

201411037B (1/2)

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24年度～26年度 総合研究報告書

研究代表者 谷口 博昭

平成27 (2015) 年 5月

目 次

I. 総合研究報告

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

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

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

III. 研究成果の刊行物・別刷

I. 総合研究報告

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

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、急遽、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、医師主導治験へ進む。

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、ポリアミノ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ール

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】

以下に年度別の開発研究の成果の要点に限り記載する。

平成 24 年度

- ① 乳がん細胞を使用してがん幹細胞形質と PRDM14 分子の密接な関連性を解明。
- ② 乳がん臨床検体による PRDM14 の発現プロファイリング、病理組織学的因子との関連性解明。
- ③ 核酸医薬の欠点を克服した PRDM14 のキメラ型 RNAi を用い、in vitro / in vivo モデルによる効果判定（単剤・抗癌剤併用）を経て、有力な 2/55 配列（まずはじめにインシリコで off target を回避するため十分検討した 55 配列を選定）を選定。
- ④ 数種の有力な核酸専用ナノキャリアー候補（主に CaP ミセル、CaP ミセル水熱処理）をキメラ型 RNAi と評価する系を樹立し評価を開始。
- ⑤ PRDM14 分子の発現抑制を可能とする核酸医薬（キメラ型 RNAi + ナノキャリアー）が、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癌幹細胞の撲滅に繋がる根拠を示した（追加特許申請へ向けた準備を東京大学 TLO、弁理士、共同研究者と開始）。

平成 25 年度

- ① 乳がんに加えて、膵がん臨床検体による

PRDM14 の発現プロファイリング、病理組織学的因子との関連性解明し POC 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（遺伝子発現アレイをベースに検討開始）。
- 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した。
- ④ 核酸用ナノキャリアー候補を治療モデルにて評価し、PEG ベースで安全性の高い、腫瘍集積能のある PIC ナノキャリアーを治療用キャリアーとして選定した。
- ⑤ 担がんマウスモデルにおいて、高い抗腫瘍効果、転移抑制能を核酸単剤、化療剤併用で実証した。
- ⑥ CRO の GLP 施設において LC-MS/MS による非標識 siRNA の高精度測定系（投与液分析法、TK バリデーションへ応用）を構築。

平成 26 年度

- ① 乳がん臨床検体、膵がん臨床検体をさらに増やして PRDM14 分子発現プロファイリング、病理組織学的因子との関連性を検討し 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（サスペンションアレイ等のオミクス解析を主体に特に液性因子について解析を行った）。
- ③ in vitro / in vivo の効果判定により、特に、orthograft, xenograft や転移モデルも含めて検証して PRDM14 のキメラ型 RNAi の治療用配列を確定。
- ④ PEG ベースで安全性の高い、腫瘍集積能のある PIC ナノキャリアーを治療用キャリアーとして選定していたが、FDA が認可済の成分で構成される PEG ベースで安全性が高く、腫瘍集積能を高めた 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を得たため、最終的な剤型に確定。
- ⑥ ③⑤を用いた in vivo モデルで、高い抗腫瘍効果、転移抑制能を実証（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ーの合成に必

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み、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。

⑨ 上記成果①-⑥を得た。これらに関し特許申請を行った（出願番号 2014-141278）。

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・効率が得られ、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 と事前相談もを行い、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嵩んだが、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。

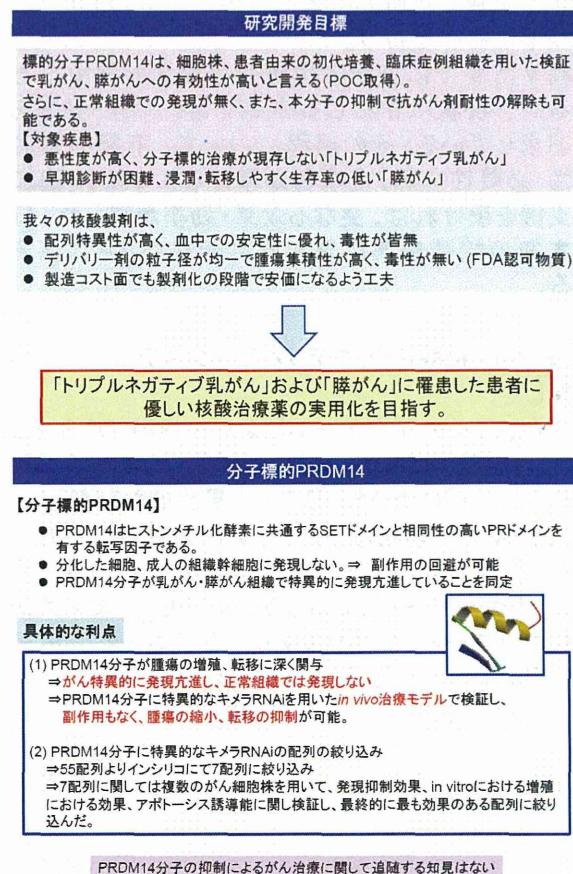
①はキメラ型 RNAi を使用することで克服し、②に関しては片岡教授・西山教授の御尽力により、静脈投与で腫瘍縮小効果を示す、可 P ミセル、PIC ミセル等多くのキャリアー剤を *in vitro*, *in vivo* 試験に供してきたが、多くの追加試験の結果、unit PIC を剤型として決定した。 *in vivo* モデルにおいて、キメラ RNAi および unit PIC を用いて、化療剤効果の増強、遠隔転移の抑制効果を確認した。H26 年度の研究課程において、① 実際に臨床試験に用いる剤型として、PRDM14 のキメラ型 RNAi の配列、DDS 剤として新規 unit PIC が選定されたこと、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

