

平 28 年 度 委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 革新的がん医療実用化研究事業  
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名： (日本語) 人工核酸 YB-1 阻害アンチセンス：膵癌に対する新しい分子標的治療の開発  
(英語) Development of chemically-modified anti-YB-1 antisense oligonucleotides: novel molecular targeted therapy against pancreatic cancer

研究開発担当者 (日本語) 先端融合医療レドックスナビ研究拠点・教授・中野 賢二  
所属 役職 氏名： (英語) Innovation Center for Medical Redox Navigation,  
Professor, Kenji Nakano

実施期間： 平成 26 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 人工核酸 YB-1 アンチセンスの品質分析法・製造法開発支援  
開発課題名： (英語) Development of quality validation and production methods for chemically-modified anti-YB-1 antisense oligonucleotides

研究開発分担者 (日本語) 大阪大学大学院薬学研究科 生物有機化学分野 教授 小比賀 聡  
所属 役職 氏名： (英語) Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University,  
Professor, Satoshi Obika

分担研究 (日本語) 人工核酸 YB-1 アンチセンスの代謝学的安全性評価  
開発課題名： (英語) Metabolic and safety evaluation of chemically-modified anti-YB-1 antisense oligonucleotides

研究開発分担者 (日本語) 国立循環器病研究センター 病態代謝部 部長 斯波 真理子  
所属 役職 氏名： (英語) Department of Molecular Innovation in Lipidology, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, Managing Director, Mariko-Harada Shiba

- 分担研究 (日本語) 人工核酸 YB-1 アンチセンスと放射線、抗癌剤併用の検討  
開発課題名: (英語) Combination of radiation and/or chemotherapy with chemically-modified anti-YB-1 antisense oligonucleotides
- 研究開発分担者 (日本語) 九州大学大学院医学系研究科 放射線診断学 教授 本田 浩  
所属 役職 氏名: (英語) Department of Clinical Radiology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Professor, Hiroshi Honda
- 分担研究 (日本語) 臨床・病理学的解析による膵癌の臨床研究対象としての妥当性の検討と人工核酸 YB-1 アンチセンスの病理組織学的な安全性評価  
開発課題名: (英語) Pathological assessment of YB-1 expression in pancreatic cancer using clinical specimens and safety evaluation of chemically-modified anti-YB-1 antisense oligonucleotides
- 研究開発分担者 (日本語) 九州大学大学院医学研究科 形態機能病理学分野 教授 小田 義直  
所属 役職 氏名: (英語) Department of Anatomic Pathology, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University, Professor, Yoshinao Oda

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

### 和文

膵癌臨床検体を用いて膵癌のYB-1核内発現は浸潤・未分化度と関連し、予後不良因子であることを明らかにし、人工核酸YB-1 アンチセンス治療の対象として妥当なことを明らかにした [Oda Y, Nakano K]。

人工核酸YB-1 アンチセンスの抗腫瘍効果と安全性の評価を行い、予備毒性試験と毒性試験 (GLP) における投与方法を決定した。更に、YB-1 アンチセンスの腫瘍血管や癌における抗腫瘍効果の機序解明に成功し、その成果を査読付き学術誌に投稿した [Setoguchi-Miyata K, Nakano K]。また、放射線あるいは放射線・抗癌剤併用によるin vitro での抗腫瘍効果の基礎検討を行い、YB-1 アンチセンスの抗癌剤の感受性増感作用を確認し、治験デザインの考察に有用な基礎データを得ることができた [Honda H, Nakano K, et al]。以上の如く、薬効に関する非臨床POC 取得を達成した。

人工核酸YB-1アンチセンス (被験物質) の品質分析法と合成方法を確立した [Obika S & GeneDesign Inc]。また、Enzyme-linked oligosorbent assay (ELOSAs) 法による被験物質の血中濃度測定バリデーション法を確立した [Shiba-Harada M]。PMDA 薬事相談 (対面助言) にて被験物質の品質分析法と規格の承認を受けて、GLP 準拠非臨床安全性試験を実施した。

