

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：35408

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05703

研究課題名（和文）Lipid-siRNA内包エクソソームを用いた免疫チェックポイント阻害剤の開発

研究課題名（英文）Development of the immune checkpoint inhibitor using the Lipid-siRNA conjugates encapsulated with exosome

研究代表者

久保 貴紀（KUBO, TAKANORI）

安田女子大学・薬学部・准教授

研究者番号：90435751

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）：本研究課題において、まず、免疫チェックポイントを標的としたLipid-siRNAを作製し、RNAi効果について評価した。その結果、Lipid-siRNAは強く標的とする免疫チェックポイントの発現を抑制した。さらに、Lipid-siRNA内包エクソソームを作成しRNAi効果を検討した結果、極めて低濃度（数pM）で、かつ、持続性高く、標的遺伝子の発現を抑制した。また、Lipid-siRNAは担がんマウスモデルに対しても、優れた抗腫瘍効果を示した。これらの結果は、Lipid-siRNAおよびLipid-siRNA内包エクソソームが新しい免疫チェックポイント阻害剤として応用できることを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗体を用いた「免疫チェックポイント阻害剤」は臨床で使用され優れた抗がん作用を持つ。しかし、免疫治療法で使用される抗体医薬品は、重篤な副作用の懸念や適用範囲の制限なども残されている。本研究で開発した、Lipid-siRNA内包エクソソームを用いた免疫チェックポイント阻害剤は、RNA干渉技術とエクソソームの能力を応用した「新しいタイプの免疫チェックポイント阻害剤」であり、本研究の結果からLipid-siRNA内包エクソソームは標的遺伝子の発現を低濃度で極めて強く抑制できることを証明した。本研究で開発した技術は、他の難治性疾患にも適用でき、応用範囲も広いことから学術的・社会に非常に意義がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we synthesized the Lipid-siRNA conjugates encapsulated with exosome, which targeted to immune checkpoint including PD-L1 and B7H4, and evaluated RNAi effect at in vitro and in vivo. At first, we evaluated RNAi efficacy of the Lipid-siRNAs (Lipid-siPDL1 and Lipid-siB7H4) without exosome. As a result, Lipid-siRNAs strongly inhibited the expression of a target immune checkpoint, and these effects were stronger than non-modified siRNAs. Next, we synthesized Lipid-siRNA conjugates encapsulated with exosome, and evaluated RNAi effect. The Lipid-siRNA conjugates encapsulated with exosome were able to strongly inhibit the expression of the target genes at extremely low concentration and exhibited prolonged RNAi efficacy. Furthermore, Lipid-siRNA showed excellent anti-tumor effect using patient-derived xenograft mouse models. These results strongly suggested that the Lipid-siRNAs and Lipid-siRNAs encapsulated with exosome may be applicable as a novel immune checkpoint inhibitor.

研究分野：生物有機化学、核酸化学

キーワード：siRNA 免疫チェックポイント エクソソーム 脂質 コンジュゲート核酸 核酸医薬

## 1. 研究開始当初の背景

がんの薬物療法には、がん細胞の死滅を直接目的とする方法と、免疫、血管増殖因子、サイトカインなどをコントロールすることで間接的にがん細胞の死滅を目的とする方法が考えられる。近年、がん薬物治療において、バイオ医薬品としての抗体を用いた分子標的がん治療薬の有効性が実証され、臨床でも応用されている。特に、免疫細胞である T 細胞表面に発現する PD-1 を標的とした抗体 (抗 PD-1 抗体: ニボルマブなど) や、PD-1 のリガンドでがん細胞表面に発現している PD-L1 を標的とした抗体 (抗 PD-L1 抗体: デュルバルマブなど) などの抗体医薬品を用いた「免疫チェックポイント阻害剤」は臨床で使用され、強い抗がん作用を持つことが証明されている。しかしながら、これらの免疫治療法で使用される抗体医薬品は、重篤な副作用の懸念や適用範囲の制限、価格の問題なども残されており、解決すべき課題となっている。

