

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09601

研究課題名(和文) 子宮頸癌に対する有機シリカ・ナノ粒子キャリアを用いたCRB1遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文) Development of CRB1 gene therapy using organosilica nanoparticle carriers for cervical cancer

研究代表者

末岡 幸太郎 (Sueoka, Kotaro)

山口大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：40452643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子治療用キャリアとして有機シリカ・ナノ粒子を用いて、CRB1 が子宮頸癌の新たな遺伝子治療となりうるかを研究した。(1)OS/TNCへのplasmid DNAの付加反応により、OS/TNCにのplasmid DNAが付加することを確認できた。(2)CRB1-OS/TNCの癌細胞への導入について、子宮体癌細胞株SNGMに遺伝子導入は確認されたものの、タンパク、mRNAレベルでの過剰発現モデルは作成できなかった。CRB1-OS/TNCの開発においては導入遺伝子の過剰発現が生じなかった。このOS/TNCは生体染色マーカーとして移植した細胞等を経時的に追跡する際に有用なツールになり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

OS/TNCの高いトランスフェクション率と安全性・安定性は、生体染色マーカーとして移植細胞を経時的に追跡する有用なツールになると考えられる。OS/TNCは、生物学的染色マーカーとして移植された細胞を経時的に追跡するための有用なツールになり得る。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that CRB1 could be a useful therapeutic agent for cervical cancer. We investigated the development of a new gene therapy for cervical cancer using organosilica theranostics nano-carrier, which have multifunctional properties different from conventional nanoparticles, as carriers for gene therapy. (1) We were able to confirm that about 300 ng of plasmid DNA was added to OS/TNC by the addition reaction of plasmid DNA to OS/TNC. (2) Transfection of CRB1-OS/TNC into cancer cells was verified using the uterine cancer cell line SNGM. Although gene transfer was confirmed, we were unable to generate a model of overexpression at the protein and mRNA levels.

The results showed that expression of CRB1-OS/TNC did not cause overexpression of the transgene. On the other hand, the high transfection rate and safety/stability of OS/TNC may make OS/TNC a useful tool for tracking transplanted cells over time as a biological staining marker.

研究分野：子宮頸癌

キーワード：子宮頸癌 CRB1 遺伝子治療用キャリア

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌は、早期では手術や放射線による治療が確立され、その有効性は証明されているが、進行・再発症例では有効な治療手段がなく、予後は極めて不良である。我々は独自の研究から CBR1 に注目し、CBR1 の発現が低下している子宮癌症例では有意に予後不良であること（特許 4967128 号、特開 2012-13504）および、CBR1 の発現低下が上皮間葉転換（EMT）を誘導し、癌の悪性度を亢進させることを見出した（Cancer Lett. 2011, 2012）。さらに、in vivo 移植実験において、CBR1 を過剰発現した子宮頸癌細胞株の移植により腫瘍形成は抑制され、逆に CBR1 発現抑制株の移植により腫瘍形成は促進されることを報告している（Reprod Med Biol, 2018）。これらの研究結果は、CBR1 が子宮頸癌に対する有用な治療薬となり得ることを示唆している。

一方で近年、癌治療において、送達機能に優れた遺伝子治療用キャリア（DDS）としてナノ粒子が注目されている。これは、腫瘍組織では血管の透過性が高くリンパ組織が未発達であるため、ナノ粒子は癌組織から排出されにくく、高度に集積されるためである（Enhanced permeability and retention (EPR) 効果）。さらに、本研究で使用する有機シリカ・ナノ粒子は従来のナノ粒子に比較して、蛍光色素などの分子を内包させる内部機能化や、核酸（遺伝子発現ベクター等）などを粒子表面に結合させる表面機能化を効率良く行うことができ、多機能化に優れた粒子である。また、生体内の様々な環境において機能的、構造的に安定性が高い。従って、この有機シリカ・ナノ粒子の使用により、遺伝子発現ベクターをこれまで以上に高率に腫瘍組織特異的に送達することが可能になると考えられる。

