

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：35408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870770

研究課題名(和文) 複数のがん関連遺伝子を標的とした脂質コンジュゲートsiRNAの相乗効果

研究課題名(英文) Synergy of gene silencing of lipid conjugate siRNAs targeting multiple oncogenes

研究代表者

久保 貴紀 (Kubo, takanori)

安田女子大学・薬学部・講師

研究者番号：90435751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大腸がん肝転移モデルマウスを用いてパルミチン酸結合型siRNA(C16-siRNA)のin vivoでの遺伝子発現抑制効果を評価した。ルシフェラーゼを発現する大腸がん細胞 (HT29Luc)をヌードマウスの門脈から注入し、肝転移形成を確認した後、VEGFおよび β -カテニンの2つ遺伝子を標的とした2種類のC16-siRNAを遺伝子導入剤 (InvivoFectamine) と共に尾静脈投与した。経時的にルシフェラーゼの発光をin vivoイメージングシステム (IVIS)で観察した結果、C16-siRNAを投与した個体群は、マウスの肝臓に形成された転移腫瘍の増殖を強く抑制した。

研究成果の概要(英文)：In this study, siRNAs were conjugated with palmitic acid at the 5'-end of the sense strand to enhance RNAi efficacy. The palmitoyl-siRNAs (C16-siRNAs) targeting VEGF and β -catenin gene were synthesized by our simple method with high yield. We performed in vivo gene silencing experiments on a liver-metastatic HT29Luc tumor mouse model. Cells of the line HT29Luc, which derived from human colon cancer cell line and that stably expresses the Firefly luciferase gene, were established from a liver-metastatic tumor of orthotopic implantation model. After systemic administration of C16-siRNAs mixed with InvivoFectamine, the RNAi effect was evaluated by the use of an in vivo imaging. Excellent gene-silencing effect of C16-siRNAs was observed in a liver-metastatic HT29Luc tumor mouse model.

研究分野：核酸化学、生物有機化学

キーワード：siRNA バイオコンジュゲート ジーンサイレンシング 脂肪酸 DDS

1. 研究開始当初の背景

短い2本鎖RNA(siRNA)を用いるRNA干渉(RNAi)は、がんなどの難治性疾患の新たな治療法として期待されているが、siRNAの体内でのデリバリー法や標的細胞への導入法の確立、安定性の向上などの課題があり、*in vivo*でのRNAi効果はまだ乏しいのが現状である。近年、コレステロールや長鎖脂肪酸が直接siRNAに結合した脂質コンジュゲートsiRNA(Lipid-siRNA)が注目されており、*in vivo*で安定なRNAi効果を示すと期待されている。しかし、これまでに報告されたLipid-siRNAは細胞導入性や安定性は向上するものの、脂質結合位置やsiRNAの構造に制限があるために、RNAi反応に関わるタンパク質(RISC等)との相互作用を妨げ、RNAi効果自体は減少する。また、Lipid-siRNAの合成法自体も汎用性に乏しく、臨床応用を含めた*in vivo*利用での障害となっている。

2. 研究の目的

本研究では既に、RNAi法の問題を解決でき、かつ、これまでのLipid-siRNAの問題も解決できる新しい脂質コンジュゲートsiRNA(Lipid-si27RNA)の開発に成功している。このLipid-si27RNAの1つの特徴として、27-ntのsiRNAから構成されており、細胞内のDicerにより21-nt siRNAへプロセシングされ、強いRNAi反応を示すことができる。2つ目の特徴として、脂質結合位置をセンス鎖の5'末端に限定している。このことにより、Dicerによる21-nt siRNAへのプロセシングの際にRNAに結合していた脂質は離脱するように設計している。3つ目の特徴として、本研究で開発した新規合成法は従来の合成法に比べ、簡便かつ高収率、高純度で目的の脂質コンジュゲートsiRNAを合成できる。また脂質は理論上siRNAのあらゆる位置に結合可能である。これまでの*in vitro*の研究で、開発したLipid-si27RNAは設計どおりにDicerによってプロセシングされ、細胞内導入性および分解酵素耐性も向上し、RNAi効果も極めて強いことを明らかにしている。

本研究では、複数のがん関連遺伝子を標的とした脂質コンジュゲートsiRNAを用い、担がんマウスにおける相乗的な抗腫瘍効果を評価する。つまり、*in vivo*での安定で活性の高いRNA干渉効果を申請者が開発した脂質コンジュゲートsiRNAで達成し、臨床での応用を目指した基礎研究を行う。

3. 研究の方法

本研究では、担がんマウスを使用してLipid-si27RNAの抗腫瘍効果を評価した。そのために、ルシフェラーゼを発現する大腸癌細胞(HT29Luc)をヌードマウスに移植したモデルマウスを作製し、その後Lipid-si27RNAを全身に投与した。実験は主に*in vivo*イメージングシステム(IVIS)を用いて非侵襲的かつ経時的・効率的に腫瘍の

