

博士(医学) 藤田 剛

論文題目

Intraperitoneal delivery of a small interfering RNA targeting NEDD1 prolongs the survival of scirrhous gastric cancer model mice.

(NEDD1 を標的とした siRNA の腹腔内投与はスキルス胃癌モデルマウスの生存期間を延長する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

びまん性胃癌(DGC)は病理学的に、腺管構造を形成せず個細胞性に胃壁に広範な浸潤増殖を呈する悪性度の高い癌である。このような浸潤形態に加えて DGC は高頻度に腹膜播種転移を来し、現在のところ有効な治療法がなく予後は極めて不良である。この DGC の腹膜への臓器特異性に着目した播種巣コントロールについてこれまで化学療法をはじめ、腹腔内抗がん剤治療、温熱化学療法、腹膜全摘術などいくつかの報告があるがその成績は未だ満足できる状態ではない。そこで我々は胃癌細胞株より樹立した高腹膜播種細胞株を用いたマウスモデルを作成し、細胞分裂中期の調節タンパクである NEDD1 を標的とした siRNA の Atelocollagen/DharmaFECT を用いた腹腔内デリバリーの有効性について検討した。

[結果]

我々はこれまでの胃癌臨床検体を用いたマイクロアレイ解析の結果から DGC では Hedgehog 経路と epithelial-mesenchymal transition (EMT) 経路が活性化されていること、それら 2 経路が crosstalk していることを報告してきた (Gastroenterology 2006)。この結果をもとに本研究では 11 種の GC 細胞株の中から両経路を保持し臨床検体における DGC の形質をより反映していると考えられる細胞株 HSC-60 を選択し、さらにこの細胞株をマウスの腹腔内で 6 代継代することによって高腹膜播種亜株 60As6 を得た。RT-PCR で 60As6 は親株 HSC-60 同様 Hedgehog 経路および EMT 経路を保持していることを確認した。60As6 は免疫不全マウスの腹腔内への注入によって容易に腹膜播種をきたし、親株 HSC-60 に比べて早期にマウスを死に至らしめる(MST 167 日:28 日)。この両細胞株に in vivo imaging の為にルシフェラーゼ遺伝子を導入し(HSC-60Luc および 60As6Luc)、生体内における腫瘍細胞量の量的評価を可能としたモデルマウスを作成した。

RNA 干渉による胃癌腹膜播種に対する分子標的治療を可能とするため、Atelocollagen/DharmaFECT によるデリバリー効率を Luciferase siRNA を用いて条件検討を行い、癌細胞内への効率的な取り込みを確認しマウスへの有効な投与プロトコルを確立した。また、GFP を遺伝子導入した 60As6 細胞を腹腔内注入し、確立したプロトコルを用いて導入した蛍光ラベルされた siRNA が実際に細胞内に取り込まれることを確認した。

治療標的として Hedgehog 経路の下流に存在する標的である ELK1 および MSX2 に対する siRNA を用いた。In vitro における増殖抑制実験では著明な増殖抑制効果を得ることができたが、免疫不全マウスにおける Xenograft モデルでは明らかな増殖抑制効果を得ることができなかった。次に我々は、胃癌臨床検体(Intestinal-type18 検体および Diffuse-type GC12 検体、非癌胃粘膜 6 検体)を用いたマイクロアレイ解析の結果から NEDD1 を選択した。NEDD1 は分裂中期において微小管重合の際に必要な gamma-tubulin ring complex 形成に必要なタンパクで正常胃粘膜での

発現は認められず胃癌細胞において高頻度に aberrant expression が認められる。さらにヒト全身組織では精巣において発現が認められるのみで、有力な治療標的遺伝子と考えられた。

そこで胃癌を標的とした NEDD1siRNA を用いた in vitro における増殖抑制効果を確認したのち、腹膜播種マウスモデル治療実験を行った。その結果、NEDD1siRNA 腹腔内投与群ではコントロール群に比べて有意な腫瘍増殖抑制効果(14days: $p=0.04$ 、21days: $p=0.034$)ならびに生存期間の延長を得ることができた(61 ± 2 vs 49 ± 6 days, $p=0.0115$)。さらに、マウス行動観察ならびにモデルマウス採血により得られた血液生化学所見では肝機能(AST、LDH、ALP)および腎機能(BUN、Cre)においてモデルマウスの治療による明らかな副作用は認められなかった。

