

がん転移治療を可能にする 生分解性高分子を素材とした がん指向性核酸搭載ミセル設計

福岡大学 薬学部

免疫・分子治療学

助教 櫛川 舞

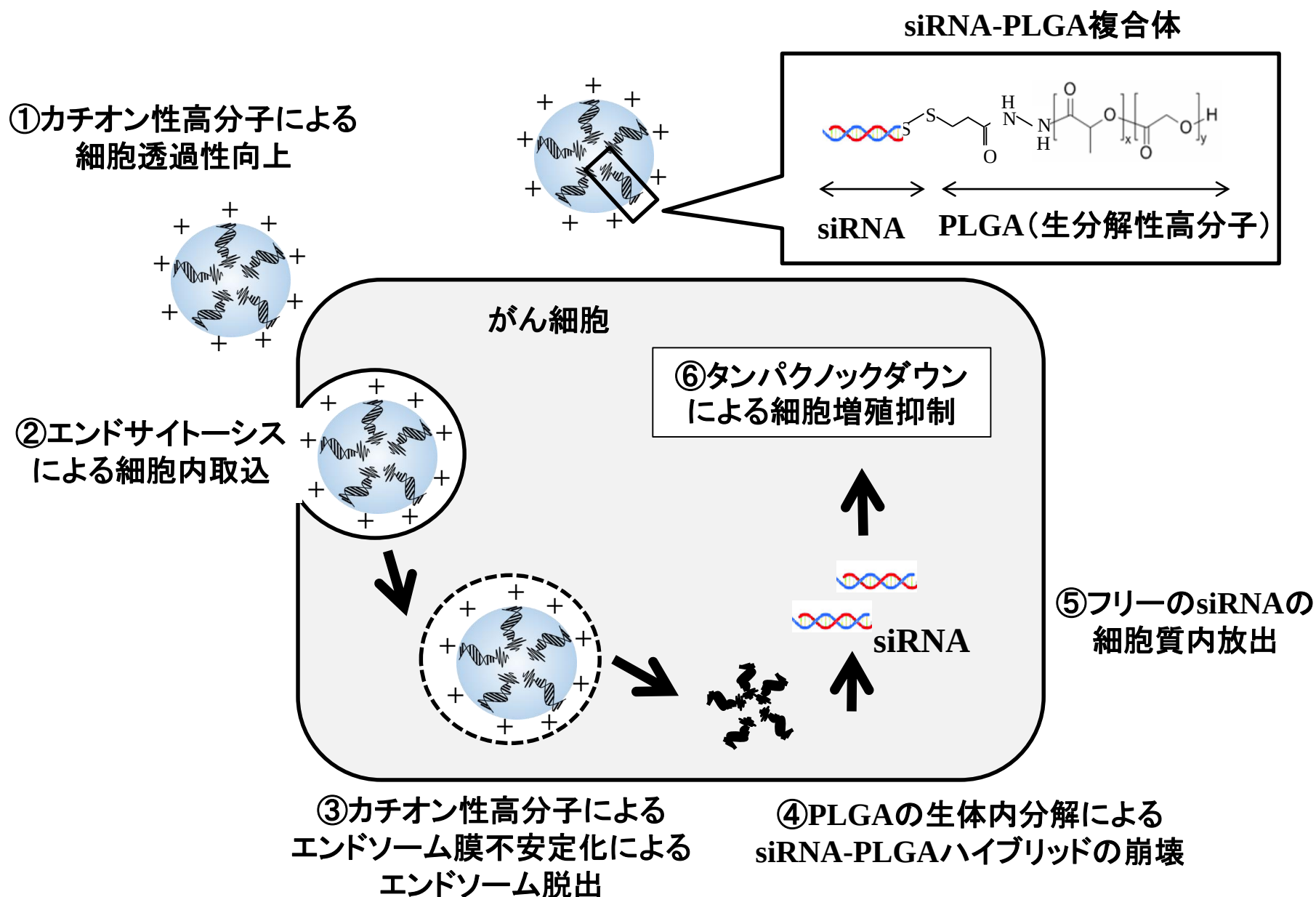
2021年5月20日

核酸医薬開発における従来技術と その問題点

核酸の実用化には、核酸の特徴である

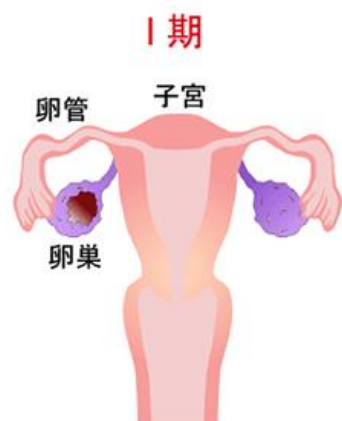
①血中安定性の低さ、②細胞膜透過性の低さ、③速やかな腎排泄の課題により、ドラッグデリバリー技術の応用が必須である。さらに、近年では、製剤化に用いられる④高分子の毒性により臨床試験に至らない事例が発生し、製剤の安全性も重要な課題である。

siRNA-PLGAハイブリッドミセルの構造と細胞内取り込み機序



疾患背景①: 早期発見の難しい卵巣がん治療

卵巣がんの病期(ステージ)分類



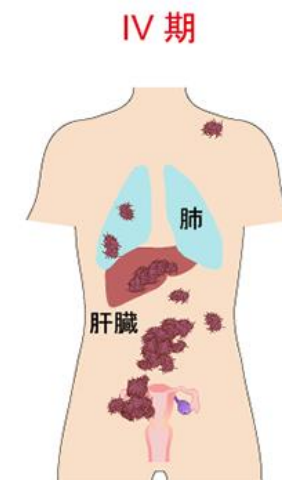
がんが卵巣だけにとどまっている状態



がんが骨盤内にあって、子宮や卵管、直腸・膀胱の腹膜などに広がっている状態



がんがリンパ節に転移しているか、骨盤腔をこえて、上腹部の腹膜、大網、小腸などに転移している状態



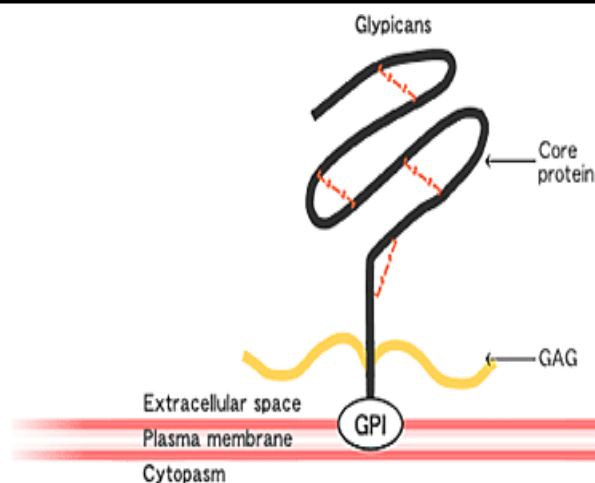
がんが肝臓や肺などに転移している状態

腹膜播種、腹水が認められる

卵巣がんは、自覚症状がないため早期発見が難しく、発見時には**III期以上**であることが多く、III期以上の5年生存率は**40%以下と非常に治療困難な疾患**である。III期以上で腹膜播種が認められ、手術困難な場合には、抗がん剤を使用した治療が行われるが現在腹膜播種に有効な治療薬がない。

