

<特集「造血制御・造血器腫瘍研究の最前線」>

RNA 干渉による造血器悪性腫瘍治療

芦 原 英 司

京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学*

RNA Interference Therapies Against Hematological Malignancies

Eishi Ashihara

*Department of Molecular Cell Physiology,**Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science*

抄 録

siRNA (short interfering RNA) は特定の mRNA のみに対し生物活性を発揮するため選択性が高く、医薬品としての開発が期待されている。標的分子としては、増殖、転移、薬剤耐性など、悪性腫瘍の病態に重要な分子を選択することが肝要である。また悪性腫瘍に対する治療の要求に応えるには適切なドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発が重要な意味をもつ。DDSはウイルス性、非ウイルス性に大別されるが、RNA 干渉 (RNAi) 療法の医療への応用には非ウイルス性 DDS の開発に大きな期待が寄せられている。固形腫瘍に対しては多くの前臨床研究で RNAi 療法の有効性は示されている。臨床試験も開始されており、RNA 干渉療法はがん治療における有効な新たな戦略のひとつとなると予想される。造血器腫瘍に対しては有効な DDS はいまだなく、開発途中であるが、今までの固形腫瘍に対する経験から大いに期待できる治療戦略である。一方で、RNAi 技術を用いた創薬スクリーニングが行なわれ、造血器腫瘍に有効な分子標的薬が選定されている。以上のことから、RNAi 技術は造血器腫瘍治療開発に大きく貢献するものと考えられる。

キーワード: RNA 干渉, siRNA, ドラッグデリバリーシステム, ハイスループットスクリーニング。

Abstract

RNA interference (RNAi) is a phenomenon of sequence-specific gene silencing in mammalian cells, and its discovery has led to its wide application as a powerful tool in post-genomic research. Recently, short interfering RNA (siRNA), which induces RNAi, has been experimentally introduced as a cancer therapy and is expected to be developed as a nucleic acid-based medicine. Selection of appropriate gene targets is an important parameter in the potential success of siRNA cancer therapies. Candidate targets include genes associated with cell proliferation, metastasis, and drug resistance. Importantly, silencing of such genes must not affect the functions of normal cells. Development of suitable drug delivery systems (DDSs) is also an important issue. Numerous methods to transfect siRNAs into cells have been developed, and the use of non-viral DDSs is preferred because it offers greater safety for clinical application than does the use of viral DDSs. However, the suitable non-viral DDSs for the transfection into hematological cancer cells have not been developed. In this article, we briefly review the mechanism of RNAi and non-viral DDSs. Next we discuss some of the most recent findings concerning the

administration of siRNAs against polo-like kinase-1 (PLK-1), which regulates the mitotic process in mammalian cells. Finally, the application of RNAi into the hematological malignancies is discussed.

Key Words: RNA interference, siRNA, Drug delivery system, High-throughput screening.

はじめに

RNA干渉 (RNAi: RNA interference) とは、2本鎖 RNA (double-stranded RNA: dsRNA) によって配列特異的に標的 RNA が分解され、その結果遺伝子の発現が抑制される現象である。本現象を発見した Fire, Mello 両博士にノーベル医学生理学賞が2006年に授与された (http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006)。RNAiは単にウイルス感染に対する生体防御機構として認識されていたが、最近の研究によりトランスポゾン (転移因子) の転移抑制や、DNA のメチル化、ヘテロクロマチン化にも関与することが示唆され、線虫、ショウジョウバエ、魚類、哺乳類、さらにヒトにおいても保存されていることが明らかとなった¹⁾。

RNAiの引き金となる dsRNA は、Dicer と呼

ばれる RNase III ファミリーに属する制限酵素により細胞内で約 21~25 塩基の short (あるいは small) interfering RNA (siRNA) と呼ばれる短鎖 RNA に切断される。この siRNA はアンチセンス側の塩基配列に相補的な mRNA を標的として分解し、アンチセンス DNA に比べて数百~数千分の1の濃度で効果を発揮する。その結果非特異的な作用が少ないため、医薬品として医療への応用が期待されている。現在、いくつかの臨床試験が開始されている (表1) が、当初は加齢性黄斑変性症における血管新生抑制を目的として、vascular endothelial growth factor (VEGF) や VEGF 受容体1に対する siRNA を眼球内に投与する局所療法として行なわれた。近年では固形腫瘍に対して全身性投与による臨床試験が行なわれているが、造血管悪性腫瘍に対してははまだ行なわれていない。その最大の

表1 RNAi療法の臨床試験

製薬企業	siRNA 製剤	標的遺伝子	疾患	投与法	臨床試験	開始時期(年)
Opko Health	Bevasiranib	VEGF	加齢性黄斑変性症	硝子体内局注	Phase III	2005
			糖尿病性黄斑部浮腫		Phase II	2006
Allergen	AGN-211745(sima-027)	VEGFR1	加齢性黄斑変性症	硝子体内局注	Phase I/II	2006
			加齢性黄斑変性症		Phase I	2006
Quark	PF-4523655 (RTP801i-14)	RTP801	加齢性黄斑変性症	硝子体内局注	Phase II	2007
	QPI-1002 (AKI-5)	p53	心血管手術後の急性腎不全		Phase I	2007
Alnylam	ALN-VSP01	RSV	RSV 感染症	鼻腔スプレー	Phase I	2007
					Phase II	2008
TransDerm	TD101	Keratin K6a	先天性爪肥厚症	肥厚部局注	Phase I	2008
Calando	CALLA-01	RRM2	治療抵抗性固形腫瘍	経静脈投与	Phase I	2008
Alnylam	ALN-VSP02	KSP + VEGF	転移性肝腫瘍	経静脈投与	Phase I	2009
Silence Therapeutics	Atu027	PKN-3	進行期固形腫瘍	経静脈投与	Phase I	2009

VEGF: vascular endothelial growth factor, VEGFR: VEGF receptor, RTP801: REDD1 (regulated in Development and DNA damage responses 1), RSV: respiratory syncytial virus, RRM2: ribonucleotide reductase M2 subunit, KSP: kinase spindle protein, PKN-3: protein kinase N3 (太字: がんに対する RNAi療法の臨床試験)

問題点は、血液細胞へ siRNA を導入できる有効な drug delivery system (DDS) がいまだ開発されていないことである。本稿では、RNAi のメカニズム、および治療開発に重要なターゲット分子や drug delivery system (DDS) を概説し、固形腫瘍に対する RNAi 療法による前臨床研究、悪性腫瘍に対する臨床試験を紹介し、造血器腫瘍細胞に対する RNA 干渉の応用について論じる。

RNAi

遺伝子の発現抑制は転写時サイレンシング (Transcriptional gene silencing: TGS) と転写後サイレンシング (Post-transcriptional gene silencing: PTGS) の2種類に大別される。TGS は DNA から mRNA への転写が起らないことによるサイレンシングであり、PTGS は通常の転写が行われた後、mRNA が何らかの原因で分解されるか、あるいはタンパクへの翻訳が阻害されることにより遺伝子機能が抑制される現象で、RNAi は PTGS に属する。

PTGS は、1990 年 4 月発行の *Plant Cell* 誌に掲載された米国の Jorgensen らのグループとオランダの Mol らのグループによるコサプレクション現象に関する論文²³⁾により初めて報告された。彼らはベチュニアの紫色をさらに濃くした花を作り出そうと、主要な色素成分であるアントシアニンを作る酵素 (カルコン合成酵素: CHS) 遺伝子を導入する実験を行った。ところが、実際は色が濃くなるどころか、内在性の CHS 遺伝子の発現までも抑制され、白く斑入りの花ができた。彼らは追加した CHS 遺伝子が何らかの原因で遺伝子発現をコントロールしている「遺伝子検閲官」を刺激し、外から追加した遺伝子 (transgene) を含め内在性の CHS 遺伝子の発現をも抑制したと推察した。この不思議な現象は長年にわたり解明されないままであったが、1998 年の Fire と Mello らは線虫を用いた研究により、dsRNA がその配列特異的に遺伝子発現を抑制するによりもたらされることを明らかにし⁴⁾、この遺伝子発現抑制効果を RNAi と名づけた⁵⁾。