以上の如く、中野賢二 (九州大学) を代表とする研究班 (小比賀聡、斯波真理子、本田浩:九州大学、小田義直、およびリサーチレジデント:宮田 (瀬戸口) 喜代子) は、人工核酸 YB-1 阻害アンチセンスの前臨床研究を実施し、臨床研究実施のための基盤を構築した。

## 英文

Our research unit (PI: Nakano K; Collaborators: Obika S, Shiba-Harada M, Honda H, Oda Y; Research resident: Miyata-Setoguchi K) has conducted a preclinical study on chemically-modified anti-YB-1 antisense therapy against pancreatic cancer.

Oda and Nakano conducted pathological analyses in clinical specimens of pancreatic cancer (PDAC) showing that YB-1 is correlated with invasion, undifferentiation phenotypes and poor prognosis, indicating that anti-YB-1 antisense therapies are potentially indicated for the treatment of PDAC.

Miyata-Setoguchi and Nakano has produced disease models to evaluate antitumor efficacy and safety potential of chemically-modified anti-YB-1 antisense oligonucleotides. Miyata-Setoguchi has identified the therapeutic mechanism of chemically-modified anti-YB-1 antisense oligonucleotides against tumor vessels and cancers. Honda and Nakano have performed a basic study to identify the enhanced effect of chemically-modified anti-YB-1 antisense oligonucleotides on chemo- and irradiation against PDAC.

Okiba and GeneDesign Inc. collaborated to establish the production and quality evaluation methods for chemically-modified anti-YB-1 antisense oligonucleotides. Shiba has developed Enzyme-linked oligosorbent assay (ELOSAs) method for determining the concentration of chemically-modified anti-YB-1 antisense oligonucleotides. PMDA has approved the quality validation method, and then we have conducted GLP-non-clinical safety examination of chemically-modified anti-YB-1 antisense oligonucleotides.

In summary, we have finished the preclinical study for chemically-modified anti-YB-1 antisense oligonucleotides against PDAC tumors.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 21件）

1. Shinkai K, \*Nakano K, Cui L, Mizuuchi Y, Onishi H, Oda Y, Obika S, Tanaka M, Katano M: Nuclear expression of Y-box binding protein-1 is associated with poor prognosis in patients with pancreatic cancer and its knockdown inhibits tumor growth and metastasis in mice tumor models. *Int J Cancer*. 2016; 139(2): 433-45. 国際誌
2. Cui L, \*Nakano K, Obchoei S, Setoguchi K, Matsumoto M, Yamamoto T, Obika S, Shimada K and Hiraoka N: Small Nucleolar Noncoding RNAs SNORA23, Upregulated in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma, Regulates Expression of SYNE2 to Promote Growth and Metastasis of Xenograft Tumors in Mice. *Gastroenterology*. 2017, in press. 国際誌

