

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18945

研究課題名(和文) 難治性がん治療薬RCAS1遺伝子標的siRNA-PLGAハイブリッドミセルの開発

研究課題名(英文) Self-assembled siRNA-PLGA conjugate micelle as RCAS1 gene silencing therapy for intractable cancer

研究代表者

樫川 舞 (Hazekawa, Mai)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：10509186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、婦人科がんの中でも特に予後の悪い卵巣がんに着目し、Glypican-3のノックダウンを作用機序とするsiRNA-PLGAハイブリッドミセルを調製し、その効果を検討した。卵巣がん腹膜播種モデルを用い、ミセル腹腔内投与から14日後に、開腹時の腹水量、腹膜内の腫瘍塊数を評価した。その結果、ミセル投与群の腹水量、腫瘍塊数は、siRNA単独投与群と比較し、有意に減少した。以上より、本製剤は卵巣がん治療薬として有用な製剤となりうる可能性が示唆され、siRNAのデリバリーのための剤形としての応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：It was recently reported that Glypican-3 (GPC-3) was specifically overexpressed in ovarian cancer. We focused on GPC-3 gene silencing for ovarian cancer therapy employing a siRNA delivery system. The purpose of our study was to prepare self-assembled siRNA-poly (D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) hybrid conjugate micelles for GPC-3 gene silencing. For in vivo experiments, micelles were administrated intraperitoneally in a mouse model of peritoneal dissemination. At 14 days after treatment with micelles, micelles decreased the volume of peritoneal fluid and the number of tumor nodes in the mesentery, compared with in the control. Self-assembled siRNA-PLGA hybrid conjugate micelles are, thus, potentially useful as an efficient siRNA delivery system for ovarian cancer therapy.

研究分野：医療系薬学、医療薬剤学

キーワード：ミセル PLGA 卵巣がん Glypican-3

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、これまでに薬物の副作用軽減を目的とした持続性注射剤としてプロスタサイクリン誘導体を主薬とした生体内分解性高分子であるポリ乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA) を用いたマイクロスフェア製剤の調製に取り組み、脳梗塞治療薬としての有用性<sup>1)</sup>、血管新生促進薬として再生医療への応用の可能性を見出し<sup>2)</sup>、生体にとって安全な PLGA を用いた薬物送達システムの構築に従事してきた。

本邦の死因第1位はがんであり、その背景には初期病変ではなく進行した状態で発見される場合が多いこと、再発した際に治療が困難となることが挙げられる。よって、現在のがん治療には、予後不良な進行・再発がんに対する新たな治療薬の開発が望まれている。RCAS1 は子宮頸がん細胞株から単離されたタンパク質で<sup>3)</sup>免疫担当細胞にアポトーシスを誘導し腫瘍細胞間質組織に質的变化を惹起することで腫瘍進展に寄与する 15 種類の悪性腫瘍の予後因子である。特に、RCAS1 タンパク質は予後不良の婦人科がんを高発現しており、進行・再発がんの予後不良である難治性婦人科がんの標的治療においてターゲットとなり得る。

そこで、*in vitro* では顕著な効果が得られているが実用化が難しいという問題を抱える核酸医薬に着目し、その剤形開発に取り組むことに至った。ターゲットタンパクをノックダウンする核酸の一つ small interfering RNA (siRNA) は、低い細胞移行性、生体内での不安定性 (分解されやすい) によりドラッグデリバリー技術が必要不可欠とされている。そこで、研究代表者は、水溶性 siRNA に対し、これまで研究で使用してきた安全性の高いかつ疎水性の生体内分解性ポリマー PLGA を結合させ、単分子を合成することでミセル製剤を調製する製剤設計を計画した。

