

201239013A

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

microRNA阻害剤による骨肉腫がん幹細胞制御を基盤とした
新たな革新的がん治療の実用化を目指す前臨床試験に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川井 章

平成 25 (2013) 年 4 月

厚生労働科学研究費補助金
難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業

**microRNA阻害剤による骨肉腫がん幹細胞制御を基盤とした
新たな革新的がん治療の実用化を目指す前臨床試験に関する研究**

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 川井 章

平成 25 (2013) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告

- microRNA 阻害剤による骨肉腫がん幹細胞制御を基盤とした新たな革新的
がん治療の実用化を目指す前臨床試験に関する研究 ----- 1
川井章

II. 分担研究報告

1. microRNA 阻害剤による骨肉腫がん幹細胞制御を目的とした前臨床試験に
おける研究の総括 ----- 13
落谷孝広
2. S-TuD 製剤の大量合成プロトコールの開発に関する研究
骨肉腫における miR-133a の標的遺伝子の解析に関する研究 ----- 17
藤原智洋
3. microRNA 阻害剤 (Tough Decoy) の製剤開発および動物実験のデータ評価 ----- 21
伊庭英夫
4. イヌ骨肉腫症例に対する抗 miR-133a 核酸製剤 ----- 25
伊藤博
5. 骨肉腫臨床検体の解析に関する研究 ----- 29
尾崎敏文
6. 骨肉腫臨床検体の解析に関する研究 ----- 31
尾崎充彦
7. microRNA 阻害剤の製剤管理および有効性試験、安全性管理に関する研究 ----- 33
松田範昭

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 35

IV. 研究成果の刊行物 ----- 37

I. 総括研究報告

microRNA 阻害剤による骨肉腫がん幹細胞制御を基盤とした

新たな革新的がん治療の実用化を目指す前臨床試験

研究分担者 川井 章 国立がん研究センター中央病院骨軟部腫瘍科

研究要旨

がん組織内におけるがん幹細胞分画をいかにして制御するか、様々ながん種で研究開発が進んでいる。この10年来治療成績の改善がみられない骨肉腫においては特にその進展が期待されている。これまでに我々は骨肉腫がん幹細胞性質を規定する miR-133a を同定し、その機能阻害により薬剤抵抗性および浸潤能が抑制されることを見出してきた。microRNA 阻害においては locked nucleic acid (LNA) を用いてきたが、LNA よりも少量で効果を示す日本発新規 microRNA 阻害剤 Tough Decoy (TuD) を応用し、新規治療法創出を目的とした前臨床試験を開始した。

共同研究者の伊庭は、特定の miRNA を高い効率で阻害する RNA decoy 分子である S-TuD (synthetic TuD) を開発し、その阻害効率の最適化を行った。その結果1個の S-TuD に含まれる2つの MBS 間で多くの塩基対を形成すると阻害効率が低減するという基本原理が、幅広い miRNA に対する S-TuD の一般則として成立することが明らかとなった。

このアルゴリズムを用いて設計した S-TuD-miR-133a を用いて、落谷は細胞レベル及び動物個体レベルでの有効性を確認した。その結果、*in vitro* では S-TuD は LNA よりも高い阻害活性を有していることが明らかになり、腫瘍移植動物モデルにおいても S-TuD 投与により miR-133a の発現が腫瘍で強く抑制されたことから、*in vivo* 環境下においても高い miRNA 阻害活性を有していることが明らかになった。また、松田により S-TuD に対する DDS の必要性の有無をペプチドキャリア A6K を用いて検証され、その結果、S-TuD の臨床想定投与用量では S-TuD 単体でも顕著な効果を示すことを見出された。

この日本発の新規 microRNA 阻害剤である S-TuD の創薬開発を進めるため、藤原は、ジーンデザイン社と共同で S-TuD 大量合成プロトコールの基盤技術が確立した。まず 2'-O-メチル化修飾された長鎖1本鎖 RNA の大量合成方法の検討を行い、次に2本鎖形成試験を行った結果、望ましい2本鎖純度を得るために1本鎖 RNA 純度の向上が必要であることが明らかとなり、この規定を基に2本鎖化する条件が得られ大量生産を実施し、併せて規格試験設定の為に基礎条件を検討した。また、藤原・松田と新日本科学との共同でこの S-TuD の生体内安全性の評価試験が開始されている。

S-TuD による miR-133a 阻害効果を生体で評価するための予備的試験として、伊藤はイヌ骨肉腫自然発生モデルにおける LNA-antimiR-133a を用いた前臨床試験に着手した。これまでに投与が完遂した右前肢発生1例においては、抗 miR-133a 核酸製剤投与中、局所における腫瘍の増大が4カ月間もの長期にわたり認められず、続き肺転移も確認されなかった。その後、投与4か月目頃から局所腫瘍サイズが増大し、感染を契機に飼い主の希望により安楽死を選択したが、その時点においても肺転移は認められなかった。抗 miR-133a 核酸製剤の転移を抑制する効果が示唆されたが、より多くの症例での検討が必要であり、現在全国からの登録システムの推進を行っている。

最後に、骨肉腫がん幹細胞分画の悪性形質を制御する分子メカニズムを解明する目的で、藤原は骨肉腫における miR-133a の標的遺伝子の解析を行った。その結果、がん抑制性機能を含む複数の標的遺伝子が同定された。その複数の候補に対する siRNA を作成・導入し、がん幹細胞様性質制御の可否を検討した結果、個々の分子がそれぞれ薬剤耐性、浸潤性を制御することが明らかになった。従って、miR-133a による骨肉腫がん幹細胞分画の悪性形質制御には、複数のがん抑制性機能を有する標的遺伝子を介していることが分子生物学的に明らかになった。

この分子の臨床的背景を評価するため、川井は国立がん研究センター中央病院で採取された骨肉腫生検検体を用いて解析を行った。新鮮検体2例については、フローサイトメトリーの結果 CD133 高発現分画が10%未満の割合で存在し、CD133 高発現分画において miR-133a が高発現していることを確認した。また、2010年以前の35例の臨床検体において miR-133a 高値を示す症例および miR-133a の標的遺伝子発現が低値を示す症例が有意に予後不良であることが判明した。これらのデータから、miR-133a 阻害により、その標的遺伝子の発現上昇を介して、その治療効果が得られている可能性が示唆された。

A. 研究背景、目的 (背景)

本研究班は、平成23年度までにヒト骨肉腫細胞株におけるがん幹細胞分画を単離し、その悪性形質に関与するmicroRNAとしてmiR-133aを同定した。さらに、locked nucleic acid (LNA)によるmiR-133a機能阻害により、薬剤耐性や浸潤能などのがん幹細胞分画における悪性形成の制御を、in vitro、in vivoにおいて見出してきた。

LNAはリボ核酸の五炭糖の2'位と4'位とがメチレン架橋 (O-CH₂-架橋) され、コンフォメーションをN型となるように化学修飾することにより対象核酸分子とのハイブリダイゼーションが強化されている。既にデンマークのサンタリス・ファーマ社が慢性C型肝炎に対する治療薬として応用しており、同社はLNA誘導体を利用したmiR-122の阻害剤の投与によりC型肝炎ウイルスの増殖を抑制することに成功し、第II相臨床試験に入っている。しかし、LNA製品は海外に特許が認可されている。

一方、これまでに伊庭らは特定のmiRNAの配列を認識してその活性を阻害するDecoy RNA (TuD RNA; Tough Decoy RNA)を設計し、これをRNA polymerase IIIにより高レベル発現させるユニットを搭載したプラスミドベクターやレトロ/レンチウイルスベクターを開発してきた。TuD RNAは特徴的な二次構造を有していて、従来のDecoy RNAに比べて著しく高い阻害効果を発揮することから、miRNAを対象とした基礎研究において有用なツールとしてmiRNAの標的の決定、発癌活性の検定をはじめとした幅広い分野で広く使用されている。しかしTuD RNA発現ウイルスベクターを治療に直接使用するためには、遺伝子治療の必要があるが、残念なことにそれにはまだ課題が多いのが現状である。そこで我々はこの基盤技術の核酸医薬化を目指して、2本の2'-OME RNA核酸オリゴで構成される分子を合成しアニールすることにより、TuD RNAの二次構造を模した、S-TuD (Synthetic TuD)と呼ぶ分子を作製した。そして3種のmiRNAに対するS-TuDについて阻害効率の高い共通した設計法を開発して公表し (Haraguchi T, et al: Nucleic Acids Res 40:e58 2012), 日本特許

