

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08359

研究課題名(和文) 浸潤・転移抑制作用を有する膵癌に対する新規核酸化合物の研究開発

研究課題名(英文) Development of novel nucleic acid compounds for pancreatic cancer which inhibit the invasiveness and metastasis

研究代表者

谷内 恵介 (Taniuchi, Keisuke)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・准教授

研究者番号：50626869

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)：膵癌細胞の葉状仮足に局在し、浸潤転移に関わるARHGEF4とLAMTOR2を基礎研究により同定した。リガンドとカチオン性ペプチドを付加したARHGEF4とLAMTOR2に対するsmall interfering RNA (siRNA)化合物をヒト膵癌オルガノイド移植マウスに尾静脈注射した結果、それぞれのsiRNA化合物は膵癌組織までデリバリーされた。ARHGEF4またはLAMTOR2を標的とするsiRNA投与群において、コントロールsiRNAの投与された群およびゲムシタピン投与群と比較して膵癌組織の増大が抑制された。マウスの肝・腎・肺に炎症や組織構築の乱れはなく、肉眼的に異常を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

k-ras変異などの膵癌細胞の増殖機序に関する基礎研究の論文発表は多い。しかし、同定された標的分子が膵癌創薬に結びついた例はなく、膵癌研究から誕生した分子標的薬は存在しない。研究代表者らは、膵癌の最大の特徴である「豊富な癌間質を伴う癌細胞の浸潤」を抑制することができれば新薬を開発できるのではないかと考えた。siRNAのデリバリーシステムとして独自に考案・合成し、siRNA化合物を合成した点が本研究の創造的などころである。本研究の核酸化合物が膵癌細胞の浸潤・転移を抑制することを示すことができれば、世界初の膵癌に対する核酸製剤開発に結びつく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We identified ARHGEF4 and LAMTOR2, which are localized in the lamellipodia of pancreatic cancer cells and involved in the invasiveness and metastasis. Small interfering RNA (siRNA) compounds against ARHGEF4 and LAMTOR2 to which ligands and cationic peptides were added were injected into human pancreatic cancer organoid-implanted mice through the tail vein. As a result, each siRNA compound was delivered to the pancreatic cancer tissue. In the siRNA-administered group targeting ARHGEF4 or LAMTOR2, pancreatic cancer tissue growth was suppressed compared to the control siRNA-administered group and the gemcitabine-administered group. There was no inflammation or disturbance of tissue architecture in the liver, kidney, or lung of the mouse.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵癌 核酸化合物 デリバリーシステム 核酸治療

1. 研究開始当初の背景

膵癌により年間 3 万 9000 人が死亡しており、膵癌の 5 年生存率は 5~10%と極めて低い数値である。使用できる膵癌治療薬は限られているため、有望な新規治療薬の開発が臨床の現場で切望されている。膵癌の予後不良の原因として術後再発率が高いことがあげられる。手術で取り除いたと思われていた癌が実際は腹膜などに直接浸潤して残存しており、再発をきたす。ステージ IIA までの比較的早期の段階で発見されても、術後再発率は 60-80%と高率である。これらの背景から、研究代表者は膵癌の浸潤・転移機構を解明することにより、浸潤および転移に関わる分子を標的とした創薬に結び付くのではないかと考えた。

研究代表者らは、ARHGEF4 および LAMTOR2 が mRNA の状態で膵癌細胞の葉状仮足に運ばれ、葉状仮足において局所翻訳されることにより、膵癌の浸潤・転移にとって中心的な役割を担っていることを明らかにした。ARHGEF4 および LAMTOR2 の局所翻訳を抑制することができれば、膵癌細胞の浸潤を減少させることが可能である。

