

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16216

研究課題名（和文）miR-143-ナノ脂質抱合粒子を用いたKRAS変異多発性骨髄腫治療法の開発

研究課題名（英文）Development of miR-143-lipid nanoparticle-based therapy against KRAS-mutant multiple myeloma

研究代表者

平島 一輝（Heishima, Kazuki）

岐阜大学・高等研究院・特任助教

研究者番号：50826633

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：KRAS変異多発性骨髄腫に対する有効な治療法は限られている。今回、RNA干渉によってRAS分子経路全体を制御する化学修飾マイクロRNA-143（miR-143）のKRAS変異多発性骨髄腫に対する抗腫瘍効果をマウスモデルで評価した。実験の結果、化学修飾miR-143投与は脾臓の腫瘍細胞量およびmiR-143標的タンパクERK1/2および増殖マーカーp-Histone H3の発現を有意に減少させることがわかった。一方、骨髄においては、有意な抗腫瘍効果を認めなかった。以上より、化学修飾miR-143は臓器特異性があるものの多発性骨髄腫モデルにおいて、有意な抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、KRAS変異多発性骨髄腫に対しては有効な治療法が限られている。今回の研究によって、KRAS変異多発性骨髄腫に対する、miR-143を使用した核酸医薬の有効性と特徴を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Effective treatments for KRAS-mutant multiple myeloma are limited. The present study evaluated the antitumor potential of chemically modified microRNA-143 (CM-miR-143), which regulates the entire RAS molecular network by RNA interference, in a KRAS-mutant multiple myeloma mouse model. The result showed that administration of CM-miR-143 significantly reduced the amount of tumor cells distributed in the spleen, as well as the expression of the miR-143 target gene ERK1/2 and the proliferation marker p-Histone H3. On the other hand, no significant antitumor effect was observed in tumor cells distributed to the bone marrow. These findings demonstrated that CM-miR-143 induced significant antitumor effects in a multiple myeloma model, although it has organ specificity.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：多発性骨髄腫 マウスモデル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

多発性骨髄腫はB細胞に由来する血液腫瘍で、全身障害（貧血、骨障害、腎障害）を来しうる重篤な疾患である。多発性骨髄腫に有効な治療薬は少なく、プロテアソーム阻害剤やサリドマイド誘導体が用いられるが、不応症例には有効な治療手段がないことが問題である。この薬剤不応性にはRAS変異の関与が強く示唆されており、実際に、KRAS変異例ではボルテゾミブ治療後再発時の生存期間は有意に短い。さらにRAS変異はきわめて多くの多発性骨髄腫症例(20-45%)に認められるため重要な治療標的と考えられる。

しかし、RASタンパクは結合可能部位が極めて少ないため低分子化合物による活性阻害が難しい。加えて、RAS分子経路は多数の代償活性化機構を持つため、RAS単独の阻害では治療効果が限定的である。そのため、これまでの低分子化合物による検討では、RASを標的とする治療薬の開発は困難を極めている。

そこで我々は、RNA干渉によってRAS分子経路全体を制御するマイクロRNA-143(miR-143)に着目した。miR-143は、RASのみならずエフェクター経路の複数の分子(Akt、ERK、SOS1)をRNA干渉により同時に抑制できるため、極めて有効なRASネットワークの阻害薬となりうる。実際に我々は、miR-143に化学的修飾を施してRNase耐性・阻害活性を向上させたmiR-143#12を開発して、複数の動物モデルで腫瘍縮小効果を確認している。

今回の研究では、上記の化学修飾miR-143#12にLipid nanoparticle(LNP)処理を施して腫瘍細胞への送達性を向上させたmiR-143#12-LNPのKRAS変異多発性骨髄腫マウスモデルにおける抗腫瘍活性を評価した。