も取得している (登録番号第4936343号)。

このS-TuDは、in vitro環境下において、同濃度のLNAよりも高い阻害活性を有することが明らかになっている。しかし生体内での効果は未だ確認されておらず、そのための大量合成の手段も確立されていない。そこでジーンデザイン社と協同し、大量合成プロトコールの作成を開始した。S-TuDは2'-O-メチル化修飾された長鎖1本鎖RNA同士が、両端に相補鎖を形成し中央部に非相同領域を配位するユニークな2本鎖構造を有する。この構造体を大量合成するためには、従来の合成法で困難とされる長鎖1本鎖RNA大量合成方法の最適化、2本鎖化方法の最適化、さらには医薬品開発に必須である規格試験の確立が必要である。骨肉腫において、がん幹細胞マーカーにおける予後解析の報告は未だなされていない。

しかし、ヒト悪性腫瘍におけるがん幹細胞マーカー発現率と患者の予後との間に負の相関があることが報告されつつある。例えば、術後FOLFOX療法を施行したステージIV大腸癌において、CD133高発現症例は無増悪生存期間 (PFS) が有意に不良であることが示されている。また、別のコホートでは、大腸癌症例において、CD133、CD44、LGR5の発現がいずれも高い症例で最も予後不良であったと報告されている。

このような背景をもとに、伊庭は日本発のS-TuDの設計アルゴリズムの確立およびS-TuD-133aの設計を行った。そのS-TuD-133aを用いた骨肉腫におけるin vitroないしin vivo解析を落谷が開始した。また、藤原はS-TuD製剤の創薬開発を目的とした大量合成プロトコールの開発をジーンデザイン社と連携して行った。松田は藤原と連携し、S-TuD製剤の安全性試験を計画し新日本科学社と提携して評価を行った。また、落谷と連携し、S-TuDを動物で用いるにあたり、DDSの必要性の有無を検証した。伊藤はイヌ骨肉腫自然発生例を用いてmiR-133a阻害による生体内治療効果の検討を開始した。具体的には、イヌの長幹骨である四肢に発生した骨肉腫に対して抗miR-133a核酸製剤を投与し、腫瘍の増殖性および遠隔転移の有無を指標にその有効性を評価した。さらには、miR-133a

阻害による骨肉腫がん幹細胞性質の抑制の機序が分かっていないため、その分子機構を解析することを目的に、藤原は更なる *in vitro* 解析を行った。尾崎(岡山大学)、尾崎(鳥取大学)は、それぞれの施設から集められた多数のヒト骨肉腫臨床材料を用い、miR-133a およびその標的遺伝子の発現解析をおこなうことを目的とし、他施設における臨床材料の収集とRNA抽出ならびにコントロールとなるhouse keeping遺伝子の解析を開始した。川井はこれらの研究を総括し、同定した骨肉腫がん幹細胞分画を制御するmiR-133aの発現を解析し、本分子を制御することがどのように予後に関わってくるかを検討する目的で、国立がん研究センター中央病院で得られた臨床検体における発現解析を様々な手法を用いて実施した。

B. 研究方法

(1) S-TuD の開発ならびに S-TuD 製剤の *in vitro* における有効性

miR-21, miR-16, miR-200c に対する S-TuD の阻害効果は、Haraguchi T, et al: *Nucleic Acids Res* 40:e58 2012 に準拠して行なった。miR-199a-3p, -5p, miR-214 に対する S-TuD は、それぞれ対応する miRNA をレンチウイルスベクターで強制発現した HeLaS3 を、また miR-142-3p は、miR-142-3p を強制発現した HEK293T 細胞をもちいて assay した。luciferase gene の 3'-UTR 領域に対応する miRNA の完全相補配列を挿入した reporter plasmid を各種の投与量の S-TuD RNA と cotransfection して 48 時間後に、dual luciferase 法により定量を行った。

(2) S-TuD-antimiR-133a の骨肉腫に対する有効性評価

1) S-TuD の *in vitro* での有効性試験

新規 microRNA 阻害剤である S-TuD の *in vitro* での効果を検討するため、ヒト骨肉腫細胞株 143B 細胞へ導入試薬を用いて、miR-133a に対する LNA と S-TuD それぞれを、10, 1, 0.1 nM の濃度で導入した。導入後、2 日後に細胞から microRNA を回収し、qRT-PCR 法を用いて、miR-133a の発現量を検討した。

2) S-TuD の動物腫瘍モデルでの有効性試験

新規 microRNA 阻害剤である S-TuD の *in vivo* での効果を検討するため、ヒト骨肉腫細胞株 143B 細胞 1.5×10^6 個を BALB/cAJcl-nu/nu ノードマウス 雌 6 週齢に同所(右膝関節内)移植を行った。

(1) 腫瘍内発現の解析

移植後、3 週間経過したマウスに miR-133a に対する S-TuD をそれぞれ 0.1mg/kg, 1mg/kg, 10mg/kg の濃度で 1 回、静脈内投与を行った。投与後 24 時間後と 1 週間後に腫瘍から total RNA を抽出し、qRT-PCR 法を用いて miR-133a の発現量を検討した (n=3)。

(2) Preliminary の有効性実験

移植後、10 日間経過したマウスに miR-133a に対する S-TuD を、1mg/kg の濃度で 1 回、静脈内投与を行った。また、移植後 11 日目と 18 日目においてシスプラチンを 3.5mg/kg の濃度で腹腔内投与を行った。これらの投与は①コントロール (PBS) 群、②S-TuD 単独投与 (S-TuD+PBS) 群、③シスプラチン単独投与 (PBS+シスプラチン) 群、④S-TuD・シスプラチン併用投与群の 4 群に分けて行い、移植後 20 日目に腫瘍の大きさを計測した (n=10)。

(3) S-TuD 製剤の大量合成プロトコールの確立

2'-O-メチル化修飾された長鎖 1 本鎖 RNA の大量合成方法の検討を中容量の固相合成システムを用い行なった。得られた条件を基に約 10 倍スケールの固相合成システムを用い生産実施した。次に得られた 1 本鎖同士を用いて 2 本鎖化するための基本条件検討と判定方法の設定を行った。得られた条件を基に 2 本鎖化を実施し、必要とされる 2 本鎖純度に達するための諸条件を確認した。この規定を基に S-TuD の大量生産を実施し、併せて規格試験設定の為の基礎方法を検討した。

(4) S-TuD の安全性試験計画と DDS の検討

S-TuD のグラムオーダーでの大量合成は世界初であるが、他種核酸製剤の合成の実績があり、将来的に GMP での合成が対応可能な施設から選定する。GLP 動物試験に適した純度を 85%と定め、最終生成物がそれを満たすよう合成・精製プロセスを最適化した。S-TuD および LNA のラットでの単回投与毒性試験・血中動態試験を委託試

験施設にて実施し、今後の GLP 動物安全性試験の実施に最適な投与量を決定する。S-TuD の DDS としてペプチドキャリア A6K を検討し、マウスでの比較有効性試験によりその必要性や至適濃度を決定した。

(5) イヌ骨肉腫症例に対する抗 miR-133a 核酸製剤投与

イヌの四肢に発生した腫瘍で病理学的に骨肉腫と診断された症例で、抗がん剤投与、断脚および温存療法を希望する患犬を対象とする。

断脚および温存症例の腫瘍部に抗 miR-133a 核酸製剤 (LAN/S-TuD) を全身投与あるいは局注して、局所の腫瘍の抑制効果、肺転移の出現、増大にかかる期間 (PFS) で有効評価を検討する。

1.断脚例

1) 肺転移なし

評価：肺転移出現までの期間を評価

2) 肺転移有り

評価：肺転移の増大にかかる期間を評価
投与方法

- ① CDDP+LAN /S-TuD (全身) を拒否された場合
- ② カルボプラチン+LAN /S-TuD (全身) を拒否された場合
- ③ カルボプラチンのみ