次世代のバイオ医薬品として注目されている RNAi 法は抗体医薬品の問題を打破できる有効な手法である。RNAi 法は短い 2 本鎖 RNA (siRNA) が、標的となる mRNA へ配列特異的に結合し遺伝子の発現を低濃度で強力に抑制する。そのため副作用が極めて少なく、がんを始めとした様々な疾患への利用が期待されている。一方で、siRNA は低い安定性や細胞内へのデリバリーに問題がある。我々は、siRNA の問題点を克服した脂肪酸結合型 siRNAs (Lipid-siRNAs) の開発に成功している。そこで本研究では、より効果的な遺伝子発現抑制能を獲得するために、エクソソームによる Lipid-siRNAs の標的組織・細胞へのデリバリー技術を開発することを試みた。つまり、PD-1 または PD-L1 をコードした mRNA に対する Lipid-siRNAs と、エクソソームの生体内デリバリー能力を応用することで、極めて強い抗がん作用を持ち、副作用が限りなく少ない、新しいタイプの「免疫チェックポイント阻害剤の開発」を行った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は「強い RNAi 効果を持つ Lipid-siRNAs とエクソソームの生体内デリバリー能力を応用し効果的に免疫チェックポイントを阻害する」ことであるが、これを達成するために 2 つの大きな課題がある。「免疫チェックポイントに対する Lipid-siRNAs の有効性を実証すること」、「エクソソームをデリバリー剤として利用し従来の siRNA を凌ぐ高活性な Lipid-siRNA 内包エクソソームを開発する」ことである。

我々はこれまでの研究で、PD-1 を標的とした Lipid-siRNAs (Lipid-siPD1) をデザイン・合成し、T 細胞へ導入させることで T 細胞中の PD-1 の発現をある程度抑制することに成功した。しかし、その効果は低く、Lipid-siPD1 の T 細胞への導入効率の向上が課題であった。そこで、がん細胞表面に存在する免疫チェックポイントである PD-L1 に着目した。多くのがん細胞は、T 細胞に比べ Lipid-siRNAs の導入効率に優れ、これまでの研究で様々な遺伝子を標的とした Lipid-siRNAs の強い RNAi 効果を実証している。そこで本研究では、がん細胞に発現する PD-L1 などの免疫チェックポイントを標的とした Lipid-siRNAs (Lipid-siPDL1) をデザイン・合成し、各種がん細胞に発現している PD-L1 などの免疫チェックポイントの発現を強く抑制することで、抗体医薬品に代わる新しいタイプの免疫チェックポイント阻害剤としての Lipid-siRNAs の開発を第一の目的とした。

しかし、免疫チェックポイントの発現を阻害出来る高活性な Lipid-siRNAs を開発しても、臨床応用を見据えた場合、生体内デリバリーの課題は払拭されない。そこで本研究では、Lipid-siRNAs の新規なデリバリー法として、「エクソソーム」に着目した。エクソソームは細胞間コミュニケーションの重要分子であり、がん細胞から放出されるエクソソームは、その情報を内包し転移先などを決定している。そのため、がんの診断や腫瘍への効果的なデリバリー剤としての利用が期待されている。Lipid-siRNAs をエクソソームへ内包した、Lipid-siRNA 内包エクソソームを開発し、免疫チェックポイント阻害剤を含めた抗がん剤として利用することが本研究の第二の目的である。この新しい手法は、これまでの免疫チェックポイント阻害剤を含む抗がん剤に比べ、副作用の懸念が少なく、適用範囲も広く、安定供給も出来ることから、新しいがん治療の道を開く可能性がある。加えて、その他の標的細胞および標的遺伝子への応用や、がんの発生・増殖・進展の機能解明、遺伝子工学的な利用などにも貢献でき、その学術的応用範囲は極めて広い。

## 3. 研究の方法

本研究課題である、「Lipid-siRNA 内包エクソソームを用いた免疫チェックポイント阻害剤の開発」において、「Lipid-siRNAs による免疫チェックポイントの発現抑制効果を確認すること」、「Lipid-siRNAs のエクソソームへの内包と標的細胞・組織への特異的デリバリーを達成すること」は重要である。そのために、以下の研究を行った。

### (1) 各がん細胞での免疫チェックポイントの発現確認

大腸がん(HT29)やスキルス胃がん(44As3)、肺がん(A549)、乳がん(T47D)などのがん細胞において、免疫チェックポイント分子が発現しているか RT-qPCR を用いて確認した。がん細胞側の免疫チェックポイント分子には B7 群 (B7-H1、B7-H2、B7-H3、B7-H4 など) があり、がん細胞による免疫チェックポイントの種類や発現量に違いがある。各がん細胞での主要な免疫チェックポイントの種類や発現量の違いを詳細に調査することは、Lipid-siRNAs をデザインする上で極めて重要である。また、通常免疫チェックポイントは各種サイトカインによる刺激により誘導されるが、その影響もがん細胞によって異なるためこれについても調査した。

