博士論文

DDS として PIC ミセルを使用したヒトパピローマウイルス（HPV）癌遺伝子 E6 および E7 をターゲットとした siRNA 治療の研究

西田　晴香

要旨

ヒトパピローマウイルス(HPV)の癌遺伝子である E6 および E7 は HPV 関連癌の発癌に必要不可欠である。E6 と E7 を標的とした核酸薬の開発は子宮頸癌治療として有望であるが、核酸薬は体内で容易に分解・排出されるためデリバリーシステムを必要とする。E6/E7 遺伝子を標的とした siRNA 内包型ポリオンコンプレックス（PIC）ミセルを、免疫不全の子宮頸癌皮下移植マウスへ全身投与することで、腫瘍の増大を抑制することができ、免疫正常な子宮頸癌自然発生マウスモデルにおいても、効果がある可能性が示唆された。HPV E6/E7 siRNA を内包した PIC ミセルは、HPV 関連癌の有効な分子標的薬となると期待される。

目次

要旨 2

目次 3

序文 4

研究目的 11

材料と方法 12

結果 26

考察 45

謝辞 50

引用文献 52

序文

siRNA とドラッグデリバリーシステム

HPV の発癌遺伝子である E6 および E7 を標的とした siRNA を含む核酸医薬は、ウイルスの発癌遺伝子を抑制するのに非常に有望な技術である。*in vitro* においては E6/E7 siRNA を使用し HPV 陽性子宮頸癌の細胞株の発育を抑制したという報告がすでにいくつかなされている[1-3]。また、ヌードマウスの子宮頸癌モデルで E6/E7 遺伝子をターゲットとした核酸医薬を腫瘍内に注射することで腫瘍の発育を抑制できた、という報告もある[4-6]。

しかしながら、siRNA は単体ではマイナスイオンの電荷を強く帯びており、癌細胞内へ取り込まれにくく、体内に存在する RNase 等の RNA 代謝によって容易に分解される。また、貪食細胞に取り込まれ、速やかに体外に排出されるなどの特徴がある。このため siRNA の全身投与でその遺伝子抑制の機能を発現させるには、特別なデリバリーシステムが必要である。そこで、東京大学工学部では、運搬体として高分子ナノキャリアを用いることによって、血中滞留時間を延長し、正常細胞に対しての非特異的な集積を回避し EPR（ enhanced permeability and retention ）効果により腫瘍内に特異的に取り込まれるように改善することができた[7]。核酸医薬の運搬体として研究されてきた物質の中には、陽イオン性の脂質やペプチド、ポリマーなどが含まれている[8]。これら

の中で siRNA 内包型のポリオンコンプレックスミセル(PIC ミセル)は、陽イオンを帯びたブロックコポリマーと siRNA と混合することにより互いに集積し自然形成され、siRNA を内包した非常に有望な高分子キャリアとして開発されてきた[9,10]。ミセルの核の部分で siRNA とジスルフィド結合をさせるために、チオールを官能基としてもつポリ（エチレングリコール）とポリ（L–リジン）のブロック共重合体から調製した、ミセルのドラッグデリバリーシステムが東京大学工学部で開発された[11]。架橋された PIC ミセルは正確に規定されたサイズであり（直径 45nm）、生体内環境で安定性を増し、*in vitro* における siRNA の効果を高めることができたと報告されている[11]。東京大学工学部において、PIC ミセルの腫瘍に対する特異的な修正を高めるため、cRGD(cyclo-Arg-Gly-Asp)ペプチドをポリエチレングリコール（PEG）の末端に搭載させた。cRGD は様々な癌細胞や癌関連内皮細胞に過剰発現している $\alpha_v\beta_3/\alpha_v\beta_5$ インテグリンに特異的に結合する蛋白である[12]。cRGD を搭載させたミセル構造に siRNA を内包することで、siRNA の腫瘍内集積を著明に改善させ、結果的に、皮下移植した腫瘍組織内で遺伝子抑制の効果を高めることができた[13,14]。

図 1　ミセル構成と立体構造

子宮頸癌と HPV の発癌メカニズム

子宮頸癌は、先進国において女性に死亡原因となる癌の中でも上位となっている。子宮頸癌の 99%は、世界中で最も一般的な性感染症ウイルスであるヒト発癌性のパピローマウイルス（HPV）の感染と関係している。発癌性 HPV の持続感染は、慢性的なウイルス増殖を招き、その結果 HPV 関連の癌が必然的に発生する。HPV の慢性的な増殖は感染上皮細胞の活発な増殖を促し、その中の一部の感染細胞が偶発的に不死化する。HPV 感染細胞の不死化は、HPV ゲノムと宿主のゲノムの統合と同時に起こり、HPV の癌遺伝子である E6 と E7 の発現が上昇する。最終的に、不死化した細胞内で染色体の不均衡が蓄積し細胞が癌化する。百種類を超える HPV のジェノタイプが確認されているが、HPV16 型および 18 型の感染が子宮頸癌発生原因のタイプのうち 70%以上を占め、腟壁や外陰、肛門、ペニスや咽頭などの他の臓器の癌にも発展する[15]。

HPV の癌蛋白である E6 と E7 の共同作用が、主に悪性腫瘍の維持や HPV 関連癌細胞でのアポトーシスの回避に関わっている。E6、E7 は図に示したように HPV ゲノム上に存在しており、p97 という同一のプロモーターを介して転写される[16]。細胞の分化とともに p97 の活性亢進が起こる。

HPV 感染した細胞内において、E7 は感染した宿主細胞の pRb 蛋白群と結合・または直接分解することによって pRb を不活化させる。pRb 蛋白の主な機能は

細胞周期の調節であり、主に、G1 期から S 期への移行を制御する。pRb と E7 が結合することで、pRb が直接結合してその活性を制御している E2F が遊離され、細胞周期の回転が促進される。HPV E7 蛋白はまた HDACs、サイクリンキナーゼ抑制因子、サイクリン A、E などを含む細胞因子と結合して E2F の遊離を促進して細胞周期を回転させる[17]。E7 には pRb 蛋白以外にも多くの標的タンパク質が同定されているが、E7 の生物学的活性の多くは、概ね pRb 蛋白の不活化に依存していると考えられている[18]。

HPV E6 蛋白は細胞のユビキチンリガーゼ E6AP と結合し、p53 などのユビキチン化を促すことによりプロテアソームにより分解機構を促進し、結果的に p53 の機能を失活させる[19]。HPV E6 はまた、hTert の発現を亢進させ、細胞膜近傍に局在する PDZ 蛋白と結合し分解することにより、テロメラーゼ活性を亢進させ細胞の癌化を促進する[20]。これらの E6 および E7 の働きは HPV 関連癌において細胞の不死化と悪性転化の維持に必要不可欠である。実際、E6 および E7 癌遺伝子は子宮頸癌や前癌病変で広範に発現しているが、正常細胞では発現していない[21]。それゆえに、これらのウイルス癌遺伝子が HPV 関連癌での遺伝子治療の標的として有力な候補であるといえる。

図 2　　HPV16 のゲノム構造

HPV ゲノムは 2 本鎖環状構造である。HPV16 ゲノムには非構造遺伝子（E1,E2,E4,E5,E6,E7）と構造遺伝子(L1,L2)と転写調節領域(LCR)が存在する。LCR には複製開始点、初期プロモーター(p97)およびそれらの調節領域が存在すし、E7 内には後期プロモーター(p670)が存在する。[22]

