

平成 27 年 5 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390322

研究課題名(和文) 癌微小環境の制御を目指す抗YB-1 miRNA/デコイ発現による難治癌治療

研究課題名(英文) Development of YB-1-silencing miRNA/ decoy gene therapy against intractable solid tumor to regulate malignant microcircumstances

研究代表者

中野 賢二 (Nakano, Kenji)

九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・教授

研究者番号：00315061

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍血管を制御が期待できる「抗YB-1 miRNA/デコイ発現プラスミド、及びmiRNAの活性を増大するexportin-5 (Xpo-5)とargonaute 2 (Ago-2)発現プラスミド」を作成して、難治固形癌にも有効性が期待できる遺伝子治療を検討した。脾癌腹膜播種マウスにおいて抗YB-1 miRNA/デコイ及びXpo-5/Ago-2プラスミドを高分子ミセルに内包して腹腔内投与した。腫瘍の抑制は認められたものの、有意な生存期間の延長に至らなかった。腫瘍組織の免疫染色で微小血管密度の抑制を認めたが、高分子ミセル局在は腫瘍辺縁部に限局し、より浸透性の高い導入方法を用いた試みが期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to develop YB-1 silencing miRNA/ decoy gene therapy against intractable solid tumors to regulate tumor angiogenesis. Block/homo-polyplex micelles, which encapsulate YB-1 miRNA/decoy expression plasmid with and without exportin-5 (Xpo-5) and argonaute-2 (Ago-2) plasmids, were intraperitoneally administered in nude mice harboring disseminated pancreatic cancer. The disseminated tumors were inhibited in the YB-1 miRNA/decoy alone and the combination treatment groups compared with the controls, but there was no significant prolongation of survival between the treatment and control groups. The microvascular density was decreased in tumor tissues treated with miRNA/decoy compared with the controls. However, the localization of micelles was limitedly detected in the peripheral area of tumor tissues. These results suggest that YB-1 silencing is promising strategy for antiangiogenesis treatment and more efficient transduction devices may resolve the issues.

研究分野：消化器外科

キーワード：YB-1 miRNA デコイ 癌微小環境 血管新生 遺伝子治療

## 1. 研究開始当初の背景

癌の悪性化に癌間質の腫瘍血管、マクロファージ等の関与が明らかとなり、治療耐性が生じにくい癌間質を標的とする治療法の有望性が示唆される。腫瘍血管や腫瘍関連マクロファージの生存/悪性形質を規定する標的を見出すことが重要となる。

多剤耐性等に関連する転写因子YB-1は多くの癌細胞に高発現し、核内移行(活性化)YB-1は予後不良因子とされる[業績 #8, #15, #18]。近年、このYB-1は癌細胞のみならず腫瘍血管に特異的に高発現していることが報告され[Takahashi M, et al: Cancer Sci 2010, 101; 1367-73]、腫瘍関連マクロファージにも発現が亢進しているという基礎データも得ているが、腫瘍血管や腫瘍関連マクロファージにおける生物学的意義、治療標的としての有用性は未だ不明である。

RNA 干渉による遺伝子発現の抑制は *in vitro* においては siRNA 導入で可能であるが、*in vivo* での導入を可能にするデリバリーシステムはなく、短期間で分解され抑制効果の持続は期待できない。一方、miRNA は siRNA と異なり、ウイルスベクターによる治療応用の試みが行われている[Lanford RE, et al: Science 2010; 327, 198-201]。分担者：片岡らは高い遺伝子発現を呈する高分子ミセル型遺伝子ベクターの開発に成功しており、高分子ミセル内包 miRNA 導入による発現抑制は初めての試みとなる。