## 2. 研究の目的

miR-143#12-LNPのKRAS変異多発性骨髄腫マウスモデルにおける抗腫瘍活性の評価

## 3. 研究の方法

マウスモデルの構築にはNOGマウスとKRAS変異型多発性骨髄腫細胞(RPMI8226)を使用した。投与物質として、LNP包埋したmiR-143#12を使用した。マウスには、20µM溶液を100µLずつ、尾静脈より隔日で合計5回、10日間投与した。抗腫瘍効果の評価項目として、各臓器腫瘍細胞量(ヒト細胞マーカーHLA-A)、増殖抑制(p-Histone H3)、全体腫瘍細胞量(lambda light chain)、miR-143標的遺伝子(KRAS、Akt、ERK1/2)を検索した。

## 4. 研究成果

本課題では、(1)モデルマウス改善と血液指標の確立と(2)投与物質の改善、(3)抗腫瘍活性の評価を行った。

### (1)モデルマウス改善と血液指標の確立

研究開始当初使用していたモデルでは、ヒトKRAS変異骨髄腫細胞(RPMI8226)は骨髄・脾臓に播種するものの、個体間でばらつきが多く検討に多くのマウスを必要とする状況であった。また、各臓器の腫瘍細胞量は組織学的(HE、免疫染色)・生化学的(ウエスタンブロット)に分析できる状態だったが、全身の腫瘍細胞量を総合的に定量する方法がなかった。

そこで、シクロホスファミドの前処置をモデル作成に組み込むことで、血中lambda light chain量を安定的に検出できるモデルの作成に成功した(図1)。また、骨髄への定着率を著しく向上させることができた。

### (2)投与物質の改善

LNP組成を変更することで活性の変化を検討する予定であったが、作成スケールと調節から投与までの期間を変更することで、従来よりも活性が10-20倍程度高いLNPを作成することができた。

### (3)抗腫瘍活性の評価

上記のモデルと投与物質を用いて、多発性骨髄腫モデルマウスにおけるmiR-143#12-LNPの抗腫瘍効果を評価した。具体的には、各臓器腫瘍細胞量(ヒト細胞特異的マーカーHLA-A免疫染色)、増殖抑制(p-Histone H3免疫染色)、全体腫瘍細胞量(Lambda light chain)、miR-143標的タン

パク (KRAS、Akt、ERK1/2) について評価を行った。投与は、20  $\mu\text{M}$  溶液を 100  $\mu\text{L}$  ずつ、尾静脈より隔日で合計 5 回、10 日間投与した。

実験の結果、miR-143#12-LNP は脾臓において HLA-A 陽性腫瘍細胞数を減少させることがわかった (図 2)。腫瘍組織における lambda light chain 量も同様に有意に減少していた (図 2)。免疫組織学的染色による検索では、腫瘍組織において miR-143 標的タンパクである ERK1/2 および増殖マーカーである p-Histone H3 の有意な減少を認めた (図 2)。一方、その他の miR-143 標的タンパクである Akt、KRAS は減少傾向を認めたものの、有意差を認めなかった (図 2)。骨髄または血中 lambda light chain 量については、有意な抗腫瘍効果を認めなかった (図 2)。副作用について、経時的体重変化と血液生化学的指標を用いて検索したが、明らかな副作用は認められなかった (図 3、4)。以上より、miR-143#12-LNP は臓器特異性があるものの多発性骨髄腫モデルマウスにおいて、有意な抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。

