

201438106A

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

PRDM14を標的とする革新的核酸治療による
難治性がん克服のための実用化に関する臨床研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 谷口 博昭

平成 27 (2015) 年 3 月

本報告書は、厚生労働省の平成26年度厚生労働科学研究委託事業（革新的がん医療実用化研究事業）による委託業務として、国立大学法人東京大学 総長 濱田 純一 代理人 国立大学法人東京大学 医科学研究所 事務部長 紺野 喜久恵 が実施した平成26年度「PRDM14を標的とする革新的核酸治療による難治性がん克服のための実用化に関する臨床研究」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告書（総括）

PRDM14を標的とする革新的核酸治療による難治性がん克服のための
実用化に関する臨床研究

谷口 博昭

II. 委託業務成果報告書（業務項目）

1. 核酸医薬の実用化に向けた非臨床試験および製剤製造の研究

長村 文孝

2. PRDM14を標的とする革新的核酸治療による難治性がん克服のための
実用化に関する研究

今井 浩三

3. 核酸医薬の治療用ナノキャリアーの同定

ユニットポリイオンコンプレックス型核酸キャリアーの構造最適化
片岡 一則

4. 核酸医薬の治療用ナノキャリアーの同定

ユニットポリイオンコンプレックス型核酸キャリアーの製造と特性解析
西山 伸宏

5. 医師主導治験の準備・計画

岩瀬 哲

6. RNA干渉を利用した核酸医薬開発における臨床試験の概要

野島 正寛

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

厚生労働科学研究委託費 (革新的がん医療実用化研究事業)
委託業務成果報告(総括・業務項目)

PRDM14 を標的とする革新的核酸治療による難治性がん克服のための
実用化に関する臨床研究

業務主任者 谷口 博昭 東京大学医科学研究所抗体ワクチン治療研究部門・特任准教授

【研究要旨】

癌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 (ユニット 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、同キャリアー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。

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。

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、並行して前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、医師主導試験へ進む。

業務項目の担当責任者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名：

- ① 今井 浩三・東京大学医科学研究所特任教授
- ② 長村 文孝・東京大学医科学研究所教授
- ③ 片岡 一則・東京大学教授
- ④ 西山 伸宏・東京工業大学教授
- ⑤ 岩瀬 哲・東京大学医科学研究所特任講師
- ⑥ 野島 正寛・東京大学医科学研究所特任講師

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)、及び膵臓がんにおいて 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、乳癌において 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 が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」

を目的としている。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、ポリアミノ酸の amino 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情報を削除し、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も出現し、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 (Nature 2010) が、乳癌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、乳癌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・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、③ 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

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。

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) Koshikawa N, Hoshino D, **Taniguchi H**, Minegishi T, Tomari T, Nam SO, Aoki M, Sueta T, Nakagawa T, Miyamoto S, Nabeshima K, Weaver A, Seiki M. Proteolysis of EphA2 causes its conversion from tumor suppressor to oncogenic signal transducer. *Cancer Res*, in press. 2014.
- 2) Adachi Y, Ohashi H, Imusumran A, Yamamoto H, Matsunaga Y, **Taniguchi H**, Noshio 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. *Tumor Biol*, 35(2): 973-85. 2014.
- 3) Yamamoto H, Watanabe Y, Maehata T, Morita R, Yoshida Y, Oikawa R, Ishigooka S, Ozawa S, Matsuo Y, Hosoya K, Yamashita M, **Taniguchi H**, Noshio 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、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 10/27/2014
パシフィコ横浜

2. 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」 10/16/2014 東京コンファレンスセンター有明

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 07/31/2014 慶応義塾大学薬学部共立キャンパス

4. 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 07/11/2014
金沢文化ホール

5. 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 07/11/2014
金沢文化ホール

(第 18 回がん転移学会研究奨励賞受賞記念講演)

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:2014年 07 月 09 日 (出願番号 2014-141278)

② 実用新案登録 なし

③ その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告書

核酸医薬の臨床応用に向けた非臨床試験および製剤製造の研究

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：核酸医薬はその安定性、細胞内への選択的な取り込み、あるいは標的遺伝子配列外への影響等の問題から、当初考えられていたよりも臨床での成果は得られていない。そのため、ドラッグデリバリー剤との合剤化、あるいは siRNA としての構造等が検討されている。臨床開発にはこの他にも障壁があるが、その1つが安全性試験あるいは製造・規格に関するガイドラインがほとんど無いことが挙げられる。本研究では、国内外の情報を収集し、製造について検討すると共に非臨床試験のデザイン等を検討し、大学内では実施できない siRNA、ドラッグデリバリー剤の製造委託および非臨床試験について企業と開発協議を進め、医師主導治験実施に向けて製造および非臨床データ収集をおこなっている。

