

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

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

平成 18 年度入学

47-66545 藤澤 優

指導教員 松村 保広 准教授

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

47-66545 がん先端生命科学分野

指導教官：松村保広

藤澤優

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バブルに超音波を照射する事でバ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。

I：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

II：表在性膀胱がんモデルマウスの作成

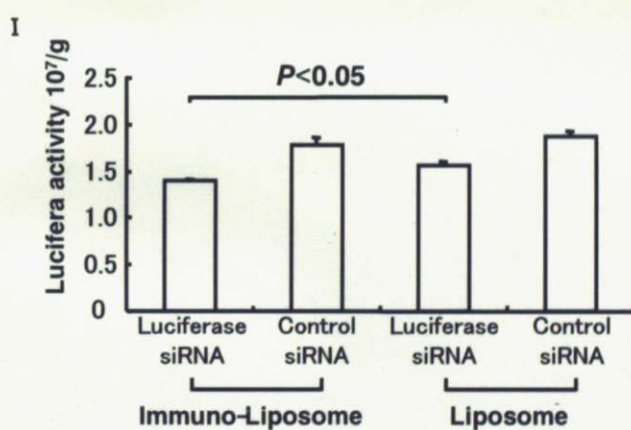
III：IとIIで得られた結果から、*in vivo*でのルシフェラーゼ遺伝子抑制の検討

結果及び考察

I：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、キャピ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。

II：膀胱がん細胞株 UM-UC-3^{Luc}・RT-112^{Luc}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

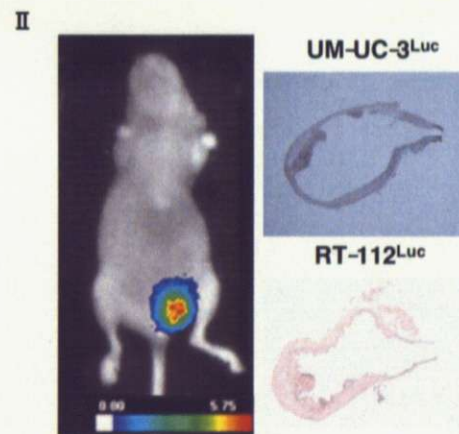


Fig. II：表在性膀胱がんモデル
左：フotonイメージャー画像
右：膀胱切片

博士課程における展望

I：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。

II：RT-112^{Luc}のクローン化を行い、形質を一定にした上でIII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に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。

目次

要旨	P2
Summary	P6
背景	
表在性膀胱がん治療の現状	P7
遺伝子治療の現状	P8
ソノポレーション	P9
siRNA	P10
表在性膀胱がんモデルマウス	P11
研究の目的	P12
実験方法	
<u>1. 表在性膀胱がんモデルマウスの作成</u>	
1) ルシフェラーゼ遺伝子のトランスフェクション及びクローニング	P13
2) フォトンイメージャーによる検討	P13
3) UM-UC-3 ^{Luc} モデルマウス作成	P13
4) 移植膀胱腫瘍におけるルシフェラーゼ免疫染色	P14
<u>2. バブルリポソームによるソノポレーションの検討</u>	
1) バブルリポソームの調整	P15
2) ルシフェラーゼ活性抑制実験	P16
3) ルシフェラーゼ活性測定	P17
<u>3. バブルリポソームによるソノポレーションの問題点検討</u>	
1) 超音波による siRNA の分解能検討	P18
<u>4. イムノバブルリポソームによる実験系の確立</u>	
1) 抗原検討	P19
2) 5637 ^{Luc} ・RT-112 ^{Luc} の作成	P20
3) 細胞のクローン化	P20
4) 5637 ^{Luc} ・RT-112 ^{Luc} モデルマウス作成	P20
5) イムノバブルリポソームの調整及び細胞への親和性の検討	P21

6) イムノバブルリポソームによる siRNA 導入検討	P22
7) イムノバブルリポソームによる siRNA 導入検討②	P22
実験結果	
<u>1. 表在性膀胱がんモデルマウスの作成</u>	
ルシフェラーゼ強制発現株の作成及びフォトンイメージャーでの確認	P23
UM-UC-3 モデルマウス作成及び免疫染色	P24
<u>2. バブルリポソームによるソノポレーションの検討</u>	
ルシフェラーゼ活性抑制テスト	P26
<u>3. バブルリポソームによるソノポレーションの問題点検討</u>	
超音波による siRNA の分解能検討	P28
<u>4. イムノバブルリポソームによる実験系の確立</u>	
抗原検討	P30
5637 ^{Luc} ・RT-112 ^{Luc} モデルマウス作成	P32
イムノバブルリポソームの検討	P35
イムノバブルリポソームによる siRNA 導入実験	P37
考察及び博士課程における展望	P38
参考文献	P40
謝辞	P42

Development of gene therapy using ultrasound and bubble-liposomes for superficial bladder cancer

Background and aim

The standard treatment method for superficial bladder cancer is transurethral resection followed by chemotherapy or BCG injection. However, half of superficial bladder cancers recur and progress to a higher grade/stage, forming locally invasive cancers that can only be treated using a radical cystectomy. Since a radical cystectomy significantly reduces the patient's quality of life, a novel modality for treating superficial bladder cancer is needed. Gene therapy continues to face large technical hurdles, and systemic modes of delivery have not yielded any successful results. Since the bladder is a closed internal organ that is easily accessible from the outside, intravesical gene therapy may be feasible. Many efficient methods for gene transfection have been developed for nonclinical experiments, but not for clinical use. We decided to examine sonoporation because it is relatively nontoxic, fast, and can be performed extracorporeally. The aim of the present study was to develop an effective intravesical gene delivery system for the treatment of bladder tumors using the transfection of anti-tumor siRNA into cancer cells by sonoporation.

However, the clinical target of gene for superficial bladder cancer had been unreported. Therefore, at the present study we evaluated the performance of luciferase gene suppression by luciferase-siRNA in sonoporation.

Materials and methods

We established an orthotopic bladder tumor model by instilling several human bladder tumor cells transfected with the luciferase gene into the bladders of nude mice. We then determined the conditions for ultrasound irradiation *in vitro* and *in vivo*. Finally, the effectiveness of luciferase-siRNA delivery using bubble liposomes / immuno-bubble liposomes and ultrasound to orthotopic bladder tumors was examined.

Results and Discussion

On the one hand, we have not been able to deliver siRNA to the cells using ultrasound and bubble liposomes effectively, but on the other, delivery of siRNA to the cells was confirmed in immuno-bubble liposomes system. And we will make this method better for *in vivo* test. The immuno-bubble liposomes system may be suitable for the cells used in orthotopic bladder tumor model.

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。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の効果が認められなか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。この為に新たな治療法の開発が求められている。



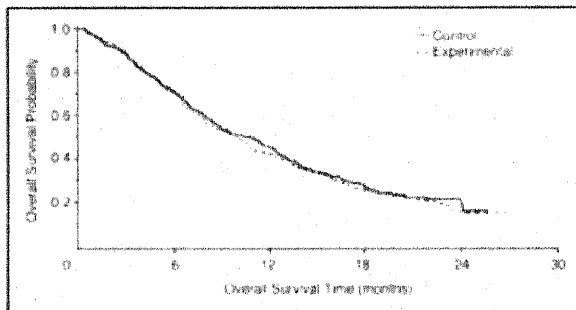
Copy right : 名古屋大学医学部泌尿器科学講座

Fig.1-1 : 膀胱がんの分類

遺伝子治療の現在

2005年アメリカ臨床腫瘍学会において、遺伝子の全身投与を行なった臨床第3相無作為比較試験の結果が報告された。この報告では非小細胞肺癌患者に対して従来行なわれている治療法であるゲミシタビン+シスプラチン群と、ゲミシタビン+シスプラチンに加えがん関連タンパクリン酸化酵素（PKC）に対するアンチセンス(Aprinocarsen)を加えた群とを比較した。結果として、Aprinocarsenを加えた群は生存期間が延長しないばかりではなく、合併症を起こす危険性が増大したという結果であった。[1]

この結果は遺伝子の全身投与において目的のがん部に有効にデリバリー出来ていないことを意味し、現時点においては遺伝子治療を行なう場合は局所投与に活路を見出すべきと考える。そこで臨床的に局所投与が有益であろうがん種を選定すべきである。



Toxicity	Control Arm (n = 321)		Experimental Arms (n = 322)		P
	G3	G4	G3	G4	
Hematologic					
Anemia	13.7	0.9	16.1	3.7	NS
Leukopenia	17.4	3.7	27.0	5.6	NS
Neutropenia	24.9	15.6	24.5	16.1	NS
Thrombocytopenia	27.4	1.9	45.0	14.3	< .0001
Nonhematologic					
Fatigue	6.5	0.3	5.3	0.0	NS
Nausea	5.3	0.0	6.2	0.0	NS
Vomiting	7.8	0.3	8.1	0.0	NS
Creatinine	1.9	0.9	0.6	0.0	NS
Febrile neutropenia	1.9	0.9	3.4	0.6	NS
Epistaxis	1.2	0.0	5.9	0.0	.0022
Renal failure	1.2	0.3	0.6	0.0	NS
Hypokalemia	0.6	0.6	2.8	0.6	NS
Weight loss	0.6	0.0	1.9	0.0	NS
Thrombosis/embolism	0.3	0.3	3.1	0.9	.0068

NOTE: All data are presented as percentage of patients.
Abbreviations: G3, grade 3; G4, grade 4; NS, not significant.
*Combined G3 and G4 toxicities in the two groups were compared.

