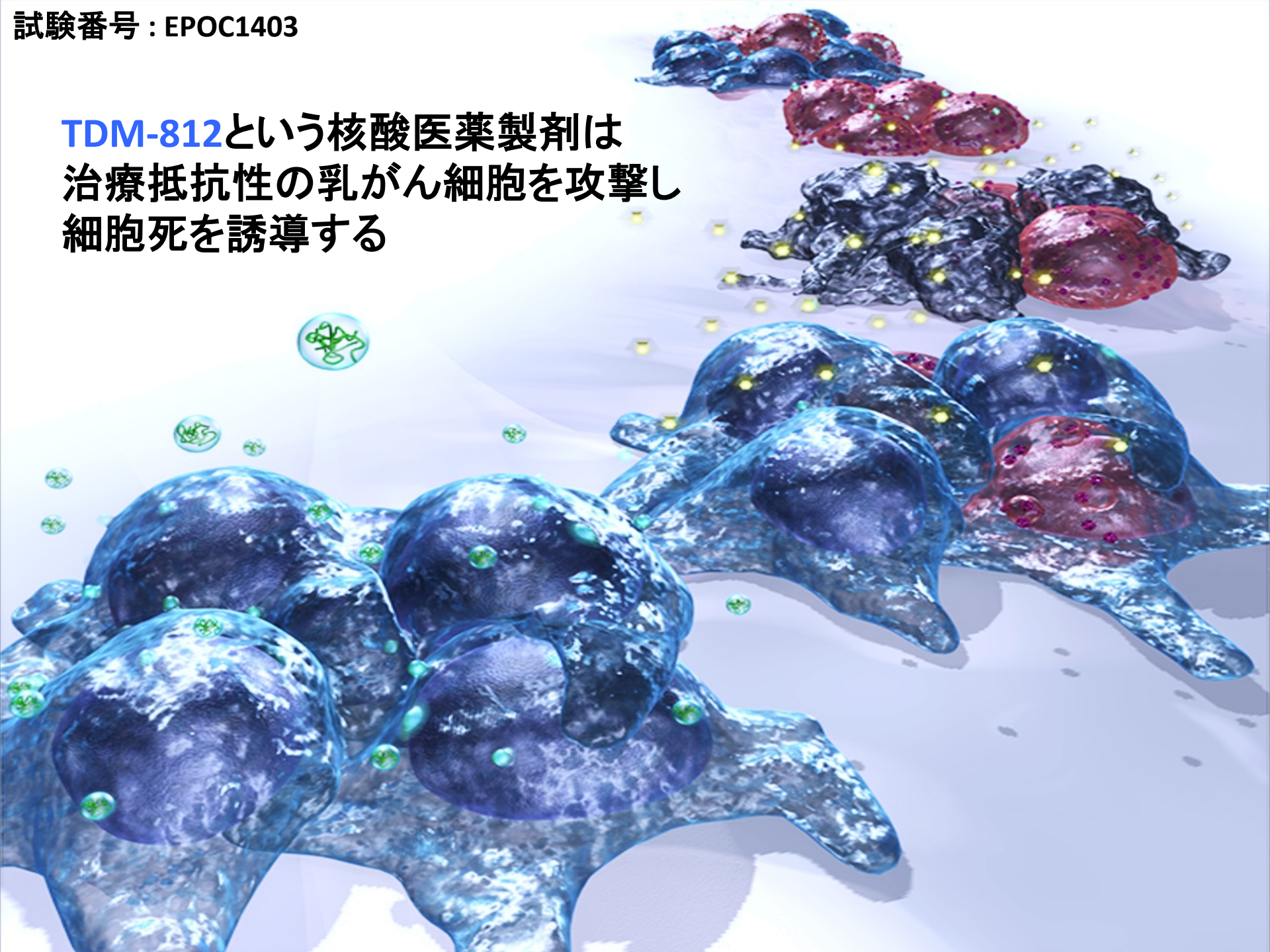


GGCCACUGUAAACUAGAACA  
GUCCGGUGACAAUUUGAUCUU

乳がんの治療抵抗性を制御する  
RPN2遺伝子の分子メカニズムと  
siRNA製剤化について

国立がん研究センター研究所  
分子細胞治療研究分野 主任分野長  
落谷孝広

**TDM-812**という核酸医薬製剤は  
治療抵抗性の乳がん細胞を攻撃し  
細胞死を誘導する



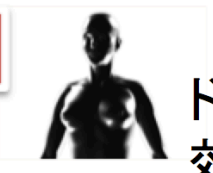


乳がん患者

ドセタキセルで乳がんが縮小



22名

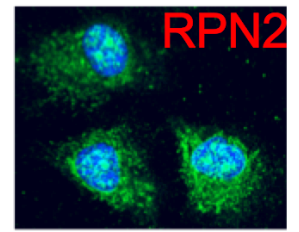


ドセタキセルで効果のない乳がん

22名

抗がん剤耐性乳がんが発現の高い遺伝子群 (36遺伝子)

