

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21791573

研究課題名（和文） siRNA を利用した子宮体癌治療と分子イメージングによるその効果判定

研究課題名（英文） Antitumor effect of siRNA on endometrial cancer

研究代表者

矢野倉 恵 (YANOKURA MEGUMI)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：20433732

研究成果の概要（和文）：

HEC-1B をヌードマウスの皮下に移植後、3 週間で腫瘍の形成を確認した。その日から各薬剤の投与を開始し、12 日目には Aurora-A siRNA+パクリタキセル群は他の群に比し有意に腫瘍径の縮小が認められた ($P<0.05$)。さらに、GFP の蛍光シグナルも著明に減少することが確認された。Aurora-A siRNA は、子宮体癌においてパクリタキセルの感受性を特異的に増強させる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Tumor development occurred 3 weeks after transplantation of HEC-1B cells in nude mice. Drugs were administered on that day and thereafter. The tumor diameter significantly decreased in mice treated with paclitaxel + Aurora-A siRNA compared with the results for other treatments ($P<0.05$). The GFP fluorescence signal also markedly decreased after treatment with paclitaxel + Aurora-A siRNA.

Aurora-A siRNA may have the potential to increase the sensitivity of endometrial tumors to treatment with paclitaxel.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	0	0	0
2011 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：siRNA、子宮体癌

1. 研究開始当初の背景

我々は、子宮体癌において細胞周期 M 期チェックポイント遺伝子である *CHFR* (*check point with forkhead-associated and ring finger*) または *Aurora-A* の過剰発現とタキサン製剤に対する感受性との関連を明らかとした。In vitro において、*CHFR* または *Aurora-A* が過剰発現しているヒト子宮体癌細胞株は、発現していない細胞株に比し、タ

キサン製剤に対する感受性が低い事実を突き止めた。*CHFR* または *Aurora-A* の過剰発現細胞株に各遺伝子の siRNA (small interfering RNA) を導入し、遺伝子発現抑制前後の各種抗癌剤に対する感受性の変化を CD-DST (collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test) 法にて測定したところ、タキサン製剤に対する感受性が特異的に増強した (Banno K, Yanokura M, et al. Int J Oncol. 2007.)。

siRNA は、2001 年に Tuschl らが高等生物をもちいた発表をして以来、急速に広まり、「PCR 以来の画期的技術」と言われている。siRNA は、これまでのアンチセンス技術に比べ非常に効率が高く、特異性の面からも優れている。また、少量の siRNA で確実な効果を生むため、導入細胞に対する毒性が生じにくいという特徴を有する。白血病細胞株の薬剤耐性遺伝子を siRNA で特異的に抑制することで、抗癌剤に対する感受性を回復させるなど、siRNA の有用性はすでに癌の領域でも示されている。しかし、siRNA をヒトの癌治療に応用するには、現在いくつかの課題が残されている。ひとつは、いかにして生体内で siRNA の安定性を図るかという点である。さらに重要なことは、いかに効率的に、しかも非特異的な生体反応を惹起せずに siRNA を癌細胞にデリバリーするかという点である。siRNA のデリバリー法には、動物個体を用いたハイドロダイナミックス導入法、各種ウイルスベクターを用いた導入法が報告されているが、臨床応用可能な siRNA のデリバリー法はいまだ確立されていない。

今回我々は、in vivo における siRNA のデリバリー手段としてアテロコラーゲン着目にした。アテロコラーゲンは、ウシの真皮から抽出した型コラーゲンを原料とし、ペプシン処理によって抗原性を示すテロペプチドと呼ばれるアミノ酸領域を消化切断して精製するため、生体へ投与しても免疫応答を惹起したり、毒性を示す可能性は極めて低いと推測されている。さらに、siRNA とアテロコラーゲンが複合体を形成するため、siRNA をヌクレアーゼによる分解から保護し、長時間の効果持続が期待される。また、アテロコラーゲンの性質として、低温時(4)では液状であるのに対し、生体内(約37)ではゲル化するという性質を有している。このため、生体内への投与後、すみやかにゲル化し局所に長時間留まることにより、siRNA の効果が効率的に発揮される。アテロコラーゲンの有用性は、近年、他臓器癌でも示されてきた(Nozawa H et al. Cancer Sci. 2006; 97(10): 1115-24.)

