

機関番号：24303
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008 ～ 2010
 課題番号：20591121
 研究課題名 (和文) 抗体結合型 β -カテニン siRNA を用いた多発性骨髄腫に対する新規治療法の開発
 研究課題名 (英文) Development of antibody-conjugated β -catenin siRNA therapy against multiple myeloma
 研究代表者
 芦原 英司 (ASHIHARA EISHI)
 京都府立医科大学・医学研究科・講師
 研究者番号：70275197

研究成果の概要 (和文)：

多くのがんの増殖に関連する β -catenin を標的として抗体結合型 siRNA の作製を試み、多発性骨髄腫 (以下、MM) に対する新規治療法の開発研究を行った。 β -catenin siRNA が免疫不全マウスに移植した MM 腫瘍の増殖を著明に抑制することを確認した。さらに抗体と siRNA の結合に成功し、抗体結合型 siRNA を作製した。本研究の成果は、多発性骨髄腫に対する RNA 干渉療法の開発へと展開できる。

研究成果の概要 (英文)：

β -catenin silencing is explored as a novel therapeutic target against multiple myeloma (MM). β -catenin protein is overexpressed in human MM cell lines as well as CD138-positive MM cells obtained from patients. The treatment of β -catenin siRNA with atelocollagen significantly inhibited the proliferation of MM cells in a MM-bearing mouse model. Furthermore, we have developed antibody-conjugated oligo-RNAs. It is suggested that these findings will enable to develop siRNA drugs against MM in the near future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科

キーワード：多発性骨髄腫、siRNA、 β -catenin、CD138、RNA 干渉、分子標的

1. 研究開始当初の背景

翻訳後遺伝子発現抑制機構である RNA 干渉を応用した siRNA 療法は、臨床医学分野においても悪性腫瘍に対する新たな分子標的治療として注目を浴び、siRNA を細胞内に有効に導入するため種々の drug delivery systems (DDSs) が開発されている。我々はカチオニックリポソームやアテロコラーゲンを用いた siRNA 療法の可能性を報告してきた。しかし、血液細胞への siRNA の導入効率は未だ十分とは言えない。

β -catenin は古典的 Wnt/ β -catenin 経路の中間タンパクで、胚の初期発生や形態形成のほか、細胞増殖シグナルに関与する。固形腫瘍のほか、急性白血病、慢性骨髄性白血病など、造血器悪性腫瘍の病態形成に関与することが知られており、さらに幹細胞生物学においても、がん幹細胞の維持に関連し非常に注目されている分子である。

CD138 抗原 (Syndecan-1) は、多発性骨髄腫 (以下、MM) 特異的に発現した抗原である。MM 細胞特異的な DDSs の開発を考えた場合、CD138 をターゲットとして、抗 CD138 抗体に結合させた薬剤を投与することは、効果的、かつ安全な治療法となる。

2. 研究の目的

本研究では抗原抗体反応を DDS に利用し、MM 細胞が特異的に発現している CD138 抗原に対する抗 CD138 抗体結合型 siRNA を作製し、MM に対する新たな分子標的療法開発の基礎的検討を行った。標的分子としては、古典的 Wnt/ β -catenin 経路の中間タンパクである β -catenin を選定した。また並行して β -catenin を分子標的とした新規分子標的治療薬の開発も行った。

3. 研究の方法

(1) MM 患者検体における β -catenin の発現の確認

MM 患者より採取した骨髄細胞から、

CD138 抗体を用いて MACS (Magnetic activated cell sorting) にて CD138 陽性 MM 細胞を純化し、 β -catenin の発現を検討した。

