

インビボ36 : 898-906 (2022)  
doi :10.21873 / invivo.12779

# SOT オリゴヌクレオチド療法 がんへの補完治療の選択肢 :

IOANNIS PAPASOTIRIOU1、 GEORGIOS BEIS2、 AGGELOS C. ILIOPOULOS2、 PANAGIOTIS APOSTOLOU2

1Research Genetic Cancer Center International GmbH、スイス、ツーク;  
2Research Genetic Cancer Center SA、フロリナ工業地帯、フロリナ、ギリシャ

概要。背景/目的 :単剤療法として、および他の治療と組み合わせた、癌におけるオリゴヌクレオチドサポート療法 (SOT)の有効性に関する早期評価。患者と方法 :この研究では、SOT投与後の95人の患者の臨床状態とパフォーマンスステータス (Karnofsky-Index)を評価した。

さらに、47人の患者のSOT投与前後の循環腫瘍細胞 (CTC)が測定され、反復測定ANOVAによって分析されました。結果 :SOT (77.89%)、他の治療法と組み合わせたSOT (69.77%)、および単剤療法としてSOTを使用した、または別の治療法に関する情報が提供されなかった (84.31%)すべての患者で臨床状態の改善が観察されました。

Karnofsky-Indexの陽性結果は、それぞれ71.58%、61.36%、80.39%でも観察されました。最後に、CTCの統計的に有意な減少が、単剤療法としてのSOTと補助療法としてのSOTの両方で観察されました。結論 :予備的な結果は、SOT療法が単剤療法としてだけでなく、癌の他の療法と組み合わせて使用できることを示しています。

基本的な生物学的プロセス (アポトーシス、増殖など)に関与する遺伝子の発現の調節は、癌の代替治療オプションとなり得ることが知られています。遺伝子発現は、RNA干渉 (RNAi)と呼ばれるプロセスによって制御されます。このプロセスでは、低分子RNA分子が相補的なメッセンジャーRNA (mRNA)に結合し、その分解を引き起こします。アンチセンス療法は、特定のmRNAに対してオリゴヌクレオチドを使用し、増殖に不可欠な遺伝子をサイレンシングするか、阻害することによって癌治療に貢献します

抗アポトーシスタンパク質の発現。特に、RNAiは遺伝子発現の調節に不可欠な通常の生物学的プロセスです。二本鎖RNA (dsRNA)分子はより短いdsRNAに分解され、塩基の相補性を介してmRNAの特定の領域に結合し、mRNAのさらなる分解を引き起こし、したがって翻訳を引き起こしません

(1) 短いdsRNAは、ダイサーによる長いdsRNAの切断によって誘導され、マイクロRNA (miRNA)、短い干渉RNA (siRNA)、およびpiwi相互作用RNA (piRNA)の生成をもたらします。次に、miRNAとsiRNAの両方がRNA誘導サイレンシング複合体 (RISC)と結合し、遺伝子サイレンシングを引き起こします (2)。 RNAiの用途は数多くあり、未知の遺伝子の機能の探索、薬剤耐性に関連する遺伝子の同定、シグナル伝達経路に関与する遺伝子、または疾患の進行や再発に関与する遺伝子が含まれます。さらに、RNAiは、癌、ウイルス感染、呼吸器疾患などのさまざまな疾患の治療に使用されています (3)。

ただし、RNA分子を使用する主な課題は、ヌクレアーゼからの保護です。 siRNAの化学的修飾により、熱安定性の向上、ヌクレアーゼによる消化に対する安定性、および生体内分布の改善が可能になります (4)。癌では、siRNA分子は通常、癌遺伝子または抗アポトーシス遺伝子のいずれかのサイレンシングに寄与します。本研究は、循環腫瘍細胞 (CTC)の遺伝子発現プロファイルに基づいて設計および製造されたSOTを使用して、オリゴヌクレオチドサポート療法 (SOT)とも呼ばれる修飾siRNA分子に基づく療法の使用が癌患者に有益であるかどうかを特定することを目的としました。データは、癌に苦しんでおり、他の種類の治療と組み合わせて、または単剤療法としてSOT療法を受けた患者から受け取ったフォローアップ質問票と、SOT用量間のCTC測定値の両方に基づいています。

この記事はオンラインで自由にアクセスできます。

連絡先 : Dr.IoannisPapasotiriou MD、Ph.D.、Research Genetic Cancer Center International GmbH、Zug、6300、Switzerland。 Tel :+41 (0)417250560、Eメール :papasotiriou.ioannis@rgcc-international.com

キーワード :オリゴヌクレオチドサポート療法、RNA干渉、癌、臨床評価、カルノフスキー指数、CTC、統計分析。

## 患者と方法

サンプル。この研究には、さまざまな種類の癌を代表する男性と女性の両方の95人の癌患者が含まれていました。この研究には、固形および血液悪性腫瘍の両方の患者も含まれました。サンプル分布は、ヨーロッパと米国からのサンプルを含めてランダムでした。

すべての手順は、安全性、生命倫理、および検証の基準に従って実施されました。この研究は、Research Genetic Cancer Center Groupの生命倫理委員会によってレビューおよび承認されました。すべての患者/ドナーは、本研究でのサンプルの使用について書面による同意を提供しました。患者は、サンプルが検査室で受け取られてテストされた日まで、サンプルを回収する権利を保持していました。

