

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460041

研究課題名(和文)がん選択的なRNA干渉治療薬の開発に向けた核酸デリバリーシステムに関する研究

研究課題名(英文)Delivery of siRNA for synthetic lethality-based cancer therapy

研究代表者

浅井 知浩 (Tomohiro, Asai)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：00381731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：合成致死性に基づくRNA干渉療法の開発を目的とし、合成致死遺伝子としてPTENおよびPARP1遺伝子に着目した。PTEN欠損がん細胞を用い、PARP1に対するsiRNA (siPARP1)の抗がん効果を評価した。我々が開発したベクターを用いてsiPARP1を細胞に導入したところ、正常細胞およびPTEN陽性がん細胞と比較し、PTEN欠損がん細胞においてDNA損傷とアポトーシス細胞の有意な増加が認められた。siPARP1は、PTEN欠損がん細胞に対して選択的な殺細胞効果を示し、その効果は低分子阻害剤Olaparibと比較して有意に高かった。本研究成果は選択的ながん治療法の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Synthetic lethality has attracted considerable attention as a novel strategy for the treatment of cancer. To explore RNA interference (RNAi) cancer therapy based on synthetic lethality, poly [ADP-ribose] polymerase 1 (PARP1) gene in human breast cancer cells lacking phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN) was silenced by small interfering RNA targeting PARP1 (siPARP1). For the efficient delivery of siPARP1 to cancer cells, dicetylphosphate-tetraethylenepentamine-based polycation liposomes (TEPA-PCL) were prepared. Treatment with siPARP1 formulated in TEPA-PCL (siPARP1/TEPA-PCL) selectively induced DNA damage and cytotoxic effects in PTEN-null cells, but not in PTEN-positive cells. These results indicate that PARP1 knockdown using siPARP1/TEPA-PCL is likely to be an effective strategy to achieve synthetic lethality against PTEN-null cancer.

研究分野：薬物送達学

キーワード：合成致死性 siRNA送達 がん PARP1 PTEN

1. 研究開始当初の背景

RNA 干渉剤の医療応用に向け、small interfering RNA (siRNA) や microRNA (miRNA) に関する研究が基礎と臨床において活発になされている。RNA 干渉を引き起こす手法としては、これら small RNAs 以外にもウイルスや plasmid DNA を用いて short hairpin RNA (shRNA) を細胞内で発現させる方法もある。しかし、核酸医薬シーズの中では相対的に低分子である合成 small RNAs をウイルスを用いずに導入する戦略は、製薬企業における医薬品開発上の優位性が非常に高い。一般に外部から投与した RNA は生体内で速やかに分解されることや細胞膜をほとんど透過しないことなどから、デリバリーシステムが RNA 創薬の成否の鍵を握っているといえる。近年、画期的な核酸医薬品の誕生にはデリバリーシステムの継続的な研究開発が不可欠であると広く認識されるようになってきている。

ところで、遺伝子変異の蓄積によって生じるがんは RNA 干渉剤の治療応用が期待される代表的な疾患である。がんにおける異常なシグナル伝達を遮断し、がん細胞選択的な細胞死へと導く siRNA の発見は、魅力的な抗がん剤シーズの発見と言い換えることができる。実際、がん研究の進展に伴い、多くの有望な治療標的とそれに対する siRNA が見出されている。これまでの RNA 干渉に関する基礎研究の成果から siRNA は少量で選択的な薬理作用の発現が期待でき、副作用が強く使用に制限が多い抗がん剤の問題点克服に繋がる可能性がある。実際、海外では siRNA を用いたがん治療の第一相臨床試験が少なくとも 6 件進行中であり、がん患者において siRNA 全身投与による RNA 干渉作用などが確認されている。がんを対象とした臨床試験で着目すべき点は、すべての siRNA シーズが DDS 製剤化されており、そのうちの 2/3 をリポソームあるいは脂質ナノ粒子が占めている点である。これは siRNA 医薬品の開発において、がんを対象とした臨床試験だけに特有な特徴である。生体内において RNA を介した情報交換のベクターの役割を果たすエクソソームの存在が示唆するように、脂質ナノ粒子を用いた siRNA デリバリーは理に適ったアプローチといえる。がんに関してはいわゆる enhanced permeability and retention 効果を狙ってナノ粒子が用いられているという側面が強いが、エクソソームの機能を模倣する試みという見方もできる。

