

氏 名	たか はし ゆう き 高 橋 有 己
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 659 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 医 療 薬 科 学 専 攻
学位論文題目	Development of novel cancer therapy strategies based on small interfering RNA delivery (siRNA デリバリーによる新規癌治療法の開発に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 高 倉 喜 信 教 授 橋 田 充 教 授 乾 賢 一

### 論 文 内 容 の 要 旨

RNA 干渉は、2 本鎖 RNA が塩基配列特異的に標的遺伝子の発現を強力に抑制する現象であり、短い 2 本鎖 RNA (siRNA)、あるいは細胞内で siRNA となる短いヘアピン型 RNA (shRNA) を用いることで誘導可能である。RNA 干渉による遺伝子発現抑制効果は強力かつ特異的であるため、癌やウイルス感染などに代表される病原タンパク質の発現亢進が原因となる疾患への治療手段としての適用が期待されている。RNA 干渉による遺伝子発現抑制効果は siRNA がデリバリーされた細胞に限局されることから、RNA 干渉による疾患治療の実現には標的細胞に siRNA を効率よくデリバリーする方法論の確立が重要である。そこで本研究では、まず癌細胞での RNA 干渉を定量的に評価可能なシステムを新たに開発し、原発性及び転移性腫瘍を標的とした siRNA デリバリーシステムの開発を行った。次いで、癌細胞の増殖・転移に関連する遺伝子を標的とした siRNA による癌治療の可能性について検討した。また、RNA 干渉の利用によるインターフェロン (IFN) 癌遺伝子治療の効果増強についても試みた。

#### 第 I 章 RNA 干渉による癌細胞内遺伝子発現抑制効果の定量的解析

RNA 干渉の利用に際しては発現抑制の最大強度だけが議論される場合が多いが、治療の観点からは発現抑制期間も重要である。そこで、癌細胞における RNA 干渉の強度及び持続時間を簡便かつ定量的に評価することを目的に、標的遺伝子としてホタルルシフェラーゼ遺伝子を、細胞数の指標としてウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を安定に発現するマウス黒色腫細胞株 B16 を樹立した。作製した B16/dual Luc 細胞において siRNA の濃度依存的な遺伝子発現の抑制が誘導可能であった。そこで、モーメント解析を利用した RNA 干渉効果の定量的解析法を開発し結果を解析することで、siRNA および shRNA 発現プラスミド DNA (pshRNA) による遺伝子発現抑制効果の強度および持続時間との定量的な関係を明らかとした。

#### 第 II 章 siRNA の腫瘍内デリバリーによる腫瘍増殖の抑制

原発性腫瘍を標的とした癌治療を目的に、B16/dual Luc 皮下腫瘍に対して siRNA または pshRNA 水溶液の腫瘍組織内に注入を行ったところ、エレクトロポレーションを併用することで腫瘍組織における標的遺伝子発現を約 30% にまで抑制可能であった。そこで、癌細胞増殖等に関与する  $\beta$ -catenin あるいは hypoxia inducible factor-1  $\alpha$  (HIF-1  $\alpha$ ) を標的とする pshRNA を新たに構築し、最適化した投与方法で腫瘍に投与した。その結果、標的遺伝子の mRNA 発現レベルの低下、ならびに腫瘍増殖の有意な抑制に成功し、一部マウスでは癌の完全退縮を認めた。

#### 第 III 章 肝臓での癌細胞増殖抑制を目的とした siRNA の経血管デリバリー

癌細胞が散在する転移性腫瘍に対しては siRNA を血管を介してデリバリーすることが有効と考え、大容量の水溶液を急速に静脈内投与するハイドロダイナミクス法を利用することで肝臓中の転移性癌細胞を標的とした RNA 干渉の誘導を試みた。その結果、B16/dual Luc 細胞を門脈内に移植することで作成した実験的肝転移モデルマウスでの検討において、肝臓中癌細胞での標的遺伝子発現を有意に抑制することに成功した。その一方で、癌細胞が肝臓に流入することで、癌細胞だけ

