

# 卵巣がんにおける核酸治療法の開発研究

東京大学大学院 新領域創成科学研究科  
先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野  
学生証番号 56528

芹沢 由里子

第 1 章	修士論文要旨 .....	6
第 2 章	緒言 .....	10
2.1.	がんとは .....	12
2.2.	卵巣がんについて .....	14
2.2.1.	卵巣がんのStage (病期) .....	18
2.2.2.	卵巣がんの組織型 .....	19
2.3.	がんの遺伝子治療の現状 .....	22
2.3.1.	核酸治療について .....	23
2.3.2.	RecQについて .....	24
2.3.3.	上皮成長因子受容体 (EGFR) について .....	26
2.3.4.	KNTC2 (HEC、HEC1) について .....	27
第 3 章	既往研究 .....	29
3.1.	既往研究とその問題点 .....	30
第 4 章	目的・理論 .....	31
4.1.	本研究の目的と理論 .....	32
第 5 章	実験方法 .....	33
5.1.	細胞培養 .....	34
5.1.1.	培養細胞について .....	34
5.1.2.	細胞培養法 .....	35
5.2.	卵巣がん細胞へのLuciferase遺伝子導入 .....	36
5.2.1.	D-Luciferin - Luciferase反応について .....	36
5.2.2.	Luciferase Vectorの導入 .....	37
5.3.	卵巣がん腹膜播種モデルマウスの作製 .....	40
5.4.	腹腔内の腫瘍可視化法 ( <i>in vivo</i> 分子イメージング) .....	41

5.5.	LiposomeによるsiRNAの導入 ( <i>in vitro</i> ) .....	42
5.6.	LiposomeによるsiRNAの導入 ( <i>in vivo</i> ) .....	44
5.6.1.	siRNA導入による腹腔内治療実験 .....	44
5.7.	siRNA及びPrimerの配列情報 .....	45
5.8.	<i>in vivo</i> における細胞回収法.....	47
5.9.	<i>in vitro</i> 薬剤処理方法 .....	48
5.9.1.	薬剤による殺細胞効果の検討.....	48
5.9.2.	siRNAと薬剤の併用による殺細胞効果の検討 .....	48
5.10.	殺細胞効果測定.....	49
5.10.1.	MTT assayについて.....	49
5.10.2.	WST-8 法について.....	51
5.11.	RNAの抽出と逆転写.....	53
5.12.	遺伝子発現解析.....	55
5.12.1.	RT-PCRによる遺伝子発現解析 .....	55
5.12.2.	Real Time PCRによる遺伝子発現解析 .....	55
5.12.3.	Western Blot法による遺伝子発現解析 .....	56
5.12.4.	免疫組織化学法による遺伝子発現解析 .....	58
第6章	結果 .....	60
6.1.	卵巣がん腹膜播種モデルマウスの作製 .....	61
6.1.1.	モデル化最適細胞株の選定 .....	61
6.1.2.	腹腔内腫瘍の可視化 .....	65
6.1.3.	腹腔内腫瘍の定量.....	66
6.2.	<i>in vitro</i> における核酸導入法の検討 .....	69
6.2.1.	比較対照Liposomeの選定.....	69
6.2.2.	最適Liposomeの決定.....	71

6.2.3.	LiposomeとsiRNAの最適混合比率.....	73
6.2.4.	Liposomeの最適粒子径.....	76
6.3.	腹腔内卵巣がん細胞への核酸導入法の検討.....	78
6.3.1.	Liposome量の決定.....	78
6.3.2.	Liposome粒子径の検討.....	79
6.3.3.	個体数を増やした検討.....	81
6.3.4.	ComplexのChargeを変化させた検討.....	82
6.3.5.	核酸導入確認（免疫染色）.....	85
6.4.	RecQによる殺細胞効果の検証.....	87
6.4.1.	各卵巣がん細胞株のRecQ1 発現確認.....	87
6.4.2.	RecQ1 siRNAによる遺伝子発現抑制.....	88
6.4.3.	RecQ1 発現抑制による殺細胞効果.....	89
6.4.4.	各卵巣がん細胞株に対する抗がん剤の効果.....	92
6.4.5.	RecQ1 siRNA導入と抗がん剤との併用効果.....	95
6.4.6.	RecQ Family siRNAによる殺細胞効果.....	98
6.5.	EGFRによる殺細胞効果の検証.....	99
6.5.1.	ES-2 細胞株のEGFR発現確認.....	99
6.5.2.	EGFR遺伝子発現抑制による殺細胞効果の検討.....	100
6.6.	KNTC2 による殺細胞効果の検証.....	101
6.6.1.	KNTC2 発現確認及び遺伝子発現抑制.....	101
6.6.2.	KNTC2 遺伝子発現抑制による殺細胞効果の検討.....	102
6.6.3.	KNTC2 遺伝子発現抑制による腹腔内抗腫瘍効果の検討.....	103
第7章	考察.....	104
7.1.	卵巣がん腹膜播種モデルマウスの作製.....	105
7.2.	<i>in vitro</i> におけるLiposomeを用いた核酸導入法の検討.....	106
7.3.	腹腔内の卵巣がん細胞への核酸導入法の検討.....	107

7.4. siRNAを用いた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	108
第 8 章	結論と今後の展望	109
8.1.	本研究の結論	110
8.2.	今後の展望	111
第 9 章	参考文献	112
参考		119
謝辞		120

# 第 1 章

# 修士論文要旨

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 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 ovarian cancer. And then, we studied an effective way of peritoneal administration of siRNA, using various cationic liposomes *in vitro* and *in vivo*.

近年の遺伝子治療臨床研究縮小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、局所投与での癌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、stage 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<sup>[1]</sup>。

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った後、効率の良い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。

腹膜播種モデルマウスの作製においては、卵巣がん細胞を BALB-nu/nu ノードマウスの腹腔内に注射することによって、人工的に腹膜播種と同じ状態を作り出した。またその際、複数の細胞株を用い、最もヒト卵巣がんの腹膜播種状態に近いものを選定した。さらに細胞株に Luciferase 発現ベクターを導入し、その強制発現細胞株を腹腔内に注射し、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。

そして、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 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、異なる粒子径の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、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つけ出した。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。

また、siRNA を用いた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では、卵巣がん細胞で過剰発現している EGFR や KNTC2 等を標的とし、*in vitro* において siRNA の導入実験を行った。その中で、KNTC2 siRNA を導入した実験において、強い殺細胞効果が観察されたため、KNTC2 siRNA を用いて卵巣がん腹膜播種モデルマウスの治療実験を行ったところ、抗腫瘍効果が示唆された。

今後、本研究で新たに開発した導入法を用いて、がん細胞特異的遺伝子の発現を抑制することにより、副作用のない画期的ながん治療法となり得るのではないかと期待する。

## 第 2 章

## 緒言

全ての生物は病を患う可能性を有しており、様々な治療法は病の症状および不安の緩和、そして病そのものの根治を目的に開発されてきた。

第2次世界大戦頃まで、日本における死亡原因の主なものは、結核と肺炎であった。戦後、抗生物質の開発と急速な社会環境（栄養と衛生状態）の改善によって、これらの疾患が急激に減少し、それに取って代わったのは脳血管疾患であったが、これも食塩摂取量の抑制と、血圧降下剤の使用などにより、著しく減少し始めた。このような状況下で常に増加を続けてきたがんは、1981年（昭和56年）に死亡原因第一位となった。実際平成17年の死亡数を死因順位別に見ると、第1位は悪性新生物（がん）で32万5885人、死亡率（人口10万対）258.2、第2位は心疾患（心臓病）17万3026人、死亡率137.1、第3位は脳血管疾患（脳卒中）13万2799人、死亡率105.2となっている（Table 2-1）。

Table 2-1 性別にみた死因順位別死亡数・死亡率(人口10万対)

死 因	平成17年						平成16年	
	総 数		男		女		総 数	
	死亡数	死亡率	死亡数	死亡率	死亡数	死亡率	死亡数	死亡率
全 死 因	1 084 012	858.9	585 118	949.6	498 894	772.4	1 028 602	815.2
悪 性 新 生 物 (1)	325 885	258.2	(1) 196 577	319.0	(1) 129 308	200.2	(1) 320 358	253.9
心 疾 患 (2)	173 026	137.1	(2) 83 911	136.2	(2) 89 115	138.0	(2) 159 625	126.5
脳 血 管 疾 患 (3)	132 799	105.2	(3) 63 637	103.3	(3) 69 162	107.1	(3) 129 055	102.3
肺 炎 (4)	107 210	84.9	(4) 57 289	93.0	(4) 49 921	77.3	(4) 95 534	75.7
不 慮 の 事 故 (5)	39 787	31.5	(5) 24 571	39.9	(6) 15 216	23.6	(5) 38 193	30.3
自 殺 (6)	30 539	24.2	(6) 22 230	36.1	(8) 8 309	12.9	(6) 30 247	24.0
老 衰 (7)	26 336	20.9	(11) 6 676	10.8	(5) 19 660	30.4	(7) 24 126	19.1
腎 不 全 (8)	20 510	16.3	(9) 9 447	15.3	(7) 11 063	17.1	(8) 19 117	15.2
肝 疾 患 (9)	16 409	13.0	(8) 10 990	17.8	(10) 5 419	8.4	(9) 15 885	12.6
慢性閉塞性肺疾患 (10)	14 415	11.4	(7) 11 018	17.9	(15) 3 397	5.3	(10) 13 444	10.7

注: 1) ( )内の数字は死因順位を示す。

2) 男の10位は「糖尿病」で死亡数は7 121、死亡率は11.6である。

3) 女の9位は「糖尿病」で死亡数は6 481、死亡率は10.0である。

4) 「結核」は死亡数が2 295、死亡率は1.8で第25位となっている。

（厚生労働省 平成17年 人口動態統計月報年計より）

この統計を見ると、平成17年の全死亡者中でのがん死亡者が占める割合は30.1%となっており、全死亡者のおよそ3人に1人はがんで死亡したことになる。

近年、がんの罹患率が増加の一途を辿っている背景には、人類の高齢化や様々な化学物質等の影響があると考えられているが、明確な原因はわかっておらず、その治療法の多くは未だ確立されていない。そのため、がん = 不治の病という意識から脱却するには、まだまだ長い時間がかかると考えられる。1981年以降死因の一位であるがんの死亡者数は年々増加し続けている。

## 2.1. がんとは

がんとは生体に出来る悪性腫瘍のことであり、何らかの原因で臓器の体細胞が無制限に増殖するようになり、周囲の組織を侵し、他へも転移して障害をもたらす、最終的に生命を奪うまでに増殖する病気である。

基本的に全ての臓器・組織にがん（悪性腫瘍）は発生する。がんは造血器由来のもの、上皮細胞からなるがん（癌腫とも呼び、英語では cancer・carcinoma）と非上皮性細胞（間質細胞からなる肉腫（英語では sarcoma））に大きく分類されるが、稀に一つの腫瘍の中で両者が混在する『癌肉腫』というものが発生する。発生頻度は、肉腫に比べ癌腫のほうが圧倒的に多数である。造血器由来のものには、白血病、悪性リンパ腫、骨髄腫などがある。また、上皮細胞由来の代表的なものには、肺がん、乳がん、胃がん、大腸がん、子宮がん、卵巣がん、頭頸部のがん（咽頭がん、舌がん等）などがある。一方、肉腫の代表的なものは、骨肉種、軟骨肉腫、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、線維肉腫、脂肪肉腫、血管肉腫などが挙げられ、発生した組織名が関されている。造血腫瘍を除くとそのほとんどは塊を作って増殖するので、固形腫瘍と一括して呼ばれることもある。がんのがんたる特徴として、自律性増殖、浸潤と転移、悪液質の3つが挙げられる。自律性増殖とは、正常な新陳代謝を逸脱し、自律的に勝手に増殖し続けるということである。また、悪液質とは、正常組織が摂取すべき栄養をどんどんがん細胞が奪い取ったり、がん細胞が産出する種々の因子により不都合な症状をもたらしたりすることにより、体が衰弱していくことである。

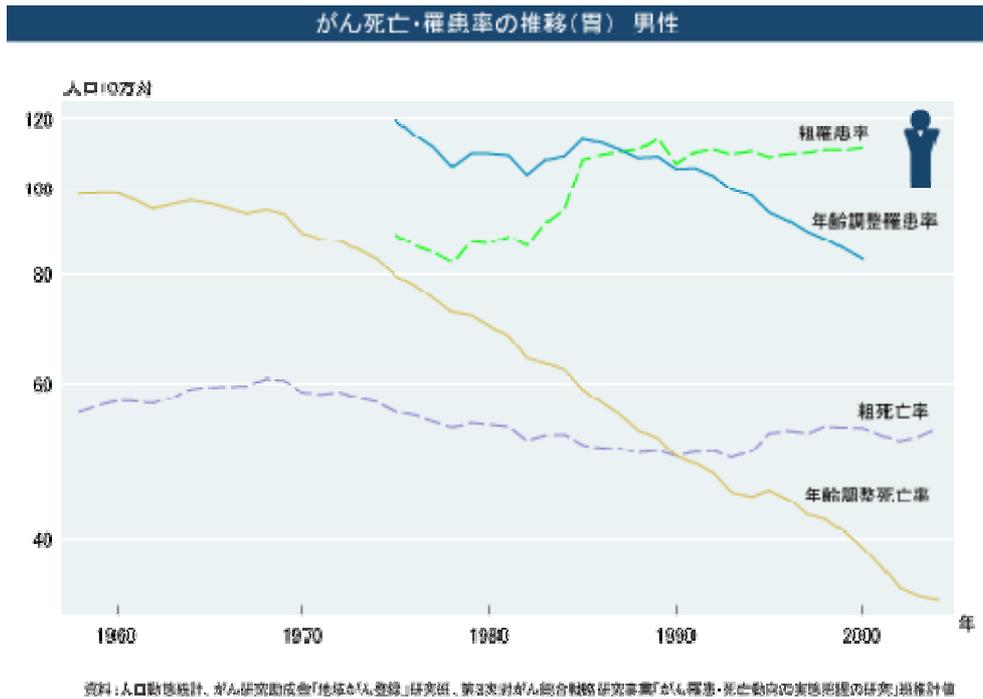
良性腫瘍でも、自律性増殖は起こるが、浸潤、転移、悪液質を起こすことはなく、増殖のスピードも悪性腫瘍よりも遅く、外科的に手術すれば再発することはない。しかしがん細胞の場合、原発部位を切除しても転移したり浸潤していたりするため、全

での癌細胞を取りきることは困難であり、肉眼的には全てのがん細胞を取りきったように見えても、目に見えないところに残っているがん細胞が再び増殖し、深刻な症状をもたらすことも多い<sup>[2]</sup>。

正常細胞ががん化するには、複数かつ特異的な遺伝子異常が生じる必要がある。がん遺伝子の活性化とがん抑制遺伝子の不活性化が繰り返され、複数の遺伝子異常が蓄積する多段階過程を通して、がんが発症、進展するのである。しかし、そのメカニズムはまだ大部分が未知である。通常の細胞のように寿命というものがなくなり、無制限の増殖を繰り返すが、遺伝子のほとんどは元の細胞のものと変わらないため、薬剤だけでがん細胞だけを殺すのは非常に難しく、がん細胞とともに正常細胞にまで影響を与えてしまうため、患者は重篤な副作用に苦しむことになる。

## 2.2. 卵巣がんについて

部位別がん死亡率の推移を見てみると、長年にわたって死亡率トップであった胃がんによる死亡率は減少しており（Fig. 2-1、2-2）、食生活の変化、診断能の向上による早期発見率の上昇などが原因と考えられる。



**Fig.2-1 胃がんの死亡率・罹患率の推移 (男性)**  
 (国立がんセンター がん情報サービスホームページより)

がん死亡・罹患率の推移(胃) 女性

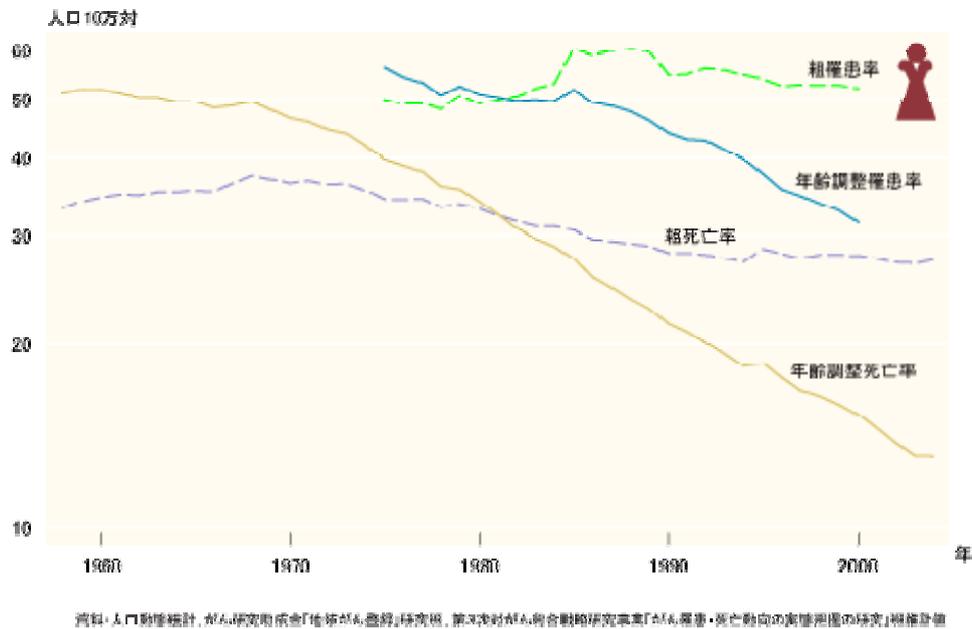


Fig.2-2 胃がんの死亡率・罹患率の推移(女性)  
 (国立がんセンター がん情報サービスホームページより)

それに対し、結腸、膵臓、前立腺、乳房、卵巣、肺などのがんによる死亡率は増加傾向にある。特に、婦人科がんである卵巣がんの死亡率は 1960 年と比較すると 3 倍以上に増加している。比較的抗がん剤が奏功するがん種であるが、更なる治療法の開発が求められる (Fig. 2-3)。

がん死亡・罹患率の推移(卵巣) 女性

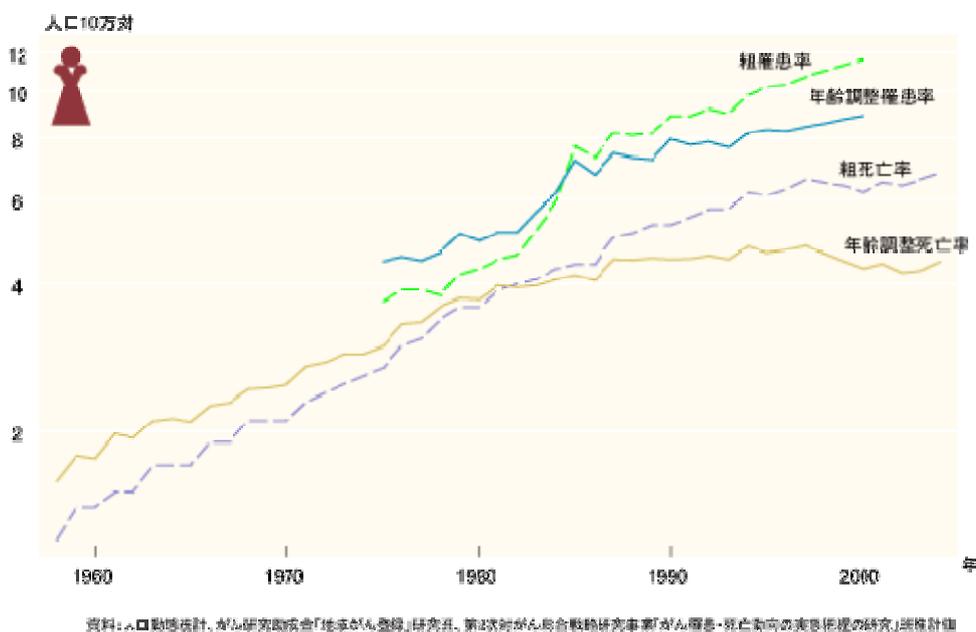


Fig.2-3 卵巣がんの死亡率・罹患率の推移(女性)

(国立がんセンター がん情報サービスホームページより)

卵巣は『沈黙の臓器』といわれ、がんによる症状が出た時にはすでにかかなり進行してしまっている場合が多い。にもかかわらず、腫瘍が発生する頻度は、女性の全生涯で見ると5～7%とされ、精巣に比べてはるかに高い<sup>[3]</sup>。

卵巣がんは解剖学的にも早期発見は困難であり、また病巣が腹腔内漿膜側に存在するため、腹腔内に広く進展しやすく、進行が非常に早い場合も多いため、進行がんとして発見されることが多い。米国では、女性の70人に1人が卵巣がん罹患し、先進国で多く、発展途上国では少ない特徴を有している。先進国の中でも日本は例外で、非常に卵巣癌の罹患率が低かった。しかし、年々罹患率の上昇が見られ、戦後60年間で粗死亡率は8倍以上となった。これは、横ばい傾向が見られる欧米とは対照的である<sup>[4]</sup>卵巣がん罹患率の増加の背景には、食生活の欧米化、少子化による妊娠回数の減少などがあると考えられているが、はっきりした原因はいまだ明らかになっていない。

卵巣がんは乳がんなどとともに、比較的抗がん剤が効きやすいがんとして知られて

いる。初期の卵巣がん、つまり転移を伴わない状態においては、手術療法や化学療法が非常に有効な治療手段となり得る。しかしながら、先述したように卵巣がんは無症状のうちに進行していくことが多く、初期は全く自覚症状がないため、早期発見は困難であり、60%以上が進行がん（Stage Ⅲ以上）の状態で見つかり、婦人科がんの中で最も予後の悪いがんとして知られている。卵巣がんによく起こる転移は『腹膜播種』であり、卵巣の表面からちょうど種を播くようにがん細胞が腹膜に広がっていく。腹膜播種は卵巣の周りに起こりやすいが、横隔膜など卵巣から最も遠く離れた腹膜にもよく見られる。腹膜播種が進行すると腹水が溜まり、腹部膨満などの転移による症状で、初めて異常を自覚することが少なくない。ほとんどの進行がんはこの腹膜播種タイプであり、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。そのため、腹膜播種タイプの卵巣がんでは、がんの腹腔内での進展が直接の死因となる場合が多い。しかし、腹腔に転移した卵巣がんが、さらに別の部位に転移することは少なく、腹腔内で長く留まる特徴を有する。よって、局所のがん制御が延命に寄与する可能性が指摘され、最近の臨床試験でも腹腔内のがんを抗がん剤によって局所制御することにより、延命効果が得られることが示されている<sup>[第1章[1]]</sup>。

年齢別に見た卵巣癌の罹患率は、40歳代から増加し、50歳代前半でピークを迎えて横ばいになり、80歳以上でまた増加する。

### 2.2.1. 卵巣がんの Stage (病期)

卵巣がんのStageはがんの広がりにより、大きく4段階に分類されている<sup>[2]</sup>。腹膜播種のような転移を術前に画像診断で見つけることは困難であるためStageは手術所見によって決定する。手術中直接見ることが出来る転移の有無だけでなく、手術後摘出物を検査した結果により、Stageの決定がなされる (Table 2-2)。

Table 2-2 卵巣がんの Stage (病期)

Stage	
	がんが片側、あるいは両側の卵巣内に限局しているもの。
	がんが骨盤内 (卵管、子宮、直腸、膀胱など) 進展を伴うもの。
	骨盤腔を超えた (上腹部への) 腹膜播種を伴うか、あるいは後腹膜 (腹腔の背側にある腹膜と背骨や背筋との間の領域で、大動脈、下大動脈、腎臓、尿管などのある場所のこと。) リンパ節または鼠径リンパ節に転移しているもの。
	がんが腹腔外の遠隔転移を伴うもの。または、肝臓に転移しているもの。

Stage I、II では手術によって完全に切除が可能だが、Stage III、IV では手術だけでは完全に取り除くことが出来ないという意味で、進行がんといわれる。

### 2.2.2. 卵巣がんの組織型

卵巣がんの90%は上皮性のがんであり、さらにその中でも5つの細胞型に分類される。5つの分類について以下に記す<sup>[5]</sup>。

漿液性腺がん：全卵巣がんの50%を占め、原発性腫瘍径のわりに進行が進んでおり、3分の2以上がStage I、IIで発見される。リンパ節転移の頻度も高く、卵巣がんの中では最も進行が早いがんである。化学療法で、90%以上の患者において奏功がみられる。

粘液性腺がん：全卵巣がんの10~15%を占め、進行が最も遅いがん。Cisplatinの感受性がなく、予後は手術の根治性に依存する。3分の2はStage I、IIで、手術において完全摘出できる症例が多く見られる。

類内膜腺がん：全卵巣がんの5~10%を占め、CisplatinとDoxorubicinにより奏功する。3分の2はStage I、IIで、手術において完全摘出できる症例が多く見られる。

明細胞がん：全卵巣がんの20~25%を占め、最近増加傾向にあるがんである。リンパ節転移をきたしやすいが、進行は決して早くなく、完全手術が出来た場合の予後は良好である。子宮内膜症との合併が高頻度であり、Cisplatinは抵抗性である。CPT-11を含む併用治療が有効とされている。3分の2はStage I、IIで、手術において完全摘出できる症例が多く見られる。

移行上皮がん：全卵巣がんの5~10%を占め、3分の2がStage I、IIで発見される。漿液性腺がんよりもCisplatinの感受性は高い。

その他、頻度は少ないが、数種類のがんが存在する。以上の組織型が種々の割合で混在している場合もある。

### 2.2.3. 卵巣がんの原因遺伝子

卵巣がんでは、5～10%に家族性発生が見られる。家族性卵巣がんには乳がん/卵巣癌症候群、遺伝性非腺腫症性大腸がん（HNPCC）で子宮体がん、卵巣癌、咽頭がん、膀胱がんなどを併発するLynch症候群、site-specific ovarian cancer症候群がある<sup>[6]</sup>。

1990年に染色体17q21領域に家族性乳がん/卵巣がん症候群の仮想原因遺伝子BRCA1が連鎖することが示され<sup>[7]</sup>、1994年にMikiらはこの領域から新しい遺伝子を単離し、この遺伝子の内部で複数の17q21連鎖家系のgermline DNAにおいて変異が見つかったことから、真の原因遺伝子であると報告した<sup>[8]</sup>。この遺伝子は24のエクソンからなる全長100 kbpの巨大な遺伝子であり、BRCAタンパクはアミノ酸末端にDNA/RNA結合ドメインを持ち、カルボキシル末端側に転写調節機能を有する転写因子と考えられている。EatonらはBRCA1遺伝子変異の保因者は乳がん発症が50歳までに49%、70歳までには71%であり、卵巣がんの発症はそれぞれ16%、42%であり、どちらかを発症する可能性は52%、82%と報告している<sup>[9]</sup>。

また我が国ではTakanoらが家族性卵巣がん19家系を解析し、乳がん/卵巣がん症候群4家系、site-specific ovarian cancer症候群3家系にBRCA1遺伝子変異の保因者を見出している<sup>[10]</sup>。BRCA1遺伝子は、家族性乳がん/卵巣がん症候群、site-specific ovarian cancer症候群の原因遺伝子の1つであるということはほぼ間違いないが、散発性乳がん、卵巣がんの発生、進展にかかわるがん抑制遺伝子である可能性は、現在のところ低い<sup>[11, 12]</sup>。

また、BRCA1と同様に乳がん、卵巣がんに共通した原因遺伝子であると考えられているBRCA2遺伝子は、構造的、機能的にBRCA1と類似性を持つことが機能解析により明らかになっている。BRCAタンパクは、RAD51を介してゲノムDNAの安定性に関与し、BRCA/Rad51制御機構の不安定化が発がん発生に繋がることが示唆されている。しかし、BRCAタンパクは転写活性化機能を持つこと、RINGフィンガードメインやp53結合ドメインなど、いくつかの機能ドメインを持つことなどが示され、BRCA遺伝子のそれらの複数の機能が総合的にがん抑制に作用していると推測される。

