

氏 名	野 河 正 輝
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	論 医 博 第 1888 号
学位授与の日付	平 成 17 年 7 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 題 目	Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. (PLK-1 を標的とした small interfering RNA の経尿道的投与による膀胱癌の増殖抑制に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 小 川 修 教 授 松 本 智 裕 教 授 藤 田 潤

論 文 内 容 の 要 旨

初診断時の膀胱癌の約70%は表在性であり、一般的に経尿道的摘除後にマイトマイシンやアドリアマイシンなどの抗癌剤、もしくはBCGの経尿道的膀胱内注入療法が行われる。これら薬剤は再発予防効果は認めるものの、予後は改善されず、約50%の表在性膀胱癌患者は再発し10%から30%の症例は悪性化し浸潤癌となる。進行期膀胱癌の治療は男性の場合は膀胱前立腺全摘術を、女性の場合は膀胱子宮全摘術を施行せざるをえず、術後に排尿および性機能に関し quality of life が著しく損なわれ、新たな治療法の開発が切望されている。

Polo-like kinase-1 (PLK-1) は、細胞分裂 M 期にその発現および活性が上昇し、中心体、紡錘体、動原体等細胞分裂装置に局在し基質をリン酸化することにより紡錘体形成、細胞分裂 M 期の進行を制御しているセリン/スレオニンキナーゼである。申請者は膀胱癌に PLK-1 が高発現しており、腫瘍の増殖に関与していることを確認し、PLK-1 遺伝子を分子標的とした small interfering RNA (siRNA) による RNA 干渉を応用した治療法を開発を目指して研究を行なった。

siRNA は非常に低濃度で標的遺伝子の発現を特異的に抑制することができる。In vitro における効果はあきらかであるが、現在のところ in vivo において効果を示した報告は少ない。この主な理由としては、標的腫瘍や臓器に十分量の siRNA を到達させる drug delivery system (DDS) が確立されていないことが考えられる。申請者は膀胱という閉鎖空間に着目し、siRNA とカチオニックリポソームの複合体を注入することで DDS の問題を克服できると考え研究を行なった。

インフォームドコンセントを得て患者から採取された膀胱癌の臨床検体58検体を用い、抗 PLK-1 抗体による免疫組織染色を行った。PLK-1 の発現と腫瘍の核異形性、筋層浸潤、リンパ管および静脈浸潤などの膀胱癌の悪性度と正の相関性を示し、予後との相関性が認められた。また、膀胱癌臨床検体の癌部では非癌部より PLK-1 の発現が高いことが明らかになった。さらに、膀胱癌細胞株10株中9株で正常線維芽細胞や正常肝細胞にくらべ PLK-1 の発現亢進が確認された。PLK-1 を標的とした合成 siRNA とカチオニックリポソームの複合体を用いて、in vitro で膀胱癌細胞株の PLK-1 の発現を抑制すると紡錘体形成が阻害され、細胞周期 M 期で停止しアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。

In vivo での PLK-1 siRNA の効果を検討するため、ルシフェラーゼ遺伝子導入ヒト膀胱癌細胞株 (UM-UC-3) を経尿道的にヌードマウス膀胱に移植し、In vivo imaging system で非観血的に膀胱癌の増殖状態の経時的な定量を行なえる正所性ヒト膀胱癌移植マウスモデルを作製した。FITC で標識した siRNA を膀胱内に投与し、siRNA が癌細胞に取り込まれることを確認した。また、PLK-1 siRNA により移植した膀胱癌の PLK-1 の発現が抑制されることを免疫組織染色にて確認した。このモデルマウスに対して、PLK-1 siRNA とカチオニックリポソームの複合体を経尿道的に投与し、膀胱に4時間貯留させた結果、有意に膀胱癌細胞の増殖が抑制された。また、siRNA の投与により体重減少、血液生化学検査値、正常膀胱粘膜組織像に著明な変化、異常は見られなかった。本研究により、膀胱癌に対する PLK-1 siRNA の膀胱内投与という新規治療法開発の可能性が示された。

論文審査の結果の要旨

Small interfering RNA (siRNA) は、RNA 干渉により特異的に標的遺伝子の発現を抑制する短い二本鎖 RNA である。Cell-free や *in vitro* での報告は多いが、*in vivo* での効果を示した報告は少ない。その理由は標的細胞や組織に効率的に siRNA を到達させる drug delivery system (DDS) がないことによる。申請者は膀胱という閉鎖空間に着目し、siRNA とカチオニックリポソームの複合体を経尿道的に膀胱内に注入することで DDS の問題を克服できると考えた。また、膀胱癌症例では細胞分裂に関与するセリン/スレオニンキナーゼである polo-like kinase 1 (PLK-1) の高発現が見られることから、標的分子として PLK-1 に焦点をあてた。

まず、膀胱癌58症例から得られた臨床検体で、PLK-1 の発現が悪性度、予後と相関することを示した。最適化した配列を持つ siRNA により *in vitro* で膀胱癌細胞株の PLK-1 発現を抑制すると、紡錘体形成が阻害され、細胞周期 M 期で停止し、アポトーシスが誘導されることを示した。さらに、ルシフェラーゼ導入ヒト膀胱癌細胞株を経尿道的にマウス膀胱に移植し、*in vivo* imaging system により生体内での腫瘍細胞の増殖を非観血的に経時的に観察できるモデル実験系を確立した。このモデルをもちいて siRNA の投与により膀胱癌の増殖を生体内で抑制することに成功した。FITC 標識 siRNA/カチオニックリポソーム複合体が移植膀胱癌細胞内に効率的に取り込まれること、および PLK-1 の発現が特異的に抑制されることを *in situ* で示した。また、siRNA 投与マウスに体重減少、血液生化学検査の異常、正常膀胱粘膜組織の変性は見られなかった。

以上の研究は、膀胱癌に対する PLK-1 siRNA の膀胱内投与というあたらしい治療法開発の可能性を示したものであり、今後の臨床応用が期待される。したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成17年7月6日実施の論文内容発表とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。