PTGS を引き起こす small RNA は、siRNA と microRNA (miRNA) に大別される。内因性の遺伝子発現を制御する miRNA に対して、siRNA は通常ウイルス、transgene といった外来性の核酸の侵入に対するゲノム防御反応として遺伝子発現を制御する。dsRNA は細胞内に取り込まれると、Dicer により細胞内で約 21 から 23 塩基の siRNA と呼ばれる短鎖 RNA に切断される。Dicer は RNase III ファミリーに属する ribonuclease で、dsRNA は Dicer のもつ 2 つの RNase III domain により短い siRNA に切断される。siRNA は ATP 依存性の 3' 末端側に 2 塩基の突出 (ovrehang) をもっており、RNAi による配列特異的な遺伝子サイレンシングの開始物質となる^{6,7)}。siRNA は RNA-nuclease 複合体 (RNA-induced silencing complex: RISC) を形成し⁸⁾、その siRNA 配列に相補的な配列をもつ mRNA を選択的に分解する。RISC を構成する Argonaute (Ago) タンパクは siRNA を 2 本の RNA にほどき、アンチセンス鎖 (guide strand) を認識し、10 番目と 11 番目の塩基の間のホスホジエステル結合部位で mRNA を切断する。切断された mRNA は RISC 内の siRNA から離れ、センス側 RNA 鎖 (passenger strand) とともに速やかに分解され、RISC は次の配列特異的な mRNA を分解していく。これを繰り返して、標的遺伝子の発現抑制をもたらす (図 1)⁹⁾。

miRNA は自身と相補的な配列をもつ mRNA からのタンパク合成を抑制する小型の RNA で、脊椎動物遺伝子の 1~4% を占めると見積もられ、標的 mRNA の主に 3' 非翻訳領域に結合し翻訳段階で PTGS を引き起こす¹⁰⁾。その結合は配列特異的ではあるが一部ミスマッチを含んでおり、そのために一種類の miRNA によって複数の mRNA が標的となる¹¹⁾。また逆に一種類の mRNA は複数の miRNA からの制御を受けることになり、これらは miRNA と mRNA の間には極めて複雑なネットワークが存在することを意味している。慢性リンパ性白血病 (CLL) において、発がんにおける miRNA の関与が初めて報告¹²⁾されて以来、多くのがん種で miRNA の発現異常が示され、病態進展のバイオマーカーや

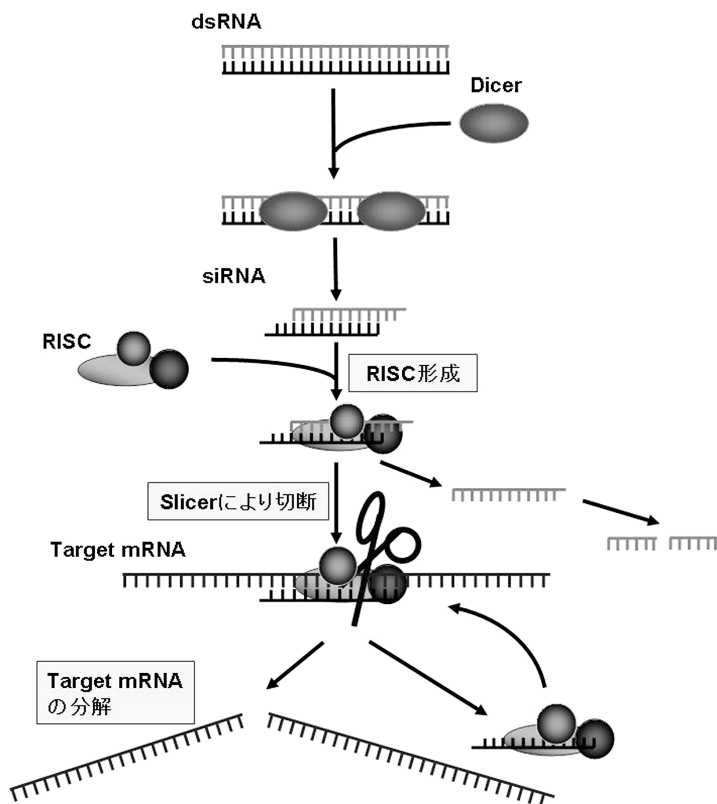


図1 RNAiのメカニズム

dsRNAが細胞内に取り込まれると、Dicerにより細胞内でsiRNAが作られる。siRNAはRNA-induced silencing complex (RISC)を形成し、Argonaute (Ago)タンパクの働きにより、2本のRNAにほどかれる。Ago2タンパクはguide strandを認識し、10番目と11番目の塩基の間のホスホジエステル結合部位でmRNAを切断する。切断されたmRNAはRISC内のsiRNAから離れ、passenger strandとともに速やかに分解される。RISCは次の配列特異的なmRNAの分解にむかう。

治療のターゲットとして注目され多くの研究が進められている¹³⁾。

RNAi 標的遺伝子

研究レベル、特に *in vitro* での RNAi 実験では、造血管腫瘍、固形腫瘍ともに RNAi のがん治療の可能性を示唆する成果は多く報告されている。生体内への投与において少ない副作用で治療効果をもたらすには、適切な標的遺伝子の選択、および DDS の開発が必須である。

RNAi 治療の標的遺伝子としては、分子標的

治療薬の開発と同様、がん細胞の増殖、転移、薬剤耐性獲得など、病態の進展に重要に関わる分子を選択することが肝要である。表2に示すように、今までの研究において多くの遺伝子が RNAi 療法の標的となる可能性が示されている。これらのうち、造血管腫瘍に対する有効性を示した主なものを以下に概説する。

1. 増殖・抗アポトーシスに関わるターゲット遺伝子

Bcl-2は抗がん剤、放射線、などの外的刺激によるアポトーシス誘導に対する抗アポトーシス

表2 がん治療における標的遺伝子

標的遺伝子	siRNA の効果が報告された主ながん種
1) 増殖・抗アポトーシスに関する遺伝子	
Bcl-2	急性白血病、慢性リンパ性白血病、肺がん
VEGF	Ewing 肉腫、前立腺がん
PLK-1	急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、悪性リンパ腫、膀胱がん、肺がん（肝転移）
Skp-2	肺がん、扁平上皮がん
Survivin	神経膠腫、 <u>バーキットリンパ腫</u> 、横紋筋肉種
Telomerase	悪性黒色腫
EZH2	前立腺がん（骨転移）
FGF-4	精巣腫瘍
2) シグナル伝達に関する遺伝子	
ERK1/2	肝細胞がん
β -catenin	大腸がん、 <u>多発性骨髄腫</u>
BCR-ABL	<u>慢性骨髄性白血病</u>
3) 薬剤耐性に関する遺伝子	
MDR1	大腸がん
RPN2	乳がん
ABCG10	胃がん
Lyn	<u>慢性骨髄性白血病（イマチニブ耐性）</u>
Fyn	<u>慢性骨髄性白血病（ニロチニブ耐性）</u>
Syk	<u>慢性リンパ性白血病</u>
4) 転移、血管新生に関する遺伝子	
VEGF/VEGFR	Ewing 肉腫、乳がん、大腸がん、前立腺がん
CCR7	大腸がん
LYN	Ewing 肉腫
RhoC	肝細胞がん

作用を有するタンパクである。多くのがんでその発がんや進展に関わっており、Bcl-2 高発現は患者の生命予後と負に相関する。担がんマウスモデルに対する *Bcl-2* siRNA 投与はがんの進展を著明に抑制することが報告されている¹⁴⁾¹⁵⁾。また、*Bcl-2* mRNA に対する antisense oligonu-

cleotide (Oblimersen sodilum) は慢性リンパ性白血病 (CLL)¹⁶⁾、難治性急性白血病¹⁷⁾、小細胞肺がん¹⁸⁾、など、造血器腫瘍をはじめ、いくつかの悪性腫瘍に対して臨床研究が行なわれている。

Survivin は inhibitors of apoptosis proteins family に属し、細胞分裂時に紡錘体形成を伴っ

た染色体分離に働く。胚組織や胎児組織には高発現しているが、成人組織での発現はほとんど認めない。しかし、がん組織における survivin の発現は高く、survivin の発現は多くの種類のがん患者の予後不良因子である。Raji バーキットリンパ腫細胞株に対し、survivin に対する short-hairpin RNA (shRNA) を導入したところ、アポトーシスを誘導し、survivin 分子がバーキットリンパ腫に対する有効なターゲットであることが報告されている¹⁹。また survivin は放射線・化学療法の抵抗性にも関与しており²⁰、siRNA による survivin の発現抑制は放射線・化学療法の感受性をあげる可能性が示唆される。その他、MCL-1^{21/22}、XIAP²³ など、抗アポトーシスタンパクの発現抑制も薬剤感受性の回復に寄与し、これらのタンパクもノックダウンすることでがん治療の臨床成績の改善をもたらすことが予想される。