そこで、本研究では CBR1 遺伝子の発現ベクターを腫瘍組織まで送達し、CBR1 タンパクを高発現させる有機シリカ・ナノ粒子キャリア（CBR1 遺伝子治療ナノ粒子キャリア：CBR1-OS/TNC）の開発を行い、子宮頸癌の新たな遺伝子治療薬に繋げることを目的とした。

2. 研究の目的

我々は、子宮頸癌細胞へ CBR1 発現ベクターを導入し、CBR1 を過剰発現させると腫瘍形成を抑制できる事実を in vivo 実験ですでに証明している。一方で研究協力者である山口大学の中村教授が新たな遺伝子治療用キャリアとして、従来のナノ粒子と比較し、多機能性、安定性、安全性に優れた有機シリカ・ナノ粒子キャリア（OS/TNC）を開発しており（米国第 8,455,255 号、日本第 4,982,687 号、米国第 9,265,729 号、日本第 5,709,292 号）、この OS/TNC を用いることで効率よく CBR1 を腫瘍組織に集積できれば、優れた抗腫瘍効果を得られる可能性は非常に高いと考えられる。本研究では CBR1 遺伝子治療ナノ粒子キャリア（CBR1-OS/TNC）を作製し、その機能解析を in vitro および in vivo で行い、さらに治療の選択肢が広がる可能性を考え、抗癌剤との併用により、抗腫瘍効果が増強されるかも検討する。

3. 研究の方法

(1) CBR1 遺伝子治療ナノ粒子キャリア（CBR1-organosilica theranostics nano-carrier; CBR1-OS/TNC）の開発

本研究で開発した CBR1-OS/TNC には CBR1 遺伝子の発現ベクターに加えて、細胞への取り込みをモニタリングするために蛍光色素（ローダミン B 等）を内包させた。

キャリアには多機能性、安定性および安全性に優れた有機シリカ（3-メルカプトプロピルトリメ

トキシシラン;MPMS) ナノ粒子を使用した。この有機シリカ・ナノ粒子キャリア (OS/TNC) には、さらに細胞への導入と plasmid DNA の付加を向上させるため、ポリエチレンイミン (PEI) をコーティングした (図 1)。PEI のサイズおよび濃度によりナノ粒子のキャリアとしての性質 (表面電位他) が異なるため、様々なサイズ (1.3 kDa~750 kDa) をコーティングした OS/TNC を作成した (表 1)。これらのうち plasmid DNA の導入と遺伝子の発現を指標に最適な OS/TNC を選定する方針で研究を進めた。

