

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07631

研究課題名(和文) ナノ粒子型油性造影剤を用いたsiRNA送達システムの開発と肝動脈塞栓術への応用

研究課題名(英文) Development of small interfering RNA system with nanoparticle type oily contrast media and application to transcatheter arterial embolization

研究代表者

谷口 純一 (Taniguchi, Junichi)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：60818714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肝癌細胞はおそらくmacropinocytosisでリピオドールを細胞質内に取り込んで入り込みが推察された。核酸とリピオドールのW/Oエマルジョンを用いることにより核酸を細胞質内に到達させ、細胞内で機能させることができることが示唆された。カチオン性ポリマーを付加したプラスミドとリピオドールのW/Oエマルジョンを作成することで、ガン細胞への遺伝子導入効率を改善させることができた。低酸素誘導因子阻害siRNAとリピオドールのW/Oエマルジョンを肝動注したラットでは、肝腫瘍のルシフェラーゼ活性が低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においてこれまで肝動脈塞栓術に使用されてきた油性造影剤・リピオドールをsiRNA送達のためのドラッグデリバリーシステムとして応用できる可能性を示すことができた。実際に低酸素誘導因子阻害siRNAとリピオドールのW/Oエマルジョンを肝動注したラットでは、肝腫瘍のルシフェラーゼ活性が低下した。今後臨床試験に発展させるための重要なステップとして位置づけられる。肝動脈塞栓術後のガン再発や悪性形質獲得を阻止する新規治療の開発基盤構築を目指す。

研究成果の概要(英文)：It was postulated that hepatoma cells may have taken up lipiodol into their cytoplasm by macropinocytosis. It was proposed that the use of a water-in-oil emulsion of nucleic acid and Lipiodol would facilitate the delivery of nucleic acid to the cytoplasm and its subsequent function within the cell. The preparation of a water-in-oil emulsion comprising a cationic polymer-added plasmid and lipiodol may enhance the efficiency of gene transfer into cancer cells. In rats that received a hepatic arterial injection of a water-in-oil emulsion of hypoxia-inducible factor-inhibiting siRNA and lipiodol, there was a reduction in luciferase activity in liver tumors.

研究分野：Interventional Radiology

キーワード：siRNA リピオドール W/Oエマルジョン

1. 研究開始当初の背景

原発性肝癌は本邦の癌死因第4位で、年間約3万人が死亡している。また、悪性腫瘍による死亡例の20-50%が転移性肝癌を有している。肝動脈塞栓術は、切除不能な原発性及び転移性肝癌に対する有効な治療法として選択されている。しかし、塞栓術後も50~80%と高頻度でガン再発が認められる。しかも、塞栓術後に再発した肝癌は、初発例と比べ生物学的悪性度が高いことが知られている。よって、再発肝癌に対して、肝動脈塞栓術を繰り返し行っても、いずれ治療不応や継続困難となることが多い。

肝動脈塞栓術後の再発肝癌において生物学的悪性度が増すメカニズムの一つとして、低酸素誘導因子・HIF-1 依存的に低酸素応答遺伝子が発現促進し、ガン細胞が悪性形質を獲得する機序が示唆されている。実際、肝動脈塞栓術後の残存肝癌では、血管新生因子・VEGF や、ガン免疫逃避に關与する PD-L1 等の低酸素応答遺伝子の発現が増加することが知られている。そこで、肝動脈塞栓術と血管新生阻害剤や免疫チェックポイント阻害剤との併用により治療成績の向上を目指した臨床研究が、国内外で行われるようになってきた。

2. 研究の目的

我々は、肝動脈塞栓術の際に、ガンの薬剤耐性や悪性形質獲得の引き金になっている HIF-1 や VEGF、PD-L1 等の遺伝子を siRNA で阻害すれば、抗腫瘍効果を高めることができるのではないかとこの着想に至った。siRNA は低分子二本鎖 RNA であり、特定の mRNA を分解してタンパクの発現を特異的に抑制できるため、副作用の少ない製剤の開発が期待できる。しかし、siRNA は通常、血液中で速やかに分解される。そこで、本研究では、ナノ粒子化した油性造影剤・リポドールに siRNA を封入することで、分解されることなく siRNA をガン細胞に取り込ませ、標的 mRNA を分解させることができるのではないかとこの着想に至った。