子宮頸癌自然発生トランスジェニックマウス(K14-HPV16 マウス)

本研究で使用した子宮頸癌自然発生トランスジェニックマウスは、1994 年に開発された[23]。基底扁平上皮細胞内で HPV16 型の癌蛋白発現を誘導するために、ヒトのケラチン 14 のプロモーター/エンハンサーの断片を使用している。HPV16 型遺伝子が組み込まれており、HPV16 型 E6/E7 がマウスの発癌を誘導する。宿主となるマウスは FVB.Cg マウスである。このモデルにおける腫瘍形成は、ホルモン依存性であり、0.1～0.25mg/60 日のエストラジオール誘発により K14-HPV16 マウスの外陰、腟、子宮頚部で浸潤性の明らかな扁平上皮癌が確認された。癌は転移性ではなかった。低エストラジオール用量(0.05mg/60 日)では、扁平上皮癌は子宮頚部上方と子宮体下部の間の移行帯に局在して確認された。上皮異形成はエストラジオール誘発 4 ヶ月で確認され、高度異形成と癌化は 6 ヶ月で確認されたという報告がある[24]。

研究目的

機能性の高い PIC ミセルの利点と E6/E7 ウイルス癌遺伝子というターゲットをふまえ、E6/E7 を標的とした核酸医薬を搭載したミセルが、臨床応用を視野に入れたナノテクノロジーを用いた有望な分子標的治療薬になる可能性が考えられる。今日までに、高分子ミセルを用いた E6/E7 siRNA の全身投与に言及した報告はなされていない[4-6]。我々は E6/E7 をターゲットとした siRNA を子宮頸癌細胞から作成した腫瘍内に PIC ミセルを用いることで運搬し、さらにマウスモデルではマウスの尾静脈から siRNA 内包ミセルを静注することによって、腫瘍増殖を抑制することができるかどうか検討する。

材料と方法

材料

1、siRNA と子宮頸癌細胞株

18E6/E7 siRNA(si18E6/E7) のセンス配列は、5’-CAUUUACCAGCCCGACGAGTT-3’、アンチセンス配列は 5’-CUCGUCGGGCUGGUAAAUGTT-3’ [15]であり、16E6/E7 siRNA(si16E6/E7)のセンス配列は 5’-GAC CGG UCG AUG UAU GUC UUG-3’、アンチセンス配列は 5’-AGA CAU ACA UCG ACC GGU CCA-3’[2]である。siRNA 配列は両方とも E7 の翻訳領域を変換するが、これらの siRNA は E6/E7 プレ mRNA および/または E6 および E7 転写物の減少によって、E6 または E7 のいずれかの発現を抑制したと報告されている[25-28]。スクランブル siRNA(siScramble)のセンス配列は 5’-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UdTdT-3’、アンチセンス配列は 5’-ACG UGA CAC GUU CGG AGA AdTdT-3’で、GL3 siRNA(siGL3)のセンス配列は 5’-CUU ACG CUG AGU ACU UCG AdTdT-3’、アンチセンス配列は 5’-UCG AAG UAC UCA GCG UAA GdTdT-3’であり、すべて北海道システムサイエンスよりアニーリングされた状態で購入した。GL3 はスクランブル siRNA と同様に意味のない配列の siRNA として、適宜使用した。HeLa 細胞、SiHa 細胞および C33A 細胞は ATCC より購入した。HeLa 細胞は 18 型 HPV、SiHa 細胞は 16 型 HPV の代表的

な子宮頸癌細胞株である。HeLa 細胞の 18 型 HPV ゲノムコピー数は 10-50 コピー、SiHa 細胞はの 16 型 HPV ゲノム数は 1 コピーである[29,30]。C33A は HPV 陰性の子宮頸癌細胞株である。

2、ポリマーおよびミセル

2.1 ポリマー作成と構造評価

ジスルフィド架橋と cRGD リガンドを有する siRNA 内包型 PIC ミセルは siRNA と cRGD-PEG-PLL(MPA/IM)と呼ばれる機能性のあるブロックコポリマーの溶液から作製した。cRGD-PEG-PLL(MPA/IM)は、PEG 末端に cRGD ペプチドを搭載し、PLL の側鎖に 1-(3-メルカプトプロピル)アミジン(MPA)と 2-イミノチオラン(IT)基が存在する(11,13,14)。ブロックコポリマーである cRGD-PEG-PLL(PEG の分子量；12,000 Da、PLL の重合度；46)は、既報(15,26)の方法に従って作成した。それから、1-(3-メルカプトプロピル)アミジン(MPA)と 2-イミノチオラン(IT)を次に述べるように PLL の側鎖で一級アミンに導入した。cRGD-PEG-PLL を 10mg/mL のポリマー濃度になるよう 100 mM のホウ酸ナトリウム溶液 (pH 9.0)に溶解した。DTBP (PLL のアミンと等価の 0.1M)を 0.5 mL の冷却水に溶解し、滴下漏斗を用いてポリマー溶液に加えた。室温で 45 分間撹拌した。次に 2-IT（PLL のアミンと等価の 2.4M）を混合液に直接加え、室温で

30 分撹拌した。それから混合液を 35℃に温めて 6 時間撹拌した。溶液を透析チューブに入れ（分子量カットオフ値:6,000-8,000）、10 mM のリン酸緩衝液(pH 7.4)内で 30 分間透析した。DTT(PLL のアミンと等価の 2M)を溶液に加え、30 分間反応させた。反応溶液を 150 mM の塩化ナトリウム溶液の中で 2 時間透析し、その後 2 時間脱イオン水の中で 2 時間透析した。最終産物である cRGD-PEG-PLL(MPA/IM)を得るために、透析した溶液を液体窒素で凍結乾燥した。得られたポリマーの構成は既報の通り ^{1}H-NMR スペクトラムにより評価した(図 3)(9,14,23)。

ポリマーは、東京大学医学系研究科附属疾患生命工学センター臨床医工学部門の研究員の方に作成したものを提供していただいた。

図 3　ブロックコポリマーcRGD-PEG-PLL の構造（^{1}H NMR spectrum で解析）(ポリマー濃度:10 mg/mL, 溶媒: D_2O, 温度: 25 ℃)

2.2 ポリオン複合体ミセル作成と構造評価

cRGD-PEG-PLL(MPA/IM)を 10 mM の HEPES 溶液(pH 7.4)の中で 5mg/mL の濃度になるように溶解した。ジスルフィド結合を還元するために、ポリマー溶液を室温で 15 分 100 mM の DTT と反応させた。siRNA 溶液(10 mM HEPES 溶液 (pH 7.4) 中 15 μM)をポリマー溶液を 2:1(v/v)の割合で混合した。混合溶液を 0.5% DMSO(v/v)入りの 5 mM HEPES 溶液(pH 7.4)の中で 1 日透析し、さらに 1 日、5 mM HEPES 溶液(pH 7.4)の中で透析した。透析した PIC ミセル溶液は 25℃で、ゼタサイザーナノ ZS 機(Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK)を使用し動的光散乱法により評価をした(図 4)。