血液サンプルの準備。すべての患者から合計20~30 mlの血液を採取し、7mlの0.02M EDTA (E0511.0250, Duchefa Biochemie BV)を含む50mlの滅菌ファルコンチューブ (4440100, Orange Scientific, Braine-l'Alleud, ベルギー)に入れました。ハーレム、オランダ) 癌患者の場合、全血サンプルを4 mlのポリスクロース溶液 (Biocoll分離溶液1077, Biochrom, ベルリン、ドイツ)を使用して室温 (RT)で2500×gで20分間遠心分離しました。単核細胞、リンパ球、血小板、および顆粒球を遠心分離後に収集し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (P3813, Sigma Aldrich, ハンブルグ、ドイツ)で洗浄しました。細胞を溶解緩衝液 (154 mM NH<sub>4</sub>Cl, 31107, Sigma-Aldrich) 、10 mM KHCO<sub>3</sub> (4854, Merck, ダルムシュタット、ドイツ) 、および脱イオン水中の0.1 mM EDTAで10分間インキュベートして、赤血球を溶解しました。次に、サンプルを上記のように遠心分離し、PBSで洗浄した。次に、細胞をパンサイトケラチンピーズ (CK4, CK5, CK6, CK8, CK10, CK13, およびCK18を認識する) (5c-81714, Gentaur, カンペンハウト、ベルギー)とともに4°Cで30分間インキュベートしました。インキュベーション後、サンプルを磁場に置いて、パンサイトケラチンのマイクロピーズ結合細胞を収集し、PBSで洗浄しました。

分子分析。CTCの検出と分離に続いて、RNeasyミニキット (74105; Qiagen, Hilden, Germany)を使用してトータルRNAを抽出しました。次に、アミノアリル MessageAmp IIキット (AM1753; Ambion, ベルリン、ドイツ)を使用して、DNAマイクロアレイ実験用に1μgの抽出RNAを調製しました。標識は、Amersham CyDyeの標識後反応性色素パック (RPN5661; GE Healthcare, フライブルク・イム・ブライスガウ、ドイツ)を使用して実施しました。参照 (Cy3標識)と患者のサンプル (Cy5標識)を混合し、Human MI ReadyArrayプラットフォーム (HS1100; Microarrays Inc., 米国アラバマ州ハンツビル)を使用して共ハイブリダイズさせました。HS 400 Proハイブリダイゼーションステーション (Tecan, Männedorf, Switzerland)を、ハイブリダイゼーション前後のプロセスと洗浄乾燥ステップに使用しました。

スライドは、5μmの解像度でInnoScan 710 (Innopsys, Carbonne, France)スキャナーで画像化されました。スキャンされたマイクロアレイ画像データは、Array-Pro Analyzer 6.3ソフトウェアを使用して処理されました。データは、バックグラウンド減算を使用して正規化されました。過剰発現した遺伝子は、qPCR反応で検証されました。qPCRの場合、1μgのRNAをcDNA合成およびリアルタイム定量PCR (RT-qPCR)反応に使用しました。cDNA合成には、PrimeScript RT試薬キット (RR037A; Takara, Saint-Germain-en Laye, France)を使用し、RT-qPCRには、KAPA SYBR Fastマスターミックスユニバーサル (×2) (KK4618; Kapa Biosystems, Hamburg, ドイツ) ;最終反応は20μlでした。目的の遺伝子およびハウスキープング遺伝子のすべてのプライマーは、Beacon Designer 8で設計されました。プライマー配列は、Basic Local Alignment Search Toolを使用して評価し、不要な遺伝子を増幅するプライマーを除外しました。

サンプルは次のようにPCRによって分析されました。95°Cで2分間、続いて95°Cで10秒間、59°Cで30秒間の45サイクル、増幅後、各ステップで5秒間、0.5°C刻みで70°Cから90°Cまで融解曲線分析を行いました。PCRデータはΔΔCt法で分析しました (5)。すべての反応において、Universalから合成されたcDNA

Human Reference RNA (740000-41; Agilent, Santa Clara, CA, USA)をポジティブコントロールとして使用しました。テンプレートなしおよびネガティブコントロールを含む追加のコントロールも、すべての実験で使用されました。反応は3回行った。

浸潤、アポトーシス、遊走などの腫瘍進行の本質的な手順に関連する遺伝子に対するsiRNA分子は、レイノルズらの規則に従って設計されました。

(6)。Xfect試薬 (631317; Takara, Beijing, PR China)を使用して、製造元の指示に従ってトランスフェクトされた患者のCTCと、トランスフェクション後24~48時間の細胞を、細胞および分子アッセイで検証しました。

SOTの生産-管理。siRNAの検証後、Oligomaker48 DNA / RNA Synthesizerを使用して、修飾されたdsRNA分子を設計および生成しました。次に、dsRNA分子を凍結乾燥し、病原体の存在と各チューブの気密性をテストして、臨床医に送りました。到着時に、SOTは注射用の1 mlの水で再構成され、溶解されました。次に、溶液を注射器に入れ、注射用に9mlの水を加えた。最終溶液を静脈内に適用した。

アンケート。本研究で使用された質問票には、患者、生年月日、悪性腫瘍の種類、および最後の治療日に関する情報が含まれていました。次に、SOT投与の少なくとも3か月後に、臨床評価とKarnofsky-Indexスケールが要求されました。

記述統計。データの記述モデルには、2つの応答スケールが使用されました。最初のものには、腫瘍反応を4つのカテゴリに分類する臨床評価に基づいていました：完全反応 (CR)、部分反応 (PR)、安定した病気 (SD)、および進行性の病気 (PD)。WHOによると、CRは疾患の消失、PRは標的病変の50%以上の減少、SDは部分奏効も進行性疾患もPDも新しい病変の出現、または非標的病変の明白な進行を示します

(7)。もう1つの尺度は、機能障害に基づいて患者を分類するKarnofsky Performance Scale Index (KI)に基づいていました。このスケールは、100 (通常の状態)から0 (死亡)までの11段階をカバーします。したがって、カルノフスキー指数が低いほど、患者の生存率は低くなります (8)。この研究では、SOT療法の肯定的な評価として、CR, PR, SDの合計、およびKI > 80を考慮します。次に、がんに対するSOT治療の有効性を研究するために、応答ベースのヒストグラムが生成されました。

