

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25年5月 18日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592084

研究課題名（和文） 3次元培養による疾患モデルを利用した HPV 関連疾患に対する RNAi 創薬の研究

研究課題名（英文） Organotypic epithelial raft cultures as HPV-related cancer models for evaluating siRNA and its delivery system

研究代表者

大和 建嗣（YAMATO KENJI）

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：50174751

研究成果の概要（和文）：siRNA を用いた HPV 関連腫瘍の治療法を確立するためには、特異性の高い siRNA と効率よいデリバリー法の開発が必須である。本研究では、ホタルルシフェラーゼ導入した不死化ヒトケラチノサイを用いて正常重層扁平上皮と HPV16 関連癌に相当する 3次元培養を作成し、これらを用いて、既存のカチオン性リポソームによって siRNA を粘膜病変へ導入することが可能である事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To utilize siRNA technology to the treatment of HPV-related diseases, developing an efficient siRNA delivery system is essential. In this study, we established organotypic raft cultures using TERT- and HPV16-E6E7 immortalized human keratinocytes stably expressing firefly luciferase. These cultures facilitated quantitative analysis of knock-down efficiency induced by local siRNA delivery and showed that some cationic liposomes could deliver siRNA through stratified squamous epithelium.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：歯科・病態科学系歯科・歯科放射線学

キーワード：HPV、RNAi、ラフトカルチャー

1. 研究開始当初の背景

(1) siRNA 技術の創薬への応用の問題点

RNAi は 2 本鎖 RNA を介して、配列特異的に mRNA に作用し、分解や翻訳抑制によってターゲット遺伝子の発現が抑制される生物学的なプロセスであるが、化学合成した 21～23 塩基からなる短 2 本鎖 RNA (siRNA) をヒト細胞に導入することで任意の遺伝子の発現を抑制することができる。このため siRNA はウイルス感染症や癌のあたらしい

治療薬 (RNAi 医薬) として期待されている。しかし、①非標的遺伝子への配列部分的相補性による発現抑制、②内在性 miRNA による細胞内 RNAi への干渉、および③自然免疫の活性化が問題となっている。これらに加えて④siRNA の標的へのよいデリバリー法がない。

(2) 癌原性パピローマウイルス関連疾患の予防と治療について

子宮頸癌は、癌原性ヒトパピローマウイルス

(HPV16,18,31,45 など)の感染が原因である。中でも16型がその約半数を占める。また近年性行動の変化などによりHPVが原因である口腔癌は増加している。最近開発されたHPV感染予防ワクチンによって子宮頸癌が減少することが予測される。しかし、既に多くの感染者が存在し、これらの感染者の前癌病変と癌に対する低侵襲治療法の確立が望まれている。HPV関連癌は、E6およびE7ウイルス癌遺伝子の異常発現によって引き起こされ、E6・E7の発現は癌細胞の増殖と生存にも必須で、一過性の発現抑制でも癌細胞の排除が可能であるため核酸医薬による治療の理想的な標的である。

(3) HPV16を標的とした強力なsiRNA配列選択

①我々は、これまでゲノム情報のコンピュータソフトウェア解析と培養実験によってHPV16 E6E7に対する世界で最も優れたsiRNA配列を見いだした。②さらにこのsiRNAの一部をDNAに置換することによって非特異反応を減少させる事に成功した。

(4) 癌原性パピローマウイルス関連疾患のsiRNA治療開発の問題点

HPV関連癌の疾患動物モデルがないため創薬研究の障害となっている。特にsiRNAは、培養細胞(単層培養)に導入させることは容易であるが、重層扁平上皮内に生じる病変への深部への到達は困難で、この問題の解決のために生体に近いsiRNAデリバリ法の評価系が必要である。

2. 研究の目的

(1) HPV16既感染者に生じた高度異型上皮および早期子宮頸癌に対して、我々の選択したHPV16 E6E7に対するsiRNAを治療に応用するために、ラフトカルチャーを用いて疾患モデルを作成する。このために、①EGFPとルシフェラーゼ(hLuc)などのレポーター遺伝子を導入したケラチノサイトの3次元培養を行い、これらを用いてsiRNAの深部への到達とRNAi効果を定量的に評価するシステムを確立する。②ヒト由来の培養細胞を用いる事でヒト遺伝子に対する非特異反応や自然免疫活性化などの副作用の評価を可能にする。③動物実験にみられるような「個体差によるデータのばらつき」が少なくできる等の利点がある。またこれらの結果、動物実験の最少化や臨床研究における患者への負担軽減が可能となる。