2. 研究の目的

浸潤している膵癌細胞には葉状仮足が多数形成されている。本研究の標的分子である ARHGEF4 と LAMTOR2 は、Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) シグナル伝達経路を活性化することにより葉状仮足形成を促し、膵癌細胞の浸潤・転移を亢進させることを明らかにした (*Int J Oncol* 53:2224-2240, 2018; *Oncotarget* 10:2869-2886, 2019)。本研究では、ARHGEF4 と LAMTOR2 を標的とした核酸製剤開発に向けた基盤研究を行う。独自に発見した膵癌細胞の浸潤・転移機構に着目することにより、ERK シグナル伝達経路が膵癌細胞の浸潤・転移にとって重要なシグナル経路であり、創薬の標的分子である ARHGEF4 と LAMTOR2 を同定することができた。

また、臨床的な膵癌と乖離していないモデルマウスを用いて薬効を評価する必要がある。研究代表者らは、ヒト膵癌細胞株を用いたオルガノイド培養技術を開発し、ヒト膵癌オルガノイドをマウス皮下に移植したヒト膵癌オルガノイド移植モデルマウスを樹立した (*Hum Cell* 35:735-744, 2022)。ヒト膵癌オルガノイド移植モデルマウスのヒト膵癌組織は、臨床的な膵癌組織と組織構築が極めて類似しており、ヒト膵癌由来の癌間質が豊富に存在し、薬効評価に優れた性質を有する。本研究では、膵癌細胞膜上に高発現しているレセプターに結合するリガンドにカチオン性ペプチドを結合したデリバリーシステムのナノ化合物を ARHGEF4 と LAMTOR2 に対する siRNA に付加する。これらの siRNA 化合物が、膵癌細胞まで効率よく輸送された結果、膵癌細胞の浸潤・転移を抑制するかを解析することを目的とする。

3. 研究の方法

① ARHGEF4 と LAMTOR2 に対する siRNA 化合物が、膵癌細胞まで効率よく輸送されるか

の検討

リガンドとカチオン性ペプチドを付加した ARHGEF4 と LAMTOR2 に対する siRNA 化合物をヒト膵癌オルガノイド移植モデルマウスに尾静脈から静脈注射する。それぞれの siRNA 化合物が膵癌組織の膵癌細胞までデリバリーされるかを検証する。細胞実験では、蛍光標識したコントロール用 siRNA にリガンド+カチオン性ペプチドを付加した核酸化合物を培養中のヒト膵癌細胞 S2-013 の培養液に一晩添加した細胞の共焦点顕微鏡観察を行った結果、核酸化合物が S2-013 細胞内に取り込まれていることを確認できた。本研究では、ヒト膵癌細胞株をオルガノイド培養することにより、培養皿の中でヒト膵癌オルガノイドを作製する。ヌードマウスを麻酔下で背部の皮下を切開し、皮下にヒト膵癌オルガノイドを移植し縫合する。マウス皮下で形成されたヒト膵癌組織は継時的に増大し、4 週で最大径 1cm、6 週で最大径 1.5cm ほどの腫瘍が形成される。移植術を行って 6 週経過したモデルマウスに蛍光標識した ARHGEF4 と LAMTOR2 に対する siRNA 化合物を静脈注射により投与する。リガンド+カチオン性ペプチドは、体内へ投与された siRNA の酵素分解を抑制し、siRNA を膵癌細胞膜表面に高発現しているリガンドレセプターに結合できるようにする。核酸化合物が、ヒト膵癌オルガノイド由来の腫瘍組織に集積することを *in vivo* 光イメージング装置 (IVIS spectrum imaging system, Caliper Life Science 社製) を用いて確認する。その後、マウスを還流固定し、膵癌組織の標本作製を行う。それぞれの群で抗 ARHGEF4 抗体または抗 LAMTOR2 抗体を用いて組織染色を行い、共焦点顕微鏡により観察を行う。siRNA の取り込まれた膵癌細胞において、ARHGEF4 と LAMTOR2 が特異的に発現抑制されていることを確認する。

