

201411037A

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)

癌幹細胞を制御する転写因子を標的とした
難治性乳癌治療法の開発

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 谷口 博昭

平成27 (2015) 年 5月

目 次

I. 総括研究報告

癌幹細胞を制御する転写因子を標的とした難治性乳癌治療法の開発
谷口 博昭

II. 分担研究報告

PRDM14核酸医薬実現に必要な非臨床試験及び規制に関する研究
長村 文孝

核酸医薬のデリバリーシステムの構築、および非臨床試験
片岡 一則

核酸医薬のデリバリーシステムの構築、および非臨床試験
西山 伸宏

癌幹細胞を制御する転写因子を標的とした難治性乳癌治療法の開発
平田 公一

癌幹細胞を制御する転写因子を標的とした難治性乳癌治療法の開発
前佛 均

麻疹ウイルスベクターを用いた乳癌幹細胞特異的PRDM14分子標的
新規癌治療法の開発に関する研究
谷 憲三朗

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

IV. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総括研究報告

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))
総括研究報告書

癌幹細胞を制御する転写因子を標的とした難治性乳癌治療法の開発

研究代表者 谷口 博昭 東京大学医科学研究所 特任准教授

【研究要旨】

がん治療を困難とする転移・浸潤、経年後再発、抗癌剤耐性にはがん幹細胞が関与する。我々は乳がん・膵臓がんにおいてがん幹細胞の標的治療を確実とする標的分子 PRDM14 を同定、すでに乳がんの診断・治療に関する特許を取得済みである。さらに、難治性でありその解決が厚労分野において急務である、トリプルネガティブ乳がん(TNBC)、膵臓がんの臨床検体における POC を取得し、同分子ががん幹細胞形質、特に遠隔転移、腫瘍血管新生、抗がん剤耐性を制御する機序を解明した。

PRDM14 のキメラ型 RNAi の治療用配列を決定、in vivo 核酸治療モデルを構築の上、共同研究者と共に革新的核酸用ドラッグデリバリー剤を検証し治療用剤型を確定、腫瘍縮小・転移抑制効果を TNBC ならびに膵がんモデルで証明し、上記特許とは別に新規に特許出願済である。

さらに、高効率で極めて安全性の高い新規核酸キャリア (unit PIC) の同定に至り、同キャリアーの特性解析、in vivo 治療モデルによる検証を行った。結果、同キャリアは革新的機序により、少ない投与回数で副作用なく極めて高い治療効果が得られることが判明したため、調整費による支援で新規 unit PIC の合成系の検討、非臨床試験を実施した。

非臨床試験の段階より、医薬品を構成する物質を GMP 準拠で行うことが必要とされた。そのため、急速、複数の国内企業・海外企業との間で会議・視察を重ね、GMP 準拠のキメラ型 RNAi の合成が可能な企業との連携が確立され、安定供給体制を構築するに至った。また、GMP 準拠の新規核酸キャリアの合成に必要な体制を構築できた。これらの GMP 準拠での大量合成の端緒にあたり、キメラ RNAi 及び unit PIC の GMP 製造に必要な経費が当初予定よりさらに嵩む状況であったが、調整費による支援で克服されている。

CRO において生体内における LC-MS/MS によるキメラ型 RNAi 単剤の高感度測定系を構築済みであり、並行して非臨床試験の委託実施のうち GMP 準拠 (一部、non GMP) で、(A) siRNA 及びユニット PIC キャリア複合体分析試験・TK バリデーション (ラット、サル)、(B) キメラ RNAi 単剤のラットでの試験 (毒性・用量設定試験)、(C) siRNA 及びユニット PIC 複合体のラットでの試験 (毒性・用量設定試験)、を行った。

最終的に日本発の革新的難治性がんの核酸治療法として POC を取得、医師主導治療へ進む。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名:

- ① 長村 文孝・東京大学医科学研究所教授
- ② 片岡 一則・東京大学大学院工学系研究科・教授
- ③ 西山 伸宏・東京工業大学資源化学研究所・教授
- ④ 谷 憲三朗・九州大学生体防御医学研究所・教授
- ⑤ 平田 公一・札幌医科大学・教授
- ⑥ 前佛 均・国立がん研究センター 研究所・ユニット長

A. 研究目的

【要旨】

乳がん治療において最大の課題は、再発・遠隔転移である。

PRDM14 分子は乳がん等の幹細胞性に関与し、PRDM14 分子の治療応用によりこれらの事象を抑制することが可能であり、抗がん剤耐性や再発・転移を克服することを目的とした。

さらに、PRDM14 が核内転写因子であることから、核酸創薬を目指してその多くの困難性 (主に、核酸配列の特異性、特に off target の回避、核酸の易分解性の克服、病変局所への集積性) を克服することを目的とした。

我々は実際に、上記の目的に沿って本事業を

推進し、分子標的治療が確立していない予後不良なトリプルネガティブ乳がん(TNBC)において PRDM14 の過剰発現と腫瘍の悪性形質の関連性を証明した後、昨年度、本研究課題を進めた結果、研究結果に記載の成果を得た。特に、キメラ型 RNAi との相乗効果で、革新的機序により、少ない投与回数で副作用なく高い治療効果が得られる新規 unit PIC を得た。さらに、非臨床試験の段階より、GMP 準拠で行うことが推奨されたため、GMP 準拠のキメラ型 RNAi の合成系・安定供給体制の構築、さらに GMP 準拠の unit PIC の合成に必要な体制を構築した。以上を基礎に実臨床応用が確実に見込める核酸製剤を確立するための非臨床試験を開始し前半を終えた。並行して共同研究者と医師主導治験計画を立案、シームレスに医師主導治験へ移行する。最終的に日本発のオリジナルな標的に対する世界初のがんを対象とした核酸医薬の医師主導治験へ展開し薬事申請へ繋げる。

【目的】

ヒストンメチル基転移酵素である PRDM 分子群の解析過程で、乳がんにおいて PRDM14 の過剰発現と腫瘍形質の関連性を証明した(特許済)。さらに、研究を進めた結果、膵臓がんにおいても、PRDM14 の過剰発現と腫瘍形質の関連性が示された。また、癌幹細胞形質と PRDM14 が密接に関連することが判明した。すなわち、PRDM14 分子はがんの増殖・転移・抗癌剤耐性に関与する。その発現抑制を可能とする核酸医薬は、単剤、化療剤との併用で、化療剤効果の増強、さらに、経年後再発、遠隔転移に関与する、「乳がん、膵臓がんのがん幹細胞の撲滅」を目的とする。

PRDM14 は核内転写因子であることから、剤型に核酸医薬を用いている。我々の事業により、すでに多くの核酸医薬のハードルが克服された(研究結果参照)。つまり、我々は、上記目的に加え、「核酸創薬のプラットフォーム(キメラ型 RNAi、新規ユニット PIC)を確立すること」を目的として研究を推進した。これらの成果を積み重ね、最終的に、「日本発のオリジナルな標的に対する医師主導治験へ歩みを進めること」を最終目的としている。

B. 研究方法

【研究方法】

A) PRDM14 分子を標的とした核酸医薬の

POC 取得

- ① 乳がん、及び膵臓がんの複数の培養細胞・初代培養細胞を用いた解析を行った。PRDM14 分子が転写因子であることから、次世代型シーケンサーによる ChIP-seq、さらに、高性能 FCM による表面抗原解析、免疫組織学的検討、サスペンションアレイによる液性因子解析を行い、癌幹細胞形質と PRDM14 の関連性を探求した。
 - ② PRDM14 のキメラ型 RNAi を用いて、多角的な in vitro 実験(MTT assay, Growth assay, SP 分画、アポトーシス評価等)を介して最適の RNAi 配列を見出した。
 - ③ 東京大学片岡研究室と協議して選定した、数種の核酸医薬用ナノキャリアーを in vivo モデル(静脈注射モデル)を評価した。具体的には、CaP ナノミセル、PIC ナノキャリアー等を in vivo レベルで抗腫瘍効果、腫瘍局所への集積能を指標に複数種検討。最終的に、PEG ベースで安全性の高い unit PIC を治療用キャリアーとして選定。
 - ④ さらに、unit PIC の開発を進め、ポリアニオンのアミノ酸を種々検討した。具体的には、蛍光標識を使用した spheroid による腫瘍深部への到達能評価、血中での滞留能評価、臓器への集積性評価、マウス腫瘍モデルにおける腫瘍への到達能・抗腫瘍効果での評価を行った。結果、④より in vitro / in vivo において高効率で安全性の高い新規 unit PIC の同定に至り、本剤は革新的機序により、キメラ型 RNAi との相乗効果で、少ない投与回数で副作用なく高い治療効果が得られることが判明。
 - ⑤ in vivo モデルで、高い抗腫瘍効果、転移抑制能を核酸単剤、化療剤併用で実証(薬効試験)。
- B) PRDM14 分子に関する臨床検体 POC 取得
- ① 神奈川県立がんセンター、札幌医大より、臨床情報が判明している乳がん・膵臓がんの組織・患者血清を入手した。その際に、研究・倫理審査を実施。
 - ② PRDM14 発現と乳がん・膵臓がん組織の qRT-PCR、遺伝子発現マイクロアレイ法、免疫組織化学法に基づいた遺伝子発現プロファイルとの臨床病理学的因子との関連性の評価。
 - ③ 対象患者の選定・治療効果に関する血清コ