ルシフェラーゼ発光を測定することにより評価した。標的遺伝子は、がん細胞で多く発現し、腫瘍の増殖・進展・転移に関係するVEGFと β -CATを選択した。今回使用したLipid-si27RNAはパルミチン酸が結合したC16-si27RNAであり、これまでの研究で*in vitro*において上記2つの遺伝子を強くノックダウンすることは確認している。

具体的な研究は以下の通りである。

肝臓に形成される腫瘍を標的とし、全身投与(尾静脈投与)でのC16-si27RNAのRNAi効果をIVISを用いて非侵襲的に評価した。肝臓への腫瘍形成は、ルシフェラーゼ遺伝子を恒常的に発現できる大腸癌細胞(HT29Luc)を用いた。この細胞は、門脈から移植後、数日で肝転移する。HT29Lucを門脈に移植し、数日後、VEGFまたは β -CAT遺伝子を標的としたC16-si27RNAと*in vivo*用導入剤との複合体を尾静脈より投与した。投与は72時間毎に3回行い、IVISを用いて全身のルシフェラーゼの発光を観察した。

2つの遺伝子を同時に標的とすることによる相乗的な抗腫瘍効果を検討するために、VEGF遺伝子および β -CAT遺伝子を標的とした2つのC16-si27RNAを併用した。細胞は上記同様HT29Luc細胞を用い、肝臓に形成された腫瘍に対して全身投与を行った。投与方法、スケジュールは上記同様である。IVISによるルシフェラーゼ発光を経時的に計測して腫瘍の増殖・進展・転移の有無を確認した。

4. 研究成果

本研究では、RNAi法の問題点を解決するためにC16-si27RNAを開発し、VEGFおよび β -CATをターゲットとした*in vivo*におけるRNAi効果を検討した。

まず、マウスでのC16-si27RNAの体内動態を検討した。蛍光ラベルしたC16-si27RNAを*in vivo*用遺伝子導入剤と共に尾静脈より導入し、経時的にIVISで観察した。その結果、インビボフェクトアミンとの複合体が顕著に肝臓に蓄積することを明らかにした。

つぎに*in vivo*におけるC16-si27RNAのRNAi効果を検討した。ルシフェラーゼ遺伝子を発現できる大腸癌由来の細胞(HT29Luc)を門脈から移植し、肝臓に形成された腫瘍を標的としてVEGFおよび β -CATをターゲットとしたC16-si27RNAを導入剤と共にマウス尾静脈から導入した。実験は1つの遺伝子をそれぞれ標的とした場合と2つの遺伝子を同時に標的とした場合の異なる2つの系で行った。その結果、C16-si27RNAは無処理群に比べ、肝臓に形成された腫瘍の増大を抑制した。また、その効果は、単独の遺伝子を標的とす

るよりも VEGF と β -CAT の 2 つの遺伝子を同時に標的とした方が強い抗腫瘍効果が確認できた (図 1)。

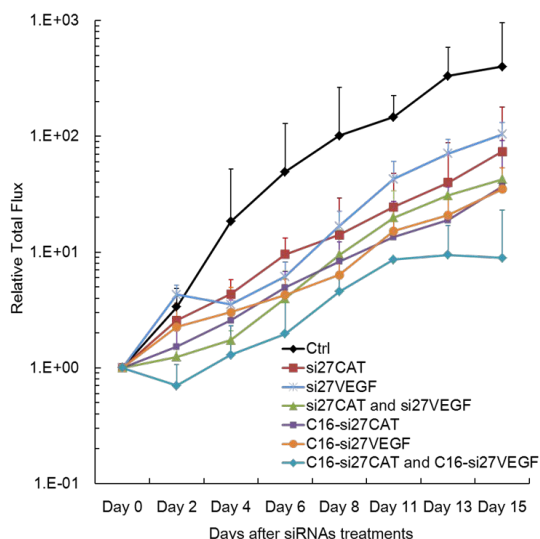


図 1. C16-si27RNAs の in vivo での RNA 干渉効果 (IVIS による経時的観察)

また、実験終了時(end-point 時)に解剖し肉眼で観察した結果、無処理群は肝臓での腫瘍増殖が確認されたのに対し、C16-si27RNA 処理群では腫瘍の増殖が抑制されていた。特に C16-si27CAT と C16-si27VEGF を併用したマウス群では著しく腫瘍増殖を抑制していた (図 2)。



図 2. C16-si27RNAs の抗腫瘍効果 (肝臓)

これらの結果は、C16-si27RNAs が in vivo でも強い RNA 干渉反応を発揮でき医療応用の可能性を広げるものである。

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 5 件)

1. Kubo T, Yanagihara K, Seyama T. In Vivo RNAi Efficacy of Palmitic Acid-Conjugated Dicer-Substrate siRNA in a Subcutaneous Tumor Mouse Model. *Chem Biol Drug Des*, (2016) in press. 査読有
DOI: 10.1111/cbdd.12720
2. Sato Y, Kubo T, Morimoto K, Yanagihara K,

Seyama T. High mannose-binding

Pseudomonas fluorescens lectin (PFL)

downregulates cell surface integrin/EGFR

and induces autophagy in gastric cancer

cells. *BMC cancer*, **16**, 63 (2016) 査読有

DOI: 10.1186/s12885-016-2099-2.