でなく肝臓構成細胞においてもHIF-1 $\alpha$ の発現が亢進することを見出した。そこでHIF-1 $\alpha$ を標的としたpshRNAの投与による肝臓での癌細胞増殖抑制を試みた。その結果、マウス結腸癌細胞Colon26の肝転移に伴うHIF-1 $\alpha$ 発現の亢進は、pshRNAの投与により抑制可能であり、これにより肝臓での癌細胞増殖を強力に抑制することに成功した。

#### 第IV章 RNA干渉によるインターフェロン癌遺伝子治療の改善

IFNはその生理作用から、がんやウイルス感染等の疾患治療に用いられている。IFNは生体内半減期が短いことから、遺伝子導入を利用した持続化による治療効果の増強が期待される。しかしながら、IFN遺伝子発現は一過性であること、また癌細胞がIFN耐性を獲得することが、IFN癌遺伝子治療の妨げとなっている。そこで、RNA干渉によるsuppressor of cytokine signaling (SOCS) およびIFN受容体 (IFNR) の発現抑制によるIFN遺伝子治療効果の増強を試みた。

B16細胞およびColon26細胞におけるSOCS遺伝子の発現をRNA干渉により抑制することでIFN- $\beta$ 、 $\gamma$ の抗腫瘍効果の増強を試みた。その結果、IFN- $\gamma$ 添加によりB16細胞におけるSOCSの発現が強力に誘導されること、RNA干渉によりこのSOCS誘導を抑制することでIFN- $\gamma$ の抗腫瘍効果が増強可能であることを見出した。

一方、IFNRを標的とするsiRNAを培養細胞にトランスフェクションすることで、IFN存在時の外来性遺伝子発現が増大した。また、siRNAとIFN発現プラスミドベクターの同時トランスフェクションによってIFN遺伝子発現の持続化に成功した。

以上、申請者は癌細胞における遺伝子発現抑制効果の定量的評価システムを構築することで、siRNAを効率よく標的細胞へデリバリー可能な方法の開発に成功し、RNA干渉による癌細胞増殖・転移抑制を実現した。またIFN癌遺伝子治療を例として、RNA干渉を利用することで他の治療手段の改善が可能であることを示すことにも成功した。本研究で得られた知見はRNA干渉による癌治療の可能性を示すとともに、他の疾患治療戦略の改善手段としてのRNA干渉の利用に関しても有用な知見を与えるものと考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

RNA干渉は、2本鎖RNAが塩基配列特異的に標的遺伝子の発現を強力に抑制する現象であり、短い2本鎖RNA (siRNA)、あるいは細胞内でsiRNAとなる短いヘアピン型RNA (shRNA)を用いることで誘導可能である。RNA干渉による遺伝子発現抑制効果は強力かつ特異的であるため、癌やウイルス感染などに代表される病原タンパク質の発現亢進が原因となる疾患への治療手段としての適用が期待されている。RNA干渉による遺伝子発現抑制効果はsiRNAがデリバリーされた細胞に限局されることから、RNA干渉による疾患治療の実現には標的細胞にsiRNAを効率よくデリバリーする方法論の確立が重要である。そこで本研究では、まず癌細胞でのRNA干渉を定量的に評価可能なシステムを新たに開発し、原発性及び転移性腫瘍を標的としたsiRNAデリバリーシステムの開発を行った。次いで、癌細胞の増殖・転移に関連する遺伝子を標的としたsiRNAによる癌治療の可能性について検討した。また、RNA干渉の利用によるインターフェロン (IFN)癌遺伝子治療の効果増強についても試みた。

#### 第I章 RNA干渉による癌細胞内遺伝子発現抑制効果の定量的解析

RNA干渉の利用に際しては発現抑制の最大強度だけが議論される場合が多いが、治療の観点からは発現抑制期間も重要である。そこで、癌細胞におけるRNA干渉の強度及び持続時間を簡便かつ定量的に評価することを目的に、標的遺伝子としてホタルルシフェラーゼ遺伝子を、細胞数の指標としてウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を安定に発現するマウス黒色腫細胞株B16を樹立した。作製したB16/dual Luc細胞においてsiRNAの濃度依存的な遺伝子発現の抑制が誘導可能であった。そこで、モーメント解析を利用したRNA干渉効果の定量的解析法を開発し結果を解析することで、siRNAおよびshRNA発現プラスミドDNA (pshRNA)による遺伝子発現抑制効果の強度および持続時間との定量的な関係を明らかとした。