本研究では、これまで肝動脈塞栓術に使用されてきた油性造影剤・リポドールを siRNA 送達のためのドラッグデリバリーシステムとして応用し、肝動脈塞栓術後のガン再発や悪性形質獲得を阻止する新規治療の開発基盤構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) リポドールの細胞内取り込みに関する検討

過去の報告では、肝動脈内に注入されたリポドールが細胞質内まで到達しているという報告が散見される。本研究ではまず、本当にリポドールが細胞質内に取り込まれ siRNA 送達に利用できるかどうかを検証した。脂肪滴染色試薬を用いてリポドールを緑色蛍光標識し、赤色蛍光タンパク (mCherry) を導入したラット肝細胞癌株 (N1S1) の培地に加え、共焦点顕微鏡で観察した。

(2) リポドールの核酸送達能に関する検討

リポドールが肝癌細胞の細胞質内まで到達することは確認できたが、実際に siRNA 等の核酸を細胞質内まで到達させ、細胞内で機能させることがどうかは不明である。そこで、本研究では、緑色蛍光タンパク発現遺伝子を搭載したプラスミド溶液とリポドールを用いた water-in-oil (W/O) エマルジョンをラット肝癌細胞株の培地に加え、プラスミドが細胞内に到達して実際に細胞内で緑色蛍光タンパク質が発現するかどうかを蛍光顕微鏡で観察した。

(3) リポドールの細胞内遺伝子導入効率向上を目指した検討

これまでの研究で、リポドールはラット肝癌細胞の細胞質内に取り込まれるため、核酸の細胞内デリバリーに応用できそうであることが分かった。しかし、遺伝子の導入効率が非常に低く、遺伝子導入効率の改善が必

要であった。そこで、リピオドールにリン脂質を付加し、また導入する遺伝子に、陽性電荷を有するカチオン性ポリマーを組み合わせることで、遺伝子導入効率の改善が得られないか検討した。実験にはルシフェラーゼ発現プラスミドを用い、プラスミド単独、カチオン性ポリマー付加プラスミド、プラスミドとリピオドールの W/O エマルジョン、カチオン性ポリマー付加プラスミド、とリピオドールの W/O エマルジョンの 4 種を、それぞれラット肝癌細胞株の培地に加え、ルシフェラーゼ活性を測定した。

(4) 抗腫瘍効果の検討

低酸素誘導因子阻害 siRNA とリピオドールの W/O エマルジョンを作成した。このエマルジョンをラット肝腫瘍モデルの肝動脈内に注入した。注入後、小動物用発光・蛍光イメージングを行い、腫瘍のルシフェラーゼ活性を評価した。

4. 研究成果

(1) リピオドールの細胞内取り込みに関する検討

共焦点顕微鏡による観察では、緑色蛍光標識したリピオドールが、ラット肝癌細胞内に取り込まれていることが確認できた (図 1)。また、共焦点顕微鏡のタイムラプス画像では、肝癌細胞が仮足を出してリピオドールを取り込んでいる様子が確認できた (図 2)。本検討の結果、肝癌細胞はおそらく macropinocytosis でリピオドールを細胞質内に取り込んで入ることが推察された。