ンパニオンマーカ-の候補を遺伝子発現マイクロアレイ法の結果を基本に分泌タンパク質に注目し選定する。

- ④ 患者血清を使用してサスペンションアレイによる液性因子解析により、血清コンパニオンマーカ-の候補を絞り込む。

C) 核酸医薬の GMP 製造

- ① キメラ RNAi の GMP 製造については、複数の国内外の企業と折衝を行い、品質試験・生産能を評価して、GMP 製造を行う企業を決定し、すでに、一部の納品を完了、GLP 試験に供している。
- ② Unit PIC の GMP 製造については、国内 DDS 作成の実績のある(株)日油と製造検討を行い、一部の納品を完了、GLP 試験に供している。

D) 核酸医薬の GLP 試験

- ① PMDA への事前相談、海外の規制当局の情報を収集。
- ② CRO における、非修飾核酸(具体的にはキメラ RNA のナイーブな形状)の LC-MS/MS を使用した検出方法の確立。
- ③ CRO における GLP 試験の実施。具体的には、GMP 準拠(一部、non GMP)で、(a) siRNA 及びユニット PIC キャリア複合体分析試験・TK バリデーション(ラット、サル)、(b) キメラ RNAi 単独のラットでの試験(毒性・用量設定試験)、(c) siRNA 及びユニット PIC 複合体のラットでの試験(毒性・用量設定試験)、を実施した。

E) 医師主導治験の準備・計画

- ① 上記で得られたデータを検討しつつ、医師研究者である長村(医科研)を中心に定期的に会合を行う。
- ② 欧米、さらに医科研で先行する多くの治験に精通する長村を中心に治験プロトコル原案を作成する。
- ③ さらに、治験コーディネーター、及び生物統計専門家を確保した。

【倫理面への配慮】

研究に使用する検体に関しては、インフォームドコンセントに十分留意し、患者の同意を得る。対象者の自由意思での検体提供が前提であり、また、協力を撤回することが可能である。さらに東

京大学の倫理審査委員会の承認を経た後に使用する。提供された試料は、解析前に試料の整理簿から住所・氏名・生年月日などの個人情報削除し、代わりに新しく符号を付ける。提供者とこの符号を結びつける対応表は、東京大学、共同研究先(札幌医大・神奈川県立がんセンター)、公的組織バンク内の個人情報管理システムにおいて厳重に保管される。また、情報管理用コンピューターは、外部との接続が無いものを使用し、また、夜間は施錠される環境にある。よって、研究の遂行により提供者の個人情報が漏洩する可能性はない。登録責任者は、本研究において個人情報管理者としての役割を兼ねる。組織検体の由来する患者の臨床病理学的情報を解析する場合には、組織を入手した患者の臨床に直接戻って解析することが無いよう、患者のプライバシーに配慮し、匿名化を行った上で解析を行う。

また、本研究においては、癌などの病変部のみに出現し、遺伝子の一次構造の異常を伴わない、遺伝子発現解析等の研究が主であり、生殖細胞系列変異や多型など、次世代に引き継がれる遺伝情報の解析は行わない。解析後の試料は、複数のサンプルを混合することによって連結不可能匿名化し、オートクレーブで確実に滅菌した上、焼却処分する。

齧歯目・サルを用いた実験に関しては、東京大学動物実験規定、及び CRO の動物実験規定に従い、動物実験委員会で動物実験計画の審査を経た後に行ない、実験に際しては、必要最低限の個体数を使用し、疼痛・苦痛を極力与えない方法で研究を進める。

臨床治験においては、前臨床試験で認められた効果や安全性を人体で確認するため、薬事法の承認取得を目的に、本研究においては、「医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令」(H9.3.27 省令 28)を遵守の上、医師主導治験を実施する。具体的には、被験者保護に関する規定、モニタリング、監査、記録の保存など、データの信頼性保証に関する規定等を順守する。治験を行うことの適否を審議する治験審査委員会の審議の透明化や情報公開を行う。

C. 研究結果

我々は、幹細胞特性を担う転写因子である PRDM14 が、乳がんにおいて癌部特異的に発現亢進しており、腫瘍の悪性形質に関連することを証明していた。

それを基盤に、乳がん幹細胞を標的とした新規治療法（核酸医薬）を確立し、日本発の革新的な難治性癌の治療として POC を取得、臨床試験へと進めることを目標として本事業を推進しており、以下の成果を得ている。

【具体的な研究成果】

研究成果①-⑥(下記)に関し追加特許申請を行った(出願番号 2014-141278)。

PMDA への事前面談を 2014 年 6 月に実施済で、さらに 2015 年 2 月に再度予定している。

- ① 乳がん臨床検体に加えて、膵がん臨床検体による PRDM14 分子の新たな POC（分子診断マーカー）取得
- ② 対象患者の同定、並びに治療効果に使用できるコンパニオンマーカー候補の同定。
- ③ in vitro / in vivo による効果判定により、PRDM14 のキメラ型 RNAi の治療用配列を決定。
- ④ PEG ベースで安全性の高い unit PIC を治療用キャリアーとして選定。
- ⑤ さらに、④より高効率で安全性の高い新規ユニット PIC の同定に至り、本剤は革新的機序(※)により、キメラ型 RNAi との相乗効果で、少ない投与回数で副作用なく高い治療効果が得られることが判明。
- ⑥ in vivo モデルで、高い抗腫瘍効果、転移抑制能を核酸単剤、化療剤併用で実証（薬効試験）。
- ⑦ 非臨床試験の段階から、その多くを GMP 準拠で行うことが推奨された。そのため、GMP 準拠のキメラ型 RNAi の合成、安定供給体制を構築、また、GMP 準拠の新規核酸キャリアの合成に必要な体制を構築した。
- ⑧ CRO にて生体内における LC-MS/MS によるキメラ型 RNAi 単剤の高感度測定系を構築済で、さらに、GMP 準拠（一部、non GMP）で、(A) siRNA 及びユニット PIC キャリア複合体分析試験・TK バリデーション(ラット、サル)、(B) キメラ RNAi 単剤のラットでの試験(毒性・用量設定試験)、(C) siRNA 及びユニット PIC 複合体のラットでの試験

(毒性・用量設定試験)、を行った。

特に⑤は革新的であり、また、多くの困難を克服して⑦を達成、非臨床試験を開始している。

(※) 革新的機序について:

- ① 腫瘍局所への EPR 効果を最大に発揮する最適サイズの単分散粒子、② 使用する PEG の分子量の低下による副作用回避、並びに PEG 含有量の低下による核酸量増加、③ FDA 認可の物質で構成、④ ホストゲスト効果による前例の無いユニークな核酸の保持、④ 免疫系からのステルス機能、⑤ 毒性を認めない

【今年度(最終年度)の調整費による研究成果】

先に記載した研究成果に重複するが、独立して以下に記載を行う。

我々はすでに上記応用研究を鋭意展開中であるが、現状に甘んじる事無く常に効果・効率を追求している。その過程において、下記の緊急性・必要性を要する項目が挙げられており、追加支援を頂ければ、更なる効果・効率を得られ、日本初の核酸創薬に繋がる可能性がさらに高まる。

