

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590273  
 研究課題名（和文） siRNAや短鎖RNAが塩基配列特異的に誘導するI型IFNを利用した新規癌治療法  
 研究課題名（英文） A novel cancer therapy using type-I interferon, which is induced by siRNA or short single-stranded RNA in a nucleotide-specific manner.  
 研究代表者  
 武井 佳史 (TAKEI YOSHIFUMI)  
 名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
 研究者番号：70362233

研究成果の概要： RNA干渉は標的遺伝子配列に相補的な短い2本鎖RNA(short interfering RNA, siRNA)による遺伝子発現抑制法である。近年、この siRNA 分子がある特別な塩基配列を持つときに限り、I型インターフェロン(=IFN)を誘導する能力があることが論文発表されている。本研究課題では、siRNA 分子の IFN 誘導能力に着目し、誘導した IFN を利用して癌細胞を殺す所（細胞、及び動物実験）までの成果を得た。

【語句説明】RNA干渉：短い2本鎖RNAが伝令RNAに結合することを介して標的遺伝子が蛋白質に翻訳されることを抑える手法。発見者は2006年のノーベル生理学・医学賞を受賞している。インターフェロン：動物体内で病原体（特にウイルス）や腫瘍細胞などの異物の侵入に反応して細胞が分泌するタンパク質である。癌細胞を殺す作用がある。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：siRNA・インターフェロン応答・抗腫瘍効果・治療・樹状細胞・アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

RNA interference(RNAi)は標的遺伝子配列に対応した短い2本鎖RNA(short

interfering RNA, siRNA)による遺伝子発現抑制法である。RNAiによる遺伝子サイレンシングは、その配列特異性と発現抑制効果が高いことから、癌などの難治性疾患に対する臨

床応用が期待されている。siRNA による標的遺伝子の発現抑制に関する報告が大半の中、2005 年に siRNA 分子による免疫賦活効果 (I 型インターフェロン=IFN や炎症性サイトカインの誘導) が報告された (Nature Medicine, 2005)。即ち siRNA は標的遺伝子の発現抑制活性だけでなく、免疫賦活活性 (新規活性) を持つ。この免疫賦活活性は『特別な塩基配列=IFN inducible sequence (IIS)』を有する siRNA のみが持つ。以下、これを siRNA (IIS) と略す。そこで、我々は siRNA (IIS) の『免疫賦活活性』に着眼し、これを基盤とした新規癌免疫治療法を提案した。

## 2. 研究の目的

免疫賦活 siRNA、即ち siRNA (IIS) をトリガーとして、細胞に I 型 IFN を誘導する。免疫細胞 (形質細胞様樹状細胞, pDC) と非免疫細胞 (線維芽細胞由来癌細胞) では同 siRNA の認識機構が異なる為、戦略を二手に分ける。pDC の場合、IFN- $\alpha$  誘導済 pDC を癌細胞と共培養 (又は細胞融合) して、癌細胞側の増殖抑制・細胞死を追跡する。皮下移植腫瘍に対しては、IFN- $\alpha$  誘導済 pDC を注入する細胞療法を行う。非免疫細胞の場合、RIG-I/Mda5 などの経路を介する IFN- $\alpha$  産生により癌細胞を殺す。双方ともに、皮下移植腫瘍 (動物実験) での癌治療効果を示す所 (=到達点) までを目的に行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 免疫賦活 siRNA をトリガーとした I 型 IFN の誘導 (in vitro 実験)

①免疫細胞に IFN を誘導する場合 形質細胞様樹状細胞 (plasmacytoid dendritic cells, pDC) に対して siRNA (IIS) をリポフェクション法で細胞に導入し、IFN- $\alpha$  分泌量を測定した。

pDC の単離法: ヒト全血から Leucosep 遠沈管 (Greiner 社) と Ficoll-Paque Plus 比重液を用いて末梢血単核球 (PBMC) を分離した。続いて CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) 発現を指標

として pDC をポジティブ選択 (磁気ビーズ system: Miltenyi-Biotec 社) した。単離 pDC を抗 CD303 抗体を用いて免疫染色し、純度を算出した。