(2) β -catenin siRNA の MM 腫瘍モデルマウスにおける治療効果

β -catenin の治療標的としての有効性を、RPMI8226MM 細胞株を移植したマウス皮下腫瘍モデルを用いて検討した。

① 1%アテロコラーゲンを DDS として β -catenin との複合体 (アテロコラーゲン最終濃度 ; 0.5%) を作製する。

② MM 皮下腫瘍が直径 10 mm となった時点より、 β -catenin /アテロコラーゲン複合体を 2/週で 4 週間投与した。腫瘍サイズを計測し、 β -catenin siRNA による MM 腫瘍に対する増殖抑制効果を検討した。

(3) CD138 抗体結合型 siRNA/オリゴ RNA の作製

抗体分子を Fab' 化し、3'-チオール化したオリゴ RNA と結合させ、Fab'-conjugated oligoRNA の作製を行った。

(4) β -catenin の MM に対する分子標的薬の開発

我々は抗体結合型 β -catenin siRNA の合成とともに、 β -catenin を標的とした分子標的治療薬の共同開発を米国製薬企業と行った。RNA 干渉を利用したハイスループットスクリーニング (HTS) 法を用いて β -catenin 特異的にそのシグナルを抑制する化合物を見出した。まず、 β -catenin siRNA を *in vitro* で腫瘍細胞に導入後、 β -catenin をノックダウンした結果の遺伝子プロファイルを同定した。一方で、ライブラリーにある化学物質を腫瘍細胞に添加した際の遺伝子プ

ロファイルの結果とβ-catenin をノックダウンした際の同様のプロファイルを示す薬剤を選び出し、β-catenin シグナルに作用する化合物を initial compound として同定した。これを構造展開することにより新規のβ-catenin 阻害剤 AV65 を公知化合物 (lead compound) として合成した。本化合物を用いて、MM 細胞に対する増殖抑制効果を検討した。

4. 研究成果

(1) MM 患者検体におけるβ-catenin の発現

MM 患者から採取した骨髄細胞より、MACS を用いて CD138 陽性骨髄腫細胞を純化した (純度 ; 90%以上) のち、ウェスタンブロッティング法により β-catenin タンパクの発現を検討した。MM 細胞は、健常人ボランティアより採取した末梢血単核細胞、および骨髄中の CD138 陽性形質細胞より著明に β-catenin の発現を確認した。さらに、細胞質成分、核成分に分け活性型の非リン酸化β-catenin の発現を確認したところ、核内での非リン酸化β-catenin は高発現していた。

(2) β-catenin siRNA の MM 腫瘍モデルマウスにおける治療効果

β-catenin siRNA 投与により、腫瘍中のβ-catenin mRNA、およびβ-catenin タンパクの発現低下、c-myc 陽性細胞の減少を認めた。さらに活性型カスパーゼ 3 陽性細胞、TUNEL 陽性細胞は scramble siRNA を投与に比して有意な増加を認めた。さらにβ-catenin siRNA/アテロコラーゲン複合体投与群で有意に MM 皮下腫

瘍の生長が抑制された (図 1)。以上のことから、β-catenin siRNA は MM 細胞にアポトーシスを誘導し、増殖抑制をもたらすことが明らかとなった。

(3) CD138 抗体結合型 siRNA/オリゴ RNA の作製

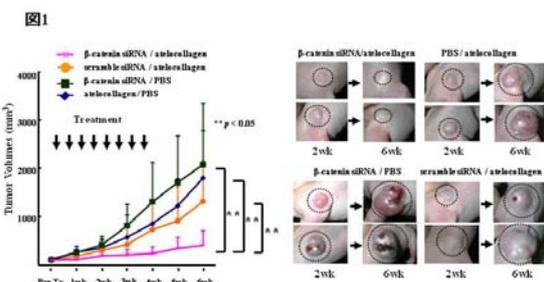
目的産物である Fab'-RNA conjugate は、オリゴ RNA の SH 基と Fab' 化させた抗体分子の SH 基との S-S 交換反応により生成した。

抗体分子 (IgG) をペプシン消化し、(Fab')₂ を生成した。次に、オリゴ RNA と (Fab')₂ 抗体分子から Fab'-RNA conjugate を作製した。ゲル濾過クロマトグラフィー法により conjugate の可能性の高い物質を回収した。