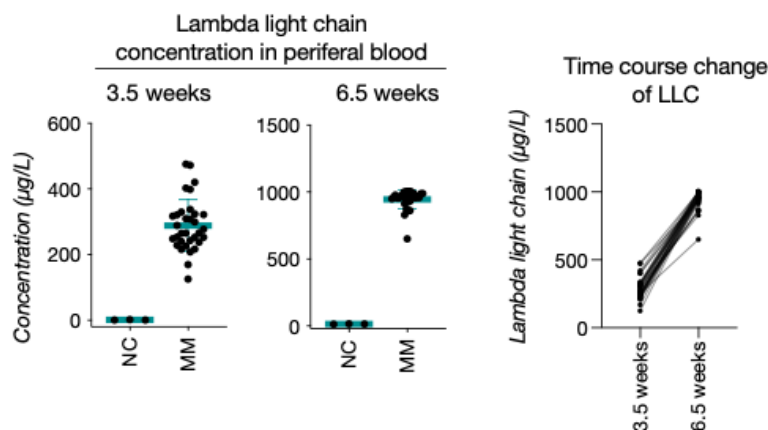


図 1: 血液中の lambda light chain 量の変化。NC: Negative control., MM: RPMI8226 細胞投与群

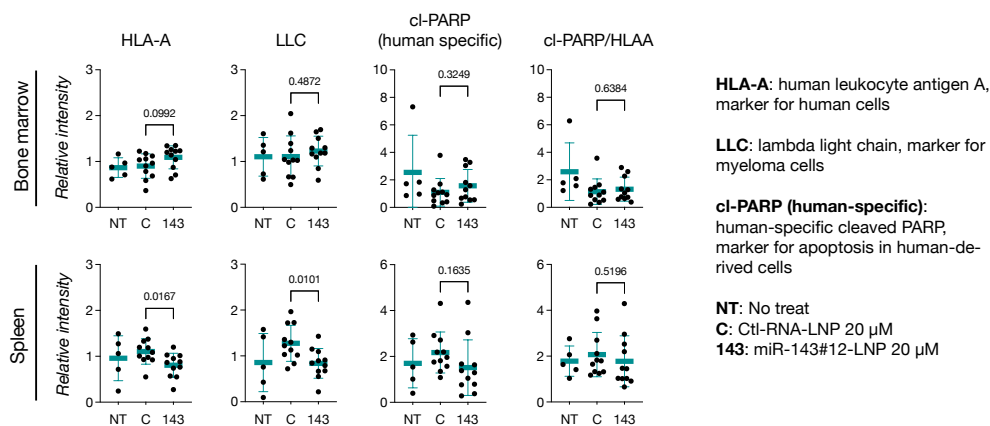


図 2: 免疫組織学的染色による染色強度の比較

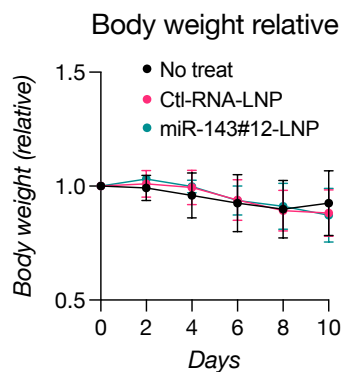


図 3: 経時的な体重の変化

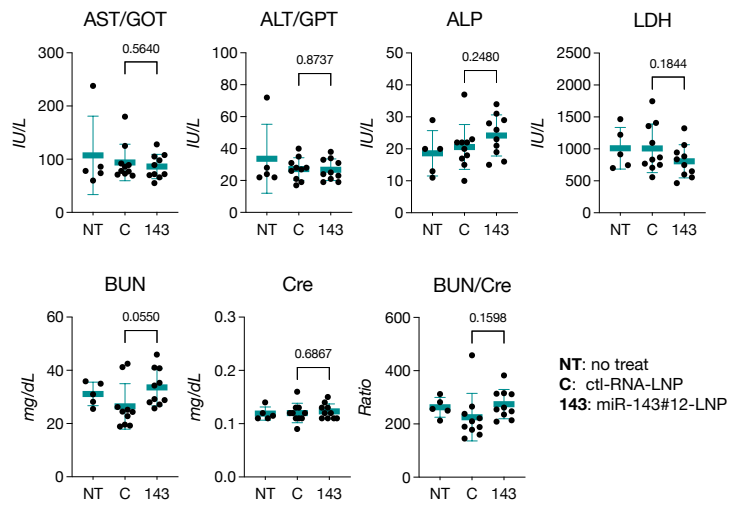


图 4: 血液生化学検査結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kazuki Heishima, Nobuhiko Sugito, Yukihiro Akao
2. 発表標題 Efficacy of liponanoparticle-embedded synthetic MIR143 in a systemic KRAS-mutant multiple myeloma model
3. 学会等名 日本癌学会
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
---------	---------