BRCA2 は染色体 13q12-13 から単離され、機能の不活性化によって乳がん、卵巣がん等の発生に繋がると考えられている。

### 2.3. がんの遺伝子治療の現状

現在、手術療法と化学療法そして放射線治療が、がんの進行状況に応じて行われている。確かに、切除できる病巣ならば、手術によって取り除いてしまうのが一番である。しかし、手術によって全ての細胞を取り除けない場合も多く、腹膜播種などはその最たるものである。腹膜播種では、腹腔内全体に細胞が散らばっており、全てを回収することは不可能である。そこで、化学療法に移る訳であるが、この抗がん剤治療には、必ず作用とともに副作用もついて回る。より治療効果をあげようとするほど、患者にもたらされる副作用の苦しみは大きくなり、その副作用により寿命を縮めるというも間々あることである。そこで生まれたのが、正常細胞を出来るだけ傷つけずに悪いところだけ狙って治療しようという、ドラッグデリバリーシステム（DDS）や分子標的治療薬剤、遺伝子治療の考え方である。

遺伝子治療は、副作用の少ない理想的な治療法として考え出され、1990年以降多くの臨床試験がアメリカを中心に行われてきた。2006年4月現在、卵巣がんの遺伝子治療に関するものだけでも125の臨床試験が米国で行われている。しかし、最初の遺伝子治療が行われてから20年近く経った現在でも、がんに対する遺伝子治療は外科手術、抗がん剤治療、放射線治療の3大治療法に取って代わるほど画期的な成果は出しておらず、臨床試験のほとんどは失敗に終わっているため、遺伝子治療及びその研究自体が縮小傾向にある。ただ、その主たる原因が、遺伝子の腫瘍への選択的デリバリーの困難性にあることは疑う余地もない。また、多くのがんでは、腫瘍は多臓器に転移しながら進行していくため、生体内での遺伝子デリバリーを可能にするための局所投与では、大きな治療効果をもたらすことができず、局所投与自体に臨床的意義の少ないものが多いことも否めない。

### 2.3.1. 核酸治療について

本研究では、RNA干渉（RNA interference = RNAi）という技術を用いて、遺伝子発現の抑制を行った。RNA干渉は、1998年にAndrew Fire とCraig C. Melloによって発見された現象で<sup>[13]</sup>、二本鎖RNA（dsRNA = double strand RNA）と相補的な塩基配列を持つmRNAが分解されるものである。RNAi実験では、この現象を利用して、人工的に合成したdsRNAを細胞内に導入することにより、特定の遺伝子の発現を抑制するものである。しかし、knockoutとは異なり、遺伝子発現抑制効果は一時的なものであるため、効果を継続させるには導入を繰り返す必要がある。

RNAiは21～23塩基という比較的小さなsiRNAが相補性を持つmRNAを特異的に効率よく分解に導くのだが、RNAiは長鎖dsRNAの存在（細胞への導入または細胞内発現）が引き金となって起こる。今までの研究成果により、RNAiは大まかに4つの段階に分けられることがわかってきた。それらは

長鎖dsRNAのsiRNA duplex（二本鎖siRNA）への変換

siRNA duplexの一本鎖への解きほぐし

一本鎖siRNAのRISC（RNA-induced silencing complex）への取り込み

標的mRNAの認識と切断

である<sup>[14]</sup>。

本研究では、RecQ、EGFR、KNTC2の3種類のsiRNAを用いて、遺伝子発現を抑制することによる殺細胞効果の検討を行った。3種類の遺伝子について、後述する。

### 2.3.2. RecQ について

DNA代謝経路の中で重要なヘリカーゼファミリーのひとつが大腸菌RecQと相同性を示すRecQ型である。RecQヘリカーゼは真核生物でも保存され、後生動物ではマルチ遺伝子ファミリーとして存在する。RecQ型ヘリカーゼは生命維持に必須ではないものの、DNAの二本鎖を巻き戻し、DNAの修復に関わり、ゲノムの安定化に寄与するといった、遺伝子のメンテナンスという重要なプロセスに関与し、この機能が損なわれると染色体の不安定化を誘発し、Bloom Syndorome、Werner Syndoromeに見られる早老・老化に伴って起こる病気の早期発症、及びがん多発症の原因となっている。ヒトRecQ型ヘリカーゼには、RecQ1( = DNA helicase Q1-like = RecQL = RecQL1 )、BLM( = Bloom Syndrome = RecQ2 )、WRN( Werner Syndrome = RecQ3 )、RTS( = RecQ4 = RecQL4 )、RecQ5 ( = RecQL5 ) の5種類のファミリーメンバーが知られており、うち3つが遺伝的疾患責任遺伝子として見出されている( Bloom Syndorome、Werner Syndorome、Rothmund-Thomson Syndrome )。これらの症候群はがんになりやすい体質やゲノムの不安定化といった表現型を共有するが臨床的症状としては区別され、機能欠失細胞の表現型も染色体欠失や姉妹染色体交換などの点で異なり、これらのヘリカーゼは『互いに補い合うことの出来ない』独立した機能を有していると考えられている<sup>[15]</sup>。

DNAヘリカーゼはミスマッチ修復、ヌクレオチド除去修復、及び直接修復を含む様々なタイプのDNA修復に関与する酵素であるが、RecQファミリーに属するタンパク質の中では、特に12q12.1に存在するRecQ1がその働きをしていると考えられており、悪性化及び染色体不安定化傾向を持つ遺伝病と関連しているというデータもいくつか示されている<sup>[16]</sup>。

BLMは上記に示したように、Bloom Syndromeの原因遺伝子であり、15q26.1に存在している。Bloom Syndromは遺伝病で発がん率が高く、若年から種々のがんを高頻度に発症する。Bloom Syndromeは非常に稀な常染色体劣性遺伝病であり、臨床的な特徴として、低身長、日光過敏症、男性の精子形成不全、免疫異常が現れる。また、ゲノムの不安定性や免疫不全を示す。BLMの翻訳産物は、boxを含むDExHを持つDNAヘリカーゼのRecQサブセットに関連し、DNA促進性ATPaseとATP依

存性 DNA ヘリカーゼ活性の両面を持つ。これは、他の遺伝子においては確認されていない機能である。

WRN は、種々の研究が最も進んでいる Werner Syndrome の原因遺伝子であり、8q12 存在している。この遺伝子の欠損は早期老化を特徴とする常染色体劣性遺伝疾患を引き起こす。またこの遺伝子は RecQ サブファミリーと DEAH (Asp-Glu-Ala-His) サブファミリーのタンパク合成を制御する。二本鎖 DNA 切断の修復にこの遺伝子が関わっている可能性が示唆されている。WRN は核質に存在し、Nuclear Dots を形成し、SV40 や EBV で形質転換した細胞やがん細胞などの増殖の早い細胞中で高発現していることが見出されている。

RTS も早期老化症状を呈する Rothmund-Thomson Syndrome の原因遺伝子であり、8q24.3 に存在する。皮膚萎縮、白内障、脱毛、骨肉種を引き起こす。また、DNA 依存的 ATPase 活性を有し、その活性が ATP 結合モチーフに依存していることが明らかにされている。

RecQ5 は広く生物種に保存されているにも拘らず、細胞内での機能については全くわかっていない<sup>[17]</sup>。これは、機能欠失の遺伝的疾患が発見されていないためであるが、高等真核生物は複数の RecQ を持つため、これらの遺伝子の、重複すると予想される機能の解明は、困難を極めている。

以上の RecQ ファミリーの欠損による遺伝性疾患の患者に由来する細胞では、高頻度の組換え、欠損、転座などの染色体異常が観察されることから、RecQ ファミリーヘリカーゼは主に DNA 複製や DNA 修復に関与することが明らかになりつつあり、RecQ ファミリーヘリカーゼの機能が欠損する遺伝性疾患では、このような修復機構が不活性化されることによりゲノムの不安定化を引き起こし、その結果、がん化や老化を促進させている可能性が示されている。また、組織における発現では、RecQ1 と RecQ5 ヘリカーゼについては各組織で普遍的に発現しているが、BLM、WRN、RTS では、組織特異的な発現を示すため、発現の高い組織と病気との関連が示唆されている。

RecQ ファミリーは、共通の Helicase Domain を持つものの、存在している染色体の位置や発現している組織も異なるため、その遺伝子の働き等も大きく異なることが

示唆されているが、生物学的機能は解明されていないことも多い。

### 2.3.3. 上皮成長因子受容体 (EGFR) について

上皮成長因子受容体 (Epidermal Growth Factor Receptor = EGFR) はチロシンキナーゼ型受容体であり、細胞膜を貫通して存在する分子量 170 kDaの糖タンパクであり、HER1、ErbB1 とも呼ばれる。1975 年にヒト線維芽細胞表面上にEGF特異的受容体の存在が報告され<sup>[18]</sup>、1978 年にヒト扁平上皮がん細胞株A431 において 170 kDaのタンパクとして同定された<sup>[19]</sup>。EGFRは多くの上皮組織で発現するが、特に重層または偽重層上皮の基底膜及び、扁平上皮での発現が多い。erbB膜透過型レセプターファミリーに属し、細胞成長、分裂、分化の調節をしていると言われている。また、EGFRの分布から、細胞増殖と上皮表面の分化に働いていると考えられている。また、carcinomaのような固形腫瘍で過剰発現していることが知られており、一部の肺がん、前立腺がん、胃がん、乳がん、大腸がん、膵臓がん、卵巣がんなどで過剰発現していることが確認されている。

erbB 受容体ファミリーにはEGFR( erbB1 )の他に、HER2( erbB2 )、HER3( erbB3 )、HER4 ( erbB4 ) が含まれ、いずれも非常に類似したタンパクである。このファミリーのタンパク質は、細胞外リガンド結合ドメイン、膜貫通ドメイン及び細胞内チロシンキナーゼドメインからなる。EGF リガンド (EGF、transforming 増殖因子、Amphiregulin、ベータセルリンなど) が EGFR 細胞外領域 2ヶ所 (領域 及び ) と結合すると、その受容体の立体配座が変化して、二量体化領域 (領域 ) が露出する。これが、その隣接物と二量体化できる立体構造をした受容体を効率よく捕捉するため、EGFR はもう一つの EGFR 単量体または別の erbB ファミリーの受容体の単量体と会合して、二量体を形成する。二量体が形成されると、細胞内ドメインのチロシンキナーゼが活性化され、受容体の自己リン酸化が引き起こされ、細胞増殖及び生存に関与する情報伝達 cascade を作動させる。EGFR の自己リン酸化によって PI3K や Akt、Ras、MAPK などのタンパク質がリン酸化され、がん増殖シグナルが核へと伝えられる。そのため、EGFR の活性化は細胞増殖、アポトーシスの阻害、血管新生及び転移を含む腫瘍増殖と進行の過程に関わっている。

また、正常細胞において EGFR は、上皮細胞の分化、発達、増殖、維持の調節に重要な役割を演じているが、この EGFR に過剰発現、遺伝子の変異、構造的変化がおきると、発がん及びがんの増殖、浸潤、転移などに関与するようになる。

さらに、EGFRのノックアウトマウスは胎生期に死亡する<sup>[20]</sup>か、皮膚、胚、消化管といった臓器の上皮に重度の発達障害を起こす<sup>[21]、[22]</sup>。一方、EGFRのリガンドであるEGFやAmphiregulin、TGF- $\alpha$ 、HB-EGFのノックアウトマウスは、軽度の角膜や皮膚、毛髪などの発達障害を起こすのみである。これは、EGFRリガンドファミリー内で、欠失した分子の働きを補い合っているのに対し、EGFRは補完する因子が存在しないことによるが、上皮細胞の発達には個々のEGFファミリーよりもEGFRの方が重要な働きをしていることが示されている<sup>[23]、[24]、[25]</sup>。

ヒトEGFR遺伝子は7番染色体短腕(7p12)に存在する。EGFR遺伝子の全長は200 kbで、28のexonと27のintronからなる<sup>[26]</sup>。Exon 1~16は細胞外領域をコードし、exon17は膜貫通領域を、exon18~28は細胞内領域をコードする。細胞内領域のうち、チロシンキナーゼ部位はexon18~24にコードされ、C末端領域はexon25~28にコードされる。

前述したように、EGFRは様々な悪性腫瘍で過剰発現しており、腎臓がんの50~90%、非小細胞肺がんの40~80%、前立腺がんの40~80%、頭頸部がんの36~100%、胃がんの33~74%、大腸がんの25~77%、乳がんの14~91%、そして卵巣がんでは35~70%に過剰発現が見られる<sup>[27]</sup>。そのため、EGFRの過剰発現はがんの予後不良因子とされている<sup>[28]、[29]</sup>。これは卵巣がんにおいても当てはまる<sup>[30]</sup>。

#### 2.3.4. KNTC2 (HEC, HEC1) について

KNTC2 (Kinetochore-associated 2 (HEC = Highly expressed in cancer protein))は、染色体18q11に存在し、動原体タンパク質複合体中に存在し、紡錘体形成の制御に参与し、微小管結合の安定化に関わり、細胞周期のM期の染色体分離を正しく行うために働く。染色体の分離と紡錘体チェックポイントに必要なNDC80複合体を形成し、細胞の増殖に関わるタンパク質である<sup>[31]</sup>。肺がんのほか、多くのがん細胞株(当研究において卵巣がんでの発現も確認)での発現が確認されているが、細胞増殖の起こ

らない正常組織での発現は、精巣以外の臓器では確認されていない<sup>[32]</sup>。また、染色体の分離において、KNTC2 のアミノ末端が関わっているのではないかと考えられている<sup>[33]</sup>。

## 第 3 章

## 既往研究

### 3.1. 既往研究とその問題点

本研究は、卵巣がん腹膜播種の腹腔内に siRNA と Cationic Liposome の complex を直接打ち込むものである。また、siRNA をがんの治療実験に用いている例はごくわずかであり、Liposome と siRNA の complex を腹腔内に投与している実験はほとんど報告されていない。本研究以前の関連している研究報告をこの章で示す。

2006 年、Armstrongらは、Stage の卵巣がんにおいて、薬剤の腹腔内投与のほうが、静脈投与と比較して延命効果があるという臨床試験の結果を発表し<sup>[1]</sup>、卵巣がん腹膜播種の治療には、静脈投与による全身治療よりも、腹腔内投与による局所治療のほうが優れているということを示した。

siRNAの投与方法についての研究では、2005 年にSoodらの研究グループは中性のLiposome(DOPC)とEphA2 siRNAのComplexを腹腔内に腫瘍を植えつけたnudeマウスに直接投与し、腹腔内腫瘍の抗腫瘍効果を確認している<sup>[2]</sup>。さらに、2006 年同じ研究グループによるFAK siRNAの腹腔内投与による抗腫瘍効果も報告されている<sup>[3]</sup>が、腹腔内へのLiposome siRNAのcomplexの直接投与実験の報告は以上の 2 報のみである。

しかし、以上の実験では中性の Liposome を用いている。siRNA が Anion 性である以上、Complex を形成した段階では、細胞と同じ Anion 性に傾いてしまい、導入効率が下がってしまう可能性がある。より導入効率を増すには、Cation 性 Liposome を用いることが妥当と考える。

がん治療の領域において、遺伝子核酸治療の有効性は証明されていない。siRNA にいたっては、臨床試験の報告さえない。全身的デリバリーのツールがない以上は、局所投与にて活路を見出すことに努めるべきである。その際、局所投与が臨床的に有効であろうがん種とその実験モデルを確立することが重要である。

また、卵巣がんにおいては、BRCA1、BRCA2 などの遺伝子の変異や、EGFR、HER-2/neu、MDR-1 など多くの遺伝子が過剰発現していることが報告されており<sup>[4、5、6、7、8]</sup>、標的となる可能性のある遺伝子の数は多い。有効な核酸デリバリー法が確立されさえすれば、さまざまな標的に対して治療実験を行い、最も抗腫瘍効果の強いものを選定し、臨床応用を目指すことも可能ではないかと考える。

## 第 4 章

## 目的・理論

#### 4.1. 本研究の目的と理論

緒言でも述べたが、卵巣がんは腹腔に転移しやすいが、腹腔内に転移した卵巣がん細胞は腹腔内で長く留まる特徴を有する。そのため、腹腔内でがんが進展していくことにより死亡するケースが多い。しかし、逆に考えれば、腹腔局所のがん制御が延命に直接寄与する可能性を持つ。

また、遺伝子の腫瘍への選択的デリバリーの困難性が遺伝子治療研究の衰退の原因となっており、現時点では、全身投与による有効な遺伝子デリバリーを行うことは不可能であると考えた。しかし、局所投与ならば、有効な治療法となりうる可能性が残されている。また、virus などを用いない核酸治療法は、安全性や操作の簡便性の面から考えても、臨床応用できる可能性が高いのではないかと考えた。

以上のことを踏まえて、局所の遺伝子発現制御が延命に寄与する可能性のあるがん種として、卵巣がんを選択し、腹腔内への核酸導入による抗腫瘍効果の検討を行うこととした。

本研究では、卵巣がんにおける腹腔内核酸治療法の開発を目指し、以下の研究を行った。

- 適切な卵巣がん腹膜播種モデルマウスの作製及び、腹腔内腫瘍可視化法の確立
- in vitro* における Liposome を用いた核酸導入法の検討
- 腹腔内の卵巣がん細胞への核酸導入及び、その条件の確立
- siRNA を用いた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

## 第 5 章

## 実験方法

## 5.1. 細胞培養

### 5.1.1. 培養細胞について

本研究では、Caov-3、OV-90、OVCAR-3、ES-2、SKOV-3 という5種類の卵巣がん細胞株を用いて実験を行った。全てが接着性の細胞であるが、ES-2のみ明細胞がんであり、それ以外の4種類の細胞は腺がんである (Table5-1)。

Table 5-1 各卵巣癌細胞株の特性

細胞名	形態	成長特性	病気
Caov-3	上皮細胞	接着性	腺癌
OV-90	上皮細胞	接着性	悪性漿液性腺癌 (腹水症)
OVCAR-3	線維芽細胞	接着性	腺癌
ES-2	線維芽細胞	接着性	明細胞癌
SKOV-3	上皮細胞	接着性	腺癌(腹水症)

全ての細胞は American Type Culture Collection ( ATCC , Manassas , VA ) から購入した。

本研究では、腹膜播腫モデルを作ることの最初の目的としたため、様々な特性を持つ卵巣癌細胞株を用いて当初の実験を行い、その後実験を行いやすい細胞株に絞って研究を進めた。

### 5.1.2. 細胞培養法

培養液は、Caov-3、OV-90、OVCAR-3 では Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma-Aldrich Chem. , Milwaukee , UK)に 10% 牛胎児血清(FBS、Tissue Culture Biologicals , Tulare , CA )、抗生物質 (ANTIBIOTIC ANTIMYCOTIC SOLUTION ( 100 × ) STABILISED, Sigma-Aldrich Chem. , Milwaukee , UK)、L-Glutamine (Sigma-Aldrich Chem. , Milwaukee , UK)を加えたものを使用し、ES-2、SKOV-3 では、McCoy 1.5mM L-Glutamine 含有 5 A Medium に 10% 牛胎児血清 (FBS、Tissue Culture Biologicals , Tulare , CA )、抗生物質 (ANTIBIOTIC ANTIMYCOTIC SOLUTION ( 100 × ) STABILISED, Sigma-Aldrich Chem. , Milwaukee , UK)を添加したものをを用いた。

また、細胞増殖にはTreated Non Pyrogenic Polystyreneの底面積 55 cm<sup>2</sup> (容量 10 ml) のシャーレ (Corning , Oneonta , NY) または、底面積約 175 cm<sup>2</sup> (容量 20 ml) のシャーレを用い、細胞は  $2.0 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup> の濃度で播種して培養を開始した。細胞培養は、37 ℃、5.0% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で行い、培養液は、1 ~ 2 日おきに新しいものと交換し、1 週間ほどで、90 % confluent状態に達した時点で、継代を行った。継代は、PBS (日水製薬株式会社 , Tokyo , Japan) (= phosphate-buffered saline、ダルベッコPBS ( - ) 粉末を溶解、オートクレーブ (株式会社トミー精工 , Tokyo , Japan) により滅菌)で細胞をよく洗って死細胞を除いた後、PBSに 0.25 % トリプシン、0.02 % EDTA (ethylenediamine-tetraacetic acid, Sigma-Aldrich Chem. , Milwaukee , UK)を使って細胞をシャーレの底面から剥がし、細胞間結合を切り、継代を行った。トリプシンは細胞を痛め、細胞生存率を低下させる要因になるため、細胞が剥がれたら出来る限り短時間で取り除く必要がある。また、各細胞は、あまり細胞数を減らしすぎると全く増殖しなくなるため、ある程度の細胞数を維持し続けるのが望ましい。

## 5.2. 卵巣がん細胞への Luciferase 遺伝子導入

本研究では、卵巣がん腹膜播種モデルの作製とともに、腹腔内に接種した腫瘍細胞の腹膜播種状態や腫瘍量の定量を行うイメージング法の開発も目指した。そこで Luciferase 発現ベクターを導入した卵巣癌細胞株を作製し、その細胞を予め注射しておいた腹腔内に D-Luciferin の接種を行うことで、D-Luciferin と細胞内の Luciferase の生物発光を検知することにより、腹腔内の腫瘍を可視化できないかと考え、実験を行った。

### 5.2.1. D-Luciferin - Luciferase 反応について

Luciferase は、ホタルや発光バクテリアなどの生物発光において、発光物質が光を放つ化学反応を触媒する作用を持つ酵素の総称である。そのため、発光酵素とも呼ばれている。生物発光とは、呼んで字のごとく生体から光が発せられることを言い、光のエネルギーを受けて光として放出する蛍光や燐光とは根本的に異なり、発光生物が行う化学反応から生じる化学エネルギーにより発光する。Luciferase とは、触媒する現象をもとに名付けられたもので、系統の離れた発光生物の Luciferase 相互の起源は概ね異なっている。このとき、Luciferase によって酸化されて発光する物質の総称を Luciferine と呼ぶ。Luciferase は酵素であるため、基質特異性を有し、近縁な種類の生物を除いて、ある発光生物の Luciferase はその生物の Luciferin としか反応しない。また、生物発光の光の波長は、Luciferase により、左右される。

本研究では、細胞内にホタルの Luciferase が組み込まれたベクターの導入を行い、ホタル Luciferin の発光基質である D-Luciferin を酸化させることによって発光を引き起こし、イメージング装置により腫瘍を可視化した。Fig.5-1 に示すように、D-Luciferin の発光機構は、Luciferase により ATP と反応した後、再び Luciferase を触媒として酸素分子により酸化され、ペルオキシドが生成し、脱炭酸分解の過程で発光する<sup>[1]</sup>。

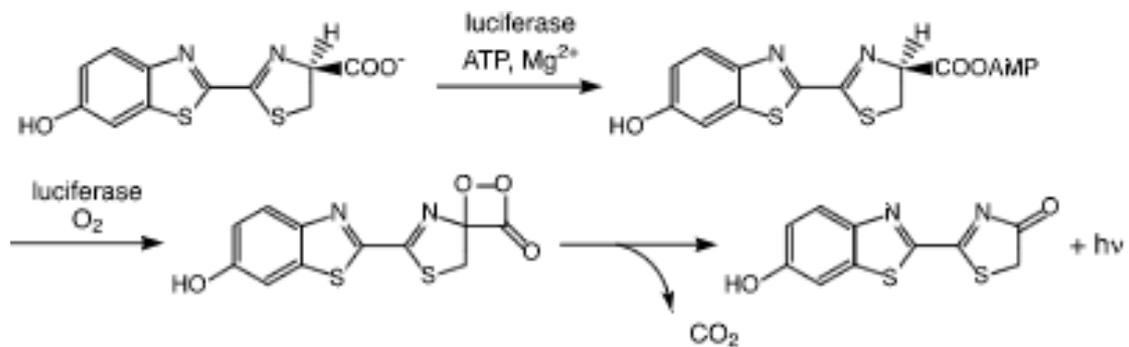


Fig.5-1 D-Luciferin の発光機構

### 5.2.2. Luciferase Vector の導入

卵巣がん細胞株には、LuciferaseとEGFPがコードされているカナマイシン、ネオマイシン耐性ベクター pEGFPLuc ( Clontech , Mountain View , CA )( Fig.5-2 ) を用いた<sup>[2-4]</sup>。

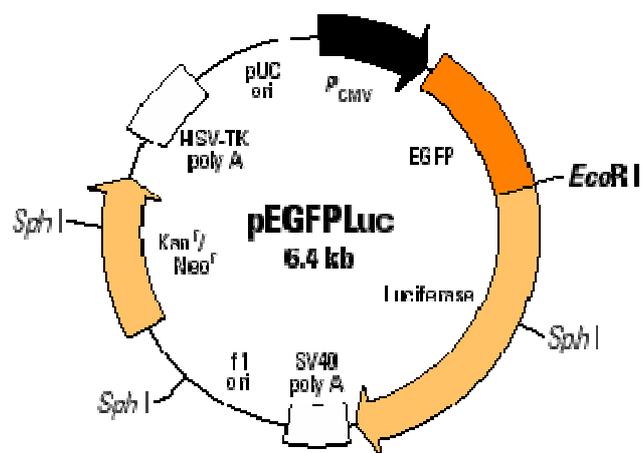


Fig.5-2 pEGFPLuc の制限酵素地図

このベクターはLuciferaseとEGFPを両方ともコードしているベクターとして販売されていたが、実験を行ってみると、EGFPの発現が弱く、蛍光顕微鏡下ではほとんどGFPの蛍光を見ることが出来なかった。尚、このpEGFPLuc Vectorは、2005年の3月をもって販売終了になっている。また、このベクターの導入には、最も汎用されている導入試薬であるLipofectamine 2000 ( Invitrogen , Carlsbad , CA ) を用いて行った。また、セレクションは、ネオマイシン耐性遺伝子から発現するアミノグリコシ

ドホストランスフェラーゼ 3' ( ) または APH3' ( ) により不活化される G418 ( =  $C_{20}H_{40}N_4O_{10} \cdot 2 H_2SO_4$  , CALBIOCHEM , San Diego , CA ) を用いた ( Fig.5-3 ) 。

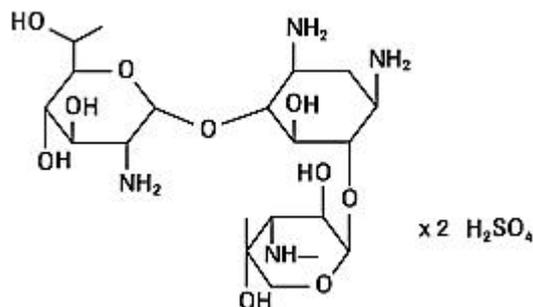


Fig.5-3 G418 の構造式

以下に、transfection、セレクション及びクローン化の手順を示す。

6well Plate ( Corning , Oneonta , NY ) に卵巣がん細胞株を  $4 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$  cells / well で播種し、インキュベーター内で 24 時間培養した。  
( 1 well の medium 量は 2 ml、細胞数は増殖の程度により調節した。)

4  $\mu$ g の pEGFPLuc と 500  $\mu$ l の opti-MEM ( GIBCO , Invitrogen , Carlsbad , CA ) を混合した。

10  $\mu$ l の Lipofectamine 2000 と 500  $\mu$ l の opti-MEM を混合し、5 分間室温で静置した。

と を混合し、20 分間室温で静置した。

細胞の培養液を取り除き、 を加えてインキュベーター内で 4 時間培養した ( = transfection ) 。

二倍の血清を含む培養液を各 well に 1 ml ずつ添加し、インキュベーター内でさらに 20 時間培養した。

培養液を取り除き、G418 を 1 mg / ml で溶解した通常培養液 2 ml と交換し、2 日間培養した ( = セレクション ) 。

2 日おきに G418 を 1 mg / ml で溶解した通常培養液 2 ml と交換し、1

週間培養を続けた。

CellBIND Surface 96well Plate ( Corning / Costar 3300 , Oneonta , NY ) に細胞を 1 cell / well で播種し、細胞が増えてくるまで培養を続けた ( = クローン化 ) 。

1 個の細胞から増えてきたクローンのみを取り出し、6 well plate に播種して、増殖させた。

Luciferase assay kit ピッカジーン ( 東洋ビーネット株式会社 , 東京 , 日本 ) を用いて、クローン化した細胞の Luciferase 活性を測定 ( Luminescencer - JNR , アトー株式会社 , Tokyo , Japan ) し、Luciferase 活性の高いものを選定した。

wild type の卵巣癌細胞株と比較して、新たに作製した Luciferase 発現細胞株が、細胞増殖や細胞形態における変化がないことを確認し、以後の実験で使用した。

### 5.3. 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 nude マウス( BALB-nu / nu、チャールスリバー , 神奈川 , 日本 ) 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。以下に具体的な実験手順を示す。

培養細胞をトリプシンではがし、細胞懸濁液を PBS 10ml に希釈し、よく混合した。

4 、 1200 rpm で 4 分間遠心し、上清を吸引除去した。

PBS を 10 ml 加え、よく希釈し、細胞数をカウントした。

4 、 1200 rpm で 4 分間遠心し、上清を吸引除去した。

$5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$  cells / 500  $\mu$ l の濃度になるように、細胞を生理食塩水で希釈した。

