

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15589

研究課題名(和文) ナノデバイスを利用した新規腎癌治療の開発

研究課題名(英文) A development of new renal carcinoma treatment using the nano-material

研究代表者

藤井 秀岳 (Fujii, Hidetaka)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・客員講師

研究者番号：10405318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はナノゲルとsiRNAを用いた新規腎細胞癌遺伝子治療を開発した。ナノゲル/siVEGFA複合体は腎癌細胞に取り込まれ、VEGF-A遺伝子のノックダウンに成功した。加えて、その複合体は腫瘍組織内においても安定性を維持できることを確認した。

siVEGFA/ナノゲル複合体をマウス腎癌内へ投与することにより、血管新生と腫瘍成長を著明に抑制することを示した。また、腫瘍内VEGF-Aを制御することにより、マウス全身における骨髄由来免疫抑制細胞(MDSCs)蓄積の減少を明らかにした。これらは、VEGF-A遺伝子の局所制御が、悪性腫瘍に関連する全身性免疫応答の改変につながることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We developed a new gene therapy for renal cell carcinoma(RCC), using the siRNAs and nanogel. The siVEGF-A/nanogel complex was engulfed by RCC, resulting in efficient knockdown of VEGF-A. In addition, it appears that the complex is stably maintained in tumor tissue. Intra-tumor injections of the complex significantly suppressed neovascularization and growth of RCC in mice. The treatment also inhibited induction of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs). These results suggest that local suppression of VEGF-A may have a positive impact on systemic immune responses against malignancies.

研究分野：腎細胞癌局所療法

キーワード：腎細胞癌 VEGF-A siRNA DDS 腫瘍免疫 免疫抑制性細胞

## 1. 研究開始当初の背景

二本鎖 RNA(dsRNA) を用いた RNA interference (RNAi) 法は 1998 年に初めて報告され(*Fire A et al, Nature, 1998*)、今や遺伝子解析や治療薬開発には必須のツールとなっている。約 20bp の siRNA (short interference RNA) は、設計が非常に簡単で安価であること、極めて特異性が高いこと、低濃度で効果が期待できることなどが大きな特徴である。この siRNA を用いた RNAi 法は、特定の遺伝子を効率よく抑制可能で、汎用性が高いために様々な分野の基礎研究や創薬開発に広く利用されている。しかし、哺乳動物体細胞、特に生体内における安定性や細胞内への導入法に課題が残っており、生体内での安全性についても未だ不明な点も多いため、siRNA を利用した癌遺伝子治療の実用化には至っていない。安全で副作用のない siRNA 投与法を確立するために、生体適合性物質からなる DDS (drug delivery system) キャリアーの開発が課題であった。

腎細胞癌は腎実質にできる悪性腫瘍の中で約 90%以上を占め、放射線療法や化学療法に抵抗性であり、外科的切除以外に有効な治療法がなかった。切除不可能な転移性腎細胞癌に対してはサイトカイン療法 (IFN- $\alpha$  や IL-2 療法) が行われてきた。しかし、その奏効率は約 10~20%と低いものであり、発熱や全身倦怠感、食思不振など全身性の副作用も多くみられた。近年、転移性腎細胞癌に対して抗血管新生治療を含む分子標的治療薬が広く使用されており、その治療効果もある程度認められるようになってきた。その中心標的遺伝子は VEGF (特に VEGF-A) とされている (*Eisen T et al. J Natl Cancer Inst 2012*)。しかし、実臨床で使用されている分子標的薬が腫瘍細胞特異的でないため、我々があまり経験したことのない重篤な副作用 (高血圧・疲労・下痢・皮膚炎など) が高頻度で出現することが問題となっている。

siRNA を用いた RNAi 法が遺伝子治療に使用可能となれば、ある特定遺伝子のみを標的とすることが可能であり、疾患単位での病態解明や治療方法確立におけるメリットは計り知れない。徐放性を有するナノキャリア (*Toita S et al. Biomacromolecules 2010*) を利用して、VEGF-A 遺伝子をターゲットにした siRNA を直接的に癌細胞へ導入可能となれば、その遺伝子発現のみを長期間抑制することが可能になり、血管新生および腫瘍増殖の抑制も期待され、全身性の副作用も軽減できると考えられる。

