

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08227

研究課題名(和文) 治療遺伝子搭載ナノ粒子を用いた小児・AYA世代がんに対する革新的治療法の開発

研究課題名(英文) Tumor-tropic liposome-mediated therapeutic delivery of mRNA for the treatment of adolescent and young adult cancers.

研究代表者

齋藤 章治 (Saito, Shoji)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師

研究者番号：10623762

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)：本研究では、腫瘍指向性脂質ナノ粒子(LNP)と誘導性カスパーゼ9(iC9)mRNAを組み合わせて、難治性がんに対するの新規治療法を開発することを目的とした。LNPの抗腫瘍効果は、MDA-MB231、SKBR3、MCF-7の3つの乳がん細胞株で検証した。iC9 mRNAを内包したLNP(iC9-LNP)は、CID存在下において、in vitroで3つのがん細胞株すべてに対して細胞傷害活性を示した。この治療法に対する感受性はがん細胞株間で不均一であり、BAX/Bcl-2比がこの違いと関連している可能性が示唆された。本遺伝子治療法は、難治性がんの治療における有望な代替手段となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、難治性乳がんに対する、腫瘍指向性脂質ナノ粒子(LNP)と誘導性カスパーゼ9(iC9)mRNAを組み合わせた新規遺伝子治療法の開発に成功した。本研究では乳がんを対象に治療効果を検証したが、本遺伝子治療法は、理論的にはがん種によらず有効性が示せるため、さまざまながん種に対する治療法に応用できる。また、アポトーシス関連の解析を行ったところ、乳がんにおいてはより悪性度の高いがん種において感受性が高いことを示した。このため、本疾患は難治性がんに対する有望な治療法として応用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cancer gene therapy can be potential therapeutics for advanced/refractory cancers. Combining tumor-tropic lipid nanoparticles (LNPs) and inducible caspase-9 (iC9) mRNA, we aimed to develop a novel treatment strategy for refractory breast cancer. LNP's anti-tumor effects were tested in vitro in three breast cancer cell lines: MDA-MB231, SKBR3, and MCF-7. LNPs could efficiently deliver encapsulated GFP mRNA to all three cancer cell lines. Furthermore, LNPs encapsulated with iC9 mRNA (iC9-LNPs) and CID showed cytotoxic activity against all cancer cell lines in vitro. Interestingly, susceptibility to iC9 gene therapy was heterogeneous among cancer cell lines. Quantification of apoptosis-related genes suggested that a high BAX/Bcl-2 ratio might be associated with iC9-LNP+CID susceptibility. Thus, cancer gene therapy using iC9-LNPs and CID could be a promising alternative for the treatment of breast cancers, especially for aggressive breast cancers.