Ochiya T et al., Nat Med, 1999



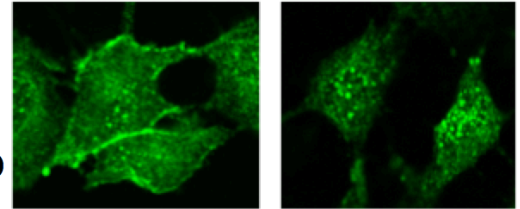
アテロコラーゲンセルトランスフェクションアレイによる候補遺伝子の絞り込み



Non-targeting siRNA RPN2 siRNA

薬剤耐性を担うRPN2遺伝子の同定

薬剤耐性乳がん細胞をアポトーシスさせる siRNAsの合成とデリバリー



RPN2siRNA は乳がんを縮小



動物に移植した薬剤耐性の乳がんの腫瘍を縮小させうるsiRNAの検証と安全性の検証(マウス, サル)



Honma K., et al. Nature Med., 14: 939-948, 2008



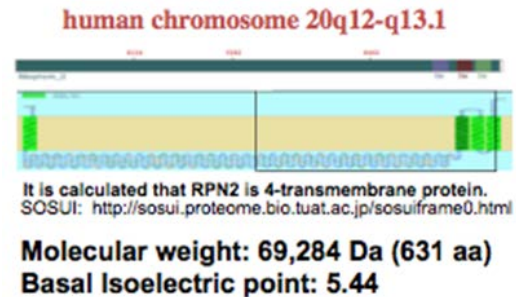
Science, 321, 2008  
Nat Clinical Practice Oncol, 12, 2008  
Clinical pharmacol & Ther, 84, 2008

臨床応用開発

# 治療の標的分子、*RPN2*とはどんな遺伝子？

## RPN2 (リボフォリンII: Ribophorin II)

- 粗面小胞体上に位置する膜タンパク質
- 乳がんの「がん幹細胞 (CSC)」画分に強く発現
- RPN2のノックダウンにより、足場非依存的な細胞増殖形成能を低下させ、またアポトーシスを惹起する