#### 第II章 siRNAの腫瘍内デリバリーによる腫瘍増殖の抑制

原発性腫瘍を標的とした癌治療を目的に、B16/dual Luc皮下腫瘍に対してsiRNAまたはpshRNA水溶液の腫瘍組織内に注入を行ったところ、エレクトロポレーションを併用することで腫瘍組織における標的遺伝子発現を約30%にまで抑制可能であった。そこで、癌細胞増殖等に関与する $\beta$ -cateninあるいはhypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )を標的とする

pshRNA を新たに構築し、最適化した投与方法で腫瘍に投与した。その結果、標的遺伝子の mRNA 発現レベルの低下、ならびに腫瘍増殖の有意な抑制に成功し、一部マウスでは癌の完全退縮を認めた。

### 第三章 肝臓での癌細胞増殖抑制を目的とした siRNA の経血管デリバリー

癌細胞が散在する転移性腫瘍に対しては siRNA を血管を介してデリバリーすることが有効と考え、大容量の水溶液を急速に静脈内投与するハイドロダイナミクス法を利用することで肝臓中の転移性癌細胞を標的とした RNA 干渉の誘導を試みた。その結果、B16/dual Luc 細胞を門脈内に移植することで作成した実験的肝転移モデルマウスでの検討において、肝臓中癌細胞での標的遺伝子発現を有意に抑制することに成功した。その一方で、癌細胞が肝臓に流入することで、癌細胞だけでなく肝臓構成細胞においても HIF-1  $\alpha$  の発現が亢進することを見出した。そこで HIF-1  $\alpha$  を標的とした pshRNA の投与による肝臓での癌細胞増殖抑制を試みた。その結果、マウス結腸癌細胞 Colon26 の肝転移に伴う HIF-1  $\alpha$  発現の亢進は、pshRNA の投与により抑制可能であり、これにより肝臓での癌細胞増殖を強力に抑制することに成功した。

### 第四章 RNA 干渉によるインターフェロン癌遺伝子治療の改善

IFN はその生理作用から、がんやウイルス感染等の疾患治療に用いられている。IFN は生体内半減期が短いことから、遺伝子導入を利用した持続化による治療効果の増強が期待される。しかしながら、IFN 遺伝子発現は一過性であること、また癌細胞が IFN 耐性を獲得することが、IFN 癌遺伝子治療の妨げとなっている。そこで、RNA 干渉による suppressor of cytokine signaling (SOCS) および IFN 受容体 (IFNR) の発現抑制による IFN 遺伝子治療効果の増強を試みた。

B16 細胞および Colon26 細胞における SOCS 遺伝子の発現を RNA 干渉により抑制することで IFN-  $\beta$ 、 $\gamma$  の抗腫瘍効果の増強を試みた。その結果、IFN-  $\gamma$  添加により B16 細胞における SOCS の発現が強力に誘導されること、RNA 干渉によりこの SOCS 誘導を抑制することで IFN-  $\gamma$  の抗腫瘍効果が増強可能であることを見出した。

一方、IFNR を標的とする siRNA を培養細胞にトランスフェクションすることで、IFN 存在時の外来性遺伝子発現が増大した。また、siRNA と IFN 発現プラスミドベクターの同時トランスフェクションによって IFN 遺伝子発現の持続化に成功した。

以上、申請者は癌細胞における遺伝子発現抑制効果の定量的評価システムを構築することで、siRNA を効率よく標的細胞へデリバリー可能な方法の開発に成功し、RNA 干渉による癌細胞増殖・転移抑制を実現した。また IFN 癌遺伝子治療を例として、RNA 干渉を利用することで他の治療手段の改善が可能であることを示すことにも成功した。本研究で得られた知見は RNA 干渉による癌治療の可能性を示すとともに、他の疾患治療戦略の改善手段としての RNA 干渉の利用に関しても有用な知見を与えるものと考えられる。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成20年2月25日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。