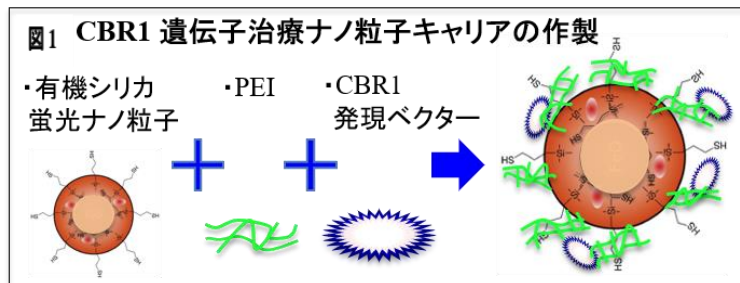


表1. これまで開発した有機シリカ・ナノ粒子キャリア (OS/TNC) のまとめ

#	ID (lot #)	有機シリカ	蛍光色素	コーティングしたPEIのサイズと濃度	ゼータ電位
1	TN3-4	MPMS	FITC	1.3 kDa	+28.91 mV
2	TN46-1	MPMS	Rhodamin B	2.0 kDa, 0.5%	+19.4 mV
3	TN46-2	MPMS	Rhodamin B	2.0 kDa, 5.0%	+19.7 mV
4	TN51-1	MPMS	Rhodamin B	750 kDa, 0.5%	+14.1 mV
5	TN51-2	MPMS	Rhodamin B	750 kDa, 5.0%	+17.0 mV
6	TN56-5	MPMS	Rhodamin B	2.0 kDa, 0.0005%	+7.9 mV
7	TN56-6	MPMS	Rhodamin B	2.0 kDa, 0.00005%	-16.8 mV
8	TN57-5	MPMS	Rhodamin B	750 kDa, 0.0005%	+5.2 mV
9	TN57-6	MPMS	Rhodamin B	750 kDa, 0.00005%	-8.4 mV
10	TN63-2	MPMS	Rhodamin B	5.0 kDa, 2.0%	-10.5 mV
11	TN64-2	MPMS	Rhodamin B	10 kDa, 2.0%	+4.3 mV
12	TN65-2	MPMS	Rhodamin B	100 kDa, 2.0%	+7.1 mV

CBR1 発現ベクターとしては、細胞への発現ベクターの導入をモニタリングするため、*CBR1* と同時に *GFP* を発現する pEF1 α -*CBR1*-IRES-AcGFP vector を構築し、使用した。OS/TNC への plasmid DNA の付加反応により (図 1)、5 μ g の OS/TNC に約 300ng の plasmid DNA が付加することを確認している。

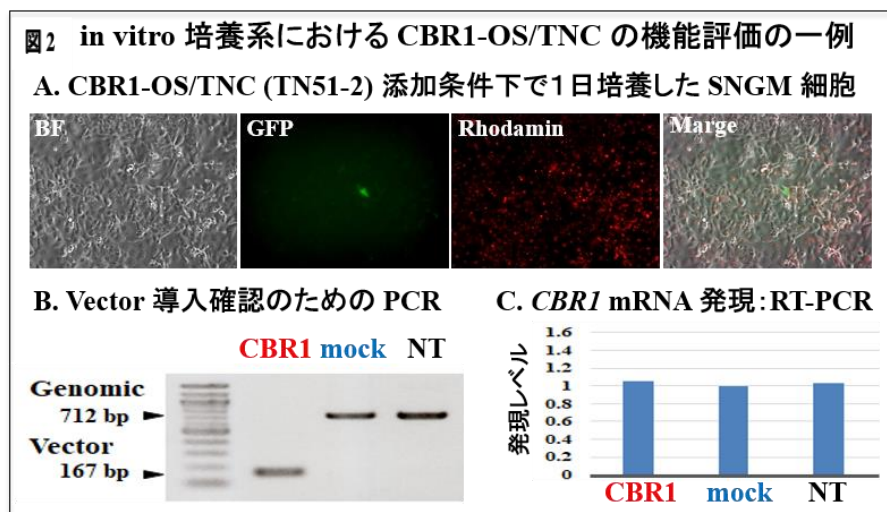
(2) CBR1 遺伝子治療ナノ粒子キャリア (CBR1-OS/TNC) の機能評価

開発した CBR1-OS/TNC の機能評価は、当初はヒト子宮癌細胞株を使用した *in vitro* の培養系と *in vivo* の異種移植マウスモデルを用いた動物実験にて検証する予定であったが、導入した遺伝子が細胞内で発現しなかったため、*in vitro* の培養系だけの機能評価を行った。

