

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861741

研究課題名(和文) ナノゲルを用いた口腔癌の新規免疫療法の開発

研究課題名(英文) Development of cancer immunotherapy using nanogel

研究代表者

足立 哲也 (ADACHI, TETSUYA)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：10613573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：特異的な遺伝子の発現を抑制することのできるsiRNAは癌治療において効果的方法であると考えられている。しかしながらsiRNAは生体内では、不安定であるため、生体内で安全に効率良く運ぶには優れた担体の開発が必須であると考えられる。本報では、VEGF 特異的siRNAとCH-CA-Spe nanogelを担癌マウスの腫瘍内に投与することで、新心血管形成とがん増殖を効果的に抑制し、抑制性生ミエロイド細胞の増殖を抑制することを示した。

研究成果の概要(英文)：RNAi (RNA interference) enables potent and specific gene silencing, potentially offering useful means for treatment of cancers. However, safe and efficient drug delivery systems (DDS) that are appropriate for tumor microenvironment delivery of siRNA have rarely been established, hindering clinical application of RNAi technology to cancer therapy. We develop cholesterol-bearing cycloamylose with spermine group (CH-CA-Spe), and shown its validity as a novel DDS for siRNA.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ナノゲル

1. 研究開始当初の背景

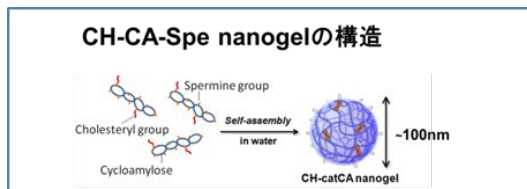
癌細胞は腫瘍微小環境を形成し、増殖する。腫瘍が形成する微小環境はがん細胞、線維芽細胞、血管、リンパ管で構成され、毛細血管が豊富で脆弱であるため抗癌剤の効果が十分に得ることができないとされている。多くの癌細胞が産生する血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor ; VEGF は、血管新生を促すことで腫瘍微小環境を形成する。また、VEGF はミエロイド由来抑制細胞 (myeloid-derived suppressor cell ; MDSC) を癌局所への集簇を促し、抗腫瘍免疫を抑制する。VEGF は血管新生だけでなく、癌細胞の増殖、抗腫瘍免疫を抑制する MDSC の分化誘導、増殖に関わる重要な因子である。そのため、VEGF を制御することで、腫瘍微小環境を改変し、抗腫瘍免疫の抑制を解除することが期待できる。近年、VEGF を標的とした分子標的薬 (モノクローナル抗体・シグナル伝達阻害薬) の登場により、癌の治療成績が向上している。しかしながら、それらは、全身投与でありその標的が癌細胞特異的でないため、出血・血栓症・消化管穿孔、創傷治癒遅延等の副作用が出現する。そのため、腫瘍微小環境で VEGF の産生を制御する、安全性の高いドラッグデリバリーシステムの開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、これらの問題を解決するため、siRNA と担体ナノゲルを用い、腫瘍微小環境で VEGF を抑制することで、抗腫瘍免疫を増強する新規の癌免疫療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

我々は、特異的な遺伝子の発現を抑制することのできる (small interfering RNA) に着目した。しかしながら siRNA は生体内では、不安定であるため、生体内で安全に効率良く運ぶには優れた担体の開発が必須であると考えられる。本研究では、VEGF 特異的 siRNA とシクロアミロース (多糖) にスペルミン基とコレステロール基を付加したナノゲル