miRNA は exosome 内包[Valadi H, et al: Nat Cell Biol 2007; 9, 654-9] や argonaute2(Ago2)との複合体[Arroyo JD, et al: PNAS 2011; 108, 5003-8]の形態で血液/体液中に分泌され、バイオマーカーとしての診断応用が着目されている。今回、Ago2 を miRNA と同時に発現させ細胞死に伴い周囲に miRNA を作用させる分泌型抗 YB-1 miRNA 核酸治療の抗腫瘍効果を初めて検討する。また、細胞内移入 + 癌標的化ペプチドを利用した癌治療が報告され[Sugahara KN, et al: Cancer Cell 2009; 16, 510-20]、本研究でも Bystander 効果を得る為に、細胞内移入ドメインと融合させた YB-1 不活化デコイを分泌型ペプチドとして発現させ周囲に作用させる分泌型デコイ遺伝子治療を合わせて検討する。

## 2. 研究の目的

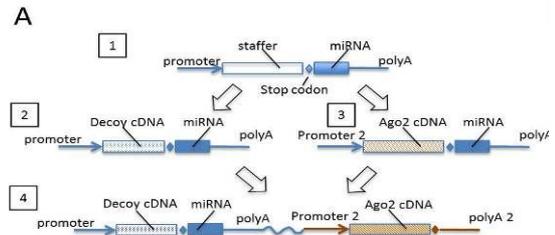
本研究の目的は、申請者が見出した YB-1 発現に対する高い抑制核酸配列を基に、bystander 効果や YB-1 活性化阻害作用を有する抗 YB-1 分泌型 miRNA/デコイ発現遺伝子を構築し、標的化素子 cRGD を搭載した高分子ミセルを用いて、癌細胞のみ

ならず癌微小環境の制御により難治性膀胱癌、肝転移、腹膜播種にも有効な遺伝子・核酸治療を開発し、薬物動態・毒性評価を行って、臨床応用への基盤を整えることにある。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 抗 YB-1 分泌型 miRNA/デコイ及び Ago2/Xpo5 発現遺伝子の構築 (図)

抗 YB-1 miRNA 単独発現プラスミド遺伝子を作成。



細胞移入ドメイン融合抗 YB-1 デコイ + miRNA 発現プラスミド遺伝子の構築：YB-1 デコイと細胞内移入ドメイン TAT ペプチドを融合したペプチドの cDNA を miRNA の上流に組込む。

Ago2 及び Xpo-5 発現プラスミド遺伝子を構築。

上記で作成した遺伝子を連結させて、同時に発現するプラスミド遺伝子を作成。

### 3-2. 腫瘍血管内皮における YB-1 の生物学的意義の検討

#### 増殖能

Multi-well plate に撒いた HUVEC 及び HPAEC 血管内皮細胞に抗 YB-1 siRNA または Control siRNA を導入し、24, 48, 72 時間後の細胞数を両群間で比較する。

#### 管腔形成能

抗 YB-1 siRNA または Control siRNA を導入した HUVEC 細胞を、増殖因子(-)マトリゲル上に撒き直し、7 時間後にゲル内に形成してくる毛細血管様の管腔を顕微鏡下に観察し、1 視野内の管腔の長さの和を両群間で比較する。

#### 癌細胞との相互作用 (背部皮下法)

癌細胞 YB-1 発現の血管新生への影響を検討する為に、*ex vivo* にて siRNA を用いて YB-1 抑制した癌細胞株あるいは control siRNA 導入癌細胞をミリポアチャンパー内に封入し、マウス皮下に埋込んで 5 日後に皮膚を採取して、実体顕微鏡にて観察し 1 視野内の新生血管数を比較する。

遺伝子治療後、腫瘍組織を採取し、YB-1, CD31(血管内皮マーカーの免疫染色を施行し、微小血管密度(MVD)を miYB-1/decoy 治療群と対照群で比較する。

### 3-3. 腫瘍関連マクロファージにおける YB-1 の生物学的意義

皮下腫瘍組織をミンソ / 酵素処理後に磁気ビーズにて腫瘍関連マクロファージ (TAM) を単離。腹腔内マクロファージ: 対照群と YB-1 発現の比較を行う。遺伝子治療後、腫瘍組織を採取し、YB-1, F4/80 (マクロファージマーカー) の免疫染色及を施行し、腫瘍関連マクロファージ (TAM) 数を対照群と比較する。

