

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293088

研究課題名(和文) 難治性疾患に対するmiRNA補充療法の開発

研究課題名(英文) Development of miRNA replacement therapy

研究代表者

黒田 雅彦 (Masahiko, Kuroda)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：80251304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、miRNA補充療法のプラットフォーム開発を行い、既存の手法では完治ができない特発性肺線維症や肺がんなどの難治性疾患治療の臨床応用を目指した。その結果、Pre-miR-451の構造に着目し、30塩基まで短縮化することに成功した。この短縮型mimic miRNAは、*in vitro*及び*in vivo*の検討から、自然免疫応答が低減される核酸であることが明らかとなった。さらに、本プラットフォーム構造によって作製したmicroRNA-34aは、Ras導入マウス肺がん発生モデルで治療効果を示し、ghRNAがmiRNA補充療法における製剤プラットフォームとして臨床応用可能であることが示された。

研究成果の概要(英文)：MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that regulate gene expression and fundamental cell processes such as development, differentiation, proliferation, and apoptosis. Reduced or elevated expression of miRNAs has been implicated in the development of various human diseases, including cancer. Therefore, miRNA replacement therapy represents a promising approach for the treatment of lung cancer. In this project, we developed a 30-nucleotide single-strand RNA, termed "guide hairpin RNA (ghRNA, ghR)", that has a physiological function similar to miRNA. The ghR caused no innate cytokine response either *in vitro* or *in vivo*. In addition, systemic and local injection of ghR-form miR-34a (ghR-34a) suppressed tumor growth in a mouse model of RAS-induced lung cancer. This novel RNA interference (RNAi) technology may provide a novel, safe, and effective nucleic acid drug platform that will increase the clinical usefulness of nucleic acid therapy.

研究分野：人体病理学

キーワード：miRNA miR-34 miR-29 IPF Dicer Ago 非小細胞性肺がん

1. 研究開始当初の背景

近年、疾患の原因分子に直接的に作用する分子標的医薬が注目されている。既にインフリキシマブ、イマチニブ、リツキシマブ等の分子標的治療薬が開発され、臨床での有効性を示すエビデンスが蓄積されている。しかしながら、既存の分子標的治療薬では有効な疾患に限られており、また Ras など細胞内伝達物質や c-Myc などの転写因子に対しては、既存の抗体医薬、低分子化合物では完全に作用を阻害できない。そのため、miRNA を含めた核酸医薬の新たな治療薬のイノベーションが必要となってきた。これまで、我々、研究代表者のグループは、(1)RNase 活性のある血清中に安定的に miRNA が存在すること、(2)種々のがん患者血清中に特異的な miRNA の発現が低下すること、(3)血清中の miRNA はエクソソームに存在し細胞間での移行があること、などを明らかにし、(4)がん特異的に結合し miRNA を送達するエクソソームの開発に成功し、さらに (5) siRNA と比べて、物理的安定性や分解酵素耐性が向上した長鎖一本鎖 RNA 分子から構成される独自の新規 RNA の開発に成功し、肺線維症モデルでの治療効果を確認している。このような、我々の核酸技術と DDS (Drug delivery system) によって、革新的な miRNA 補充療法の開発が期待できると考えた。

2. 研究の目的

microRNA (miRNA) は 20 塩基長前後の小 RNA で、生体の様々な生理活性を制御する。従来手法では標的にできない分子に対してこの miRNA を用いた治療が期待されている。これまで我々は、種々の疾患における臨床応用を前提に研究を行い(1)エクソソームを利用した miRNA の DDS の開発、(2)標的細胞指向性の核酸医薬品の開発、(3)治療標的となる miRNA の単離、を行ってきた。この研究成果を踏まえ、本研究では、Dicer 非依存型 miRNA のプラットフォームの開発を行い、局所ならびに全身投与の miRNA 補充療法によって、既存手法では完治できない特発性肺線維症や肺がんなどの難治性疾患治療の臨床応用を目指した。

3. 研究の方法

(1)Dicer 活性の低いがん細胞でも効果を発揮する補充型 miRNA プラットフォームの開発:

一般的にがん細胞は、Dicer の活性が低いため、miRNA の発現量が低下していると考えられている。従って miRNA の補充療法を検討する際は、Dicer 非依存的な miRNA の Ago2 の取り込みが重要と考える (Nature 425:584,2010, Science 328:1694,2010)。このような背景から、すでに我々は、loop sequence 構造を有する miRNA を合成し検討を行って