#### (2) 免疫チェックポイントに対する Lipid-siRNAs のデザイン・合成と RNAi 効果の確認

標的とする免疫チェックポイントは、がん細胞に発現する PD-L1 や B7-H4 とした。この PD-L1 や B7-H4 に対する siRNAs (siPDL1、siB7H4) をデザインし、この siRNAs の末端に脂肪酸 (パルミチン酸やオレイン酸など) を結合させた Lipid-siRNAs (Lipid-siPDL1、Lipid-siB7H4) を合成した。Lipid-siRNAs の合成は、本研究でこれまでに開発した簡便かつ高収率な合成技術を用いた。合成した Lipid-siRNAs はヒト由来がん細胞に導入し、標的とする免疫チェックポイントの発現を、RT-qPCR、フローサイトメトリー (FACS) などを用いて確認した。また、サイトカインであるインターフェロン (INF $\gamma$ ) 存在下で PD-L1 の発現を亢進させた状態における Lipid-siPDL1 の RNAi 効果についても検討した。

#### (3) Lipid-siRNA 内包エクソソームの作製と細胞導入の確認

エクソソームは市販されており調整が容易なミルクエクソソームを用いた。Lipid-siRNAs のエクソソームへの内包は Exo-Fect reagent (フナコシ) を用い、効率よく Lipid-siRNAs をエクソソームへ内包させた。作製した Lipid-siRNA 内包エクソソームはがん細胞へ導入し、その細胞導入効率を共焦点蛍光顕微鏡および FACS を用いて評価した。

#### (4) Lipid-siRNA 内包エクソソームの免疫チェックポイントに対する RNAi 効果の確認

作製した Lipid-siRNA 内包エクソソームの RNAi 効果をごん細胞で発現している PD-L1 または B7H4 を標的とし、RT-qPCR、FACS などを用いて評価した。

#### (5) Lipid-siRNAs の *in vivo* への応用

がん細胞をヌードマウスの皮下に移植した担がんマウスを作製し、Lipid-siRNAs を腫瘍へ直接投与することで Lipid-siRNAs の抗腫瘍効果を評価した。また、がん細胞をヌードマウスの門脈から移植して肝臓に転移させた肝がん転移マウスモデルを作製し、Lipid-siRNAs をマウス尾静脈より全身投与したときの、Lipid-siRNAs の抗腫瘍効果についても検討した。移植した細胞は、ルシフェラーゼを恒常的に発現することが出来るルシフェラーゼ発現がん細胞で、*in vivo* イメージング装置 (IVIS) を用いて非侵襲的に腫瘍の増大を確認することが出来る。*In vivo* 用の導入剤として、インビボフェクトアミン 3.0 (IVF) を用いた。また、エクソソームを用いた *in vivo* 導入についても検討を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) 各がん細胞での免疫チェックポイントの発現確認

様々ながん細胞における免疫チェックポイントの発現を確認した結果、がん免疫チェックポイントの 1 つである PD-L1 (B7-H1) は、スキルス胃がん細胞 (44As3) において高く発現していることが明らかとなり、また別の免疫チェックポイントである B7-H4 は乳がん細胞 (T47D) や別の胃がん細胞 (MKN28) で高く発現していることが明らかとなった。このように、がん細胞によって免疫チェックポイント分子の発現量に差があり、かつ、がん細胞は発現する免疫チェックポイント分子の種類を巧みに使い分けていることが示唆された。また、サイトカインによる刺激によってもその発現は亢進した。その中でも、INF $\gamma$  は多くのがん細胞の PD-L1 の発現を濃度依存的に高く亢進し、もともと PD-L1 の発現量が少ない T47D 細胞などにおいても INF $\gamma$  添加によりその発現は著しく高くなった。