*Nature Medicine*, 2008

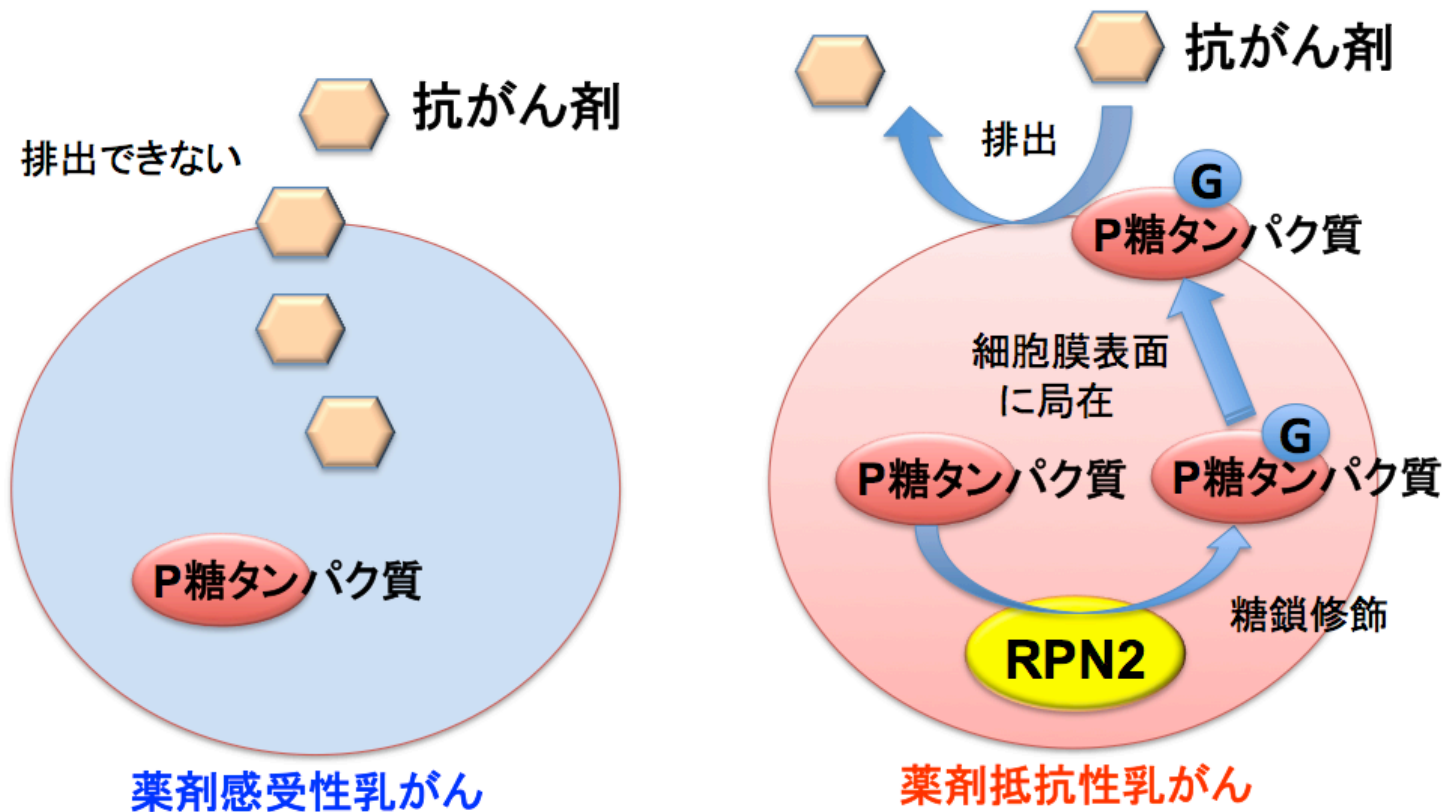
乳がん細胞などで***RPN2***遺伝子が強く働くと

- ・乳がん細胞は抗がん剤に耐性を獲得
- ・がん幹細胞というがん細胞を生み出す元となる細胞をつくりだす
- ・患者さんの予後が悪い

トリプルネガティブの乳がん細胞の悪性化に参与している

# RPN2高発現乳がんにおける治療抵抗性メカニズム1

RPN2は殺細胞性薬剤への抵抗性も誘導する。