そのため、卵巣がんの治療においては、いかに早期発見をするか、
または有効な腹膜播種治療薬を開発することが急務である。

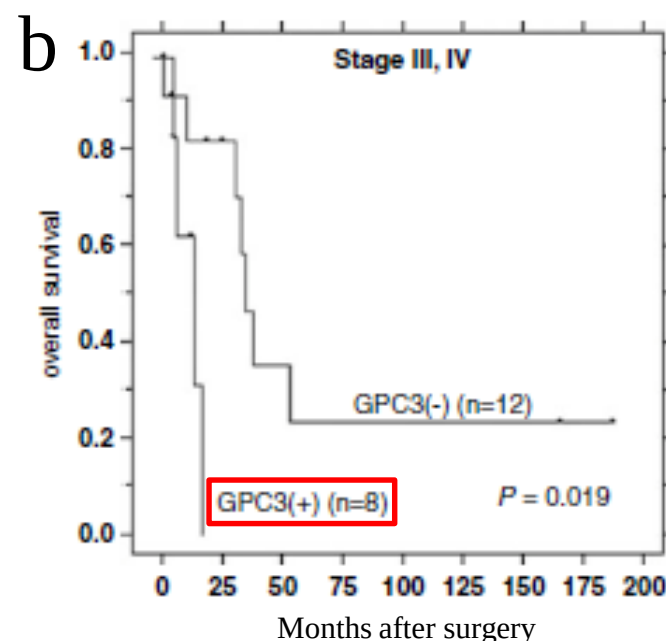
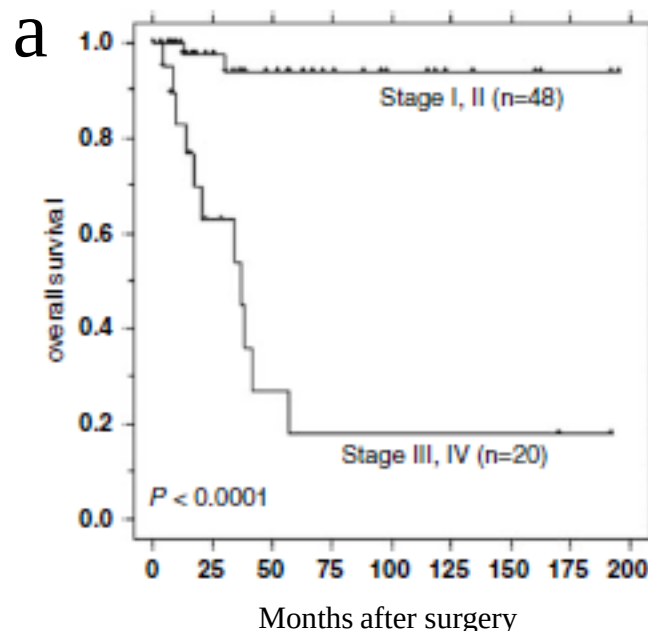
疾患背景②: GPC3の高発現は、卵巣がんの予後の悪化を促進する



標的遺伝子Glypican-3 (GPC3)とは:

GPC3は**悪性度の高い卵巣がん患者に特に高発現**しており(下図参照)、がんの増殖、転移に関与するグリピカンファミリーの一つである糖タンパクである。肝臓がんでも高発現していることが知られており、膜表面からその一部が切断され、血清中に可溶性タンパクとして存在することから**腫瘍マーカー**として使用されている。