図 4　動的光散乱法によって測定した siE6/E7(黒丸)および siScramble(白丸)内包ミセルのサイズ分布ヒストグラム。

方法

1、in vitro における細胞毒性試験

HeLa 細胞および C33A 細胞は 24 ウェルプレートに 1 ウェルにつき 10000 個の細胞を、SiHa 細胞は 20000 個の細胞をまいた。標準的な細胞培養条件で 24 時間培養した。血清を除去した 1100μL の OptiMEM- I (Life Technologies) 溶液中で、15μM,4.7μL の siRNA 溶液と 11μL の Lipofectamine®2000 Transfection Reagent (Life Technologies) を混合した。この遺伝子導入用溶液を 10% ウシ胎児血清(FBS)を含む Dulbecco's modified Eagle's メディウム (DMEM) で薄め、それぞれのウェルにアプライした（siRNA の最終濃度が 20 nM となるようにした）。6 時間後、siRNA 入りの培養液を除去し、各ウェルを PBS で洗浄し抗生物質と 10%FBS 入りの DMEM に置換した。48 時間後、生細胞数を Cell Counting Kit 8 溶液(CCK 8, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)で評価した (培養液 10μL に対し 1μL 使用した) 。全てのデータは未処理の細胞をコントロールとしてその吸光度の値との相対値で比較した（n=6）。siGL3 を SiHa 細胞のコントロール siRNA として使用した。

2、 In vitro における qRT−PCR による RNA 発現の検討

HeLa 細胞、SiHa 細胞 (1 ウェルにつき 30000 個) を 24 ウェルプレートにまき、1 で述べたように各サンプルに siRNA 溶液を反応させた。その後細胞から全て

の RNA を RNeasy Mini Kit (QIAGEN,Hilden,Germany) を使用して抽出した。抽出した RNA を RT-PCR kit (TOYOBO,Osaka,Japan)を使用して逆転写した。Light Cycler R 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を使用して qRT-PCR を行い、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)、E6、E7 (HPV 18 型および 16 型)の mRNA の発現を評価した。E6 と E7 の発現レベルを GAPDH を内部基準として⊿CT 法により解析した。E6、E7 (HPV 18 型および 16 型)および GAPDH のプライマーは表 1 に記載した通りである。GAPDH、E6 および E7 の PCR 条件は次の通りである。GAPDH:72℃18 秒、64℃10 秒、95℃10 秒を 35 サイクル、E6 (HPV 18 型):72℃5 秒、64℃10 秒、95℃10 秒を 35 サイクル、E7 (HPV 18 型):72℃13 秒、66℃10 秒、95℃10 秒を 35 サイクル、E6 (HPV 16 型):72℃8 秒、61℃10 秒、95℃10 秒を 35 サイクル、E7 (HPV 16 型):72℃12 秒、60℃10 秒、95℃10 秒を 35 サイクルである。全ての PCR 反応は融解曲線解析に従った。

表1. qRT-PCRで使用したプライマー配列

遺伝子	プライマー	配列 (5'-3')	サイズ (bp)
GAPDH	Sense	ACCACAGTCCATGCCATCAC	452
	Antisense	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	
HPV18 E6	Sense	CGGCGACCCTACAAGCTACC	106
	Antisense	ACCTCTGTAAGTTCCAATACTGTCTTGC	
HPV18 E7	Sense	GCTAGCATATGCATGGACCTAAGGCAAC	314
	Antisense	TCTAGATTACTGCTGGGATGCACACC	
HPV16 E6	Sense	TGCACAGAGCTGCAAACAAC	121
	Antisense	AGCATATGGATTCCCATCTC	
HPV16 E7	Sense	CGGAATTCATGCATGGAGATACACCTACAT	299
	Antisense	CGGGAAGCTTATGGTTTCTGAGAACAGATGG	

GAPDH;グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ

3、腫瘍内集積

HeLa 細胞を *in vivo* で移植腫瘍として使用するために継代した。Charles River Laboratories（Tokkyo,Japan）から購入した BALB/c ヌードマウスに 2.0 × 10^6 個の HeLa 細胞を皮下注し 2 週間成長させ、ドナー腫瘍を作製した。2 週間後、ドナー腫瘍を摘出し、3 × 3 mm の腫瘍片に分離した。腫瘍片を 6 週齢のメスの BALB/c ヌードマウスに皮下移植した。皮下移植した日から 9 日目に、siRNA に蛍光（Alexa647）を結合させマウスの尾静脈から静注し、静注後 24 時間で IVIS (PerkinElmer, Waltham, MA)を使用して皮下の子宮頸癌における siRNA の蓄積を解析した。また、腫瘍以外の臓器（肺、肝臓、脾臓、筋肉）の集積も同様に IVIS を使用して siRNA の集積を解析した。

4、 In vivo 実験

siE6/E7 内包 PIC ミセルの抗腫瘍効果を *in vivo* において評価するため、皮下移植モデルを HeLa では BALB/c ヌードマウスで、SiHa では SHO (ヘアレス SCID) マウスで作製した。SiHa においても BALB/c ヌードマウスで皮下移植モデルを作製しようと試みたが、生着しなかったため、SHO (ヘアレス SCID)マウスでモデルを作製した。マウスに細胞を皮下注(HeLa 細胞; 2.0 × 10^6 個, SiHa 細胞; 2.0 × 10^7 個)し、それぞれ適した期間をおいて腫瘍を増大させ、ドナー腫瘍を作製した(HeLa 細胞; 2 週間, SiHa 細胞; 6 週間)。その後、ドナー腫瘍を摘出して 3×3mm

の腫瘍片に切った。腫瘍片は Charles River Laboratories から購入した 6 週齢のメスマウスに皮下移植した。移植後 5 日目より試薬の静注を開始した。siE6/E7 内包ミセル、siScramble 内包ミセル、そして 10mM の HEPES 溶液をコントロールとして 0、1、3、5、8、9 日目（最初の静注日を day0 とする）に静注を行った（1 個体あたり 20 μg の siRNA)。SiHa 腫瘍に対しては、静注を 0、1、2、4、5、6、8、9、10 日目に施行した。腫瘍サイズを 0、3、6、8、10、12 日目に測定した。腫瘍体積は $1/2a \times b^2$ (a; 長径, b; 短径)として計算した。腫瘍はマウスから 12 日目に摘出した。

ミセルの毒性を調べるために、全ての群でマウスの体重を、0、3、6、8、10、12 日目に測定した。

さらに、ミセルの蓄積は全身臓器の中で特に腎臓に多いことが報告されており[13]、腎毒性を検討するために、HeLa 腫瘍における *in vivo* 実験の 12 日目に、全ての群のマウスから腎臓を摘出し、パラフィン包埋を形成し組織標本を作成した。ApopTag Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit（EMD Millipore,Billerica,MA）を用い TUNEL 染色を用い、DAB 発色により細胞のアポトーシスの有無を評価した。

5、 in vivo 実験における qRT-PCR 解析

in vivo 実験後、腫瘍内の E6 および E7 mRNA の発現量を解析するために、12

日目に摘出した腫瘍から RNeasy Mini Kit (QIAGEN,Hilden,Germany) を使用して RNA を抽出した。抽出した RNA を RT-PCR kit (TOYOBO,Osaka,Japan)を使用して逆転写した。Light Cycler R 480 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を使用して qRT-PCR を行い、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH)、E6、E7 (HPV 16 型)の mRNA の発現を評価した。解析方法やプライマーは、方法 2、 In vitro における qRT−PCR による RNA 発現の検討で記載した方法と同様に行った。