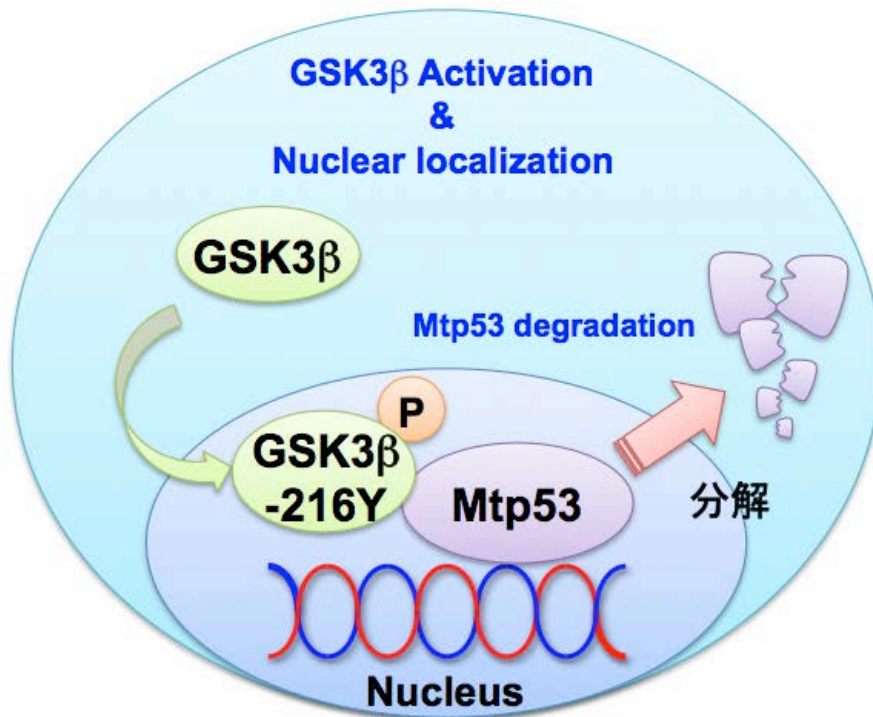


RPN2は薬剤の排出を担うP糖タンパク質の糖鎖修飾を活性化することで治療抵抗性を生み出している

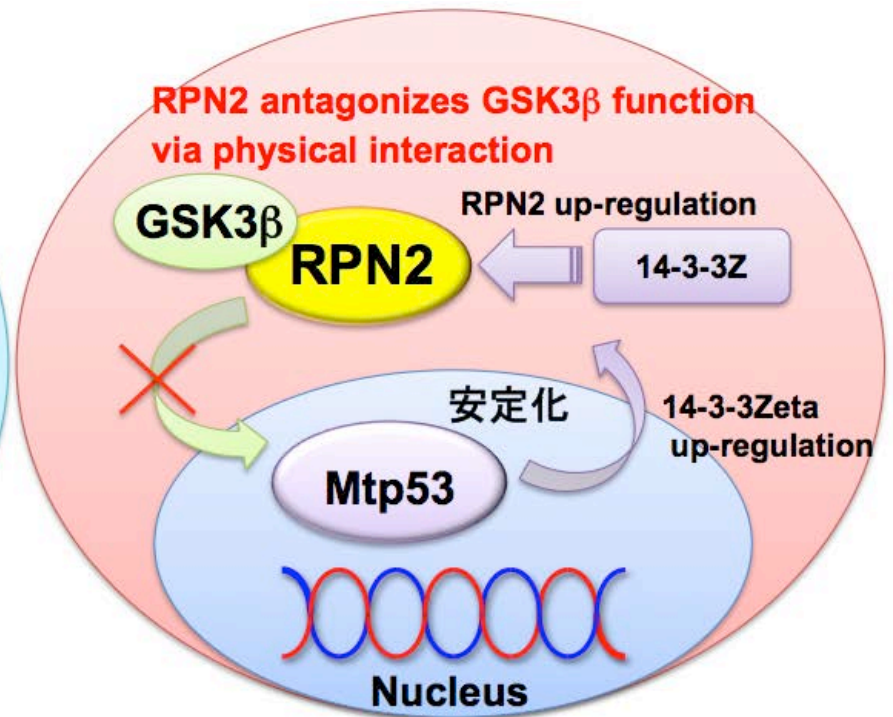
Honma K, et al., *Nature Medicine*, 2008  
Tomoinaga N, et al., *Mol Cancer*, 2014

