

氏 名	有馬 純
(ふりがな)	(ありま じゅん)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	甲 第 63 号
学 位 審 査 年 月 日	令和 6 年 1 月 26 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 名	Antitumor effects of chemically modified miR-143 lipoplexes in a mouse model of pelvic colorectal cancer via myristoylated alanine-rich C kinase substrate downregulation (骨盤内大腸癌再発マウスモデルにおける化学修飾 型 miR-143 リポプレックスの MARCKS の抑制による 抗腫瘍効果)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 朝日 通雄 教授 近藤 洋一 教授 日下 裕介

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

背景：MicroRNA (miR) は 20 塩基程度からなる微小機能性核酸であり、主に標的遺伝子の 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。miR の発現異常が、発がんやがんの進展に関与していることが多くのがん種で示されている。そのため、miR は、診断バイオマーカーや治療の標的として期待されている。がん抑制型 miR は、発癌過程で減少した miR を補充し、正常な細胞機能に近づけることで抗腫瘍的に働くとされている。しかしながら、miR は体内の核酸分解酵素で代謝されるため、がんに効果的に作用するためには、miR を標的臓器に到達させる drug delivery system (DDS)を確立させることが課題である。この課題を克服するために、我々は miR-143 に化学修飾を付加した化学修飾型 miR-143 を開発した。具体的には、リン酸部の phosphorothioate 修飾

や、糖部 2' 位の修飾を付加し、非修飾の miR-143 (Ambion®) よりも核酸分解に対する抵抗性を有した miR である。この化学修飾型 miR-143 を用いて、これまでに腎がんや膀胱がんにおいて、抗腫瘍効果を報告してきた。また、近年、陽イオン性の脂質ナノ粒子が、siRNA に代表される核酸医薬の DDS として用いられており、miR 創薬への応用も期待される。

大腸直腸癌は生活習慣の欧米化に伴い、我が国でも増加しており、根治的切除後の再発症例も増加傾向にある。再発症例に対する治療の第一選択は、外科的切除であるが、骨盤内再発病変に対する追加切除は、膀胱、前立腺、子宮、仙骨などの他臓器切除を必要とするため、患者負担が極めて大きい。従って、手術に代わる代替治療戦略を構築することが必要であり、我々は大腸癌骨盤内再発マウスモデルを作製し、代替治療の可能性を探索してきた。

これらの背景から、本研究では、化学修飾型 miR-143 と陽イオン性の脂質ナノ粒子で構成した化学修飾型 miR-143 リポプレックスの、大腸癌骨盤内再発マウスモデルにおける抗腫瘍効果を検証することとした。

目的: 我々が作製した大腸癌骨盤内再発モデルマウスに化学修飾型 miR-143 リポプレックスを投与し、抗腫瘍効果とその機序を明らかにすることが目的である。

方法: まず、核酸分解酵素に対する耐性を検証するために、非修飾の miR-143、化学修飾型 miR-143 をウシ胎児血清 (FBS) 内で 37 度でインキュベーションし、経時的に濃度を qRT-PCR 法で測定した。次に、化学修飾型 miR-143 リポプレックスをマウス尾静脈より投与し、血中の滞留性を評価した。大腸癌骨盤内再発モデルマウスは、ルシフェラーゼ導入株である大腸癌細胞 DLD-1 clone#1-Luc および HT-29-Luc (10 万個/100 μ L) を、ヌードマウスの直腸、膺、坐骨の中心点に注入して作製した。このマウスモデルの尾静脈に、化学修飾型 miR-143 リポプレックスを投与し、腫瘍内の miR-143 の局在を *in situ* hybridization で評価した。抗腫瘍効果に関しては、*in vivo* imaging system (IVIS) を用いた腫瘍量と全生存期間について、コントロール miR 投与群と化学修飾型 miR-143 投与

群で比較検証した。コントロール miR としては、非機能性 miR を用いた。両群の miR 投与後の腫瘍サンプルを採取し、プロテオーム解析、western blot 法 (WB 法)、免疫染色、PCR 法を用いて抗腫瘍効果の分子学的機序を探索し、化学修飾型 miR-143 の標的遺伝子の同定を試みた。*in vivo* で得られた標的遺伝子に対して、*in vitro* でノックダウンを行い、大腸癌細胞の増殖抑制に寄与するかを検証した。