また、GPC3は、T細胞やB細胞、マクロファージなどの**免疫細胞にも存在**しており、炎症作用を介してがん転移の進展への関与も知られている。



開発製剤の標的遺伝子抑制による卵巣がん細胞増殖抑制効果



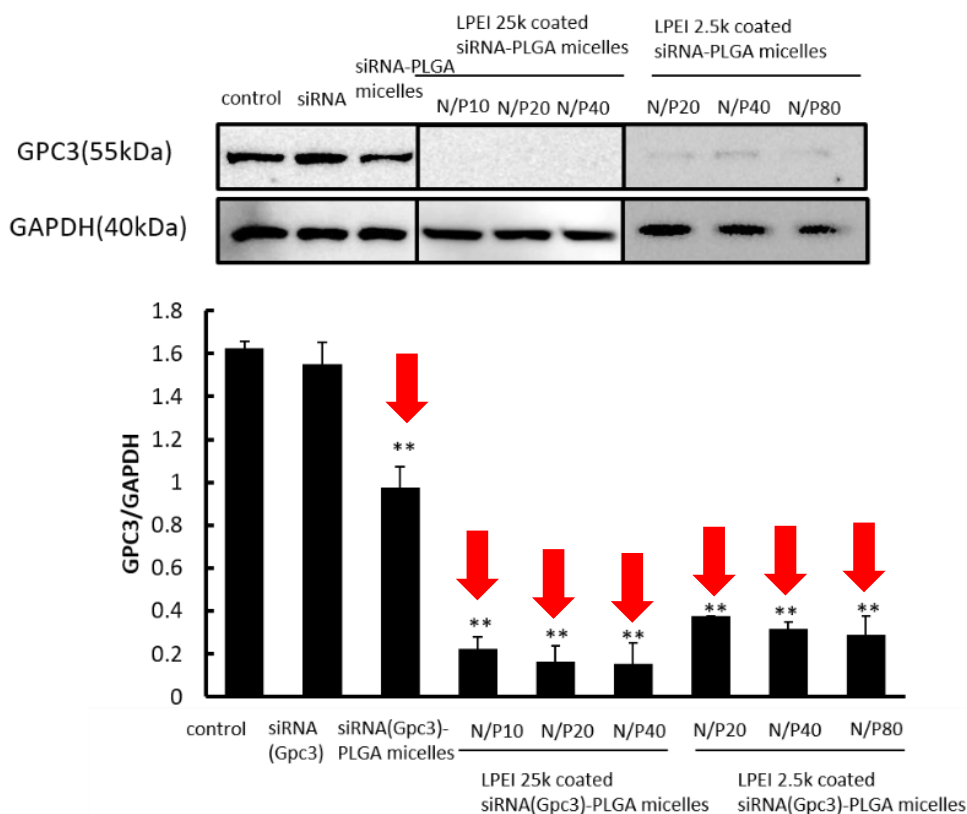
<方法>

細胞株: マウス卵巣がん細胞株HM-1

ミセル製剤添加24時間培養後にウェスタンブロッティングおよび細胞増殖/細胞毒性アッセイキット

WST-8による細胞生存率の評価を行った。チオール基修飾siRNAは、サーモフィッシュャー社より購入した。

<ウェスタンブロッティングによるGPC3発現量の定量>



<細胞増殖/細胞毒性アッセイキットWST-8による細胞生存率の評価>

name of formulations		Cell viability (%)
Control (non treatment with siRNA)		100.0 ± 1.2
siRNA (Gpc3)		99.7 ± 0.5
siRNA-PLGA hybrid micelles		86.5 ± 0.9 ** ↓
Liner polyethylenimine (LPEI) 25k coated siRNA-PLGA hybrid micelles	N/P 10 ※	63.3 ± 2.6 ** ↓
	N/P 20	58.5 ± 2.5 ** ↓
	N/P 40	56.2 ± 5.4 ** ↓
LPEI 2.5kcoated siRNA-PLGA hybrid micelles	N/P 20	85.0 ± 0.3 ** ↓
	N/P 40	74.7 ± 1.9 ** ↓
	N/P 80	70.6 ± 0.3 ** ↓

※N/P比: siRNAに対するLPEIのモル比

Mean ± SD (n=3) **p<0.01 vs control (Bonferroni test/ANOVA)

