

核酸医薬を用いた腹腔内治療で、難治性の胃がん腹膜播種（ふくまはしゅ）を治療する ～がん細胞を直接攻撃する次世代医薬の開発へ～

名古屋大学大学院医学系研究科消化器外科学の小寺 泰弘 教授、神田 光郎 講師の研究グループと、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所創薬デザイン研究センターの小比賀 聡 招へいプロジェクトリーダー、笠原 勇矢 サブプロジェクトリーダーは共同研究によって、腹膜播種^{※1}を起こす胃がんで特徴的に高発現する特徴的な分子である synaptotagmin 13 (SYT13) を標的にしたアンチセンス核酸医薬^{※2}によって、胃がん細胞の活動性が著しく低下し、細胞死を引き起こすことを明らかにしました。アンチセンス核酸医薬を用いた腹腔内治療によって、がんを移植したマウスの腹膜播種の進展を止めることができました。

胃がんは依然として罹患数・死亡者数の高い疾患です。胃がんの治療の見通しに大きく関わる再発転移の形式の中でも腹膜播種は最も頻度が高く、かつ難治性です。現在では、分子標的治療薬^{※3}を含めた抗がん剤の全身投与（点滴もしくは内服）で治療が行われていますが、その効果は限られています。より直接的に腹膜播種のがん細胞を攻撃する方法として抗がん剤（パクリタキセル）を腹腔内投与する治療法が考案されましたが、効果が限定的であり、より効果の高い治療薬の開発が求められています。我々は、腹膜播種を起こす胃がん細胞に高発現する特徴的な分子として SYT13 を発見し、研究を進めてきました。その中で、より効率的に SYT13 を阻害する治療薬を開発するため、国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 創薬デザイン研究センターと共同研究を実施しました。大阪大学で開発されたアミド架橋型人工核酸^{※4}を搭載したアンチセンス核酸医薬は生体内で高い安定性を持ち、かつ標的である SYT13 への結合親和性が向上しており、腹腔内治療に理想的なツールです。また、特別なキャリアー^{※5}がなくともアンチセンス核酸医薬の効果を低濃度かつ短期間で引き出す Ca²⁺ enrichment of medium 法^{※6}を用いることで、安全性の面から実用化へのハードルを下げています。

標的とする SYT13 以外の遺伝子と結合してしまうこと（オフターゲット効果といいます）が少なくなるよう 71 種の候補アンチセンス核酸を独自技術で設計・合成し、より効果の高い配列を選択しました。選択した 2 種のアンチセンス核酸は、90%以上の SYT13 発現抑制効率を示しました。これらは細胞の増殖する能力だけでなく、胃がん細胞が腹膜播種を形成するために重要とされる能力の数々（浸潤する能力、移動する能力、接着する能力）を著しく低下させることも明らかになりました。また、がん細胞の転移や抗がん剤抵抗性に重要ながん幹細胞性^{※7}も、SYT13 を阻害することで低下しました。作用メカニズムを明らかにするために実施したシグナル解析により、細胞膜上に存在する SYT13 は刺激物質により活性化し、がんの悪性度に強く関与する細胞内シグナルを調節していることが分かりました。マウスの腹腔内に胃がん細胞を注入して腹膜播種の状態を作り、アンチセンス核酸医薬を腹腔内投与すると、腹膜播種の進行が抑制され、マウスの生存期間が延長しました。アンチセンス核酸医薬で注意すべき副作用に肝障害がありますが、我々は投与濃度の調整やアンチセンス核酸の配列によって肝障害が抑えられること、休薬によってもとの状態に回復することを確認しました。

SYT13 を標的にしたアンチセンス核酸医薬は、既存のがん治療薬と異なる、完全に新しい作用メカニズムを持つ治療法となります。これを病変のある腹腔内に直接投与することによって、全身投与よりも副作用を抑えつつ、効率的に腹膜播種を治療することが期待されます。現在、SYT13 を標的にしたアンチセンス核酸医薬の最適化を完了し、第 I 相臨床試験に向けて、動物を用いた非臨床安全性試験を進めています。将来的には、胃がんと同様に腹膜播種が高頻度にかかる膵がんや卵巣がんにも応用していくことを目指しています。