3. Sato Y, Morimoto K, Kubo T, Sakaguchi T, Nishizono A, Hirayama M, Hori K. Entry Inhibition of Influenza Viruses with High Mannose Binding Lectin ESA-2 from the Red Alga *Euchemum serra* through the Recognition of Viral Hemagglutinin. *Mar. Drugs*, **13**, 3454-3465 (2015) 査読有
DOI: 10.3390/md13063454
4. Tsuji T, Satoyoshi R, Aiba N, Kubo T, Yanagihara K, Maeda D, Goto A, Ishikawa K, Yashiro M, Tanaka M. Agr2 mediates paracrine effects on stromal fibroblasts that promote invasion by gastric signet-ring carcinoma cells. *Cancer Res.*, **75** 356-366 (2015) 査読有
DOI: 10.1158/0008-5472
5. Yanagihara K, Takigahira M, Kubo T, Ochiya T, Hamaguchi T, Matsumura Y. Marked antitumor effect of NK012, a SN-38-incorporating micelle formulation, in a newly developed mouse model of liver metastasis resulting from gastric cancer. *Ther. Deliv.*, **5** 129-138 (2014) 査読有
DOI: 10.4155/tde.13.143.

[学会発表](計 10 件)

1. 柳原五吉、久保貴紀、森本千恵、横崎 宏: 十二指腸神経内分泌がん由来悪液質誘発マウスモデルの樹立、第 74 回日本癌学会学術総会、10/8-10 (2015)、名古屋
2. 久保貴紀、瀬山敏雄: 脂肪酸結合型 siRNA の in vivo での遺伝子発現抑制効果について、日本核酸医薬学会第 1 回年会、11/30-12-2 (2015)、京都
3. 久保貴紀、奥野まや、四ヶ所悠紀、原田有希、森千花、瀬山敏雄: パルミチン酸修飾 DsiRNA の in vivo での遺伝子発現抑制効果、第 55 回 日本生化学会 中国・四

- 国支部例会、6/6-7 (2014)、愛媛
4. 奥野まや、原田有希、久保貴紀、近藤慎一、瀬山敏雄：ルシフェラーゼを発現する慢性骨髄性白血病細胞 (K562-Luc) に対する BCR/ABL 遺伝子を標的とした RNAi 効果について、第 55 回 日本生化学会 中国・四国支部例会、6/6-7 (2014)、愛媛
 5. 森千花、四ヶ所悠紀、久保貴紀、近藤慎一、瀬山敏雄：不飽和脂肪酸結合型 siRNA による効果的な遺伝子発現抑制効果、第 55 回 日本生化学会 中国・四国支部例会、6/6-7 (2014)、愛媛
 6. 久保貴紀、瀬山敏雄：脂肪酸結合型 siRNA の *in vivo* での遺伝子発現抑制効果について、アンチセンス・遺伝子・デリバリー シンポジウム 2014、9/8-9 (2014)、東京
 7. 原田有希、奥野まや、久保貴紀、近藤慎二、柳原五吉、瀬山敏雄：光イメージングを用いたがん悪液質誘導細胞 (Aku-NEC) に対する薬剤評価、第 53 回 日本薬学会中国四国支部学術大会、11/8-9(2014)、広島
 8. 四ヶ所悠紀、森千花、久保貴紀、近藤慎二、瀬山敏雄：強力な RNAi 効果を示す飽和脂肪酸結合型 siRNA、第 53 回 日本薬学会中国四国支部学術大会、11/8-9(2014)、広島
 9. 久保貴紀、奥野まや、原田有希、森千花、四ヶ所悠紀、瀬山敏雄：パルミチン酸結合型 siRNA の *in vivo* における遺伝子発現抑制効果、第 53 回 日本薬学会中国四国支部学術大会、11/8-9(2014)、広島
 10. 久保貴紀：核酸医薬としての脂肪酸修飾型 RNA 干渉分子の開発、第 132 回日本薬学会中国四国支部例会、1/10 (2015)、広島

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久保 貴紀 (KUBO, Takanori)
 安田女子大学 薬学部 薬学科 講師
 研究者番号：90435751

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：