おり、具体的には、抗腫瘍効果と標的分子が明らかな hsa-miR-34a を用いて検討し、loop sequence の重要な配列を同定、さらに Dicer 非依存的な miR-144 の配列を参考にして検討を行った。

(2)特発性肺線維症(IPF)モデルマウスにおける miRNA 補充療法の検討:

miRNA 補充療法の臨床適応を考慮すると、これまでに有効な治療薬がない疾患であること、疾患の原因として miRNA の減少が明らかになっていること、有効な DDS が存在すること、の 3 つの点が重要である。この点を考慮して我々は 2 つの疾患を考えた。1 つは特発性肺線維症 (IPF) である。これまでに我々は、独自の一本鎖核酸を用い TGFβ を標的にして、特発性肺線維症モデルマウスで、その効果を確認している。一方で、TGFβ の効果があるのは IPF の初期病変のみであることも指摘されている。このような背景の中で我々は、TGFβ など線維化に關与する遺伝子を抑制的に制御する miR-29b に注目した。実際に miR-29b は線維化の原因となる遺伝子を抑制する。本研究では、補充型 miR-29b の最適な配列を決定し、プレオマイシン誘発マウス肺線維症モデルを用いて検討を行った。

(3) 肺がんモデルマウスにおける miRNA 補充療法の検討:

肺がんは、最も予後の悪いがんの 1 つである。近年肺がんのドライバー遺伝子である、EGFR や ALK に対する分子標的医薬品が上市されているが、5 年生存率は依然として低く、初期に分子標的医薬品に反応した肺がんが治療抵抗性になる症例が多い。このような背景から、我々は肺がんの miRNA スクリーニングを行い、幾つかの治療標的になる miRNA を同定した。既に報告もあるが、中でも、miR-34 は予後の悪い肺がんで発現が減少し、標的分子が CDK4、CDK6、Bcl-2 などで、最も効果的に肺がん細胞を細胞死に誘導し、尚かつ細胞周期も停止させるという作用を有する miRNA であることがわかっている。我々は、早期の miRNA 補充療法の臨床応用を目指すため、miR-34 を選択した。28 年度ではすでに技術的に確立している経肺の吸入型 DDS により作製した RAS 変異肺がんモデルマウスを用いて in vivo 検討を行った。

4. 研究成果

(1)Dicer 活性の低いがん細胞でも効果を発揮する補充型 miRNA プラットフォームの開発:

本研究において、miRNA の中で唯一 DICER に依存しないで発現する Pre-miR-451 の構造に着目し、RNA 干渉効果を保ちながら 30 塩基まで短縮化することに成功した (図 1)

短縮型が抑制Mimic microRNAの開発

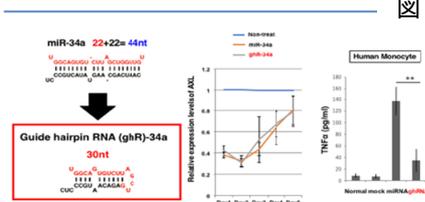
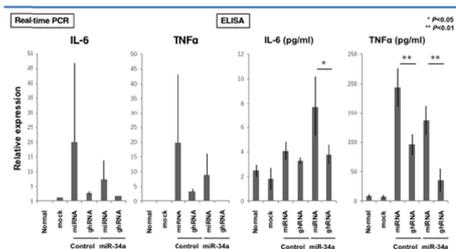


図 1

さらに、この短縮型 mimic miRNA は、RNAi 干渉を誘導する無修飾核酸として最短であり、in vitro 及び in vivo の検討から、自然免疫応答が低減される核酸であることが明らかとなった。(図2)

図2 ghRNA構造は炎症性サイトカインの産生が低減される



この miRNA の短縮化は、miRNA の配列にかかわらず可能であり、補充型 miRNA プラットフォームとして、臨床応用に有望な技術と考えられる。

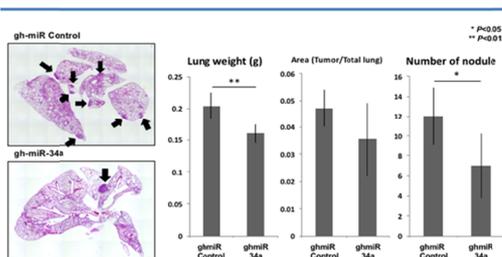
(2) 特発性肺線維症 (IPF) モデルマウスにおける miRNA 補充療法の検討:

