

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09242

研究課題名(和文) ウルトラファインバブルによるDDSを活用した難治性卵巣癌に対する核酸医薬の開発

研究課題名(英文) Development of nucleic acid drug for intractable ovarian cancer using drug delivery system(DDS) by ultra fine bubble

研究代表者

宮本 新吾 (Miyamoto, Shingo)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：40209945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌の増殖抑制効果を持つmicroRNAを、卵巣癌細胞株に遺伝子導入して、SCIDマウスの皮下に播種後の腫瘍形成能について検討しました。この結果により、miR-135a-3Pが血清バイオマーカーおよび核酸医薬として有用である可能性を示しました。このmiR-135a-3Pを含有したウルトラファインバブルの作成に組み、画期的な核酸医薬の開発を実現しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌は一般的に予後が悪いといわれており、既存の化学療法に加えて、新薬開発が不可欠です。本研究によって、卵巣癌の増殖を抑制できるmicro RNAの同定ができました。さらに、ウルトラファインバブルによる薬剤輸送によって、投与される薬剤の量は少なくなり、十分な効果を保ったまま副作用を軽減することができるため、非常に社会的意義のある研究であるといえます。

研究成果の概要(英文)：We introduced a microRNA, which has an inhibitory effect on the growth of ovarian cancer, into an ovarian cancer cell line and examined the tumorigenicity after subcutaneous dissemination in SCID mice. This result indicates that miR-135a-3P may be useful as a serum biomarker and nucleic acid drug. We worked on the creation of an ultrafine bubble containing this miR-135a-3P and realized the development of an epoch-making nucleic acid drug.

研究分野：腫瘍

キーワード：核酸医薬 microRNA 卵巣癌 ウルトラファインバブル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近未来、本邦では男女に関わらずの2人に1人が悪性腫瘍で死亡すると報告されています。このように急増する悪性腫瘍の撲滅に向けて、標的治療薬の開発に大きな期待が寄せられています。しかし、固形腫瘍に対する標的治療においては、各症例の標的分子発現の評価が困難なため、標的治療薬の十分な効果を予測することができていません。固形腫瘍の一つである卵巣癌は、容易に腹膜播種し著明な腹水貯留をきたす難治性腫瘍として極めて致死性の高い婦人科疾患です。したがって、現行の核酸アナログに代表される抗癌剤や近年開発された標的治療薬( Bevacizumab や PPAR Inhibitor ) では予後の改善は期待できず新たな治療薬とともにその治療適応を診断する検査法が開発が切望されています。

### 2. 研究の目的

核酸医薬は、直接標的とする分子の機能を遺伝子レベルで抑制あるいは亢進させることから、将来性が大いに期待されている薬剤です。しかし、核酸医薬は生体内での安定性や、薬剤が高価なこともあり標的とする細胞に到達するための Drug Delivery System ( DDS ) に問題を抱えています。近年、研究協力者である BONAC Corp. は、生体内で安定な一本鎖 RNA ( ボナック核酸で、 Locked Nucleic Acids の一つ ) の開発に成功し、RNA を標的とする核酸医薬の開発を可能としています。また、共同研究者である立花らは、10~200nm の粒径を持つ生体の構成成分であるリン脂質二重膜から構成される人工細胞様リポソームに造影剤及び抗癌剤とともに特殊ガス ( パーフロロカーボン ) を同時に封入させることに成功 ( バブルリポソーム ) しています。この封入したバブルリポソームは、腫瘍組織に特異的に集積させて臨床診断用の周波数による超音波と併用すると細胞周辺でキャピテーションと呼ばれる物理気泡運動が起こすと、容易に遺伝子や薬物を細胞内に導入することができます ( Tachibana K, et al. Lancet (1999), 353, 1409 )。この方法を用いることで、極めて効果的に標的治療薬を標的組織に運搬できることとなります。