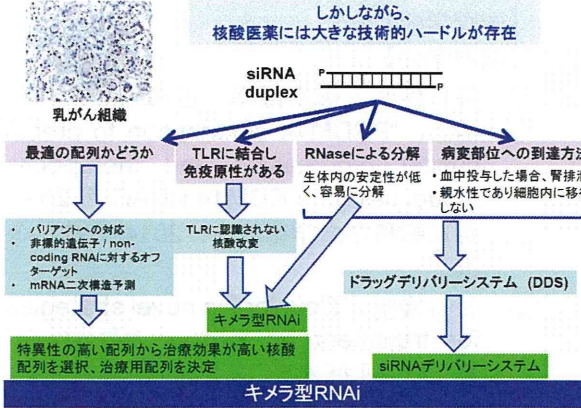
がん治療において最大の課題は、再発・遠隔転移である。PRDM14 分子はがんの幹細胞性に関与し、PRDM14 分子の治療応用によりこれらの事象を抑制することが可能である。その発現の抑制を可能とする核酸医薬は、単剤使用、及び術前・術後の化学療法薬との併用で、既存抗癌剤の効果の増強、さらには、経年後の再発、遠隔転移に関与するがん幹細胞の撲滅に繋がり医療現場における必要度は高い。また、実際の製剤化を視野に入れた製造体制を構築しており、今後、本邦の核酸創薬に大きく貢献できる。世界初の核酸医薬であり、規制当局との折衝が必要であり多くの困難が想定されるが、その結果、核酸医薬の標準化・指針が得られ、日本発の核酸創薬に大きく貢献できることは間違いない。

【図解資料(補足)】



核酸医薬のハードルと学際的アプローチ - 理学・工学・医学

PRDM14が核内転写因子である → 核酸医薬の開発へ



【核酸 - キメラ型RNAi】

- 安定性・免疫低誘導性等の面からsiRNAに比べ動物実験に適している。



具体的な利点

- 安定性が非常に高い
 - RNaseに対する耐性が高く、保護剤がない場合でも、血清中で約24時間検出可能 ⇒ siRNAは血清中では、1時間以内に分解し、in vivoにおいて、siRNAより有利。
- 免疫応答誘導性が低い
 - dsRNAではないので、細胞に対する免疫応答の誘導性が低い
 - 保護基を通常必要としないため代謝産物が生命体由来
- 製造コストの低減が可能
 - RNA合成単価に比べてDNA合成単価は極めて安価 ⇒ 大量合成の際には、総コストを大きく低減できる可能性がある。
- 複雑な特許問題が無い
 - キメラ型RNAiの技術は、平成18年5月に特許成立(特許3803318号) ⇒ 本邦以外に欧州、カナダ、オーストラリア、インド等で成立

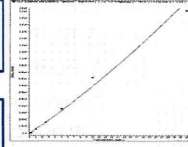
以上の観点から、キメラ型RNAiは他の核酸薬剤の追随を許さない

非臨床試験について

【基本技術の開発】

CROと共同で、LC-MS/MSを用いた'非標識のキメラ型RNAiの高精度測定系'(投与液分析手法バリデーション、TK/バリデーション)を構築

- RNAiの測定系確立(投与液分析法バリデーション)
 - LC-MS/MS法で測定が可能(マウス・サルで実施)
 - 高精度測定が可能(0.005µg/mL)
 - 放射性標識体や蛍光標識体が不要

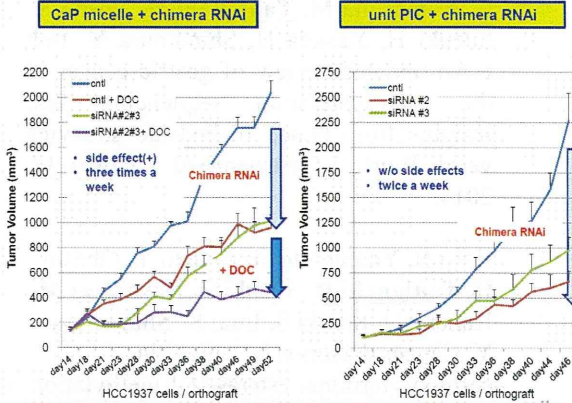


- siRNA及びDDS複合体分析試験
- siRNA及びDDS複合体のラット予備試験の一部(反復用量設定試験)