項目 1 核酸ドラッグデリバリーシステム(DDS)に関して:

現在、我々の研究チームにおいて核酸 DDS として、共同研究者である片岡教授、西山教授が開発された PIC ナノキャリアーを最終的な剤型とし、PMDA と事前相談も行い、非臨床試験に使用した。この PIC ナノキャリアーは、カチオン(陽イオン)性ポリマーとしてポリリジン(PLL)、非イオン性ポリマーとしてポリエチレングリコール(PEG)を用いて合成したブロック共重合体が水中で球殻状に会合したミセルである。本ミセルの性質・利点として、

- ①製造が容易、②優れた血中滞留性、③粒子径が均一・極小(単分散)で EPR 効果を最大限に発揮、④in vivo でリポソームや高分子ミセルで見られる肝臓、脾臓への集積性は示さず、がん組織特異的に集積、⑤高い安全性(肝・腎パラメータの変動なし)

が挙げられる。すべて、FDA が認可している物質のみで構成されるミセルである。

構成成分である PEG は FDA が認可している添加物であるが、一方で細胞(マクロファージ、腎尿細管上皮、肝)の空胞化が報告されている。そこで、血中滞留性を担保する PEG の含量を減らし

ても、上記ミセルと同等以上の効果が得られる可能性が高い新規PIC ナノキャリアー(カチオンポリマーをFDA認可の他アミノ酸に換装)による薬効試験を同時に進行させてきた。

その結果、新規 PIC ナノキャリアーは、上記①③④⑤に加えて、

⑥さらに優れた血中滞留性、⑦投与回数を減じても(週3回から週2回)、先行研究対象の PIC ミセル以上の腫瘍増殖抑制効果を示した。

以上より、新規 PIC ミセルに関して GMP 準拠での合成、非臨床試験が不可欠な状況であった。調整費により研究推進した結果、新規 PIC ミセルに関して GMP 準拠での合成体制が構築され、非臨床試験が進行中である。

項目 2 キメラ型 RNAi、及び新規 unit PIC の GMP 準拠製造に関して:

我々の研究チームにおいて、GMP 準拠での核酸合成プロジェクトが進行中である。経費削減の観点から、すでに、大量核酸合成のノウハウを有し、GMP 準拠での核酸合成可能な企業と検討を重ね、最終的に 2~3 万円/g を目標での製剤化を前提に開発を進めている。

また、新規 unit PIC に関して、GMP 準拠製造を日油(株)と検討を行い、体制を構築できた。今後、大量合成の条件検討を行う計画である。

GMP 準拠での大量核酸、及び DDS の合成の端緒にあたり、必要な経費が当初予定より富んだが、調整費をもとに研究を推進し、克服することができた。

D. 考察

がん幹細胞形質と PRDM14 分子の密接な関連性を解明することにより、その発現抑制を可能とする核酸医薬は、単剤、化療剤との併用で、化療剤効果の増強、さらに、経年後再発、遠隔転移に関与するがん幹細胞の撲滅に繋がる可能性が in vitro / in vivo 実験を介して示唆された。

核酸医薬の高いハードルとして、① 核酸の配列特異性・安定性、② 核酸医薬に最適化されたドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発、が知られている。①は真の標的分子の knock down が治療効果、副作用の回避の上で重要である。また、一般的な siRNA は半減期が

極めて短く、治療効果を得る上で頻回投与が必要となり、患者の QOL を低下させてしまう。②に関しては、癌の原発巣以外に転移巣を含めて治療を行う上で不可欠であり、さらに、核酸の血液中ででの安定性の保持、また、EPL 効果による腫瘍細胞への特異的な集積と副作用の回避を可能とする。

①はキメラ型 RNAi を使用することで克服し、②に関しては片岡教授・西山教授の御尽力により、静脈投与で腫瘍縮小効果を示す、可 P ミセル、PIC ミセル等多くのキャリアー剤を in vitro, in vivo 試験に供してきたが、多くの追加試験の結果、unit PIC を剤型として決定した。in vivo モデルにおいて、キメラ RNAi および unit PIC を用いて、化療剤効果の増強、遠隔転移の抑制効果を確認した。

H26 年度の研究課程において、① 実際に臨床試験に用いる剤型として、PRDM14 のキメラ型 RNAi の配列、DDS 剤として新規 unit PIC が選定されたこと、② GMP 準拠の PRDM14 のキメラ型 RNAi の合成、安定供給体制を構築、③ GMP 準拠の新規核酸キャリアの合成に必要な体制を構築した、という成果が得られたことが重要である。②③により、CRO にて各種非臨床試験が進行しており、来年度 1/4 期には試験が終了する運びである。その結果を治験プロトコル原案に反映し、治験審査に進む。

以上より、本シーズは乳がん、膵臓がんの抗癌剤への低感受性、遠隔転移、経年後再発に有効と想定され、医師主導治験へと進み、その成果は、患者 QOL の向上、死亡数の著減へ至ると考えられる。

E. 結論

がん治療において最大の課題は、再発・遠隔転移である。PRDM14 分子はがんの幹細胞性に関与し、PRDM14 分子の治療応用によりこれらの事象を抑制することが可能である。

その発現の抑制を可能とする核酸医薬は、単剤使用、及び術前・術後の化学療法薬との併用で、既存抗癌剤の効果の増強、さらには、経年後の再発、遠隔転移に関与するがん幹細胞の撲滅に繋がり医療現場における必要度は高い。

また、実際の製剤化を視野に入れた製造体制を構築しており、今後、本邦の核酸創薬に大きく貢献できる。世界初の核酸医薬であり、規制当局との折衝が必要であり多くの困難が想定さ

れるが、その結果、核酸医薬の標準化・指針が得られ、日本発の核酸創薬に大きく貢献できることは間違いない。

F. 健康危険情報

特記すべきことは無い。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Adachi Y, Ohashi H, Imsumran A, Yamamoto H, Matsunaga Y, Taniguchi H, Nosho K, Suzuki H, Sasaki Y, Arimura Y, Carbone DP, Imai K, Shinomura Y. The effect of IGF-I receptor blockade for human esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *Tumour Biol*, 35(2): 973-85, 2014.
2. Yamamoto H, Watanabe Y, Maehata T, Morita R, Yoshida Y, Oikawa R, Ishigooka S, Ozawa S, Matsuo Y, Hosoya K, Yamashita M, Taniguchi H, Nosho K, Suzuki H, Yasuda H, Shinomura Y, Itoh F. An updated review of gastric cancer in the next-generation sequencing era: insights from bench to bedside and vice versa. *World J Gastroenterol*. 20:3927-37, 2014.

2. 学会発表

【国際学会】なし
【国内学会】

1. 谷口博昭、山本博幸、越川直彦、今井浩三. “PRDM14 contribution to breast cancer progression and therapeutic model using PRDM14 RNAi” 第23回がん転移学会学術総会. 2014/07/11 金沢
2. 谷口博昭. “Developing novel strategies for treatment on cancer metastasis” 第23回がん転移学会学術総会. 2014/07/11 金沢 (第18回がん転移学会研究奨励賞受賞記念講演)
3. 谷口博昭、前田芳周、宮田完二郎、山

本博幸、片岡一則、今井浩三. 「転写因子 PRDM14 分子を標的とした新規 RNAi-ミセル複合体による乳がん治療法の開発」第30回 DDS 学会. 2014/07/31 東京

4. 谷口博昭、山本博幸、今井浩三. 「ヒストンメチル化転移酵素 PRDM14 分子を標的とした核酸製剤による乳がん治療法の開発」第73回日本癌学会学術総会. 2014/09/27 横浜
5. 山本博幸、渡邊嘉行、及川律子、森田亮、吉田良仁、松尾康正、細谷浩介、山下真幸、前畑忠輝、谷口博昭、能正勝彦、安田 宏、伊東文生. 「内視鏡胃洗浄廃液 DNA を用いた BARHL2 遺伝子メチル化解析は胃癌の早期発見に有用である」第73回日本癌学会学術総会. 2014/09/26 横浜

3. 講演

谷口博昭. 「乳がんを対象としたヒストンメチル基転移酵素を標的とする新規核酸製剤の開発」文部科学省・次世代がんシーズ戦略的育成プログラム公開シンポジウム「革新的創薬シーズを活かす最先端 DDS・イメージング技術」 2014/10/16 東京コンファレンスセンター有明