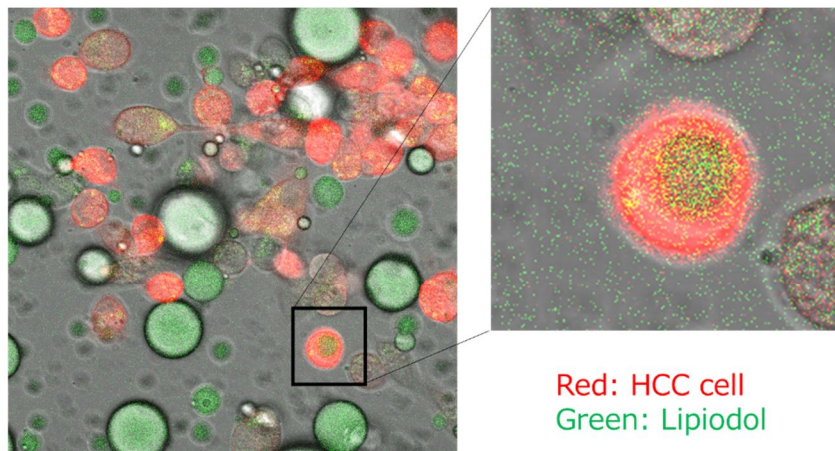


図1. 脂肪滴染色試薬を用いてリピオドールを緑色蛍光標識し、赤色蛍光タンパク (mCherry) を導入したラット肝細胞癌株 (N1S1) の培地に加え、共焦点顕微鏡で観察した。緑色のリピオドールが赤色のラット肝癌細胞内に取り込まれていることが確認できた。

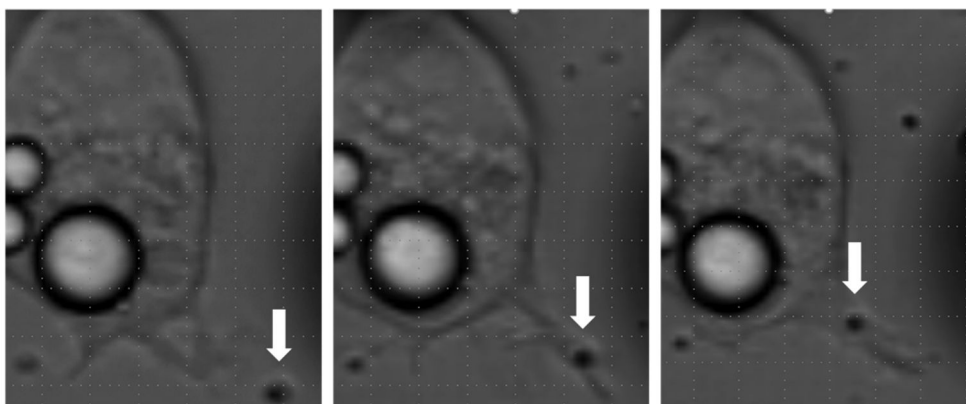


図2. 共焦点顕微鏡のタイムラプス画像では、肝癌細胞が仮足を出してリピオドール油滴 (矢印) を取り込んでいる様子が確認できた。

(2) リピオドールの核酸送達能に関する検討

緑色蛍光タンパク発現遺伝子を搭載したプラスミド溶液とリピオドールを用いた water-in-oil (W/O)エマルジョンをラット肝癌細胞の培地中に加えると、プラスミドが細胞内に到達し、実際に細胞内で緑色蛍光タンパク質が発現する現象が確認できた(図3)。一方、プラスミド溶液をそのままラット肝癌細胞の培地中に加えても、細胞内での緑色蛍光タンパク質の発現は確認できなかった。この結果より、核酸とリピオドールの W/O エマルジョンを用いることにより核酸を細胞質内に到達させ、細胞内で機能させることができることが示唆された。

