

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15615

研究課題名(和文) 消化器癌根絶を目指した革新的核酸医薬品の開発

研究課題名(英文) Development of innovative nucleic acid medicine for gastroenterological cancer

研究代表者

今野 雅允 (KONNO, Masamitsu)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座講師

研究者番号：80618207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：miR302, miR200c の天然型配列を元にガイド鎖とパッセンジャー鎖をそれぞれ20種前後、組み合わせで400種、合計800種の候補配列を設計した。これまでの経験に基づき生体内のRNA分解酵素に耐えうると予想される配列の設計を行った。スクリーニングを行い、人工架橋型miR302, 200cをそれぞれ3種類程度まで絞り込んだ。この核酸を自然膵癌及大腸癌発癌モデルマウスに投与し、治療実験を行った。癌の体積を継続的に計測及び有害事象の有無を検討した。これにより最も効果の強い人工架橋型核酸を決定した。

研究成果の概要(英文)：We designed 20 kinds of guide chain and a passenger chain based on natural sequence of miR302 or miR200c. 400 kinds of artificial nucleic acid medicine were elaborated. The arrangement expected that a RNase in the body could be endured based on the former experience was designed. A screening was performed and even about 3 kinds of the artificial building type miR302, 200c was narrowed down respectively. These nucleic acids were injected to natural pancreatic cancer and a colon cancer carcinogenic model mouse. The volume of the cancer was measured and a presence of adverse event was monitored. Finally we identified the most efficient artificial building type nucleic acid medicine.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：癌 核酸 創薬

1. 研究開始当初の背景

我々を含む内外の研究で、胎生期に発現する3種類のマイクロRNA (miR369, 302, 200c) を利用すれば細胞のリプログラミングが可能であることが明らかになった (PNAS 2010; Cell Stem Cell 2011 他)。さらに我々は既存の抗癌剤への抵抗性を持つ軟知性消化器癌幹細胞にこれら3種類のマイクロRNAを導入するとリプログラミング効果により癌幹細胞はその性質を大きく変え、細胞死または既存の抗癌剤への感受性を獲得した細胞へと変化することを見出した (PNAS 2010; PLoS One 2015)。即ちこれら3種類のマイクロRNAを核酸医薬品として開発することは難治性消化器癌の根絶につながると考えられる。しかし核酸医薬品の開発には大きなハードルがある。一般にRNAは体内に多量に存在(唾液、汗など)するRNA分解酵素により速やかに分解されてしまうこと、更にマイクロRNAを核酸医薬品として扱う際は特にオフターゲット効果が高いこと等から医薬品としての効果が低いことが知られている。そこで分子安定性 (RNA分解酵素耐性) とオフターゲット効果の低減を実現するためには、人工架橋型分子修飾(2'5'共有結合・S化・リン酸化等) (国際特許: PCT/JP2010/068409; 小比賀ら共同) を用いた核酸医薬品の開発が最適であると考えられる。このような核酸医薬品の最適化はこれまでに類を見ない研究ではあるが核酸医薬品の発展には必須であり、早期の医薬品の実現に向けて加速的に実施する必要がある。我々はこれまでに3種類のマイクロRNAのうちmiR369から人工架橋型核酸を設計し、約400種類の改変型試作品を合成、活性を調べた。その結果、天然型に比較して標的蛋白質翻訳を抑制または亢進する候補配列が同定され、特異的な分子機構を解明した (PLoS One 2015)。本申請ではこの成功例を踏まえて、miR200とmiR302の人工設計を行い、天然型よりも核酸医薬品として機能が勝るシーズ最適化を進め、早期の革新的創薬を実現化する。さらにこの最適化した核酸医薬品を生体内で安全かつ有効に局所到達させる為に、核酸に最適なドラッグデリバリーシステム (ユニット PIC) (国際特許: PCT/JP2008/070154; これまでの共同研究により開発) に搭載し、世界初の人工架橋型マイクロRNA核酸医薬品を実現化する。

2. 研究の目的

我々は既存の抗癌剤への抵抗性を持つ軟知性消化器癌幹細胞にこれら3種類のマイクロRNAを導入するとリプログラミング効果により癌幹細胞はその性質を大きく変え、細胞死または既存の抗癌剤への感受性を獲得した細胞へと変化することを見出している。これら3種類のマイクロRNAを核酸医薬品として開発することは難治性消化器癌の根絶につながると考えられる。しかしRNAは体