- \*. Setoguchi K, Cui L, Hachisuka N, Obchoei S, Shinkai K, Wada F, Yamamoto T, Harada-Shiba M, Obika S, \*Nakano K: Antisense oligonucleotides targeting Y-box binding protein-1 inhibit tumor angiogenesis by downregulating Bcl-xL/VEGFR2 and Bcl-xL/Tie axes. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2017, in revise. 国際誌
3. Shimoyama A, Fujisaka A, Obika S : Evaluation of Size-exclusion Chromatography for The Analysis of Phosphorothioate Oligonucleotides. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 2017, 136, 55-56. 国際誌
4. Hara T, Kodama T, Takegaki Y, Morihiko K, Ito K, Obika S : Synthesis and Properties of 7-Deazapurine- and 8-Aza-7-deazapurine-Locked Nucleic Acid Analogs: The Effect of Glycosidic Torsion Angle, *J. Org. Chem.*, 2017, 82, 25-36. 国際誌
5. Nahar S, Singh A, Morihiko K, Moai Y, Kodama T, Obika S, Maiti S : Systematic Evaluation of Biophysical and Functional Characteristics of Selenomethylene Locked Nucleic Acid Mediated Inhibition of miR-21, *Biochemistry*, 2016, 55, 7023-7032. 国際誌
6. Mitsuoka Y, Yamamoto T, Kugimiya A, Waki R, Wada F, Tahara S, Sawamura M, Noda M, Fujimura Y, Kato Y, Hari Y, Obika S: Triazole- and Tetrazole-bridged Nucleic Acids: Synthesis, Duplex Stability, Nuclease Resistance, and In Vitro and In Vivo Antisense Potency, *J. Org. Chem.*, 2017, 82, 12-24. 国際誌
7. Islam M A, Waki R, Fujisaka A, Ito R K, Obika S : In Vitro and In Vivo Biophysical Properties of Oligonucleotides Containing 5'-Thio Nucleosides, *Drug Discov. Ther.*, 2016, 10, 263-270. 国際誌
8. Horiba M, Yamaguchi T, Obika S : Synthesis of scpBNA-<sup>m</sup>C, -A and -G Monomers, and Evaluation of The Binding Affinities of scpBNA-modified Oligonucleotides toward Complementary ssRNA and ssDNA, *J. Org. Chem.*, 2016, 81, 11000-11008. 国際誌
9. Mitsuoka Y, Aoyama H, Kugimiya A, Fujimura Y, Yamamoto T, Waki R, Wada F, Tahara S, Sawamura M, Noda M, Hari Y, Obika S: Effect of An N-substituent in Sulfonamide-bridged Nucleic Acid (SuNA) on Hybridization Ability and Duplex Structure, *Org. Biomol. Chem.*, 2016, 14, 6531-6538. 国際誌
10. Yamamoto T, Sawamura M, Wada F, Harada-Shiba M, Obika S: Serial incorporation of a monovalent GalNAc phosphoramidite unit into hepatocyte-targeting antisense oligonucleotides. *Bioorg Med Chem* 2016; 24(1): 26-32. 国際誌
11. Yamamoto T, Wada F, Harada-Shiba M: Development of Antisense Drugs for Dyslipidemia, *J Atherosclerosis Thrombosis*, 2016;23(9): 1011-1025. 国際誌
12. Chijiiwa Y, Moriyama T, Ohuchida K, Nabae T, Ohtsuka T, Miyasaka Y, Fujita H, Maeyama R, Manabe T, Abe A, Mizuuchi Y, Oda Y, Mizumoto K, Nakamura M: Overexpression of microRNA-5100 decreases the aggressive phenotype of pancreatic cancer cells by targeting PODXL. *Int J Oncol*. 2016; 48(4):1688-700. 国際誌