抗がん剤試験実施に必要な非臨床試験:すでに開始している

- 薬効薬理試験
 - 安全性薬理試験
 - 薬物動態試験
 - 一般毒性試験
 - 免疫毒性試験(承認申請に必要)
 - 光安全性試験
- 課題: DDSとの合剤としての特性, どの範囲まで非臨床試験を実施するか

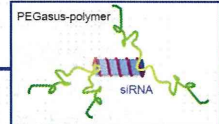
PRDM14を標的とした核酸治療の結果



siRNA用ドラッグデリバリーシステム ~ unit PIC

【siRNA用ドラッグデリバリーシステム (DDS)】

- 共同研究を御担当頂いている東京大学片岡一則教授、東工大西山伸宏教授により開発・特許出願済。
- 本ミセルは、カチオン(陽イオン)性ポリマーとしてはポリリジンないし別のアミノ酸を、非イオン性ポリマーとしてはPEGを用いて合成したDDS ⇒ FDAが認可している物質のみで構成。



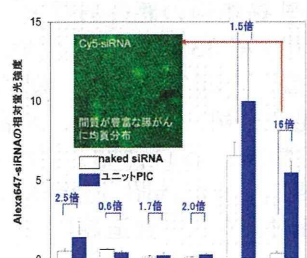
具体的な利点

- 製造が容易で、明確な構造を有する ⇒ 製剤面で大きな利点
- 特異的な構造 ⇒ 優れた血中滞留性を示す
- 粒子径が均一、かつ、極小(単分散を示す) ⇒ EPR効果を最大限に発揮する
- 担がんマウスを用いた体内動態試験で、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ない ⇒ 効果的にがん組織特異的に集積
- 間質が豊富な臓器がんモデルにおいても、サイズが小さいため高い組織浸透性を示し、均質ながん組織内分布が得られる。
- 高い安全性が確認されている(肝機能、腎機能パラメータへの影響が皆無)

以上の観点から、新規DDSは他の核酸デリバリー剤の追随を許さない

unit PICの利点

膵がん(BxPC3細胞)モデルマウスにおけるユニットPICの体内動態



3次元培養膵がん細胞へのsiRNA導入によるアポトーシス誘導

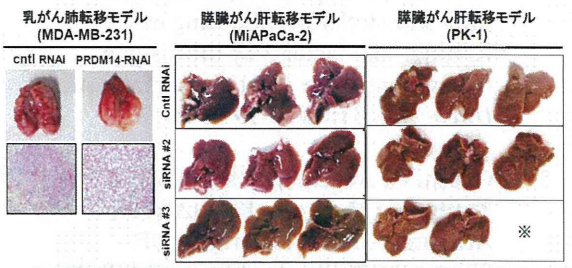
市販の導入試薬(RNAi Max) スフェロイド表面にしかアポトーシスが起こらない 一部の細胞は細胞傷害によるネクロシスを示した

ユニットPIC スフェロイド内部に効果的にアポトーシスを誘導

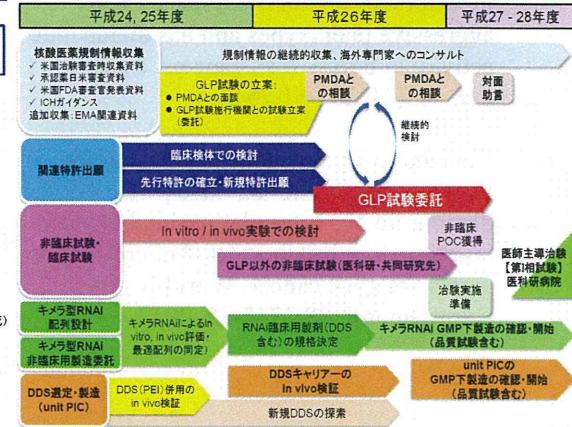
細胞核:青, 細胞死:緑(アポトーシス誘導された細胞死) 赤(ネクロシス:壊死)

非臨床試験 ~ 転移能への影響

- PRDM14が発現している乳がん細胞株を用いて、tail vein injection法で肺転移モデルを作成し、治療用核酸製剤で治療した(週2回投与) ⇒ 結果、RNAi治療介入群で肺転移が抑制された(下図)。
- 同様にPRDM14が発現している膵臓がん細胞株を用いて、脾臓静脈よりがん細胞を注入し肝転移モデルを作成、治療用核酸製剤で治療した(週3回投与) ⇒ 結果、RNAi治療介入群で肝転移が抑制された。



