

2014/1036B

厚生労働科学研究費補助金
がん対策推進総合研究事業（革新的がん医療実用化研究事業）

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24～26年度 総合研究報告書

研究代表者 川井 章

平成27（2015）年 4月

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

研究代表者 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 数年治療成績の改善をみない骨肉腫に対する新規治療法として、我々は現行標準治療に locked nucleic acid (LNA)による miR-133a 阻害を併用した治療を開発し、非臨床におけるその有効性を平成 23 年度までに見出してきた。本研究班は、LNA よりも少量で効果を示す日本発新規 microRNA (miRNA) 阻害剤 Synthetic Tough Decoy (S-TuD)を導入した前臨床試験を平成 24 年度より開始した。本研究報告書は 3 年間の研究結果を総括するものである。

特定の miRNA を高い効率で阻害する RNA decoy 分子である S-TuD は伊庭らにより開発された。平成 24 年度には、その阻害効率の最適化を行い、1個の S-TuD に含まれる2つの MBS(microRNA binding site)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。平成 25 年度には、阻害効率を最適化した S-TuD を合成することを目標にまだ確定していない S-TuD RNA 構造の諸パラメーターを検討した。その結果、Stem2 の鎖長が 10~14 塩基対で、ほぼ同等の高い阻害効率を示した。合成修飾 RNA の収率、純度から考えると合成鎖長は短ければ短いほど有利であることから、その後は Stem2 の長さは 10 塩基対に固定することとした。平成 26 年度は、薬物動態を解析するために real-time RT-PCR 法を用いた S-TuD の超微量検出法の開発を行い、これを確立した。また種々の S-TuD の導入が interferon などの免疫反応を一切誘導しないことが示された。さらに、S-TuD の血清中での安定性の評価を行い、マウス血清やヒト血清内で極めて安定であることが確認された。

日本発新規 miRNA 阻害剤 S-TuD の創薬開発を進めるため、川井・藤原・松田らはジーンデザイン社と協同で合成プロトコルを開発した。平成 24 年度には、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。その結果、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た。平成 25 年度には、初期検討した長鎖 1 本鎖 RNA の大量合成方法の最適化を検討し、これまでよりも高収率で合成品を得ることに成功した。次に合成した 1 本鎖 RNA による 2 本鎖形成試験を行った結果、望ましい 2 本鎖純度が得られた。また医薬品開発に必要な規格試験についてもクリアし、治験薬製造が可能な状況を実現した。平成 26 年度には、長鎖 1 本鎖 RNA の大量合成方法のさらなる最適化を検討した結果、これまでよりも少ない精製回数で効率的に合成品を得ることに成功した。さらに医薬品開発に必要な安定性試験についても実施し、治験薬製造が可能な状況を実現した。

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・根津・藤原らは、平成 24 年度に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示し、in vivo 環境下においても腫瘍組織に対する高い miRNA 阻害活性を示すことが明らかになった。また、藤原・松田らは S-TuD に対する DDS(ペプチドキャリア A6K)の必要性の有無を検証し、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した。平成 25 年度には、S-TuD-133a の骨肉腫に対する抗腫瘍効果を in vitro および in vivo で解析した。その結果、negative control(S-TuD-NC)群と比較して S-TuD-133a 群で浸潤能の有意な低下を認め、LNA と同様の効果が確認された。一方、マウスを用いた有効性試験においては、S-TuD-NC と S-TuD-133a との間に移植原発巣の腫瘍サイズの有意差はみられなかったが肺転移形成を抑制することが明らかとなり、S-TuD-133a とシスプラチン併用群において担癌マウスの生存期間の延長が観察された。平成 26 年度には、松田らにより S-TuD-133a の動物モデルにおける有効性と安全性の検証が継続されている。腫瘍切除モデルにおいて、S-TuD-133a および S-TuD-100 などの単独および併用による転移抑制効果、延命効果を検証し、現在治療後経過観察中である。

S-TuD 製剤の生体内安全性試験は、平成 24 年度から平成 25 年度にかけて松田らにより行われた。ラットに対する単回投与安全性試験の結果、S-TuD 単独での毒性は見られず、シスプラチンと S-TuD 併用投与による毒性の増強もみられなかった。骨肉腫の悪性形質と密接に関与する miRNA-133a と並んで重要である miRNA-100 についても、臨床時に想定される妥当な投与量における十分な安全性が確認された。4 週間反復投与においても、S-TuD 単独での毒性は見られず、シスプラチンと S-TuD 併用投与による毒性の増強はみられなかった。平成 25 年度には、伊藤らによりイヌに対する安全性試験も行われた。4 頭のビーグル犬を用いて S-TuD

を高濃度に投与した結果、臨床症状、血液検査値および病理組織学的検査に明らかな異常は認められず、極めて安全域の広い薬剤であることが判明した。

S-TuD-133a のイヌ自然発生骨肉腫症例に対する生体内有効性試験は、伊藤らを中心に行われた。伊藤らは平成24年度に全国からの症例の登録システムを構築し、これまでに9例の症例におけるS-TuDの臨床的な有効性が評価されている。これまでのところ、四肢に発症した骨肉腫症例に対し、抗がん剤単独治療に比較して併用治療における肺転移の抑制効果が認められている。イヌ骨肉腫の1年生存率は30-60%と報告されており、現時点では断脚後経過観察期間が1年未満の症例がほとんどであるが、さらなる経過観察を継続することで、その有効性が明らかとなる。この有効性試験に附随し、落谷、根津らは、イヌ自然発生骨肉腫における血清および腫瘍組織のmiR-133aを検索した。その結果、イヌ骨肉腫でもヒト同様にmiR-133aの発現が確認された。S-TuD-133a投与前後における血清中miR-133a発現レベルの推移の検証も行い、S-TuD-133a投与前と比較して投与後(断脚前)で有意に発現レベルが低下していることも見出した。一方、再発・転移例では、断脚後S-TuD-133a投与を継続しても血清miR-133aの発現レベルが再度上昇してくる症例も認められた。

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解析は藤原らにより行われた。骨肉腫におけるmiR-133aの標的遺伝子の解析を行った結果、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。

miR-133a およびその標的遺伝子を含む作用分子の発現に着目した臨床検体の解析は藤原・川井・尾崎・尾崎らにより行われた。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結果、新鮮生検検体において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が見出された。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。平成25年度に尾崎・尾崎らは、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て、岡山大学医学部および鳥取大学医学部における材料収集を開始した。岡山大学では45例のホルマリン固定・パラフィン包埋標本が収集され、鳥取大学では18例が収集された。RNAを抽出しmiR-133aおよびRUN-6B発現量を測定した結果、全ての症例においてmiRNA発現を確認することが可能であった。定量PCRにて発現解析を解析し、それぞれの予後との相関性を解析したところ、岡山大学の患者群においてmiR-133aの高発現が患者のoverall survival およびmetastasis-free survivalの予後不良と有意に相関していることが明らかになった。これは国立がん研究センター中央病院における結果と一致する内容であり、骨肉腫におけるmiR-133a機能阻害の臨床的意義が示された。鳥取大学の患者群については、entry数が少ないため予後における有意差は確認されなかったが、不良な転帰を辿った患者群におけるmiR-133aの発現量は、予後良好群と比べ、約14倍高値を示した。平成26年度には、岡山大学整形外科で採取されたヒト骨肉腫臨床材料におけるmiR-133aおよびその標的遺伝子の発現を解析した。ヒト骨肉腫25例の凍結標本を収集し、miR-133aの標的遺伝子annexin A2 (ANXA2)の発現解析を行い、それぞれの予後との相関性を解析したところ、ANXA2高発現が患者のoverall survival およびmetastasis-free survivalの予後良好と相関する傾向が見出された。尾崎らは、鳥取大学病院で採取されたヒト骨肉腫臨床材料を用いANXA2の発現を免疫染色により評価した。鳥取大学に保管されているヒト骨肉腫切除標本10例における検討により、骨肉腫におけるANXA2陽性腫瘍細胞は、類骨形成能の高い領域で多く観察された。検討に用いた骨肉腫10例において、ANXA2陽性例および陰性例はそれぞれ5例ずつであった。ANXA2陽性例は、肺転移陽性群において4例中1例(25.0%)、一方肺転移陰性例群において6例中4例(66.7%)と前者で低値を示した。以上より、ヒト骨肉腫原発巣において、miR-133a発現がその標的分子であるANXA2発現を低下させ、肺転移促進性に関与することで予後不良となることが示唆され、骨肉腫におけるmiR-133a機能阻害の有用性を示唆する結果となった。