# RPN2高発現乳がんにおける治療抵抗性メカニズム2

RPN2とGSK3βが結合することで、Mtp53の分解が抑制され  
乳がん幹細胞の形質が維持される。



Non CSC Phenotypes



CSC Phenotypes

RPN2は核内のmutant p53を安定化することで  
治療抵抗性を生み出している

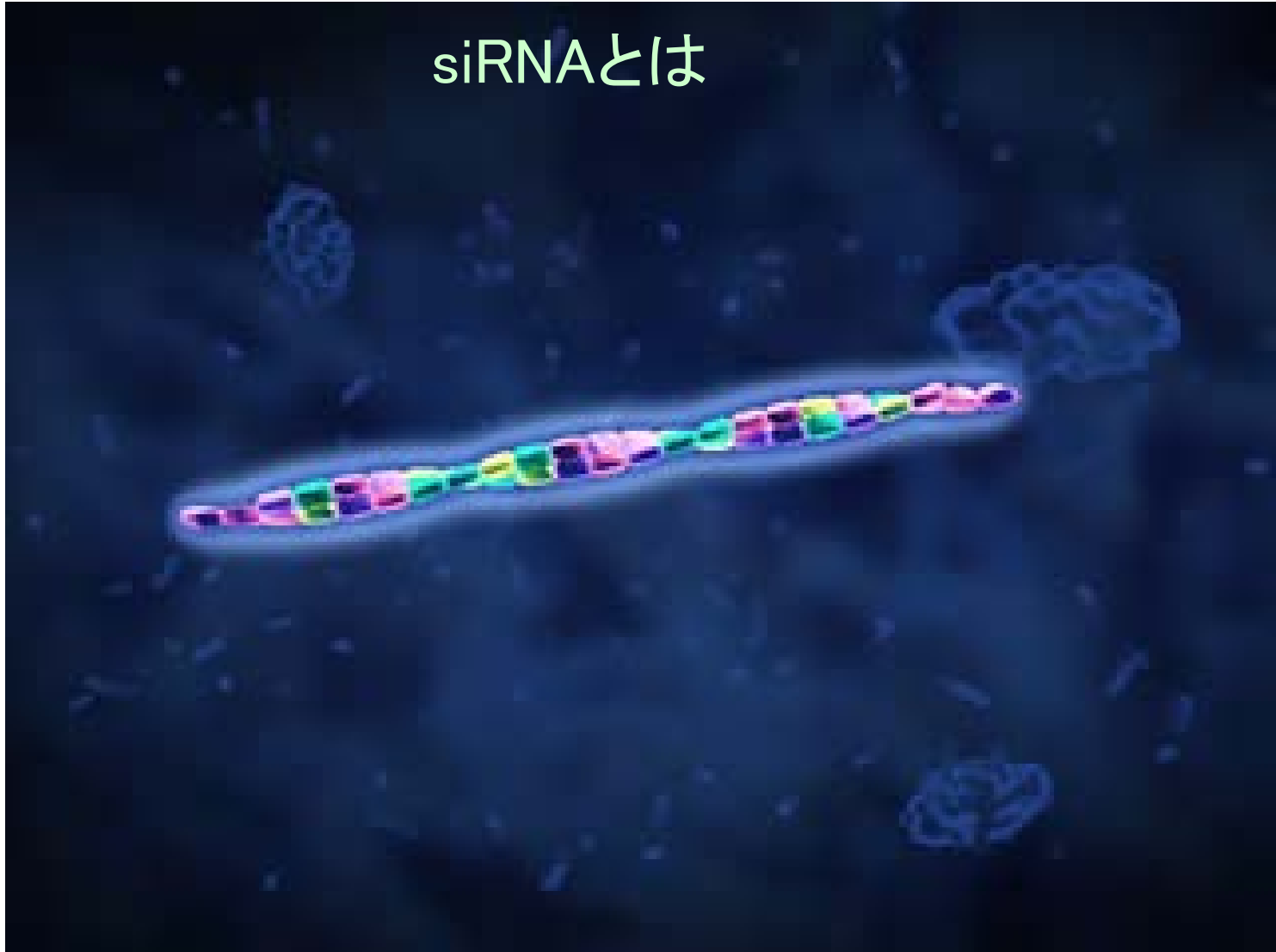
Takahashi RU et al., Sci Rep, 2013

Takahashi RU et al., Nat Commun, 2015

# RPN2を抑制する「核酸医薬品」の開発

RISC:RNA 誘導型サイレンシング複合体

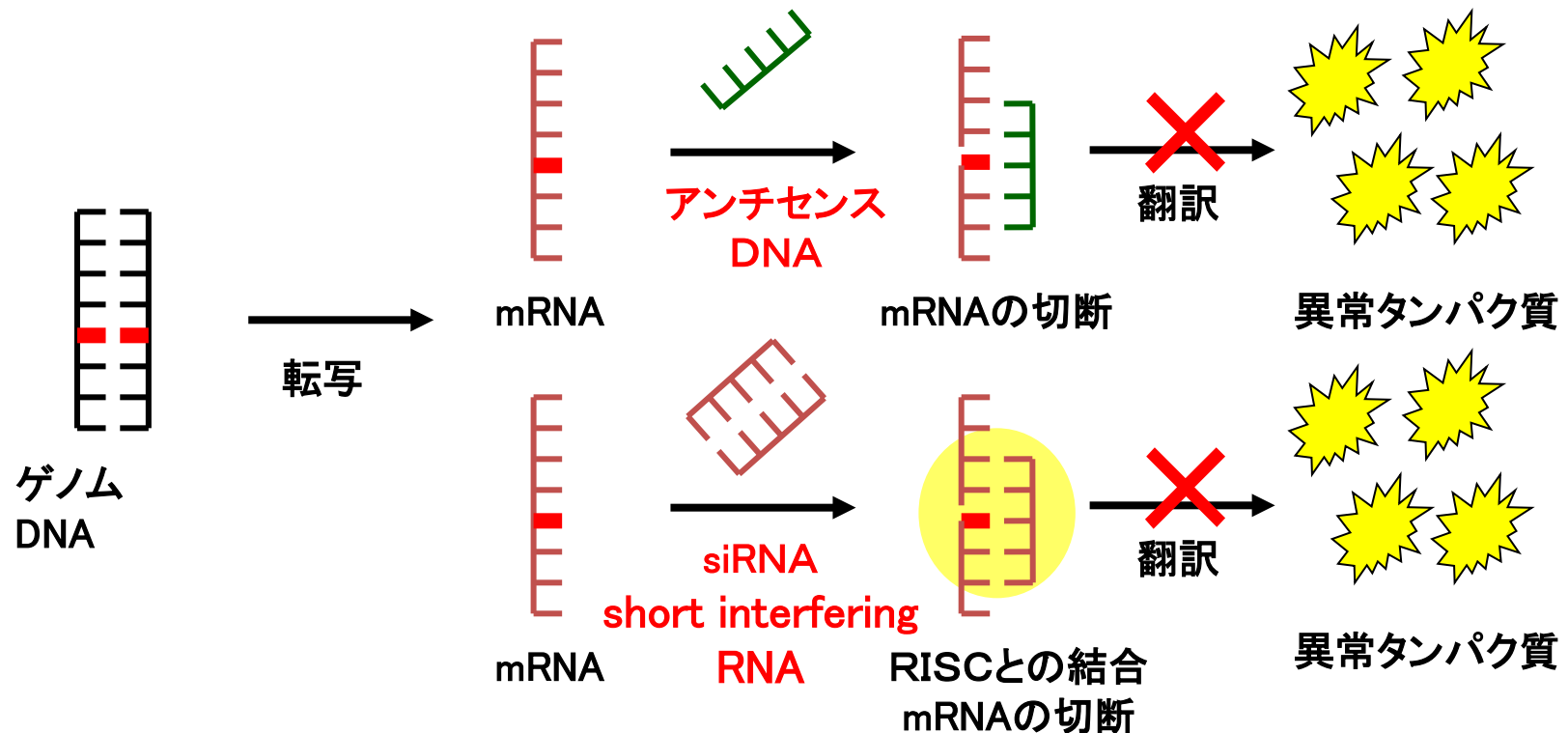
siRNAとは



# オリゴヌクレオチドを用いた核酸医薬

**アンチセンスDNA法** : 20mer程度の短鎖核酸を用いて病因タンパク質を産生するmRNAを分解する治療方法  
遺伝子治療には該当しない

**siRNA法** : 20mer程度の二重鎖RNAにより病因タンパク質を産生するmRNAを分解する治療方法  
遺伝子治療には該当しない



RISC:RNA 誘導型サイレンシング複合



# 核酸医薬のメリット

	RNAi 核酸医薬	低分子 化合物	抗体医薬
創薬候補決定までの行程	短期	長期	長期
標的による薬物動態	不変	不変	不変
標的の多様性	対応	対応	細胞表面のみ
毒性・副作用	少ない	強い場合も	少ない