ロードマップ



F. 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.
3. Kato N, Yamamoto H, Adachi Y, Ohashi H, **Taniguchi H**, Suzuki H, Nakazawa M, Kaneho H, Sasaki S, Imai K, Shinomura Y. Cancer detection by ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1 methylation in pancretobiliary fluids, *World J Gastroenterol*, 19(11): 1718-1727, 2013.
4. **Taniguchi H**, Jacinto FV, Villanueva A, Fernandez AF, Yamamoto H, Carmona FJ, Puertas S, Marquez VE, Shinomura Y, Imai K, Esteller M. Silencing of the Kruppel-like factor 2 by the histone methyltransferase EZH2 in human cancer. *Oncogene*, 31: 1988-1994. 2012.
5. Ohashi H, Adachi Y, Yamamoto H, **Taniguchi H**, Nosho K, Suzuki H, Arimura Y, Imai K, Carbone DP, Shinomura Y. Insulin-like growth factor receptor expression is associated with aggressive phenotypes and has therapeutic activity in biliary tract cancers. *Cancer Sci*, 103(2): 251-61. 2012.
6. Yamamoto H, Adachi Y, **Taniguchi H**, Kunimoto H, Nosho K, Suzuki H, Shinomura Y. Interrelationship between microsatellite instability and microRNA in gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol*. 18:2745-55, 2012.

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
- ⑥ 谷口博昭、山本博幸、越川直彦、清水元治、今井浩三. 「ヒストンメチル化酵素分子の発現亢進による乳癌細胞の悪性形質獲得」第22回日本がん転移学会学術集会. 2013/07/11 松本
- ⑦ 谷口博昭、山本博幸、伊東文生、今井浩三. 「ヒストンメチル化酵素分子の発現亢進による乳癌細胞の悪性形質獲得とその臨床応用」第33回日本分子腫瘍マーカー研究会. 2013/10/02 横浜
- ⑧ 松永康孝、足立 靖、山本博幸、大橋広和、能正勝彦、谷口博昭、鈴木拓、佐々木泰史、有村佳昭、遠藤高夫、今井浩三、篠村恭久. 「食道癌におけ

- る IGF-I 受容体の発現と分子標的としての可能性」第 72 回日本癌学会学術総会. 2013/10/05 横浜
- ⑨ 谷口博昭, 山本博幸, 今井浩三. 「ヒストンメチル化酵素分子の発現亢進による乳癌細胞の悪性形質獲得」第 72 回日本癌学会学術総会. 2013/10/04 横浜
- ⑩ 山本博幸, 須河恭敬, 能正勝彦, 前畑忠輝, 谷口博昭, 五十嵐央祥, 伊藤美樹, 内藤崇史, 足立 靖, 鈴木 拓, 伊東文生, 今井浩三, 篠村恭久. 「胃癌におけるトラスツズマブ治療の効果予測因子となりうる HER2 シグナル関連分子異常の関連の解析」第 72 回日本癌学会学術総会. 2013/10/03 横浜
- ⑪ 足立 靖, 井伊正則, 須河恭敬, 谷口博昭, 能正勝彦, 鈴木 拓, 山本博幸, 有村佳昭, 今井浩三, 篠村恭久. 「K-ras 変異陽性消化器癌に対するインスリン様増殖因子受容体を標的とした治療」第 21 回日本癌病態治療研究会. 2012/07/06 群馬 (奨励研究賞)
- ⑫ 谷口博昭, 山本博幸, 越川直彦, 清木元治, 今井浩三. "Silencing of Kruppel-like factor 2 by the histone methyltransferase EZH2 in human cancer" 第 21 回がん転移学会総会. 2012/07/12 広島
- ⑬ 高橋悠佳, 坂本毅治, 谷口博昭, 清木元治. 「乳がん細胞における KLF2 の転写制御機構の解析」第 71 回日本癌学会学術総会. 2012/09/21 札幌
- ⑭ 谷口博昭, 山本博幸, 鈴木 拓, 能正勝彦, 須河恭敬, 國本浩明, 五十嵐央祥, 伊藤美樹, 内藤崇史, 佐々木 茂, 足立靖, 今井浩三, 篠村恭久. 「胃癌における刷子縁ミオシン Ia 遺伝子の不活性化とその臨床応用」第 71 回日本癌学会学術総会. 2012/09/21 札幌
- ⑮ 國本浩明, 山本博幸, 谷口博昭, 鈴木拓, 能正勝彦, 須河恭敬, 五十嵐央祥, 伊藤美樹, 内藤崇史, 佐々木 茂, 足立 靖, 今井浩三, 篠村恭久. 「ヒトがんにおける DNA メチル化フィンガープリントの同定: 原発不明癌の原発巣検索における有用性」第 71 回日本癌学会学術集會. 2012/09/20 札幌
- ⑯ 伊藤美樹, 山本博幸, 田沼徳真, 谷口博昭, 能正勝彦, 須河恭敬, 内藤崇史, 鈴木 拓, 足立 靖, 高橋宏明, 細川正夫, 今井浩三, 篠村恭久. 「MCA microarray を用いたヒト食道扁平上皮癌におけるゲノムワイドメチル化異常の解析と I 型膜貫通糖蛋白質 LRFN5 不活性の同定」第 71 回日本癌学会学術総会. 2012/09/20 札幌
- ⑰ 足立 靖, 山本博幸, 大橋広和, 能正勝彦, 谷口博昭, 鈴木 拓, 有村佳昭, 遠藤高夫, 今井浩三, 篠村恭久. 「K-ras 変異遺伝子がある消化器癌に対する Insulin-like growth factor(IGF)-I receptor(IGF-IR)を標的とした治療」第 71 回日本癌学会学術総会. 2012/09/19 札幌
- ⑱ 松永康孝, 能正勝彦, 須河恭敬, 伊藤美樹, 内藤崇史, 三橋 慧, 國本浩明, 谷口博昭, 馬場祥史, 足立 靖, 山本博幸, 今井浩三, 篠村恭久. 「大腸癌における腫瘍内浸潤 CD45RO+T 細胞の密度は独立した予後のバイオマーカーとなりうる」第 71 回日本癌学会学術総会. 2012/09/19 札幌

