

総 説

# microRNA創薬による次世代がん治療

谷 口 高 平

大阪医科大学一般・消化器外科学教室, 大阪医科大学トランスレーショナルリサーチ部門,  
大阪医科大学救急医学教室

**要旨:** MicroRNA (miRNA)は内在性のRNAサイレンシング機構であり, 様々な生命現象に関与していることが明らかにされ, 既存のセントラルドグマを一変させた。特にがん領域での研究成果は目覚しく, 様々ながんの病態がmiRNAを通じて解明された。近年, 抗がん治療において, 治療効果の改善と副作用の軽減を目的に, 多数の分子標的薬が登場したが, がんの根絶には至らず, 次世代がん治療としてmiRNAを含めた核酸創薬が期待されている。しかし, 実現のためには, microRNA創薬が抱える諸問題を解決する必要がある。最も大きな課題は血中滞留性を含めた, ドラッグデリバリーシステムの開発であり, 医工薬の知見を集約した研究が求められる。本稿では, 現在のがん治療が抱える課題を踏まえ, miRNAがん研究におけるこれまでの研究成果と課題への取り組みを中心に概説する。

Key words: microRNA, 核酸医薬, Warburg効果, drug delivery system, 医工薬連携

緒 言

MicroRNA (miRNA)は20塩基程度からなる微小機能的核酸であり, 標的遺伝子の主に3'-非翻訳領域に結合し, その発現を負に制御することで機能を発揮する(図1)。miRNAは我々の体内に存在する内在性のRNAサイレンシング機構であり, 遺伝子発現のファインチューナーと称され, その発見はセントラルドグマを一変させ

た<sup>1)2)</sup>。現在, ヒトでは2500種類以上のmiRNAが報告されており, miRNAの様々な生命現象や多くの疾患への関与が指摘されている<sup>3)4)</sup>。特にがんでは, miRNAの脱制御が発がん, がんの進展に寄与することが知られており<sup>5)</sup>, 我々もその機能を報告してきた。また近年, miRNAの発現はバイオマーカーとしても有用であり<sup>6)</sup>, がん早期診断に応用する取組みが本邦でも国家プロジェ

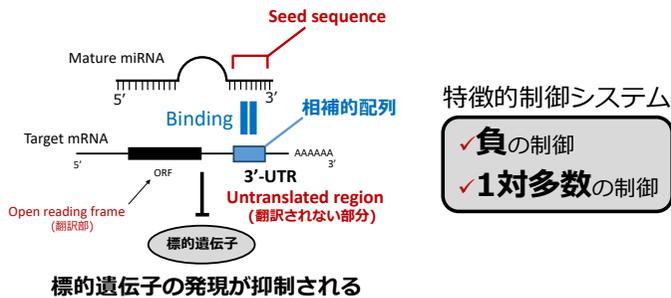


図1 microRNA (miRNA)による遺伝子制御機構のシェーマ図  
miRNAの5'末端から2-8番目の塩基配列(seed sequence)と相補的配列を有する3'側の非翻訳領域に結合し, 標的遺伝子の発現を抑制する。1つのmiRNAが数百の標的遺伝子を持ち, 発現を負に制御することが特徴である。

クトとして遂行している。一方で、次世代がん治療として、miRNAを含めた核酸創薬が期待されているが、未だその実現には至っていない。本稿では、現在のがん治療が抱える課題を踏まえ、miRNA研究におけるこれまでの研究成果と今後の展望について述べる。

### microRNAと発がん

前述の通りmiRNAは、標的遺伝子の非翻訳領域に結合し、その発現を負に制御する。そのメカニズムとして、mRNA不安定化や翻訳阻害が報告されている<sup>7)8)</sup>。即ち、通常、我々の体内ではmiRNAが正常に機能することで、標的遺伝子の発現抑制を介しホメオスタシスが維持されていると言える。しかし、様々な要因によりmiRNAの脱制御が生じると、標的遺伝子の抑制機構が破綻し、発現が上昇する。発がんの場合を想定するとmiRNAによりがん遺伝子、がん抑制遺伝子のバランスが調節され、そのバランスが、がん促進的に傾くと発がんが誘発される(図2)。

2005年に慢性リンパ性白血病(CLL)において抗アポトーシス分子である*BCL2*の発現上昇がmiR-15a/miR-16-1の脱制御を介して生じることが報告され<sup>9)</sup>、同時期に*RAS*がlet-7 familyにより制御されていることが報告された<sup>10)</sup>。これらは代表的ながん抑制型miRNA(Tumor suppressor miRNA: TS-miRNA)として機能している。一方で、がん促進型miRNA (Onco miRNA)としてmiR-17-92 clusterによる、がん促進作用が同時期にリンパ腫で報告されている<sup>11)</sup>。筆者の留学先でご指導頂いたAkao等のグループは2006年にlet-7, miR-143-3p, miR-145-5pの機能を大腸腫瘍で報告しており、miRNAがん

研究の創設期より研究に着手している<sup>12)13)</sup>。同グループの報告では、大腸腫瘍におけるmiR-143-3p, miR-145-5pの脱制御は腺腫の段階で生じており、miRNAの脱制御が発がんのinitiatorであることがうかがえる<sup>14)~16)</sup>。miRNAの脱制御機構としてはメチル化などのエピジェネティック変化や、*TP53*の変異、DroshaなどのmiRNAプロセシング分子の異常などが報告されているが、未解明の部分も多い<sup>17)~21)</sup>。しかし、少なからず、発がん過程において、多くのmiRNAの脱制御が生じた結果、標的がん遺伝子の発現上昇、標的がん抑制遺伝子の発現低下がもたらされ、がんが発育、進展していくことはもはや明白である。

### microRNAの臓器特異性とWarburg効果

自身のmiRNA研究としてmiR-124-3pの大腸がんにおける機能解析に着手した。miR-124-3pはneuronal cellsに豊富に分布され、神経分化に関与することが報告されている<sup>22)</sup>。我々は、大腸腫瘍においてmiR-124-3pが脱制御されることを見出し、新たな標的遺伝子としてAlternative Splicingに関与するPolypyrimidine tract binding protein 1 (*PTBPI*)を同定した<sup>23)</sup>。*PTBPI*はHeterogeneous nuclear ribonucleoproteins (HnRNPs) familyに属しExon Splicing Silencer (ESS)として機能するRNA binding proteinである。また*PTBPI*はHepatitis C virus (HCV)を代表としてウイルスのinternal ribosome entry site (IRES)構造に結合しキャップ非依存的な翻訳を促進させgenome replicationに関与することが報告されている<sup>24)25)</sup>。興味深いことに1956年にWarburgにより提唱された、がん特異的エネルギー代謝