これまでに申請者らは siRNA 全身投与によるがん治療を念頭におき、 polycation liposomes (PCL) を用いた siRNA デリバリーに関する研究を遂行してきた。PCL は、ポリカチオン部分に由来する強力なプロトンスポンジ効果とリポソーム特有の膜融合効果を併せ持つ機能的な核酸導入ベクターであることを報告してきた(Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008 他)。近年では、PCL のポリカ

チオン部分について siRNA の導入に適した化学構造をスクリーニングし、ポリカチオン脂質 dicetyl phosphate-tetraethylenepentamine conjugate (DCP-TEPA) を含む PCL に高い導入活性を見出した (特許公告番号 ; US20100094020)。次に、長期血中滞留性を付与するためのポリエチレングリコール(PEG) 修飾ならびに標的細胞への特異性を付与するためのペプチド修飾を施した PCL を調製し、がんへの siRNA デリバリーについて研究を行った (若手研究 (B) 平成 19-21 年度 (代表) Bioconjug. Chem. 2011 他)。さらに、siRNA の化学修飾技術をナノ粒子の設計段階で取り入れることにより、siRNA 全身投与時に高い安定性と優れた腫瘍集積性を示すデリバリーシステムの構築に成功した。これにより、担がんマウスにおいて高い遺伝子ノックダウン効果と有意ながん治療効果が得られた (若手研究 (B) 平成 22-24 年度 (代表) J. Control. Release. 2012 他)。

2. 研究の目的

本研究課題では、siRNA のがん医療への応用展開に寄与することを目的とし、これまでの全身投与型 siRNA ベクターに関する研究成果を進展させ、より選択的ながん治療法を開発する。新規ナノ粒子を用いて合成致死性 (synthetic lethality) を示す siRNA をがん細胞にデリバリーし、「必要な場所に必要な量の薬を必要な時間だけ作用させる」という DDS の概念に「必要な場所だけで活性を発揮する」というプラスアルファの要素を追加する。合成致死性とは、単独変異では致死性を示さない複数の遺伝子が同時に機能を失うことで初めて致死性を示すことを指し (Fig. 1)。現在この現象を応用した新規がん治療薬の開発が競って進められている。しかし、これまで合成致死性を利用した新規分子標的薬の開発は低分子化合物でしか進行しておらず、siRNA 医薬品の開発はなされていない。

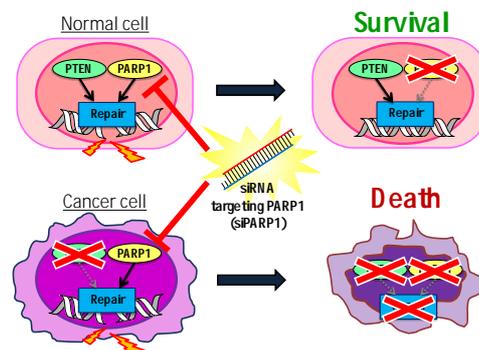


Fig. 1 A scheme of synthetic lethality

そこで本研究では、合成致死性に基づく siRNA 医薬品の開発を目指し、合成致死遺伝子の組合せとして phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 (PTEN)

と poly [ADP-ribose] polymerase 1 (PARP1) に着目した。両者はともに DNA 修復に関与するとされ、PTEN は約半数のがんで欠損が認められている。そこで、PARP1 を標的とした siRNA (siPARP1) を PTEN 欠損がん細胞に導入し、合成致死性に基づく RNA 干渉療法の有効性について検討した。