細胞内だけでなく細胞外へも分泌される、いわゆる分泌型miRNAの骨肉腫における知見は未だ得られておらず、平成26年度に、藤原らは骨肉腫における分泌型miR-133aのおよびその臨床病理学的相関性を解析した。

2010年から2012年に採取された治療前の骨肉腫患者10名、非骨肉腫患者10名、および健常者8名から採取された血清を解析したところ、健常者、非骨肉腫患者群と比較し、骨肉腫患者群の血清でmiR-133a発現が有意に高いことが示された。さらに、骨肉腫患者の術前血清と比較し術後血清では有意に発現低下を示し、単癌状態を示すバイオマーカーあるいはS-TuD治療における効果判定のモニタリングマーカーとしての可能性が示唆された。

miRNAが発現制御する遺伝子の候補の中から膜タンパク質を特異的に抽出するための基盤技術の開発も平成26年度に実施された。細胞膜上のタンパク質をビオチン標識し、タンパク質を抽出してアビジンカラムで精製、ペプチド化した後に、質量分析で同定した。複数の骨肉腫細胞および骨芽細胞を調べ、実験手法の最適化を図り、平均して300種類のタンパク質を同定した。本研究は、同定されたタンパク質のデータベース化、および細胞間での多様性を反映しうる鍵となる膜タンパク質の同定のための基盤技術として、今後の応用が期待される。

前臨床試験全般に求められる統計的手法については、平成25年度に吉村により検討された。抗体医薬品や小分子化合物などの分子標的治療薬が多く開発されるに至り、これら治療薬に想定される機序を考慮すると、サブグループ解析の重要性が急速に高まっている。吉村は、日米欧の規制当局等によるガイドラインにおけるサブグループ解析に関する記述をまとめることによって、サブグループ解析を実施する場合の現状の論点をまとめることを目的とした。その結果、サブグループ解析の結果の解釈において重要なポイントである、consistency(均一性)、生物学的尤もらしさ、エビデンスの再現性それぞれの評価において、現状よく用いられる方法では必ずしも十分な評価が行えないことが示された。サブグループ解析について、方法論上の整備が現状不十分であり、現実に応じた新たな解析方法の開発を要することが示された。

以上の研究結果より、新規miRNA阻害剤S-TuDの骨肉腫に対する臨床応用に向けての基盤が構築された。将来的には骨肉腫の範疇を超え、miRNA発現異常を示す様々な悪性腫瘍やその他の疾患に対する日本発S-TuD製剤の応用が期待される。

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製品は海外企業が既に特許を獲得している。

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、従来のデコイ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、大量合成プロトコルの作成を継続している。この構造体の大量合成を実用化するためには、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。また、製剤自体の安定性や血中における安定性など、検討すべき課題が多いのが現状である。その課題に取り組みながら、本製剤の有効性ならびに安全性の検証を進める必要がある。

現在のヒト医療あるいは獣医療での骨肉腫の治療は、外科的手術、放射線療法、および薬物療法(主として抗がん剤や分子標的治療薬)が主流となっている。他にも温熱療法、活性化リンパ球療法などの免疫療法、高濃度ビタミンC点滴療法、代替療法(サプリメントやホメオパシーなど)、あるいは外科療法の併用としての動注療法などが行われている。このように様々な療法があり、また医療の発展により生存率は上昇したものの、ヒトで5年生存率が50~70%、犬での1年生存率が30~60%と、依然として根治を見込める安定した治療法は確立されていない。イヌの骨肉腫は、イヌの骨原発性腫瘍の80%程を占め、患部に強い疼痛を与えQuality of lifeを著しく損なう。断脚などの侵襲性が高い外科手術を行ったとしても、発見時から早期に肺転移を起こす腫瘍であり、予後は非常に悪い。前述の既存療法や検査では治療成績に限界があるため、新たな治療法や早期発見や予後、再発判定の為のマーカーが求められている。ヒトの骨肉腫とイヌのそれは発生年齢が若齢と中齢の二峰性の分布を取ることや、発生部位の病態が非常に似ていることから、腫瘍発生のメカニズムも類似していると考えられている。今回臨床試験に用いたS-TuDはヒトの骨肉腫に発現しているmiR-133aの阻害剤であるが、イヌでの有効性も期待でき、同時にその成果はヒト医療の発展にも繋がると予想される。

近年、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。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。本研究班は、平成23年度までにヒト骨肉腫細胞株においてがん幹細胞分画を単離し、ヒト骨肉腫手術検体におけるがん幹細胞分画の存在とその分画におけるmiR-133a高発現を見出してきた。近年、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。したがって、ヒト骨肉腫組織におけるmiR-133a発現の臨床病理学的意義を明らかにすること、さらにmiR-133aの標的遺伝子群の同定および臨床病理学的因子と比較検討は、骨肉腫の発生および進展のメカニズムを明らかにする上で極めて重要であるのみならず、骨肉腫の治療方針決定や予後予測の観点からも有用性が高い。このような背景を基に、複数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行うことを目的とした。国立がん研究センター中央病院および鳥取大学・岡山大学における臨床材料を用いて検討した。

さらに、miRNA 細胞内だけでなく細胞外へも分泌され(分泌型miRNA)、血液中に安定した形で存在することが知られるようになった。特にがんをはじめとする疾患の病態やステージなど、ヒトの生理状態によってその発現量や種類が大きく変化するため、血液などの体液を利用した非侵襲的な診断用バイオマーカーとして開発されようとしている。骨軟部腫瘍における分泌型miRNAの存在は明らかになっておらず、本年度は骨肉腫における分泌型miR-133aのおよびその臨床病理学的相関性との解析から新たなバイオマーカーとしての可能性を検討した。

また、miRNAは複数の遺伝子の発現および分子パスウェイを制御することによってがん幹細胞の維持・分化に関わっている。miRNAが制御するタンパク質の候補は数多く報告されており、どの候補に焦点を当てるかが研究の成否を分けることになる。候補タンパク質のうち、膜タンパク質を重点的に調べることは、治療標的の新規候補の同定および個別化医療

のためのバイオマーカー候補の同定において有効である。一方、ある遺伝子産物・タンパク質が膜に局在するかどうかは核酸・アミノ酸配列から予想することは未だ困難であり、データベースとしても開発途中である。現状では、実際のサンプルにあたって解析を行う必要があるが、そのための方法論も未だ確立されていない。タンパク質を網羅的に解析する手法として質量分析を用いた実験が普及しており、一度に数千種類のタンパク質を同定・定量できる標準的な装置が市販されている。一方、膜タンパク質を特異的にスクリーニングする手法については開発が必要である。骨肉腫の新規治療法の開発に資する膜タンパク質の同定法を確立する基盤的技術を開発するために、実験手法の最適条件を検討した。

このような背景をもとに、平成24年度には、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を行った。続いて平成25年度には、S-TuDの最適化、S-TuD製剤の開発プロトコルの改良、S-TuD製剤の複数の標的にわたる安全性試験、S-TuD-133aを用いた骨肉腫におけるin vitroないしin vivo解析、イヌ骨肉腫自然発生例を用いたS-TuD有効性および安全性試験、多施設におけるヒト骨肉腫臨床材料を用いたmiR-133aの発現解析を行った。平成26年度は、S-TuD合成プロトコルの更なる最適化、S-TuD製剤の安定性評価、S-TuD製剤の超微量検出法の開発、S-TuDの血清中での安定性評価、単癌マウスに対する有効性試験、イヌ自然発生骨肉腫症例に対する有効性および安全性試験、それに伴う腫瘍内および血清中miRNAの発現解析等を行った。

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の阻害効果の評価を、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に対して、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 細胞を用いて 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 の最適化

miR-122, miR-142-3p に対する S-TuD の阻害効果の assay は、Haraguchi T, et al: Nucleic Acids Res 40:e58 2012 に準拠して行ない、培養細胞に対して 3'-UTR に対応する miRNA の完全相補配列を含むレポーターを transient expression させることにより行った。

具体的には miR-122 に対する S-TuD は、内在性の miR-122 を高レベルに発現している Huh-7 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。reporter plasmid は各種の投与量の S-TuD RNA と cotransfection して 48 時間後に、dual luciferase 法により定量を行った。

(3) S-TuD の超微量検出法の開発

精製された S-TuD122 標品 (全て 2'-O-Methyl 化されている) を用いて、MBS(miRNA binding site)と Stem II 領域に対する primer を設計し、これを逆転写酵素により伸長させ得られた cDNA を real-time PCR により増幅、定量する系を数種考案した。

(4) S-TuD の免疫反応誘導性の検討

HCT-116 細胞に 10nM S-TuD を transfection 法で導入し、7 ないし 24 時間後に Total mRNA を回収した。そして Interferon の標的遺伝子群である内在性の OAS-1, OAS-2, MX1, IRF-9, IFITM-1 mRNA の発現量を real-time PCR 法で検定した。