研究分野：血液腫瘍、免疫療法、遺伝子治療

キーワード：リポソーム mRNA医薬 Caspase 9 アポトーシス 遺伝子治療

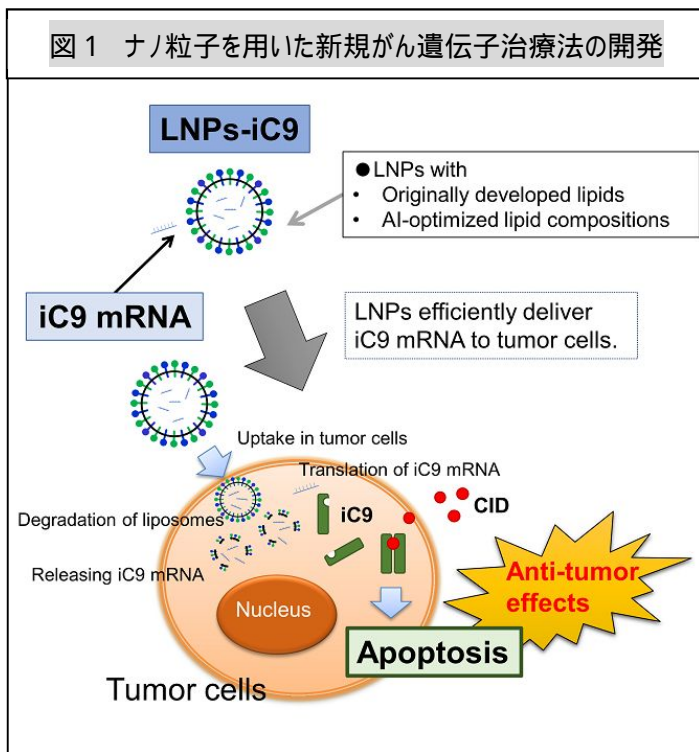
### 1. 研究開始当初の背景

難治性小児・AYA 世代がん患者の予後は未だ不良であり、これらの患者に対する新規治療法の開発は喫緊の課題である。ナノ粒子を利用したデリバリーシステム(DDS)は、標的臓器や標的細胞の生理的特徴に注目することで、優先的に薬剤・核酸等を届けることを可能とする。われわれは、腫瘍細胞の細胞膜の特徴に注目したナノ粒子を、(株)東芝との共同研究で開発した。これまでの予備実験において、このナノ粒子が腫瘍細胞に優先的に取り込まれ、内包した標識遺伝子を腫瘍細胞に発現させることに成功した。そこで、本研究では、このナノ粒子に殺細胞遺伝子を内包することで、難治性小児・AYA 世代がん治療に応用できないか検証することを目的とした。

### 2. 研究の目的

本研究では、腫瘍指向性ナノ粒子に自殺遺伝子を内包することで、新規のがん治療法につなげることを目的とした(図1)。

免疫調節遺伝子または自殺遺伝子の使用を含む遺伝子治療は、難治性がんの有望な治療法として期待されている。誘導性カスパーゼ9 (iC9)は、元来養子免疫療法の安全性スイッチとして開発された。iC9は、mFKBP-Caspase-9タンパク質で構成され、二量体化の化学誘導物質(CID)によりiC9タンパク質が二量体化すると、下流のアポトーシス経路を活性化する。本研究においては、最適化された脂質組成を調整することにより腫瘍指向性を付与した脂質ナノ粒子(LNPs)を用いて、がん細胞にiC9 mRNAを選択的に送達することで抗腫瘍効果をもたらすことができるか検証を行った。