4. 新聞掲載

「乳がん細胞へ カプセルで薬」東大、治験を開始 (2014年12月30日 日本経済新聞朝刊 9ページ)

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許出願

谷口博昭、今井浩三、片岡一則、西山伸宏、宮田完二郎、前田芳周、「がん幹細胞分子マーカー」発明等の届出書提出日:2013年7月10日(公開番号:特願 2015-33381)

② 実用新案登録 なし

③ その他 なし

II. 分担研究報告

PRDM14 核酸医薬実現に必要な非臨床試験及び規制に関する研究

研究分担者 長村 文孝 東京大学医科学研究所先端医療開発推進分野教授

研究要旨：本研究は乳がん発症に関するPRDM14をターゲットとした医薬品開発を目的としている。siRNA は、設計の容易さと特異性及び安定性に優れており、本研究においてPRDM14 をターゲットとして医薬品開発するための手法として用いている。本研究においては、①核酸医薬品として siRNA の製剤化とドラッグデリバリーシステム(DDS)の決定、②治験実施に必要な非臨床試験の情報収集、③医薬品医療機器総合機構(PMDA)との協議を踏まえた非臨床試験の策定と実施を主に行う。平成 26 年度は研究代表者の谷口とともに siRNA と DDS の規格決定および委託先企業の絞り込みを行った。また、今後の非臨床試験の実実施計画について委託先企業と協議を重ね、今後の非臨床試験実施の目処及び臨床試験実施に目処をつけることができた。

A. 研究目的

本事業に於いては、これまでの研究において乳がんの発がん機序、特にがん細胞の幹細胞特性あるいは薬剤耐性について重要な働きを果たしていると考えられる分子であるPRDM14に注目し、これをターゲットとした医薬品開発を行うことを目的としている。PRDM14に作用するための手段としてsiRNAを選択し、これにDDSを組み合わせることによって必要な製剤化としての規格を決定し、治験実施に必要な非臨床試験の実施を行う。核酸医薬開発は、まだガイドラインが乏しく、規制情報に関しても十分とは言えない。そこで本研究では、核酸医薬開発に必要な非臨床試験の実施とそのために必要な製剤としての規格決定及び非臨床試験の立案と実施に必要な情報収集と規制対応を行い、円滑な開発を行うことを目的とする。

B. 研究方法

医薬品としての規格決定には、siRNAの最適な配列の決定とこれに合ったDDSの選択が必要である。研究代表者・谷口と共同してこれらを特に有効性と安全性の観点から決定する。核酸医薬品開発についての情報収集は、①国内外の法規・ガイドライン、審査資料、審査報告書等の公開資料の収集と分析、②関連文献の収集と分析、③関連学会での情報収集と研究者あるいは規制当局担当官へのインタビューを行う。また、収集した情報を元にGLP準拠非臨床試験実施機関との協議を行い必要な非臨床試験の件等を行う。

(倫理面への配慮)

公開情報の収集と分析を行い、人あるいは動物

への投与は本研究では実施しないため該当せず。ただし、非臨床試験実施機関には実験動物の愛護を徹底させる。

C. 研究結果

核酸医薬は、平成25年にアンチセンスDNAのKynamroが静注薬として初めて承認（眼内注入は1剤が承認済み）され、世界的に注目されているが、siRNAは医薬としてはまだ承認には至っていない。その理由として、①体内での安定性、②最適配列の決定の困難さ、③非臨床試験及び臨床試験で用いる製剤の大量かつ適切な価格での入手の困難さ、④DDSと組み合わせる必要があること、が挙げられる。ガイドラインや規制情報はAmerican Society of Clinical Oncologyで米国の規制当局関係者からは作成の情報は何れなかったものの治験の実施は増加しており、再び核酸医薬品の開発が盛んとなってきていることが判明した。

体内での安定性はDDSとの組み合わせで解決できる問題ではあるが、非臨床試験でのバリデーション試験、体内動態の測定においては安定性が最低限確保できないと開発に困難をきたす。このためキメラ型siRNAを用いることとした。安定であるだけでなく、製造コストの抑制にも繋がることを判明した。

最適配列の絞り込みは共同研究者の名取らと実施し、今年度は、動物実験結果により配列を決定し、2剤のsiRNA（配列）ではなく、1剤のsiRNAを用いることを決定した。これらの配列について、また、核酸医薬品として開発することについての特許の侵害について検討を行ったが、ロードマップ等を考慮し、開発に特に支

障を来すものはないことが判明した。

非臨床試験は、血清での測定をLC-MS/MS法で実施できることに目処がついたことから、どのような動物系を用いて実施するかを検討を行った。これらをふまえ、トキシコカインेटィクス測定バリデーション(ラット、LS-MS/MS法)、安定性試験、合剤としての濃度分析バリデーション試験、合剤の分析条件最適化検討試験、合剤からのsiRNAの解離条件決定試験、合剤投与後のラット血漿中siRNA濃度確認試験、合剤投与後のコモンマーモセット・及びカニクイザルでの濃度確認試験、コモンマーモセット・及びカニクイザルでのトキシコカインेटィクス測定バリデーション試験、コモンマーモセット及びカニクイザルでのPK比較試験、ラットの単回及び反復投与毒性試験、サルでの単回及び反復毒性試験、製剤の分析条件からなる非臨床試験を実施することとした。なお、サルでの検討は、投与製剤量が少なくすむコモンマーモセットか、血清量を確保でき、また、動物実施系として確立されているアカゲザルのどちらを用いるかについて検討を行った。核酸医薬品としての実験系としてはどちらの種も確立はされていないもの、経静脈投与を想定していることと、生化学その他の非臨床試験としての十分な血清量を確保することが望ましいことからアカゲザルを用いることとした。

siRNAを含む核酸製剤の開発における問題点は、GMPグレードの製剤を安価に確保することが困難であることが挙げられる。国内企業も核酸医薬品としての製造を開始することが判明したが、製造開始日は本事業では間に合わず、また、製造量も不足することが判明した。国外企業では大量製造が可能である企業はあるものの、規制当局の査察を受け、GMP準拠の製造が保証される企業はまれであった。このうち1社が価格としても核酸医薬品開発として競争力を有することのできる価格で製造委託が可能であることが判明し、非臨床試験で用いるsiRNAを確保することができた。DDSは共同研究者の片岡の保有する製剤のうち、ユニットPICを用いることを決定し、国内企業で製造可能な企業と検討を行い、非臨床試験のうちGLP試験で用いる品質と、医師主導治験で用いる品質の製剤の製造委託と製品の確保が可能となった。

DDSは共同研究者の片岡が開発したDDSを複数種谷口と検討したが、構造的安定であり、組織親和性が高く、また、原材料が米国FDAで認可されており、安全性の梟がすくなくと推定されるユニットPICを用いることが決定した。

医師主導治験を実施するためには、非臨床試験を進めているこの段階から投与方法、スケジュール、実施体制を構築していく必要があるが、東大医科研の生物統計家の参加した実施計画書等の作成、あるいは自ら治験を実施しようとする者及びこの監督下で治験を実施する体制を構築した。

D. 考察

核酸医薬品、特にsiRNA製剤開発に必要な情

報収集を国内外から行った。その結果、今後の非臨床試験を策定する上で必要と考えられる情報を得ることができた。しかし、国内での核酸医薬品医療機器総合機構と厚生労働省がすすめる革新的核酸医薬品・医療機器・再生医療実用化促進事業で核酸医薬品開発に対するガイドラインの整備を進めており、開発が国内外で再び急速に進められ、また、各規制当局もガイドライン等を整備しているため、次の治験段階でも引き続き情報の収集と対応を行うことが必要である。

非臨床試験での実施項目に本研究で目処を付けることができ、また、次のステップである医師主導治験の実施準備を行うことができたので、治験として開発を進め、連携することのできる製薬企業を選定し、核酸医薬品として開発することが必要である。