6、 in vivo 実験におけるウエスタンブロット解析

in vivo 実験後、腫瘍内の p53 発現を検討するために、12 日目の腫瘍をマウスから摘出し、腫瘍からの蛋白抽出を行った。蛋白抽出は、CelLytic^{TM}-MT Mammalian Tissue Lysis/Extraction Reagent (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO)とプロテアーゼインヒビター(Roche, Basel, Switzerland)を使用した。蛋白濃度はプロテインアッセイキット(BioRAD, Hercules, CA)により測定した。P53 に対する抗体 (DO1, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) を推奨される使用法によりウエスタンブロットに使用した。P53 蛋白を検出するために Zenon HRP Mouse IgG_{2a} ラベリングキット (Invitrogen)を適切に使用し一次抗体に HRP を標識した。バンドは BioRAD western blotting systems (BioRAD, Hercules, CA) の HRP 基剤 (Immobilon^{TM} Western; Millipore corporation, Billerica, MA)の化学発光条件で

検出した。

7、 子宮頸癌自然発生モデルにおける E6/E7siRNA ミセル投与実験

7-1、in vivo 実験

子宮頸癌自然発生トランスジェニックマウス(以下 K14-HPV16 マウス)は、NCI(National Cancer Institute)から 2 ペアを譲り受け、それを継代した。既報[24]に従って、約 4 週齢の K14-HPV16 マウスに 0.05mg/60 日放出性のエストロゲンペレット（Estradiol-17β、SE-121、ナカライテスク）をマウスの耳付近の皮下に移植し、これを 3 回繰り返して 6 ヶ月間、エストロゲン誘発をおこなった。6 ヶ月間のエストロゲン誘発後のマウスを、siE6/E7 内包ミセル投与群、siScramble 内包ミセル投与群、control 群に振り分け、前述の SiHa 腫瘍における *in vivo* 実験のプロトコールをふまえて(SiHa 腫瘍が HPV16 型であることより)、0、1、2、4、5、6、8、9、10 日目（最初の静注日を day0 とする）に静注を施行した。1 回静注あたり 20μg の siRNA を投与した。何も投与しない群を control 群とした。10 日目の静注後、0～2 日後にマウスを安楽死させ、子宮を摘出した。

7-2、免疫組織学的検査

上記の摘出した子宮を、4%パラホルムアルデヒドにて固定し、パラフィン包埋したのち、子宮頚部体部移行帯が十分観察できるように組織標本を作製し、

まずヘマトキシリン・エオジン染色(HE 染色)を施行し、光学顕微鏡を用いて観察した。p53 免疫染色はマウスモノクローナル抗 p53 抗体(DO1, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA　1:200 希釈)で、E7 免疫染色はラビットポリクローナル抗 HPV-E7 抗体(bs-10446R, Bioss Inc, Wobum, MA, USA 1:100 希釈)で染色し、それぞれペルオキシダーゼ付二次抗体で染色し発色させ、光学顕微鏡で観察した。

8、 統計学的解析

全てのデータは平均値±標準偏差として表した。P 値は、両側分布と Excel の t 検定機能で、両側分布と不等分散を使用した Student's *t* 検定によって決定した。0.05 未満の p 値を統計学的に有意とみなした。

結果

1、in vitro における E6/E7 をターゲットとした siRNA による E6 および E7 転写産物の減少

我々はまず HPV 関連子宮頸癌の細胞株である SiHa 細胞と HeLa 細胞において、siE6/E7 による E6 および E7 の転写産物の遺伝子抑制効果を検証した。si16E6/E7 と si18E6/E7 を推奨されている方法でリポフェクタミンを使用し、SiHa 細胞および HeLa 細胞内に遺伝子導入した。E6 および E7 転写産物の評価は、siE6/E7 と、関連性のない siRNA(siScramble)を使用して qRT-PCR により細胞内の E6 と E7mRNA 量を測定することで比較した(図 5)。si16E6/E7 を導入した SiHa 細胞では siScramble をコントロールとして導入したときと比較し、E6 と E7 どちらの mRNA 量も約 50%と有意な減少が確認された。si18E6/E7 においても、siE6/E7 を導入した HeLa 細胞の mRNA 量は siScramble をコントロールとして導入したときより約 70%も減少がみられた。それゆえにそれぞれのタイプの siE6/E7 は細胞増殖を調節している HPV のタイプに対応して子宮頸癌細胞内で配列特異的に RNA 干渉することが確認された。

図 5　qRT-PCR で測定した培養 SiHa 細胞(A)と HeLa 細胞(B)における E6 および E7 mRNA 発現量。結果は平均値±標準偏差として表した(n=6)。si16E6/E7 および si18E6/E7 は、siScramble と比較し、SiHa 細胞および HeLa 細胞内の E6 および E7mRNA を有意に減少させることがわかった。(＊;$p<0.05$)

2、 siE6/E7 の HPV 型特異的な細胞増殖抑制効果

次に siE6/E7 を導入した子宮頸癌細胞 SiHa (HPV16 型陽性)、HeLa (HPV18 型陽性)、C33A (HPV 陰性)子宮頸癌細胞株の細胞増殖を検証した。si16E6/E7 または si18E6/E7 をこれら 3 つの細胞株に遺伝子導入した。siScramble をコントロールとして導入した。siE6/E7 を導入した細胞の細胞増殖を siScramble を導入した細胞と比較して、導入後 48 時間の時点で細胞生存率を吸光度で検出し、生細胞数を量的に評価した(図 6)。Si16E6/E7 を導入した際、SiHa 細胞の増殖は有意に抑制されていたが、HeLa 細胞と C33A では抑制されなかった。対照的に、si18E6/E7 を導入した際、HeLa 細胞の増殖は抑制されていたが、SiHa 細胞と C33A では増殖は抑制されなかった。細胞増殖における siE6/E7 の抑制効果は HPV の型特異的に、また配列特異的に働くことがわかった。

図 6　si16E6/E7(A)と si18E6/E7(B)をリポフェクタミンを用いて導入した 3 種類の培養子宮頸癌細胞株の増殖抑制実験の結果。生細胞数を CCK8kit を使用し測定した。結果は平均値±標準偏差として表した(n=6)。*in vitro* において、si16E6/E7 および si18E6/E7 は HPV タイプ特異的に細胞増殖抑制効果があることがわかった。(＊;$p<0.05$)

3、皮下移植した子宮頸癌における siE6/E7 の腫瘍集積

腫瘍を標的とした siRNA を運搬するために、腫瘍細胞の表面に過剰発現している$\alpha_v\beta_3$または$\alpha_v\beta_5$ インテグリンに特異的に結合するリガンドである cRGD ペプチドを搭載させた siRNA を内包した PIC ミセルを作成した。約 50 nm に規定されたサイズである cRGD 搭載 PIC ミセルの構造の評価は、動的光散乱法により確認した(図 4)。si16E6/E7 と siScramble に使用した PIC ミセルのサイズ分布はほぼ同じであり、PIC ミセルは内包する siRNA 配列に影響されないということが示唆された。子宮頸癌モデルにおいてミセル集積を確認するために、Alexa647 で標識した si18E6/E7 を PIC ミセルに内包させた。ミセルに内包された Alexa647 標識 si18E6/E7 と内包されていない単体の Alexa647 標識 si18E6/E7 を、HPV18 型陽性の HeLa 細胞（HeLa 腫瘍）を皮下に移植したマウスに静注した。静注後、腫瘍を摘出してイメージング解析機で腫瘍内の蛍光集積を測定した。得られた画像を図 7A に示す。siE6/E7 内包ミセルを静注されたマウスから摘出された全ての腫瘍で、Alexa647 標識 siRNA の蛍光集積が高かった（緑から赤）のに対し、siE6/E7 単体を静注したものではほとんど蛍光集積が確認されなかった（青から緑）。siE6/E7 内包型ミセルを静注したマウスから摘出した腫瘍内での蛍光集積の定量的解析では、siE6/E7 単体を静注された群より約 3 倍も多いことがわかった(図 7 B)。この結果より、PIC ミセルは静注によって効果的に siRNA を HeLa