A. 研究目的

本研究事業では乳がんを初めとしたがんにおいて、がん幹細胞の維持に必要と考えられるPRDM14を標的として核酸医療を医師主導治験で実施することを目的としている。核酸医薬は、前例に乏しく、また適当なガイドラインが世界的に乏しいことから、治験実施のために必要な非臨床試験あるいは製剤化に関して、規制当局とも相談しながら手探りの状況で進めているのが実情である。本研究は、国内外の情報を収集し、医薬品医療機器総合機構の薬事戦略相談を利用して、企業とも連携しながらGMP準拠製剤を提供できる企業を選択し、その製剤としての規格を決定し、非臨床試験のどの項目をどのような試験デザインで実施するか検討し、GLP準拠試験は委託し、医師主導治験を実施することを目的とする。

B. 研究方法

核酸医薬開発に関する情報を論文、国内外の規制当局および関連学会の情報を収集し、非臨床試験がどのように実施されているかを取り纏める。この情報をもとに、核酸およびドラッグデリバリー剤 (DDS) の特性から考え、最適と考えられる規格、製造での CMC (Chemistry, Manufacturing and Control) の状況および非臨床試験の実施項目やデザインを取りまとめる。本研究では、核酸は安定したキメラ型を使用し、また、DDS は本研究

事業の分担研究者である片岡教授らの開発品であり、組織内での情報の共有を図り、規制対応を行っていく。

(倫理面への配慮)

公開情報の取扱あるいは委託業務発注のみであり、該当せず

C. 研究結果

核酸に関しては、関連学会での情報収集あるいは企業との面談により、従来よりも安価で大量の核酸を安定的に供給することが可能な企業を選定することができた。これにより、非臨床試験の実施が価格によって制限されることがなくなり、本事業の実現性が高まった。品質的にも多くの規制当局の査察をうけ、十分な検査項目とその基準値を設定しており、これにより、核酸としての製剤化に目処をつけることができた。

DDSは、研究分担者の片岡教授らが開発したユニットPICを用いることにした。この製造に関して、企業との面談を進め、供給可能な企業を選定することができ、少量からGMP準拠製品製造に向けた製造手法を検討しており、情報の交換により本年度の少量生産と来年度のGMP準拠製品の製造に目処を付けることができた。製品の規格については、新たな製品であり、また、DDSの規格に関するガイドラインに乏しいことから、この製品

に適した規格を取りまとめた。

核酸医薬では、体内動態をどのように測定するかも問題となるが、連携企業とLC-MS/MS法での測定を可能とし、蛍光標識のように分子あるいは粒子に影響を与えない方法での測定が可能となった。これを元に、下記の試験を実施した。

- ・ siRNA製剤の分析条件最適化検討試験
- ・ siRNA製剤からのsiRNA解離条件検討試験
- ・ siRNA製剤投与後のラット血漿中siRNA濃度確認試験
- ・ siRNA製剤投与後のカニクイザル血漿中siRNA濃度確認試験
- ・ siRNA製剤投与後のコモンマーモセット血漿中siRNA濃度確認試験
- ・ LC-MS/MS法でのラットTKバリデーション試験
- ・ siRNAでのラット4反復毒性試験

これらの結果からは、今後の非臨床試験の継続に特に支障となる問題点は発見できず、この後の安全性試験等の実施にむすびつけていくことができた。サルについては、コモンマーモセットとカニクイザルを上記の様に比較検討しており、上記の結果と供給状況と合わせて非臨床試験で用いるサル種を決定する。

D. 考察

従来、核酸医薬の普及の妨げになるであろうと言われていたのが核酸製造コストである。抗体医薬品に匹敵する価格であり、これは市販後はもちろん、非臨床試験段階においても調達のコストから十分な非臨床試験実施の妨げになっている。今回の研究では、今後の臨床開発および市場で十分な競争力を有する製剤の入手を確立した。また、DDSについては核酸の性質と合い、標的組織・細胞に選択的に到達し、なおかつ毒性の低いものを選定する必要がある。この製造方法について、GMP準拠製剤の入手に目処をつけることができた。

非臨床試験については、核酸あるいはDDSを修飾することなく、核酸を測定することをLC-MS/MS法を用いて実施することができ、より正確な方法を確認することができた。これによりラットとサルでの体内動態試験、あるいは安全性試験における組織分布状況も測定可能となり、従来よりも情報量が多く、かつ正確な検討ができるものと考えられる。今後の非臨床試験としては、安定性試験、濃度測定バリデーション試験、ラットとサルでの単回および反復毒性および回復性試験、細菌における復帰突然変異試験、ほ乳類培養細胞における染色体試験を実施することとしている。最終的には核酸とDDSの合剤としての製剤となるが、治験での品質保証については、検討の余地が残っているが、これらに必要な情報は入手しており、薬事戦略相談を通じて医薬品医療機器総合機構とも合意に達することができると考えられる。