(5) S-TuD の血清中での安定性の評価

各種 S-TuD をマウスまたはヒト血清と混合後 37°C で一定時間保温後、液体 N₂ 中で凍結した。各検品は、核酸分解酵素のない H₂O で 100 倍希釈後直ちに、20%TBE native polyacryl amide gel により 200V で電機泳動した。ゲルは SyBR Gold (Invitrogen) により染色し、Wise UV (WUV-M20) で検出した。

(6) S-TuD 製剤の大量合成プロトコールの確立・大量合成法の最適化及び予備安定性試験

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った。

平成 24 年度は、中容量の固相合成システムを用い検討した。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。

平成 25 年度は、小容量の固相合成システムを用い各種条件検討を行った。得られた最適条件を基にグラムスケールが製造可能な固相合成システムを用い、数百ミリグラム以上の合成を 3 つの異なる S-TuD(S-TuD133a-pf, S-TuD100-5p-pf, S-TuD-NC1nt-1) に対して生産実施した。次に精製した 1 本鎖同士を用いて 2 本鎖化するための基本条件の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。これらの条件を基に 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的な分析手法として、2'-O-メチル化修飾された長鎖 1 本鎖 RNA の定量的な不純物解析法及び 2 本鎖純度検定試験法の最適を行った。

平成 26 年度は、得られた最適条件を基にグラムスケールが製造可能な固相合成システムを用い、いくつかの異なる S-TuD に対して数百ミリグラム以上の合成を実施した。併せて治験薬としての安定性を評価する為、S-TuD 凍結乾燥品の予備的な長期安定性試験 (1 年間) を行い、各ポイントでの物性試験を実施した。

(7) 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 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、② S-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)。

(8) S-TuD を用いた *in vitro* 解析

ヒト骨肉腫細胞株 143B を用いて、S-TuD-133a (ジーンデザイン社、最終濃度 30nM) により miR-133a の発現を阻害し、RT-qPCR により阻害効率を確認した。また miR-133a 発現阻害による機能解析として Matrigel を用いた invasion assay、薬剤感受性試験、さらには proliferation assay を行った。薬剤としては、ヒトに使用される Doxorubicin(DOX)、Cisplatin(CDDP)、Ifosfamide(IFO)、Methotrexate(MTX)、およびイヌに対して使用される Calboplatin(CBDCA) を選択した。

(9) S-TuD を用いた *in vivo* 解析

生体内有効性試験のため、移植マウス自然肺転移骨肉腫治療モデルを用いた。具体的には、骨肉腫高転移株 143B 1.5×10^6 cells を 4-6 週雌ノードマウスの脛骨近位へ投与し、腫瘍サイズおよび肺転移をそれぞれ caliper、IVIS システムにて評価した。

治療群は、①生食/生食、②S-TuD-NC/生

食、③S-TuD-133a/生食、④S-TuD-NC/シスプラチン、⑤S-TuD-133a/シスプラチン、の 5 群に分けて評価を行った。S-TuD は 0.1mg/kg で尾静注投与、シスプラチンは 3.5mg/kg で腹腔内投与を行った。肺転移評価後、すべてのマウスの生存期間を観察し、Kaplan-Meier 法にて解析した。

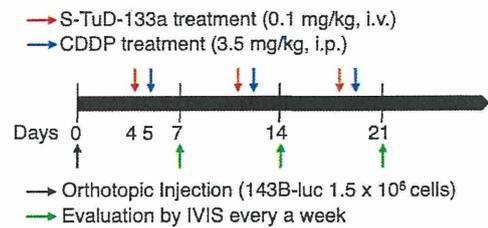


図 1.併用投与群のプロトコール

(10) 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。

(11) 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。

(12) S-TuD 製剤安全性試験

S-TuD-133a および S-TuD-100 という骨肉腫の悪性形質に関与する二つの標的別の製剤を用い、ラットに対する 4 週間反復投与による安全性試験および、シスプラチン併用時の反復投与安全性試験を実施した。試験は、GL

P対応の委託試験施設(株式会社新日本科学 安全性研究所)にて行った。

(13) ヒト骨肉腫マウス移植モデルを用いた S-TuD-133a 有効性試験

S-TuD-133a および S-TuD-100 生物学的安全性は、シスプラチンとの併用のもと、臨床想定投与量前後における反復投与試験で確認した。この臨床想定投与量は、マウス担癌モデルでの標的 miRNA のノックダウン効果および延命効果に基づいて設定している。ところが、実際の臨床においては、原発巣の腫瘍は外科的に切除することが常であり、その処置後の転移を如何に抑制するかが延命効果に直結すると考える。そこで、マウスを用いた比較的大規模な群構成において、より臨床に近いと考えられる骨内腫瘍形成後、断脚モデルおよび、再現性の高い皮下腫瘍作成後、切除モデルにおいて、S-TuD-133a および S-TuD-100 投与による転移抑制効果、延命効果を検証した。その際、シスプラチンの併用ならびに S-TuD の DDS として有用なペプチドキャリア A6K の併用による影響も含めて検証し、安全性試験の結果をふまえた臨床適用の至適投与量の設定を試みた。試験は、委託試験施設(株式会社新日本科学 安全性研究所)にて行った。

(14) イヌ自然発生骨肉腫に対する安全性試験

ビーグル犬4頭(雄2頭、雌2頭)を用いて行った。

1) 投与方法

- ▶ 薬剤投与は、一週間隔で3回血管内に投与した
- ▶ 静脈に設置した留置針を經由して薬剤を投与した。
- ▶ カルボプラチンは 50mg/m² を 5% グルコース液に溶解し、30 分かけて投与した。次いで S-TuD を 5ml の生理食塩液で溶解 (10mg/vial で保存) し、投与群に対し指定の用量を 30 分かけて投与した。
- ▶ 余剰の S-TuD は直ちに凍結保存した。

2) 投与群・投与量

- ▶ A: 0.1mg/kg + カルボプラチン 50mg/m²
- ▶ B: 1.0mg/kg + カルボプラチン 50mg/m²
- ▶ C: 5.0mg/kg + カルボプラチン 50mg/m²
- ▶ D: 陰性 S-TuD(陰性コントロール) + カ

ルボプラチン 50mg/m²

3) 検査項目

(1) 一般血液・生化学検査

(2) 臨床観察

- ▶ 活動性
- ▶ 排尿状態
- ▶ 排便状態
- ▶ 体温
- ▶ 心拍数・心拍異常
- ▶ 脱水の有無
- ▶ 可視粘膜所見
- ▶ 体表リンパ節・腹部触診所見

1日2回(9時・17時)下記の項目を確認する。

血液検査は投与前、投与後1日目、7日目、10日目、14日目、17日目、21日目とした。

(3) 病理検査

病理は最終日の21日目に行った。

採材臓器

- ▶ 腹腔内
- ▶ 肝臓/脾臓/胃/十二指腸/膵臓/腎臓(左右)/膀胱/生殖器(卵巣/子宮体 or 精巣/前立腺)
- ▶ 胸腔内
- ▶ 心筋/肺
- ▶ その他
- ▶ 大腿筋/体表リンパ節(浅頸リンパ節)/骨髄

(15) イヌ自然発生骨肉腫症例に対する S-TuD-133a 有効性試験

【試供動物】

術前あるいは術後の病理検査で骨肉腫が確定診断された8症例と術前の病理検査にて骨肉腫が疑われた1症例を対象とした。

S-TuDを投与した骨肉腫症例は、付属骨格に発生したものが4例(大腿骨骨頸部2例、橈骨遠位部1例、上腕骨近位部1例)、軸性骨格に発生したものが4例(下顎2例、上顎1例、肋骨1例)であった。また、術前の病理検査で骨肉腫が疑われたが、術後病理検査で悪性間葉系腫瘍と診断された1例(左後肢)においても、S-TuD臨床試験を行った。

術前にS-TuDを投与できた症例は4例あり、内訳は四肢に発生したものは3例、下顎に発生したものが1例であった。術後から投与を始めた症例は5例あり、内訳は四肢に発生したものは2例、下顎1例、上顎1例、そして肋骨1例であった。

【手術】

原則的に完全切除を目的とした根治手術を行った。なお四肢に発生した場合、前肢は肩甲骨から、後肢は大腿骨頭から離断する断脚術を行った。

【抗がん剤】

Carboplatin(CBDCA)を主に用いた。製剤はカルボプラチン点滴静注液 150mg「サワイ」(沢井製薬、大阪、日本)を使用した。その他に症例の状態により Cisplatin(CDDP)、Cyclophosphamide (CPA)、Doxorubicin(DXR)、ならびに Etoposide(VP-16)を用いた。製剤はそれぞれ、ランダ注(日本化薬、東京、日本)、エンドキサン注(塩野義製薬、大阪、日本)、アドリアシン注(協和発酵、東京、日本)、ならびにペプシドカプセル(ブリストルマイヤーズ、東京、日本)を用いた。