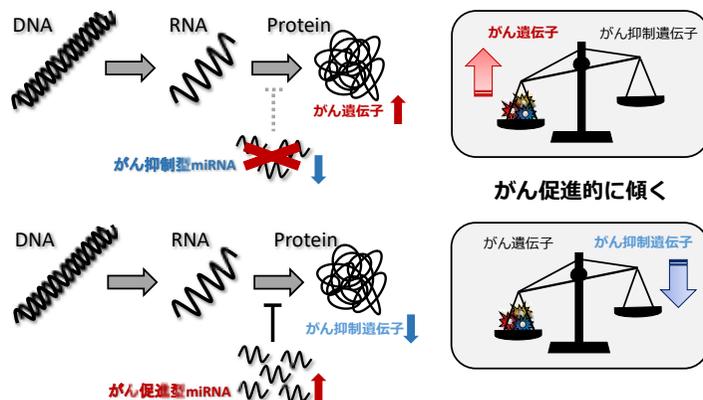


図2 miRNAの脱制御による発がん機構の概念図

がん遺伝子を標的とするmiRNA (がん抑制型miRNA)の発現が低下すると、がん遺伝子の発現が増加し、がん促進的に働く(上図)。反対に、がん抑制遺伝子を標的とするmiRNA (がん促進型miRNA)の発現が上昇すると、がん抑制遺伝子の発現が低下し、がん促進的に働く(下図)。

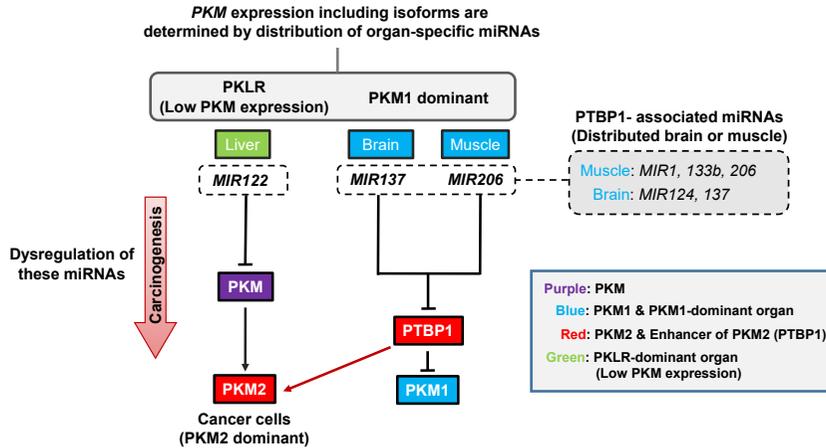


図3 臓器特異的miRNAの脱制御によるWarburg効果獲得機構のシェーマ図

*PTBP1*及び*PKM*を標的とするmiRNAは臓器特異的に分布している。miRNA発現の偏在により、各臓器における*PKM* isoformの発現が調節されており、miRNAが臓器の特徴を形成する1つの機構である。*PTBP1*/*PKM2*軸はWarburg効果の根幹のカスケードの1つであり、臓器特異的miRNAの脱制御とWarburg効果の獲得が発がんに関与していることが示唆される(図は文献30より引用)。

機構(Warburg効果)が50年の時を経て再び着目される中<sup>26)</sup>、*PTBP1*は解糖系の律速酵素であるピルビン酸キナーゼisoformの発現を*PKM2*に誘導することが相次いで報告された<sup>27) 28)</sup>。David等は*PTBP1*の転写因子としてIRES構造を持つ代表的がん遺伝子である*MYC*を挙げている<sup>27)</sup>。幸いにも*PTBP1*はmiR-124-3pの標的遺伝子であり、miR-124-3pの大腸がん細胞株に導入により*PKM* isoformの発現は*PTBP1*の抑制を介して*PKM2*から*PKM1*に典型的シフトを示した<sup>23)</sup>。これによりmiR-124-3p/*PTBP1*/*PKM* isoformのカスケードが同定された。更に興味深いことに、*PTBP1*を標的とするmiRNAは脳、筋組織に偏在するmiRNAから構成されていた<sup>29)</sup>。我々は、脳組織特異的な*PTBP1*調節miRNAとしてmiR-124-3p、miR-137-3pを筋組織特異的な*PTBP1*調節miRNAとしてmiR-1-3p、miR-133b、miR-206を同定した<sup>29) 30)</sup>。更に、肝臓組織特異的に発現するmiR-122-5pは*PKM*の3' UTRに直接結合し*PKM*自身の発現を抑制している<sup>31) 32)</sup>。事実、肝臓では*PKM*のisozymeである*PKLR*のみが発現している<sup>30) 33)</sup>。何れのmiRNAも発がん過程で脱制御され、がん細胞のWarburg効果獲得に関与している<sup>30)</sup>(図3)。*PTBP1*は大腸腫瘍、胃がん、膀胱がんで高発現しており、神経膠芽腫での発現増加の報告を合わせると普遍的がん遺伝子であると推測される<sup>34) - 37)</sup>。即ち、Warburg効果は発がん過程の普遍的獲得形質であり、その表現形の1つが*PTBP1*/*PKM2*の発現上昇であると考えられる。近年、Satoh等の大腸腫瘍における網羅的メタボローム解析によりWarburg効果の根幹を調節する遺伝子として

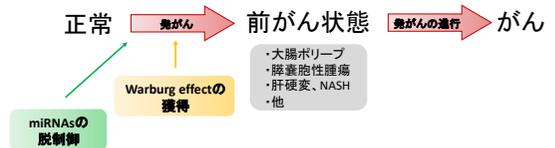


図4 Warburg効果獲得と発がん関連性の概念図

Warburg効果関連遺伝子の発現は様々ながん種で普遍的に亢進しており、大腸ポリープの検討では、前がん病変で既に発現が亢進していた。Warburg効果関連遺伝子の発現はmiRNAにより制御を受けており、miRNAの脱制御とWarburg効果の獲得が発がんの根源的現象ではないかと考え、現在、様々な前がん病変で解析を進めている。

*MYC*が示されている<sup>38)</sup>。我々の解析結果からも、miR-145-5pの*MYC*を介した、*PTBP1*の制御機構が明らかになっている<sup>35)</sup>。現在、miR-34aのWarburg効果に関する機能を解析しているが、やはり*MYC*が1つの重要な標的遺伝子の様である。今後、*MYC*調節に関与するmiRNAの機能を深く追及することでWarburg効果の根幹が更に明らかになるかもしれない。また、発がん過程のどの段階でWarburg効果が獲得されているかは非常に重要な検証課題である。Satoh等の報告においても大腸腺腫の段階で既にWarburg効果の形質を獲得していることが示されており<sup>38)</sup>、これはmiRNAの脱制御が発がんのinitiatorであるという我々の結果を裏付ける。現在、様々な前がん病変におけるWarburg効果獲得に関しての検証をmiRNAの観点から進めている(図4)。