### (2) 免疫チェックポイントに対する Lipid-siRNAs のデザイン・合成と RNAi 効果の確認

PD-L1 を標的とした Lipid-siPDL1 をデザイン・合成した。結合させた脂肪酸は、パルミチン酸 (C16)、ステアリン酸 (C18)、オレイン酸 (Ole)、リノール酸 (Lio) であり、siRNA のセンス鎖の 5' 末端にアミノ基を介して直接結合させた。作製した、Lipid-siPDL1 を PD-L1 が高発現しているスキルス胃がん細胞 (44As3) に導入し、PD-L1 遺伝子の発現抑制効果について評価した。その結果、siPDL1 は標的である PD-L1 の発現を強く抑制しており、Lipid-siPDL1 は未修飾の siPDL1 に比べ PD-L1 の発現を強く抑制した (図 1)。特に、不飽和脂肪酸であるオレイン酸やリノール酸を結合させた Ole-siPDL1 や Lio-siPDL1 において強い RNAi 効果を認めた。さらに、INF $\gamma$  を 44As3 細胞に添加し、PD-L1 の発現を強制的に高くした状態での Lipid-siPDL1 の RNAi 効果についても検討した (図 2)。その結果、Lipid-siPDL1 は INF $\gamma$  の刺激によって PD-L1 が高く発現した状態においても、強く PD-L1 の発現を抑制し、未修飾の siPDL1 よりも顕著に強い RNAi 効果を示した。また、Lipid-siPDL1 の中でも Lio-siPDL1 は最も強い RNAi 効果を

示した。FACS による評価においても、同様の結果を得ており、mRNA レベルのみならず、細胞表面に提示される PD-L1 についても Lipid-siPDL1 で減少されることが出来た。

また、B7-H4 を標的とした Lipid-siB7H4 についてもデザイン・合成し、標的遺伝子に対する発現抑制効果を検討した。細胞は B7-H4 を比較的高く発現している乳がん細胞(T47D)を用いた。その結果、Lipid-siB7H4 に関しても標的である B7-H4 の発現を強く抑制しており、未修飾の siB7H4 より強い遺伝子発現抑制効果を確認した。

### (3) Lipid-siRNA 内包エクソソームの作製と細胞導入の確認

エクソソームは市販されており調整が容易なミルクエクソソームを用いた。ミルクエクソソームには牛由来ミルクエクソソームとヒト由来ミルクエクソソームがあり、Lipid-siRNAs とエクソソームの複合体において、ヒト由来ミルクエクソソームの方が RNAi 効果が高かったため本研究ではヒト由来ミルクエクソソームを使用した。Lipid-siRNAs のエクソソームへの内包は Exo-Fect reagent(フナコシ)を用いた。Exo-Fect reagent には Exo-Fect Exosome Transfection Kit と Exo-Fect siRNA/miRNA Transfection Kit があり、どちらもエクソソームへの siRNA のトランスフェクションに最適化された試薬であったが、Exo-Fect siRNA/miRNA Transfection Kit を用いた方が Lipid-siRNAs 内包エクソソームの RNAi 効果が高かったため、本研究では Exo-Fect siRNA/miRNA Transfection Kit を用いた。これらの条件で作製した Lipid-siRNA 内包エクソソームの RNAi 効果、細胞導入性などについて検討した。まず、本実験系の最適化を進めるために、これまでの我々の研究で RNAi 効果等で優れた実績がある

カテニンを標的とした Lipid-siRNAs(Lipid-siCATs)を用いた。Lipid-siCATs は、これまでに 16 種類の異なる脂肪酸を結合させることに成功しており、かつ、RNAi 効果も強いことを確認している。Lipid-siCATs 内包エクソソームをがん細胞に添加し、その標的遺伝子発現抑制効果を RT-qPCR で確認したところ、一般的な細胞導入剤であるリポソーム(LipofectamineRNAiMAX)を用いたときに比べ、大きく RNAi 効果を増強させるには至らなかった。そこで、Lipid-siRNA 内包エクソソームにカチオン性リポソームを加え、エクソソーム自体の取り込みを増強させたところ、極めて強い RNAi 効果を示した。またこの効果は、Lipid-siRNA 内包エクソソームにおいて顕著に増強し、siRNA 内包エクソソームを同方法で添加した場合に比べ、著しく強い RNAi 効果を示した(図 3)。また、Lipid-siRNA 内包エクソソーム、および、そのカチオン性リポソームとの複合体についての細胞導入性を共焦点顕微鏡および FACS により観察した結果、Lipid-siRNA 内包エクソソーム/リポソーム複合体は、高い細胞導入性を有していることが明らかとなった(図 4)。

### (4) Lipid-siRNA 内包エクソソームの免疫チェックポイントに対する RNAi 効果の確認

Lipid-siRNA 内包エクソソームはカチオン性リポソームとの複合体を形成することにより極めて強い RNAi 効果発揮することが示唆されたため、PD-L1 を標的とした Lipid-siPDL1 にもこの技術を応用した。PD-L1 に対する Lipid-siPDL1 内包エクソソーム/リポソーム複合体を

