

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04313

研究課題名(和文) 骨髄腫細胞標的sgRNA薬と微小環境標的薬剤の併用による新たな骨髄腫治療法の開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutics for multiple myeloma that uses myeloma cell targeting sgRNA and microenvironment targeting sgRNA

研究代表者

梨本 正之 (Nashimoto, Masayuki)

新潟薬科大学・健康・自立総合研究機構・教授

研究者番号：30228069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫は2番目に多い難治性の血液がんである。低分子や抗体からなる新たな分子標的薬の開発により平均生存年数は延びてきているが、ほとんどの患者でこれらの薬に対しても抵抗性を持つ骨髄腫細胞が出現し再発してしまう。

我々の開発したTRUE gene silencing法はsgRNAを用いた遺伝子発現抑制法であり、我々の最終目標は骨髄腫患者を治癒に導く核酸医薬であるsgRNAを発見することである。本研究では、骨髄腫細胞の増殖を助けているマクロファージの性質を攻撃型に変えるsgRNA薬候補を見出し、マウス実験においてこのsgRNA薬の腫瘍増殖抑制効果を確認した。

研究成果の概要(英文)：Multiple myeloma is the second most common refractory hematological malignancy. Although mean survival is extended by development of new molecular target drugs made of small molecules or antibodies, drug-resistant myeloma cells emerge in most of the patients and result in subsequent relapse of cancer.

We have developed TRUE gene silencing as a gene expression suppression technology using sgRNA, and our final goal is to discover therapeutic sgRNAs to cure multiple myeloma. In this study, we found a candidate sgRNA drug that can change macrophages that support myeloma growth to those that attack myeloma cells, and demonstrated that this sgRNA drug can suppress tumor growth in a mouse model experiment.

研究分野：RNA治療学

キーワード：核酸医薬 多発性骨髄腫 sgRNA TRUE gene silencing マクロファージ 腫瘍微小環境

1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫は2番目に多い血液がんであり、全世界で年間15万人程の患者がこれにより死亡していると思われている。米国では、およそ45,000人の患者がおり、毎年新たに24,000人程が多発性骨髄腫と診断されている。診断からの平均生存年数はわずかに約3-4年であったが、最新の骨髄腫治療法を試すことができる米国においては、サリドマイド誘導体であるレナリドマイドやプロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブなどの新しい薬が導入されてきて、この10年間で平均生存年数は約7-8年に伸びてきている。しかしながら、ほとんどの患者で、これらの薬に対して抵抗性を持つ骨髄腫細胞が出現し、がんが再発してしまう。多発性骨髄腫は未だに原因も解明されておらず、成功率の低い骨髄移植以外に治療法もないがんである。2011年12月15日号のNature誌に掲載された多発性骨髄腫の特集記事には、「この血液がんは、未だにほとんど確実な死刑宣告である」という記載がある。

このような困難な状況下にはあるものの、着実に良い知らせは蓄積しており、2011年3月には38人の多発性骨髄腫患者の全ゲノム配列が決定され、RAS、NF-κB、Mycの活性化やp53の不活性化に導く変異のがん化への関連が確認された[Nature, 2011, vol 471, 467-472]。また、予想外なことに、42%の患者において、RNA加工やタンパク質への翻訳に関係する遺伝子に変異があることが発見された。これらの骨髄腫ゲノムの情報は、低分子、抗体、あるいは核酸を用いた分子標的薬の開発を促進するはずである。

がんの増殖にはその微小環境が重要な役割を担っており、多発性骨髄腫では骨髄間質細胞や骨髄マクロファージ(MΦ)との相互作用が骨髄腫細胞の増殖に決定的な影響を与えていることが分かっている[Seminars in Hematology, 2004, vol 41, 1-5; Blood, 2009, vol 114, 3625-3628]。MΦは炎症を促進するM1と炎症を抑制するM2の両極端な状態の間の何れかの状態にあると考えられており、M1 MΦはIL-12やTNF-αを、M2 MΦはIL-10やTGF-βやVEGFを多く分泌する[Immunity, 2014, vol 41, 14-20]。腫瘍に浸潤しその増殖を助ける腫瘍関連MΦはM2状態にあるが、CSF-1Rの低分子阻害剤によりM1状態に遷移させることにより膠芽腫の増殖を抑制することが示されている[Nature Medicine, 2013, vol 19, 1264-1272]。多発性骨髄腫においても、M2状態の骨髄MΦをM1状態に遷移させることにより、血管新生や腫瘍増殖を抑え、分子標的薬の効果を最大限に発揮できることが期待される。