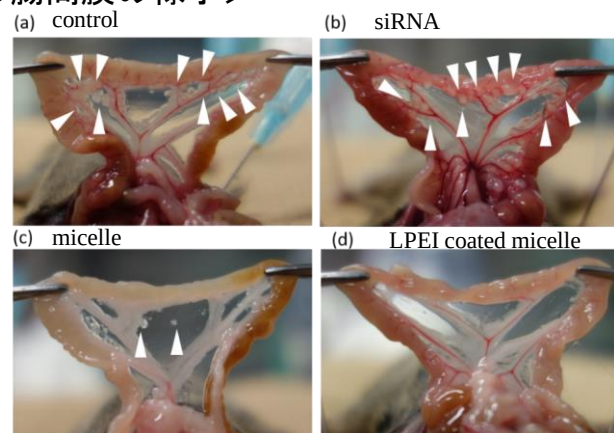
開発製剤は、細胞内取り込み効率が高く、がん細胞の増殖を有意に抑制した。

卵巣がん腹膜転移モデルマウスにおける開発製剤の がん転移抑制効果

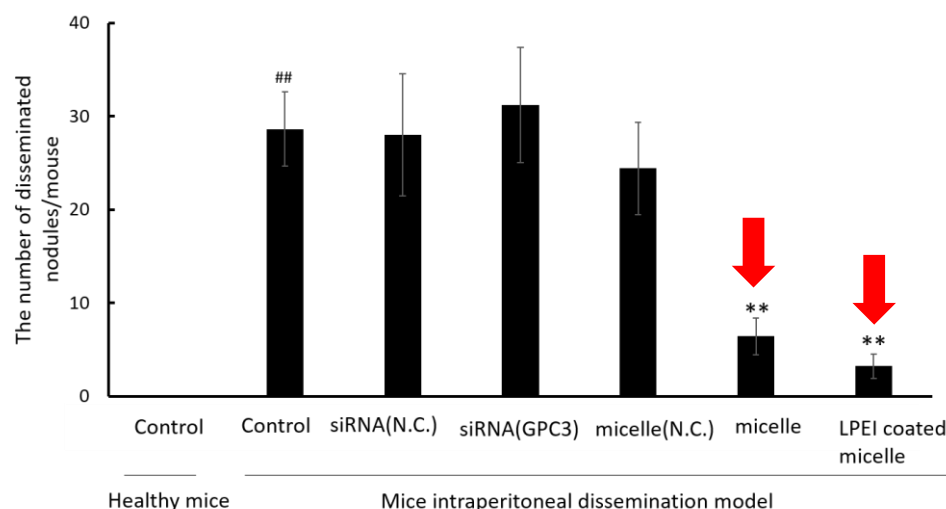


＜方法＞卵巣がん腹膜転移モデル: B6C3F1雌性マウスにマウス卵巣がん細胞株HM-1を腹腔内に移植し14日後に開腹し、腹腔内転移コロニー数の計測、腹水を回収し、腹水中のサイトカインをELISA法にて定量した。
ミセル製剤は、HM-1腹腔内移植24時間後に1回（100 pmol/mouse）腹腔内投与した。