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. 雑誌・書籍

- ① 谷口博昭、今井浩三. 「固形がんの免疫・抗体療法-基礎研究の進歩と臨床応用-抗体療法の基礎 (種類、特徴など) 概論」日本臨床 70 巻 12 号 2087-2092 (2012)
- ② 谷口博昭、今井浩三. 「DDS を利用した抗体医薬の展望 ドラッグデリバリーシステムの新展開 II - 核酸医薬・抗体医薬・ワクチン医療を支える DDS 技術」シーエムシー 出版. 113-119

(2012)

- ③ 星野大輔、谷口博昭、越川直彦. 「分子標的薬-がんから他疾患までの治療をめざして -分子標的薬の作用機序・薬理作用- がん浸潤とその抑制」 日本臨床増刊号" 154-158 (2012)

5. 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 成立特許

先行研究で、PRDM14 が乳がん・卵巣がん特異的に発現亢進し、腫瘍の悪性形質に関連することを示していた。それに関する、乳がんの診断・治療に関する特許「乳癌および卵巣癌の治療薬、検出方法ならびに検出用キット」(特許 2012-253108 号)を成立させた。

- ③ 実用新案登録 なし
④ その他 なし

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 教授

研究要旨：本研究事業は、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。本研究において、① siRNA と DDS の規格を決定し非臨床試験および医師主導治験で用いる製品の製造委託先を決定し投与製剤を確保することができ、②治験を実施するために必要な非臨床試験の実施項目を定めることができた。これにより医師主導治験の実施が可能な状況となった。

A. 研究目的

本事業に於いては、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ための非臨床試験段階までの開発終了を目的としている。PRDM14 を制御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。核酸医薬品開発は、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、核酸医薬品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

投与製剤としての製品の規格決定には、siRNA の最適な配列の決定とこれに合ったドラッグデリバリーシステム(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の観点から決定した。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関連学会への出席とインタビュー、により実施した。これらの情報を基に、非臨床試験受託企業あるいは、siRNA 製造及び DDS 製造企業と協議を行い非臨床試験の実施項目と方法の委託と製造の委託を行った。

(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。そのため、規制情報等を収集し本研究への応用を試みた。これにより、①臨床試験の実施項目はDDSや検出方法にもよって異なるため依然、ad hocであり確立されたものではないこと、②siRNAは安定化のため製剤により様々な修飾を施しているため、それらを考慮に入れなければならないこと、③DDSの種類により非臨床試験は異なり、内包される物質との結合率等によっても異なること、④核酸医薬の開発の主体はアカデミア単独かアカデミア発ベンチャー企業であることが多く、大手製薬企業が初期から開発しているものは極めて限られている。そのため、非臨床試験に関する情報が乏しいこと、⑤米国FDAは非臨床試験ではpre-IND meeting等のスポンサーとの面談ではmonkeyを対象種として選択することを推奨しており、動物愛護あるいは今後の資金計画の観点からもより慎重に非臨床試験の計画を立てる必要があること。また、げっ歯類の使用が必ずしも全ての毒性試験で要求されない可能性があること、⑥DDSとしてリポソームを使用する場合には内包される医薬品

の特徴が明確である場合にはリポソーム製剤としての毒性試験の一部は省略することが可能であること、を明らかにした。一方、国内での開発を進める場合には医薬品医療機器総合機構（PMDA）の薬事戦略相談が不可欠であるが、製剤の規格化決定に関する方針、核酸の検出・体内動態測定の方針、GLP試験を含めた非臨床試験の策定、siRNAとDDSの合剤としての解析方針、最終的な対面助言の実施方針などを決め、開発方針を決定した。

siRNAを用いた臨床開発困難であると言われていたが、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。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事が判明した。

