

令和元年5月21日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10861

研究課題名(和文) 核酸医薬による骨肉腫の肺転移予防法開発に向けた前臨床試験

研究課題名(英文) Development of preventive nucleic acid drugs against lung metastasis of osteosarcoma

研究代表者

尾崎 充彦 (Osaki, Mitsuhiro)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：40325006

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究代表者らは、ヒト骨肉腫細胞を用いた自然肺転移モデルマウスへのmiR-143静注による肺転移抑制効果を実証してきた。本研究では、イヌを対象とした前臨床試験の実施を念頭に、イヌ骨肉腫細胞へのmiR-143導入による浸潤・転移抑制効果を検討した。miR-143は、イヌ骨肉腫細胞の浸潤能を抑制し、自然肺転移モデルマウスへの投与による転移抑制効果を示すことを明らかにした。イヌ個体へのmiR-143投与には、安全性や腫瘍細胞への導入効率の良いキャリアが必要である。ペプチドやキトサンをmiR-143と混合し溶解性および細胞導入効果を検証したが、適切なキャリアを見出すには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、新規医薬品として注目されて開発が進められている「核酸医薬」によって、骨肉腫の予後を規定する肺転移を予防する方法の構築を目指している。合成miR-143を肺転移予防の核酸医薬として臨床応用するための前臨床試験として、ヒト骨肉腫の病態と類似性の高いイヌを用いた安全性および肺転移予防効果の検証が非常に有用である。本研究は、ヒト骨肉腫細胞のみならずイヌ骨肉腫細胞に対するmiR-143の肺転移予防効果を実証し、骨肉腫罹患犬を対象とした前臨床試験の成果がヒトへの効果を予測するモデルとなることを強く示唆することができた。

研究成果の概要(英文)：Previously, we revealed that intravenous injection of miR-143 suppressed lung metastasis of human osteosarcoma cells in a mouse model. In this study, we examined whether the invasion and metastasis of canine osteosarcoma cells could be suppressed by miR-143 injection which would serve as a basis for a future preclinical study using dogs. Transfection of miR-143 inhibited cell invasion and injection of miR-143 suppressed lung metastasis of canine osteosarcoma cells in a mouse model. A carrier is needed to safely and efficiently introduce miR-143 into tumor cells. Although some peptides or chitosan were used as carriers, their solubility and efficiency for transfecting miR-143 into tumor cells were not sufficient.

研究分野：腫瘍病理学

キーワード：miR-143 イヌ骨肉腫 肺転移

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト骨肉腫は、悪性腫瘍の 0.1%程度を占める比較的稀な骨原発のがんであるが、その 75%は 10代で発症し小児に発生する特徴を持っている。原発巣に対する治療は、外科的切除と化学療法との組み合わせによりおこなわれるが、その 5 年生存率は約 70%であり、患者の 3 割程度は、術後 3 年以内に肺転移を生じ、極めて予後不良である。したがって、骨肉腫の術後の肺転移を抑制することができれば、患者(とりわけ小児患者)の長期予後の改善が大きく期待できる。しかしながら、現在臨床応用されているがん転移を予防する薬剤はない。

本研究申請者は、骨肉腫細胞の肺転移を規定するマイクロ RNA (miRNA)を同定するため、ヒト骨肉腫細胞株 143B 細胞(高転移株)とその親株である HOS 細胞(13 歳女児の骨肉腫由来:非転移株)における miRNA 発現プロファイルを miRNA microarray にて検索し、143B 細胞(高転移株)にて発現が著しく低下している miRNA として miR-143 を同定した。miR-143 は、143B 細胞(高転移株)へ導入することにより *in vitro* 系で細胞の浸潤能を抑制することを明らかにした。さらに miR-143 (対照群として negative control miRNA)を 143B 細胞マウス膝関節接種モデル(=ヒト骨肉腫自然肺転移モデルマウス)へ尾静脈を介して全身投与した。その結果、対照群では 4 週以内に 10 匹中 10 匹(100%)に肺転移を生じ、その後 2 週間以内に全例死亡したが、miR-143 投与群における肺転移例は 10 匹中 4 匹(40%)のみであり、miR-143 投与による著しい肺転移抑制効果(上図)を示すことを世界に先駆けて報告した。さらにヒト骨肉腫原発巣(臨床材料)を用いた解析の結果、miR-143 高発現例では肺転移頻度が低いことを示してきた(Osaki et al. Mol Ther 2011)。

以上の結果は、骨肉腫の肺転移には miR-143 発現低下が関与しており、miR-143 を投与することにより、肺転移を抑制できることを強く示唆している。近年、miRNA や siRNA などの核酸を医薬品として治療への応用を目指した研究開発が進められているが、その新規性ゆえ効果や安全性を検証するため、中型動物を対象とした前臨床試験が重要視されている。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト骨肉腫の病態と同様の臨床経過を示すイヌ骨肉腫症例に焦点を当て、上述のヒト骨肉腫細胞を用いた検討に則して、イヌ骨肉腫細胞を用いた *in vitro* および *in vivo* による浸潤・転移抑制効果を実証する。さらにイヌの骨肉腫自然発症例への miR-143 投与に向け細胞導入効率および安全性の高いキャリア探索と製剤化条件を検討し、ヒトへの臨床応用に向けた効果および安全性を担保する基盤を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、以下の 3 点を実施する。