PLK-1 は細胞分裂に関わる serine/threonine kinase で、有核生物に広く保存された構造を有する。その発現は細胞周期の G1 期では低く、S 期の終わりから増加し、G2/M 期にピークとなる²⁴。PLK-1 は、①G2 期末に cyclin dependent kinase (CDK) 1 を活性化し M 期に導入する、②分裂前中期に紡錘体を形成する、③中期から後期にかけて染色体分離 anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C；分裂後期促進複合体/サイクロソーム) を活性化する、④終期において細胞質分離を起こす、などの機能を有し^{25/26}、さらに p53 の機能を抑制し細胞分裂の促進をもたらす。PLK-1 はがんの増殖にも関連しており、急性骨髄性白血病 (AML)²⁷、慢性骨髄性白血病 (CML)²⁸、びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫²⁹ において高発現が報告されており、PLK-1 の高発現した悪性リンパ腫患者の生命予後は不良である²⁹⁻³¹。また、乳がん、卵巣がん、膀胱がん、非小細胞肺癌など、多くの固形腫瘍においても、生命予後と PLK-1 の発現に相関が報告されている³²⁻³⁶。このように PLK-1 はがんの進展と密接に関係しており、RNAi 療法の好ましい標的分子と考える。

2. 健シグナル伝達に関わるターゲット遺伝子
t(9;22) 転座により作られる Bcr-Abl キメラタンパクは、恒常的にチロシンキナーゼを活性化し Ph 陽性の CML や Ph 陽性の急性リンパ芽球性白血病 (ALL) を発症させる。第一世代のチロシンキナーゼ阻害剤であるイマチニブ (グリベック)、第二世代のダサチニブ (スプリセル)、ニロチニブ (タシグナ) により、Ph 陽性 CML や ALL の治療成績は劇的に改善した³⁷⁻⁴⁰。このことは Bcr-Abl キメラタンパクを標的とした治療法は Ph 陽性白血病の治療戦略として有効であることを物語っており、Bcr-Abl mRNA に対する RNAi 療法の開発が現在進められている⁴¹⁻⁴³。

β -catenin は E-Cadherin と結合し細胞骨格に関与するとともに、古典的 Wnt 経路のエフェクタータンパクでもあり、発生、細胞増殖や分化に重要な働きを持つ⁴⁴。細胞質内の β -catenin は、casein kinase-I, glycogen synthase kinase (GSK)-3 β , adenomatous polyposis coli (APC), Axin などによる複合体によりリン酸化を受け、速やかにユビキチン化され分解されていく。しかし多くの大腸がんでは APC 遺伝子に変異があり、細胞質内に β -catenin が蓄積し核内に移行し、その結果転写因子である T cell factor と結合し、c-myc や cyclin D1 など、標的遺伝子を活性化し、がん化を引き起こす。大腸がん以外に卵巣がん、急性白血病、多発性骨髄腫 (MM) など、多くのがん種で β -catenin 高発現を認め、がん患者の生命予後を左右することが報告されている⁴⁵⁻⁴⁸。筆者らは、MM 皮下腫瘍マウスモデルに β -catenin siRNA を投与し MM 腫瘍の増殖が抑制されることを報告した⁴⁶ が、このことから β -catenin も RNAi 療法のターゲットとして有効であることが示唆される。

3. 薬剤耐性に関わるターゲット遺伝子

P-糖タンパク (P-gp) は MDR1 遺伝子産物で、その発現は抗がん剤耐性をもたらす。MDR1 mRNA のノックダウンはアドリアマイシン、ビンクリスチンの感受性を回復し^{49/50}、また P-gp 以外の耐性に関わる ABCG2, RPN2 などの mRNA に対する siRNA 投与もがん細胞株における抗がん剤感受性を回復する^{51/52}。また造血

器腫瘍では薬剤耐性獲得の機序の一つとして、間質細胞との接着による薬剤耐性 (CAM-DR) が注目されている⁵³。CAM-DR を獲得した CLL では spleen tyrosine kinase (Syk) が高発現しており、Syk をノックダウンすることで抗がん剤の感受性が回復する⁵⁴。このような薬剤耐性に関わる分子も RNAi 療法のターゲットとして有効である。

非ウイルス性 DDS の開発

siRNA を単独で静脈から投与すると、細網内皮系による取り込みや nuclease による加水分解により急速に血中から消失し、標的となる組織・細胞への到達は極めて困難である。そのため多くの化学修飾が試みられている^{55/56}が、RNAi を治療として応用する場合、血中や組織中での siRNA の安定性をさらに図るため DDS を用いて投与することが必須となる。siRNA を細胞内に導入するには、化学合成された siRNA をカチオニックリポソームやポリマーなどの非ウイルス性 DDS を用いて外来より投与し導入する方法^{14/32/34/57}と、ウイルスベクターを用いて siRNA 発現カセット、shRNA を細胞内に導入後、siRNA を発現させる方法⁵⁸がある。ウイルス性 DDS の有効性は動物モデルにおいて多数報告されているが、レトロ、レンチウイルスベクターはゲノム内にランダムに組み込まれ、悪性腫瘍の発症が懸念される^{59/60}。またアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターは安全性が高く、かつ筋肉、神経、肝細胞など、非分裂細胞へ効率よく導入し、様々な疾患を対象として治療法の開発が進められている。しかし標的臓器によって各血清型の AAV の導入効率が異なり、また発現量を高めるためには膨大な量の AAV ベクターを必要とすることから、AAV ベクターの臨床応用への道りはいまだ遠いと考えられる。このようなことから、RNAi 療法の医療への応用には非ウイルス性 DDS の開発に大きな期待が寄せられている。

1. カチオニックリポソーム

非ウイルス性の DDS は、リポソーム、ポリマー、および膜融合性/透過性を高める分子を

結合させた siRNA-conjugates に大別される。カチオニックリポソームは陽性に荷電しており、陰性に荷電した siRNA と静電的に結合しやすく、細胞膜にも吸着されやすい。受動的に細胞膜に吸着した siRNA/リポソーム複合体は、エンドサイトーシスを介して細胞質内に取り込まれ、エンドゾームから抜け出して siRNA を細胞質内に放出し (Escape endosome)、RNAi プロセスが進んでいく。siRNA/リポソーム複合体の作製も比較的容易で、リポソームは DDS として汎用されている^{14/61/62}。さらに、血中での複合体の分解を避け、細胞内への導入効率を上げるべくポリエチレングリコール (PEG) 修飾や陽性荷電のある脂質と膜融合性のある脂質 (fusogenic lipid) からなる脂質二重膜を有する stable nucleic acid-lipid particles (SNALPs) など、化学修飾を施したリポソームも開発されている^{15/63/64}。しかし浮遊系細胞、血液細胞への siRNA の導入は非常に困難であり、新たに血球細胞表面に発現する抗原に対する抗体を結合させた DDSs の開発が試みられている⁶⁵。

2. アテロコラーゲン

高分子ポリマーもプラスミド DNA の DDS として従来から使われていた。脂質を基本としたカチオニックポリマーは陽性に荷電しており、カチオニックリポソームと同様に siRNA と混合後、細胞膜に吸着されエンドサイトーシスで細胞質内に取り込まれ、“プロトンスポンジ効果”により細胞質内に siRNA を放出する⁶⁶。

天然ポリマーであるアテロコラーゲンは仔ウシの真皮から抽出した I 型コラーゲンで、抗原性の大部分を有するテロペプチド部分をペプシンにより消化切断されたもの (分子量:300 kDa, 直径:1.5 nm, 分子長:300 nm) である⁶⁷。既に創部の被覆材、分解性縫合糸、皮膚陥没部の修復用皮下投与剤などの医療材料として臨床応用されており、生体投与時の安全性は確認されている。アテロコラーゲンは低温 (2~10°C) では液状 (ゲル状) であるが、温度が上がる (30~37°C) ことによって分子の長軸方向に規則正しく配列会合し、繊維化して網目状のマトリックス構造を形成する。生理的条件下では陽性に荷

電しているため、陰性に荷電した核酸分子と静電的に結合し、低温では粒子状の複合体を形成する。アテロコラーゲンは高濃度では繊維化傾向が強く投与局所に留まり、生体内の酵素などによりアテロコラーゲンが分解され徐放性に siRNA を放出し、RNAi 効果を持続的に発揮する⁴⁶⁾⁶⁸⁾⁶⁹⁾。一方、低濃度では複合体の粒子径が数百 nm と小さいことから細胞内に取り込まれやすく、経静脈投与も可能で担がんマウスに対してその有効性が報告されている³²⁾⁷⁰⁾⁷¹⁾。

3. siRNA-conjugates

リポソームやポリマーの開発によりターゲットの効率は改善されているが、他の技術として siRNA に細胞膜貫通性ペプチド (cell penetrating peptide: CPP)⁷²⁾⁷³⁾ や、コレステロールのような脂溶性分子などを結合させた siRNA-conjugates も作製されている⁷⁴⁾⁷⁵⁾。また抗体やアプタマーを siRNA に直に結合させた製剤も開発されており、HIV-1 envelop に対する抗体とプロタミンを結合させた siRNA は HIV が感染した CD4 T 細胞へ選択的に導入される⁷⁶⁾。