E. 結論

PRDM14に対するsiRNAとDDSとの合剤としての核酸医薬品開発について、非臨床試験の計画を決定した。非臨床及び医師主導治験で用いるsiRNAとDDSの製造を委託する企業を決定した。非臨床試験の完遂に向けて現時点では、大きな考慮事項はなく、今後の医師主導治験に向けて必要な準備および製造と非臨床試験に必要な体制と準備を整えることができた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- Ohashi K, Nagamura-Inoue T, Nagamura F, Tojo A, Miyamura K, Mori T, Kurokawa M, Taniguchi S, Ishikawa J, Morishima Y, Atsuta Y, Sakamaki H. Effect of graft sources on allogeneic hematopoietic stem cell transplantation outcome in adults with chronic myeloid leukemia in the era of tyrosine kinase inhibitors: a Japanese Society of Hematopoietic Cell Transplantation retrospective analysis. *Int J Hematol* 100 296-306 2014
- 長村文孝 トランスレーショナルリサーチの重要性 病院 73(7) 540-544 2014

2. 学会発表

- Noriko Fujiwara, Fumitaka Nagamura, Kazufumi Matsumoto, Naohide Yamashita, Yukie Takemura, Kiyoko Kamibeppu. Nursing Education Program on Translational Research as a Master's Course. International Association of Clinical Research Nurses. 2014

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし

核酸医薬のデリバリーシステムの構築、および非臨床試験

研究分担者 片岡一則 東京大学大学院工学系研究科/医学系研究科 教授

研究要旨

本研究では、研究分担者の西山と連携して、*in vivo* 応用が可能な siRNA デリバリーシステムの開発を行っている。前年度までは、新たな siRNA デリバリーシステムとして、分岐型 PEG-poly(L-Lysine)(PEGasus-PLys)ブロック共重合体 2 分子と siRNA 1 分子から形成されるユニット PIC 型 siRNA キャリアを構築し、その固形がんの分子治療における有用性を実証した。そこで本年度は、ユニット PIC 型 siRNA キャリアが優れた血中滞留性を示すメカニズムとして、ユニット PIC とフリーの PEGasus-PLys の間に動的平衡状態が存在することを、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)法により明らかにした。さらに、ユニット PIC の安全性を生理学的パラメーターの測定により評価した。

A. 研究目的

核酸医薬の実用化に向けた最大の課題は、安全かつ効率的に核酸分子を標的細胞まで送達することのできるキャリアシステムの開発である。現在、カチオン性脂質やカチオン性高分子から形成される siRNA キャリアの開発が世界中で活発に行われており、一部に肝臓に対する高いデリバリー効率が認められているものの、固形がん等のその他の臓器・組織に対して全身投与で siRNA を送達できるキャリアシステムは未だ開発されていない。このような背景において、近年、片岡と西山は poly(ethylene glycol)-poly(L-lysine)(PEG-PLys)および分岐状の PEG 鎖を有する PEGasus-poly(L-Lysine)(PEGasus-PLys)と 1 分子の siRNA がポリイオンコンプレックス(PIC)を形成することを見出し、ユニット PIC 型 siRNA キャリアと名付けて開発を進めてきた(図 1)。

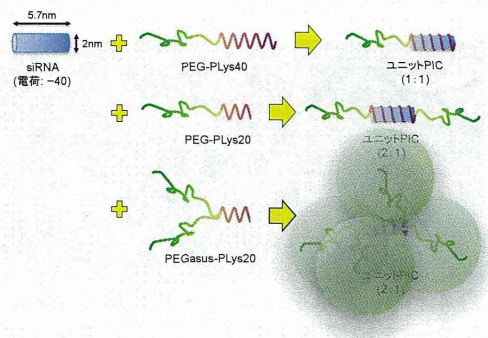


図 1. ユニット PIC 型 siRNA キャリアの模式図

前年度までの研究により、ユニット PIC

型 siRNA キャリアは、優れた血中滞留性と固形がん集積性を示すことが確認された。さらに、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)および PRDM14 を標的とする siRNA のデリバリーにより固形がんの増殖が有意に抑制されることが確認された。そこで本年度は、ユニット PIC 型 siRNA が優れた血中滞留性を示すメカニズムとして、ユニット PIC とフリーの PEGasus-PLys の間に動的平衡状態が存在することを、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)法により明らかにした。さらに、ユニット PIC の安全性を生理学的パラメーターの測定により評価した。

B. 研究方法

1) FRET 法によるユニット PIC 型 siRNA キャリアの動的平衡状態の評価

前年度までの研究により、ユニット PIC の血中滞留性は、N/P 比(siRNA 中のリン酸残基に対する PLys 中のアミノ基のモル比)に依存し、N/P=10 において極めて優れた血中滞留性を示すことが確認されている。一方、ユニット PIC は、siRNA 1 分子とポリマー 2 分子で定量的に形成されることが確認されており、N/P=10 では 18 分子の余剰のポリマーが存在することになる。この結果より、血中に存在するフリーの PEGasus-PLys がユニット PIC の安定化に寄与しているものと考えられる。そこで我々は、ユニット PIC と PEGasus-PLys の間に動的平衡関係が存在するという仮説を立て、それを立証するための実験を実施した。

具体的には、siRNA および PEGasus-PLys をそれぞれ Alexa647 および Alexa 594 で標識し、Alexa 594 から Alexa647 への FRET

を示すユニット PIC を構築した。このユニット PIC を BALB/c マウスの静脈内に投与し、耳介の血管中の FRET による蛍光を経時的に *in vivo* 共焦点顕微鏡を用いて評価した。ユニット PIC と PEGasus-PLys の間の動的平衡関係の有無を評価する目的においては、FRET を示すユニット PIC の投与 5 分後に非標識の PEGasus-PLys をさらに投与し、FRET の蛍光強度を経測定する実験を行った。



図 2. *in vivo* 共焦点顕微鏡による血中の FRET の評価

2) ユニット PIC 型 siRNA キャリアの安全性評価

BALB/c (雄, 6 週令, n=6) に 2 nmol の siRNA(配列 Plk-1)を搭載したユニット PIC を 2 日おきに 5 回静脈内投与し、14 日目に血液を回収した (前年度に報告した抗腫瘍効果の試験と同じ条件)。その後、血球数と生理学的パラメーターを測定した。

(倫理面への配慮)

本研究成果においける動物実験に関しては、事前に動物実験計画書を提出し、東京大学の動物実験委員会による承認を得た上で実施した。動物実験を行うすべての者は、大学主催の動物実験教育訓練を受講し、認定を受けた上で、「動物の保護および管理に関する法律」などに従い、動物愛護の観点に十分に配慮した上で実験を行っている。

C. 研究結果

1) FRET 法によるユニット PIC 型 siRNA キャリアの動的平衡状態の評価

Alexa647 標識 siRNA と Alexa594 標識 PEGasus-PLys から形成されるユニット PIC は FRET を示す(図 3)。ここで、ユニット PIC と PEGasus-PLys の間に動的平衡関係が存在する場合、非標識の PEGasus-PLys

を添加するとユニット PIC の Alexa594 標識 PEGasus-PLys と非標識の PEGasus-PLys の交換反応が生じるために、FRET の効率が低下する(図 3)。本実験では、この実験を *in vivo* 共焦点顕微鏡を用いてマウスの体内で実施することによって、血中のユニット PIC と PEGasus-PLys の間の動的平衡関係を調べることにした。

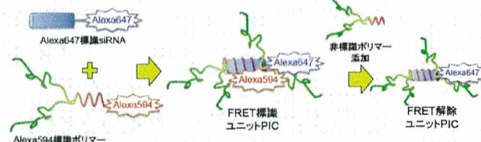


図 3. FRET を示す 2 重蛍光標識ユニット PIC の調製と非標識ポリマーの添加によるユニット PIC とポリマー間の動的平衡関係の評価

Alexa647 と Alexa594 で標識されたユニット PIC は、FRET によって Alexa 594 の励起により Alexa647 の蛍光 (赤) を示す。この FRET による赤の蛍光は、血流中においても変化しないことから、ユニット PIC は血中においても安定であることが確認された。ここに時間差で生理食塩水および非標識の PEGasus-PLys の投与を行ったところ、生理食塩水の場合は蛍光強度に変化が認められなかったが(図 4 左)、PEGasus-PLys の投与においては FRET 効率の低下が認められ、Alexa594 由来のマゼンタの蛍光が確認された(図 4 右)。この傾向は、FRET 効率の評価によって定量的にも確認され、生理食塩水の投与においては FRET 効率に変化は見られないが、非標識ポリマーの投与においては FRET 効率が 55%程度まで低下することが分かった。

