

論文内容の要旨

論文提出者氏名 藤井 秀岳

論文題目

Cycloamylose-Nanogel DDS-mediated intratumor silencing of the vascular endothelial growth factor regulates neovascularization in tumor microenvironment.

論文内容の要旨

siRNA を用いた RNAi 法は、特定の遺伝子を効率よく抑制でき、その設計が安価で簡便であり、汎用性が高いため様々な分野での基礎研究や創薬開発に広く利用されている。しかし、siRNA の生体組織への投与方法や投与された siRNA の生体内での安全性については未だ不明な点も多いため、siRNA を利用した癌遺伝子治療の実用化に至っていない。安全で副作用のない siRNA 投与方法を確立するために、生体適合性物質からなる DDS キャリアーの開発が課題であった。そこで申請者らは、サイクロアミロース（多糖）にスぺルミン基とコレステロール基を付加したナノサイズのゲル、CH-CA-Spe nanogel を開発し、VEGF-A に特異的な siRNA (siVEGF) との複合体をマウス腎癌皮下移植モデルの腫瘍組織内に投与することによって、抗腫瘍効果と腫瘍免疫への影響について検討することを本研究の目的とした。

申請者らはまず、Renca 細胞に蛍光標識された siRNA (FAM-siRNA) と nanogel の複合体を添加し、3 または 7 時間後に siRNA の細胞内局在を共焦点蛍光顕微鏡にて検討したところ、ライソソームへの siRNA の局在は、cationic liposome 群に比べて、nanogel 群において増加していた。つまり siRNA/nanogel complex がライソソーム経路を経て腫瘍細胞に取り込まれることが明らかとなった。さらに、Renca 細胞内における VEGF-A の発現は遺伝子レベルとタンパクレベルの両方で有意に抑制されていた。また、マウスの他癌腫(膀胱癌:MBT-2、

メラノーマ:B16) やヒト腎癌細胞株 (786-0、ACHN) においても CH-CA-Spe nanogel は siVEGF を腫瘍細胞へ効果的に導入できることが確認された。

次にマウス腎癌皮下移植モデルの腫瘍内に FITC-siRNA/nanogel 複合体を投与したところ、腫瘍組織内に FITC-siRNA が移行しており、標的遺伝子である VEGF-A 発現の抑制が認められ、FITC-siRNA/nanogel 複合体による腫瘍組織内の標的遺伝子ノックダウン効果が確認された。さらに、4 日毎合計 5 回の連続投与によって、皮下移植腫瘍の増殖と血管新生が有意に抑制された。

抗血管新生療法は、腫瘍組織のみならず循環血中に増加する CD11b⁺Gr-1⁺細胞である MDSC (骨髄由来抑制細胞) や炎症性サイトカインの産生を抑制することが知られているが、担癌宿主での MDSC 誘導や炎症性サイトカインの産生における VEGF-A の関与については十分に理解されていない。そこで、腫瘍組織からの VEGF-A 産生の抑制が MDSC の誘導を阻止できるか否かについて検討したところ、siVEGF/nanogel 複合体の腫瘍内投与は、コントロール群に比べて有意に MDSC の出現を抑制した。また、Cytometric Bead Array (CBA) にて、IL-17A 産生も有意に低下していることが確認された。

以上の結果より、siVEGF/nanogel 複合体の腫瘍内投与は siVEGF を腫瘍細胞に送達し、腫瘍組織の VEGF-A 発現を有意に抑制し、腫瘍増殖の抑制と腫瘍増殖に伴い出現する免疫抑制の解除に結びついていることが明らかとなった。CH-CA-Spe nanogel は、生体適合性分子から成る合成化合物であるため、リボソームやポリマーなどの合成化学物質やアテロコラーゲン (他の動物種由来) などの既存の DDS に比べて、生体組織への毒性が少なく、サイズ、構造、表面修飾を自在に変えることも可能であり、生体組織への遺伝子導入の課題 (安全性、導入効率、ターゲティングなど) が克服できることが期待される。さらに本研究の結果から、抗 VEGF 療法と免疫療法の併用という新しい癌治療法の開発に繋がると考えられた。