

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18351

研究課題名(和文) 血管へのsiRNA送達による難治性肺転移がんに対する新規治療法の創製

研究課題名(英文) Development of new therapy for lung-metastasis cancer by selective siRNA delivery to vasculature

研究代表者

櫻井 遊 (Sakurai, Yu)

千葉大学・大学院薬学研究院・特任助教

研究者番号：00707234

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血管へのsmall interfering RNA (siRNA) 送達により難治性肺転移がんの新規治療法を確立することを目的とした。肺転移モデルとして、マウス乳がん細胞を静脈内投与することで作成したマウスに血管にsiRNAを送達するシステム(TET-MEND)を投与したところ、悪性化にかかわるたんぱく質の抑制が認められた。また、抗体による抑制によって抗腫瘍効果が知られているdelta-like ligand 4 (DLL4) という遺伝子に対するsiRNAを送達したところ延命効果が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本成果は、既存のがんそのものを狙う治療法とは異なる新しい治療概念を提唱する。がんそのものを狙う治療法ではがんの増殖性に着目した医薬品が多い。そのため、正常な組織の増殖が盛んな毛髪組織や骨髄の免疫細胞にまで障害がおよび副作用の原因となる。一方で、本研究により確立した血管を標的とする治療法はがん細胞を標的としないためにその懸念は小さい。また、この両方が肺転移がんにも応用可能であることを示した。現在、転移したがんに対して有効な治療法は存在しないことから、ステージ後期のがんに苦しめられているがん患者に新たな選択肢を提供できるような治療法の開発に繋がらう。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed at a development of new therapy for lung-metastatic cancer by siRNA delivery to tumor vasculature. Lung-metastasis model was prepared by an injection of murine cancer cells via the tail vein. When TET-MEND was administered into the lung-metastasis model, we observed a suppression of target protein in the metastasis. Then, to prove the therapeutic effect of TET-MEND, siRNA against delta-like ligand 4 (DLL4) was encapsulated into TET-MEND. Tumor volume was monitored after the continuous injection of TET-MEND encapsulating siRNA-DLL4. As a consequence, a significant prolongation in overall survival was obtained.

研究分野：薬物送達学

キーワード：siRNA 脂質ナノ粒子 肺転移 免疫チェックポイント阻害剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

転移がんは、がんの死因の90%以上を占めるが、現在の三大療法は奏功しない。そのため、薬剤耐性を有する難治性転移がんの新たな治療法が切望されている。申請者は、すでに原発がんの血管に small interfering RNA (siRNA) を送達する脂質ナノ粒子 RGD-MEND (multi functional envelope-type nano device) によりがんの成長を抑制することに成功した。この結果から、がん細胞を直接標的とせず血管を標的とするがん治療法が有効であることが示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、この方法を新規リガンドの同定・脂質組成などの最適化により発展させることで、治療抵抗性のある転移がん組織内の血管をターゲットとする脂質ナノ粒子 tumor endothelium-targeting (TET)-MEND を開発して、血管新生を抑制することに基づく転移がんの有効な治療を達成する。

3. 研究の方法

肺転移モデルはマウス乳がん細胞由来 4T1 細胞を $1.0 \sim 10 \times 10^5$ cells を BALB/c 雌性マウス (4週令) に尾静脈内投与することにより作成した。転移作成後、1~4 週間後に肺を摘出し、作成した凍結切片に対して免疫染色を行い、血管の頑健性のマーカーとして α smooth muscle actin (α SMA)、type-IV collagen (COLIV)、および vascular endothelial cadherin (VEcad) の発現を評価した。また、血管への siRNA 送達による治療効果の検証として、vascular endothelial cell growth factor receptor 2 (VEGFR2) および delta-like ligand 4 (DLL4) に対する siRNA を内封した TET-MEND をアルコール希釈法により作成した。移植後、1、4、7 日後に TET-MEND を投与し、動物倫理規定に従い 1 週間のうちに 10% 以上の体重減少をエンドポイントとして、生存率を評価した。また、血管新生の抑制による血管正常化と免疫療法の組み合わせによる新規治療法の治療効果を評価するために、programmed death 1 (PD-1) 抗体を同時に投与した際の抗腫瘍効果についても評価を行った。