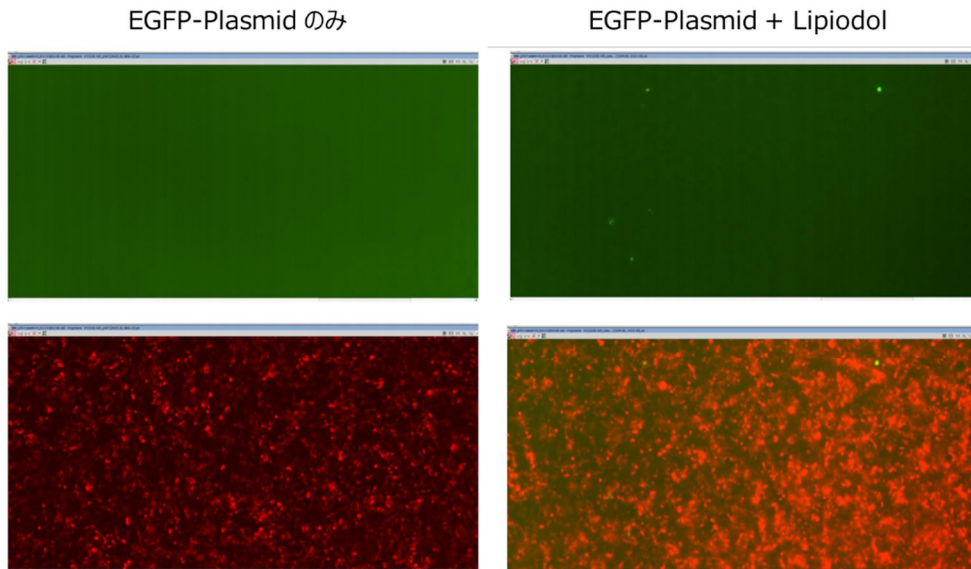


図3. 緑色蛍光タンパク発現遺伝子を搭載したプラスミド溶液とリピオドールを用いたwater-in-oil (W/O)エマルジョンをラット肝癌細胞の培地中に加えると、プラスミドが細胞内に到達し、実際に細胞内で緑色蛍光タンパク質が発現する現象が確認できた。一方、プラスミド溶液をそのままラット肝癌細胞の培地中に加えても、細胞内での緑色蛍光タンパク質の発現は確認できなかった。

(3) リピオドールの細胞内遺伝子導入効率向上を目指した検討

ラット肝癌細胞にルシフェラーゼ発現プラスミドを加え、ルシフェラーゼ活性を観察した。カチオン性ポリマーを付加したプラスミドとリピオドールの W/O エマルジョンを作成することで、ガン細胞への遺伝子導入効率を改善させることができた(図4)。