### 抗がん治療の抱える問題点

我々が半世紀以上も使用しているいわゆる、抗がん剤はDNA合成や細胞分裂といった、生命の根源的現象を阻害するため、治療域と副作用域が近接していることが問題である。抗がん剤は第2次世界大戦中のマスタードガス研究に起源があることを考えるとその毒性も容易に想像できる。近年、副作用軽減を目指し、がん細胞に特異的に発現する分子を狙い撃つ分子標的剤の開発が盛んに行われている。分子標的剤の概念は何もがん治療に限ったことではなく、消化性潰瘍の治療剤であるヒスタミンH2受容体拮抗薬や高血圧治療剤であるアンジオテンシンII受容体拮抗薬なども分子を標的とした治療剤である。この様に、分子生物学の発展により、さまざまな生命現象のシグナル分子が明らかとなり、それを標的とした治療剤が開発されているが、がんにおいてはシグナル分子が複雑であり、がん種により活性化されているシグナル分子が異なることが、分子標的治療剤の開発を難しくしている。いわゆる単一のドライバー遺伝子として慢性骨髄性白血病(CML)における*BCR-ABL*融合遺伝子の存在が有名であり、*BCR-ABL*チロシンキナーゼ阻害薬であるイマチニブによりCMLの予後は著しく改善した<sup>39) 40)</sup>。しかしながら、長期投与により*BCR-ABL*キナーゼドメインの点突然変異が生じ、治療抵抗性を示し、確固たるドライバー遺伝子を有するCMLでさえ、新たな治療薬の開発と耐性獲得の繰り返しを呈している<sup>41) - 44)</sup>。固形腫瘍においては大腸がんのadenoma carcinoma sequence (ACS)<sup>45)</sup>や膵がんのpancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN)<sup>46)</sup>に代表される様に、多段階発症であり、真のドライバー遺伝子の同定は難しい。*KRAS* codon 12の変異が大腸がん、膵がんを含んだ様々ながん種で共通認識されているにも関わらず、*KRAS*を標的とした分子標的治療剤は未だ存在しない。

2015年、オバマ、アメリカ合衆国大統領の一般教書演説で、“Precision Medicine Initiative”が発表されたことは記憶に新しい。遅れること3年、本邦でも、厚生労働省により全国で11つのがんゲノム医療の中核拠点病院が選定され、「がん関連遺伝子パネル検査システム」を用いたPrecision Medicineが先進医療制度として動き出した。現在、当院もがんゲノム医療中核拠点連携病院として取組みを進めている。このシステムを端的に述べると、同時に複数のがん関連遺伝子の発現を対象患者ごとで調べ、その発現状況から個人に最適な治療薬を選択するというものである。しかし実際にdruggableな治療薬が見出される確率は2, 3割程度とも言われている。これは本邦で行われている治験が欧米と比べ極端に少ないことなどに起因しており、早急な体制整備が望まれる。

Precision Medicineは確かに一部の患者に対し、Drug Repositioningを可能にするが、現時点で既に、新たなイノベーションにも期待せざるを得ない。

### microRNA創薬の利点

従来の抗がん剤治療は「面」であるが、面が広すぎて正常細胞にまで影響を及ぼすことが問題である。分子標的治療は言い換えると、最も効果的で特異的な「点」を標的とした治療である。がんの性質を考えると、点治療には限界が存在することは明白であり、様々な新薬におけるRCTの結果、予後は数か月しか延長しないことがその限界の証明である。近年、免疫チェックポイント阻害剤の登場で、その点が、がん微小環境まで広がったことは、がん治療の革新的な事象であるが<sup>47)</sup>、一方で、点と点を組み合わせた「線」の治療がどこまで有効であるかを見極めなければならない。miRNAは1種のmiRNAが数百もの標的遺伝子をもつ。また1つの遺伝子のmRNA非翻訳領域にはmiRNAの結合部分が複数存在し発現が制御されている。これは生体内の「システム」と言える。発がん過程におけるmiRNAの脱制御と標的遺伝子群が、がん促進的に傾くことは「システムの破綻」である。この概念をもとに、我々はTS-miRNAを用いた創薬を「miRNA補充療法によるシステムの正常化」と位置付け、次世代がん治療として臨床応用を目指している(図5)。発がんにより変化した遺伝子群全体を捉えることは、miRNAの特徴を最も生かしており、元の状態に近づけるということは副作用の観点からも理にかなっていると考えられる。

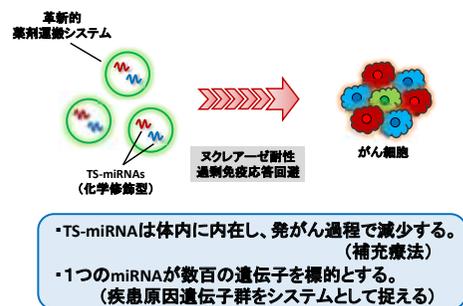


図5 miRNA補充療法の概念図

発がんにおける、がん抑制型miRNAの脱制御により、がん遺伝子群の発現が亢進することは、生体内システムの破綻であると考えられる。がん抑制型miRNAを補充し治療することは、システムの改善と位置付けられる。ドラッグデリバリーシステムの改善と、miRNA化学修飾により、血中滞留性を保持し、標的細胞への輸送を可能とし、補充療法の実現を目指す。

### microRNA創薬の障壁と打開策

しかしmiRNA創薬を実現させるには解決すべき点が存在する。当然、がんにおける対象疾患は切除不能進行がんや治療不能な血液腫瘍であり、血流を介した全身投与が想定される。しかし、血液中にはRNA分解酵素(ヌクレアーゼ)が存在するため、血液内に投与されたmiRNAは速やかに分解される。即ち、長期血中滞留性の保持が重要な課題であり、これは核酸創薬全体が抱える問題である<sup>48) 49)</sup>。

打開策の1つは、miRNA自身に化学修飾を施すことである。miRNAの化学修飾としてはリン酸部の修飾としてphosphorothioate修飾(O原子のS化)(図6A)、糖部2'位の修飾として2'-F、2'-O-Methyl(2'-OMe)、2'-O-Methoxyethyl(2'-MOE)や、2'位と4'位の架橋型locked nucleic acid(LNA)等が知られている<sup>49) - 52)</sup>(図6B)。Akao等はmiR-143-3pに対しこれ等の修飾を組み合わせたsynthetic miR-143-3pを合成し(図7A)、KRAS drivenな大腸がんに対し高い抗腫瘍効果を得ている<sup>53)</sup>(図7B)。また、Urata等は糖部2'位にジスルフィド結合を有する2'-O-Methyldithiomethyl修飾を施したReducing-Environment-Dependent Uncatalyzed Chemical Transforming RNA(REDUCT RNA)を開発しており<sup>54)</sup>、現在、共同でmiR-145-5p修飾の最適化を進めている。REDUCT RNAはヌクレアーゼに対する耐性を有し、細胞内還元環境でジスルフィド結合が切断され、天然型へと変換するプロドラッグ型RNAである<sup>55) - 58)</sup>(図7C)。