E. 結論

核酸医薬開発における障壁である、□DDSの選定、□核酸およびDDSの製造企業の確保、③製剤の品質の保証、④体内での測定系確立、⑤非臨床試験の実施、について情報の収集や解析あるいは

企業との相談によって本研究ではクリアーすることを目的に遂行してきた。このうち、①から□についてはほぼ目処を付けることができ、⑤については一部の試験を本年度実施しており、来年度実施が必要な試験の項目とデザインについては選定が進んでおり、医師主導治験の実施に向けて準備が整いつつあると考えられる。

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 FDAにおける抗がん剤の審査 医薬品/医療機器の承認申請書の上手な書き方・まとめ方 技術情報協会 216-219, 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 73:540-544, 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

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

厚生労働科学研究委託費 (革新的がん医療実用化研究事業)
委託業務成果報告(総括・業務項目)

PRDM14 を標的とする革新的核酸治療による難治性がん克服のための
実用化に関する臨床研究

担当責任者 今井 浩三 東京大学医科学研究所・特任教授

【研究要旨】

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 (ユニット 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、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治療用剤型として決定された。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ため、共同研究者と共にキメラ型 RNAi、ユニット PIC を GMP 準拠で製造する体制を整えた。共同研究者と CRO における非臨床試験が来年度 1/4 期までに終了し、結果、臨床試験計画に非臨床試験が反映される予定である。一方、研究分担として、本治療法のコンパニオンマーカの同定を遂行しており、有望な血清マーカー候補が得られている状況である。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。

A. 研究目的

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、乳癌において 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。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、遠隔転移の抑止が可能となる。また、PRDM14 の発現と高い相関性を有する分泌タンパク遺伝子候補が得られており、さらに実臨床を視野に入れて開発研究を展開することで、有効性の高いコンパニオンマーカの同定に至り、臨床試験のスピードアップを図る。共同研究先の成果を積み重ね、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」を目的としている。

B. 研究方法

【研究方法】

- A) 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・患者血清を倫理審査の上、入手した。
 - 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。

B) 医師主導治験の準備・計画

- ① CRO において非臨床試験で得られたデータを検討するために定期的に会合を行う。
- ② 医科研で先行する多くの治験に精通しており、治験プロトコル原案の作成を行う。
- 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】

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

- ① 本プロジェクトの課題の達成に必要な病理組織とそれに対応する手術・化学療法前の患者組織、血清を倫理審査を経て必要数確保した。
- ② 腫瘍細胞モデルを使用し、発現マイクロアレイ、ChIP-seqによるスクリーニングを行った。PRDM14と発現相関をもつ遺伝子で分泌タンパク遺伝子にカテゴライズされる遺伝子を候補遺伝子として同定した。
- ③ Microarray dataにおいて、PRDM14 遺伝子の発現量と 0.95 以上の相関係数を示し、回帰直線の傾きが 0.5~2.0 であり、データベース上分泌タンパクであることが知られている候補を ELISA 法にて検証を行った。
- ④ 患者血清検体を用いて統合的オミックス解析（サスペンションアレイ）により、PRDM14 の発現と高い相関性を有する分泌タンパク遺伝子、すなわち、血清診断バイオマーカー候補のスクリーニングを行った。
- ⑤ 医科研で先行する多くの治験に精通しており、治験プロトコール原案の作成を行った。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。

D. 考察

GMP 準拠のキメラ型 RNAi および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。これを受けて、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ール原案に反映し、治験審査に進む。

また、PRDM14 の発現と高い相関性を有する分泌タンパク遺伝子候補が得られており、さらに実臨床を視野に入れて開発研究を展開することで、有効性の高いコンパニオンマーカーの同定に至り、臨床試験のスピードアップにつながると考えられる。

以上より、今後、本プロジェクトは医師主導治

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

研究分担として、本治療法のコンパニオンマーカーの同定を遂行しており、有望な血清マーカー候補が得られている状況である。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ため、共同研究者と共にキメラ型 RNAi、ユニット PIC を GMP 準拠で製造する体制を整えた。共同研究者と CRO における非臨床試験が来年度 1/4 期までに終了し、結果、臨床試験計画に非臨床試験が反映される予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表
- 1) Nasuno M, Arimura Y, Nagaishi K, Isshiki H, Onodera K, Nakagaki S, Watanabe S, Idogawa M, Yamashita K, Naishiro Y, Adachi Y, Suzuki H, Fujimiya M, **Imai K**, Shinomura Y. Mesenchymal stem cells cancel azoxymethane-induced tumor initiation. **STEM CELLS** 32(4):913-25, 2014.
- 2) Ito M, Mitsunashi K, Igarashi H, Nosho K, Naito T, Yoshii S, Takahashi H, Fujita M, Sukawa Y, Yamamoto E, Takahashi T, Adachi Y, Nojima M, Sasaki Y, Tokino T, Baba Y, Maruyama R, Suzuki H, **Imai K**, Yamamoto H, Shinomura Y. MicroRNA-31 expression in relation to BRAF mutation, CpG island methylation and colorectal continuum in serrated lesions. **Int J Cancer**. 135(11):2507-15, 2014.
- 3) 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. **Tumor Biol** 35(2): 973-85, 2014.
- 4) Yasui H, Ishida T, **Imai K**. The role of DNA methylation in the genetics and epigenetics of multiple myeloma. In: Steve Holt, editors. Multiple myeloma: risk factors, diagnosis and treatments. :Series: **Cancer Etiology, Diagnosis and Treatments**. Hauppauge NY: Nova Science Publishers. 147-156, 2014.