3 . 研究の方法

PTEN 欠損がん細胞として MDA-MB-468 ヒト乳がん細胞、対照の PTEN 陽性がん細胞として MDA-MB-231 ヒト乳がん細胞を用いた。また正常細胞としてヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) を用いた。各細胞にそれぞれ RNA 干渉を誘導するため、DCP-TEPA を含有する PCL に siPARP1 を保持させたナノ粒子 (siPARP1/TEPA-PCL) を調製した。はじめに、このナノ粒子を用いて siPARP1 を各細胞に導入し、その遺伝子サイレンシング効果を RT-PCR 法およびウエスタンブロットング法にて評価した。次に、各細胞の PARP1 をノックダウンし、そのアポトーシス誘導能をフローサイトメトリーによって解析した。さらに、PARP1 ノックダウンの細胞増殖抑制効果を WST-8 assay で評価した。また、PTEN 陽性がん細胞において PTEN と PARP1 をダブルノックダウンし、両遺伝子の失活による合成致死性について検証した。両遺伝子の欠損状態に起因する合成致死のメカニズム解析の一端として、PARP1 ノックダウンが PTEN 欠損がん細胞の DNA 修復機構に与える影響を Comet assay により評価した。

4 . 研究成果

siPARP1/TEPA-PCL を調製し、ゼータサイザーでその粒子径を測定したところ、粒子径約 150 nm、多分散指数 0.1 以下の均一なナノ粒子が形成されていることが確認された。この siPARP1/TEPA-PCL を用い、MDA-MB-468 および MDA-MB-231 の PARP1 遺伝子をサイレンシングした。Fig. 2 には RT-PCR 法によって評価した PARP1 mRNA の相対的発現量を示す。

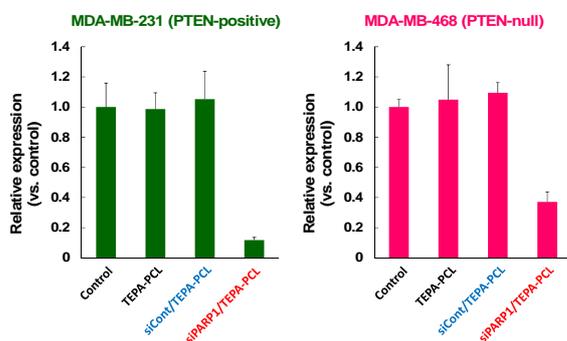


Fig. 2 Gene silencing of PARP1 using siPARP1/TEPA-PCL

MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells were incubated with TEPA-PCL, control siRNA

(siCont) /TEPA-PCL or siPARP1/TEPA-PCL (50 nM siRNA), respectively. The amount of PARP1 mRNA was examined by real-time RT-PCR 24 h after the transfection. Data are presented as relative expression of PARP1 mRNA to that of control (no treatment) with S.D. bars.

MDA-MB-231 細胞、MDA-MB-468 細胞の両細胞において、対照群と比較し、siPARP1/TEPA-PCL 添加群で有意な PARP1 mRNA の発現抑制が認められた。続いてウエスタンブロットング法にてノックダウンを評価したところ、RT-PCR 法の結果と関連し、顕著な PARP1 タンパク質の発現抑制が認められた (data not shown)。以上より、TEPA-PCL の siPARP1 導入ベクターとしての有用性が示唆された。

PARP1 ノックダウンの PTEN 欠損がん細胞に対するアポトーシス誘導能を検討した。FITC 標識 Annexin V とヨウ化プロピジウムにより細胞を蛍光染色し、フローサイトメトリーを用いて siPARP1 導入後の経時的なアポトーシス解析を行った。その結果、siPARP1 処理をした MDA-MB-468 細胞において、時間依存的なアポトーシス細胞の増加が観察された。一方、MDA-MB-231 細胞では PARP1 ノックダウンによるアポトーシス誘導はほとんど認められなかった (Fig. 3)。また正常細胞として HUVEC を用いて同様の実験を行ったところ、やはりアポトーシス誘導はほとんど認められなかった (data not shown)。すなわち、PTEN 欠損がん細胞のアポトーシスは、PARP1 ノックダウンにより選択的に誘導されることが示唆された。