4. 浮遊系細胞への導入の工夫

正常血液細胞や造血器腫瘍細胞のような浮遊系細胞に対しては、ほとんどの非ウイルス性 DDS では *in vitro* の実験系においてもほとんど導入されず、レトロ、レンチウイルスベクターやエレクトロポレーションを用いている。これは現在繁用されている非ウイルス性 DDS では、その受動的な導入に限界があることを物語っている。リポソームを用いて siRNA を導入することを考えた場合、まず siRNA/リポソーム複合体が細胞膜と融合することが第一段階として起こるわけであるが、複合体が腫瘍細胞と融合しやすいか否かが siRNA の導入効率を左右することになる。血液細胞、造血器腫瘍細胞の膜脂質組成に近い成分からなる DDS を作製すれば、造血器腫瘍細胞への導入効率の改善が予想される。現在筆者らは、造血器腫瘍細胞の脂質組成に注目し、新規 DDS の開発を開始している。

siRNA を能動的に効率よく導入するため、抗体結合型の DDS や siRNA 製剤の開発が行われ

ている。ハーバード大学の Peer らは、ホスファチジルコリン、コレステロール、およびジパルミトイルホスファチジルエタノラミンで構成されるリポソームにヒアルロン酸を結合させ、ヒアルロン酸と抗体分子をアミド結合させた抗体結合型の DDS を開発した。彼らは炎症性腸疾患 (IBD) モデルマウスに対して、炎症を惹起する単球、Tリンパ球に発現する $\beta 7$ -インテグリンに対する抗体を結合させたりポソームに *Cyclin D1* に対する siRNA を包埋し、系静脈的に投与し治療効果を検討した。isotype 抗体を結合させた製剤や negative control siRNA を包埋した抗 $\beta 7$ -インテグリン抗体結合型の製剤に比べ、IFN- γ 、IL-2、IL-12、TNF- α といった Th1 サイトカインの腸組織内での発現は有意に減少した。さらに IBD マウスの腸組織破壊や体重減少は消失し、血液細胞をターゲットとした、抗体結合型 DDS を用いた RNAi 療法の有効性を報告している⁶⁵⁾。また同じくハーバード大学の Song らは、抗体の Fab 部分とプロタミンを結合させ、これに siRNA を結合させた製剤を作製し、HIV-1 envelop に対する抗体を用いて、HIV 感染 CD4⁺ T 細胞への導入効率を検討した。この siRNA 製剤は通常のリポフェクション導入試薬ではほとんど導入されない CD4⁺ T 細胞に対しても良好な導入効率を示し、さらに HIV *env* を発現させた黒色腫細胞の皮下腫瘍に対して *c-myc*、*MDM2*、*VEGF* siRNA を経静脈的に投与したところ、有意な腫瘍の増殖抑制を認めている⁷⁶⁾。筆者らも現在、新規の結合方法により抗体と siRNA の結合製剤を開発中である。このような抗体結合型の DDS、siRNA 製剤の開発は、造血器腫瘍に対する RNAi 療法にブレイクスルーをもたらすであろう。

PLK-1 を標的とした RNAi の前臨床研究

PLK-1 siRNA をリポフェクション法にて、各種ヒト膀胱がん細胞株、肺がん細胞株、中皮腫細胞株に導入すると、いずれも容量依存的、時間依存的に PLK-1 の発現を抑制し、がん細胞の増殖を抑制した。細胞周期解析では G2/M 期で

細胞回転が停止し、その後subG1分画の細胞増加を認め、また形態的には核の断片化やダンベル様の核、染色体の誤整列や分離異常をもつ細胞がみられた。さらに *PLK-1* siRNA の導入によりカスパーゼ-3が活性化され、アポトーシス細胞が増加した。以上のことから、*PLK-1* siRNA 処理によりがん細胞はG2/M期で停止し、カスパーゼ依存性のアポトーシスが誘導され細胞死に至ると考えられる³²⁾³⁴⁾⁵⁶⁾。

次に *PLK-1* siRNA の治療の可能性を正所性担がんモデルマウスを用いて検討した。RNAi 療法は当初、局所投与における効果が検討されており、それは局所に高濃度の siRNA を滞留させることで RNAi を引き起こし、効果を最大限に発揮させることを目的としている。このコンセプトをもとに、膀胱をひとつの「閉鎖空間」と見立て、そこに *PLK-1* siRNA を滞留させることで膀胱がんに対する治療法となりうると考え、siRNA の膀胱内注入療法を行った。ルシフェラーゼ遺伝子を導入した膀胱がん細胞株を

用いて正所性膀胱がんモデルを作製し、*in vivo* imaging system (IVIS) (Xenogen 社) にて *PLK-1* siRNA の治療効果を検討した。この IVIS はがん細胞が産生するルシフェラーゼが、基質であるルシフェリンと反応し生じる生物発光 (Bioluminescence) を CCD カメラで検出し、腫瘍の生長や治療効果を同一動物で経時的に、かつ非観血的に検討できる³⁴⁾。ルシフェラーゼ遺伝子を導入した膀胱がん細胞株を経尿道的に移植し生着を確認後、*PLK-1* siRNA をカチオンリポソーム LIC-101 を DDS として経尿道的に投与し、尿道を閉じ一定時間膀胱がん曝し腫瘍内に取り込ませた。*PLK-1* siRNA/LIC 複合体は腫瘍内の *PLK-1* の発現を抑制し、膀胱がんの増殖を有意に抑制した (図2)⁷⁷⁾。

次に *PLK-1* siRNA の経静脈投与における効果を、肺がんの肝転移腫瘍モデルを用いて検討した。ルシフェラーゼ遺伝子を導入した肺がん細胞が経門脈的に肝臓に遊走し生着したことを確認後、*PLK-1* siRNA を低濃度のアテロコラー

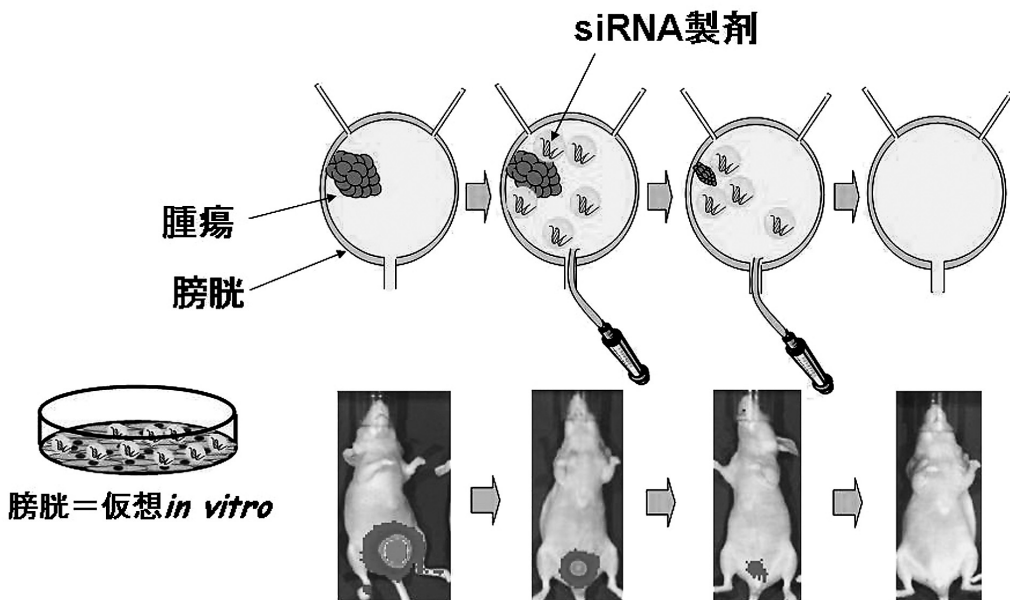


図2 膀胱がんに対する *PLK-1* siRNA の膀胱内注入療法

尿道を閉鎖することで、膀胱を「閉鎖空間」、「仮想 *in vitro*」と見立てることができるユニークな治療法である。

ゲン（最終濃度：0.05%）を DDS として尾静脈より投与した。膀胱がんに対する局所投与の場合と同様、*PLK-1* siRNA/アテロコラーゲン複合体は転移性腫瘍における *PLK-1* の発現を抑制し、腫瘍の増殖を有意に抑制した（図 3A, B）³²。以上より、*PLK-1* siRNA が悪性腫瘍に対する RNAi 療法の有効なツールであることが明らかとなった。造血器腫瘍に対して有効な新規 DDS の開発により、造血器腫瘍に対しても強力な治療ツールとなると推察する。