## 2. 研究の目的

がんは、わが国の死因第1位の疾患であり、進行・再発婦人科がんは予後不良という背景から、本疾患の治療薬開発の貢献度は非常に高い。そこで、本研究では、子宮頸がんをはじめとする予後不良の婦人科がん細胞に高発現する RCAS1 タンパク質に着目し、RCAS1 遺伝子に対する siRNA のがん細胞内送達を目的とし、がん細胞特異的、高い血中滞留性、高い細胞内取り込み、高い siRNA 活性を兼ね備えた新規がん細胞認識 siRNA-PLGA ハイブリッド高分子ミセル製剤の開発を行う。

しかしながら、研究開始当初にターゲットとしていた RCAS1 遺伝子に対する siRNA および shRNA は、*in vitro* 評価において、治療効果の期待できる十分なタンパクノックダウン効果が確認できなかった。そこで、本研究では、難治性婦人科がんの一つ卵巣がんを高発現している Glypican-3 (GPC3) にターゲットタンパクを変更し、高いノックダウン効率を示す siRNA を選択し、本研究の目的であった siRNA-PLGA ハイブリッド高分子ミセル製剤の調製に取り組んだ。(図1)

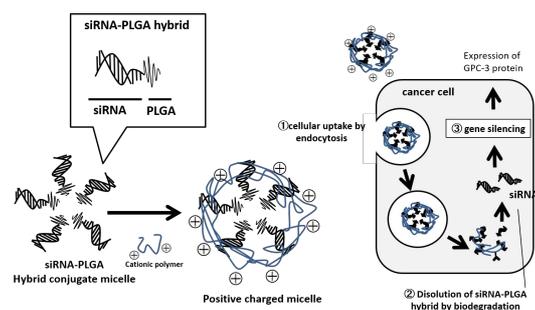


図1 siRNA-PLGA ハイブリッド高分子ミセル製剤の構造と作用機序

## 3. 研究の方法

### (1) siRNA-PLGA ハイブリッド高分子ミセル製剤の調製

siRNA と PLGA の複合体は、既報に従い合成した<sup>4)</sup>。DCC、NHS で PLGA のカルボン酸を活

性化後、クロスリンカーである PDPH に反応させ PLGA-PDPH を合成した。チオール基を修飾した siRNA とジスルフィド結合の置換反応を行い siRNA-PLGA ハイブリッドを合成した。その後、親水性溶媒中で自己会合によりミセルを形成させた。

( 2 ) 臨界ミセル濃度 ( critical micelle concentration : CMC ) の測定

疎水性蛍光プローブであるピレンを使用し、蛍光強度により siRNA-PLGA ハイブリッド分子の CMC を算出した。

( 3 ) siRNA-PLGA ハイブリッド高分子ミセル製剤およびカチオン性高分子による表面修飾 siRNA-PLGA ハイブリッド高分子ミセル製剤の粒度分布および表面電荷の測定

動的光散乱法を利用した装置 ( Zetasizer, Marvern ) により測定した。

( 4 ) 卵巣がん細胞株を用いた評価

卵巣がん細胞株 HM-1 を使用し、 $2 \times 10^4$  個ずつ細胞を播種し、siRNA、ミセル製剤、カチオン性高分子による表面修飾ミセル製剤をトランスフェクション試薬なしで添加し、培養 48 時間後に細胞を回収し、ウェスタンブロッティングにてタンパクノックダウン効率を評価した。同細胞を用い、WST-8 assay により細胞増殖作用を評価した。

( 5 ) 卵巣がん腹膜播種モデルマウスを用いた評価

腹膜転移モデルの作製：マウス卵巣がん細胞株 HM-1 を 6 週齢雌性 B6C3F1 マウスの腹腔内に  $1 \times 10^6$  個投与し、14 日後開腹した。抗腫瘍効果の評価：卵巣がん腹膜転移モデルに siRNA、ミセル製剤、表面修飾ミセル製剤を腹腔内投与し、開腹時の腹水量、腹膜内の腫瘍塊数を評価した。

( 6 ) 抗体結合型 siRNA-PLGA ハイブリッド高分子ミセル製剤の調製

各種濃度の異なる IgG 抗体溶液と、一定濃度の siRNA-PLGA ハイブリッド溶液を混合し、抗体がミセルの表面に静電氣的相互作用により結合させた抗体結合型 siRNA-PLGA ハイブリッド高分子ミセルを形成した。

