

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 西田 晴香

子宮頸癌は、先進国において女性の死亡原因となる癌の中でも上位を占める。子宮頸癌の 99% は、性感染症ウイルスのひとつである発癌性のヒトパピローマウイルス (HPV) の感染と関係している。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の 70%以上を占め、膣壁や外陰、肛門、ペニスや咽頭などの他の臓器の癌にも発展する。HPV の癌蛋白である E6 と E7 の共同作用が、子宮頸部細胞の癌化に関わっている。HPV 感染した細胞の中で E7 は様々な蛋白と結合することで、感染した宿主細胞の細胞周期を促進する。HPV E6 蛋白は p53 失活させ、細胞のアポトーシス機能を破綻させ、またテロメラーゼを活性させ細胞を癌化させる。実際、E6 と 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。それゆえに、E6 および E7 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。

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理想的な技術である。*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ある。また、子宮頸癌マウスモデルで E6/E7 遺伝子を標的とした核酸医薬を腫瘍内に局注することで腫瘍の発育を抑制できたという報告もある。しかし、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、体内で容易に分解され速やかに排出される特徴がある。このため siRNA の全身投与でその遺伝子抑制機能を発現させるには、特殊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した。核酸医薬のキャリアとして研究されてきたマテリアルの中には、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。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 を内包した有望な高分子キャリアとして東京大学工学部で開発されてきた。PIC ミセル

のサイズは直径約 45nm で、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。腫瘍への特異的な集積を高めるため、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。このミセル構造に siRNA を内包することで、siRNA の腫瘍内集積を著明に改善させ、皮下移植した腫瘍組織内での遺伝子抑制効果を高めることができたので報告する。

まず HPV 関連子宮頸癌の細胞株である HPV16 型陽性の SiHa 細胞と HPV18 型陽性の HeLa 細胞において、E6/E7 siRNA による E6 および E7 の遺伝子抑制効果を検証した。E6 と E7 は SiHa 細胞および HeLa 細胞各々に発現しており、E6 と E7 の転写は共通のプロモーターを介して転写される。本研究では、既報で E6 および E7 の両遺伝子抑制が認められた、E6/E7 を標的とした siRNA、HPV16 型 E6/E7 標的 siRNA (si16E6/E7) と HPV18 型 E6/E7 標的 siRNA (si18E6/E7) を使用した。リポフェクタミンを使用し、si16E6/E7 と si18E6/E7 を 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 E7 mRNA 量を測定することで比較した。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。HeLa 細胞でも si18E6/E7 を導入した E6 と E7 mRNA 量は siScramble をコントロールとして導入したときより約 70% 減少がみられた。これより siE6/E7 は HPV の型特異的 RNA 干渉することが確認された。

次に siE6/E7 を導入した子宮頸癌細胞の細胞増殖を検証した。SiHa (HPV16 型陽性)、HeLa (HPV18 型陽性)、C33A (HPV 陰性) 子宮頸癌細胞株を使用して siE6/E7 の HPV 型特異的な抗腫瘍効果を検討した。si16E6/E7 または si18E6/E7 を 3 つの細胞株に遺伝子導入し、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、量的に評価した。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 細胞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 細胞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、また配列特異的であることがわかった。

腫瘍を標的とした siRNA を運搬するために、siRNA を内包した cRGD ペプチド搭載型 PIC ミセルを作成した。子宮頸癌モデルにおいてミセルの腫瘍集積を確認するために、Alexa647 で標識した si18E6/E7 を PIC ミセルに内包した。ミセルに内包された Alexa647 標識 si18E6/E7 と Alexa647 標識 si18E6/E7 単体を、HPV18 型陽性の HeLa 腫瘍を皮下に移植したマウスに静注し、腫瘍を摘出してイメージング解析機 (IVIS) で腫瘍内の蛍光集積を測定した。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のに対し、siE6/E7 単体を静注した群ではほとんど蛍光集積が確認されなかった。PIC ミセルは静注によって効果的に siRNA を HeLa 腫瘍に運搬できることが示唆された。

次に子宮頸癌マウスモデルにおける siE6/E7 内包 PIC ミセルの静脈投与での抗腫瘍効果を調べた。子宮頸癌細胞である SiHa と HeLa 細胞を皮下注し、免疫不全マウスの皮下腫瘍モデルを作成した。siE6/E7 内包ミセルと siScramble ミセルとバッファーをマウスの尾静脈より静注し、腫瘍サイズを計測した。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 日目まで同様に腫瘍サイズが増大したのに対し、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、腫瘍増大抑制効果が認められた。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。

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、上記の実験において、12 日目に皮下の腫瘍を摘出し、ウェスタンブロットで p53 の発現量を検討した。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、siE6/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。HeLa 腫瘍でも同様の結果であった。siE6/E7 内包ミセルの抗腫瘍効果は、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。

また、子宮頸癌自然発生モデルにおける PIC ミセル投与実験では、HE 染色では差が認められなかったものの、免疫染色では siE6/E7 投与群において E7 の発現が低下し、p53 が復活していた。子宮頸部に局在する病変においても、さらに、免疫正常なマウスに全身投与した場合でも、その腫瘍抑制効果を発揮する可能性が示唆された。

最近核酸医薬治療において、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、オフターゲット効果が指摘されている。この効果を減少させるためにいくつかの工夫が報告されているが、本研究ではヒトが保有していない HPV 固有の E6/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た。また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。この現象に関しても回避するための工夫が報告されているが、本研究では免疫正常な子宮頸癌自然発生モデルマウスでも分子学的に抗腫瘍効果が確認されており、本研究で使ったミセルは、ABC 現象を回避できる可能性が示唆された。まだ課題は残されているが、本研究において、HPV 癌遺伝子をコードした siRNA 内包 PIC ミセルは、将来的に中咽頭やペニス、膣、外陰や肛門癌を含む幅広い HPV 関連癌の非常に有効な治療候補となる可能性がある。