

平成30年6月6日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04920

研究課題名(和文)速効性DDSを用いた消化器癌の核酸治療の開発

研究課題名(英文)Development of nucleic acid therapy using rapid acting DDS

研究代表者

山本 浩文(YAMAMOTO, Hirofumi)

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：30322184

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：スーパーアパタイト(sCA)に内包したmiR-29b-1-5pは膵癌に対してもよく効いた。sCAはインテグリンの制御を通じて腫瘍部の間質圧を効果的に下げるので、単独で静注しても、抗癌剤やICGなどの光感受性物質を腫瘍に集積させることができた。sCA作成後にPEG化することで、ステルス効果によって肝臓の集積を減少させたり、血中の安定化から抗腫瘍効果の増強を期待したが、性能の向上はみられなかった。sCAの問題点であった肝臓への過集積を克服するために、素材から見直し、新たに完成したDDSはsCAの肝障害の問題をクリアし、核酸量も格段に低減させることに成功し、実用化への準備が整った。

研究成果の概要(英文)：Super carbonate apatite particles incorporating miR-29b-1-5p was effective to pancreatic cancer cells, while miR-4689 was not so effective to pancreatic cancer cells. sCA could lower interstitial fluid pressure (IFP) at the tumor stroma via integrin mediated mechanism. EPR related molecules hydroxyperoxidase, TNF, nicotine were also affected. This led to efficient accumulation of anti-tumor agents or light sensitizer ICG in the tumor tissues by sCA injection alone. sCA-ICG is thought to be a good candidate for the photodynamic therapy. PEGylation of sCA did not realize improvement of stealth effect or increased tumor uptake. Finally we could make up a novel DDS device that does not accumulate in liver, yet does accumulate abundantly in tumor only with 10% amount of nucleic acid when compared to sCA. This would facilitate nucleic acid medicine in near future.

研究分野：消化器外科学

キーワード：ドラッグデリバリーシステム 核酸医療

1. 研究開始当初の背景

核酸は生体内ですぐに分解され腫瘍細胞への導入効率が非常に低い。核酸配列に起因する免疫反応や正常臓器への集積も問題である。DDS の代表であるリポソームは肝臓に集積するが固型腫瘍への集積は限定的であり、ミセルは抗癌剤を内包するキャリアとしては多くの臨床実績があるが核酸のキャリアとしては臨床実績がない。このことは固形癌の核酸医療が未だ多くの障壁を打ち破れない現状を示している。炭酸アパタイトを細粒化したスーパーアパタイト粒子（super carbonate apatite: sCA）は従来問題とされてきた障壁をクリアし臨床応用が期待できる本邦発の核酸デリバリー法である。核酸を内包したスーパーアパタイト粒子は、マウス静注後速やかに腫瘍細胞に集積し、細胞内では核酸が速やかに細胞質に移行する。速効性なので核酸が生体内で壊される前に効かせることができ、他のデリバリーシステムでは効果のみられない程度の少量の核酸（siRNA-survivin）量で十分な抗腫瘍効果を発揮した。一方で正常臓器への取り込みは最も少なく固形腫瘍の核酸治療剤としての可能性を有する（Wu X et al., Plos One 2014）。本申請課題では、核酸医薬のがん治療応用を目指して炭酸アパタイトナノ粒子デリバリー法の有用性・安全性を検証する。

2. 研究の目的

本邦発の固形癌に対する核酸医療を実現するための基盤研究を行う。すなわちスーパーアパタイト（sCA）の薬物動態を小動物で検討する。これまでに開発した肝転移抑制 miR-340（Takeyama H et al., Mol Cancer Ther 2014）や KRAS 変異大腸癌に効くマイクロ RNA（miR-4689）と sCA との複合剤の皮下腫瘍・転移モデルでの治療効果を他の DDS と比較して評価し、複合治療剤としての特許を取得する。更に血中の低分子化合物を腫瘍のみに引き込むという sCA 独特の作用を利用して、sCA の腫瘍イメージングや光線力学療法の可能性について検討する。更に実用化に向けて安全性を高めるための sCA の PEG 化についても検討する。

3. 研究の方法

- (1) マウス、ラットを用いて核酸およびスーパーアパタイトの血中、体内動態を調べ血中半減期や AUC、臓器分布について明らかとする。
- (2) 治療的 microRNA を内包したスーパーアパタイトの抗腫瘍効果について検討する。
- (3) sCA の腫瘍間質液圧の低減作用のメカニズム解明と、これに基づいた抗癌剤の作用増強、腫瘍イメージング、光線療法への応用