もう1つの打開策はmiRNAを運搬するdrug delivery system: DDSの開発である。Miyata等は、核酸DDSに求められる機能として(1)細胞外で核酸を安定に保護する機能、(2)標的とする組織・細胞を特異的に認識し、内部へと侵入する機能、(3)的細胞に取り込まれた後の、エンドソーム脱出能、(4)細胞質で核酸を放出する機能の4点を挙げている<sup>59)</sup>(図8)。核酸分子中のリン酸基、細胞表面は共に負に帯電しており、細胞膜を透過させるためにカチオン性キャリアが汎用される。*In vitro*の遺伝子導入試薬として汎用されているLipofectamine<sup>®</sup>やPolyethylenimine(PEI)はいずれもカチオン性であり、エンドサイトーシスにより高率に細胞内へ導入される<sup>60)</sup>。しかしながら、カチオン性キャリアは細胞内成分との非特異的相互作用により細胞毒性を示すことや、血液中に投与された場合に血液成分への非特異的吸着を介して肝臓などでトラップされてしまうことが肝外病変に対する治療では問題とされている<sup>61) - 63)</sup>。これらの課題を解決するために、Miyata等は非イオン性で生体適合性に優れたpolyethylene glycol(PEG)とカチオン性高分子のブロック共重合体を合成し<sup>64) 65)</sup>、核酸との静電相互作用(荷電中和)を介した最小会合数のナノ粒子(unit polyion complex: uPIC)を開発した<sup>59) 66) 67)</sup>(図9A)。DDSを設計する際に粒子径は非常に重要であり、腎排泄の回避(10 nm以上が望ましい)、組織の透過性、マクロファージによる食食の回避などを考慮しなければならない<sup>48)</sup>。また、固形がんに対しては100 nm以下のナノ粒子の集積率が良いとされており、enhanced permeability and

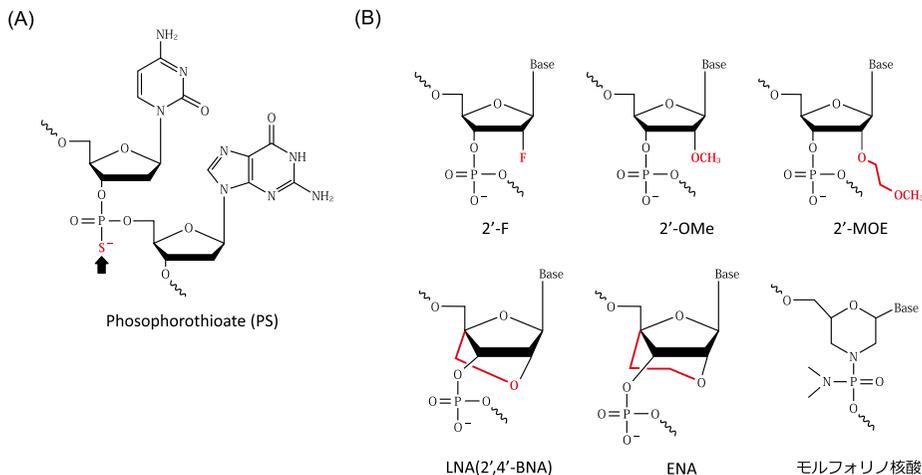


図6 miRNAに用いられる化学修飾

(A) 核酸リン酸部の修飾。(B) 核酸糖部の修飾。F: Fluorination, OMe: O-Methyl, MOE: O-Methoxyethyl, LNA: Locked Nucleic Acid, BNA: Bridged Nucleic Acid, ENA: Ethylene bridged Nucleic Acids (図は井上貴雄先生のご提供及び、文献50, 52より引用)。

retention (EPR) 効果として知られている<sup>68) 69)</sup>。これに関してCabral等は、膵臓がんモデルなどの間質が豊富な固形がんにおける集積性については、粒子径50 nm以下のナノ粒子が特に優れていると結論付けている<sup>70)</sup>。従って、uPICはEPR効果で腫瘍組織に集積し、エンドサイトーシスによりがん細胞に取り込まれると考えられる。

現在、我々はsynthetic miR-143-3p, miR-145-5pとuPICを組み合わせ、乳がん高転移株モデルにおける転移抑制を含めた抗腫瘍効果の検証を開始している。

一方、Wada等は膜透過性上昇と酵素耐性を目的に疎水性アミノ酸と塩基性アミノ酸を組み合わせた両親媒性ヘリックスペプチドを開発しsiRNAの細胞内導入に成功

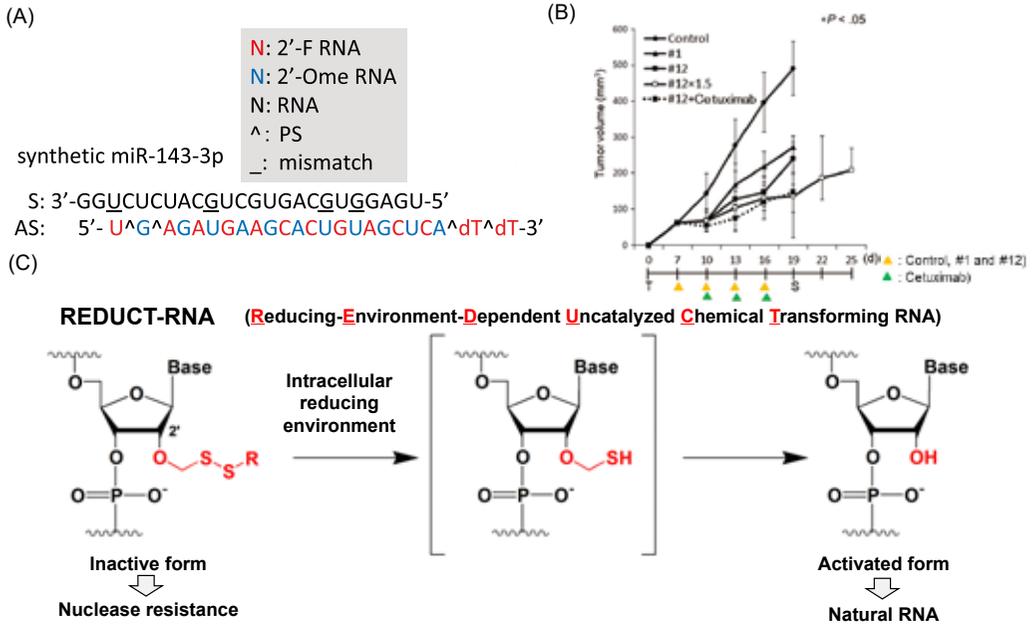


図7 我々が用いているmiRNA化学修飾  
 (A) Synthetic miR-143-3pの模式図。PS: Phosphorothioate (塩野義製薬と岐阜大学の共同開発による。文献53より引用)。(B)大腸がん細胞株皮下移植ヌードマウスに対する、Synthetic miR-143-3pの抗腫瘍効果。DDSとしてuPICを用いて、全身投与により抗腫瘍効果を確認した。Cetuximab腹腔内投与の併用により抗腫瘍効果の増強を認めた(文献53より引用)。(C) REDUCT-RNAの模式図。ヌクレアーゼ耐性と、細胞内で天然型に変換される(図は林淳祐先生のご提供)。