### 3-4. 抗腫瘍効果の評価

癌細胞 (Luc 安定発現株) を移植して、腹膜播種マウスモデルを作成。抗 YB-1 分泌型 miRNA / デコイ 遺伝子内包高分子ミセル、および Ago-2 または Xpo-5 遺伝子内包ミセルを腹腔内投与し、IVIS イメージングにて経時的に腫瘍量を定量化し、腫瘍増殖抑制効果と生存期間を対照群と比較する。

### 3-4. 薬物動態・安全性評価

蛍光 (Fluolid) 標識した高分子ミセルを腹腔内投与し、高分子ミセルの腫瘍組織局在を検討する。遺伝子内包高分子ミセル投与し、体重測定と血液一般・生化学検査を施行。

## 4. 研究成果

### 1) YB-1 の腫瘍血管における意義

血管内皮 HUVEC, HPAEC は YB-1 siRNA 導入は増殖を有意に抑制した (図 1)。機序として、細胞周期解析にて cell cycle 促進タンパクの抑制が、アポトーシス解析にて軽度のアポトーシス誘導が認められた。

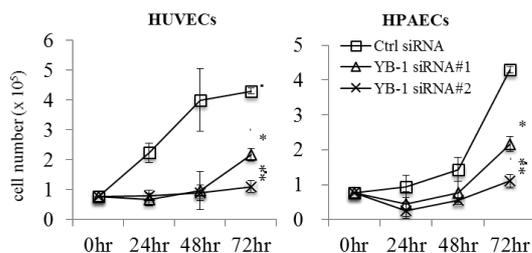


図 1 . YB-1 発現抑制による血管内皮増殖抑制

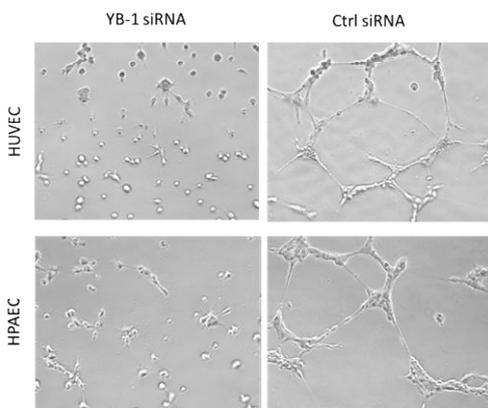


図 2 . YB-1 発現抑制による血管内皮管腔形成能の抑制

また、YB-1 siRNA 導入は、血管内皮の有意な管腔形成能も阻害した (図 2)。

In vivo における腫瘍血管における YB-1 の意義を検討する為に、miRNA / decoy 発現プラスミドを高分子ミセルに内包して、マウス腓膵癌皮下腫瘍に局所投与したところ、CD31 免疫染色で YB-1 抑制によって著明に微小血管密度の減少を認めた (図 3)。

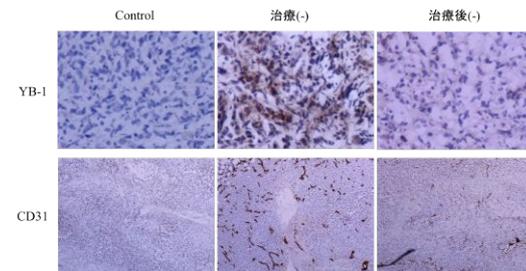


図 3 . YB-1 miRNA / decoy 遺伝子導入後のマウス皮下腫瘍における微小血管密度

以上の結果より、腫瘍血管に特異的に高発現する YB-1 は、腫瘍血管内皮の増殖および管腔形成に重要な働きをしていることが明らかとなった。

YB-1 は癌細胞にも高発現することが知られ、癌細胞と血管内皮の相互作用に関して、マウス背部皮下法にて検討した。YB-1 をノックダウンした腓膵癌 (図 4) ・乳癌細胞を背部皮下に移植しても、有意な新生血管の抑制は認められなかった。YB-1 は検討した癌細胞の血管増殖因子の発現への関与は大きくないものと考えられた。