(2) 本研究で確立した3次元培養モデルを用いて既存および新規のデリバリ法の評価を行い、良いものが見つければ動物実験によってその効果を確認する。

本研究は、現在のRNAi創薬が直面しているsiRNAの特異性評価とデリバリ法開発の問題を解決するために有用である。また子宮

頸癌や口腔癌などの新しい治療に貢献できるなど大きな意義がある。このようなデリバリ法は他の皮膚・粘膜・口腔疾患や腫瘍性疾患のRNAi創薬に応用できる。

3. 研究の方法

(1) 正常扁平上皮およびHPV16陽性癌モデル
正常扁平上皮およびHPV16陽性癌細胞に相当する細胞株にレンチウイルスを用いてレポーター遺伝子(EGFP、hLuc)を導入した。

①ヒト正常扁平上皮モデル：

ヒト正常ケラチノサイトをhTERT導入によって不死化した細胞株HDK1Tを使用し、レンチウイルスによってEGFPあるいはhLucを導入した(HDK1T-EGFP、HDK1T-luc)

②癌病変モデル：

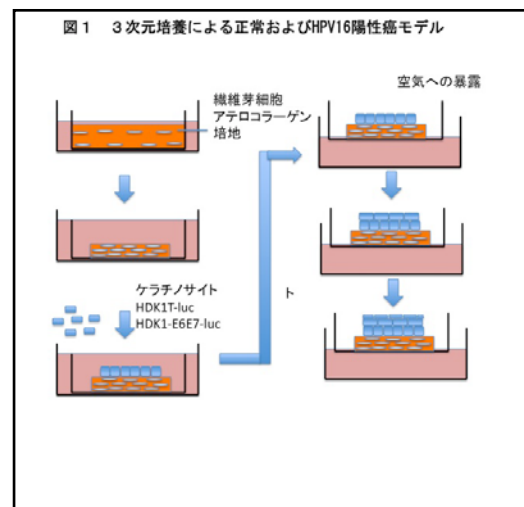
ヒト正常ケラチノサイトをHPV16E6E7癌遺伝子で不死化した細胞株(HDK1-E6E7)を使用した。同様にEGFPあるいはhLucを導入した(HDK1-E6E7-EGFP、HDK1-E6E7-luc)。

(2) 正常扁平上皮およびHPV16陽性癌病変の3次元培養

①3次元培養法

アテロコラーゲン添加培地と不死化ヒト線維芽細胞を混和後、6-ウエルプレート内のカルチャーインサートに移した。コラーゲンのゲル化後、ウエル内およびインサート内に培地を満たした。その後コラーゲンが十分収縮するまで培地交換した(約1週間)。ウエル内とコラーゲン培養内の培地を分化培地(ケラチノサイト培地と10%FCS添加DMEMを等量混和したもの)に置き換え、その上にケラチノサイトを密集培養した。翌日培地内に塩化カルシウムを添加し、ケラチノサイト培養表面を水面上に持ち上げて、ケラチノサイト層を空気に暴露し、重層扁平上皮への増殖分化を誘導する(10-14日)。

正常扁平上皮モデルは、HDK1T-lucを用いて、HPV16陽性癌病変モデルHDK1-E6E7-lucを用



いた3次元培養で作成した。

② 3次元培養における hLuc siRNA による RNAi 効果の定量的解析

培地内にD-ルシフェリンを添加後、Luc 活性をルミノイメージアナライザーで定量した。

③ 3次元培養の組織学的解析

ホルマリン固定した後に、パラフィン包埋切片をHE染色し、光学顕微鏡にて観察した。

(3) siRNA と dsRDC と細胞導入法

①用いた siRNA の配列は、下記の通りで2本鎖にアニーリングさせて使用した。dsRDC では、下線部の配列を DNA に置換した。

コントロール、5' -CCGUACUAGCCAUAUGCGUC、5' -CGCAUAAUGGCUAGUACGGGU;

hLuc, 5' -CCGUGGUGUUCGUGCUAAGA、

5' -UUAGACACGAACACCACGGUA;

E6E7-497, 5' -GACCGGUCGAUGUAUGUCUUG、

5' -AGACAUACAUCGACCGGUCCA;

E6E7-573, 5' -CACCUACAUUGCAUGAAUUA、

5' -UAUUCAUGCAAUGUAGGUGUA;

E6E7-752, 5' -CUUCGGUUGUGCGUACAAAGC、

5' -UUUGUACGCACAACCGAAGCG

②siRNA および DNA-RNA キメラ型 siRNA の導入は、Lipofectamine RNAiMAX および invivofectamine (共にインビトロジェン社) を用いた。