本研究は国立研究開発法人日本医療研究開発機構 創薬ブースター事業（19nk0101349h0004、腹膜播種に特化した新たな胃癌分子標的医薬の探索）支援を受けて進められ、その成果は、米国科学雑誌「Molecular Therapy - Nucleic Acids」（2020 年 10 月 6 日付けの電子版）に掲載されました。第 I 相臨床試験に向けての動物を用いた非臨床安全性試験は国立研究開発法人日本医療研究開発機構 橋渡し研究戦略的推進プログラム（201m0203132h0001）の支援を受けて進めています。

ポイント

- 胃がんの中でも、特に予後不良な腹膜播種を起こすがん組織で特異的に高発現する synaptotagmin 13 を標的とするアンチセンス核酸医薬を創製しました。
- 国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 創薬デザイン研究センターの独自技術で設計されたアンチセンス核酸配列にアミド架橋型人工核酸を搭載することで生体内安定性と標的結合親和性を高めています。さらに、特別なキャリアーを必要としない導入方法を用いています。
- アンチセンス核酸医薬を用いた腹腔内治療によって、がんを移植したマウスの腹膜播種進展を止めることができました。

1. 背景

胃がんは日本で年間罹患数（約 13 万人）、年間死亡者数（約 5 万人）ともに第 2 位と頻度が高いがんです。腹膜播種は、がん細胞が腹腔内に散らばるように細かな粒を多発して広がっていく転移形式であり、胃がんの中でも特に難治性で予後不良な状態とされています。現在の標準治療である抗がん剤の全身投与（点滴もしくは内服）では、薬剤ががん細胞に十分に届かないことが一因と考えられ、抗がん剤の腹腔内投与が試みられました。しかし、従来からあるパクリタキセルの腹腔内投与では効果が限定的であり、より効果の高い治療薬の開発が求められています。

名古屋大学の研究グループでは、胃がんの転移に関する基礎研究の成果として、SYT13 が腹膜播種を生じる胃がん組織で特異的に高発現していることを発見しました。この SYT13 を阻害することで胃がん腹膜播種を治療するという創薬コンセプトのもと、独自性の高いアンチセンス核酸の配列設計技術と、特別なキャリアーを必要としない Ca^{2+} enrichment of medium 法の技術を有する国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所 創薬デザイン研究センターとの共同研究を行いました。アンチセンス核酸医薬の全身投与は安全性という点で高いハードルが想定されますが、胃がん腹膜播種の治療における腹腔内投与は、有害事象を回避し、かつ直接的にがん細胞を攻撃するアプローチです。アミド架橋型人工核酸を搭載したアンチセンス核酸医薬は、すでに腹腔内投与が臨床使用されているパクリタキセルの約 7 倍の分子量を有しています。そのため腹膜透過からの血中移行率が低く、腹腔内に長く停滞し長時間にわたってがん細胞に暴露されることで薬効を発揮することが期待されます。

2. 研究成果

まず、実際の胃がん症例で切除した胃がん組織中の SYT13 発現を汎用性の高い免疫染色法（がん組織のスライドを試薬で染めること）を用いて調べると、明瞭に SYT13 発現の陽性・陰性が判定可能であり、SYT13 発現陽性の胃がんでは明らかに腹膜播種発生率が高いことが分かりました。

SYT13 の mRNA 配列情報から高次構造予測（図 1A）を行い、肝毒性を起こしやすい配列やオフターゲット効果（標的である SYT13 以外の遺伝子を阻害してしまう可能性）の回避と、アンチセンス核酸との結合性の良い配列を考慮しながら累計 71 種の候補アンチセンス核酸を合成しました（図 1B）。これらを順次、SYT13 ノックダウン効率（発現を阻害する度合い）、試験管内でのがん