前臨床試験	短期	中-短期	短期
血中の半減期	調節可能	調節可能	調節不能
分子量	小さい	様々	大きい
製造コスト	少ない	少ない	大きい
DDSの必要性	✓必要性大	少ない	少ない

# 薬効成分

## RPN2siRNA

塩基配列: sense 5' -GGCCACUGUUAAACUAGAACA -3'  
antisense 3' - GUCCGGUGACAAUUUGAUCUU -5'

分子量: 13,354 (sense: 6,703, antisense: 6,651)

説明: 21-merの天然型RNAのデュプレックス(ds-siRNA)として化学合成する。  
RPN2siRNAは無菌化してバイアルへ充填する(3 mg)。

## RPN2siRNAの規格

項目	試験方法	規格
性状	目視	白色から薄黄白色の粉末
分子量	MS	13,354±1.0
純度	SEC-HPLC	≥85%
不純物(類縁物質)	SEC-HPLC	主要不純物について報告する
残留溶媒	GC-MS	検出された物質について、ICH-Q3Cで定められた値を超えないこと
重金属	ICP-MS	検出された物質について、ICH-Q3Dで定められた値を超えないこと
水分含量	カールフィッシャー法	< 15%
ナトリウム含量	フレイム原子吸光分析	6-8%
エンドトキシン	ゲル化法	< 1 EU/mg
無菌性	無菌試験	無菌であること
不溶性異物	不溶性異物検査	注射用水に溶解した時、目視で容易に検出される異物がないこと
不溶性微粒子	不溶性微粒子試験	注射用水に溶解した時、混在してはならない微粒子がないこと