*全身投与における LAN /S-TuD の安全性確認が行われてからとする。

2.温存例

評価：原発巣、肺転移 (無場合の場合は出現までの時間、有りの場合は腫瘍抑制効果)

3.投与方法

- ①CDDP+LAN/S-TuD (局所)
- ②CDDP+LAN/S-TuD (全身)
- ③カルボプラチン+LAN /S-TuD (局所)
- ④カルボプラチン+LAN /S-TuD (全身)
- ⑤カルボプラチンのみ

*全身投与における LAN /S-TuD の安全性確認が行われてからとする。

4.投与量

局所投与：

LNA:1mg/kg
S-TuD:0.1mg/kg

全身投与：

LNA:10mg/kg(or1mg/kg)

S-TuD:1mg/kg(or0.1mg)

5.検査

検査は治療前、1 カ月後、3 カ月後、6 カ月後、1 年後とする。なお、死亡時には、治療開始からの生存期間 (日) を記録し、入手可能であれば骨肉腫の検体を凍結する。

検査項目

- 1) 大きさ (横・奥行き・高さ)
- 2) 同一方向からの写真
- 3) 血液・生化学検査「ALP」
- 4) X-ray (胸部・局所)
- 5) CT(全身 or 胸部・局所)

(6) miR-133a の標的遺伝子の同定

miR-133a 導入骨肉腫 CD133 低発現細胞における miRNA-Argonaute-2 複合体に対する免疫沈降法から得られた cDNA を用いて標的遺伝子の網羅的解析を行った。その複数の候補に対する siRNA を作成・導入し、がん幹細胞様性質制御の可否を検討した。また、その 3'UTR における miR-133a 結合阻害効果をレポーターアッセイにより解析した。

(7) 多施設における骨肉腫臨床検体の収集と解析

岡山大学医学部において保管されている、ヒト骨肉腫原発巣切除組織のホルマリン固定・パラフィン包埋標本の検索を開始した。これまでに収集された標本のうち、1990年～2010年に手術を施行された標本 (90 例) からは、RNA 抽出を開始した。また、Real-time PCR に適したサンプルであるかを検討する目的で miR-103 および RUN6B 発現量を測定した。

同様に、鳥取大学医学部において保管されている、ヒト骨肉腫原発巣切除組織のホルマリン固定・パラフィン包埋標本の検索を開始した。これまでに収集された標本のうち、1996年～2008年に手術を施行された標本 (11 例) からは、すでに RNA 抽出を開始し、Real-time PCR に適したサンプルであるかを検討する目的で miR-103 発現量を測定した。

(8) 骨肉腫臨床検体における miR-133a お

よびその標的遺伝子の解析

CD133 高発現/低発現分画のそれぞれにおける miR-133a 発現を解析する目的で、2010 年以降に国立がん研究センター中央病院で得られた骨肉腫生検組織 2 例を single cell にコラーゲン処理を行い、フローサイトメトリーにより解析した。その高発現/低発現分画を分取し、RNA を抽出し、qRT-PCR にて miR-133a の発現を解析した。

また、miR-133a および miR-133a の標的遺伝子の発現解析を行う目的で、2010 年以前に国立がん研究センター中央病院で得られた骨肉腫 48 例のパラフィンブロックおよび 35 例の cDNA を解析した。パラフィンブロックからは RNA を抽出し miR-133a の qRT-PCR を行い、統計学的に予後解析を行った。また、cDNA を用いて miR-133a の標的遺伝子の発現解析を qRT-PCR により行い、統計学的に予後解析を行った。

(倫理面への配慮)

ヒト組織標本を用いた解析に関しては、当センター倫理審査委員会の承認を受けている (No.16-50 ゲノム・プロテオーム解析に基づく骨軟部腫瘍の分子病態把握とその臨床応用を目指す多施設共同研究)。

C. 研究結果

(1) S-TuD の開発ならびに S-TuD 製剤の *in vitro* における有効性

miR-21, miR-16, miR200c に対してそれぞれ MBS の少しずつ異なる S-TuD 分子を作製し、それらの培養細胞系に導入後阻害効果を dual luciferase 法により評価した。これらの結果を評価して、以下の一般則を抽出した。

一般に、より標的 miRNA との結合親和性が高い MBS 配列の方がより効果的であるが、S-TuD 分子内での MBS 間の結合が強い場合は S-TuD は効果が大きく減弱する。この際、S-TuD 内における RNA 構造の予測法として CentroidFold と呼ばれるアルゴリズムを使うと、阻害効果と 2 次構造予測に良い相関がえられた。すなわち 2 つの MBS 間で 8 塩基対までの形成は、S-TuD の活性に大きな影響は与えなかった。しかし 9 塩基対以上の形成は、著しく

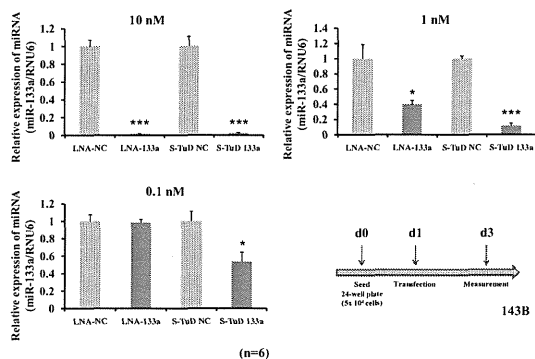
阻害活性を落とすので、標的 miRNA の 5' 端から 10 番目の塩基に対してのみミスマッチを導入した MBS を作製し、塩基対の数を下げることは極めて有効であった。また TuD では、天然の RNA であるため Ago2 による切断が大きくその活性を下げていたが、MBS 配列として標的の miRNA に完全相補な配列の 3' 端から 10 番目と 11 番目の間に 4nt 挿入した配列 (バルジ) を導入することによりこの問題を解決していた。今回 S-TuD に点変異の導入だけでは塩基対の軽減につながらない場合、このバルジ導入法も極めて有効であることが示された。

このような原理に基づく MBS 設計のアルゴリズムを作成し、それぞれ miR-199a-3p, -5p, miR-214、及び miR-142-3p の 4 種の S-TuD を設計しその阻害効率を評価したところ、いずれの場合にも 1nM 以下で、対応する miRNA の活性を完全に抑制しうることが証明された。また miR-133a に対する S-TuD も同じアルゴリズムで設計して、その評価は藤原博士にお願いし、極めて良好な阻害効果を検出している。

(2) S-TuD-antimiR-133a の骨肉腫に対する有効性評価

1) StuD の細胞での有効性

LNA と S-TuD はともに 10 nM の濃度では、miR-133a への発現が強く抑制されていた。しかし、1 nM の濃度では、S-TuD は約 9 割遺伝子発現を抑制しているのに対して、LNA は 6 割程度の抑制効果であった。さらに、0.1 nM の濃度においては、S-TuD は約 5 割の遺伝子発現抑制効果を示したのに対して、LNA は遺伝子抑制効果が観察されなかった。このことから、S-TuD は *in vitro* 環境下において、LNA よりも高い阻害活性を有していることがヒト骨肉腫細胞で明らかになった。



(1) 腫瘍内発現の解析

S-TuD 投与群では、0.1mg/kg、1mg/kg、10mg/kg の全ての濃度において、miR-133a の発現が強く抑制されていた。24 時間後の腫瘍において、1mg/kg の濃度では、S-TuD は約 8 割遺伝子発現を抑制し、さらにその効果は 1 週間後も持続されていた。このことから、S-TuD は *in vivo* 環境下において、高い miRNA 阻害活性を有していることがヒト骨肉腫細胞で明らかになった。