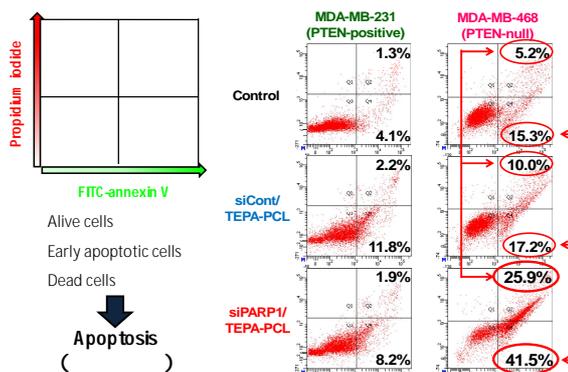


Fig. 3 Increase in apoptotic cells by PARP1 knockdown in PTEN-null cells

MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells were incubated with siCont/TEPA-PCL or siPARP1/TEPA-PCL (50 nM siRNA), respectively. Apoptotic cells were detected 72 h after the transfection by flow cytometry using FITC-conjugated annexin V and propidium iodide.

続いて、siPARP1 処理による PTEN 欠損がん細胞に対する殺細胞効果を WST-8 assay により検討した結果、MDA-MB-231 細胞では siPARP1 処理による増殖抑制効果はほぼ認められなかったのに対し、MDA-MB-468 細胞では増殖抑制効果に加えて殺細胞効果が観察された (Fig. 4)。PTEN 欠損がん細胞に対する siPARP1 の抗がん効果は、PARP1 の低分子阻害剤である Olaparib と比較して有意に高かった (data not shown)。以上の結果は、フローサイトメトリーでの検討を支持する結果であり、PARP1 ノックダウンが PTEN 欠損がん細胞に対して選択的かつ強力に細胞死を誘導することが示唆された。

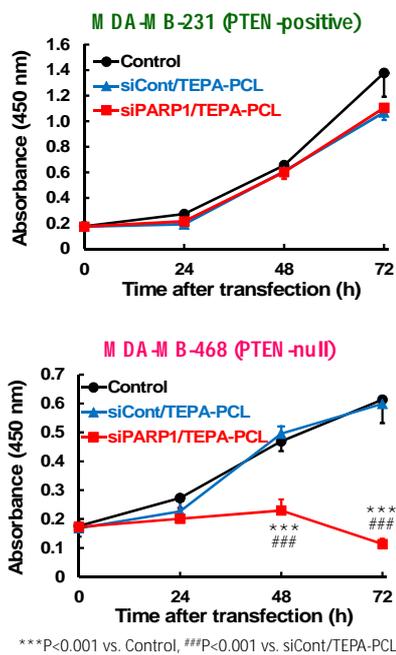


Fig. 4 Impact of PARP1 knockdown on the growth of breast cancer cells

MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells were incubated with siCont/TEPA-PCL or siPARP1/TEPA-PCL (50 nM siRNA), respectively. Cell growth was evaluated by WST-8 assay 24, 48 and 72 h after the transfection. Data represent mean with S.D. bars.

そこで、MDA-MB-468 細胞のアポトーシスが PTEN 遺伝子の欠損及び PARP1 遺伝子のサイレンシングによる合成致死に起因するものか否かについて検討した。具体的には、siPTEN 処理した MDA-MB-231 細胞に siPARP1 を導入することで、両遺伝子の発現が同時に抑制された条件の作成を試みた。その結果、PTEN と PARP1 をダブルノックダウンした群で、対照群と比較して顕著な増殖抑制効果が認められた (Fig. 5)。siRNA によるノックダウン効果のため、殺細胞効果ほど強力な効果は認められなかったが、細胞増殖における両遺伝子の発現の重要性が明らかと

なった。これは、PTEN 欠損がん細胞における PTEN および PARP1 遺伝子の合成致死性を支持する結果といえる。

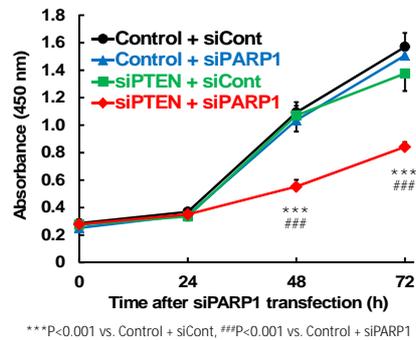


Fig. 5 Impact of knockdown of both PTEN and PARP1 on the growth of PTEN-positive breast cancer cells

MDA-MB-231 cells were incubated with siCont/TEPA-PCL or siPARP1/TEPA-PCL (50 nM siRNA) 48 h after the siPTEN transfection. Cell growth was evaluated by WST-8 assay 24, 48 and 72 h after the siPARP1 transfection. Data represent mean with S.D. bars.