- (1) イヌ骨肉腫細胞への miR-143 導入による浸潤能抑制効果の確認
4 種類のイヌ骨肉腫細胞へ miR-143 を導入し、細胞浸潤能を抑制する普遍性を確認する。併せて、細胞増殖への影響の有無を検討する。
- (2) イヌ骨肉腫自然肺転移モデルマウスへの miR-143 投与による、肺転移抑制効果の検証
マウス膝関節に 4 種類のイヌ骨肉腫細胞を接種して原発巣を作らせ、自然に肺へ転移するモデルを作製する。このマウスへ miR-143 を尾静脈投与し、個体レベルでの肺転移抑制効果を検証する。
- (3) イヌ個体へ投与可能な miR-143 のキャリア選択
自然発症した骨肉腫罹患犬への miR-143 製剤投与に向け、細胞導入効率が良好でイヌ個体への投与可能なキャリアおよび核酸との混合条件を探索する。

4. 研究成果

- (1) イヌ骨肉腫細胞への miR-143 導入による浸潤能抑制効果の確認
4 種類のイヌ骨肉腫細胞(OOS, cHOS, POS, HMPOS)における miR-143 発現を定量 PCR にて解析したところ、OOS, cHOS, POS, HMPOS の順で発現が高かった。これらの細胞株へ合成した miR-143 を導入し、タイプ I コラーゲンコーとされた細胞浸潤アッセイキットを用いて解析したところ、OOS を除く 3 株でコントロール群と比較し浸潤能抑制効果が示された。他方、細胞増殖への影響は無かった。かかる所見は、イヌ骨肉腫細胞株においてもヒト骨肉腫細胞株と同様に miR-143 低発現株への miR-143 導入により細胞増殖への影響を示すことなく浸潤能を抑制することが示された。

- (2) イヌ骨肉腫自然肺転移モデルマウスへの miR-143 投与による、肺転移抑制効果の検証
マウス膝関節にルシフェラーゼ遺伝子導入した 4 種類のイヌ骨肉腫細胞を接種して原発巣を作らせ、自然に肺へ転移するモデル作製を試みた結果、POS-luc および HMPOS-luc で自然肺転移モデルマウスが作製できた。そこで、 1×10^6 個の POS-luc をマウス膝関節に移植し、ペプチド製剤である A6K をキャリアとして miR-143 (コントロールとして miR-NC) を 3 日に 1 回の頻度で投与した。6 週間後に生体イメージングにて観察したところ、コントロール群では 8 匹中 5 匹 (62.5%)、miR-143 投与群では 6 匹中 3 匹 (50.0%) に肺転移陽性シグナルが検出され、miR-143 投与群で低値を示した。さらに犠牲死させ、肺における転移巣数を算出したところ、コントロール群では平均 58.4 個である一方、miR-143 投与群では 51.2 個と減少傾向を示した。かかる所見は、miR-143 投与によるイヌ骨肉腫細胞の肺転移抑制効果を示唆しており、ヒト骨肉腫細胞と概ね同様の効果を示すと考えられた。
- (3) イヌ個体へ投与可能な miR-143 のキャリア選択
自然発症した骨肉腫罹患犬への miR-143 製剤投与に向け、イヌ個体への投与可能なキャリアおよび核酸との混合条件を探索した。マウス個体への miR-143 投与の際に用いるキャリアには、ペプチド製剤である A6K を用いた。この際、イヌへの投与に向け同じ体重比となるよう核酸量を増やしたところ、混合液量を増やして作製する過程で一部析出し白濁することが明らかとなった。析出物の存在は、塞栓を生じる可能性があるため、イヌやヒトへの静注に適していない。そこで、構造等への変化を加えることで溶解性が高いと期待される新規ペプチド 2 種へ変更した。さらにポリエチレングリコールグラフト化キトサン (PEG-キトサン) を新たなキャリアとして追加検討した。PEG-キトサンは、カチオン性高分子の一つで低毒性のキャリアであることが知られており、これを PEG 化することで親水性および血中での安定性の亢進が報告されている。これら新規ペプチド 2 つと PEG-キトサンの計 3 種のキャリアを用いて、溶媒の pH や合成核酸との混合比率、混合時間をパラメーターとして、溶解性および骨肉腫細胞への導入効率をそれぞれ検討した。いずれのキャリアも核酸との混和による溶解性は高く、透明化条件を明らかにできた。しかしながら、骨肉腫細胞への導入効率は、A6K と比較し著しく低く、イヌ個体投与に適したキャリアを見出すには至らなかった。イヌ個体さらにはヒトへの miR-143 投与に向け、核酸と混合し高い溶解性を示すキャリア探索の必要性が課題としてあげられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1 Sasaki R, Osaki M, Okada F: MicroRNA-based diagnosis and treatment of metastatic human osteosarcoma. *Cancers* (査読有) 11, 2019, p553, DOI:10.3390/cancers11040553
- 2 Tsuge M, Osaki M, Sasaki R, Hirahata M, Okada F: SK-216, a novel inhibitor of plasminogen activator inhibitor-1, suppress lung metastasis of human osteosarcoma. *Int J Mol Sci* (査読有) 19, 2018, p736, DOI:10.3390/ijms19030736

〔学会発表〕(計 1 件)

- 1 尾崎充彦：マイクロ RNA 発現異常から紐解く骨肉腫の肺転移機構、第 25 回日本がん転移学会、2016 年

(2)研究協力者

研究協力者氏名：岡田 太
ローマ字氏名：(OKADA, futoshi)

研究協力者氏名：平畑 美緒
ローマ字氏名：(HIRAHATA, mio)

研究協力者氏名：津毛 美乃里
ローマ字氏名：(TSUGE, minori)

研究協力者氏名：佐々木 諒
ローマ字氏名：(SASAKI, ryo)

研究協力者氏名：井澤 浩則
ローマ字氏名：(IZAWA, hironori)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。