

2007年3月 修了

先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野

芹沢 由里子

学生証番号：56528

『卵巣がんにおける核酸治療法の開発研究』

keywords : Gene Delivery System、卵巣がん、腹膜播種、siRNA

指導教員：松村保広

指導教員役職：助教授

卵巣がんにおける核酸治療法の開発研究

学生証番号 56528

がん先端生命科学分野

芹沢 由里子

指導教官 松村保広

【序論】

近年の遺伝子治療臨床研究衰退傾向の主たる要因は、全身投与で有効な遺伝子デリバリーを達成するには多くの障壁があることによる。したがって、現時点においては遺伝子の局所投与に活路を見出すべきであると考えた。そこで、局所投与でのがん制御が延命に寄与する可能性のあるがん腫として、卵巣がんを選択した。卵巣がんは日本でも増加傾向にあり、多くが無症状のうちに進行していくため、60%以上が進行がんで発見され、婦人科がんの中で最も予後の悪いがんである。また、ほとんどの進行がんは腹膜播種による腹水を伴うため、手術による根治が困難なことが知られている。しかし、卵巣がんは腹腔内で長く留まる特徴を有するため、腹腔内という局所のがん制御が延命に寄与する可能性を持つ。事実、stageⅢの卵巣がん（腹膜播種を伴うが遠隔転移がないがん）において、薬剤の腹腔内投与の方が、静脈投与よりも延命効果があるという臨床試験の結果も示されている。

そこで、腹腔内に核酸投与を行うことにより、がん増殖を制御することを目的とし、修士論文研究を行った。本研究では、ヒトの卵巣がん腹膜播種状態を再現し、かつ腫瘍状態を可視化するモデルマウスの作製を行い、効率の良い遺伝子及び核酸導入法の検討を行った。さらに、がん細胞で発現している遺伝子の発現を抑制することによる、腫瘍増殖抑制効果及び殺細胞効果の有無の検討を行った。

【結果】

1. 卵巣がん腹膜播種モデルマウスの作製

卵巣がん腹膜播種モデルの作製では、卵巣がん細胞株の選定から実験を開始した。通常の *in vitro* 実験で用いている Caov-3、OV-90、OVCAR-3、ES-2、SKOV-3 の 5 種類の細胞株を 6～8 週齢のメスの BALB-nu/nu nude マウスの腹腔内にそれぞれ移植し、腹水の蓄積や腫瘍の定着を観察した。その結果、ES-2 細胞株を注射した nude マウスのみ腹囲、体重ともに急激な増加が見られ、

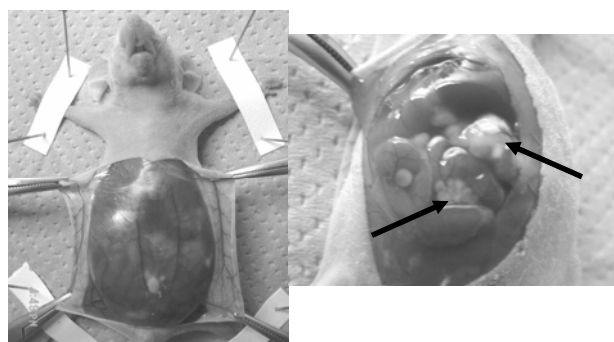


Fig. 1 卵巣がん腹膜播種モデルマウス
(左の図では、腹腔内に血性腹水が充満している。
右の図の矢印の先が腹腔内の腫瘍)

腹腔内を観察してみると、血性腹水が充満しており、粒状の腫瘍が腹腔内全体に広がり、その一部は腹水内に漂って、正にヒト卵巣がん腹膜播種の状態を呈

していた (Fig. 1)。また、特に腸間膜、横隔膜には大量の腫瘍が付着していた。それ以外の細胞株を注射したマウスでは1ヶ月経過した後も大きな体重の増加は見られず、腹腔内の腫瘍が消えていたり、非常に小さい固形腫瘍が着いているだけであったりしたため、ES-2 細胞株を用いたヒト卵巣がん腹膜

播種モデルがもっとも適切であると判断した。

さらに細胞株に Luciferase ベクター導入したものを腹腔内に注射し、Photon Counting 装置を用いることによって、腹膜播種の状態や腫瘍量を定量化するイメージング法の開発も行った。