2.5 ml のテルモシリンジ( テルモ株式会社 , Tokyo , Japan ) と 25G の TERMO NEEDLE を用いて、nude マウスの腹腔内に、500  $\mu$ l / 匹ずつ、 の細胞懸濁液を注射した。またこの際、2 ml ごとに細胞懸濁液を混ぜ合わせて、常に同じ濃度の細胞懸濁液であるようにした。

3 日おきにマウスの体重及び腹囲を計測する。また、Luciferase 発現ベクターを導入した細胞を腹腔内に注射した場合には、イメージング装置にて腫瘍を可視化し、腫瘍の着き具合の確認及び腫瘍量の測定を行った。

2 ~ 4 週間後、マウスをサクリフェイスして解剖を行い、腫瘍の定着の仕方や着きやすい部位、腫瘍量の確認を行った。

#### 5.4. 腹腔内の腫瘍可視化法 (*in vivo* 分子イメージング)

腹腔内の腫瘍を可視化するためには、予め細胞内に Luciferase ベクターを導入しておく必要があることは、前述した。しかし、Luciferase ベクターを挿入した細胞を腹腔内に植えつけ、D-Luciferin を腹腔内に注射しても、外から見ただけでは当然のことながら生物発光を見ることは出来ない。そこで、フォトンイメージャー( BIOSPACE MESURES , Paris , France ) を用いて腹腔内の光子を検出した。フォトンイメージャーは、強化型 CCD カメラで腹腔内の Photon を検出し、その検出された Photon を増幅し、検出位置情報と外部からの映像と組み合わせることで、どこにどれほどの量の腫瘍が存在するかを生体外から確認することが出来る。また解析ソフトを用いることにより、腫瘍量を定量化することも可能である。そこで、フォトンイメージャーを用いた腫瘍可視化方法を記す。

マウスを小動物用麻酔システム (SBH Scientific , Ontario Canada ) に入れ、フォーレン (アボット ジャパン株式会社 , Osaka , Japan ) を用いて麻酔をかけた。

マイジェクター (テルモ株式会社 , Tokyo , Japan ) を用いて、PBS で 25 mg / ml に溶解した D-Luciferin( SBH Scientific , Ontario , Canada ) を 100  $\mu$ l マウスの腹腔内に注射し、Luciferin を十分反応させるため、5 分待った。( Luciferin の反応は腹腔注射後 5 分が最大で、その後減衰していく。また、Luciferin は注入後 30 分くらいで、尿として体外に排出されてしまうため、測定は速やかに行う必要がある。また、腫瘍を植えつける部分に関わらず、D-Luciferin は腹腔内に注入する。本実験は腹腔内に腫瘍を植えつけたため、Luciferin の腫瘍への到達時間を考慮する必要はなかったが、脳腫瘍など腹腔から遠い部位の場合は、待ち時間はもっと長くなる。)

マウスをフォトンイメージャーの中に入れ、Protocol に従って、Photon の検出と外形の写真撮影を行い、ソフトによる解析を行い、腫瘍を可視化すると同時に腫瘍量の定量を行った。

## 5.5. Liposome による siRNA の導入 ( *in vitro* )

siRNA 導入実験を行うにあたり、まず導入試薬として市販されている Liposome のうち、どれが最も siRNA の導入に適しているか確認することから始めた。3社の Liposome 導入試薬 ( Lipofectamine2000、RNAiFect Transfection Reagent、X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent ) の検討を行った。Lipofectamine2000 ( Invitrogen , Carlsbad , CA ) は最も良く用いられている導入試薬だが、その毒性の強さが問題とされている。RNAiFect Transfection Reagent ( QIAGEN GmbH , Hilden , Germany ) と X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent ( Roche , Mannheim , Germany ) は siRNA 導入用に開発された試薬で、血清存在下でも導入効率が低下しない上、毒性が低いとされた。各社の Liposome の導入は、試薬の Protocol に従って行った。この3種の Liposome を用いて検討を行い、毒性が強くない、かつ導入効率が優れている Liposome を1種類選定した。

また、本研究は、第一製薬株式会社の Liposome を用いて、生体内での腫瘍への siRNA 導入を行うことを目的として行ったが、第一製薬株式会社の Liposome が他社の Liposome と比べて siRNA 導入効率がどう異なるかを明らかにするため、上記の手順で選定した Liposome を第一製薬の Liposome の比較対照として用いた。さらに実験では、Liposome の成分や粒子径の違いによる導入効率の変化の検討も行ったが、導入手順は成分や粒子径の違いによって変化することはなく、全て同一 Protocol で核酸導入を行った。

Liposome による siRNA の導入効率の実験では、Luciferase 発現ベクターが導入されている細胞を用い、Luciferase siRNA を導入することにより、その検討を行った。Luciferase siRNA ( 以下 siRNA ) は第一製薬株式会社 ( Tokyo , Japan ) よりその配列情報を提供され、北海道システム・サイエンス株式会社 ( Sapporo , Japan ) に合成を委託した。また、非特異的 siRNA ( NS RNA、以下 NS ) は Luciferase の siRNA 配列情報から、北海道システム・サイエンス株式会社にスクランブル配列の設計と合成を依頼した。

市販されている Liposome を用いた核酸の導入手順は、各社の Protocol 通りなので、ここでは第一製薬提供の Liposome を用いた導入法のみ記す( 96 well plate で 10 well

分の Transfection 法、siRNA : Liposome = 1 : 100 (モル比) の場合 )

Transfection の 24 時間前に細胞を 3500 cells / well で播種した。

乾燥した Liposome を DNase RNase Free Water で復水し、4 時間で一晩静置した。

250  $\mu$ l の Opti-MEM に 20  $\mu$ M の siRNA を 2  $\mu$ l 加え、よく混合した ( siRNA 量は実験により変化 )

250  $\mu$ l の Opti-MEM に 4  $\mu$ l の Liposome を加え、よく混合した後に、5 分静置した。

と を混合し、20 分間室温で静置した。

に 20 %牛胎児血清を含む DMED を 500  $\mu$ l 加え、よく混合した。

のプレートの培養液を除き、を 100  $\mu$ l / well ずつ添加した ( この方法での siRNA の最終濃度は 40 nM )

48 時間インキュベーター内で培養を行った後、導入効率、毒性、殺細胞効果等の評価を行った。

## 5.6. Liposome による siRNA の導入 (*in vivo*)

第一製薬には、*in vivo* 用 Liposome として、*in vitro* の 10 倍濃度の Liposome を合成してもらった。それにより、液量を増やすことなく、腹腔内への siRNA 導入が可能となった。*in vivo* 実験では、*in vitro* 実験以上に siRNA、Liposome、導入液量など様々な条件を変化させて検討を行っているため、一定のプロトコルというものはない。そこで、最も導入に優れていたと判断した siRNA 600 pmol、Liposome 3  $\mu$ l、液量 1 ml のプロトコルを示す。( siRNA : Liposome = 1 : 50 (モル比))。

Transfection 2 日前に、ヌードマウスの腹腔内に 1.0 ml のテルモシリンジ (テルモ株式会社, Tokyo, Japan) と 25G の TERMO NEEDLE を用いて、Luciferase 遺伝子導入 ES-2 細胞を  $5 \times 10^5$  cells / 500  $\mu$ l で植えた。

乾燥した Liposome を DNase RNase Free Water で復水し、4 時間で一晩静置した。

500  $\mu$ l の Opti-MEM に 100  $\mu$ M の siRNA を 6  $\mu$ l 加え、よく混合した。

500  $\mu$ l の Opti-MEM に 3  $\mu$ l の Liposome を加え、よく混合した後に、5 分静置した。

とを混合し、20 分間室温で静置した。

*in vivo* イメージング装置によって腫瘍のつき具合を確認した後、2.5 ml のテルモシリンジ (テルモ株式会社, Tokyo, Japan) と 25G の TERMO NEEDLE を用いて、ヌードマウスの腹腔内に 1 ml の complex を注射した。

48 時間後、*in vivo* イメージング装置等を用いて、導入効率、毒性、抗腫瘍効果等の評価を行った。

### 5.6.1. siRNA 導入による腹腔内治療実験

本研究では、KNTC2 siRNA を用いて、卵巣がん腹膜播種モデルマウスに対する治療実験を行った。導入手順は 5.6. と同様であるが、siRNA-Liposome の投与回数が異なるため、追記する。導入実験では腫瘍移植 2 日後に siRNA の導入を行ったが、治療実験では、2 日後と同量の siRNA を腫瘍移植 3 日後と 4 日後にも、計 3 回、3 日連続投与を行った。また、イメージング装置による腹腔内腫瘍の観察は、1 回目の siRNA 投与後 2、6 日目に行った。

## 5.7. siRNA 及び Primer の配列情報

実験に用いた siRNA と Primer の配列情報を示す。

### { siRNA }

Luciferase siRNA ( sense ) : 5'-ACAUCACUUACGCUGAGUACUUCGAAG-3'

Luciferase siRNA ( antisense ) : 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGUGAUGUAU-3'

Luciferase Non Specific siRNA ( sense ) :

5'-CCCUCUAGUCUAGCGAGAUAAUUCAAG-3'

Luciferase Non Specific siRNA ( antisense ) :

5'-UGAAUUAUCUCGCUAGACUAGAGGGAU-3'

RecQ1 siRNA ( sense ) : 5'-GGAACUCAGAAGCAUGUAA dT dT-3'

RecQ1 siRNA ( antisense ) : 5'-UUACAUGCUUCUGAGUCC dT dT-3'

RecQ1 Non Specific siRNA ( sense ) : 5'-UUCUCCGAACGUGUCACGU dT dT-3'

RecQ1 Non Specific siRNA ( antisense ) : 5'-ACGUGACACGUUCGGAGAA dT dT-3'

EGFR ( 644 ) siRNA ( sense ) : 5'-GGCACGAGUAACAAGCUCA dT dT-3'

EGFR ( 644 ) siRNA ( antisense ) : 5'-UGAGCUUGUACUCGUGCC dT dT-3'

EGFR ( 42833 ) siRNA ( sense ) : 5'-GGAGCUGCCCAUGAGAAAU dT dT-3'

EGFR ( 42833 ) siRNA ( antisense ) : 5'-AUUUCUCAUGGGCAGCUCC dT dT-3'

EGFR Non Specific siRNA : Ambion の Silencer Negative Control #1 siRNA 使用

( 配列非公開 )

**[ Primer ]**

GAPDH Forward Primer : 5'- TGACCACAGTCCATGCCATC-3'

GAPDH Reverse Primer : 5'- CCACCCTGTTGCTGTAGCC-3'

Luciferase Forward Primer : 5'-GATGCACATATCGAGGTGGACAT-3'

Luciferase Reverse Primer : 5'- GCATACGACGATTCTGTGATTTG-3'

RecQ1 Forward Primer : 5'-AAGCAGTGTTTAGAGGATTC-3'

RecQ1 Reverse Primer : 5'-TTTATTTACCATTTTCAGCAT-3'

KNTC2、EGFR の Primer は市販品であるため、配列情報なし。

## 5.8. *in vivo* における細胞回収法

Imaging 装置による評価が終わった後に、腹腔内の腫瘍細胞を取り出して Real-Time PCR を行い、細胞内に siRNA がきちんと導入されて遺伝子の発現を抑制しているかの検討を行った。細胞を取り出した後の RNA の単離および逆転写は *in vitro* と同じ手順で行ったため、ここでは割愛し、腹腔内からの腫瘍回収法のみ記す。

Imaging 装置による測定が終わったマウスを、ドライアイスまたはネブタールを用いてサクリファイした。

20 ml のテルモシリンジ (テルモ株式会社, Tokyo, Japan) と 21G の TERMO NEEDLE を用いて、nude マウスの腹腔内に、2.5 ml / 匹ずつ生理食塩水を注射した。

マウスの腹部を 20 回程度よく揉んだ。

メッツレンバウム剪刀 (ケイセイ医科工業株式会社, Tokyo, Japan) と無傷性ピンセット (株式会社メディセオメディカル, Tokyo, Japan) を使い、マウスの右側腹部から切開し、腹膜に直径 5 mm 程度の穴を開けた。

穴から搾り出すようにして生理食塩水及び、腫瘍を 15 ml チューブ (Corning, Oneonta, NY) に回収した。(免疫染色を行う場合は、ここで 500  $\mu$ l / プレパラートの腫瘍懸濁液を別に分けた。)

遠心分離機 (日立工機株式会社, Ibaraki, Japan) を用いて、1500rpm、4 で 5 分間遠心し、腫瘍をペレット状にした上で、チューブの口を下に向けて生理食塩水を取り除いた。(タンパク質を抽出する場合は、ここでチューブごと液化窒素に浸し凍らせた上で、-80 で保存し、タンパク質の抽出を行った。) 腫瘍に ISOGEN を加え、RNA の抽出を行った (ISOGEN 後は *in vitro* と同一手順)。

## 5.9. *in vitro* 薬剤処理方法

### 5.9.1. 薬剤による殺細胞効果の検討

本研究では、卵巣がん治療の代表的抗がん剤であるCisplatin (CDDP、日本化薬株式会社、東京、日本)と塩酸ドキソルビシン(アドリアマイシン、協和発酵工業株式会社、東京、日本)の殺細胞効果を検討した<sup>[5]</sup>。

Cisplatinは、0.5 mg/mlで販売されている溶液を生理食塩水で希釈し1 mM溶液を作った。生理食塩水に希釈するのは、水に希釈すると活性が低下するためである。その液を最大濃度100  $\mu$ Mになるようにmediumで希釈し、細胞に添加した。

また、塩酸ドキソルビシンは粉末をジメチルスルホキシド(DMSO)に溶解し、10 mMの溶液を作った。その液を最大濃度5  $\mu$ Mでmediumに希釈し、細胞に添加した。DMSOはそれ自体でも毒性を有するため、最終濃度が0.05%以下になるように留意する必要がある。薬剤添加72時間後に殺細胞効果を検討した。以下に、薬剤処理方法を記す。

卵巣がん細胞を薬剤処理の24時間前に3500cells/well(細胞によって、この数は異なる)で96well plateに播種した。

事前に上記した方法で作成しておいた薬剤溶液を、mediumで段階希釈した(Cisplatinは0~1 mM、塩酸ドキソルビシンは0~5  $\mu$ M)。

の細胞に の薬剤溶液を添加し、インキュベーター内で72時間培養を行った。MTT法やWST-8法で細胞生存率の検討を行った。

### 5.9.2. siRNAと薬剤の併用による殺細胞効果の検討

siRNAと薬剤の併用効果を見るためには、それぞれを同時刻に作用させなければならない。siRNAは核酸導入がなされてから効果が出てくるまでに時間がかかるので、同時にsiRNAと薬剤を添加するのではなく、siRNA導入24時間後に薬剤を添加し、72時間後に殺細胞効果の検討を行った。siRNAの導入手順は、5.5.と全く同じ方法で行い、薬剤処理は5.9.1.に記した手順で行った。

## 5.10. 殺細胞効果測定

本研究は、がんの新たな治療法の開発を目指したため、どの薬剤または核酸がどの程度の殺細胞効果を持っているかを正確に把握する必要があった。そこで、薬剤処理を行った後の細胞毒性試験や細胞増殖の測定に多く使われている2種類の測定法を用いて、殺細胞効果の検討を行った。

### 5.10.1. MTT assay について

MTT assayは、細胞毒性試験や細胞増殖率の測定などに良く用いられている測定法である。MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) とは、分子式 $C_{18}H_{16}BrN_5S$ で示されるテトラゾリウム塩の一種である。MTTは細胞内に取り込まれると細胞内のミトコンドリア中の脱水素によりホルマザン (Formazan) に変化する (Fig.5-4)。このホルマザンは青色の非水溶性の結晶で、生成後は沈殿する<sup>[6]</sup>。これをジメチルスルホキシドなどの有機溶媒で溶解させ、良く混ぜると均一の赤紫色の溶液となるので、この溶液の550nmにおける吸光度を測定する。

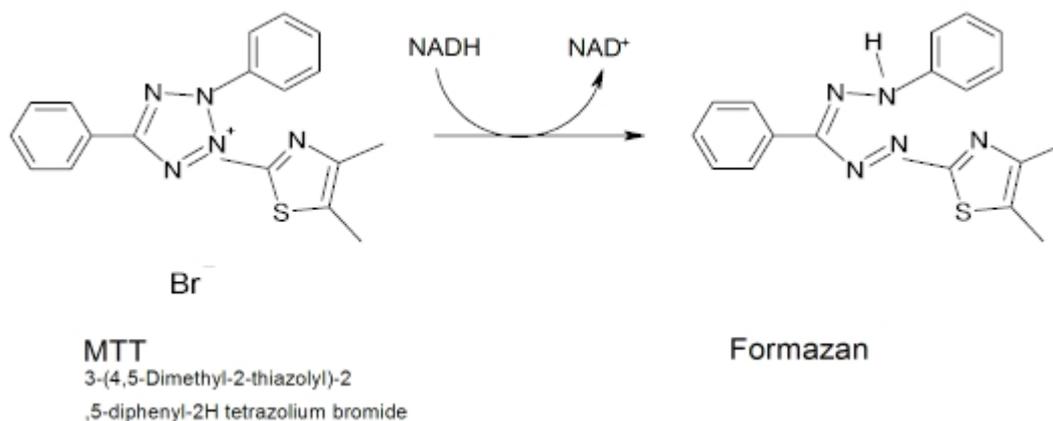


Fig.5-4 MTT の反応

MTT自体は水溶性で黄色の溶液だが、Fig.5-4のように脱水素酵素の反応により、MTTとNADHの間に酸化還元反応が起こり、MTTがFormazanに還元され、NADHがNAD<sup>+</sup>に酸化される。この脱水素酵素はミトコンドリアの呼吸鎖に関連する酵素であり、

細胞の状態の指標となる。細胞が元気な場合は酵素活性が高いため、Formazanへの還元が活発に起こるが、細胞が弱っている場合はそれがあまり起こらず、細胞が死んでいる場合はほとんど起こらないため、その度合いが色の濃さに反映されている。また、通常健康な状態の細胞数とFormazanの赤紫色素の濃度との間に検量線を引くことが可能で、細胞数と赤紫色素の濃さ（吸光度として測定）のグラフを描くことにより、細胞数計測にも利用されている。実際の測定手順を以下に記す。

CellBIND Surface 96well Plate ( Corning / Costar 3300 , Oneonta , NY ) に細胞を 500 ~ 5000 cells / well で播種し、インキュベーター内で 24 時間培養した（ 1 well の medium 量は 100  $\mu$ l、細胞数は細胞増殖の程度によって調節した）、培養液を取り除き、薬剤または siRNA 入りの培養液を添加し、72 時間（ siRNA の場合は 48 時間）インキュベーター内で培養を続けた。

PBS に溶解した MTT ( Xenometrix , Allschwill , Switzerland ) を 15 ~ 20  $\mu$ l 添加し、インキュベーター内で 4 時間反応させた。

5、1500 rpm で 10 分間プレートを遠心し、細胞及び Formazan が剥がれ落ちないようにした。

下に叩きつけるようにして培養液及び反応液を取り除き、ジメチルスルホキシド（和光純薬工業株式会社，大阪，日本）を 180  $\mu$ l 加え、5 分間プレートごと振盪した。

マイクロプレートリーダー（SPECTRA MAX 190，日本モレキュラーデバイス株式会社，東京，日本）で、550 nm における吸光度を測定した。

細胞生存率は、コントロール群を 1 とし、薬剤または siRNA 添加群の吸光度をコントロール群に対する割合で評価した。

### 5.10.2. WST-8 法について

WST-8 法も、MTT assayと同様に、細胞毒性試験や、細胞増殖率の検討に用いられる測定法だが、ほとんど同じ原理を用いているMTT assayほど汎用されてはいない。しかし、難溶性のFormazanが沈殿物として析出するMTT assayに比べ、WST-8 の生成物は水溶性Formazanであるため、MTT assayのように溶解操作を必要としないため、より再現性が高くなる。以下にWST-8 ( Cell Counting Kit-8 ) による細胞増殖試験の原理を示す ( Fig.5-5 ) [7]。

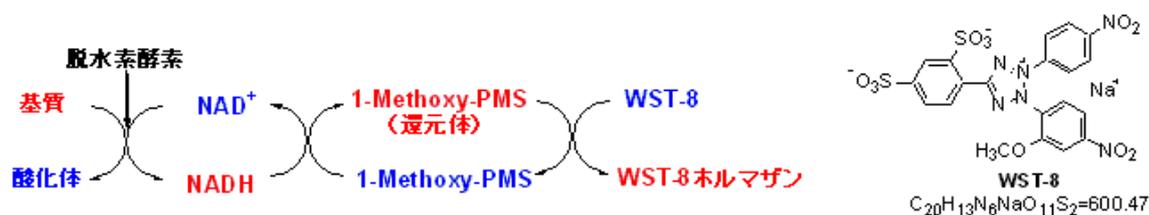


Fig.5-5 WST-8 の反応

また、WST-8 法の測定波長は 450nm である。具体的な測定手順を以下に記す。

CellBIND Surface 96well Plate ( Corning / Costar 3300 , Oneonta , NY ) に細胞を 500 ~ 5000 cells / well で播種し、インキュベーター内で 24 時間培養した ( 1 well の medium 量は 100 μl、細胞数は細胞増殖の程度によって調節した ) 培養液を取り除き、薬剤または siRNA 入りの培養液を添加し、72 時間 ( siRNA の場合は 48 時間 ) インキュベーター内で培養を続けた。

下に叩きつけるようにして培養液及び反応液を取り除き、WST-8 液 ( 株同仁化学研究所 , 熊本 , 日本 ) を 10 μl と通常培養 medium 90 μl を混合したものを添加し、インキュベーター内で 1 時間反応させた。

マイクロプレートリーダー ( SPECTRA MAX 190 , 日本モレキュラーデバイス株式会社 , 東京 , 日本 ) で、450 nm における吸光度を測定した。

細胞生存率は、コントロール群を 1 とし、薬剤または siRNA 添加群の吸光度をコントロール群に対する割合で評価した。

塩酸ドキソルビシンは、粉末をジメチルスルホキシド（和光純薬株式会社，大阪，日本）で 10 mM に希釈し、最大濃度 5  $\mu$ M になるように medium に溶解し、細胞に添加した。この際、ジメチルスルホキシドの濃度が 0.05 %を超えないように留意した。

添加後、72 時間で MTT または WST-8 により細胞生存を測定した。

## 5.11. RNA の抽出と逆転写

本研究では siRNA を用いた遺伝子の発現制御を行ったため、RNA およびタンパクの発現確認実験は非常に重要であり、数多く行った。 *in vitro* の細胞や腹腔内の腫瘍から RNA を単離し、逆転写 (Reverse Transcription) してから、PCR (Polymerase Chain Reaction) または Real-Time PCR を行い、遺伝子の発現量を確認した。

RNA の単離に関しては、ISOGEN (株式会社ニッポンジーン, Toyama, Japan) を用い、そのプロトコルにしたがって抽出を行った。また、この際 RNase-Free DNase set (QIAGEN) を用いて、DNase 処理を行った。抽出した RNA はエタノール沈殿させ、-80 の冷蔵庫 (朝日ライフサイエンス株式会社, Tokyo, Japan) で保存した。TE (TRIS EDTA Buffer Solution pH 8.0, Sigma-Aldrich Chem., Milwaukee, UK) に溶解させた状態の RNA をエタノール沈殿させる手順は以下に記す。

1.5 ml チューブ (Sorenson Bioscience, Inc, West Salt Lake City, UT) 内の水相 (RNA 溶解液) に対して、2 ~ 2.5 倍の 100 %エタノールと、10 分の 1 量の 3 M Sodium Acetate を加え、よく混合した後、1500 rpm で 5 分間遠心した。

チューブを一回下に向けて液を捨て、沈殿 (RNA) のみを残した。

70 %エタノールをチューブいっぱいになるまで加え、-80 の冷凍庫で保存した。

取り出した RNA を用いて逆転写反応を行い、相補的 DNA (complementary DNA = cDNA) を合成し、得られた cDNA を用いて PCR を行った。逆転写反応の手順を示す。

TE に溶解した RNA の濃度を、ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE) で測定した。

600 pg 程度の RNA を DNase RNase free Water に溶解して 3  $\mu$ l にした。

に Buffer for Reverse Transcription (10 $\times$  PCR Buffer と 25 mM MgCl<sup>2</sup> Solution) を混合したもの、Applied Biosystems, Lincoln Centre Drive Foster

City, CA) を 6  $\mu$ l、dNTP mix (Applied Biosystems, Lincoln Centre Drive Foster City, CA) を 8  $\mu$ l、Random Hexamers (Applied Biosystems, Lincoln Centre Drive Foster City, CA) を 1  $\mu$ l、RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Lincoln Centre Drive Foster City, CA) を 1  $\mu$ l、MuLV Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, Lincoln Centre Drive Foster City, CA) を 1  $\mu$ l 加え、全量を 20  $\mu$ l にした。

PCR Thermal Cycler (タカラバイオ株式会社, Shiga, Japan) に をセットし、22 (10 分) 42 (15 分) 99 (5 分) 4 ( ) で逆転写反応を行い、cDNA の合成を行った。

## 5.12. 遺伝子発現解析

### 5.12.1. RT-PCR による遺伝子発現解析

5.10.に示した方法で逆転写した cDNA を使い、Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いて、PCR を行った。プロトコルは Applied Biosystems の条件に従って行った。また、アニーリングの温度は 51~56 で行った。以下に条件を記す。

〔条件〕

Template . . . 1 $\mu$ l	} Total 20 $\mu$ l (27~30 cycles)
Buffer for PCR . . . 3 $\mu$ l	
(25mM MgCl <sub>2</sub> Solution : 2 $\mu$ l, 10 $\times$ PCR Buffer : 1 $\mu$ l)	
Amp Taq DNA polymerase (5 U/ $\mu$ l) . . . 0.125 $\mu$ l	
Primer mix (5 $\mu$ M) . . . 0.5 $\mu$ l	
DNase RNase Free Water . . . 16.375 $\mu$ l	

### 5.12.2. Real Time PCR による遺伝子発現解析

Real Time PCR による mRNA の発現解析では、ABI 7500 fast real-time PCR (Applied Biosystems) を使い、そのプロトコルにしたがって Real time PCR とデータ解析を行った。以下に条件を記す。また、内部コントロールとして GAPDH を用いた。

〔条件〕

Template . . . 1 $\mu$ l	} Total 20 $\mu$ l (40 cycles)
2 $\times$ PCR master mix . . . 10 $\mu$ l	
20 $\times$ TaqMan primer & probe . . . 1 $\mu$ l	
DNase RNase Free Water . . . 8 $\mu$ l	

### 5.12.3. Western Blot 法による遺伝子発現解析

〔細胞回収 (*in vitro*)〕

培養 dish 内の medium を吸引除去し、冷却した PBS で 2 回洗浄した。

冷却した PBS を dish に添加し、セルスクレーパー (SARSTEDT AG & Co. ,

N-Brecht , Germany ) で細胞を掻き取り、15 ml チューブに細胞を回収した。

冷却した PBS を再度 dish に添加し、セルスクレーパーで細胞を掻き取り、 の  
15 ml チューブに加えた。

4 、1500 rpm で 5 分間遠心分離した。

上清を除去し、液体窒素で凍結させた ( - 80 で保存した ) 。

〔タンパク質の抽出〕

RIPA Buffer を調整した。

( RIPA Buffer : 1 M Tris HCl ( pH 8.0 ) · · · 50  $\mu$ l

10 % Noidet P40 · · · 100  $\mu$ l

10 % Na Deoxycholate · · · 25  $\mu$ l

1 M NaCl · · · 100  $\mu$ l

Halt Protease Inhibitor Cocktail Kit

( Pierce Biology , Rockford , IL ) · · · 2  $\mu$ l

DNase RNase Free Water · · · 673  $\mu$ l

総量 : 1 ml

RIPA Buffer を希釈 Buffer として用いる時は Protease Inhibitor カクテル  
は加えず、代わりに DNase RNase Free Water を 2 ml 加える。 )

- 80 で保存してある Sample に RIPA Buffer を 15 ~ 30  $\mu$ l 加え、Sample を溶  
解し、1.5 ml チューブに溶解液を移し、氷上で 15 分静置した。