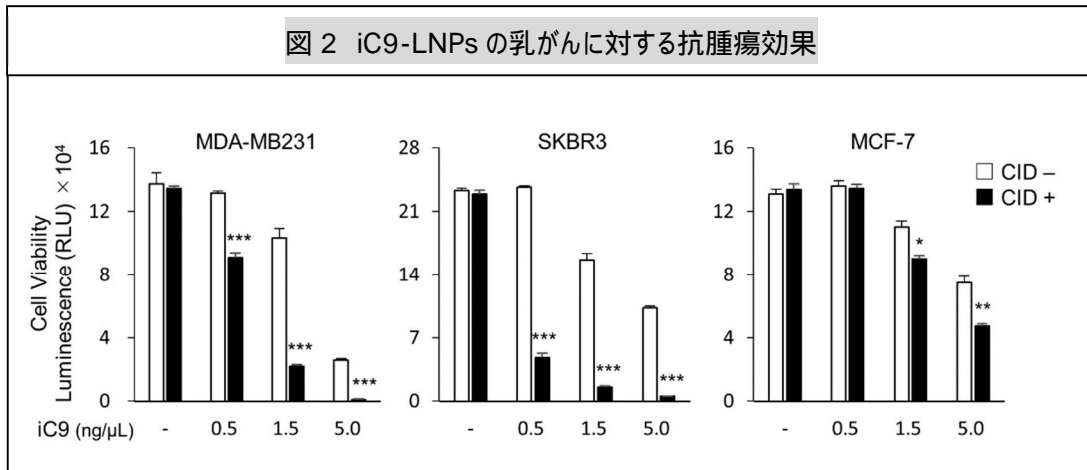


### 3. 研究の方法

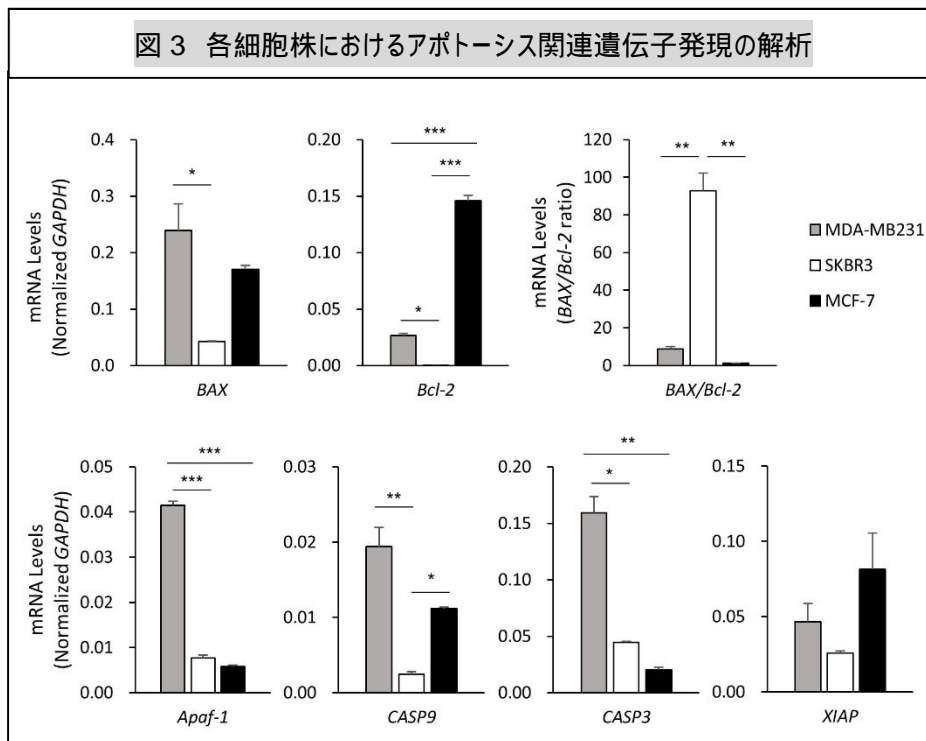
小児 AYA 世代がんとして、乳がんを疾患モデルとして研究を進めた。3 つの乳がん細胞株である MDA-MB231 (TNBC)、SKBR3 (HER2+) および MCF-7 (ER+) を用いて、新規治療法の有効性を評価した。iC9 mRNA 内包 LNPs および CID を用いてアポトーシス細胞死誘発作用を検証した。LNPs は、乳がん腫瘍株に発現しやすい組成を GFP mRNA 内包 LNPs を用いて選択した。iC9 mRNA は、コーディング領域に mFKBP-Caspase9 を組み込んで作製した。生細胞率は、RealTime-Glo MT Cell Viability Assay (Promega) を用いて発光強度を測定して解析し、カスパーゼ阻害剤である qVD-0ph を用いることでアポトーシスによる細胞死であることを確認した。カスパーゼ9 活性およびカスパーゼ 3/7 活性は、Caspase-Glo9 Assay および Caspase-Glo3/7 Assay (Promega) を用いて発光強度を測定して解析した。また、各乳がん細胞株におけるアポトーシス関連遺伝子 (BAX、Bcl-2、Apaf-1、CASP9、CASP3、XIAP) の発現を qPCR にて定量解析し、各腫瘍細胞における iC9 mRNA 内包 LNPs および CID を用いた細胞死誘発効果の違いを考察した。最後に、iC9-CID の効果が弱かった MCF-7 に対して Bcl-2 および XIAP レベルに着目し、これを低下させる報告のある bortezomib を併用したときの iC9-CID による細胞傷害活性を検証した。