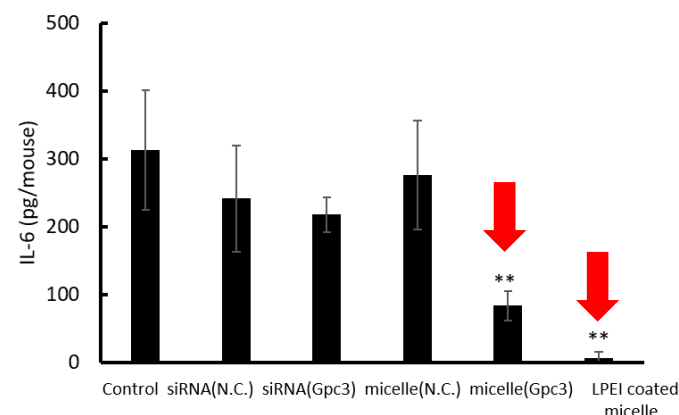
＜開腹後の腸間膜の様子＞



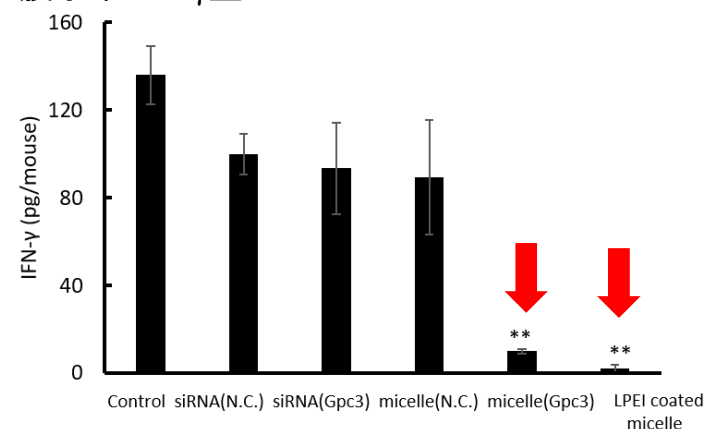
＜腹腔内の転移コロニー数＞



＜腹水中IL-6量＞



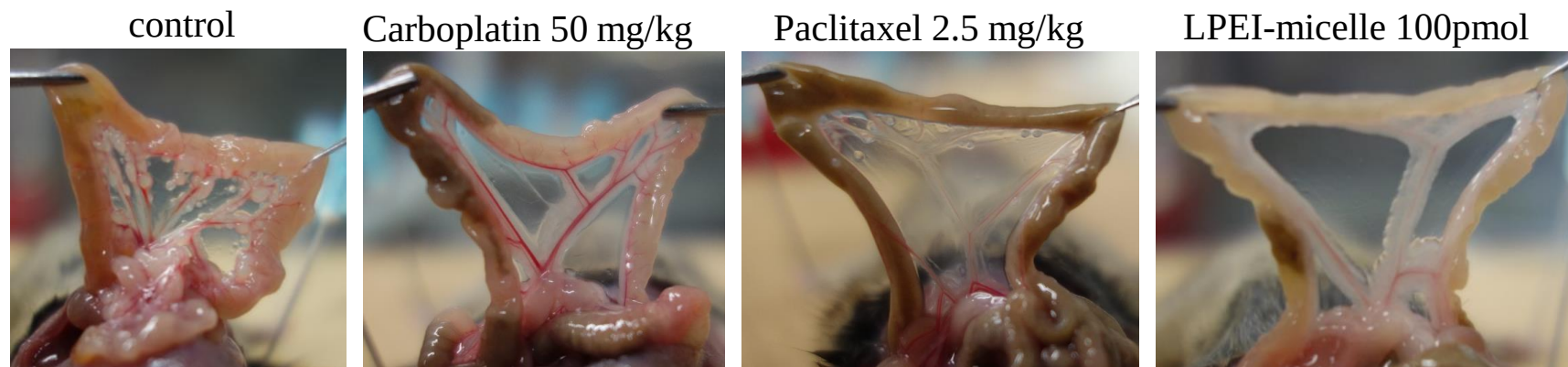
＜腹水中IFN-γ量＞



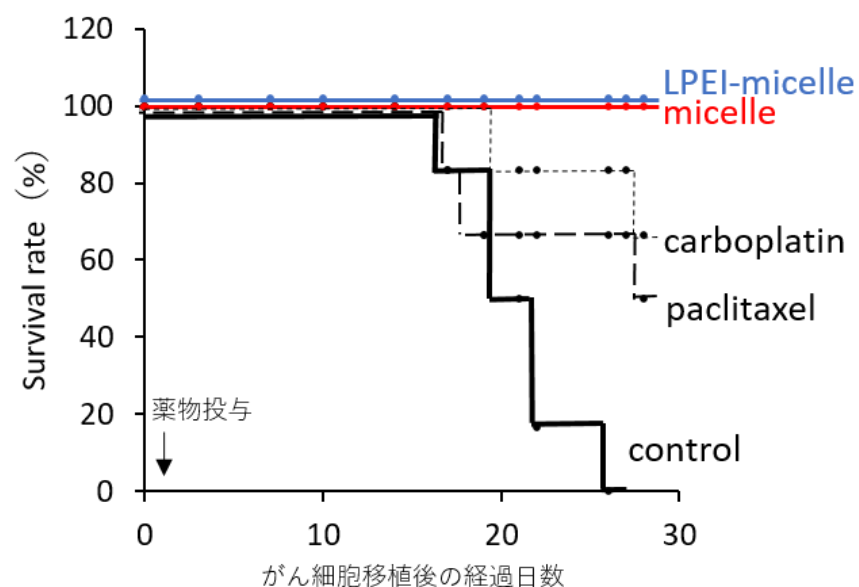