- 5) Harada T, Yamamoto E, Yamano H, Nojima M, Maruyama R, Kumegawa K, Ashida M, Yoshikawa K, Kimura T, Harada E, Takagi R, Tanaka Y, Aoki H, Nishizono M, Nakaoka M, Tuyada A, Niinuma T, Kai M, Shimoda K, Shinomura Y, Sugai T, **Imai K**, Suzuki H. Analysis of DNA methylation in bowel lavage fluid for detection of colorectal cancer. **Cancer Prevention Research** (Philadelphia, Pa.), 7(10):1002-10, 2014.
- 6) **Imai K**. Overview and Future prospect of "Promotion plan for the platform of human resource development for cancer". **Juntendo Medical Journal**, 60(3): 234-237, 2014.
- 7) Yamamoto M, Yajima H, Takahashi H, Yokoyama Y, Ishigami K, Shimizu Y, Tabeya T, Suzuki C, Naishiro Y, Takano K, Yamashita K, Hashimoto M, Keira Y, Honda S, Abe T, Suzuki Y, Mukai M, Himi T, Hasegawa T, **Imai K**, Shinomura Y. Everyday clinical practice in IgG4-related dacryoadenitis and/or sialadenitis: Result from the SMART database. **Modern Rheumatology**. 27:1-6, 2014.
- 8) Naito T, Nosho K, Ito M, Igarashi H, Mitsuhashi K, Yoshii S, Aoki H, Nomura M, Sukawa Y, Yamamoto E, Adachi Y, Takahashi H, Hosokawa M, Fujita M, Takenouchi T, Maruyama R, Suzuki H, Baba Y, **Imai K**, Yamamoto H, Ogino S, Shinomura Y. IGF2 differentially methylated region hypomethylation in relation to pathological and molecular features of serrated lesions. **World J Gastroenterol** . 20(29): 10050-61, 2014.
- 9) Yamamoto M, Shimizu Y, Takahashi H, Yajima H, Yokoyama Y, Ishigami K, Tabeya T, Suzuki C, Matsui M, Naishiro Y, **Imai K**, Shinomura Y. CCAAT/enhancer binding protein α (C/EBP α)+ M2 macrophages contribute to fibrosis in IgG4-related disease? **Mod Rheumatol**, 2:1-3, 2014.
- 10) Yasui H, Tsurita G, **Imai K**. DNA synthesis inhibitors for the treatment of gastrointestinal cancer. **Expert Opin Pharmacother**. 15(16):2361-72, 2014.
- 11) Kagami H, Agata H, Inoue M, Asahina I, Tojo A, Yamashita N, **Imai K**. The Use of Bone Marrow Stromal Cells (Bone Marrow-Derived Multipotent Mesenchymal Stromal Cells) for Alveolar Bone Tissue Engineering: Basic Science to Clinical Translation. **Tissue Engineering Part B: Reviews**. 20(3): 229-232, 2014.
- 12) Igarashi H, Kurihara H, Mitsuhashi K, Ito M, Okuda H, Kanno S, Naito T, Yoshii S, Takahashi H, Kusumi T, Hasegawa T, Sukawa Y, Adachi Y, Okita K, Hirata K, Imamura Y, Baba Y, **Imai K**, Suzuki H, Yamamoto H, Nosho K, Shinomura Y. Association of microRNA-31-5p with clinical efficacy of anti-EGFR therapy in patients with metastatic colorectal cancer. **Annals of Surgical Oncology**. [Epub ahead of print], 2014.
- 13) Yamamoto S, Otsu M, Matsuzaka E, Konishi C, Takagi H, Hanada S, Mochizuki S, Nakauchi H, **Imai K**, Tsuji K, Ebihara Y. Screening of drugs to treat 8p11 myeloproliferative syndrome using patient-derived induced pluripotent stem cells with fusion gene CEP110-FGFR1. **Plos One**, in press, 2015.
- 14) Nosho K, Igarashi H, Ito M, Mitsuhashi K, Kurihara H, Kanno S, Yoshii S, Mikami M, Takahashi H, Kusumi T, Hosokawa M, Sukawa Y, Adachi Y, Hasegawa T, Okita K, Hirata K, Maruyama R, Suzuki H, **Imai K**, Yamamoto H, Shinomura Y. Clinicopathological and molecular characteristics of serrated lesions in Japanese elderly patients. **Digestion**. 91(1):57-63. 2015.
- 15) Yamamoto M, Nojima M, Takahashi H, Yokoyama Y, Ishigami K, Yajima H, Shimizu Y, Tabeya T, Matsui M, Suzuki C, Naishiro Y, Takano KI, Himi T, **Imai K**, Shinomura Y. Identification of relapse predictors in IgG4-related disease using multivariate analysis of clinical data at the first visit and initial treatment. **Rheumatology**. 54(1):45-9, 2015.
- 16) Yamamoto M, Takahashi H, Shimizu Y, Yajima H, Suzuki C, Naishiro Y, **Imai K**, Shinomura Y. Seasonal allergies and serial changes of serum levels of IgG4 in cases treated with maintenance therapy for IgG4-related disease. **Modern Rheumatology**. 13:1-2. 2015.
- 17) Yamamoto H, **Imai K**. Microsatellite instability. **Archives of Toxicology**. in press, 2015.
- 18) Mitsuhashi K, Nosho K, Sukawa Y, Matsunaga Y, Ito M, Kurihara H, Kanno S, Igarashi H, Naito T, Adachi Y, Tachibana M, Tanuma T, Maguchi H, Shinohara T, Hasegawa T, Imamura M, Kimura Y, Hirata K, Maruyama R, Suzuki H, **Imai K**, Yamamoto H, Shinomura Y. Association of Fusobacterium species in pancreatic cancer tissues with molecular features and prognosis. **Oncotarget**. in press, 2015.

