

令和元年6月12日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15691

研究課題名(和文) 高分子ナノミセルに搭載した転移抑制マイクロRNAを用いた核酸医薬への挑戦

研究課題名(英文) Development of nuclear acid medicine by using tumor suppressive microRNA conjugated with high molecular nano-micelle

研究代表者

鱸野 秀一 (TATARANO, Shuichi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：30624655

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)：治療抵抗性腎癌のmiRNA発現プロファイルにおいてmiR-210-3pは発現が低下しTWIST1を標的とした癌抑制的作用を有した。またmiR-1274aは発現が亢進し癌遺伝子の作用を有するBMP1Bを直接制御した。引き続きunit polyion complexes (u-PIC)と一本鎖であるmiRNAの3'末側約10塩基をDNAに置換したキメラmiRNAを調整しナノミセル型DDSを確立した。これを40nMの濃度で培養細胞に添加したところ、各miRNAの細胞内濃度は投与前に比べて100倍以上に上昇することが観察され、標的遺伝子の20～50%のノックダウン効果とアポトーシス誘導が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

unit polyion complexes (u-PIC)は生体内で安定するキメラ型2重鎖miRNAを内包することが可能であり、ナノミセル型ドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発に成功した。各miRNAは培養癌細胞に効率よく取り込まれて抗腫瘍効果を発揮することが確認できた。次の段階のin-vivo投与実験を経て将来の核酸医薬創薬に向けて有意義な情報を得ることが出来た。

研究成果の概要(英文)：Based on microRNA expression profile of drug-resistant renal cell carcinoma, miR-210-3p was downregulated and had tumor suppressive function via targeting TWIST1. miR-1271a was upregulated and had oncogenic function via targeting tumor suppressive BMP1B. Followed by, we established nano-micelle type drug delivery system (DDS) by conjugating unit polyion complexes (u-PIC) and chimera microRNA in which 10 base nucleotides from its 3' prime region were exchanged to DNA. When the DDSs with 40 nM of miRNAs were administrated to the cultured cancer cells, the concentration of each microRNA was elevated to 100 times or more than pre-administrations. Also, from 20 to 50% knockdown effect of each target genes and apoptosis induction were observed.

研究分野：泌尿器腫瘍学

キーワード：ナノミセル マイクロRNA

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

## 1. 研究開始当初の背景

核酸医薬品は、安価で大量に化学合成できるため、1980年代後半に、世界規模で開発研究が始まった。その後、何回かの盛り上がり、停滞を繰り返し、2013年に全身投与性の家族性高コレステロール血症治療薬 (Mipomersen sodium) がアメリカ FDA から承認された。2015年3月には我が国でも日本新薬によるデュシェンヌ型筋ジストロフィー治療剤の早期探索的臨床試験が完了するなど、核酸医薬品に対する期待は依然高い。ヒトゲノム解析研究の成果として、ゲノム中には蛋白をコードしない RNA が多数存在する事が判明した。その中で、僅か 19 塩基 ~ 22 塩基の 1 本鎖 RNA 分子はマイクロ RNA と呼ばれる。近年の研究から、マイクロ RNA の発現異常が、癌を含むヒト疾患に深く関わっている事が明らかとなってきた。泌尿器科領域の癌についても、世界規模で、マイクロ RNA 研究が盛んに行われている。申請者は、2007年から、癌・マイクロ RNA 研究を開始し、現在までに 70 報以上の、癌・マイクロ RNA 研究論文を発表しており、国内トップの実績を有する。申請者は、癌細胞で発現抑制を認めたマイクロ RNA を癌細胞に核酸導入する機能スクリーニングから、癌細胞の遊走・浸潤を顕著に抑制する「転移抑制型マイクロ RNA」の探索に成功している。

高分子ミセルとは、ポリエチレングリコールなどの親水性ポリマーとポリアミノ酸誘導体などの疎水性ポリマーを水中で自己組織化させたもので、球表面に親水性ポリマーが、内側に疎水性ポリマーが位置する二層構造をもつ。核酸や抗癌剤を封入する事が可能であり、癌細胞への DDS としての有効性が示されている。この技術は、東京大学大学院・工学系研究科・マテリアル工学専攻の片岡研究室のみ作成可能である。この様に、機能性核酸である「転移抑制型マイクロ RNA」と高分子ミセルを組み合わせる事により、核酸医薬品の可能性を追求できると考え申請に至った。