4. 研究成果

(1) HDK1T および HDK1-E6E7 細胞を用いた siRNA の評価系について

HPV16 E6E7 を標的とした siRNA およびその dsRDC の HPV16 関連癌への特異的増殖抑制効果の評価するために、正常ケラチノサイトを hTERT で不死化した細胞株 (HDK1-T) と HPV16 E6E7 で不死化した細胞株 (HDK1-E6E7) を用いた。これまで HPV16 陽性癌細胞 (SiHa) と陰性癌細胞 (HeLa) を用いていたが、HeLa 細胞は、siRNA と核酸導入試薬による非特異的細胞毒性への感受性が高く、両細胞から得られたデータの比較が困難であった。HDK1-E6E7-luc と HDK1-T-luc 細胞は、共に同じ初代培養細胞に由来し、siRNA 導入条件と導入効率ともにほぼ同じであった。これらの細胞に E6E7 siRNA あるいは dsRDC (497, 752) を同じ条件 (Lipofectamine RNAiMAX、濃度 0.5 nM) で導入し、6 日後に細胞生存率を解析した。siRNA-497 は HDK1-E6E7-luc と HDK1-T-luc 細胞の両方の増殖を抑制したが、DNA 修飾した dsRDC-497 は、HDK1-E6E7-luc への増殖抑制効果 (19.1%) を保持しつつ、HDK1-T-luc への細胞生存率を 62.5% まで回復させた。siRNA-752 は、siRNA-497 比べ高い特異性を有していたが、dsRDC 修飾はその活性を低下させた。以上より HDK1-E6E7-luc と HDK1-T-luc 細胞は、E6E7 siRNA の特異的あるいは非特異的増殖抑制効果の評価するのに有効であることが示唆された。また、dsRDC

修飾は siRNA の非特異的効果を抑制するのに有効であった。従来は、癌細胞株を用いた特異性評価が殆どで、我々のようなケラチノサイトをつかった siRNA の評価システムは臨床での副作用回避に有用であると考えられた。(2) HDK1T および HDK1-E6E7 によるラフトカルチャーの作成

HDK1T-luc および HDK1-E6E7-luc によるラフトカルチャーを作成し、ルシフェラーゼ活性をルミノイメージアナライザーによって解析した。図2のように、構造は、正常および扁平上皮癌に相当し、これらのルシフェラーゼ活性も容易に検出できた。

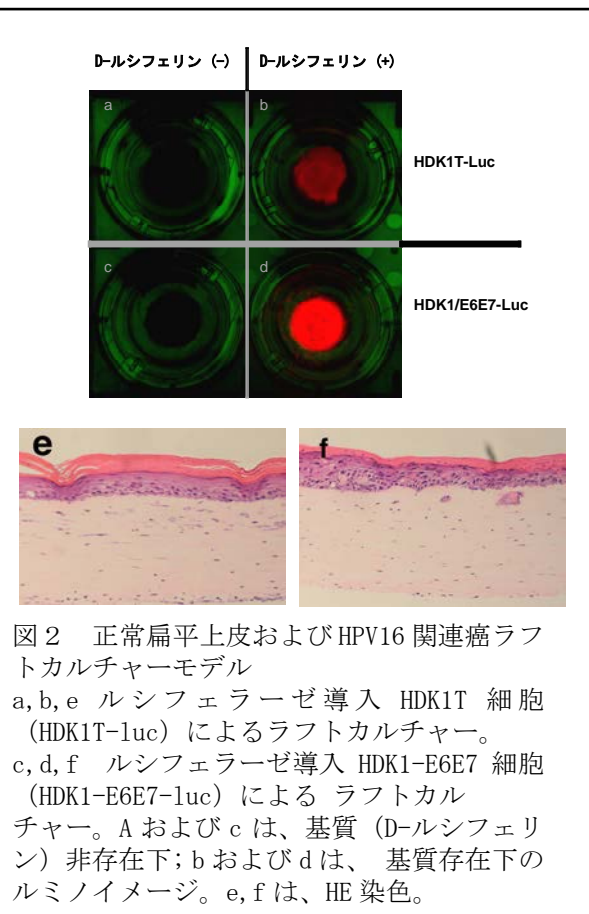


図2 正常扁平上皮および HPV16 関連癌ラフトカルチャーモデル

a, b, e ルシフェラーゼ導入 HDK1T 細胞 (HDK1T-luc) によるラフトカルチャー。
c, d, f ルシフェラーゼ導入 HDK1-E6E7 細胞 (HDK1-E6E7-luc) によるラフトカルチャー。A および c は、基質 (D-ルシフェリン) 非存在下; b および d は、基質存在下のルミノイメージ。e, f は、HE 染色。