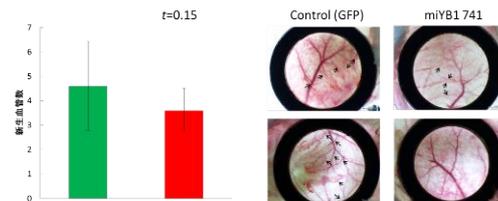


図 4 . マウス背部皮下法による血管新生の検討

一方、腫瘍関連マクロファージ (TAM) に関しては血管新生を促進する因子として知られているが、マウス皮下腫瘍の TAM とコントロールとして正常マウスの腹腔内マクロファージで検討したところ、YB-1 発現の差は認めず (図 5)、miRNA / decoy 発現プラスミド局所投与した皮下腫瘍においても、対照群と TAM 数の差を認めなかった。

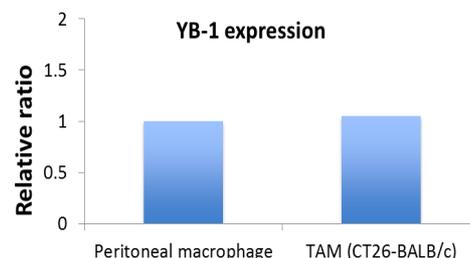


図 5 . マウス皮下腫瘍 TAM における YB-1 発現

以上の結果より、YB-1 は癌細胞あるいは TAM を介した機序というより、血管内皮細胞に直接的に血管新生を促進するシグナルとして働いていることが示唆された。

## 2) 治療効果

YB-1 発現を抑制する遺伝子治療の効果、難治とされる膵癌の腹膜播種モデルも用いて検討した。まず、YB-1 miRNA/ decoy 発現群において、対照群と比較して腫瘍の増大は抑制されるものの、その差は有意差に至らなかった(図6)。

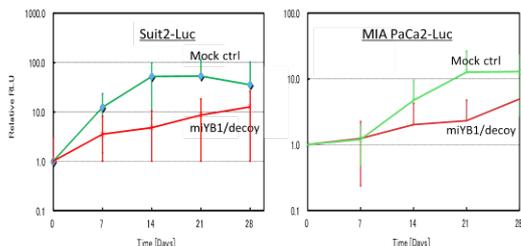


図6．膵癌腹膜播種モデルにおける高分子ミセル内包 YB-1 miRNA/ decoy 発現プラスミド投与後の IVIS イメージングによる腫瘍量の評価

その為、miRNA の阻害活性を増幅する因子 Ago-2, Xpo-5 を同時に遺伝子発現する治療法を次に試みた。しかし、腹膜播種モデルとも腫瘍抑制は軽度認められたが (Suit2-luc は day22 に有意差あり: 図7)、その差は著明ではなく、生存期間の延長も認められなかった(図8)。

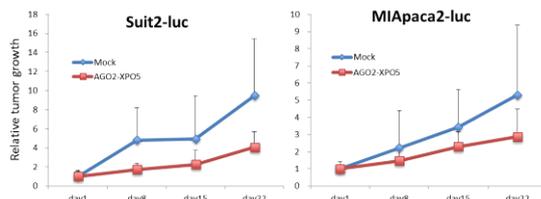


図7．膵癌腹膜播種モデルにおける高分子ミセル内包 YB-1 miRNA/ decoy + Ago2/Xpo-5 発現プラスミド投与後の IVIS イメージングによる腫瘍量の評価