## 2. 研究の目的

核酸医薬品は、製造工程がシンプルで、安価に大量に製造できる利点を有するが、核酸医薬品を標的細胞に送り込む、Drug Delivery System (DDS) が実用化できていない欠点も有する。申請者は、腎癌・膀胱癌・前立腺癌細胞で発現が抑制されている低分子機能性 RNA であるマイクロ RNA に着目し、マイクロ RNA を細胞に導入する機能スクリーニングから、癌細胞の遊走・浸潤を顕著に抑制する「転移抑制型マイクロ RNA」を見出した。本申請は、「転移抑制型マイクロ RNA」を高分子ナノミセルに包埋して転移モデルマウスに投与し、*in vivo* における転移抑制効果を検証する研究である。研究目的は、高分子ナノミセルの DDS の有効性と、マイクロ RNA の核酸医薬品の可能性を明らかにする事である。

## 3. 研究の方法

これまでに、*in vitro* の解析で明らかとなった「転移抑制型マイクロ RNA」を「高分子ナノミセル」に包埋し、この「高分子ナノミセル」を DDS として、転移モデルマウスに投与する事により、「転移抑制型マイクロ RNA」の *in vivo* における転移抑制効果を明らかにする。この研究を進めるため以下の項目について検討を行う。

- (1) 泌尿器癌マイクロ RNA 発現プロファイルから、新規の「転移抑制型マイクロ RNA」を探索し、本研究に用いるマイクロ RNA の候補を増やす。
- (2) 「高分子ナノミセル」に搭載する「転移抑制型マイクロ RNA」の組み合わせを検討し、単独、複数の場合について、転移抑制効果を明らかにする。
- (3) 転移抑制効果を発揮したマイクロ RNA について、*in vivo* におけるマイクロ RNA 制御分子経路を明らかにして、マイクロ RNA の作用機序を明らかにする。

#### 4. 研究成果

2016年度は「治療抵抗性腎癌マイクロRNA発現プロファイル」に基づき、腎癌組織で発現が抑制されているマイクロRNAについて機能解析を施行した。まずはmicroRNA-210-3pに着目して、ゲノム編集技術であるCRISPR-Cas9を用いたノックアウトを行った。そして、レンチウイルスによりCas9およびguideRNAを発現させるCRISPR/Cas9システムを用いて、腎癌細胞株でmiRNAのノックアウトを行った。guideRNAはWebデザインツールで選択し、また、オフターゲット効果の可能性を最小にするため、いずれのmiRNAに対してもguideRNAは2種類以上作成した。CRISPR/Cas9を導入したいずれの細胞株においても100%に近い発現抑制を得ることができた。microRNA-210-3は腎癌においては正常腎組織と比べて、その発現が上昇していたが、進行癌においては逆にその発現は低下しており、癌抑制的作用を有することが明らかになった。その標的電子の一つとして癌遺伝子的作用を有するTWIST1が挙げられ、 Kaplan-Meier解析では予後予測因子であることが判明した。膀胱癌では次世代シーケンサーによるmiRNA発現解析を行い、933個の既知miRNAと17個の新規miRNAの発現を解析し得た。933個の既知miRNAのうち、膀胱癌で有意に発現が低下していた60個のmiRNAの中でリストの上位のものから解析を行ってきた。その結果、microRNA-199 familyの発現高値は膀胱癌患者の予後良好の予測因子であり、インテグリンシグナル伝達を制御して、癌抑制的に働くことが示唆された。このようにマイクロRNAを基点とした膀胱癌の新しい癌シグナル経路が明らかになった。