【投与方法】

以下のプロトコールに沿って投与された。

day	採血	手術	抗がん剤投与	S-TuD投与	レントゲン検査	CT検査	miR133定量
0	○ (S-TuD投与前)			○	○	△	○(血清)
3	○			○			
6	○	○					○(組織)
抜糸処置(術後約2週間)							
0 (抗がん剤投与初日)	○		○	○			
21	○		○	○	○		
42	○		○	○			○(血清)
68	○		○	○	○		
3month					○		○(血清)
6month					○	○	
1year					○	○	○(血清)

○・・・原則として行う。
△・・・可能であれば行う。

術前投与が可能であった症例には、術前にS-TuDを0.1mg/kgを計2回、最低24時間以上間隔を空けて静脈内投与した。術後の投与は原則として抜糸後(約2週目)、CBDCAと併用してS-TuD 0.1mg/kgを、4回を目安として投与した。投与回数や投与開始日、投与間隔、CBDCAの用量は症例の状態に応じて異なり、表6に示した。投与方法は静脈カテーテルを留置し、CBDCAをボラス投与した後に、生理食塩水をカテーテル内洗浄の目的で少量静脈内投与し、その後にS-TuDを投与した。

術前投与が出来なかった症例に対しては、状態を見て抗がん剤投与に耐えられると判断された時にCBDCAと併用して、S-TuD 0.1mg/kgを血管内投与した。術後の投与方法は、動注カテーテルを留置した症例には動注カテーテルからCBDCAの投与終了後に、

生理食塩水を洗浄目的で注入し、その後S-TuDを投与した。

なお、全ての症例で、初回投与の前に飼い主に今回の試験についての目的および実験動物での安全性を説明し、投与の同意を頂いた上で、投与プロトコールを開始した。

【身体検査】

来院時の身体検査項目として体温、体重測定を行い、家庭での一般状態の聴取を実施した(排尿、排便、活動性、食欲の様子やその他飼い主の気づいた変化等)。これらはS-TuD投与直前から、S-TuDの投与プロトコール終了まで実施した。

【病理検査】

東京農工大学農学部臨床腫瘍学研究室およびノースラボ(北海道、日本)に病理検査依頼した。

【X線・CT検査】

レントゲン検査、あるいはコンピュータ断層撮影(CT)検査により、術前の腫瘍の確認、術後の再発や転移の有無を確認した。

【血液検査】

症例の静脈から採血された血液を用いて検査を実施した。血液検査はS-TuDならびに抗がん剤投与の前後に実施した。血漿は主にアルカリフォスファターゼ(ALP)の推移を観察する目的で血液化学検査を実施した。その他に血糖値(GLU)、血液尿素窒素(BUN)、血漿クレアチニン(CRE)、アスパルテートアミノトランスフェラーゼ(AST)、アラニアミノトランスフェラーゼ(ALT)、総ビリルビン(T-Bil)、総コレステロール(T-Cho)、血中総蛋白(TP)、アルブミン(Alb)、血中電解質(Na-K-Cl)、カルシウム(Ca)、リン(P)、およびC反応性蛋白(CRP)の測定を、症例の状態を鑑みながら測定した。血液化学検査にはFUJI DRI CHEM 7000Vを用いた。血清分離は3000rpm、10minで行い、分離した血清は-80℃にて保存した。

【腫瘍組織採材】

外科手術にて摘出した腫瘍組織の一部を採材し、液体窒素に10秒間浸漬して、急速凍結させ保存した。検体はmiR-133aを定量するまで-80℃で保存した。

(16)イヌ自然発生骨肉腫に対する有効性試験における骨肉腫組織・血清中miR-133a解析

リアルタイム定量PCR(qRT-PCR)を用いて、

以下の条件で解析した。

組織:組織は凍結したままマルチビーズショッカー(安井機器)により粉碎後、QIAzol Lysis Reagent(QIAGEN) 700 μ l に溶解。更に miRNeasy Mini Kit(QIAGEN)を使用して total RNA を抽出。primer は hsa-miR-133a(cfa-miR-133a と同源性あり、Mature miRNA sequence UUGGUCCCCUUAACCAGCUGU)を用いた。inner controlとして、RNU6Bを用いた。

血清:S-TuD 術前投与が可能だった症例には、S-TuD 投与前、手術前、術後 1.5 ヶ月、および術後 3 ヶ月時点の血清を用いて miR-133a を定量した。術前投与が行えなかった症例に関しては、術後 1.5 ヶ月、術後 3 ヶ月時点での血清を用いて miR-133a を定量した。症例 D は、術後 9 ヶ月、12 ヶ月時点での血清で定量した。採取した血液を 10,000rpm、10min、4°Cで遠心し、上清 200 μ L を使用し、miRNeasy Mini Kit を用いて、QIAGEN Supplementary Protocol(Purification of total RNA, including small RNAs, from serum or plasma using the miRNeasy Mini Kit)に従い total RNA 抽出した。primer は has-miR-133a、および cel-miR-39(Mature miRNA sequence UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG)を用いた。Taqman プローブはそれぞれに特異的なものを用いた。

血清、組織共に、RNA 逆転写は Taqman microRNA Reverse Transcription Kit を用い、qRT-PCR には Taqman 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG を用いた。血清サンプルおよび組織サンプルにおける発現量の解析には Comparative Ct 法を用いた。

(17) 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-PCT 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。

(18) 多施設における骨肉腫臨床検体の収集と miR-133a およびその標的遺伝子の発現解析ならびに臨床背景との相関性の検証

①岡山大学

平成 24 年度より、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、2000 年～2012 年に手術を施行された標本(45 例)を収集可能であった。平成 25 年度は、それぞれの検体より RNA 抽出を行い、また、Real-time PCR に適したサンプルであるかを確認した。さらに、miR-133a および RUN6B 発現量を測定し、臨床経過との関連性を検討した。

平成 26 年度には、ヒト骨肉腫原発巣切除組織の凍結保存検体の検索を開始した。これまでに収集された標本のうち、2000 年～2012 年に手術を施行された標本(25 例)を収集可能であった。それぞれの検体より RNA 抽出を行い、miR-133a の標的遺伝子である annexin A2 (ANXA2)および β -actin の発現量を測定し、臨床経過との関連性を検討した。

②鳥取大学

鳥取大学においては、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 18 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 溶液を用いて Real-time PCR をおこなない miR-133 および RNU6B 発現量を測定した。測定した 18 例中 11 例において全ての RNA 発現量を検出できたことから、これらの症例に関する臨床データをファイルから抽出した。

各 miRNA 発現との関連性の比較に用いるため、臨床データとしては、年齢・性別・発生部位・subtype・初診時転移の有無と部位・術前/術後化学療法の内容(種類のみ)・化学療法奏功性・経過観察期間・腫瘍学的転帰・

転移/再発/死亡までの期間を抽出した。

平成 26 年度には、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 10 例を対象にし、ANXA2 発現を免疫組織化学的に検索した。腫瘍細胞における ANXA2 陽性細胞を検索し、陽性細胞率 10%以上の症例を陽性例、他方 10%未満の症例を陰性例とした。臨床病理学的因子と比較検討し、ANXA2 発現の意義を検索した。

(19) 骨肉腫患者由来血中 miRNA 発現の解析

岡山大学ならびに国立がん研究センターにおいて保管されている、骨肉腫患者由来血清の検索を開始した。これまでに収集された標本のうち、2000 年～2012 年に採取された治療前の骨肉腫患者 10 名、非骨肉腫患者 10 名、および健常者 8 名から採取された血液より血清を分離し RNA 抽出を行った。それぞれの検体より RNA 抽出を行い、miR-133a および *cel*-miR-39 の発現量を測定し、臨床経過との関連性を検討した。

(20) 骨肉腫細胞の膜タンパク質のプロテオーム解析による治療標的候補の探索のための基盤的技術の開発

細胞：骨肉腫細胞 (HOS、HMMG/HOS、143B、MG63) および骨芽細胞 (hFOB) を使用した。

ビオチン標識法：培養細胞を PBS で洗浄し血清タンパク質を除去した後、膜表面に存在するタンパク質をビオチン化した。ビオチン化試薬としてビオチンとタンパク質結合部位との間にジスルフィド結合が入っているものを使用した。全タンパク質を細胞から抽出し、ビオチン化されたタンパク質をアビジンカラム (ピアス社) で回収した。そして、還元剤でカラムを処理することで、ビオチン・アビジン複合体からタンパク質を回収した。最後に遠心濃縮によりタンパク質を濃縮した。