② ARHGEF4 と LAMTOR2 に対する siRNA 化合物による浸潤・転移抑制効果と予後改善効果の検討

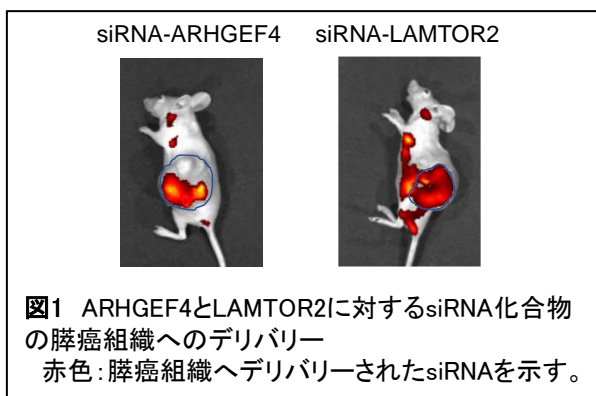
ARHGEF4 と LAMTOR2 に対する siRNA 化合物をヒト膵癌オルガノイド移植モデルマウスに 1 回/週の頻度で合計 6 回尾静脈から静注投与する。各群 10 匹のマウスに投与を行う。移植の翌週から投与を開始し、全身状態の変化を観察する。6 回目の投与を終了した翌週まで経時的に腫瘍サイズを計測して腫瘍増大抑制効果を検討する。コントロール siRNA の核酸化合物を投与された群 (10 匹) および進行膵癌に対する治療で使用されるゲムシタビンを腹腔内投与する群 (10 匹) も準備して経時的に腫瘍径を測定する。ゲムシタビン投与群では、1 回/週、合計 6 回のゲムシタビン単剤の腹腔内投与を行う。その後、すべての群の膵癌組織を摘出し、ホルマリン固定する。ヘマトキシリン&エオジン染色を行い、組織標本作製する。膵癌原発巣からの筋層浸潤の程度・脈管侵襲・皮下リンパ節転移・肝転移・肺転移をコントロール siRNA の核酸化合物を投与されたマウス群と比較する。予後改善を検討するために、上記と同様に各群 10 匹のヌードマウスに、ARHGEF4 と LAMTOR2 に対する siRNA 化合物を合計 6 回尾静脈から静注投与する。移植後 12 週目までの生命予後および全身状態の変化を観察する。ARHGEF4 または LAMTOR2 を標的とする siRNA 投与群において、コントロール siRNA の投与されたマウス群およびゲム

シタビン投与群に比較して予後が延長するかを解析する。解剖時にモデルマウスの採血を行い、肝・腎・膵機能および治療効果の指標になる腫瘍マーカーCA19-9 の測定を行う。

4. 研究成果

① ARHGEF4 と LAMTOR2 に対する siRNA 化合物が、膵癌細胞まで効率よく輸送されるかの検討について

siRNA が生体内で機能を発揮するためには、経静脈投与された siRNA を膵癌細胞へ安全に送達させるデリバリー技術の確立が重要である。カチオン性ペプチドが siRNA の熱力学的な安定性や RNase A 耐性を向上する効果を有する上に、siRNA と複合体を形成して細胞内に導入してもノックダウン活性を阻害しないことを明らかにした (**Bioorg Med Chem 21:1717-23, 2013**)。さらに、膵癌細胞への取り込みを促すリガンドをカチオン性ペプチドに結合することに成功した。*In vitro* にて作成したヒト膵癌オルガノイドをヌードマウスの背部皮下に移植後 6 週目に腫瘍径が 1.5cm ほどのサイズになったところで、蛍光標識した ARHGEF4 と LAMTOR2 に対する siRNA 化合物を尾静脈注射により投与した。24 時間後、*in vivo* imager にて撮影した結果、核酸化合物はヒト膵癌オルガノイド由来の腫瘍組織に集積することを確認した (図 1)。その後、マウスを還流固定し、膵癌組織の標本を作製した。それぞれの群で抗 ARHGEF4 抗体または抗 LAMTOR2 抗体を用いて組織染色を行い、共焦点顕微鏡により観察を行った結果、siRNA の取り込まれた膵癌細胞において、ARHGEF4 と LAMTOR2 が特異的に発現抑制されていることを確認できた。