Fig.1-2 : Aprinocarsen の併用療法

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。第一世代のマイクロバブルは空気が内包され、血中での安定度が低く長時間の診断が困難であった。そこで難溶性のガスが内包され、安定度が向上した第二世代のマイクロバブルが開発されてきた。これらマイクロサイズのバブルに超音波を照射する事でバ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[2, 3]。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[4]。詳しいメカニズムは明らかにされていないが、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ている。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が[5, 6]、siRNA を用いて行なったソノポレーションも報告がある[7, 8]。

ソノポレーションの概略図

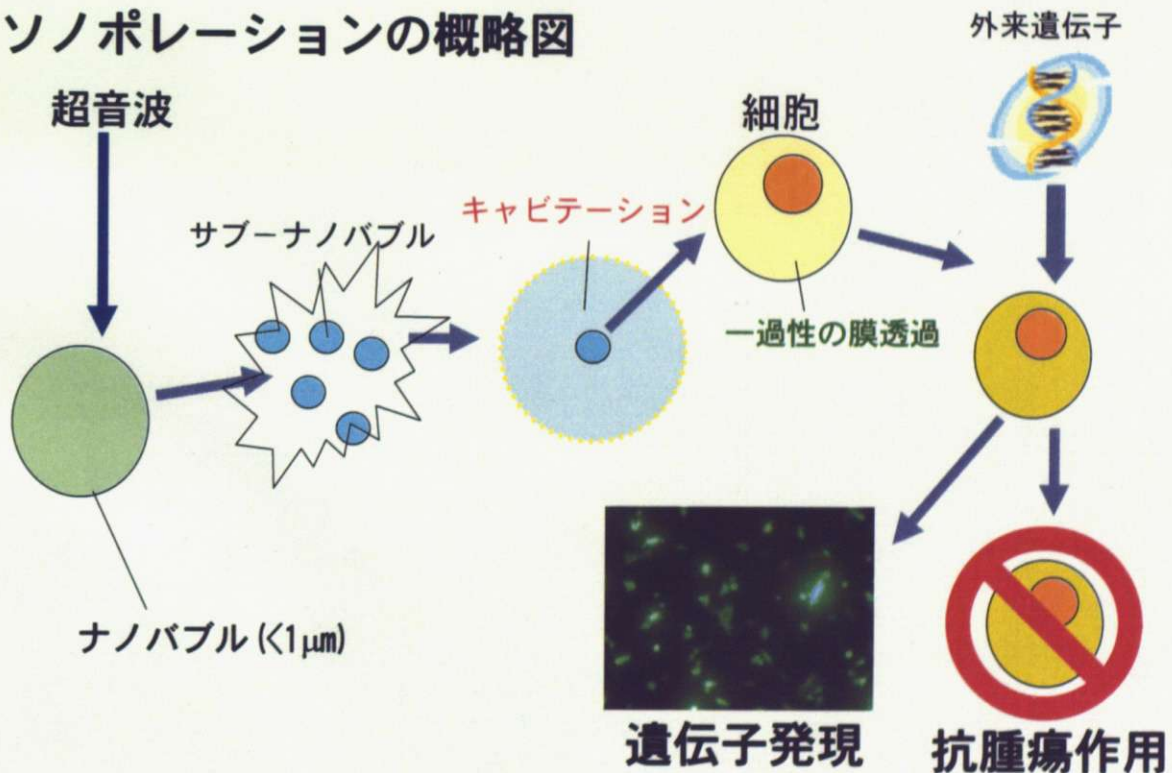


Fig.1-3 : ソノポレーションの概略図

siRNA

線虫に siRNA(short interfering RNA : small interfering RNA)を導入する事で遺伝子発現抑制効果が得られる事が 1998 年に Fire らによって報告された[9]。その後この RNAi(RNA interference : RNA 干渉) はショウジョウバエ、哺乳類等でも効果が確認され、高い導入効率かつ発現抑制効果を得られる事が知られる事となった。しかし、RNAi による遺伝子発現抑制効果は実験的手法に用いられているにすぎず、臨床応用に耐える手法になるには至っていない。

細胞内に導入された 2 本鎖 siRNA は Dicer 活性によって不必要な塩基が切断される。一般的に 5'末端側の結合が強い塩基が不要として切断される傾向にある。その後残った塩基がタンパク質と複合体を作り、RISC (RNA Induced Silencing Complex)を形成する。この時 RISC に取り込まれる塩基をガイド鎖、Dicer 活性によって切断される塩基をパッセンジャー鎖と言う。ガイド鎖によって認識された目的配列が RISC によって切断され、目的の遺伝子の発現が抑制される事となる[10]。

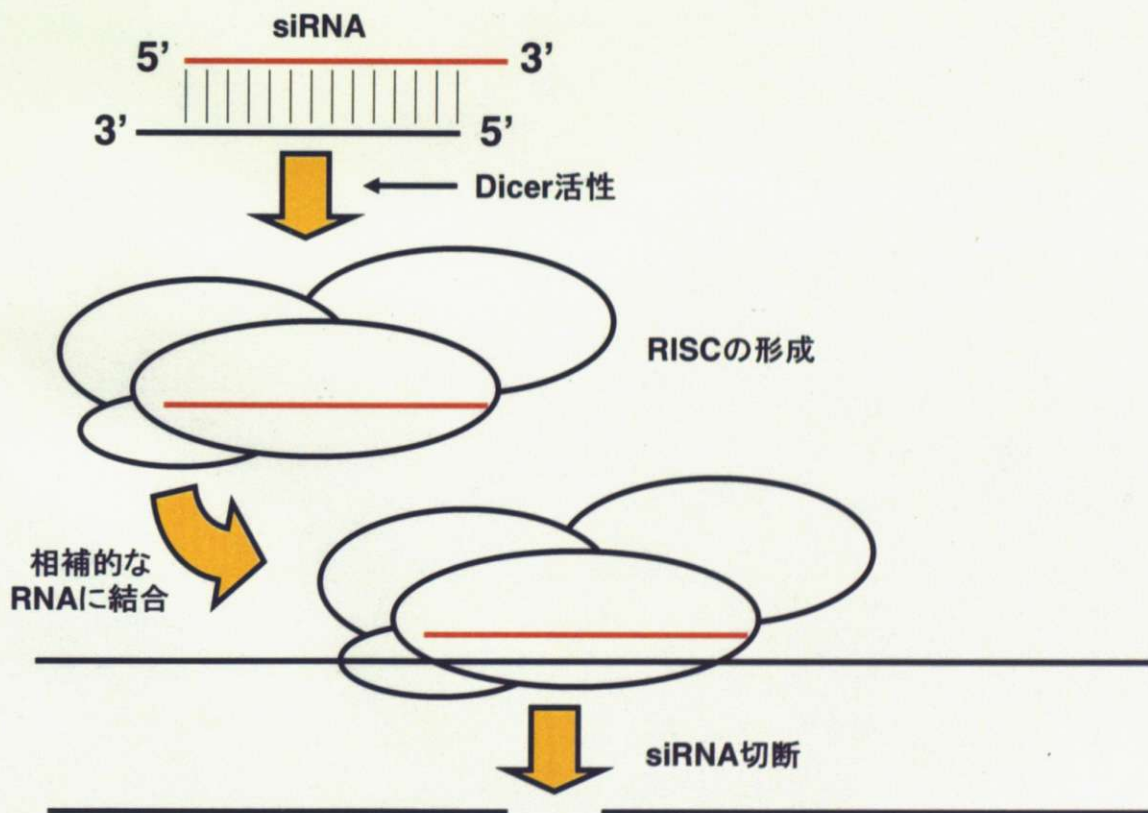


Fig.1-4 : siRNA の作用機序

表在性膀胱がんモデルマウス

1970年代は膀胱癌の誘発剤である N-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamide(FANFT) をマウスに経口投与する事によって自然的に膀胱がんを発症させていた[11]。この方法ではより臨床検体に近いモデルマウスを得られるものの発症までに10ヶ月程度を要し、実験に用いるのは困難であった。その後電極で膀胱内を刺激し、傷を生じさせた後に膀胱がん細胞株を植えつける方法が主流となったが[12]、この方法も安定したモデルを供給する方法とはならなかった。その後膀胱内にトリプシン処理を施し、膀胱内のグリコサミドグリカン層を除く事によって安定した表在性膀胱がんモデルマウスが確立された[13]。このトリプシン処理により UM-UC-3, T24, KU-7 など細胞株でのモデルマウスが確立され[14]、これらの細胞株にルシフェラーゼを強制発現させる事でマウスを生存させたまま体外から細胞の生着、成長を確認できる事となった[15, 16]。現在ではルシフェラーゼ活性と MRI 画像によって測定された腫瘍体積との相関関係も検討されるに至っている[17]。

本研究の目的

背景でも述べた様に、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膀胱炎のリスクを伴い、新たな治療方法の開発がのぞまれる。本研究では現在行なわれている経尿道的切除術、抗がん剤の膀胱内注入、BCGなどの併用療法に代わる、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。

抗腫瘍作用を得る為のメカニズムとして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および特異性から、的確なsiRNAの使用方法を確立すれば十分に実用に耐える手法であると考えられる。

また、全身投与による使用が否定された核酸治療の残された応用方法としても局所投与は非常に期待出来る。ここで考えられる局所投与として、本研究において対象とした膀胱内の表在性膀胱がん、腹腔内に播種したステージⅢの卵巣がん、肝臓内へのみ拡がった肝がん、脳内のみで拡がる脳腫瘍などが挙げられる。本研究ではその中でも外部から比較的アクセスしやすい膀胱を対象として研究する事とした。閉鎖的な臓器であり、かつ他臓器に影響の少ない膀胱内なら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。

今まで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[18, 19]。

よって本研究では表在性膀胱がんの遺伝子治療法を確立するため以下の3点を行う事とした。

- I：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
- II：表在性膀胱がんモデルマウスの作成
- III：IとII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

実験方法

1. 表在性膀胱がんモデルマウスの作成

1) ルシフェラーゼ遺伝子のトランスフェクション及びクローニング

pcDNA3.1(invitrogen)と pGL3-Control Vector(promega)を混合し、プラスミドの比が 1 : 9 になる様にする。これらプラスミドの混合物を Lipofectamine2000 を用いて UM-UC-3 に導入する。導入後に G418: ジェネティシン(Calbiochem)1mg/ml でセレクションする[20]。セレクション後 96well plate に 0.5cells/well で播種し、クローニングを行なった。クローニング後、フォトンイメージャー(BIOSPACE MESURES 社製)を用いてルシフェラーゼ活性を確認した。

2) フォトンイメージャーによる検討

In vitro

UM-UC-3^{Luc}をトリプシン処理し、 4×10^6 cells/ml から 2.5×10^5 cells/ml まで段階希釈する。96well plate に 100 μ l ずつ播種し、ルシフェリン 0.25mg/ml を 100 μ l/well 加え 5 分後にフォトンイメージャーにてルシフェラーゼ活性を測定した。

In vivo

25mg/ml のルシフェリンをマウスの腹腔内に 100 μ l 注射した。マウスをフォトンイメージャーにセットし、注射から 5min 後にルシフェラーゼ活性を測定した。

3) UM-UC-3^{Luc}モデルマウス作成

UM-UM-3^{Luc}をトリプシン処理し、 2×10^7 cells/ml に調整する。

BALB-c nu/nu マウスに 10%ネンブタール 100 μ l を腹腔内注射して麻酔する。尿道に水滴をつけ、24G \times 3/4"サーフロー留置針(TERUMO)の外筒を尿道に挿入する。膀胱を押して尿を除き、尿道口を結紮する。0.25%トリプシン EDTA(SIGMA)を 100 μ l 注入し、30 分放置後トリプシンを取り除く。生理食塩水 100 μ l で膀胱内を洗浄して、細胞懸濁液 100 μ l を注入する。水を与えずに 4 時間放置後、結紮を外す。

4) 移植膀胱腫瘍におけるルシフェラーゼ免疫染色

マウスの尿道からサーフロー留置針の外筒を挿入して膀胱から尿を除く。シリンジを OCT コンパウンドで満たしてサーフロー留置針の外筒をつけた後、挿入していた外筒と取り替える。マウスを開腹し膀胱を確認しながら OCT コンパウンドを注ぎ込み、膀胱を回収する。膀胱をケースに入れ、コンパウンドで周りを満たし、エタノール・ドライアイスで凍結させる。