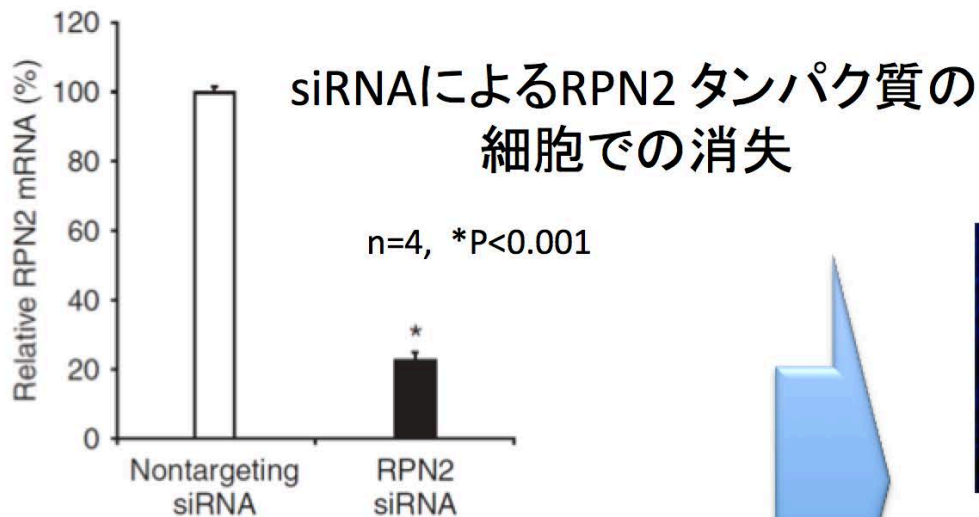
# RPN2 siRNAの塩基配列

配列: **RPN2 siRNA**

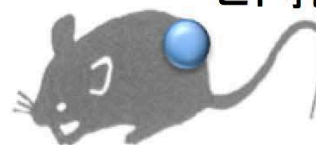
**Sense 5'- GGCCACUGUUAAACUAGAACA-3'**  
**antisense 3'- GUCCGGUGACAAUUUGAUCUU -5'**

Ribophorin II (RPN2)とは、乳癌の「がん幹細胞」とされるESA+/CD44+/CD24-の分画に特異的に発現している粗面小胞体に局在する膜タンパクであり、そのRPN2遺伝子の配列をもとに合成され、その発現をノックダウンする能力を有するsiRNAが、RPN2siRNAである。RPN2のsiRNAによるノックダウンは、癌幹細胞の生物学的特徴である**造腫瘍性、薬剤耐性、転移**等の能力を顕著に抑制することがin vitroおよびin vivoの解析から明らかとなっている。国立がん研究センター中央病院(乳腺・腫瘍内科)にて、122例の乳癌症例についてRPN2の発現をみたところ、Triple Negative (TNBC)の症例にて、RPN2の発現量と腫瘍サイズおよび予後の悪さの相関がみられている。腫瘍細胞へのRPN2siRNA導入により、腫瘍細胞のアポトーシスを惹起した。

# RPN2をsiRNAによりノックダウンすることで、治療抵抗性を解除し、治療抵抗性乳癌における腫瘍細胞のアポトーシスを誘導する

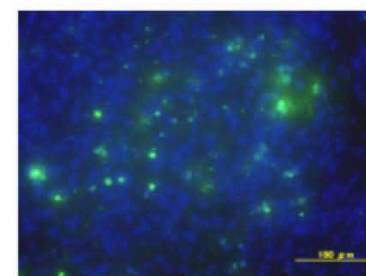
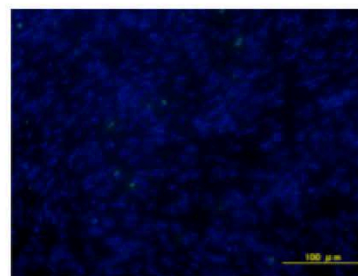