- 19) Nakagaki S, Arimura Y, Nagaishi K, Isshiki H, Nasuno M, Watanabe S, Idogawa M, Yamashita K, Naishiro Y, Adachi Y, Suzuki H, Fujimiya M, **Imai K**, Shinomura Y. Contextual niche signals towards colorectal tumor progression by mesenchymal stem cell in the mouse xenograft model. **J Gastroenterol**, [Epub ahead of print], 2015.
- 20) **今井浩三**. 総説 橋渡し研究の展開と我が国の医療. 東京都病院薬剤師会雑誌 63(2): 5-8, 2014.
- 21) 湯地晃一郎, 井元清哉, 山口類, 宮野悟, 上昌広, **今井浩三**. 人口動態に基づいた日本医療の未来予測—高齢多死社会の到来, 特集「超高齢者に対する外科治療の問題点」南江堂臨床雑誌「外科」, 76(5): 457-463, 2014.
- 22) 能正勝彦, 五十嵐央祥, 伊藤美樹, 三橋 慧, 栗原弘義, 菅野伸一, 内藤崇史, 須河安恭敬, 松永康孝, 足立 靖, 野島正寛, **今井浩三**, 丸山玲緒, 鈴木 拓, 山本博幸, 篠村恭久. 大規模コホートをを用いた大腸癌のノンコーディングRNA発現異常と生活習慣の分子疫学的解析. 日本癌病態治療研究会誌, 20(1):60-63, 2014.
- 23) **今井浩三**. 私とリウマチ学. 分子リウマチ治療, vol.7 no4, 244-246, 2014.
- 24) 鈴木拓, **今井浩三**. がんエピゲノム異常を理解し、応用し、そして制御するために. 実験医学 Vol.32 No.19, 3024-3029, 2014.
- 25) 安井寛, **今井浩三**. 抗体医薬, DDS 研究 30 年, PHARMA TECH JAPAN 臨時増刊号, 31(2): 94-101, 2015.
- 26) 佐々木茂, 篠村恭久, **今井浩三**. 抗体治療 特集「DDS がもたらした新しい臨床の風景」. **Drug Delivery System**, 30(1): 16-24, 2015.

2. 学会発表

【国際学会】

1. Kato Y, Hiromi H, Tujisaki M, Matsune T, Sasaki S, Hinoda Y, Shinomura Y, **Imai K**. A combination of the anti-fibroblast growth factor receptor 1 monoclonal antibody and interferon- α/β suppresses human hepatic cancer cells in vitro and in vivo. 41st Congress of the International Society of Oncology and

Biomarkers. 2014, Barcelona.

【国内学会】

1. **今井浩三**. 東京大学医科学研究所におけるTRの現状と展望. シンポジウム2「我が国におけるトランスレーショナルリサーチの現状とこれからの展望」第51回日本臨床分子医学会学術集会, 東京国際フォーラム. 2014, 東京
2. **今井浩三**. 招聘講演「東大医科研における橋渡し研究とその発展」第103回日本病理学会総会 特別企画, 広島国際会議場フェニックスホール. 2014, 広島
3. **今井浩三**. 特別講演「最先端医療の開発とDNA情報に基づく新たな社会」. 多摩大学寺島実郎監修リレー講座. 2014, 東京
4. **今井浩三**. 東京理科大学生命医科学研究所シンポジウム「東京大学医科学研究所における橋渡し研究の現状とその展開」、東京理科大学ヒト疾患モデル研究センター, 2014, 千葉県.