内に多量に存在するRNA分解酵素により速やかに分解されてしまうこと、更にマイクロRNAを核酸医薬品として扱う際は特にオフターゲット効果が高いこと等から医薬品としての効果が低いことが知られている。そこで分子安定性とオフターゲット効果の低減を実現するためには、人工架橋型分子修飾を用いた核酸医薬品の開発が最適であると考えられる。このような核酸医薬品の最適化はこれまでに類を見ない研究ではあるが核酸医薬品の発展には必須であり、早期の医薬品の実現に向けて加速的に実施する必要がある。我々はこれまでに3種類のマイクロRNAのうちmiR369から人工架橋型核酸を設計し、約400種類の改変型試作品を合成、活性を調べた。その結果、天然型に比較して標的蛋白質翻訳を抑制または亢進する候補配列が同定され、特異的な分子機構を解明した。本申請ではこの成功例を踏まえて、miR200とmiR302の人工設計を行い、天然型よりも核酸医薬品として機能が勝るシーズ最適化を進め、早期の革新的創薬を実現化する。さらにこの最適化した核酸医薬品を生体内で安全かつ有効に局所到達させる為に、核酸に最適なドラッグデリバリーシステムに搭載し、世界初の人工架橋型マイクロRNA核酸医薬品を実現化する。

3. 研究の方法

miR302, miR200c 人工修飾配列のデザインは天然型配列を元にガイド鎖 (mRNA の3'非翻訳領域に結合する鎖) とパッセンジャー鎖 (ガイド鎖に結合し2本鎖マイクロRNAを形成する鎖) をそれぞれ20種前後、組み合わせで400種、合計800種の候補配列を設計した。これまでの経験に基づき生体内のRNA分解酵素に耐えうると予想される配列の設計を行った。設計した人工修飾配列の核酸を1次スクリーニング (ルシフェラーゼレポーターアッセイ) 及び2次スクリーニング (癌細胞の増殖能、抗癌剤感受性を指標としたアッセイ) により最適な配列の決定を行った。さらにドラッグデリバリーシステムによる動物実験により最も効果の強い人工架橋型核酸を決定した。

4. 研究成果

(i) miR302, miR200c 人工修飾配列のデザイン
miR302, miR200c の天然型配列を元にガイド鎖 (mRNA の3'非翻訳領域に結合する鎖) とパッセンジャー鎖 (ガイド鎖に結合し2本鎖マイクロRNAを形成する鎖) をそれぞれ20種前後、組み合わせで400種、合計800種の候補配列を設計した。これまでの経験に基づき生体内のRNA分解酵素に耐えうると予想される配列の設計を行った。

(ii) 1次スクリーニングによる最適配列の絞り込み
スクリーニングはこれら設計した人工マイクロRNAを合成し、上記のルシフェラーゼレ

ポーターアッセイを行うことでルシフェラーゼの発光量を計測した。この1次スクリーニングにより miR302, miR200c の最適な人工架橋型配列をそれぞれ 10 種類程度まで絞り込んだ。

(iii) 抗癌作用検討による2次スクリーニング

1次スクリーニングにより10種類程度まで絞り込んだ miR302, 200c をそれぞれ大腸癌、膵臓癌細胞株へ導入しその効果検討を行った。効果検討は細胞の増殖能、細胞死の割合、また、抗がん剤(5-FU やジェムシタピン)との併用投与を行い細胞の生存率を測定した。このスクリーニングにより人工架橋型 miR302, 200c をそれぞれ3種類程度まで絞り込んだ。

(iv) ドラッグデリバリーシステムによる動物実験

自然膵癌及大腸癌発癌モデルマウス(癌組織はルシフェラーゼで発光するため動物の外部から癌を観察することが可能なマウス)を用いて治療実験を行った。治療実験には2次スクリーニングで絞り込んだ人工架橋型 miR302, 200c をドラッグデリバリーシステム(ユニット PIC)に搭載した形で使用した。ユニット PIC に2次スクリーニングで絞り込んだ人工架橋型核酸を搭載した。マウス尾静脈から投与し、癌の体積を継続的に計測した。また同時に有害事象の有無も検討した。これにより最も効果の強い人工架橋型核酸を決定した。

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 16 件)