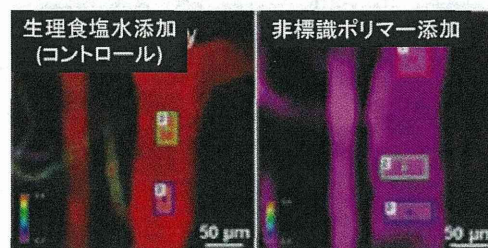


図 4. FRET を示すユニット PIC に非標識ポリマーを時間差で投与した際の血中における FRET (赤 : Alexa647、マゼンタ : Alexa594)

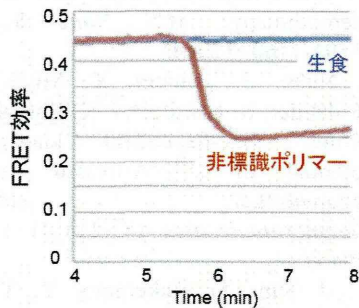


図 5. マウスの血中における FRET 効率の変化

2) 固形がんへのユニット PIC 型 siRNA キャリアの集積と siVEGF のデリバリーによる分子治療

前年度までに膵臓がんをはじめとする種々の固形がんモデルに対して有効性が確認されている条件でユニット PIC を投与し、14 日後にマウスを犠牲死させ、血球数および生理学的パラメーターの評価を行った(表 1)。まず、本実験のすべての期間において、ユニット PIC の投与によるマウスの体重変化は認められなかった。また、血球数および生理学的パラメーターに関しても、すべての数値においてコントロール群との有意な差は認められなかった。以上の結果より、ユニット PIC は、高い安全性を有するものと考えられる。

表 1. ユニット PIC 投与後の生理学的パラメーターの変化

	WBC ($\times 10^7$ uL)	Neutro ($\times 10^7$ uL)	Lymph ($\times 10^7$ uL)	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinin (mg/dL)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Alkaline Phosphatase ($\times 10$ IU/L)
生理食塩水	49 ± 7	15 ± 3	29 ± 2	4.3 ± 0.1	2.4 ± 0.0	16 ± 1	0.10 ± 0.02	41 ± 4	23 ± 1	43 ± 5
ユニットPIC	49 ± 5	14 ± 2	29 ± 3	4.1 ± 0.1	2.4 ± 0.0	18 ± 1	0.11 ± 0.01	35 ± 3	25 ± 7	49 ± 2

D. 考察

前年度までの研究により、PEGasus-PLys と siRNA を混合することにより、1 分子の siRNA を搭載したユニット PIC が構築されることを見出した。このユニット PIC は、従来の siRNA キャリアと比較して、高い血中滞留性(血中半減期~3 時間)と固形がん集積性を示し、種々の固形がんモデルに対して siRNA のデリバリーに基づく有意な抗腫瘍効果を示すことも明らかになった。そこで本年度は、ユニット PIC が長期

血中滞留性を示すメカニズムを明らかにするために、ユニット PIC と PEGasus-PLys の間の動的平衡関係を FRET を利用して検討した(図 3)。この FRET の実験は、共焦点顕微鏡を利用してマウスの耳介の血管の蛍光を観察することにより、生きているマウスの体内で行うことが可能である(図 2)。本実験の結果、非標識の PEGasus-PLys を投与しない条件においては、FRET 効率は変化しなかったが、非標識の PEGasus-PLys を投与した場合には、FRET 効率の顕著な低下が認められた(図 4、5)。これらの結果より、図 6 に示すように、ユニット PIC とフリーの PEGasus-PLys の間には動的平衡状態が存在するものと考えられ、フリーの PEGasus-PLys がユニット PIC の長期血中滞留性に寄与しているものと思われる。すなわち、ユニット PIC は、血中でタンパク質等の様々な生体分子との相互作用によって不安定化を受けても、フリーの PEGasus-PLys が速やかにユニット PIC を形成し、siRNA を保護する機能が働いているものと考えられる。以上のように、本年度の研究によって、ユニット PIC 型 siRNA キャリアが優れた血中滞留性を示すメカニズムに関して、従来には無い新しい概念を提唱することができた。

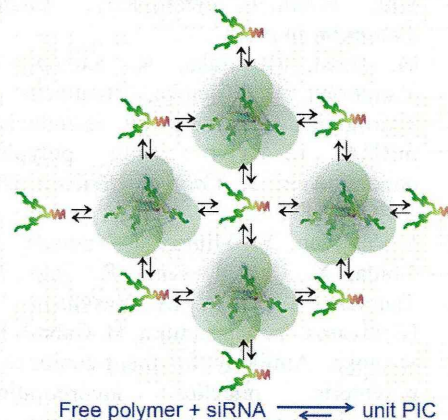


図 6. siVEGF を内包したユニット PIC による治療後の血管密度の変化

一方、ユニット PIC 型 siRNA キャリアの安全性に関しては、制がん活性試験で著効が確認された投与スケジュールにおけるマウスの体重変化および血球数、生理学的パラメーターの変化を評価した。その結果、

それらのすべての数値においてコントロール群との有意な差は認められられず、ユニットPICは、高い安全性を有することが示唆された。

E. 結論

以上のように、本年度は、前年度までの研究により優れた血中滞留性と固形がん集積性、さらには固形がんモデルに対する有意な治療効果が確認されているユニットPIC型siRNAキャリアが優れた血中滞留性を示すメカニズムを検証し、フリーのPEGasus-PLysがユニットPICの安定化に寄与する新しい概念を提唱した。さらに、ユニットPIC型siRNAキャリアの安全性を検証し、治療実験と同等の条件において、マウスの体重および血球数、生理学的パラメーターに変化が見られないことを確認した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) H. Gao, H. Takemoto, Q. Chen, M. Naito, H. Uchida, X. Liu, K. Miyata, K. Kataoka, Regulated protonation of polyaspartamide derivatives bearing repeated aminoethylene side chains for efficient intracellular siRNA delivery with minimal cytotoxicity. *Chem. Commun.* in press
- 2) M. Baba, K. Itaka, K. Kondo, T. Yamasoba, K. Kataoka, Treatment of neurological disorders by introducing mRNA in vivo using polyplex nanomicelles. *J. Control. Release* 201 41-48 (2015)
- 3) J. -Y. Ahn, Y. Miura, N. Yamada, T. Chida, X. Liu, A. Kim, R. Sato, R. Tsumura, Y. Koga, M. Yasunaga, N. Nishiyama, Y. Matsumura, H. Cabral, K. Kataoka, Antibody fragment-conjugated polymeric micelles incorporating platinum drugs for targeted therapy of pancreatic cancer. *Biomaterials* 39 23-30 (2015)
- 4) H.-C. Yen, H. Cabral, P. Mi, K. Toh, Y. Matsumoto, X. Liu, H. Koori, A. Kim, K. Miyazaki, Y. Miura, N. Nishiyama, K. Kataoka, Light-induced cytosolic activation of reduction-sensitive camptothecin-loaded polymeric micelles for spatiotemporally controlled in vivo chemotherapy. *ACS Nano* 8 (11) 11591-11602 (2014)
- 5) L. Nuhn, S. Tomcin, K. Miyata, V. Mailander, K. Landfester, K. Kataoka, R. Zentel, Size-dependent knockdown potential of siRNA-loaded cationic nanohydrogel particles. *Biomacromolecules* 15 (11) 4111-4121 (2014)
- 6) H. -J. Kim, H. Takemoto, Y. Yi, M. Zheng, Y. Maeda, H. Chaya, K. Hayashi, P. Mi, F. Pittella, R. J. Christie, K. Toh, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Precise engineering of siRNA delivery vehicles to tumors using polyion complexes and gold nanoparticles. *ACS Nano* 8 (9) 8979-8991 (2014)
- 7) H. Wu, H. Cabral, K. Toh, P. Mi, Y.-C. Chen, Y. Matsumoto, N. Yamada, X. Liu, H. Kinoh, Y. Miura, M. R. Kano, H. Nishihara, N. Nishiyama, K. Kataoka, Polymeric micelles loaded with platinum anticancer drugs target preangiogenic micrometastatic niches associated with inflammation. *J. Control. Release* 189 1-10 (2014)
- 8) H. Uchida, K. Itaka, T. Nomoto, T. Ishii, T. Suma, M. Ikegami, K. Miyata, M. Oba, N. Nishiyama, K. Kataoka, Modulated protonation of side chain aminoethylene repeats in N-substituted polyaspartamides promotes mRNA transfection. *J. Am. Chem. Soc.* 136 (35) 12396-12405 (2014)
- 9) Y. Oe, R. J. Christie, M. Naito, S. A. Low, S. Fukushima, K. Toh, Y. Miura, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Actively-targeted polyion complex micelles stabilized by cholesterol and disulfide cross-linking for systemic delivery of siRNA to solid tumors. *Biomaterials* 35 27 7887-7895 (2014)
- 10) S. Quader, H. Cabral, Y. Mochida, T. Ishii, X. Liu, K. Toh, H. Kinoh, Y. Miura, N. Nishiyama, K. Kataoka, Selective intracellular delivery of proteasome inhibitors through pH-sensitive polymeric micelles directed to efficient antitumor therapy. *J. Control. Release* 188 67-77 (2014)

