

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670018

研究課題名(和文) miRNAを用いた腫瘍新生血管正常化製剤の開発と新たながん治療戦略の創出

研究課題名(英文) Novel strategy of tumor treatment via the normalization of tumor vasculature by microRNA

研究代表者

奥 直人 (Oku, Naoto)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：10167322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：がんは我が国死因別死亡率第一位の疾患である。がん部位では、がん細胞が栄養を得るために新しい血管が形成される。この血管新生の抑制は、がんの増殖を抑えるとともに、血管を正常化し、抗がん剤を働きやすくする。本研究では当初より抗がん剤との併用を目的に、生体内で一連の血管新生に関わるタンパク質合成を抑制し、血管正常化を促進することが期待される核酸分子を用いた副作用が少なく高い血管正常化作用を示す薬剤を開発を目的とした。実際にかんを移植したマウスにおいて、核酸医薬品ががん部位の血管を正常化し、抗がん剤をがんに行きやすくした。そして核酸医薬品と抗がん剤を併用することにより、がんの増殖を抑えることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Previously, we clarified that miR-499 suppressed tumor growth through the inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) production and subsequent angiogenesis. In this study, we focused on the genetic therapy using microRNA-499 (miR-499) in combination with chemotherapy for the advanced treatment of cancer. Firstly, tetraethylenepentamine-based polycation liposomes (TEPA-PCL) were prepared and modified with angiogenic vessel-targeted peptide for the delivery of miR-499 (APRPG-miR-499) to angiogenic vessels and tumor cells. The tumor blood flow was significantly improved, after systemic administration of APRPG-miR-499 to colon carcinoma-bearing mice. In addition, the accumulation of doxorubicin (DOX) in the tumors was increased by pre-treatment with APRPG-miR-499. Finally, the combination therapy of APRPG-miR-499 and DOX resulted in significant suppression of the tumor growth.

研究分野：薬物送達学

キーワード：核酸医薬品 RNA干渉 ポリカチオンリポソーム がん治療 マイクロRNA 血管正常化 TEPA-PCL miR-499

## 1. 研究開始当初の背景

腫瘍における血管新生は腫瘍の増殖に必須の現象であり、申請者らは新生血管を直接傷害することで、高いがん治療効果が得られることを報告してきた (*J. Control. Release*, 2007; *Cancer Lett.*, 2010; *Int J Cancer*, 2010; *J Control Release*, 2012a 他)。一方、血管新生抑制剤は、当初抗がん作用が期待され多くの開発研究がなされたが、血管傷害とは異なり、単独で高い抗腫瘍効果を示す薬剤開発には至っていない。一方で、血管新生抑制剤の血管正常化作用が注目され、実際にアバスチンに代表される血管新生抑制剤は、抗がん剤との併用により初めて効果を示す。これは抗がん剤との併用時に、血管正常化作用により抗がん剤の腫瘍到達性が改善され、抗腫瘍作用を増強するためと考えられている。

microRNA(以下miRNA)は細胞増殖や血管新生などの関連する一連のタンパク質発現を抑制することにより、効率的に生体で起こるイベントを制御している。申請者らは血管正常化をさらに促進するためには、血管新生に関わる一連のタンパク質発現を抑制できるmiRNAが有利に働くと考え、miR92、miR499等の血管新生を制御するmiRNAの作用について明らかとしてきた (*J Gene Med.* 2013a; 2013b)。高効率の血管正常化作用は血行性転移の抑制にも寄与する。本研究では抗がん剤との併用療法を当初より目的として、強力な血管正常化作用を有し副作用の少ないmiRNA製剤を開発することを目的としている。また Enhanced Permeability and Retention (EPR) 効果に基づく抗がん剤のDDS製剤を併用した場合、新生血管間隙の正常化が早ければ効きにくくなり、血流改善効果が早ければより効きくことになることが考えられるが、このような検討はほとんどなされていない。本研究では血管正常化のプロセスを明らかとし、腫瘍微小環境の関連を利用した新たな腫瘍治療戦略を提唱することを考えて企画された。

## 2. 研究の目的

腫瘍における血管新生の抑制は、腫瘍増殖を抑えるとともに、血管を正常化すると考えられる。血管正常化は腫瘍への薬剤送達に有利に働くため、血管新生抑制剤を併用することにより、その抗腫瘍作用を増強することが

知られている。本研究では当初より抗がん剤との併用を目的に、生体内で一連の血管新生に関わるタンパク質合成を抑制し、血管正常化を促進することが期待されるmicroRNAを用いた副作用が少なく高い血管正常化作用を示す薬剤を開発する。さらに新生血管脆弱性を前提とする抗がん剤のDDS製剤が、血管正常化プロセスの中でがん治療効果に及ぼす影響を検討することにより、新たながん治療戦略の創出を目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 腫瘍新生血管標的化miR499全身投与型製剤の調製と体内動態の解析：腫瘍新生血管標的化miR499全身投与型製剤(以下miRNA製剤と略)のコアとなるリポソームは、我々が開発したカチオン脂質Dicetylphosphate-tetraethylenepentamine(DCP-TEPA、図1)を