腫瘍内に運搬できることが示唆された。また、他臓器での siRNA の蓄積は、siRNA ミセル投与群において siRNA 単体静注群および no treat 群と比較して腫瘍および脾臓で有意に高かった（図 **8**）。

図 7　皮下の HeLa 腫瘍における試薬静注後の siRNA 単体および PIC ミセル内包型 siRNA の集積結果。

(A)　Alexa647 標識された siRNA 単体およびミセル内包型 siRNA 静注 24 時間後に摘出した腫瘍の IVIS による解析。

(B)HeLa 腫瘍内の Alexa647 標識された siRNA の蛍光集積。結果は平均値±標準偏差として表した(n=3)。

ミセル内包型 siRNA は siRNA 単体よりも有意な腫瘍集積が認められた。

(＊;$p<0.05$)

図 **8**　siRNA ミセルおよび siRNA 単体の静注 24 時間後の他臓器を含めた siRNA の集積を IVIS で測定した結果。non treat は試薬を投与しなかったマウスの臓器。siRNA ミセル投与群では siRNA 単体投与群と non treat 群と比較して腫瘍および脾臓で siRNA の有意な集積が認められた。(＊;$p<0.05$)（n=3~4）

4、 siE6/E7 内包ミセルの静注投与による腫瘍増殖抑制効果

siE6/E7 の細胞増殖抑制効果および PIC ミセルによる siE6/E7 の腫瘍内集積の増加をふまえて、我々は次に子宮頸癌マウスモデルにおける siE6/E7 内包 PIC ミセルの静脈投与の抗腫瘍効果を調べることにした。子宮頸癌細胞である SiHa と HeLa を免疫不全マウスに皮下注し、皮下腫瘍を作成した（それぞれ SiHa 腫瘍、HeLa 腫瘍と記載する）。それを 3mm×3mm の断片に切断し、免疫不全マウスの臀部に近い皮下に移植した。siE6/E7 内包ミセルと siScramble ミセルとバッファーのみを si16E6/E7 では 9 回、si18E6/E7 では 6 回、それぞれマウスに静注した。東京大学工学部での *in vivo* におけるミセル投与実験のプロトコールに従い、0 日目、3 日目、6 日目にミセルを投与したところ、有意な腫瘍増殖抑制効果が認められず(図 9 A)、0、 1 日目、3、4 日目、6、7 日目と連続投与にしたところ効果が認められた(図 10 A)。また、HeLa 腫瘍で効果のあったプロトコールに従って SiHa 腫瘍の *in vivo* 実験を施行したところ、有意な腫瘍増殖抑制効果が認められず(図 9 B)、0、1、2 日目、4、5、6 日目、8、9、10 日目と 3 回連続投与にしたところ効果が認められた(図 10 B)。

SiHa および HeLa 腫瘍の大きさは 2 日おきに 3 次元測定法により計測した。バッファーのみまたは siScramble 内包ミセルを投与されたマウスでは 3-4 日目から 12 日目までに同じように腫瘍サイズが増大し、SiHa および HeLa 腫瘍ともに

0 日目と比較すると 8 倍から 12 倍となった。それに比較し、siE6/E7 内包ミセルを投与したマウスではどちらの腫瘍モデルにおいても、バッファーや siScramble 投与群と比べて、有意な腫瘍増大抑制効果が認められた。最終的に、siE6/E7 内包ミセル投与後の腫瘍サイズは、SiHa 腫瘍および HeLa 腫瘍どちらにおいても 0 日目の約 3 から 4 倍であった。これより、siE6/E7 内包ミセルの静注投与は、siRNA 配列に依存し 2 種の異なる子宮頸癌モデルで腫瘍増殖抑制効果があることがわかった。これは、siE6/E7 内包ミセルの腫瘍内集積の増加(図 7)と、*in vitro* における siE6/E7 による細胞増殖抑制効果(図 5 と図 6)と一致する結果である。

また腎毒性を検討するために行った、HeLa 腫瘍 in vivo 実験終了後の腎臓の各群の TUNEL 染色では、どの群でもアポトーシスを起こしている細胞は確認されなかった（図 11）。

図 9　A,B 皮下の子宮頸癌モデル SiHa(A)および HeLa(B)における siE6/E7 内包ミセルの抗腫瘍効果。矢印は試薬を静注した日を示す(1 匹 1 回静注あたり 20 μg siRNA)。結果は平均値±標準偏差として表した(n = 4–5)。
HeLa 腫瘍で腫瘍増殖抑制効果の認められたプロトコールで施行した SiHa 腫瘍の *in vivo* 実験の結果(**A**)。既存のプロトコールに従ってミセルを 3 回投与した HeLa 腫瘍の *in vivo* 実験の結果(**B**)。ともに有意な腫瘍増殖抑制効果が認められず、静注回数を増やすこととした。

図 10 A,B 皮下の子宮頸癌モデル SiHa(A)および HeLa(B)における siE6/E7 内包ミセルの抗腫瘍効果。矢印は試薬を静注した日を示す(1 匹 1 回静注あたり 20 μg siRNA)。結果は平均値±標準偏差として表した(n = 3–5)。初回に設定したプロトコールを変更し、静注回数を増やしたところ、siE6/E7 内包ミセルを投与した群は、Buffer 及び siScramble 群と比較し、明らかな腫瘍増殖抑制効果を示した。Buffer 群、siScramble 群では、腫瘍発育に差が認められなかった。
(＊;p<0.05)

C

図 10 C　SiHa 腫瘍における *in vivo* 実験 12 日目の皮下腫瘍の写真。

D

図 10 D　HeLa 腫瘍における *in vivo* 実験 12 日目の皮下腫瘍の写真。

図 10 E,F　皮下の子宮頸癌モデル SiHa(E)および HeLa(F)における *in vivo* 実験におけるマウスの体重の推移。全ての群で、マウスの体重の推移に有意差は認めなかった。

図 **11**　HeLa 腫瘍における *in vivo* 実験 12 日目に摘出した腎臓の TUNEL 染色(×400)。全ての群で、アポトーシスを起こしている細胞は見られなかった。

siE6/E7 内包ミセルによる抗腫瘍効果が RNA 干渉によるものかどうか検証するため、12 日目に皮下の SiHa 腫瘍を摘出し E6 および E7mRNA の発現量を qRT-PCR 解析で検討した。また同様に摘出した SiHa および HeLa 腫瘍内での p53 の発現量をウェスタンブロットで検討した。HPV E6 癌遺伝子による p53 の分解が E6/E7 転写産物の RNA 干渉により抑制されるからである。SiHa 腫瘍内の E6 mRNA の発現量は、si16E6/E7 内包ミセル投与群は siScramble 内包ミセル投与群よりも有意に低下していたが、E7 mRNA の発現量は、si16E6/E7 内包ミセル投与群と siScramble 内包ミセル投与群では差が認められなかった(図 12)。