ペプチド調整と質量分析：回収されたビオチン化タンパク質をトリプシンで切断してペプチド化し、質量分析装置 (OrbiTrap XL、サーモ社) にてペプチドの精密質量を測定した。得られたペプチドのデータについて、MasCot ソフトウェア (マトリックス・サイエンス社) を使用してデータベース検索を行い、ペプチドの同定および半定量を行った。

(21) 統計解析法の検討

日米欧の規制当局等によるガイドライン (ICH ガイドラインを含む) におけるサブグループ解析についての記載を収集し、実際にサブグループ解析を実施する場合の現状の論点を抽出した。

(倫理面への配慮)

動物を用いる実験においては「動物愛護管理法」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、「厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を踏まえ、各施設における動物取扱の取り決めを遵守して実施した。

ヒト組織標本を用いた解析に関しては、文部科学省および厚生労働省による疫学研究に関する倫理指針に従って行った。事前の十分な説明と自由意思による同意に基づいた研究を行い、個人情報 は徹底して保護した。患者情報を記載しているデータファイルは、暗証番号を使用し研究者個人しか使用できないようにした。また、本研究の開始に関しては、事前に各施設の倫理委員会により審査及び承認を得ることで研究の適正性を確保した。

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。

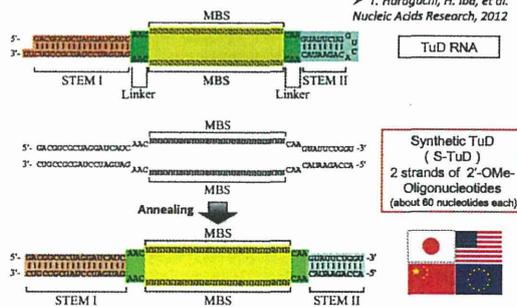
一般に、より標的 miRNA との結合親和性が高い MBS 配列の方がより効果的であるが S-TuD 分子内での、MBS 間の結合が強い場合は S-TuD は効果が大きく減弱する。この際、S-TuD 内における RNA 構造の予測法として CentroidFold と呼ばれるアルゴリズムを使うと、阻害効果と 2 次構造予測に良い相関がえられた。すなわち 2 つの MBS 間で 8 塩基対までの形成は、S-TuD の活性に大きな影響は与えなかった。しかし 9 塩基対以上の形成は、著しく阻害活性を落とすので、標的 miRNA の 5' 端から 10 番目の塩基に対してのみミスマッチを導入した MBS 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るが、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。

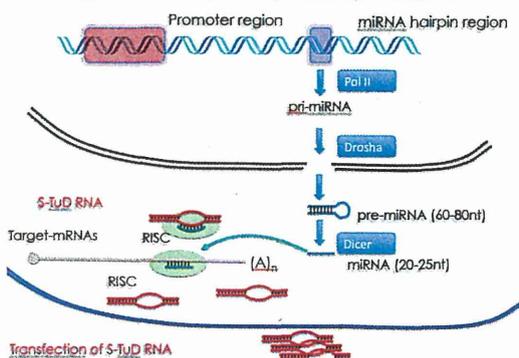
このような原理に基づく MBS 設計のアルゴリズムを作成し、それぞれ miR-199a-3p, -5p, miR-214, 及び miR-142-3p の 4 種の S-TuD を設計しその阻害効率を評価したところ、いずれの場合にも 1nM 以下で、対応する miRNA の活性を完全に抑制しうることが証明された。また miR-133a に対する S-TuD も同じアルゴリズムで設計して、その評価は藤原博士にお願いし、極めて良好な阻害効果を検出している。

特定のmiRNAを阻害する強力な Decoy RNA (Synthetic Tough Decoy ;S-TuD) の設計

> T. Haraguchi, H. Iba, et al. Nucleic Acids Research, 2012



Suppression of specific miRNA by S-TuD RNA



(2) S-TuD の最適化

miR-122, 及び miR-142-3p に対する S-TuD 分子を昨年度決定した MBS を使用して、Stem2 の鎖長の異なるものをそれぞれ合

成した。それらを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、以下の結果を得た。

Stem2 の鎖長が 8, 10, 12, 14, 16, 18 塩基対の 6 種の S-TuD-miR-122 を同モルで Huh7 細胞にそれぞれ導入して解析したところ、Stem2 の鎖長が 14, 12 ではほぼ最大の阻害効果を観察し、10 では、これに次ぐ高い阻害効果がみられた。一方鎖長 8 では、その活性は大きく損なわれた。

同様の assay を、S-TuD-142-3p・miR-142 を外来的に強制発現させた HEK293 細胞細胞に導入していったところ、10-14 でほぼ最大の阻害活性を得た。同質量の投与と比較すると鎖長が短い方が有利となることもあり、Stem の長さを従来型の 10 から伸ばしても、阻害活性を高めることはほとんどないと結論した。その結果、昨年度大量合成した本研究班で *in vivo* で使用した S-TuD-miR133a は Stem2 鎖長の面からも、至適域にあることが判明した。

特定のmiRNAを阻害する強力な Decoy RNA (Synthetic Tough Decoy ;S-TuD) の阻害活性の最適化

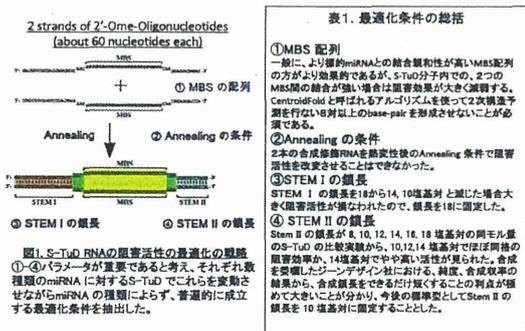


図1 S-TuD RNAの阻害活性の最適化の経緯
①-④パラメータが重要であると考え、それぞれ最良のmiRNAに対するS-TuDでこれらを実験させたがmiRNAの種類によらず、普遍的に成立する最適化条件を抽出した。

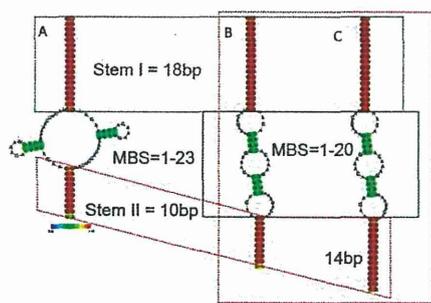


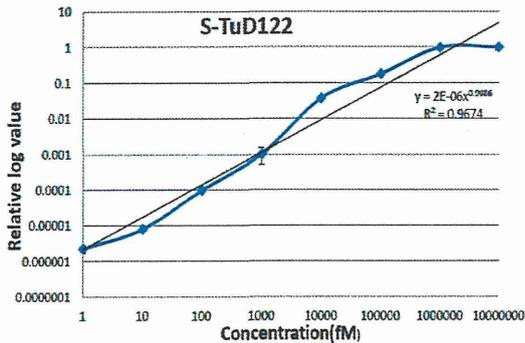
図2 本研究のin vivo 研究のために大量合成したS-TuD-miR133aの配列とその2次構造

2次構造は、CentroidFoldを用いて予測した。赤い程、安定した塩基対を形成することを示す。表1に示す一般則から、最終的にB (STEM II 10 塩基対) を使用して、良好なin vivo の成績を挙げている。MBS の鎖長も23から21塩基に減らして、合成効率と純度を高めるように配慮した。

(3) S-TuD の超微量検出法の開発

これまでに miR-122RNA を標的とする S-TuD122 を材料系に選び、S-TuD122 に特異的な primer を用いて半定量的 RT-PCR さ

らには、real-time RT-PCR による超微量検出法の開発に成功し、検量線の解析からfMの精製標品の検量線の濃度まで検出できる系が作成できた。現在S-TuDの種類によらず使用できるStem II領域に対するuniversal primer set を使用して、ほぼ同程度の感度で検出する系も確立した。



(4) S-TuD の免疫反応誘導性の検討

種々の S-TuD (10nM)や positive control としての Poly (I:C) (100ng/ml)を HCT116 細胞にtransfection 後7ないし24時間後に RNAを抽出して、各内在性遺伝子mRNA量を定量的PCR で定量した。その結果、S-TuD を transfection した細胞は、いずれの Interferon 応答遺伝子群の誘導をしないことが示された。