ヒト乳がん移植腫瘍

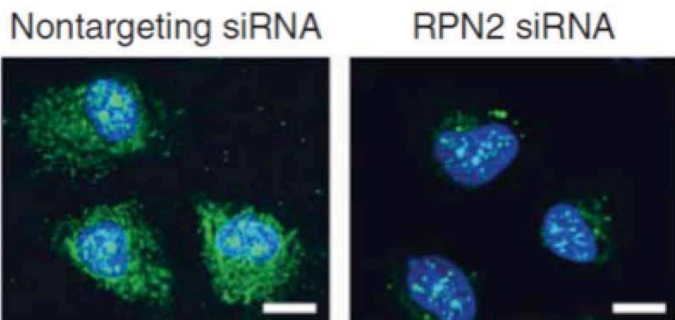


Control siRNA

RPN2 siRNA



腫瘍組織内のアポトーシスを誘導



Bar: 5 um

腫瘍の縮小

Control Non-silencing siRNA

RPN2 siRNA



Doc 20 mg/kg (every 2 weeks)

Bar: 5 mm

in vitroでのRPN2siRNAのトランスフェクションによるノックダウン MCF7-ADR細胞、トランスフェクション72時間

# 核酸医薬実現に必要なブレークスルー技術と研究体制

1) アカデミア発の優れた治療標的遺伝子・・・日本発、世界初（国産）

## **RPN2遺伝子**の発見（*Nat Med*、2008）

2) 核酸医薬デリバリー技術・・・国産

国内企業スリー・ディー・マトリックス社の有する**A6Kペプチド**を利用

（特徴）前臨床試験としてイヌの自然発生乳腺腫瘍にRPN2siRNAをA6Kとともに局所デリバリーすることにより、腫瘍縮小効果を確認。

3) 基礎と臨床の強いタッグによるTR研究の実現

研究所  
中央病院（乳腺・腫瘍内科）  
企業（スリー・ディー・マトリックス（株））



# 基礎研究から臨床開発研究への効率の良い橋渡し研究を推進



研究所

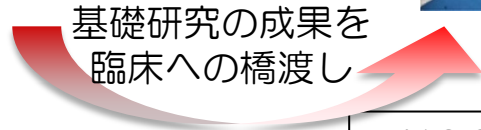
先端医療開発センター



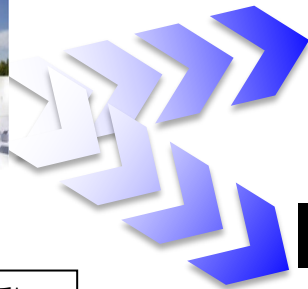
中央病院



東病院



基礎研究の成果を  
臨床への橋渡し



日本初クリニカル  
シーケンス検査  
室の構築

CLIA準拠  
検査ラボ

アカデミア・企業との  
共同研究・創薬研究開発の創造  
(例 島津製作所  
(ノーベル賞技術の活用))

NCCで行われる研究の動物・生体試料・研究支援

日本独自のヒトがん培養細胞・  
動物モデルの作製  
→日本人向け医薬品開発の評価系



生体試料コア  
血液・病理サンプル(2013年)  
ゲノム検査も可能な

中央病院:	2928640件
東病院:	183416

臨床情報の紐づいた病理材料

中央病院:	3834(手術)
	16370(生検)
東病院:	2385(手術)
	9168(生検)

血液検体・手術検体のご提供

- 細胞株
  - 919ヒト細胞株
  - 自家樹立165株
- 動物モデル
  - 同所移植モデル
  - PDxモデルの作製
- 試験管内モデル

## 基礎研究から臨床応用へ発展した進行中のプロジェクト

- LC-SCRUM-Japan (3つの融合遺伝子を解析する全国的な臨床試験)
- NCC Onco-panel (日本人のがんに関連する遺伝子を検査するキット)
- 国内初の乳がんを対象とした核酸医薬品の臨床試験
- 血中マイクロRNAによる診断技術開発 (国家プロジェクト)

日本から、がん治療の  
新たな時代を切り拓く。

## RPN2遺伝子の機能を抑えることで乳癌を治療する



トリプルネガティブの乳癌

アカデミア発

国立がん研究センター発

最新の科学技術をベースにした画期的な薬剤:

### 核酸医薬品



## TDM-812

(RPN2siRNA/A6K複合体)



株式会社スリー・ディー・マトリクス  
特許 USP 7179784, USP 7871258,  
PCT/JP2011/064527 ほか

国立がん研究センター研究所  
分子細胞治療研究分野



国立がん研究センター中央病院  
乳腺・腫瘍内科

B2B (基礎から臨床へ)