作成した OCT コンパウンドからクライオスタットを用いて厚さ 4~6 μ m で切片を切り出す。切片を風乾させ、冷 10%中性緩衝ホルマリンで固定する。3% H_2O_2 /MeOH 中で 20 分処理し PBS(-)洗浄を 15 分間、3 回行なう。3%スキムミルクを滴下し、ブロッキングする。Rabbit 抗ルシフェラーゼ抗体(CORTEX)をスキムミルクで 100 倍希釈し、切片に滴下する。PBS(-)洗い 3 分、3 回行なう。Goat 抗 Rabbit 抗体 (DAKO) を滴下。PBS(-)洗い 5min、3 回行なう。DAB(DAKO)を調整し滴下する。milliQ 水ですすいだ後にヘマトキシリンに入れ流水で洗浄しエタノール、キシレン処理をした後にマリノールで封入する[21]。

抗体番号及びメーカー

Rabbit anti-luciferase : CORTEX BIOCHEM(CR2029RAP)

2. バブルリポソームによるソノポレーションの検討

1) バブルリポソームの調整

5ml用バイヤル瓶にリポソーム溶液(1mg/ml)を2ml入れる。バイヤル瓶の中を C_3F_8 : パーフルオロプロパン 7.5ml で満たして蓋を閉じる。再度 C_3F_8 を 7.5ml 追加して加圧し、超音波洗浄機で激しく振る。

リポソームへのgas封入方法

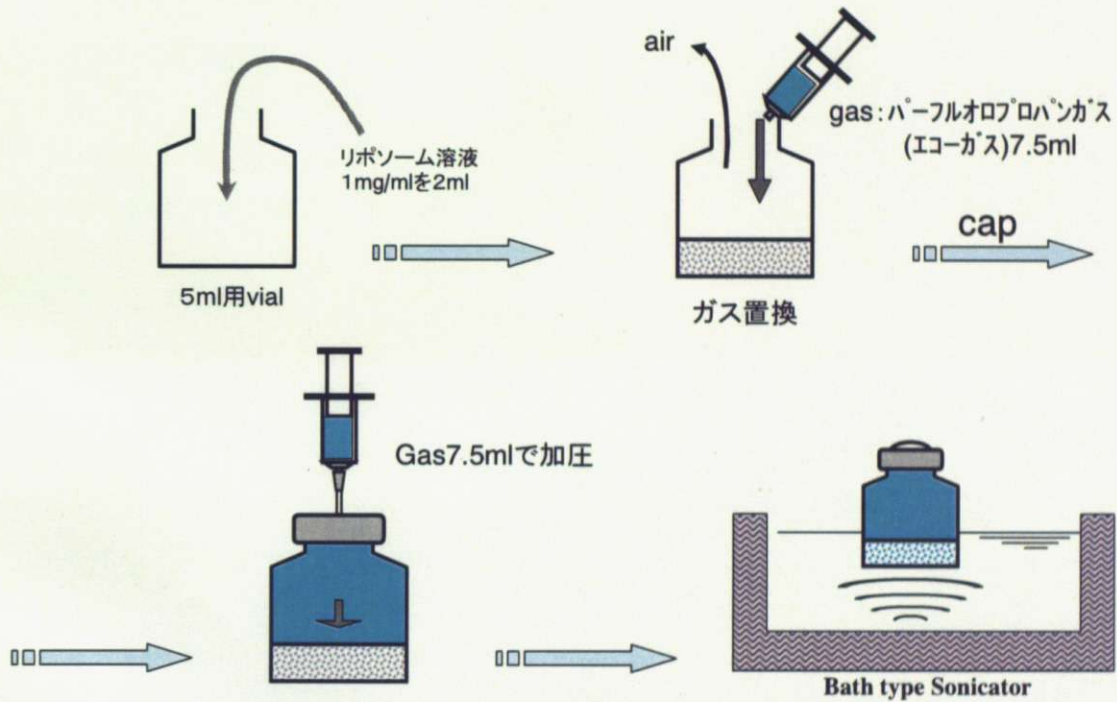


Fig.2-1: リポソーム調整方法

2) ルシフェラーゼ活性抑制実験

48well plate に UM-UC-3^{Luc} を播種する。細胞が培養皿へ接着後、Opti-MEM に培地を交換する。Lipofectamine2000 でルシフェラーゼ siRNA の最終濃度 16.6nM、バブルリポソームでは最終濃度 100nM で導入を行なう。バブルリポソーム添加後、周波数 980kHz、5Vrms(1.6W/cm²)、Duty Ratio50%、で 10 秒照射を行なった。超音波照射後 16 時間後に培地を MEM に交換する。24 時間後と 48 時間後に細胞を回収し、ルシフェラーゼ活性を測定する。

実験条件を以下に示す。

超音波照射のみ：

Opti-MEM200μl/well

バブルリポソーム+超音波：

Opti-MEM180μl/well+バブルリポソーム 20μl/well

バブルリポソーム+超音波+control-siRNA：

Opti-MEM176μl/well+バブルリポソーム 20μl/well+5μM control-siRNA 4μl/well

バブルリポソーム+超音波+ルシフェラーゼ-siRNA：

Opti-MEM176μl/well+バブルリポソーム 20μl/well+5μM ルシフェラーゼ-siRNA 4μl/well

Lipofectamine2000+control-siRNA：

MEM500μl+Opti-MEM100μl+lipofectamine 1μl+2.5μM control-siRNA4μl

Lipofectamine2000+ルシフェラーゼ-siRNA：

MEM500μl+Opti-MEM100μl+lipofectamine 1ml+2.5μM ルシフェラーゼ-siRNA4μl

3) ルシフェラーゼ活性測定

アスピレーターを用いて well から培地を取り除き PBS(-)洗淨を行なう。Lysis buffer (ピッカジーン) を加え 5 分放置する。細胞回収後、液体窒素で凍結させ室温で融解させる。15000rpm,4℃,5min 遠心後上清を回収しタンパク量を定量する。タンパク量を 5mg に合わせルシフェリン (ピッカジーン) を 100 μ l/well 加え、吸光度 562nm で測定しルシフェラーゼ活性を測定する。

3. バブルリポソームによるソノポレーションの問題点検討

1) 超音波による siRNA の分解能検討

control siRNA(Ambion)を RNase-free water で希釈し、1ng/1 μ l 濃度に調整し 500 μ l を 24well plate に加える。周波数 980kHz、Duty Ratio50%、出力 1W/cm²~5W/cm² で 60 秒間または 120 秒間超音波を照射する。超音波照射後に回収し、3M NaOAc50 μ l、エタチンメイト 3 μ l、100%エタノール 1250 μ l を加え、攪拌する。15000rpm、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心後上清を除き 70%エタノール 300 μ l を加える。15000rpm、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心し上清を除いて風乾する。

風乾後に RNase-free water20 μ l を加え、5%の Nusieve GTG Agarose(TaKaRa)ゲルで電気泳動を行なった。

4. イムノバブルリポソームによる実験系の確立

1) 抗原検討

膀胱がん細胞株をトリプシン処理し、カルチャースライドへ播種する。細胞接着を確認後冷 10%パラフォルムアルデヒドリン酸緩衝溶液で 10 分固定する。3% H_2O_2 /MeOH 中で 20 分処理し PBS(-)洗浄を 15 分間、3 回行なう。3%スキムミルクを滴下し、ブロッッキングする。Ep-CAM,CD-44v6 の抗体を調整し、スライドに滴下して 1 時間放置。PBS(-)洗い 3 分を 3 回行なう。ヤギ抗マウス IgG (DAKO) を滴下。PBS(-)洗い 5 分を 3 回行なう。DAB(DAKO)を調整し、滴下。milliQ 水ですすいだ後にヘマトキシリンに入れ流水で洗浄しエタノール、キシレン処理をした後にマリノールで封入する。

抗体番号及びメーカー

抗 Ep-CAM(Epithelial adhesion molecule)抗体 : VU-1D9 (serotec)

抗 CD-44v6 抗体 : 2F-10 (R&D)

抗 CD-44v6 抗体 : VFF-7 (ALEXIS)

抗 CD-44v6 抗体 : VFF-18 (Chemicon)

抗体使用濃度

VU-1D9 : 4 μ g/ μ l

2F-10 : 4 μ g/ μ l

VFF-7 : 2 μ g/ μ l

VFF-18 : 1 μ g/ μ l

2) 5637^{Luc}・RT-112^{Luc}の作成

膀胱がん細胞株 5637,RT-112 を 6well plate に播種する。接着後、DMEM に培地を交換する。

Opti-MEM100 μ l に pEF6-Luc-IRES-Venus を 2 μ g 加え混合する。FuGENE7 μ l を加え、vortex した後に 6well plate に加える。48 時間程度経過してから blastcidinS (InvivoGen) によるセレクションを開始する。

3) 細胞のクローン化

目的細胞に遺伝子導入剤を用いてルシフェラーゼを発現させる。導入後、抗生剤でセレクションを行い、96well plate に 0.5cells/well で播種しクローニングを行なう。

4) 5637^{Luc}・RT-112^{Luc}モデルマウス作成

5637^{Luc},RT-112^{Luc} をトリプシン処理し、 2×10^7 cells/ml に調整する。

BALB-c nu/nu マウスに 10%ネンブタール 100 μ l を腹腔内注射して麻酔する。尿道に水滴をつけ、24G \times 3/4”サーフロー留置針の外筒を尿道に挿入する。膀胱を押し尿を除き、0.25%トリプシン EDTA を 100 μ l 注入し 30 分放置する。トリプシンを除去後サーフロー外筒の先で膀胱内を刺激し、出血させる。生理食塩水 100 μ l で膀胱内を洗浄して尿道口を結紮する。細胞懸濁液 100 μ l を注入する。水を与えずに 4 時間放置後、結紮を外す。

フォトンイメージャーでルシフェラーゼ活性を測定し、膀胱回収後に OCT コンパウンド (Sakura Finetek Tissue) に包埋してルシフェラーゼに対して免疫組織化学染色を施す。

5) イムノバブルリポソームの調整及び細胞への親和性の検討

カルチャースライド（4 区画）に RT-112 を播種し、細胞接着後に 4%パラホルムアルデヒドで 10 分間固定する。PBS(-)で洗浄する。

NBD 修飾したリポソームに抗体修飾を施したもの（以下イムノバブルリポソーム）を 1mg/ml で調整してバイアル瓶に加える。C₃F₈を 7.5ml でバイアル瓶を満たし、バイアル瓶の蓋をした後に再度 C₃F₈を 7.5ml 追加し、加圧する。超音波洗浄機にてバブルリポソームを調整し、カルチャースライド 1 区画にイムノバブルリポソームと DMEM を 500 μ l-0 μ l(100% バブル)・375 μ l-125 μ l(75% バブル)・250 μ l-250 μ l(50% バブル)・125 μ l-375 μ l(25%バブル)の比率で加え、37℃で 1 時間インキュベーションする。インキュベーション後 PBS(-)洗浄 15 分を 3 回行ない、蛍光顕微鏡にて蛍光を観察する。