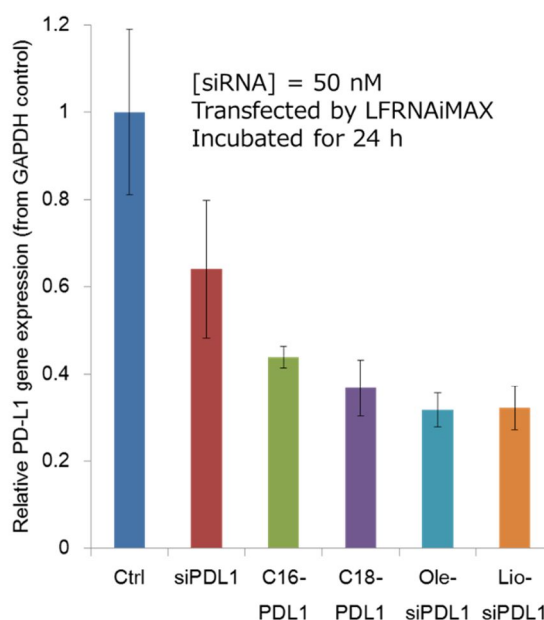


図1. Lipid-siPDL1sによる RNAi効果. スキルス胃がん細胞(44As3)で高発現している PD-L1 mRNA をLipid-siPDL1s(50nM)でノックダウンした。Lipid-siPDL1の細胞への導入はLFRNAiMAXを用いた。

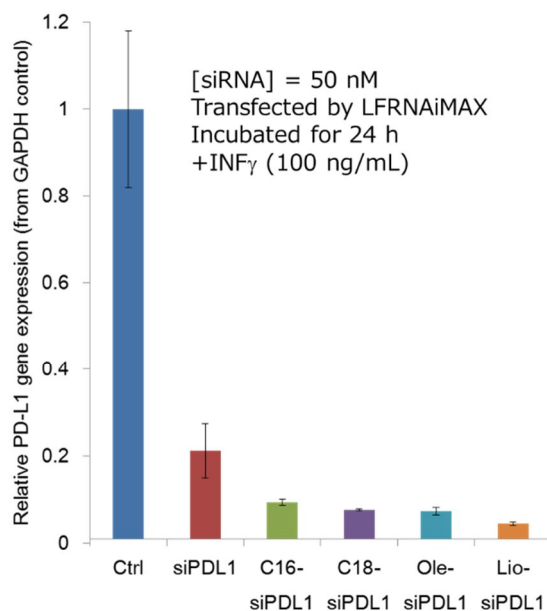


図2. INF $\gamma$ 存在下においてLPD-L1の発現を亢進させた状態でのLipid-siPDL1s(50 nM)による RNAi効果. Lipid-siPDL1の細胞への導入はLFRNAiMAXを用いた。