Mean ± SD (n=5) **p<0.01 vs control (Bonferroni test/ANOVA)

開発製剤は、卵巣がん腹膜転移モデルの転移コロニー数、腹水中の炎症を有意に抑制した。

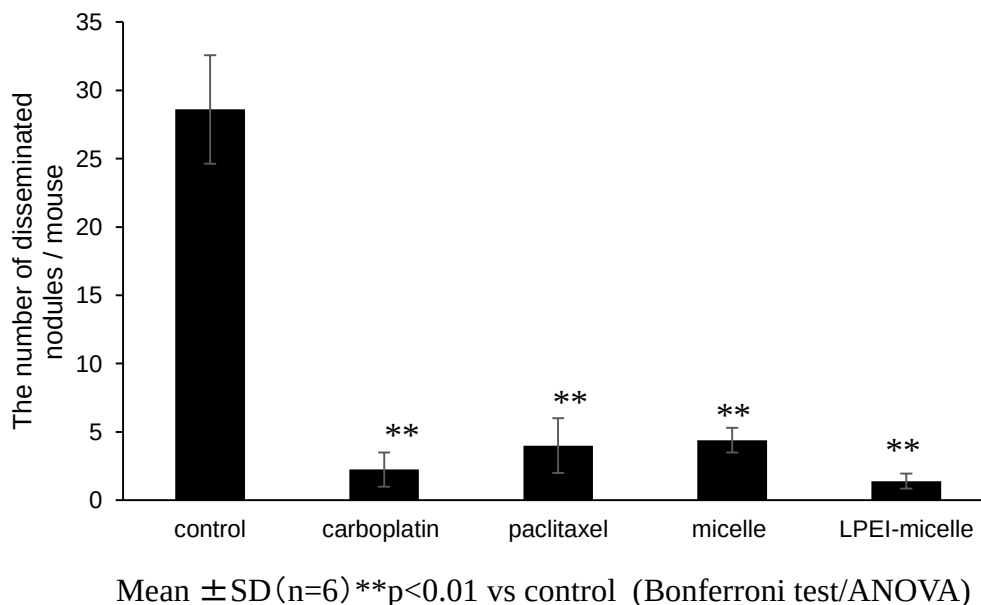
卵巣がん腹膜転移モデルマウスにおける開発製剤の がん転移抑制効果(標準治療薬との比較)