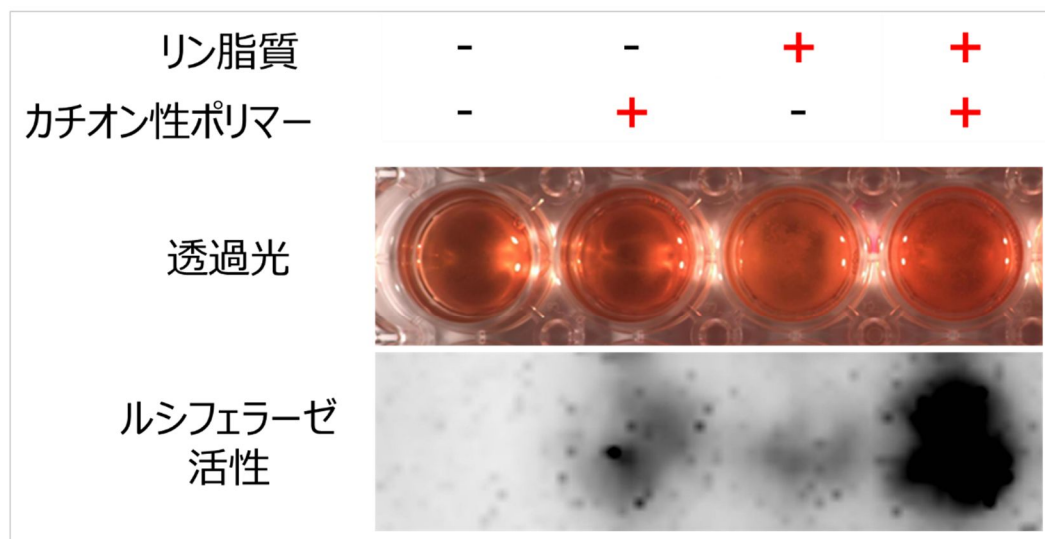


図4. カチオン性ポリマーを付加したプラスミドとリピオドールのW/Oエマルジョンを作成することで、ガン細胞への遺伝子導入効率を改善させることができた。

(4) 抗腫瘍効果の検討

低酸素誘導因子阻害 siRNA とリポドールの W/O エマルジョンを肝動注したラットでは、肝腫瘍のルシフェラーゼ活性が低下した (図 5)。

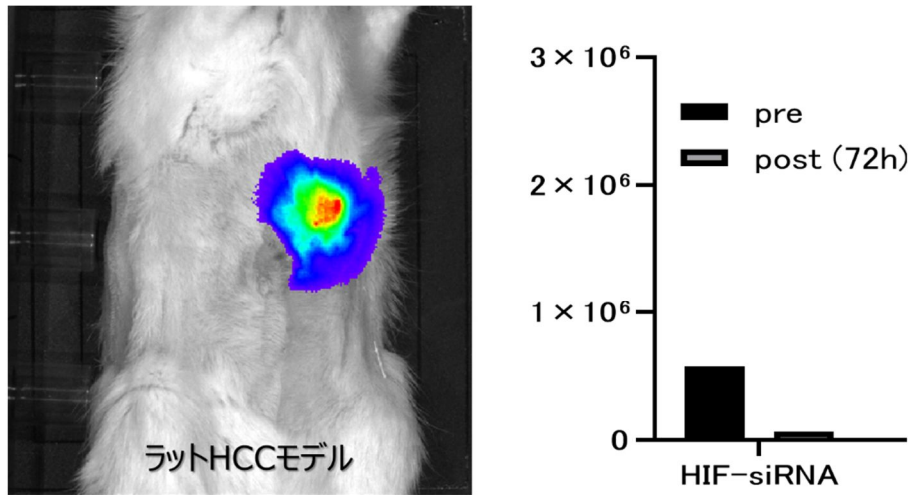


図5. 低酸素誘導因子阻害siRNAとリポドールのW/Oエマルジョンを肝動注したラットでは、肝腫瘍のルシフェラーゼ活性が低下した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kinota Naoya, Takaki Haruyuki, Kobayashi Kaoru, Kako Yasukazu, Kodama Hiroshi, Ogasawara Atsushi, Maruyama Mitsunari, Takahagi Motonori, Taniguchi Junichi, Moriyama Taiki, Yokoyama Hiroyuki, Komoto Hisashi, Kunimoto Ryo, Yoshimura Nahomi, Yamakado Koichiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Clinical Experience of Percutaneous Radiofrequency Ablation Using an arfa RF ABLATION SYSTEM in Various Organs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Interventional Radiology	6. 最初と最後の頁 93～99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.22575/interventionalradiology.2022-0012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Enomoto Hirayuki, Fujiwara Masayuki, Kono Hiroshi, Kako Yasukazu, Takahagi Motonori, Taniguchi Junichi, Ishikawa Eri, Ikeda Naoto, Takashima Tomoyuki, Yuri Yukihiisa, Aizawa Nobuhiro, Nakano Ryota, Shiomi Hideyuki, Nishimura Takashi, Hirota Seiichi, Yamakado Koichiro, Iijima Hiroko	4. 巻 13
2. 論文標題 Metastasis of Hepatocellular Carcinoma in the Pouch of Douglas Successfully Treated by Radiation Therapy: A Case Report	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Life	6. 最初と最後の頁 225～225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/life13010225	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Taniguchi Junichi, Takaki Haruyuki, Sugino Yuichi, Yoshimura Nahomi, Kunimoto Ryo, Yokoyama Hiroyuki, Moriyama Taiki, Kinota Naoya, Inao Yoshie, Maruyama Mitsunari, Ogasawara Atsushi, Kodama Hiroshi, Kako Yasukazu, Kobayashi Kaoru, Yamakado Koichiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Use of Microballoon Catheter in Transarterial Ethanol Embolization of Renal Angiomyolipoma: A Retrospective Comparative Study with Historical Control?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Interventional Radiology	6. 最初と最後の頁 9～16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.22575/interventionalradiology.2020-0036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kinota Naoya, Kodama Hiroshi, Moriyama Taiki, Taniguchi Junichi, Maruyama Mitsunari, Ogasawara Atsushi, Kako Yasukazu, Kobayashi Kaoru, Takaki Haruyuki, Shibata Akio, Minagawa Kyoko, Takeshima Yasuhiro, Yamakado Koichiro	4. 巻 7