IPF のマウスモデルの作製にあたっては、プレオマイシンの誘導モデルを用いた。具体手にはこのマウスモデルにおいては、肺線維症の形成はプレオマイシン投与後 3 週目で起こった。プレオマイシンによる肺線維症を誘導後、miR-29b の経気道的な投与を行った。その結果、miR-29b 投与群では、非投与群に比べ、有意に、線維化巣が減少していた。また、採取した肺におけるコラーゲン遺伝子の mRNA を qPCR 法を用いて発現したところ、コラーゲンの減少が、miR-29b 投与群には観察された。

(3) 肺がんモデルマウスにおける miRNA 補充療法の検討:

今回、我々が開発した miRNA のプラットフォームを応用して、肺がんの miRNA 補充療法の in vivo の評価を行った。具体的には、変異 Ras 導入マウス肺がん発生モデルに対して miR-34 を補充することで、その治療効果を検討した。その結果、図3に示すように経気道的に miR-34 を導入したマウスにおいて、肺がんの結節の数、腫瘍の面積、肺重量の低下が確認された。

図3 ghRNA型のmicroRNA-34a(ghmiR-34a)のRAS導入マウスモデルでの腫瘍抑制



以上の結果は、今回の研究で開発された miRNA のプラットフォーム技術が新規の miRNA 補充量の基盤技術となる事を示すも

のである。本技術は日本及び国外の特許出願も完了している(特許 PCT/JP2014/084508)。今後は本技術を用いて、早期の臨床開発に向けて尽力していきたい。

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 31 件) 全件 査読有

- Oikawa K, Takanashi M, Kuroda M. (7 名 6 番目) PRG4 expression in myxoid liposarcoma maintains tumor cell growth through suppression of an antitumor cytokine IL-24. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017;485(1):209-14. doi:10.1016/j.bbrc.2017.02.055.
- Yamada Y, Takanashi M, Sudo K, Kuroda M. (6 名 6 番目) Novel form of miR-29b suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *PLoS One.* 2017;12(2):e0171957. doi: 10.1371/journal.pone.0171957. 査読有
- Nakaya M, Watari K, Nakaya T, Kuroda M. (21 名 19 番目) Cardiac myofibroblast engulfment of dead cells facilitates recovery after myocardial infarction. *J Clin Invest.* 2017. Jan;127(1):383-401. doi: 10.1172/JCI83822.
- Matsumoto Y, Itami S, Kuroda M, Murakami Y. (6 名 3 番目) MiR-29a Assists in Preventing the Activation of Human Stellate Cells and Promotes Recovery From Liver Fibrosis in Mice. *Mol Ther.* 2016; 24(10):1848-59. doi: 10.1038/mt.2016.127.
- Ohno S, Sudo K, Kuroda M. (12 名 12 番目) Development of Novel Small Hairpin RNAs That do not Require Processing by Dicer or AGO2. *Mol Ther.* 2016; 24(7):1278-89. doi: 10.1038/mt.2016.81.
- Fujinaga H, Watanabe N, Kuroda M. (10 名 10 番目) Cord blood-derived endothelial colony-forming cell function is disrupted in congenital diaphragmatic hernia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016; 310(11):L1143-54. doi:10.1152/ajplung.00357.2015.
- Taketani Y, Usui T, Ohno S, Kuroda M. (12 名 12 番目) Topical Use of Angiopoietin-like Protein 2 RNAi-loaded Lipid Nanoparticles Suppresses Corneal Neovascularization. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2016; 5:e292. doi: 10.1038/mtna.2016.1.
- Kanekura K, Cammack AJ, Mahadevan J, Kuroda M, Urano F. (8 名 5 番目) Poly-dipeptides encoded by the C9ORF72 repeats block global protein translation. *Hum Mol Genet.* 2016; 25(9):1803-13. doi: 10.1093/hmg/ddw052.
- Ohno S, Drummen GP and Kuroda M. (3 名