28日間における生存率



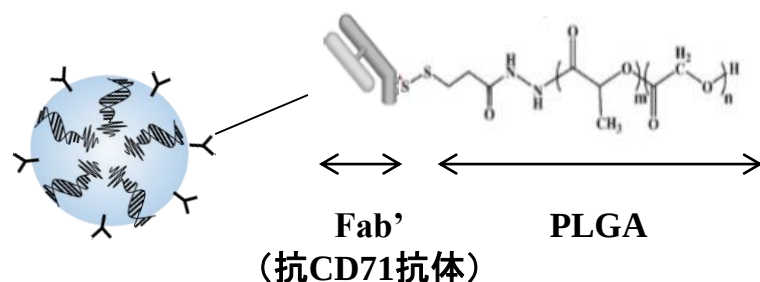
実験14日目の腹腔内腫瘍数



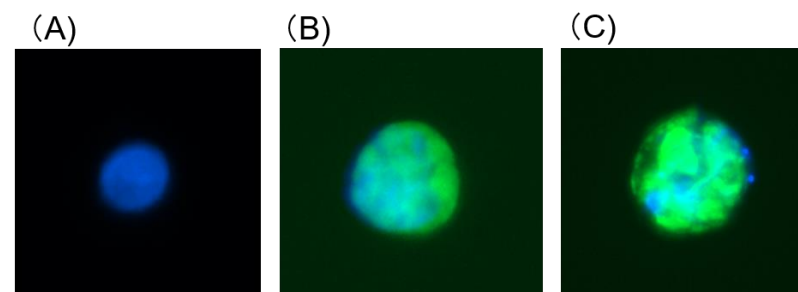
開発製剤は、標準治療薬であるカルボプラチンやパクリタキセルよりも生存率を延長させた。

がん指向性開発製剤の特異的標的細胞集積効果の検証

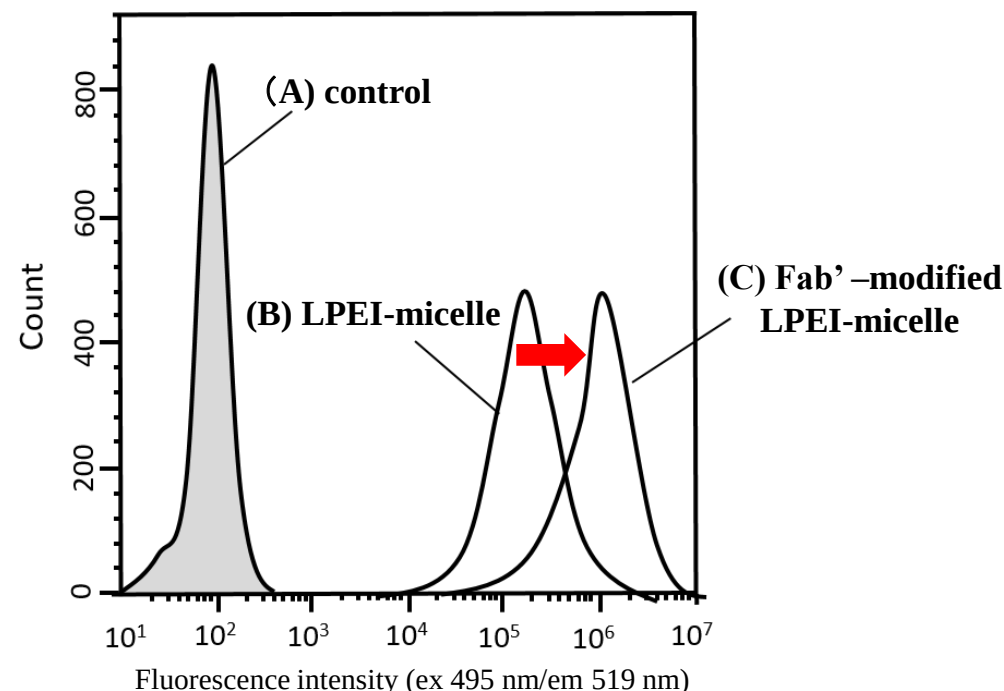
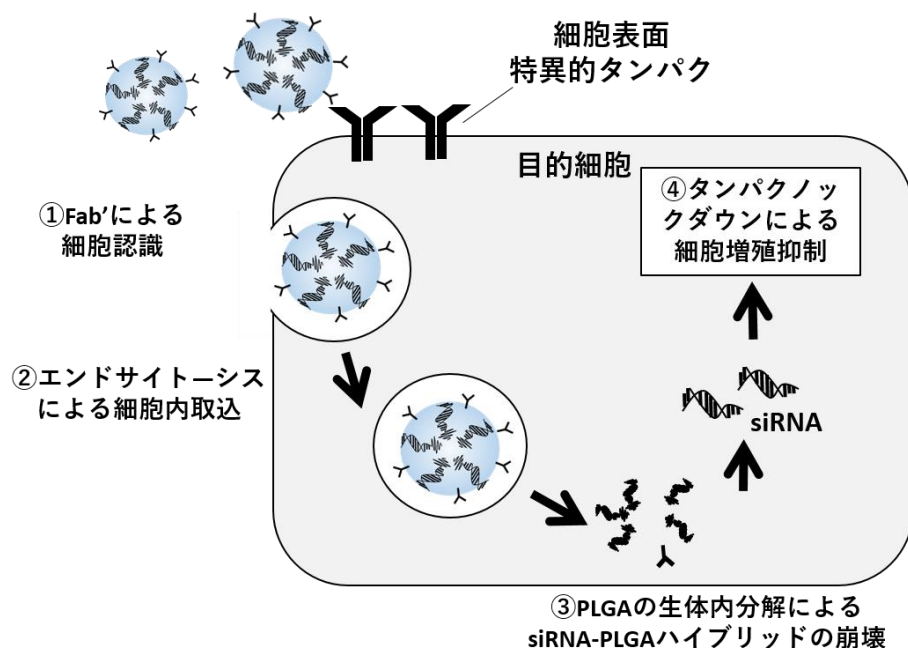
＜がん指向性ミセル製剤の構造と細胞内取り込み機序＞