推論統計。仮説検定では、非独立平均値の差の評価に伝統的に広く適用されてきたため、一元配置反復測定分散分析が使用されました (9)。

これは、3つ以上の従属グループ間の平均を比較する対応のあるt検定 (2つの従属グループ間の平均を比較するために使用)の拡張です (10)。このモデルは、(a)同じ被験者の異なる時点で連続的に測定された結果の違いを評価するため、または (b)異なる条件下で同じ被験者でいくつかの結果が測定された平均を比較するために使用できます (例：治療)。テストされた帰無仮説は、関連するすべての平均が等しいというものです。ANOVAは全体的なp値を与えるため、どのグループ平均が等しいかどうかを識別しません。これは、事後テスト、つまり、選択した対象の手段または手段のすべての可能な組み合わせのペアワイズ比較を実行することによって実現できます。これには複数の帰無仮説の検定が含まれるため、それに応じて有意水準が調整されます。この研究では、ボンフェローニ調整を使用しました。ついに、

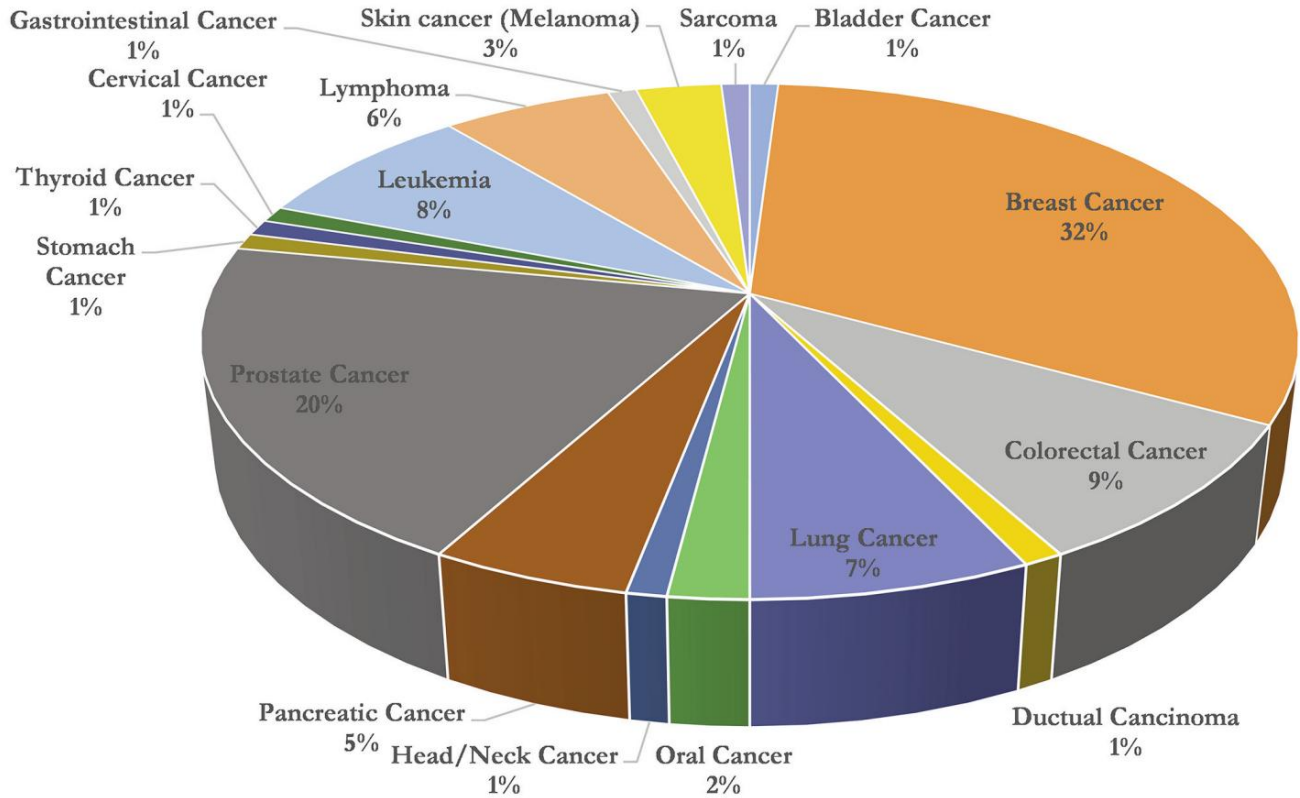


図1.オリゴヌクレオチドサポート療法後の癌症例のパーセンテージサイクルチャートの表現。

ANOVAは、すべてのサンプル母集団が正規分布しているという仮定に基づいているため、データセットの正規性を確認するために、シャピロ-ウィルク検定が使用されました (11)。統計分析は、R環境 (12)で、データ操作と視覚化用のtidyverse (13)、公開可能なプロットを作成するためのggpubr (14)、統計分析用のrstatix (15)などのパッケージを使用して実行されました。

## 結果

### 記述統計。

がん患者。分析に使用されたデータは、平均59歳の41歳から87歳の95人の患者に関するもので、そのうち46人が女性で、49人が男性でした。

大多数は乳がん患者 (32.00%)であり、続いて前立腺がん患者 (20.00%)、結腸直腸がん (9.00%)、および肺癌 (7.00%)でした。がんデータの分布を図1に示します。患者は他のタイプの治療法と組み合わせてSOTを受け (58.00%)、残り (42.00%)はSOTを単剤療法として使用しました。

すべてのがんの種類。図2Aには、SOTと癌に関する臨床評価のヒストグラムが示されています。この図に示すように、ヒストグラムの生成では、がんの種類に関係なく、すべての患者が考慮されました。

またはSOTが別の治療法と組み合わせられたかどうか。フォローアップ質問票の研究により、臨床評価では、ほとんどの回答がPR (40)、23がSD、21 PD、6 PR-SD、および5 CRであることが明らかになりました。CR、PR、SDの合計の肯定的な評価として考えると、癌に対するSOTの肯定的な評価のパーセンテージは77.89% (74/95)の値に達します。また、図2BはKIのヒストグラムを示しています。

正常な活動および/または疾患の軽度の症状を伴う正常な活動に対応する80を超えるKI値 (KI > 80)を陽性評価と見なすと、68人の患者のKI値は80を超え、27人の患者は80未満であることがわかります。したがって、この場合の肯定的な評価の割合は71.58% (68/95)と推定されました。