- 1) Koseki, J., Konno, M., Asai, A., Colvin, S. H., Kawamoto, K., Nishida, N., Sakai, D., Kudo, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Enzymes of the one-carbon folate metabolism as anticancer targets predicted by survival rate analysis. *Sci. Rep.*, 8(1):303, 2018.
DOI: 10.1038/s41598-017-18456-x
- 2) Konno, M., Matsui, H., Koseki, J., Asai, A., Kano, Y., Kawamoto, K., Nishida, N., Sakai, D., Kudo, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Computational trans-omics approach characterised methylomic and transcriptomic involvements and identified novel therapeutic targets for chemoresistance in gastrointestinal cancer stem cells. *Sci. Rep.*, 8(1):899, 2018.
DOI: 10.1038/s41598-018-19284-3
- 3) Ohashi, T., Eguchi, H., Kawamoto, K., Konno, M., Asai, A., Colvin, H., Ueda, Y., Takaoka, H., Iwagami, Y., Yamada, D., Asaoka, T., Noda, T., Wada, H., Gotoh, K., Kobayashi, S., Koseki, J., Satoh, T., Ogawa, K., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Mitochondrial pyruvate carrier modulates the epithelial-mesenchymal transition in cholangiocarcinoma. *Oncol. Rep.*, 39(3):1276-1282, 2018.
DOI: 10.3892/or.2017.6172
- 4) Nishizawa, Y., Konno, M., Asai, A., Koseki, J., Kawamoto, K., Miyoshi, N., Takahashi, H., Nishida, N., Haraguchi, N., Sakai, D., Kudo, T., Hata, T., Matsuda, C., Mizushima, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Oncogene c-Myc promotes epitranscriptome m⁶A reader YTHDF1 expression in colorectal cancer. *Oncotarget*, 9(7):7476-7486, 2017.
DOI: 10.18632/oncotarget.23554
- 5) Nishizawa, Y., Konno, M., Asai, A., Koseki, J., Kawamoto, K., Miyoshi, N., Takahashi, H., Nishida, N., Haraguchi, N., Sakai, D., Kudo, T., Hata, T., Matsuda, C., Mizushima, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Hypoxia stimulates the cytoplasmic localization of oncogenic long noncoding RNA LINC00152 in colorectal cancer. *Int. J. Oncol.*, 52(2):453-460, 2018.
DOI: 10.3892/ijco.2017.4218
- 6) Taketo, K., Konno, M., Asai, A., Koseki, J., Toratani, M., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H., Ogawa, K. Epitranscriptome m⁶A writer METTL3 promotes chemo- and radioresistance in pancreatic cancer cells. *Int. J. Oncol.*, 52(2):621-629, 2018.
DOI: 10.3892/ijco.2017.4219
- 7) Ogawa, H., Konno, M., Kawamoto, K., Nishida, N., Koseki, J., Mizushima, T., Satoh, T., Eguchi, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Fetal hepatocyte derived culture medium elicits adipocyte differentiation to bile duct cell lineages in mouse. *Biomedical Reports.*, 497-499, 2018.
<https://doi.org/10.3892/br.2018.1080>
- 8) Tsunekuni, K., Konno, M., Asai, A., Koseki, J., Kobunai, T., Takechi, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. MicroRNA profiles involved in trifluridine resistance. *Oncotarget.*, 8(32):53017-53027, 2017.
DOI: 10.18632/oncotarget.18078
- 9) Yamada, N., Honda, Y., Takemoto, H., Nomoto, T., Matsui, M., Tomoda, K., Konno, M., Ishii, H., Mori, M., Nishiyama, N. Engineering Tumour Cell-binding synthetic polymers with sensing dense transporters associated with aberrant glutamine metabolism. *Sci. Rep.*, 7(1):6077, 2017.
DOI: 10.1038/s41598-017-06438-y
- 10) Asukai, K., Kawamoto, K., Eguchi, H., Konno, M., Asai, A., Iwagami, Y., Yamada, D., Asaoka, T., Noda, T., Wada,