(4) β-catenin の MM に対する分子標的薬開発

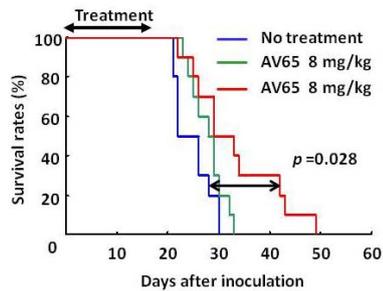
β-catenin に対する新規分子標的化合物 AV65 は、濃度、および時間依存性に MM 細胞株の増殖を抑制し、また MM 患者より採取した CD138 陽性 MM 細胞の増殖も抑制した。フローサイトメトリー法、fluorometric protease アッセイにて AV65 はカスパーゼの活性化を介して MM 細胞をアポトーシスに陥らせていることが明らかとなった。また、AV65 の β-catenin の下流シグナルへの影響を TCF レポーターアッセイ、および c-myc、survivin のタンパク発現で確認したところ、TCF シグナルは AV65 濃度依存性に低下し、c-myc、survivin の発現低下を認めた。次に、MM 細胞株を用いて作製した正所性 MM 担がんモデルマウスに対する AV65 の治療効果を検討した。AV65 治療群は無治療群に比して統計学的に有意に生存期間を延長した (図 2)。

以上より、AV65 は MM に対する β-catenin を標的とした新規薬剤としての可能性があることが明らかとなった。現在、本 AV65 をさらに構造展開した薬



剤を用いた臨床試験が米国で計画中である。

図2



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 45 件)

- ① Yao H, Ashihara E, Maekawa T. Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in human cancers. Expert Opinion on Therapeutic Targets、査読有、in press.
- ② Ashihara E, Kawata E, Maekawa T. Future Prospect of RNA interference for cancer therapies. Curr Drug Targets、査読有、11:345-360, 2010.
- ③ 芦原英司. RNA干渉を用いたがん治療。癌と化学療法、査読無、37:2033-2041, 2010.
- ④ Kawata E, Ashihara E, Nakagawa Y, Kiuchi T, Ogura M, Yao H, Sakai K, Tanaka R, Nagao R, Yokota A, Takeuchi M, Kimura S, Hirai H, Maekawa T. A combination of a DNA-chimera siRNA against PLK-1 and zoledronic acid suppresses the growth of malignant mesothelioma cells in vitro. Cancer Lett、査読有、294:245-253, 2010.
- ⑤ Kobayashi T, Kuroda J, Ashihara E, Terui Y, Oomizu S, Yamamoto M, Taniyama A, Matsumoto Y, Horiike S, Hatake K, Yamauchi A, Hirashima M, Taniwaki F. Anti-myeloma activity of modified galectin-9 through JNK and

p38 MAPK pathways. Leukemia、査読有、24:843-850, 2010.

- ⑥ Ashihara E, Kawata E, Nakagawa Y, Shimazaki C, Kuroda J, Taniguchi T, Uchiyama H, Tanaka R, Yokota A, Takeuchi M, Kamitsuji Y, Inaba T, Taniwaki M, Kimura S, Maekawa T. β -catenin siRNA successfully suppressed progression of multiple myeloma in a mouse model. Clin Cancer Res、査読有、15:2731-2738, 2009.
- ⑦ Kuroda J, Matsumoto Y, Tanaka R, Kurita K, Kobayashi T, Shimizu D, Kimura S, Ashihara E, Horiike S, Shimazaki C, Taniwaki M. JAK2V617F-positive essential thrombocythemia and multiple myeloma with IGH/CCND1 gene translocation co-exists, but originate from separate clones. Acta Haematol、査読有、120:177-181, 2008.
- ⑧ Kuroda J, Kamitsuji Y, Kimura S, Ashihara E, Kawata E, Nakagawa Y, Takeuchi M, Murotani Y, Yokota A, Tanaka R, Andreeff M, Taniwaki M, Maekawa T. Anti-myeloma effect of homoharringtonine with concomitant targeting of the myeloma-promoting molecules, Mcl-1, XIAP, and beta-catenin. Int J Hematol、査読有、87:507-515, 2008.
- ⑨ Kawata E, Ashihara E, Kimura S, Takenaka K, Sato K, Tanaka R, Yokota A, Kamitsuji Y, Takeuchi M, Kuroda J, Tanaka F, Yoshikawa T, Maekawa T. Administration of PLK-1 small interfering RNA with atelocollagen prevents the growth of liver metastases of lung cancer. Mol Cancer Ther、査読有、7:2904-2912, 2008.