別の治療を受けた患者または受けていない患者、またはこれに関する情報がなかった患者のいずれかを考慮したサブデータセットについても、同様の結果が得られました。結果は表1にまとめられています。特に、SOTと別の治療法の併用を考慮すると、臨床評価の結果は、69.77% (30/43)に等しい陽性評価のパーセンテージを示しました。KIのそれぞれのパーセンテージは61.36% (27/44)でした。最後に、追加の治療が行われなかった、または情報が利用できなかったSOTで治療された患者のサンプルを考慮すると、臨床評価のそれぞれのパーセンテージは84.31%でした。

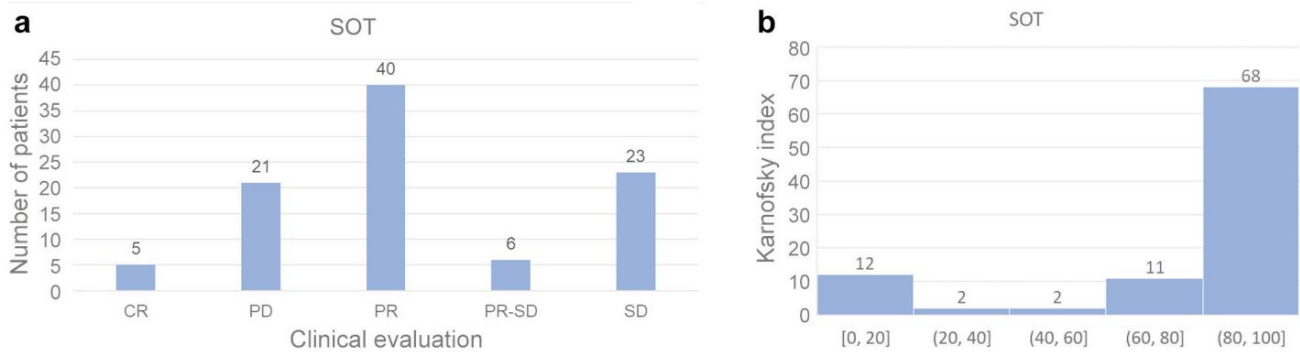


図2.臨床評価とカルノフスキー指数のヒストグラム。(A)すべてのサンプルのオリゴヌクレオチドサポート療法 (SOT)の臨床評価のヒストグラム。(B)すべてのサンプルのSOTのカルノフスキーインデックスのヒストグラム。

(43/51)、KIの場合は80.39% (41/51)でした。要約すると、結果は、癌患者に対するSOT療法が効率的であり、他の療法と組み合わせることができる (または組み合わせられない)ことを示しています。

がん特異的。図3は、がんの種類に応じたSOT療法を受けている患者の臨床評価の分布を円グラフで示しています。SOTの奏効率は、SOT療法を受けているがん患者の臨床評価ががんの種類によって異なることを示しています。患者のサンプルから、癌患者の治療に対する反応の割合は、白血病 (100%)、前立腺癌 (95%)、結腸直腸 (88%)、および乳房 (81%)で高いことが観察されました。

#### 推論統計。

単剤療法としてのSOT。単剤療法としてのSOTの場合、年齢の中央値が62歳の25人の個人が同じ結果変数 (CTCカウント)で3回測定され、統計的に有意な差 (減少)を調査するために一元配置反復測定ANOVAテストが適用されました。患者のSOT投与間のCTCの比較。ただし、ANOVAは、すべてのサンプル母集団が正規分布しているという仮定に基づいています。データセットの正常性を確認するために、シャピロ-ウィルク検定を利用しました。このテストの結果、 $p$ 値 $> 0.05$ が得られました。これは、正規性に違反していないため、一元配置反復測定分散分析の適用が可能であることを示しています。統計結果を図4に示します。ここで、線量の時点はx軸にあり、CTCはy軸にあります。アスタリスクは有意差コードを示します。つまり、「\*\*\*\*」は $p$ 値 $\leq 0.0001$ を表し、「\*\*\*」は $p$ 値 $\leq 0.001$ を表し、「\*\*」は $p$ 値 $\leq 0.01$ を表し、「\*」は $p$ 値 $\leq 0.05$ を表します。最初のSOT投与前の初期測定に対応する $t_0$ で、CTCは95%信頼区間 (CI)で $5.23 \pm 0.67$ の平均値を持つことがわかりました。最初の投与後のCTC測定値に対応する $t_1$ で、平均値は $4.63 \pm 0.55$ に等しいことがわかりました。

表I.オリゴヌクレオチドサポート療法 (SOT)の臨床評価およびカルノフスキー指数に関する結果の要約。パーセンテージは、すべてのサンプル、補助療法でも治療されたサンプル、およびSOT (追加療法なし)のみで治療されたサンプル、または情報が入手できなかったサンプルの3つの異なるケースに対する方法の有効性を示しています。別の治療法で治療されているかどうか。臨床評価では、有効性は完全奏効 (CR)、部分奏効 (PR)、および安定した疾患 (SD)の合計として推定され、カルノフスキー指数の値は80を超えていると見なされました。すべてのがんの種類が考慮されました。

SOT	すべてのサンプル	補助療法	補助療法なし-情報
クリニカル 評価 (CR + PR + SD)	74/95 = 77.89%	30/43 = 69.77%	43/51 = 84.31%
カルノフス キー指数 (> 80)	68/95 = 71.58%	27/44 = 61.36%	41/51 = 80.39%

95%CIの場合。最後に、2回目の投与後のCTCカウントに対応する $t_2$ で、平均値は95%CIで $4.05 \pm 0.47$ であることがわかりました。見てわかるように、CTCカウントの平均値はそれぞれ1回目と2回目の投与後に大幅に減少しています。実際、一元配置反復測定ANOVAを適用すると、これら3つのグループの平均がすべて $p$ 値 $< 0.05$ で等しくないことが明らかになりました。特に、得られたF統計値は25.07 (F検定で比較)であり、被験者内要因 (ges)による変動量は0.511でした。これらの結果を表IIIに示します。