4. 研究成果

(1) 肺転移モデルマウスを用いた血管を標的とする治療法の確立

1. 肺転移モデルにおける血管構造の解析

原発巣の血管構造は脆弱であり、基底膜や裏打ちする細胞(ペリサイト)が欠如している。ナノ粒子はこの脆弱な構造を介して、がん組織へと移行することが知られている。一

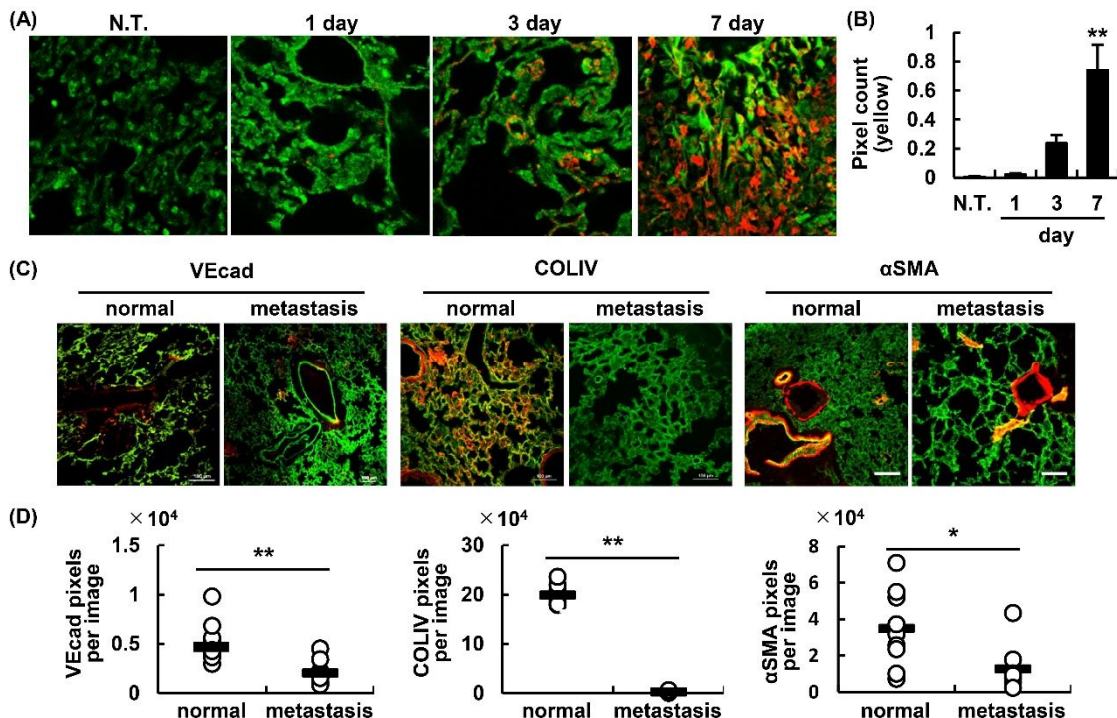


図1 転移巣における血管の脆弱性の評価

方で、転移巣における血管構造に関する評価は今のところほとんどなされていない。そこで、血管新生が起きているかをプロモデオキシウリジン (BrdU) の取り込みで、および肺転移巣における血管の頑健性について、ペリサイト (α SMA)、基底膜 (COLIV)、内皮細胞の接着 (VEcad) の発現を解析した。その結果、転移、1, 3, 7 日後の肺では経時的に増殖する血管内皮を表す BrdU 陽性の細胞が増加していた (図 1A, B)。また、正常マウス (normal) と比較して、転移 7 日後のマウスの肺 (metastasis) では血管の頑健性を示すいずれのマーカーの発現も減少していた (図 1C, D)。以上のことから、転移巣の血管は原発巣の血管同様脆弱な構造をしており、TET-MEND による新生血管ターゲティングが可能である可能性が示唆された。また、従来報告に基づいて考察すると、enhanced permeability and retention (EPR) 効果による滞留性高分子の集積も期待された。しかしながら、蛍光標識した TET-MEND は静脈内投与後、肺転移巣に蓄積する様子が認められた。一方で、リガンドを搭載しない PEG のみを保持した脂質ナノ粒子 (PEG-LNP) では肺転移巣への集積はほとんど認められなかった。さらに、肺転移と皮下移植を同時に行ったマウスに対して PEG-MEND を投与すると転移巣への集積量は著しく低かった。