13. Horioka K, Ouchida K, Sada M, Zheng B, Moriyama T, Fujita H, Manabe T, Ohtsuka T, Shimamoto M, Miyazaki T, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M: Suppression of CD51 in pancreatic stellate cells inhibits tumor growth by reducing stroma and altering tumor-stromal interaction in pancreatic cancer. *Int J Oncol.* 2016 Apr;48(4):1499-508. 国際誌
14. Wada S, Yasuhara H, Wada F, Sawamura M, Waki R, Yamamoto T, Harada-Shiba M, Obika S: Evaluation of the effects of chemically different linkers on hepatic accumulations, cell tropism and gene silencing ability of cholesterol-conjugated antisense oligonucleotides. *J Control Release* 2016; 226, 57-65. 国際誌
15. Yamamoto T, Yahara A, Waki R, Yasuhara H, Wada F, Harada-Shiba M, Obika S: Amido-bridged nucleic acids with small hydrophobic residues enhance hepatic tropism of antisense oligonucleotides in vivo. *Org Biomol Chem* 2015; 13(12), 3757-65. 国際誌
16. Yamamoto T, Obika S, Nakatani M, Yasuhara H, Wada F, Shibata E, Shibata MA, Harada-Shiba M: Locked nucleic acid antisense inhibitor targeting apolipoprotein C-III efficiently and preferentially removes triglyceride from large very low-density lipoprotein particles in murine plasma. *Eur J Pharmacol* 2014; 723, 353-9. 国際誌
17. Yamamoto T, Fujii N, Yasuhara H, Wada S, Wada F, Shigesada N, Harada-Shiba M, Obika S: Evaluation of multiple-turnover capability of locked nucleic acid antisense oligonucleotides in cell-free RNase H-mediated antisense reaction and in mice. *Nucleic Acid Ther.* 2014; 24(4): 283-90. 国際誌
18. Shinoto M, Yamada S, Terashima K, Yasuda S, Shioyama Y, Honda H, Kamada T, Tsujii H, Saisho H, Working Group for Pancreas Cancer: Carbon ion radiation therapy with concurrent gemcitabine for patients with locally advanced pancreatic cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2016; 95(1): 498-504. 国際誌
19. Shinoto M, Nakamura K, Shioyama Y, Sasaki T, Nishie A, Asayama Y, Ohga S, Yoshitake T, Terashima K, Asai K, Matsumoto K, Honda H: Prognostic significance of a minute amount of ascites during chemoradiotherapy for locally advanced pancreatic cancer. *Anticancer Res* 2016; 36(4), 1879-84. 国際誌
20. Mizuuchi Y, Aishima S, Ohuchida K, Shindo K, Fujino M, Hattori M, Miyazaki T, Mizumoto K, Tanaka M, Oda Y: Anterior gradient 2 downregulation is mediated by epithelial mesenchymal transition and correlates with poor outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Lab Invest.* 2015; 95(2): 193-206. 国際誌
21. Akagawa S, Ohuchida K, Torata N, Hattori M, Eguchi D, Fujiwara K, Kozono S, Cui L, Ikenaga N, Ohtsuka T, Aishima S, Mizumoto K, Oda Y, Tanaka M: Peritoneal myofibroblasts at metastatic foci promote dissemination of pancreatic cancer. *Int J Oncol.* 2014;45(1):113-20. 国際誌

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 毒性ゼロに向けた革新的医薬プラットフォーム構築, 口頭発表, 小比賀聡, 第2回革新的バイオ研究開発シンポジウム, 2017.1.20, 国内
2. Recent Progress in the Development of Bridged Nucleic Acids -Design, Synthesis and Properties of GuNA and scpBNA, 口頭発表, 小比賀聡, 12<sup>th</sup> Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society, 2016.9.26, Montreal, 国外
3. 核酸医薬の実現に向けた人工核酸スクリーニング技術, 口頭発表, 小比賀聡, 医薬基盤・健康・栄養研究所創薬デザイン研究センターシンポジウム, 2016.11..22, 国内
4. 核酸医薬開発におけるこれからの化学, 口頭発表. 小比賀聡, 第1回日本核酸医薬学会, 2015.11.30, 国内
5. Recent Progress in the Development of Bridged Nucleic Acids, 口頭発表. 小比賀聡, PacificChem2015, 2015.12.16, 国内
6. 毒性ゼロに向けた革新的核酸医薬プラットフォーム構築, 口頭発表. 小比賀聡, 第1回革新的バイオ研究開発シンポジウム, 2016.1.19, 国内
7. Oligonucleotide Therapeutics: From Base Pairs to Bedside 「Recent Progress in the Development of Bridged Nucleic Acids」. Obika S: PacificChem2015, Sheraton Waikiki, Honolulu, 2015年12月16日
8. 抗ヒト PCSK9 アンチセンス薬の臨床応用へ向けた効率的スクリーニング及び非ヒト霊長類を用いた薬効確認試験, ポスター発表, 和田郁人, 山本剛史, 橘敬祐, 小林直之, 小比賀聡, 斯波真理子, 日本核酸医薬学会第2回年会, 2016年11月15日~17日, 国内
9. 人工核酸による ABCA1 発現上昇を介した新規動脈硬化症治療法の開発研究, 口頭発表, 和田郁人, 上田哲也, 小比賀聡, 斯波真理子, 遺伝子・デリバリー研究会第16回夏期セミナー, 2016年9月12日~13日, 国内
10. アンチセンス核酸の活性向上に向けた単量体 GalNAc の構造最適化研究, 口頭発表, 澤村元気, 山本剛史, 小比賀聡, 斯波真理子, 遺伝子・デリバリー研究会第16回夏期セミナー, 2016年9月12日~13日, 国内
11. 肝指向性コレステロール修飾型アンチセンス分子の高活性化に向けた検討, 口頭発表, 上田哲也, 和田郁人, 小比賀聡, 斯波真理子, 遺伝子・デリバリー研究会第16回夏期セミナー, 2016年9月12日~13日, 国内
12. 動脈硬化症治療を目的とした ABCA1 発現上昇を誘導する人工核酸の開発研究, ポスター発表, 上田哲也, 和田郁人, 小比賀聡, 斯波真理子, 第48回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2016年7月14日~15日, 国内

