

# 超音波/バブルリポソームによる表在性膀胱がんに対する遺伝子治療

2008年3月修了

先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野

47-66545 藤澤優

指導教員：松村保広 准教授

キーワード：表在性膀胱がん 遺伝子治療 sonoporation siRNA

## 背景

### 表在性膀胱がん治療の現状

膀胱がんは腫瘍が膀胱の内側の粘膜層に存在する表在性膀胱がん、腫瘍が筋層にまで達した浸潤性膀胱がんとに大別される。初期診断において、70～80%の患者が表在性膀胱がんとして診断されるため必然的に膀胱がんの治療は表在性膀胱がんに対する治療が主となる。現在、表在性膀胱がんに対して行なわれている治療法として、尿道からカテーテルを通し腫瘍を取り除く経尿道的切除術、抗がん剤の膀胱内注入、結核菌（BCG：Bacillus Calmette-Guerin）の膀胱内注入により膀胱粘膜の剥離を即す方法等が併用されている。しかし、現在行なわれている治療法の欠点として患者の50%程度が再発し、全体の10～30%の患者はより悪性度の高いがんや、浸潤性の膀胱がんへと変化する。また、BCGの膀胱内注入の副作用として炎症や発熱が起こる事も問題となっている。現在はがんの浸潤やBCGの副作用が起こった際の治療法として膀胱全摘が行なわれている。その結果患者は回腸排尿を余儀なくされ、QOL(quality of life)は著しく低下する。この為には既知の治療法に変わる、もしくは併用療法を行なえる治療法の開発が求められている。

### ソノポレーション

マイクロバブルは血管中で造影剤として使用されてきた。これらマイクロサイズのパブルに超音波を照射する事でパブルを破裂させキャビテーションと呼ばれる現象を引き起こす事が出来る。このキャビテーションは細胞に一過性の膜透過性を生じさせ、細胞に遺伝子や薬剤等を導入する事が可能となり、この方法はソノポレーションと呼ばれている。ソノポレーションは他の遺伝子導入に比べ細胞への毒性が低く、細胞への分子導入にかかる時間も短い為、臨床応用に適した遺伝子導入方法であると考えられる。現在、ソノポレーションで行なわれている遺伝子導入方法はプラスミドを用いた遺伝子発現が主流となっている。

### 本研究の目的

現在行なわれている表在性膀胱がんに対する治療法は再発や感染症のリスクを伴い、表在性膀胱がんに対する治療方法として最良と言うには程遠い。そのため現在行なわれている治療法に代わる、又はそれらとの併用に耐える治療方法の開発を本研究の目的とした。

本研究では抗腫瘍作用を得る為の方法としてRNAiに着目した。現時点ではsiRNAによる遺伝子抑制効果は臨床段階での応用には至っていないが、siRNAが持つ高い遺伝子抑制能と簡便な作用機序から、的確なsiRNAの使用方法を確立すれば十分に実用に耐える方法であると考えられる。本研究で対象となる膀胱は臓器の中で外部から比較的アクセスしやすく、閉鎖的な臓器であり、siRNAを高濃度で使用する事も可能であると考えた。併せてsiRNAの導入方法として、導入方法が比較的安易で非侵襲性であるソノポレーションを用いる事とした。ソノポレーションに用い

られるマイクロバブルの一部は実際に認可を受け人体への使用も認められている。しかしながら表在性膀胱がんに対して有効な抗腫瘍作用を得られ、腫瘍特異的に発現が認められる様な遺伝子は報告が少ない。

よって本研究では遺伝子導入方法の確立を目指すため、以下の3点を行う事とした。

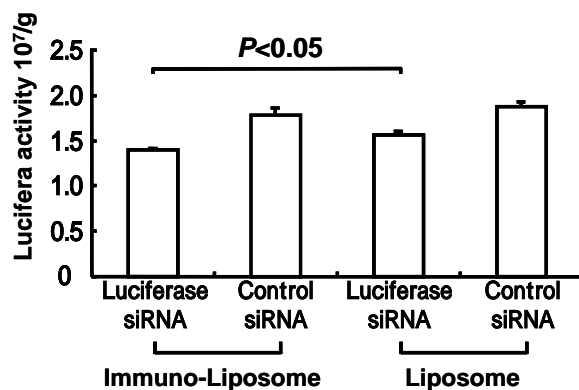
- ：ルシフェラーゼ強制発現株に対するルシフェラーゼ-siRNAの導入方法の検討
- ：表在性膀胱がんモデルマウスの作成
- ：と で得られた結果から、*in vivo*でのルシフェラーゼ遺伝子抑制の検討

## 結果及び考察

：リポソームによって作られるナノサイズのバブル（以下：バブルリポソーム）を用いてルシフェラーゼの抑制効果を検討した。結果、十分なルシフェラーゼ活性抑制効果を得られなかったため、キャビテーションの効果を向上させるべく膀胱がん細胞の膜タンパクを認識する抗体をバブルリポソームに付加した。（以下：イムノバブルリポソーム）

バブルリポソームとイムノバブルリポソームを用いて再度同様の実験を行なったところ、イムノバブルリポソームはバブルリポソームに比べ有意にルシフェラーゼ活性を抑制した。

：膀胱がん細胞株UM-UC-3<sup>Luc</sup>・RT-112<sup>Luc</sup>懸濁液をヌードマウスの膀胱に注入する事で表在性膀胱がんモデルマウスの作成に成功した。これらの細胞株にはルシフェラーゼを強制発現させているため、前述のルシフェラーゼ活性抑制試験を*in vivo*で行なう事が出来る。またRT-112にはイムノバブルリポソームの使用が可能である抗原の発現も確認している。



イムノバブルリポソームによる遺伝子抑制

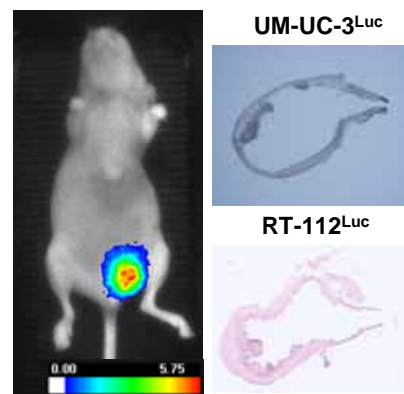


Fig. : 表在性膀胱がんモデル

左: フォトンイメージャー画像

右: 膀胱切片

## 博士課程における展望

：有意な抑制効果を得られたが十分な抑制結果ではないため更に条件検討を行なう。

：RT-112<sup>Luc</sup>のクローン化を行い、形質を一定にした上で の*in vivo*実験を行う。

*in vivo*でのルシフェラーゼ抑制効果を得られた後は表在性膀胱がんの特異的に発現している遺伝子を対象とし、抗腫瘍作用を得る事を目的として実験を行っていく予定である。