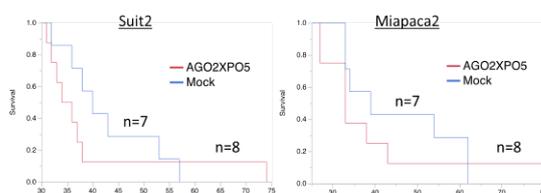


図8．膵癌腹膜播種モデルにおける高分子ミセル内包 YB-1 miRNA/ decoy + Ago2/Xpo-5 発現プラスミド投与後の Kaplan-Meier 生存曲線

## 3) 薬物動態・安全性評価

その要因として、我々は別の実験系ではあるが、同じブロック・ホモ高分子ミセルを用いた腹腔内遺伝子導入モデルにおいて、蛍光標識した高分子ミセルの体内分布を検討したところ、腫瘍における局在は周辺部に限局しており、腫瘍全体に遺伝子導入が達成できていないことが明らかとなった(図9)。

一方、安全性に関しては、体重変化・血液検査にて問題がないことは確認できている(非公開データ)。

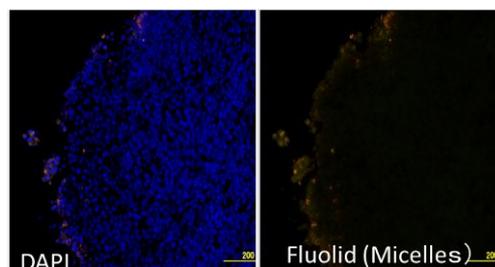


図9．蛍光 Fluolid 標識高分子ミセルの腹腔内投与後の腹膜播種腫瘍組織における局在

腹膜播種に対して治療分子を腹腔内投与する場合、血管内腔から癌細胞・腫瘍血管に治療遺伝子が主に送達されることは考えにくい。分担：片岡らが成果を報告している cRGD 標的化素子の架橋も、大きく送達効率・治療効果を亢進することは可能性として低いと考えられた。本研究で用いたブロック・ホモ高分子ミセルは血中投与に最適化した構造ではないため、新たに遺伝子キャリアを含めた治療戦略の再考察が必要と考えられた。

YB-1 発現阻害は血管新生・癌の増殖を著明に抑制し、癌特異性も高いことから、今後、腫瘍での浸透性がより高いと考えられる YB-1 阻害核酸を用いた研究へと発展させる予定である。

## 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 8 件)すべて査読有

Cui L, Osada K, Imaizumi A, Kataoka K, Nakano K: Feasibility of a subcutaneously administered block/homo-mixed polyplex micelle as a carrier for DNA vaccination in a mouse tumor model. J Control Release 2015, in press

Furugaki K, Cui L, Kunisawa Y, Shinkai K, Tanaka M, Kataoka K, Nakano K: Intraperitoneal transduction of tumor-associated antigen, CD40L and GM-CSF genes by polyplex micelle elicits vaccine effect in mouse tumor models. Plos One 9(7); e101854, 2014.

Matsushita S, Onishi H, Nakano K, Nagamatsu I, Imaizumi A, Hattori M, Oda Y, Tanaka M, Katano M: The Hedgehog Signaling Pathway is a Potential Therapeutic Target for Gallbladder

Cancer. Cancer Sci 105(3): 272-80, 2014; DOI: 10.1111/cas.12354.

Nagamatsu I, Onishi H, Matsushita S, Kubo M, Kai M, Imaizumi A, Nakano K, Hattori M, Oda Y, Tanaka M, Katano M: NOTCH4 Is a Potential Therapeutic Target for Triple-negative Breast Cancer. Anticancer Res. 2014; 34(1): 69-80.

Morifuji Y, Onishi H, Iwasaki H, Imaizumi A, Nakano K, Tanaka M, Katano M: Reoxygenation from chronic hypoxia promotes metastatic processes in pancreatic cancer through the Hedgehog signaling. Cancer Sci 105(3): 324-33, 2014; doi: 10.1111/cas.12348.