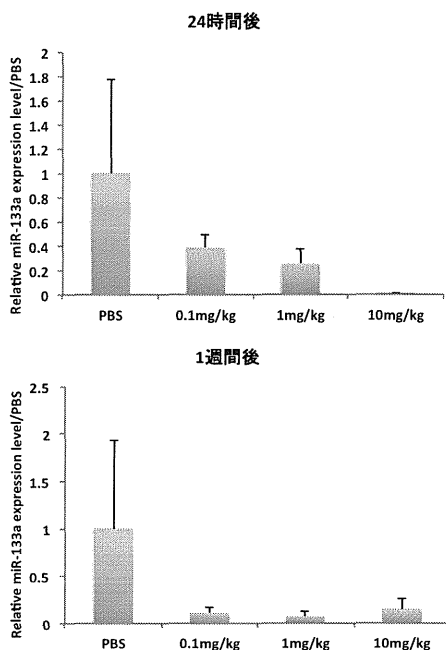


図2 S-TuD による腫瘍内 miR-133a の発現抑制効果

(2) Preliminary の有効性実験

コントロール群に比べ、S-TuD 単独投与群、シスプラチン単独投与群、S-TuD・シスプラチン併用投与群において、腫瘍の増殖抑制効果が示された。また S-TuD 単独投与群では 1.4 割程度の増殖抑制効果を示したのに対して、併用投与群では 2.8 割程度の抑制効果であった。このことから、miR-133a に対する

S-TuD は *in vivo* 環境下において、シスプラチンと併用して投与を行うことで高い腫瘍増殖抑制効果を示すことが明らかになった。

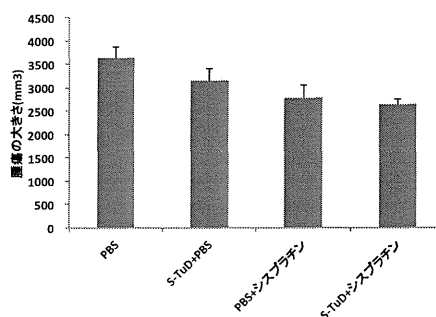


図3 S-TuD・シスプラチン併用投与による予備的検討

(3) S-TuD 製剤の大量合成プロトコールの確立

2'-O-メチル化修飾された長鎖 1 本鎖 RNA の合成及び精製について、基本的な方法を確立し、大量生産を実施した。得られた高純度 1 本鎖修飾 RNA 同士 2 本鎖化を行う際の条件検討及び、純度 85%以上の 2 本鎖を得られる条件を確立し、最終収量 1 グラムの S-TuD を得ることに成功した。

次に、創薬開発に向かうための規格試験設定を最終目標として、まず 2 本鎖化した S-TuD について、純度検定の方法を検討し、基礎条件を得るとともに、1 本鎖合成物の不純物について定性的解析を実施した。

(4) S-TuD の安全性試験計画と DDS の検討

S-TuD 並びに LNA の合成に関しては、条件を満たす施設として株式会社ジーンデザインを見出し、精製条件を最適化することで最終生成物の純度 85%を達成し、1g 程度の大量合成を実現した。S-TuD の単回投与毒性試験・血中動態試験については、委託試験施設での計画書を策定し、1.0~100 mg/kg の範囲で投与量を決定した。LNA の試験に関しても計画書を策定し、年度内に実施予定である。S-TuD と A6K の複合体を調製し、マウスでの比較有効性試験の結果、S-TuD の臨床想定投与用量では DDS 無しでも顕著な効果を確認した。

(5) イヌ骨肉腫症例に対する抗 miR-133a

核酸製剤投与

(症例)

患者名：T.G.

品種：ラブラドル・レトリバー

体重：27.6 kg

初診：24年6月

右前肢の橈骨部の腫脹、跛行を主訴として来院した。患部は硬固で骨からの腫脹（長径5cm）と思われた。飼い主は昨年23年11月頃に腫脹に気づいていたが、歩行に支障が認められなかった。近医で治療していたが24年4月頃に跛行が認められたことから当院へ来院した。

当院では、X-ray、血液検査、腫脹部のFNAを実施した。

X-ray 所見では、検査の結果、FNAでは紡錘形の大小不同の細胞、核小体明瞭、多核細胞および各分裂像（骨増生）の激しい細胞が確認された。X-ray 所見では肺転移は認められなかった。

治療：

メタカム

プレビコックス

鎮痛剤を主体とした治療を希望するが前肢の断脚および積極的な抗がん剤治療については否定された。

07.30 痛みは軽減されたせいかよく眠るようになった。腫瘍の大きさに変化は認められなかった。この時点での肺転移は認められなかった。

08.09 miRNA について飼い主に説明し治療の承諾を得た。投与後の抗がん剤治療も同意を得ることができた。

WBC 6.400

HCT 32.8%

ALP481

その他生化学検査値に異常は認められなかった。

カルボプラチン 50mg/m² (BW 28.35kg) 45mg/head

腫瘍のサイズ 長径 7.14 cm

LNA 投与量 2ml

08.27 症状、腫瘍のサイズは変化なし

LNA 投与量 1ml

血液検査値：異常所見なし

09.10 触診しても痛がらないし、気にする様子はない。X-ray 肺への転移は認められない。

10.01 特異所見なし

10.18 腫瘍増大（皮膚の壊死がみられる）。

11.29 腫瘍増大（皮膚潰瘍）

12.11 飼い主の希望により安楽死（肺への転移は認められない）。

(6) miR-133a の標的遺伝子の同定

標的遺伝子検索においては、miRNA-Argonaute-2 複合体に対する免疫沈降法から得られた cDNA の網羅的解析から、約 5,000 種類の候補遺伝子を得た。また、miR-133a を細胞内導入した骨肉腫細胞株から得られた cDNA の網羅的解析から、約 2,000 種類の候補遺伝子を得た。これらのデータおよび *in silico* で確認されている miR-133a の標的遺伝子から共通するものが 20 種類選出された。個々の遺伝子に対する siRNA を作成し、それぞれの発現抑制下に機能解析を行ったところ、SGMS2、UBA2、SNX30、ANXA2 が浸潤能を規定し、MAST4、DUSP11、ANXA2 が薬剤抵抗性を規定することが明らかとなった。

(7) 他施設における骨肉腫臨床検体の収集と解析

岡山大学ではこれまでにヒト骨肉腫切除標本のホルマリン固定・パラフィン包埋ブロック 16 例（2005-2010年）を集め、薄切および脱パラフィン後、常法にて RNA を抽出した。抽出した RNA 溶液の濃度は、100~475ng/μl であり、Real-time PCR にて miR-103 および RUN6B 発現量を測定した結果、いずれも miR-103 および RUN6B 発現を確認することができ、本研究をおこなうにあたり適したサンプルであることが確認できた。

また、鳥取大学ではこれまでにヒト骨肉腫切除標本のホルマリン固定・パラフィン包埋ブロック 11 例を集め、薄切および脱パラフィン後、常法にて RNA を抽出した。抽出した RNA 溶液の濃度は、3~250ng/μl であり、Real-time PCR にて miR-103 発現量を測定した結果、いずれも miR-103 発現を確認することができ、本研究をおこなうにあたり適したサンプルであることが確認できた。

(8) 骨肉腫臨床検体における miR-133a お

よびその標的遺伝子の解析

2010 年以降に国立がん研究センター中央病院で得られた骨肉腫生検組織 2 例を採取後 20 分以内にコラーゲン処理を開始し single cell に分解したのちフローサイトメトリーにより解析した結果、CD133 高発現細胞は生検組織内の約 10%未満の分画で存在した。さらに、CD133 高発現/低発現分画を sorting により分取し、RNA を抽出した。qRT-PCR にて miR-133a の発現を解析したところ、CD133 低発現分画に比べ CD133 高発現分画における miR-133a の発現は約 10 倍程度高値を示した。

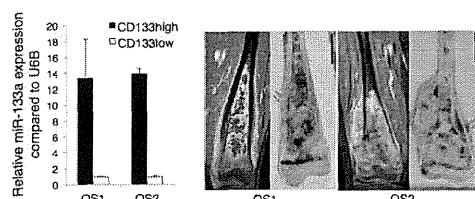


図 1. 2010 年以降に国立がん研究センター中央病院にて採取された骨肉腫生検検体による miR-133a の発現解析

また、2010 年以前の骨肉腫 48 例のパラフィンブロックを薄切および脱パラフィン後、常法にて RNA を抽出した。RUN6B で normalize した miR-133a の発現を qRT-PCR によって解析したところ、miR-133a 高値を示す集団において有意に予後不良であることが分かった。miR-133a 高値/低値の cut off 値は SPSS software を用いて AUC curve を描き、統計学的に算出した値を採用した。