#### 4. 研究成果

eGFP mRNA 内包 LNP は 3 種の乳がん細胞株に効率よく取り込まれ、腫瘍細胞における GFP の発現を確認できた (発現細胞率 80% 以上)。さらに、iC9 mRNA 内包 LNP (iC9-LNP) と CID の添加により、すべての乳がん細胞株に対して細胞傷害活性を示した (図 2)。一方、本治療法の感受性は、細胞株毎に違いが認められた。iC9-LNP 低用量において強いアポトーシス細胞死を示した最も感受性の良い細胞は SKBR3 (HER2<sup>+</sup>) であった。

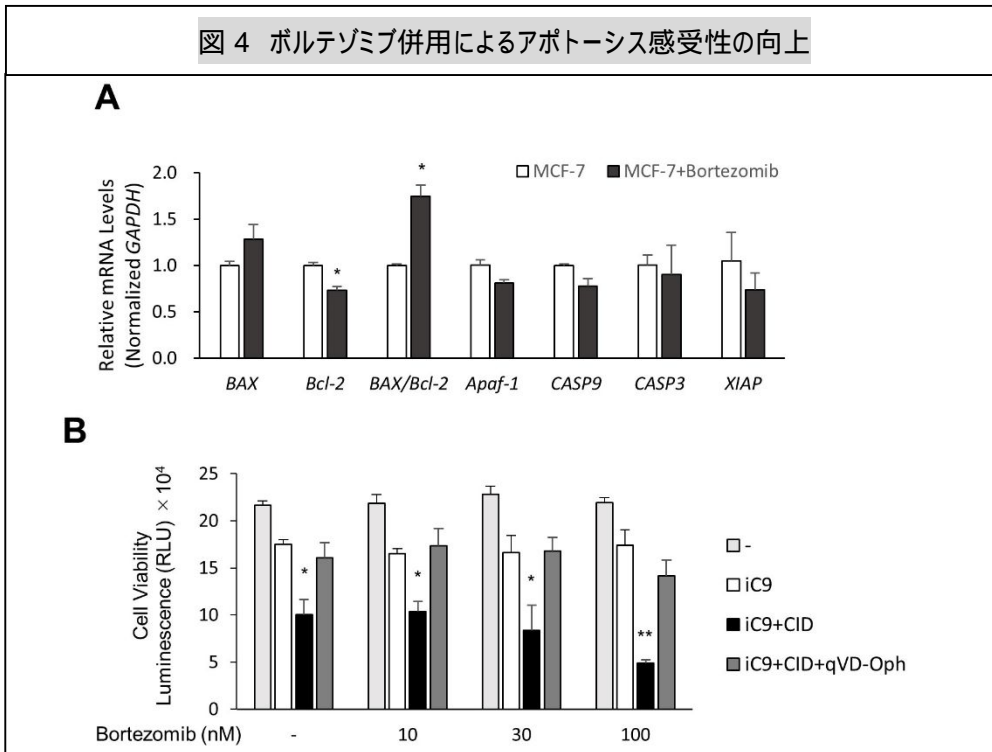


SKBR3 (HER2<sup>+</sup>) は、抗アポトーシス因子である Bcl-2 が最も低値で、BAX/Bcl-2 比が高かった (図 3)。MDA-MB231 (TNBC) においても良好なアポトーシス細胞死を誘導したが、iC9-LNP 高用量において CID 添加なしに細胞死が起きた。MDA-MB231 においては、iC9 発現量が最も高かった。また、アポトーシス促進因子である BAX が最も高く、内因性カスパーゼ因子である Apaf-1、CASP9、CASP3 値が最も高かった。MCF-7 (ER<sup>+</sup>) においては、iC9-LNP 低用量では細胞死は示さず、iC9-LNP 高用量において細胞死を示したがその効果は弱かった。iC9-LNP 高用量添加による iC9 発現は SKBR3 と同程度であったが、Caspase9 活性が誘導されていない。MCF-7 は、抗アポトーシス因子 Bcl-2 が高値であり、内因性カスパーゼ阻害因子である XIAP も高値傾向であった。