② ARHGEF4 と LAMTOR2 に対する siRNA 化合物による浸潤・転移抑制効果と予後改善効果の検討について

ARHGEF4 と LAMTOR2 に対する siRNA 化合物の抗腫瘍効果を検討するために、ヌードマウス背部皮下にヒト膵癌オルガノイドを移植した 1 週間後から尾静脈注射にて 1/週の頻度で 6 週間投与した。siRNA 化合物を投与した群 (n=10) では膵癌腫瘍周囲への浸潤を抑制することによりコントロール群 (n=10) およびゲムシタビン単剤投与群 (n=10) に比較して有意に膵癌腫瘍の増大を抑制する結果を得た。リガンドを付加しない核酸化合

物を投与した群においてはコントロールと抗腫瘍効果の差はなかったが、リガンドを付加した核酸化合物を投与した群では顕著な腫瘍増大抑制効果を認めた。その結果、ARHGEF4 と LAMTOR2 に対する siRNA 化合物投与群の 12 週目までの予後はコントロール群に比較して改善傾向を認めた。

ヒト膵癌オルガノイド移植モデルマウスの血清を用いて CA19-9 濃度の測定を経時的に実施して論文報告を行った (**Hum Cell 35:735-744, 2022**)。ヌードマウスの背部皮下へヒト膵癌オルガノイドを移植後 4 週目と 8 週目の測定を行った。コントロールとして、ヌードマウスの背部皮下へヒト膵癌細胞株のみを局所注射した従来のゼノグラフトモデルを用いた。ヒト膵癌オルガノイド・モデルマウスの血清 CA19-9 濃度は経時的に上昇したが、従来のゼノグラフトモデルでは局所注射後 8 週目の CA19-9 濃度が 4 週目の CA19-9 濃度よりも低い結果であった。従来のゼノグラフトモデルの腫瘍組織の中心部は一部が壊死しており、相対的に膵癌細胞数が減少しており CA19-9 濃度を用いた評価が困難であった。

ヌードマウスの背部皮下へヒト膵癌オルガノイドを移植後 4 週目と 8 週目の採血を行い、血清中の CA19-9 の濃度測定を行った。ARHGEF4 と LAMTOR2 に対する siRNA 化合物を投与した群 (n=10) とゲムシタビン単剤投与群 (n=10) の血清 CA19-9 濃度はコントロール群 (n=10) に比較して 4 週目では差がなかったが、8 週目の時点で低下していた。

本研究を実施した結果、静脈内注射により投与された ARHGEF4 と LAMTOR2 を標的にする siRNA 化合物は膵癌組織にデリバリーされ、ゲムシタビン単剤投与群に比較して膵臓周囲への浸潤を抑制する機序により腫瘍増大は抑制される結果を得た。

<発表論文>

1. Tanaka C, Furihata K, Naganuma S, Ogasawara M, Yoshioka R, Taniguchi H, Furihata M, Taniuchi K. Establishment of a mouse model of pancreatic cancer using human pancreatic cancer cell line S2-013-derived organoid. *Hum Cell* 35:735-744, 2022.
2. Taniuchi K, Ueno M, Yokose T, Sakaguchi M, Yoshioka R, Ogasawara M, Kosaki T, Naganuma S, Furihata M. Upregulation of PODXL and ITGB1 in pancreatic cancer tissues preoperatively obtained by EUS-FNAB correlates with unfavorable prognosis of postoperative pancreatic cancer patients. *PLoS ONE* 17:e0265172, 2022.
3. Taniuchi K, Ogasawara. KHSRP-bound small nucleolar RNAs associate with promotion of cell invasiveness and metastasis of pancreatic cancer. *Oncotarget* 11:131-147, 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tanaka C, Furihata K, Naganuma S, Ogasawara M, Yoshioka R, Taniguchi H, Furihata M, Taniuchi K.	4. 巻 35
2. 論文標題 Establishment of a mouse model of pancreatic cancer using human pancreatic cancer cell line S2-013-derived organoid.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hum Cell	6. 最初と最後の頁 735-744
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13577-022-00684-7.	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 -
1. 著者名 Taniuchi K, Ueno M, Yokose T, Sakaguchi M, Yoshioka R, Ogasawara M, Kosaki T, Naganuma S, Furihata M.	4. 巻 17
2. 論文標題 Upregulation of PODXL and ITGB1 in pancreatic cancer tissues preoperatively obtained by EUS-FNAB correlates with unfavorable prognosis of postoperative pancreatic cancer patients.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0265172
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0265172.	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 -
1. 著者名 Takahashi Y, Sato K, Wada T.	4. 巻 87
2. 論文標題 Solid-Phase Synthesis of Boranophosphate/Phosphorothioate/Phosphate Chimeric Oligonucleotides and Their Potential as Antisense Oligonucleotides.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Org Chem	6. 最初と最後の頁 3895-3909
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.joc.1c01812.	査読の有無 無
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 Taniuchi K, Ogasawara M.	4. 巻 11
2. 論文標題 KHSRP-bound small nucleolar RNAs associate with promotion of cell invasiveness and metastasis of pancreatic cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 131-147
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.27413	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 -