13. 抗ヒト PCSK9 アンチセンス薬の臨床応用へ向けた効率的スクリーニング及び非ヒト霊長類を用いた薬効確認試験, ポスター発表, 和田郁人, 山本剛史, 小林直之, 橋敬祐, 伊藤浩介, 小比賀聡, 斯波真理子, 第 48 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2016 年 7 月 14 日～15 日, 国内
14. 動脈硬化症の治療に向けた遺伝子発現誘導型核酸の開発研究, ポスター発表, 和田郁人, 上田哲也, 山本剛史, 小比賀聡, 斯波真理子, 第 16 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム, 2016 年 5 月 16 日, 国内
15. 家族性高コレステロール血症を対象とした核酸医薬の開発, 口頭発表, 斯波真理子, 第 16 回遺伝子・デリバリー研究会シンポジウム, 2016 年 5 月 16 日, 国内
16. 架橋型人工核酸を用いた分子標的薬開発. 口頭発表. 斯波真理子. 第47 回日本動脈硬化学会総会・学術集会, 2015 年7 月9 日～10 日, 国内
17. Effects of Selective Down-regulation of Apolipoprotein C-III by Antisense Oligonucleotides. Wada F, Yamamoto T, Obika S, Harada-Shiba M:ポスター発表, XV II International Symposium on Atherosclerosis 2015, 2015年5月23日～26日, Amsterdam国外
18. Therapeutic Approach of Critical Limb Ischemia by LDL-Apheresis-Its Effect and Mechanism-. 口頭発表、Harada-Shiba M: 第80 回日本循環器学会学術集会、2016 年3 月18 日～20 日、国内
19. Homozygous familial hypercholesterolemia(HoFH) in Japan-Current situation and upcoming treatment-. 口頭発表、Harada-Shiba M, 10thAPSAVDC Congress, Luncheon Seminar2, 2016年7月14日～16日, 東京
20. Pancreatic ductal adenocarcinoma without high-grade pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) may develop via a pathway other than PanIN-carcinoma sequence. ポスター発表、Miyazaki T, Ohishi Y, Miyasaka Y, Ozono K, Abe A, Mochidome N, Saeki K, Nagai E, Oda Y, Nakamura M. 46th American Pancreatic Association annual meeting, 2015. 11. 4-7, 国外
21. 通常型膵癌におけるSMAD4発現と背景のPanIN gradeは相関する. ポスター発表, 宮崎哲之、大石善丈、相島慎一、水内祐介、服部正見、大藪慶吾、阿部篤、持留直希、田中雅夫、小田義直. 第104 回日本病理学会総会(名古屋), 2015. 4. 30-5. 2, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

特記事項無し

(4) 特許出願

特許出願 1

出願番号・公開番号	PCT/JP2015/069947
発明の名称	アンチセンス抗悪性腫瘍薬
出願日（優先日）	平 27.7.10
出願人（特許権者）	中野 賢二
出願国	PCT
登録日	未登録（審査中）
登録番号	

特許出願 2

出願番号・公開番号	PCT/JP2010/068409
発明の名称	架橋型人工ヌクレオシドおよびヌクレオチド
出願日（優先日）	平 22.2.4
出願人（特許権者）	国立大学法人大阪大学
出願国	PCT
登録日	平 26.12.26
登録番号	5669073