6) イムノバブルリポソームによる siRNA 導入検討

RT-112^{Luc}を Cell Dissociation Solution Non-Ezzymatic(SIGMA)で処理し、Opti-MEM で 1×10^6 cells/ml に調整する。懸濁液 135 μ l を 48well plate に播種し、培養皿への接着を待たずに control siRNA 若しくはルシフェラーゼ-siRNA を 7.5pmol 加える。イムノバブルリポソーム又はバブルリポソームを 15 μ l 加え一定時間揺らしながらインキュベーション後、超音波を照射した。

超音波照射条件

照射プローブ：BFC ϕ 30

Intensity：6W/cm²

Duty Ratio：50%

照射時間：1分

7) イムノバブルリポソームによる siRNA 導入検討②

RT-112^{Luc}を Cell Dissociation Solution Non-Enzymatic(SIGMA)で処理し、Opti-MEM で 2×10^6 cells/ml に調整する。懸濁液 135 μ l を 48well plate に播種し、培養皿への接着を待たずに control siRNA 若しくはルシフェラーゼ-siRNA を 7.5pmol 加える。イムノバブルリポソームまたはバブルリポソームを作成後、1分40秒・3分40秒・5分40秒・7分40秒経過後に 15 μ l/well 加え 10秒間揺らしながらインキュベーションする。その後超音波を照射する。

超音波照射条件

照射プローブ：BFC ϕ 30

Intensity：6W/cm²

Duty Ratio：50%

照射時間：1分

実験結果

1. 表在性膀胱がんモデルマウスの作成

ルシフェラーゼ強制発現株の作成及びフォトンイメージャーでの確認

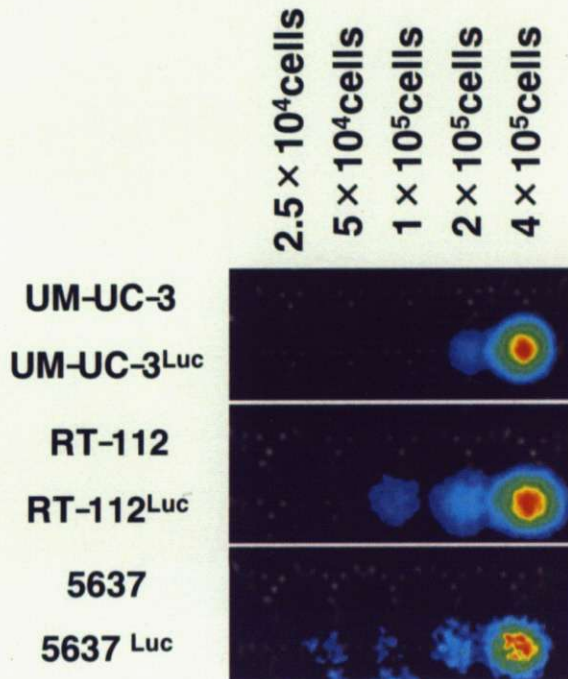


Fig. 3-1: フォトンイメージャーによるルシフェラーゼ活性測定

細胞をトリプシン処理し、 4×10^5 cells/well ~ 2.5×10^4 cells/well まで段階希釈し、ルシフェリンを $100 \mu\text{l}$ 加えた後活性を測定した。

UM-UC-3Luc に導入されている pGL3 のみでは導入を確認するための薬剤耐性を得られない。pcDNA3.1 プラスミドベクターを用いる事でネオマイシン耐性遺伝子を発現させて薬剤耐性を与える事に成功した(Fig.3-1)。本実験ではネオマイシン耐性遺伝子の発現に伴うジェネティシン耐性を利用する為、G418 でのセレクションを行なった。G418 のみのセレクションではルシフェラーゼ活性の無い株も存在する事になるが、トランスフェクションに続くクローニングによってルシフェラーゼ活性の無い細胞を除いた。

RT-112、5637 に導入した pEF6-Luciferase-IRES-Venus は同一プラスミド中にルシフェラーゼとプラストサイジンに対する薬剤耐性遺伝子を有するため、プラストサイジンでセレクションを行い、ルシフェラーゼ活性を有する細胞のみにする事が一過程によって行えた。

UM-UC-3 モデルマウス作成及び免疫染色

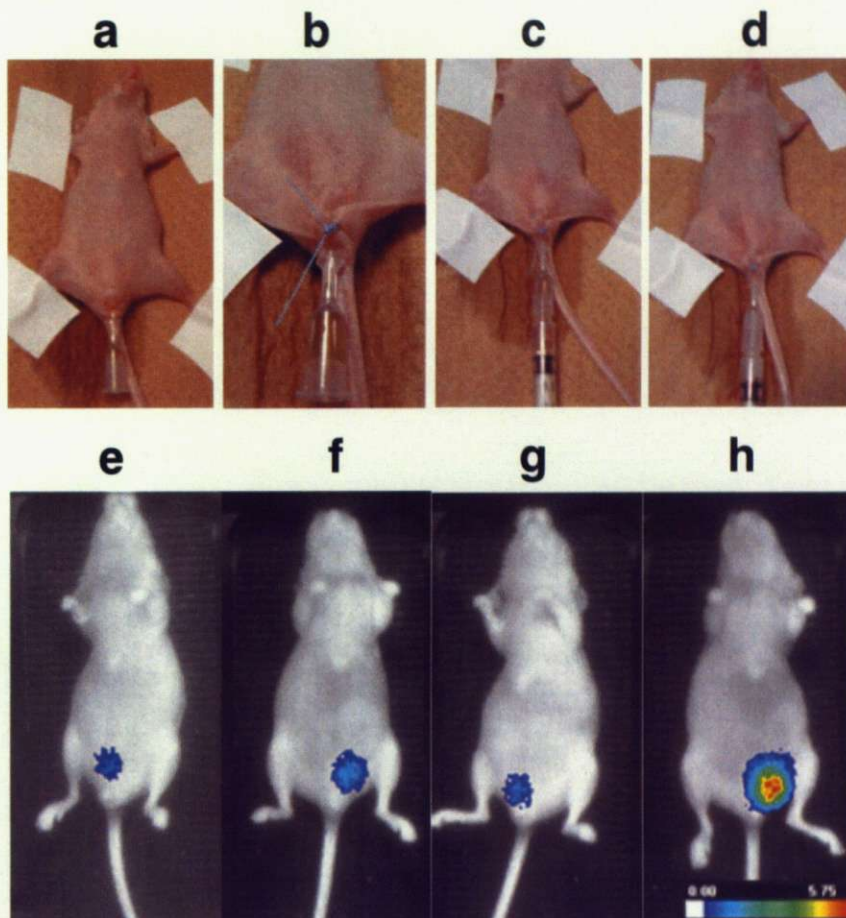


Fig. 3-2: 表在性膀胱がんモデルマウス作成及びフォトンイメージャーによる経時変化

a~d: 表在性膀胱がんモデルマウス作成過程 a: 麻酔を施したマウスの尿道からカテテルを挿入する。b: 尿道口を結紮しカテテルに溜まった尿を除去する。c: トリプシン処理を施す。d: 細胞懸濁液を注入する。

e~h: フォトンイメージャーで観察した経時変化 a: 細胞移入後1週間 f: 2週間
g: 3週間 h: 4週間

膀胱内に UM-UC-3Luc を注入した後、ルシフェラーゼの経時的な増大を確認出来た。実験手技中に出血を伴ったマウスにルシフェラーゼ活性を確認出来る個体が多かったため、以降の実験ではトリプシン処理後にサーフロー外筒で膀胱内を刺激して擦過傷をつける事とした。