検討する免疫賦活 siRNA 等: 4 種の siRNA と 2 種の short single-stranded RNA (ssRNA) を検討した。siRNA 配列のうち、2 種は既発表配列である (Hornung V et al, Nature Medicine, 2005; Judge AD et al, Nature Biotechnology, 2005)。申請者が独自に見出した配列 2 種も検討対象とした。

IFN- $\alpha$  の定量: pDC 培養上清をヒト IFN- $\alpha$  ELISA を用いて定量した。総 RNA を取り、Realtime RT-PCR も検討した。

I 型 IFN 誘導のメカニズムについて、下記の項目も検討した。

- ・pDC 成熟化 (GM-CSF による) の必要性の有無
- ・pDC における siRNA (IIS) 認識機構の解明

②非免疫細胞に IFN を誘導する場合 非免疫細胞の場合、線維芽細胞が Poly (I:C) に反応して、IFN- $\alpha$  を誘導することが知られる。線維芽細胞を形態とするヒト癌細胞 3 種 (腎癌 ACHN、結腸癌 COLO201 及び皮膚黒色腫 COLO800) に対して、siRNA (IIS) を導入後、IFN- $\alpha/\beta$  の分泌量を ELISA で測定した。

### (2) 免疫賦活 siRNA による I 型 IFN 誘導を利用したヌードマウス癌治療 (in vivo 実験)

in vitro の実験成果を in vivo マウス実験に応用して抗腫瘍効果を得ることを目標に下記のような方法で検討を行った。

①pDC を使った癌治療 (細胞療法) ヌードマウス鼠径部皮下にヒト前立腺癌細胞 (PC-3, 前述) を移植して腫瘍を作成した。siRNA (IIS) を pDC に導入して、IFN を誘導した。腫瘍に IFN 誘導済 pDC を注入後 (2x10<sup>6</sup> 個/腫瘍)、下記の 3 項目を検討した。

- ・腫瘍の増殖阻害
- ・腫瘍内部や血中の I 型 IFN 量
- ・TUNEL 法による癌組織のアポトーシス

②非免疫細胞の場合の癌治療実験 ヒト癌細胞(癌種は線維芽細胞由来の上述の3種)をヌードマウスに皮下移植して腫瘍を作成する。I型IFN誘導の最も高いsiRNA(IIS)を腫瘍に直接注入する。アテロコラーゲンDDSにより、注入したsiRNA(IIS)の安定性を維持し、腫瘍への取り込みをはかった。

#### 4. 研究成果

研究成果を下記の如く、2つに分けて記載する。

##### (1) 免疫賦活 siRNA をトリガーとした I 型 IFN の誘導 (in vitro 実験) に関する成果

ヒト全血から、Leucosep 遠沈管と Ficoll-Paque Plus 比重液を用いて末梢血単核球(PBMC)を分離し、続いて CD304(BDCA-4)発現を指標として形質細胞様樹状細胞(pDC)をポジティブ単離することに成功した。単離した pDC の純度は 82%であった。この pDC に対して、IIS 配列を有する siRNA をリポフェクション法で導入すると、細胞培養上清中に IFN- $\alpha$  が分泌された。pDC による IFN- $\alpha$  誘導に GM-CSF の添加はそれほど奏功しなかった。また、リポフェクション法を電気導入法にかえると、同 IFN- $\alpha$  誘導作用が消失した。ヒト前立腺癌細胞 PC-3 を IFN- $\alpha$  誘導済 pDC と共培養することによって、癌細胞 PC-3 の増殖が抑制されることを証明した。細胞融合装置を用いて、IFN- $\alpha$  誘導済 pDC と PC-3 を融合すると、癌細胞の死滅効果が強くなった。

##### (2) 免疫賦活 siRNA による I 型 IFN 誘導を利用したヌードマウス癌治療 (in vivo 実験) に関する成果

①樹状細胞を使った癌治療(細胞療法)ヌードマウス鼠径部皮下に移植して作成した腫瘍(=ヒト前立腺癌由来 PC-3 腫瘍)に対して、IFN 誘導済樹状細胞(pDC)を注入した。その結果、腫瘍のアポトーシス誘導(TUNEL 法