Ohgidani M, Furugaki K, Shinkai K, Kunisawa Y, Itaka K, Kataoka K, Nakano K: Block/homo polyplex micelle-based GM-CSF gene therapy via intraperitoneal administration elicits antitumor immunity against peritoneal dissemination and exhibits safety potentials in mice and cynomolgus monkeys. J Control Release 2013, 167(3): 238-247; doi: 10.1016/j.jconrel.2013.02.006.

Odate S, Nakamura K, Onishi H, Kojima M, Uchiyama A, Nakano K, Kato M, Tanaka M, Katano M: TrkB/BDNF signaling pathway is a potential therapeutic target for pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. Lung Cancer. 2013;79(3):205-14. doi: 10.1016/j.lungcan.2012.12.004.

Iwasaki H, Nakano K, Shinkai K, Kunisawa Y, Hirahashi M, Oda Y, Onishi H, Katano M: Hedgehog Gli3 activator signal augments tumorigenicity of colorectal cancer via upregulation of adherence-related genes. Cancer Sci. 2013; 104(3):328-36. doi: 10.1111/cas.12073. Epub 2013 Jan 10.

〔学会発表〕(計 16 件)

崔林、古垣浩一、新海健太郎、田中雅夫、中野賢二：非ウイルスベクターを用いた DNA ワクチンによる難治癌に対する集学的治療への試み。第 115 回日本外科学会定期学術集会 2015 年 4 月 16~18 日(名古屋)。

Cui L, Furugaki K, Osada K, Kataoka K, Nakano K: Tumor-associated antigen gene-loading polyplex micelle is a

promising platform for anti-cancer DNA vaccine. AACR Annual Meeting 2015, April 18-22, 2015 (Philadelphia, USA)

新海健太郎、中野賢二、大西秀哉、田中雅夫、片野光男：膵癌における YB-1 高発現の生物学的意義に関する検討。第 27 回日本バイオセラピー学会学術集会総会 2014 年 12 月 4-5 日(大阪)

Shinkai K, Nakano K, Onishi H, Tanaka M, Katano M: Y-box binding protein-1 is involved in tumor angiogenesis and a promising therapeutic target. ESMO 2014 Congress, Sep 28, 2014, (Madrid, Spain)

崔林、新海健太郎、岩崎寛智、片野光男、田中雅夫、片岡一則、中野賢二：新規癌遺伝子ワクチンとしての腫瘍関連抗原遺伝子を内包した高分子ミセルの安全性と治療効果の検討。第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014 年 4 月 3 日~5 日(京都)

新海健太郎、中野賢二、岩崎寛智、大西秀哉、田中雅夫、片野光男：固形腫瘍の血管新生に寄与する YB-1 の治療標的としての有用性。第 114 回日本外科学会定期学術集会 2014 年 4 月 3 日~5 日(京都)

崔林、新海健太郎、岩崎寛智、片野光男、田中雅夫、片岡一則、中野賢二：非ウイルス型遺伝子キャリアを用いた新規がん治療ワクチンの開発。第 26 回日本バイオセラピー学会学術集会総会(ワークショップ) 2013 年 12 月 4 日~5 日(盛岡)

古垣浩一、国澤由美、扇谷昌宏、新海健太郎、坂井綾、片野光男、田中雅夫、中野賢二：非ウイルスベクターを用いた消化器がんに対する新規遺伝子ワクチン療法の開発。第 68 回日本消化器外科学会総会(ワークショップ) 2013 年 7 月 18 日~20 日(宮崎)

Nakano K: Novel DNA vaccine platform: tumor-associated antigen/ adjuvant genes-loading polyplex micelle for cancer therapy. 第19回日本遺伝子治療学会(口演) 2013年7月4日~6日(岡山)

Wakata A, Okubo Y, Fukuhara T, Cohen JB, Glorioso JC, Nakano K, Kumagai I, Kuroki M, Hamada H, Uchida H: Syncytial mutations augment the oncolytic potential of a fully retargeted herpes simplex virus vector. 第19回日本遺伝子治療学会(プリナリーセッション) 2013年7月4日~6日(岡山)