(5) S-TuD の血清中での安定性の評価

S-TuD をマウス血清や、ヒト血清内に添加して37℃で保温して解析したところ、3日以上にわたってほぼ消化されることなく血中で安定に存在することが確認された。

(6) S-TuD 製剤の大量合成プロトコルの確立・大量合成法の最適化及び予備安定性試験

平成 24 年度には、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。

平成 25 年度の検討では、検討を行った結果、現在までに 1 本鎖部分の合成については約 3 倍の高収率で目的産物が得られ、精製方法の単純化と 2 本鎖化の最適化を達成した。具体的には、合成収率が改善された結果、合成時に生じる不純物は大幅に減少し、前年度の製造状況では精製が 3 回から 5 回は必要だったところ、各 1 本鎖共、陰イオンクロマトグラフィー及び逆相クロマトグラフィー各 1 回ずつの精製のみで望ましい純度が確保できる状況となった。

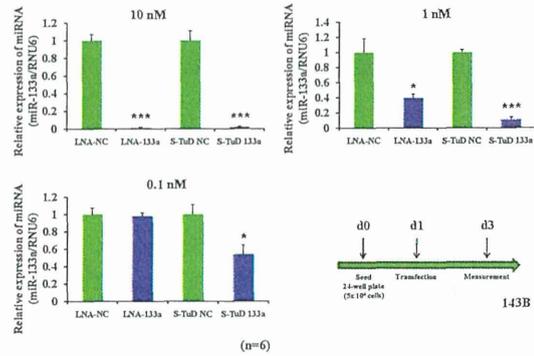
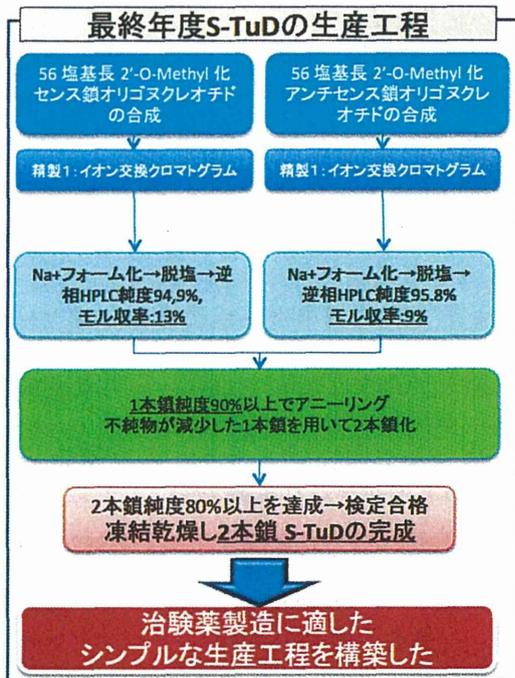
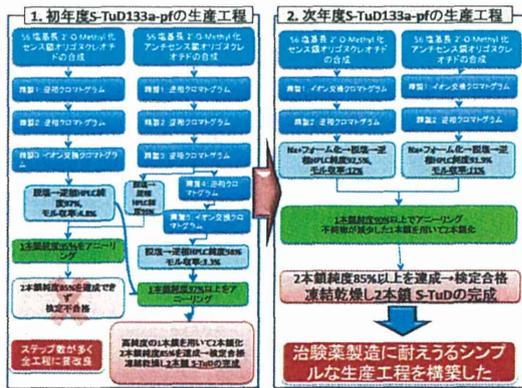
平成26年度の検討では、製造状況では精製が3回は必要だったところ、各1本鎖共、陰イオンクロマトグラフィーの精製のみで望ましい純度が確保できることをS-TuD-NC2Int-1の合成に際して確認した。これらの製造工程が改善した結果の比較を前年度分として主に精製の工程が短縮され、治験薬の実製造に適した各工程の最適化と単純化が達成された。

予備的な安定性試験に関しては、1本鎖部分の不純物の定量的解析と配列解析、2本鎖純度検定を実施した。S-TuDの安定性試験はこれまで実施された実績がなかったが、凍結乾燥状態での1年間の安定性試験を実施した。温度は-20℃及び5℃の2つの温度設定で実施した。また試験は質量分析、吸光度試験、二本鎖の純度試験及びエンドキシン検定を各時点で測定し、物性及び生物学的な変化の有無を確認した。

その結果、2つの温度設定の各期間において規格設定値を超える変化は確認できなかった。このため、S-TuD凍結乾燥品の保管温度は冷凍保存だけでなく、冷蔵保存が可能であることが示された。

ジーンデザイン社における S-TuDの大量合成法の確立

2010年11月：核酸医薬として医薬品製造業許可を取得
(許可区分：医薬品 無菌医薬品)



2) S-TuD 投与による腫瘍内発現の解析
 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。

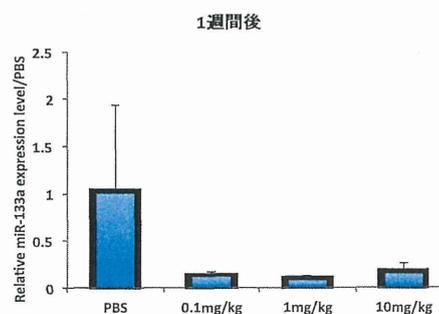
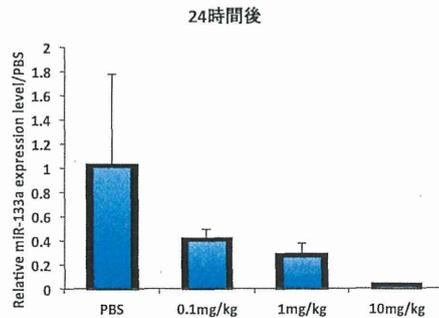


図 S-TuD による腫瘍内 miR-133a の発現抑制効果

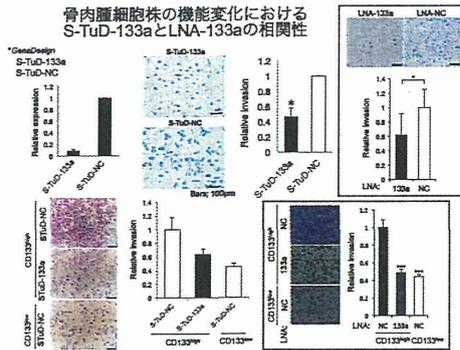
(8) S-TuD-miR-133a を用いた *in vitro* 機能解析

ヒト骨肉腫細胞株 143B を用いて S-TuD-133a により miR-133a の発現阻害をすることで、RT-qPCR でおよそ 90% 発現が抑制されていることを確認した。matrigel を用いた invasion assay を行ったところ、S-TuD-133a

(7) S-TuD-antimiR-133a の骨肉腫細胞に対する阻害効率の評価

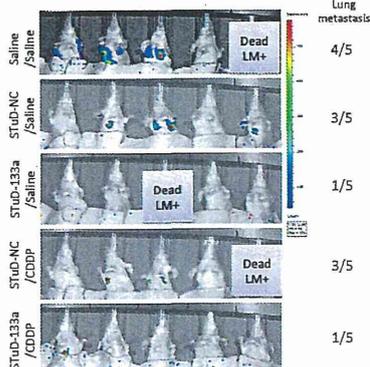
1) S-TuD の骨肉腫細胞への阻害効率
 LNA と S-TuD はともに 10 nM の濃度では、miR-133a への発現が強く抑制されていた。しかし、1 nM の濃度では、S-TuD は約 9 割遺伝子発現を抑制しているのに対して、LNA は 6 割程度の抑制効果であった。さらに、0.1 nM の濃度においては、S-TuD は約 5 割の遺伝子発現抑制効果を示したのに対して、LNA は遺伝子抑制効果が観察されなかった。このことから、S-TuD は *in vitro* 環境下において、LNA よりも高い阻害活性を有していることがヒト骨肉腫細胞で明らかになった。

群では Negative control 群と比較して浸潤能をおよ 50%抑制した ($p=0.003, n=4$)。一方で、proliferation および cytotoxicity アッセイではいずれも 2 群間で有意な差は認められなかった。



(9) S-TuD-133a を用いた in vivo 解析

腫瘍形成については、①・②・③群と④・⑤群で有意差を認めたものの、②・③群間および④・⑤群間での有意差は認められなかった。すなわち、シスプラチンによる腫瘍抑制効果は明らかであったが、S-TuD-133a とコントロール群の間での有意差は認められなかった。しかし、IVIS による肺転移の評価においては、⑤群で最も肺転移形成が抑制されていることが判明した。また、②・③群間でも肺転移形成に差を認め、S-TuD-133a による転移抑制効果が示唆された。IVIS による肺転移の評価の後、すべてのマウスの生存期間を follow した結果、⑤群において最も長い生存期間の延長が観察された。