同様に 2010 年以前の骨肉腫 35 例の cDNA を用い、 β -actin で normalize した miR-133a 標的遺伝子の発現を qRT-PCR によって解析した結果、SGMS2、UBA2、SNX30、MAST4、ANXA2 における発現高値が有意に予後良好と相関することが判明した。それぞれの標的遺伝子における発現高値/低値の cut off 値は、miR-133a と同様に、SPSS software を用いて AUC curve を描き、統計学的に算出した値を採用した。

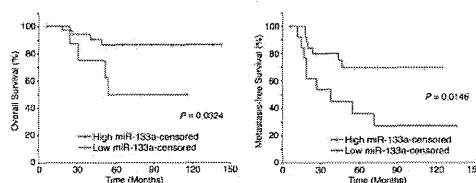


図 2. 1998-2010 年に国立がん研究センター中央病院にて採取された骨肉腫生検検体 48 例における miR-133a の発現と予後の解析

D. 考察

microRNA 阻害剤による骨肉腫がん幹細胞制御を基盤とした新たな革新的がん治療の実用化を目指す前臨床試験においては、S-TuD の適正配列考案、創薬化、安全性、有効性、miR-133a の有効性の分子機構、臨床側面との関連性、など、様々な課題が存在している。各分担研究者らによるこれらの研究結果から、平成 24 年度にあらかじめ想定していた計画課題は順調に解決され、次年度の課題に取りかかるための基盤作りが整った。

伊庭による研究で、ほぼ MBS 設計法については確定したと考えられ、ほぼすべての miRNA に対する良好な S-TuD が、このアルゴリズムを使って設計できること、miR-133a もその適用範囲にあることが実証された。伊庭は同時にパラメーター②③④についても、いくつかの miRNA に対する S-TuD を使って最適化を進めている。予備的には③が最も改良の余地があると考えられるので今後これに取り組みたいと考えている。

落谷により、ヒト骨肉腫細胞株 143B 細胞へ導入試薬を用いて、miR-133a に対する LNA と S-TuD それぞれを、10, 1, 0.1 nM の濃度で導入した結果、S-TuD は LNA よりも高い阻害活性を有していることが明らかになった。さらに、腫瘍移植動物モデルでは、S-TuD 投与群 0.1mg/kg、1mg/kg、10mg/kg の全ての濃度において、miR-133a の発現が腫瘍で強く抑制されていた。24 時間後の腫瘍において、1mg/kg の濃度では、S-TuD は約 8 割遺伝子発現を抑制し、さらにその効果は 1 週間後も持続されていた。以上の結果から、本前臨床試験で用いる予定の S-TuD は in vitro

及び *in vivo* において十分な阻害活性を有している事が証明された。

藤原の研究結果により、S-TuD の大量合成プロトコール確立及び規格試験設定の為の基礎データが得られ、日本発の新規 miRNA 阻害剤を用いた創薬開発の加速をもたらすと考えられた。S-TuD は 2 本鎖からなり、各鎖の純度を 97% 以上に精製を行うことで、最終生成物の純度が 85% 以上となることを見出した。本精製法は将来的な GMP 製造時にも適用可能であり、今後純度をさらに高めていく計画である。S-TuD の有効性試験の結果から、臨床想定投与用量は 1.0mg/kg 付近と見出され、その 100 倍量までの単回投与毒性試験・血中動態試験を実施したことで、来年度実施予定の GLP 安全性試験を計画できる。

松田・落谷の研究結果により、S-TuD と A6K の複合体によるマウス試験では、S-TuD 低用量にて microRNA 阻害効果の増強を認めたが、高用量では A6K の複合による顕著な増強はなく、臨床想定投与用量付近では S-TuD 単体にて生体内で十分機能することが示唆された。DDS の必要性について来年度さらに詳細に検証する。

イヌにおける四肢の骨肉腫の発生率は、悪性骨腫瘍の 80% 以上を占める。特に体重が 20 kg 異常になるとその発生率は増大する（大型犬種）。

発生年齢：中央値 8 歳（8 カ月～13 歳）
断脚後の骨肉腫の転移率は 98% で、最も多く認められるのは肺への転移である。

1) 断脚により治療した 65 頭の生存期間中央値 126 日

2) シスプラチン治療による生存期間の中央値は、6-13 ヶ月、1 年生存率 30-62%、2 年生存率 7-12% である。2 年生存率 7-21% である。

3) 手術後カルボプラチン (300mg/m²) では、生存期間中央値 10.5 カ月で術後 1 年生存 35% であった。

伊藤による今回の症例は前肢の異常に気づき開業医で治療するも改善が認められなかったことから 5 カ月目に東京農工大学センターの腫瘍科に紹介来院された。通常は異常（跛行、腫脹など）に気づいてから約 6 カ月目には殆どの症例で肺転移が認められる。しかし、症例は LNA 投与後、

局所における腫瘍の増大が 4 カ月間もの長期にわたり認められず NC 状態が続き肺転移も確認されなかった。その後、4 カ月目頃から急速に局所の腫瘍が増大し皮膚の壊死および潰瘍が認められてきた。局所は感染が生じ、液状部の腐敗臭が進んだことから飼い主の希望により安楽死を選択した。同院において治療後 6 カ月で安楽死に至ったが、肺等への遠隔転移は認められなかった。

藤原による miR-133a の標的遺伝子の解析においては、浸潤能や薬剤抵抗性の改善を規定する分子が明らかとなった。これらは、既に他のがん種においてがん抑制性に働いているものを含んでいる。miR-133a は骨肉腫がん幹細胞分画においてはがん促進性の機能を有していると考えられるため、このようながん抑制性分子ががん幹細胞分画において発現抑制されていることが悪性形質の発現に寄与していることが考えられた。逆に、miR-133a 阻害においては、これらががん抑制性分子が発現促進され、骨肉腫の悪性形質の抑制に寄与していることが考えられた。

鳥取大学医学部で収集された臨床検体（ホルマリン固定・パラフィン包埋標本）から抽出された RNA は、Real-time PCR にて miRNA 発現を測定する目的に適していることがわかった。今後は、さらに症例数を増やして RNA を抽出すると共に、miR-133a 発現量解析を開始することとした。本研究分担者は、既にヒト骨肉腫への miR-143 導入によりその細胞浸潤能が抑制され、動物モデルを用いた検討により、miR-143 全身投与によるヒト骨肉腫細胞の肺転移が抑制されることを報告している。したがって、ヒト骨肉腫細胞株のがん幹細胞分画で高発現している miR-133a 発現と、骨肉腫細胞の転移に関与する miR-143 との関係を探ることで、miR-133a の生物学的意義を明らかにできる可能性が示唆される。

岡山大学医学部で収集された臨床検体（ホルマリン固定・パラフィン包埋標本）から抽出された RNA は、Real-time PCR にて miRNA 発現を測定する目的に適していることがわかった。今後はさらに症例数を増やして RNA を抽出すると共に、miR-133a 発現量解析を開始する予定であ

る。

これらの施設で採取された臨床検体において miR-133a およびその標的遺伝子の相関関係を解析することで、国立がん研究センターで得られた臨床病理学的意義の普遍性を明らかにすることができる可能性が示唆される。

様々ながん種において、がん幹細胞の検索とその臨床病理学的意義が検討されている。骨肉腫における検討は未だ報告がなく、今回我々は骨肉腫がん幹細胞マーカーとその臨床病理学的解析を初めて検討した。川井による研究において骨肉腫細胞株における実験から得られた miR-133a が臨床検体にも同様の傾向で発現していることから、miR-133a 阻害により治療的効果が得られる可能性が示唆された。また、miR-133a 発現と予後との負の相関関係、miR-133a の標的遺伝子発現と予後との正の相関関係から、miR-133a 阻害により、その標的遺伝子の発現上昇を介して、その治療効果が得られている可能性が示唆された。