最後に、平均のどのペアが有意に異なっているかを見つけるために、多重比較検定が実行され、結果も表IIIに示されています。特に、表IIIは、複数のペアワイズ比較に対応する調整済み $p$ 値 (ボンフェローニ調整)を示しています。見てわかるように、3つのペアワイズ比較すべて、つまり $t_0$ と $t_1$ 、 $t_0$ と $t_2$ 、および $t_1$ と $t_2$ は、有意差を示しました。



図3.癌の種類に応じたオリゴヌクレオチドサポート療法 (SOT)を受けている患者の臨床評価 (6%を超えるパーセンテージのみを示しています)。

CTCカウントの減少に関連します。つまり、t0-t1グループの比較ではp.adj値<0.05、t0-t2グループの比較ではp.adj値<0.05、t1-t2グループのp.adj値<0.05です。'比較。

補助療法としてのSOT。補完療法としてのSOTの場合、年齢中央値67歳の22人の患者からのCTCの3回の反復測定が、前述の同じ手順を使用して分析されました。特に、データはシャピロ-ウィルク検定を使用して正規性についてチェックされ、p値>0.05が得られました。したがって、正規性の仮定が検証されました。統計結果を図5 (図4と同様)に示します。ここで、線量の時点はx軸にあり、CTCはy軸にあります。初期測定に対応するt0で

最初のSOT投与の前に、CTCは95%CIで4.15±0.51の平均値を持っていることがわかりました。最初の投与後のCTC測定に対応するt1で、平均値は95%CIで3.65±0.53に等しいことがわかりました。最後に、2回目の投与後のCTCカウントに対応するt2で、平均値は95%CIで3.01±0.43であることがわかりました。見てわかるように、1回目と2回目の投与後のCTCカウントの平均値は大幅に減少しています。実際、一元配置反復測定ANOVAを適用すると、これら3つのグループの平均がすべてp値<0.05で等しくないことが明らかになりました。特に、得られたF統計値は27.101であり、被験者内因子 (ges)による変動量は0.563です。これらの結果を表IIIに示します。

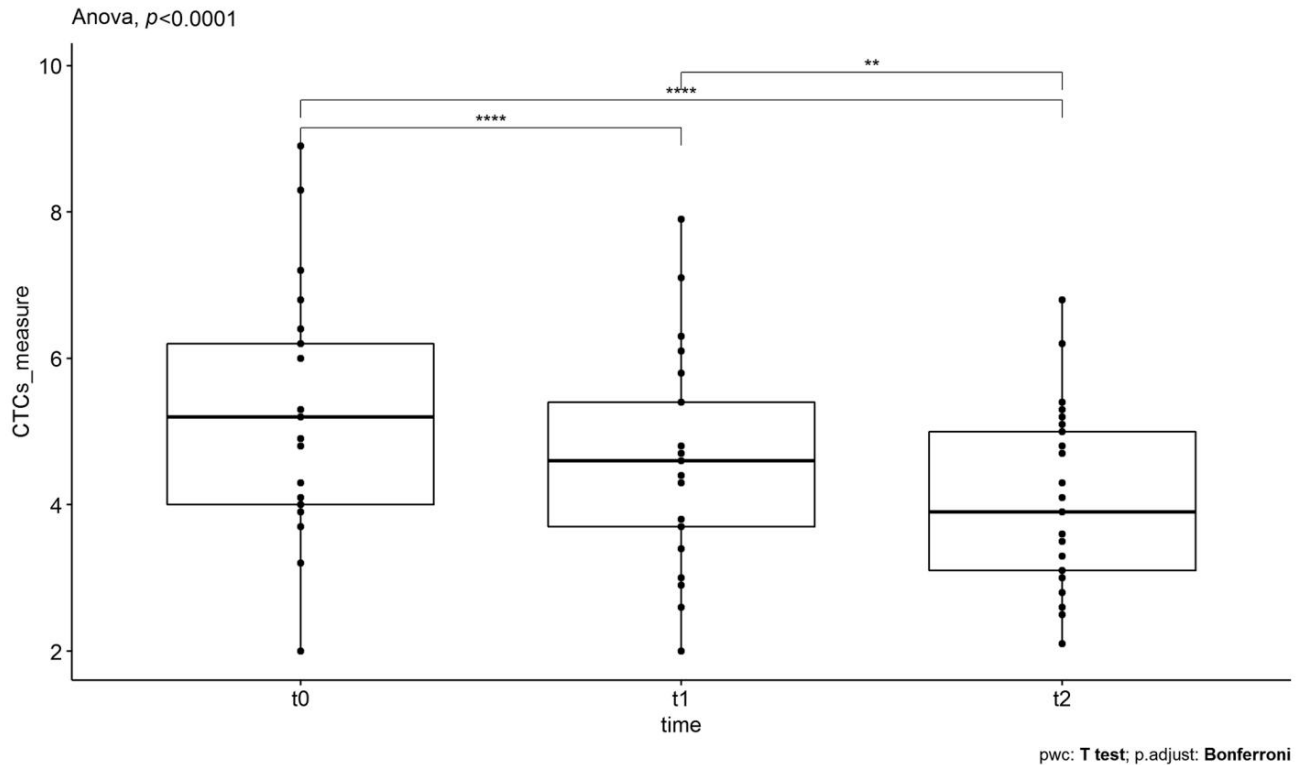


図4.単剤療法としてのオリゴヌクレオチドサポート療法 (SOT)について測定された、循環腫瘍細胞 (CTC)数の箱ひげ図。異なる時点t0 (最初のSOT投与前)、t1 (最初のSOT投与後)、およびt2 (2回目のSOT投与後)。CTCの平均値の減少は、統計的に有意であることがわかりました。

表II.単剤療法としてのオリゴヌクレオチドサポート療法における循環腫瘍細胞の違いに対するANOVAおよびボンフェローニ補正。

ANOVAの要約									
効果	DFn	DFd	F	p値	p < 0.05	ges			
時間	2	48	25.07	3.51e-08	*	0.511			
ボンフェローニ補正									
.y.	グループ1	グループ2	n1	n2	統計	df	p値	p.adj	p.adj.signif
1 CTCs_	t0	t1	25	25	c (t=5.271)c	c (df=24)c	2.09e-05	6.27e-05	****
2つのCTC_	t0	t2	25	25	(t=5.474)c	(df=24)c	1.35e-05	4.05e-05	****
3つのCTC_	t0	t2	25	25	(t=3.794)	(df=24)	0.000885	0.003	**