このような経緯により、新規腎細胞癌遺伝子治療に利用できる DDS キャリアーとしてナノサイズのゲルを開発し、siRNA とナノゲル複合体をマウス腎癌に対する遺伝子治療に使用することとした。さらに、VEGF-A は血管新生において中心的な役割を果たしていることに疑いの余地はないが、近年では様々な免疫能や炎症性サイトカインとの関係も報告されており (*Christina LR et al. PLoS ONE 2009*)、腫瘍内 VEGF-A を制御することによる抗腫瘍効果とマウスにおける免疫機構を解析するという着想に至った。

## 2. 研究の目的

ナノゲルを用いて VEGF-A 特異的な siRNA をマウス腎癌細胞に導入するという、従来にない新しい治療法を開発を目的とする。現在の腎細胞癌治療において、抗血管新生療法や免疫療法単独では治療成績の向上は限られている。ナノゲルを用いた新たな治療法を確立することにより、siRNA を用いた新規遺伝子治療への道を切り開くことができ、得られた免疫解析による新規免疫療法との併用も期待できる。また将来的に、疾患各種因子をこの RNAi 法を用いて抑制することができれば、様々な疾患において、病因の解析や新規治療法開発にも応用できる可能性があり、臨床的にも非常に意義があると考えられる。

### 3. 研究の方法

1) *in vitro* におけるナノゲルのDDSとしての評価を行う。ナノゲルとVEGFA-siRNA (以下 siVEGF) との複合体を作製する。mRNAレベルのノックダウン効率はリアルタイムRT-PCRで行い、蛋白発現の解析についてはELISA法を用いる。*in vitro*においては、マウスにおける様々な癌腫 (腎癌: Renca、膀胱癌: MBT-2、メラノーマ: B16) に対しての遺伝子導入を行うことにより評価する。

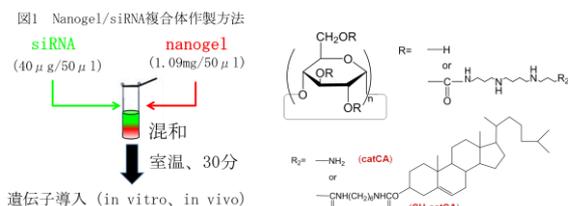
2) *in vivo* におけるナノゲルのDDSとしての評価を行う。癌種は、Balb/cマウス由来の腎癌自然発生株であるRenca細胞を用いる。5x10<sup>5</sup>個のRenca細胞をメスの9週齢Balb/cマウスの右側腹部皮下へ移植し、約50 mm<sup>3</sup>まで成長した時点で実験に用いる。生体内での安定性を視覚的に評価するため、FITC蛍光標識されたsiRNAを用い、生体内での安定性を評価する。

3) 抗腫瘍効果の検討を行う。上述のマウス腎癌皮下移植モデルを用い、腫瘍体積が約50 mm<sup>3</sup>となった時点を day0 と定め、腫瘍増殖抑制実験を開始する。投与複合体量は50 μL/回 (siRNA量は20 μg)、4日毎に5回投与とする。腫瘍径を継続的に測定する。

4) day20で腫瘍を摘出し、腫瘍の計測や遺伝子解析に用いる。腫瘍内のVEGFAの遺伝子発現はリアルタイムRT-PCRで行う。マウス血清や脾臓を摘出し、免疫学的解析に用いる。

### 4. 研究成果

1) 我々の使用したナノゲルは、サイクロアミロース (多糖) にスペルミン基とコレステロール基を付加させたものであり (図1右)、生体適合性の高い物質で構築されている。siRNA/ナノゲル複合体は、siVEGF (40 μg/50 μL) とナノゲル (1.09mg/50 μL) を混和後、室温で30分間静置して作製した。この複合体を siVEGF 0.8 μg/10 μL となるように希釈して *in vitro* では使用した (図1左)。