PTEN と PARP1 は共に DNA 修復機構への関与が報告されているため、両遺伝子の機能喪失が DNA 修復能力に及ぼす影響を Comet assay により検討した。Comet assay においては、断片化 DNA の泳動距離 (Tail length) と相対量 (% tail DNA) が DNA 損傷の指標となる。これらの数値を掛け合わせて Tail moment を算出することで DNA 損傷度の定量化を行った。その結果、siPARP1 処理により MDA-MB-231 細胞と MDA-MB-468 細胞の両細胞で DNA 損傷が増大したが、PTEN を欠損した MDA-MB-468 細胞において PARP1 ノックダウンの影響が顕著に認められた (Fig. 6)。したがって、PTEN と PARP1 の両遺伝子の欠損状態が DNA 修復不全に起因する DNA 損傷の増大を引き起こすことが示唆された。

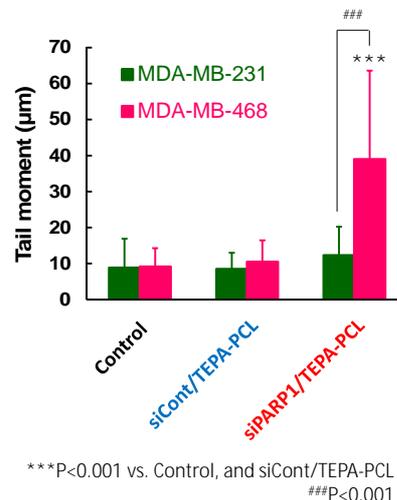


Fig. 6 Accumulation of DNA strand breaks in PTEN-null cells treated with siPARP1

MDA-MB-231 and MDA-MB-468 cells were transfected with siCont or siPARP1 using TEPA-PCL for 72 h, respectively. Tail moment was analyzed using Image J software. Tail moment (μm) = % tail DNA x Tail length. Data show mean with S.D. bars.

PTEN と PARP1 の DNA 修復経路における機能については現時点では不明であるが、DNA 修復因子の一つである Rad51 との関連が両方で報告されている。したがって、Rad51 が中心的な役割を果たす「相同組換え修復 (Homologous recombination; HR)」に参与する可能性が考えられる。DNA 修復の破綻が合成致死の起点となることは非常に興味深い知見であり、合成致死誘導に基づく新たな創薬ターゲットの発掘や有効な治療法の開発に繋がることを期待される。

以上より、我々が開発した核酸デリバリーシステムを用いて PTEN 欠損がんの PARP1 遺伝子をサイレンシングする RNA 干渉療法は、選択性の高いがん治療法になりうると考えられる。

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 22 件)

- 1) Koide H, Okamoto A, Tsuchida H, Ando H, Ariizumi S, Kiyokawa C, Hashimoto M, Asai T, Dewa T, Oku N: One-step encapsulation of siRNA between lipid-layers of multi-layer polycation liposomes by lipoplex freeze-thawing. *J. Control. Release* **228**, 1-8 (2016) doi: 10.1016/j.jconrel.2016.01.032.
- 2) Okamoto A, Asai T, Ryu S, Ando H, Maeda N, Dewa T, Oku N: Enhanced efficacy of doxorubicin by microRNA-499-mediated improvement of tumor blood flow. *J. Clin. Med.* **5**, 10 (2016) doi: 10.3390/jcm5010010.
- 3) Koide H, Asai T, Kato H, Yonenaga N, Yokota M, Ando H, Dewa T, Nango M, Maeda N, Oku N: Susceptibility of PTEN-positive metastatic tumors to small interfering RNA targeting the mammalian target of rapamycin. *Nanomedicine* **11**, 185-194 (2015) doi: 10.1016/j.nano.2014.09.003.
- 4) Okamoto A, Asai T, Kato H, Shimizu K, Ando H, Minamino T, Mekada E, Oku N: Antibody-modified lipid nanoparticles for selective delivery of siRNA to tumors expressing membrane-anchored form of HB-EGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **449**, 460-465 (2014) doi: 10.1016/j.bbrc.2014.05.043.