＜蛍光標識siRNAの細胞内送達効率の評価＞



青: DAPI 緑: Alexa488標識siRNA



がん指向性開発製剤は、特異的に標的細胞を認識し、siRNAの細胞内送達効率を向上した。

新技術の特徴・従来技術との比較

- 使用している高分子が安全な素材である。
- 本技術であるPLGAハイブリッドミセルを利用した高効率な核酸送達により、*in vivo*において、核酸の投与量が従来の1/10～1/50に削減できる(100pmol (siRNAとして)/mouse1回投与で2週間有効:スライド7参照)。
- 多様な疾患治療薬開発を目指した、本研究とは異なる標的遺伝子や標的細胞認識分子への応用が可能なユニバーサルデザインである。

想定される用途

- 本ミセル製剤は、核酸医薬の安全かつ安定なDDSとして期待できる。
- 本ミセル製剤は、ペプチドも含有できる特徴を生かし、生理活性のあるペプチド含有医薬品への応用も可能である。
- 遺伝子導入試薬への応用も可能である。

実用化に向けた課題

- 現在、本開発製剤の卵巣がん転移治療効果については、標準治療薬と比較して、有意な治療効果、生存期間の延長効果まで検証済みである。
- 今後、実用化に向けて、がん細胞特異的集積性をさらに高めるために、静脈内投与後の開発製剤のマウスにおける体内分布について実験データを取得し、静脈投与可能な製剤設計条件設定を行っていく。

企業への期待

- 未解決の製剤の集積性向上は、がん細胞表面に特異的に発現する分子の中から最適な候補分子を選択することで克服できると考えている。
- 核酸医薬の開発、また難治性がん、遺伝子疾患、希少疾患の治療薬の研究開発に展開する製薬企業との共同研究を希望する。
- また、遺伝子導入試薬の製造・販売に関与する企業に、本技術の導入を期待する。

本技術に関する知的財産権

発明の名称	: 薬物送達粒子及び医薬組成物
出願番号	: 特願2020-172692
出願人	: 学校法人福岡大学
発明者	: 櫛川 舞

お問い合わせ先

福岡大学 研究推進部 産学官連携センター

T E L : 092-871-6631

F A X : 092-866-2308

e-mail : sanchi@adm.fukuoka-u.ac.jp