- 11) Y. Mochida, H. Cabral, Y. Miura, F. Albertini, S. Fukushima, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Bundled assembly of helical nanostructures in polymeric micelles loaded with platinum drugs enhancing therapeutic efficiency against pancreatic tumor. *ACS Nano* 8 (7) 6724-6738 (2014)
 - 12) S. Chuanoi, Y. Anraku, M. Hori, A. Kishimura, K. Kataoka, Fabrication of polyion complex vesicles with enhanced salt and temperature resistance and their potential applications as enzymatic nanoreactors. *Biomacromolecules* 15 (7) 2389-2397 (2014)
 - 13) K. Furugaki, L. Cui, Y. Kunisawa, K. Osada, K. Shinkai, M. Tanaka, K. Kataoka, K. Nakano, Intraperitoneal administration of a tumor-associated antigen SART3, CD40L, and GM-CSF gene-loaded polyplex micelle elicits a vaccine effect in mouse tumor models. *PLOS ONE* 9 7 e101854 (2014)
 - 14) Y. Maeda, F. Pittella, T. Nomoto, H. Takemoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Fine-tuning of charge-conversion polymer structure for efficient endosomal escape of siRNA-loaded calcium phosphate hybrid micelles. *Macromol. Rapid Commun.* 35 13 1211-1215 (2014)
 - 15) A. Dirisala, K. Osada, Q. Chen, T. A. Tockary, K. Machitani, S. Osawa, X. Liu, T. Ishii, K. Miyata, M. Oba, S. Uchida, K. Itaka, K. Kataoka, Optimized rod length of polyplex micelles for maximizing transfection efficiency and their performance in systemic gene therapy against stroma-rich pancreatic tumors. *Biomaterials* 35 (20) 5359-5368 (2014)
 - 16) L. Nuhn, S. Gietzen, K. Mohr, K. Fischer, K. Toh, K. Miyata, Y. Matsumoto, K. Kataoka, M. Schmidt, R. Zentel, Aggregation behavior of cationic nanohydrogel particles in human blood serum. *Biomacromolecules* 15 (4) 1526-1533 (2014)
 - 17) T. Ueno, K. Endo, K. Hori, N. Ozaki, A. Tsuji, S. Kondo, N. Wakisaka, S. Murono, K. Kataoka, Y. Kato, T. Yoshizaki, Assessment of antitumor activity and acute peripheral neuropathy of 1,2-diaminocyclohexane platinum (II)-incorporating micelles (NC-4016). *Int. J. Nanomedicine* 9 (1) 3005-3012 (2014)
 - 18) K. Nagata, K. Itaka, M. Baba, S. Uchida, T. Ishii, K. Kataoka, Muscle-targeted hydrodynamic gene introduction of insulin-like growth factor-1 using polyplex nanomicelle to treat peripheral nerve injury. *J. Control. Release* 183 27-34 (2014)
 - 19) S. Murayama, P. Kos, K. Miyata, K. Kataoka, E. Wagner, M. Kato, Gene regulation by intracellular delivery and photodegradation of nanoparticles containing small interfering RNA. *Macromol. Biosci.* 14 (5) 626-631 (2014)
 - 20) H. -J. Kim, K. Miyata, T. Nomoto, M. Zheng, A. Kim, X. Liu, H. Cabral, R. J. Christie, N. Nishiyama, K. Kataoka, siRNA delivery from triblock copolymer micelles with spatially-ordered compartments of PEG shell, siRNA-loaded intermediate layer, and hydrophobic core. *Biomaterials* 35 (15) 4548-4556 (2014)
 - 21) Wibowo, K. Osada, H. Matsuda, Y. Anraku, H. Hirose, A. Kishimura, K. Kataoka, Morphology control in water of polyion complex nanoarchitectures of double-hydrophilic charged block copolymers through composition tuning and thermal treatment. *Macromolecules* 47 (9) 3086-3092 (2014)
 - 22) T. Nomoto, S. Fukushima, M. Kumagai, K. Machitani, Arnida, Y. Matsumoto, M. Oba, K. Miyata, K. Osada, N. Nishiyama, K. Kataoka, Three-layered polyplex micelle as a multifunctional nanocarrier platform for light-induced systemic gene transfer. *Nat. Commun.* 5 3545 (2014)
 - 23) F. Pittella, H. Cabral, Y. Maeda, P. Mi, S. Watanabe, H. Takemoto, H. -J. Kim, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Systemic siRNA delivery to a spontaneous pancreatic tumor model in transgenic mice by PEGylated calcium phosphate hybrid micelles. *J. Control. Release* 178 18-24 (2014)
2. 学会発表
- 1) K. Kataoka, Block copolymer micelles as smart nano carriers for targeted drug delivery, 5th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2014 (PSWC),

- 2014.04.16, Melbourne, Australia, 基調講演
- 2) K. Kataoka, Block copolymer micelles as smart nanocarriers for targeted drug delivery, CACO-PBSS Cancer Nanotherapeutics Workshop, 2014.04.23, Crowne Plaza Hotel, Foster City, California, USA, 招待講演
 - 3) K. Kataoka, Block copolymer micelles as smart nanocarriers for targeted drug delivery, Seminar at Eshelman School of Pharmacy, University of North Carolina, 2014.04.25, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, USA, 招待講演
 - 4) 片岡一則, 未来の医療を変えるナノDDS～あらゆる微小空間で生体機能をコントロールする革新技術の創製～, 2014 年度グレーター東大塾 超高齢社会日本を支える医療技術と社会システム, 2014.05.14, 東京大学伊藤国際研究センター 中教室 文京区 東京都, 招待講演
 - 5) 片岡一則, 高分子ナノテクノロジーによる標的指向型創薬, 第 55 回日本神経学会学術大会, 2014.05.21, 福岡国際会議場・福岡サンパレス・福岡国際センター 福岡市 福岡県, 招待講演
 - 6) 片岡一則, ナノマテリアルから広がる医療イノベーション- 高分子ミセルによるがんの標的治療 - 第41回日本毒理学学会学術年会, 2014.07.02, 神戸コンベンションセンター 神戸市 兵庫県, 特別講演
 - 7) K. Kataoka, Nanomaterials as 'the magic bullet' to eradicate cancer, The 15th Anniversary Symposium of Science and Technology of Advanced Materials, 2014.07.03, Sanjo Conference Hall, Bunkyo, Tokyo, 招待講演
 - 8) K. Kataoka, Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanosystems from functionalized block copolymers, NanoBio Australia 2014 5th International NanoBio Conference & 3rd International Conference on BioNano Innovation (ICBNI), 2014.07.08, The University of Queensland, Brisbane, Australia, 招待講演
 - 9) 片岡一則, スマートライフケア社会への変革を先導するナノバイオテクノロジー～あらゆる微小空間で生体機能をコントロールする革新技術の創製～, 実験動物中央研究所平成 26 年度(第 33 回)学術懇話会, 2014.07.24, 学士会館 千代田区 東京都, 招待講演
 - 10) K. Kataoka, Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanosystems from functionalized block copolymers, ISACS15 Challenges in Nanoscience, 2014.08.18, University of California, San Diego Price Center, San Diego, California, USA, 総会講演
 - 11) 片岡一則, 未来の医療を変えるナノDDS～あらゆる微小空間で生体機能をコントロールする革新技術の創製～, 東大柏ベンチャープラザ 10 周年記念, 2014.09.04, 東京大学柏の葉キャンパス駅前サテライト 柏市 千葉県, 招待講演
 - 12) K. Kataoka, Block copolymer micelles as smart nanosystems for targeted drug delivery, MGH-UTokyo Symposium 2014 "Frontiers in Biomedical Engineering", 2014.09.24, Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, USA, 招待講演
 - 13) 片岡一則, スマートライフケア社会への変革を先導するナノバイオテクノロジー～あらゆる微小空間で生体機能をコントロールする革新技術の創製～, 三井物産研究所 第 16 回最先端材料技術調査研究委員会, 2014.09.30, 川崎生命科学・環境研究センター 川崎市 神奈川県, 招待講演
 - 14) K. Kataoka, Block copolymer micelles as smart nanosystems for targeted drug delivery, 11th France-Japan DDS Symposium "Recent Achievements and Further Challenges in Drug Delivery Research", 2014.10.08, Awaji Yumebutai International Conference Center, Hyogo, Japan, 招待講演
 - 15) K. Kataoka, Smart targeted therapy by self-assembled supramolecular