4 、15000 rpm で 10 分間遠心分離した。

上清 ( タンパク質成分 ) のみを 1.5 ml チューブに移した。

タンパク質の定量は BCA Protein Assay Kit ( Pierce Biology , Rockford , IL ) を用

いたので、手順は割愛する。

#### 〔泳動〕

タンパクを 10 ~ 15  $\mu\text{g}$  Apply し、Sample Buffer を加えた。

Heat Block を 65 で 15 分間行った。

10%のプレキャストゲル PAG ミニ「第一」を SDS-PAGE の入った泳動装置に固定し、マーカ―と を注入した。

30 mA で 1 時間泳動を行った。

#### 〔Western Blotting〕

BIO-RAD TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (BIO-RAD , Hercules , CA) に Transfer Buffer に 20 分間浸した濾紙を 4 枚重ねた。

Transfer buffer に 20 分間浸したニトロセルロース膜を の濾紙の上に重ね、泳動が終わったゲルを乗せた。

濾紙を の上に 4 枚重ね、空気を抜いた後に、0.8 mA /  $\text{cm}^2$  で 1 時間泳動を行った。

ニトロセルロース膜を 5 % Skim Milk / TBS-T の Blocking 液に浸し、室温で 1 時間ゆっくり攪拌し続けた。

TBS-T で 15 分洗浄を 2 回繰り返した。

ビニール袋にニトロセルロース膜を入れ、Skim Milk で希釈 (500 ~ 2000 倍) した一次抗体を加え、4 、Over night でゆっくり攪拌して反応を行った。

TBS-T で 20 分洗浄を 3 回繰り返した。

ビニール袋にニトロセルロース膜を入れ、Skim Milk で希釈 (500 ~ 2000 倍) した二次抗体を加え、室温で 1 時間ゆっくり攪拌して、反応させた。

TBS-T で 40 分洗浄を 4 回行った。

一次抗体：RecQ1・・・ジーンケア研究所株式会社より提供

EGFR・・・EGFR(1005):sc-03

(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)

$\beta$ -actin · · · Monoclonal Anti- $\beta$ -actin Clone AC-15 (Sigama)

二次抗体：anti-mouse (or rabbit) IgG-HRP (Santa Cruz)

現像は ECL Western Blotting Detection Reagents ( GE Healthcare , Fairfield , CT )  
を用いて行った。

#### 5.12.4. 免疫組織化学法による遺伝子発現解析

5.7.で回収してきた腫瘍懸濁液 ( 1 プレパラートあたり 500  $\mu$ l ) を PBS で 10 倍希釈し、Auto Smear CF-120 ( Sakura , Tokyo , Japan ) を使って、プレパラート ( MAS コート付き、松浪硝子工業株式会社 , Osaka , Japan ) に貼り付かせた。プレパラートをドライヤーの冷風で 1 時間以上乾燥させてから、10% 中性緩衝ホルマリンに 10 分間浸し、固定を行った。以下に Luciferase の免疫染色の手順を記す。

プレパラートをバスケットに移し、超純水に一瞬浸した。

30% 過酸化水素水をメタノール ( 和光純薬株式会社 , 大阪 , 日本 ) で 3 % に希釈した液にプレパラートを浸し、20 分間静置した。

プレパラートをバスケットに移し、流水で 2 分間洗浄した。

PBS の入った洗浄バットに移し、揺らしながら 15 分間洗浄を 3 回繰り返した。

プレパラートの水分をふき取り、PAP PEN ( ダコ・ジャパン株式会社 , Kyoto , Japan ) で、Sample を囲んだ。

プレパラートを湿潤器に移した。

PBS で溶解した 3 % Skim Milk を滴下 ( Sample を完全に覆う程度 ) し、25 分静置した。

プレパラートを叩きつけるように Skim Milk を除いた。

PBS で 100 倍希釈した Luciferase の抗体 ( Anti-Luciferase ( Firefly ) , Affinity Purified , San Leandro , CA ) を滴下し、1 時間静置した。

プレパラートをバスケットに移し、抗体を超純水で洗い流した。

PBS の入った洗浄バットに移し、揺らしながら 3 分間洗浄を 3 回繰り返した。

二次抗体である ENVISION / HRP (ダコ・ジャパン株式会社) を滴下し、30 分間静置した。

プレパラートをバスケットに移し、PBS の入った洗浄バットで揺らしながら 5 分間洗浄を 3 回繰り返した。

DAB+ ( 3,3'-Diaminobenzidine Tetrahydrochloride ) Liquid System (ダコ・ジャパン株式会社) を滴下し、5 分間静置した。

プレパラートをバスケットに移し、DAB を超純水で洗い流した。

Hematoxylin and Eosin ( HE ) 液に 20 秒浸した後、染色した。

プレパラートをバスケットに移し、流水で 2 分間洗浄した。

水を切り、エタノール (和光純薬工業株式会社) に段階的に浸した後、キシレン (和光純薬工業株式会社) に段階的に浸して、水分を除去した。

カバーガラス (松浪硝子工業株式会社) に MOUNT-QUICK (大道産業株式会社、Kanagawa , Japan ) を乗せ、スライドガラス上の Sample を MOUNT-QUICK で覆うようにして封入した。

平らな場所で 1 日乾燥させた。

## 第 6 章

## 結果

## 6.1. 卵巣がん腹膜播種モデルマウスの作製

### 6.1.1. モデル化最適細胞株の選定

卵巣がん細胞株 5 種を、nudeマウス (n = 3) の腹腔内に  $5 \times 10^6$  cells / 500  $\mu$ l ずつそれぞれ注射し、腹囲の増大、体重の増加を 1 ヶ月間観察した後に、サクリファイして腹腔内の腫瘍を観察した。その結果、ES-2 細胞株を注射したnudeマウスのみ腹囲 (Fig. 6-1)、体重 (Fig. 6-2) とともに急激な増加が見られ、腹腔内注射後 18~21 日で死亡した。

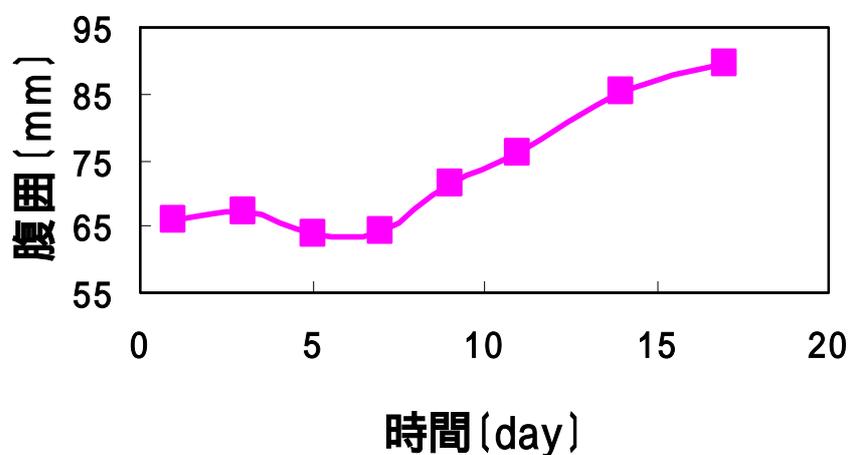


Fig. 6-1 ES-2 細胞腹腔内注射 mouse の腹囲

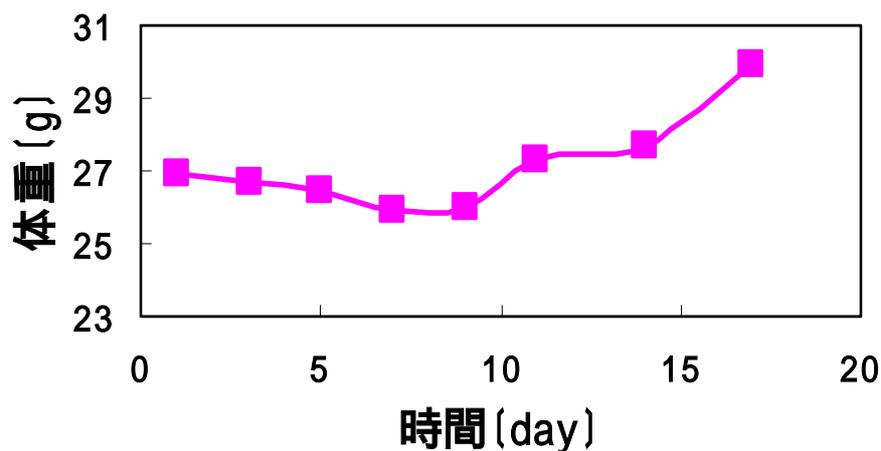


Fig. 6-2 ES-2 細胞腹腔内注射 mouse の体重

死亡したマウスの腹腔内を観察してみると、血性腹水 (Fig.6-3) 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. 6-4、6-5、6-6、6-7)。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ヶ月たっ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、着いていても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短期的実験に適切であると判断した。



Fig. 6-3 ES-2細胞株移植卵巣がん腹膜播種モデルマウス

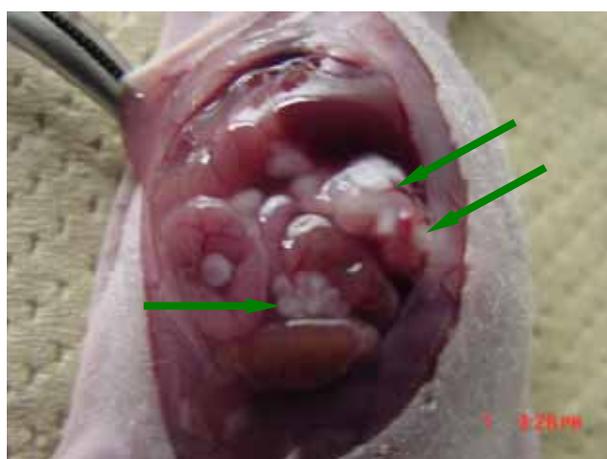


Fig. 6-4 ES-2細胞株移植卵巣がん腹膜播種モデルマウスの腹腔内1  
(矢印の先が腫瘍。さまざまな臓器にこびりつくようにして腫瘍が付着し、増殖した。)

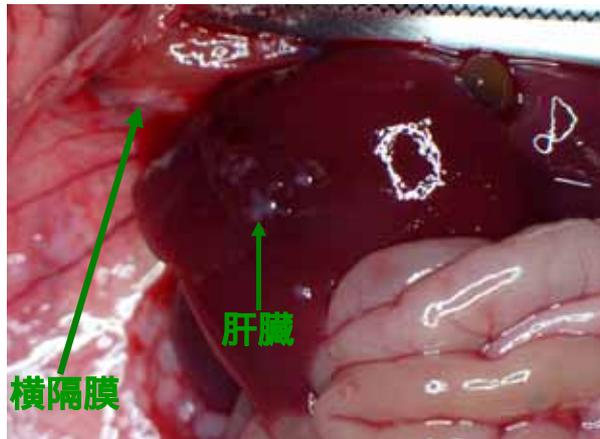


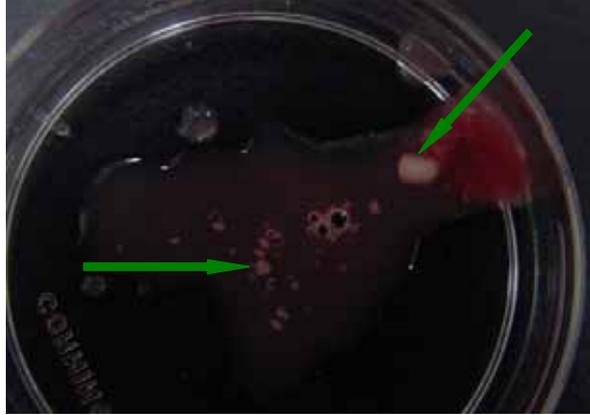
Fig. 6-5 ES-2 細胞株移植卵巣がん腹膜播種モデルマウスの腹腔内 2

(矢印の先が腫瘍。初期の段階で横隔膜、腸間膜での増殖が見られ、後期には肝臓表面でも粒状の腫瘍が増殖した。この段階では、腹膜がはちきれそうなくらい腹水が溜まっている。)



Fig. 6-6 ES-2 細胞株移植卵巣がん腹膜播種モデルマウスの腸間膜

(矢印の先が腫瘍。腸間膜の血管に沿うように粒状の腫瘍が付着し、増殖した。)



**Fig. 6-7 ES-2 細胞株移植卵巣がん腹膜播種モデルマウスの腹水**  
(矢印の先が腫瘍。腹水の中にはさまざまな大きさの粒状腫瘍が漂っていた。)

### 6.1.2. 腹腔内腫瘍の可視化

卵巣がん腹膜播種モデルマウスが完成したので、腹腔内の腫瘍を可視化し、腹膜播種状態の経時変化を追いつけるために、Luciferaseベクターが導入されたES-2 卵巣がん細胞株をnudeマウスの腹腔内に  $5 \times 10^6$  cells注射し、腹膜播種状態の形成過程を観察した (Fig. 6-8)。比較対照として、Luciferaseベクター-OV-90 卵巣がん細胞株を  $5 \times 10^6$  cells腹腔内に注射し、その違いを検討した (Fig. 6-9)。

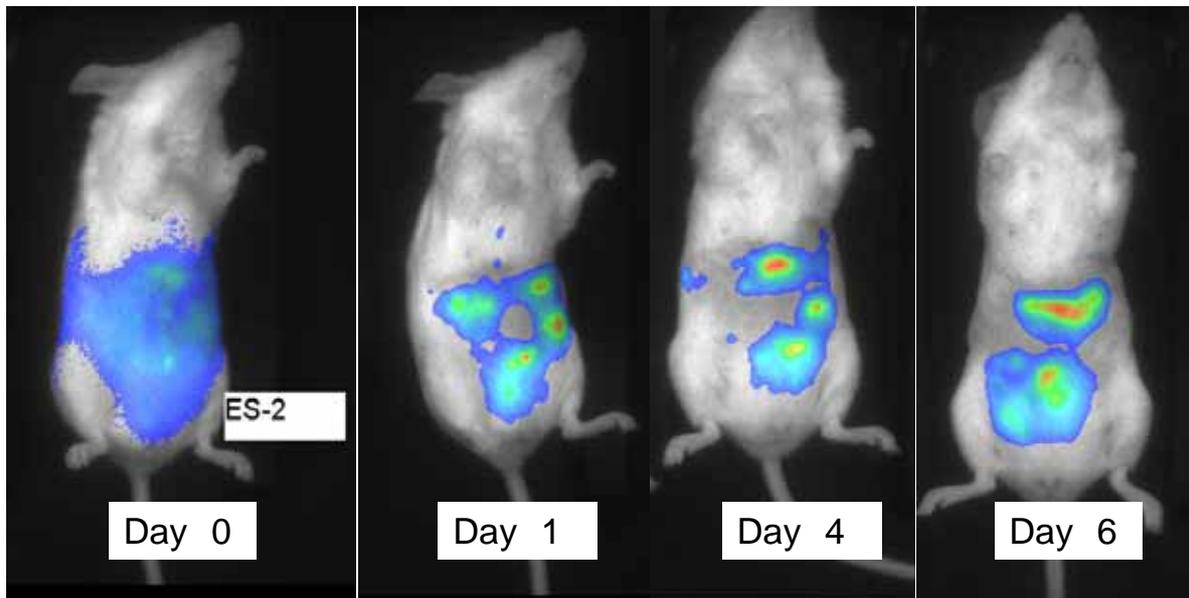


Fig. 6-8 腹腔内腫瘍とその増殖 (ES-2 細胞)

(図の青い部分は細胞が少ないところ、赤い部分は細胞が多いところ)

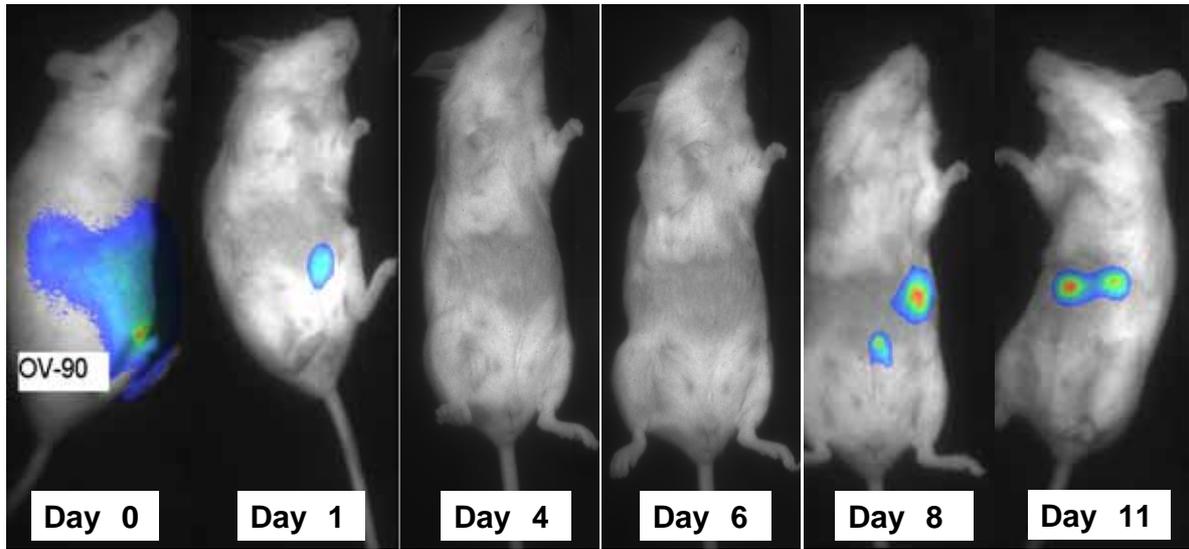


Fig. 6-9 腹腔内腫瘍とその増殖 (OV-90 細胞)

Fig. 6-8 と Fig. 6-9 を比べた結果、ES-2 を腹腔内に注射したマウスでは、細胞が減少することなく、腹腔内全体に広がって増殖していくのに対し、OV-90 を注射したマウスでは、細胞がいったん減少し、画像での検出限界以下 (数値は検出可能) まで細胞数が落ち込んでから、腹腔内の特定の箇所のみで定着して増えていく様子がわかった。腫瘍の増殖の様子からも、ES-2 細胞を用いた腹膜播種モデルの方が、腹腔内全体に腫瘍が広がり、腹水を伴うヒト卵巣がん腹膜播種を適切に模倣していることが実証された。

### 6.1.3. 腹腔内腫瘍の定量

卵巣がん腹膜播種モデルマウスの腹腔内の腫瘍は、imaging装置により可視化できることは 6.1.2. で確認した。しかし、imaging装置により検出される数値が必ずしも細胞数を示しているとは言い切れないため、Luciferaseベクター導入ES-2 細胞を皮下に植え付け (Fig. 6-10) その腫瘍体積 ( $= (\text{長径} \times \text{短径}^2) / 2$ ) とimaging装置が検出したLuciferase活性の数値に相関関係があるかどうか検討した。

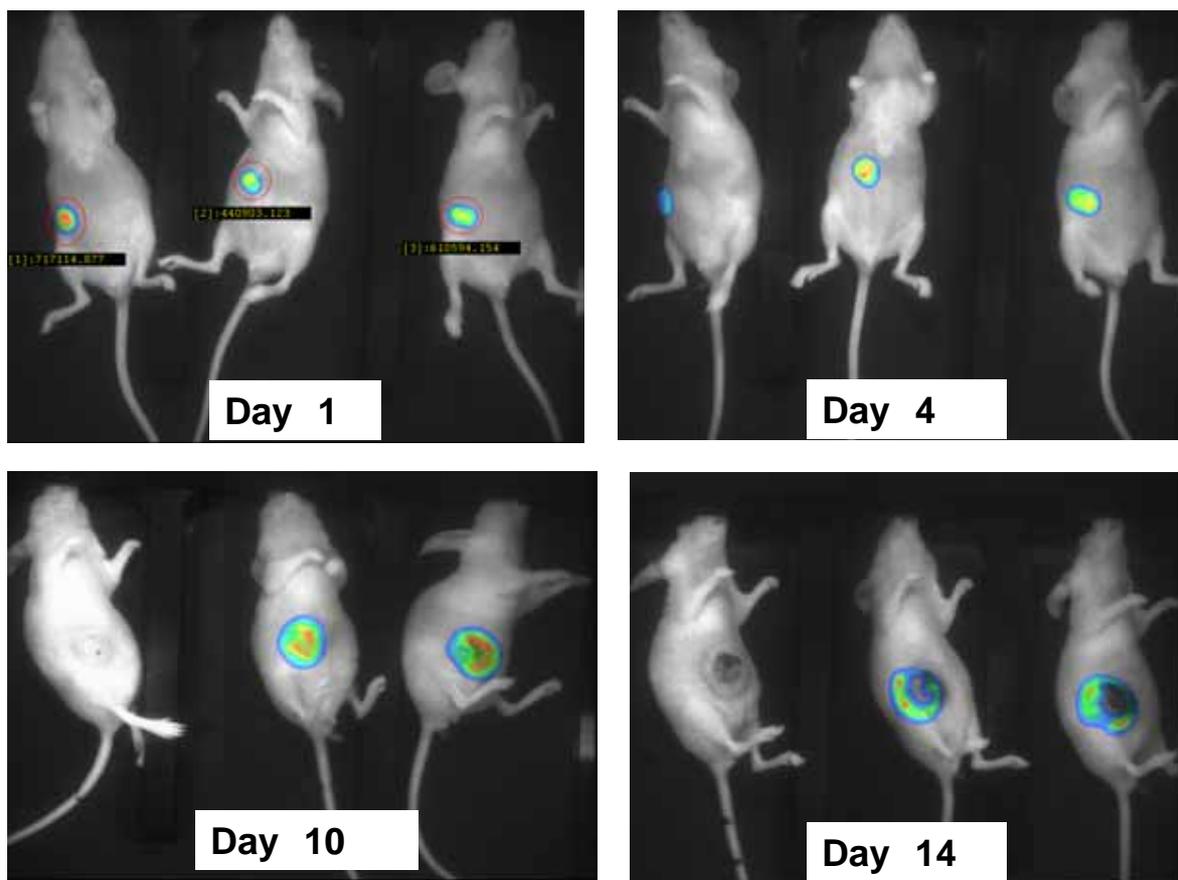


Fig. 6-10 ES-2 細胞皮下腫瘍の imaging 画像

皮下腫瘍の観察を続けた結果、day 14 になると皮下腫瘍の特に中心部 (Fig. 6-10 ではかさぶたのように腫瘍が黒くなっている部分) が壊死してしまい、Luciferase 活性が失われていた。そのため、day14 以降のデータは、腫瘍体積 = 細胞数ということにはならないと判断し、それ以前の数値を用いて、腫瘍体積と imaging 装置が示した Luciferase 活性との関係を Fig. 6-11 に示した。また、事前の検討により、imaging 装置は頭蓋骨内や体の反対側の腫瘍も映し出せることを確認しており、腹腔内すべての腫瘍を映し出せると判断した。そのため、Fig. 6-11 の結果は腹腔内の腫瘍にも適応可能だと考えた。

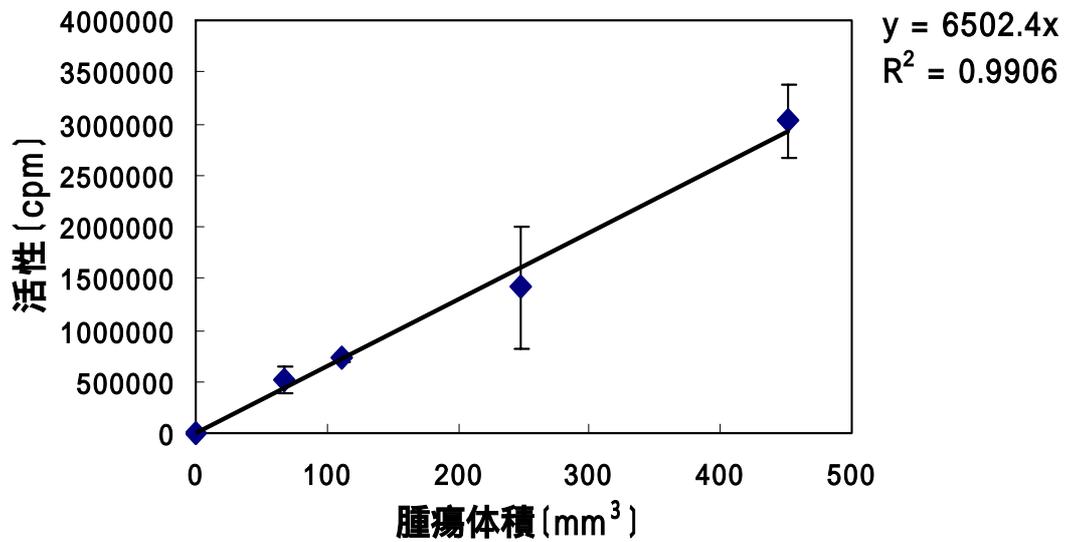


Fig. 6-11 腫瘍体積と Luciferase 活性との関係 (n = 3)

Fig. 6-11 より、皮下腫瘍の体積と Luciferase 活性との間には強い相関関係が見られた。それにより、imaging 装置が検出する Luciferase 活性の数値により、細胞の定量が可能であることが示された。そのため、今後細胞内の腫瘍の増減は、Luciferase 活性により判断することとした。

## 6.2. *in vitro* における核酸導入法の検討

本研究では、第一製薬から *in vivo* 用 Liposome の提供を受けた。*in vivo* 実験を行う前に、*in vitro* での検討が必要不可欠であると判断し、*in vitro* における最適 Liposome、siRNA と Liposome の比率、粒子径の検討を行った。

### 6.2.1. 比較対照 Liposome の選定

第一製薬の Liposome の実験では、市販されている Liposome を比較対照とした。市販されている siRNA 導入試薬の検討のため、Luciferase 発現ベクターを組み込んだ ES-2 細胞に Luciferase siRNA を各試薬で導入し、遺伝子発現効率の検討を行った。結果を Fig. 6-12 に示す。また、通常の血清のない状態の siRNA 導入に加え、*in vivo* での実験を想定し、血清を含む medium で siRNA 導入も行った。

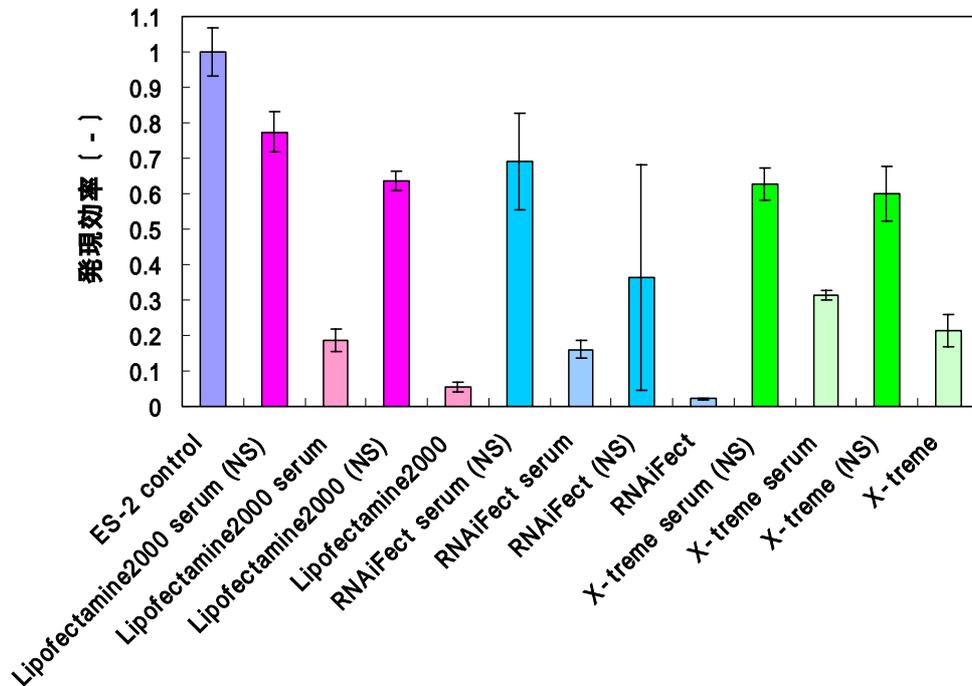


Fig.6-12 各リボソーム導入試薬の核酸導入効率

( siRNA の濃度は 50 nM、 S.D.= 3 well の平均 ± 標準偏差

RNAi Fect = RNAiFect Transfection Reagent

X-treme = X-tremeGENE siRNA Transfection Reagent

NS=Non Specific siRNA

Serum = 血清含有 medium での導入 )