をはかる。

- (4) スーパーアパタイトを PEG 化することで血中安定性の向上と製剤としての安定化をはかる。

4. 研究成果

(平成 27 年度)

- ・miR-4689 と miR-340 の抗腫瘍効果をヌードマウスの大腸癌細胞由来の皮下腫瘍を用いて検討した。その結果、miR-4689 は KRAS 変異を有する大腸癌に良好な抗腫瘍効果を示したが、miR-340 はさほど強い効果を示さなかった。miR-4689 は安定した強い抗腫瘍効果を示し、KRAS と AKT1 の両方の分子を抑制した。しかし、miR-340 の抗腫瘍効果は動物モデルでの再現性が不安定であり、臨床応用可能なレベルではないと判断し miR-340 を掘り下げることは断念した。

- ・miR-4689 は KRAS 変異株モデルからスクリーニングした核酸であるが、同じ検出系で miR-29b-1-5p を同定した。

- ・スーパーアパタイトの原料であるカルシウムの代わりに Ca44 同位体を利用して計測したスーパーアパタイトの血中半減期はミセルと同程度であった。ICG をスーパーアパタイトに内包させ、臓器分布を経時的に観察した。肝臓、腎臓への取り込みが多くみられたが 24 時間でほぼ消退した。

- ・ステルス効果と粒子の血中の安定化を期待してスーパーアパタイトに PEG 化処理を行なった。しかし、PEG 化だけでは粒子の安定化や in vivo での性能向上はみられなかった。

(平成 28 年度)

- ・KRAS 変異大腸癌に効果を示す新たな核酸である miR-29b-1-5p と miR-4689 のふたつのマイクロ RNA を用いて KRAS 変異のある 4 種の隣癌を用いて抗腫瘍効果を検討した。その結果、miR-4689 よりも miR-29b-1-5p が圧倒的に高い強力な抗腫瘍効果（細胞増殖、細胞浸潤、アポトーシス誘導）を示した。

- ・ゲムシタピンとオキザリプラチンなどの抗癌剤と miR-29b-1-5p との併用効果も確認された。

- ・担癌マウスの治療実験でも miR-29b-1-5p は効果的であった。

- ・オキザリプラチンとスーパーアパタイト単独投与との併用効果をマウス担癌モデルで検討した。スーパーアパタイトによって腫瘍内の抗癌剤濃度は 1.5 倍に上昇し、抗腫瘍効果も増強された。腫瘍間質液圧の低減化によるものと考えられた。

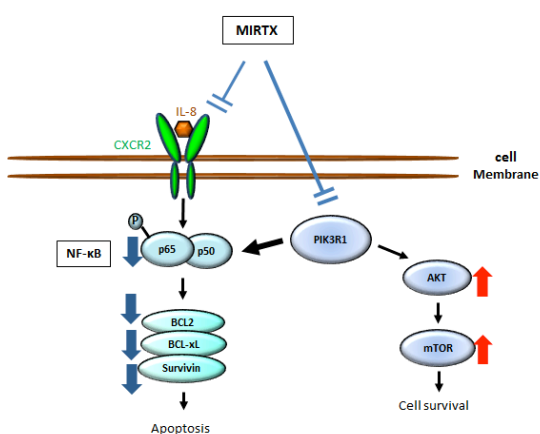
- ・ICG をスーパーアパタイトに内包し、静注することでマウスの腫瘍イメージングに成功した。

- ・スーパーアパタイト単剤による抗癌剤の効

果増強は、in vitroでは、タキソテール、5-FU、アドリアマイシン、オキザリプラチンなどで確認された。In vivo実験では、オキザリプラチンとスーパーアパタイトの併用による抗腫瘍効果の増強も確認できた。

(平成29年度)

・KRAS変異大腸癌に効果を示す新たな核酸であるmiR-29b-1-5pが強い抗腫瘍効果を発揮することが分かっていたが、この作用はmiR-29b-1-5p mimicとして投与される二本鎖のうち、miR-29b-1-5pではなく、相補鎖のbyproduct (MIRTX) の方のseed sequenceがPIK3R1, CXCR2などを標的として、NFκBシグナル伝達を阻止し、細胞死を引き起こすことを明らかとした (図1)。