申請者らは、血中に存在する microRNA に着目し、臨床的予後や治療薬による効果に関連して変動する microRNA をアレイ解析より抽出してきました。さらに、それらの microRNA は癌細胞に発現し、microRNA の mimic あるいは siRNA を遺伝子導入することで抗腫瘍効果を示すことを明らかにしています。血中で検出可能で抗腫瘍効果を示す microRNA を、造影剤とともに封入したバブルリポソームを作製して、安全性及び有効性を検討することにより、難治性卵巣癌治療のコンパニオン診断薬と同時に標的治療薬を作製することができれば、悪性腫瘍患者の予後改善とともに医療経費削減を目指す医療イノベーションを大きく推進できると期待できます。

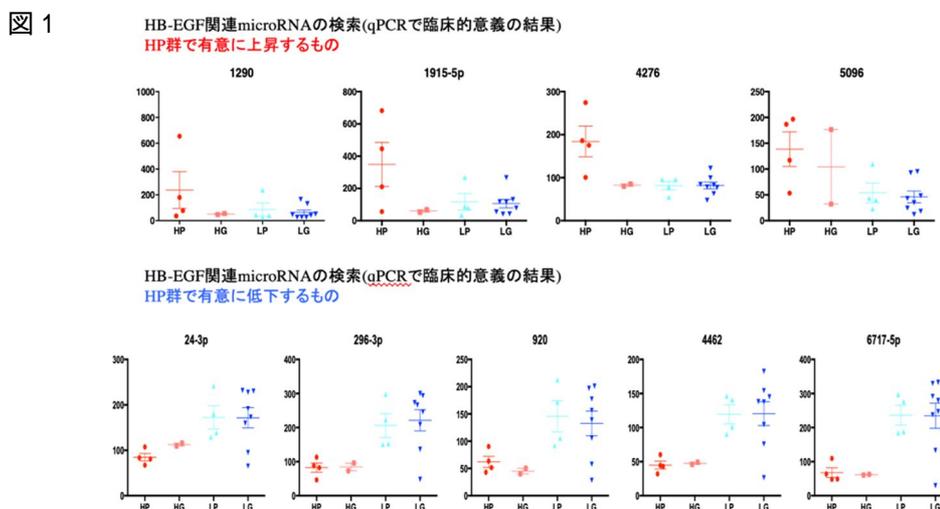
### 3. 研究の方法

卵巣癌症例の予後、HB-EGF 値、HB-EGF を標的とした治療薬 BK-UM の効果、卵巣癌培養細胞株から抽出した microRNA の mimic ( 19 種類 ) あるいは shRNA ( 14 種類 ) を、卵巣癌細胞株 SKOV3, ES2, MCAS に遺伝子導入して、SCID マウスの皮下に播種後の腫瘍形成能について Blank 遺伝子

を導入したコントロール細胞と比較します。この結果で、核酸医薬となりうる microRNA を同定します。臨床的予後の明らかな初発卵巢癌患者の血清中・組織中の microRNA の発現を Real-time PCR で測定して臨床的意義を明らかにします。さらに血清中に存在する microRNA の発現解析によるコンパニオン診断薬とナノバブルによる DDS を活用した核酸医薬の開発を行い、コンパニオン診断薬に基づく核酸医薬を用いた創薬開発です。

#### 4 . 研究成果

卵巢癌症例の予後、HB-EGF 値、HB-EGF を標的とした治療薬 BK-UM の効果、卵巢癌培養細胞株から抽出した microRNA の mimic(19 種類)あるいは shRNA(14 種類)を、卵巢癌細胞株 SKOV3, ES2, MCAS に遺伝子導入して、SCID マウスの皮下に播種後の腫瘍形成能について Blank 遺伝子を導入したコントロール細胞と比較しました。この結果により、BK-UM に高い感受性を示した患者に特異的な 6 種類の microRNA を同定し、HB-EGF 高発現で予後不良群と HB-EGF 低発現で予後良好群の発現アレイ解析により、図 1 に示す通り、HB-EGF が高値で予後不良の症例において有意に発現が上昇する 9 種類の micro RNA を同定しました。