最適配列の設計は共同研究者の名取らが実施し、研究責任者の谷口と細胞あるいは動物を用いた寺実験により決定した。当初2種類の配列を決め、合剤での開発も検討していたが、最終的には一種ル②絞り込みを行った。これらの配列について、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。

本研究ではキメラ型siRNAをDDSとの合剤で用いるため、非臨床試験にて検出し、体内動態を解析する手法を開発する必要がある。非臨床試験受託企業と手法の解析を進め、LC-MS/MS法で実施できることが可能となった。また、これらをふまえ、トキシコカインテ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の分離条件決定試験、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テ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、安全性の県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製剤をDDSの合剤として開発するため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、医薬品として開発することが必要であると考えられる。

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、それぞれの規格を決定し、非臨床試験の計画を決定すると共に委託を行った。また、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すると共に必要な製品の確保を行った。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

・ Matsumoto K, Sumino K, Fukahori H, Kitaoka

- K, Kamibeppu K, Nagamura F, Stressor Scale for Clinical Research Coordinators: development and psychometric testing. *J Advan Nursing* 6: 7; 1636-45, 2012
- Ebihara Y, Takahashi S, Mochizuki S, Kato S, Kawakita T, Ooi J, Yokoyama K, Nagamura F, Tojo A, Asano S, Tsuji K. Unrelated cord blood transplantation after myeloablative conditioning regimen in adolescent patients with hematologic malignancies: a single institute analysis. *L eukemia Res* 36(2):128-31, 2012.
 - Mae H, Ooi J, Takahashi S, Kato S, Kawakita T, Ebihara Y, Tsuji K, Nagamura F, Echizen H, Tojo A. Acute kidney injury after myeloablative cord blood transplantation in adults: the efficacy of strict monitoring of vancomycin serum trough concentrations. *Transplant Infect Dis* 15:181-6, 2013.
 - 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
- 多発性骨髄腫におけるLINE-1異常低メチル化と臨床遺伝子学的特徴の相関 第72回日本癌学会学術総会 2013
 - 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
- G. 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
 3. その他
なし

2. 学会発表

- 大木桃代 長村文孝 他 臨床研究参加患者の心理状態と対応策の検討（1）第25回日本健康心理学会年次大会 2012
- 小室美子、長村文孝 他 東京大学におけるトランスレーショナルリサーチの支援強化領域の検討と支援強化に向けた体制整備 第2回レギュラトリーサイエンス学会
- 加藤直也、長村文孝 他 日本人を被験者とした肝障害患者薬物動態試験 第2回レギュラトリーサイエンス学会 2012
- 長村文孝 細胞療法への臨床試験支援組織の取り組み～免疫療法を中心として 第5回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会 2013
- 藤田由利子、小野敏明、落合央、Ann M Lee、長村文孝、高橋聡、森尾友宏 実臨床応用に向けたウイルス特異的細胞障害性T細胞療法の開発 第5回造血器腫瘍免疫療法研究会学術集会 2013
- M Nojima, Y Aoki, H Yasui, R Maruyama, E Yamamoto, H Asaoku, T Tokino, F Nagamura, T Ishida, K Imai, Y Shinomura, H Suzuki

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きた。この取り組みの中で、分岐型 PEG-poly(L-Lysine)(PEGasus-PLys) ブロック共重合体の利用によって、siRNA 1 分子と 2 分子の PEGasus-PLys からなる会合体が選択的に形成されることを見出し、ユニットポリオンコンプレックス(ユニット PIC)と名付けた。ユニット PIC は、従来の siRNA キャリアと比較して、優れた血中滞留性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顕著な抗腫瘍効果を示した。また、マウスの体重変化と生理学的パラメーターの評価により、ユニット PIC が安全なキャリアであることも実証された。

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)。

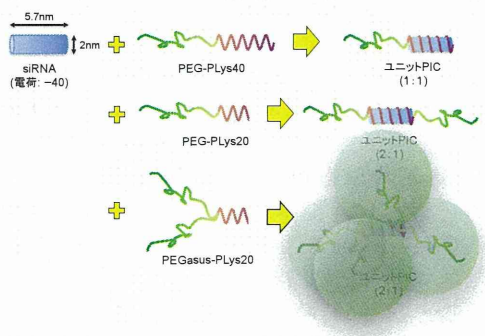


図 1. ユニット PIC 型 siRNA キャリアの模式図

本研究では、まず、ユニット PIC 型 siRNA

キャリアの構造最適化を目的として血中滞留性の評価を行った。また、ユニット PIC が長期血中滞留性を示すメカニズムに関して、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)法を用いて評価した。最適化されたユニット PIC に関しては、固形がん集積性を評価し、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抗腫瘍効果を検討した。さらに、ユニット PIC の安全性について、マウスの体重と生理学的パラメーターの変化から評価を行った。