Fig. 6-12 では、RNAiFect Transfection Reagent を用いて siRNA 導入を行った細胞の遺伝子発現が最も減少しているが、Non Specific siRNA (NS) においても、遺伝子発現が低下している。これは、導入試薬自体の毒性であり、RNAiFect を添加したことで細胞死を起こしたために遺伝子発現が減少したと考えられ、Specific な siRNA を導入した細胞の遺伝子発現減少が、必ずしも導入された siRNA だけの効果によるものではない事を示している。一方、Lipofectamine2000 で導入した細胞では、NS の遺伝子発現の低下は少なく、しかも Specific siRNA を導入した細胞での遺伝子発現

抑制効果も優れていることから、以後の実験では、Lipofectamine2000 を siRNA 導入の比較用試薬として用いることとした。

### 6.2.2. 最適 Liposome の決定

*in vivo* で拡散導入実験を行う前に、*in vitro* において実験を行い、さまざまな検討を行った。当初第一製薬からは、組成の異なる A、B、C の3種類の Liposome を提供 (Table 6-1) されたため、通常の導入手順による核酸導入を行い、最も導入効果が優れているものを選定した。

Table 6-1 各リポソームの脂質量

カチオン脂質	A	B	C
カチオン脂質濃度 〔mg / ml〕	0.519	0.744	0.714
総脂質濃度 〔mg / ml〕	1.41	1.55	1.86

Liposome の導入手順は、A、B、C すべて同一であり、Luciferase ベクター入りの ES-2 細胞株に Luciferase siRNA 導入を行い、その遺伝子発現抑制効率を測定することにより、導入効率の検討を行った (Fig. 6-13)。また、WST-8 法で細胞生存率を測定することにより、細胞毒性の有無の検討も行った (Fig. 6-14)。また、比較対照として、Lipofectamine2000 を用いた siRNA 導入も同時に行った。

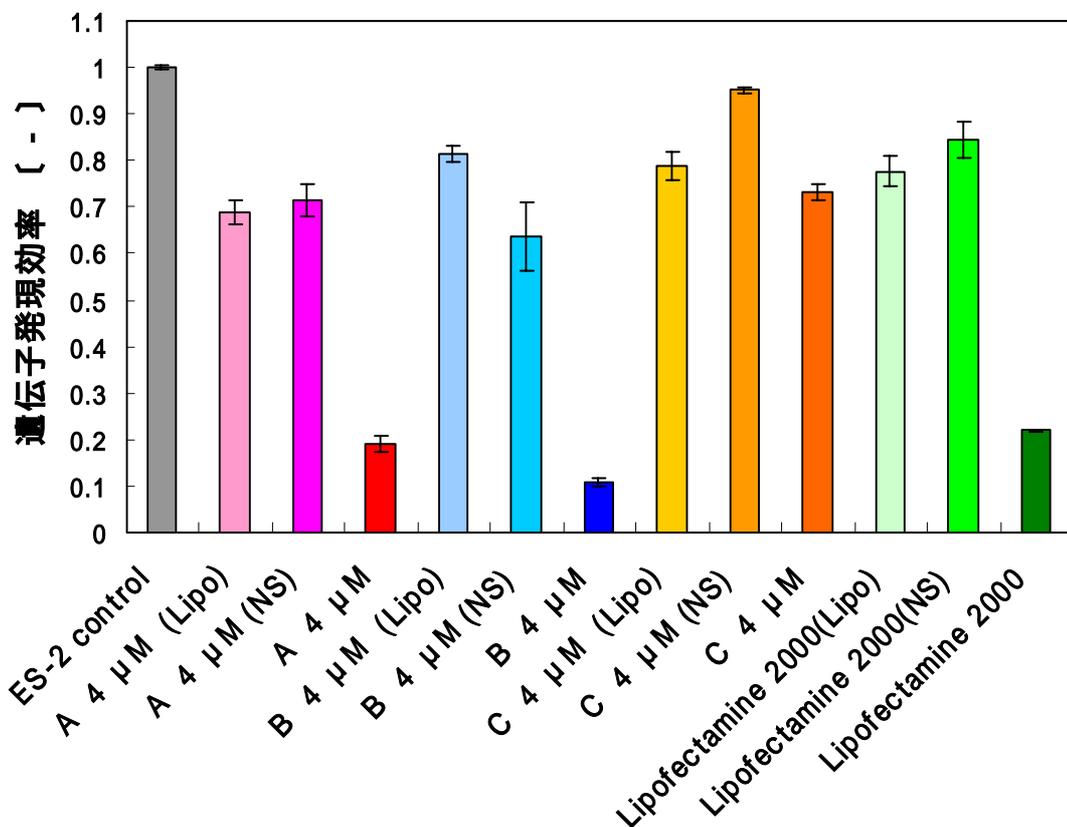


Fig. 6-13 Liposome を用いた遺伝子発現抑制

(数値は Liposome の濃度、siRNA 濃度はすべて 40 nM、Lipo = Liposome のみ、NS=Non Specific、表記なし = Luciferase siRNA、S.D.= 3 well の平均 ± 標準偏差

Lipofectamine2000 はプロトコル〔 2 μM 〕通り)

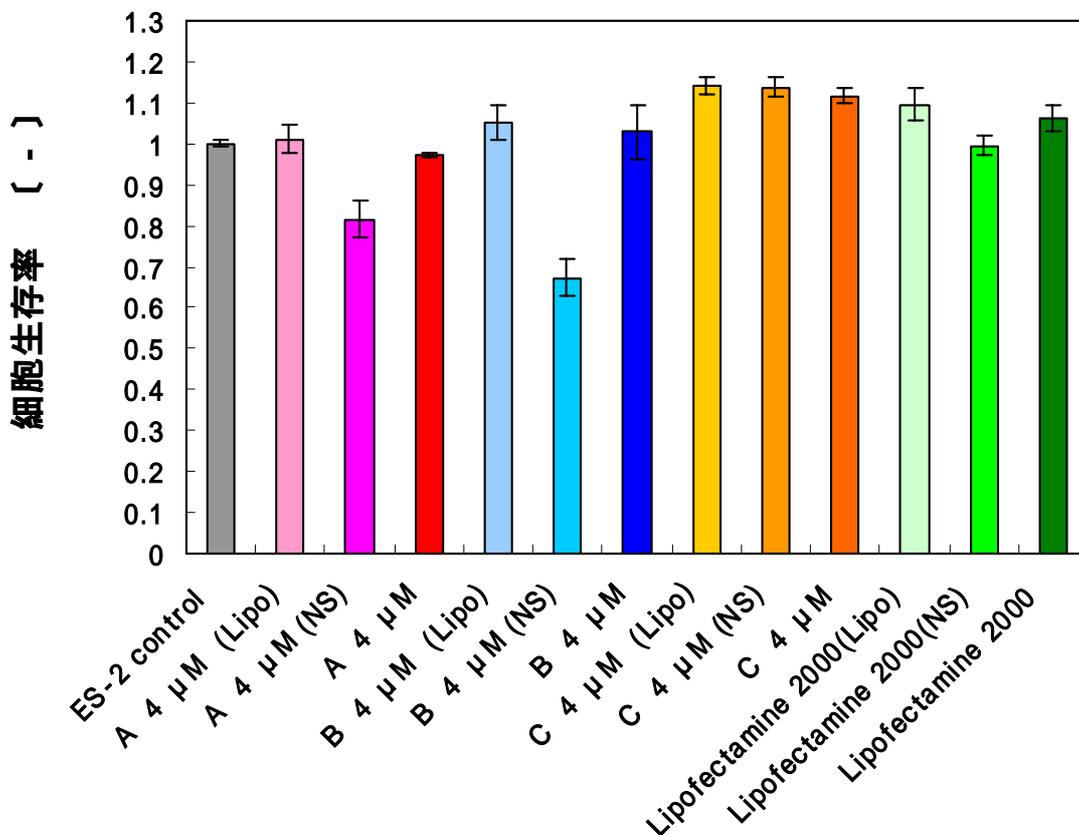


Fig. 6-14 Liposome を用いた遺伝子発現抑制時の細胞生存率

(S.D.= 3 well の平均 ± 標準偏差)

この結果、Liposome B が最も導入効率がよく、かつ毒性もないため、今後の実験では、Liposome B に絞って実験を行うことにした。

### 6.2.3. Liposome と siRNA の最適混合比率

6.2.2.により、LiposomeB が最も導入効率が良いということが明らかになった。また、そこで、提供された Protocol 通りの Liposome と siRNA 比 (Liposome : siRNA = 100 : 1 (モル比)) が最適であるか検討し、最も導入効率のよい比率を割り出すことにした。siRNA の濃度を最も毒性がなく、かつ導入効率もよかった 40 nM (それ以上では導入効率が悪く、それ以上では毒性により生存率が低下した) 固定し、LiposomeB の濃度を 2、4、8 μM と変化させることにより、どのように核酸導入効

率が変わるか検討を行った ( Fig. 6-15、 6-16 )。

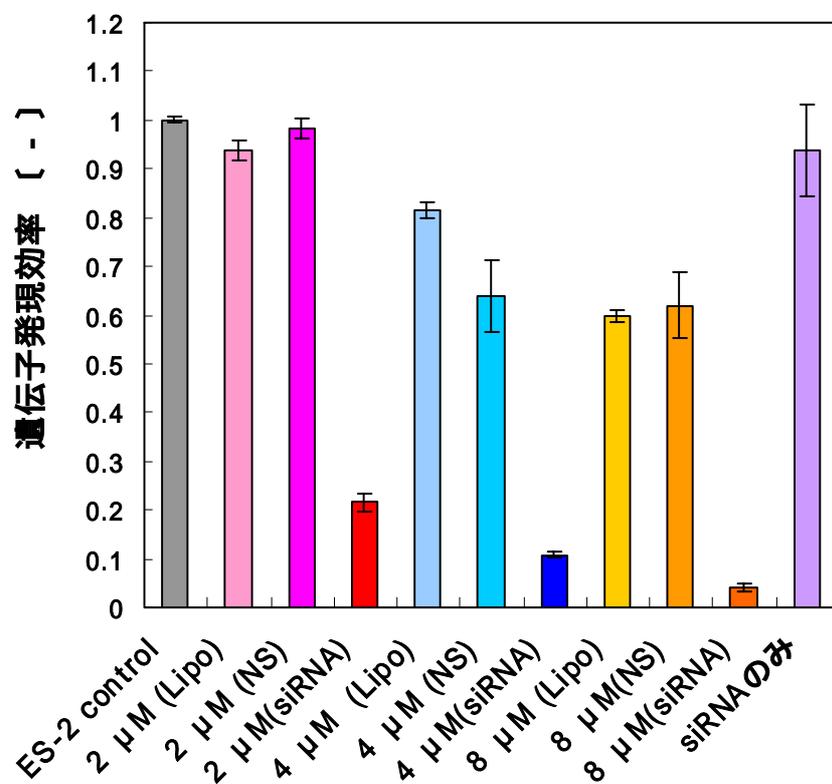


Fig. 6-15 Liposome : siRNA の比を変化させたときの遺伝子発現抑制  
( S.D.= 3 well の平均 ± 標準偏差、 NS = Non Specific、 siRNA = Luciferase siRNA )

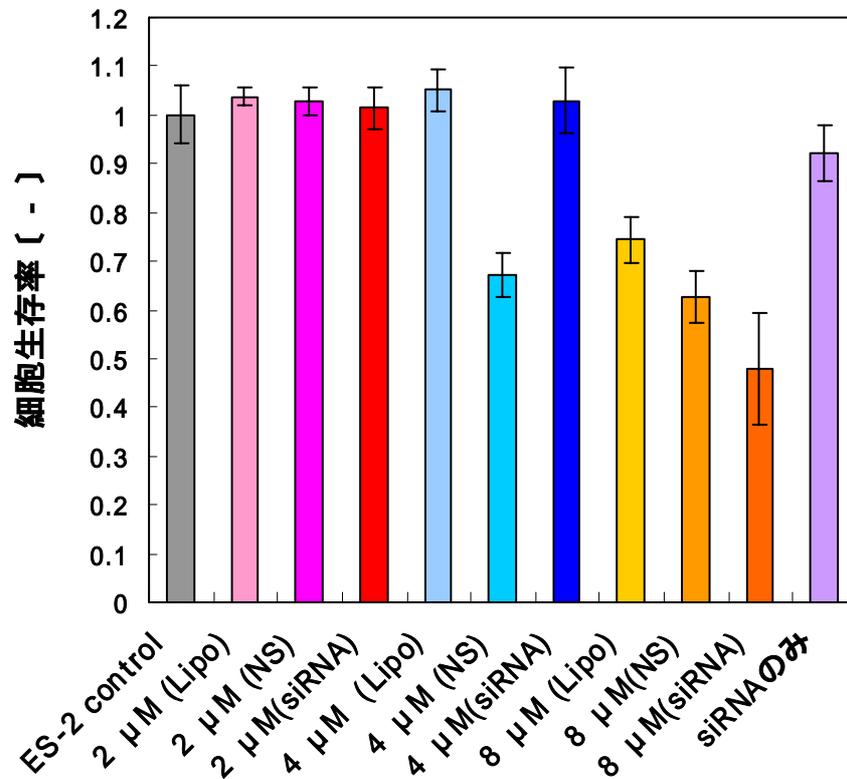


Fig. 6-16 Liposome : siRNA の比を変化させた遺伝子発現抑制時の細胞生存率  
( S.D. = 3 well の平均 ± 標準偏差 )

8 μM が最も導入効率がよかったが、核酸導入時の毒性なども考慮した結果、protocol 通り ( Liposome : siRNA = 100 : 1 = 4 μM : 40 nM ) の混合比率で今後の実験を行うこととした。また、siRNA 単独では何の影響も及ぼさず、毒性も低いことがわかった。

### 6.2.4. Liposome の最適粒子径

LiposomeB について、組成は同一だが粒子径の異なるものを3種類合成してもらい、最適粒子径の決定を行った。各粒子径は、Table 6-2 に示した。

Table 6-2 LiposomeB の粒子径

	LARGE	MIDDLE	SMALL
粒子径〔nm〕	180.9	148.0	70.5

導入手順、標的遺伝子は6.2.1.と全く同様に行った。また、Liposome と siRNA の最適混合比率が変化しないことを確認するために、protocol 通りの Liposome 4 μM に加えて、Liposome 2 μM での検討も行った (Fig. 6-17、6-18)。

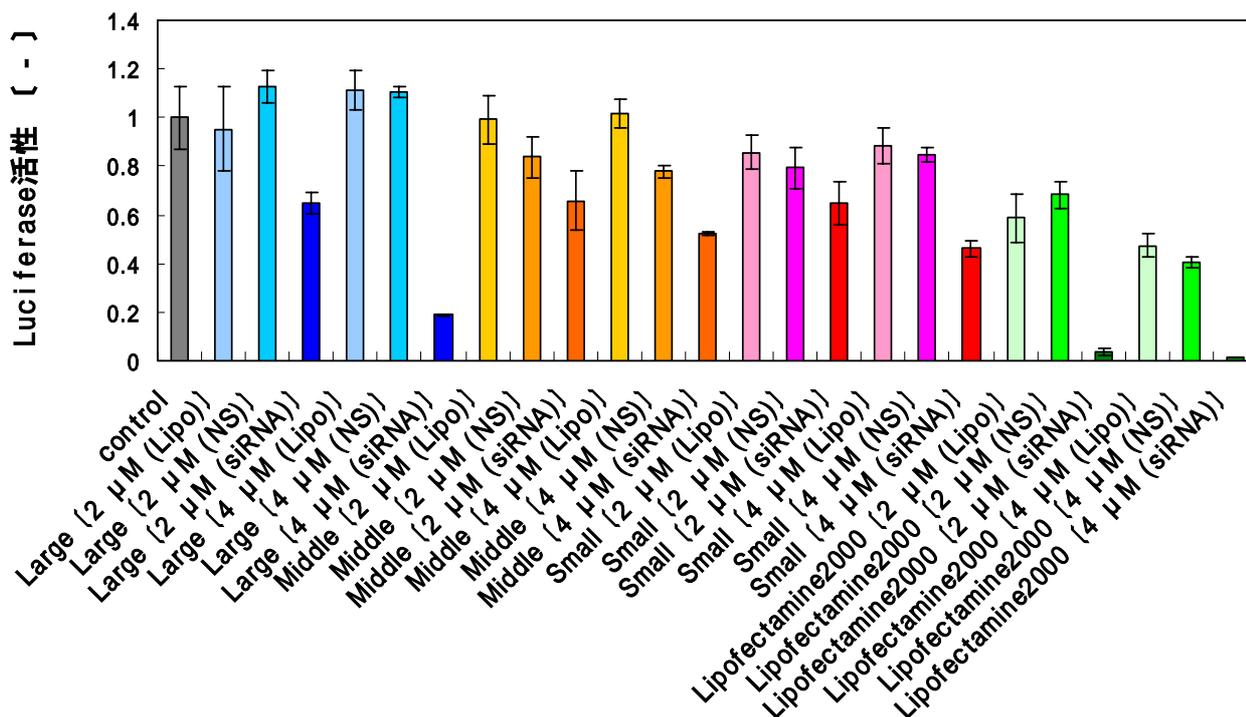


Fig. 6-17 粒子径の異なる LiposomeB を用いた遺伝子発現抑制

(S.D.= 3 well の平均 ± 標準偏差)

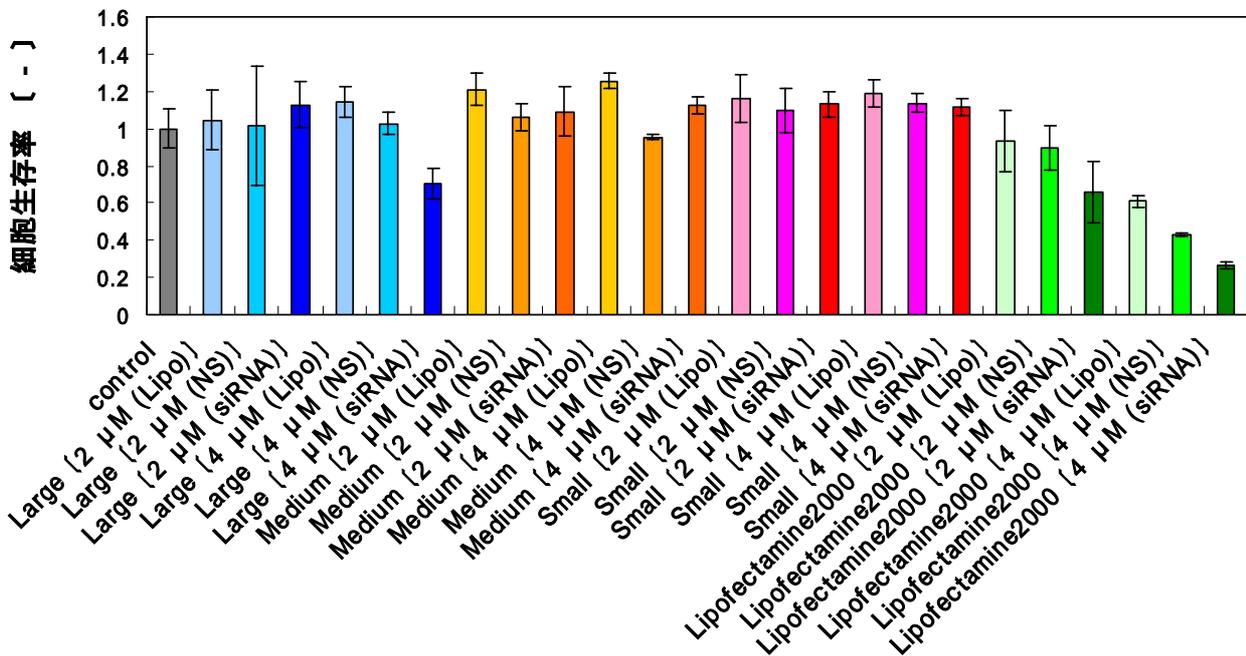


Fig. 6-18 粒子径の異なる LiposomeB を用いた遺伝子発現抑制時の細胞生存率  
(S.D.= 3 well の平均 ± 標準偏差)

この実験の結果、Lipofectamine2000 の導入効率が最もよかった。Lipofectamine2000 のプロトコルでは Liposome は 2 μM であったため、4 μM の毒性は予想されたものだった。しかし、プロトコル通りであっても Lipofectamine2000 は細胞が若干弱っていたり、細胞数が少なかったりすると強い毒性を示すという問題点も露呈された。また、粒子径の違う Liposome の中では、Large Liposome の導入効率が最も優れていた。Large Liposome は Lipofectamine2000 と比較して、格段に毒性が低く、導入試薬として非常に優れていることが示された。

提供された Liposome は、*in vivo* 用として開発されたものであり、6.2.4.の結果は、あくまで *in vitro* のものに過ぎないため、*in vivo* でも同様の実験を行う必要がある。だが、腹腔は構造上、*in vitro* と類似したコンパートメント状態であるため、同じような傾向の結果が得られる可能性が高いと考え、*in vitro* の実験結果を踏襲するかた

ちで、*in vivo* 導入実験に移行した。

### 6.3. 腹腔内卵巣がん細胞への核酸導入法の検討

*in vitro* における結果を踏まえて、卵巣がん腹膜播種モデルマウスを用いた腹腔内核酸投与の最適条件の決定を行った。

#### 6.3.1. Liposome 量の決定

Liposome-siRNAのcomplexの毒性は、Liposomeの濃度に依存する<sup>[1]</sup>。また、cation性が高ければ高いほど毒性が強くなり、毒性を出さないようにするためには、siRNAの比率を増やし中性に近づけることが大事だが、中性に近づくにつれてcomplexは凝集しやすくなる<sup>[2]</sup>。さらに、LiposomeとsiRNAの比率やLiposomeの最適量は、挿入を行う臓器によって異なる上、臓器ごとの明確な数値はいまだ明らかになってはいない。

そこで、*in vivo* 実験では、Liposomeの最大量を決定するために、10、30、60 nmolの3つの濃度のLarge-Liposomeを、卵巣がん細胞株を植え付けたnudeマウスの腹腔内に注入し最大量を決定するとともに、Protocol通りのsiRNA:Liposome比1:100でNon SpecificのsiRNA(100、300、600 pmol)とLiposome(10、30、60 nmol、Large)のcomplexを作成し、腹腔内に注射し、48時間後にimaging装置で腹腔内のLuciferaseの発現量を確認することにより、毒性の有無を検討した(Fig. 6-19)。

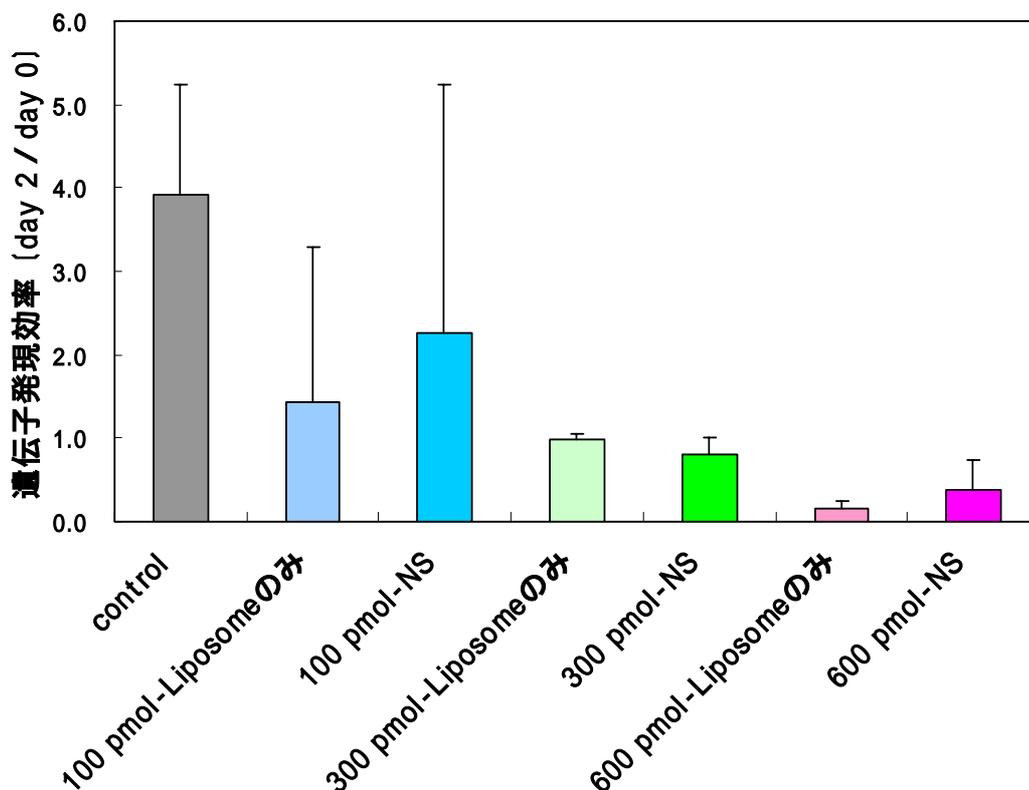


Fig. 6-19 腹腔内の Liposome 毒性評価

( 数値は siRNA の量、Liposome のみの場合は、数値の量の siRNA を transfection する場合に必要な Liposome 量、n = 2 )

Fig. 6-19 で 600 pmol の siRNA を transfection する場合に必要な Liposome ( 60 nmol ) を注射すると、毒性が強すぎ、細胞数の減少が確認された。そのため、毒性が若干軽減され、細胞数の減少が見られなくなった 30 nmol を Liposome 最大量と決定した。

### 6.3.2. Liposome 粒子径の検討

6.3.1. で Liposome の最大量を決定したので、次にその量でどの粒子径の Liposome が最も導入効率が優れ、かつ毒性を示さないか検討を行った。

6.2.4. で *in vitro* での評価を行った Large、Middle、Small の 3 種類の粒子径を持つ Liposome をそれぞれ 30 nmol、Luciferase siRNA および Non Specific siRNA を 300 pmol ( Liposome : siRNA = 100 : 1 ) で complex を作り、腹腔内に注射し、48

時間後に imaging 装置で腹腔内の Luciferase 発現量を測定することで、毒性の有無を検討した (Fig. 6-20)。

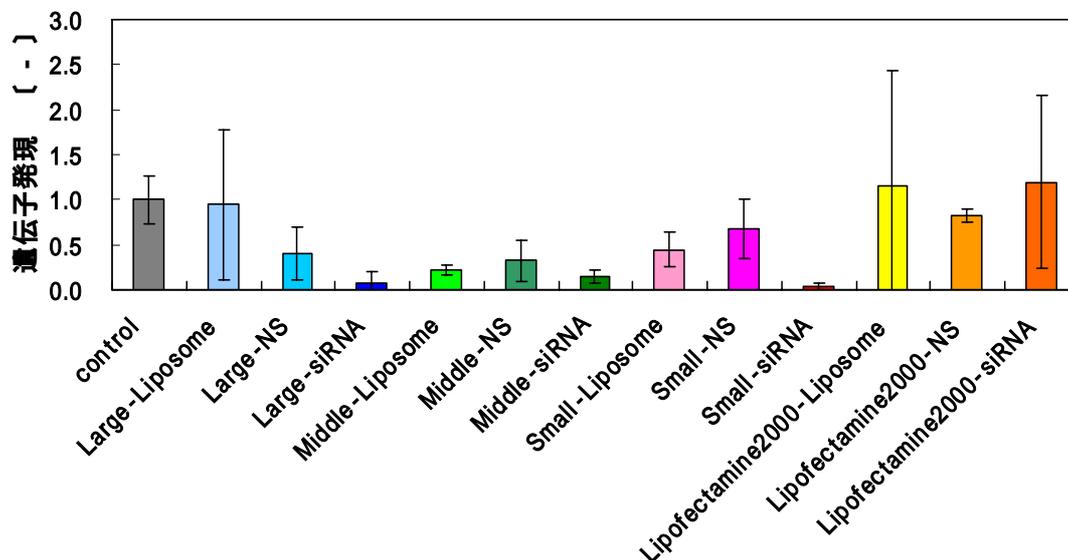


Fig. 6-20 粒子径の異なる LiposomeB を用いた遺伝子発現抑制 (腹腔内)

( n = 3 )

この結果、Middle と Small の Liposome を導入した mouse では、Liposome のみでも、遺伝子発現の低下が見られた。これは、Liposome の細胞毒性により、細胞が死んだことで Luciferase 活性が下がったと考えられる。それに対し、Large では、Liposome のみでは Control と殆ど同等の遺伝子発現を示し、細胞生存に影響を与えるような毒性がないことが明らかになった。よって、今後の実験では、Large-Liposome に絞って、動物実験を行うこととした。

また、*in vitro* において強い毒性を示した Lipofectamine2000 は、*in vivo* では毒性がなかったが、siRNA と Lipofetamine2000 の complex を導入したものでも、全く遺伝子発現の減少が見られなかったことから、腹腔内での核酸導入能力を持たないことが示唆された。