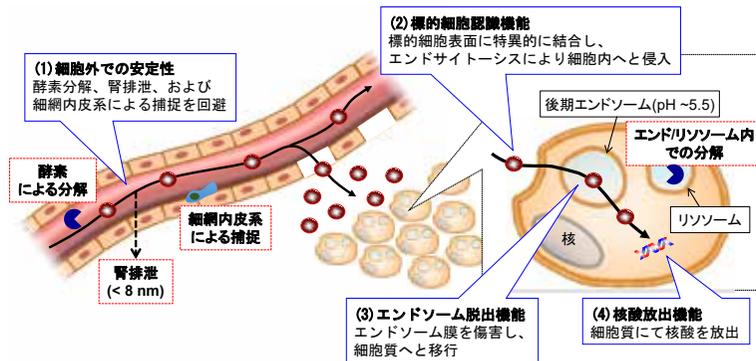


図8 核酸創薬における課題とDDSに求められる機能  
 miRNAを含めた核酸創薬には図に示した4点の課題克服が必要である(図は宮田完二郎先生のご提供及び、文献59より引用)。



表1 現在進行中のmiRNA創薬を用いた臨床試験の一覧(文献51より引用)

Name (company)	Agent	DDS	Target disease	Trial details	Clinical trial gov identifier
Mirvirasen (Santaris Pharma A/S and Hoffmann-La Roche)	AntimiR-122	LNA	Chronic hepatitis C	Single-centre phase I, completed	NCT01646489
				Multicentre phase II, completed	NCT01200420
				Multicentre phase II, ongoing	NCT01872936
				Single-centre phase II, completed	NCT02031133
				Single-centre phase II, completed	NCT02508090
RG-101 (Regulus Therapeutics)	AntimiR-122	GalNAc	Chronic hepatitis C	Phase I, completed	-
				Multiple phase II, ongoing	-
RG-125/AZD4076 (Regulus Therapeutics)	AntimiR-103/107	GalNAc	T2DM and NAFLD	Single-centre phase I, ongoing	NCT02612662
				Single-centre phase I/IIa, ongoing	NCT02826525
MRG-106 (miRagen Therapeutics)	AntimiR-155	LNA	Cutaneous T cell lymphoma and mycosis fungoides	Multicentre phase I, ongoing	NCT02580552
MRG-201 (miRagen Therapeutics)	miR-29 mimic	Cholesterol conjugate	Scleroderma	Single-centre phase I, ongoing	NCT02603224
MesomiR-1 (EnGeneC)	miR-16 mimic	EDV	Mesothelioma, NSCLC	Multi-centre phase I, ongoing	NCT02369198
MRX34 (Mirna Therapeutics)	miR-34a mimic	LNPs	Multiple solid tumor	Multicentre phase I, terminated	NCT01829971

DDS, drug delivery system; EDV, EnGeneC delivery system; GalNAc, N-acetyl-D-galactosamine; LNA, locked nucleic acid; LNPs, lipid nanoparticles; NAFLD, non-alcoholic fatty liver disease; NSCLC, non-small cell lung cancer; T2DM, type 2 diabetes.

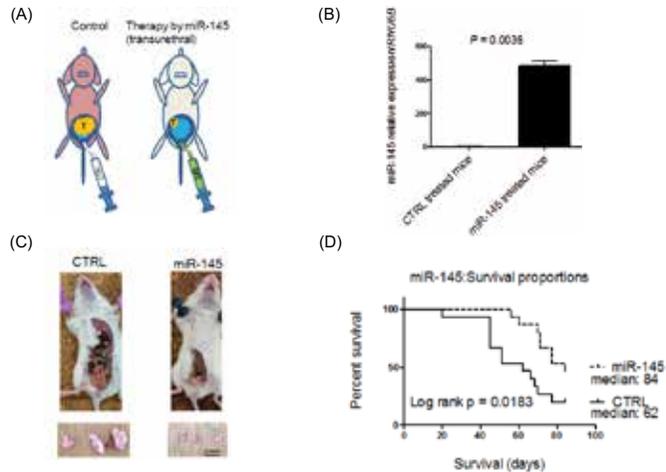


図10 マウス膀胱がん同所移植モデルに対する、miR-145-5p膀胱内投与による抗腫瘍効果 (A)膀胱内投与のシェーマ図。(B)膀胱内投与により移植腫瘍片内にmiR-145-5pの集積を確認した。(C)miR-145-5p膀胱内投与後の腫瘍写真。miR-145-5p膀胱内投与により抗腫瘍効果を認めた。(D)miR-145-5p膀胱内投与時の生存曲線。miR-145-5p膀胱内投与により生存率の延長を認めた(文献90より引用)。

### 今後の展望

我々は2015年に膀胱がん同所移植モデルでmiR-145-5pの膀胱内注入法による抗腫瘍効果を検討した。本研究では、内視鏡的に完全切除が難しいとされている膀胱上皮内がんの再発における、BCG膀胱内注入療法の代替療法としてmiRNA創薬の可能性を試みた。DDSとしては、

市販のカチオン性liposomeを用いたが、顕著な抗腫瘍効果と予後の延長を認めた<sup>90)</sup>(図10A-D)。現在、Akao等のグループが本学、泌尿器科学教室と連携し、uPICを併用したsynthetic miR-143-3pの全身投与、膀胱内注入法を用いて効果を検証しており成果が待たれる。当教室でも、腫瘍が表在し、局所投与が可能である乳がん、中で

も予後不良なトリプルネガティブ乳がん(TNBC)を標的疾患に選定し、検証を進めている。更に、再発性疾患として骨盤内臓全摘という過大侵襲を伴いQOLが著しく損なわれる直腸がん骨盤内再発を標的にし、動物モデルの作製に着手している。将来的展望として、早期発見が困難で、問質が豊富で薬剤移行性に乏しい、膵臓がん、スキルス胃がんなどの改善を目指したいと考えている。

### まとめ

miRNAは詳細な病態解明から、早期発見のバイオマーカー、創薬に至るまで幅広い臨床応用の可能性を有している。何が問題かは既に多く研究者が共通に認識しており、医・工・薬の知見を集約したイノベーションが望まれる。近年の核酸創薬分野の進展は著しく、いよいよ真の次世代がん治療の幕が開ける日もそう遠くはない。本学の建学の精神「医育機関の使命は医学教育と医学研究であり、またその研究は実地の医療に活かすことで完成する」に基づき、1つでも多くの知見を臨床に還元する場面に携わることを目標に日々邁進したい。