さらに、MCF7 のアポトーシス抵抗性を緩和するため、bcl-2 阻害薬である bortezomib を併用することで、LNP-iC9 治療の有効性を向上させることができないか検証を行った。Bortezomib 併用により Bcl-2 が低下し、BAX/Bcl-2 値が上昇した (図 4 A)。さらに、bortezomib は既報の通り単剤では MCF7 に対する抗腫瘍活性は認めなかったが、併用により iC9-CID による細胞死誘発が増強することが示された (図 4 B)。したがって、bortezomib は、MCF7 のアポトーシス抵抗性を緩和することで、iC9-CID による細胞死誘発効果を増強することが示唆された。

図 4 ポルテゾミブ併用によるアポトーシス感受性の向上



【結論】

本研究において、LNPs によって効率的に目的の mRNA を乳がん細胞株に導入発現させることが可能であり、自殺遺伝子 iC9mRNA を搭載することでアポトーシス細胞死を誘導できることが示された。各乳がん細胞に対する iC9-CID の効果の違いが見られたが、この違いは、アポトーシス関連遺伝子の BAX/Bcl-2 比と関連している可能性が示された。さらに、抗アポトーシス因子 Bcl-2 が高い腫瘍細胞においては iC9-CID の効果が弱い可能性があるが、bortezomib を併用することによって効果が回復する可能性が示唆された。乳がん細胞においては、Luminal A (ER+) 型で、抗アポトーシス因子 Bcl-2 が高い細胞が Luminal A (ER+) であることが多いことが報告されているが、これらの ER+乳がんに対してはホルモン療法が有効であるため、自殺遺伝子 iC9 を用いた遺伝子治療の対象となる可能性は低いと考えられる。一方、難治性乳がんであるトリプルネガティブ乳がん (TNBC) 細胞株である MDA-MB231 において対しては、本治療法の強い抗腫瘍効果が示された。したがって、iC9mRNA 搭載 LNPs と CID を用いたがん遺伝子治療は、乳がん、特に悪性度が高い難治性乳がんの治療に有望な代替手段となる可能性が示された。

本研究の要旨は国際学術雑誌に受理され掲載された (Nakashima I, Saito S, Akahoshi E, Yagyu S, Sugano-Ishihara M, Nakazawa Y. Non-viral inducible caspase 9 mRNA delivery using lipid nanoparticles against breast cancer: An in vitro study. Biochem Biophys Res Commun. 2022 Dec 20;635:144-153. )