さらに近年、腫瘍研究分野において、蛍光タンパクを用いたイメージング技術が発達してきた。蛍光タンパクは、これまで見えなかった腫瘍の様々な進展過程を可視化することに成功した。しかも、in vivo イメージングは、いかなる侵襲的処置の必要もなく生きている動物の内部で増殖している腫瘍を観察することができるという大きなメリットがある。また、治療効果の追跡にイメージング技術を応用すれば、経時的に同一個体での評価が可能であり、各時点でマウスを屠殺するという従来の方法と根本的に異なる解析技術といえる。

そこで今回我々は、子宮体癌に対する siRNA を用いた核酸医療の確立を目指し、蛍光タンパクを使った全身イメージングによる腫瘍の観察により、これまでの研究では明らかにできなかった siRNA の動態や正常組織への影響を明らかにするとともに、子宮体癌の siRNA 治療の抗腫瘍効果評価や再発・転移の早期発見など、臨床応用に結びつけるための基礎的研究を実施する。

2. 研究の目的

(1) In vivo における CHFR および Aurora-A siRNA のアテロコラーゲン DDS による子宮体癌に対するタキサン製剤の併用効果の解析

これまでの研究により明らかとなった、in vitro における CHFR または Aurora-A の過剰発現とタキサン製剤に対する感受性との関連を in vivo でも解析する。タキサン製剤抵抗性のヒト子宮体癌由来培養細胞をヌードマウスの皮下に注射し、腫瘍を形成させる。CHFR または Aurora-A siRNA/アテロコラーゲン複合体をマウスに形成した腫瘍に局所投与、タキサン製剤(パクリタキセル)を腹腔内投与にて併用する。その際の抗腫瘍効果を腫瘍サイズの経時変化を指標として測定することにより、各遺伝子 siRNA/アテロコラーゲン複合体とタキサン製剤との併用効果を検討する。

(2) 全身イメージングによる siRNA の動態解析

GFP (green fluorescent protein) 発現ヒト子宮体癌細胞株を作成し、ヌードマウスの皮下に移植する。十分な大きさの皮下腫瘍が形成された後、GFP siRNA をアテロコラーゲンをを用いてマウス尾静脈より全身性にデリバリーさせ、分子イメージングで GFP のシグナルを検出し、GFP 発現抑制効果を検討する。さらに、RFP (red fluorescent protein) 標識 siRNA を同様にマウスの尾静脈より全身にデリバリーさせ、GFP および RFP のシグナルを検出することにより、siRNA の腫瘍部への集積性、正常部への影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) In vivo の M 期チェックポイント遺伝子 siRNA/アテロコラーゲン複合体のデリバリー効果およびタキサン製剤との併用効果の検討

タキサン製剤抵抗性のヒト子宮体癌由来培養細胞をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍を形成させる。形成された皮下腫瘍に siRNA/アテロコラーゲン複合体を局所投与する。まず、蛍光標識付きのコントロール

siRNA を使用し、投与後、経時的に腫瘍を摘出し観察することで、in vivo における腫瘍内への siRNA の到達度および効果持続時間を検討する。

次に、マウスに移植した皮下腫瘍の直径が約 5mm に達したら、CHFR または Aurora-A siRNA/アテロコラーゲン複合体 (100nM) を局所投与し、48 時間後にパクリタキセル (5mg/kg) を腹腔内投与にて併用する。これを 1クールとし、3~6クール行い、その際の抗腫瘍効果を経時的に腫瘍サイズを測定することにより、M 期チェックポイント遺伝子 siRNA/アテロコラーゲン複合体とタキサン製剤との併用効果を検討する。また、摘出した腫瘍を Ki-67、TUNEL、CHFR または Aurora-A 抗体を用いて免疫染色を行い、細胞増殖能の変化、アポトーシス誘導性および siRNA の作用を確認する。