がん治療における臨床試験

RNAi を用いた臨床試験は未だ数えるほどしか行われていないのが現状である（<http://>

clinicaltrials.gov/ct2/home, 表 1)。最初に検討されたのは加齢黄斑変性症に対する VEGF に対する siRNA 療法で、現在第 III 相試験まで進行している。核酸医薬開発に携わっている製薬企業は、現在こぞって siRNA や DDS の開発を行っており、Alnylam Pharmaceuticals は細胞分裂に関わる kinase spindle protein と VEGF に対する siRNA 製剤である ALN-VSP02 を開発し、現在進行期の転移性肝腫瘍を有する患者に対する Phase I 臨床試験を行っている。Calando Pharmaceuticals は標準療法に抵抗性の固形腫瘍を有する患者に対して CALLA-01 製剤の Phase I 臨床試験を行っている。CALLA-01 製剤は DNA 複製に作用する ribonucleotide reductase

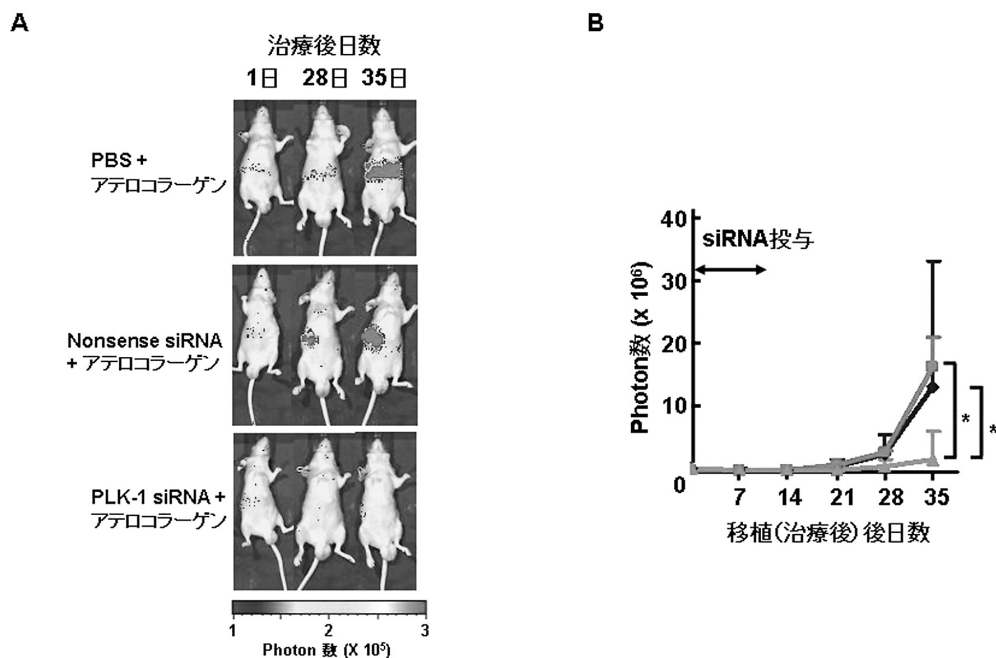


図3 肺がんの転移性肝腫瘍モデルマウスに対する *PLK-1* siRNA を用いた RNAi 療法（文献 32 より引用）脾臓表面にルシフェラーゼ遺伝子を導入した肺がん細胞株を接種し、経門脈的に肝臓に転移され生着を確認後、*PLK-1* siRNA を低濃度のアテロコラーゲン（最終濃度：0.05%）を DDS として尾静脈より 10 日間投与し、治療効果を IVIS にて観察した。

A : *PLK-1* siRNA/アテロコラーゲン複合体投与群にて、ルシフェリンによる生体発光は増加しなかった。

B : *PLK-1* siRNA/アテロコラーゲン複合体 (25 μ g siRNA/0.05%アテロコラーゲン：▲) は nonsense siRNA/アテロコラーゲン複合体 (25 μ g siRNA/0.05%アテロコラーゲン：■)，アテロコラーゲン投与群 (0.05%：◆) に比して、転移性肝腫瘍の増殖を有意に抑制した。(* p <0.05)

の M2 subunit に対する siRNA と Rondel™ という CDP nanoparticle を混合した siRNA 製剤で、担がんマウスモデルや霊長類を用いてその有効性、および安全性が報告されている⁷⁸⁾⁷⁹⁾。しかし、まだ造血器腫瘍に対する臨床試験は企画されておらず、siRNA 投与による造血器腫瘍治療法の開発には有効な DDS の開発が必須となる。

RNAi を用いた造血器腫瘍に対する治療法開発の可能性

1. 造血器腫瘍に対する RNAi 療法の報告

造血器悪性腫瘍患者に対して、siRNA をはじめて全身に投与した経験は 47 歳女性の CML (accelerated phase) の患者に対するドイツからの報告であった⁸⁰⁾。本患者は非血縁同種幹細胞移植を受け major cytogenetic response であったが PCR にて *Bcr-Abl* mRNA は陽性であった。移植後 247 日目に再発したため、イマチニブ (グリベック) を 400 mg/日 で投与開始したが、血液学的副作用のため 300 mg/日 に減少投与した。*Bcr-Abl* mRNA は減少し 280 日目には complete hematological response になったが、381 日目に皮下腫瘍として再発、その後胸水貯留を認め胸腔内にも浸潤を認めた。Ara-C 20 mg 投与を行ったが末梢血中にも CML 細胞が増加したため、Ara-C 40 mg に増量した。当初イマチニブに良好な反応を示していたが、*Bcr-Abl* 遺伝子の増幅と変異の出現により再発したため、siRNA 療法を併用した。10 μ g/kg の *Bcr-Abl* siRNA とリポソームとの複合体を経静脈的に投与し、また 300 μ g の siRNA 製剤を皮下腫瘍に対して直接投与した。初回投与後、*Bcr-Abl* mRNA レベルは劇的に減少したが、2 回目 (30 μ g/kg)、3 回目 (10 μ g/kg) 投与では効果は見られず、移植後 473 日目に永眠となった。経過中、副作用としてはめまい (WHO grade 1) を認めたのみであった。現在行われている臨床研究のように構築されたものではなく実験的治療の色を有した一例報告ではあるが、siRNA の全身投与により *Bcr-Abl* mRNA レベルを減少させ、大きな副作用を認めなかったことは興味深い。*Bcr-Abl*

キメラ遺伝子異常という単一の原因により発症する CML のような疾患は RNAi 療法に最適と考えられ、現在進められている CML に対する RNAi 療法の開発⁴¹⁻⁴³⁾ とともに新規 DDS の開発に期待したい。

2. 薬剤スクリーニングとしての RNAi

siRNA 治療のほかに、新規薬剤スクリーニングに RNAi は活用されている。従来の創薬のプロセスでは、細菌や植物の成分である天然化合物や化学合成化合物から有効性成分を、いわば“宝探し”のようにして選定し、精製後薬剤を創出してきた。しかし分子生物学や遺伝子エンジニアリングの進歩により、イマチニブ (グリベック) やトラスツマブ (ハーセプチン) のようながん特異的な分子を標的とした薬剤を創出する時代が到来した。さらに現在はハイスループットスクリーニング (high-throughput screening: HTS) により膨大な化学物質ライブラリーに対してスクリーニング試験を実施し薬剤を選定する時代を迎えた。そのスクリーニングの方法の一つとして RNAi が用いられている。すなわち、ターゲットとする分子に対する siRNA を作製し、それを *in vitro* で腫瘍細胞に導入後、ターゲット遺伝子をノックダウンした結果の遺伝子プロファイルを同定する。一方で、ライブラリーにある化学物質を腫瘍細胞に添加した際の遺伝子プロファイルからターゲット分子をノックダウンした際と同様のプロファイルを HTS で選び出し、ターゲット分子に対する薬剤を選定するのである (図 4)⁸¹⁾。筆者らは HTS で選定された、Wnt 経路の下流分子である β -catenin に対する分子標的薬 AV65 の MM に対する増殖抑制効果を検討した。AV65 は容量依存的に、かつ時間依存的に MM 細胞株をアポトーシスに誘導し、さらに、MM の正所性モデルマウスの生存期間を有意に延長させた。AV65 は MM に対する新規分子標的薬となる可能性が示唆される (投稿準備中)。このように RNAi は薬剤スクリーニングを通して造血器腫瘍治療開発に寄与している。