2. 血管新生阻害による肺転移治療効果の検証

血管新生阻害による治療効果の評価に先んじて、標的組織におけるタンパク質・mRNA 発現の抑制について評価した。初めに、静脈内投与後の標的タンパク質である VEGFR2 の発現を免疫染色により観察した (図 2A)。また、複数取得した画像を定量解析し、血管内皮マーカー CD31 と共局在する VEGFR2 の面積を定量した (図 2B)。その結果、TET-MEND 投与群において、VEGFR2 発現の有意な発現低下が見られた。さらに、転移巣と肺の非転移部を目視で分け、それぞれの部位に対して VEGFR2 の mRNA 発現量を定量的 RT-PCR により定量した (図 2C)。転移巣 (cancer part) では TET-MEND による VEGFR2 抑制が見られた。一方、転移巣が非がん部 (non-cancer part) では VEGFR2 の抑制は認められなかった。この結果は、TET-MEND による siRNA 送達のがん部の新生血管に選択的であることを示唆しており、正常臓器に対する影響が少ない選択的な送達法である可能性が明らかとなった。

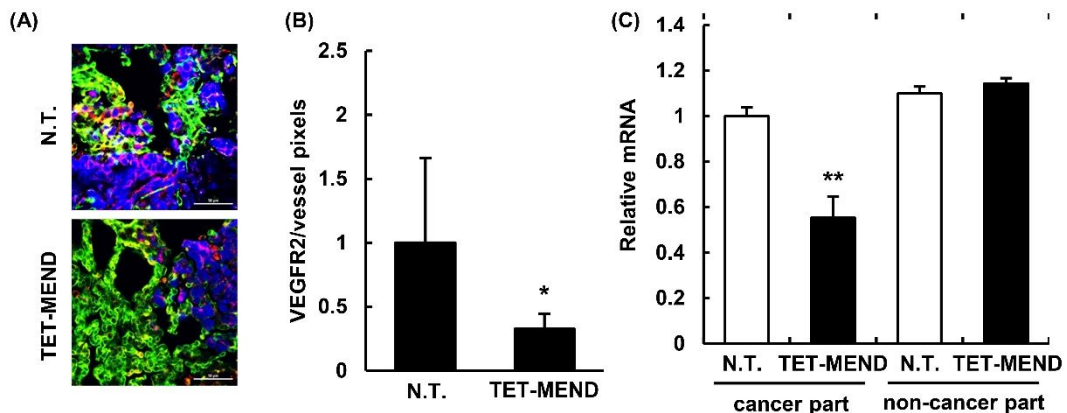


図 2 肺転移巣における TET-MEND による遺伝子抑制効果 (タンパク質・mRNA) の評価

次に、転移巣血管への siRNA 送達による治療効果の評価を行った。同様に作成したマウスに対して隔日で TET-MEND を投与し、生存率を経時的に観察した。初めに、VEGFR2 に対する siRNA を搭載した際の治療効果について評価した。本 siRNA と送達システムの組み合わせは腎細胞がんの原発巣モデルにおいて、すでに治療効果が認められている (Sakurai Y et al., *J Control Release.* (2013))。しかしながら、VEGFR2 の抑制では TET-MEND による延命効果は全く認められなかった。そこで、delta-like ligand 4 (DLL4) に着

目した。DLL4 の抑制は非生産的な血管を増やすことでがん組織の退縮を起こすことが報告されており (Ridgway J et al., *Nature.* (2006))、VEGFR2 とは異なる機序によることから治療効

