

平成 21 年 5 月 13 日現在

研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2007 ~ 2008
課題番号：	19591520
研究課題名(和文)	siRNAとデコイベクターによるリンパ管新生因子機能喪失と乳癌リンパ節転移阻止
研究課題名(英文)	Inhibition of lymph node metastasis of mammary cancer due to functional loss of lymphangiogenesis factors by siRNA and/or decoy vectors
研究代表者	
	柴田 雅朗 (Shibata Masa-Aki)
	大阪医科大学・医学部・准教授
	研究者番号： 10319543

研究成果の概要：VEGF-C siRNA 発現ベクターは、マウス乳癌のリンパ節・肺転移に対して、強力な抑制効果を発揮した。VEGF-D siRNA や VEGFR-2 デコイを組み込んだベクターでは有意な転移抑制効果は示されなかった。また、VEGF-C siRNA と VEGFR-2 デコイの複合群において観察された抗腫瘍効果は VEGF-C siRNA に起因するもので、VEGFR-2 デコイを複合することによる加算的效果は示されなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	2,500,000	750,000	3,250,000
20年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：乳腺外科学、癌遺伝子治療

1. 研究開始当初の背景

癌の終末像は転移による死である。乳癌の死因においても殆どはリンパ節、肺などへの転移によるものであり、癌転移を克服する事こそが延命効果につながると考えられ、癌治療の最大の課題と言える。癌細胞はリンパ管を介したリンパ行性転移や血管を介した血行性転移、あるいは近隣

組織への直接的浸潤がある。癌細胞の浸潤・転移を担うシグナルを遮断出来れば、転移の抑制につながり、延命をもたらすものと考えられる。従って、乳癌の転移抑制に対する低毒性の治療法あるいは化学予防法の開発は急務である。

Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C) は強力なリンパ管新生因子であり、

正常組織では大腸、乳管、前立腺、甲状腺、卵巣、心筋および骨格筋で発現が認められている。しかしながら、乳癌を含む様々な悪性腫瘍においても、腫瘍細胞自身が VEGF-C を過剰に発現している。乳癌患者において、VEGF-C の過剰発現と予後不良やリンパ節転移には強い相関が示されている。また、実験動物を用いた研究においても、VEGF-C の過剰発現がリンパ節転移に対して促進的に作用することが報告されている。VEGF-D もリンパ管新生因子であり、これらの事実は VEGF-C や VEGF-D が転移阻止に対する治療的戦略のターゲットになり得ることを示唆している。

そこで、VEGF-C と VEGF-D の siRNA による機能喪失を生じさせ、またあるいは VEGF-A および VEGF-C の受容体である VEGFR-2 をデコイベクター（おとりの VEGFR-2 受容体で機能しない）により機能低下させ、乳癌のリンパ節転移の抑制を試みた。更にはこれらのベクターの複合治療群も設け、加算的・相乗的效果を期待し、治療効果の更なる向上を狙った。

2. 研究の目的

ヒト乳癌はリンパ節、肺、肝、骨などに転移し、腫瘍サイズとの間には強い正の相関があり、生存率とは負の相関がある。その中でもリンパ節転移は最も予後の悪い因子である。最近、リンパ管内皮に特異的に発現する VEGFR-3 とそのリガンドである VEGF-C および VEGF-D（いずれも腫瘍細胞が産生）により腫瘍内のリンパ管新生が誘導されることが証明され、次いで VEGF-C および VEGF-D が乳癌のリンパ節転移に対して促進的に作用することが報告された。そこで、VEGF-C と VEGF-D の siRNA による機能喪失を生じさせる。あるいは、VEGF-A および VEGF-C

の受容体である VEGFR-2 をデコイベクター（おとりの VEGFR-2 受容体で機能しない）により機能低下させ、乳癌のリンパ節転移の抑制を試みた。更にはこれらのベクターの複合治療群も設け、加算的・相乗的效果を期待し、治療効果の更なる向上を狙った。

3. 研究の方法

VEGF-C および VEGF-D に対する異なった配列を標的とするそれぞれの 4 種類の 21 塩基の 2 重鎖 siRNA を合成した。Negative siRNA control はいかなる mRNA にも相補性を示さない 21 塩基の 2 重鎖 siRNA で 3' 末端が Cy5 で標識されているものを用いた (Qiagen 社)。24-well plate を用いて、1 well 当たり 8×10^4 個の BJMC3879 細胞 (マウス乳癌細胞) を撒き、5nM と 25nM の Negative siRNA (Cy5 標識) を遺伝子導入試薬 HiPerFect (Qiagen 社) にて siRNA を細胞に導入した。遺伝子導入後、24 時間後の遺伝子導入効率を Cy5 の赤蛍光を指標に計測した結果、5nM では 56%、25 nM では 73% の導入効率を示した。次に、VEGF-C 並びに VEGF-D siRNA を 25nM で遺伝子導入し、24 時間後に細胞から RNA を抽出し、real-time RT-PCR (Roche 社) により、ノックダウン効率を GAPDH の相対値による $\Delta\Delta CT$ 法により算出した。その結果、最大のノックダウンを示した配列は、Control に比較して、VEGF-C siRNA では 66% ノックダウン、VEGF-D siRNA では 51% ノックダウンであった。その配列の siRNA と Negative siRNA を pBasi siRNA 発現ベクターに組み込み、次の動物実験に用いた。VEGFR-2 デコイベクターについては InvivoGen 社のものを使用した。