ウェスタンブロットの解析では、SiHa 腫瘍では、siScramble 内包ミセルまたはバッファーを投与された腫瘍では p53 が全く発現していないのに対し、si16E6/E7 内包ミセルを投与された腫瘍では p53 発現が回復していた(図 13、左)。HeLa 腫瘍では siScramble またはバッファー投与された腫瘍では p53 がわずかに検出されたが、si18E6/E7 内包ミセルを投与された腫瘍では p53 発現量が増加していた(図 13、右)。これらの結果より siE6/E7 内包ミセルの抗腫瘍効果は、siE6/E7 が静脈注射により皮下の子宮頸癌に運搬されたことで、E6/E7 をターゲットとした RNA 干渉によるものであることが示唆された。E6/E7 蛋白をウェスタンブロットで検出しようと試みたが、E6//E7 自体の蛋白量が微量であったためか検出することができなかった。

図 **12**　si16E6/E7 内包ミセルを投与したマウスから摘出した 12 日目の SiHa 腫瘍内の E6 mRNA および E7 mRNA 量を解析した結果(A;E6 mRNA 発現量、B;E7 mRNA 発現量　ともに buffer 群の発現量を 1 として発現量比で比較した)。SiHa 腫瘍内において、si16E6/E7 ミセル投与した群では、siScramble ミセル投与群と比較し、E6 mRNA 発現量は低下していたが、E7 mRNA 発現量には差がなかった。（＊;p<0.05）

図 13　siE6/E7 内包ミセルを投与したマウスから摘出した 12 日目の子宮頸癌内の p53 発現をウェスタンブロットにて解析した結果。SiHa 腫瘍および HeLa 腫瘍内において、si16E6/E7 ミセルおよび si18E6/E7 ミセルを投与した群では、Buffer および siScramble 群よりも p53 の発現が上昇していた。

5、 子宮頸癌自然発生モデルにおける siE6/E7 内包ミセルの静注投与による組織学的検討

HPV16 型陽性である SiHa 腫瘍における、siE6/E7 内包ミセルの静注による抗腫瘍効果をふまえて、我々は NCI より譲り受けた子宮頸癌自然発生トランスジェニックマウス(K14-HPV16 マウス)での組織学的検討を行った。

既報[23]に従って、0.05mg/60 日の濃度でエストロゲン刺激を 6 ヶ月間行い、マウスを siE6/E7 内包ミセル投与群、siScrambel 内包ミセル投与群、コントロール群の 3 群に振り分け、HPV16 型陽性である SiHa 腫瘍の *in vivo* 実験のプロトコールに従いミセルの静注を行い、投与終了後 0~2 日後にマウスから子宮を摘出し組織学的検討および免疫組織学的検討をした。既報では 6 ヶ月のエストロゲン刺激によって子宮頸部体部移行帯が癌化するとのことであったが、今回は CIN1～CIN3 の異形成への変化にとどまった。HE 染色での観察では、siE6/E7 ミセル投与群では CIN1～2、siScramble ミセル投与群およびコントロール群でも CIN2～3 程度の異形成にとどまり、群による違いはみられなかった（データは示していない、n=3-4)。しかし、E7 および p53 の免疫組織学的検査では、肉眼的に差が認められた(図 14、表 2)。siE6/E7 内包ミセル投与により E7 の発現が抑制され、また、E6 発現を抑制することにより p53 がレスキューされている結果となった。これより、HE 染色下では違い認められなかったが分

子レベルでは肉眼的に差が認められ、siE6/E7 内包 PIC ミセルが、免疫正常な K14-HPV16 マウスにおいても抗腫瘍効果をもつ可能性が示唆された。また、皮下移植した腫瘍でなく、子宮頸部に自然発生した癌病変にも効果をもつ可能性が示唆された。

	siScramble	siE6/E7
E7	強陽性	ほぼ陰性
p53	陰性	中等度～強陽性

図 14、表 2
子宮頸癌自然発生マウスモデルのミセル投与実験後、マウスから子宮を摘出し、子宮頸部体部移行帯での E7 および p53 の免疫染色を行った。si16E6/E7 投与したマウスでは E7 が分解され、p53 発現が上昇していた(n=1)。

考察

in vitro における siE6/E7 の HPV 関連子宮頸癌細胞の増殖抑制効果は、E6 および E7 の mRNA 量測定の結果を考慮すると、E6 と E7 の転写産物の減少によるものと考えられた。siE6/E7 による細胞増殖抑制効果（図 6）は E6/E7 mRNA の減少量(図 5)よりも効果が弱くみえるのは、細胞周期が停止されている細胞でもまだアポトーシスに陥っていない細胞が存在するためと考えられた。

皮下の HeLa 腫瘍モデルにおける他種類の siRNA の全身投与で効果的であったと報告のある[13,14]、cRGD リガンドとチオール機能を持ち合わせた PIC ミセルを、本研究で、子宮頸癌モデルにおいて siE6/E7 の全身的な運搬体として応用した。その結果として、siE6/E7 内包ミセルは、皮下の HeLa 腫瘍と SiHa 腫瘍モデルで標的遺伝子特異的に抗腫瘍効果を発揮した。この抗腫瘍効果は、siScramble 内包ミセル投与群では抗腫瘍効果がみられなかったことや、siE6/E7 内包ミセル投与マウスから摘出した腫瘍内で癌抑制遺伝子である p53 の発現が復活していたことからも裏付けられた。SiHa および HeLa 子宮頸癌細胞では、p53 の分解が HPV による癌化の鋭敏なバイオマーカーとなり得ることが示唆される。また、*in vivo* 実験終了後の SiHa 腫瘍内の E6 および E7mRNA の発現量の検討では、バッファー投与群と si16E6/E7 ミセル投与群に差がみられなかった。E7mRNA 発現量に関しては siScramble ミセル投与群と si16E6/E7 ミセル投与群に

も差が見られなかった。これは、摘出腫瘍の中には、ミセルがまだ運搬されていない腫瘍細胞や、運搬されていても mRNA の減少が起きていない腫瘍細胞が含まれており、これらの細胞内の mRNA も増幅され、優位な差が出なかったためと考えた。

siScramble 内包ミセル投与群とバッファー投与群で腫瘍の成長曲線に違いがなかったことより、ミセルそのものによる細胞毒性がない可能性が考えられた。さらに、siE6/E7 内包および siScramble 内包ミセルの全身投与群のマウスではバッファー投与群と比較しマウスの体重減少がどちらの群でも確認されなかった。

子宮頸癌自然発生モデルの実験においては、既報の様には発癌せずエストロゲン添加が不十分であった可能性があるため、CIN の病変にばらつきがあり、HE 染色での違いの評価は難しかったが、分子レベルでは siE6/E7 ミセルの投与により肉眼的に E7 発現が抑制され、p53 の発現が上昇していた。エストロゲン添加が十分な条件でさらに継続的にミセル投与をしていくことで、HE 染色で差が認められる可能性も考えられる。さらに、免疫不全でない K14-HPV16 マウスにおいて、siRNA 内包 PIC ミセルの効果が示唆されたことは、大きな成果であると考えられる。ミセル投与後、採血できたマウスは 2 匹にとどまり、K14-HPV16 マウスでのミセル投与における副作用や血中エストロゲンの評価ができなかっ