Renca 細胞を 24 well プレートに 5x10<sup>4</sup> cells/well で撒き、24 時間培養した後、siRNA/ナノゲル複合体を 5~15 μL (siRNA 0.4~1.2 μg) 添加し、24 時間後に RNA を抽出し、リアルタイム RT-PCR を行った。コントロールとして、untreatment (UT)、ナノゲル単独、negative-siRNA (siCont) 群との比較を行った。siVEGF/ナノゲル複合体は Renca 細胞内の VEGFA 発現を著明に抑制した (図 2 左)。また、ELISA 法により蛋白レベルでの抑制効果も認められた (図 2 右)。

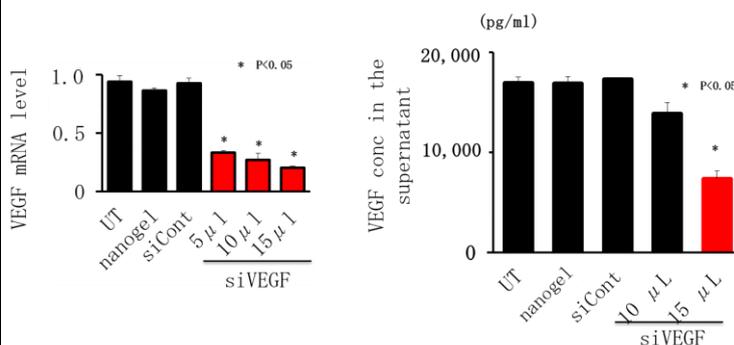


図2 siVEGF/ナノゲル複合体の導入効果

また、マウスにおける他の癌種に同様の導入を試みたところ、

B16 (メラノーマ細胞) や MBT-1 (膀胱癌細胞) にもリアル

タイム RT-PCR で導入効果が認められ、種々の癌細胞へも

siRNA を導入できることが示唆された (図 3)。

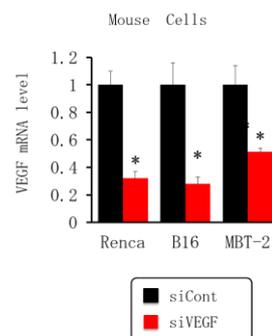


図3 他癌種への導入

2) siFITC/ナノゲル複合体 50  $\mu$ L (siFITC 20  $\mu$ g/匹) を腫瘍内へ局所投与した。導入後 24 時間経過した時点で腫瘍を切除し、蛍光顕微鏡で観察した。siFITC 単独投与群では FITC シグナルが消失しており視認することが困難であったが、siFITC/ナノゲル複合体投与群においては FITC のシグナルを容易に確認することができた (図 4)。これにより、siRNA はナノゲルにより生体内でも安定して存在することができ、組織内滞留性に優れていることが示唆された。

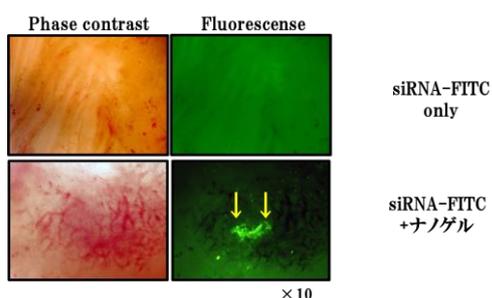
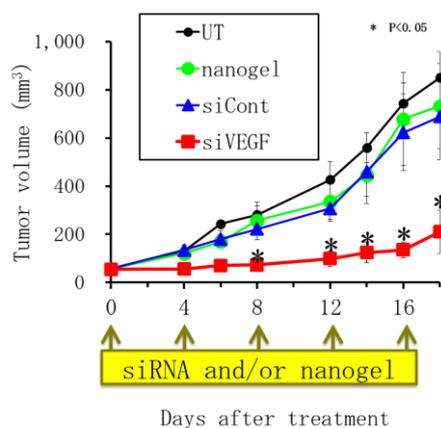