我々は、TRUE gene silencing (tRNase ZL-utilizing efficacious gene silencing) 法と呼ぶ遺伝子発現抑制技術を開発してきた。tRNA前駆体切断酵素 tRNase ZL を利用するこの技術は、がんなどの疾病に対する治療法として

の可能性を秘めている。この技術の基盤は、この酵素がtRNA前駆体やmicro-tRNA前駆体に類似したRNA複合体を認識し切断することができ、7-30ヌクレオチド(nt)のsmall guide RNA (sgRNA)を用いてあらゆるRNAを任意の部位で特異的に切断することができる特性にある(図1)。sgRNAは、5'-half-tRNA、14-nt linear RNA、RNA heptamer、hook RNAの4種類に分類される(図2)。sgRNAを発

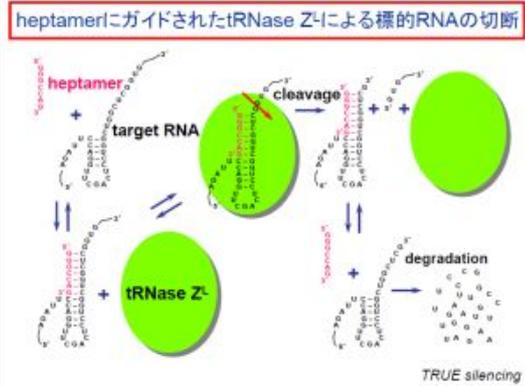


図1

ヒトtRNase Zの多様な基質RNAと4種類のsgRNA

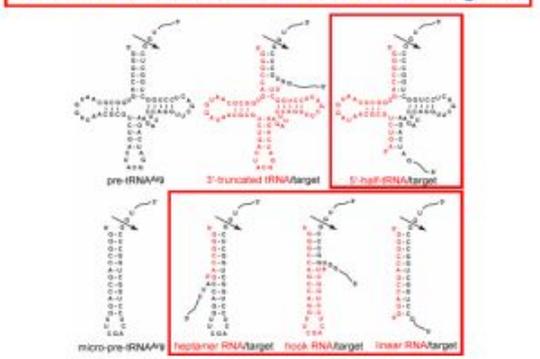


図2

現プラスミドや合成2'-O-methyl RNAの形で哺乳動物細胞中に導入することによって、その標的となるmRNAやmiRNAの発現を抑えることができる。更に、我々は「がん治療用sgRNA薬スクリーニングシステム」を開発し、骨髄腫細胞株や白血病細胞株に効率よくapoptosisを誘導する数10種類のheptamer型sgRNAを見出した。現在、骨髄腫細胞株に効率よくapoptosisを誘導する7つのheptamer型sgRNAに関して、apoptosis誘導機構の解明およびマウスxenograftモデルにおけるこのsgRNA薬の腫瘍増殖抑制効果の試験を行っている。H11247、H15540、H15860については、既にマウス実験での腫瘍増殖抑制効果を確認している。

2. 研究の目的

我々は、TRUE gene silencing法を多発性骨髄腫に応用し、患者を寛解・治癒に導くことができるsgRNA薬を発見することを長期目標としている。本研究においては、(1)骨髄腫

患者から得られた新鮮骨髄腫細胞に対する、上記7種類のsgRNA薬のapoptosis誘導能を試験すること、(2) sgRNA薬スクリーニングシステムを用いて、MΦをM1状態に遷移させるsgRNAを見出すこと、(3) このMΦ標的sgRNA薬あるいは既存のMΦ標的薬剤と骨髄腫細胞標的sgRNA薬の併用による、MΦ共存下における骨髄腫細胞へのapoptosis誘導を*in vitro*および*in vivo*で試験することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 新鮮骨髄腫細胞に対するsgRNAのapoptosis誘導能試験

我々は「がん治療用sgRNA薬スクリーニングシステム」を用いて、種々のヒト骨髄腫細胞株(KMM-1、RPMI-8226、KMS-12-BM、KMS-12-PE、KMS-11、RPMI-1788、Oda)に効率よくapoptosisを誘導する7つのheptamer型sgRNAを既に見出ししている(この7つのsgRNAをM-7と表記する)。本試験では、多発性骨髄腫患者から得られた新鮮骨髄腫細胞に対する、何種類かのM-7 sgRNA薬のapoptosis誘導能を解析する。具体的には以下の実験を行った。

協力病院にて同意の得られた骨髄腫患者から骨髄液を採取する。

EasySep Human CD138 Positive Selection Kit (STEMCELL Technologies)を用いて、CD138陽性形質細胞を分離し、RPMI 1640培地中で培養する。

得られた新鮮骨髄腫細胞に対して、M-7 sgRNA薬をそれぞれ終濃度1 μMになるように培地に加え、3日間培養する。

MTT試験により、新鮮骨髄腫細胞に対するM-7 sgRNA薬のapoptosis誘導効率を解析する。

#### (2) MΦ標的sgRNA薬のスクリーニング

60種類のheptamer型sgRNAからなるライブラリーをスクリーニングし、ヒトの腫瘍関連M2 MΦをM1状態に遷移させるsgRNAを見出す。具体的には以下の実験を行った。

ヒトU937およびTHP-1細胞を分化誘導剤12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)で刺激し、M様細胞に分化させる。60種類のheptamer型sgRNAをスクリーニングし、IL-10やIL-12の生産量を指標に、上記M様細胞をM1 MΦへ遷移誘導するsgRNAを見出す。cytokine量はELISAを用いて、遺伝子発現の変化はqRT-PCRを用いて測定する。

健常者の末梢血からEasySep Direct Human Monocyte Isolation kit (STEMCELL Technologies)を用いてCD14陽性細胞を分離し、M-CSFによりMに分化させる。この分化したMをTCCM(骨髄腫細胞を16時間培養したRPMI 1640培地で細胞を除去したもの)で培養することにより、腫瘍関連M2 Mを生成する。で

得られたsgRNAのヒト新鮮Mに対する遷移誘導効果を試験する。

#### (3) *in vivo* MΦ標的および骨髄腫細胞標的sgRNA薬併用試験

腫瘍関連M2 MΦ標的sgRNA薬と骨髄腫細胞標的sgRNA薬の併用による、腫瘍関連MΦ共存下における骨髄腫細胞へのapoptosis誘導を*in vivo*で試験する。ヒト骨髄腫細胞株KMM-1を、SCID/NODマウスの皮下に移植したマウスxenograftモデルを用いて個体レベルでの腫瘍増殖抑制効果を試験する。具体的には以下の流れで実験を行った。

SCID/NODマウス24匹の皮下に、マトリゲルを用いてヒト骨髄腫細胞株(KMM-1)を移植する。

ヒト細胞が生着したマウス24匹を選択し、6匹ずつ4つのグループに分け、それぞれのグループのマウスに生理食塩水、骨髄腫細胞標的sgRNA薬単独、MΦ標的sgRNA薬単独、およびMΦ標的sgRNA薬と骨髄腫細胞標的sgRNA薬の両剤を皮下に局所投与する。

その後、毎日皮下の腫瘍の体積を計測し、体積が1500 mm<sup>3</sup>を超えたらマウスを安楽死させ、腫瘍を摘出する。

腫瘍体積の増加率グラフや生存率グラフの解析を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 新鮮骨髄腫細胞に対するsgRNAのapoptosis誘導能試験

同意の得られた多発性骨髄腫患者から採取した骨髄液から、抗CD138抗体を用いてCD138陽性形質細胞を分離した。この新鮮骨髄腫細胞に対するsgRNA薬の効果を試験して、M-7 sgRNA薬のうちH15540およびH15603が効率よくapoptosisを誘導することが示された。

#### (2) MΦ標的sgRNA薬のスクリーニング

約60種類のheptamer型sgRNAからなるライブラリーをスクリーニングし、ヒトの腫瘍関連M2 MΦをM1状態に遷移させるsgRNAを探索した。ヒトU937およびTHP-1細胞を分化誘導剤TPAで刺激し、MΦ様細胞に分化させ、これらの細胞を用いてsgRNAライブラリーのスクリーニングを行った。sgRNA存在下において培地中に分泌されたIL-10あるいはIL-12の量をELISA法にて測定した。

その結果、sgRNA H15540がMΦ様U937細胞のIL-10分泌量を減少させ、H15860がIL-12分泌量を増加させることを見出した。また、sgRNA H1、H5462、H15860はMΦ様THP-1細胞のIL-12分泌量を増加させた。これらの結果から、sgRNA H1、H5462、H15540、H15860は、M2 MΦをM1状態に遷移させる可能性があることが示唆された。

また、より精度と感度の高いqRT-PCR法によりIL-10 mRNAおよびIL-12b mRNAを定量

した。その結果、H10923、H12960、H13024の3種類のsgRNAは、両MΦ様細胞においてIL-12b mRNAの発現量を上昇させた。このことから、これらのsgRNAはMΦの性質をM1状態の方向に遷移させることができることが示唆された。

更に、ヒト新鮮末梢血由来の単球を分化させたMΦを用いて、sgRNA薬H12960がIL-10 mRNAの発現量を減少させIL-12b mRNAの発現量を上昇させることを示した。このことは、H12960がヒト新鮮MΦの性質もM1状態の方向に遷移させることができることを示唆している。

### (3) *in vivo* MΦ 標的および骨髄腫細胞標的 sgRNA 薬併用試験

MΦの性質をM1状態の方向に遷移させることができることが示唆されたsgRNA薬(H12960)と骨髄腫細胞に効率よくapoptosisを誘導するsgRNA薬(H15603)を、それぞれ単独で、あるいは併用して局所投与するマウスxenograft実験を行った。

その結果、sgRNA薬の併用による顕著な相乗効果は観察されなかったが、sgRNA薬H12960は単独投与でもヒト骨髄腫細胞株KMM-1を移植した免疫不全マウス実験において、腫瘍の増殖を抑えることが示された。このことは、sgRNA薬H12960がマウスの腫瘍関連M2 MΦをM1に遷移させることによって腫瘍の増殖を抑える効果を発揮する可能性を示唆している。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計1件)

Arisa Haino, Tatsuya Ishikawa, Mineaki Seki, and Masayuki Nashimoto. (2016) TRUE Gene Silencing: Screening of a Heptamer-type Small Guide RNA Library for Potential Cancer Therapeutic Agents. *Journal of Visualized Experiments* **112**, e53879. DOI: 10.3791/53879.

### 〔学会発表〕(計2件)

石川達矢、二宮翔、川野光興、阿部貴志、高橋昌幸、田村正人、高橋由明、梨本正之「ヒトの血漿、末梢血単核細胞、培養細胞株由来のtRNase ZLをガイドする小さなRNA」平成27年度日本生化学会関東支部例会/第56回新潟生化学懇話会、2015年6月、新潟日報メディアシップ、新潟  
梨本正之「TRUE gene silencing: がん治療用sgRNA薬の開発」第19回バイオ治療研究会学術集会、2015年12月、東京理科大学森戸記念館、東京

### 〔産業財産権〕

#### 取得状況(計3件)

名称: ヒト白血病細胞のアポトーシスを

#### 誘導するヘプタマー型スモールガイド核酸

発明者: 梨本正之、高橋益廣、成田美和子、吉田哲郎、宮澤達也

権利者: 学校法人 新潟科学技術学園 新潟薬科大学、国立大学法人 新潟大学

種類: 特許権

番号: US9617538B2

取得年月日: 2017年4月11日

国内外の別: 米国

名称: ヒト白血病細胞のアポトーシスを誘導するヘプタマー型スモールガイド核酸

発明者: 梨本正之、高橋益廣、成田美和子、吉田哲郎、宮澤達也

権利者: 学校法人 新潟科学技術学園 新潟薬科大学、国立大学法人 新潟大学

種類: 特許権

番号: 特許第5995849号

取得年月日: 2016年9月21日

国内外の別: 日本

名称: ヒト血液がん細胞のアポトーシスを誘導するヘプタマー型スモールガイド核酸

発明者: 梨本正之

権利者: 学校法人 新潟科学技術学園 新潟薬科大学

種類: 特許権

番号: 第5959522号

取得年月日: 2016年8月2日

国内外の別: 日本

### 〔その他〕

梨本正之「多発性骨髄腫治療用ダブルヘプタマー型sgRNA薬の開発」日本骨髄腫患者の会主催セミナー、2017年9月、新潟県立がんセンター新潟病院

梨本正之「多発性骨髄腫治療用ダブルヘプタマー型sgRNA薬の開発」日本骨髄腫患者の会主催セミナー、2017年5月、日本赤十字看護大学

梨本正之 (2015) TRUE silencing 法を基盤とした血液がん治療薬の開発. 月報私学第215号, 11月, 8頁.

<http://www2.nupals.ac.jp/kenkoujiritsu/theme/post.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梨本 正之 (NASHIMOTO, Masayuki)

新潟薬科大学・健康自立総合研究機構・教授

研究者番号: 30228069

### (2) 研究分担者

青木 定夫 (AOKI, Sadao)

新潟薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 40242408

高橋 益廣 ( TAKAHASHI, Masuhiro )  
新潟大学・医学部・教授  
研究者番号：90179531

(3)研究協力者

灰野 亜理沙 ( HAINO, Arisa )

石川 達矢 ( ISHIKAWA, Tatsuya )