(2)ヌードマウスを用いた全身イメージングの条件検討

蛍光タンパクを用いた分子イメージングは、得られるシグナルが明るい、ルシフェラーゼのような基質が不要である、多様な色彩が使用できるといったメリットを有する解析法である。蛍光タンパクである GFP は、安定して腫瘍細胞に組み込むことができ、RFP などを併用すれば、二色イメージングが可能である。実際、マウスの臓器にアデノウイルスベクターを使用して GFP を導入し、イメージングにより可視化することに成功している (Yang M et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97: 12278-82.)。一方、GFP を発現した腫瘍細胞をマウスの皮下に移植したが、1週間経過してもイメージングで検出できなかったとの報告もあり、蛍光タンパクによるイメージング技術は完成されているとは言い難い (Choy G et al. Biotechniques. 2003; 35: 1022-26)。そこで我々は、GFP によるヒト子宮体癌細胞のイメージングに際し、十分な光量、コントラスト、倍率など、様々な条件を検討する。

In vitro において、GFP 発現ベクターをヒト子宮体癌細胞株に導入した際、薬剤耐性遺伝子を利用した selection により発現ベクターが組み込まれた細胞のみを回収する。さらにフローサイトメトリーにより GFP 高発現株を作成し、イメージングにより十分な発色が検出できるか確認する。

In vivo においては、ヌードマウスの自家蛍光を抑制するためクロロフィルを除いた専用飼料を用いる。さらに未処置状態でイメージングし、自家蛍光の度合、励起波長、コントラスト、画像処理について検討し、in vivo での最適なイメージング条件を見つける。

(3)In vivo における分子イメージングによる

siRNA の動態解析

GFP 発現ヒト子宮体癌細胞株を作成し、ヌードマウスの皮下に移植する。十分な大きさの腫瘍が形成された後、GFP siRNA をアテロコラーゲンを用いてマウス尾静脈より全身にデリバリーさせ、イメージングで GFP のシグナルを検出し、GFP 発現抑制効果を検討する。

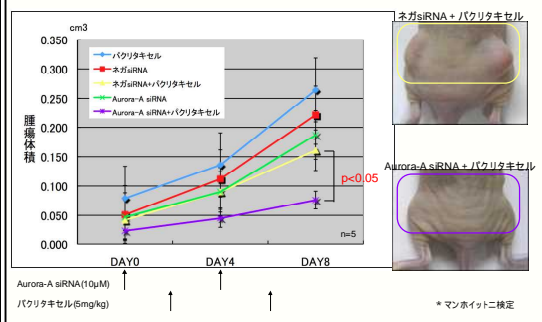
次に、GFP 発現ヒト子宮体癌細胞株を移植したヌードマウスに対し、RFP 標識付 CHFR または Aurora-A siRNA/アテロコラーゲン複合体を同様にマウスの尾静脈より全身にデリバリーさせ、GFP および RFP の両シグナルを検出することにより、siRNA の腫瘍部への集積性を検討する。正常部への集積または残存が確認された場合は、経時的にイメージングを行い、その影響をインターフェロンや炎症性サイトカインに対する各種抗体を用いた免疫組織化学的手法により検討する。

さらに、CHFR または Aurora-A siRNA とタキサン製剤感受性との併用効果をイメージングにより可視的に解析する。

4. 研究成果

HEC-1B をヌードマウスの皮下に移植後、3 週間で腫瘍の形成が確認された。マウスをパクリタキセル単独群、ネガ siRNA 単独群、ネガ siRNA+パクリタキセル併用群、Aurora-A siRNA 単独群、Aurora-A siRNA+パクリタキセル併用群の 5 群に分け、検討を行った。