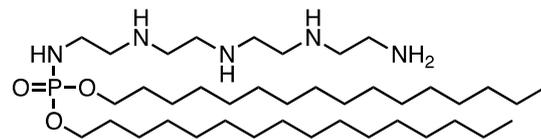


図1 DCP-TEPAの構造

含む100 nm径のリポソームで、これにセンス鎖にコレステロールを付加したmiR499を複合化し、長期血中滞留性を付与するためにポリエチレングリコール(PEG)脂質で修飾した。このPEG先端には、標的化を目的として、VEGF受容体に親和性を有する新生血管特異的ペプチドAla-Pro-Arg-Pro-Gly(APRPG)を結合させた。

これまでにインビトロの系でヒト臍帯内皮細胞を用いた管腔形成(血管新生モデル)を阻害すること、血管新生関連タンパク質のノックダウン効果を有することを確認した。本検討では、まずこのmiRNA製剤の体内動態をDiIC<sub>18</sub>で蛍光標識したリポソームを用いて検討した。組織レベルの動態はEx vivoでIVISにて測定し、腫瘍内動態は腫瘍切片の蛍光顕微鏡観察および共焦点レーザー顕微鏡観察により行った。組織分布の定量的評価については放射標識リポソームを用いて行った。モデル動物にはマウス大腸がん株化細胞C26-NL17を皮下移植したマウスを用いた。

(2) miRNA製剤による新生血管正常化の解析：担がんマウスにmiRNA製剤を静脈内投与後、時間を変えてFITCデキストランを静脈内

投与し、一定時間後に腫瘍の凍結切片を作成した。この切片を蛍光顕微鏡観察し、FITCデキストランの血管透過性の評価を行った。血流正常化については血流存在下で血管に結合するトマトレクチンにより染色し、CD31染色によるすべての血管の画像との差を取ることで評価した。

(3) miRNA 製剤による抗腫瘍作用と抗がん剤との併用効果の検討：担がんマウスに miRNA 製剤を静脈内投与後、腫瘍体積を測定し、抗腫瘍効果を評価した。また血管正常化検討の結果等も踏まえ、抗がん剤と併用投与した際の抗腫瘍効果について検討した。miRNA 投与後何日で抗がん剤を投与すると最も有効であるか、miRNA 製剤と抗がん剤を交互に投与した場合と、miRNA 製剤を先に複数回投与してから抗がん剤を投与した場合の抗腫瘍効果など、スケジュールリングを綿密に行い、効果的に検討を進めた。

#### 4. 研究成果

(1) はじめに血管正常化の指標として miR-499 による血流改善効果を検討した。ピオチン標識トマトレクチンを用いて血流を有する血管を染色し、腫瘍内血管の血流の有無を評価した。その結果、対照群では血流を有する血管が少ないのに対し、APRPG-miR-499 投与群では顕著な血流改善効果が認められた。これより miR-499 によってがんの微小環境が変化し、腫瘍全体への効率的薬剤送達が可能になることが示唆された。

(2) 次に、血管正常化作用による DOX の腫瘍への集積性の変化を評価した。APRPG-miR-499 の投与 4 日後に DOX を静脈内投与し、その 3 時間後に腫瘍内 DOX を定量した結果、対照群と比較して APRPG-miR-499 の前投与により DOX が腫瘍に有意に多く集積していた。これより、miR-499 による血管正常化作用は腫瘍への薬剤送達を向上することが示された。

(3) 最後に、Colon26 NL-17 担がんマウスに APRPG-miR-499 を静脈内投与し、その 4 日後に DOX を静脈内投与することで、miR-499 と DOX の併用療法による抗がん効果を評価した。その結果、miR-499 と DOX の併用療法は DOX 単独療法と比較して有意に DOX のがん増殖抑制効果を増強した(図2)。

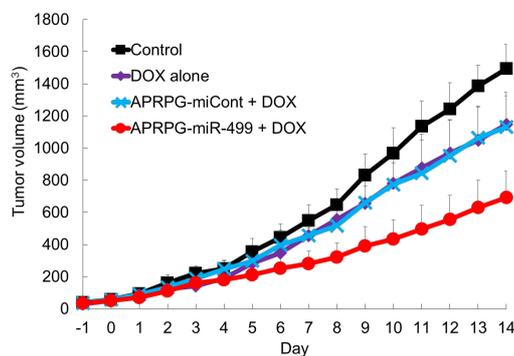


図2 Colon26 NL-17 をマウス腹側部に移植し、腫瘍容積が 50mm<sup>3</sup> となった時点(day 0)として核酸医薬品を投与した。その4日後(day 4)に DOX を投与し、腫瘍の容積を測定した。