- 3 番目) Focus on Extracellular Vesicles: Development of Extracellular Vesicle-Based Therapeutic Systems. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17(2). doi: 10.3390/ijms17020172.
10. Takanashi M, Sudo K, Ohno S, Kuroda M. (11 名 11 番目) Novel Types of Small RNA Exhibit Sequence- and Target-dependent Angiogenesis Suppression Without Activation of Toll-like Receptor 3 in an Age-related Macular Degeneration (AMD) Mouse Model. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2015;4:e258.doi: 10.1038/mtna.2015.34
 11. Yoon JH, Sudo K, Kuroda M, Taniguchi T, Weinstein M, Mamura M. (18 名 3 番目) Phosphorylation status determines the opposing functions of Smad2 and Smad3 as STAT3 cofactors in TH17 differentiation. *Nature communications.* 2015 ;6:7600. doi: 10.1038/ncomms8600.
 12. Nakama T, Kuroda M and Ishibashi T. (20 名 19 番目) Inhibition of choroidal fibrovascular membrane formation by new class of RNA interference therapeutic agent targeting periostin. *Gene Ther.* 2015; 22(2):127-37. doi: 10.1038/gt.2014.112.
 13. Toyono T, Usui T, Kuroda M, Amano S. (8 名 6 番目) Angiopoietin-like 7 is an anti-angiogenic protein required to prevent vascularization of the cornea. *PLoS One.* 2015; 10(1):e0116838. doi: 10.1371/journal.pone.0116838.

〔学会発表〕(計 54 件)

1. 黒田雅彦、核酸医薬の臨床応用 (招待講演)、第 384 回 CBI 学会講演会、東京、2017 年 5 月 25 日
2. 黒田雅彦 他、浸潤性乳管癌に出現する let-7 発現細胞の検討、第 106 回日本病理学会総会、東京、2017 年 4 月 29 日
3. 黒田雅彦 他、Mir-34a によるがん抑制遺伝子 BLU の発現制御機構、第 106 回日本病理学会総会、東京、2017 年 4 月 29 日
4. 黒田雅彦 他、RNA 干渉核酸に働く短鎖ヘアピン RNA の探索と機能解析、第 106 回日本病理学会総会、東京、2017 年 4 月 28 日
5. 黒田雅彦 他、miRNA 生成経路を欠損する肺がん細胞株の解析、第 106 回日本病理学会総会、東京、2017 年 4 月 28 日
6. 黒田雅彦、RNA ワールドと肺がん発がん機構、(教育講演) 第 108 回 ACCP 日本部会定期教育講演会、東京、2016 年 10 月 29 日
7. 黒田雅彦、エクソソームの臨床応用、(招待講演) エクソソーム 2016、東京、2016

年 10 月 26 日

8. 黒田雅彦 他、新規ヘアピン型 RNA 干渉核酸の探索と機能解析、第 8 回日本 RNAi 研究会、第 3 回日本細胞外小胞体学会、広島、2016 年 8 月 31 日
9. 黒田雅彦 他、肺線維症に対する miR-29b 補充療法、(医学会奨励賞受賞講演) 第 177 回東京医科大学医学会総会、東京、2016 年 6 月 4 日
10. 黒田雅彦、miRNA 補充療法の開発、第 12 回日本臨床プロテオーム研究会、東京、2016 年 5 月 21 日
11. 黒田雅彦 他、miRNA 生成経路を欠損する肺がん細胞株の解析、第 105 回日本病理学会総会、仙台、2016 年 5 月 12 日
12. 黒田雅彦 他、肺がんにおける Argonaute ファミリーの機能解析、第 105 回日本病理学会総会、仙台、2016 年 5 月 12 日
13. 黒田雅彦 他、乳がん幹細胞の酸化ストレス抵抗性における miR-27a の作用、第 105 回日本病理学会総会、仙台、2016 年 5 月 12 日
14. Kuroda M et.al, Development of novel Dicer- and Ago2-independent small hairpin RNAs, American Society of Gene & Cell Therapy(ASGCT) 19th Annual Meeting, Washington,DC, USA, May 4, 2016.
15. 黒田雅彦、エクソソームが開く新しい医療 (特別講演)、第 19 回日本統合医療学会、山口、2015 年 12 月 12 日
16. 黒田雅彦、エクソソームの臨床応用 (招待講演)、近未来医療フォーラム、東京、2015 年 9 月 1 日
17. 黒田雅彦 他、microRNA の生成経路を欠損する肺がん細胞株の解析、第 12 回日本病理学会カンファレンス、神戸、2015 年 7 月 24 日
18. 黒田雅彦 他、肺線維症に対する miR-29b 補充療法、第 12 回日本病理学会カンファレンス、神戸、2015 年 7 月 25 日
19. 黒田雅彦 他、副作用を軽減した短鎖型核酸医薬の開発、第 12 回日本病理学会カンファレンス、神戸、2015 年 7 月 25 日
20. 黒田雅彦 他、肺線維症に対する miR-29b 補充療法、第 104 回日本病理学会総会、名古屋、2015 年 5 月 2 日
21. 黒田雅彦 他、肺がんにおける Argonaute ファミリーの発現・機能解析、第 104 回日本病理学会総会、名古屋、2015 年 5 月 2 日
22. 黒田雅彦 他、肺がん治療を想定した副作用の少ない短鎖型新規核酸医薬の開発、