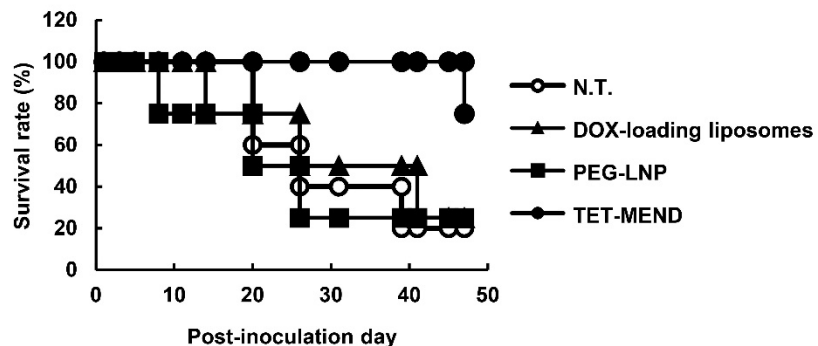


図 3 TET-MEND による新生血管 DLL4 の抑制と延命効果の検証

果が見られることを期待した。この DLL4 に対する siRNA を搭載した TET-MEND を投与したところ、生存期間が延長することが認められた (図 3)。また、リガンドを搭載していない PEG-LNP では延命効果は認められなかったこと。以上のことから、肺転移巣の治療において、新生血管を標的とした siRNA 送達は新規治療法として有用であることが示唆された。

(2) PD-1 抗体との組み合わせによる新規治療法の確立

当初予定していた治療効果がすでに見られたことから、免疫療法との組み合わせによる抗腫瘍効果について検討を開始した。

1. 血管新生阻害と免疫チェックポイント阻害剤による相乗的治療効果の検証

免疫チェックポイント阻害剤である PD-1 抗体に対して部分的な阻害効果を持つマウス大腸がん細胞 MC3 に対する遺伝子抑制効果について評価した。前項と同様 RGD 修飾した粒子を投与して 24 時間後に腫瘍組織の免疫染色を行った。その結果、コントロール siRNA 搭載群では VEGFR2 シグナルの減少は認められなかった一方で、VEGFR2 に対する siRNA 搭載群では有意な発現量の減少が見られた (図 4)。

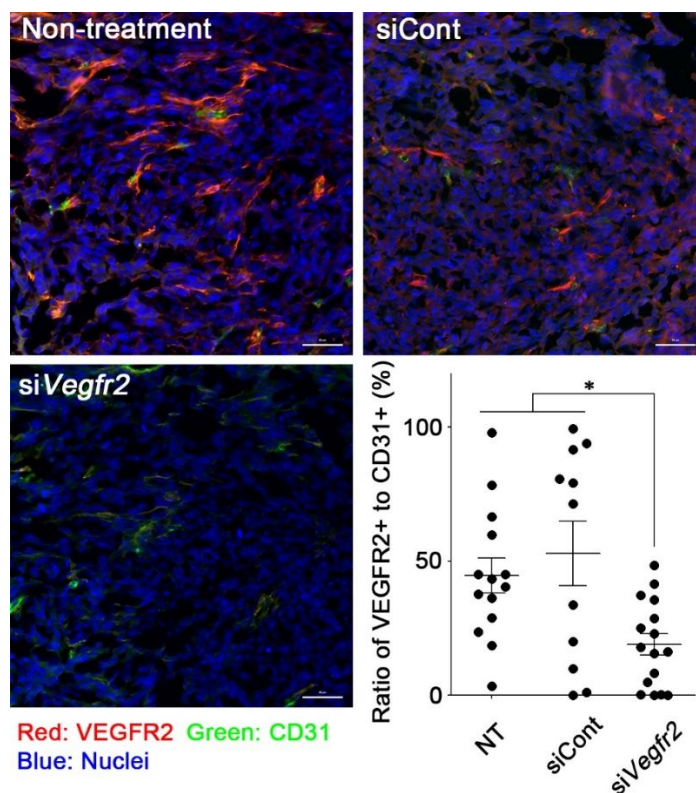


図 4 マウス大腸がん MC3 における VEGFR2 タンパク質抑制の評価

次に、PD-1 抗体との併用治療法について評価を行った。MC3 細胞を移植後抗体と粒子を投与し、経時的に腫瘍体積を計測した (図 5A)。その結果、コントロール IgG 投与と比較して PD-1 抗体単独投与群ならびに VEGFR2 投与群において腫瘍の成長が抑制される様子がみられた (図 5B)。さらに、併用治療群ではより強い相乗的な治療効果が認められた。また、腫瘍体積が 200 mm³ を基準として、それより抑えられた場合を responder 群、成長してしまった場合を non-responder 群とすると、PD-1 抗体単独群では responder 率が 25% だったのに対し、併用療法群では 62.5% まで上昇した (図 5C)。以上のことから、血管を標的とした siRNA 送達による治療と、免疫チェックポイント阻害剤による併用療法は、免疫チェックポイント阻害剤の大きな問題となっている低い奏効率を改善する可能性が示唆された。今後、併用療法によって治療効果が上昇した理由について検討を行う予定である。