- 5) Ando H, Asai T, Koide H, Okamoto A, Maeda N, Tomita K, Dewa T, Minamino T, Oku N: Advanced cancer therapy by integrative antitumor actions via systemic administration of miR-499. *J. Control. Release* **181**, 32-39 (2014) doi: 10.1016/j.jconrel.2014.02.019.
- 6) Asai T, Tsuzuku T, Takahashi S, Okamoto A, Dewa T, Nango M, Hyodo K, Ishihara H, Kikuchi H, Oku N: Cell-penetrating peptide-conjugated lipid nanoparticles for siRNA delivery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **444**, 599-604 (2014) doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.107.
- 7) Ando H, Okamoto A, Yokota M, Asai T, Dewa T, Oku N: Polycation liposomes as a vector for potential intracellular delivery of microRNA. *J. Gene Med.* **15**, 375-383 (2013) doi: 10.1002/jgm.2744.
- 8) Kenjo E, Asai T, Yonenaga N, Ando H, Ishii T, Hatanaka K, Shimizu K, Urita U, Dewa T, Nango M, Tsukada H, Oku N: Systemic delivery of small interfering RNA by use of targeted polycation liposomes for cancer therapy. *Biol. Pharm. Bull.* **36**, 287-291 (2013)

他 14 件

〔学会発表〕(計 39 件)

- 1) 新規脂質ナノ粒子/siRNA を用いた効率的な遺伝子サイレンシング. 日本薬学会第 135 年会, 一般シンポジウム「第 11 回若手が拓く新しい薬剤学 ~ 薬剤学が切り拓く次世代創薬・育薬への新展開」, 2016 年 3 月 29 日, 横浜
- 2) 脂質ナノ粒子を用いた小分子 RNA デリバリー技術の開発とがん治療への応用. 日本油化学会第 54 回年会, オレオナノサイエンス部会シンポジウム, 2015 年 9 月 10 日, 名古屋
- 3) リボソーム DDS を用いた脳梗塞治療法の開発. 第 31 回日本 DDS 学会, シンポジウム 5「虚血性脳・心疾患をターゲットとする DDS の新展開」, 2015 年 7 月 3 日, 東京
- 4) リボソームを用いた核酸デリバリーシステムに関する研究. 日本薬学会第 29 年会, 日本薬学会奨励賞受賞講演, 2014 年 5 月 21 日, 大宮
- 5) Treatment of PTEN-positive tumors with small interfering RNA targeting the mammalian target of rapamycin. 2nd International Conference and Exhibition on Cell & Gene Therapy, October 25, 2013, Orlando, FL, USA

他 34 件

〔図書〕(計 4 件)

- 1) 浅井知浩, 奥 直人: DDS キャリア作成

- プロトコル集 第1章 第5節 ペプチド修飾リボソームの調製 p30-35, 株式会社 シーエムシー出版 (2015)
- 2) 浅井知浩, 奥 直人: 非経口投与製剤の開発と応用—一次世代型医薬品の新規投与形態の開拓を目指して—第3編 第16章 第2節 腫瘍新生血管を標的とした核酸デリバリーシステムの開発 p231-236, 株式会社 シーエムシー出版 (2013)
 - 3) 浅井知浩, 奥 直人: DDS 技術の実用化手法 第4章 第1節 [2] 2 RNA 干渉医薬の DDS 技術の動向と実用化の可能性 p172-177, 株式会社 技術情報協会 (2013)
 - 4) Koide H, Asai T, Shimizu K, Oku N: Drug carrier systems for anticancer agents. *Polymeric Biomaterials*, 2, chapter 6, 153-170 CRC Press (2013)

〔その他〕

ホームページ等

Publications & Awards

<http://w3pharm.u-shizuoka-ken.ac.jp/radiobio/mbc/Publication.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

浅井 知浩 (ASAI TOMOHIRO)

静岡県立大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：00381731