[学会発表] (計 59 件)

- ① Yao H, Ashihara E, Nagao R, Kimura S,

Hirai H, Strovel JW, Padia J, Cholody WM, Maekawa T. AV-65, a Novel inhibitor of the Wnt/ β -catenin signaling pathway, inhibits the proliferation of myeloma cells. The 51st American Society of Hematology Annual Meeting and Exposition. 2009 Dec 5-8, New Orleans, USA.

- ② Kawata T, Ashihara E, Hirai H, Maekawa T. A combination of a DNA-chimera siRNA against PLK-1 and zoledronic acid suppresses the growth of malignant mesothelioma cells in vitro. 第16回日本遺伝子治療学会年次学術集会 2010年7月2日 栃木.
- ③ 八尾尚幸、芦原英司、平位秀世、前川 平. 多発性骨髄腫に対する新規 Wnt/ β -cateninシグナル阻害剤の抗腫瘍効果. 第69回日本癌学会学術総会 2010年9月22日 大阪.
- ④ 芦原英司. RNA干渉によるがん治療の開発. 第18回日本アポトーシス研究会・学術集会 シンポジウム 2009年8月1日 長崎.
- ⑤ 八尾尚幸、芦原英司、長尾里奈、武内美紀、田中瑠璃子、横田明日美、平位秀世、前川 平. 多発性骨髄腫に対する新規 Wnt/ β -cateninシグナル阻害剤の抗腫瘍効果. 第71回日本血液学会学術集会 2009年10月23日 京都.
- ⑥ 芦原英司、河田 英里、黒田 純也、木村晋也、前川 平. β -catenin siRNAによる骨髄腫増殖抑制効果. 第12回がん分子標的治療研究会 2008年6月26日 東京.

[図書] (計4件)

- ① 芦原英司、前川 平. メディカルドゥ、遺伝子MOOK15 最新RNAと疾患研究 2009. 139-146.

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 細胞培養容器及びその容器を用いた細胞培養方法

発明者: 務中達也、阿部浩久、叶井正樹、明地将一、前川 平、木村晋也、芦原英司、庄子習一、川合健太郎

権利者: 島津製作所、京都大学、早稲田大学
種類: 特許

番号: 特願 2010-200679

出願年月日: 2010.9.8

国内外の別: 国内

名称: 細胞運動評価用マイクロ反応装置

発明者: 務中達也、阿部浩久、叶井正樹、前川 平、木村晋也、芦原英司、庄子習一

権利者: 島津製作所、京都大学、早稲田大学
種類: 特許

番号: 特願 2009-148339

出願年月日: 2009.6.23

国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.kuhp.kyoto-u.ac.jp/~dtm/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

芦原 英司 (ASHIHARA EISHI)

京都府立医科大学・医学研究科・講師
研究者番号: 70275197

(2) 研究分担者

前川 平 (MAEKAWA TAIRA)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：80229286

木村 晋也 (KIMURA SHINYA)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：80229286

(3) 連携研究者

島崎 千尋 (SHIMAZAKI CHIHIRO)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：50170931