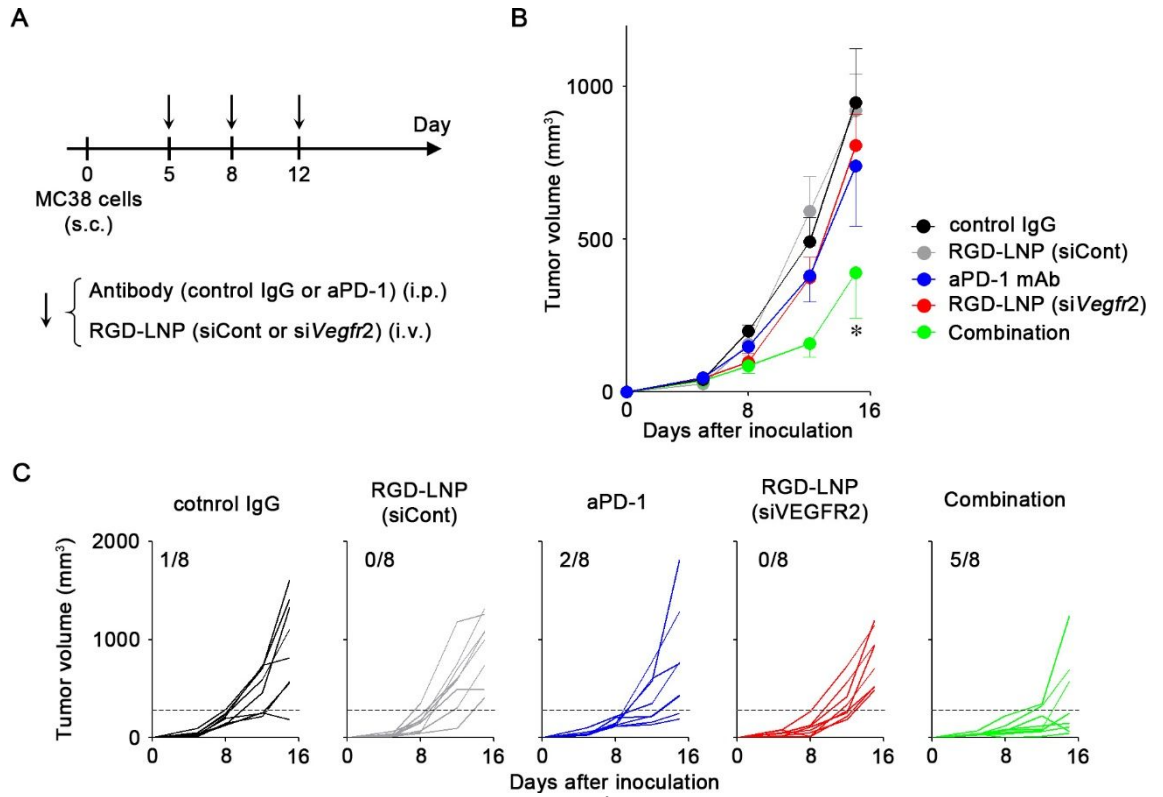


図5 VEGFR2 siRNA 送達と免疫チェックポイント阻害剤による併用療法

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sakurai Y, Hada T, Kato A, Hagino Y, Mizumura W, Harashima H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Effective Therapy Using a Liposomal siRNA that Targets the Tumor Vasculature in a Model Murine Breast Cancer with Lung Metastasis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Ther Oncolytics.	6. 最初と最後の頁 102-108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.omto.2018.10.004.	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yu Sakurai, Wataru Mizumura, Hideyoshi Harashima
2. 発表標題 Development of siRNA delivery system by EpCAM-targeting lipid nanoparticles using non-standard macrocyclic peptide.
3. 学会等名 the 29th Annual Meeting of the European Society for Biomaterials (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 届出時名称：新規ヒアルロン酸誘導体を含む薬剤キャリア及び、新規ヒアルロン酸誘導体とカチオン性脂質による薬剤送達方法	発明者 加藤月、櫻井遊、原島秀吉、樋田京子、樋田泰浩、間石奈湖	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-086308	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----