

令和 4 年 4 月 29 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07979

研究課題名(和文)腫瘍特異的siRNAデリバリーによるKRAS変異型大腸癌に対する新規治療法開発

研究課題名(英文)Tumor specific siRNA delivery for KRAS mutant colorectal cancer

研究代表者

志村 貴也 (Shimura, Takaya)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師

研究者番号：90405192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：KRAS変異型大腸癌・膵癌細胞の細胞膜に有意に高発現する膜結合性タンパク：抗Glut1抗体をリポソーム表面に結合させてリポソームを担体とし、KRAS siRNAを内包したPEG化リポソームを作成した(siKRAS-Glut1-LP)。この新規の核酸デリバリーシステム：siKRAS-Glut1-LPは、KRAS変異型大腸癌・膵癌細胞へ集積し、KRAS発現を抑制することにより、大腸癌・膵癌細胞増殖を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでKRAS変異型大腸癌に対しては特異的な治療薬がなかった。本研究により開発した、ドラッグデリバリーシステムは、KRAS変異を有する大腸癌・膵癌組織へ特異的にsiRNAをデリバリーすることによりdriver oncogeneであるKRAS発現を阻害する新規治療法である。本研究成果は、予後不良であるKRAS変異型大腸癌・膵癌の新規治療法として注目される。しかしながら、薬剤の安定性にはまだ課題があり、今後の組成の工夫を加え、動物実験による有効性と安全性の評価を加えることにより画期的な新規治療となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Glut1 is a membrane-binding protein that overexpresses in cell membranes of KRAS-mutated colorectal cancer and pancreatic cancer. We newly established anti-Glut1 antibody conjugated liposome containing siRNA of KRAS gene inside (siKRAS-Glut1-LP) in this study. This novel delivery system of nucleic acids (siKRAS-Glut1-LP) accumulated cell membranes of KRAS-mutated colorectal cancer and pancreatic cancer cells and inhibited cancer cell growth through suppressing KRAS expression.

研究分野：消化器内科

キーワード：大腸癌 膵癌 KRAS変異 ドラッグデリバリー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の複数の新規薬剤の開発により切除不能大腸癌に対する薬物療法は目覚ましく発展した。一方、大腸癌の約 40~50%を占める *KRAS* 変異型大腸癌はキードラッグのひとつである抗 EGFR 抗体薬が奏功しないことから治療選択肢が限られるため予後不良であり、特異的な治療薬の開発が急務である。

KRAS 遺伝子は大腸癌進展における driver oncogene であり、これまで *KRAS* 阻害剤の開発に力が注がれてきた。*KRAS* タンパクは低分子 GTP 結合タンパク質であり GTP と結合することで活性化されるが、結合部位の複雑性や GTP の細胞内濃度が高濃度であることから *KRAS* 阻害剤の開発は困難を極め未だ *KRAS* を特異的に阻害する化合物は合成されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*KRAS* を直接標的とする *KRAS* 変異型大腸癌に対する新規治療法を開発することである。本研究開発にあたり、申請者らは視点を変え、*KRAS* 阻害剤のスクリーニングや化合物合成をするのではなく、siRNA を大腸癌へ送達させる核酸デリバリーシステムの開発を目指した。