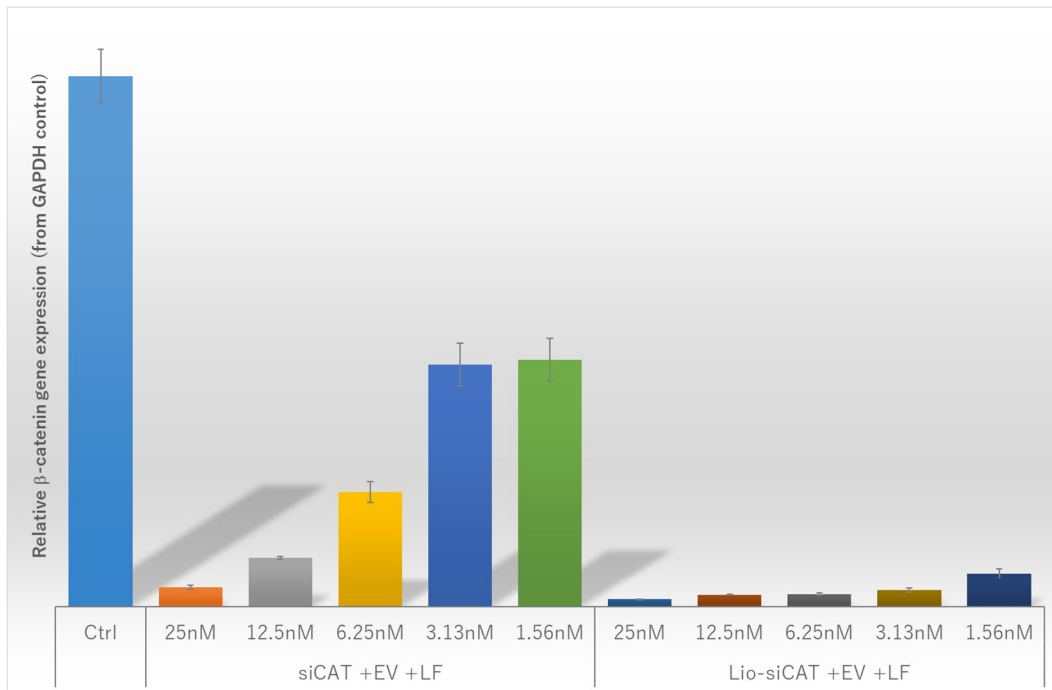


図3. Lipid-siRNA内包エクソソーム/リポソーム複合体の濃度依存的なRNAi効果. siRNAおよびLipid-siRNAをエクソソームへ内包し、カチオン性リポソームを加え細胞へ添加した。48時間インキュベート後、標的遺伝子( $\beta$ -カテニン)の発現をRT-qPCR法にて評価した。siCAT: $\beta$ -カテニンを標的としたsiRNA. Lio-siCAT: siCATのセンス鎖の5'末端にリノール酸を結合させたLipid-siRNA. EV: エクソソーム. LF:カチオン性リポソーム.

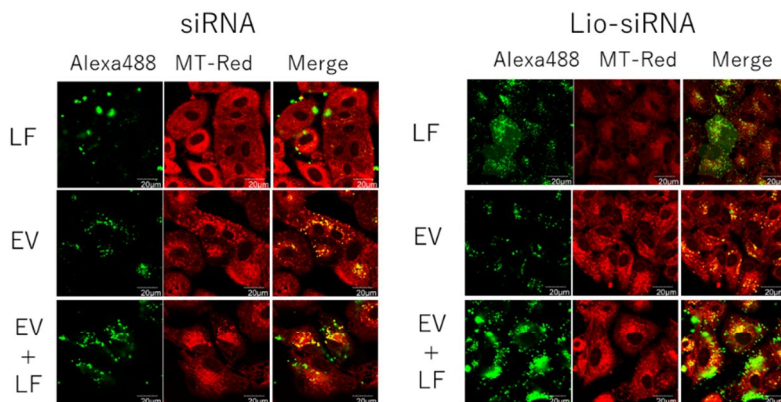


図4. Lipid-siRNA内包エクソソーム/リポソーム複合体の細胞導入性. Alexa488でラベル化したsiRNAおよびLipid-siRNAを、リポフェクトアミンとの複合体(LF)、エクソソームへの内包(EV)、エクソソームへ内包後リポフェクトアミンと複合体(EV+LF)を作成し、細胞へ導入し、共焦点蛍光顕微鏡で観察した。Lio-siRNA: センス鎖の5'-末端にリノール酸を結合させたLipid-siRNA. Alexa488: Alexa488でラベル化したsiRNAまたはLipid-siRNA. MT-Red: ミトコンドリア. Merge: Alexa488とMT-Redの画像を重ね合わせた画像.

T47D 細胞に添加し、PD-L1 の発現を RT-qPCR で観察した結果、強い RNAi 効果が確認できた。しかしながら、 $\beta$ -カテニンを標的とした Lipid-siCAT 内包エクソソーム/リポソーム複合体に比べ、Lipid-siPDL1 内包エクソソーム/リポソーム複合体の RNAi 効果は期待したほど強いものではなかった。今後、エクソソームへの内包方法やリポソームの添加方法など、更なる検討が必要である。