[考察]

びまん性胃癌は高率に腹膜へ臓器特異的に転移・再発を来す。したがって腹膜におけるコントロールは治療成績に大きなインパクトをもたらすと考えられる。

RNA 干渉の発見によって遺伝子治療の分野は劇的な変化を迎えた。しかし siRNA は生体内では nuclease によって容易に分解されることから、siRNA 治療の成功の可否はそのデリバリー効率に大きく依存している。特に腹腔内腫瘍細胞に対する有効なデリバリーシステムは未だ確立されていない。我々は DharmaFECT によるリポソームパッケージングを行った後 atelocollagen による slow release を可能とすることでこれまで困難であった腹腔内癌細胞への効率的な標的遺伝子に対する delivery システムを構築することができた。

現在腹膜播種に対してタキサン系抗がん剤の腹腔内投与の有効性が報告されているが、骨髄抑制・脱毛をはじめ多くの副作用が報告されている。我々の標的とした NEDD1 ではタキサン系抗がん剤同様、微小管の重合阻害をターゲットとしつつ、副作用を抑えた局所に対する理想的な分子標的治療システムを確立することが可能であった。

[結論]

NEDD1 を標的とした siRNA の腹腔内投与はスキルス胃癌モデルマウスにおいて腹膜播種結節の増殖抑制効果をもたらす生存期間を有意に延長させた。また、本研究における腹腔内デリバリーシステムは他の候補遺伝子を標的とした応用が可能で胃癌腹膜播種治療プラットフォームとして非常に有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

びまん性胃癌(DGC)は病理学的に、腺管構造を形成せず個細胞性に胃壁に広範な浸潤増殖を呈する悪性度の高い癌である。このような浸潤形態に加えて DGC は高頻度に腹膜播種転移を来し、現在のところ有効な治療法がなく予後は極めて不良である。申請者はこの DGC の腹膜への臓器特異性に着目し、胃癌細胞株より樹立した高腹膜播種細胞株を用いたマウスモデルを作成した、この系を用いて、従来このがんで活性化しているシグナル経路のひとつである、細胞分裂中期の調節タンパクである NEDD1 をとあげた。さらに、デリバリー法にも工夫をこらし NEDD の siRNA の Atelocollagen/DharmaFECT を用いた腹腔内デリバリーの有効性について検討した。

申請者は DGC の形質をより反映していると考えられる細胞株 HSC-60 を選択し、さらにこの細胞株をマウスの腹腔内で6代継代することによって高腹膜播種亜株 60As6を得た。RT-PCR で 60As6 は親株 HSC-60 同様 Hedgehog 経路および上皮間葉系変換経路を保持していることを確認した。

60As6 は免疫不全マウスの腹腔内への注入によって容易に腹膜播種をきたし、親株 HSC-60 に比べて早期にマウスを死に至らしめる。この細胞を用い、NEDD1siRNA を用いた *in vitro* における増殖抑制効果を確認したのち、腹膜播種マウスモデルで治療実験を行った。その結果、NEDD1siRNA 腹腔内投与群ではコントロール群に比べて有意な腫瘍増殖抑制効果 (14days: $p=0.04$ 、21days: $p=0.034$) ならびに生存期間の延長を得ることができた (61 ± 2 vs 49 ± 6 days、 $p=0.0115$)。さらに、マウス行動観察ならびにモデルマウス採血により得られた血液生化学所見では肝機能 (AST、LDH、ALP) および腎機能 (BUN、Cre) においてモデルマウスの治療による明らかな副作用は認められなかった。これらの結果から、申請者はこのモデルを最終的にはヒト腹膜播種への治療に貢献するものと考えている。

以上により、本論文は博士(医学)の学位の授与にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者 主査 梶村 春彦
副査 浦野 哲盟 副査 平川 聡史