たため、今後もさらなる調査が必要と考える。

最近では、投与した siRNA が標的ではない遺伝子に作用し RNAi 効果を発揮してしまうといった、オフターゲット効果が指摘されている[31-33]。このオフターゲット効果を減少させるために、それぞれの個体に合わせて siRNA の濃度を低下させることや[31,34,35]、センスとアンチセンスで非対称の siRNA を使用する[36]、癌独自の遺伝子にできるだけ特異的な配列を用いる[35]、いくつかの siRNA を組み合わせると siRNA の濃度をあげてもオフターゲット効果が起こらない[37]、などの工夫がいくつか報告されている。また、siRNA にコレステロール基などの化学修飾を行うことでもオフターゲット効果が減少するなどの報告があり[38]、東大工学部では実際化学修飾した siRNA を使用して抗腫瘍効果を検討する研究も行われている[14]。オフターゲット効果を減少させるには、今後もさらなる研究が必要と考えるが、今回の研究ではヒトが保有していない HPV 固有の E6 と E7 という癌遺伝子を標的としているため、オフターゲット効果の可能性は低いと考えている。

また、ポリマーやミセルの全身投与により、それに対する抗体が体内で産生され、2 回目以降の静注において、血中滞留時間が激減し、肝臓・脾臓への蓄積が増加するという ABC 現象(accelerated blood clearance)も指摘されている[39,40]。以前は抗 PEG 抗体の産生のみ指摘されていたが、最近ではミセルにも、同様の

現象が認められる可能性があることがわかってきた[41]。ポリマーやミセルをDDS として使用するときは、この現象をできるだけ回避することが望ましいと考えられる。ABC 現象についても研究が進められてきており、ABC 現象は全身投与されたポリマーやミセルが、脾臓の B 細胞で認識されることで誘導されると考えられている[42]。ABC 現象をできるだけ回避するためには、B 細胞に認識されないように、より小さいサイズのミセルを使用すること(既報では 30nm 程度[43]や、投与回数を考慮して投与濃度を調製していく必要があることなどが回避の方法として考えられている[39]。本研究では約 40nm の比較的小さい高分子ミセルを使用していることや、免疫正常な K14-HPV16 マウスの実験においても、分子レベルで PIC ミセルの効果が認められたことより、本研究で使用したミセルは ABC 減少を回避できる構造である可能性も示唆されるが、腫瘍集積の実験において腫瘍以外に脾臓に siRNA の有意な集積を認めたことから、今後さらなる検討が必要であると考える。また、以上の問題が回避されたとしても、本研究で認められた siRNA 治療効果は、腫瘍増殖抑制効果であり、腫瘍縮小効果は認められなかったことから、ヒトへの応用する場合は、生命予後を考えた場合、長期の継続投与が必要になってくると考えられ、長期投与した場合の副作用の有無も検討していかなければならないと考える。

本研究において、HPV 関連子宮頸癌治療のために HPV の癌遺伝子をコードし

た siRNA から標的 PIC ミセルを作成した。このミセル形成は、生物学的構成要素の非特異的な相互作用を減少させるようにデザインされており、癌細胞表面をターゲットとし、細胞内に入ると siRNA を放出する。siE6/E7 内包ミセルの全身投与は HeLa 腫瘍および SiHa 腫瘍のどちらの皮下モデルでも有意に腫瘍増殖抑制効果を示し、これは siRNA 配列特異的であることがわかった。この siE6/E7 内包ミセルの抗腫瘍効果は、腫瘍内の p53 発現の回復および siRNA 運搬における腫瘍内蓄積の増加の結果と一致していた。cRGD リガンドは癌細胞表面だけではなく、$\alpha_v\beta_3$ と$\alpha_v\beta_5$ インテグリンを介し癌関連上皮細胞表面にも特異的に結合することを考慮すると、HPV 癌遺伝子をターゲットとしたミセルは将来的に、中咽頭やペニス、腟、外陰や肛門癌を含む幅広い HPV 関連癌の有効な治療候補となる可能性がある。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、研究の立案から、実験手技、論文執筆まで、様々な面においてご指導、ご鞭撻いただきました東京大学医学部産婦人科の松本陽子先生、川名敬先生には実験手技、実験方法、論文執筆などにおいて細かくご指導いただきました。また、この研究の要である、ポリマーの提供・さらにはそれに関連する様々な実験手技、実験方法を指導してくださった東京大学工学部の R.James Christie 氏、内藤端氏、宮田完二郎先生、西山伸宏先生には、様々な面でご支援くださり大変お世話になりました。また東京大学医学部産婦人科の長阪一憲先生、足立克之先生、有本貴英先生、永松健先生、平池修先生、織田克利先生には、産婦人科の教室研究会などにおいて研究に対するアドバイスなど、色々な角度からご支援いただきました。さらに東京大学工学部教授の片岡一則先生には、共同研究としてご理解いただき、ご多忙の中、直接論文執筆のご指導などをいただきました。また東京大学医学部産婦人科の藤井知行先生、大須賀穣先生には、当教室の教授として、研究にご理解、ご支援いただきました。

研究室でともに仕事をしてまいりました東京大学医学部産婦人科学教室の冨尾賢介先生、山下亜紀先生、田口歩先生、井上知子先生、藤本麻葉先生、嘉本寛江先生、吉田光代先生、佐藤雅和先生には、カンファランスや実際の実験に

おいて様々なアドバイスやご協力をいただきました。あらためて感謝の意を表したいと思います。

引用文献

1. M. Jiang, J. Milner, Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA,a primer of RNA interfence, Oncogene. 21 6041–6048 (2002).

2. K. Yamato, T. Yamada, M. Kizaki, K. Ui-Tei, Y. Natori, M. Fujino, *et al*, New highly potent and specific E6 and E7 siRNAs for treatment of HPV16 positive cervical cancer, Cancer Gene Ther. 15 140–153 (2008).

3. K. Butz, T. Ristriani, A. Hengstermann, C. Denk, M. Scheffner, F. Hoppe-Seyler, siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells, Oncogene, 22 5938–5945 (2003).

4. X. Niu, Z. Peng, W. Duan, H. Wang, P. Wang, Inhibition of HPV 16 E6 oncogene expression by RNA interference *in vitro* and *in vivo*, Int. J. Gynecol. Cancer 16 743–751 (2006).

5. T. Fujii, M. Saito, E. Iwasaki, T. Ochiya, Y. Takei, S. Hayashi, *et al*, Intratumor injection of small interfering RNA-targeting human papillomavirus 18 E6 and E7 successfully inhibits the growth of cervical cancer, Int. J. Oncol. 29 541–548 (2006).

6. M. Yoshinouchi, T. Yamada, M. Kizaki, J. Fen, T. Koseki, Y. Ikeda, et al, *In vitro* and *in vivo* growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer

cells by E6 siRNA, Mol. Ther. 8 762–768 (2003).

7. K. Whitehead, R. Langer, D. Anderson, Knocking down barriers advances in siRNA delivery, Nat. Rev. Drug Discov. 8 129–138 (2009).

8. R. Juliano, M. Alam, V. Dixit, H. Kang, Mechanisms and strategies for effective delivery of antisense and siRNA oligonucleotides.NucleicAcidsRes. 36. 4158–4171 (2008).

9. K. Kataoka, A. Harada, Y. Nagasaki, Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance, Adv. Drug. Deliv. Rev. 47 113–131 (2001).

10. K. Miyata, N. Nishiyama, K. Kataoka, Rational design of smart supramolecular assemblies for gene delivery: Chemical challenges in the creation of artificial viruses, Chem. Soc. Rev. 41 2562–2574 (2012).