2017年度は、腎癌で発現が亢進していたmiR-1274aに着目し、anti-miRを用いた発現抑制による機能解析を行った。その結果、anti-miR投与群で細胞増殖・浸潤・遊走能が著明に抑制された。miR-1274aは腎癌臨床検体においては正常腎組織と比べて、その発現が上昇していた。その標的電子の一つとして癌遺伝子的作用を有するbone morphogenetic protein receptor type 1B (BMPR1B)がピックアップされた。癌抑制的作用を有するBMPR1Bは癌遺伝子的miR-1274aにより直接制御されることがルシフェラーゼアッセイで明らかになった。TCGAのデータベース解析により、BMPR1B低発現は生命予後不良因子であることが確認された。膀胱癌でも次世代シーケンサーによるmiRNA発現解析を行い、933個の既知miRNAと17個の新規miRNAの発現を解析し得た。933個の既知miRNAのうち、膀胱癌で有意に発現が低下していた60個のmiRNAの中でリストの上位のものから解析を行っている。このようにマイクロRNAを基点とした膀胱癌の新しい癌シグナル経路が明らかになった。

2018年度はナノミセル型ドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発に着手した。本研究の課題は二つあり、一つはRNaseで分解されやすいmiRNAを体内で如何に安定させるかであり、もう一つは体内でmiRNAを腫瘍まで効率よく運搬するドラッグデリバリーシステム(DDS)の確立である。前者は一本鎖であるmiRNAの3'末側約10塩基をDNAに置換したキメラmiRNAを合成し、さらにこれを2重鎖とすることで従来のmiRNAと比べて遥かに安定した体内動態を確立できた。またアンチセンス鎖はDNAに置き換わっているために、オフターゲット効果を抑制できる利点もある。これをunit polyion complexes (u-PIC)とキメラmiRNAを調整し、その内部にキメラmiRNAを効率よく包有できるナノミセル型DDSを確立した。そこで、今回はまずin vivo実験のための至適条件を探るためのin vitro実験を行った。これまでのin vitro実験で著名な抗腫瘍効果があった4種類のmiRNA(miR-1, miR-133a, miR-145, miR-218)の配列をキメラ型2重鎖miRNAとして人工合成した。uPICと調整して40nMの濃度で培養細胞に添加したところ、各miRNAの細胞内濃度は投与前に比べて100倍以上に上昇することが観察された。細胞内濃度のターンオーバーは早く、投与6時間後にはほぼゼロとなった。次にmiR-218細胞内導入によるCAV2ノックダウン効果をリアルタイムPCR法で検討したところ、細胞株によってやや

ばらつきはあるが20~50%のノックダウン効果を得た。Magic Red 解析によるアポトーシス実験ではmiR-218を100nM濃度で投与すると、確実にアポトーシスが誘導された。今回の一連の研究により、uPICはキメラ型2重鎖miRNAを内包することが可能であり、膀胱癌培養細胞に効率よく取り込まれて抗腫瘍効果を発揮することが確認できた。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

1. Yoshino H, Yonezawa T, Yonemori M, Miyamoto K, Sakaguchi T, Sugita S, Osako Y, Tatarano S, Nakagawa M, Enokida H.  
Downregulation of microRNA-1274a induces cell apoptosis through regulation of BMPR1B in clear cell renal cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2018;39:173-181. 査読有  
DOI : 10.3892/or.2017.6098.
2. Yoshino H, Yonemori M, Miyamoto K, Tatarano S, Kofuji S, Nohata N, Nakagawa M, Enokida H.  
microRNA-210-3p depletion by CRISPR/Cas9 promoted tumorigenesis through revival of TWIST1 in renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2017;8:20881-20894. 査読有  
DOI : 10.18632/oncotarget.14930.

〔学会発表〕(計 9件)