G. 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:2014年07月09日 (出願番号2014-141278)
- ② 実用新案登録 なし
- ③ その他 なし

研究要旨

本事業では、PRDM14 キメラ型 RNAi を合成高分子を主成分とする送達システムに搭載し、医師主導治験を行うことを目指している。送達システムとしては、siRNA 分子と分岐状ポリエチレングリコール-カチオン性ポリアミノ酸ブロック共重合体 2 分子の自己組織化によって形成されるユニットポリイオンコンプレックス(ユニット PIC)について研究を行っており、これまでに優れた血中滞留性、固形がんへの特異的集積性、siRNA のデリバリーに基づく抗腫瘍効果が確認されてきた。本分担研究では、本年度において、ユニット PIC の血中滞留性の評価を実施し、構成ブロック共重合体のカチオン構造の最適化を行った。この評価を通じて、非臨床試験のためのポリマーの組成を決定した。

A. 研究背景、目的 (背景)

siRNAは、細胞内の標的mRNAを特異的かつ効率的にノックダウンできることから、疾患治療への応用が期待されている。従来の低分子薬、抗体医薬と比較して、あらゆる疾患に対して配列から容易に設計でき、副作用が少なく、かつ製造コストの抑制や期間の短縮も可能であることから、siRNAは次世代医薬品シーズとして大きな可能性を秘めている。しかしながら、核酸医薬には、1)生体内安定性に乏しく容易に分解される、2)血中に投与した場合、速やかに腎臓から排泄される、3)分子量が大きく親水性であるために細胞内への移行性が低い等の解決すべき課題が存在することが知られており、実用化のためにはsiRNAの送達システムの開発が必要不可欠である。実際に、siRNAの臨床試験においては局所投与が可能な眼科疾患等を除いて、何らかのDDS技術が利用されている(*Nature Mater.* 12: 967(2013))。

siRNA の送達システムは、カチオン性脂質を利用したリポプレックス型とカチオン性高分子を利用したポリプレックス型に大別され、ウイルス等の生物由来のシステムと比較して、安全性、コスト、製造容易性などにおいて優れている。しかしながら、これらのシステムは、デリバリーが比較的容易な肝臓を標的とした一部のシステムが臨床試験へと進んでいるものの、実用化にはまだ遠く、固形がんを標的とした場合には、生体内における安定性およびがん組織への集積性の向上が必要である。さらに、製剤面からは、siRNA 送達システムは、複雑な製造プロセスを要さず、簡便でかつ再現良く調製できることも重要である。

このような背景において、東京大学の片岡と東京工業大学の西山は、ポリエチレングリコール-poly(L-lysine)(PEG-PLys)ブロック共重合体と siRNA のポリイオンコンプレックス(PIC)に基づく siRNA 送達システムに関する研究を行ってきた。その結果、分岐状のポリエチレングリコール(PEGasus)を有する PEGasus-PLys に関して PLys と siRNA の鎖長のマッチングを検討したところ、1 分子の siRNA に対して 2 分子の PEGasus-PLys が会合したユニット PIC が形成されることを見出した(図 1)。ユニット PIC は、明確な構造を有し、製造も容易であることから製剤面で大きな利点を有している。また、これまでに優れた血中滞留性を示し、固形がんにも効果的に集積することが確認された。さらに、ユニット PIC は、膵臓がんモデルに対して優れた組織浸透性を示し、siRNA のデリバリーに基づく治療効果を示すことも確認されている。

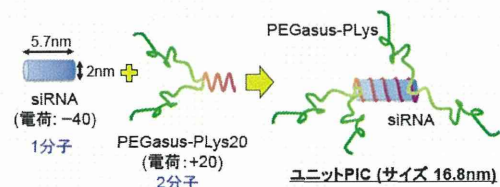


図 1. ユニット PIC の模式図

本事業では、PRDM14 キメラ型 RNAi をユニット PIC に搭載し、医師主導治験を行うことを目指している。本分担研究では、本年度において、ユニット PIC を構成するブロック共重合体のカチオン構造の最適化を行い、非臨床試験のためのポリマーの組成を決定した。

(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。

B. 研究方法

1) ユニット PIC の血中滞留性の評価

Alexa647 で標識した siRNA と異なる組成の PEG_{Gasus}-PLys とを任意の 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) で混合することによってユニット PIC を調製した。調製したユニット PIC の血中滞留性は BALB/c マウスに投与し、耳介の血管内の蛍光強度の経時変化を in vivo 共焦点顕微鏡を用いることによって評価した (図 2)。