[図1] MIRTXはNFκBシグナル伝達を阻止し、細胞死を引き起こす。

細胞死に関わる分子としては、Bcl2, survivin, caspase 3, PARPの変化も確認された。これには近年発達した二本鎖核酸の一本を不活化させる技術によるところが大きくサーモフィッシュャー社、ジーンデザイン社のシステムを導入し両社ともにbyproduct sequenceが抗腫瘍効果を発揮することを支持した。動物モデルを二つに増やし、DLD1とHT29のいずれのxenograftでもMIRTXによる顕著な治療効果を認め、腫瘍組織の免疫染色によって、リン酸化NFκBが低下していることが示された。これらの成果は、追加実験を重ねAACRの癌治療関連ジャーナルであるMol Cancer Ther (IF 5.76) に採択された。

・ICG をスーパーアパタイトに内包し、静注することでマウスの腫瘍に ICG を集積させ、これを励起する近赤外線をあてることで、one shot のみで顕著なマウス皮下大腸腫瘍の増殖抑制効果を認めた。これには、温度上昇と活性酸素発生の両者が関与していた。リポソームとの比較では、マウスの肝臓や脾臓などからの ICG の消退が速やかである利点がある。更に、ICG-スーパーアパタイト複合体に Glucose を同時封入することで、より強い抗

線力学療法の治療効果を観測した。このことは、封入体に抗酸化遺伝子に対する siRNA を導入するなどして、更に強力な光治療の可能性を示唆する。In vitro 実験による ICG 取り込み、照射時間の变化などについての追加実験を重ね、やはり AACR の癌治療関連ジャーナルである Mol Cancer Ther (IF 5.76) に採択された。

・網羅的遺伝子解析によってスーパーアパタイトの腫瘍間質圧低減作用には、複数の分子作用が関わっていることが分かった。これらは TNFα, hydrogen peroxidase, nicotine を含む。
・スーパーアパタイトの実用化に向けて課題となったのは、腫瘍への核酸の集積はよいが肝臓への集積が大量である点である。これでは早晩、副作用のために開発が困難となる。この点を追究して、粒子製造の組成から新たに見直し、スーパーアパタイトとは全く異なる物性をもつ新しい DDS を開発した。この新規 DDS を用いると、従来の 10%の核酸量で同程度の腫瘍への集積と、より強い抗腫瘍効果がみられるようになった。一方、肝臓への核酸の集積はほぼみられなくなり、実用化への準備は整った。

<引用文献>

- ① Wu X, Yamamoto H, Nakanishi H, Yamamoto Y, Inoue A, Tei M, Hirose H, Uemura M, Nishimura J, Hata T, Takemasa I, Mizushima T, Hossain S, Akaike T, Matsuura N, Doki Y, Mori M. Innovative delivery of siRNA to solid tumors by super carbonate apatite. PLoS One. 10(3), 2015, e0116022
DOI: 10.1371/journal.pone.0116022.
- ② Takeyama H, Yamamoto H, Yamashita S, Wu X, Takahashi H, Nishimura J, Haraguchi N, Miyake Y, Suzuki R, Murata K, Ohue M, Kato T, Takemasa I, Mizushima T, Ishii H, Mimori K, Doki Y, Mori M. Decreased miR-340 expression in bone marrow is associated with liver metastasis of colorectal cancer. Mol Cancer Ther. 13(4), 2014, 976-985
DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0571.

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2件)

- ①Inoue A, Mizushima T, Wu X, Okuzaki D, Kambara N, Ishikawa S, Wang J, Qian Y, Hirose H, Yokoyama Y, Ikeshima R, Hiraki M, Miyoshi N, Takahashi H, Haraguchi N, Hata T, Matsuda C, Doki Y, Mori M, Yamamoto H. A miR-29b Byproduct Sequence Exhibits Potent Tumor-Suppressive Activities via Inhibition of NF-κB Signaling in KRAS-Mutant Colon Cancer Cells. Mol Cancer Ther. 査読有 17, 2018, 977-987
DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0850.

②Tamai K, Mizushima T, Wu X, Inoue A, Ota M, Yokoyama Y, Miyoshi N, Haraguchi N, Takahashi H, Nishimura J, Hata T, Matsuda C, Doki Y, Mori M, Yamamoto H. Photodynamic Therapy Using Indocyanine Green Loaded on Super Carbonate Apatite as Minimally Invasive Cancer Treatment. Mol Cancer Ther. 査読有 in press, 2018, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-17-0788.

[学会発表] (計1件)

2016 癌学会 (横浜) Hirofumi Yamamoto, Tsunekazu Mizushima, Hidekazu Takahashi, Naotsugu Haraguchi, Jyunichi Nishimura, Taishi Hata, Chu Matsuda, Yuichiro Doki, Masaki Mori

[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

山本 浩文 (YAMAMOTO, Hirofumi)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：30322184

(2) 研究分担者

森 正樹 (MORI, Masaki)
大阪大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70190999

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者
なし ()