[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名　西田　晴香

本研究は、体内で容易に分解・排泄されるため全身投与による治療が困難であった siRNA の運搬体として、東京大学工学部で開発されたナノミセル型 DDS(PIC ミセル)を用いることにより、子宮頸癌の発癌原因であるヒトパピローマウイルス(HPV)固有の癌遺伝子をターゲットとした siRNA を使用して、全身投与による抗腫瘍効果を検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. 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(siE6/E7 と表記) による E6 および E7 の遺伝子抑制効果を検証した si16E6/E7 を導入した SiHa 細胞ではコントロール siRNA として Scramble siRNA(siScramble と表記)を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、HeLa 細胞でも約 70%減少がみられ、siE6/E7 は HPV の型特異的 RNA 干渉することが確認された。
2. siE6/E7 を導入した子宮頸癌細胞の細胞増殖を検証するため 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、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ところ、細胞増殖における siE6/E7 増殖抑制効果は、HPV の型特異的、また配列特異的であることがわかった。
3. 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ところ 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。

4. 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るために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ところ、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。
5. 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ところ、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。HeLa 腫瘍でも同様の結果であり、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。
6. 子宮頸癌自然発生マウスにおいての 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。

以上、本論文は PIC ミセルを用い、HPV 固有の癌遺伝子をターゲットとした siRNA の全身投与で腫瘍増殖抑制効果があることを明らかにした。これまで、子宮頸癌皮下移植モデルにおける siRNA の全身投与での抗腫瘍効果の報告はなく、また HPV 固有の癌遺伝子をターゲットとしている点から、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 関連癌の非常に有効な治療候補となる可能性があることを証明した研究であり、学位の授与に値するものと考えられる。