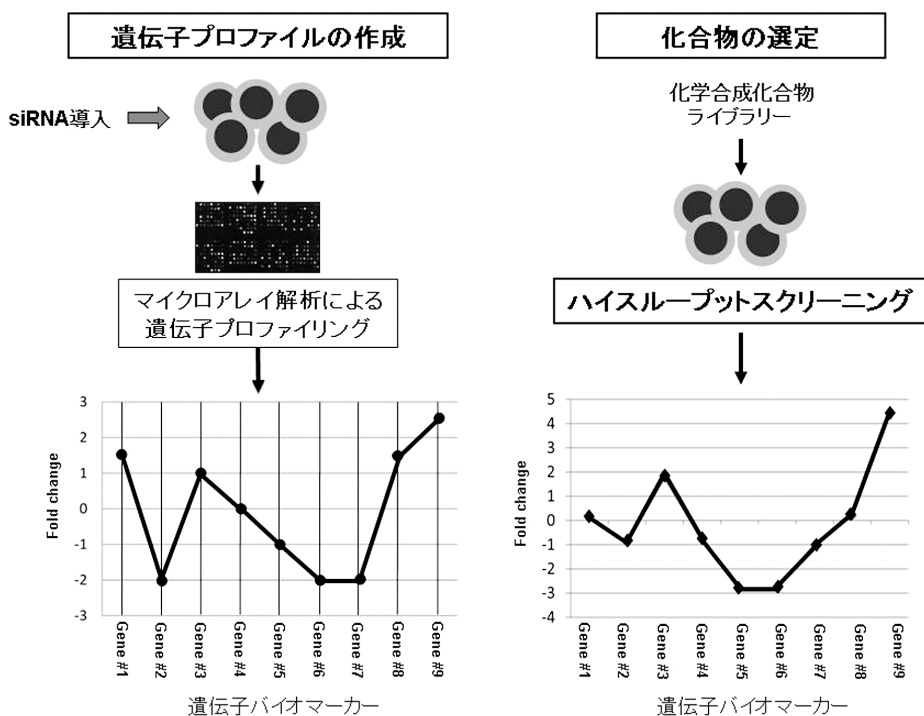


図4 RNAiを用いたハイスループットスクリーニング法

ターゲットとする分子に対する siRNA を作製し腫瘍細胞に導入する。ターゲット遺伝子をノックダウン後の遺伝子プロファイルを同定する (左)。一方で、ライブラリーにある化学物質を腫瘍細胞に添加した際の遺伝子プロファイルからターゲット分子をノックダウンした際と同様のプロファイルを HTS で選び出し、ターゲット分子に対する分子標的薬剤を選定する (右)。

結 語

前臨床研究や臨床試験の結果からわかるように、siRNA 製剤を用いた RNAi 療法は固形腫瘍治療における有効な新たな戦略のひとつとなると想像される。しかし造血器腫瘍に対しては有効な DDS がいまだ存在せず、今後の開発が待たれる。またより有効で、より副作用が少ない siRNA 製剤を世に輩出するには、siRNA の pharmacodynamics, pharmacokinetics を明らかにする必要があり、そのためには siRNA 量を正確に測定する技術開発も必須である。さらに siRNA の単独療法がいいのか、他の抗がん剤、分子標的治療薬との併用療法⁸²⁾ が望ましいのか、さらに siRNA の標的分子は単独がいいのか、それとも複数個⁸⁶⁾⁸⁴⁾ を標的とするのがいい

のか、siRNA の適切な投与法の考案も重要な課題である。一方で RNAi 技術は分子標的薬の創薬に大きく寄与しており、RNAi を用いた HTS 法により造血器腫瘍に対する新たな分子標的薬が開発されてくることが期待される。

謝 辞

RNA 干渉を用いた治療開発研究の基礎をご教授くださり、研究の機会を与えてくださった、京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部 前川 平教授、ならびに、ともに研究を遂行してくれた大学院生、教室員の皆さんに深謝いたします。

文 献

- 1) Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004; 431: 343-349.
- 2) Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 1990; 2: 279-289.
- 3) van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR. Flavonoid genes in *petunia*: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 1990; 2: 291-299.
- 4) Fire A, Albertson D, Harrison SW, Moerman DG. Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* 1991; 113: 503-514.
- 5) Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811.
- 6) Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; 409: 363-366.
- 7) Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* 2001; 20: 6877-6888.
- 8) Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000; 404: 293-296.
- 9) Ashihara E, Kawata E, Maekawa T. Future prospect of RNA interference for cancer therapies. *Curr Drug Targets* 2010; 11: 345-360.
- 10) Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259-269.
- 11) Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet* 2005; 37: 495-500.
- 12) Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of microRNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15524-15529.
- 13) Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol* 2007; 302: 1-12.
- 14) Yano J, Hirabayashi K, Nakagawa S, Yamaguchi T, Nogawa M, Kashimori I, Naito H, Kitagawa H, Ishiyama K, Ohgi T, Irimura T. Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7721-7726.
- 15) Sonoke S, Ueda T, Fujiwara K, Sato Y, Takagaki K, Hirabayashi K, Ohgi T, Yano J. Tumor regression in mice by delivery of Bcl-2 small interfering RNA with pegylated cationic liposomes. *Cancer Res* 2008; 68: 8843-8851.
- 16) O'Brien S, Moore JO, Boyd TE, Larratt LM, Skotnicki A, Koziner B, Chanan-Khan AA, Seymour JF, Bociek RG, Pavletic S, Rai KR. Randomized phase III trial of fludarabine plus cyclophosphamide with or without oblimersen sodium (Bcl-2 antisense) in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1114-1120.
- 17) Marcucci G, Byrd JC, Dai G, Klisovic MI, Kourlas PJ, Young DC, Cataland SR, Fisher DB, Lucas D, Chan KK, Porcu P, Lin ZP, Farag SF, Frankel SR, Zwiebel JA, Kraut EH, Balcerzak SP, Bloomfield CD, Grever MR, Caligiuri MA. Phase 1 and pharmacodynamic studies of G3139, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with chemotherapy in refractory or relapsed acute leukemia. *Blood* 2003; 101: 425-432.
- 18) Rudin CM, Salgia R, Wang X, Hodgson LD, Masters GA, Green M, Vokes EE. Randomized phase II Study of carboplatin and etoposide with or without the bcl-2 antisense oligonucleotide oblimersen for extensive-stage small-cell lung cancer: CALGB 30103. *J Clin Oncol* 2008; 26: 870-876.
- 19) Gu CM, Zhu YK, Ma YH, Zhang M, Liao B, Wu HY, Lin HL. Knockdown of survivin gene by vector-based short hairpin RNA technique induces apoptosis and growth inhibition in Burkitt's lymphoma Raji cell line. *Neoplasma* 2006; 53: 206-212.
- 20) Yamamoto H, Ngan CY, Monden M. Cancer cells survive with survivin. *Cancer Sci* 2008; 99: 1709-1714.

- 21) Ji M, Li J, Yu H, Ma D, Ye J, Sun X, Ji C. Simultaneous targeting of MCL1 and ABCB1 as a novel strategy to overcome drug resistance in human leukaemia. *Br J Haematol* 2009; 145: 648-656.
- 22) Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, Sica S, Leone G, Efremov DG. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2008; 111: 846-855.
- 23) Ma JJ, Chen BL, Xin XY. XIAP gene downregulation by small interfering RNA inhibits proliferation, induces apoptosis, and reverses the cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2009; 146: 222-226.
- 24) Winkles JA, Alberts GF. Differential regulation of polo-like kinase 1, 2, 3, and 4 gene expression in mammalian cells and tissues. *Oncogene* 2005; 24: 260-266.
- 25) Barr FA, Sillje HH, Nigg EA. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 429-440.
- 26) van de Weerd BC, Medema RH. Polo-like kinases: a team in control of the division. *Cell Cycle* 2006; 5: 853-864.
- 27) Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, Takezaki Y, Tasaka T, Togitani K, Koeffler HP, Yokoyama A. A novel treatment strategy targeting polo-like kinase 1 in hematological malignancies. *Leukemia* 2009; 23: 1564-1576.
- 28) Gleixner KV, Ferenc V, Peter B, Gruze A, Meyer RA, Hadzijušufovic E, Cerny-Reiterer S, Mayerhofer M, Pickl WF, Sillaber C, Valent P. Polo-like kinase 1 (Plk1) as a novel drug target in chronic myeloid leukemia: overriding imatinib resistance with the Plk1 inhibitor BI 2536. *Cancer Res*; 70: 1513-1523.
- 29) Liu L, Zhang M, Zou P. Expression of PLK1 and survivin in diffuse large B-cell lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2007; 48: 2179-2183.
- 30) Imai H, Sugimoto K, Isobe Y, Sasaki M, Yasuda H, Takeuchi K, Nakamura S, Kojima Y, Tomomatsu J, Oshimi K. Absence of tumor-specific over-expression of Polo-like kinase 1 (Plk1) in major non-Hodgkin lymphoma and relatively low expression of Plk1 in nasal NK/T cell lymphoma. *Int J Hematol* 2009; 89: 673-678.
- 31) Liu L, Zhang M, Zou P. Polo-like kinase 1 as a new target for non-Hodgkin's lymphoma treatment. *Oncology* 2008; 74: 96-103.
- 32) Kawata E, Ashihara E, Kimura S, Takenaka K, Sato K, Tanaka R, Yokota A, Kamitsuji Y, Takeuchi M, Kuroda J, Tanaka F, Yoshikawa T, Maekawa T. Administration of PLK-1 small interfering RNA with atelocollagen prevents the growth of liver metastases of lung cancer. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 2904-2912.
- 33) Knecht R, Elez R, Oechler M, Solbach C, von Ilberg C, Strebhardt K. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1999; 59: 2794-2797.
- 34) Nogawa M, Yuasa T, Kimura S, Kuroda J, Sato K, Segawa H, Yokota A, Maekawa T. Monitoring luciferase-labeled cancer cell growth and metastasis in different in vivo models. *Cancer Lett* 2005; 217: 243-253.
- 35) Strebhardt K, Kneisel L, Linhart C, Bernd A, Kaufmann R. Prognostic value of pololike kinase expression in melanomas. *Jama* 2000; 283: 479-480.
- 36) Wolf G, Elez R, Doermer A, Holtrich U, Ackermann H, Stutte HJ, Altmannsberger HM, Rubsamen-Waigmann H, Strebhardt K. Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 1997; 14: 543-549.
- 37) Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, Donato N, Nicoll J, Paquette R, Cortes J, O'Brien S, Nicaise C, Bleickardt E, Blackwood-Chirchir MA, Iyer V, Chen TT, Huang F, Decillis AP, Sawyers CL. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med* 2006; 354: 2531-2541.
- 38) Kantarjian H, Shah NP, Hochhaus A, Cortes J, Shah S, Ayala M, Moiraghi B, Shen Z, Mayer J, Pasquini R, Nakamae H, Hugué F, Boque C, Chuah C, Bleickardt E, Bradley-Garelík MB, Zhu C, Szatrowski T, Shapiro D, Baccarani M. Dasatinib versus imatinib in newly diagnosed chronic-phase chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 362: 2260-2270.
- 39) Kantarjian H, Giles F, Wunderle L, Bhalla K, O'Brien S, Wassmann B, Tanaka C, Manley P, Rae P, Mietlowski W, Bochinski K, Hochhaus A, Griffin JD, Hoelzer D, Albitar M, Dugan M, Cortes J, Alland L, Ottmann OG. Nilotinib in imatinib-resistant CML and Philadelphia chromosome-positive ALL. *N Engl J Med* 2006; 354: 2542-2551.
- 40) Saglio G, Kim DW, Issaragrisil S, le Coutre P, Etienne G, Lobo C, Pasquini R, Clark RE, Hochhaus A,

- Hughes TP, Gallagher N, Hoenekopp A, Dong M, Haque A, Larson RA, Kantarjian HM. Nilotinib versus imatinib for newly diagnosed chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2010; 362: 2251-2259.
- 41) Wilda M, Fuchs U, Wossmann W, Borkhardt A. Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene* 2002; 21: 5716-5724.
- 42) Scherr M, Battmer K, Winkler T, Heidenreich O, Ganser A, Eder M. Specific inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA. *Blood* 2003; 101: 1566-1569.
- 43) Mendonca LS, Moreira JN, Pedroso de Lima MC, Simoes S. Co-encapsulation of anti-BCR-ABL siRNA and imatinib mesylate in transferrin receptor-targeted sterically stabilized liposomes for chronic myeloid leukemia treatment. *Biotechnol Bioeng*.
- 44) Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998; 14: 59-88.
- 45) Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1653: 1-24.
- 46) Ashihara E, Kawata E, Nakagawa Y, Shimazaki C, Kuroda J, Taniguchi K, Uchiyama H, Tanaka R, Yokota A, Takeuchi M, Kamitsuji Y, Inaba T, Taniwaki M, Kimura S, Maekawa T. beta-catenin small interfering RNA successfully suppressed progression of multiple myeloma in a mouse model. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 2731-2738.
- 47) Gamallo C, Palacios J, Moreno G, Calvo de Mora J, Suarez A, Armas A. beta-catenin expression pattern in stage I and II ovarian carcinomas: relationship with beta-catenin gene mutations, clinicopathological features, and clinical outcome. *Am J Pathol* 1999; 155: 527-536.
- 48) Ysebaert L, Chicanne G, Demur C, De Toni F, Prade-Houdellier N, Ruidavets JB, Mansat-De Mas V, Rigal-Huguet F, Laurent G, Payrastra B, Manenti S, Racaud-Sultan C. Expression of beta-catenin by acute myeloid leukemia cells predicts enhanced clonogenic capacities and poor prognosis. *Leukemia* 2006; 20: 1211-1216.
- 49) Chen XP, Wang Q, Guan J, Huang ZY, Zhang WG, Zhang BX. Reversing multidrug resistance by RNA interference through the suppression of MDR1 gene in human hepatoma cells. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 3332-3337.
- 50) Xia Z, Zhu Z, Zhang L, Royal C, Liu Z, Chen Q, Adam BL. Specific reversal of MDR1/P-gp-dependent multidrug resistance by RNA interference in colon cancer cells. *Oncol Rep* 2008; 20: 1433-1439.
- 51) Priebsch A, Rompe F, Tonnie H, Kowalski P, Surowiak P, Stege A, Materna V, Lage H. Complete reversal of ABCG2-depending atypical multidrug resistance by RNA interference in human carcinoma cells. *Oligonucleotides* 2006; 16: 263-274.
- 52) Honma K, Iwao-Koizumi K, Takeshita F, Yamamoto Y, Yoshida T, Nishio K, Nagahara S, Kato K, Ochiya T. RPN2 gene confers docetaxel resistance in breast cancer. *Nat Med* 2008; 14: 939-948.
- 53) Meads MB, Hazlehurst LA, Dalton WS. The bone marrow microenvironment as a tumor sanctuary and contributor to drug resistance. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 2519-2526.
- 54) Puissant A, Dufies M, Raynaud S, Cassuto JP, Auberger P. Targeting lysosomes to eradicate imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells. *Leukemia*; 24: 1099-1101.
- 55) Bumcrot D, Manoharan M, Koteliensky V, Sah DW. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol* 2006; 2: 711-719.
- 56) Kawata E, Ashihara E, Nakagawa Y, Kiuchi T, Ogura M, Yao H, Sakai K, Tanaka R, Nagao R, Yokota A, Takeuchi M, Kimura S, Hirai H, Maekawa T. A combination of a DNA-chimera siRNA against PLK-1 and zoledronic acid suppresses the growth of malignant mesothelioma cells in vitro. *Cancer Lett* 2010; 294: 245-253.
- 57) Urban-Klein B, Werth S, Abuharbid S, Czubyko F, Aigner A. RNAi-mediated gene-targeting through systemic application of polyethylenimine (PEI)-complexed siRNA in vivo. *Gene Ther* 2005; 12: 461-466.
- 58) Thomas CE, Ehrhardt A, Kay MA. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 346-358.
- 59) Check E. A tragic setback. *Nature* 2002; 420: 116-118.
- 60) Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 2003; 348: 255-256.
- 61) Felgner PL, Ringold GM. Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 1989; 337: 387-388.

- 62) Hirabayashi K, Yano J, Inoue T, Yamaguchi T, Tanigawara K, Smyth GE, Ishiyama K, Ohgi T, Kimura K, Irimura T. Inhibition of cancer cell growth by polyinosinic-polycytidylic acid/cationic liposome complex: a new biological activity. *Cancer Res* 1999; 59: 4325-4333.
- 63) Morrissey DV, Lockridge JA, Shaw L, Blanchard K, Jensen K, Breen W, Hartsough K, Machermer L, Radka S, Jadhav V, Vaish N, Zinnen S, Vargeese C, Bowman K, Shaffer CS, Jeffs LB, Judge A, MacLachlan I, Polisky B. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 1002-1007.
- 64) Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, Harborth J, Heyes JA, Jeffs LB, John M, Judge AD, Lam K, McClintock K, Nechev LV, Palmer LR, Racie T, Rohl I, Seiffert S, Shanmugam S, Sood V, Soutschek J, Toudjarska I, Wheat AJ, Yaworski E, Zedalis W, Koteliensky V, Manoharan M, Vornlocher HP, MacLachlan I. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 2006; 441: 111-114.
- 65) Peer D, Park EJ, Morishita Y, Carman CV, Shimaoka M. Systemic leukocyte-directed siRNA delivery revealing cyclin D1 as an anti-inflammatory target. *Science* 2008; 319: 627-630.
- 66) Boussif O, Zanta MA, Behr JP. Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold. *Gene Ther* 1996; 3: 1074-1080.
- 67) Sano A, Maeda M, Nagahara S, Ochiya T, Honma K, Itoh H, Miyata T, Fujioka K. Atelocollagen for protein and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55: 1651-1677.
- 68) Minakuchi Y, Takeshita F, Kosaka N, Sasaki H, Yamamoto Y, Kouno M, Honma K, Nagahara S, Hanai K, Sano A, Kato T, Terada M, Ochiya T. Atelocollagen-mediated synthetic small interfering RNA delivery for effective gene silencing in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: e109.
- 69) Takei Y, Kadomatsu K, Yuzawa Y, Matsuo S, Muramatsu T. A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics. *Cancer Res* 2004; 64: 3365-3370.
- 70) Hanai K, Kurokawa T, Minakuchi Y, Maeda M, Nagahara S, Miyata T, Ochiya T, Sano A. Potential of atelocollagen-mediated systemic antisense therapeutics for inflammatory disease. *Hum Gene Ther* 2004; 15: 263-272.
- 71) Takeshita F, Minakuchi Y, Nagahara S, Honma K, Sasaki H, Hirai K, Teratani T, Namatame N, Yamamoto Y, Hanai K, Kato T, Sano A, Ochiya T. Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 12177-12182.
- 72) Meade BR, Dowdy SF. Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59: 134-140.
- 73) Chiu YL, Ali A, Chu CY, Cao H, Rana TM. Visualizing a correlation between siRNA localization, cellular uptake, and RNAi in living cells. *Chem Biol* 2004; 11: 1165-1175.
- 74) Soutschek J, Akinc A, Bramlage B, Charisse K, Constien R, Donoghue M, Elbashir S, Geick A, Hadwiger P, Harborth J, John M, Kesavan V, Lavine G, Pandey RK, Racie T, Rajeev KG, Rohl I, Toudjarska I, Wang G, Wuschko S, Bumcrot D, Koteliensky V, Limmer S, Manoharan M, Vornlocher HP. Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature* 2004; 432: 173-178.
- 75) Wolfrum C, Shi S, Jayaprakash KN, Jayaraman M, Wang G, Pandey RK, Rajeev KG, Nakayama T, Charrise K, Ndungo EM, Zimmermann T, Koteliensky V, Manoharan M, Stoffel M. Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 1149-1157.
- 76) Song E, Zhu P, Lee SK, Chowdhury D, Kussman S, Dykxhoorn DM, Feng Y, Palliser D, Weiner DB, Shankar P, Marasco WA, Lieberman J. Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 709-717.
- 77) Nogawa M, Yuasa T, Kimura S, Tanaka M, Kuroda J, Sato K, Yokota A, Segawa H, Toda Y, Kageyama S, Yoshiki T, Okada Y, Maekawa T. Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. *J Clin Invest* 2005; 115: 978-985.
- 78) Bartlett DW, Davis ME. Impact of tumor-specific targeting and dosing schedule on tumor growth inhibition after intravenous administration of siRNA-containing nanoparticles. *Biotechnol Bioeng* 2008; 99: 975-985.
- 79) Heidel JD, Yu Z, Liu JY, Rele SM, Liang Y, Zeidan

- RK, Kornbrust DJ, Davis ME. Administration in non-human primates of escalating intravenous doses of targeted nanoparticles containing ribonucleotide reductase subunit M2 siRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 5715-5721.
- 80) Koldehoff M, Steckel NK, Beelen DW, Elmaagacli AH. Therapeutic application of small interfering RNA directed against bcr-abl transcripts to a patient with imatinib-resistant chronic myeloid leukaemia. *Clin Exp Med* 2007; 7: 47-55.
- 81) Bol D, Ebner R. Gene expression profiling in the discovery, optimization and development of novel drugs: one universal screening platform. *Pharmacogenomics* 2006; 7: 227-235.
- 82) von Bueren AO, Shalaby T, Oehler-Janne C, Arnold L, Stearns D, Eberhart CG, Arcaro A, Pruschy M, Grotzer MA. RNA interference-mediated c-MYC inhibition prevents cell growth and decreases sensitivity to radio- and chemotherapy in childhood medulloblastoma cells. *BMC Cancer* 2009; 9: 10.
- 83) Elmaagacli AH, Koldehoff M, Peceny R, Klein-Hitpass L, Ottinger H, Beelen DW, Opalka B. WT1 and BCR-ABL specific small interfering RNA have additive effects in the induction of apoptosis in leukemic cells. *Haematologica* 2005; 90: 326-334.
- 84) Shi XH, Liang ZY, Ren XY, Liu TH. Combined silencing of K-ras and Akt2 oncogenes achieves synergistic effects in inhibiting pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo. *Cancer Gene Ther* 2009; 16: 227-236.

著者プロフィール



芦原 英司 Eishi Ashihara

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学・講師

略 歴：1987年3月 京都府立医科大学卒業
 5月 京都府立医科大学第二内科
 1993年2月 アメリカ合衆国ニューヨーク血液センター客員研究員
 1995年4月 京都府立洛東病院 内科第四（一般内科）副医長
 （京都府立医科大学第二内科助手併任）
 1998年6月 博士（医学）京都府立医科大学
 2001年4月 京都府立洛東病院 内科第四（総合内科）医長
 （京都府立医科大学第二内科学内講師併任）
 2003年9月 京都大学医学部附属病院探索医療センター
 重症心不全への細胞移植プロジェクト助手
 2005年4月 京都大学医学部附属病院輸血細胞治療部助手
 2007年4月 同 助教
 2009年4月 同 院内講師
 2010年4月 京都府立医科大学大学院医学研究科細胞生理学講師

専門分野：血液学，がん細胞/幹細胞生理学

最近の興味：がん細胞，幹細胞の生命現象に及ぼすイオン環境の意義

- 主な業績：1. Kawata E*, Ashihara E*, Nakagawa Y, Kiuchi T, Ogura M, Yao H, Sakai K, Tanaka R, Nagao R, Yokota A, Takeuchi M, Kimura S, Hirai H, Maekawa T. A combination of a DNA-chimera siRNA against PLK-1 and zoledronic acid suppresses the growth of malignant mesothelioma cells in vitro. *Cancer Lett* 2010; 294: 245-253. (*equal contribution)
2. Ashihara E, Kawata E, Maekawa. Future Prospect of RNA interference for cancer therapies. *Curr Drug Targets* 2010; 11: 345-360.
3. Ashihara E*, Kawata E*, Nakagawa Y, Shimazaki C, Kuroda J, Taniguchi T, Uchiyama H, Tanaka R, Yokota A, Takeuchi M, Kamitsuji Y, Inaba T, Taniwaki M, Kimura S, Maekawa T. β -catenin siRNA successfully suppressed progression of multiple myeloma in a mouse model. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 2731-2738. (*equal contribution)
4. Kawata E, Ashihara E, Kimura S, Takenaka K, Sato K, Tanaka R, Yokota A, Kamitsuji Y, Takeuchi M, Kuroda J, Tanaka F, Yoshikawa T, Maekawa T. Administration of PLK-1 small interfering RNA with atelocollagen prevents the growth of liver metastases of lung cancer. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 2904-2912.
5. Ashihara E, Tsuji H, Sakashita H, Haga H, Yurugi K, Kimura S, Egawa H, Manabe T, Uemoto S, Maekawa T. Antidonor antibody in patients receiving ABO-identical and HLA-mismatched living donor liver transplants: effect on survival. *Transplantation* 2007; 83: 506-509.
6. Tateishi K, Ashihara E, Takehara N, Nomura T, Honsho S, Nakagami T, Morikawa S, Takahashi T, Ueyama T, Matsubara H, Oh H. Clonally amplified cardiac stem cells are regulated by Sca-1 signaling for efficient cardiovascular regeneration. *J Cell Sci* 2007; 120(Pt 10): 1791-1800.
7. Kakazu N, Ashihara E, Hada S, Ueda T, Sasaki H, Terada M, Abe T. Development of spectral colour banding in cytogenetic analysis. *Lancet* 2001; 357: 529-530.
8. Ashihara E, Shimazaki C, Sudo Y, Kikuta T, Hirai H, Sumikuma T, Yamagata N, Goto H, Inaba T, Fujita N, Nakagawa M. FLT-3 ligand mobilizes hematopoietic primitive and committed progenitor cells into blood in mice. *Eur J Haematol* 1998; 60: 86-92.
9. Sudo Y, Shimazaki C, Ashihara E, Kikuta T, Hirai H, Sumikuma T, Yamagata N, Goto H, Inaba T, Fujita N, Nakagawa M. Synergistic effect of FLT-3 ligand on the granulocyte colony-stimulating factor inducing mobilization of hematopoietic stem cells and progenitor cells in mice. *Blood* 1997; 88: 3186-3191.