### 謝辞

本稿で紹介した内容の多くは、岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科の赤尾研究室で行われたものであり、miRNAのがん研究を初期から行ってこられた赤尾幸博教授にご指導頂いたことに深く感謝致します。また、当時から継続したサポートを頂いている赤尾研究室メンバーにも改めて感謝致します。現在、DDSシーズを御提供頂いている、宮田完二郎准教授(東京大学 宮田研究室)、浦田秀仁教授、和田俊一准教授、林淳祐助手(大阪薬科大学 機能分子創製化学研究室)に感謝申し上げます。また、本稿に資料を御提供頂いた、井上貴雄室長(国立医薬品食品衛生研究所 遺伝子医薬部第2室)に感謝申し上げます。

そして、本大学でTR部門立ち上げをサポート頂いた、大槻勝紀学長、小野富三人研究支援センター長、研究支援センターの方々、並びに、東治人教授、小村和正助教、当教室での研究体制整備に尽力頂いた、内山和久教授、高須朗教授、宮本亜紀子研究秘書にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

最後に、今回寄稿の機会をお与え頂いた、内山和久教授に深く御礼申し上げます。

### 参考文献

1) Lee, RC., Feinbaum, RL., Ambros, V.: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*.

*Cell* 75: 843–54, 1993

- 2) Reinhart, BJ., Slack, FJ., Basson, M., Pasquinelli, AE., Bettinger, JC., Rougvie, AE., et al.: The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403: 901–6, 2000
- 3) Ambros, V.: The functions of animal microRNAs. *Nature* 431: 350–5, 2004
- 4) Esteller, M.: Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 12: 861–74, 2011
- 5) Croce, CM.: Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat Rev Genet* 10: 704–14, 2009
- 6) Schwarzenbach, H., Nishida, N., Calin, GA., Pantel, K.: Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 11: 145–56, 2014
- 7) Baek, D., Villen, J., Shin, C., Camargo, FD., Gygi, SP., Bartel, DP.: The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455: 64–71, 2008
- 8) Guo, H., Ingolia, NT., Weissman, JS., Bartel, DP.: Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466: 835–40, 2010
- 9) Cimmino, A., Calin, GA., Fabbri, M., Iorio, MV., Ferracin, M., Shimizu, M., et al.: miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 13944–9, 2005
- 10) Johnson, SM., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., et al.: RAS is regulated by the *let-7* microRNA family. *Cell* 120: 635–47, 2005
- 11) He, L., Thomson, JM., Hemann, MT., Hernandez-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., et al.: A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435: 828–33, 2005
- 12) Akao, Y., Nakagawa, Y., Naoe, T.: *let-7* microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull* 29: 903–6, 2006
- 13) Akao, Y., Nakagawa, Y., Naoe, T.: MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. *Oncol Rep* 16: 845–50, 2006
- 14) Akao, Y., Nakagawa, Y., Hirata, I., Iio, A., Itoh, T., Kojima, K., et al.: Role of anti-oncomirs miR-143 and -145 in human colorectal tumors. *Cancer*

- Gene Ther 17: 398–408, 2010
- 15) Nakagawa, Y., Akao, Y., Taniguchi, K., Kamatani, A., Tahara, T., Kamano, T., et al.: Relationship between expression of onco-related miRNAs and the endoscopic appearance of colorectal tumors. *Int J Mol Sci* 16: 1526–43, 2015
  - 16) Nakagawa, Y., Akao, Y., Tahara, T., Yamashita, H., Nagasaka, M., Shibata, T., et al.: Development and endoscopic appearance of colorectal tumors are characterized by the expression profiles of miRNAs. *Med Mol Morphol* 51: 82–8, 2018
  - 17) Suzuki, H., Takatsuka, S., Akashi, H., Yamamoto, E., Nojima, M., Maruyama, R., et al.: Genome-wide profiling of chromatin signatures reveals epigenetic regulation of MicroRNA genes in colorectal cancer. *Cancer Res* 71: 5646–58, 2011
  - 18) He, L., He, X., Lim, LP., de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447: 1130–4, 2007
  - 19) Suzuki, HI., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., Miyazono, K.: Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* 460: 529–33, 2009
  - 20) Suzuki, HI., Miyazono, K.: Emerging complexity of microRNA generation cascades. *J Biochem* 149: 15–25, 2011
  - 21) Suzuki, HI.: [Dissecting microRNA biogenesis and microRNA-mediated regulation of gene network]. *Seikagaku* 87: 413–21, 2015
  - 22) Makeyev, EV., Zhang, J., Carrasco, MA., Maniatis, T.: The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 27: 435–48, 2007
  - 23) Taniguchi, K., Sugito, N., Kumazaki, M., Shinohara, H., Yamada, N., Nakagawa, Y., et al.: MicroRNA-124 inhibits cancer cell growth through PTB1/PKM1/PKM2 feedback cascade in colorectal cancer. *Cancer Lett* 363: 17–27, 2015
  - 24) Tsuchihara, K., Tanaka, T., Hijikata, M., Kuge, S., Toyoda, H., Nomoto, A., et al.: Specific interaction of polypyrimidine tract-binding protein with the extreme 3'-terminal structure of the hepatitis C virus genome, the 3'X. *J Virol* 71: 6720–6, 1997
  - 25) Clerte, C., Hall, KB: The domains of polypyrimidine tract binding protein have distinct RNA structural preferences. *Biochemistry* 48: 2063–74, 2009
  - 26) Warburg, O.: On the origin of cancer cells. *Science* 123: 309–14, 1956
  - 27) David, CJ., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P., Manley, JL.: HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature* 463: 364–8, 2010
  - 28) Clower, CV., Chatterjee, D., Wang, Z., Cantley, LC., Vander Heiden, MG., Krainer, AR.: The alternative splicing repressors hnRNP A1/A2 and PTB influence pyruvate kinase isoform expression and cell metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 1894–9, 2010
  - 29) Taniguchi, K., Ito, Y., Sugito, N., Kumazaki, M., Shinohara, H., Yamada, N., et al.: Organ-specific PTB1-associated microRNAs determine expression of pyruvate kinase isoforms. *Sci Rep* 5: 8647, 2015
  - 30) Taniguchi, K., Sugito, N., Shinohara, H., Kuranaga, Y., Inomata, Y., Komura, K., et al.: Organ-Specific MicroRNAs (MIR122, 137, and 206) Contribute to Tissue Characteristics and Carcinogenesis by Regulating Pyruvate Kinase M1/2 (PKM) Expression. *Int J Mol Sci* 19, 2018
  - 31) Liu, AM., Xu, Z., Shek, FH., Wong, KF., Lee, NP., Poon, RT., et al.: miR-122 targets pyruvate kinase M2 and affects metabolism of hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 9: e86872, 2014
  - 32) Nakao, K., Miyaaki, H., Ichikawa, T.: Antitumor function of microRNA-122 against hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 49: 589–93, 2014
  - 33) Noguchi, T., Yamada, K., Inoue, H., Matsuda, T., Tanaka, T.: The L- and R-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from a single gene by use of different promoters. *J Biol Chem* 262: 14366–71, 1987
  - 34) Taniguchi, K., Sakai, M., Sugito, N., Kumazaki, M., Shinohara, H., Yamada, N., et al.: PTB1-associated microRNA-1 and -133b suppress the Warburg effect in colorectal tumors. *Oncotarget* 7: 18940–52, 2016
  - 35) Minami, K., Taniguchi, K., Sugito, N., Kuranaga, Y., Inamoto, T., Takahara, K., et al.: MiR-145 negatively regulates Warburg effect by silencing KLF4 and PTBP1 in bladder cancer cells. *Oncotarget* 8: 33064–77, 2017