2. 論文標題 Lymphangiography as a Treatment for Refractory Congenital Chylothorax Due to RASopathies: A Report of Two Cases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Interventional Radiology	6. 最初と最後の頁 17~20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.22575/interventionalradiology.2021-0014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Moriyama Taiki, Kodama Hiroshi, Taniguchi Junichi, Kinota Naoya, Maruyama Mitsunari, Ogasawara Atsushi, Kako Yasukazu, Takaki Haruyuki, Kobayashi Kaoru, Nitta Sho, Hasegawa Kana, Shirai Kunihiro, Takimoto Yumi, Sugiyama Yukiko, Tsubamoto Hiroshi, Yamakado Koichiro	4. 巻 6
2. 論文標題 Successful Embolization of Collaterals from the Round Ligament Artery during Uterine Artery Embolization for Traumatic Uterine Leiomyoma Rupture: A Case Report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Interventional Radiology	6. 最初と最後の頁 108~111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.22575/interventionalradiology.2021-0003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Futani Hiroyuki, Takaki Haruyuki, Sawai Tatsuo, Taniguchi Junichi, Kako Yasukazu, Ide Yoshi-Hiro, Yamakado Koichiro, Tachibana Toshiya	4. 巻 100
2. 論文標題 Long-term survival following radiofrequency ablation of lung metastases in an elderly patient with calcaneal osteosarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e26681~e26681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000026681	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 谷口純一、高木治行、吉村奈穂美、横山裕至、森山太輝、河本悠、高萩基仁、小笠原篤、児玉大志、加古泰一、小林薫、麩谷博之、山門亨一郎
2. 発表標題 有痛性骨軟部腫瘍に対する球状塞栓物質を用いた塞栓術
3. 学会等名 第51回日本IVR学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷口純一、高木治行、川口貴之、高萩基仁、小笠原篤、児玉大志、加古泰一、小林薫、麩谷博之、山門亨一郎。
2. 発表標題 骨軟部腫瘍に対する経皮的凍結治療
3. 学会等名 第71回中部・第72回関西IVR研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Taniguchi J, Takaki H, Moriyama T, Takahagi M, Ogasawara A, Kodama H, Kako Y, Kobayashi K, Futani H, Yamakado K.
2. 発表標題 Percutaneous cryoablation for the treatment of bone and soft tissue tumors: Initial experience.
3. 学会等名 7th Asian conference on Tumor ablation ACTA 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷口純一、高木治行、吉村奈穂美、國元亮、森山太輝、木野田直也、丸山光也、小笠原篤、児玉大志、加古泰一、小林薫、山門亨一郎。
2. 発表標題 骨軟部腫瘍に対する経皮的凍結治療の初期経験。
3. 学会等名 第50回日本IVR学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 谷口純一、高木治行、古川佳孝、片岡幸三、山田祐介、兼松明弘、山本新吾、山門亨一郎。
2. 発表標題 術後腹腔内尿漏に足してNBCAで瘻孔塞栓術を施行した1例。
3. 学会等名 第70回関西Interventional Radiology研究会
4. 発表年 2022年

〔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
研究 分担者	山門 亨一郎 (Yamakado Koichiro) (20263022)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	
研究 分担者	高木 治行 (Takaki Haruyuki) (30378377)	兵庫医科大学・医学部・准教授 (34519)	
研究 分担者	平田 豊 (Hirata Yutaka) (10441247)	兵庫医科大学・医学部・講師 (34519)	

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
---------	---------