得られたミセル製剤に対し、平均粒子径およびゼータ電位、細胞取り込み効率、タンパクノックダウン効果を評価した。

#### 4 . 研究成果

( 1 ) siRNA-PLGA ハイブリッド高分子ミセル製剤の調製と物性評価

siRNA-PLGA ハイブリッド高分子ミセル製剤は、平均粒子径約 120 nm で約 -40 mV の負のゼータ電位を有しており、カチオン性高分子修飾ミセル製剤は平均粒子径約 120 nm で約 40 mV の正のゼータ電位を有していた。

( 2 ) 卵巣がん細胞株 HM-1 を用いた siRNA-PLGA ハイブリッド高分子ミセル製剤の機能解析

siRNA-PLGA ハイブリッド高分子ミセル製剤は、siRNA 溶液と比較し有意な細胞導入効率の向上が認められた。また、蛍光標識を行ったミセル製剤を用いた検討により細胞内にミセル製剤の分布が認められたことから、ミセル製剤が確実に細胞内に取り込まれその後 siRNA のノックダウン効果を発揮していることが示唆された。

さらに、正のゼータ電位を有するカチオン性高分子修飾ミセル製剤は非修飾のミセル製剤と比較して顕著な細胞導入効率の向上が認められ、ターゲットタンパクのノックダウン率と卵巣がん細胞株の細胞増殖率抑制効果には相関が認められた。

( 3 ) 卵巣がん腹膜播種モデルマウスを用いた siRNA-PLGA ハイブリッド高分子ミセル製

## 剤の抗腫瘍効果

ミセル製剤の腹腔内投与から 14 日後に、開腹時の腹水量、腹膜内の腫瘍塊数を評価した。その結果、ミセル製剤投与群の腹水量、腫瘍塊数は、siRNA 単独投与群と比較し、有意に減少した。

## (4) 抗体結合型 siRNA-PLGA ハイブリッド高分子ミセル製剤の調製とその *in vitro* 評価

抗体結合型ミセル製剤は、抗体非結合型ミセル製剤よりも、粒子径が小さく、ゼータ電位は両製剤とも負の値を示すが、抗体結合型ミセルの方がその絶対値は小さくなる傾向があった。また、抗体結合型ミセル製剤は、抗体非結合型ミセル製剤と比較し、細胞内取り込み効率に有意な変化は認められなかったが、タンパクノックダウン効果が向上することがわかった。

以上より、細胞内移行性の極めて低い siRNA の細胞内移行性向上のためには、siRNA-PLGA ハイブリッド分子を利用したミセル化が非常に有用であった。さらに、GPC3 をターゲットとした siRNA-PLGA ハイブリッド高分子ミセルは、卵巣がん治療薬として有用であることがわかった。また、抗体結合型にすることでがん細胞特異的な集積性を増すことが示唆された。しかしながら、抗体結合型 siRNA-PLGA ハイブリッド高分子ミセル製剤についてはさらなる詳細な検討が必要であり、モデルマウス等を使用した *in vivo* 評価での有効性の検証が今後の課題である。

## <引用文献>

- 1) Hazekawa M. et al., The effect of treatment with a sustained-release prostacyclin analogue (ONO-1301-loaded PLGA microsphere) on short-term memory impairment in rats with transient global cerebral ischemia. *J Microencapsul.* 29, 211-218 (2012)

- 2) Hazekawa M. et al., The angiogenic effect of ONO-1301, a novel long-acting prostacyclin agonist loaded in PLGA microspheres prepared using different molecular weights of PLGA, in a murine sponge model. *Drug Dev Ind Pharm.* 40(11), 1435-42 (2014)
- 3) Nakashima M. et al., Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1. *Nat Med.* 5(8), 938-942 (1999)
- 4) Lee SH, et al. Self-assembled siRNA-PLGA conjugate micelles for gene silencing. *J Control Release.* 152, 152-158 (2011)