表在性膀胱がんモデルマウスの膀胱免疫染色

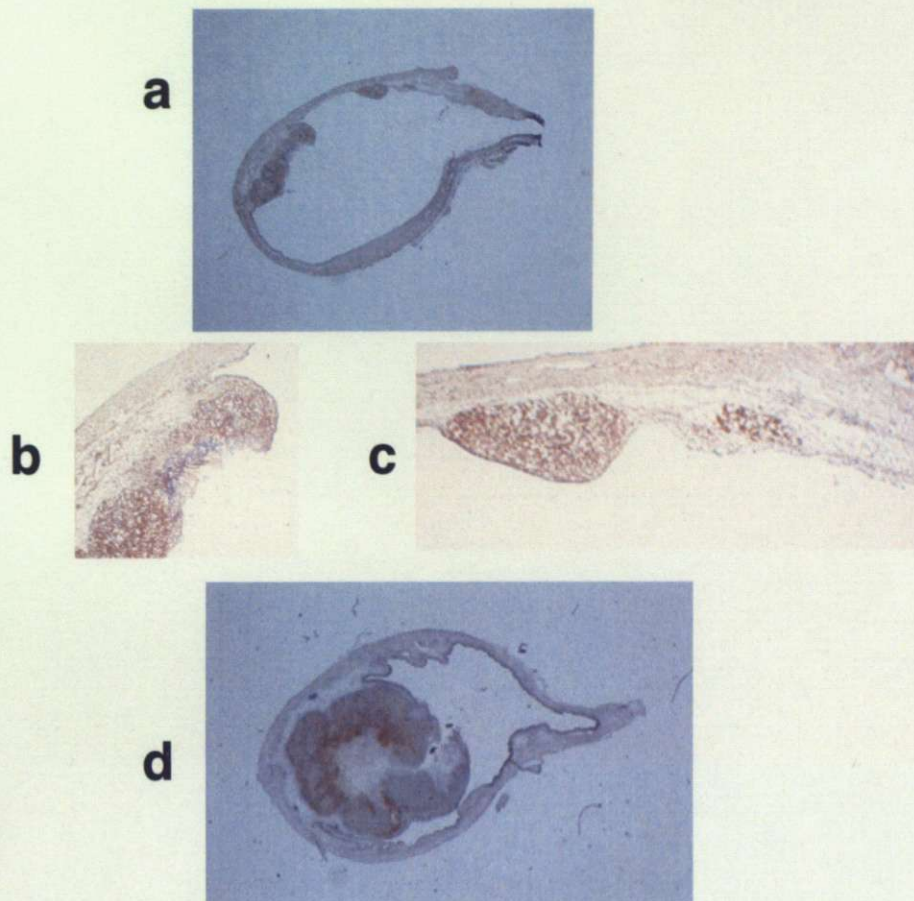


Fig. 3-3 : UM-UC-3^{Luc}モデルマウスの膀胱凍結切片

a : 細胞移入26日目の膀胱切片、ルシフェラーゼ抗体を用いた免疫染色結果
b, c : 腫瘍を拡大したもの d : 細胞移入56日目の膀胱切片

Fig.3-3のaで示される通り、主となる腫瘍は膀胱の奥に存在するがそこから離れた場所にも腫瘍が存在する。

移入から56日間と長期間観察を続けても腫瘍は粘膜層にのみ留まり、筋層へ浸潤する事は無かったため、目的であった表在性膀胱がんモデルマウスの確立は成功した。

2. バブルリポソームによるソノポレーションの検討

ルシフェラーゼ活性抑制テスト

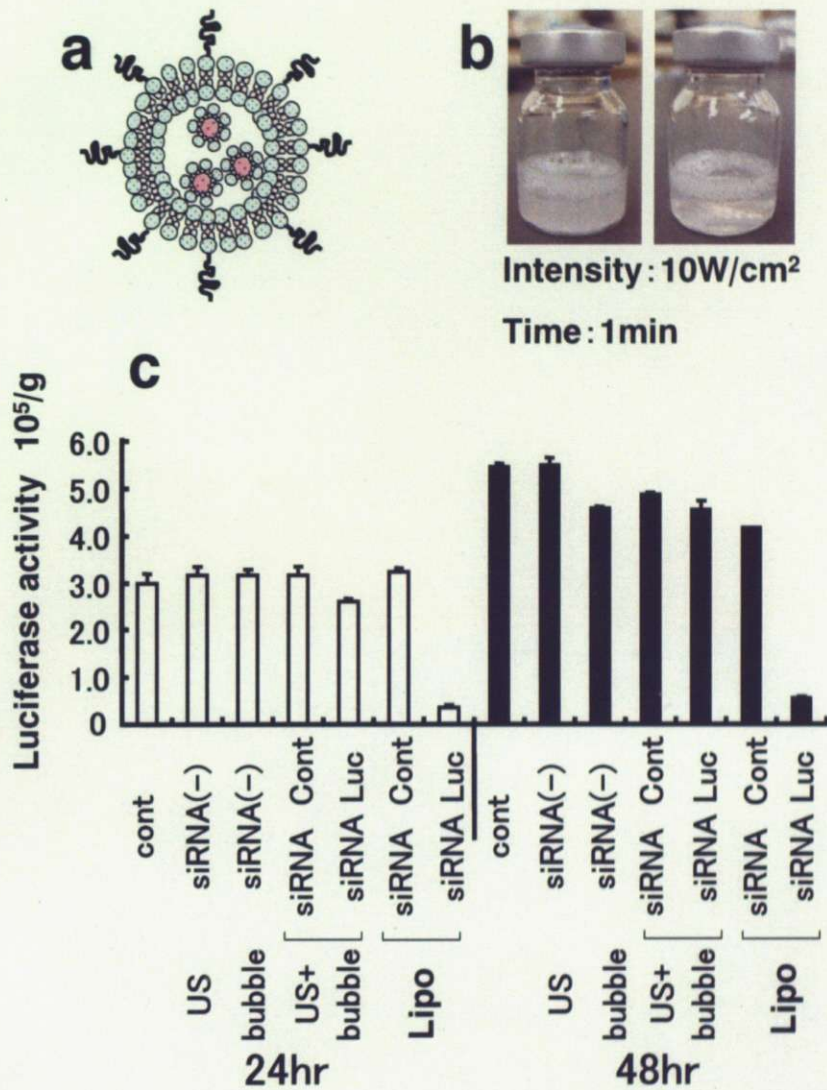


Fig. 3-4: バブルリポソームによるルシフェラーゼ活性抑制

a: バブルリポソームの模式図 二重膜のリポソームにパーフルオロプロパンが取り込まれバブルになっている。 b: 調整後と超音波照射後のバブルリポソーム 10W/cm²の超音波照射後に白濁していた溶液が透き通っている。 c: バブルリポソームによるsiRNA抑制 バブルリポソームを用いてsiRNAを導入した後のルシフェラーゼ活性を示した。

略記号 US:超音波照射

Bubble:バブルリポソーム

Lipo:Lipofectamine2000

トランスフェクション試薬として汎用されている Lipofectamine2000 を用いて、control-siRNA 及び Luciferase-siRNA を導入した際には、ルシフェラーゼ遺伝子の発現が抑制される事を確認した(Fig.3-4 c)。

しかしながら、現在の条件下においてはバブルリポソームと超音波の併用ではルシフェラーゼ抑制効果を確認する事が出来なかった(Fig.3-4 c)。

過去の知見より、同様の実験についてプラスミドを導入する目的で行った実験においてはプラスミドの導入が確認されている事から、目的分子をプラスミドから RNA にした事で問題点が生じた若しくは、実験に用いているバブルが前述の報告とは違うバブルである事が可能性として挙げられる。

具体的には

- I : 超音波による物理的な刺激によって siRNA が破壊されている
 - II : マイクロバブルの起こすキャビテーションの効率が低い可能性
- の2点を挙げ、これらの事項の確認を行う事とした。

3. バブルリポソームによるソノポレーションの問題点検討

超音波による siRNA の分解能検討



Fig. 3-5 : 超音波によるsiRNAの分解能検討

siRNA溶液に超音波照射後、エタノール沈殿を施し電気泳動を行なった。
以下は超音波の照射条件

- | | |
|-----------------------------|------------------------------|
| ①: negative control | ⑦: 5W/cm ² 60sec |
| ②: positive control | ⑧: 1W/cm ² 120sec |
| ③: 1W/cm ² 60sec | ⑨: 2W/cm ² 120sec |
| ④: 2W/cm ² 60sec | ⑩: 3W/cm ² 120sec |
| ⑤: 3W/cm ² 60sec | ⑪: 4W/cm ² 120sec |
| ⑥: 4W/cm ² 60sec | ⑫: 5W/cm ² 120sec |

siRNA に超音波を照射し、電気泳動の結果を得た。超音波の照射によってされることで siRNA が破壊されていない事が確認された。前述のバブルリポソームでの検討では超音波照射が 10 秒だった事から超音波による siRNA の分解が直接的な問題では無い事が明らかとなった。

よって今後の遺伝子導入方法の実験の検討にあたり、よりキャピテーションの効率を上げる事が必要であると考えた。キャピテーションの効率を上げる為、バブルリポソームがより細胞に近づいている必要がある事を示唆した報告がされていた[22]。

そこで実験に用いているバブルリポソームの表面に抗体修飾を施す事によりバブルリポソームと細胞との親和性を向上させ、よりキャピテーションの効率を上げる事とした。

抗原に用いる分子の決定に際し、より臨床応用が可能である技術に近づけるため典型的な腫瘍マーカーである Ep-CAM(Epithelial adhesion molecule)[23, 24]と CD44v6[25-27]を抗原として用いる事とした。膀胱がんにおいて CD44v6 の発現を確認した報告もある[28]。抗体で修飾したバブルリポソーム (イムノバブルリポソーム) を用いた場合のキャピテーションの模式図を Fig.3-5-2 に示す。

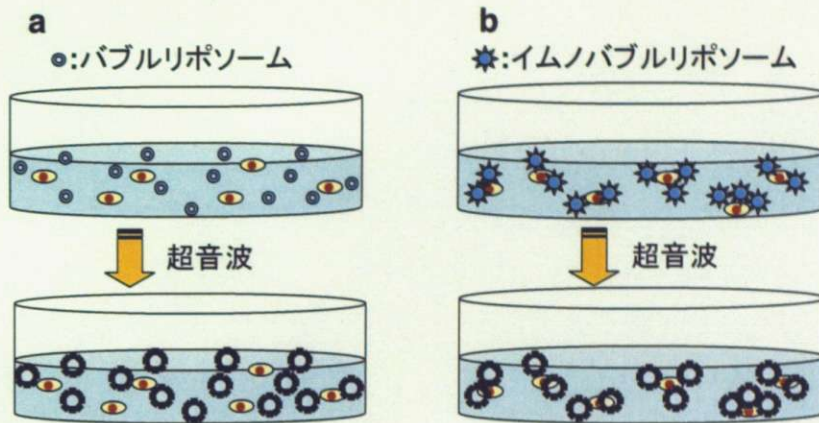


Fig. 3-5-2: イムノバブルリポソームによるキャビテーション

従来のバブルリポソームは培地中に一様に存在するため、キャビテーションを引き起こすとされるバブルの破裂も培地中で一様に起きていたと推察出来る。それとは対照的に、実験に用いる膀胱がんの膜抗原を認識するイムノバブルリポソームを使用した場合、バブルは細胞膜に結合し、キャビテーションも細胞に近い箇所で起こると考えられる。

イムノバブルリポソームに用いる最適な細胞株を同定するため、モデルマウスの作成が可能な UM-UC-3 を含め、複数の膀胱がん細胞株での Ep-CAM, CD44v6 の発現を検討した。

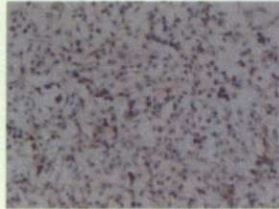
4. イムノバブルリポソームによる実験系の確立

抗原検討

UM-UC-3

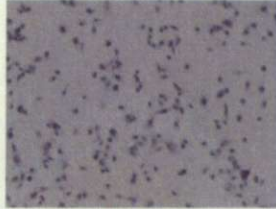


Ep-CAM (VU1D9)



CD44v6 R&D (2F-10)

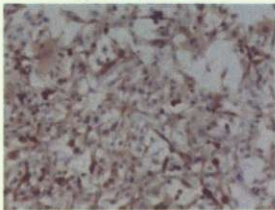
UM-UC-3 pGL3



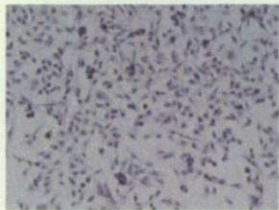
Ep-CAM (VU1D9)



CD44v6 R&D (2F-10)



CD44v6 Chemicon (VFF-18)



CD44v6 ALEXIS (VFF-7)

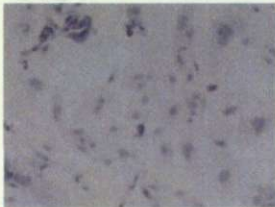


CD44v6 Chemicon (VFF-18)



CD44v6 ALEXIS (VFF-7)

J-82



Ep-CAM (VU1D9)

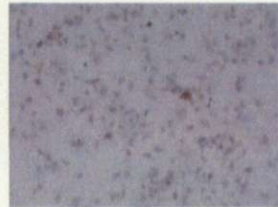


CD44v6 R&D (2F-10)

TCCSUP



Ep-CAM (VU1D9)



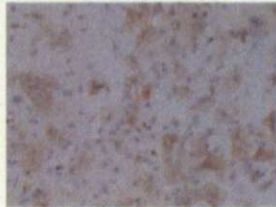
CD44v6 R&D (2F-10)