による)に成功し、有意な抗腫瘍効果を得た。

②非免疫細胞(線維芽細胞)に対する癌治療 ヒト癌細胞3種(腎癌 ACHN、結腸癌 COLO201、皮膚黒色腫 COLO800: いずれも線維芽細胞由来の癌)を各々ヌードマウス皮下に移植し、腫瘍を作成した。これらの腫瘍に対して、治療実験を行った。その結果、IFN 誘導を起こす siRNA (siRNA-IIS) を腫瘍に直接注入することにより、有意な抗腫瘍効果を得た。抗腫瘍効果の作用機序が、これらの癌細胞において誘導された IFN- $\alpha$  によるアポトーシスを介したものであることを証明した。

#### 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15件)

1. Mu P, Nagahara S, Makita N, Tarumi S, Kadomatsu K, Takei Y. Systemic delivery of siRNA specific to tumor mediated by atelocollagen: Combined therapy using siRNA targeting Bel-xL and cisplatin against prostate cancer. Int J Cancer, in press, 2009. 査読有
2. Sakamoto I, Ito Y, Mizuno M, Suzuki Y, Sawai A, Tanaka A, Maruyama S, Takei Y, Yuzawa Y, Matsuo S. Lymphatic vessels develop in tubulo-interstitial fibrosis. Kidney Int, in press, 2009. 査読有
3. Takenaka H, Horiba M, Ishiguro H, Sumida A, Hojo M, Usui A, Akita T, Sakuma S, Ueda Y, Kodama I, Kadomatsu K. Midkine prevents ventricular remodeling and improves long-term survival after myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol, Vol. 296 (No. 2): H462-9, 2009. 査読有
4. Takei Y\*, Nemoto T, Mu P, Fujishima T, Ishimoto T, Hayakawa Y, Yuzawa Y, Matsuo

S, Muramatsu T, Kadomatsu K. In vivo silencing of a molecular target by short interfering RNA electroporation: tumor vascularization correlates to delivery efficiency. *Mol Cancer Ther*, Vol. 7 (No. 1): 211-21, 2008. 査読有

\*, corresponding author.

5. Ishimoto T, Takei Y\*, Yuzawa Y, Hanai K, Nagahara S, Tarumi Y, Matsuo S, Kadomatsu K. Downregulation of monocyte chemoattractant protein-1 involving short interfering RNA attenuates hapten-induced contact hypersensitivity. *Mol Ther*, Vol. 16 (No. 2): 387-95, 2008. 査読有

\*, corresponding author.

6. Uehara S, Shimada N, Takeda Y, Koyama Y, Takei Y, Ando H, Satoh S, Uno A, Sakurai K. 3' Poly(dA)-tailed thrombin DNA aptamer to increase DNase-resistance and clotting inhibitory activity. *Bull Chem Soc Jpn*, Vol. 81 (No. 11): 1485-91, 2008. 査読有

7. Narita H, Chen S, Komori K, Kadomatsu K. Midkine is expressed by infiltrating macrophages in in-stent restenosis in hypercholesterolemic rabbits. *J Vasc Surg*, Vol. 47 (No. 6): 1322-9, 2008. 査読有

8. Ikematsu S, Nakagawara A, Nakamura Y, Ohira M, Shinjo M, Kishida S, Kadomatsu K. Plasma midkine level is a prognostic factor for human neuroblastoma. *Cancer Sci*, Vol. 99 (No. 10): 2070-4, 2008. 査読有

9. Maekawa F, Minehira K, Kadomatsu K, Pellerin L. Basal and stimulated lactate fluxes in primary cultures of astrocytes are differentially controlled by distinct proteins. *J Neurochem*, Vol. 107 (No. 3): 789-98, 2008. 査読有