(3) HDK1-E6E7-luc によるラフトカルチャーを用いた HPV16 関連癌への siRNA 局所投与法の評価。コントロールおよび hLuc に対する siRNA を Lipofectamine RNAiMAX あるいは invivofectamine と複合体形成後、HDK1-E6E7-luc によるラフトカルチャー上に重層し、その 48 時間後にルミノイメージアナライザーでルシフェラーゼ活性を定量した。Lipofectamine RNAiMAX は、mock に対して最大 25% のルシフェラーゼ活性を抑制した。また、invivofectamine は、mock に対して hLuc siRNA で 20% の有為な発現抑制が見られた (図 3)。いずれも光学顕微鏡による観察では、明らかな細胞毒性は観察されなかった。この

評価系は、簡便でデータのばらつきが少なく、また定量性も高く、デリバリ法の評価には大変有用であると考えられた。またカチオン性リポソームは、ある程度、扁平上皮病変へのsiRNA 到達を可能にし、これらの改良によって治療法に応用できる可能性を有していた。今後は、ラフトカルチャーを用いてこれらの改良や新規のデリバリ法の開発に利用していく予定である。

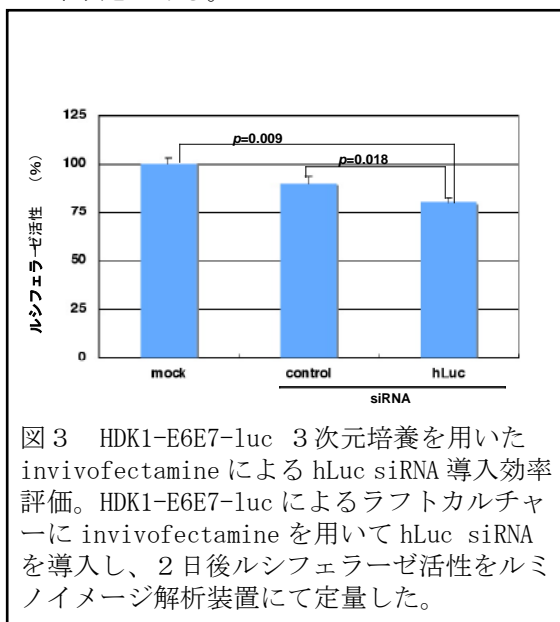


図3 HDK1-E6E7-luc 3次元培養を用いた invivolectamine による hLuc siRNA 導入効率評価。HDK1-E6E7-luc によるラフトカルチャーに invivolectamine を用いて hLuc siRNA を導入し、2日後ルシフェラーゼ活性をルミノイメージ解析装置にて定量した。

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)

- (1) Egawa, N., Nakahara, T., Ohno, S., Narisawa-Saito, M., Yugawa, T., Fujita, M., Yamato, K., Natori Y. and Kiyono, T. The E1 protein of human papillomavirus type 16 is dispensable for maintenance replication of the viral genome, J Virol 86, 2012, 3276-3283, 査読有
DOI:10.1128/JVI.06450-11
- (2) Yamato, K., Egawa, N., Endo, S., Ui-Tei, K., Yamada, T., Saigo, K., Hyodo, I., Kiyono, T. and Nakagawa, I. Enhanced specificity of HPV16 E6E7 siRNA by RNA-DNA chimera modification, Cancer Gene Ther, 18, 2011, 587-597, 査読有
DOI:10.1038/cgt.2011.28
- (3) Endo, S., Yamato, K., Hirai, S., Moriwaki, M., Fukuda, K., Suzuki, H., Abei, M., Nakagawa, I. and Hyodo, I. Potent in vitro and in vivo antitumor effects of MDM2 inhibitor nutlin-3 in gastric cancer cells, Cancer Sci.102, 2011, 605 - 613, 査読有
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01821

[学会発表] (計5件)

- (1) 大和建嗣, Identification of a short RNA segment in the siRNA seed region required for efficient RNAi, 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11日～12月14日 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡市)
- (2) 廣瀬充明, ヒト胃癌細胞に対するclassIII HDAC阻害剤 tenovin-6の抗腫瘍効果に関する検討, 第71回日本癌学会学術総会, 2012年9月19日～9月21日ロイトイン札幌(札幌)
- (3) Ueno T, The antitumor effect of HDAC inhibitor Tenovin-6 for gastric cancer cells, American Association of Cancer Research 103rd Annual Meeting, March 31～April 1, 2012; Chicago, IL
- (4) 大和建嗣, AGO2-association, microRNA suppression and cytotoxicity of RNA-DNA chimera modified siRNA, 第34回日本分子生物学会年会, 平成23年12月13日～12月16日 パシフィコ横浜(横浜市)
- (5) Endo S, The anti-tumor effect of MDM2 antagonist nutlin-3 in gastric cancer cell in vitro and in vivo. American Association of Cancer Research 101st Annual Meeting, April 17～April 21, 2010, Washington, DC

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大和 建嗣 (YAMATO KENJI)
筑波大学・医学医療系・研究員
研究者番号: 50174751