細胞増殖能や浸潤能の阻害効果を比較して、効果の高いアンチセンス核酸配列を選抜しました。

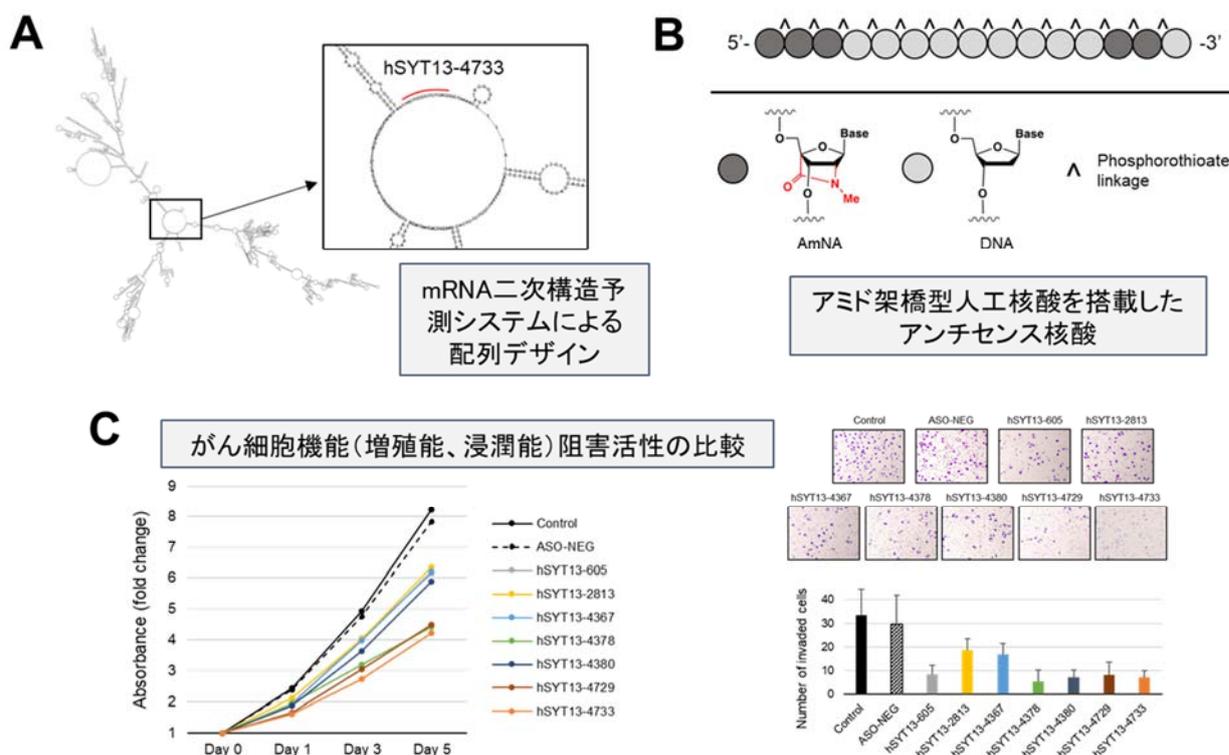


図 1 : mRNA 二次構造予測システムを用いたアンチセンス核酸配列のデザイン (A)。アミド架橋型人工核酸を搭載したアンチセンス核酸の構造 (B)。候補アンチセンス核酸のがん細胞機能 (増殖能、浸潤能) 阻害活性の比較 (C)。

これらの結果から、hSYT13-4378 と hSYT13-4733 の 2 つを有望なアンチセンス核酸として選定しました。この 2 つのアンチセンス核酸を胃がん細胞に添加することにより、細胞死を引き起こすカスパーゼというタンパク質の活性が増加 (図 2A) するとともに腹膜播種の形成に重要ながん幹細胞性が低下しました (図 2B)。さらに、アンチセンス核酸の濃度に平行して、がん細胞の遊走能 (移動する能力) が低下しました (図 2C)。作用メカニズムを明らかにするために実施したシグナル解析により、細胞膜上に存在する SYT13 は CXCL12 と HB-EGF という遊離タンパク質の刺激を受けて活性化し、がんの悪性度に強く関与する FAK シグナルを調節していることが分かりました (図 2D)。