### 6.3.3. 個体数を増やした検討

6.3.2. で、最適な Liposome 粒子径が決定したので、Large-Liposome と Lipofectamine2000 に絞り込み、6.3.2. と全く同じ条件で個体数を増やしてより詳細な検討を行った ( Fig. 6-21 )。

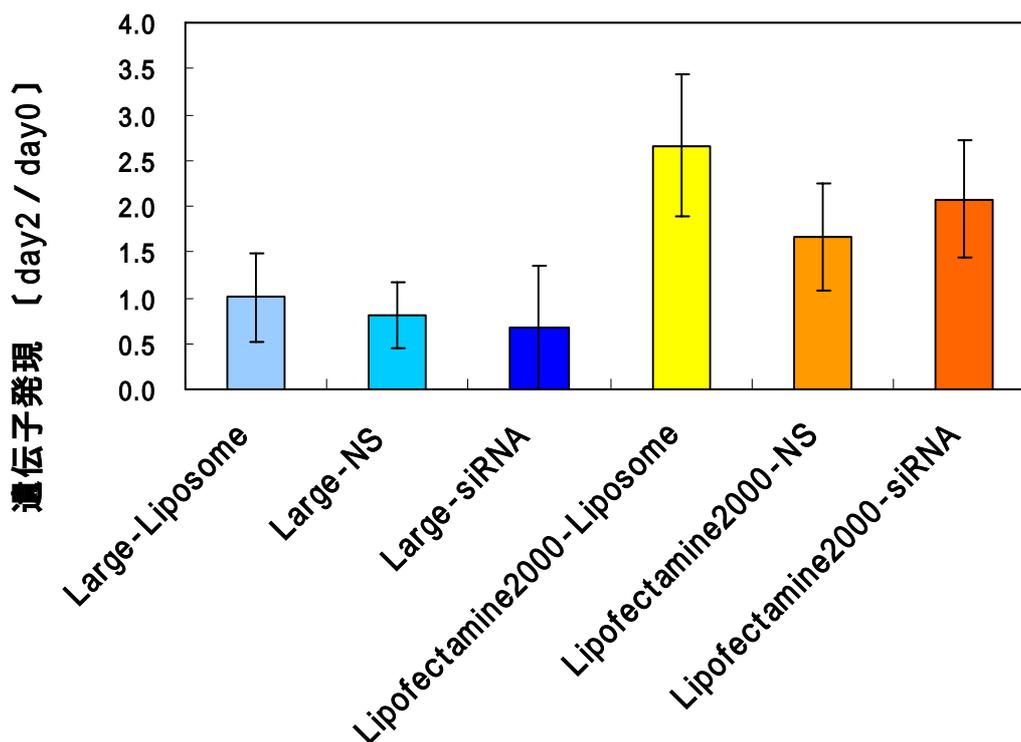


Fig. 6-21 腹腔内の遺伝子発現抑制 ( n = 7 )

Fig. 6-21 より、やはり Lipofectamine2000 には、腹腔内での核酸導入能力がないことが明らかになった。

また、Large-Liposome は、遺伝子発現抑制効果は示すものの、Non Specific と大きな効果の差は見られなかった。また、個体差によるばらつきも大きく、Liposome と siRNA の complex の Charge が Cation 性に傾きすぎているために毒性が出ているのではないかと考えられたため、complex の Charge を中性に近づけて、腹腔内核酸導入実験を行うこととした。

#### 6.3.4. Complex の Charge を変化させた検討

これまでの実験では、Liposome ( Large ) を 30 nmol、siRNA を 300 pmol ( Liposome : siRNA = 100 : 1 ) で complex を作り、腹腔内導入実験を行ってきたが、Complex の Charge を中性に近づけるため、Liposome を 30 nmol、siRNA を 600 pmol ( Liposome : siRNA = 50 : 1 ) とした混合率の異なる complex を作製し、核酸導入実験を行ったところ、今までなかった complex の凝集が起こった ( Fig. 6-22 )。

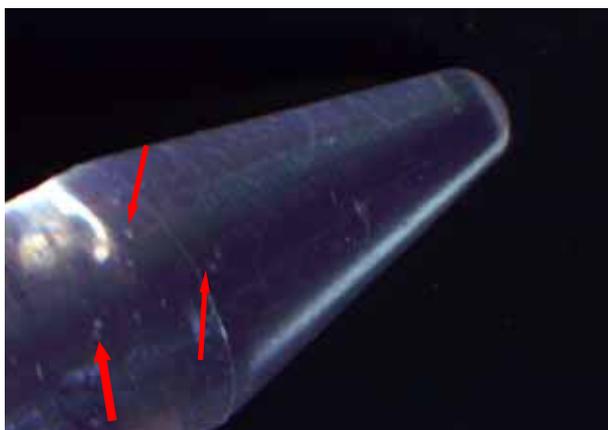


Fig. 6-22 Charge を変化させたために起きた Complex の凝集

中性に近づいたために、complexの凝集が引き起こされたと考えられた<sup>[3]</sup>が、中性に近づいたために起こる凝集は導入効率への影響はなく、また凝集が起こったとしても、注射針を通らなくなるほどの強い凝集ではないため腹腔内局所投与を行うことが可能であると判断し、凝集したままのcomplexを腹腔内へ導入し、imaging装置にてLuciferase活性の測定を行った。( Fig. 6-23、6-24 )。

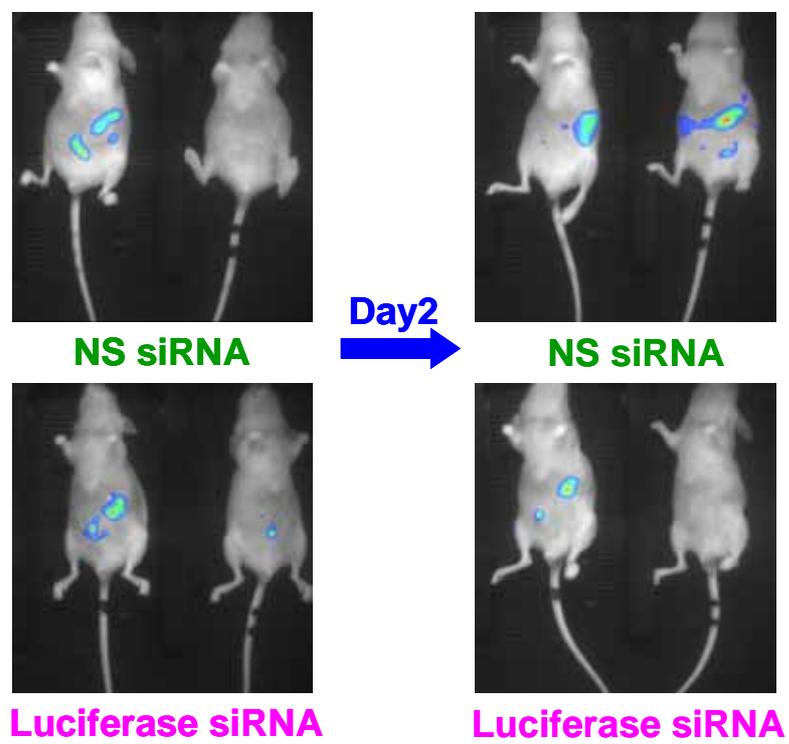
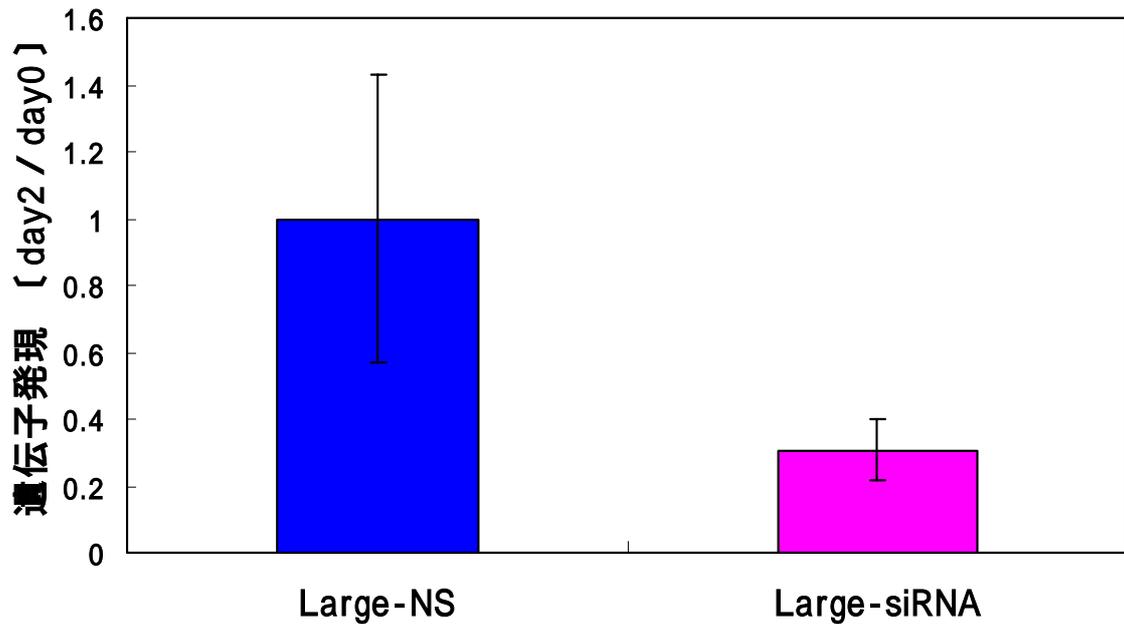


Fig. 6-23 腹腔内遺伝子発現抑制の imaging 画像  
 ( siRNA 導入日とその 2 日後に腹腔内の Luciferase 活性を測定 )



**Fig. 6-24 Charge を変化させた腹腔内遺伝子発現抑制**

( n = 6、Large Liposome を用いて導入、 p = 0.0032 )

Fig. 6-23 を見ると、Non Specific siRNA のグループでは siRNA 導入 2 日後の Luciferase 活性は増加しているが、Luciferase siRNA を導入したグループでは減少が見られる。Complex が中性に近づいた結果、今まで complex の毒性による細胞死のために引き起こされていた遺伝子発現の減少がなくなり、Non Specific siRNA のグループと Luciferase siRNA のグループとの間に遺伝子発現抑制自体による差が表れたと考えられ、この条件による腹腔内拡散導入が最適ではないかと結論付けた。

### 6.3.5. 核酸導入確認（免疫染色）

腹腔内の腫瘍を 5.8.に示した方法で回収し、5.12.4.に記した方法でLuciferaseの免疫染色を行った。また、染色された腫瘍塊の解析方法は同様の実験を行っている論文の方法に従った<sup>[4]</sup> ( Fig. 6-25、6-26、Table 6-3 )

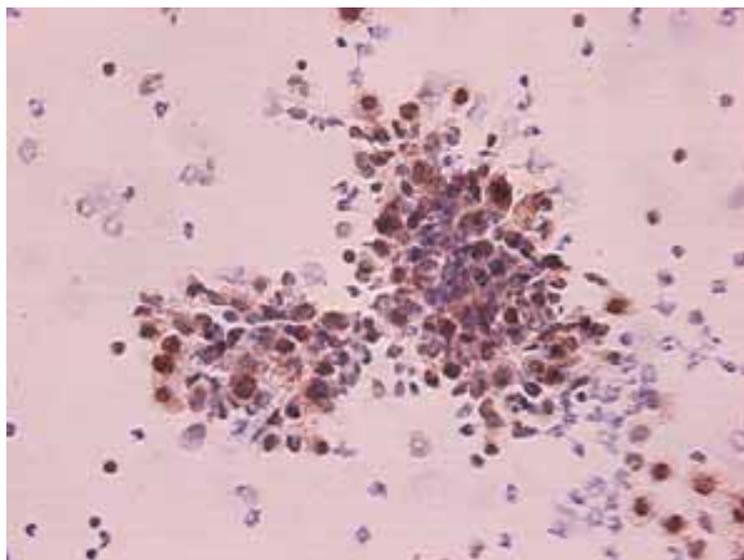


Fig. 6-25 Luciferase が強発現している腫瘍塊

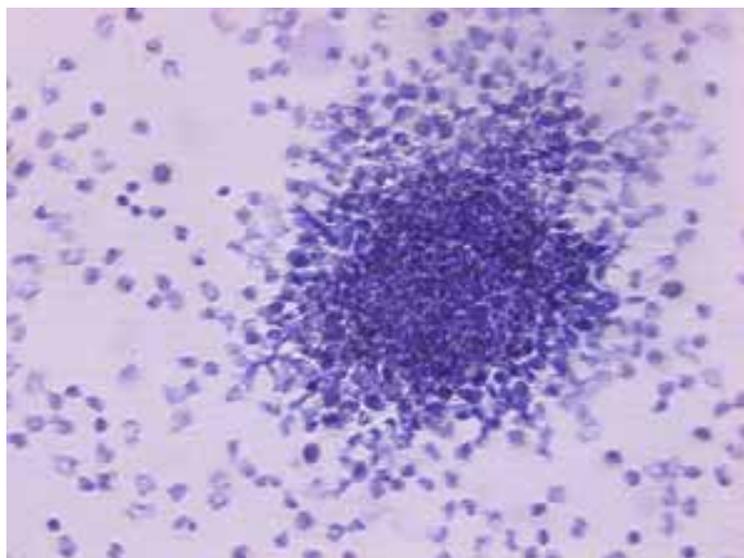


Fig. 6-26 Luciferase が発現のない腫瘍塊

Table 6-3 染色された Luciferase 腫瘍塊数

		総腫瘍塊数	80%以上	50~80%	10~50%	10%以下
NS	1	10	7	3	0	0
	2	4	2	2	0	0
	3	4	1	3	0	0
siRNA	1	15	0	5	5	5
	2	19	1	10	6	2
	3	5	0	2	3	0

Table 6-3に基づいて、Non Specific群とLuciferase siRNA群を $X^2$ 検定したところ、 $p < 0.0001$  という結果が得られた。

## 6.4. RecQ による殺細胞効果の検証

### 6.4.1. 各卵巣がん細胞株の RecQ1 発現確認

本研究では、RecQ1 の遺伝子発現を抑制することによる殺細胞効果検討を行ったため、細胞株から RecQ1 が発現していることが大前提となるので、RecQ1 の発現を mRNA レベル (RT-PCR) とタンパクレベル (Western Blot) で確認した。RT-PCR の結果を Fig. 6-27 に、Western Blot の結果を Fig. 6-28 に示す。

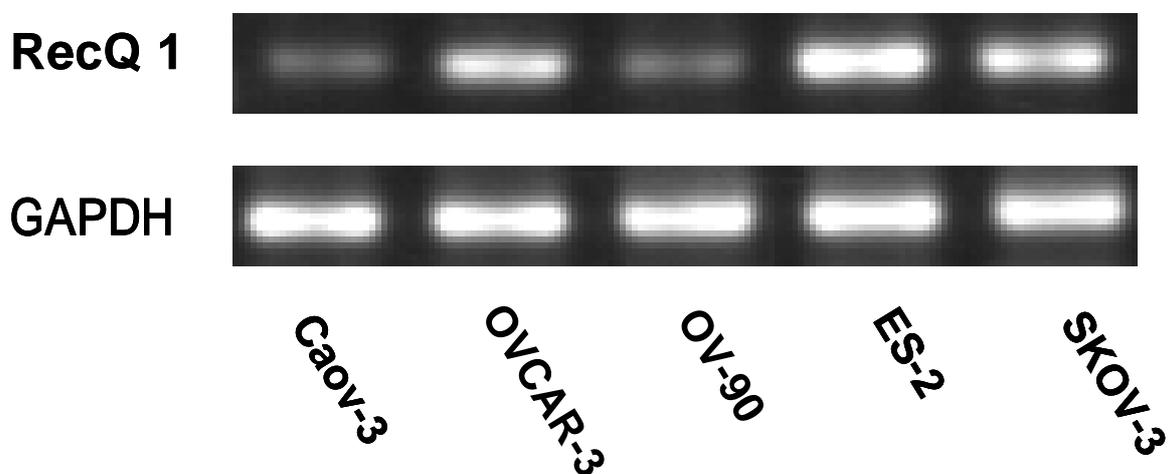


Fig. 6-27 各卵巣がん細胞株における RecQ1 発現 (mRNA)

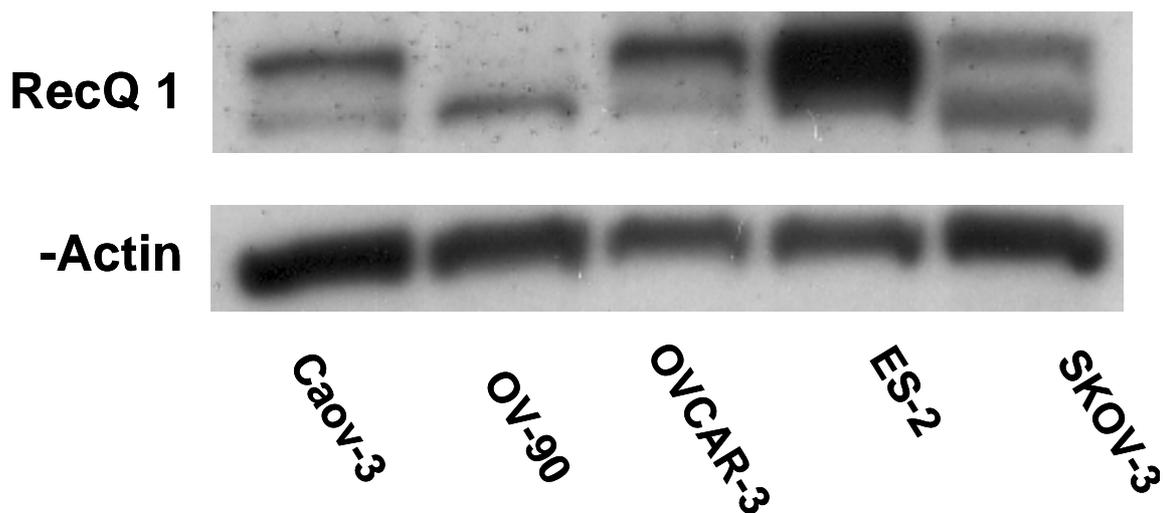


Fig. 6-28 各卵巣がん細胞株における RecQ1 発現 (タンパク)

Fig. 6-27、6-28 より、発現量は細胞によって異なるが、5種類全ての卵巣がん細胞株において、RecQ1 の発現が確認できた。また、タンパクの解析で見られた二本のバンドは RecQ1 とその異性体であると考えられた。

#### 6.4.2. RecQ1 siRNA による遺伝子発現抑制

株式会社ジーンケア研究所から提供された RecQ1 siRNA を用いて、各卵巣がん細胞株の RecQ1 遺伝子発現抑制効果を確認した (Fig. 6-29)。また、RecQ1 siRNA の導入実験は、第一製薬から Cationic Liposome を提供される以前に行ったため、全ての導入実験は市販されている導入試薬の中で最も導入効率が優れていた Lipofectamine2000 を用いて行った。

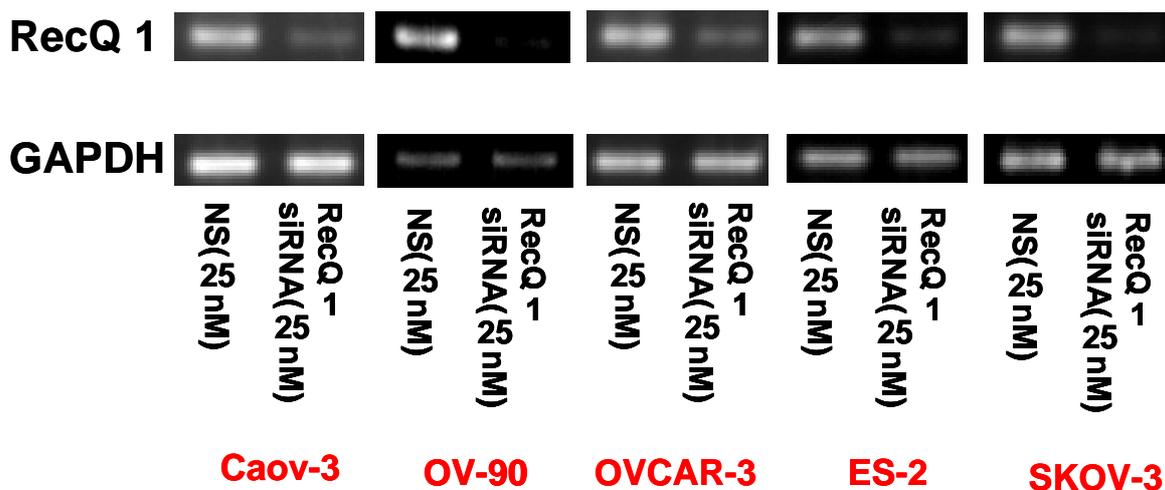


Fig. 6-29 RecQ1 siRNA 導入による遺伝子発現抑制

この結果、どの卵巣がん細胞株においても、RecQ1 siRNA は遺伝子発現抑制効果を示した。

### 6.4.3. RecQ1 発現抑制による殺細胞効果

ジーンケア研究所株式会社から提供された RecQ1 siRNA が遺伝子発現を確実に抑制することが確認されたため、RecQ1 の遺伝子発現抑制による殺細胞効果の有無を MTT assay により検討した ( Fig.6-30 ~ 6-34 )。

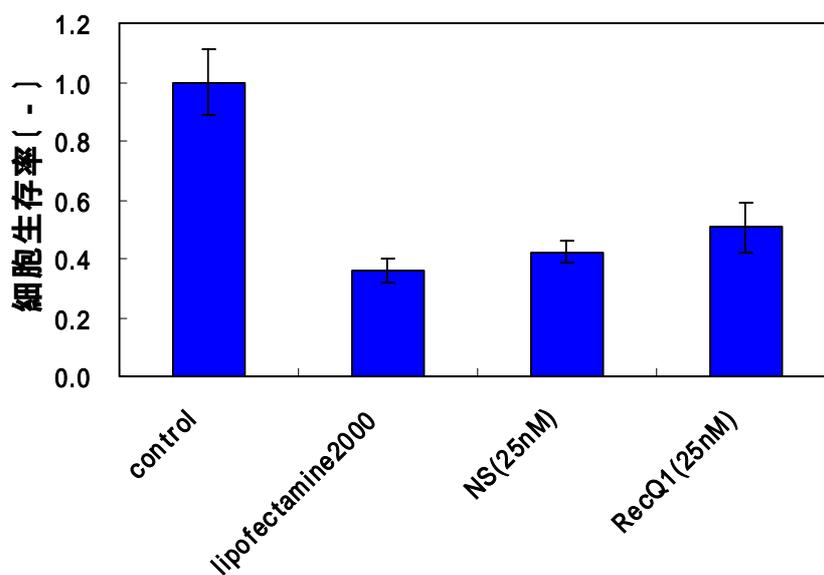


Fig. 6-30 Caov-3 細胞株の RecQ1 発現抑制による殺細胞効果

(( ) 内は siRNA の濃度、NS = Non Specific siRNA、RecQ1 = RecQ1 siRNA、

S.D.= 3 well の平均 ± 標準偏差)

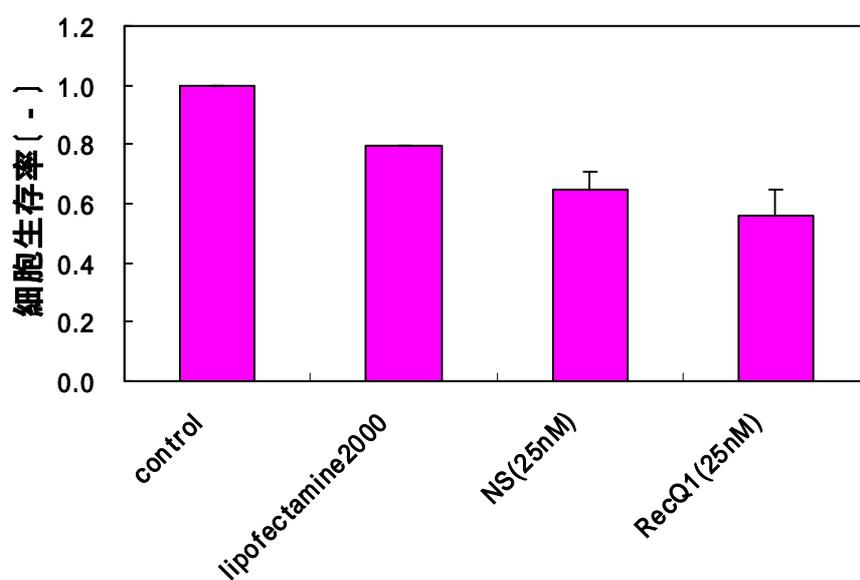


Fig. 6-31 OV-90 細胞株の RecQ1 発現抑制による殺細胞効果  
(S.D.= 3 well の平均 ± 標準偏差)

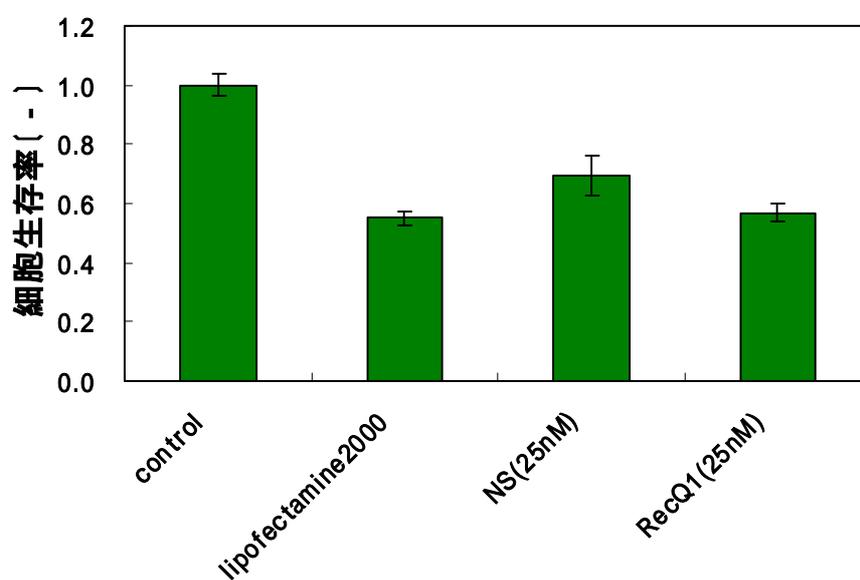


Fig. 6-32 OVCAR-3 細胞株の RecQ1 発現抑制による殺細胞効果  
(S.D.= 3 well の平均 ± 標準偏差)

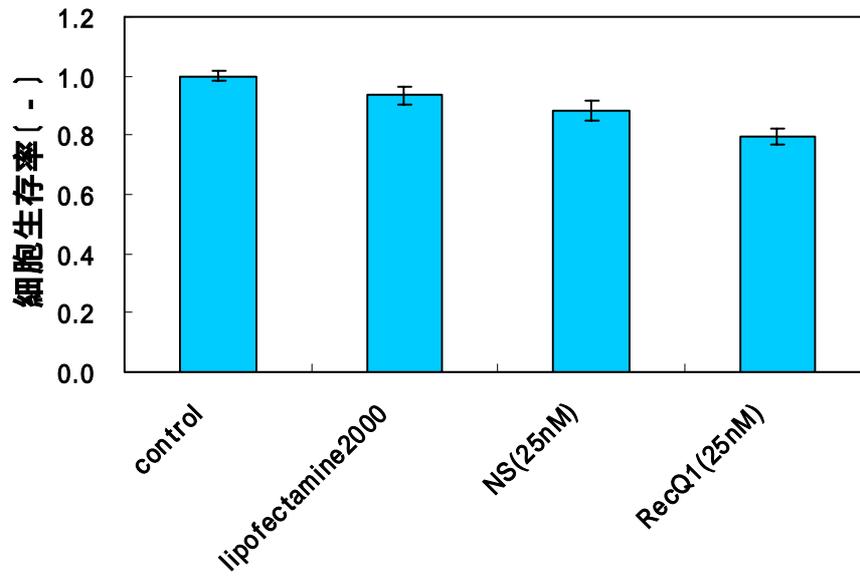


Fig. 6-33 ES-2 細胞株の RecQ1 発現抑制による殺細胞効果  
(S.D.= 3 well の平均 ± 標準偏差)