10. Tanabe K, Matsumoto M, Ikematsu S,

Nagase S, Hatakeyama A, Takano T, Niikura H, Ito K, Kadomatsu K, Hayashi S, Yaegashi N. Midkine and its clinical significance in endometrial carcinoma. *Cancer Sci*, Vol. 99 (No. 6): 1125-30, 2008. 査読有

11. Chen S, Bu G, Takei Y, Sakamoto K, Ikematsu S, Muramatsu T, Kadomatsu K. Midkine and LDL-receptor-related protein 1 contribute to the anchorage-independent cell growth of cancer cells. *J Cell Sci*, Vol. 120 (No. 22): 4009-15, 2007. 査読有

12. Ishiguro K, Ando T, Maeda O, Ohmiya N, Niwa Y, Kadomatsu K, Goto H. Ginger ingredients reduce viability of gastric cancer cells via distinct mechanisms. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 362 (No. 1): 218-23, 2007. 査読有

13. Kosugi T, Yuzawa Y, Sato W, Arata-Kawai H, Suzuki N, Kato N, Matsuo S, Kadomatsu K. Midkine is involved in tubulointerstitial inflammation associated with diabetic nephropathy. *Lab Invest*, Vol. 87 (No. 9): 903-13, 2007. 査読有

14. Maehara H, Kaname T, Yanagi K, Hanzawa H, Owan I, Kinjou T, Kadomatsu K, Ikematsu S, Iwamasa T, Kanaya F, Naritomi K. Midkine as a novel target for antibody therapy in osteosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun*, Vol. 358 (No. 3): 757-62, 2007. 査読有

15. Hidaka H, Yagasaki H, Takahashi Y, Hama A, Nishio N, Tanaka M, Yoshida N, Villalobos IB, Wang Y, Xu Y, Horibe K, Chen S, Kadomatsu K, Kojima S. Increased midkine gene expression in childhood B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, Vol. 31 (No. 8): 1045-51, 2007. 査読有

[学会発表] (計8件)

1. Mu P, Kadomatsu K, Takei Y. The combinational therapy of Bcl-xL siRNA and cisplatin in prostate cancer. *Biochemistry and Molecular Biology* 2008 (BMB 2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会 2008年12月12日 (横浜市) 査読有)

2. 武井佳史 アテロコラーゲンを用いた siRNA の腫瘍特異的デリバリー 第67回日本癌学会総会 Meet the Expert (Luncheon Seminar) 共催 株式会社高研 (名古屋市・2008年10月29日) 査読有

3. 門松健治、武井佳史、岸田聡 成長因子ミッドカインの癌進展への関与 第67回日本癌学会総会 International session Chemokine, cytokine, and Cancer (名古屋市・2008年10月28日) 査読有

4. Takei Y. Paclitaxel fits nicely to combine with molecular targeting cancer therapy via RNA interference. Ehrlich II-2nd World Conference on Magic Bullets Celebrating the 100th Anniversary of the Nobel Prize Award to Paul Ehrlich (Invited Talk) Oct 5, 2008 Nürnberg, Germany. 査読有

5. 石本卓嗣、武井佳史、湯澤由起夫、松尾清一、門松健治 Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) 発現を減少する siRNA による接触性過敏反応の抑制 第30回日本分

子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 (横浜市・2007年12月14日) 査読有

6. ムー・ピン、門松健治、武井佳史 Bcl-xL siRNA とシスプラチンの併用による前立腺癌治療第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 (横浜市・2007年12月14日) 査読有

7. Takei Y. In vivo delivery of siRNA by electroporation. The 21st Century Center of Excellence (COE) Program 4th International Symposium on Functional Molecules Linked to Neurodegeneration and Oncogenesis - Towards Molecular Targeted Therapy (Nagoya, JAPAN. Oct 25-26, 2007). 査読有

8. 武井佳史、柳原五吉 ヒトスキルス胃癌の腹膜播種性転移を制御する microRNA 群の解析と治療への応用 第66回日本癌学会総会 (横浜市・2007年10月5日) 査読有

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

武井 佳史 (TAKEI YOSHIFUMI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：70362233

##### (2) 研究分担者

門松健治 (KADOMATSU KENJI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：80204519