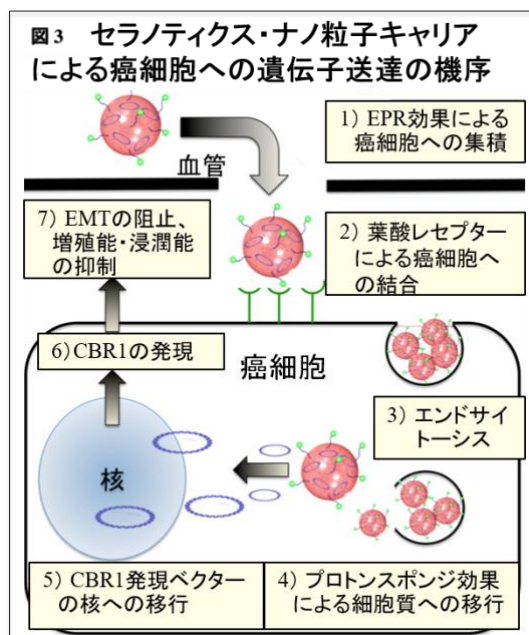
in vitro 培養系における CBR1-OS/TNC の機能評価

CBR1-OS/TNC の癌細胞への導入および導入した遺伝子の発現について子宮体癌細胞株 SNGM を用いて検証した。OS/TNC の細胞への添加は、条件検討により 1×10^5 細胞/well (24 well-plate) に対して 5 μ g の条件がいずれの OS/TNC においても至適であることが判明した。その条件によって、特に導入状況が良かった OS/TNC (TN46-1, 2 および TN51-1, 2) では、ほとんど全ての細胞で OS/TNC のマーカーであるローダミンのシグナル (図 2. A ; Rhodamin) が確認された。また、CBR1 発現ベクターの細胞内への導入を、発現ベクターに挿入された *CBR1* 配列 (167bp) を標的とした genomic PCR で調べたところ、CBR1-OS/TNC 導入細胞 (図 2. B ; CBR1) で CBR1 発現ベクターの導入が確認された。しかしながら、次に、発現ベクターからの遺伝子発現のモニターとした GFP の発現を調べたところ、いずれの OS/TNC を導入した細胞でもほとんど確認されず、TN51-1 および TN51-2

を導入した細胞でのみ、 1×10^5 細胞あたり 1-2 個の GFP 陽性細胞が確認された (図 2. A ; GFP)。さらに導入した *CBR1* の mRNA 発現を RT-PCR で調べたところ、いずれの CBR1-OS/TNC を導入した細胞 (図 2. C ; CBR1) においても *CBR1* の過剰発現は認められなかった。



以上の結果から、CBR1-OS/TNC は SNGM 細胞において細胞内に導入され、それに伴い CBR1 発現ベクターも細胞内へ導入されているが、発現ベクターからの転写が生じていないと考えられた。現在想定されている「セラノティクスナノ粒子キャリアによる癌細胞への遺伝子送達の機序」を図 3 に示した。本研究の結果を機序に照らし合わせると、CBR1-OS/TNC はエンドサイトーシスによる癌細胞内への導入 (図 3. 3) までは生じているが、それ以降の過程における CBR1-OS/TNC の細胞質への移行 (図 3. 4)、CBR1 発現ベクターの核への移行 (図 3. 5) あるいは CBR1 発現ベクターの OS/TNC からの乖離のいずれか、あるいはこれらが複合的に阻害されていると考えられた。



4. 研究成果

本研究の成果では、CBR1-OS/TNC の開発においては導入遺伝子の過剰発現が生じないという大きな課題が残った。一方で、OS/TNC の細胞への導入は非常に高効率であった。また、OS/TNC の細胞への導入における安全性の高さ (細胞毒性の低さ) は、リポフェクションのような市販されて

いる導入試薬を使用したトランフェクションより優っていることも判明した。本研究で用いた SNGM 細胞はリポフェクションによる遺伝子導入では、至適条件でも 20%程度の細胞が死滅している。それに対して、OS/TNC を導入した SNGM 細胞では非処理細胞と同様に細胞の死滅は生じず、細胞増殖および形態についても顕著な変化は生じなかった。また、SNGM 細胞に導入した OS/TNC は導入後 3 回の継代を伴う 2 週間の培養においても、細胞内に残留し続け、Rhodamin の蛍光が安定して保たれていた。OS/TNC の導入における安全性については、網羅的な遺伝子発現の変化等さらなる検証が必要ではあるが、高い導入率および安全性・安定性から、この OS/TNC は生体染色マーカーとして移植した細胞等を経時的に追跡する際に有用なツールになり得ると考えられる。

今後、導入遺伝子の過剰発現に関する課題が解消され、さらに、CBR1 を腫瘍組織に効率よく集積できる方法として確立できれば、CBR1-OS/TNC は世界で初めての子宮癌における遺伝子治療薬になり得、特許取得と産学連携による医薬品の開発に大きな期待が持てる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------