- 36) Sugiyama, T., Taniguchi, K., Matsushashi, N., Tajirika, T., Futamura, M., Takai, T., et al.: MiR-133b inhibits growth of human gastric cancer cells by silencing pyruvate kinase muscle-splicer polypyrimidine tract-binding protein 1. *Cancer Sci* 107: 1767–75, 2016
- 37) Jin, W., McCutcheon, IE., Fuller, GN., Huang, ES., Cote, GJ.: Fibroblast growth factor receptor-1 alpha-exon exclusion and polypyrimidine tract-binding protein in glioblastoma multiforme tumors. *Cancer Res* 60: 1221–4, 2000
- 38) Satoh, K., Yachida, S., Sugimoto, M., Oshima, M., Nakagawa, T., Akamoto, S., et al.: Global metabolic reprogramming of colorectal cancer occurs at adenoma stage and is induced by MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: E7697–E706, 2017
- 39) O'Brien, SG., Guilhot, F., Larson, RA., Gathmann, I., Baccarani, M., Cervantes, F., et al.: Imatinib compared with interferon and low-dose cytarabine for newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 348: 994–1004, 2003
- 40) Hochhaus, A., O'Brien, SG., Guilhot, F., Druker, BJ., Branford, S., Foroni, L., et al.: Six-year follow-up of patients receiving imatinib for the first-line treatment of chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 23: 1054–61, 2009
- 41) Hughes, T., Deininger, M., Hochhaus, A., Branford, S., Radich, J., Kaeda, J., et al.: Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood* 108: 28–37, 2006
- 42) Soverini, S., Hochhaus, A., Nicolini, FE., Gruber, F., Lange, T., Saglio, G., et al.: BCR-ABL kinase domain mutation analysis in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine kinase inhibitors: recommendations from an expert panel on behalf of European LeukemiaNet. *Blood* 118: 1208–15, 2011
- 43) Redaelli, S., Mologni, L., Rostagno, R., Piazza, R., Magistroni, V., Cecon, M., et al.: Three novel patient-derived BCR/ABL mutants show different sensitivity to second and third generation tyrosine kinase inhibitors. *Am J Hematol* 87: E125–8, 2012
- 44) 吉田 孝寛, リュウ イリーン, 太田 美穂子, 中山 博, 柳原 康夫, 中村 裕樹, 他: 第三世代BCR-ABLチロシンキナーゼ阻害薬ボナチニブ(アイクルシグ<sup>®</sup>)の薬理学的特性および臨床成績. *日本薬理学雑誌* 150: 54–61, 2017
- 45) Markowitz, SD., Bertagnolli, MM.: Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* 361: 2449–60, 2009
- 46) Takaori, K., Hruban, RH., Maitra, A., Tanigawa, N.: Pancreatic intraepithelial neoplasia. *Pancreas* 28: 257–62, 2004
- 47) Ribas, A., Puzanov, I., Dummer, R., Schadendorf, D., Hamid, O., Robert, C., et al.: Pembrolizumab versus investigator-choice chemotherapy for ipilimumab-refractory melanoma (KEYNOTE-002): a randomised, controlled, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 16: 908–18, 2015
- 48) 宮田 完二郎, 内田 智士, 内藤 瑞, 片岡 一則: 高分子ナノテクノロジーが切り拓く核酸医薬デリバリー. *Drug Delivery System* 31: 44–53, 2016
- 49) Li, Z., Rana, TM.: Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 13: 622–38, 2014
- 50) 井上 貴雄: 核酸医薬品開発の現状. *Drug Delivery System* 31: 10–23, 2016
- 51) Rupaimoole, R., Slack, FJ.: MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov* 16: 203–22, 2017
- 52) 井上 貴雄: 第1章 核酸医薬品における開発の現状と安全性評価 1節 核酸医薬品の開発動向. 先端治療技術の実用化と開発戦略(核酸医薬, 免疫療法, 遺伝子治療, 細胞医薬品) 3–18, 2017
- 53) Akao, Y., Kumazaki, M., Shinohara, H., Sugito, N., Kuranaga, Y., Tsujino, T., et al.: Impairment of K-Ras signaling networks and increased efficacy of epidermal growth factor receptor inhibitors by a novel synthetic miR-143. *Cancer Sci* 2018
- 54) Ochi, Y., Nakagawa, O., Sakaguchi, K., Wada, S., Urata, H.: A post-synthetic approach for the synthesis of 2'-O-methyldithiomethyl-modified oligonucleotides responsive to a reducing environment. *Chem Commun (Camb)* 49: 7620–2, 2013