最後に、平均のどのペアが有意にあるかを見つけるために異なる、多重比較検定が実施され、結果は表IIIにも示されています。特に、表III調整されたp値を示します (ボンフェローニ調整) 複数のペアワイズ比較に対応します。そのまま見ることができます。3つのペアワイズ比較すべてが明らかになりました

CTC数の減少に関連する重要な違い、つまり、t0-t1グループの比較ではp.adj-value < 0.05、t0-t2グループの比較ではp.adj-value < 0.05、t1-t2グループの比較ではp.adj value < 0.05。

全体として、統計的に有意な減少両方の場合の平均CTC値 (単剤療法としてのSOT

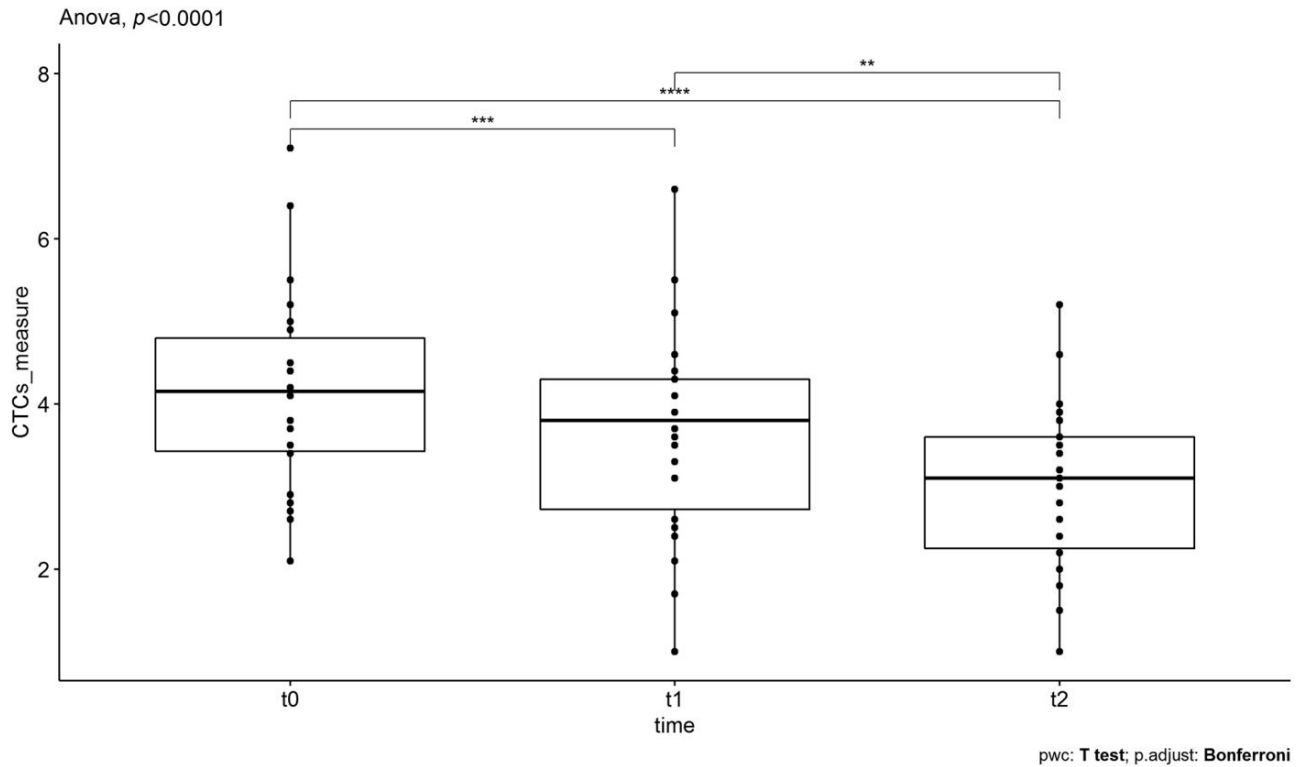


図5.補助療法としてのオリゴヌクレオチドサポート療法 (SOT)について測定された、循環腫瘍細胞 (CTC)数の箱ひげ図。異なる時点t0 (最初のSOT投与前)、t1 (最初のSOT投与後)およびt2 (2回目のSOT投与後)管理)。CTCの平均値の減少は、統計的に有意であることがわかりました。

表III.補助的オリゴヌクレオチド療法 (SOT)における循環腫瘍細胞の違いに対するANOVAおよびボンフェローニ補正治療。

ANOVAの要約									
効果	DFn	DFd	F	p値	p < 0.05	ges			
時間	2	42	27.101	2.76e-08	*	0.563			
ボンフェローニ補正									
.y.	グループ1	グループ2	n1	n2	統計	df	p値	p.adj	p.adj.signif
1 CTCs_	t0	t1	22	22	c (t = 4.456)c	c (df = 21)c	0.000218	0.000654	***
2つのCTC_	t0	t2	22	22	(t = 6.477)c	(df = 21)c	2.03e-06	6.09e-06	****
3つのCTC_	t0	t2	22	22	(t = 3.785)	(df = 21)	0.001	0.003	**

だけでなく、支持的な治療)時間の経過とともに強力です SOT療法が重要な役割を果たしているように見えることの兆候さらなる増加に対する効果的な対策としての役割他に関係なく、循環腫瘍細胞代替治療または介入 (手術または化学療法/放射線療法)。

討論

本研究は、の早期評価を提供することを目的とした単剤療法としての癌患者におけるsiRNAの使用または他の種類の治療法と組み合わせて。これらのsiRNA分子、SOTは、患者のCTCに基づいて設計されました