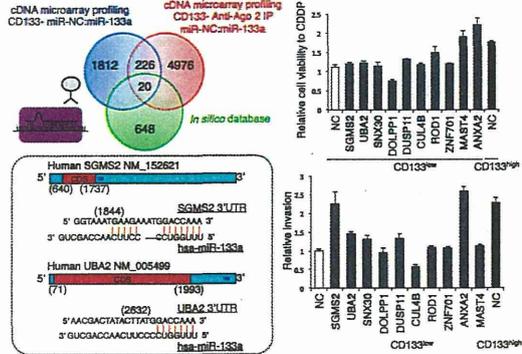


(10) miR-133a の標的遺伝子の同定

miR-133a の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。

miR-133a の標的遺伝子解析による分子機構の解明



(11) 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 の試験につい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認めた。

(12) S-TuD 製剤安全性試験

ラットに対する 4 週間反復投与毒性試験の結果、S-TuD 単独での毒性は見られなかった。シスプラチン投与群では 4 例が死亡し、各検査においてシスプラチンの毒性と考えられる変化が散見されたが、S-TuD 併用投与による毒性の増強はみられなかった。また、S-TuD100 の単回全身投与試験の結果、S-TuD 単独投与ではいずれの検査においても変化はみられなかった。シスプラチン投与各群では、体重測定、血液学的検査、血液生化学的検査、剖検、病理組織学的検査において、シスプラチンの投与に起因すると考えら

れる種々の変化がみられた。シスプラチン単独投与群と比較して、S-TuD 併用投与群では体重の低値傾向及び尿素窒素、クレアチニンの高値傾向がみられた。以上の結果より、STuD の単独投与による毒性はみられないが、シスプラチンとの併用投与によってシスプラチンの毒性を僅かに増強する可能性が示唆された。

S-TuD 133a 4週間反復投与毒性試験(ラット静脈内全身投与)
臨床想定投与量の100倍量までの毒性試験の結果、S-TuD133a単独複数回投与による毒性は見られず、シスプラチン併用時のS-TuD 133aによる増悪は見られなかった。



(13) ヒト骨肉腫マウス移植切除モデルを用いた S-TuD-133a 有効性試験

はじめに骨内腫瘍形成後、断脚モデルを検討したが、手技の不安定性や処置時間の問題等から、比較可能な群数での実験モデルの作成に至らなかった。そこで、再現性の高いことが期待できる皮下腫瘍作成後、切除モデルに移行し、外科的処置後の転移検証モデルを確立した。S-TuD-133a 単体、S-TuD-100単体、それらの組み合わせ、シスプラチンとの併用、A6Kキャリアの併用の群を設定して、8週間の静脈内反復全身投与試験を行った。

0.1mg/kgのS-TuD-100またはS-TuD-133aの全身投与により、がん幹細胞分画の阻害性が見られた。両者の併用による効果の増強は、より長期間の延命効果の検証試験において確認する必要があると示唆された。転移抑制や延命効果に関しては、有意差が出た時点において、至適投与量の決定ができると考える。

DDSであるA6Kの添加による、腫瘍抑制効果の増強は確認されなかった。これは、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ためであると考え。すなわち、S-TuD単剤での全身での奏効性が確認されたといえる。

S-TuD単独での毒性は、S-TuD-133aおよびS-TuD-100の両者において見られなかった。シスプラチン併用群では、各検査におい

てシスプラチンの毒性と考えられる変化が散見されたが、S-TuD併用投与による毒性の増強はみられなかった。

(14) イヌ自然発生骨肉腫に対する安全性試験

1) 臨床観察

検体A・Bは投与後13日目で軟便・下痢を発症したが対照療法で治癒。検体Dは、投与後9日目で水溶性の下痢を呈したが対照療法で速やかに改善された(S-TuDとの因果関係は不明)。投与群は全体的に軟便を併発しているが、コントロール犬も同様な症状を呈しているためS-TuDとの関連性は不明である。

2) 血液検査

コントロールを除く実験犬A,B,CはS-TuD投与後2週目で一過性の白血球の上昇が認められたが、生化学検査値の異常は認められなかった。炎症性反応を示すCRP値は、DおよびBで一過性に上昇したが、他の試験犬では異常が認められなかった。

3) 剖検所見

- ▶ 解剖の結果、肉眼的な異常は認められなかった。

- ▶ 採材組織

すべての組織において異常は認められなかった。

- ▶ 骨格筋

異常は認められなかった。

犬における骨肉腫とS-TuDの安全性試験

Dog Osteosarcoma: ヒトの骨肉腫と類似している
全体の原発性骨腫瘍のうち、イヌでは80%を占め、ヒトと同様な病態を示す。
所測+カルボプラチン=投与回数 4回/3weeks/iv 中央生存期間値 6.9-10.7ヵ月
肺転移で死亡

<p>・S-TuD安全性試験 投与群・投与量 投与方法: 静注(点滴) 1回/week×3回 A:0.1mg/kg+カルボプラチン50mg/m² B:1.0mg/kg+カルボプラチン50mg/m² C:5.0mg/kg+カルボプラチン50mg/m² D:毒性S-TuD(毒性コントロール)+カルボプラチン50mg/m²</p> <p>経路: 臨床観察 検体A・Bは投与後13日目で軟便・下痢を発症したが対照療法で治癒。(因果関係は不明)。投与群は全体的に軟便を併発しているが、コントロール犬も同様な症状を呈しているためS-TuDとの関連性は不明である(ストレス性と思われる)。 血液検査 実験犬A,B,Cともに投与後2週目で一過性の白血球の上昇が認められた。生化学検査値の異常は認められなかった。 剖検・病理組織所見 肉眼的な異常は認められなかった。すべての組織において異常は認められなかった。 骨格筋 異常は認められなかった。</p>
--

(15) イヌ自然発生骨肉腫に対する有効性試験

以下のデータにおける図表等詳細データは伊藤らの分担研究報告書に記載している。

【一般状態】

全症例において、S-TuD投与に起因すると思われる副作用は確認されなかった。局所再発が認められた症例H、と症例I、および肺転

移が起こり死亡した症例 D を除き、投与症例群に、体温、体重、排尿、排便、活動性、食欲に大きな変動は認められなかった。

【治療経過】

全症例において、S-TuD 治療投与プロトコルが完了、あるいはプロトコル途中で死亡している。

症例 A,B,C,F,および G は投与プロトコルを完遂し、転移や再発は現在認められていない。

症例 E は投与プロトコルを完遂後、術後 1 年で右腎臓への転移を認めた。

症例 H は外科手術で腫瘍を完全切除できず、再発を認めた。

症例 D,I は術後早期に、S-TuD 治療投与プロトコル中に死亡した。

【血液検査】

全血球計算: 症例 H では術後、局所再発した腫瘍からの出血が著しかったことに起因すると思われるヘマトクリット値の低下が起きた。症例 E では術後から血小板の値が低下した(全身状態に異常は認めなかった)。それ以外の症例では特に大きな問題は認められなかった。

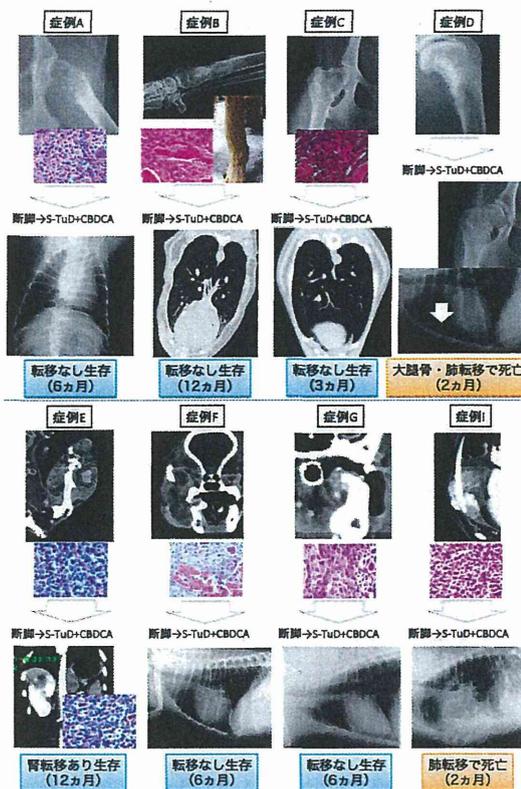
血液化学検査: 術前に ALP が正常値(<254 IU/L)を越えていた症例は、症例 H の 1 例を除き術後には正常値に帰した。腫瘍を除去し切れなかった症例 H の ALP 値は一定して高値を推移し、症例 I の ALP 値は再発が発覚した頃に急激に上昇した。