(CH-CA-Spe nanogel) の複合体を担癌マウスの腫瘍内に投与し、抗腫瘍効果と腫瘍免疫への影響について検討した。

4. 研究成果

実験には、VEGF を高発現することで知られているマウス腎細胞癌の細胞株 Renca 細胞を

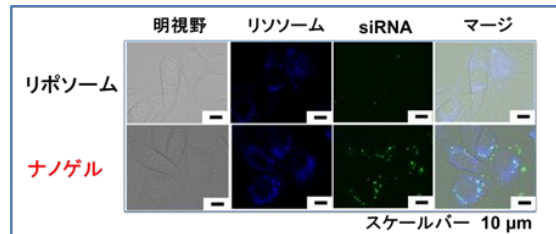


図1. *in vitro*におけるナノゲル/siRNA複合体の細胞内動態

使用した。Renca 細胞に蛍光標識された FAM-siRNA とナノゲルの複合体を添加し、siRNA の細胞内局在を共焦点レーザー顕微鏡

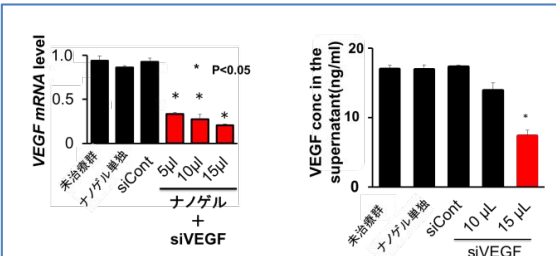


図2. ナノゲル/siVEGFはVEGF mRNAの発現を抑制する。

にて観察した(図 1)。ナノキャリアを用いた siRNA では細胞外からエンドソームにより取り込まれた物質がリソソームと融合し、分解

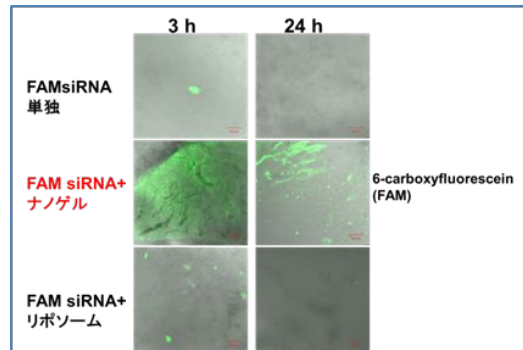


図3. ナノゲル/siVEGFの組織内動態

され、siRNA が細胞質基質に放出されることで、標的遺伝子がサイレンシングされる。siRNA のリソソームの局在を可視化することにより、効率的に細胞質基質に siRNA が送達されたかを評価することができる。FAM-siRNA とナノゲルの複合体群は、一般的な担体であるカチオン性リボソーム群と比

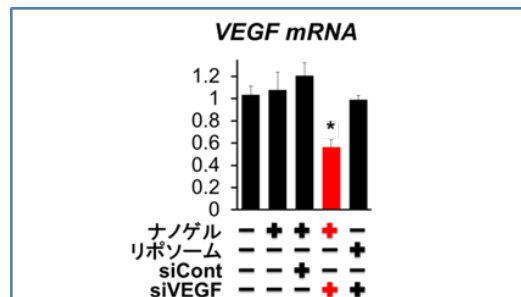


図4. ナノゲル/siVEGFの腫瘍内投与は、腫瘍組織の VEGF mRNAの発現を抑制する。

較し、リソソームでの FAM-siRNA は増加して

いた。これにより結果は siRNA/ナノゲル複合体は、エンドソーム/リソソーム経路を経て、

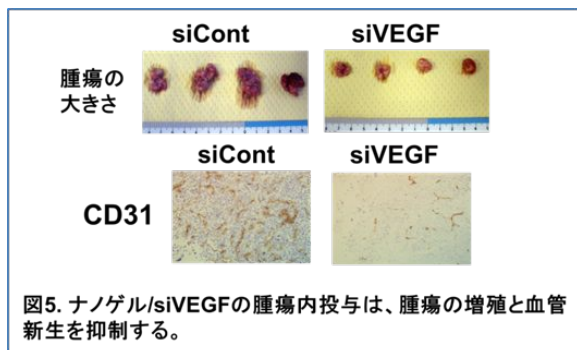


図5. ナノゲル/siVEGFの腫瘍内投与は、腫瘍の増殖と血管新生を抑制する。

効率的に siRNA を細胞質基質に放出することが明らかとなった。さらに、siVEGF/ナノゲル複合体を Renca 細胞の培養系に添加し、リアルタイム PCR で VEGF 遺伝子の発現を確認し、培養上清中の VEGF の産生を ELISA で測定した。解析の結果、siVEGF/ナノゲル複合体は、VEGF 遺伝子レベルとタンパクレベルの両方で有意に抑制した(図 2)。次に担癌マウスモデルの腫瘍内に FITC-siRNA/ナノゲル複合体を投与したとこ

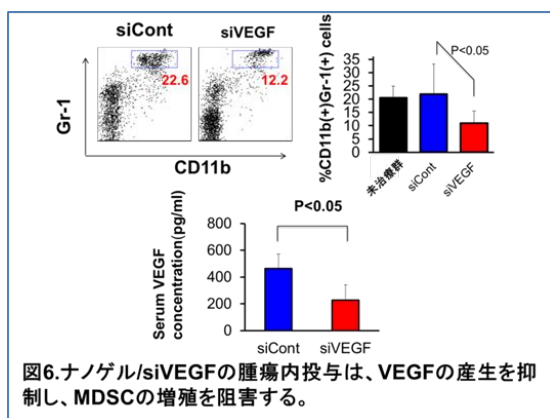


図6. ナノゲル/siVEGFの腫瘍内投与は、VEGFの産生を抑制し、MDSCの増殖を阻害する。

ろ、腫瘍組織内に FITC-siRNA が移行を確認した(図 3)。また、siVEGF ナノゲル複合体を腫瘍組織内に投与したところ、標的遺伝子である VEGF 発現の抑制が認められた(図 4)。さらに、4 日毎合計 5 回の連続投与によって、皮下移植腫瘍の増殖と血管新生が有意に抑制された(図 5)。