遺伝子発現プロファイルと標的抗アポトーシスタンパク質。製品は、患者への注射前にin vitroアッセイで検証され、製造中および製造後に品質管理が行われ、病原体のない製品が保証されました。

特に、癌に対してSOT療法を使用したすべての患者の臨床状態評価は77.89%で陽性でしたが、回答の71.58%がKISケールで80を超えていたため、KISケールに基づいて陽性評価も見つかりました。SOTを他の治療法と組み合わせて使用した患者では、69.77%の患者が良好な臨床状態評価を示しましたが、KISケールによると回答の61.36%が80を超えていたため、KISケールに基づいて陽性の評価も見つかりました。SOTを単剤療法として使用した（または別の療法に関する情報が提供されなかった）患者の場合、陽性の臨床状態は84.31%に達しましたが、回答の80.39%はKISケールで80を超えていました。がんの種類に関する限り、臨床状態の評価では、白血病（100%）、前立腺（95.00%）、結腸直腸（88.00%）、および乳がん（81.00%）でより高い反応が観察されたことが明らかになりました。最後に、CTCの統計的に有意な減少が、SOTを排他的治療として受けた25人の患者（調整されたp値<0.05）と、補助療法としてそれを使用したか情報がなかった患者（22）の両方で見られました。別の治療法に関して与えられた（調整されたp値<0.05）。全体として、これらの予備的な結果は、記述統計と推論統計の両方に基づいており、SOTを単剤療法として、または他の療法と組み合わせて患者の状態を改善するために使用できることを示しています。

生細胞の通常のプロセスとは別に、遺伝子サイレンシングは、さまざまな病気に対する科学者にとって有用で強力なツールになり得ます。治療薬としてのsiRNAの使用は、他の分子では不可能な遺伝子を標的にする可能性があるため、非常に有望です。これらの分子は、裸で使用することも、脂質または他の分子（GalNAc）と結合させて使用することもできます。大多数はさまざまな段階で臨床試験中であり、FDAによって承認されているのはごくわずかです（16）。Onpatrolは、FDAが承認した最初のRNA薬であり、遺伝性トランスレチンアミロイドーシスによって誘発される多発神経障害のために設計された脂質ナノ粒子ベースの短鎖干渉RNA薬です（17,18）。

アンチセンスヌクレオチドは、デュシェンヌ型筋ジストロフィーや脊髄性筋萎縮症などの神経筋疾患でも成功裏に使用されており、効果的な治療法はあまり開発されていません（19）。さらに、siRNAはC型肝炎ウイルス（HCV）で使用されており、HCV RNAや他のウイルスの破壊によってその複製をブロックします（20）。

RNAi療法は慢性ヒトウイルス感染症にも使用でき、ナノキャリアの使用は患者の利益を高めます（21）。セレンプロテインKなどの特定のタンパク質をノックダウンすると、ダニの宿主であるIxodes scapularis内のBorrelia burgdorferiが枯渇します。これは、siRNA分子に幅広い治療用途があることを示しています（22）。したがって、特にタンパク質の過剰発現が

腫瘍形成または腫瘍進行に関与します。ほとんどの場合、RNAiは癌遺伝子と抗アポトーシスタンパク質を沈黙させるために癌で使用されます。Bcl2 mRNAの分解による、Bcl2抗アポトーシスタンパク質の標的化は、さまざまな種類の癌の癌治療において非常に一般的です（23）。siRNA分子の修飾により、ヌクレアーゼに対する保護が強化され、薬物動態特性が向上するため、これらの分子を臨床現場で使用できます（4）。最も一般的な修飾は、リボース骨格の2'位置（2'-O-メチル、2'-O-メトキシエチル、2'-デオキシ-2'-フルオロウリジン）、またはsiRNAのリン酸結合の変化です（24）。siRNA分子は四半期ごとに投与することができ、患者に問題を起こすことなく治療効果を高めることができます。これは、低分子量の分子や抗体では実現できないことです（25）。

この研究で検討されたサンプルの数が少ないにもかかわらず、癌でのSOTの使用が患者にとって非常に有益である可能性があることを示しました。siRNA分子は安全でターゲティングに特異的であるため、他の薬剤では使用できない場合に使用できます。臨床ルーチンで使用するためにさらに多くのサンプルをテストする必要がありますが、癌のSOT療法に関するこれらの予備的な統計結果は有望です。

## 利害の対立

著者は、この作業に関して利害の衝突はないと報告しています。

## 著者の貢献

IPが調査を監督しました。GBはデータの分析を行い、原稿を起草しました。Allはデータの分析を行い、原稿を作成しました。

PAは分子生物学アッセイを実施し、原稿を作成しました。

## 参考文献

- キムDとロッシJ :RNAiメカニズムとアプリケーション。 *Biotechniques* 44 (5) : 613-616,2008。PMID :18474035,DOI :10.2144/000112792
- WilsonRCおよびDoudnaJA :RNA干渉の分子メカニズム。 *Annu Rev Biophys* 42 : 217-239,2013。PMID :23654304,DOI :10.1146/annurev-biophys-083012-130404
- Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK :RNA干渉 :生物学、メカニズム、およびアプリケーション。 *Microbiol Mol Biol Rev* 67 (4) : 657-685,2003。 PMID :14665679,DOI :10.1128/MMBR.67.4.657-685.2003
- Corey DR :化学修飾 :RNA干渉の臨床応用の鍵？ *J Clin Invest* 117 (12) : 3615-3622, 2007。PMID :18060019,DOI :10.1172/JCI33483 5 LivakKJおよびSchmittgenTD :リアルタイム定量PCRおよび2<sup>-</sup>(Delta Delta C (T))メソッド。 *Meth* 25 (4) : 402-408,2001。 PMID :11846609,DOI :10.1006/meth.2001.1262
- Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall WS, Khvorova A :RNA干渉のための合理的なsiRNA設計。 *Nat Biotechnol* 22 (3) : 326-330,2004。PMID :14758366, DOI :10.1038/nbt936