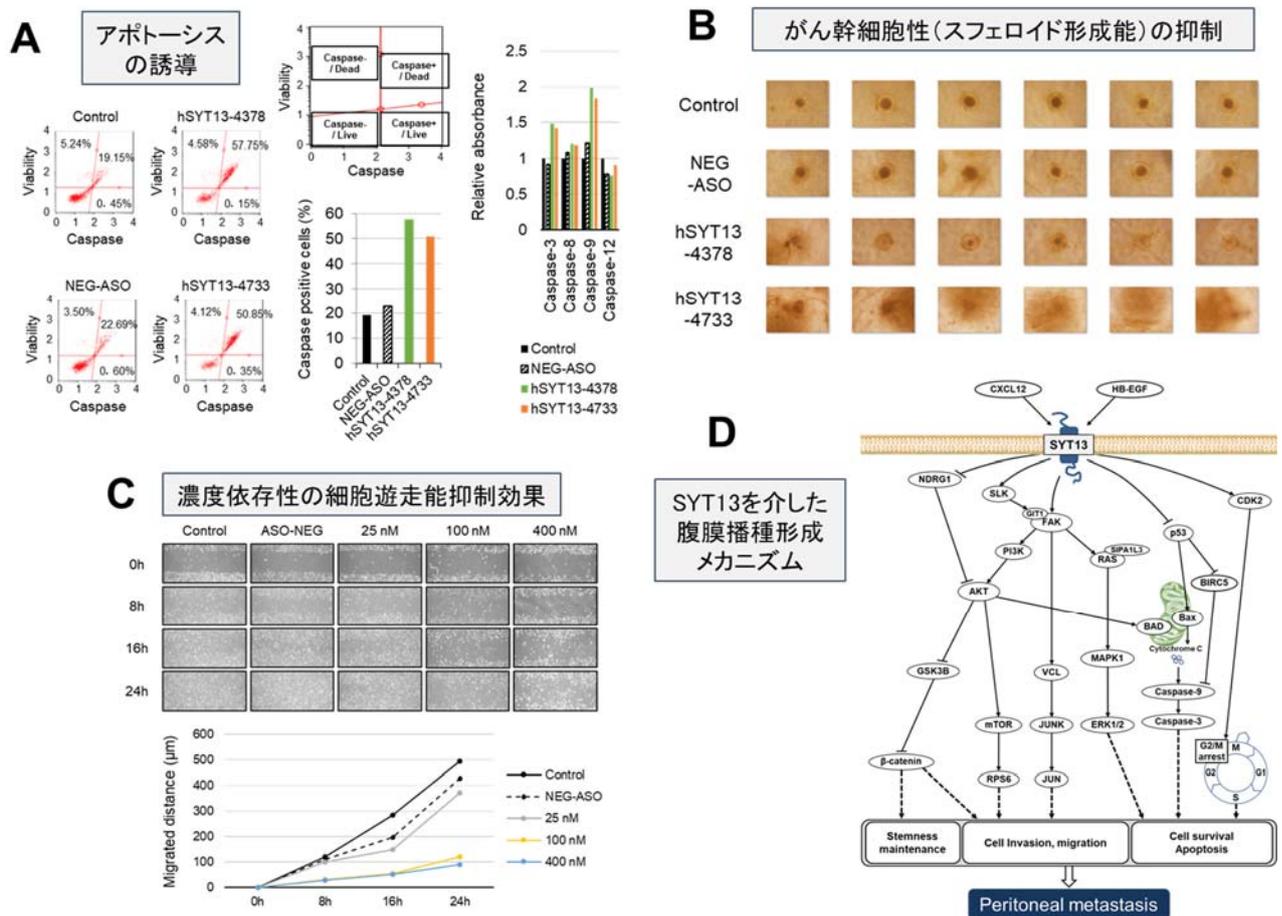


図 2： アンチセンス核酸による胃癌細胞の細胞死（アポトーシス）誘導（A）、腹膜播種形成に重要とされるがん幹細胞性（B）や細胞遊走能（C）の抑制。シグナル解析に基づいた、SYT13 を介した胃癌腹膜播種形成メカニズム（D）。