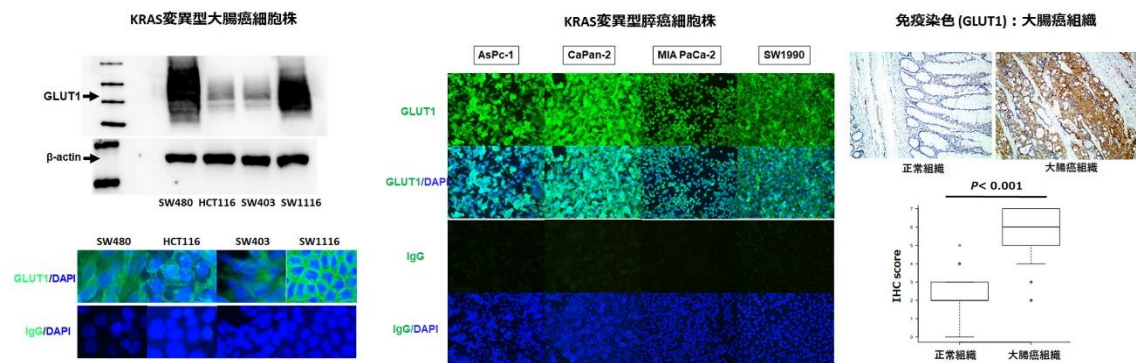
3. 研究の方法

KRAS 変異型大腸癌・膵癌細胞の細胞膜に有意に高発現する膜結合性タンパク：抗 GLUT1 抗体をリポソーム表面に結合させてリポソームを担体とし、*KRAS* siRNA を内包した PEG 化リポソームを作成した (si*KRAS*-GLUT1-LP)。他にコントロールとしてリポソーム表面に IgG を結合した si*KRAS*-IgG-LP、および非特異的 siRNA のコントロール (siNT) を内包した siNT-IgG-LP などを作成し、*KRAS* 変異型大腸癌細胞や膵癌細胞への集積や抗腫瘍効果を評価した。

4. 研究成果

まずは、4 種類の *KRAS* 変異型ヒト大腸癌細胞株、および 4 種類の *KRAS* 変異型ヒト膵癌細胞株において、GLUT1 が共発現していることを蛍光免疫染色において見出した。さらに、120 例のヒト大腸癌組織と正常組織における GLUT1 発現を免疫染色において検討したところ、正常組織と比較し大腸癌組織中において GLUT1 が有意に強発現していることを見出した (図 1)。

図 1: *KRAS* 変異型大腸癌・膵癌における GLUT1 発現



以上のことから、前述のごとく、*KRAS* 変異型大腸癌・膵癌の細胞膜に特異的に高発現する GLUT1 に対する抗体をリポソーム表面に結合させたりポソームを作成することにより、ドライバー oncogene である *KRAS* の siRNA を腫瘍特異的にデリバリーするドラッグデリバリーシステムをデザインし作成した。さらに血液中でのリポソームを安定化させるためにリポソーム表面は PEG 化した (図 2)。

図 2: 抗 GLUT1 抗体結合性 *KRAS*-siRNA PEG 化リポソーム

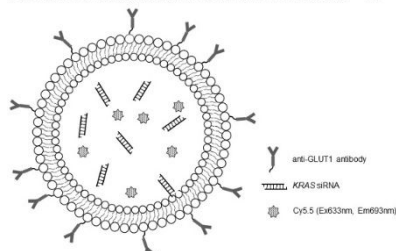
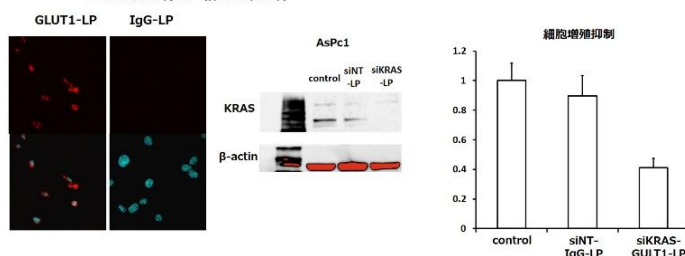


図 3: 抗 GLUT1 抗体結合性 *KRAS*-siRNA リポソームの大腸癌・膵癌細胞への集積と *KRAS* 発現抑制・細胞増殖抑制



蛍光免疫染色より、*KRAS* 変異型大腸癌・膵癌細胞の表面に GLUT1 抗体結合性リポソームが集積すること、および si*KRAS* をリポソーム内に内包させることにより癌細胞内の *KRAS* タンパクの

発現が抑制されることを確認した（図 3）。動物実験にて検証するために、研究分担者によりリポソームの作成過程を種々の条件下で検討されたが、リポソームの多量生産および長期の安定性を担保することが困難との結論に至り、動物実験での検証は行うことができなかった。