一方、卵巢癌細胞株(MCAS, RMG2)に BK-UM を添加して、表 1 に示す通り、HB-EGF の発現とともに変動する 5 種類の micro RNA を同定しました。

表 1

systematic_name	MCAS			RMG2		
	3D培養	CRM197	fold change	3D培養	CRM197	fold change
hsa-miR-92a	38.21288	123.6872	<b>3.236793458</b>	73.756996	177.62772	<b>2.408283005</b>
hsa-miR-23a	32.91973	103.1727	<b>3.13406884</b>	73.880905	200.607	<b>2.715275348</b>
hsa-miR-1299	40.3668	104.6885	<b>2.59343074</b>	36.9809	161.2402	<b>4.360093994</b>
hsa-miR-1246	845.3142	2056.503	<b>2.432826752</b>	904.8468	1960.014	<b>2.166128012</b>
hsa-miR-1290	129.77031	314.6421	<b>2.424607755</b>	157.07814	391.4617	<b>2.492146266</b>
hsa-miR-630	119.8126	249.325	<b>2.080958096</b>	60.7738	177.98929	<b>2.928717474</b>

また、miR-135a-3P は、卵巢癌患者血清でコントロールより有意に高発現であり、特にプラチナ耐性の予後不良患者で高発現であったことを明らかにしました。さらに、卵巢癌患者の組織・腹水・血液のいずれにおいても miR-135a-3P の発現が低い場合に 予後不良であったことを

同定し、miR-135a-3P が血清バイオマーカーおよび核酸医薬として有用である可能性を示しました。卵巣癌の症例において、HB-EGF を標的とした治療薬 BK-UM の静脈内投与での第 I 相試験開始を目的とし、BK-UM 静脈内投与の非臨床試験を実施しました。BK-UM の腹腔内投与よりも静脈内投与の方が、より高い血中濃度を得られることを明らかにしました。ヌードマウスを用いた腫瘍増殖抑制試験では、静脈内投与の方が有意に腫瘍増殖を抑制したことで、腹腔内投与よりも静脈内投与の方が簡便でかつ有効性が高いことを示しました。さらに HB-EGF と再発卵巣癌の予後および転機を解析し、再発卵巣癌患者において血清 HB-EGF 値が、プラチナ製剤抵抗性を予測するバイオマーカーとして有用である可能性を示しました。また、より安定性の高くかつ濃度の高いウルトラファインバブルの作成に取組み、溶存する気体として一酸化窒素が特に優れている可能性を示しました。この結果をもとに、miR-135a-3P を核酸医薬として、ウルトラファインバブルに取り込むことで、より効率的で効果的な DDS の方法を確立しました。さらに安定性の高くかつ濃度の高いウルトラファインバブルの作成に取組み、溶媒の最適なアルブミン濃度、溶存ガスの種類を絞り込み、既存のもの約 10 倍のバブル濃度を実現しました。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮田康平
2. 発表標題 Micro RNAに着目した卵巣癌の創薬研究
3. 学会等名 第28回FCAMワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深川 怜史、井槌大介、勝田隆博、南 星旭、四元房典、宮原大輔、城田京子、宮本新吾
2. 発表標題 再発卵巣癌の予後予測バイオマーカーとしての血中HB-EGFの有用性
3. 学会等名 日本産科婦人科学会第70回学術講演会
4. 発表年 2018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	深川 怜史  (Fukagawa Satoshi)  (20772453)	福岡大学・医学部・講師   (37111)	
研究分担者	立花 克郎  (Tachibana Katuro)  (40271605)	福岡大学・医学部・教授   (37111)	

6. 研究組織（つづき）

	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	四元 房典  (Yotumoto Fusanori)  (40533089)	福岡大学・医学部・准教授    (37111)	

	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 協 力 者	宮田 康平  (Miyata Kohei)  (80759233)	福岡大学・医学部・准教授    (37111)	

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