1. Suppression of oncogenic microRNA-1274a suppression induces cell apoptosis through BMPR1B acceleration in renal cell carcinoma.  
Hideki Enokida, Takashi Sakaguchi, Hirofumi Yoshino, Masaya Yonemori, Kazutaka Miyamoto, Satoshi Sugita, Masayuki Nakagawa.  
2018 AUA annual meeting (May 18, 2018, San Francisco USA).
2. The dual-stranded microRNA-199 family members have tumor-suppressive function via directly targeting integrin & 3(ITGA3) as a potential therapeutic target in bladder cancer.  
Shuichi Tatarano, Hideki Enokida, Takashi Sakaguchi, Hirofumi Yoshino, Masaya Yonemori, Kazutaka Miyamoto, Satoshi Sugita, Masayuki Nakagawa.  
2018 AUA annual meeting (May 18, 2018, San Francisco USA).
3. The tumor suppressor microRNA-223 targets WDR62 directly in bladder cancer.  
Satoshi Sugita, Shuichi Tatarano, Hideki Enokida, Takashi Sakaguchi, Hirofumi Yoshino, Masaya Yonemori, Kazutaka Miyamoto, Masayuki Nakagawa.  
2018 AUA annual meeting (May 18, 2018, San Francisco USA).
4. Metabolism re-programming as a therapeutic target for drug resistant renal cell carcinoma.  
Hirofumi Yoshino, Satoshi Sugita, Shuichi Tatarano, Hideki Enokida, Takashi Sakaguchi, Masaya Yonemori, Kazutaka Miyamoto, Masayuki Nakagawa.  
2018 AUA annual meeting (May 18, 2018, San Francisco USA).
5. Bromodomain protein BRD4 as a potential therapeutic target in sunitinib-resistant renal cell carcinoma.  
Takashi Sakaguchi, Satoshi Sugita, Shuichi Tatarano, Hideki Enokida, Hirofumi Yoshino, Masaya Yonemori, Kazutaka Miyamoto, Masayuki Nakagawa.

- 2018 AUA annual meeting (May 18, 2018, San Francisco USA).
6. Targeting Sunitinib Resistant cells by tumor suppressive miRNA-99a-3p through ribonucleotide reductase regulation in Clear Cell Renal Cell Carcinoma.  
Osako, Youichi, Takashi Sakaguchi, Satoshi Sugita, Shuichi Tatarano, Hideki Enokida, Hirofumi Yoshino, Masaya Yonemori, Kazutaka Miyamoto, Masayuki Nakagawa.  
2018 AUA annual meeting (May 18, 2018, San Francisco USA).
7. Tumor-suppressive microRNA-26a-5p/-26b-5p inhibit cancer cell migration and invasion through targeting PLOD2 that is a potential prognostic marker in bladder cancer.  
Kazutaka Miyamoto, Naohiko Seki, Ryosuke Matsushita, Masaya Yonemori, Hirofumi Yoshino, Takashi Sakaguchi, Satoshi Sugita, Hideki Enokida, Masayuki Nakagawa.  
2017 AUA annual meeting (May 16, 2017, Boston USA).
8. The dual-stranded microRNA-199 family members (miR-199a-3p/-5p and miR-199b-3p/-5p) are potential prognostic markers and have tumorsuppressive function via directly targeting integrin  $\alpha 3$  (ITGA3) in bladder cancer.  
Takashi Sakaguchi, Hirofumi Yoshino, Masaya Yonemori, Kazutaka Miyamoto, Satoshi Sugita, Ryosuke Matsushita, Masayuki Nakagawa, Hideki Enokida.  
2017 AUA annual meeting (May 16, 2017, Boston USA).
9. Tumor-suppressive microRNA-223 inhibits cell aggressiveness by regulating WDR62 in bladder cancer.  
Satoshi Sugita, Hirofumi Yoshino, Kazutaka Miyamoto, Masaya Yonemori, Takashi Sakaguchi, Ryosuke Matsushita, Masayuki Nakagawa, Hideki Enokida.  
2017 AUA annual meeting (May 16, 2017, Boston USA).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
[www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~urology/index.php](http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~urology/index.php)

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：榎田 英樹  
ローマ字氏名：Enokida Hideki  
所属研究機関名：鹿児島大学  
部局名：医歯学域医学系  
職名：准教授  
研究者番号(8桁): 80347103

研究分担者氏名：関 直彦  
ローマ字氏名：Seki Naohiko  
所属研究機関名：千葉大学  
部局名：大学院医学研究院  
職名：准教授  
研究者番号(8桁): 50345013

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：吉野 裕史  
ローマ字氏名：Yoshino Hirofumi

研究協力者氏名：松下 良介  
ローマ字氏名：Matsushita Ryouzuke

研究協力者氏名：宮元 一隆  
ローマ字氏名：Miyamoto Kazutaka

研究協力者氏名：米森 雅也  
ローマ字氏名：Yonemori Masaya

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。