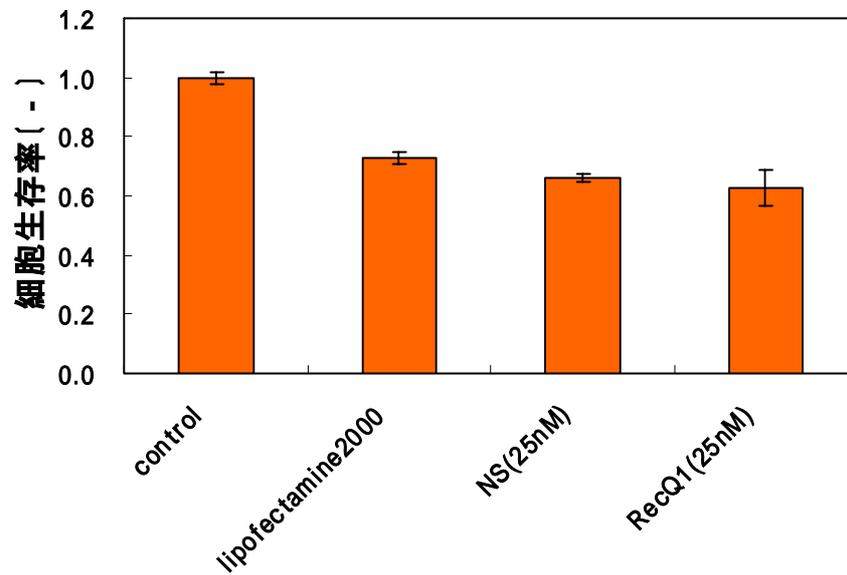


Fig. 6-34 SKOV-3 細胞株の RecQ1 発現抑制による殺細胞効果  
(S.D.= 3 well の平均 ± 標準偏差)

以上の結果より、RecQ1 の発現を単独で抑えても殺細胞効果は確認できなかった。そ

ここで、卵巣がんの化学療法に用いられている薬剤との併用効果の検討を行うこととした。

#### 6.4.4. 各卵巣がん細胞株に対する抗がん剤の効果

まず、卵巣がんの治療によく用いられているCisplatin ( Fig. 6-35 ) とDoxorubicin ( Fig. 6-36 ) を用いて、各卵巣がん細胞株に対する効果をMTT assayにて調べ、IC<sub>50</sub> ( Table 6-4 ) を割り出した。

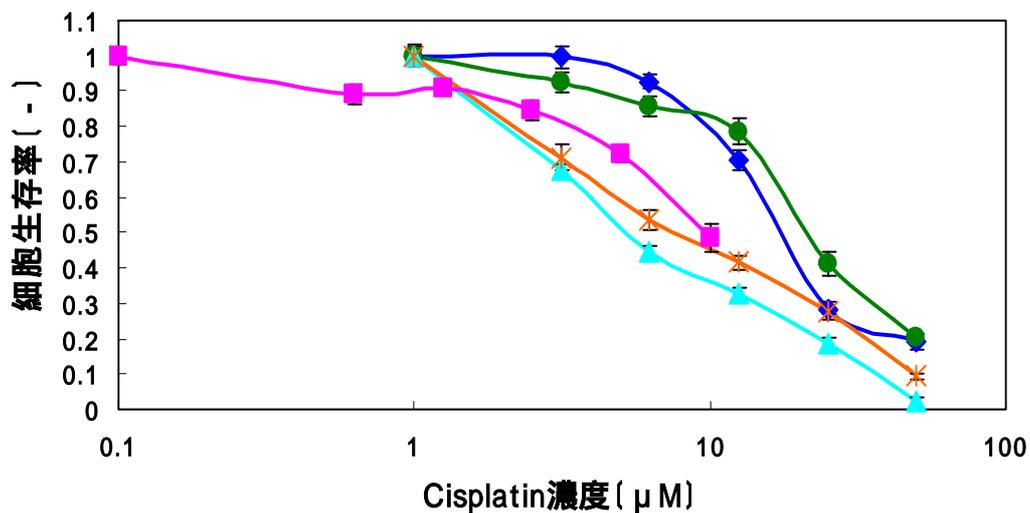


Fig. 6-35 各卵巣がん細胞株に対する Cisplatin の殺細胞効果

( □ : Caov-3、○ : OV-90、△ : OVCAR-3、◇ : ES-2、\* : SKOV-3、  
S.D.= 3 well の平均 ± 標準偏差 )

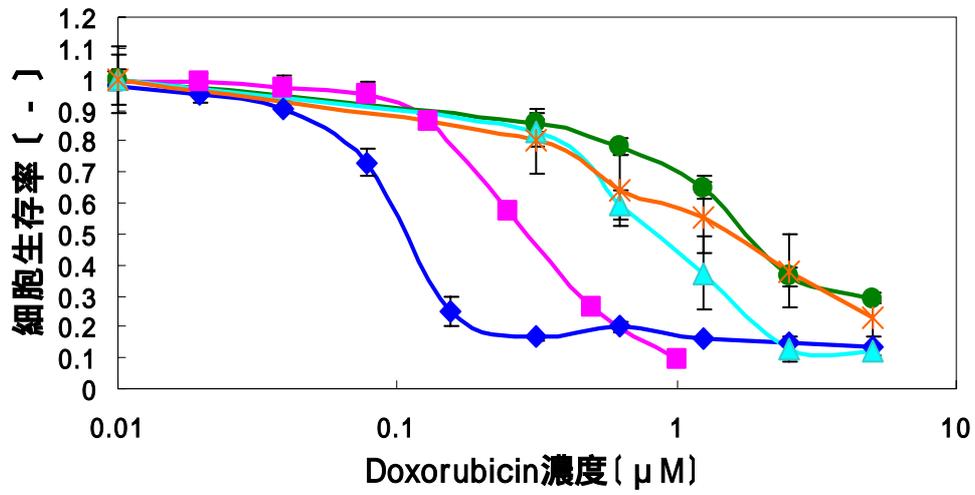


Fig. 6-36 各卵巣がん細胞株に対する Doxorubicin の殺細胞効果

( : Caov-3、 : OV-90、 : OVCAR-3、 : ES-2、 \* : SKOV-3、  
S.D.= 3 well の平均 ± 標準偏差)

Table 6-4 各薬剤におけるIC<sub>50</sub>

	細胞名	IC <sub>50</sub> (μg/ml)
Cisplatin	Caov-3	17.44
	OV-90	9.58
	OVCAR-3	21.22
	ES-2	5.03
	SKOV-3	7.74
Doxorubicin	Caov-3	0.11
	OV-90	0.29
	OVCAR-3	1.79
	ES-2	0.84
	SKOV-3	1.54

以上のように、抗がん剤の効果を確認した上で、RecQ1 siRNA 導入との併用を行った。

#### 6.4.5. RecQ1 siRNA 導入と抗がん剤との併用効果

前述したように、RecQ1 の発現を抑制することで、抗がん剤の効果を増強できるか否か検討を行った ( Fig. 6-37 ~ 6-46 )。

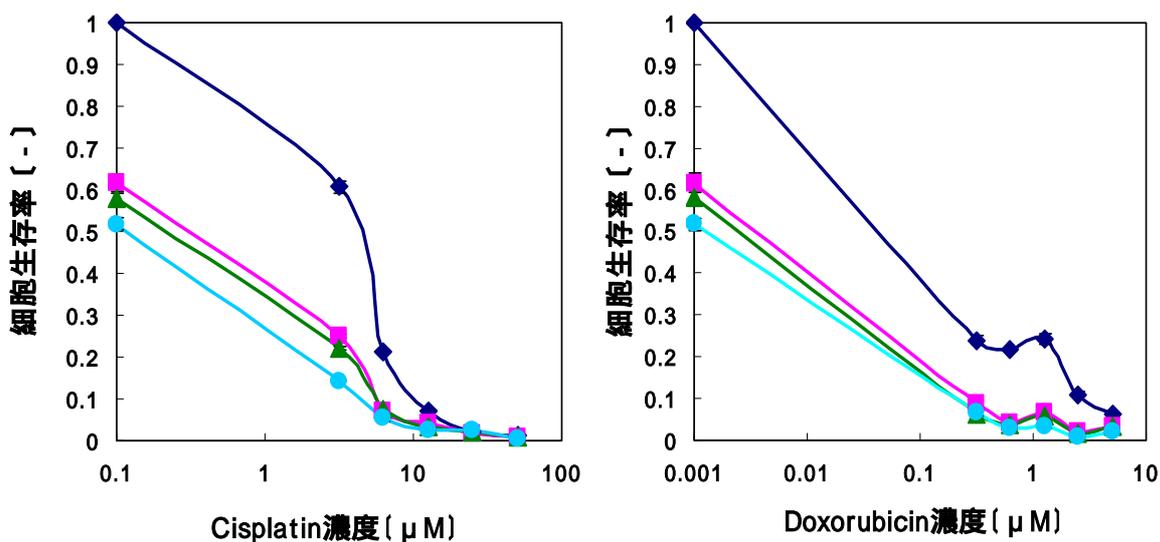


Fig. 6-37、6-38 Caov-3 卵巣がん細胞株における RecQ1 siRNA と  
抗がん剤の併用効果

( : 抗がん剤のみ、 : 抗がん剤 + Lipofectamine2000、 : 抗がん剤 + NS ( 25 nM )  
: 抗がん剤 + RecQ1 siRNA ( 25 nM ) S.D.= 3 well の平均 ± 標準偏差 )

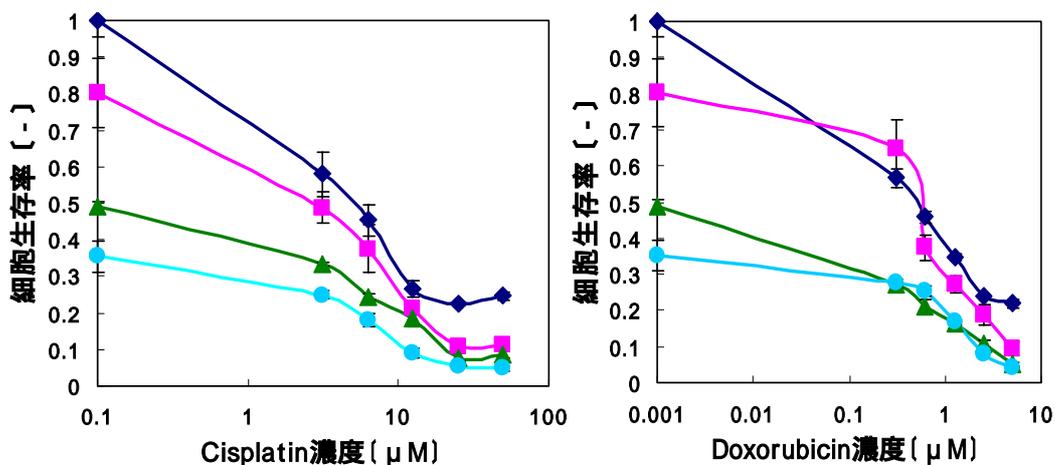


Fig. 6-39、6-40 OV-90 卵巣がん細胞株における RecQ1 siRNA と  
抗がん剤の併用効果 ( S.D.= 3 well の平均 ± 標準偏差 )

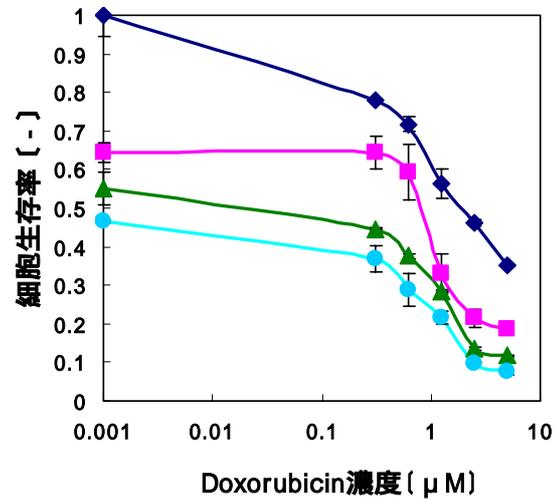
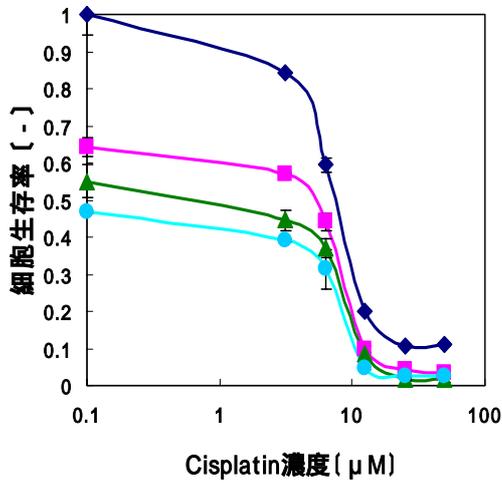


Fig. 6-41、6-42 OVCAR-3 卵巣がん細胞株における RecQ1 siRNA と  
抗がん剤の併用効果 (S.D.= 3 well の平均 ± 標準偏差)

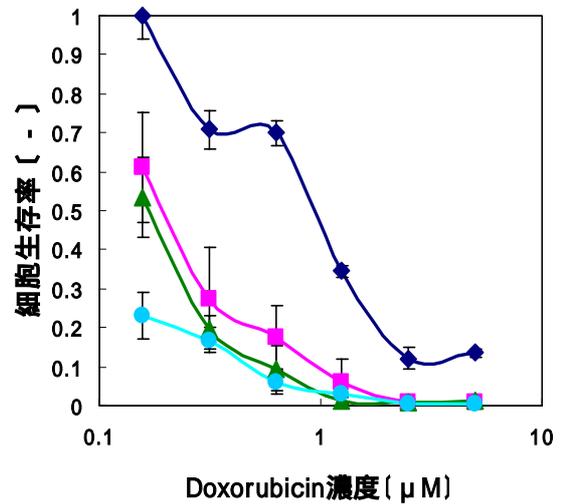
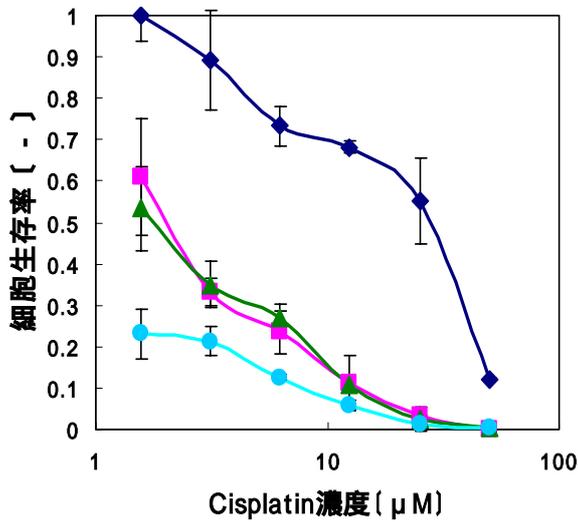


Fig. 6-43、6-44 ES-2 卵巣がん細胞株における RecQ1 siRNA と抗がん剤の併用効果  
(S.D.= 3 well の平均 ± 標準偏差)

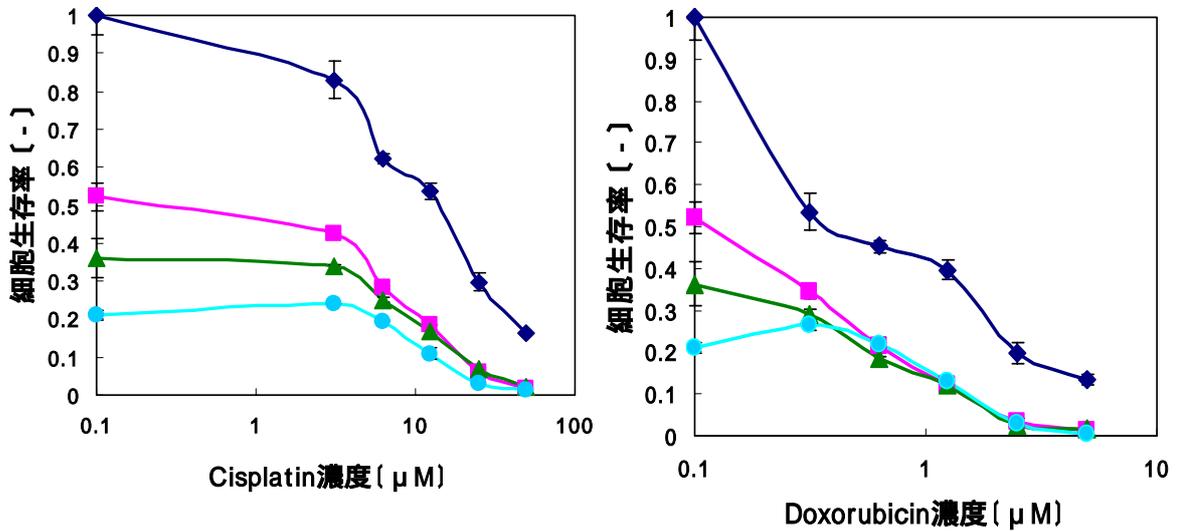


Fig. 6-45、6-46 SKOV-3 卵巣がん細胞株における RecQ1 siRNA と  
抗がん剤の併用効果 (S.D.= 3 well の平均 ± 標準偏差)

Fig. 6-37 ~ Fig. 6-46 より、抗がん剤と RecQ1 siRNA を併用することによって、抗がん剤の効果を増強する顕著な結果は得られなかった。また、薬剤との併用により細胞が弱ったため、Lipofectamine2000 の毒性が顕著に表れてしまい、Non Specific siRNA と RecQ1 siRNA の効果の差がわかりにくくなってしまった。

#### 6.4.6. RecQ Family siRNA による殺細胞効果

DNA 修復やゲノムの安定化には、RecQ1 だけでなく、RecQ Family 全体がかかわっている可能性が指摘されるため、RecQ Family 5 種の siRNA を混合したものを細胞に導入することによる殺細胞効果の検討を、卵巣がん細胞株 ES-2 において行った (Fig. 6-47)。

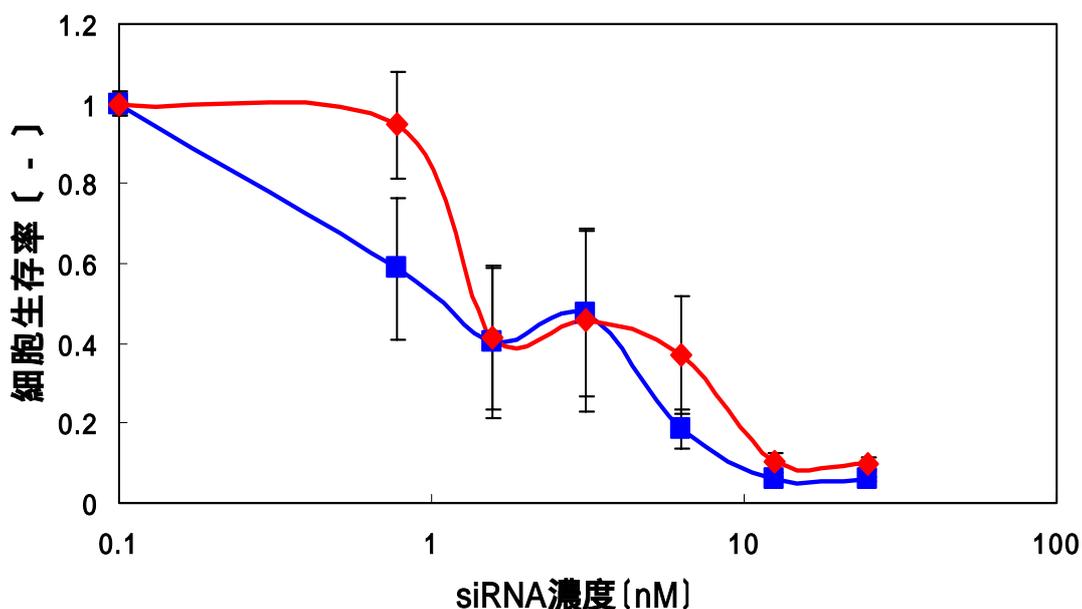


Fig. 6-47 RecQ Family siRNA 5 種類混合導入時の殺細胞効果

( : NS、 : RecQ Family siRNA 5 種混合(1 種類の濃度は siRNA 濃度の 1 / 5)  
S.D.= 3 well の平均 ± 標準偏差)

この実験では、RecQ1 Family siRNA 5 種混合の細胞生存率の方が Non Specific siRNA よりも高い傾向が見られ、5 種混合したことによる殺細胞効果の増強は確認できなかった。

## 6.5. EGFR による殺細胞効果の検証

### 6.5.1. ES-2 細胞株の EGFR 発現確認

本研究では、まず EGFR が卵巣がん細胞株 ES-2 で発現しているかどうかの確認を、mRNA レベル (RT-PCR) とタンパクレベル (Western Blot) で行った。RT-PCR と Western Blot の結果を Fig. 6-48 に示す。

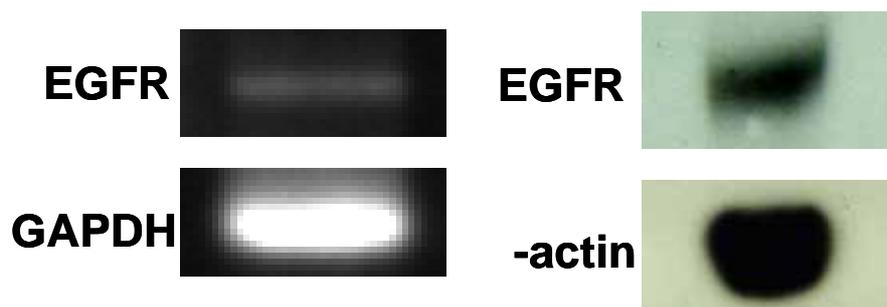


Fig. 6-48 ES-2 細胞株における EGFR の発現確認  
(左が RT-PCR の結果、右は Western Blot の結果)

この結果、ES-2 細胞での EGFR の発現が確認できたため、siRNA による殺細胞効果の検討を行うこととした。

### 6.5.2. EGFR 遺伝子発現抑制による殺細胞効果の検討

Ambion ( Applied Biosystems ) から購入した 2 種類の siRNA を *in vitro* において ES-2 細胞株に導入し、殺細胞効果の検討を行った ( Fig. 4-49 )。

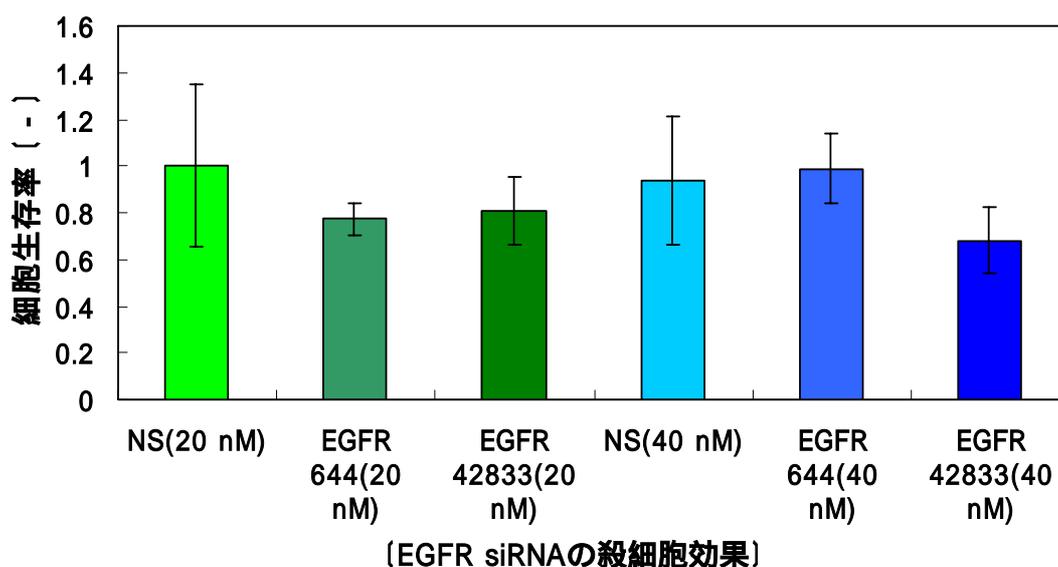


Fig. 6-49 EGFR siRNA の殺細胞効果

(数字は、EGFR siRNA の製品番号、( ) 内の数字は siRNA の濃度、  
S.D.= 3 well の平均 ± 標準偏差)

この実験の結果、EGFR siRNA による顕著な殺細胞効果は見られなかったが、siRNA の遺伝子発現抑制効果が十分でなかった可能性がある。検討に用いた 2 種類の EGFR 以外にも数種類の EGFR siRNA が市販されているため、それらを用いて今後も検討を重ねていく必要があると考える。

## 6.6. KNTC2 による殺細胞効果の検証

### 6.6.1. KNTC2 発現確認及び遺伝子発現抑制

KNTC2 が卵巣がん細胞株 ES-2 から発現しているかどうかの確認とジーンケア研究所株式会社から提供された KNTC2 siRNA の *in vitro* における遺伝子発現抑制効果 (Transfection48 時間後) の検討を、Real Time PCR にて行った (Fig. 6-50)。

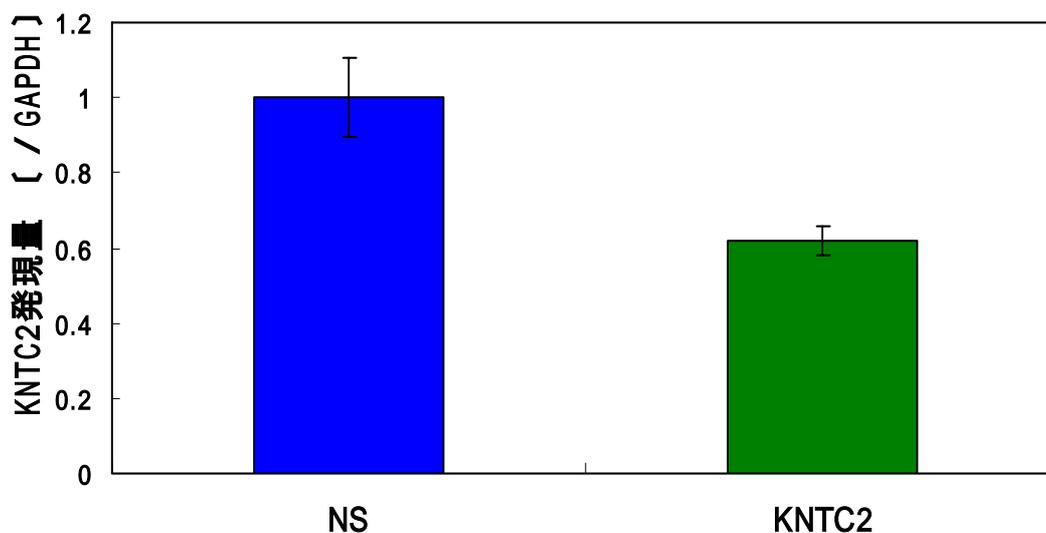


Fig. 6-50 KNTC2 siRNA の遺伝子発現抑制効果 (siRNA の濃度は 40 nM)

この実験の結果、以前同社から提供された RecQ1 siRNA よりも遺伝子発現抑制効果が悪いことが明らかになった。RNAi 効果として、遺伝子発現抑制しやすい遺伝子とそうでない遺伝子があることが知られている。これは、遺伝子の代謝速度や二次構造、などが関わっているのではないかと考えられているが、詳細は未だ不明のままである。次に、この程度の発現抑制抑制が細胞生存にどのような影響を及ぼすか、検討を行った。

### 6.6.2. KNTC2 遺伝子発現抑制による殺細胞効果の検討

*in vitro* において、ES-2 細胞株に KNTC2 siRNA を、Large Liposome を用いて導入し、96 時間後の殺細胞効果の検討を行った ( Fig. 6-51 )。