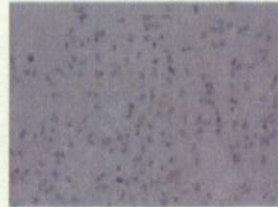
CD44v6 Chemicon (VFF-18)



CD44v6 ALEXIS (VFF-7)



CD44v6 Chemicon (VFF-18)



CD44v6 ALEXIS (VFF-7)

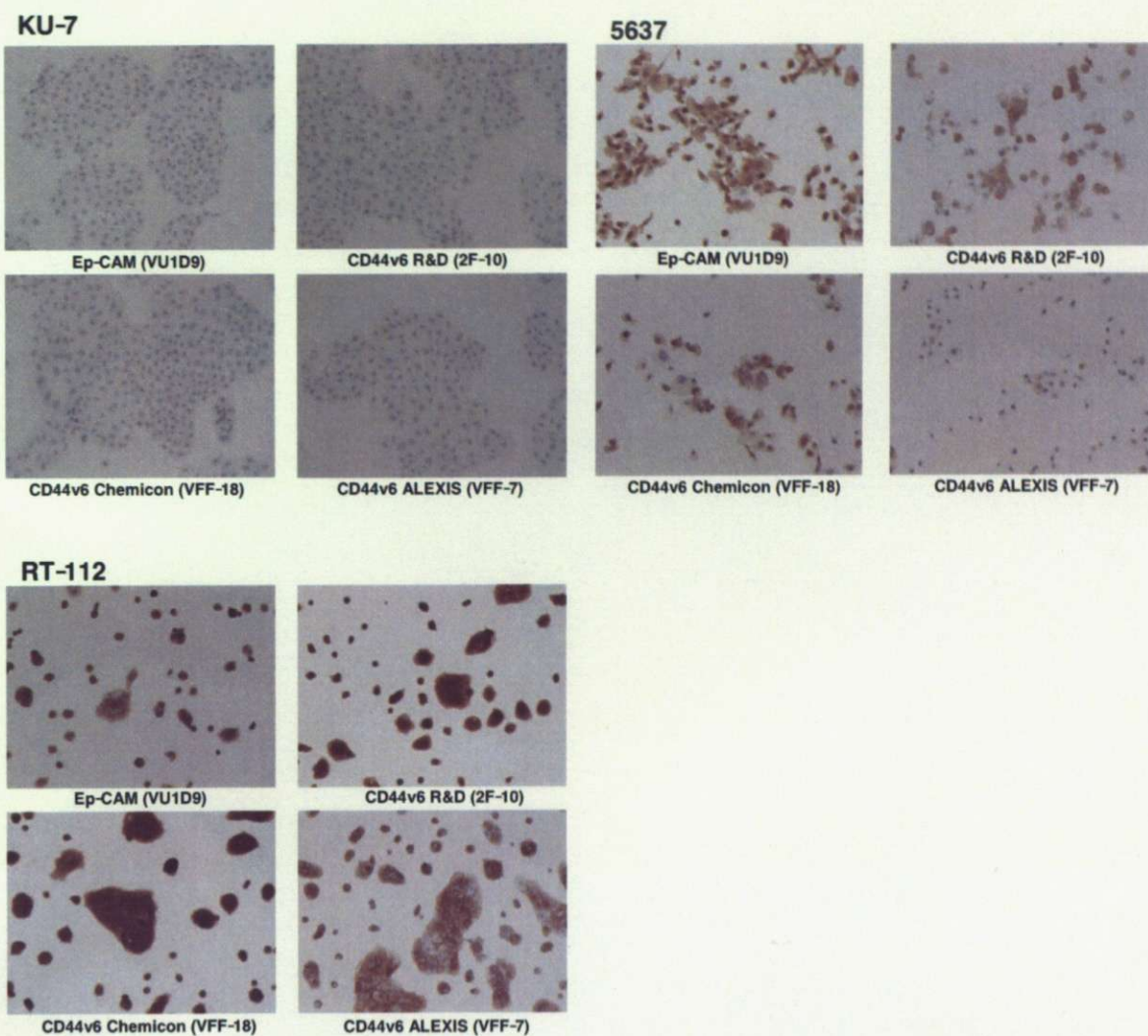


Fig. 3-6 : 膀胱がん細胞株におけるEp-CAM, CD44v6の発現

膀胱がん細胞株を固定後Ep-CAMとCD44v6に対して免疫染色を行なった。

免疫染色の結果を Fig.3-6 にまとめた。表在性膀胱がんのモデルマウスが得られているUM-UC-3にはEp-CAMの発現が確認出来なかった。また発現の確認されたCD44v6についても細胞株毎に染色されている濃度に差があり、発現の強弱が確認出来た。CD44v6の発現が強く、Ep-CAMも発現している5637とRT-112について既に確立している表在性膀胱がんモデルマウスの作成が可能か否か検討を行なった。

5637^{Luc}, RT-112^{Luc} モデルマウス作成

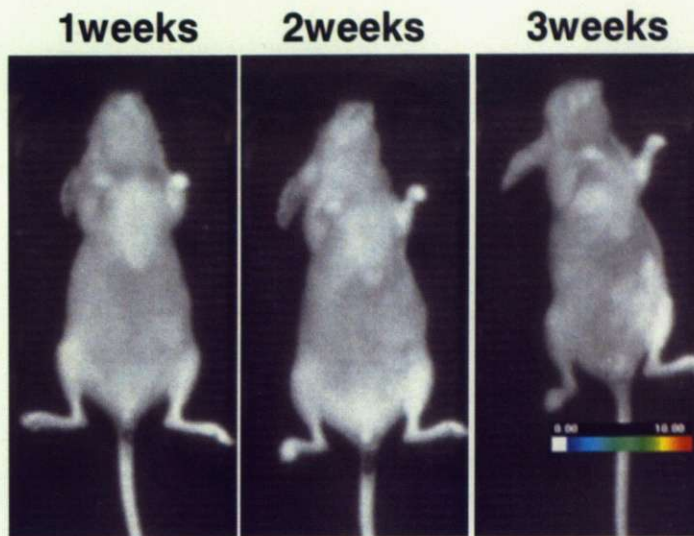


Fig.3-7: 5637^{Luc}によるモデルマウス

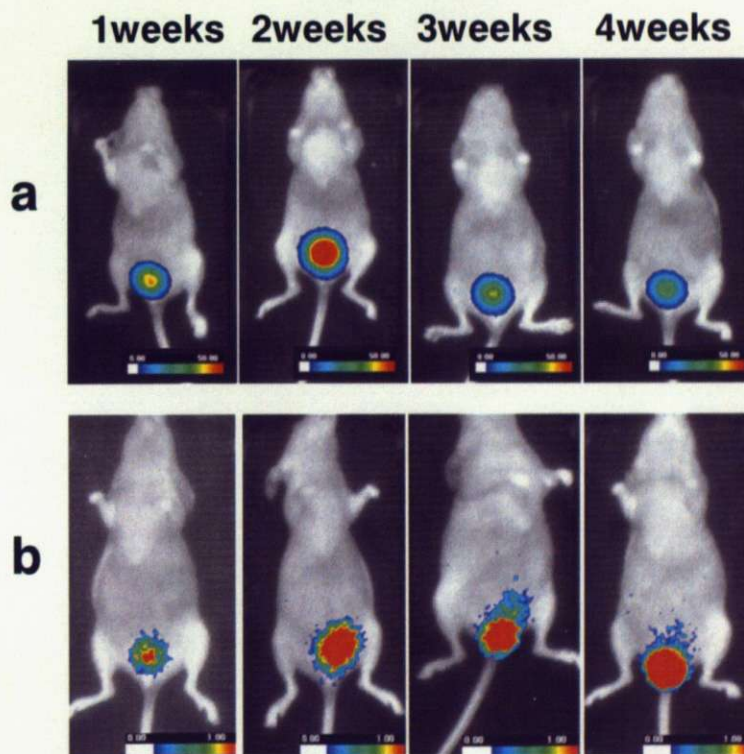


Fig. 3-8 : RT-112^{Luc}によるモデルマウスの経時変化

RT-112^{Luc}を移入した表在性モデルマウスの経時変化a, b共に膀胱内にルシフェラーゼ活性が確認出来る。

フォトンイメージャーでルシフェラーゼ活性の経時変化を観察した。5637^{Luc}によるモデル作成では移入後 3 週間目までルシフェラーゼの活性が測定出来なかった(Fig.3-7)。一方、RT-112^{Luc}での検討では経時的なルシフェラーゼの活性の上昇が確認され、細胞の生着が示唆された(Fig.3-8 a,b)。

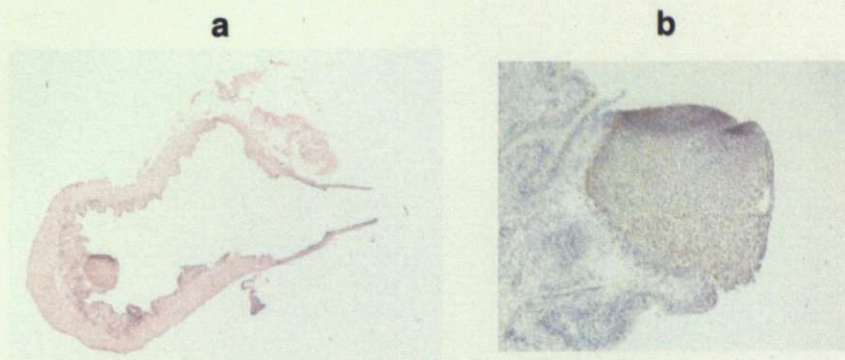


Fig. 3-9 : RT-112^{Luc}モデルマウス膀胱切片

RT-112^{Luc}を移入後4週後に切除した膀胱をルシフェラーゼ抗体で免疫染色した。
a : 膀胱の切片写真 b : 腫瘍の拡大写真

RT-112^{Luc}モデルマウスの膀胱を回収し、免疫染色を行なった。UM-UC-3による腫瘍は粘膜層内に存在しているように感じられたが(Fig.3-3 b,c)、対照的に RT-112 の腫瘍は粘膜層に付着しているように感じられる(Fig.3-9 b)。RT-112 で作成したマウスのルシフェラーゼ活性は2週間後に最も高く、以降は減少する個体が多く確認された(Fig.3-8 a,b)。またルシフェラーゼ活性が上昇後、活性部位が尿道部に移動するマウスも数匹確認された事から RT-112 による腫瘍はもろく、一定以上の大きさになると剥がれ落ち、尿道に詰まる事が考えられた。それを示唆する様に Fig.3-8b の個体は膀胱内でのルシフェラーゼ活性の上昇後、ルシフェラーゼ活性が尿道に移動している。