【X 線・CT 検査】

術後に X 線および CT 検査にて再発や転移は 3 症例で認められた。転移症例は症例 D(肺転移)、症例 I(胸腔内再発)、および症例 E(右腎臓への転移)であった。その他の 6 例では、現在までの術後 3 ヶ月~1 年に渡って転移は認められていない(外科手術で腫瘍を除去し切れなかった症例 H を含む)。

イヌ自然発生骨肉腫症例に対する有効性・安全性評価

番号	犬種	年齢	性別	発生部位	初診時転移	転移の有無・部位	局所再発	経過観察期間	転帰
A	バグ	11	F	大腿骨	なし	なし	なし	6ヵ月	ODF
B	ジャーマン・シェパード	9	M	肋骨	なし	なし	なし	12ヵ月	ODF
C	ウイペット	12	F	大腿骨	なし	なし	なし	3ヵ月	ODF
D	アイリッシュ・セッター	10	M	上腕骨	なし	肺、大腿骨	なし	2ヵ月	DOD
E	チワワ	8	M	大腿骨	なし	腎臓	なし	12ヵ月	AWD
F	ミニチュア・シュナウザー	7	F	下顎骨	なし	なし	なし	6ヵ月	ODF
G	ゴールデン・レトリバー	6	M	下顎骨	なし	なし	なし	6ヵ月	ODF
H	雑種	15	M	上顎骨	なし	なし	あり *原発巣遺残	5ヵ月	DOD
I	ドールマン	9	F	肋骨	なし	肺	なし	2ヵ月	DOD



(16) イヌ自然発生骨肉腫に対する有効性試験における骨肉腫組織・血清中 miR-133a 解析

組織: 本研究班のイヌ自然発症骨肉腫に対して S-TuD-133a 投与を行った症例の内、手術検体が確保可能であった 5 症例、6 検体での腫瘍内 miR-133a 発現レベルを解析した。6 検体の miR-133a 発現レベルは様々であった。

症例 No.4 では、初発時の検体と転移時の検体の比較が行え(いずれも S-TuD-133a 投与後)、転移時は初発時と比較して、腫瘍内 miR-133a の発現が上昇していた。

また他の症例と比較して腫瘍内 miR-133a

の発現レベルが異常高値であった症例 No.9 は、断脚後 4 ヶ月で死亡しており非常に予後不良の症例であった。

しかし、No.2 のように発現レベルが他と比較して高値でなくても予後不良である症例も認められた。

いずれの症例も S-TuD-133a 投与前の腫瘍組織また正常組織の確保が出来ず、症例毎、症例間の十分な比較が行えておらず、今後の課題である。

血清:以下の 2 項目において検討した。

①S-TuD-133a 投与前血清中 miR-133a 発現量:図 2 に症例毎の投与前血清中 miR-133a の qRT-PCR の結果を示した。その発現レベルと表 1 に示す予後との間に相関は認めなかった。しかし、正常犬 6 症例との比較では、骨肉腫症例では血清中 miR-133a の発現が高い傾向にあった。

②S-TuD-133a 投与前後 miR-133a 発現推移:S-TuD-133a 投与前と比較すると手術前(1 回または 2 回投与後)では、有意に血清中 miR-133a の発現レベルが低下していた($p < 0.05$)。しかし、断脚後 1.5 ヶ月、3 ヶ月では有意差を認めず、断脚後に発現が再度上昇する症例も認められた。

(17) 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。

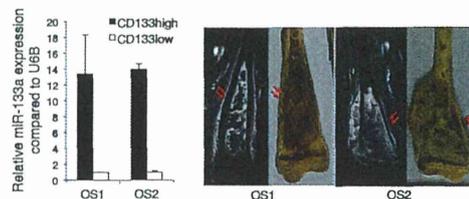


図. 2010 年以降に国立がん研究センター中央病院にて採取された骨肉腫生検検体による miR-133a の発現解析

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。

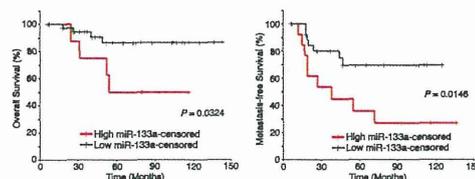


図. 1998-2010 年に国立がん研究センター中央病院にて採取された骨肉腫生検検体 48 例における miR-133a の発現と予後の解析

(18) 多施設における骨肉腫臨床検体を用いた miR-133a およびその標的遺伝子の発現解析ならびに臨床背景との相関性の検証

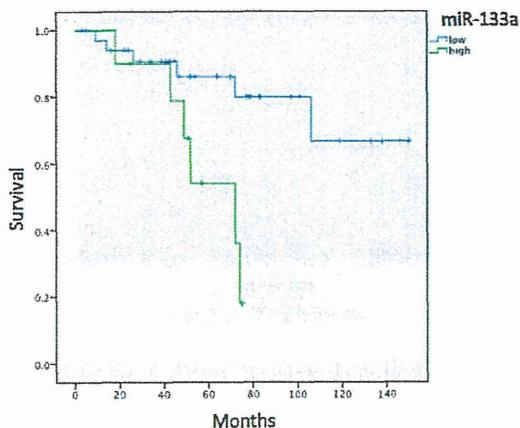
①岡山大学

2000-2012年に岡山大学整形外科で治療を行った45症例の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を収集した。患者群の内訳は、男性20例、女性25例、平均年齢33歳。発生部位は大腿骨22例、脛骨6例、上腕骨3例、その他14例であった。

これらの検体の薄切および脱パラフィンを行った後、常法にてRNAを抽出した。Real-time PCRにてRUN6B発現量を測定した結果、いずれのマイクロRNA発現も確認可能であることを確認した。

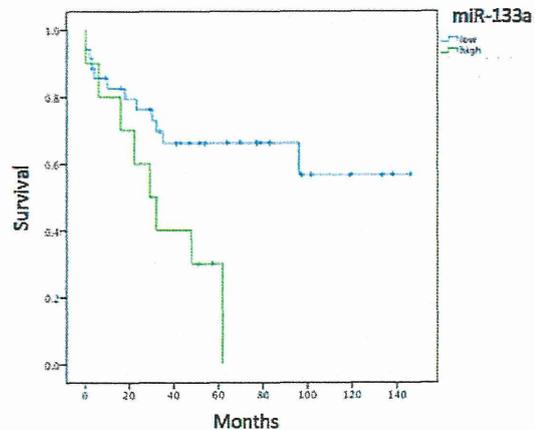
miR-133aの発現と臨床情報との関連性を統計学的に解析した結果、miR-133aの発現高値と患者予後不良が有意に相関することが判明した。miR-133aのcut off pointはROC曲線を作成し、Youden-Indexにより統計学的に算出した。

本手法で設定したcut off pointを基準にOverall survivalをKaplan-Meier法により解析した結果、miR-133a高値を示す患者群の予後はmiR-133a低値を示す患者群の予後よりも有意に悪く、5年生存率はそれぞれ86%、54%であった(log-rank test: $p = 0.009$) (図2)。



(図) miR-133aの発現に基づくOverall survival (log-rank test, $p = 0.009$)

同様に、Metastasis-free survivalをKaplan-Meier法により解析した結果、miR-133a高値を示す患者群の予後はmiR-133a低値を示す患者群の予後よりも有意に悪く、5年生存率無転移生存期間はそれぞれ66%、30%であった(log-rank test: $p = 0.016$)。



(図) miR-133aの発現に基づくMetastasis-free survival (log-rank test, $p = 0.016$)

miR-133a 標的遺伝子の解析については、2000～2012年に岡山大学整形外科で治療を行った25症例のヒト骨肉腫切除標本の凍結標本を収集した。患者群の内訳は、男性11例、女性14例、平均年齢31歳であった。

これらの検体より常法にてRNAを抽出した。Real-time PCRにて β -actin発現量を測定した結果、いずれの発現も確認可能であることを確認した。

ANXA2の発現と臨床情報との関連性を統計学的に解析した結果、ANXA2の発現高値と患者予後良好が相関する傾向にあることが判明した。ANXA2のcut off pointはROC曲線を作成し、Youden-Indexにより統計学的に算出した。設定したcut off pointを基準にoverall survivalをKaplan-Meier法により解析した結果、ANXA2高値を示す患者群の予後はANXA2低値を示す患者群の予後よりも良好である傾向が示され、10年全生存率はそれぞれ75%、50%であった(log-rank test: $p = 0.430$)。

同様に、Disease-free survivalをKaplan-Meier法により解析した結果、ANXA2高値を示す患者群の予後はANXA2低値を示す患者群の予後よりも良好である傾向にあり、5年無病生存率はそれぞれ48%、30%であった(log-rank test: $p = 0.320$)。

②鳥取大学

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18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。