- 55) Ochi, Y., Nakagawa, O., Hayashi, J., Wada, S., Urata, H.: A New Nucleic Acid Prodrug Responsive to High Thiol Concentration: Synthesis of 2'-O-Methylthiomethyl-Modified Oligonucleotides by Post-Synthetic Modification. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* 62: 4 63 1–20, 2015
- 56) Ochi, Y., Imai, M., Nakagawa, O., Hayashi, J., Wada, S., Urata, H.: Gene silencing by 2'-O-methylthiomethyl-modified siRNA, a prodrug-type siRNA responsive to reducing environment. *Bioorg Med Chem Lett* 26: 845–8, 2016
- 57) Hayashi, J., Samezawa, Y., Ochi, Y., Wada, S., Urata, H.: Syntheses of prodrug-type phosphotriester oligonucleotides responsive to intracellular reducing environment for improvement of cell membrane permeability and nuclease resistance. *Bioorg Med Chem Lett* 27: 3135–8, 2017
- 58) Hayashi, J., Nishigaki, M., Ochi, Y., Wada, S., Wada, F., Nakagawa, O., et al.: Effective gene silencing activity of prodrug-type 2'-O-methylthiomethyl siRNA compared with non-prodrug-type 2'-O-methyl siRNA. *Bioorg Med Chem Lett* 28: 2171–4, 2018
- 59) 宮田 完二郎: 高分子・無機材料を用いたナノ構造体の創製と核酸デリバリーへの応用. *日本核酸医薬学会誌* 22: 13–23, 2018
- 60) 瀬上 由貴, 川上 茂: 遺伝子導入試薬. *Drug Delivery System* 32: 66–8, 2017
- 61) Lv, H., Zhang, S., Wang, B., Cui, S., Yan, J.: Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. *J Control Release* 114: 100–9, 2006
- 62) Hatanaka, K., Asai, T., Koide, H., Kenjo, E., Tsuzuku, T., Harada, N., et al.: Development of double-stranded siRNA labeling method using positron emitter and its in vivo trafficking analyzed by positron emission tomography. *Bioconjug Chem* 21: 756–63, 2010
- 63) 曾宮 正晴, 黒田 俊一: 非カチオン性リポソームによる核酸医薬送達法の可能性. *Drug Delivery System* 31: 35–43, 2016
- 64) Kataoka, K., Togawa, H., Harada, A., Yasugi, K., Matsumoto, T., Katayose, S.: Spontaneous Formation of Polyion Complex Micelles with Narrow Distribution from Antisense Oligonucleotide and Cationic Block Copolymer in Physiological Saline. *Macromolecules* 29: 8556–7, 1996
- 65) Miyata, K., Nishiyama, N., Kataoka, K.: Rational design of smart supramolecular assemblies for gene delivery: chemical challenges in the creation of artificial viruses. *Chem Soc Rev* 41: 2562–74, 2012
- 66) Harada, A., Kataoka, K.: Chain length recognition: core-shell supramolecular assembly from oppositely charged block copolymers. *Science* 283: 65–7, 1999
- 67) Miyata, K.: Smart polymeric nanocarriers for small nucleic acid delivery. *Drug Discov Ther* 10: 236–47, 2016
- 68) Matsumura, Y., Maeda, H.: A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs. *Cancer Research* 46: 6387–92, 1986
- 69) Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K.: Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *Journal of Controlled Release* 65: 271–84, 2000
- 70) Cabral, H., Matsumoto, Y., Mizuno, K., Chen, Q., Murakami, M., Kimura, M., et al.: Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size. *Nat Nanotechnol* 6: 815–23, 2011
- 71) Wada, S., Hashimoto, Y., Kawai, Y., Miyata, K., Tsuda, H., Nakagawa, O., et al.: Effect of Ala replacement with Aib in amphipathic cell-penetrating peptide on oligonucleotide delivery into cells. *Bioorg Med Chem* 21: 7669–73, 2013
- 72) Wada, S., Urase, T., Hasegawa, Y., Ban, K., Sudani, A., Kawai, Y., et al.: Aib-containing peptide analogs: cellular uptake and utilization in oligonucleotide delivery. *Bioorg Med Chem* 22: 6776–80, 2014
- 73) Wada, S., Iwata, M., Ozaki, Y., Ozaki, T., Hayashi, J., Urata, H.: Design of cyclic RGD-conjugated Aib-containing amphipathic helical peptides for targeted delivery of small interfering RNA. *Bioorg Med Chem* 24: 4478–85, 2016
- 74) Wada, S., Takesada, A., Nagamura, Y., Sogabe, E., Ohki, R., Hayashi, J., et al.: Structure-activity

- relationship study of Aib-containing amphipathic helical peptide-cyclic RGD conjugates as carriers for siRNA delivery. *Bioorg Med Chem Lett* 27: 5378–81, 2017
- 75) Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., Tuschl, T.: Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12: 735–9, 2002
  - 76) Jopling, CL., Schutz, S., Sarnow, P.: Position-dependent function for a tandem microRNA miR-122-binding site located in the hepatitis C virus RNA genome. *Cell Host Microbe* 4: 77–85, 2008
  - 77) Henke, JI., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schuttler, CG., Fehr, C., et al.: microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J* 27: 3300–10, 2008
  - 78) Fukuhara, T., Matsuura, Y.: Role of miR-122 and lipid metabolism in HCV infection. *J Gastroenterol* 48: 169–76, 2013
  - 79) Jopling, CL., Yi, M., Lancaster, AM., Lemon, SM., Sarnow, P.: Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309: 1577–81, 2005
  - 80) Janssen, HL., Reesink, HW., Lawitz, EJ., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., et al.: Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N Engl J Med* 368: 1685–94, 2013
  - 81) Fitzgerald, K., Frank-Kamenetsky, M., Shulgamorskaya, S., Liebow, A., Bettencourt, BR., Sutherland, JE., et al.: Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: a randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet* 383: 60–8, 2014
  - 82) Nair, JK., Willoughby, JL., Chan, A., Charisse, K., Alam, MR., Wang, Q., et al.: Multivalent N-acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing. *J Am Chem Soc* 136: 16958–61, 2014
  - 83) Bader, AG.: miR-34 - a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Front Genet* 3: 120, 2012
  - 84) Wang, X., Li, J., Dong, K., Lin, F., Long, M., Ouyang, Y., et al.: Tumor suppressor miR-34a targets PD-L1 and functions as a potential immunotherapeutic target in acute myeloid leukemia. *Cell Signal* 27: 443–52, 2015
  - 85) Akao, Y., Noguchi, S., Iio, A., Kojima, K., Takagi, T., Naoe, T.: Dysregulation of microRNA-34a expression causes drug-resistance to 5-FU in human colon cancer DLD-1 cells. *Cancer Lett* 300: 197–204, 2011
  - 86) Akao, Y., Khoo, F., Kumazaki, M., Shinohara, H., Miki, K., Yamada, N.: Extracellular disposal of tumor-suppressor miRs-145 and -34a via microvesicles and 5-FU resistance of human colon cancer cells. *Int J Mol Sci* 15: 1392–401, 2014
  - 87) Kumazaki, M., Noguchi, S., Yasui, Y., Iwasaki, J., Shinohara, H., Yamada, N., et al.: Anti-cancer effects of naturally occurring compounds through modulation of signal transduction and miRNA expression in human colon cancer cells. *J Nutr Biochem* 24: 1849–58, 2013
  - 88) Beg, MS., Brenner, AJ., Sachdev, J., Borad, M., Kang, YK., Stoudemire, J., et al.: Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs* 35: 180–8, 2017
  - 89) Tolcher, AW., Rodriguez, WV., Rasco, DW., Patnaik, A., Papadopoulos, KP., Amaya, A., et al.: A phase 1 study of the BCL2-targeted deoxyribonucleic acid inhibitor (DNAi) PNT2258 in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 73: 363–71, 2014
  - 90) Inamoto, T., Taniguchi, K., Takahara, K., Iwatsuki, A., Takai, T., Komura, K., et al.: Intravesical administration of exogenous microRNA-145 as a therapy for mouse orthotopic human bladder cancer xenograft. *Oncotarget* 6: 21628–35, 2015