RT-112^{Luc}の成長速度の差異について

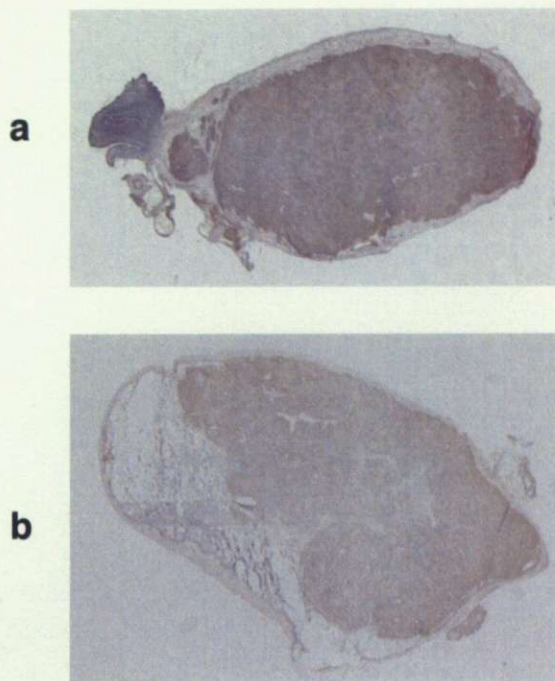


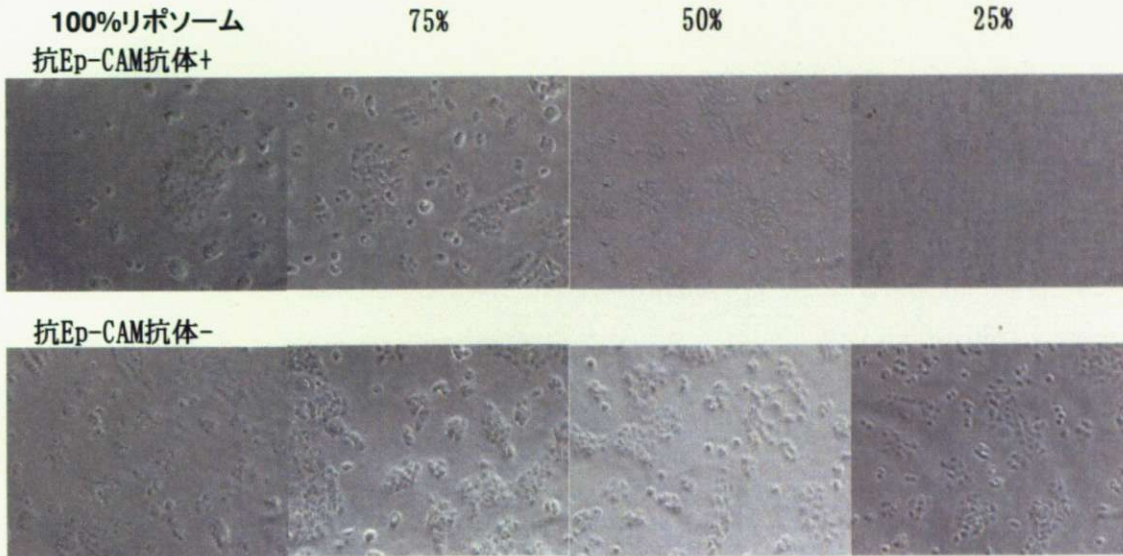
Fig. 3-10 : RT-112^{Luc}による膀胱内腫瘍

RT-112^{Luc}移入後3週目に回収した膀胱のルシフェラーゼ免疫染色画像

これらの個体は膀胱回収時には、細胞移入後 3 週間であったが膀胱内が腫瘍で満たされている(Fig.3-10)。4 週目に回収した膀胱と比べて腫瘍の成長速度の速さを示している(Fig.3-9)。腫瘍により膀胱内を満たされていたにも関わらず腫瘍が膀胱外に浸潤していなかった。RT-112 を用いても表在性膀胱がんのモデルマウスの作成が可能であった。

イムノバブルリポソームの検討

a



b

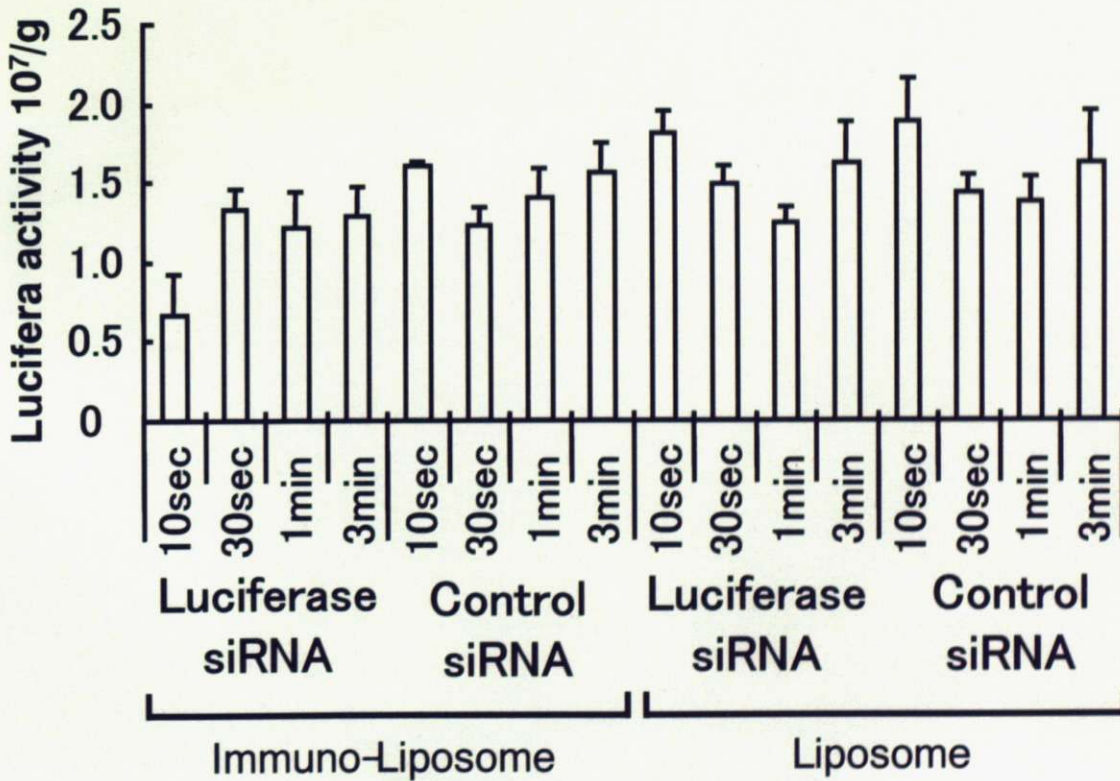


Fig. 3-11: イムノバブルリポソーム

イムノバブルリポソームとRT-112の親和性を検討した。a: 固定細胞とイムノリポソームをインキュベーションした結果 b: イムノバブルリポソームを用いたsiRNA導入検討

抗 Ep-CAM 抗体で修飾されているリポソームでは蛍光が確認され、リポソームが細胞へ接着している事が確認された(Fig.3-11 a 上段)。一方、抗体修飾を施していないリポソームでは蛍光が確認されず、細胞への接着が確認できなかった(Fig.3-11 a 下段)。リポソームへの抗体修飾の過程によって抗体の失活が起きなかった事が確認出来た。以降の実験ではこのリポソームを用いて作ったイムノバブルリポソームを使って実験を行った。

イムノバブルリポソームを用いてルシフェラーゼ遺伝子抑制実験を行った。イムノバブルリポソームを培地に添加後、10 秒間・30 秒間・1 分間・3 分間のインキュベーションを行なった後に超音波を照射した。同一条件下でありながらバラツキの大きい結果となった(Fig.3-11 b)。各群の中でイムノバブルリポソームを作成した直後に行なったイムノバブルリポソーム-Luciferase siRNA-10 秒の条件で著しいルシフェラーゼ抑制効果が確認された。この結果からバブルリポソーム作成後に時間依存的にバブルリポソームが崩壊しており、バブルリポソーム作成後一定時間を過ぎた系では siRNA 導入が行なえない可能性が示唆された。このため、バブルリポソームの作成から培地に添加するまでの経過時間を固定し、実験を行う事とした。

イムノバブルリポソームによる siRNA 導入実験

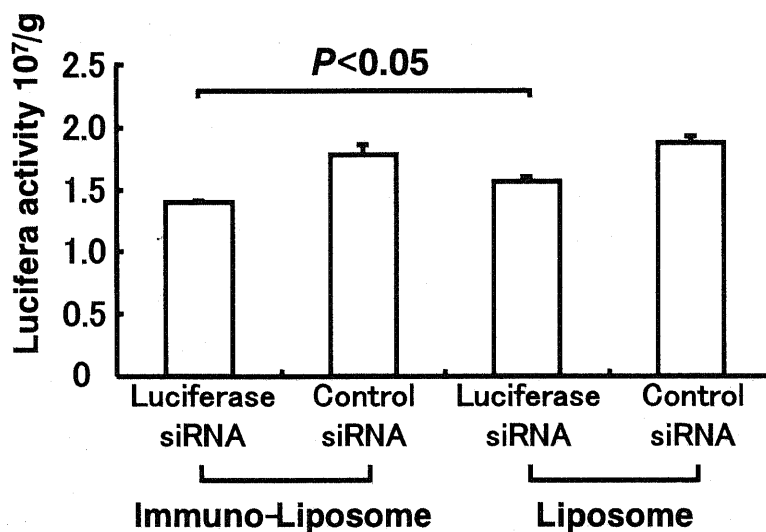


Fig 3-12 : イムノバブルリポソームによる遺伝子導入

各々のバブル調整後1分40秒、3分40秒、5分40秒、7分40秒経過後にバブルを添加

バブルリポソームを作成してから短時間で遺伝子導入の検討を行なった結果、非常に安定した実験結果を得られた。また、ルシフェラーゼ-siRNA を導入した群ではルシフェラーゼ活性の抑制が観察された。さらにバブルリポソームの表面に抗体修飾を施したイムノバブルリポソームでは有意な抑制効果を確認出来た。

考察及び博士課程における展望

表在性膀胱がんモデルマウス作成における膀胱内壁への刺激

研究を始めた当初は全くモデルマウスの作成が成功しなかった。トリプシン処理若しくはカテーテルを強く突き立てたことにより出血したマウスに成功例が多い事からカテーテルの先で膀胱内に擦過傷をつける事で問題が解決した。擦過傷をつける行為は物理的に粘膜層を傷つけるため、筋層で腫瘍が増殖する事になり腫瘍の浸潤性膀胱がんへの変異を惹起する可能性があると考えたが影響は無かった。本研究におけるモデルマウス作成では病理学的に表在性膀胱がんである事を確認出来た。

トリプシン処理によるモデルマウス作成方法の他に電極[12]、塩酸[29]で膀胱内を処理する方法が報告されている。これらの報告から表在性膀胱がんモデルマウスを作成するためには膀胱内壁を腫瘍が増殖しやすい環境に整える事が不可欠だと示唆されている。