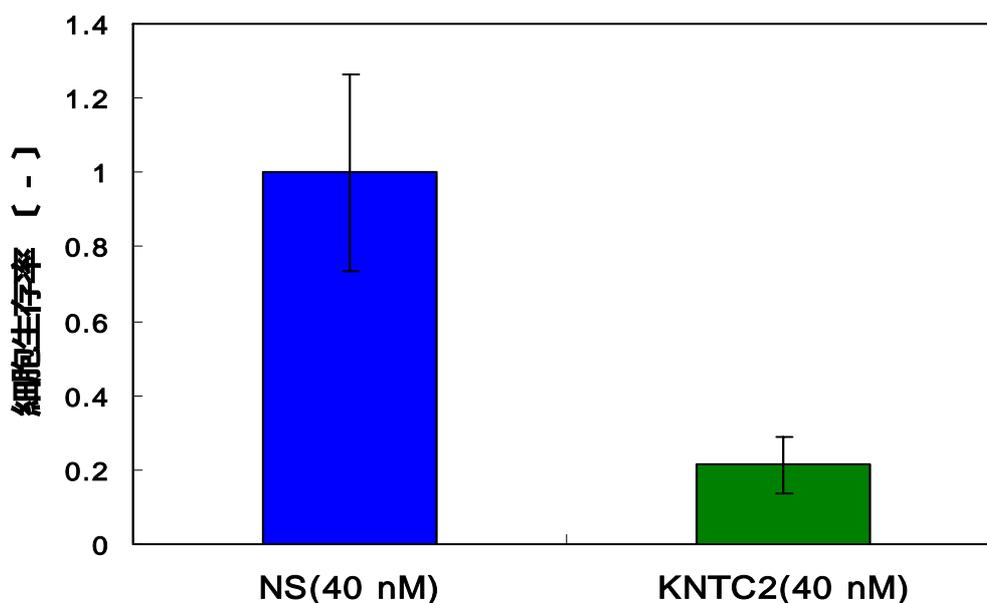


Fig. 6-51 KNTC2 siRNA の殺細胞効果( ( ) 内の数字は siRNA の濃度)

Fig. 6-50 では、遺伝子発現抑制効果は決して強いものではなかった。しかし、KNTC2 の発現抑制により、強い殺細胞効果が示された。これは、KNTC2 の発現抑制が、細胞に致命的な影響を与えるものだということを示唆している。この結果を踏まえて、KNTC2 siRNA による、卵巣がん腹膜播種モデルの腹腔内治療実験を行うこととした。

### 6.6.3. KNTC2 遺伝子発現抑制による腹腔内抗腫瘍効果の検討

5.6.1.の方法にしたがって、KNTC2 siRNA による腹腔内遺伝子発現抑制を行い、抗腫瘍効果の有無を検討した (Fig. 6-52)。

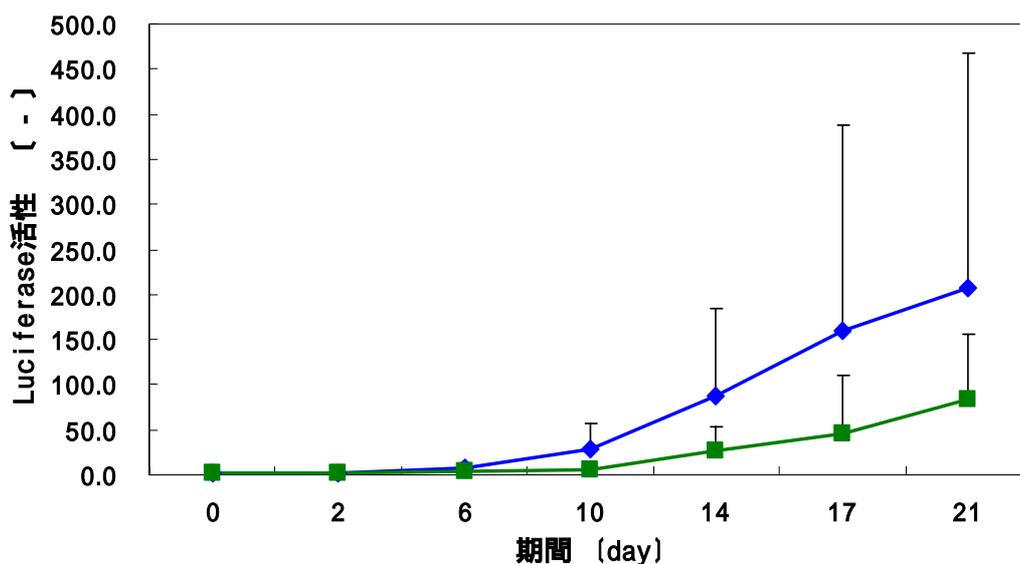


Fig. 6-52 KNTC2 siRNA の抗腫瘍効果

( が Non Specific siRNA、 が KNTC2 siRNA、 n = 5 )

KNTC2 siRNA による腹腔内抗腫瘍効果の検討においては、抗腫瘍効果が示唆されたが、有意差は示されなかった。

## 第 7 章

## 考察

## 7.1. 卵巣がん腹膜播種モデルマウスの作製

5種の卵巣がん細胞株を用いて、卵巣がん腹膜播種モデルマウスの作製を試みた。しかし、腹腔内全体に細胞が広がり、腹水を伴って、腹水中を粒状の細胞塊が漂っている、実際のヒト卵巣がんの腹腔内転移の状態を再現するのはかなり困難であった。そんな中で、ヒト明細胞がん細胞 ES-2 を腹腔内に植え付けたマウスでは、ヒト卵巣がんの腹膜播種状態が的確に再現されており、しかも、非常に簡便な手順でモデルマウスの作製が可能であるため、卵巣がん腹膜播種のモデルマウスとして最適ではないかと考えられる。さらに、ES-2 細胞株を用いたモデルマウスの利点として、腫瘍形成が迅速に行われることがある。モデルマウスの作製から siRNA の導入実験とその評価まで 1 週間で行えることは、動物実験の中では非常に早く、実験手法として優れたものであることを示している。

さらに、Luciferase ベクターを導入した ES-2 細胞を腹腔内に植え付けた腹膜播種モデルは、細胞がどの部位でどのように増殖するかをリアルタイムで可視化できるようにした上で、腹腔内のがん細胞を定量することも可能にした。また、siRNA の導入実験では、細胞内に拡散が導入されきちんと作用しているか否かを数値および画像で確認できた。さらに、細胞状態を確認するためには、今までマウスを解剖するしか方法がなかったが、体外から確認できるため、同一個体を長時間観察し続けることが可能となった。

しかし、本モデルは明細胞がん細胞株を用いているため、今後卵巣がんの半数を占める漿液性腺がんの細胞株によるモデルも作製し、両方のモデルを用いて検討を行ったほうが、より包括的なヒト卵巣がん腹膜播種の治療実験が行えるのではないかと考える。

## 7.2. *in vitro* における Liposome を用いた核酸導入法の検討

*in vitro* での核酸導入効率や毒性は、細胞の撒き方、細胞数などの、導入以前の条件に大きく左右されるため、細胞ごとの最適細胞数や播種の仕方などの条件決めが非常に重要であると考えられる。また、各社の導入試薬で血清の有無による導入効率の違いを比較してみたが、導入効率はさほど減少することはなかった。むしろ毒性が軽減され、導入本来の毒性や効率を比較しやすくなった。

卵巣がん細胞株では、LiposomeB が最も導入効率や毒性の低さの面で優れていたが、これは研究室内の共同研究者が行なった脳腫瘍細胞株や大腸がん細胞株を用いた検討でも同様の結果が示された。しかし、粒子径の大きさの検討で、ES-2 では最も大きい Liposome が *in vitro* での導入に最も優れていたが、他の細胞株では必ずしも同じ結果にはならなかった。これは、Liposome 粒子径と細胞特性や細胞の大きさとの間の相互関係によるものであると考えられる。腹膜播種モデルでは Large が最も優れていたが、脳腫瘍モデルにおいては Small が最も優れているという結果が示されているため、これにはある一定の傾向があるのではないかと思う。また、*in vitro* において siRNA の配列や分子量の違いにより、導入効率や毒性が若干変化するなどなんらかの影響が示唆された。

本研究において、*in vitro* の実験はあくまで *in vivo* 実験のための予備実験という位置づけで行ったものであるが、今後 *in vitro* において、細胞特性と Liposome、siRNA と Liposome の相性を詳細に検討し、傾向を把握しておけば、より効率のよい導入が行え、さらに *in vivo* の条件に合わせて最適な Liposome を合成し、使い分けるなど、さまざまな導入実験の指標となり得るのではないかと思う。

### 7.3. 腹腔内の卵巣がん細胞への核酸導入法の検討

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 の毒性が強くなり、導入条件の再検討を行う必要があった。また、*in vitro* で最も導入効率が高かった Lipofectamine2000 は、*in vivo* の腹腔内では全く siRNA 導入能力がなかった。さらに、粒子径の検討では、*in vitro* と同様に Large Liposome が最も腹腔内への導入に適しているという結果になった。

siRNA と Liposome の割合を *in vitro* では siRNA : Liposome = 1 : 100 (モル比) としたが、anion 性の腹腔内では、Liposome の量が多すぎて Cation 性が強くなり、腹腔内の細胞に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))。そうしたところ、今まで Non Specific siRNA を導入しただけでもおきていた遺伝子発現量の減少が起らなくなり、コントロールのマウスと同様の指数関数的な発現量増加が見られるようになった。

これは、Complex が中性に近づいた結果、今まで Complex の毒性による細胞死のために引き起こされていた遺伝子発現の減少がなくなり、Non Specific siRNA のグループと Luciferase siRNA のグループとの間に遺伝子発現抑制自体による差が表れたと考えられる。また、凝集したことにより、血管を通じて腹腔外に出て行く complex の量が減少し、細胞 1 個あたりに接触できる siRNA の量が増加したことも導入効率の増加に影響したのではないかと思う。また、この凝集により結果的に、本当の意味での局所投与を成し得たこととなる。

今後、siRNA と Liposome との complex の Charge に関して、さらなる検討を行っていくことで、もっと導入効率が高められるのではないかと考える。

#### 7.4. siRNA を用いた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

本研究では、RecQ1、EGFR、KNTC2 の siRNA を用いた核酸導入を行った。しかし、RecQ1 と EGFR においては残念ながら殺細胞効果は認められなかった。KNTC2 siRNA の検討においては、*in vitro* での殺細胞効果が認められ、腹腔内でも抗腫瘍効果が示唆された。しかし、有意差が認められるほどの抗腫瘍効果はなく、ばらつきが大きかった。今後臨床応用を目指して導入条件や導入時期等のさらなる検討を行っていく必要があると考える。

また、腹腔内への導入法が確立された以上、殺細胞効果のある遺伝子を見つけ出すことが、治療実験へと直結するため、もっと多数の遺伝子に関して *in vitro* の siRNA の導入実験を行い、検討を重ねることで、より殺細胞効果の強いものを選定していけると思う。

## 第 8 章

## 結論と今後の展望

## 8.1. 本研究の結論

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。それにより、例えば、siRNA の治療実験の場合、腹腔内での siRNA の効果継続期間もはっきりとわかるようになり、どれくらいの間隔を置いて siRNA の連続投与を行えば良いかを割り出すことが容易になった。

本実験で用いた Liposome は *in vivo* 用のものだったが、*in vitro* における siRNA 導入効率は非常に良い上に毒性も少なく、優れた導入試薬として通常の Transfection 実験に使用できるのではないかと考える。

殺細胞効果のある遺伝子の選定では、今のところ 3 種類の遺伝子のみの検討しか行っていないため、今後、さらに多くの遺伝子に関して包括的な検討を行っていく必要がある。また、本研究で殺細胞効果のあった KNTC2 に関しては、正常細胞への影響はないとされているが、さらに治療実験を進めていくためには、もっと詳細にその影響を検討し、安全性をしっかりと示していかなければならない。

そして、*in vivo* での導入だが、siRNA と cationic Liposome との Complex は毒性もなく確実に導入でき、かつ遺伝子発現を抑制することが確認された。また、KNTC2 siRNA を用いた腹腔内治療実験では、有意差こそなかったが、腫瘍増殖を抑制できることが示唆された。さらに siRNA 量や投与期間の検討などを進めていくことにより、明確な治療効果を示すことが出来るのではないかと考えている。また、将来的には抗がん剤との併用などを行えば、効果を最大限に引き出すことが可能となり、臨床応用も目指せるのではないかと思う。

また、今後、より殺細胞効果のある遺伝子の探索を継続し、その siRNA に合わせた最適な Charge さえ決定できれば、本導入法を臨床で用いることが出来る日も来るのではないかと期待している。

## 8.2. 今後の展望

私がこれまで行ってきた研究は、あくまで卵巣がんにおける腹腔内核酸治療のアウトラインに過ぎず、それぞれの実験に関して今後も検討し、改善する余地は十分ある。特に、siRNA と Liposome の Complex の mol 比すなわち最適 Charge の決定は、今後の核酸治療において、非常に重要な役目を果たすこととなると思う。また、細胞や腫瘍の性質、siRNA の配列に合わせた Charge の条件を決めておくことで、より幅広い分野においてこの核酸導入法が使えるのではないかと思う。今後、殺細胞効果の高い siRNA も見つかるだろう。そのときに、この導入法を用いて最適な条件で治療実験を行えるようになっていることを願ってやまない。

本研究は、まだまだ臨床応用には程遠く、ゴール地点は全く見えない状態である。だが、本研究は衰退の一途をたどる遺伝子治療の中で、卵巣がんにおける腹腔内核酸治療の可能性を示し、その臨床応用への道を一步踏み出せたのではないかと自負している。

## 第 9 章

## 参考文献

## 第1章

- [ 1 ] Deborah K. Armstrong, Brian Bundy et al. (2006) Intraperitoneal Cisplatin and Paclitaxel in Ovarian Cancer , *The New England Journal of Medicine* , **354** , 34-43

## 第2章

- [ 1 ] 厚生労働省 ホームページより  
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai05/>
- [ 2 ] 国立がんセンター がん情報サービスホームページより  
<http://ganjoho.ncc.go.jp/top.html>
- [ 3 ] 小西郁夫 (2003) 研修医のための必修知識～婦人科疾患の診断・治療・管理 , *日本産科婦人科学会誌* , **55** , 363-368
- [ 4 ] 有吉寛、上田龍三 (日本臨床腫瘍学会)ら 編 (2003) 臨床腫瘍学 , *癌と化学療法社* , 823-841
- [ 5 ] 国立がんセンター中央病院内科レジデント 編 (2000) がん診療レジデントマニュアル 第2版 , *株式会社 医学書院* , 85-92
- [ 6 ] 新津洋司郎、横田淳 編 (1999) 臨床家のためのがん遺伝子 / がん抑制遺伝子 , *株式会社 南江堂* , 98
- [ 7 ] JM Hall, MK Lee et al. (1990) Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21 , *Science* , **250** , 1684-1689
- [ 8 ] Miki Y, Swensen J et al. (1994) A strong candidate for breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. , *Science* , **266** , 66-71
- [ 9 ] Easton D, Ford D et al. (1995) Breast and ovarian cancer incidence in BRCA1 mutation carriers. , *American Journal of Hum Genet* , **56** , 265-271
- [ 10 ] Takano M, Aida H et al. (1997) Mutation analysis of BRCA1 gene in ovarian and breast-ovarian cancer families in Japan. , *Japanese Journal of Cancer Research* , **88** , 407-413

- [ 11 ] Futreal A, Liu Q et al. ( 1994 ) BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. , *Science* , **266** , 120-122
- [ 12 ]Takahashi H, Behbakht K et al.( 1995 )Mutation analysis of the BRCA1 gene in ovarian cancers. , *Cancer Research* , **55** , 2998-3002
- [ 13 ] Andrew Fire, Craig C. Mello et al. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* , *Nature* , **391** , 806-811
- [ 14 ] 塩見美喜子、九十九裕子 ( 2004 ) small RNA が引き起こす遺伝子発現制御機構 , *実験医学* , **22** , 2503-2511
- [ 15 ] Mohaghegh P., Ian D. Hickson et al. ( 2001 ) DNA helicase deficiencies associated with cancer predisposition and premature ageing disorders , *Human Molecular Genetics* , **10** , 741-746
- [ 16 ]Imamura O., Fujita K. et al.( 2002 )Werner and Bloom helicase are involved in DNA repair in a complementary fashion , *Oncogene* , **21** , 954-963
- [ 17 ] Nakayama M., Kawasaki K. et al. ( 2004 ) The possible roles of the DNA helicase and C-terminal in RecQ5/QE : complementation study in yeast , *DNA Repair* **3** , 369-378
- [ 18 ] Carpenter G., Kenneth J. Lemback et al. ( 1975 ) Characterization of the binding of <sup>125</sup>I-labeled epidermal growth factor to human fibroblast , *Journal of Biological Chemistry* , **250** , 4297-4304
- [ 19 ] Carpenter G., King L Jr. et al ( 1978 ) Epidermal growth factor stimulates phosphorylation in membrane preparations *in vitro* , *Nature* , **276** , 409-410

- [ 20 ] David W. Threadgill, Andrzej A. Dlugosz et al. ( 1995 ) Targeted disruption of mouse EGF receptor : effect of genetic background on mutant phenotype , *Science* , **269** , 230-234
- [ 21 ] Paivi J. Miettinen, Berger J. Meneses et al.( 1995 ) Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor , *Nature* , **376** , 337-341
- [ 22 ] Maria Sibilio, Erwin F. Wagner et al. ( 1995 ) Strain-dependent epithelial defects in mice lacking the EGF receptor , *Science* , **269** , 234-238
- [ 23 ] Noreen Luetkeke, Ting Hu Qiu et al. ( 1999 ) Target inactivation of EGF and amphiregulin genes reveals distinct roles for EGF receptor ligands in mouse mammary gland development , *Development* , **126** , 2739-2750
- [ 24 ] G. Bruce Mann, Kerry J. Fowler et al. ( 1993 ) Mice with a null mutation of the TGF alpha gene have abnormal skin architecture, wavy hair, and curly whiskers and often develop corneal inflammation , *Cell* , **73** , 249-261
- [ 25 ] Noreen Luetkeke, Ting Hu Qiu et al. ( 1993 ) TGF alpha deficiency results in hair follicle and eye abnormalities in targeted and waved-1 mice , *Cell* , **73** , 263-278
- [ 26 ] Jill L. Reiter, David W. Threadgill et al. ( 2001 ) Comparative Genomic Sequence Analysis and Isolation of Human and Mouse Alternative EGFR Transcripts Encoding Truncated Receptor Isoforms , *Genomics* , **71** , 1-20
- [ 27 ] Nicola Normanno, Monica R. Maiello et al. ( 2002 ) Epidermal Growth Factor Tyrosine Kinase Inhibitor ( EGFR-TKIs ) : Simple Drugs With a Complex Mechanism of Action ? , *Journal of Cellular Physiology* , **194** , 13-19
- [ 28 ] Fred R. Hirsch, Marileila Varella-Garcia et al. ( 2003 ) Epidermal Growth Factor in Non-Small-Cell Lung Carcinomas : Correlation Between Gene Copy Number and Protein Expression and Impact on Prognosis , *Journal of Clinical Oncology* , **21** , 3798-3807

- [ 29 ] H. Yamazaki, Y. Fukui et al. ( 1988 ) Amplification of the structurally and functionally altered epidermal growth factor receptor gene ( c-erbB ) in human brain tumors. , *Molecular and Cellular Biology* , **8** , 1816-1820
- [ 30 ] Amanda Psyrrri, Mohamad Kassir et al. ( 2005 ) Effect of Epidermal Growth Factor Receptor Expression Level on Survival in Patients with Epithelial Ovarian Cancer , *Clinical Cancer Research* , **11** , 8637-8643
- [ 31 ] Gurozov EN., Izquierdo M. ( 2006 ) RNA interference against Hec1 inhibit growth *in vivo*. , *Gene Therapy* , **13** , 1-7
- [ 32 ] Hayama S., Daigo Y. et al. ( 2006 ) Activation of CDCA1-KNTC2, member of centromere protein complex, involved in pulmonary carcinogenesis. , *Cancer Research* , **66** , 10339-10348
- [ 33 ] Deluca JG., Gall WE. Et al. ( 2006 ) Kinetochores microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1. , *Cell* , **127** , 969-982

### 第 3 章

- [ 1 ] Deborah K. Armstrong, Brian Bundy et al.( 2006 ) Intraperitoneal Cisplatin and Paclitaxel in Ovarian Cancer , *The New England Journal of Medicine* , **354** , 34-43
- [ 2 ] Charles N. Landen Jr., Arturo Chavez-Reyes et al. ( 2005 ) Therapeutic EphA2 Gene Targeting *In vivo* Using Neutral Liposome Small Interfering RNA Delivery , *Cancer Research* , **65** , 6910-8
- [ 3 ] Jyotsnabaran Halder, Aparna A. Kamat et al. ( 2006 ) Focal Adhesion Kinase Targeting Using *In vivo* Short Interfering RNA Delivery in Neutral Liposomes for Ovarian Cancer , *Clinical Cancer Research* , **12** , 4916-4924
- [ 4 ] Diana M. Smith-Beckerman, Kit W. Fung et al. ( 2005 ) Proteome Changes in Ovarian Epithelial Cells Derived from Women with BRCA1 Mutations and Family Histories of Cancer , *Molecular & Cellular Proteomics* , **4** , 156-168

- [ 5 ]Kelvin Y. K. Chan, Hilmi Ozcelik et al.( 2002 )Epigenetic Factors Controlling the BRCA1 and BRCA2 Genes in Sporadic Ovarian Cancer , *Cancer Research* , **62** , 4151-4156
- [ 6 ]Ben Davidson, Virginia Espina et al. ( 2006 ) Proteomic Analysis of Malignant Ovarian Cancer Effusions as a Tool for Biologic and Prognostic Profiling , *Clinical Cancer Research* , **12** , 791-799
- [ 7 ]J. P. Delord, C. Allal et al. ( 2005 ) Selective inhibition of HER2 inhibits AKT signal transduction and prolongs disease-free survival in a micrometastasis model of ovarian carcinoma , *Annals of Oncology* , **16** , 1889-1897
- [ 8 ]Jessica A. George, Ting Chen et al. ( 2005 ) Src Tyrosine Kinase and Multidrug Resistance Protein-1 Inhibitors Act Independently but Cooperatively to Restore Paclitaxel Sensitivity to Paclitaxel-Resistant Ovarian Cancer Cells , *Cancer Research* , **65** , 10381-10388

## 第 5 章

- [ 1 ]鈴木 喜隆( 1980 )ホタルの発光はどのようにして維持されるか - ホタル生物発光とルシフェリンの生合成 , *化学と生物* , **18** , 169-171
- [ 2 ]J R de Wet, K V Wood et al. ( 1987 ) Firefly luciferase gene : structure and expression in mammalian cells , *Molecular and cellular biology* , **7** , 725-737
- [ 3 ]Clontech ホームページより <http://www.clontech.com/clontech/>
- [ 4 ]Douglas C. Prasher, Virginia K. Eckenrode et al. ( 1992 ) Primary structure of the *Aequorea victoria* green - fluorescent protein , *gene* , **111** , 229-233
- [ 5 ]高久 史磨、矢崎 義雄ら ( 2006 ) 治療薬マニュアル 2006 , 株式会社医学書院 , 1456-1458,1486-1488
- [ 6 ]Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays , *Journal of Immunol Methods* , **65** , 55-63

[7] 同仁化学 商品カタログページより

[http://dominoweb.dojindo.co.jp/goodsr5.nsf/View\\_Display/](http://dominoweb.dojindo.co.jp/goodsr5.nsf/View_Display/)

## 第6章

[1] Luisa Barzon, Marco Boscaro et al. (2004) Endocrine Aspects of Cancer Gene Therapy, *Endocrine Reviews*, **25**, 1-44

[2] Norbert Maurer, Kim F. Wong et al. (2001) Spontaneous Entrapment of Polynucleotides upon Electrostatic Interaction with Ethanol-Destabilized Cationic Liposomes, *Biophysical Journal*, **80**, 2310-2326

[3] Robert J. Lee, Leaf Huang (1995) Folate-targeted, Anionic Liposome-entrapped Polylysine-condensed DNA for Tumor Cell-specific Gene Transfer, *The Journal of Biological Chemistry*, **271**, 8481-8487

[4] H. Jiang, Y. Feng (2006) Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) correlated with tumor growth and apoptosis in ovarian cancer, *International Journal of Gynecological Cancer*, **16**, 405-412

## **参考**

### **参加学会**

芹沢由里子、小泉史明、黒田順一郎、小玉哲也、松村保広

“ 卵巣がん遺伝子・核酸治療法の開発 ”

第 65 回日本癌学会学術総会、横浜、2006 年 9 月 28 ~ 30 日

## 謝辞

本研究は、2005年4月から2007年1月にかけて、国立がんセンター東病院 臨床開発センター がん治療開発部(東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学 専攻 がん先端生命科学分野)にて行ったものです。

松村保広部長には、卵巣がんにおける核酸治療法の開発研究というテーマを与えていただき、時には優しく、時には厳しく、ご指導くださいましたことを心より感謝申し上げます。また、実験のことだけではなく、研究者としての考え方や研究の進め方等、今後私が研究者として生きていくために、非常に勉強になることを多数ご教授いただき、本当にありがとうございました。

江角浩安臨床開発センター長には、いつも気にかけていただき、そして研究を進めていく上で見落とししていた点や、実験手法などを教えていただき、その知識の深さと広さにただただ感服する毎日でした。本当にお世話になりました。

また、臨床腫瘍病理部の部長であり、がん先端生命科学分野の教授でもある落合淳志先生には、臨床開発センターワークの時などに鋭いご指摘をいただき、またその問題解決の方向性を示していただきました。本当にありがとうございました。

小泉史明室長には、実験の手法や気をつけなければいけない点、そして毎日の実験における有益なアドバイスを頂きましたことを感謝申し上げます。小泉先生は、生物学的実験を殆ど行ったことのない私に、一から実験というものを教えていただき、そして普段の生活に関しても気にかけていただき、そのアドバイスのひとつひとつが今も強烈に心に残っております。本当にありがとうございました。

安永正浩室長は、一番追い込まれて苦しかった時期に、常に適切かつ鋭いご助言をしていただき、実験の検討法など多くのことに関してお世話になりました。また、家庭のこと、健康のことまで気にかけていただき、本当に有難く、感謝申し上げます。

土原一哉室長には、部内ワーク、臨床開発センターワークなどの場で、常に鋭いご指摘をいただきました。先生のご指摘があったおかげで気づかされたことは非常に多く、感嘆するばかりでした。

黒田順一郎先生は、研究のことに留まらずさまざまな相談にのっていただき、先生のところに相談しに行くと、いつも心が軽くなりました。また、たくさんご迷惑をお

かけし申し訳ありませんでした。そして、心から感謝申し上げます。

根岸孝仁先生は、免疫染色を始め多くの実験技術を教えてくださっただけでなく、実験におけるさまざまな疑問に、丁寧に答えてくださいました。ありがとうございました。

古賀宣勝先生には、動物実験での器具の扱い方を教えていただき、多数の実験手法や試薬についてその理論や方法を教えていただきました。また、先生の豪快な雰囲気は非常に有難く、落ち込んでいるときも励まされました。心よりお礼申し上げます。

実験助手の三江直子さんには、入学当時からさまざまなことを教えていただいただけでなく、実験や普段の生活におけるさまざまな相談にのっていただきました。常に優しく話を聞いていただいたことを本当に感謝申し上げます。

同じく実験助手の宮武浩子さんは、さまざまな実験手法を教えていただきました。どんな実験に関する質問にも答えていただき、研究者として尊敬の念を覚えるとともに、心から感謝申し上げます。

さらに、実験助手の金井智恵子さんにも、入学当初からさまざまなことを一から教えていただきました。感謝を申し上げますとともに、お体が良くなられたことを心からお喜び申し上げます。

また、秘書である椎名薫さん、阿部恵子さんには様々なことで迷惑をおかけいたしました。お二人の優しい笑顔には、いつも元気付けられ、本当にありがたかったです。

中島貴子先生にも、いろいろなことを教えていただいただけでなく、何度も励ましていただきました。

そして、国立がんセンター中央病院の宮木聡恵さん、井上一也さん、泉澤順子さんは、real-time PCR を何度も行っていただき、非常に助かりました。ありがとうございました。

さらに、藤岡ルミさん、小野塚博子さんにも本当にお世話になりました。

研究室の先輩である、伊藤孝さん、空閑亘さんには、普段の実験から、学会などの発表法など、様々な質問や相談に応じていただきました。本当にありがとうございました。また、同級生である山下諒子さん、厚海奈穂さん、久保田秀行君にも、本当にお世話になりました。特に山下さんには幾度となく励ましてもらいました。本当にあ

りがとうございました。後輩である藤澤優君、斉藤洋平君、金原左京君、梶田千尋さんには、いつも支えていただきました。特に、藤澤優君、斉藤洋平君には、非常に頼りない先輩であったため、逆に教えていただくこともありました。本当にありがとうございました。

最後になりましたが、いつもどっしりと構えて私を支えてくれた父、病身でありながら常に私のことを心配し続けてくれた母、妹、祖父母、友人をはじめとする私を支えてくださった全ての方々に感謝申し上げます。ここに記しきれませんが、本研究を行う上で、非常に多くの方のお世話になりました。皆様のお陰で、無事に修士研究をまとめることが出来ました。どうもありがとうございました。

平成 19 年 2 月

芹沢 由里子