以上より、本年度の課題は計画通り遂行されたと考える。S-TuD の有効性試験、複数回投与の安全性試験、臨床検体による複数施設での解析を来年度の課題の主軸とする。ひきつづき各研究分担者におけるエフォートを継続していく。

E. 結論

microRNA 阻害剤による骨肉腫がん幹細胞制御を基盤とした新たな革新的がん治療の実用化を目指す前臨床試験という課題のもと、S-TuD の開発合成、大量合成プロトコルの確立、安全性試験の着手、in vitro 試験の着手、in vivo 試験の着手、DDS の検討、骨肉腫臨床検体における解析が予定通り行われた。特に、S-TuD-antimiR-133a の合成法の確立は世界初であり、創薬研究の大きな一歩であったと考える。また、miR-133a 標的遺伝子には骨肉腫の予後に関与する新たな分子が同定されており、本研究を通じて骨肉腫の新たな分子標的遺伝子が同定されたことも大きな成果であった。来年度もひきつづき、各課題に対するエフォートを行っていく。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. 藤原智洋、川井章、小坂展慶、尾崎敏文、落谷孝広：骨肉腫における microRNA の最新の知見と臨床応用への挑戦、癌と化学療法、2013 年 3 月号、癌と化学療法社、*In Press*
2. Tomohiro Fujiwara, Akira Kawai, Akihiko Yoshida, Toshifumi Ozaki, and Takahiro Ochiya. Cancer Stem Cells of Sarcoma. Role of Cancer Stem Cells in Cancer Biology and Therapy. Eds. Thomas Dittmar, Enrico Mihich, Kurt S. Zänker. SCIENCE PUBLISHERS. ENFIELD, NEW HAMPSHIRE, USA. *In Press*
3. Mutsumi Hosako, Taika Muto, Yukiko Nakamura, Koji Tsuta, Naobumi Tochigi, Hitoshi Tsuda, Hisao Asamura, Takeshi Tomonaga, Akira Kawai, Tadashi Kondo
Proteomic study of malignant pleural mesothelioma by laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis identified cathepsin D as a novel candidate for a differential diagnosis biomarker.
Journal of Proteomics 75: 833-844, 2012
4. Kazutaka Kikuta, Daisuke Kubota, Tsuyoshi Saito, Hajime Orita, Akihiko Yoshida, Hitoshi Tsuda, Yoshiyuki Suehara, Hitoshi Katai, Yasuhiro Shimada, Yoshiaki Toyama, Koichi Sato, Takashi Yao, Kazuo Kaneko, Yasuo Beppu, Yasufumi Murakami, Akira Kawai, Tadashi Kondo
Clinical proteomics identified ATP-dependent RNA helicase DDX39 as a novel biomarker to predict poor prognosis of patients with gastrointestinal stromal tumor.
Journal of Proteomics 75: 1089-1098, 2012
5. Daisuke Kubota, Taketo Okubo, Tsuyoshi Saito, Yoshiyuki Suehara, Akihiko Yoshida, Kazutaka Kikuta, Hitoshi Tsuda, Hitoshi Katai, Yasuhiro Shimada, Kazuo Kaneko, Akira Kawai, Tadashi Kondo.

- Validation study on Pletin and ATP-dependent RNA helicase DDX39 as prognostic biomarkers in gastrointestinal stromal tumour. *Jpn J Clin Oncol* 42: 730-741, 2012
6. Koichi Ogura, Akira Kawai, et al. Alveolar Soft Part Sarcoma: A single-center 26 patient case series and review of the literature. *Sarcoma* Epub 2012 May 15
 7. Koichi Ogura, Tomohiro Fujiwara, Yasuo Beppu, Hirokazu Chuman, Akihiko Yoshida, Hirotaka Kawano, Akira Kawai Extraskelatal myxoid chondrosarcoma: a review of 23 patients treated at a single referral center with long-term follow-up *Arch Orthop Trauma Surg* 132: 1379-1386, 2012
 8. shizaka, A., Mizutani, T., Kobayashi, K., Tando, T., Sakurai, K., Fujiwara T., and Iba H. Double plant homeodomain (PHD) finger proteins DP3a and -3b are required as transcriptional co-activators in SWI/SNF complex-dependent activation of NF- κ B RelA/p50 heterodimer. *J. Biol. Chem.* 287:11924-11933, 2012.
 9. Kurashima, Y., Amiya T., Nochi T., Fujisawa K., Haraguchi T., Iba H., Tsutsui H., Sato S., Nakajima S., Iijima H., Kubo M., Kunisawa, J., and Kiyono H. Extracellular ATP mediates mast cell-dependent intestinal inflammation through P2X7 purinoceptors. *Nature Communications* 3:1034, 2012.
 10. Tagawa, T., Haraguchi, T., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Sakurai, K., Inada, K., and Iba H. Multiple microRNAs induced by Cdx1 suppress Cdx2 in human colorectal tumor cells. *Biochem. J.* 447:449-455, 2012.
 11. 原口健、伊庭英夫: 2'-OME RNA オリゴを基盤とした独特の二次構造を持つ新規 microRNA 阻害剤、S-TuD. *遺伝子医学 MOOK* 23:169-175, 2012.
 12. Kobayashi S, Yamada-Okabe H, Suzuki M, Natori O, Kato A, Matsubara K, Jau Chen Y, Yamazaki M, Funahashi S, Yoshida K, Hashimoto E, Watanabe Y, Mutoh H, Ashihara M, Kato C, Watanabe T, Yoshikubo T, Tamaoki N, Ochiya T. Kuroda M, Levine AJ, Yamazaki T. LGR5-positive colon cancer stem cells interconvert with drug-resistant LGR5-negative cells and are capable of tumor reconstitution. *Stem Cells*, 30:2631-2644, 2012
 13. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Hagiwara K, Takeshita F, Ochiya T. Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs. *J Biol Chem*, 287:1397-1405, 2012
 14. Hagiwara K, Kosaka N, Yoshioka Y, Takahashi RU, Takeshita F, Ochiya T. Stilbene derivatives promote Ago2-dependent tumour-suppressive microRNA activity. *Sci Rep*, 2:314, 2012
 15. Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T., Kato T. Micromanaging iron homeostasis - Hypoxia-inducible micro-RNA-210 suppresses iron homeostasis-related proteins. *J Biol Chem*, 287:34110-34119, 2012
- ## 2. 学会発表
1. Tomohiro Fujiwara, Nobuyoshi Kosaka, Ryo-u Takahashi, Yusuke Yoshioka, Keitaro Hagiwara, Fumitaka Takeshita, Daisuke Kubota, Tadashi Kondo, Akira Kawai, Toshifumi Ozaki, Takahiro Ochiya : RNA-I THERAPEUTICS AS A NOVEL STRATEGY AGAINST TUMOR-INITIATING POPULATION OF OSTEOSARCOMA; MICRORNA INHIBITION IN COMBINATION WITH CURRENT CHEMOTHERAPY, 2012年11月, 17th Connective Tissue Oncology Society, Prague
 2. 藤原智洋、高橋陵宇、小坂展慶、竹下文隆、川井章、尾崎敏文、落谷孝広 : 新規 microRNA 阻害剤による骨肉腫に対する前臨床試験 2012年10月第27回日本整形外科学会基礎学術集会、名古屋
 3. Tomohiro Fujiwara, Nobuyoshi Kosaka, Ryo-u Takahashi, Yusuke Yoshioka, Keitaro Hagiwara, Fumitaka Takeshita, Daisuke Kubota, Tadashi Kondo, Akira Kawai, Toshifumi Ozaki, Takahiro Ochiya : A Novel Therapeutic Strategy against Tumor Initiating Cells of Osteosarcoma; microRNA Inhibition with the Combination of Current Chemotherapy 2012年9月 第71回日