GLUT 1 が *KRAS* 変異型大腸癌・膵癌特異的に発現することを見出した。GLUT1 結合性 si*KRAS* 内包性リポソームは、*KRAS* 変異型大腸癌・膵癌に対する新規治療となりうることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nomura S, Shimura T, Katano T, Iwai T, Mizuno Y, Yamada T, Ebi M, Hirata Y, Nishie H, Mizushima T, Nojiri Y, Togawa S, Shibata S, Kataoka H	4. 巻 91
2. 論文標題 A multicenter, single-blind randomized controlled trial of endoscopic clipping closure for preventing coagulation syndrome after colorectal endoscopic submucosal dissection	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastrointestinal Endoscopy	6. 最初と最後の頁 859-867
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gie.2019.11.030. Epub 2019 Nov 28.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Natsume M, Shimura T, Iwasaki H, Okuda Y, Hayashi K, Takahashi S, Kataoka H	4. 巻 123
2. 論文標題 Omental adipocytes promote peritoneal metastasis of gastric cancer through the CXCL2-VEGFA axis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 459-470
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-020-0898-3. Epub 2020 May 22.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimura T, Dayde D, Wang H, Okuda Y, Iwasaki H, Ebi M, Kitagawa M, Yamada T, Yamada T, Hanash SM, Taguchi A, Kataoka H	4. 巻 123
2. 論文標題 Novel urinary protein biomarker panel for early diagnosis of gastric cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1656-1664
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-020-01063-5. Epub 2020 Sep 16	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Katano T, Shimura T, Nishie H, Iwai T, Itoh K, Ebi M, Mizuno Y, Togawa S, Shibata S, Yamada T, Mizushima T, Inagaki Y, Kitagawa M, Nojiri Y, Tanaka Y, Okamoto Y, Sugiura M, Matoya S, Nagura Y, Inagaki Y, Koguchi H, Ono S, Ozeki K, Hayashi N, Takiguchi S, Kataoka H	4. 巻 55
2. 論文標題 The first management using intubation of a nasogastric tube with Gastrografen enterography or long tube for non-strangulated acute small bowel obstruction: a multicenter, randomized controlled trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 858-867
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00535-020-01708-5. Epub 2020 Jul 15.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okuda Y, Shimura T, Iwasaki H, Katano T, Kitagawa M, Nishigaki R, Fukusada S, Natsume M, Tanaka M, Nishie H, Ozeki K, Yamada T, Kataoka H	4. 巻 Oct 13
2. 論文標題 Serum Exosomal Dicer Is a Useful Biomarker for Early Detection of Differentiated Gastric Adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000510993.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimura T, Ozeki T, Ushigome H, Hirokawa T, Shiga K, Takahashi H, Kataoka H	4. 巻 Feb 19
2. 論文標題 A novel balloon-attached endoscopy-assisted reduction technique for an acute strangulated stoma prolapse	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Endoscopy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/a-1346-8427	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwasaki H, Shimura T, Yamada T, Nishigaki R, Okuda Y, Fukusada S, Ozeki T, Kitagawa M, Katano T, Tanaka M, Nishie H, Ozeki K, Kubota E, Tanida S, Kataoka H.	4. 巻 Feb 22
2. 論文標題 Novel and Simple Criteria for Predicting Mortality of Peptic Ulcer Disease.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.6945-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukusada S, Shimura T, Iwasaki H, Okuda Y, Katano T, Nishigaki R, Ozeki T, Kitagawa M, Nishie H, Tanaka M, Ozeki K, Kubota E, Tanida S, Kataoka H	4. 巻 Apr 1
2. 論文標題 Relationship between Immunophenotype and Clinicopathological Findings for Superficial Nonampullary Duodenal Epithelial Tumor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Digestion	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000514812	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwasaki H, Shimura T, Yamada T, Okuda Y, Natsume M, Kitagawa M, Horike SI, Kataoka H	4. 巻 54
2. 論文標題 A novel urinary microRNA biomarker panel for detecting gastric cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1061-1069
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00535-019-01601-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwasaki H, Shimura T, Kataoka H	4. 巻 498
2. 論文標題 Current status of urinary diagnostic biomarkers for colorectal cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Chim Acta.	6. 最初と最後の頁 76-83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cca.2019.08.011.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimura T, Iwasaki H, Kitagawa M, Ebi M, Yamada T, Yamada T, Katano T, Nisie H, Okamoto Y, Ozeki K, Mizoshita T, Kataoka H.	4. 巻 12