VEGF は、腫瘍組織のみならず循環血中に増加する MDSC を分化誘導し、抗腫瘍免疫を抑制することが知られている。そこで、腫瘍組織からの VEGF 産生の抑制が MDSC の誘導を阻止できるか否かをフローサイトメトリーと ELISA で確認した。siVEGF/ナノゲル複合体の腫瘍内投与は、コントロール群に比べて有意に MDSC の出現を抑制した。同時に、血清中の VEGF を ELISA で測定したところ、siVEGF/ナノゲル複合体投与群では、コントロール群と比較し VEGF の産生が有意に抑制された(図 6)。siVEGF/ナノゲル複合体の投与により、脾臓中の免疫細胞が産生する IL-17 が有意に低下していることが確認された。癌組織に浸潤した T 細胞は、IL-17 を産生することで腫瘍微小環境の血管新生を促進すること

が報告されている。

以上の結果より、siVEGF/ナノゲル複合体の腫瘍内投与は siVEGF を腫瘍細胞に送達し、腫瘍組織の VEGF-発現を有意に抑制し、腫瘍増殖と血管新生の抑制と腫瘍増殖に伴い出現する MDSC の増殖を抑制することが明らかとなった。多糖由来のナノゲルは、リポソームやゼラチン・コラーゲン(他の動物種由来)などの既存の担体と比較し、優れた徐放性、生体内安定性を有し、臨床治験が行われていることから安全性も高いと考えられる。本研究の結果から、抗 VEGF 療法と免疫療併用という新しい癌免疫療法の開発に繋がると考えられた。

## 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 6 件)

1: "Silicon Nitride Bioceramics Induce Chemically Driven Lysis in Porphyromonas Gingivalis."

Pezzotti G, Bock RM, McEntire BJ, Jones E, Boffelli M, Zhu W, Baggio G, Boschetto F, Puppulin L, Adachi T, Yamamoto T, Kanamura N, Marunaka Y, Bal BS.

Langmuir. 査読あり 29:3024-35. 2016 .

2: "Biomaterial force induces the growth factor production in human periodontal ligament-derived cells."

Ichioka H, Yamamoto T, Yamamoto K, Honjo K, Adachi T, Oseko F, Mazda O, Kanamura N, Kita M.

Odontology. 査読あり 104:27-34. 2016.

3. "Vibrational algorithms for quantitative crystallographic analyses of hydroxyapatite-based biomaterials:II, Application to decayed human teeth."

Adachi T, Pezzotti G, Yamamoto T, Ichioka H, Boffelli M, Zhu W, Kanamura N.

Analytical and Bioanalytical Chemistry. 査読あり 407:3343-56. 2015

4. "Vibrational algorithms for quantitative crystallographic analyses of hydroxyapatite-based biomaterials:I, Theoretical foundations."

Pezzotti G, Zhu W, Boffelli M, Adachi T, Ichioka H, Yamamoto T, Marunaka Y, Kanamura N.

Analytical and Bioanalytical Chemistry. 査読あり 407:3325-42. 2015

5."Evaluation of a dental pulp-derived cell sheet cultured on amniotic membrane substrate."

Honjo K, Yamamoto T, Adachi T, Amemiya T, Kita M, Kanamura N, and Mazda O.  
Bio-Medical Materials and Engineering.  
査読あり 1:203-12. 2015.2014

6."Cycloamylose-nanogel drug delivery system-mediated intratumor silencing of the vascular endothelial growth factor regulates neovascularization in tumor microenvironment. "

Fujii H, Shin-Ya M, Takeda S, Hashimoto Y, Mukai SA, Sawada S, Adachi T, Akiyoshi K, Miki T, Mazda O.

Cancer Science. 査読あり 105:1616-25.2014

〔学会発表〕(計 4 件)

1.Adachi T, Yamamoto T, Ichioka H, Amemiya T, Boffelli M, McEntire BJ, Bal BS , Kanamura N, Pezzotti G

"Surface modulation of silicon nitride ceramics for dental implant. "

The 45th American Association for Dental Research / 40th Canadian Association for Dental Research Annual Meeting & Exhibition, Los Angeles, March 16-19.2016

2: 足立哲也、山本俊郎、市岡宏顕、Marco Boffelli、Wenliang Zhu、金村成智、Giuseppe Pezzotti

「先制医療の実現化へ向けた光学的齲蝕診断法の開発」

第143回日本歯科保存学会年度秋季学術大会、文京シビックセンター、東京、2015年11月12日～13日

3: 足立哲也、山本俊郎、市岡宏顕、Wenliang Zhu、Giuseppe Pezzotti、金村成智

「ラマン分光分析を用いた齲蝕の新規診断法の開発」

第15回日本抗加齢医学会総会、福岡国際会議場、福岡、2015年5月29日～31日

4. Adachi T , Yamamoto T, Honjo K, Ichioka H, Yamamoto K, Oseko F, Kita M, Kanamura N.

"Reduction of oxidative stress by Astaxanthin in lipopolysaccharide-treated human gingival fibroblasts. "

93rd General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, Boston, March 11-14, 2015

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

足立 哲也 (ADACHI ,Tetsuya)

京都府立医科大学, 医学部附属病院

専攻医

研究者番号:10613573