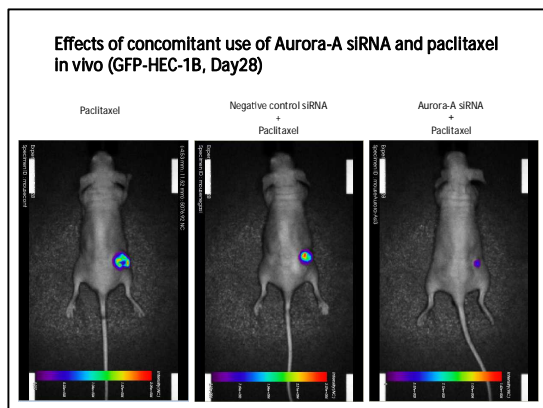
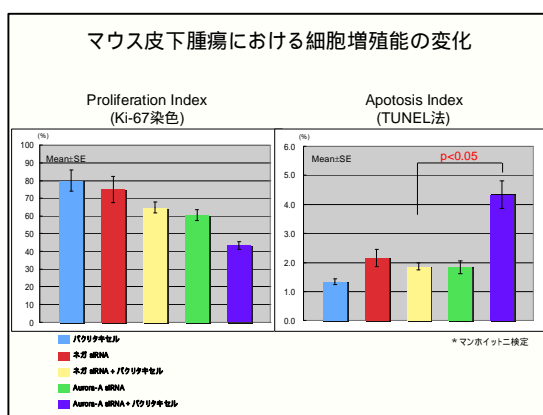
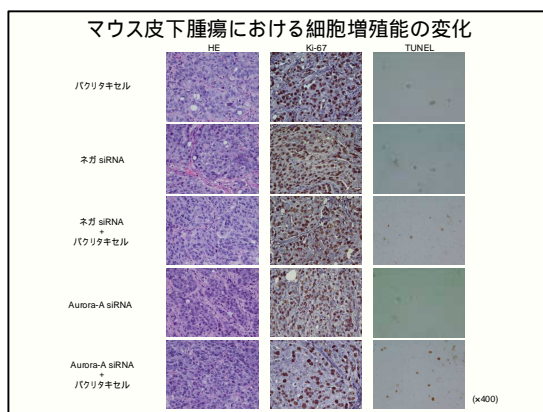
in vivo における Aurora-A siRNA とパクリタキセルの併用効果



siRNA/アテロコラーゲン複合体の局所投与を 4 日毎に、siRNA/アテロコラーゲン複合体の局所投与開始 2 日後から、パクリタキセルの腹腔内投与を 4 日ごとに行った。投与開始 12 日目において皮下腫瘍の体積は、群において最も低く、群に比し有意に低下していた ($p < 0.05$)。腫瘍のアポトーシスは、群において最も高く、群に比し有意に上昇していた ($p < 0.05$)。

分子イメージング的手法を用いた計測でも、群は群に比し著明な蛍光シグナルの減少が確認された。

Aurora-A siRNA の代わりに、CHFR siRNA を用いた検討でも、同様の結果を得た。



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3件)

Banno K, Kisu I, Yanokura M, Masuda K, Kobayashi Y, Ueki A, Tsuji K, Yamagami W, Nomura H, Susumu N, Aoki D.
Endometrial Cancer and Hypermethylation: Regulation of DNA and microRNA by Epigenetics. *Biochemistry Research International*

2012 印刷中 査読有り

Banno K, Kisu I, Yanokura M, Masuda K, Ueki A, Kobayashi Y, Susumu N, Aoki D.
Epigenetics and genetics in endometrial cancer: new carcinogenic mechanisms and relationship with clinical practice. *Epigenomics* 4; 147-162, 2012. 査読有り

6 . 研究組織

(1)研究代表者

矢野倉 恵 (YANOKURA MEGUMI)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号：20433732