUC18: a unique member of the immunoglobulin supergene family. *Melanoma Res*, 3, 1993, 337-40

Cheung R.C., Ng T.B., Wong J.H., et al., Chitosan: an update on potential biomedical and pharmaceutical applications. *Mar Drugs*, 13, 2015, 5156-86

Fukui N., Yawata T., Nakajo T., et al., Targeting CD146 using folic acid-conjugated nanoparticles and suppression of tumor growth in a mouse glioma model. *J Neurosurg*, 134, 2020, 1772-1782

Phillips H.S., Kharbanda S., Chen R., et al.: Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*, 9, 2006, 157-73

Bhat K.P.L., Balasubramanian V., Vaillant B., et al.: Mesenchymal differentiation mediated by NF- $\kappa$ B promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer Cell*, 24, 2013, 331-46

## 5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Fukui Naoki, Yawata Toshio, Nakajo Takahito, Kawanishi Yu, Higashi Youichirou, Yamashita Tatsuyuki, Aratake Takaaki, Honke Koichi, Ueba Tetsuya	4. 巻 134
2. 論文標題 Targeting CD146 using folic acid-conjugated nanoparticles and suppression of tumor growth in a mouse glioma model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 1772-1782
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3171/2020.4.JNS193078	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 福井直樹、八幡俊男、上羽哲也	4. 巻 46
2. 論文標題 siRNA結合ナノパーティクルを用いた膠芽腫に対する標的遺伝子治療法の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 779-782
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 -
1. 著者名 Morisawa Shumpei, Jobu Kohei, Ishida Tomoaki, Kawada Kei, Fukuda Hitoshi, Kawanishi Yu, Nakayama Taku, Yamamoto Shinkuro, Tamura Naohisa, Takemura Mitsuhiro, Kagimoto Nao, Ohta Tsuyoshi, Masahira Noritaka, Fukuhara Hideo, Ogura Shun-ichiro, Ueba Tetsuya, Inoue Keiji, Miyamura Mitsuhiro	4. 巻 37
2. 論文標題 Association of 5-aminolevulinic acid with intraoperative hypotension in malignant glioma surgery	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Photodiagnosis and Photodynamic Therapy	6. 最初と最後の頁 102657 ~ 102657
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pdpdt.2021.102657	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 Hamada Tomoya, Aratake Takaaki, Higashi Youichirou, Ueba Yusuke, Shimizu Takahiro, Shimizu Shogo, Yawata Toshio, Ueba Tetsuya, Nakamura Rina, Akizawa Toshifumi, Fujieda Mikiya, Saito Motoaki	4. 巻 61
2. 論文標題 Zinc-aggravated M1 microglia regulate astrocytic engulfment via P2×7 receptors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Trace Elements in Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 126518 ~ 126518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtemb.2020.126518	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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川西 裕, 濱田史泰, 上羽佑亮, 門田知倫, 中居永一, 福田 仁, 福井直樹, 上羽哲也
2. 発表標題 悪性脳腫瘍に対するPDD/PDT
3. 学会等名 日本蛍光ガイド手術研究会第4回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川西 裕, 宇高恵子, 八幡俊男, 藤田昇平, 西本祥大, 上羽佑亮, 中居永一, 福田 仁, 福井直樹, 上羽哲也
2. 発表標題 悪性神経膠腫に対するWT1-W10免疫療法
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川西 裕, 宇高恵子, 八幡俊男, 藤田昇平, 西本祥大, 上羽佑亮, 中居永一, 福田 仁, 福井直樹, 上羽哲也
2. 発表標題 悪性神経膠腫に対するWT1-W10免疫療法
3. 学会等名 第80回日本脳神経外科総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八幡俊男、藤田昇平、福井直樹、川西裕、西本祥大、上羽哲也
2. 発表標題 膠芽腫幹細胞におけるCD146の機能とその関連遺伝子の発現阻害による増殖抑制機構の検討
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 八幡俊男、福井直樹、川西裕、上羽哲也
2. 発表標題 膠芽腫幹細胞が高発現するCD146の機能とその阻害による腫瘍増殖抑制機構の検討
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川西裕、宇高恵子、八幡俊男、藤田昇平、西本祥大、濱田史泰、竹村光広、中居永一、福井直樹、福田仁、上羽哲也
2. 発表標題 悪性神経膠腫に対するWT1-W10免疫療法
3. 学会等名 第81回日本脳神経外科学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤田昇平、八幡俊男、福井直樹、川西裕、西本祥大、上羽哲也
2. 発表標題 膠芽腫幹細胞におけるCD146の発現阻害による増殖抑制機構の検討
3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022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	上羽 哲也  (Ueba Tetsuya)  (00314203)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授    (16401)	

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	八幡 俊男  (Yawata Toshio)  (40380323)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教     (16401)	

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