- 本癌学会日本癌学会学術総会、札幌
4. 藤原智洋、高橋陵宇、小坂展慶、竹下文隆、川井章、尾崎敏文、落谷孝広：RNA 干渉による原発性および転移性骨腫瘍の制御 2012年7月 第30回日本骨代謝学会学術集会、東京
 5. 藤原智洋、高橋陵宇、小坂展慶、竹下文隆、川井章、尾崎敏文、落谷孝広：RNA 干渉による骨肉腫の幹細胞性の制御 2012年7月 第45回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、東京
 6. 原口 健、上野 義仁、伊庭英夫 独自の二次構造を持つ 2'-OME RNA オリゴを基盤とした microRNA 阻害剤「S-TuD」 第12回分子複合医薬研究会、大阪、2011年11月12日
 7. 原口 健、上野 義仁、伊庭英夫 独自の二次構造を持つ 2'-OME RNA オリゴ新規 microRNA 阻害剤「S-TuD」 第28回日本 DDS 学会学術集会、札幌、2012年7月5日
 8. Iba H., Sakurai, K., Kobayashi, K., Haraguchi, T. SWI/SNF complex catalytic subunit, Brm, as a key epigenetical regulator in cancer cells. The 71st Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (第71回日本癌学会学術総会),札幌, 2012年9月19日 (シンポジウム)
 9. Iba H., Sakurai, K., Kobayashi, K., Chang J. and Haraguchi, T. Molecular switches formed by miR-199a and Brm, a catalytic subunit of SWI/SNF chromatin remodeling factor, determine inflammation status in cancer cells

Homeostatic Inflammation Symposium (IEIIS 2012) October 24 Tokyo.
 10. 尾崎充彦、岡田 太：ヒト骨肉腫細胞の肺転移は、miR-143 発現低下による PAI-1 および MMP13 発現量増加が関与する 第21回日本がん転移学会学術集会・総会、2012年7月12-13日、広島
 11. 尾崎充彦、平畑美緒、田中宏樹、押村光雄、岡田 太：ヒト骨肉腫細胞に対する miR-143 導入効果とその標的遺伝子の siRNA 導入効果の比較検討 第4回日本 RNAi 研究会、2012年8月30日-9月1日、広島
 12. 尾崎充彦、平畑美緒、落谷孝広、田中宏樹、井藤久雄、岡田 太、押村光雄：miR-143 標的遺伝子である PAI-1 と MMP13 はヒト骨肉腫細胞の肺転移を制御する 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19-21日、札幌
 13. 平畑美緒、尾崎充彦、押村光雄、岡田太：miR-143 標的遺伝子である PAI-1 と MMP13 はヒト骨肉腫細胞の肺転移を制御する 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11-14日、福岡
 14. 尾崎敏文、岡田恭司、川井章、石井猛、西田佳弘、平賀博明、松本誠一、田仲和宏、生越章、荒木信人 日常診療に生かす軟部腫瘍診療ガイドライン 第85回日本整形外科学会学術総会 2012年5月17-20日、京都市
 15. 国定俊之、武田健、井谷智、長谷井嬢、杉原進介、尾崎敏文 体幹部発生軟部肉腫の治療戦略 第45回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会 2012年7月14-15日、東京都
 16. 武田健、国定俊之、井谷智、長谷井嬢、井上円加、尾崎敏文 不適切切除された軟部肉腫に対する追加切除の治療成績 第45回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会 2012年7月14-15日、東京都
- G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
 - 1) 米国特許出願 61/696981, MicroRNA-based methods and Assays for Osteosarcoma, 2012.9.5 (出願中)
 - 2) 国際特許出願 PCT/IB2012/002626, MICRORNA-BASED METHODS AND ASSAYS FOR OSTEOSARCOMA, 2012.9.7 (出願中)
 2. 実用新案登録
特になし。
 3. その他
特になし。

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

microRNA 阻害剤による骨肉腫がん幹細胞制御を目的とした前臨床試験における研究の総括

研究分担者 落谷孝広 国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野 分野長

研究要旨

日本発の新規 microRNA 阻害剤である S-TuD の前臨床研究を進めるため、S-TuD の細胞レベル、及び動物個体レベルでの有効性を確認することを初年度の目的とした。まずヒト骨肉腫細胞株 143B 細胞へ導入試薬を用いて、miR-133a に対する LNA と S-TuD それぞれを、10, 1, 0.1 nM の濃度で導入した結果、S-TuD は LNA よりも高い阻害活性を有していることが明らかになった。さらに、腫瘍移植動物モデルでは、S-TuD 投与群 0.1mg/kg、1mg/kg、10mg/kg の全ての濃度において、miR-133a の発現が腫瘍で強く抑制されていた。24 時間後の腫瘍において、1mg/kg の濃度では、S-TuD は約 8 割遺伝子発現を抑制し、さらにその効果は 1 週間後も持続されていたことから、S-TuD は *in vivo* 環境下において、高い miRNA 阻害活性を有していることがヒト骨肉腫細胞で明らかになった。

A. 研究背景、目的

(背景)

本研究班は、平成23年度までにヒト骨肉腫細胞株におけるがん幹細胞分画を単離し、その悪性形質に関与する microRNA として miR-133a を同定した。さらに、locked nucleic acid (LNA) による miR-133a 機能阻害により、薬剤耐性や浸潤能などのがん幹細胞分画における悪性形成の制御を、*in vitro*、*in vivo* において見出してきた。

本研究の目的は、この「がん幹細胞」の重要分子である miR-133a を阻害剤により機能制御し骨肉腫の治療抵抗性を改善させることを、マウスやイヌを用いた更なる前臨床試験において確認すること、またその薬理的解析を推進し、臨床における新たながん治療法の創出に繋げることである。臨床応用に向け、平成24年度はこれまでの解析で用いた microRNA 阻害剤の一つである locked nucleic acid (LNA) の生体内治療効果のエビデンスをさらに多くの動物固体モデルで確認するだけでなく、新規 microRNA 阻害剤の一つである Tough Decoy (TuD) における効果も東京大学医科学研究所と連携の上で確認することである。

B. 研究方法

1) S-TuD の *in vitro* での有効性試験

新規 microRNA 阻害剤である S-TuD の *in vitro* での効果を検討するため、ヒト骨肉腫

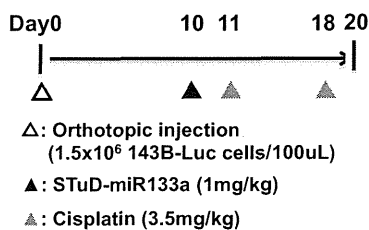
細胞株 143B 細胞へ導入試薬を用いて、miR-133a に対する LNA と S-TuD それぞれを、10, 1, 0.1 nM の濃度で導入した。導入後、2 日後に細胞から microRNA を回収し、qRT-PCR 法を用いて、miR-133a の発現量を検討した。2) S-TuD の動物腫瘍モデルでの有効性試験 新規 microRNA 阻害剤である S-TuD の *in vivo* での効果を検討するため、ヒト骨肉腫細胞株 143B 細胞 1.5×10^6 個を BALB/cAJcl-nu/nu スードマウス 雌 6 週齢に同所（右膝関節内）移植を行った。

(1) 腫瘍内発現の解析

移植後、3 週間経過したマウスに miR-133a に対する S-TuD をそれぞれ 0.1mg/kg、1mg/kg、10mg/kg の濃度で 1 回、静脈内投与を行った。投与後 24 時間後と 1 週間後に腫瘍から total RNA を抽出し、qRT-PCR 法を用いて miR-133a の発現量を検討した (n=3)。

(2) Preliminary の有効性実験

移植後、10 日間経過したマウスに miR-133a に対する S-TuD を、1mg/kg の濃度で 1 回、静脈内投与を行った。また、移植後 11 日目と 18 日目においてシスプラチンを 3.5mg/kg の濃度で腹腔内投与を行った。これらの投与は ①コントロール (PBS) 群、②S-TuD 単独投与 (S-TuD+PBS) 群、③シスプラチン単独投与 (PBS+シスプラチン) 群、④S-TuD・シスプラチン併用投与群の 4 群に分けて行い、移植後 20 日目に腫瘍の大きさを計測した (n=10)。



(倫理面への配慮)