- H., Gotoh, K., Nishida, N., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Micro-RNA-130a-3p regulates gemcitabine resistance via PPARG in cholangiocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.*, 24(8):2344-2352, 2017.
DOI: 10.1245/s10434-017-5871-x
- 11) Konno, M., Asai, A., Kawamoto, K., Nishida, N., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. The one-carbon metabolism pathway highlights therapeutic targets for gastrointestinal cancer. *Int. J. Oncol.*, 50(4):1057-1063, 2017.
DOI: 10.3892/ijo.2017.3885
- 12) Miyo, M., Konno, M., Colvin, S. H., Nishida, N., Koseki, J., Kawamoto, K., Tsunekuni, K., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. The importance of mitochondrial folate enzymes in human colorectal cancer. *Oncol. Rep.*, 37(1):417-425, 2017.
DOI: 10.3892/or.2016.5264
- 13) Nishizawa, Y., Nishida, N., Konno, M., Kawamoto, K., Asai, A., Koseki, J., Takahashi, H., Haraguchi, N., Nishimura, J., Hata, T., Matsuda, C., Mizushima, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Clinical significance of histone demethylase NO66 in invasive colorectal cancer. *Ann. Surg. Oncol.*, 24(3):841-849, 2017.
DOI: 10.1245/s10434-016-5395-9
- 14) Baek, S.J., Sato, K., Nishida, N., Koseki, J., Azuma, R., Kawamoto, K., Konno, M., Hayashi, K., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H., Ogawa, K. MicroRNA miR-374, a potential radiosensitizer for carbon ion beam radiotherapy. *Oncol. Rep.*, 36(5):2946-2950, 2016.
DOI: 10.3892/or.2016.5122
- 15) Colvin, S. H., Nishida, N., Konno, M., Haraguchi, N., Takahashi, H., Nishimura, J., Hata, T., Kawamoto, K., Asai, A., Tsunekuni, K., Koseki, J., Mizushima, T., Satoh, T., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Oncometabolite D-2-hydroxyglurate directly induces epithelial-mesenchymal transition and is associated with distant metastasis in colorectal cancer. *Sci. Rep.*, 6:36289, 2016.
DOI: 10.1038/srep36289
- 16) Miyo, M., Konno, M., Nishida, N., Sueda, T., Noguchi, K., Matsui, H., Colvin, H., Kawamoto, K., Koseki, J., Haraguchi, N., Nishimura, J., Hata, T., Gotoh, N., Mastuda, F., Satoh, T., Mizushima, T., Shimizu, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Metabolic adaptation to nutritional stress in human colorectal cancer. *Sci. Rep.*,

6:38415, 2016.

DOI: 10.1038/srep3841

〔学会発表〕(計 7 件)

- 1) 今野雅允, 他: 消化器癌の悪性度に関わるメカノバイオロジー、第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 29 日、パシフィコ横浜(神奈川県)
- 2) 今野雅允, 他: 転移性癌幹細胞に特異的な代謝機構の究明、第 26 回日本がん転移学会学術集会・総会、2017 年 7 月 28 日、大阪国際会議場(大阪)
- 3) 今野雅允, 他: 消化器がん幹細胞の代謝制御、第 5 回がん代謝研究会 in 札幌、2017 年 7 月 13 日、北海道大学医学部学友会館「フラテ」大ホール(北海道)
- 4) 今野雅允, 他: New Trans-omics Analysis revealed Novel Functions of the Cancer Specific Metabolic Pathway in Cancer Stem Cells、2017 Cellular and Molecular Bioengineering Annual Conference、2017 年 1 月 4 日、Hapuna Beach Prince Hotel | Big Island of Hawaii, USA
- 5) 今野雅允, 他: 新規数理解析手法を用いた癌幹細胞の治療抵抗性に関わる因子の同定、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 2 日、パシフィコ横浜(神奈川県)
- 6) 今野雅允, 他: 大腸癌の飢餓ストレスに適応した代謝変化、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 8 日、パシフィコ横浜(神奈川県)
- 7) 今野雅允, 他: TCA サイクル非依存的大腸癌細胞の代謝制御機構の解明、第 4 回がん代謝研究会 in 鹿児島、2016 年 7 月 7 日、かごしま県民交流センター(鹿児島)

〔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〕

該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今野 雅允 (KONNO Masamitsu)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座
講師

研究者番号: 80618207

(2) 研究分担者

石井 秀始 (ISHII Hideshi)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任教授
(常勤)

研究者番号: 10280736

川本 弘一 (KAWAMOTO Koichi)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教
(常勤)
研究者番号：30432470

西田 尚弘 (NISHIDA Naohiro)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50588118

小関 準 (KOSEKI Jyun)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教
(常勤)
研究者番号：20616669

(3)連携研究者

小比賀 聡 (OBIKA Satoshi)
大阪大学・大学院薬学系研究科・教授
研究者番号：80243252

西山 伸宏 (NISHIYAMA Nobuhiro)
東京工業大学・化学生命科学研究所・教授
研究者番号：10372385

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