## 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)

- 1) Hazekawa M., Kojima H, Haraguchi T, Yoshida M, Uchida T.  
Effect of self-healing encapsulation on the initial burst release from PLGA microspheres containing a long-acting prostacyclin agonist, ONO-1301  
*Chem Pharm Bull*, 65(7), 653-659 (2017)  
DOI: 10.1248/cpb.c17-00025. (査読あり)
- 2) Hazekawa M., Morioka M, Nishinakagawa T, Kawakubo-Yasukochi T, Nakamura S, Nakashima M.  
Assessment of cytotoxicity of imatinib for oral squamous cell carcinoma by a real-time cell analysis system  
*eJBio*, 13(1), 56-62 (2017) (査読あり)

[学会発表](計9件)

- 1) Hazekawa M., Nishinakagawa T, Kawakubo-Yasukochi T, Nakashima M.  
Therapeutic effects of self-assembled siRNA-PLGA hybrid conjugate micelles for melanoma  
第77回日本癌学会学術大会 2018.9.27-29  
(大阪)

- 2) Hazekawa M, Nishinakagawa T, Kawakubo-Yasukochi T, Nakashima M.  
Preparation of self-assembled siRNA-PLGA hybrid micelles for target cell recognition  
日本核酸医薬学会第 4 回年会  
2018.7. 9-11 ( 福岡 )
- 3) Hazekawa M, Morioka M, Nishinakagawa T, Kawakubo-Yasukochi T, Nakamura S, Nakashima M.  
Therapeutic effects of self-assembled siRNA-PLGA hybrid conjugate micelles for ovarian cancer  
第 76 回日本癌学会学術大会 2017.9.28-30 ( 横浜 )
- 4) Hazekawa M, Morioka M, Nishinakagawa T, Kawakubo-Yasukochi T, Nakamura S, Nakashima M.  
Preparation of self-assembled siRNA-PLGA hybrid conjugate micelles as GPC-3 gene silencing therapy for ovarian cancer  
FIP PSWC 2017, 6th Pharmaceutical Sciences World Congress, 21-24 May 2017 ( Stockholm, Sweden )
- 5) 櫛川舞、森岡政彦、西中川拓也、安河内友世、中村誠司、中島学  
新規卵巣がん治療 siRNA-PLGA ハイブリッドミセルの調製  
日本薬剤学会第 32 年会 2017.5.11-13 ( 大宮 )
- 6) 櫛川舞、西中川拓也、安河内友世、中島学  
卵巣がんにおける siRNA-PLGA ハイブリッドミセル製剤の遺伝子抑制による治療効果  
第 90 回日本薬理学会年会 2017.3.15-17 ( 長崎 )
- 7) Hazekawa M, Morioka M, Nishinakagawa T, Yasukochi T, Nakashima M.  
Assessment of cytotoxicity of anticancer reagents for oral squamous cell carcinomas using a real-time cell monitoring analysis system  
Australian and New Zealand Head & neck cancer society 2016.10.25-27 ( Auckland, New Zealand )
- 8) Hazekawa M, Morioka M, Nishinakagawa T, Yasukochi T, Nakashima M.  
Application of real-time cell monitoring device in evaluation the IC<sub>50</sub> levels of anticancer reagents  
第 75 回日本癌学会学術大会 2016.10.6-8 ( 横浜 )
- 9) 櫛川舞、森岡政彦、西中川拓也、安河内友世、中島学  
抗がん剤の IC<sub>50</sub> 算出における Real-Time Cell Analysis system の有用性  
第 136 回日本薬学会年会 2016.3.26-29( 横浜 )
- 〔その他〕  
ホームページ等  
福岡大学薬学部免疫・分子治療学研究室ホームページ  
<http://www.pha.fukuoka-u.ac.jp/user/chiyou/web/>
- 6 . 研究組織  
(1)研究代表者  
櫛川 舞 (HAZEKAWA MAI)  
福岡大学・薬学部・助教  
研究者番号：10509186