- 7 西野M, Jagannathan JP, Krajewski KM, O'Regan K, Hatabu H, Shapiro G, Ramaiya NH : 分子医学の時代における個別化された腫瘍反応評価 : RECISTの落とし穴を補完するための癌特異的および治療特異的反応基準。 *AJR Am J Roentgenol* 198 (4) : 737-745, 2012. PMID : 22451534, DOI : 10.2214 / AJR.11.7483
- 8 Timmermann C : 「最高の生活の質に関する質問票をください」 : カルノフスキー尺度と癌試験における生活の質の測定の歴史。 *Chronic Illn* 9 (3) : 179-190, 2013. PMID : 23239756, DOI : 10.1177 / 1742395312466903 9 Schober P and Vetter TR : 反復測定的设计と縦断データの分析 : 最初は成功しない場合は、再試行してください。 *Anaesth Analg* 127 (2) : 569-575, 2018. PMID : 29905618, DOI : 10.1213 / ANE.0000000000003511
- 10 Mishra P, Singh U, Pandey CM, Mishra P, および Pandey G : スチューデントのt検定の適用、分散分析、および共分散。 *Ann Card Anaesth* 22 (4) : 407-411, 2019. PMID : 31621677, DOI : 10.4103 / aca.ACA\_94\_19
- 11 Shapiro SS および Wilk MB : 正規性の分散分析 (完全なサンプル)。 *Biometrika* 52 : 591-611, 1965. DOI : 10.1093 / biomet / 52.3-4.591
- 12 Rコアチーム : R 統計計算のための言語と環境。 R Foundation for Statistics Computing, ウィーン, オーストリア。 <https://www.R-project.org/> で入手可能 [最終アクセス日は2021年11月1日]
- 13 Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, D'Agostino McGowan L, François R, Grolemund G, Hayes A, Henry L, Hester J, Kuhn M, Lin Pedersen T, Miller E, Bache SM, Müller K, Ooms J, Robinson D, Seidel DP, Spinu V, Takahashi K, Vaughan D, Wilke C, Woo K, Yutani H : tidyverseへようこそ。 *J Open Source Softw* 4 (43) : 1686, 2019. DOI : 10.21105 / joss.01686 14 Kassambara A : ggpubr : 'ggplot2' ベースのパブリケーションレディプロット。  
  
Rパッケージバージョン0.4.0。 <https://cran.r-project.org/web/packages/ggpubr/index.html> [最終アクセス日 : 2020年6月27日] 15 Kassambara A : rstatix : 基本的な統計的検定のためのパイプフレンドリーなフレームワーク。 Rパッケージバージョン0.7.0。 <https://CRAN.R-project.org/package=rstatix> で入手可能 [最終アクセス日は2021年12月20日]
- 16 Nikam RR と Gore KR : siRNAの旅 : 臨床開発と標的化送達。 *Nucleic Acid Ther* 28 (4) : 209-224, 2018. PMID : 29584585, DOI : 10.1089 / nat.2017.0715 17 Akinc A, Maier MA, Manoharan M, Fitzgerald K, Jayaraman M, Barros S, Ansell S, Du X, Hope MJ, Madden TD, Mui BL, Semple SC, Tam YK, Ciufolini M, Witzigmann D, Kulkarni JA, van der Meel R, Cullis PR : オンパトロジーと核酸ベースの薬剤を含むナノ医薬品の臨床翻訳。 *Nat Nanotechnol* 14 (12) : 1084-1087, 2019. PMID : 31802031, DOI : 10.1038 / s41565-019-0591-y
- 18 Weng Y, Xiao H, Zhang J, Liang XJ, Huang Y : RNAi治療とその革新的なバイオテクノロジーの進化。 *Biotechnol Adv* 37 (5) : 801-825, 2019. PMID : 31034960, DOI : 10.1016 / j.biotechadv.2019.04.012
- 19 Sardone V, Zhou H, Muntoni F, Ferlini A, Falzarano MS : 神経筋疾患に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドベースの治療。 *分子22 (4) : 563, 2017. PMID : 28379182, DOI : 10.3390 / molecules22040563*
- 20 Kelleher AD, Cortez-Jugo C, Cavalieri F, Qu Y, Glanville AR, Caruso F, Symonds G, Ahlenstiel CL : RNAi治療法 : ヒト感染症に対する抗ウイルス戦略。 *Curr Opin Pharmacol* 54 : 121-129, 2020. PMID : 33171339, DOI : 10.1016 / j.coph.2020.09.011 21 Smolic R, Volarevic M, Wu CH, Wu GY : C型肝炎ウイルス治療におけるsiRNAの応用の可能性。 *Curr Opin Investig Drugs* 7 (2) : 142-146, 2006. PMID : 16499284。
- 22 Kumar D, Embers M, Mather TN, Karim S : ダニベクターIxodes scapularis内のボレリアブルグドルフェリ感染にはセレノプロテインKが必要ですか? *Parasit Vectors* 12 (1) : 289, 2019. PMID : 31174589, DOI : 10.1186 / s13071-019-3548-y 23 Zhang YX, Kong CZ, Wang LH, Li JY, Liu XK, Xu B, Xu CL, Sun YH : ウルソール酸はBcl-2を介した耐性を克服します JNKの活性化を伴う前立腺癌細胞のアポトーシスは、Bcl-2のリン酸化と分解を誘導しました。 *J Cell Biochem* 109 (4) : 764-773, 2010. PMID : 20052671, DOI : 10.1002 / jcb. 22455
- 24 Lee SJ, Kim MJ, Kwon IC, Roberts TM : 主要ながんの種類におけるsiRNAの送達戦略と潜在的な標的。 *Adv Drug Deliv Rev* 104 : 2-15, 2016. PMID : 27259398, DOI : 10.1016 / j.addr.2016.05.010 25 Hu B, Zhong L, Weng Y, Peng L, Huang Y, Zhao Y, Liang XJ : Therapeutic siRNA : 最先端。 *Signal Transduct Target Ther* 5 (1) : 101, 2020. PMID : 32561705, DOI : 10.1038 / s41392-020-0207-x

2021年12月1日受領  
2021年12月22日改訂  
2021年12月23日受理