B. 研究方法

1) ユニット PIC 型 siRNA キャリアの調製と血中滞留性の評価

PEG 分子量、PLys 重合度の異なる PEG-PLys および PEGasus-PLys を蛍光標識 siRNA と混合し、形成された会合体を分析超遠心および蛍光相関分光によって評価した。形成されたユニット PIC 型 siRNA キャリアに関しては、耳介の血管内における蛍光標識 siRNA の蛍光を生体内共焦点顕微鏡(IVCLSM)を用いて経時的に測定することにより評価した。

2) 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

本項目では、実験 1)において最も優れた血中滞留性を示した PEG 分子量 37,000、PLys 重合度 20 (37×2-20) の PEGasus-PLys から形成されるユニット PIC の血中滞留メカニズムに関して検討を行った。

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。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 IVCLSM 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。

3) 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

ヒト膵臓がん BxPC3 細胞の皮下移植モデルを作成し、投与 48 時間後の蛍光標識 siRNA の集積を評価した。また BxPC3 の皮下移植モデルマウスに対して siVEGF (25 μ g siRNA と 6 回投与)を投与した時の腫瘍サイズを経時的に測定した。また、治療後の血管内皮細胞マーカーの免疫染色を行い、siVEGF のデリバリーによる血管密度の変化を評価した。

4) siPRDM14 のデリバリーによるヒト乳がん HCC1937wt 細胞の固形がんモデルの治療

研究代表者の谷口と連携して、siPRDM14 のデリバリーによるヒト乳がん HCC1937wt 細胞の固形がんモデルの治療に関して、これまで開発を進めてきたリン酸カルシウム(CaP)ミセルとユニット PIC 型 siRNA キャリアの2つのキャリアシステムの効果の比較を行った。siPRDM14 に関しては、配列の異なる2種類の siRNA(#2、

#3)の効果を検討した。

5) 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 2nmol の siRNA 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。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) ユニット PIC 型 siRNA キャリアの調製と血中滞留性の評価

PEG-PLys および PEGasus-PLys と蛍光標識 siRNA を電荷比で 1:1 になるように混合し、形成された会合体の分析超遠心および蛍光相関分光(FCS)による解析を行ったところ、Lys 重合度が 40 の場合はポリマーと siRNA の比率が 1:1、Lys 重合度が 20 の場合はポリマーと siRNA の比率が 2:1 のユニット PIC が形成されることを確認した。PEG の分子量が 37,000 の PEGasus-PLys(20) と siRNA から形成されるユニット PIC のサイズは 16.8nm であった。

蛍光標識 siRNA を搭載したユニット PIC の血中滞留性を耳介の血管内における蛍光の変化を IVCLSM で測定することにより評価した(図 2)。その結果、ユニット PIC の血中滞留性には、長鎖 PEG>短鎖 PEG、PEGasus>PEG、PLys(20)>PLys(40)の傾向があることが認められた。なかでも PEGasus(37,000 \times 2)-PLys(20)から形成されたユニット PIC は非常に高い血中滞留性を示し、投与 6 時間後においても投与量の 20%が血中に残存していることが確認された(図 2)。

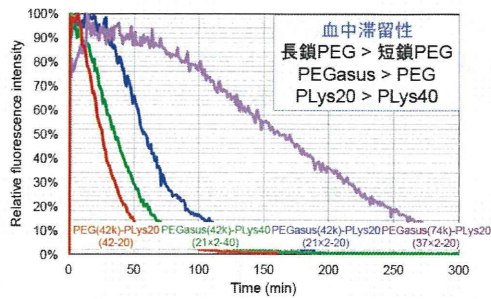


図2. ユニットPIC型 siRNA キャリアの血中滞留性の評価

2) 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、血中でのユニットPIC と PEGasus-PLys の間の動的平衡関係を調べることにした。

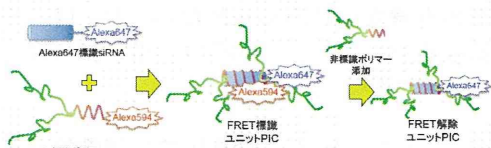


図3. FRET を示す 2 重蛍光標識ユニットPIC の調製と非標識ポリマーの添加によるユニットPIC とポリマー間の動的平衡関係の評価

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 5)。

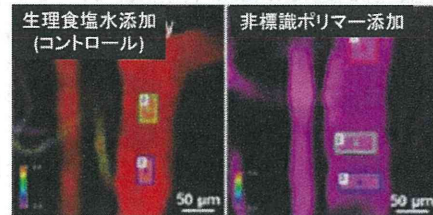


図 4. FRET を示すユニットPIC に非標識ポリマーを時間差で投与した際の血中における FRET (赤: Alexa647、マゼンタ: Alexa594)