#### (5) Lipid-siRNAs の *in vivo* への応用

まず、Lipid-siRNAs の抗腫瘍効果を検討す

るために、マウス皮下に腫瘍を形成したマウスモデルを用いて、Lipid-siRNAs/IVF 複合体を直接投与した。その結果、Lipid-siRNAs/IVF 複合体を投与した担がんマウス群は、siRNAs/IVF を投与した担がんマウス群に比べ、腫瘍の増大が抑制された。次に、肝臓にがん細胞が転移した肝転移マウスモデル用いて、Lipid-siRNAs/IVF 複合体をマウス尾静脈より投与した。その結果、全身投与の系においても、Lipid-siRNAs/IVF 複合体は優れた抗腫瘍効果を発揮し、siRNAs/IVF 投与群に比べ有意に腫瘍の増大を抑制した。Lipid-siRNA 内包エクソソームや Lipid-siRNA 内包エクソソーム/リポソーム複合体についても *in vivo* での RNAi 効果を確認したかったが、本研究期間内に実行することが出来なかった。今後、エクソソームを *in vivo* デリバリーとした Lipid-siRNA の抗腫瘍効果について検討したい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yanagihara Kazuyoshi, Iino Yuki, Yokozaki Hiroshi, Kubo Takanori, Oda Tatsuya, Kubo Takashi, Komatsu Masayuki, Sasaki Hiroki, Ichikawa Hitoshi, Kuwata Takeshi, Seyama Toshio, Ochiai Atsushi	4. 巻 89
2. 論文標題 A Comparative Study of Patient-Derived Tumor Models of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Involving Orthotopic Implantation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000521714	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 Nishimura Yoshio, Kikuchi Hidetomo, Kubo Takanori, Arai Rie, Toguchi Yuki, Yuan Bo, Sunaga Katsuyoshi, Cho Hidetsura	4. 巻 70
2. 論文標題 Synthesis of 4,4-Disubstituted 3,4-Dihydropyrimidin-2(1 <i>H</i> )-ones and -thiones, the Corresponding Products of Biginelli Reaction Using Ketone, and Their Antiproliferative Effect on HL-60 Cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 111~119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c21-00794	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 Akagi Reiko, Kubo Takanori, Hatori Yuta, Miyamoto Takafumi, Inouye Sachiye	4. 巻 170
2. 論文標題 Heme oxygenase-1 induction by heat shock in rat hepatoma cell line is regulated by the coordinated function of HSF1, NRF2 and BACH1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 501~510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab065	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 Takanori Kubo, Yoshio Nishimura, Yuichiro Sato, Kazuyoshi Yanagihara, Toshio Seyama	4. 巻 16
2. 論文標題 Sixteen Different Types of Lipid-Conjugated siRNAs Containing Saturated and Unsaturated Fatty Acids and Exhibiting Enhanced RNAi Potency.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS chemical biology	6. 最初と最後の頁 150-164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.0c008	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 Ken-Ichiro Sakata , Kojiro Maeda , Nozomi Sakurai , Shanshang Liang , Seitaro Nakazawa , Kazuyoshi Yanagihara , Takanori Kubo , Hironori Yoshiyama , Yoshimasa Kitagawa , Jun-Ichi Hamada , Hisashi Iizasa	4. 巻 40
2. 論文標題 ADAR2 Regulates Malignant Behaviour of Mesothelioma Cells Independent of RNA-editing Activity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer research	6. 最初と最後の頁 1307-1314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.14072	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 Yuta Hatori , Takanori Kubo , Yuichiro Sato , Sachiye Inouye , Reiko Akagi , Toshio Seyama	4. 巻 9
2. 論文標題 Visualization of the Redox Status of Cytosolic Glutathione Using the Organelle- and Cytoskeleton-Targeted Redox Sensors.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Antioxidants (Basel, Switzerland)	6. 最初と最後の頁 129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox9020129	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 Yoshio Nishimura , Hidetomo Kikuchi , Takanori Kubo , Yuki Gokurakuji , Yuri Nakamura , Rie Arai , Bo Yuan , Katsuyoshi Sunaga , Hidetsura Cho	4. 巻 61
2. 論文標題 Synthesis of 6-unsubstituted 2-oxo, 2-thioxo, and 2-amino-3,4-dihydropyrimidines and their antiproliferative effect on HL-60 cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Tetrahedron Letters	6. 最初と最後の頁 151967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tetlet.2020.15196	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 Kubo T, Nishimura Y, Hatori Y, Akagi R, Mihara K, Yanagihara K, Seyama T.	4. 巻 93