図 2. in vivo 共焦点顕微鏡による Alexa647 標識 siRNA 搭載ユニット PIC の血中滞留性評価

2) ブロック共重合体のカチオン構造の最適化

研究分担者の西山と連携してカチオン性セグメントとしてポリオルニチン (POrn) を有するブロック共重合体 (PEG_{Gasus}-POrn) を合成した (図 3)。PEG_{Gasus}-POrn の組成は、PEG_{Gasus}-PLys の系において最も高い血中滞留性を示した 37x2-20 [PEG 分子量: 37,000x2; POorn 重合度: 20] に固定した。任意の N/P 比

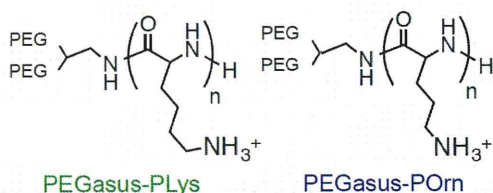


図 3. PEG_{Gasus}-PLys と PEG_{Gasus}-POorn の化学構造

で PEG_{Gasus}-POorn と Alexa647-siRNA を混合することによりユニット PIC を構築し、1) と同様に in vivo 共焦点顕微鏡を用いて血中滞留性の評価を実施した。

3) siPRDM14 と PEG_{Gasus}-POorn から形成されるユニット PIC の抗腫瘍効果

研究代表者の谷口と連携してヒト乳がん HCC1937 細胞の固形がんモデルに対する siPRDM14 搭載ユニット PIC の抗腫瘍効果を検証した。

C. 研究結果

1) ユニット PIC の血中滞留性の評価

異なる組成の PEG_{Gasus}-PLys から形成されるユニット PIC (N/P=10) の血中滞留性を評価した結果を図 4 に示す。この結果、短鎖 PEG よりも長鎖 PEG、PEG よりも PEG_{Gasus}、PLys 重合度が 40 より 20 の条件において血中滞留性が高くなることが確認された。また、最も高い血中滞留性を示した PEG_{Gasus}-PLys 37x2-20 [PEG 分子量: 37,000x2; PLys 重合

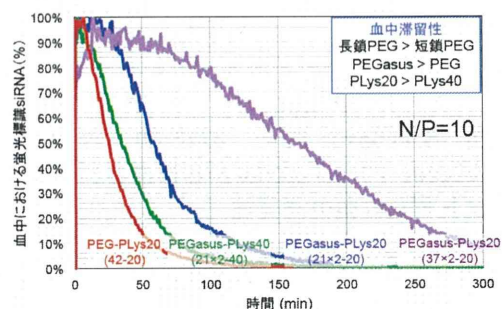


図 4. PEG_{Gasus}-PLys と PEG_{Gasus}-POorn の化学構造

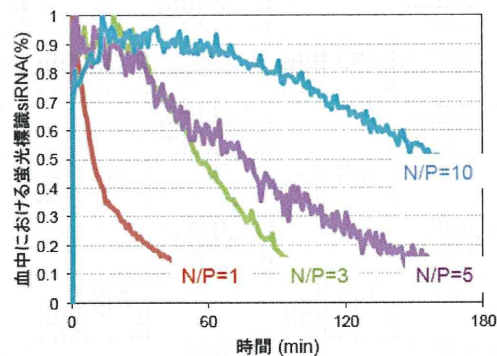


図 5. PEG_{Gasus}-PLys 37x2-20 から形成されるユニット PIC の血中滞留性

度:20]からなるユニットPICにおいてN/P比を変化させて血中滞留性を評価した結果を図5に示す。その結果、N/Pの増加に従い、ユニットPICの血中滞留性が高くなることが確認された。

2) ブロック共重合体のカチオン構造の最適化

PEGasus-PLys 37x2-20 と PEGasus-POrn 37x2-20 のそれぞれから形成されるユニットPIC (N/P=5,10)の血中滞留性を比較した(図6)。その結果、両者はN/P=10においては同等の血中滞留性を示した。一方、N/P=5において、図5に示したようにPEGasus-PLysから形成されるユニットPICは血中滞留性が大幅に低下したが、PEGasus-POrnから形成されるユニットPICはN/P=10のそれと同等の血中滞留性を示すことが明らかになった。

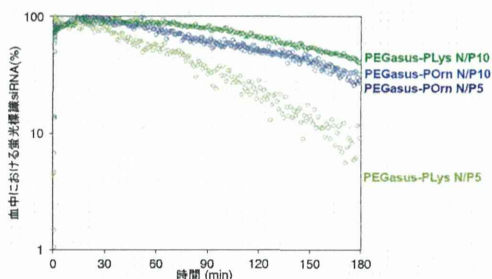


図 6. PEGasus-PLys 37x2-20 および PEGasus-POrn 37x2-20 から形成されるユニットPICの血中滞留性

3) siPRDM14とPEGasus-POrnから形成されるユニットPICの抗腫瘍効果

PEGasus-PLys 37x2-20 および PEGasus-POrn 37x2-20 と siPRDM14 から形成されるユニットPICのヒト乳がん HCC1937