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Yanagisawa R, Nakazawa H, Nishina S, Saito S, Shigemura T, Tanaka M, Nakazawa Y.	4. 巻 27-Mar
2. 論文標題 Investigation of risk factors associated with erythrocyte engraftment after ABO-incompatible hematopoietic stem cell transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Transplant	6. 最初と最後の頁 e14300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ctr.14300	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 Morokawa H, Yagyu S, Hasegawa A, Tanaka M, Saito S, Mochizuki H, Sakamoto K, Shimoi A, Nakazawa Y.	4. 巻 Nov 22;9(11)
2. 論文標題 Autologous non-human primate model for safety assessment of piggyBac transposon-mediated chimeric antigen receptor T cells on granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Transl Immunology	6. 最初と最後の頁 e1207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cti2.1207	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 Matsuoka D, Hirabayashi K, Murase T, Saito S, Hidaka Y, Nakazawa Y.	4. 巻 Dec;67(12)
2. 論文標題 Assessment of kidney function using inulin-based and estimated glomerular filtration rates before and after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in pediatric patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatr Blood Cancer	6. 最初と最後の頁 e28733
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/pbc.28733	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 Tanaka M, Yanagisawa R, Yamanaka M, Konno S, Takemura K, Kojima S, Okura E, Morita D, Saito S, Komori K, Matsuzawa H, Sakashita K, Tozuka M, Nakazawa Y.	4. 巻 Aug;59(4)
2. 論文標題 Transfusion outcome for volume- and plasma-reduced platelet concentrates for pediatric patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Transfus Apher Sci	6. 最初と最後の頁 102776
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transci.2020.102776	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 Furui Y, Morita D, Okura E, Komori K, Saito S, Hirabayashi K, Tanaka M, Nakazawa Y.	4. 巻 May;62(5)
2. 論文標題 Thyroid tumor surveillance using ultrasound in childhood cancer survivors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatr Int	6. 最初と最後の頁 562-568
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14179	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 Shigemura T, Sakashita K, Okura E, Morita D, Komori K, Kurata T, Hirabayashi K, Saito S, Tanaka M, Yanagisawa R, Nakazawa Y.	4. 巻 May;111(5)
2. 論文標題 Comparative analysis of graft-versus-host disease prophylaxis with tacrolimus in combination with methylprednisolone or methotrexate after umbilical cord blood transplantation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 702-710
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-020-02826-9	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 Morota H, Saito S, Uchida E, Okura E, Matsuoka D, Hidaka Y, Natsume T, Watanabe T, Shigemura T, Morita D, Tanaka M, Kurata T, Sakashita K, Nakazawa Y.	4. 巻 Apr;67(4)
2. 論文標題 Delayed methotrexate clearance and acute kidney injury after high-dose methotrexate chemotherapy concurrent with dasatinib in a patient with relapsed Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: A case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatr Blood Cancer	6. 最初と最後の頁 e28173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pbc.28173	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 Saito S, Taira C, Matsuda K, Yanagisawa R, Morita D, Shigemura T, Yoshikawa K, Tanaka M, Sakashita K, Mukai S, Shimodaira S, Koike K, Nakazawa Y.	4. 巻 Apr;61(4)
2. 論文標題 Complete measurable residual disease response after combination chemotherapy with AML-type and ALL-type regimens in pediatric B/myeloid acute bilineal leukemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Leuk Lymphoma	6. 最初と最後の頁 967-970
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/10428194.2019.1697813	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7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Saito S, Nakashima I, Akahoshi E, Ishihara-Sugano M, Yagyu S, Nakazawa Y.
2. 発表標題 Non-Viral Delivery of Therapeutic mRNA Using Tumor-Tropic Liposomes for the Treatment of Solid Tumors
3. 学会等名 American Society of Gene and Cell Therapy 24th Annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤章治
2. 発表標題 難治性血液腫瘍に対する遺伝子・細胞治療の開発
3. 学会等名 第124回日本小児科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Saito, S; Nakashima, I; Hasegawa, A; Akahoshi, E; Sugano, M; Yagyu, S; Nakazawa, Y
2. 発表標題 Tumor-Tropic Liposome-Based Delivery of Therapeutic mRNA for T Cell Leukemias
3. 学会等名 第62回日本小児血液・がん学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Saito, S; Nakashima, I; Hasegawa, A; Akahoshi, E; Ishihara-Sugano, M; Yagyu, S; Nakazawa, Y
2. 発表標題 Tumor-Tropic Liposome-Mediated Therapeutic Delivery of mRNA for T Cell Malignancies
3. 学会等名 63rd ASH Annual Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Saito, S; Nakashima, I; Hasegawa, A; Akahoshi, E; Ishihara-Sugano, M; Yagyu, S; Nakazawa, Y
2. 発表標題 Tumor-Tropic Liposome-Mediated Therapeutic Delivery of mRNA for T Cell Malignancies
3. 学会等名 23rd Annual Meeting of the American Society for Gene and Cell Therapy (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Saito, S; Nakashima, I; Hasegawa, A; Akahoshi, E; Sugano, M; Yagyu, S; Nakazawa, Y
2. 発表標題 Tumor-tropic liposome-mediated therapeutic delivery of mRNA for pediatric / adolescent and young adult cancers.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Saito, S; Nakashima, I; Hasegawa, A; Akahoshi, E; Sugano, M; Yagyu, S; Nakazawa, Y
2. 発表標題 1.Tumor-tropic liposome-mediated therapeutic delivery of mRNA for T cell malignancies
3. 学会等名 第82回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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