- nanosystems, JSPS A3 Foresight International Symposium on Nano-Biomaterials and Regenerative Medicine, 2014.10.09, Tokyo Women's Medical University, Shinjuku, Tokyo, 招待講演
- 16) 片岡一則, 超分子ナノマシンによる薬物・遺伝子のピンポイントデリバリー, 第 79 回日本泌尿器科学会東部総会, 2014.10.14, パシフィコ横浜 横浜市 神奈川県, 教育講演
- 17) 片岡一則, ナノテクノロジーで創る魔法の弾丸～がんの標的治療への挑戦～, 第 42 回日本潰瘍学会, 2014.11.01, 慶応義塾大学芝共立キャンパス 港区 東京都, 特別講演
- 18) K. Kataoka, Nanotechnology to develop "the magic bullet" for targeted cancer therapy, 27th International Microprocesses and Nanotechnology Conference (MNC 2014), 2014.11.05, Hilton Fukuoka Sea Hawk, Fukuoka, Fukuoka, 招待講演
- 19) 片岡一則, Smart targeted therapy by self-assembled supramolecular nanosystems, 第 30 回(2014)京都賞記念ワークショップ先端技術部門「バイオマテリアル研究の最前線」/The 2014 Kyoto Prize Workshop in Advanced Technology, 2014.11.12, 国立京都国際会館 京都市 京都府 /Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan, 招待講演
- 20) K. Kataoka, Targeted chemo- and molecular-therapy by self-assembled supramolecular nanomedicines, The 10th International Polymer Conference IPC2014, 2014.12.04, International Congress Center, Tsukuba, Ibaraki, 招待講演
- 21) 片岡一則, 高分子ミセル医薬: その特徴と将来展望, 日本 DDS 学会創立 30 周年シンポジウム, 2014.12.15, 東京ガーデンパレス 文京区 東京都, 招待講演
- 22) K. Kataoka, Block copolymer micelles as smart nanosystems for drug targeting, The 1st International Symposium on Translational Nanomedicine, 2015.01.09, Sun Yat-Sen University (SYSU), Guangzhou, China, 基調講演
- 23) 片岡一則, ナノ DDS 技術による均質・高付加価値な難病治療・再生医療の実現, 第 3 回 国際先端生物学・医学・工学会議 (ICIBME 2015), 2015.01.15, 名古屋大学 豊田講堂シンポジオン 名古屋市、愛知県, 基調講演
- 24) 片岡一則, 未来の医療を変えるナノ DDS ～あらゆる微小空間で生体機能をコントロールする革新技術の創製～, 新春特別講演会「未踏科学技術 2015」, 2015.01.20, 公益財団法人日本化学会化学会館 千代田区 東京都, 招待講演

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

- 1.特許取得
特になし
- 2.実用新案登録
特になし
- 3.その他
特になし

核酸医薬のデリバリーシステムの構築、および非臨床試験

研究分担者 西山伸宏 東京工業大学 資源化学研究所 教授

研究要旨

本研究では、研究分担者の片岡と連携して、*in vivo* 応用が可能な siRNA デリバリーシステムの開発を行っている。前年度までは、リン酸カルシウム(CaP)を主成分とする高分子ミセルの開発を行う一方で、片岡と共に 1 分子の siRNA が PEG-poly(L-Lysine)ブロック共重合体により安定化されたユニット PIC 型 siRNA キャリアの開発を進めてきた。そこで本年度は、ユニット PIC の固形がんへのデリバリー効率を高めることを目的として、ブロック共重合体の末端に導入したチオール基を介して金ナノ粒子の表面に導入し、コア-シェル型のミセル様ナノ粒子を構築した。構築したナノ粒子については、培養がん細胞による取り込み、ルシフェラーゼ遺伝子のノックダウン効率等の評価を行い、さらに担がんマウスを用いた動物実験により、血中滞留性、固形がん集積性、遺伝子ノックダウン活性を評価した。

A. 研究目的

核酸医薬の実用化に向けた最大の課題は、安全かつ効率的に核酸分子を標的細胞まで送達することのできるキャリアシステムの開発である。現在、カチオン性脂質やカチオン性高分子から形成される siRNA キャリアの開発が世界中で活発に行われており、一部に肝臓に対する高いデリバリー効率が認められているものの、固形がん等のその他の臓器・組織に対して全身投与で siRNA を送達できるキャリアシステムは未だ開発されていない。このような背景において、近年、西山は、片岡と共に 1 分子の siRNA が PEG-poly(L-Lysine) ブロック共重合体により安定化されたユニット PIC が形成されることを見出し(図 1)、その siRNA キャリアとしての応用を行ってきた。本年度は、ユニット PIC の固形がんへのデリバリー効率を高めることを目的として、ブロック共重合体の末端に導入したチオール基を介して金ナノ粒子の表面に導入し、コア-シェル型のミセル様ナノ粒子を構築し(図 2)、その *in vitro* および *in vivo* 評価を実施した。

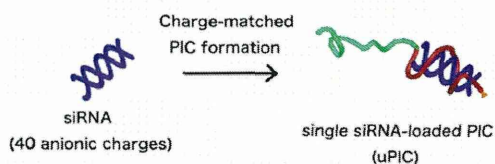


図 1. siRNA1 分子を搭載したユニット PIC (uPIC) の形成

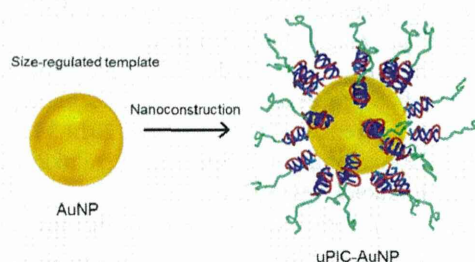


図 2. ユニット PIC/金ナノ粒子 (AuNP) 複合体

B. 研究方法

1) ユニット PIC/金ナノ粒子複合体の調製

PEG-poly(L-Lysine)の合成は、PEG-NH₂を開始剤として L-Lys(TFA)の N-カルボン酸無水物(NCA)の開環重合により合成し、アミン末端に SPDP を反応させることによりチオール基を導入した。ここでは siRNA とポリカチオンの鎖長が一致するように、40 量体の poly(L-Lysine)を合成した。PEG-poly(L-Lysine)と siRNA を 10mM PBS(pH7.2)中で混合することによりユニット PIC を形成させ、金ナノ粒子(AuNP)と混合することにより、チオール基と金との相互作用を介してユニット PIC が表面に導入された AuNP を調製した。

2) ユニット PIC/金ナノ粒子(AuNP)複合体の *in vitro* 機能評価

調製したユニット PIC/AuNP 複合体の *in vitro* 機能評価をルシフェラーゼ(Luc)を安定発現させた HeLa 細胞を用いて評価した。ユニット PIC/AuNP 複合体の細胞内取り込みは、Alexa 標識 siRNA を用いて、フローサイトメトリーによる解析を行うことに