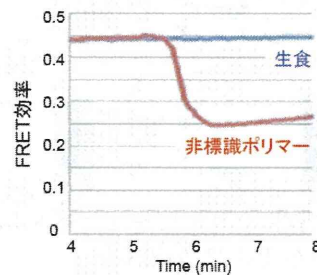


図 5. マウスの血中における FRET 効率の変化

3) 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

ヒト膵臓がん BxPC3 細胞の皮下移植モデルにおける投与 48 時間後の蛍光標識 siRNA の集積を評価した(図 6)。その結果、

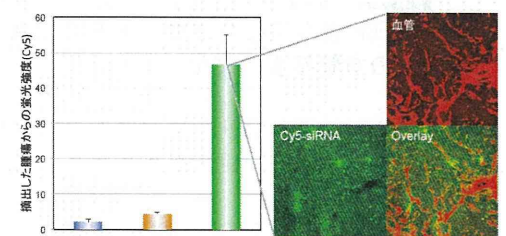


図 6. 蛍光標識 siRNA の固形がん(BxPC3)への集積

最も高い血中滞留性を示した PEGasus-(37,000×2)-PLys(20)からなるユニット PIC において siRNA 単体より顕著に優れた蛍光標識 siRNA の固形がんへの集積が認められた。

次に、BxPC3 細胞の皮下移植モデルマウスに対して PEGasus(37,000×2)-PLys(20)からなるユニット PIC に siVEGF を搭載してその制がん活性を検証した(図 7)。その結果、がんの増殖が有意に抑制され、腫瘍マーカー(CEA, CA19-9)の大幅減少が認められた。さらに、治療後の腫瘍血管の密度を免疫染色により評価したところ、ユニット PIC の投与によって血管密度の明らかな減少が認められた(図 8)。

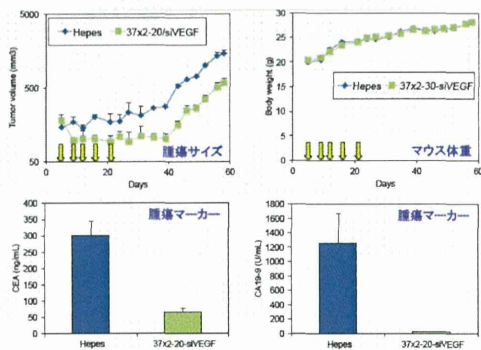


図 7. siVEGF を内包したユニット PIC による固形がん (BxPC3) の治療

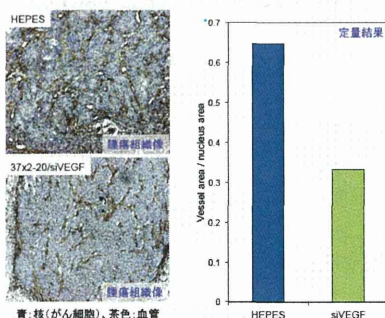


図 8. siVEGF を内包したユニット PIC による治療後の血管密度の変化

4) siPRDM14 のデリバリーによるヒト乳がん HCC1937wt 細胞の固形がんモデルの治療

ヒト乳がん HCC1937wt 細胞の固形がんモデルに対して、siPRDM14 を内包した CaP ミセルおよびユニット PIC の抗腫瘍効果を検証した(図 8)。その結果、2 種類の配

列の異なる siPRDM14 は共に有効性を示し、CaP ミセルとユニット PIC はほぼ同等の優れた抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。

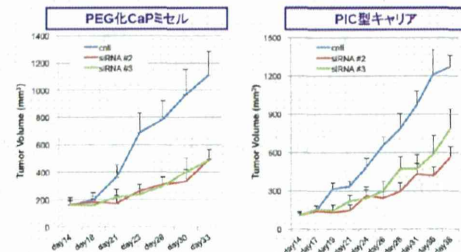


図 9. ヒト乳がん HCC1937wt 細胞の皮下移植モデルに対する siPRDM14 内包 CaP ミセルおよびユニット PIC の治療効果

5) ユニット PIC 型 siRNA キャリアの安全性評価

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 ($\times 10^3$ / uL)	Neutro ($\times 10^3$ / uL)	Lymph ($\times 10^3$ / uL)	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	BUN (mg/dL)	Creatinin (mg/dL)	ALT (IU/L)	AST (IU/L)	Alkaline Phosphot ase ($\times 10$ 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

本研究では、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 を構築した。PLys(20) 場合には、siRNA 1 分子に対して 2 分子の PEGasus-PLys がコンプレックス化しており、siRNA の中心として 4 方向に PEG が生えた正四面体構造を有するものと考えられる。この結果、siRNA の生体分子との相互作用が効果的に抑制され、図 2 に示す