以上のことから、miR-499 は、これまでに報告したがん細胞増殖抑制効果に加え、抗がん剤の効果を増強する作用を持つことが明らかとなり、効率的ながん治療を可能にすることが示唆された。本研究成果は核酸創薬の発展に寄与することが期待できる。

#### 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3件)

- (1) Okamoto A, Asai T, Ryu S, Ando H, Maeda N, Dewa T, Oku N. Enhanced Efficacy of doxorubicin by microRNA-499-mediated improvement of tumor blood flow. *J Clin Med*. 5: E10. (2016).
- (2) Koide H, Okamoto A, Tsuchida H, Ando H, Ariizumi S, Kiyokawa C, Hashimoto M, Asai T, Dewa T, Oku N. One-step encapsulation of siRNA between lipid-layers of multilayer polycation liposomes by lipoplex freeze-thawing. *J Control Release*. 228:1-8 (2016).
- (3) Koide H, Asai T, Kato H, Yonenaga N, Yokota M, Ando H, Dewa T, Nango M, Maeda N, Oku N. Susceptibility of PTEN-positive metastatic tumors to small interfering RNA targeting the mammalian target of rapamycin. *Nanomedicine*. 11: 185-194 (2015).

[学会発表](計10件)

- (1) A. Okamoto, N. Okada, T. Asai, T. Minamino, E. Mekada, N. Oku: PLK1 Knockdown with Lipid Nanoparticles Encapsulating siRNA for the Treatment of

- Cancer. 2015 AAPS Annual Meeting and Exposition (Orlando USA) 2015年10月25日
- (2) 安藤英紀、浅井知浩、奥直人：microRNA 全身送達による新規がん治療戦略. 第24回DDSカンファランス(静岡)2015年9月4日
- (3) J. Li, S. Ryu, A. Okamoto, T. Asai, Takehisa DEWA, N. Oku: Highly Efficient RNAi with Low Concentration of siRNA Using Novel Polycation Liposome. 第61回日本薬学会東海支部総会・大会2015(名古屋)2015年7月4日
- (4) 奥直人、浅井知浩：核酸医薬DDS技術開発におけるデリバリー担体の評価技術. 日本薬学会 第30年会 p55(長崎)2015年5月22日
- (5) 劉暁、安藤英紀、前田典之、浅井知浩、出羽毅久、奥直人：miR-499血管正常化作用による抗がん剤の薬効増強. 日本薬学会第135年会(神戸)2015年3月28日
- (6) 岡本彩香、岡田憲明、浅井知浩、清水広介、南野哲男、目加田英輔、奥直人：抗体修飾脂質ナノ粒子を用いた腫瘍選択的siRNA送達技術の開発. 遺伝子・デリバリー研究会 第15回シンポジウム(京都)2015年5月1日
- (7) 岡本彩香、岡田憲明、加藤寛己、浅井知浩、南野哲男、目加田英輔、奥直人：機能性ナノキャリアを用いた腫瘍選択的核酸デリバリー. 日本薬学会第135年会(神戸)2015年3月28日
- (8) S. Ryu, H. Ando, T. Asai, T. Dewa, T. Minamino, N. Oku: Cancer therapy with systemic administration of liposomal microRNA-499. 第19回静岡健康・長寿学術フォーラム(沼津)2014年11月7日
- (9) A. Okamoto, N. Okada, T. Asai, H. Kato, T. Minamino, E. Mekada, N. Oku: Evaluation of antibody-modified lipid nanoparticles for tumor-targeted delivery of siRNA. The 2<sup>nd</sup> International Conference on Pharma and Food (静岡)2014年11月5日
- (8) S. Ryu, H. Ando, T. Asai, T. Dewa, T. Minamino, N. Oku: Advanced cancer therapy by systemic administration of miR-499. Liposome Research Days 2014 (Copenhagen) 2014年8月6日

- (9) A. Okamoto, T. Asai, H. Kato, K. Shimizu, T. Minamino, E. Mekada, N. Oku: Antibody- modified lipid nanoparticles for tumor- targeted siRNA delivery Liposome Research Days 2014 (Copenhagen) 2014年8月4日
- (10) 岡本彩香、加藤寛己、浅井知浩、清水広介、南野哲男、目加田英輔、奥直人：腫瘍選択的 siRNA 送達を目指した機能性ナノキャリアの有用性評価. 日本薬学会第29年会(大宮)2014年5月20日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://db.u-shizuoka-ken.ac.jp/show/prof257.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

奥直人 (OKU, Naoto)

静岡県立大学・薬学部・教授

研究者番号：10167322

### (2) 研究分担者

浅井知浩 (ASAI, Tomohiro)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：00381731

### (3) 研究分担者

清水広介 (SHIMIZU, Kosuke)

静岡県立大学・薬学部・講師

研究者番号：30423841