2. 核酸導入法の検討および導入条件の確立

核酸導入法の検討では、第一製薬株式会社から提供された成分の異なる3種類のリポソームを用いて、Luciferase 発現ベクター導入細胞への Luciferase siRNA の導入実験を行い、最も導入効率が良く、そして毒性の少なかったものを選定した。その後、そのリポソームにおいて、異なる粒子径ものを数種合成してもらい、*in vitro* で導入を行い、最適な粒子径を決定した。

さらに、*in vivo* において腹腔内の腫瘍への Liposome を用いた核酸導入を行い、Liposome の最適粒子径および、Liposome と核酸との最適比率の決定を行い、毒性がなくかつ導入効率のよい条件を見出した (Fig. 2)。本実験では、imaging 装置で遺伝子発現抑制を判断するだけでなく、腹腔内の細胞を免疫染色することによって、発現量の減少は細胞死によるものではなく、腹腔内の腫瘍細胞の遺伝子発現抑制に起因するものであることの確認を行った。

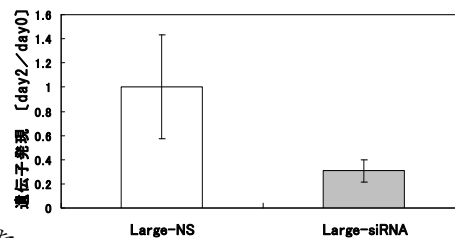


Fig. 2 腹腔内遺伝子発現抑制 (NS=Non Specific siRNA, siRNA=Luciferase siRNA, n=6, p=0.0032)

3. 遺伝子発現抑制による殺細胞効果及び抗腫瘍効果の検討

卵巣がん細胞で過剰発現しているとされる遺伝子を標的とし、*in vitro* において siRNA の導入実験を行った。その結果、KNTC-2 siRNA を導入した細胞において、強い殺細胞効果が観察された (Fig. 3) ため、KNTC-2 siRNA を用いて卵巣がん腹膜播種モデルマウスの腹腔内への治療実験を行ったところ、抗腫瘍効果が示唆された。

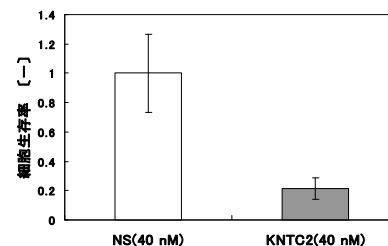


Fig. 3 KNTC2 siRNA の殺細胞効果

【考察及び結論】

本研究で作製された卵巣がん細胞株 ES-2 を用いた腹膜播種モデルマウスは、siRNA 導入治療実験はもちろんのこと、様々な治療実験に用いることが可能である。また、腫瘍を可視化させたことにより、腫瘍状態の確認および経時変化を追い続けることが可能となった。

また、腹腔内への核酸導入では当初、*in vitro* の条件をそのまま *in vivo* に適用したが、腹腔内では Cation 性の Liposome の毒性が強くなってしまい、導入条件の再検討を行う必要があった。Anion 性の腹腔内では、Liposome の量が多すぎて Cation 性が強くなってしまい、腹腔内の細胞に Liposome が付着し毒性を示したのではないかと考え、siRNA の量を増やし、Complex の Charge を変化させた (siRNA : Liposome = 1 : 50 (モル比))。その結果、siRNA と cationic Liposome との Complex は毒性もなく導入でき、遺伝子発現を抑制することが確認された。

KNTC2 siRNA は、本研究において殺細胞効果及び抗腫瘍効果を示したが、今後より最適な条件の検討を行っていくことにより、さらに治療効果が高まっていくのではないかと考える。

There are several obstacles in the effective gene delivery to cancer tissues and the clinical trial of gene therapy is now on decline.

We, therefore, think that local administration of a gene may be more useful than the systemic one. A local therapy is, however, limited to a particular cancer or a particular stage of the cancer in terms of its usefulness.

Recent clinical trial revealed that the intraperitoneal administration of anti cancer agents was more effective than the systemic administration for patients with stage III ovarian cancer (*New England Journal of Medicine*, 2006).

The aim of our study is to develop a new intraperitoneal administration way of siRNA. First, we developed experimental mice model corresponding to a human stage III ovarian cancer. And then, we studied an effective way of peritoneal administration of siRNA, using various cationic liposomes *in vitro* and *in vivo*.