古垣浩一、扇谷昌宏、新海健太郎、国澤由美、坂井綾、相島慎一、片野光男、田中雅夫、中野賢二

**賢二**：新規ベクターを用いた肺癌に対する新規免疫遺伝子治療法の開発。第30回日本呼吸器外科学会（ポスター）2013年5月9日～10日（名古屋）

新海健太郎、岩崎寛智、大西秀哉、田中雅夫、**片野光男**、**中野賢二**：膵癌の腫瘍形成能および血管新生における Y-box binding protein-1 の意義：膵癌と癌周囲微小環境の多角的制御による治療への展開。第113回日本外科学会定期学術集会（ワークショップ）2013年4月11日～13日（福岡）

Iwasaki H, **Nakano K**, Onishi H, **Katano M**: Hedgehog Gli3 signal contributes to anchor-independent growth and tumorigenicity for colorectal cancer. ESMO 2012 (poster), September 28-October 2, 2012 (Vienna, Austria)

扇谷昌宏、古垣浩一、新海健太郎、国沢裕美、**片岡一則**、**中野賢二**：非ウイルス型ベクター高分子ミセルの腹腔内投与による膵癌に対する GM-CSF 遺伝子治療。第25回日本バイオセラピー学会学術集会総会（倉敷）2012年12月13-14日（ワークショップ）

Ohgidani M, Furugaki K, Shinkai K, Kunisawa Y, Itaka K, **Kataoka K**, **Nakano K**: Block/homo polyplex micelle-based GM-CSF gene therapy via intraperitoneal administration elicits antitumor immunity against peritoneal dissemination and exhibits safety potentials in mice and cynomolgus monkeys. AACR Special Conference: Tumor Immunology, Dec 2-5, 2012, (Miami, FL)

**中野賢二**：腫瘍血管を標的とする非ウイルス型デリバリーシステムを用いた miRNA 治療：治療抵抗性の腹膜播種・膵臓癌に対する新たな治療戦略。第112回日本外科学会定期学術集会（シンポジウム）2012年4月12-14日（千葉）

〔図書〕（計 1 件）

**中野賢二**：分子細胞治療フロンティア 2015. “次世代の難治癌個別化治療に向けた DDS 搭載遺伝子ワクチンの開発”、飯田橋パピルス（東京）2014. Pp147-156.

〔産業財産権〕  
出願状況（計 4 件）

名称：Antisense anticancer agents.  
発明者：**Kenji Nakano**, Satoru Obika, Tsuyoshi Yamamoto

権利者：国立大学法人九州大学、他  
種類：特許  
番号：US 62/023067  
出願年月日：2014年7月10日  
国内外の別：国外

名称：Anti-tumor DNA vaccine  
発明者：**Kenji Nakano**  
権利者：国立大学法人九州大学  
種類：特許  
番号：PCT/JP2014/060356  
出願年月日：2014年4月5日  
国内外の別：国外

名称：Anti-tumor DNA vaccine  
発明者：**中野賢二**  
権利者：国立大学法人九州大学  
種類：特許  
番号：特許願 2013-079854  
出願年月日：2013年4月5日  
国内外の別：国内

名称：アポトーシス誘導剤及び癌治療薬  
発明者：**中野賢二**、**片岡一則**、西山伸宏  
権利者：国立大学法人九州大学、他  
種類：特許  
番号：特許願 2012-089772  
出願年月日：2012年4月10日  
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://redoxnavi.kyushu-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
中野 賢二 (NAKANO, Kenji)  
九州大学・先端融合医療レドックスナビ研究拠点・教授  
研究者番号：00315061

(2) 研究分担者  
片野 光男 (KATANO, Mitsuo)  
九州大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：10145203

(3) 研究分担者  
片岡 一則 (KATAOKA, Kazunori)  
東京大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号：00130245