データには示していないがフォトンイメージャーでの測定結果では細胞移入後には除々にルシフェラーゼ活性が減少していき、細胞移入後 10 日前後からはルシフェラーゼ活性の値が上昇する。この結果から細胞が 10 日程度膀胱内に留まれば細胞が増殖する状況になると考えられるが、膀胱内を刺激する事によって擦過傷が膀胱内に出来、その傷に細胞が生着する事で排尿によって体外へ運ばれる事が少なくなるのではないかと考えられる。

表在性膀胱がんモデルマウスの利用

UM-UC-3 によるモデルマウス作成では、非常に高い確率でモデルを得られた。この UM-UC-3 には Ep-CAM の発現が確認できなかった。しかし UM-UC-3 にも CD44v6 の発現は確認されたため(Fig.3-6)、今後イムノバブルリポソームに用いる抗体を抗 CD44v6 抗体にする事で UM-UC-3 モデルマウスの膀胱内においてもイムノバブルリポソームが腫瘍をターゲティングする事が可能であると考えられる。

RT-112 は Ep-CAM を発現しているため(Fig.3-6)、RT-112 モデルマウスは我々が作製したイムノバブルリポソームが使用出来る。しかしながら、モデルマウス作成の成功率は UM-UC-3 ほど高くない。これは RT-112^{Luc}のクローン化を行っていないため、細胞の性質の違いによるものであると考えられる。加えて、細胞移入後 4 週間後に小さな腫瘍がある個体が確認された一方(Fig.3-9)、移入後 3 週間後にも関わらず膀胱を埋めている腫瘍がある個体が確認されており(Fig.3-10)、生着した細胞の膀胱内での増殖速度にも差異が生じている。今後はルシフェラーゼ活性の強い RT-112^{Luc}をクローン化し、実際にモデルマウスの作成検討を行い最適な増殖速度の細胞での系を確立する事が必要である。

本研究開始当初はバブルリポソームによる *in vivo*での検討のために作成を行なった表在性膀胱がんモデルマウスであったが、発現している膜タンパクの同定(Fig.3-6)や当研究室保有の抗体との親和性を確認した結果(Fig.3-11 a)、本研究で行なったバブルリポソームによ

る検討のみでは無く抗体修飾した抗がん剤の効果の検討等、表在性膀胱がんの治療実験に幅広く応用出来ると考えられる。

5637についても既に確立している表在性膀胱がんモデルマウス作成方法に基づいてモデルマウス作成を行なった。細胞移入後 2 週間経過したマウスをフォトンイメージャーで測定した結果(Fig.3-7)、ルシフェラーゼ活性が確認されないため 5637 では表在性膀胱がんモデルマウスの作成が出来ない事が明らかとなった。

ソノポレーションの条件検討

これまでのソノポレーションに関する報告では Levovist、Optison などの使用によるものが主である事から[3]、本研究でもそれらのマイクロバブルを用いて超音波の照射強度、時間、導入分子の濃度などを検討してみるべきであった。しかしながらマイクロバブルに加えて、本研究で使用した超音波プローブも論文中で使用されている超音波プローブ(NEPAGENE 社製)とは異なるため、一概に同条件が適切とは考えられず、既存のマイクロバブルでの検討を行わずにバブルリポソームを用いて条件検討を行なった。実験結果は示していないが本研究の条件下でプラスミドの導入を行なった結果として、 $6\text{W}/\text{cm}^2$ での照射条件が適切だという知見が得られた。プラスミドの実験と同様に siRNA に対して行なった実験によっても $6\text{W}/\text{cm}^2$ の出力での siRNA 導入が確認された(Fig.3-12)。この結果は報告されている超音波出力よりも強い出力であり、本研究で使用しているバブルリポソームが既存のマイクロバブルよりも高いエネルギーによってキャビテーションを誘発する事が示唆された[4, 8]。

Fig.3-11 a の結果は抗体に標識した蛍光が全ての細胞に結合している様には見えないため、リポソームに結合させる抗体の数もしくは抗体の抗原への親和性を向上させる事でさらに強い siRNA 導入効率を得られるのではないかと考えている。また、本実験ではバブルリポソームの添加量を全液量の 10%に固定したが添加比率を上げる事で相対的なバブルの存在率を上げ、キャビテーションの効率を向上出来る可能性があると考えられる。

in vivo による検討

*in vitro*において十分なソノポレーション条件とクローン化した RT-112^{Luc}により作成した表在性膀胱がんモデルマウスの確立後、それらを使用して *in vivo*での検討を行う予定である。*in vivo*においては *in vitro*よりも強い強度で超音波を照射する事が可能であるため[3]、 $6\text{W}/\text{cm}^2$ を超える出力で検討を行なう事が可能であると考えられる。高い出力での超音波の照射は強いソノポレーションの効果を誘発するため、*in vivo*ではより高い siRNA 導入効果を得られると考えている。

*in vivo*での超音波照射条件決定後には、表在性膀胱がんに特異的に発現している遺伝子に対する siRNA を用いる事で抗腫瘍作用を検討する予定である。

参考文献

1. Paz-Ares, L., et al., *Phase III study of gemcitabine and cisplatin with or without aprinocarsen, a protein kinase C-alpha antisense oligonucleotide, in patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer*. J Clin Oncol, 2006. 24(9): p. 1428-34.
2. Tachibana, K., et al., *Induction of cell-membrane porosity by ultrasound*. Lancet, 1999. 353(9162): p. 1409.
3. Li, T., et al., *Gene transfer with echo-enhanced contrast agents: comparison between Albunex, Optison, and Levovist in mice-initial results*. Radiology, 2003. 229(2): p. 423-8.
4. Ohta, S., et al., *Microbubble-enhanced sonoporation: efficient gene transduction technique for chick embryos*. Genesis, 2003. 37(2): p. 91-101.
5. Taniyama, Y., et al., *Local delivery of plasmid DNA into rat carotid artery using ultrasound*. Circulation, 2002. 105(10): p. 1233-9.
6. Maruyama, K., et al., *[Drug and gene delivery by "bubble liposomes" and ultrasound]*. Yakugaku Zasshi, 2007. 127(5): p. 781-7.
7. Saito, M., et al., *Sonoporation mediated transduction of pDNA/siRNA into joint synovium in vivo*. J Orthop Res, 2007. 25(10): p. 1308-16.
8. Kinoshita, M. and K. Hynynen, *Key factors that affect sonoporation efficiency in in vitro settings: the importance of standing wave in sonoporation*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. 359(4): p. 860-5.
9. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. 391(6669): p. 806-11.
10. Agrawal, N., et al., *RNA interference: biology, mechanism, and applications*. Microbiol Mol Biol Rev, 2003. 67(4): p. 657-85.
11. Soloway, M.S., *Intravesical and systemic chemotherapy of murine bladder cancer*. Cancer Res, 1977. 37(8 Pt 2): p. 2918-29.
12. Soloway, M.S. and S. Masters, *Urothelial susceptibility to tumor cell implantation: influence of cauterization*. Cancer, 1980. 46(5): p. 1158-63.
13. Watanabe, T., et al., *An improved intravesical model using human bladder cancer cell lines to optimize gene and other therapies*. Cancer Gene Ther, 2000. 7(12): p. 1575-80.
14. Kikuchi, E., et al., *Inhibition of orthotopic human bladder tumor growth by lentiviral gene transfer of endostatin*. Clin Cancer Res, 2004. 10(5): p. 1835-42.
15. Edinger, M., et al., *Noninvasive assessment of tumor cell proliferation in animal models*. Neoplasia, 1999. 1(4): p. 303-10.

16. Nogawa, M., et al., *Monitoring luciferase-labeled cancer cell growth and metastasis in different in vivo models*. Cancer Lett, 2005. 217(2): p. 243-53.
17. Hadaschik, B.A., et al., *A validated mouse model for orthotopic bladder cancer using transurethral tumour inoculation and bioluminescence imaging*. BJU Int, 2007. 100(6): p. 1377-84.
18. Ning, S., et al., *siRNA-mediated down-regulation of survivin inhibits bladder cancer cell growth*. Int J Oncol, 2004. 25(4): p. 1065-71.
19. Hou, J.Q., et al., *Effect of small interfering RNA targeting survivin gene on biological behaviour of bladder cancer*. Chin Med J (Engl), 2006. 119(20): p. 1734-9.
20. de Wet, J.R., et al., *Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells*. Mol Cell Biol, 1987. 7(2): p. 725-37.
21. Thierry, A.R., et al., *Systemic gene therapy: biodistribution and long-term expression of a transgene in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. 92(21): p. 9742-6.
22. Newman, C.M. and T. Bettinger, *Gene therapy progress and prospects: ultrasound for gene transfer*. Gene Ther, 2007. 14(6): p. 465-75.
23. Balzar, M., et al., *The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM)*. J Mol Med, 1999. 77(10): p. 699-712.
24. Odashiro, D.N., et al., *Expression of EpCAM in uveal melanoma*. Cancer Cell Int, 2006. 6: p. 26.
25. Koopman, G., et al., *Activated human lymphocytes and aggressive non-Hodgkin's lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44*. J Exp Med, 1993. 177(4): p. 897-904.
26. Heider, K.H., et al., *Differential expression of CD44 splice variants in intestinal- and diffuse-type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa*. Cancer Res, 1993. 53(18): p. 4197-203.
27. Fox, S.B., et al., *Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms*. Cancer Res, 1994. 54(16): p. 4539-46.
28. Matsumura, Y., et al., *Non-invasive detection of malignancy by identification of unusual CD44 gene activity in exfoliated cancer cells*. Bmj, 1994. 308(6929): p. 619-24.
29. Kadhim, S.A., et al., *Genetically regulated response to intravesical bacillus Calmette Guerin immunotherapy of orthotopic murine bladder tumor*. J Urol, 1997. 158(2): p. 646-52.

謝辞

本研究は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おいて行ないました。

研究室として所属した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の松村保広先生、安永正浩先生、小泉史明先生、黒田順一郎先生、古賀宣勝先生、根岸孝仁先生、中島貴子先生、宮武浩子さん、三江直子さん、金井智恵子さん、椎名薫さん、阿部恵子さんには、研究を始め至らぬ点をご指導頂きありがとうございました。

本研究に用いたりポソームを提供して頂き、ご助言を下された帝京大学薬学部生物薬剤学教室の丸山一雄先生、鈴木亮先生、滝澤知子先生、超音波照射プローブを提供して頂き、ご助言を下された東北大学先進医工学研究機構の小玉哲也先生に深謝いたします。

研究科の同期で共に研究を行なった齋藤洋平君、梶田千尋さん、金原左京君、真田賢君、星野歩子さんにも大変お世話になりました。ありがとうございました。また後輩である荒川寛茂君、鷺見美幸さんに対しては頼りない先輩でしたが支えて頂きありがとうございました。