本研究においては動物実験およびヒト検体を用いた解析を行っておらず、倫理審査対象とはなっていない。

C. 研究結果

1) StuD の細胞での有効性

LNA と S-TuD はともに 10 nM の濃度では、miR-133a への発現が強く抑制されていた。しかし、1 nM の濃度では、S-TuD は約 9 割遺伝子発現を抑制しているのに対して、LNA は 6 割程度の抑制効果であった。さらに、0.1 nM の濃度においては、S-TuD は約 5 割の遺伝子発現抑制効果を示したのに対して、LNA は遺伝子抑制効果が観察されなかった。このことから、S-TuD は *in vitro* 環境下において、LNA よりも高い阻害活性を有していることがヒト骨肉腫細胞で明らかになった。

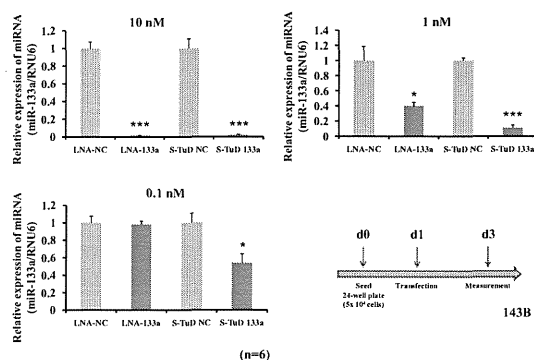


図1 S-TuD の *in vitro* での有効性試験

(1) 腫瘍内発現の解析

S-TuD 投与群では、0.1 mg/kg、1 mg/kg、10 mg/kg の全ての濃度において、miR-133a の発現が強く抑制されていた。24 時間後の腫瘍において、1 mg/kg の濃度では、S-TuD は約 8 割遺伝子発現を抑制し、さらにその効果は 1 週間後も持続されていた。このことから、S-TuD は *in vivo* 環境下において、高い miRNA 阻害活性を

有していることがヒト骨肉腫細胞で明らかになった。

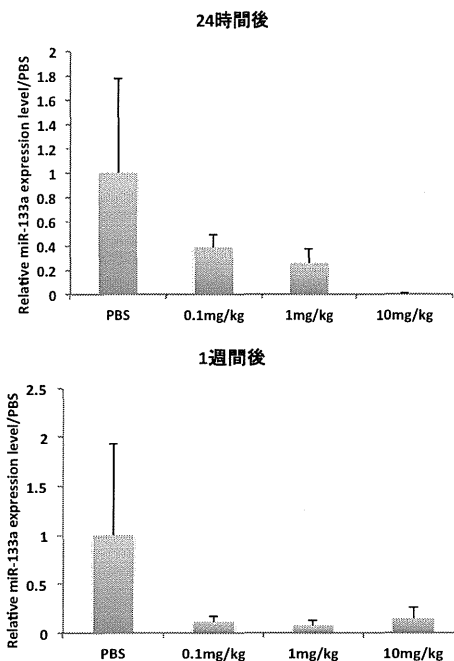


図2 S-TuD による腫瘍内 miR-133a の発現抑制効果

(2) Preliminary の有効性実験

コントロール群に比べ、S-TuD 単独投与群、シスプラチン単独投与群、S-TuD・シスプラチン併用投与群において、腫瘍の増殖抑制効果が示された。また S-TuD 単独投与群では 1.4 割程度の増殖抑制効果を示したのに対して、併用投与群では 2.8 割程度の抑制効果であった。このことから、miR-133a に対する S-TuD は *in vivo* 環境下において、シスプラチンと併用して投与を行うことで高い腫瘍増殖抑制効果を示すことが明らかになった。

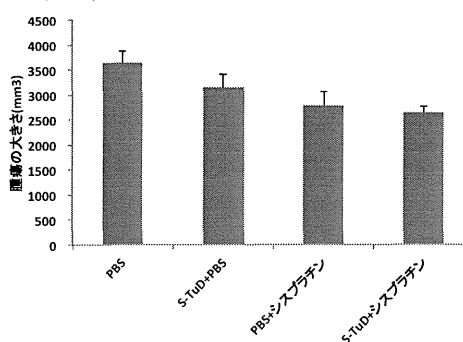


図3 S-TuD・シスプラチン併用投与による予備的検討

D. 考察

ヒト骨肉腫細胞株 143B 細胞へ導入試薬を用いて、miR-133a に対する LNA と S-TuD それぞれを、10, 1, 0.1 nM の濃度で導入した結果、S-TuD は LNA よりも高い阻害活性を有していることが明らかになった。さらに、腫瘍移植動物モデルでは、S-TuD 投与群 0.1mg/kg、1mg/kg、10mg/kg の全ての濃度において、miR-133a の発現が腫瘍で強く抑制されていた。24 時間後の腫瘍において、1mg/kg の濃度では、S-TuD は約 8 割遺伝子発現を抑制し、さらにその効果は 1 週間後も持続されていた。以上の結果から、本前臨床試験で用いる予定の S-TuD は in vitro および in vivo において十分な阻害活性を有している事が証明された。

E. 結論

本研究の結果、miR-133a 発現阻害による骨肉腫がん幹細胞形質の抑制の基盤となる核酸医薬が確定した。今後、この S-TuD の安全性および毒性試験を PMDA の指示に従って、外部第三者機関にて執り行う準備を開始する。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kobayashi S, Yamada-Okabe H, Suzuki M, Natori O, Kato A, Matsubara K, Jau Chen Y, Yamazaki M, Funahashi S, Yoshida K, Hashimoto E, Watanabe Y, Mutoh H, Ashihara M, Kato C, Watanabe T, Yoshikubo T, Tamaoki N, Ochiya T, Kuroda M, Levine AJ, Yamazaki T. LGR5-positive colon cancer stem cells interconvert with drug-resistant LGR5-negative cells and are capable of tumor reconstitution. *Stem Cells*, 30:2631-2644, 2012
2. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Hagiwara K, Takeshita F, Ochiya T. Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs. *J Biol Chem*, 287:1397-1405, 2012
3. Hagiwara K, Kosaka N, Yoshioka Y, Takahashi RU, Takeshita F, Ochiya T. Stilbene derivatives promote Ago2-dependent tumour-suppressive microRNA activity. *Sci Rep*, 2:314, 2012
4. Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, Kato T.

Micromanaging iron homeostasis - Hypoxia-inducible micro-RNA-210 suppresses iron homeostasis-related proteins. *J Biol Chem*, 287:34110-34119, 2012

2. 学会発表

17. Tomohiro Fujiwara, Nobuyoshi Kosaka, Ryo-u Takahashi, Yusuke Yoshioka, Keitaro Hagiwara, Fumitaka Takeshita, Daisuke Kubota, Tadashi Kondo, Akira Kawai, Toshifumi Ozaki, Takahiro Ochiya: RNA-I THERAPEUTICS AS A NOVEL STRATEGY AGAINST TUMOR-INITIATING POPULATION OF OSTEOSARCOMA; MICRORNA INHIBITION IN COMBINATION WITH CURRENT CHEMOTHERAPY, 2012 年 11 月, 17th Connective Tissue Oncology Society, Prague
18. 藤原智洋、高橋陵宇、小坂展慶、竹下文隆、川井章、尾崎敏文、落谷孝広: 新規 microRNA 阻害剤による骨肉腫に対する前臨床試験 2012 年 10 月 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、名古屋
19. Tomohiro Fujiwara, Nobuyoshi Kosaka, Ryo-u Takahashi, Yusuke Yoshioka, Keitaro Hagiwara, Fumitaka Takeshita, Daisuke Kubota, Tadashi Kondo, Akira Kawai, Toshifumi Ozaki, Takahiro Ochiya: A Novel Therapeutic Strategy against Tumor Initiating Cells of Osteosarcoma; microRNA Inhibition with the Combination of Current Chemotherapy 2012 年 9 月 第 71 回日本癌学会日本癌学会学術総会、札幌
20. 藤原智洋、高橋陵宇、小坂展慶、竹下文隆、川井章、尾崎敏文、落谷孝広: RNA 干渉による原発性および転移性骨腫瘍の制御 2012 年 7 月 第 30 回日本骨代謝学会学術集会、東京
21. 藤原智洋、高橋陵宇、小坂展慶、竹下文隆、川井章、尾崎敏文、落谷孝広: RNA 干渉による骨肉腫の幹細胞性の制御 2012 年 7 月 第 45 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会、東京