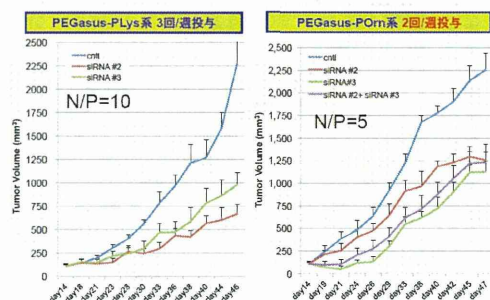


図 7. PEGasus-PLys 37x2-20 および PEGasus-POrn 37x2-20 から形成されるユニットPICによるヒト乳がんモデルの治療

細胞の固形がんモデルに対する抗腫瘍効果を評価した(図7)。その結果、PEGasus-POrnから形成されるユニットPICは、N/P=5、2回/週投与の条件で、PEGasus-PLysから形成されるユニットPICのN/P=10、3回/週投与の条件と同等の抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。

D. 考察

図4に示すように、ユニットPICは、短鎖PEGよりも長鎖PEG、PEGよりもPEGasus、PLys重合度が40よりも20の条件において血中滞留性が高くなることが確認された。この結果は、図1に示すように、siRNA分子に2分子のPEGasus-PLysが相互作用し、4本のPEG鎖が正四面体の頂点となるように効果的にsiRNAを覆う構造体を形成することが、ユニットPICが長期血中滞留性を示すために重要であることを示唆している。一方、最も高い血中滞留性を示したPEGasus-PLys 37x2-20に関して、N/P比の効果を検討したところ、ユニットPICの血中滞留性はN/P比依存的に向上することが確認された(図5)。特に、N/P比=10(18本の余剰のポリマーが存在する条件)において顕著な血中滞留性の改善が確認されている。一方、ユニットPICは、1分子のsiRNA1と2分子のPEGasus-PLysから定量的に形成されていることが確認されており、図5の結果は、フリーのPEGasus-PLysがユニットPICの血中滞留性に影響を与えていることを示唆しているものと考えられる。また、図4のユニットPICの血中滞留性の結果は、ポリマーの血中滞留性に相関していることが別の実験からも分かっている。以上の結果より、研究分担者らは、ユニットPICが血中で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を安定化する機構が存在しているのではないかと考えている。

次に、ユニットPICを形成するPEGasus-ポリカチオンのカチオン構造について検討を行い、PLysよりも側鎖のメチレン基が一つ少ないPOrnを用いることによって、N/P=5における血中滞留性が大幅に改善し、N/P=10のPEGasus-PLysから形成されるユニットPICと同等の血中滞留性が得られることが確認された(図6)。N/P=10のユニットPICの場合には18本の余剰のポリマーが存在するが、N/P=8の場合には余剰のポリマーは8本であり、体

内に投与するポリマーを少なくするという観点から PEGasus-POrn は PEGasus-PLys よりも優れていると考えられる。この結果は、PEGasus-POrn が PEGasus-PLys よりも siRNA と安定な PIC を形成することを示唆しているものと考えられる。

最後に、研究代表者の谷口と連携して、PEGasus-PLys 37x2-20 および PEGasus-POrn 37x2-20 と siPRDM14 から形成されるユニット PIC のヒト乳がん HCC1937 細胞の固形がんモデルに対する抗腫瘍効果を評価した(図 7)。その結果、PEGasus-POrn から形成されるユニット PIC は、サンプル調製および投与条件に関して N/P 比を 10→5、投与回数を週 3 回→週 2 回に変更したにも拘らず、PEGasus-PLys から形成されるユニット PIC と同等の抗腫瘍効果を示すことが確認された。以上のように、ユニット PIC を構成するポリマーを PEGasus-PLys から PEGasus-POrn に変更することによって、より少ないポリマー投与量で同等以上の血中滞留性と抗腫瘍効果が達成された。

以上の結果より、PEGasus-POrn をユニット PIC の調製に用いるポリマーとして今後開発を進めていく予定である。

E. 結論

本年度は、ユニット PIC の血中滞留性の評価を実施し、構成ブロック共重合体のカチオン構造の最適化を行った。その結果、PEGasus-POrn をユニット PIC 構成ポリマーに用いることによって、より少ないポリマー投与量で、優れた血中滞留性と抗腫瘍効果が確認された。以上の結果より、PEGasus-POrn を今後の非臨床試験を含めた開発ステージへと進めていく予定である。

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. Chuano, 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. Muro, 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.