図 4 投与 24 時間後の FITC シグナル

3) マウス腎癌皮下移植モデルに対して Untreatment 群、ナノゲル単独投与群、siCont/ナノゲル複合体群、siVEGF/ナノゲル複合体をそれぞれ腫瘍内へ局所投与し、抗腫瘍効果を検討した。siVEGF/ナノゲル投与群のみ 8 日目から腫瘍成長の抑制を認め、day20 まで計 5 回の投与を行ったが、抗腫瘍効果は持続していた (図 5)。

図 5 腫瘍成長曲線



4) day20 にて腫瘍を切除した。siVEGF/ナノゲル複合体投与群の腫瘍成長は肉眼的にも著明に抑制されており (図 6)、腫瘍重量は有位に小さかった。



図 6 肉眼的所見

また、腫瘍内血管新生を CD31 免疫染色と Microvessel density (MVD) にて解析したところ、siVEGFA 投与群の血管新生は著明に抑制されていた (図 7)。

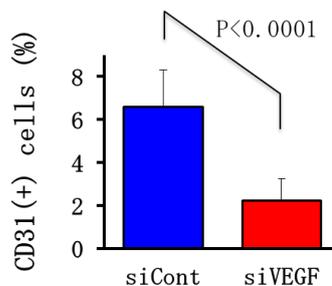


図 7 腫瘍組織の CD31 陽性細胞比率

次に、腫瘍内 VEGF-A 制御によるマウス個体の免疫能への影響を調べた。マウス脾臓細胞の FACS 解析により、VEGF-A 治療群では CD11b<sup>+</sup>Gr1<sup>+</sup>細胞 (骨髄由来免疫抑制細胞: MDSC) の蓄積がコントロール群よりも著明に減少していることを確認した (図 8)。

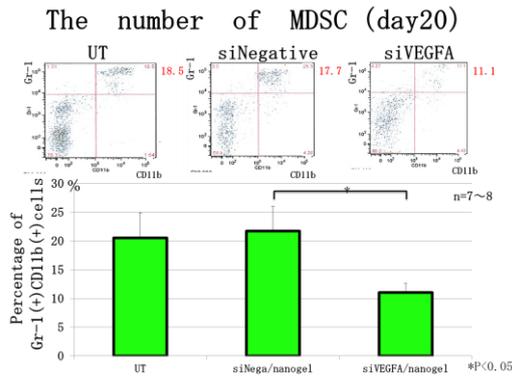


図8 マウス脾臓細胞のFACS解析

これらの結果より、ナノゲルは *in vitro* において siRNA を様々な細胞へ導入することが可能であり、*in vivo* においても

siRNA s /ナノゲル複合体は優れた組織滞留性をもつ優れた DDS であることが示唆された。

近年、VEGF-A は血管新生因子として注目される以外に、免疫抑制や炎症性サイトカインとの関連が注目されている。我々は腫瘍内 VEGF-A を制御することにより、マウス全身における MDSC 蓄積の減少を明らかにした。MDSC が蓄積すると、NO 産生や Treg 誘導などによる免疫抑制状態につながるとされており、我々の結果は悪性腫瘍に関連する全身性免疫応答の改変につながること示唆している。

今後は、抗血管新生治療と腫瘍免疫との関連を解析し、抗血管新生治療と新たな免疫療法との併用を検討する。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藤井 秀岳 (FUJII, Hidetaka)

京都府立医科大学・医学研究科・客員講師

研究者番号: 10405318

##### (2) 研究分担者

本郷 文弥 (HONGO, Fumiya)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号: 80291798

上田 崇 (UEDA, Takashi)

京都府立医科大学・医学研究科・客員講師

研究者番号: 50601598

浮村 理 (UKIMURA, Osamu)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：70275220

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし