

( 続紙 1 )

京都大学	博士 (薬学)	氏名	河野 裕 允
論文題目	超音波応答性マンノース修飾リポソームを利用した腫瘍関連マクロファージ選択的核酸医薬送達に基づくがん治療に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>腫瘍関連マクロファージ(TAM)は、がんの増殖・転移に関わるがん微小環境の形成に重要な役割を演じ、種々のサイトカインや増殖因子の産生を通してがんの成長を促進する。一方、最近の研究において、転写因子NF-κBをノックアウトしたマウスにがん細胞を移植してもTAMは腫瘍増殖を促進するM2表現型を示さず、M1表現型をとってTh1型サイトカインの産生を通して腫瘍の成長を抑制することが報告された。本知見を基に申請者は、NF-κBの活性抑制によりTAMの表現型をM2型からM1型へ転換できるという仮説を立てた。本仮説を実証することができれば効果的ながん治療法の構築に繋げられるが、その検証研究を行うためには、がん微小環境中のTAMをターゲットとしてNF-κB活性を抑制する医薬品を送達する技術の開発が不可欠である。</p> <p>そこで申請者は、所属研究室において開発された超音波応答性マンノース修飾リポソームを利用し、NF-κBの活性を抑制するオリゴ核酸医薬のTAMへの送達に基づくがん治療の可能性を検討した。まずオリゴ核酸医薬によるNF-κBの活性抑制がM2型マクロファージの表現型を転換できることをin vitro実験によって確認し、さらに固形がんモデルおよび腹水がんモデルにおいてin vivoでのマクロファージ表現型の転換およびがん抑制効果を評価した。本研究成果を、以下3章にわたって論述する。</p>			
第1章 NF-κBの活性を抑制するオリゴ核酸医薬の導入によるマクロファージの表現型転換の検証			
<p>まず、NF-κB活性の抑制によりM2型マクロファージの表現型をM1型へ転換できることを実証するため、NF-κB活性を抑制するオリゴ核酸医薬の導入によるマクロファージの特性変化をin vitroにおいて評価した。実験には、マウス腹腔マクロファージをがん細胞培養上清中で培養し、TAMと類似した性質を示すM2-likeマクロファージに誘導した細胞を用いた。遺伝子導入試薬であるLipofectamine® 2000を用いてNF-κB (p50) siRNAあるいはNF-κB decoyをM2-likeマクロファージに導入した結果、いずれのオリゴ核酸においてもM2-likeマクロファージのTh1型サイトカイン産生量の顕著な増大が認められた。また、M2型の指標である血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、マトリックスメタロプロテアーゼ-9(MMP-9)、およびマンノース受容体の発現量も顕著に減少する他、M1型の指標である一酸化窒素の産生量が増大することも確認され、NF-κB活性を抑制するオリゴ核酸医薬の導入によりM2-likeマクロファージをM1型に転換できることが確認された。</p>			
第2章 超音波応答性マンノース修飾リポソームを利用したNF-κB decoyの腫瘍関連マクロファージへのターゲティングと固形がん治療効果の評価			
In vivoにおいてTAMの表現型転換を実現するためには、TAMへ効率的に核酸を送達			

する技術の開発が不可欠である。パーフルオロプロパンガスの微小気泡を内封し、表面をマンノースで修飾した超音波応答性マンノース修飾リポソームは、マンノース受容体発現細胞への標的指向性と、超音波による穿孔を介して高分子を細胞質内に直接送達する機能を兼ね備えた製剤である。TAMにはマンノース受容体が高発現していることから、申請者は本キャリアをTAM選択的核酸医薬送達技術として利用することを試みた。NF- $\kappa$ B decoyと超音波応答性マンノース修飾リポソームとの複合体をcolon-26細胞を皮下に移植した固形がんモデルマウスの腫瘍組織内へ投与後、超音波照射を施した結果、NF- $\kappa$ B decoyがTAMに高い比率で分布することが確認された。そこで次に、本手法によるNF- $\kappa$ B decoy導入後にTAMを単離し、その表現型を評価した結果、Th1型サイトカインの産生誘導、およびVEGF、MMP-9発現量の顕著な減少が認められ、*in vivo*においてもTAM表現型のM1型への転換が示された。さらに本手法により、優れた腫瘍増殖抑制効果、並びに延命効果が得られた。

### 第3章 超音波応答性マンノース修飾リポソーム/NF- $\kappa$ B decoy複合体のがん性腹膜炎治療への応用

TAMは固形腫瘍のみならず、がん性腹水中にも存在し、がん性腹膜炎を増悪させることが報告されている。そこで、超音波応答性マンノース修飾リポソームを利用したTAM選択的NF- $\kappa$ B decoy導入法のがん性腹膜炎治療への応用を試みた。がん性腹水中ではTAMの分布が広範囲にわたるため、TAMへのNF- $\kappa$ B decoy導入効率が固形腫瘍の場合と異なる可能性がある。そこで、超音波応答性マンノース修飾リポソーム/NF- $\kappa$ B decoy複合体をEhrlich腹水がんモデルマウスに腹腔内投与後、超音波照射を施した際のNF- $\kappa$ B decoy導入効率を評価した結果、がん性腹水中のTAMに対しても高いNF- $\kappa$ B decoy導入効率を得られた。次に、TAMの表現型転換を確認するため、本手法によるNF- $\kappa$ B decoy導入後に単離したTAMにおけるサイトカイン発現を評価した結果、Th1型サイトカインの発現量増大が認められた。さらに、本手法により腹腔内におけるがん細胞増殖に加え、腹水貯留まで顕著に抑制でき、高い延命効果が得られることが示された。

以上、申請者は、*in vitro*においてNF- $\kappa$ Bの活性を抑制するオリゴ核酸医薬をマクロファージに導入することにより、その表現型をM2型からM1型へ転換できることを証明した。さらに、超音波応答性マンノース修飾リポソームを利用したマウス固形腫瘍およびがん性腹水中のTAMに対する効率的なNF- $\kappa$ B decoyの導入により、TAMの表現型をM1型に転換できることを明らかにした。また、いずれのがんモデルにおいても本手法により腫瘍増殖抑制および延命効果が得られることも確認した。以上の知見は、NF- $\kappa$ Bを標的としたTAMの表現型制御に基づく新規がん治療法を構築する上で有益な基礎的情報を提供するものと考えられる。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

腫瘍関連マクロファージ(TAM)は、がんの増殖・転移に関わるがん微小環境の形成に重要な役割を演じ、種々のサイトカインや増殖因子の産生を通してがんの成長を促進するが、転写因子NF- $\kappa$ Bをロックアウトすると、マウスにがん細胞を移植してもTAMは腫瘍増殖を促進するM2表現型ではなくM1表現型となり、Th1型サイトカインの産生を通して腫瘍の成長は抑制される。そこで申請者は、NF- $\kappa$ Bの活性を抑制することによりTAMの表現型をM2型からM1型へ転換できがんの増殖抑制が可能となるという仮説を立て、TAMをターゲットとしてNF- $\kappa$ B活性を抑制する核酸医薬を送達しこれを検証した。

最初に、NF- $\kappa$ B活性の抑制によりM2型マクロファージの表現型をM1型へ転換できることを実証するため、マウス腹腔マクロファージをがん細胞培養上清中で培養してTAMと類似した性質を示すM2-likeマクロファージに誘導し、NF- $\kappa$ B活性を抑制するオリゴ核酸医薬を導入してその特性の変化をin vitroで評価した。遺伝子導入試薬であるLipofectamine® 2000を用いてNF- $\kappa$ B (p50) siRNAあるいはNF- $\kappa$ B decoyをM2-likeマクロファージに導入した結果、いずれのオリゴ核酸においてもM2-likeマクロファージのTh1型サイトカイン産生量の顕著な増大が認められ、一方、M2型の指標である血管内皮細胞増殖因子(VEGF)、マトリックスメタロプロテアーゼ-9(MMP-9)、およびマンノース受容体の発現量が顕著に減少すると共にM1型の指標である一酸化窒素の産生量が増大し、NF- $\kappa$ B活性を抑制するオリゴ核酸医薬の導入によりM2-likeマクロファージをM1型に転換できることが確認された。

次に、in vivoにおけるTAMの表現型転換を検討するために、マンノース受容体発現細胞への標的指向性と、超音波による穿孔を介して高分子を細胞質内に直接送達する機能を兼ね備えた製剤である超音波応答性マンノース修飾リポソームを用いて、マンノース受容体が高発現しているTAMへの選択的核酸医薬送達を試みた。NF- $\kappa$ B decoyと超音波応答性マンノース修飾リポソームとの複合体を、皮下に移植したcolon-26細胞の固形腫瘍組織内へ注入後、超音波照射を施した結果、NF- $\kappa$ B decoyがTAMに高い比率で分布することが確認された。そこでNF- $\kappa$ B decoy導入後にTAMを単離しその表現型を評価した結果、Th1型サイトカインの産生誘導、およびVEGF、MMP-9発現量の顕著な減少が認められ、in vivoにおいてもTAM表現型のM1型への転換が示された。さらに本処置により、colon-26固形がんに対して腫瘍増殖抑制効果および延命効果が得られた。

TAMは固形腫瘍のみならずがん性腹水中にも存在しがん性腹膜炎を増悪させるので、次に超音波応答性マンノース修飾リポソームを利用したTAM選択的NF- $\kappa$ B decoy導入法のがん性腹膜炎治療への応用を試みた。がん性腹水中ではTAMの分布が広範囲にわたるため、TAMへのNF- $\kappa$ B decoy導入効率が固形腫瘍の場合と異なる可能性があるが、超音波応答性マンノース修飾リポソーム/NF- $\kappa$ B decoy複合体をEhrlich腹水がんモデルマウスに腹腔内投与後超音波照射を行った際のNF- $\kappa$ B decoy導入効率を評価した結果、がん性腹水中のTAMに対しても高いNF- $\kappa$ B decoy導入効率を得られた。また、本手法によるNF- $\kappa$ B decoy導入後に単離したTAMにおけるサイトカイン発現を評価した結果、Th1型サイト

カインの発現量増大が認められ、TAMの表現型転換が確認された。さらに、本手法により腹腔内におけるがん細胞増殖に加え、腹水貯留まで顕著に抑制でき、高い延命効果が得られた。

以上、申請者は、in vitroにおいてNF- $\kappa$ Bの活性を抑制するオリゴ核酸医薬をマクロファージに導入することにより、その表現型をM2型からM1型へ転換できることを証明した。さらに、超音波応答性マンノース修飾リポソームを利用したマウス固形腫瘍およびがん性腹水中のTAMに対する効率的なNF- $\kappa$ B decoyの導入により、TAMの表現型をM1型に転換できることを明らかにした。また、本手法により腫瘍増殖抑制および延命効果が得られた。以上の知見は、NF- $\kappa$ Bを標的としたTAMの表現型制御に基づく新規がん治療法を構築する上で有益な基礎的情報を提供するものとする。

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する。また、平成26年2月25日、論文内容とそれに関連した事項について諮問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものとする。公表に際しては、（当分の間）当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日以降