次に、マウスを用いた動物実験でアンチセンス核酸による腹腔内治療の効果を調べました。胃癌細胞（MKN1 細胞） 100 万個をマウスの腹腔内に移植し、腹膜播種を作成しました。これに対して、アンチセンス核酸を腹腔内投与して治療したところ、同じく核酸医薬である siRNA よりも強力に腹膜播種の進行を抑制しました（図 3A）。さらにアンチセンス核酸を投与することで、マウスの生存期間が延長するかどうかについて調べました。胃癌細胞（NUGC4 細胞） 200 万個を腹腔内に移植し、腹膜播種を作成したマウスにアンチセンス核酸を腹腔内投与したところ、腹膜播種の進展が抑制され、マウスの生存期間も有意に延長しました（図 3B）。アンチセンス核酸が、標的である SYT13 以外の遺伝子を阻害してしまう（オフターゲット効果）可能性について調査したところ、とくに hSYT13-4733 ではその危険性がきわめて低いことが分かりました。

一般にアンチセンス核酸医薬は高濃度投与によって肝毒性が生じる可能性が報告されています。そこで、マウスにアンチセンス核酸を投与して 2 週間後と、そこから休薬した 2 週間後に血液検査を行いました。hSYT13-4378 では軽度の肝機能異常を認めましたが、2 週間の休薬で正常値に回復しました。hSYT13-4733 では、肝機能異常を認めませんでした（図 3C）。