- 第 104 回日本病理学会総会、名古屋、2015 年 5 月 1 日
23. Kuroda M et al., Development of novel form of mimic microRNA for lung cancer therapy、AACR Annual Meeting 2015、Philadelphia, Pennsylvania, USA、April 18, 2015
 24. Kuroda M., The development of short form of mimic microRNA for lung cancer therapy、26th EORTC-NCI-ACR Symposium.21th Nov 2014, Barcelona, SPAIN.
 25. 黒田雅彦 他、肺がんを効果的に抑制する Mimic microRNA の新規形状の探索、第 55 回日本肺がん学会学術集会、京都、2014 年 11 月 14 日
 26. 黒田雅彦、核酸医薬品の新展開 (招待講演)、第 32 回日本ヒト細胞学会学術集会、東京、2014 年 8 月 31 日
 27. 黒田雅彦 他、エクソソームによるドラッグデリバリーシステムの応用、第 6 回日本 RNAi 研究会(JARI)、第 1 回日本細胞外小胞学会(JSEV)、広島、2014 年 8 月 28 日
 28. 黒田雅彦 他、がんを効果的に抑制する短縮型 Mimic microRNA の開発、第 33 回分子病理学研究会、宮城、2014 年 7 月 26 日
 29. 黒田雅彦 (オーガナイザー)、核酸医薬品開発に向けて、次世代医薬“核酸医薬”創出に向けた Strategy2014、東京、2014 年 7 月 15 日

〔図書〕(計 2 件)

1. 黒田雅彦 他、医薬ジャーナル社、miRNA の最新知識-基礎領域から診断・治療応用まで-、2017、195 (145-152)
2. 黒田雅彦 他、文光堂、グリオーマ治療の Decesion Marking 脳神経外科診療プラクティス、2016、304 (260-261)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 4 件)

1. 名称：遺伝子発現制御のための人工マッチ型 miRNA およびその用途
発明者：黒田雅彦、大野慎一郎
権利者：株式会社ボナック、学校法人東京医科大学
種類：特許(国内移行に係る出願)
番号：特願 2015-555079 号
出願年月日：2016 年 6 月 24 日
国内外の別：国内

2. 名称：遺伝子発現制御のための人工マッチ型 miRNA およびその用途
発明者：黒田雅彦、大野慎一郎
権利者：株式会社ボナック、学校法人東京医科大学
種類：特許(国内移行に係る出願)
番号：特願 2015-555078 号
出願年月日：2016 年 6 月 23 日
国内外の別：国内
3. 名称：遺伝子発現制御のための人工ミミック miRNA およびその用途
発明者：黒田雅彦、大野慎一郎
権利者：学校法人東京医科大学
種類：特許(国際出願)
番号：PCT/JP2014/084508
出願年月日：2014 年 12 月 26 日
国内外の別：国外
4. 名称：遺伝子発現制御のための人工マッチ型 miRNA およびその用途
発明者：黒田雅彦、大野慎一郎
権利者：株式会社ボナック、学校法人東京医科大学
種類：特許(国際出願)
番号：PCT/JP2014/084725
出願年月日：2014 年 12 月 27 日
国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tokyo-med.ac.jp/molpathol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 雅彦 (Masahiko Kuroda)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号：80251304

(2) 研究分担者

村上 善基 (Yoshiki Murakami)
大阪市立大学・医学(系) 研究科(研究院)・准教授
研究者番号：00397556

(3) 研究分担者

須藤 カツ子 (Katsuko Sudo)
東京医科大学・医学部・兼任講師
研究者番号：50126091