BJMC3879Luc2 乳癌細胞を BALB/c マウス雌に移植し、週 1 回、腫瘍内にベクター (Control, VEGF-C siRNA, VEGFR2 デコイおよび両者の複合、VEGF-D siRNA) をエレクトロポレーションによる遺伝子導入 (Neppa Gene 社) を実施し、実験終了の 7 週まで実施した。エレクトロポレーションの遺伝子導入条件は、100 Volt、1 パルス当たり 20 msec で 8 回の反復パルスであった。動物の体重および腫瘍径を毎週、計測した。実験終了後、全生存動物を屠殺・剖検し、病理組織学的標本を作製し、転移の有無を病理組織学的に検索した。また、血管内皮のマーカーである CD31 を指標として、更にリンパ管内皮のマーカーである Podoplanin を指標として、それらの腫瘍組織内での密度を算定した。

4. 研究成果

ノックダウン効率の高い VEGF-C と VEGF-D に対する siRNA 配列を特定した。最大のノックダウンを示した配列は、Control に比較して、VEGF-D siRNA では 51%、VEGF-C siRNA では 66% のノックダウンを示した。それらの配列の siRNA を siRNA 発現ベクターに組み込み、動物実験を行った。また、VEGFR-2 デコイベクター単独と VEGF-C siRNA との複合群も設けた。その結果、腫瘍体積では実験開始の 3 ないし 4 週より 6 週まで VEGF-C siRNA 群、VEGF-C siRNA と VEGFR-2 デコイとの複合群および VEGF-D siRNA 群で、対照群に比較して、有意な低下が観察された。リンパ節転移および肺転移では、VEGF-C siRNA 群のみに有意な抑制が示され、複合群では低下傾向のみを認めた。1 匹当たりの転移臓器の総数でみた場合においても、同様の抑制傾向が示された。腫瘍内微小血管密度は VEGF-C siRNA

群と複合群で有意な抑制を示した。腫瘍組織のリンパ管内へ頻りに癌細胞が浸潤しており、これら侵襲を受けたリンパ管の数を定量解析した結果、これらの群で有意差は示されなかったものの、抑制傾向が示された。

以上、VEGF-C siRNA 発現ベクターは、マウス乳癌のリンパ節・肺転移に対して、強力な抑制効果を発揮した。VEGF-D siRNA や VEGFR-2 デコイを組み込んだベクターでは有意な転移抑制効果は示されなかった。また、VEGF-C siRNA と VEGFR2 デコイの複合群において観察された抗腫瘍効果は VEGF-C siRNA に起因するもので、VEGFR2 デコイを複合することによる加算的效果は示されなかった。

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 2 件)

- ① Shibata, M-A., Morimoto, J., Shibata, E. and Otsuki, Y. Combination therapy with short interfering RNA vector against VEGF-C and VEGF-A suppresses lymph node and lung metastasis in a mouse immunocompetent mammary cancer model. *Cancer Gene Ther.*, 15, 776-786 (2008). 査読有り
- ② 柴田雅朗、森本純司、赤松香奈子、大槻勝紀. リンパ管新生 (VEGF-C) に対する siRNA を用いたマウス乳癌転移の抑制ならびに IL-12 遺伝子との複合治療. 乳癌基礎研究. 17 巻, 49-52, 2008 年.

査読無し

〔学会発表〕（計3件）

- ① 柴田雅朗ほか. VEGF-CないしはVEGF-Aを標的とするsiRNAベクター複合投与によるマウス乳癌モデルでのリンパ節・肺転移の抑制. 第68回日本癌学会総会, 2009年10月1日横浜.
- ② 柴田雅朗ほか. VEGF-C, VEGF-DおよびVEGF-A siRNA発現ベクターを用いた高転移性マウス乳癌モデルに対する癌遺伝子治療. 第33回日本リンパ学会, 2009年7月18日大阪.
- ③ 柴田雅朗ほか. Combination therapy with siRNA vectors against VEGF-C and VEGF-A suppresses lymph node and lung metastasis in a mouse cancer model. 第15回日本遺伝子治療学会, 2009年7月9日大阪.

〔その他〕

ホームページ

<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/an1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 雅朗 (Shibata Masa-Aki)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10319543

(2) 研究分担者

森本 純司 (Morimoto Junji)
大阪医科大学・医学部・講師
研究者番号：90145889