2. 論文標題 Urinary Cysteine-Rich Protein 61 and Trefoil Factor 3 as Diagnostic Biomarkers for Colorectal Cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 539-544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2018.12.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Natsume M, Shimura T, Iwasaki H, Okuda Y, Kitagawa M, Okamoto Y, Hayashi K, Kataoka H.	4. 巻 83
2. 論文標題 Placental growth factor is a predictive biomarker for ramucirumab treatment in advanced gastric cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Chemotherapy and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1037-1046
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00280-019-03817-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nomura S, Shimura T, Katano T, Iwai T, Mizuno Y, Yamada T, Ebi M, Hirata Y, Nishie H, Mizushima T, Nojiri Y, Togawa S, Shibata S, Kataoka H.	4. 巻 91
2. 論文標題 A multicenter, single-blind randomized controlled trial of endoscopic clipping closure for preventing coagulation syndrome after colorectal endoscopic submucosal dissection.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gastrointestinal Endoscopy	6. 最初と最後の頁 859-867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gie.2019.11.030.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimura T, Iwasaki H, Kitagawa M, Ebi M, Yamada T, Yamada T, Katano T, Nisie H, Okamoto Y, Ozeki K, Mizoshita T, Kataoka H.	4. 巻 Mar;12(3)
2. 論文標題 Urinary Cysteine-Rich Protein 61 and Trefoil Factor 3 as Diagnostic Biomarkers for Colorectal Cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Transl Oncol.	6. 最初と最後の頁 539-544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tranon.2018.12.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okuda Y, Shimura T, Yamada T, Hirata Y, Yamaguchi R, Sakamoto E, Kataoka H.	4. 巻 Dec;23(6)
2. 論文標題 Colorectal obstruction is a potential prognostic factor for stage II colorectal cancer.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Int J Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 1101-1111.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-018-1307-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件(うち招待講演 1件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 志村 貴也
2. 発表標題 癒着性小腸イレウスに対するロングチューブ vs. 経鼻胃管ガストログラフィン造影のランダム化比較試験
3. 学会等名 第16回日本消化管学会総会(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 志村貴也、尾関貴紀、片岡洋望
2. 発表標題 表在性非乳頭部十二指腸腫瘍に対する当院の内視鏡的治療方針とその妥当性の検討
3. 学会等名 第99回日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 志村貴也、岩崎弘靖、片岡洋望
2. 発表標題 大腸がんに対する尿中診断バイオマーカーの開発
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shimura T, Iwasaki H, Ebi M, Yamada T, Yamada T, Kataoka H.
2. 発表標題 POTENTIAL OF URINARY CYSTEINE-RICH PROTEIN 61 AND TREFOIL FACTOR 3 AS NOVEL BIOMARKERS FOR THE DETECTION OF COLORECTAL CANCER.
3. 学会等名 DDW2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 志村貴也、尾関啓司、片岡洋望.
2. 発表標題 十二指腸腫瘍に対する当院での内視鏡治療指針の妥当性の検討
3. 学会等名 第97回日本消化器内視鏡学会総会.
4. 発表年 2019年

1 . 発表者名 Shimura T, Iwasaki H, Yamada T, Kataoka H.
2 . 発表標題 Potential of urinary microRNA biomarker panel for the early detection of gastric cancer.
3 . 学会等名 UEGW2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Shimura T, Nishie H, Ozeki K, Takiguchi S, Kataoka H.
2 . 発表標題 The results of endoscopic resection for superficial non-ampullary duodenal neoplasms.
3 . 学会等名 IGCS2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Natsume M, Shimura T, Iwasaki H, Okuda Y, Kataoka H.
2 . 発表標題 Omental fat tissue promotes peritoneal dissemination of gastric cancer.
3 . 学会等名 UEGW2019 (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Roopali Roy, Takaya Shimura, Adelle Dagher and Marsha A. Moses.
2 . 発表標題 The obesity and pancreatic cancer connection: Crosstalk between adipose, tumor, and stroma.
3 . 学会等名 AACR Special Conference on Pancreatic Cancer: Advances in Science and Clinical Care (国際学会)
4 . 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	田上 辰秋 (Tagami Tatsuaki) (10609887)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・准教授 (23903)	
研究 分担者	尾関 哲也 (Ozeki Tetsuya) (60277259)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・教授 (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------