2. 論文標題 Antitumor effect of palmitic acid-conjugated DsiRNA for colon cancer in a mouse subcutaneous tumor model.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Chem Biol Drug Des.	6. 最初と最後の頁 570-581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cbdd.13454	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 Yanagihara K, Kubo T, Iino Y, Mihara K, Morimoto C, Seyama T, Takeshi K, Ochiai A, Yokozaki H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Development and characterization of a cancer cachexia model employing a rare human duodenal neuroendocrine carcinoma-originating cell line.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 2435-2450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26764	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 Sato Y, Matsubara K, Kubo T, Sunayama H, Hatori Y, Morimoto K, Seyama T.	4. 巻 11
2. 論文標題 High Mannose Binding Lectin (PFL) from Pseudomonas fluorescens Down-Regulates Cancer-Associated Integrins and Immune Checkpoint Ligand B7-H4.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 e604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11050604	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 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 飯野由貴、柳原五吉、横崎宏、久保貴紀、久保崇、小松将之、佐々木博己、市川仁、桑田健、瀬山敏雄、落合淳志
2. 発表標題 同所移植を用いた患者由来膵臓がんモデルの特性の比較
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 赤木玲子、久保貴紀、羽鳥勇太、宮本崇史、井上幸江
2. 発表標題 ラットHeme oxygenase-1の熱ショック応答～HSF1、NRF2、BACH1による転写調節～
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 井上幸江、伊豫田拓也、沖田直之、宮本崇史、久保貴紀、坂本祐美、赤木玲子
2. 発表標題 抗酸化酵素ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の熱ショック応答機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久保貴紀、西村良夫、佐藤雄一郎、柳原五吉、瀬山敏雄
2. 発表標題 脂質コンジュゲートsiRNAのRNAi効果について
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久保貴紀、柳原五吉、瀬山敏雄
2. 発表標題 飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸結合型siRNAの細胞導入性とRNAi効果について
3. 学会等名 第61回 日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤木玲子、久保貴紀、村上千穂、井上 幸江
2. 発表標題 温熱ストレス負荷によるヘムオキシゲナーゼ 1 誘導メカニズム ~ HSF1, NRF2, BACH1の役割 ~
3. 学会等名 第61回 日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大田美沙貴、西村良夫、菊地秀与、久保貴紀、池田優希乃、袁博、須永克佳、長秀連
2. 発表標題 4,4-二置換ジヒドロピリミジン 5-エステルおよび 5-カルボン酸の合成と HL-60 に対する増殖抑制効果
3. 学会等名 第59回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 赤木玲子、佃美穂、久保貴紀、村上千穂、井上幸江
2. 発表標題 マウス由来肝癌細胞におけるH0-1遺伝子の熱ショック応答機構の解明
3. 学会等名 第59回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村良夫、久保貴紀、中北いぶき、中村優里、長秀連
2. 発表標題 Liebeskind-Srogl クロスカップリングを用いる 6-無置換 2-アリアルジヒドロピリミジンの合成
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菊地秀与、西村良夫、久保貴紀、袁博、須永克佳、長秀連
2. 発表標題 2-thioxo-dihydropyrimidine誘導体のHL-60細胞の細胞周期に及ぼす影響
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中本麻美、久保貴紀、佐藤雄一郎、西村良夫、寺田 美沙樹、徳山美紅、宮崎真有、柳原五吉、瀬山敏雄
2. 発表標題 脂肪酸結合型siRNAを用いた免疫チェックポイント阻害剤の開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会 第5回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保貴紀、西村良夫、佐藤雄一郎、羽鳥勇太、赤木玲子、柳原五吉、瀬山敏雄
2. 発表標題 In vitroおよびin vivoで高いRNAi効果を示すパルミチン酸コンジュゲートDicer-substrate siRNAの開発
3. 学会等名 日本核酸医薬学会 第5回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 徳山美紅、久保貴紀、佐藤雄一郎、西村良夫、柳原五吉、瀬山敏雄
2. 発表標題 免疫チェックポイント(PD-L1)を標的とした脂肪酸結合型siRNAのRNAi効果
3. 学会等名 第57回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保貴紀、西村良夫、柳原五吉、瀬山敏雄
2. 発表標題 脂肪酸コンジュゲートDicer-substrate siRNAの抗腫瘍効果
3. 学会等名 第57回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保貴紀、西村良夫、柳原五吉、瀬山敏雄
2. 発表標題 マウス皮下腫瘍モデルに対する脂肪酸コンジュゲートDicer-substrate siRNAの抗腫瘍効果
3. 学会等名 第11回日本RNAi研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 久保貴紀、瀬山敏雄	4. 発行年 2021年
2. 出版社 情報機構	5. 総ページ数 401
3. 書名 医薬品におけるDDS技術開発と製剤への応用 「4章 核酸医薬にもちいられるDDS化手法 - siRNAコンジュゲート技術の概要と医薬への応用 -」	

〔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	柳原 五吉  (Yanagihara Kazuyoshi)  (20158025)	国立研究開発法人国立がん研究センター・先端医療開発センター・特任研究員   (82606)	削除：2020年8月13日
研究分担者	瀬山 敏雄  (Seyama Toshio)  (90163120)	安田女子大学・薬学部・教授   (35408)	

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
---------	---------