1. 著者名 谷内恵介	4. 巻 41
2. 論文標題 10mm以下膵癌診断における膵癌細胞エクソソーム由来RNA検索の可能性	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 胆と膵	6. 最初と最後の頁 401-407
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 内田一茂、常風友梨、谷内恵介、耕崎拓大、池浦司、岡崎和一	4. 巻 41
2. 論文標題 自己免疫性膵炎の病因・病態：自然免疫の視点から	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 胆と膵	6. 最初と最後の頁 951-955
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 谷内 恵介、岡林 雄大、阪口 昌彦、岩田 純	4. 巻 118
2. 論文標題 膵管内乳頭粘液性腫瘍の診断マーカー同定と診断応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本消化器病学会雑誌	6. 最初と最後の頁 235-244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11405/nisshoshi.118.235	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 0件）

1. 発表者名 谷内恵介、廣瀬享、内田一茂
2. 発表標題 潤抑制効果を持つ核酸製剤の膵癌への実用化研究
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷内恵介、谷口英樹、内田一茂
2. 発表標題 膵癌オルガノイドを用いた新規モデルマウスによる膵癌早期診断マーカー同定に向けた戦略
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷内恵介、上野誠、内田一茂
2. 発表標題 術前に膵癌予後予測を行うことにより、術前化学療法を行うべき症例を絞り込めるか？
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 常風友梨、谷内恵介、長沼誠二、内田一茂、降幡睦夫
2. 発表標題 膵癌細胞の運動・浸潤に関わるWASF2の同定
3. 学会等名 第38回日本ヒト細胞学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷内恵介、田中千遥、長沼誠二、常風友梨、内田一茂、降幡睦夫、谷口英樹
2. 発表標題 ヒト膵癌オルガノイド移植マウスの病理組織学的検討
3. 学会等名 第38回日本ヒト細胞学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 谷内恵介
2. 発表標題 新規治療薬の承認を目指した膵癌研究
3. 学会等名 第38回日本ヒト細胞学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤一樹、高木一憲、原倫太郎、谷内恵介、和田猛
2. 発表標題 葉酸結合同型カチオン性オリゴペプチドを用いた膵癌特異的なsiRNAのデリバリー
3. 学会等名 第69回高分子討論会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計4件

産業財産権の名称 膵がん及び膵管内乳頭粘液性腫瘍のマーカー	発明者 谷内恵介	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-115619	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 ヒト膵癌オルガノイドを用いたマウスモデルの樹立	発明者 谷内恵介、谷口英樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-078771	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 膵癌治療剤	発明者 谷内恵介	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-100937	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 膵がん診断キット	発明者 谷内恵介	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-174333	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 Marker for pancreatic cancer and intraductal papillary mucinous neoplasms	発明者 Keisuke Taniuchi	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2016367349 (Australia)	取得年 2021年	国内・外国の別 外国

〔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	和田 猛 (Wada Takeshi) (90240548)	東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・教授 (32660)	

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