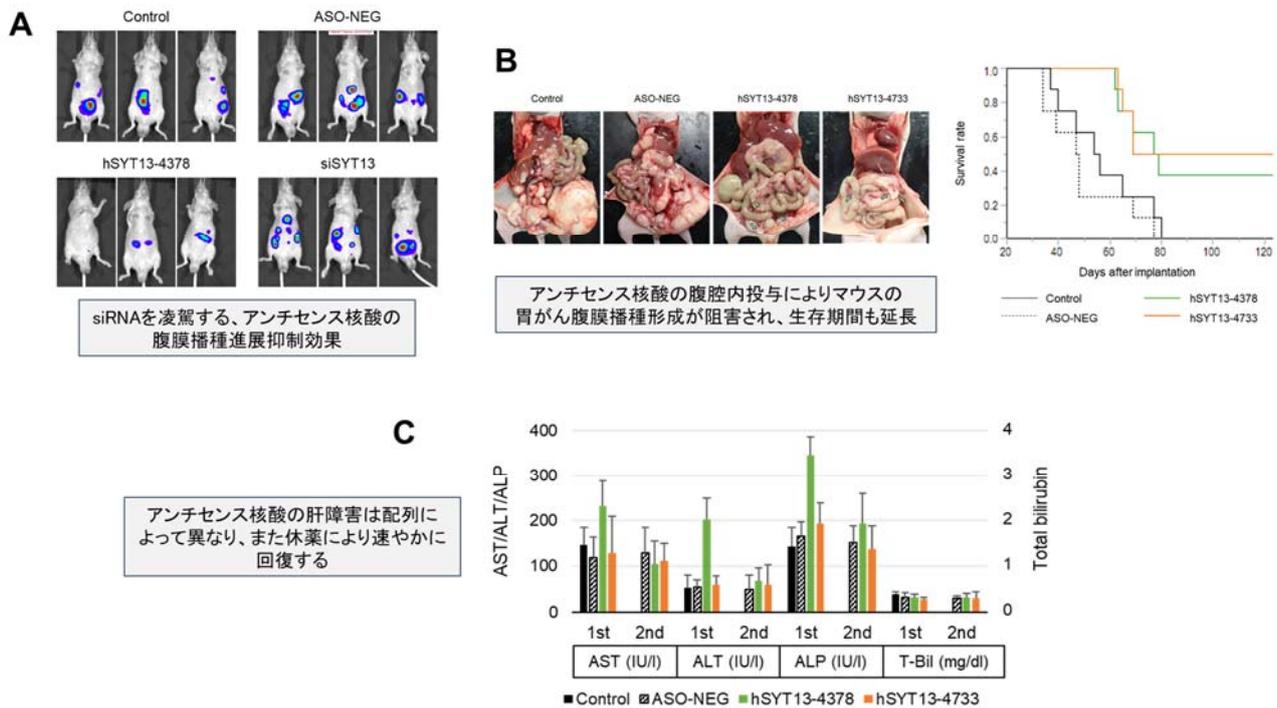


図3：腹膜播種を作成したマウスに対するアンチセンス核酸腹腔内投与の治療効果（A）と生存期間延長効果（B）。アンチセンス核酸投与後の肝機能検査（C）。

これらの研究成果は、すでに国内特許に出願しています。

3. 今後の展開

胃がん腹膜播種は従来の点滴や内服による抗がん剤治療では効果が限られており、新しい治療薬と投与方法が望まれています。SYT13を標的としたアンチセンス核酸医薬は、作用メカニズムが既存の全ての分子標的治療薬と異なるため、完全に新しい治療薬となります。これを病変のある腹腔内に直接投与することによって、全身投与よりも副作用を抑えつつ、効率的に腹膜播種を治療することが期待されます。今後、第I相臨床試験開始に向けて非臨床安全性試験を進めていくとともに、将来的には胃がんのみならず、腹膜播種が予後を大きく左右する膵がん、卵巣がんなどの他のがんにも応用していくことを目指しています。

腹腔内治療は腹腔投与用皮下ポートを留置することで、外来通院で繰り返し簡単に実施することが可能です。腹膜播種の治療のみでなく、胃がんの切除後に再発の危険性の高いケースで予防的に投与して腹膜播種再発を防ぐという活用法も検討しています。

4. 用語説明

※1 腹膜播種

がんの転移の一つで、腹腔内にがん細胞が播種（散らばること）して腹膜上に多数のがん細胞の塊である小結節を形成するものです。腹膜播種が増加することで、腹水や腸閉塞を引き起こします。

※2 アンチセンス核酸医薬

核酸（DNA や RNA）を治療に応用した核酸医薬の1つです。通常は化学修飾された1本鎖のDNAで、標的とする mRNA に結合し蛋白質合成を制御します。

※3 分子標的治療薬

がんなどの治療において、その病気に特有あるいは過剰に発現している特定の標的分子を狙い撃ちにしてその機能を抑える薬剤の総称です。がん細胞のみを攻撃することで、より高い治療効果とより少ない副作用を併せ持つ治療法として期待されています。

※4 アミド架橋型人工核酸

標的 RNA への結合性を高めつつ生体内で分解されにくくするために核酸の糖部に人工的にアミド架橋構造を加えた核酸誘導体です。

※5 キャリアー

薬剤を必要な場所へ送り届けるための試薬や構造物のことです。この場合は、アンチセンス核酸をがん細胞内に取り込ませるための試薬を指します。

※6 Ca^{2+} enrichment of medium 法

アンチセンス核酸をカルシウム濃度を高めに設定した液で溶解する方法です。

※7 がん幹細胞性

がん細胞の中には、分裂して自分と同じ細胞を作り出すことができ、かついろいろな細胞に分化できる性質をもつ集団（がん幹細胞）があるとされ、がんの転移や治療への抵抗性に関与すると考えられています。このがん幹細胞が持つ性質をがん幹細胞性といいます。

5. 発表雑誌

掲雑誌名：Molecular Therapy - Nucleic Acids

論文タイトル：Amido-bridged Nucleic Acid-modified Antisense Oligonucleotides Targeting SYT13 to Treat Peritoneal Metastasis of Gastric Cancer

著者：Mitsuro Kanda,¹ Yuuya Kasahara,^{2, 3} Dai Shimizu,¹ Takashi Miwa,¹ Shinichi Umeda,¹

Koichi Sawaki,¹ Shunsuke Nakamura,¹ Yasuhiro Koderu,¹ Satoshi Obika^{2, 3}

所属 : ¹Department of Gastroenterological Surgery (Surgery II), Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan

²Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, Osaka, Japan

³National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition (NIBIOHN), Osaka, Japan

DOI : 10.1016/j.omtn.2020.10.001

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Mole_The_201006en.pdf