結果：化学修飾型 miR-143 は非修飾の miR-143 と比較して、ウシ血清 (FBS) への混入後、60 分まで高い濃度で保たれており、マウス尾静脈内投与後の血中では、化学修飾型 miR-143 リポプレックスは投与後 72 時間まで濃度が維持されていた。また、*in situ* hybridization では、化学修飾型 miR-143 リポプレックスが、腫瘍組織内の血流が豊富な領域に到達していることが観察された。化学修飾型 miR-143 リポプレックスは、大腸癌骨盤内再発マウスモデルに対して、有意な抗腫瘍効果を示し、全生存期間の延長を示した。採取した腫瘍サンプルのプロテオーム解析から、化学修飾型 miR-143 の標的遺伝子として Myristoylated Alanine-rich C Kinase Substrate (MARCKS) が同定された。プロテオーム解析の結果は、免疫染色や WB 法でも確認できた。また、*in vitro* でも、化学修飾型 miR-143 は、MARCKS を抑制して、大腸癌の増殖を抑制した。さらに、MARCKS を siRNA でノックダウンすると、大腸癌の増殖が抑制された。以上の結果から、化学修飾型 miR-143 リポプレックスは、MARCKS を介して、骨盤内大腸癌に対して抗腫瘍的に機能することが示唆された。

考察：化学修飾型 miR-143 は、FBS 中の核酸分解酵素に対する耐性を示し、さらに化学修飾型 miR-143 リポプレックスは、血流によって腫瘍に到達したため、抗腫瘍効果をもたらしたと考えられる。また、全生存期間の延長は、化学修飾型 miR-143 リポプレックスが致死的な副作用が生じないことを示唆している。標的遺伝子に関しては、以前の研究では、化学修飾型 miR-143 が RAS ネットワークを抑制し、KRAS、SOS1、AKT、ERK の抑制により、大腸、胃、膀胱がんの増殖を抑制することを示していた。本研究では、プロテオーム解析による網羅的タンパク発現解析を通じて、MARCKS が新たな標的遺伝子であるこ

とを明らかにした。MARCKS は、肺がん等で、がんの成長・増殖・遊走能・浸潤性に関与する膜関連タンパク質として知られており、がん治療の標的遺伝子であると認識されている。本研究においても、MARCKS のノックダウンにより大腸癌細胞の増殖抑制が示された。

結論：化学修飾型 miR-143 リポプレックスの血中投与は、マウスの生存期間を延長し、骨盤内大腸癌の増殖を有意に抑制した。さらに、MARCKS は化学修飾型 miR-143 の主要な標的遺伝子であった。本研究によって、化学修飾型 miR-143 リポプレックスが、骨盤内大腸癌再発に対して、MARCKS 抑制により抗腫瘍的に機能することが明らかになった。

論文審査結果の要旨

MicroRNA (miR) は、がんの発生や進行に関与する微小機能性核酸であり、特にがん抑制型 miR はがん治療への応用が期待される。しかし、miR は体内の核酸分解酵素によって代謝されるため、その安定化と drug delivery system (DDS) を確立させることが課題である。この課題に対応するため、申請者らは miR-143 に化学修飾を付加した化学修飾型 miR-143 を開発した。この化学修飾型 miR-143 は、リン酸部の phosphorothioate 修飾や糖部 2' 位の修飾付加により、非修飾の miR-143 よりも、核酸分解に対する抵抗性を有した miR である。また、近年、陽イオン性の脂質ナノ粒子が、核酸医薬の DDS として用いられており、miR 創薬への応用も期待される。

大腸直腸癌は生活習慣の欧米化に伴い我が国で増加しており、根治的切除後の再発症例も増加傾向にある。特に骨盤内再発の外科的切除では、患者負担が極めて大きいため、手術に代わる代替治療戦略を構築することが必要である。

本研究では、化学修飾型 miR-143 と陽イオン性の脂質ナノ粒子で構成した化学修飾型 miR-143 リポプレックスの大腸癌骨盤内再発モデルへの抗腫瘍効果とその機序を明らかにすることを目的とした。

ヌードマウスに大腸癌細胞を移植して骨盤内再発モデルを作製し、化学修飾型 miR-143 リポプレックスを経静脈的に全身投与した。その結果、化学修飾型 miR-143 リポプレックスは、腫瘍組織内の血流が豊富な領域に到達しており、骨盤内腫瘍に対して、高い抗腫瘍効果を示すことを見出した。また機序解明のため、化学修飾型 miR-143 リポプレックス投与後、採取した腫瘍サンプルのプロテオーム解析による網羅的タンパク発現解析を通じて、Myristoylated Alanine-rich C Kinase Substrate (MARCKS) が化学修飾型 miR-143 の新たな標的遺伝子であることを明らかにした。細胞実験で、MARCKS の発現抑制が大腸癌の増殖を有意に抑制したことより、申請者らの以前の研究では、化学修飾型 miR-143 が RAS ネットワークを抑制することにより、大腸、胃、膀胱がんの増殖を抑制することを示していたが、MARCKS が新たながん治療の標的遺伝子であることが示唆された。

本研究は、化学修飾型 miR-143 リポプレックスが骨盤内大腸癌再発に対して、MARCKS

抑制により抗腫瘍的に機能することを明らかにしており、今後の大腸がん治療の発展に貢献する可能性が期待される。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

（主論文公表誌）

Molecular Therapy Nucleic Acids 2023 Dec. 12, volume 34, 102079