11. R.J. Christie, K. Miyata, Y. Matsumoto, T. Nomoto, D. Menasco, T.C. Lai, M. Pennisi, K. Osada, S. Fukushima, N. Nishiyama, Y. Yamasaki, K. Kataoka, Effect of polymer structure on micelles formed between siRNA and cationic block copolymer comprising thiols and amidines, Biomacromolecules 12 3174–3185 (2011).

12. W. Arap, R. Pasqualini, E. Ruoslahti, Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model, Science 279 377–380 (1998).

13. R.J. Christie, Y. Matsumoto, K. Miyata, T. Nomoto, S. Fukushima, K. Osada, J. Halnaut, F. Pittella, H.J. Kim, N. Nishiyama, K. Kataoka, Targeted polymeric micelles for siRNA treatment of experimental cancer by intravenous injection, ACS Nano 6 5174–5189 (2012).

14. Y. Oe, R.J. Christie, M. Naito, S.A. Low, S. Fukushima, K. Toh, Y. Miura, Y. Matsumoto, N. Nishiyama, K. Miyata, K. Kataoka, Actively-targeted polyion complex micelles stabilized by cholesterol and disulfide cross-linking for systemic delivery of siRNA to solid tumors, Biomaterials 35 7887–7895 (2014).

15. R. Accardi, R. Rubino, M. Scalise, T. Gheit, N. Shahzad, M. Thomas, L. Banks, C. Ndiveri, B.S. Sylla, R.A. Cardone, S.J. Reshkin, M. Tommasino, E6 and E7 from human papillomavirus type 16 cooperate to target the PDZ protein Na/H exchange regulatory factor 1, J. Virol. 85 8208–8216 (2011).

16. C.M. Hebner, L. A. Laimins, Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity, Rev Med Virol. 16 83-97 (2006).

17. 篠 諭司:【パピローマウイルスの発ガン機構】ヒトパ ピローマウイルスの初期遺伝子機能 パピローマウイルスによる腫瘍(清水文七 編),文光堂 47-56 (2000).

18. 齋藤真子、清野 透:【HPV --関連するがんの予防に 向けての展開--】HPV による発がん機構 細胞 38 522-526 (2000).

19. O'Connor MJ, Targeting of transcriptional cofactors bythe HPV E6 protein : another tale of David and Goliath, Trends Microbiol 8 45-47 (2000).

20. L. Gewin, H. Myers, T. Kiyono, et al, Identification of anovel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex, Genes Dev. 18 2269-2282 (2004).

21. J. Doorbar, Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. Clin Sci(Lomd) 110 525-41 (2006).

22. ウイルス　第58巻　第2号,pp.165-172, 2008

23. J.M. Arbeit, K. Munger, P.M. Howley, D. Hanahan, Progressive squamous epithelial neoplasia in K 14-human papillomavirus type 16 transgenic mice, J.Virol. 68 4358-4368 (1994).

24. D.A. Elson, R.R. Riley, A. Lacey, G. Thordarson, F.J. Talamantes, J.M. Arbeit, Sensitivity of the cervical transformation zone to estrogen-induced squamous carcinogenesis, Cancer Res. 60 1267-1275 (2000).

25. J.T. Chang, T.F. Kuo, Y.J. Chen, C.C. Chiu, Y.C. Lu, H.F. Li, C.R. Shen, A.J. Cheng, Highly potent and specific siRNAs against E6 or E7 genes of HPV16- or HPV18-infected cervical cancers, Cancer Gene Ther. 17 827–836 (2010).

26. J.S. Lea, N. Sunaga, M. Sato, G. Kalahasti, D.S. Miller, J.D. Minna, *et al*, Silencing of HPV 18 oncoproteins wiyh RNA interference causes growth inhibition of cervical cancer cells, Report Sci. 14 10–18 (2007).

27. N. Sima N, W. Wang, D. Kong, D. Deng, Q. Xu, J. Zhou, RNA interference against HPV16 E7 oncogene leads to viral E6 and E7 suppression in cervical cancer cells and apoptosis via upregulationof Rb and 53, Apoptosis 13 273–280 (2008).

28. R.A. DeFilippis, E.C. Goodwin, L. Wu, D. DiMaio, Endogenous human papillomavirus E6 and E7 Proteins differentially regulate proliferation, senescence, and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells, J. Virol. 77 1551–1563 (2003).

29. C. Yee, I. Krishnan-Hewlett, R. Schlegel, PM. Howley, Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma lines, Am. F. Pathol. 361-366 (1985).

30. FV. Breitburd, Cell culture systems for the study of papillomavirus, Papillomavirus and Human Disease. 371-392 (1987).

31. A.L.Jackson, S.R.Bartz,Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi,Nat.Biotech.20 521-524 (2004).

32. P.C.Scacheri,O.Rozenblatt-Rosen,Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells,P.Natl.Acad.Sci-Biol. 101 1892-1897 (2004).

33. O. Snove, T.Holen, Many commonly used siRNAs risk off-taeget activity, Biochem Biophys Res Commun. 391 256-263 (2004).

34. D.R. Caffrey, J. Zhao, Z. Song, M.E. Schaffer, S.A. Haney, R.R. Subramanian, A.B. Seymour, J.D. Hughes, siRNA off-target effects can be reduced at concentrations that match their individual potency, PloS One.6 1-11 (2011).

35. D. Semozarov, L. Frost, Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures, P.Natl.Acad.Sci-Biol.100 6347-6352 (2003).

36. Z.Yuan, X. Wu, C. Liu, G Xu, Z. Wu, Asymmetric siRNA : new strategy to improve specificity and reduce off-target gene expression, Hum.Gene.Ther.23 521-532 (2012).

37. C. Li, Z. Liu, F. Yang, W. Liu, D. Wang, E. Dong, Y. Wang, C-I. Wu, X. Lu, siRNA with decreased off-target effect facilitate the identification of essential genes in cancer cells, Oncotarget.6 21603-13 (2015).

38. A.L. Jackson, J. Burchard, Position-specific Chemical Modification Increases Specificity of siRNA-mediated Gene Silencing, RNA (2006).

39. P. Laverman, A.H. Brouwers, E.T. Dams, W.J. Oyen, O.C. Boerman, Preclinical anc clinical evidence for disappearance of long-circulating characteristics of polyethylene glycol liposomes at low lipid dose, J.Pharmacol.Exp.Ther. 293 996-1001 (2000).

40. T. Ishida, T. Ichikawa, M. Ichihara, Y. Sadzuka, H. Kiwada, Effect of the physicochemical properties of initially injected liposomes on the clearance of subsequently injected PEGylated liposomes in mice, J.Control.Release. 95 403-412 (2004).

41. H. Koide, T. Asai, K. Hatanaka, K. Shimizu, M. Yokoyama, T Ishida, H. Kawai, N. Oku, Elucidation of accelerated blood clearance phenomenon caused by repeat injection of PEGylated nanocarriers, Yakugaku Zasshi. 129 1445-1451 (2009).

42. T. Ishida, M. Ichihara, X. Wang, H. Kiwada, Spleen plays an important role in the induction of accelerated blood clearance of PEGylated liposomes, J.Control.Release.115 243-250 (2006).

43. H. Koide, T. Asai, H. Kato, H. Ando, K. Shiraishi, M. Yokoyama, N. Oku, Size-dependent induction of accelerated clearance phenomenon by repeated injections

of polymeric micelles, Int. J. Pharm. 432 75-79 (2012).